

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische
Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor Univ.-Prof. Dr. J.W. Fischer

Einfluss einer pharmakologischen Thrombin-Inhibition
auf die Morphologie und Inflammation des Fettgewebes
in Mausmodellen der akzelerierten Atherosklerose, des
Übergewichtes und des Diabetes mellitus

Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Birte Valentin

2020

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Ich bin manchmal rund, manchmal eckig;
Mal gefüllt und auch mal leer;
Ich puffere und gebe Stabilität;
Und trage ab und zu ein Krönchen.
Wer bin ich?

Zusammenfassung

Das pandemische Auftreten von Übergewicht und Adipositas geht mit einer erhöhten Inzidenz von metabolischen Erkrankungen einher. In der Klinik ist das metabolische Syndrom als tödliches Quartett aus Adipositas, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2 und Hyperlipidämie bekannt. Der kontinuierliche Anstieg des Auftretens der vier Diagnosen, die in das metabolische Syndrom einfließen, stellt für das Gesundheitssystem ein wachsendes Problem hinsichtlich Folgeerkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) oder Myokardinfarkten dar, die auch eine große volkswirtschaftliche Bedeutung haben. Unter der Entwicklung einer Adipositas konnte auch eine Disposition für eine verstärkte Gerinnung gezeigt werden; aus diesem Grund rückte der prothrombotische Faktor Thrombin in den Fokus der aktuellen Forschung. Ebenso ist bekanntermaßen eine chronische Entzündung des viszeralen Fettgewebes ein begünstigender Faktor für die Entstehung von Atherosklerose.

In dieser Dissertation konnte anhand eines diabetischen Adipositas-Mausmodells (*LepR^{db/db}*, Leptin-Rezeptor-Defizienz) ein positiver Einfluss der direkten Thrombin-Inhibitoren Argatroban und Dabigatran auf inflammatorische Prozesse im viszeralen Fettgewebe nachgewiesen werden. Neben vergleichbar antiinflammatorischen Effekten auf das Fettgewebe in einem murinen Modell der akzelerierten Atherosklerose (*Ldlr^{-/-}*, LDL-Rezeptor-Defizienz) wurde zudem ein atheroprotektiver Effekt von Argatroban auf die Entwicklung atherosklerotischer Plaques im Aortenursprung gezeigt.

Darüber hinaus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit im viszeralen Fettgewebe der *Ldlr^{-/-}*-Mäuse das Phänomen des *beigings*, also der Umwandlung von weißem in braunes Fettgewebe, durch eine Thrombin-Inhibition beobachtet. Bisher wurden Thrombin-Inhibitoren nicht als *browning-agents* beschrieben.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit positive Effekte des Thrombin-Inhibitors Argatroban auf die Fettgewebsinflammation, die weiter im Tiermodell und in klinischen Studien untersucht werden sollten. Eine positive Beeinflussung der Entstehung von atherosklerotischen Plaques und der Limitation von Entzündungsprozessen durch eine Thrombin-Inhibition könnte eine zukünftige Behandlungsstrategie des metabolischen Syndroms und seiner Folgen darstellen.

Abstract

The pandemic occurrence of overweight and obesity is associated with an increased incidence of metabolic diseases. In clinical practice, the metabolic syndrome is known as a deadly quartet of obesity, arterial hypertension, type 2 diabetes mellitus and hyperlipidemia. The continuous increase in the incidence of the four diagnoses that are included in the metabolic syndrome represents a growing problem for the health care system with regard to secondary diseases such as coronary heart disease (CHD), peripheral arterial occlusive disease (PAOD) or myocardial infarction, which are also of great economic importance. Under the development of obesity, a predisposition to increased coagulation could also be demonstrated; for this reason, the prothrombotic factor thrombin became the focus of current research. It is also known that chronic inflammation of the visceral fat tissue is a favourable factor for the development of atherosclerosis.

In this dissertation, a diabetic mouse model of obesity (*LepR^{db/db}*, leptin receptor deficiency) showed a positive influence of the direct thrombin inhibitors Argatroban and Dabigatran on inflammatory processes in visceral fat tissue. In addition to comparable antiinflammatory effects on fat tissue in a murine model of accelerated atherosclerosis (*Ldlr^{-/-}*, LDL-receptor deficiency), an atheroprotective effect of Argatroban on the development of atherosclerotic plaques in aortic origin was shown.

In addition, the present study observed the phenomenon of beigeing, i.e. the conversion of white into brown fat tissue, by thrombin inhibition in the visceral fat tissue of *Ldlr^{-/-}* mice. So far, thrombin inhibitors have not been described as browning agents.

In summary, the results of this work show positive effects of the thrombin inhibitor argatroban on fat tissue inflammation, which should be further investigated in animal models and clinical studies. A positive influence of thrombin inhibition on the development of atherosclerotic plaques and the limitation of inflammatory processes could be a potential future treatment strategy for metabolic syndrome and its consequences.

Abkürzungsverzeichnis

ABI	<i>ankle brachial Index</i> , Knöchel-Arm-Index
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AgRP	<i>agouti-related peptide</i>
ATIII	Antithrombin III
BMI	<i>body mass index</i> , Körpermasseindex
BSA	Bovines Serumalbumin
CART	Kokain- und Amphetamin-regulierte Transkript
CLS	<i>crown-like structures</i>
Con	Kontrolle
CD	<i>cluster of differentiation</i>
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
EtOH	Ethanol
FG	Fettgewebe
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
GLUT	Glucose-Transporter
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HIT 2	Heparin induzierte Thrombozytopenie Typ 2
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
<i>Ldlr</i>	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LE	Lungenembolie
MAC2	Galektin-3
MCP1	<i>monocyte chemoattractant protein 1 (CCL-2)</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MeOH	Methanol
min	Minuten

NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
PAF	<i>platelet activating factor</i> , Thrombozyten-aktivierenden Faktoren
PAR	Protease-aktivierter-Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PKC	Proteinkinase C
PLT	<i>platelets</i> , Thrombozyten
POMC	Proopiomelanocortin
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-activated rezeptor γ</i>
RBC	<i>red blood cells</i> , Erythrozyten
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SRA	<i>scavenger receptor A</i>
TB	Tris-Borat Puffer
TF	<i>tissue factor</i>
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TVT	Tiefe Venenthrombose
UCP-1	<i>uncoupling protein 1</i> , Thermogenin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
sWAT	Subkutanes weißes Fettgewebe
vWAT	Viszerales weißes Fettgewebe
vWF	von-Willbrand-Faktor
WBC	Weißer Blutzellen

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
Abkürzungsverzeichnis	3
Inhaltsverzeichnis	5
1 Einleitung	1
1.1 Entwicklung und klinische Relevanz von Adipositas und Adipositas-bedingten Folgeerkrankungen	1
1.2 Das Fettgewebe	3
1.2.1 Aufbau und Zusammensetzung	3
1.2.2 Browning und Whitening.....	4
1.2.3 Das Fettgewebe als endokrines Organ.....	5
1.2.4 Adipositas und Entzündung im Fettgewebe.....	6
1.3 Adipositas und Diabetes mellitus	8
1.3.1 Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2	8
1.4 Atherosklerose	8
1.4.1 Aufbau der Arterienwand.....	9
1.4.2 Atherogenese.....	9
1.4.3 Adipositas und Atherogenese.....	10
1.5 Thrombin	12
1.5.1 Adipositas und eine verstärkte Thrombingenerierung	13
1.5.2 Die Wirkung von Thrombin auf Protease-aktivierte Rezeptoren	13
1.5.3 PAR-vermittelte Wirkungen von Thrombin im Fettgewebe.....	14
1.5.4 Physiologische Thrombinhemmung.....	15
1.5.5 Pharmakologische Thrombinhemmung	15
1.6 Ziel der Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Substanzen	17
2.2 Puffer und Lösungen	17
2.3 Erstantikörper	18
2.4 Zweitantikörper	18
2.5 Geräte und Material	19
2.6 In vivo Experimente im Mausmodell	20
2.6.1 Mauslinien und Behandlung	20
2.7 Histologische Aufarbeitung des Gewebes	21
2.8 Färbeschema der aortalen Ursprünge	23

2.9	Immunhistochemische Färbungen	23
2.9.1	MAC2 Färbung	23
2.9.2	HE Färbung.....	24
2.9.3	Kollagen Färbung.....	24
2.9.4	Biglykan Färbung	25
2.9.5	Öl Rot O Färbung und Präparation.....	25
2.9.6	UCP-1 Färbung	26
2.10	Auswertung	27
2.10.1	Gewicht, Körperlänge, BMI, Cholesterin	27
2.10.2	Auswertung mit <i>Fiji</i>	27
2.10.3	Viszerales Fettgewebe	29
2.10.4	Aortaler Ursprung.....	30
2.10.5	Aorten	31
2.11	Statistische Auswertung	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Die Effekte einer Thrombin-Inhibition im Adipositasmodell (<i>LepR^{db/db}</i>-Tiere)	32
3.1.1	Einfluss einer Thrombin-Inhibition mittels Argatroban oder Dabigatran auf das Gewicht in <i>LepR^{db/db}</i> -Tieren	32
3.1.2	Einfluss auf die Adipozytenmorphologie in <i>LepR^{db/db}</i> -Tieren	33
3.1.3	Crown like structures in <i>LepR^{db/db}</i> -Tieren.....	36
3.2	Die Effekte einer Thrombin-Inhibition im atherosklerotischen Mausmodell (<i>Ldlr^{-/-}</i>-Tiere)	37
3.2.1	Einfluss einer Thrombin-Inhibition auf das Gewicht in <i>Ldlr^{-/-}</i> -Tieren unter Argatrobanbehandlung	37
3.2.2	Einfluss auf die Adipozytenmorphologie im <i>Ldlr^{-/-}</i> -Modell	37
3.2.3	Crown like structures in <i>Ldlr^{-/-}</i> -Tieren	39
3.2.4	Lipidprofil in <i>Ldlr^{-/-}</i> -Tieren.....	40
3.2.5	Blutzellzusammensetzung in <i>Ldlr^{-/-}</i> -Tieren	41
3.2.6	Atherosklerotische Läsionen unter Einfluss einer Thrombin-Inhibition in <i>Ldlr^{-/-}</i> -Tieren.....	42
3.2.7	Einfluss einer Thrombin-Inhibition auf das <i>beiging</i> in <i>Ldlr^{-/-}</i> -Tieren unter Argatrobanbehandlung	46
4	Diskussion	50
4.1	Schlussfolgerung	50
4.2	Das <i>LepR^{db/db}</i>-Modell unter Thrombin-Inhibition	50
4.2.1	Einfluss auf die Adipozytenmorphologie im <i>LepR^{db/db}</i> -Modell	50
4.2.2	Crown-like structures im <i>LepR^{db/db}</i> -Modell	52
4.3	Das <i>Ldlr^{-/-}</i>-Modell unter Thrombin-Inhibition	52
4.3.1	Einfluss auf die Adipozytenmorphologie im <i>Ldlr^{-/-}</i> -Modell	52
4.3.2	Crown like structures im <i>Ldlr^{-/-}</i> -Modell	53

4.4	Atherogenese unter Thrombin-Inhibition im <i>Ldlr</i>^{-/-}-Modell.....	55
4.4.1	Lipidprofil und Blutzellzusammensetzung im <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Modell	56
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	59
6	Anhang.....	66
6.1	Tabellenverzeichnis	66
6.2	Abbildungsverzeichnis	66

1 Einleitung

1.1 Entwicklung und klinische Relevanz von Adipositas und Adipositas-bedingten Folgeerkrankungen

Die Prävalenz der Adipositas hat sich weltweit zwischen den Jahren 1980 mit 6,4 % und 2008 mit 12 % fast verdoppelt. Weltweit sind über 34,4 % der Erwachsenen übergewichtig (*body mass index* (BMI) ≥ 25 kg/m²) und 12 % adipös (BMI ≥ 30 kg/m²)¹. In Deutschland zeigt sich ebenfalls ein zunehmender Trend zu Übergewicht (BMI ≥ 25 kg/m²). Ein Fünftel der Bewohner Deutschlands sind adipös (BMI ≥ 30 kg/m²)².

Die Gründe für die steigende Prävalenz können ein westlicher Lebensstandard durch veränderte Lebens- und Ernährungsgewohnheiten sein, die zu einem Ungleichgewicht von Kalorienzufuhr und -verbrauch führen³. Eine Fehlernährung mit fett- und zuckerhaltigen Nahrungsmitteln, Essstörungen, Bewegungsmangel, endokrine Erkrankungen, Medikamente und Stress sind Risikofaktoren für die Entwicklung von Übergewicht und einem adipösen Phänotyp².

Mit Übergewicht und Adipositas geht eine verstärkte Anfälligkeit für kardiometabolische Erkrankungen einher. Dies hängt damit zusammen, dass unter einem adipösen Phänotyp das Gleichgewicht der Adipokin-Sekretion durch das viszerale Fettgewebe gestört und zugunsten proinflammatorischer Adipokine verlagert wird. Es kommt zu einer chronischen Entzündung des viszeralen Fettgewebes. Eine zentrale Rolle spielen hierbei die erhöhten Spiegel der proinflammatorischen Adipokine Resistin und Leptin und zugleich die Reduktion des antiinflammatorischen Adiponektins. Leptin und Resistin fördern als proinflammatorische Adipokine Entzündungsprozesse, Insulinresistenz, Dyslipidämie und Atherogenese. Hingegen hat das antiinflammatorische Adipokin Adiponektin einen protektiven Effekt auf das Gefäßendothel, die beteiligten Makrophagen bei der Plaqueentstehung und damit auf die Entstehung von Plaques. Zusätzlich wirkt es einer Insulinresistenz entgegen, sodass bei einer verminderten Adiponektin Sekretion unter einem adipösen Phänotyp eine Insulinresistenz und damit die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 begünstigt wird.

Unter einem adipösen Phänotyp konnte eine gesteigerte Prädisposition für eine verstärkte Gerinnung beobachtet werden, insbesondere kam es zu einer vermehrten Bildung von Thrombin^{4,5}. Ein vermehrtes Vorkommen von Thrombin fördert die Plaqueentstehung und damit kardiovaskuläre Erkrankungen unter adipösen Bedingungen⁶.

Aus diesen Gründen ist bei übergewichtigen Patienten das Risiko für eine koronare Herzkrankheit (KHK) um 20 % und bei adipösen Patienten um 50 % erhöht². Ebenfalls

steigt bei Übergewicht das Risiko für einen Myokardinfarkt ⁷ und das Auftreten einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) ⁸.

Die Kombination verschiedener chronisch-metabolischer Erkrankungen bestehend aus stammbetonter Adipositas, Insulinresistenz, Dyslipoproteinämie und arterieller Hypertonie, ist das metabolische Syndrom. Ätiologisch für die endokrinen Störungen des Zuckerstoffwechsels gilt das oben bereits erwähnte Zusammenspiel aus einer peripheren Insulinresistenz und chronischer Inflammation im Fettgewebe ⁹. Die Insulinresistenz führt nicht nur zu einer Hyperglykämie sondern auch zu erhöhten Triglyzeriden-Spiegeln im Blut, gehemmter Lipolyse und führt durch die Hyperinsulinämie über eine Natriumretention zu einer arteriellen Hypertonie ¹⁰. Da die Erkrankung lange symptomlos bleibt und in frühen Stadien nur anhand von Laborwerten diagnostiziert werden kann, wird sie oft erst in späten klinischen Stadien entdeckt. Als Langzeitfolgen des metabolischen Syndroms treten Atherosklerose, Diabetes mellitus Typ 2 und kardiovaskuläre Komplikationen wie Apoplex, arterielle Hypertonie und Myokardinfarkt auf ⁹. Den kausalen Therapieansatz für das metabolische Syndrom stellt eine Kombination aus Gewichtsreduktion, ausgewogener, energiereduzierter Ernährung und regelmäßiger sportlicher Aktivität dar ¹¹.

Über die gesundheitlichen Aspekte hinaus sind Adipositas und das metabolische Syndrom von großem volkswirtschaftlichem Interesse. In den letzten Dekaden stieg die Prävalenz dieser Erkrankungen stetig an, so dass 2014 ca. 30 % der Weltbevölkerung übergewichtig oder adipös waren. Bei gleichbleibendem Anstieg könnten bis 2030 ca. 50 % der Weltbevölkerung betroffen sein ¹². Diese Entwicklung wird in der Zukunft eine große Herausforderung für unser Gesundheitssystem darstellen.

1.2 Das Fettgewebe

1.2.1 Aufbau und Zusammensetzung

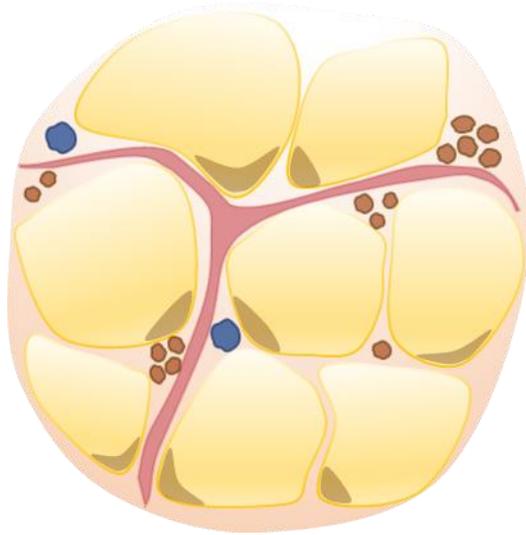


Abbildung 1 Weißes Fettgewebe

Schematischer Aufbau des weißen Fettgewebes. Charakteristisch ist die univakuoläre Struktur mit randständigem Zellkern. In braun sind Makrophagen, in blau Immunzellen und in rot ein Gefäß schematisch dargestellt.

Das Fettgewebe stammt von mesenchymalen Stammzellen ab und gehört dem Bindegewebe an ¹³. Es wird zwischen univakuolärem weißem (WAT), plurivakuolärem beigen und plurivakuolärem braunen (BAT) Fettgewebe unterschieden. Das WAT wird nochmals in subkutanes (sWAT) und viszerales (vWAT) weißes Fettgewebe unterteilt. Das sWAT erfüllt dabei eine Isolierfunktion und verhindert Wärmeverluste des Körpers. Hingegen umschließt das vWAT innere Organe und erfüllt hier eine Polster-, Stütz- und Schutzfunktion ¹⁴.

Die Hauptfunktion des WAT ist die Speicherung und Bereitstellung von Energie. Zudem ist WAT das größte endokrine Organ des Körpers. WAT beeinflusst durch seine endokrine Funktion metabolische Prozesse, wie z.B. die Nahrungsaufnahme, den Blutdruck, die Plaquentstehung und wirkt auf das Immunsystem ein ¹⁵. So enthält WAT neben Adipozyten auch Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und zusätzlich Stammzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Präadipozyten und vaskuläre Zellen ¹⁶ (**Abbildung 1**). Nur etwa 40 % der Zellen im WAT sind Adipozyten, die jedoch über 90 % des Volumens ausmachen ¹⁷.

Unter einer Nahrungskarenz kommt es durch eine gesteigerte Lipolyse im WAT zur Sekretion von unveresterten Fettsäuren (*non-esterified fatty acids*, NEFA). NEFA hemmen über einen negativen Feedback-Mechanismus die Glukoseaufnahme in die Adipozyten und bewirken in der Leber eine gesteigerte Lipolyse, wodurch die Versorgung von Nervenzellen und Erythrozyten mit Glucose aufrechterhalten bleibt ¹⁸. Somit führt eine Nahrungskarenz über eine gesteigerte Lipolyse zu einer Abnahme des Adipozytenvolumens, die Adipozytenanzahl bleibt hingegen unverändert ¹⁶.

1.2.2 Browning und Whitening

Das BAT ist ein hochspezialisiertes Fettgewebe, das viele Mitochondrien aufweist und durch Entkopplung der Atmungskette mittels Thermogenin (UCP-1) Wärme erzeugen kann¹⁶. Es findet sich bevorzugt interskapulär und perirenal¹⁴. Braunes Fettgewebe ist verstärkt bei Säuglingen und Kleinkindern zu finden und schützt vor Wärmeverlusten^{19,20}.

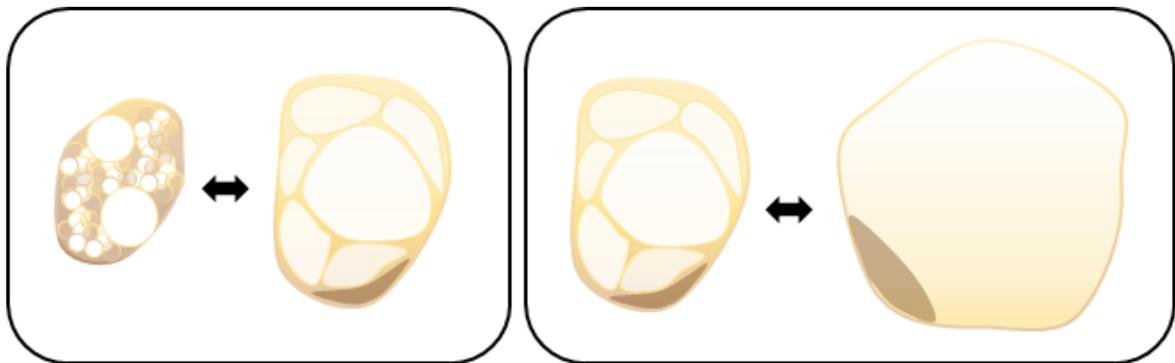


Abbildung 2 *browning* und *whitening*

Schematische Darstellung von *whitening* und *browning* (von links nach rechts dargestellt: brauner Adipozyt, beiger Adipozyt, beiger Adipozyt, weißer Adipozyt).

Das beige Fettgewebe wurde innerhalb des WAT entdeckt¹⁴. Im beigen Fettgewebe umgeben kleinere Fettvakuolen größere Fetttropfen. Beige Fettzellen exprimieren ebenfalls UCP-1, jedoch im geringeren Maße als BAT²¹.

Durch Kältestimulation kann WAT in beiges Fettgewebe umgewandelt werden. Dieser Prozess wird in der Literatur „*browning*“ genannt¹⁴. Nach stattgefundenener Kältestimulation gehen die beigen Fettzellen wieder in WAT über. Dieser Prozess wird als „*whitening*“ bezeichnet²². Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sowohl „*browning*“ als auch „*whitening*“ reversible Umgebungstemperatur-abhängige Prozesse sind (**Abbildung 2**).

Liegt eine positive Energiebilanz (vermehrte Kalorienzufuhr, weniger physische Aktivität) vor, findet eine Umstrukturierung und Veränderung der Zellzusammensetzung des WAT statt. Der Körper versucht, das Kalorienüberangebot vermehrt in Form von Fett zu speichern. Bereits existierende weiße Adipozyten hypertrophieren durch Lipogenese, bis sie eine kritische Grenze erreichen. Ab dieser Grenze werden Präadipozyten zur Proliferation und Differenzierung angeregt, die Angiogenese wird im Fettgewebe verstärkt und es werden vermehrt proinflammatorische Mediatoren ausgeschüttet^{23,24}.

1.2.3 Das Fettgewebe als endokrines Organ

Durch die große Anzahl der von Adipozyten sezernierten Adipokine wird deutlich, dass das Fettgewebe nicht nur zur Speicherung von Energie und für die Thermoregulation zuständig²³, sondern zusätzlich das größte endokrine Organ des Körpers ist. Über die autokrine, parakrine als auch endokrine Wirkung der Adipokine kann das Fettgewebe metabolische Prozesse und immunologische Funktionen beeinflussen.

Adipokine wie Leptin, Adiponektin, Retinol-bindendes Protein 4, *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1) und Resistin interagieren sowohl mit zentralen als auch peripheren Organen, wie zum Beispiel dem Gehirn, der Leber, dem Pankreas und dem Skelettmuskel. Dadurch können Nahrungsaufnahme, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, Blutdruck, Gerinnungssystem und Entzündungen beeinflusst werden^{25,26}.

Unterschieden wird zwischen proinflammatorischen Adipokinen, wie Resistin und Leptin und antiinflammatorischen Adipokinen, wie Adiponektin.

Bei einer gesteigerten Hypertrophie von Adipozyten, wie sie unter einem adipösen Phänotyp auftritt, kommt es zu einer vermehrten Produktion der proinflammatorischen Adipokine Leptin und Resistin und zu einer verminderten Produktion des antiinflammatorischen Adipokins Adiponektin.

Das proinflammatorische Adipokin Resistin wurde im Jahr 2001 entdeckt. Im Mausmodell sind erhöhte Plasma Resistin-Spiegel unter Diät-induzierten adipösen Phänotypen mit einer Insulinresistenz vergesellschaftet. Die Insulinsensitivität der Mäuse erhöhte sich bei Zugabe eines Anti-Resistin-Antikörpers und andersherum entwickelten gesunde Mäuse unter Resistingabe eine Insulinresistenz. Über die Aktivierung des NFκB-Signalweges fördert Resistin zudem proinflammatorische Prozesse und erhält so die Entzündungsreaktion im Fettgewebe aufrecht²⁷.

Ein weiteres proinflammatorisches Adipokin ist das Proteohormon Leptin, das eine wichtige Rolle in der Nahrungsaufnahme und dem Energieumsatz spielt²⁸. Leptin-Rezeptoren sind auf Neuronen der Kerngebiete des *Nucleus arcuatus* und des *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus exprimiert. Die Neuronengruppe des *Nucleus arcuatus* schüttet die appetitstimulierenden Neuropeptide *agouti-related peptide* (AgRP) und Neuropeptid Y (NPY) aus. Hingegen produziert die Neuronengruppe des *Nucleus paraventricularis* das Proopiomelanocortin (POMC) und das Kokain- und Amphetamin-regulierte Transkript (CART), die durch Leptin proteolytisch aktiviert werden und appetitzügelnd wirken²⁹.

Liegen im Organismus erhöhte Leptinspiegel vor, bindet Leptin an den Leptin-Rezeptor der Neuronengruppe des *Nucleus arcuatus* und unterdrückt so die Ausschüttung der appetitstimulierenden Neuropeptide AgRP und NPY. Gleichzeitig können POMC und CART durch Leptin aktiviert werden und ihre appetitzügelnde Wirkung ausüben. Der Leptinspiegel sinkt, wenn dem Organismus wenig Nahrung und wenige Energiereserven zur Verfügung

stehen. Daraufhin wird die Ausschüttung der appetitstimulierenden Neuropeptide AgRP und NPY gefördert und POMC und CART werden nicht aktiviert. Liegen niedrige Leptin-Spiegel vor, so kommt es zu einem vermehrten Hungergefühl und zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme^{30,31}.

Neben der Beeinflussung des Appetits und des Hungergefühls führt Leptin durch die Stimulation des sympathischen Nervensystems zu einer Erhöhung des Blutdruckes und durch eine Entkopplung der Atmungskette zu einer gesteigerten Thermogenese^{32,33}.

Adipöse Patienten weisen meist durch eine erworbene Leptin-Resistenz erhöhte Leptin-Spiegel auf³⁴. Damit einhergehend fallen die protektiven Leptin-Wirkungen weg, sodass es vermehrt zu einer Insulinresistenz, Dyslipidämie und erhöhten Glukosekonzentrationen im Blut kommt³⁵.

Das Peptidhormon Adiponektin ist ein antiinflammatorisches Adipokin, dem ein protektiver Effekt für das Auftreten eines Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas, kardiovaskulärer Erkrankungen und einer Erhöhung der Insulinsensitivität zugesprochen wird. Dieser protektive Effekt wird unter anderem durch eine verminderte Glukoneogenese in der Leber und eine erhöhte Oxidation von Fettsäuren im Muskel vermittelt³⁶⁻⁴⁰.

Ebenfalls können die im Fettgewebe ansässigen Makrophagen über die Sekretion von Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin 6 (IL6) parakrin den Adipozytenstoffwechsel beeinflussen. Bei Adipositas ändert sich die Adipokinsekretion der Adipozyten und die Zytokinsekretion der Makrophagen, was zu folgenschweren Schäden wie z.B. dem metabolischen Syndrom, Diabetes mellitus Typ 2, Autoimmunerkrankungen und Gefäßerkrankungen, wie KHK führen kann²⁶.

1.2.4 Adipositas und Entzündung im Fettgewebe

Unter adipösen Bedingungen kommt es im Fettgewebe auf zellulärer und molekularer Ebene zu Veränderungen, die zu einer Hypertrophie, Hyperplasie, Infiltration von Monozyten, einer Rarifizierung von neuronalen Strukturen und Gefäßen und einer verstärkten Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren führen^{41,42}. Dass Immunzellen für die Biologie des Fettgewebes eine große Rolle spielen, spiegelt sich durch eine gesteigerte Sekretion von TNF α und anderer Zytokine bei einem adipösem Phänotyp wieder^{16,43}.

Im adipösen Zustand wandern Makrophagen, durch MCP1 und Apoptose angelockt, vermehrt in das Fettgewebe ein. Dort polarisieren sich die eingewanderten Makrophagen vermehrt zu proinflammatorischen CD11c+ M1-polarisierten Makrophagen (in der weiteren Arbeit als M1 Makrophagen bezeichnet)⁴⁴. Diese sezernieren TNF α , was in Kombination mit der verstärkten Freisetzung von freien Fettsäuren die Entwicklung einer Insulinresistenz begünstigt, die eine verminderte Glukoseaufnahme in das Gewebe und eine steigende

Blutglukosekonzentration zur Folge hat ^{18,45}. Neben der Entwicklung einer Insulinresistenz erhöht sich der Plasmaspiegel an freien Fettsäuren, wodurch der NF κ B Signalweg in der Leber stimuliert wird, was wiederum zu einer vermehrten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie auch MCP1 führt ^{46,47}.

Im Fettgewebe finden sich Immunzellen, wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten, Mastzellen, B- und T-Lymphozyten und Makrophagen ^{16,40}.

Es können sich sowohl CD86+ M1-Makrophagen als auch antiinflammatorische CD206+ M2-Makrophagen (in der weiteren Arbeit als M2 Makrophagen bezeichnet) im Fettgewebe ansiedeln. Derzeit werden zwei Thesen diskutiert, wie es zu einer vermehrten Akkumulation von M1 Makrophagen im Fettgewebe unter einem adipösen Phänotyp kommt. Die erste These diskutiert, dass unter adipösen Bedingungen vermehrt Ly-6C^{hi}CCR2⁺ Makrophagen zirkulieren, die sich unter inflammatorischen Bedingungen zu M1 Makrophagen weiterentwickeln. Eine andere These geht von der Möglichkeit der Makrophagenpolarisation der im Fettgewebe vorhandenen Makrophagen von M2 Makrophagen zu M1 Makrophagen unter adipösen Bedingungen aus ⁴⁴. Weisberg *et al.* fanden heraus, dass diese M1 Makrophagen den Großteil der im Fettgewebe gebildeten Entzündungsfaktoren wie TNF α , IL6 und iNOS produzieren ⁴⁰.

Über 90% aller Makrophagen im Fettgewebe finden sich um apoptotische Adipozyten und stellen sich histologisch als „*crown-like structures*“ (CLS) dar (**Abbildung 3**).

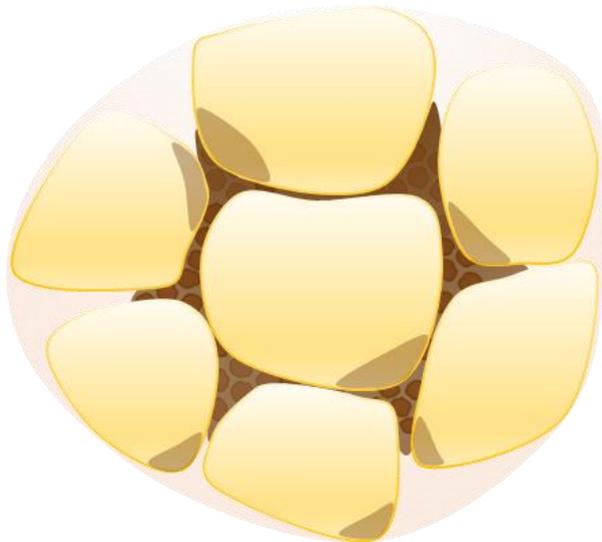


Abbildung 3 *crown-like structures*

Schematische Darstellung von *crown-like structures* (CLS, braun) im viszeralem Fettgewebe. CLS bestehen aus Makrophagen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen apoptotischen Adipozyten und einem adipösen Phänotyp besteht und bis zu 15-fach mehr Makrophagen unter adipösen Zuständen im Fettgewebe zu finden sind. Unter diesen Umständen steigen auch die TNF α -Spiegel an ⁴⁸. Weiterhin findet sich unter adipösen Zuständen eine verringerte Anzahl von regulatorischen T-Zellen, die zum Beispiel Makrophagen inhibieren können ⁴⁹.

1.3 Adipositas und Diabetes mellitus

Derzeit existieren verschiedene Thesen für den Zusammenhang des molekularen Pathomechanismus hinter der Entwicklung eines Diabetes mellitus unter einem adipösen Phänotyp.

Zum einen wird die oben beschriebene chronische Entzündung im Fettgewebe und damit einhergehende veränderte Adipokin- und Zytokinsekretion durch Adipozyten und Entzündungszellen als ursächlich für die Entstehung einer Insulinresistenz beschrieben. Durch die Verlagerung der Adipokin-Sekretion zugunsten der proinflammatorischen Adipokine, wie Resistin und Leptin wird die Entstehung einer Insulin-Resistenz und damit einhergehend die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 gefördert⁵⁰.

Weiter wird ein gestörter Lipidstoffwechsel als ursächlich für die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 mit Lipotoxizität als Ursache für den Untergang der β -Inselzellen in der Pancreascauda diskutiert. Zu der Entstehung der Lipotoxizität wird ein Überfluss an Lipiden und die fehlende Kapazität zur Speicherung dieser Lipide vermutet⁵¹.

1.3.1 Entwicklung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2

Insulin ist ein Peptidhormon, das bei einem Anstieg der Blutglukosekonzentration, zum Beispiel durch Nahrungsaufnahme, aus den β -Inselzellen des Pankreas in das Blut sezerniert wird. Es bindet an Insulinrezeptoren von Fett-, Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen und fördert dort den Einbau von Glukose-Transporter 4 (GLUT 4) in die Zellmembran. Über diesen Transporter kommt es zu einer Aufnahme von Glukose aus dem Blut, wodurch die Blutglukosekonzentration sinkt. Durch Insulin wird die Speicherung von Glukose in Form von Glykogen und die Lipogenese gefördert^{10,52}.

Unter einer Insulinresistenz reagiert der Insulinrezeptor nicht mehr adäquat auf Insulin, es kommt trotz erhöhtem Glukoseangebots im Blut zu einer gestörten Glukoseaufnahme in das Fettgewebe und in die Muskulatur. Dies fördert die Aktivierung von katabolen Stoffwechselprozessen: Die Adipozyten reagieren mit einer gesteigerten Lipolyse und Freisetzung von Triglyzeriden und in der Leber findet zusätzlich eine verstärkte Glukoneogenese statt. Dieser Zustand resultiert in einem weiteren Anstieg der Blutglukosekonzentration und einer weiteren Ausschüttung von Insulin. Wird dieser Kreislauf aufrechterhalten, erschöpfen sich mit der Zeit die β -Inselzellen des Pankreas und ein manifester Diabetes mellitus Typ 2 entsteht⁵³.

1.4 Atherosklerose

Atherosklerose beschreibt einen multifaktoriellen entzündlichen Prozess an der lumennahen Schicht der Arterienwand, durch den es zu einer Lumenverengung und

Verhärtung der Arterien kommt. Folgen dieses Prozesses im arteriellen System können eine arterielle Hypertonie, KHK und Minderperfusion von Gewebe bis hin zu einem kompletten Verschluss des Gefäßes sein. Tritt ein kompletter Verschluss des Gefäßes im arteriellen System auf und kann das poststenotische Gewebe nicht über Kollateralen versorgt werden, kommt es zu Gewebeinfarkten. Ein weiteres Risiko von atherosklerotischen Veränderungen im arteriellen Gefäßsystem stellt die Embolisation von Plaques oder Plaqueanteilen dar, die ebenfalls zu einem Verschluss von Gefäßen im distalen Verlauf des Gefäßsystems führen kann. So treten zum Beispiel Verschlüsse von hirnversorgenden Arterien nach Plaqueabgang in der *Arteria carotis interna* auf, die zu einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA) bis zu einem ischämischen Infarkt mit bleibendem Schaden führen können. In den westlichen Ländern machen die Folgen der Atherosklerose ungefähr 50 % der Todesursachen aus ⁵⁴.

Aus diesem Grund ist es für die Medizin und das Patientenwohl wichtig, weiter zu erforschen, welche Einflüsse sich positiv und negativ auf die Entstehung der Atherosklerose auswirken, um diese frühzeitig zu hemmen oder ein Fortschreiten der Veränderungen an den Gefäßwänden und deren Folgen zu verhindern.

1.4.1 Aufbau der Arterienwand

Arterielle Gefäße weisen einen dreischichtigen Aufbau auf. Lumennah liegt die Intima, die sich aus einer Endothelschicht, einer Schicht aus lockerem Bindegewebe und der *Lamina elastica interna* zusammensetzt ⁵⁴. Das Intima-Endothel weist antithrombotische Faktoren, wie negativ geladene Glykosaminoglykane und neutral geladene Phospholipide auf und sezerniert zusätzlich Gerinnungsinhibitoren und Aktivatoren der Fibrinolyse. Das lockere Bindegewebe hingegen beinhaltet Kollagen, von-Willebrand-Faktor (vWF), Laminin, Thrombospondin und Vitronectin, die eine Thrombozytenaggregation fördern ⁵⁵. An die Intima schließt sich die aus glatten Muskelzellen bestehende Media an. Die äußere Schicht bildet die Adventitia, die aus *Lamina elastica externa* und Bindegewebe besteht und die gefäßwandversorgenden Gefäße führt ⁵⁴.

1.4.2 Atherogenese

Durch Scherstress und ständige Belastung des Endothels in Blutgefäßregionen wie Gefäßaufzweigungen oder Gefäßabgängen kann es zu einer Verletzung des einschichtigen Intima-Endothels kommen, die mit einer verstärkten Permeabilität für Makromoleküle wie *low density lipoprotein* (LDL), Lipoprotein a und anderer Lipoproteine einhergeht ⁵⁶.

LDL lagert sich in der subendothelialen Matrix der Intima ab. Zusätzlich werden durch die Endothelverletzungen und damit einhergehender Zytokinfreisetzung glatte Muskelzellen der Media zur Proliferation und Migration in die Intima angeregt. Dort wird das akkumulierte

LDL durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Myeloperoxidase, Sphingomyelinase und sekretorische Phospholipasen oxidiert. Das oxidierte LDL stimuliert die Endothelzellen der Intima, proinflammatorische Moleküle wie M-CSF, MCP1, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle zu produzieren, wodurch es zu einer weiteren Einwanderung von Zellen in die Intima kommt^{54,56,57}. Vermittelt durch die neu exprimierten Adhäsionsmoleküle durchwandern vermehrt Monozyten die Endothelzellschicht und akkumulieren in der Intima. Die dort durch M-CSF stimulierten Monozyten proliferieren und differenzieren sich zu Makrophagen und sezernieren selbst M-CSF, Proteoglykane und Zytokine. Dadurch werden weitere in die Intima einwandernde Monozyten zur Differenzierung und Proliferation angeregt⁵⁴. Mit dem kontinuierlichen Anstieg von oxidiertem LDL und der vermehrten Invasion von Leukozyten wird die Permeabilität der Intima größer. Makrophagen nehmen nun in der Intima vermehrt oxidiertes LDL über CD36 und SRA (*scavenger receptor A*) auf und entwickeln sich zu Schaumzellen⁵⁸⁻⁶⁰.

Regulatorische T-Zellen wandern ebenfalls über die Adhäsionsmoleküle in die Intima ein und rufen eine intima- und mediaübergreifende chronische Inflammation durch immunregulatorische Stoffe hervor. Durch die chronische Entzündung getriggert findet ein Umbauprozess des Intima- und des Mediagewebes statt und es entsteht ein Plaque mit einer bindegewebigen Kappe, die einen Lipidkern umschließt. Der Lipidkern bildet sich aus apoptotischen Schaumzellen und extrazellulärer Cholesterinakkumulation⁵⁴.

Im Verlauf kann es zu einem Aufbruch des Plaques kommen. Dabei findet ausgelöst durch das Aufbrechen des Plaques und der damit einhergehenden Freilegung von *tissue factor* (TF) eine Gerinnungsreaktion am Plaque statt, die im Laufe der Zeit das Gefäßlumen zunehmend einengt⁵⁴. Durch den oben beschriebenen Gewebeumbau verliert die Arterienwand ihre Elastizität und wird brüchig. Die progrediente Versteifung der Gefäßwand kann eine arterielle Hypertonie begünstigen und sich in einem pathologisch erhöhten Knöchel-Arm-Index (ABI) äußern⁶¹

1.4.3 Adipositas und Atherogenese

Die Verschiebung des Adipokin-Sekretions-Gleichgewichts zugunsten proinflammatorischer Adipokine hat einen Einfluss auf die Atherogenese⁶²⁻⁶⁴ (**Abbildung 4**).

Ein Schlüsselenzym in der Atherogenese ist eNOS. Die eNOS generiert NO, was einen Einfluss auf den Vasotonus von Gefäßen und auf die Präsentation von Oberflächmolekülen hat. Resistin bewirkt eine erniedrigte eNOS-Aktivität und führt parallel zu einem Anstieg von intrazellulären ROS²⁷. Über die verminderte eNOS Aktivität werden vermehrt Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche von Gefäßendothelzellen präsentiert, die wiederum zu einer verstärkten Migration von Entzündungszellen, insbesondere von Makrophagen in das Gefäßendothel führen. Somit resultiert ein hoher Resistin-Spiegel in

einer erniedrigten Endothelzellbarriere. Weiterhin übt Resistin nicht nur einen Einfluss auf die Makrophagen hinsichtlich der Einwanderung in die Endothelzellen aus, sondern sorgt für eine gesteigerte Aufnahme von oxidiertem LDL und induziert dadurch die Bildung von Schaumzellen. Der Anstieg intrazellulärer ROS unterstützt die Entwicklung eines proinflammatorischen Milieus, wodurch es zu einer weiteren Einwanderung von Makrophagen und zu einem Anstieg an oxidiertem LDL kommt, was eine weitere Schaumzellentwicklung unterstützt⁶⁵⁻⁶⁷.

Leptin übt als proinflammatorisches Adipokin ebenfalls Einfluss auf die Atherogenese aus. Unter erhöhten Leptinspiegeln kommt es zu einer Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies, damit einer Erhöhung des oxidativen Stresses. Zugleich bewirkt ein erhöhter Leptinspiegel eine verstärkte Gerinnung und eine Proliferation von glatten Muskelzellen des Gefäßendothels mit einer zusätzlichen Endothelzeldysfunktion. Diese Effekte fördern die Entstehung von atherosklerotischen Plaques⁶⁸.

Unter einem gesunden Phänotyp überwiegen die protektiven Effekte des antiinflammatorischen Adipokins Adiponektin auf das Gefäßendothel und die Makrophagen. Adiponektin beeinflusst Gefäßendothelzellen positiv, indem es die intraendotheliale eNOS-Aktivität steigert, die zum einen zu einer Reduktion der Präsentation von Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche und zum anderen zu einer Hemmung der Oxidation von LDL führt. Zusätzlich bewirkt Adiponektin eine Reduktion der Präsentation des *scavenger receptors* auf der Zelloberfläche von Makrophagen und führt zugleich zu einer Reduzierung der Cholesterol Acyltransferase 1 Aktivität in den Makrophagen. Dies alles resultiert in einem protektiven Effekt auf die Endothelzellen durch eine verminderte Einwanderung von Makrophagen in das Gefäßendothel, eine Reduktion der intraendothelialen Schaumzellbildung und somit einer Reduktion der Plaqueentstehung.

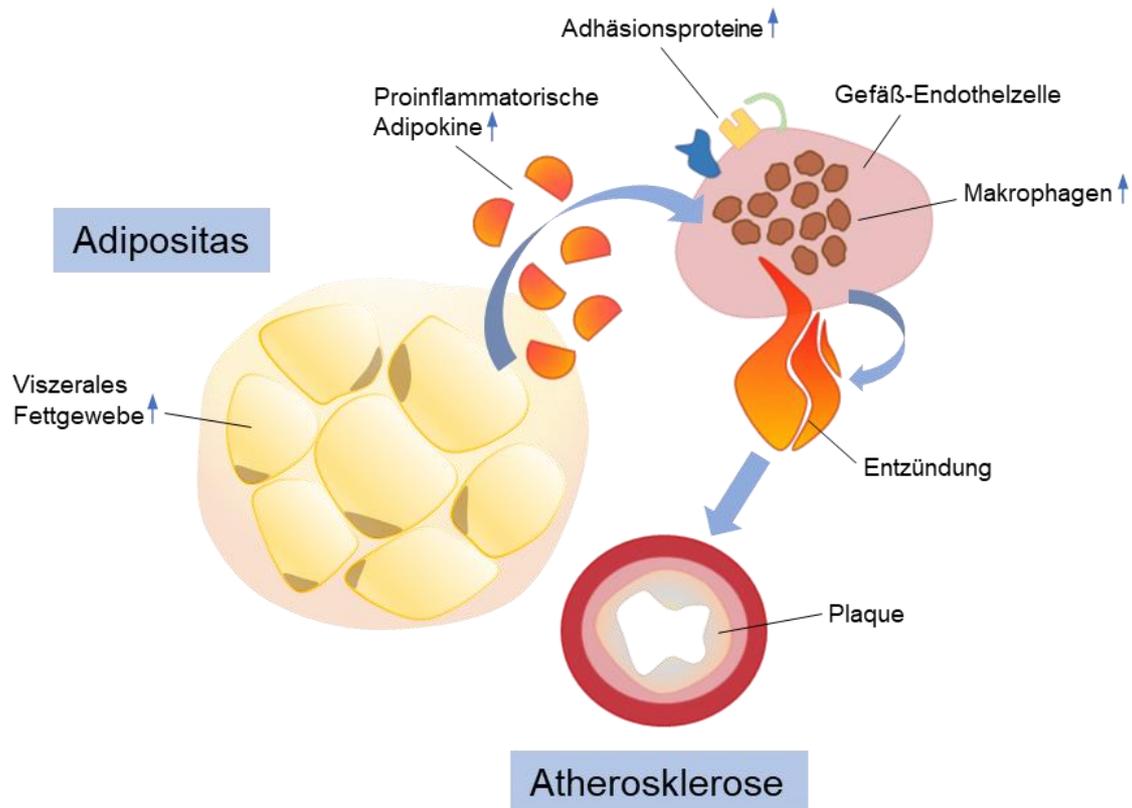


Abbildung 4 Der Zusammenhang zwischen Adipositas und Atherogenese

Unter adipösen Bedingungen kommt es zu einer gesteigerten Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die eine verstärkte Expression von Adhäsionsproteinen auf Endothelzellen fördern. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität für Makrophagen. Makrophagen sezernieren innerhalb der Endothelzelle proinflammatorische Zytokine, wodurch ein proinflammatorisches Milieu aufrechterhalten und die Migration von Makrophagen in die Endothelzellen gefördert wird. Dieser proinflammatorische Status begünstigt die Plaqueentstehung.

1.5 Thrombin

Die Serinprotease Thrombin hat eine Schlüsselrolle im Endweg der Blutgerinnung inne und reguliert darüber hinaus rezeptorvermittelt die endotheliale Zellaktivierung, Plättchenaggregation und Angiogenese^{69,70}. Durch einen Komplex des intrinsischen Weges der Blutgerinnung, bestehend aus Faktor Xa, Va, Phospholipiden und Kalzium, wird Prothrombin gespalten und zu Thrombin aktiviert. Anschließend kann Thrombin Thrombozyten, Faktor V, VIII und XI aktivieren und so selbst über einen *Feedback*-Mechanismus zu einer verstärkten Thrombin-Generierung führen. Durch Thrombin wird Fibrinogen zu Fibrin gespalten und die verletzte Gewebestelle kann durch einen Fibrinthrombus verschlossen werden⁷¹.

Über eine PAR (Protease-aktivierter Rezeptor)-vermittelte Aktivierung der Endothelzellen regt Thrombin die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL1, IL6 und MCP1 an^{72,73}. Thrombin kann direkt Monozyten aktivieren, die über die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren wie TNF α , IL1 β , IL6 und MCP1 Entzündungsprozesse weiter fördern⁷⁴.

Durch die Stimulation von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) kommt es zu einer gesteigerten Angiogenese im atherosklerotischen Plaque. Virmani *et al.* fanden heraus, dass die neu entstandenen Gefäße im Plaque teilweise instabil sind und es so zu Einblutungen in den Plaque kommt, was eine Plaqueinstabilität begünstigt ⁷⁵.

Giri *et al.* konnten unter erhöhten Thrombin-Spiegeln eine erhöhte Verfügbarkeit von Arginase und damit abfallende Arginin- und NO-Spiegel feststellen, was zu einer Vasokonstriktion führt ⁷⁶. Mit einem gleichzeitigen Anstieg der NADPH-Oxidase-Aktivität unter erhöhten Thrombin-Spiegeln kommt es zu einer gesteigerten ROS-Bildung. Durch den erhöhten Spiegel an ROS wird die Lipidoxidation gesteigert, was zu einer erhöhten Apoptoserate und einer verstärkten Plaqueentstehung führt ⁷⁷. Zusätzlich fanden Orbe *et al.* in Studien heraus, dass nach einem akuten Koronarsyndrom (ACS) erhöhte Thrombinspiegel und damit eine verstärkte Gerinnungsneigung vorliegen ⁷⁸.

Da Thrombin einen Einfluss auf Entzündungen und durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2), *Platelet-derived growth factor* (PDGF) und VEGF einen Einfluss auf die Angiogenese hat, spielt es eine wichtige Rolle in der Entstehung der Atherosklerose ⁷⁹⁻⁸¹. Veränderte Thrombin-Spiegel könnten somit einen Einfluss auf die Plaquestabilität haben ⁸²⁻⁸⁴.

1.5.1 Adipositas und eine verstärkte Thrombingenerierung

Durch die verstärkte Sezernierung proinflammatorischer Zytokine und Adipokine unter adipösen Bedingungen kommt es zu einer Stimulation von Thrombozyten, des Gefäßendothels und über eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen der Gefäßwände zu einer Aktivierung prothrombotischer Signalwege im Körper. Dadurch wird vermehrt Thrombin generiert und eine verstärkte Plättchenaktivierung ermöglicht ⁸⁵. Eine Erhöhung von TNF α und IL 6 führt zu einer Aktivierung des *tissue factors*, wodurch es zu einer Generierung von Thrombin kommt.

1.5.2 Die Wirkung von Thrombin auf Protease-aktivierte Rezeptoren

Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. PAR werden auf verschiedenen Geweben und Zellen wie Thrombozyten, Endothelzellen, Leukozyten und Fibroblasten exprimiert und können darüber unterschiedliche Systeme und pathophysiologische Vorgänge wie Fibrose, Thrombose und Entzündungen im Körper beeinflussen ⁸⁶. Bisher wurden im Menschen und im Mausmodell vier verschiedene PAR-Subtypen entdeckt. Serinproteasen binden an den Liganden des extrazellulären N-Terminus des PAR und spalten diesen ⁸⁷. Der dadurch entstandene neue extrazelluläre N-Terminus aktiviert intrinsisch den Rezeptor und löst darüber die intrazelluläre Signalkaskade aus. Die Serinprotease Thrombin kann auf diese

Weise die humanen PAR-1, -3 und -4 aktivieren⁷⁰. PAR-2 hingegen wird durch Trypsin, Trypsinase und die Faktoren VIIa und Xa, nicht jedoch durch Thrombin aktiviert⁸⁸⁻⁹⁰.

PAR-1 und PAR-2 werden auf Endothelzellen exprimiert. PAR-1 wird Thrombin-vermittelt aktiviert und führt zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität des Endothels⁹¹. Liegt eine Gefäßverletzung vor, werden über Entzündungsmediatoren lokale Proteasen oder Mastzell-Trypsasen freigesetzt, die den endothelialen PAR-2 aktivieren können⁷⁰. Durch die Aktivierung von PAR-2 werden vermehrt Adhäsionsmoleküle auf der Endotheloberfläche exprimiert und Leukozyten und Thrombozyten können anhaften. Thrombin vermittelt hierbei zusätzlich die Expression von Thrombozyten-aktivierenden Faktoren (PAF), IL6 und IL8^{92,93}. Daher spielen endotheliale PARs eine große Rolle in der Endothelzellantwort auf Entzündungen oder Verletzungen.

PAR-3 fungiert im Mausmodell als Cofaktor für Thrombin bei der Aktivierung von PAR-4. Weiss *et al.* beschrieben, dass PAR-3 an der Entwicklung von Thrombosen und Lungenembolien beteiligt ist⁹⁴.

PAR-4 kann über Thrombin, Trypsin und Cathepsin G aktiviert werden und ist in der Thrombozytenaktivierung und Entzündungsreaktion involviert⁹⁵. PAR-4 findet sich sowohl auf Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen als auch auf Adipozyten des viszeralen Fettgewebes⁹⁶⁻⁹⁸. Wird PAR-4 aktiviert, kommt es zu einer Einwanderung von Leukozyten und eine Entzündungsreaktion wird begünstigt⁹⁹. Durch den Einfluss von PAR-4 auf glatte Gefäßmuskelzellen könnte PAR-4 eine Schlüsselrolle in der Atherosklerose-Entstehung zukommen.

1.5.3 PAR-vermittelte Wirkungen von Thrombin im Fettgewebe

Strande *et al.* konnten im viszeralen Fettgewebe PAR-1 und PAR-4 nachweisen. PAR-1 findet sich vermehrt auf Zellen des Gefäßsystems und PAR-4 auf Adipozyten und Präadipozyten. Eine Stimulation von Adipozyten mit Thrombin führt zu einer erhöhten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen aus Adipozyten und von Angiogenesefaktoren aus Adipozyten und Präadipozyten. Diese Effekte können mittels des direkten Thrombin-Inhibitors Lepirudin antagonisiert werden⁹⁸.

Eine Aktivierung von PAR-4 im viszeralen Fettgewebe führt zu einer Induktion der Sekretion von TNF α , IL1 β , IL6, MCP1 und VEGF⁹⁸. Naldini *et al.* zeigten, dass Thrombin im Fettgewebe zusätzlich Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen zur Sezernierung von IL1 β und TNF α anregt^{72,74}. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass unter einer erhöhten Konzentration von Thrombin ein proinflammatorischer Zustand im Fettgewebe entsteht, durch parakrine Wirkung aufrechterhalten wird und endokrin andere Gewebe und Prozesse im Organismus beeinflussen kann.

Lim *et al.* wiesen unter einem adipösen Phänotyp eine durch Fettsäuren getriggerte verstärkte Expression von PAR-2 im viszeralen Fettgewebe auf Stromazellen und Makrophagen nach. Der Einsatz eines PAR-2 Antagonisten führte zu einer Reduktion des Gewichts, einer verminderten Insulinresistenz und Glukosetoleranz, einer kardiovaskulären Dysfunktion und hatte einen antiinflammatorischen Effekt ¹⁰⁰⁻¹⁰³.

1.5.4 Physiologische Thrombinhemmung

Um eine generalisierte Blutgerinnung zu verhindern, stehen dem Organismus verschiedene physiologische Inhibitoren der Blutgerinnung zur Verfügung.

Dabei stellt Antithrombin III (ATIII) den wichtigsten Inhibitor dar. Es wird Vitamin-K-unabhängig von der Leber synthetisiert. Indem es mit Prothrombin Komplexe bildet, wird die enzymatische Spaltung von Prothrombin zu Thrombin verhindert. Zusätzlich inhibiert ATIII die Faktoren IXa, Xa, XIa und XIIa irreversibel und greift so in die Aktivierungsphase der sekundären Hämostase ein ^{104,105}.

Das Protein-C/S-System stellt eine weitere wichtige Möglichkeit der Inhibition der Blutgerinnung dar. Die Proteine C und S werden Vitamin-K-abhängig in der Leber gebildet und sind Plasmabestandteile. Protein S ist ein Cofaktor und aktiviert Protein C. Durch seine proteolytische Aktivität kann Protein C die Faktoren Va und VIIIa hemmen ^{106,107}.

Als Proteinase-Inhibitoren spielen α 1-Antitrypsin und Antitrypsin- α 2-Makroglobulin eine wichtige Rolle in der Hemmung der Thrombinentstehung.

1.5.5 Pharmakologische Thrombinhemmung

1.5.5.1 Argatroban

Argatroban ist ein reversibler, direkter Thrombin-Inhibitor und wird intravenös verabreicht. Argatroban bindet selektiv an eine katalytische Bindungsstelle des Thrombins. Es kann dabei sowohl an freies als auch an fibrin gebundenes Thrombin binden. Unabhängig von ATIII hemmt Argatroban die Bildung von Fibrin, die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren, die Thrombozytenaggregation und die Bildung von aktiviertem Protein C ¹⁰⁸. In der Klinik wird Argatroban zur Antikoagulation bei heparininduzierter Thrombozytopenie Typ 2 (HIT II) per Infusion eingesetzt, da es keine plättchenaktivierenden Antikörper induziert. Ein weiterer Vorteil ist, dass Argatroban über die Leber abgebaut wird und so auch bei Niereninsuffizienz im stationären Rahmen verordnet werden kann.

1.5.5.2 Dabigatran

Dabigatran ist ein direkter Thrombin-Inhibitor, der oral in Form des Prodrugs Dabigatranetexilat (in der weiteren Arbeit als Dabigatran bezeichnet) verabreicht wird und

in der Leber und im Plasma durch unspezifische Esterasen zu Dabigatran hydrolysiert wird. Dabigatran bewirkt eine reversible, kompetitive Hemmung von freiem und fibrinogengebundenem Thrombin sowie rezeptorvermittelter Thrombinwirkungen. Unter Gabe von Dabigatran wird die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und zusätzlich die thrombininduzierte Thrombozytenaggregation verhindert. In der Klinik wird Dabigatran zur Prävention von Schlaganfall und systemischer Embolie bei erwachsenen Patienten mit nicht valvulärem Vorhofflimmern, sowie zur Primärprävention von venösen thromboembolischen Ereignissen bei erwachsenen Patienten nach elektivem chirurgischen Hüft- oder Kniegelenkersatz eingesetzt. Zusätzlich kann Dabigatran zur Behandlung tiefer Venenthrombosen (TVT) und Lungenembolien (LE), wie auch zur Prävention von rezidivierenden TVT und LE eingesetzt werden. Dabigatran wird renal eliminiert und sollte aus diesem Grund nicht Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion oder Niereninsuffizienz verabreicht werden ¹⁰⁹.

1.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis von substanz-spezifischen Unterschieden einer pharmakologischen Thrombin-Inhibition mittels zweier direkter Thrombininhibitoren, Argatroban und Dabigatran, auf die Morphologie und Inflammation des Fettgewebes in adipösen, diabetischen *LepR^{db/db}*-Mäusen. Zusätzlich wird der Einfluss einer Thrombin-Inhibition durch Argatroban auf die Entstehung und die morphologische Veränderung von atherosklerotischen Arealen in einem murinen Modell der akzelerierten Atherosklerose, den *Ldlr^{-/-}* Mäusen, untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen

Tabelle 1 Verwendete Substanzen

Substanz	Katalognummer	Firma
Roticlear	A538.5	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (absolut)	107017	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	1.09249.0500	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rotimount	HP68.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Argatroban	100mg/ml Konzentrat PZN 07331326	Mitsubishi Tanabe Pharma GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Öl Rot O	O-0625	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chondroitinase ABC aus Proteus vulgaris	C3667	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2 Verwendete Lösungen

Lösung	Katalognummer	Firma
Ethanol (95 %)	84836.360	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay-Sous-Bois, Frankreich
Ethanol (70 %)	84858.360	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay-Sous-Bois, Frankreich
DAB + Chromogen	DAB530	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
HCl (10 %)	0710.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂ (30 %)	CP26.1	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Histofix (4 %)	P087.3	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	B694698	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	1.060.092.511	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	1.04005.1000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3 Verwendete Färbelösungen

Färbelösung	Ansatz
Celestineblau	5 g Ammoniumeisen-III-sulfat, 100 ml destilliertem Wasser, 0,5 g Celestineblau, 14 ml Glycerin
Blockierlösung	10% FCS, 1% BSA, 10% 10xTBS <i>ad Aqua dest.</i>
Picro-Siriusrot	0,1 g Siriusrot, 100 ml Pikrinsäure
Öl Rot O	35 ml Öl Rot O Stammlösung (0,4 g Öl Rot O <i>ad</i> 80 ml 100% MeOH), 10 ml NaOH (1M)
1 % Eosin	1 % Eosin Y Dinatrium-Salz, 0,05 % Essigsäure

Tabelle 4 Verwendete Puffer

Puffer	Ansatz
1xPBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 8mM Na ₂ HPO ₄ in H ₂ O
10xTB	60,57 g Tris (MW 121,14 g/mol) auf 1 l <i>Aqua dest</i> (pH 7.6)
Citrat-Puffer für das Antigen-Retrieval	10 mMol Natriumcitrat, 0,05% Tween 20 pH 6.0, 1:10 Verdünnung

2.3 Erstantikörper

Tabelle 5 Verwendete Erstantikörper

Zielstruktur	Beschreibung	Katalognummer	Firma
MAC2	Rat Anti-Mac2 Monoclonal AK	CL8942AP	Cedarlane, Burlington, Ontario, Kanada
UCP1	Rabbit Anti-UCP-1	ab10983	Abcam, Cambridge, UK
Biglykan	Rabbit anti-Biglykan	LF159	Laboratory of Larry W. Fisher, PhD, National Institute of Dental and Craniofacial Research/NIH, Bethesda, USA

2.4 Zweitantikörper

Tabelle 6 Verwendete Zweitantikörper

Färbung	Beschreibung	Katalognummer	Firma
MAC2	Goat Anti-Rat IgG2a HRP	NB7126	Novus Biologicals, Minneapolis, USA
UCP1 & Biglykan	Goat Anti-Rabbit IgG HRP	sc2004	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA

2.5 Geräte und Material

Tabelle 7 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Modell	Firma
Mikrotom	RM 2255	Leica, Wetzlar, Deutschland
Tissue-Tek (verwendet für Entwässerung)	Tissue-Tek VIP	Sakura Finetek GmbH, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Leica-EG (verwendet zum einparaffinieren der Proben)	Leica-EG1150	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffinstreckbad	Typ 25900	MEDAX, Neumünster, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop	Axiostar Plus	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop	CX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Axiolmager.M2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Präparationsstation	Stemi 2000-C KL 1500 LCD (Durchlicht)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge	Mini Spin Plus	Eppendorf, Tokio, Japan
Färbekammer	Vertical Staining Jar	ThermoElectron, Waltham, Massachusetts, USA
Kamera	Power Shot G10	Canon, Tokio, Japan
Einbettungskästchen	Routine VI Loose	Leica, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	SuperFrost®Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Deckgläschen	24x60mm	Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Präparatkasten	5280723 275x185x40mm	CEESEM, Marburg, Deutschland

2.6 In vivo Experimente im Mausmodell

2.6.1 Mauslinien und Behandlung

Für diese Dissertation wurden weibliche *low density lipoprotein* (LDL)-Rezeptor-defiziente Mäuse als kombiniertes Modell für Atherosklerose und Diät-induzierter Insulinresistenz und Hyperglykämie (*Ldlr*^{-/-}, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) und weibliche Leptin-Rezeptor-defiziente Mäuse als Diabetes- und Adipositas-Modell (*LepR*^{db/db}, Jackson Laboratory) verwendet.

Die Mäuse unter Argatroban-Behandlung bekamen eine fettreiche Diät bestehend aus 21% Fett und 0,15% Cholesterin (S8200-E010; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) und die Mäuse unter Dabigatran-Behandlung bekamen Dabigatranetexilat verpresst in Tierfutter verfüttert, um eine Progression von Atherosklerose und einen adipösen Phänotyp zu begünstigen. Für die Versuche mit dem Thrombin-Inhibitor Argatroban, wurden die *Ldlr*^{-/-}-Mäuse und die *LepR*^{db/db}-Mäuse in eine mit Wirkstoff behandelte- und eine Placebo-Gruppe aufgeteilt. Ab einem Alter von zehn Wochen erhielten die Tiere Pumpen subkutan implantiert, die entweder den Wirkstoff Argatroban (0,6 mg/kg KG pro Tag) oder NaCl enthielten. Ein Pumpenwechsel fand nach vier Wochen statt. Nach zwanzig Wochen (*Ldlr*^{-/-}) oder vier Wochen (*LepR*^{db/db}) wurden die benötigten Proben aus den Tieren entnommen.

Für die Versuche mit dem Thrombin-Inhibitor Dabigatran wurden *LepR*^{db/db}-Mäuse ab einem Alter von zehn Wochen behandelt. Die Wirkstoffgruppe bekam Fettfutter mit dem direkten Thrombin-Inhibitor Dabigatranetexilat (in der weiteren Arbeit als Dabigatran bezeichnet) in einer Dosierung von 5 mg/g Futter verfüttert, die Placebo-Gruppe bekam dasselbe Futter jedoch ohne Dabigatran. Die Boehringer Ingelheim Pharma GmbH und Co. KG (Biberach/Riß, Deutschland) stellte das Futter freundlicherweise zur Verfügung. Nach vier Wochen wurden die benötigten Gewebe entnommen und untersucht (**Abbildung 5**).

Jedes Tier wurde unter standardisierten Bedingungen mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser gehalten. Alle durchgeführten Versuche erfolgten nach den gesetzlichen Vorgaben nach § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) überprüft und genehmigt (Az. 84-02.04.2011.A237, ZETT Nr. A237/11).

Die Fütterung der Spezialdiäten sowie die Implantation der osmotischen Minipumpen wurden von Frau Dr. Kathrin Feldmann durchgeführt. Ich habe im Rahmen meiner FELASA A-Zertifizierung bei der Organentnahme und der nachfolgenden Aufarbeitung der Organe für die histologischen Untersuchungen assistiert. Im Laufe meiner Dissertation habe ich die FELASA B-Zertifizierung erfolgreich erworben.

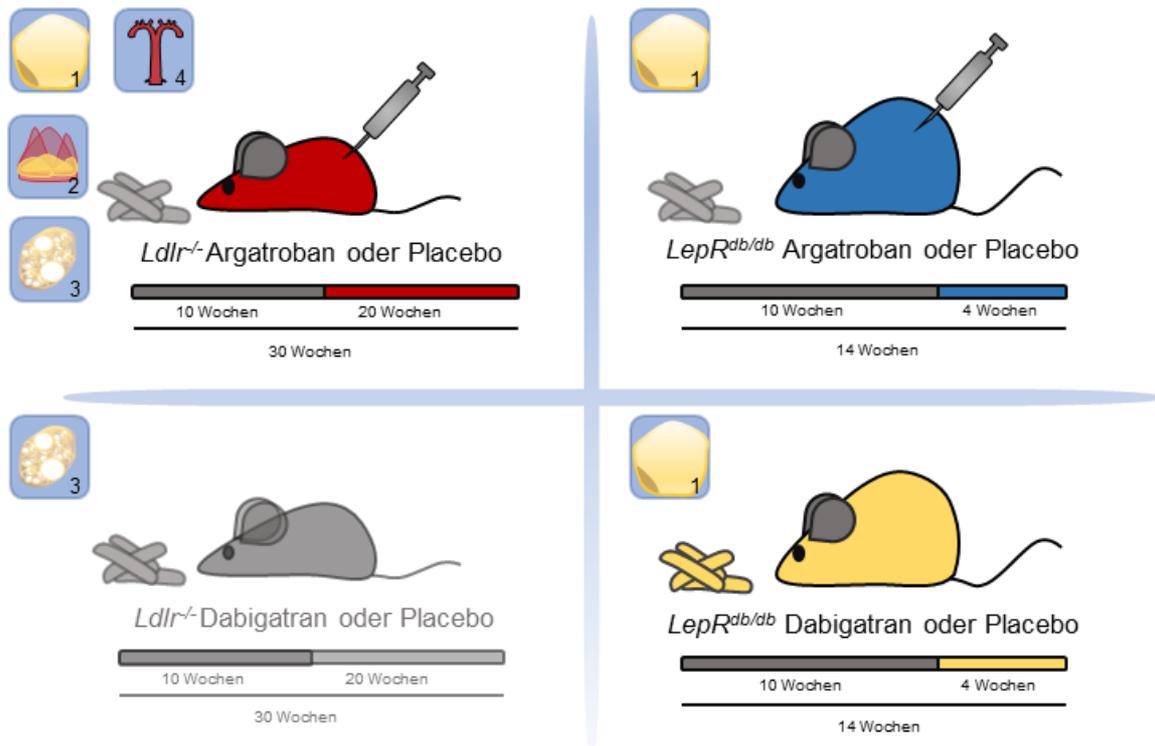


Abbildung 5 Behandlungsart der verwendeten Mäuse

Schematische Darstellung der verwendeten Mauslinien, der Behandlungsdauer und der Behandlungsart. Alle verwendeten Mäuse starteten im Alter von zehn Wochen (grauer Balken) mit der jeweiligen Behandlung (Balken in den Farben der Mäuse). Alle Mäuse erhielten eine Western Diät (Futter in grau dargestellt), dabei wurde bei *LepR^{db/db}* der Wirkstoff Dabigatranetexilat p.o. verfüttert (Futter gelb dargestellt). Die Argatroban-Behandlung erfolgte über s.c. implantierte Pumpen (hier vereinfacht als Spritze dargestellt). Bei *Ldlr^{-/-}* Tieren unter Argatroban-Behandlung wurden viszerales Fettgewebe (1), Aortenursprünge (2), subkutanes Fettgewebe (3) und Aorten (4) untersucht. Bei *LepR^{db/db}* unter Argatroban-s.c. und Dabigatran-Behandlung p.o. wurde das viszerale Fettgewebe (1) untersucht. Als Kontrollgruppe wurde bei *Ldlr^{-/-}* Tieren unter Dabigatran-Behandlung p.o. zusätzlich das subkutane Fettgewebe (3) untersucht. Die anderen Gewebe wurden im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Kathrin Feldmann analysiert (grau transparent dargestellt). Der Versuch endete mit einem Alter der Mäuse von 30 Wochen (*Ldlr^{-/-}*) oder 14 Wochen (*LepR^{db/db}*).

2.7 Histologische Aufarbeitung des Gewebes

Viszerales und subkutanes Fettgewebe sowie Herzen wurden jeweils entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden anschließend am Mikrotom mit einer Schnittdicke von 5 µm geschnitten.

Dabei wurde das viszerale und subkutane Fettgewebe konsekutiv geschnitten und drei Ebenen, die jeweils 300 µm voneinander entfernt lagen, auf Objektträger aufgezogen.

Nach diesem Schema wurden 20 Objektträger erstellt, die 20 konsekutive Schnitte der 3 Ebenen enthielten.

Das Gewebe der Herzen wurde bis zum Erreichen der Ausbildung des Aortenursprungs und Auftreten der Taschenformationen verworfen und anschließend konsekutiv mit je zwei

Schnitten pro Objektträger aufgezogen bis zum Verlassen der Aortenklappenebene (**Abbildung 6**). Für die Färbungen wurden vier Ebenen im Abstand von 30 µm genutzt.

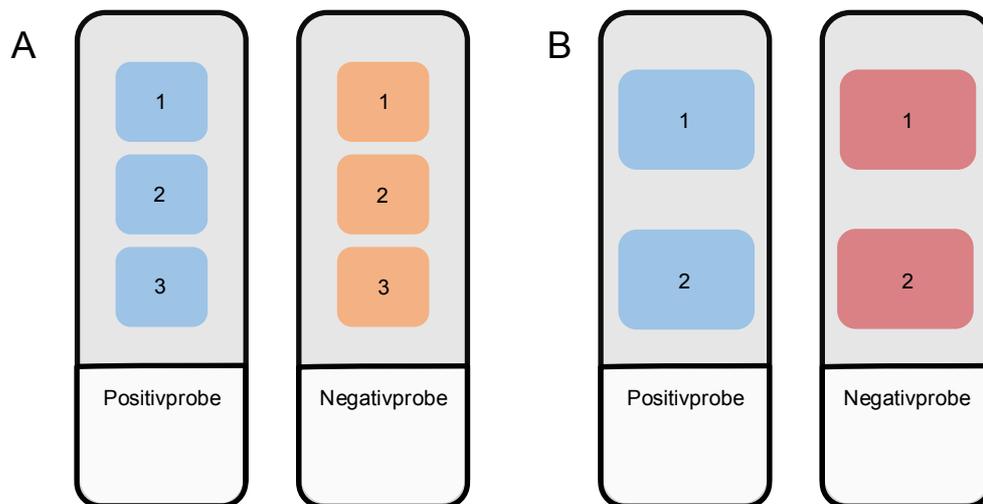


Abbildung 6 Schnittschema von Fettgewebe und Aortenursprüngen

Schematische Darstellung der Anordnung der Schnitte von (A) Fettgewebe in drei Schnittebenen und (B) des Aortenursprungs mit je zwei Schnittebenen auf den Objektträgern.

Anschließend trockneten die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur und wurden am nächsten Tag bei 60 °C für eine Stunde hitzefixiert. Die abgekühlten Schnitte wurden entweder direkt für Färbungen verwendet oder in Präparatkästen gelagert.

Um Schwankungen der Konzentrationen der eingesetzten Chemikalien bzw. Unterschiede in der Färbungszeit zu vermeiden und so eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen, wurden alle Präparate einer Tiergruppe gleichzeitig gefärbt.

Das viszerale Fettgewebe wurde gemäß der beschriebenen Färbeprotokolle mittels Hämalaun-Eosin und auf MAC2 gefärbt.

Das subkutane Fettgewebe wurde mittels Hämalaun-Eosin und auf UCP-1 gefärbt.

Das Herzgewebe wurde mittels Hämalaun-Eosin und auf MAC2, Biglykan und Kollagen gefärbt.

Aus den Tieren entnommene Aorten wurden in Formalin eingelegt und nach einer eintägigen Verweildauer in 1xPBS mittels Präparierbesteck unter einem Stereomikroskop bearbeitet. Dabei wurden die paraaortalen Fettreste entfernt. Anschließend wurde eine Öl Rot O- Färbung (s. Protokoll Öl Rot O) der Aorten durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Aorten mittels Präparierbesteck längs aufgeschnitten und fotografiert.

Alle Aorten einer Gruppe wurden zeitgleich gefärbt und fotografiert, um mögliche färbebedingte Schwankungen und tageszeitlich veränderte Lichtverhältnisse zu vermeiden.

2.8 Färbeschema der aortalen Ursprünge

Die aortalen Ursprünge wurden konsekutiv geschnitten und für die weiteren Untersuchungen wurden vier Ebenen definiert (**Abbildung 7**). Ebene 1 wurde zur Detektion von Makrophagen auf MAC2 gefärbt, Ebene 2 auf das Proteoglykan Biglykan. Für Biglykan konnte eine positive Korrelation zwischen vaskulärem Biglykan-Vorkommen und der Stabilität der fibrösen Kappe des Plaques nachgewiesen werden ¹¹⁰. Außerdem konnten Arbeiten unserer Forschungsgruppe beweisen, dass Biglykan einen endogenen Inhibitor von Thrombin im atherosklerotischen Mausmodell darstellt ¹¹¹. Ebene 3 zur Bestimmung der Plauegröße und Morphologie mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Ebene 4 auf Kollagen, da ein erhöhter Kollagenanteil zu einer verbesserten Plauestabilität führt ¹¹²⁻¹¹⁴. Über alle Ebenen wurde zusätzlich die Gesamt-Plauegröße bestimmt, um eine intrinsische Plaue-Heterogenität auszugleichen.

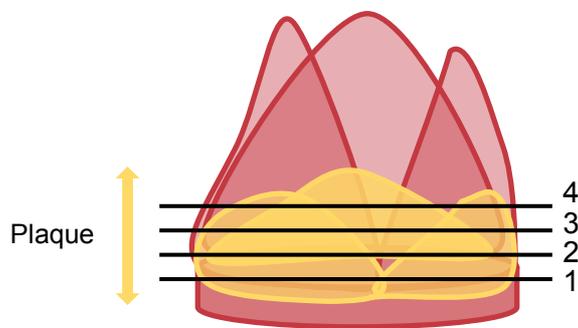


Abbildung 7 Aortenklappe mit Plaue

Schematische Darstellung der gewählten vier Schnittebenen im Plaue der Aortenklappe und des Aortenursprungs

2.9 Immunhistochemische Färbungen

Alle Färbungen wurden für die verschiedenen Tiergruppen am gleichen Tag mit den gleichen Lösungen, Antikörperkonzentrationen und Chemikalien gefärbt.

Für alle Färbungen der in Paraffin eingebetteten Gewebe waren die Schritte der Entparaffinierung, der Entwässerung und des Eindeckens gleich.

Für die Entparaffinierung wurden die Schnitte unter dem Abzug dreimal für je 15 Minuten in Roticlear und anschließend für je zwei Minuten in einer absteigenden Ethanolreihe gewaschen. Dabei wurde Ethanol absolut, 95% Ethanol und 70 % Ethanol verwendet.

Für die Entwässerung wurden alle Schnitte unter dem Abzug für je zwei Minuten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70% Ethanol, 95% Ethanol und Ethanol absolut) und anschließend für fünf Minuten mit Roticlear gewaschen.

Nach vorsichtigem Entfernen der Roticlear-Reste unter dem Abzug mittels eines Kosmetiktuchs, wurden die Schnitte mit Rotimount eingedeckt.

2.9.1 MAC2 Färbung

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten in 1xPBS gewaschen. Daran schloss sich ein Blockierschritt mit Blockierlösung für eine Stunde an.

Als nächstes wurde der 1. Antikörper in einer Konzentration von 0,75 µl auf 100 µl 1%BSA/1xPBS auf die eine Hälfte der Schnitte und 1%BSA/1xPBS als Negativ-Kontrolle auf die andere Hälfte der Schnitte pipettiert. Die Inkubation fand in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht statt.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte für je fünf Minuten dreimal in 1xPBS gewaschen. Darauf folgte ein H₂O₂ Block für fünf Minuten unter dem Abzug. Anschließend wurde der Waschschrift dreimal für je fünf Minuten in 1xPBS wiederholt.

Als nächstes wurde der 2. Antikörper in einer Konzentration von 1:200 in 1xPBS auf die Schnitte pipettiert und die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur abgedeckt in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde der PBS-Waschschrift (dreimal je fünf Minuten) wiederholt, um ungebundene Antikörperreste abzuwaschen.

Für die Detektion wurden die Schnitte für zehn Minuten in 1xTB gewaschen, bevor der Färbungsschritt mit DAB (80 ml DAB Substrat auf 4 ml DAB-Chromogen) stattfand. Um die Reaktion mit DAB zu stoppen wurden die Schnitte anschließend zurück in 1xTB für fünf Minuten gestellt. Anschließend fand ein Waschschrift für eine Minute mit destilliertem Wasser statt.

Für die Kernfärbung wurden die Schnitte für eine Minute in Hämalaun getaucht und danach kurz zuerst mit Leitungswasser und anschließend mit 1% HCl abgespült. Der Bläuungsschritt fand unter fließendem kaltem Leitungswasser für fünf Minuten statt. Danach wurden die Schnitte für eine Minute mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun erfolgte das Entwässern und Eindecken, wie oben beschrieben.

2.9.2 HE Färbung

Im Anschluss an die Entparaffinierung wurden die Schnitte zweimal für je fünf Minuten in 1xPBS gewaschen. Für die Färbung wurden die Schnitte für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für eine Minute in Hämalaun getaucht. Daraufhin wurden die Schnitte zuerst kurz in Leitungswasser und danach in 1% HCl gewaschen. Es schloss sich nun der Bläuungsschritt für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser an. Nach dem Bläuen wurden die Schnitte für eine Minute in 1% Eosin getaucht. Wie oben beschrieben, erfolgte nun das Entwässern und Eindecken.

2.9.3 Kollagen Färbung

Im Anschluss an die Entparaffinierung wurden die Schnitte zweimal für je fünf Minuten in 1xPBS gewaschen und anschließend für eine Minute mit destilliertem Wasser bedeckt. Als nächstes wurden die Schnitte für sieben Minuten in Celestineblau gefärbt. Nach der Färbung folgte ein kurzes Eintauchen der Schnitte in 1% HCl mit anschließendem Bläuungsschritt für zehn Minuten unter fließendem kaltem Leitungswasser. Nun wurden die

Schnitte für 20 Minuten in Picro-Siriusrot-Lösung getaucht. Wie anfangs beschrieben, erfolgte nun das Entwässern und Eindecken.

2.9.4 Biglykan Färbung

Nach dem Entparaffinierungsschritt wurden die Schnitte zweimal für je fünf Minuten in 1xPBS gewaschen. Für den Verdau wurden die Objektträger vorsichtig mit einem Kosmetiktuch um das Gewebe herum trockengewischt und Chondroitinase in einem Mischungsverhältnis von 1 µl Chondroitinase zu 100 µl ABC-Puffer auf das Gewebe pipettiert. Anschließend wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad gelagert. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift für jeweils fünf Minuten in 1xPBS. Als nächstes wurden die Schnitte für eine Stunde bei RT in Blockierlösung blockiert. Der 1. Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1:500 in BSA/PBS auf das Gewebe pipettiert und die Objektträger in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am nächsten Tag schloss sich ein erneuter Waschschrift mit 1xPBS an. Dabei wurden die Schnitte für je fünf Minuten dreimal in 1xPBS gewaschen.

Darauf folgte ein H₂O₂ Block für fünf Minuten unter dem Abzug. Anschließend wurde der Waschschrift dreimal für je fünf Minuten in 1xPBS wiederholt.

Als nächstes wurde der 2. Antikörper in einer Konzentration von 1:400 in 1xPBS auf die Schnitte pipettiert und die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur abgedeckt in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift für jeweils fünf Minuten mit 1xPBS.

Für die Detektion wurden die Schnitte für zehn Minuten in 1xTB gewaschen. Darauf schloss sich der Färbungsschritt mit DAB (80 ml DAB Substrat auf 4 ml DAB-Chromogen) an. Um die Reaktion mit DAB zu unterbrechen, wurden die Schnitte anschließend zurück in 1xTB für fünf Minuten gestellt, um danach eine Minute mit destilliertem Wasser gewaschen zu werden.

Für die Kernfärbung wurden die Schnitte nun für eine Minute mit Hämalaun bedeckt und darauf kurz zuerst mit Leitungswasser und anschließend mit 1 % HCl abgespült. Der Bläuungsschritt fand unter fließendem kaltem Leitungswasser für fünf Minuten statt. Danach wurden die Schnitte für eine Minute mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun erfolgte das Eindecken, wie oben beschrieben.

2.9.5 Öl Rot O Färbung und Präparation

Die Aorta wurde zuvor in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend in 1xPBS gelagert. Als erstes wurden die Aorten für fünf Minuten in 78 % MeOH gewaschen und anschließend für 90 Minuten in die Färbelösung getaucht. Nach der Entfärbung durch fünfminütiges

Waschen in 78 % MeOH wurden die Aorten präpariert oder erneut bei 4 °C in 1xPBS gelagert.

Die Präparation fand mittels Pinzette und chirurgischer Schere unter einem Stereomikroskop statt. Dabei wurde die Aorta der Länge nach von der Aortenbifurkation bis zum Aortenklappenansatz aufgeschnitten. Der Aortenbogen wurde rückseitig ebenfalls bis distal des Abgangs der *A. subclavia sinistra* aufgeschnitten, sodass der Aortenbogen vollständig aufgeklappt werden konnte (**Abbildung 8**). Die präparierte Aorta wurde anschließend im aufgeklappten Zustand abfotografiert.

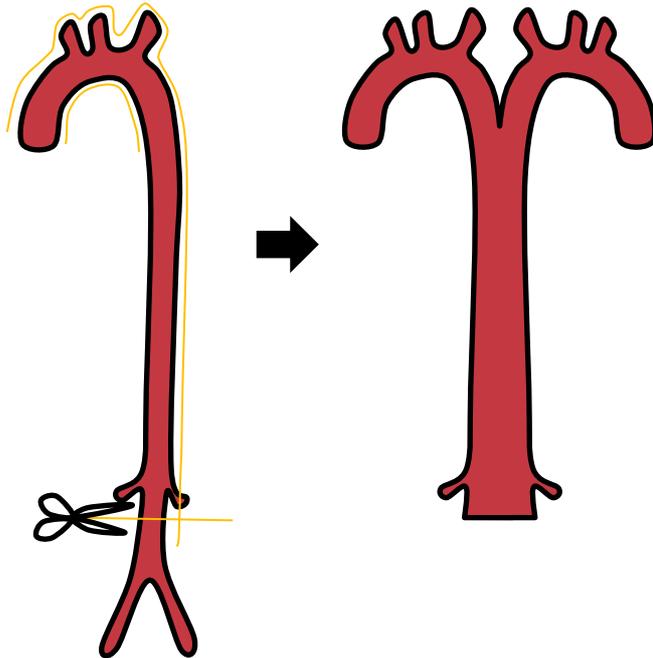


Abbildung 8 Präparation der Aorten

Schematische Darstellung der Präparation der Aorten. Entlang der gelben Linien wurde die Aorta aufgeschnitten (links im Bild) und anschließend aufgeklappt (rechts im Bild).

2.9.6 UCP-1 Färbung

Als erstes erfolgten die Entparaffinierungsschritte, wie oben beschrieben. Dann schloss sich ein dreifacher Waschschrift mit 1x PBS für je fünf Minuten an. Als nächste wurde ein *Citrat Antigen Retrieval* für eine Stunde durchgeführt. Daraufhin folgte ein erneuter zweifacher Waschschrift mit 1xPBS für je fünf Minuten. Die Blockierung wurde wie oben beschrieben für eine Stunde durchgeführt. Es folgte das Pipettieren des 1. Antikörpers (1:500) und der entsprechenden Negativkontrolle mit 1%BSA/1xPBS und eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Der zweite Färbetag startete mit einem dreifachen 1xPBS Waschschrift für je fünf Minuten mit anschließendem H₂O₂-Block für fünf Minuten. Danach wurde erneut dreifach je fünf Minuten mit 1xPBS gewaschen. Als nächstes wurde der 2. Antikörper (1:200) auf die Schnitte pipettiert und die Schnitte für eine Stunde bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Erneut wurde dreimal für je fünf Minuten mit 1x PBS gewaschen und es schlossen sich die Schritte für die Detektion mit TB und DAB und der Kernfärbung (s. MAC2 Färbung) an. Entwässert und eingedeckt wurden die Objektträger wie oben beschrieben.

2.10 Auswertung

2.10.1 Gewicht, Körperlänge, BMI, Cholesterin

Die Tiere wurden wöchentlich gewogen und die Endlänge bestimmt. Der BMI (g/cm^2) wurde für jedes Tier am Tag des Versuchsendes berechnet. Die Cholesterinwerte wurden im Plasma der behandelten Tiere mittels ELISA ermittelt.

Postmortem wurde durch eine Herzpunktion Blut aus dem rechten Vorhof entnommen und mittels 0,32 % Natriumcitrat antikoaguliert. Anschließend wurde das Gemisch aus Blut und Natriumcitrat für 15 min bei 4°C und $800 \times g$ zentrifugiert, um das Plasma von den korpuskulären Blutbestandteilen zu trennen. Der abpipettierte Plasmaüberstand wurde ein zweites Mal bei $15700 \times g$ für 5 min bei 4°C zentrifugiert, um kleinste korpuskuläre Reste vom Plasma abzutrennen. Bis zur Analyse des Plasmas wurde das Plasma bei -20°C gelagert. Untersucht wurden für das Atherosklerose-Mausmodell unter Argatroban- oder Placebo-Behandlung das Gesamtcholesterin (mg/dl), HDL (mg/dl) und das Verhältnis LDL/VLDL.

2.10.2 Auswertung mit Fiji

Durch die Programmierung eines Makros mit Hilfe der Software *Fiji*¹¹⁵ und der *BioVoxel Image Processing and Analysis Toolbox* (BioVoxel, Mutterstadt) konnte eine halbautomatische Auswertung durchgeführt werden. Dadurch konnten Fehler hinsichtlich der Auswahl der Adipozyten bei der Auswertung reduziert und insgesamt eine größere Anzahl an Adipozyten untersucht werden (**Abbildung 9**). So konnte der systematische Fehler bei der Auswertung geringgehalten werden.

Jeder Schritt wurde zuvor an mehreren charakteristischen Bildern getestet und angepasst. Die gewonnenen Einstellungen wurden für die Auswertung für alle Bilder übernommen.

Die Auswertung erfolgte nach folgendem Ablauf: Das Bild wurde manuell in Fiji eingefügt. Automatisch öffnete sich das *Bio formats plugin*, worüber die einzelnen Farbkanäle des Bildes aufgetrennt werden konnten. Dann wurde der Farbkanal c=2 gewählt und das Makro gestartet.

Zur weiteren Verarbeitung wurde der Farbkanal "1" ausgewählt. Als nächstes wurde das Bild in ein 8-bit Bild konvertiert. Durch die *Pseudo flat field correction* wurden 2D Bildartefakte, die z.B. durch eine zweite Raumlichtquelle beim Mikroskopieren auftreten, korrigiert.

Nun folgten mehrere Bildoptimierungsschritte unter der Anwendung eines passenden Schwellenwertes (*Threshold*) für das Bild: Der Kontrast wurde angehoben, um eine bessere Erfassung der filigranen Adipozytengrenzen zu ermöglichen. Zusätzlich wurde das Hintergrundrauschen im Bild reduziert. Die *Fill Holes*-Funktion sorgt für ein Auffüllen von

kleinen Lücken im Hintergrund. Durch die *Watershed Irregular Features*-Funktion können angrenzende Objekte voneinander getrennt und als zwei separate Objekte erkannt werden. Als nächstes fand der erste manuelle Schritt zur Überprüfung der Auswertung statt. Hierbei konnten defekte Adipozyten oder Paraffinlücken im Schnitt, die sonst als Adipozyt gewertet würden, erkannt und manuell gelöscht werden.

Nun erfolgte die erste Auswertung des Bildes. Die zu untersuchenden Adipozyten wurden erfasst und gezählt. Gleichzeitig wurden für die erste Auswertung der ROI Manager und die Auswertungstabelle gelöscht, da sich ein zweiter manueller Auswertungsschritt hieran anschloss. Zuvor fand noch eine Bildinvertierung des Hintergrundes statt, sodass die Objekte für die Auswertung schneller erkannt werden und eventuelle Risse in den Adipozytenmembranen leichter und schneller bei der manuellen Überprüfung erkannt werden können.

Anschließend fand die zweite manuelle Auswertung statt und alle erhobenen Daten, inklusive der *ROIs* des Bildes, wurden dem Nutzer präsentiert. Diese konnten nun manuell abgespeichert und für die weitere Auswertung verwendet werden.

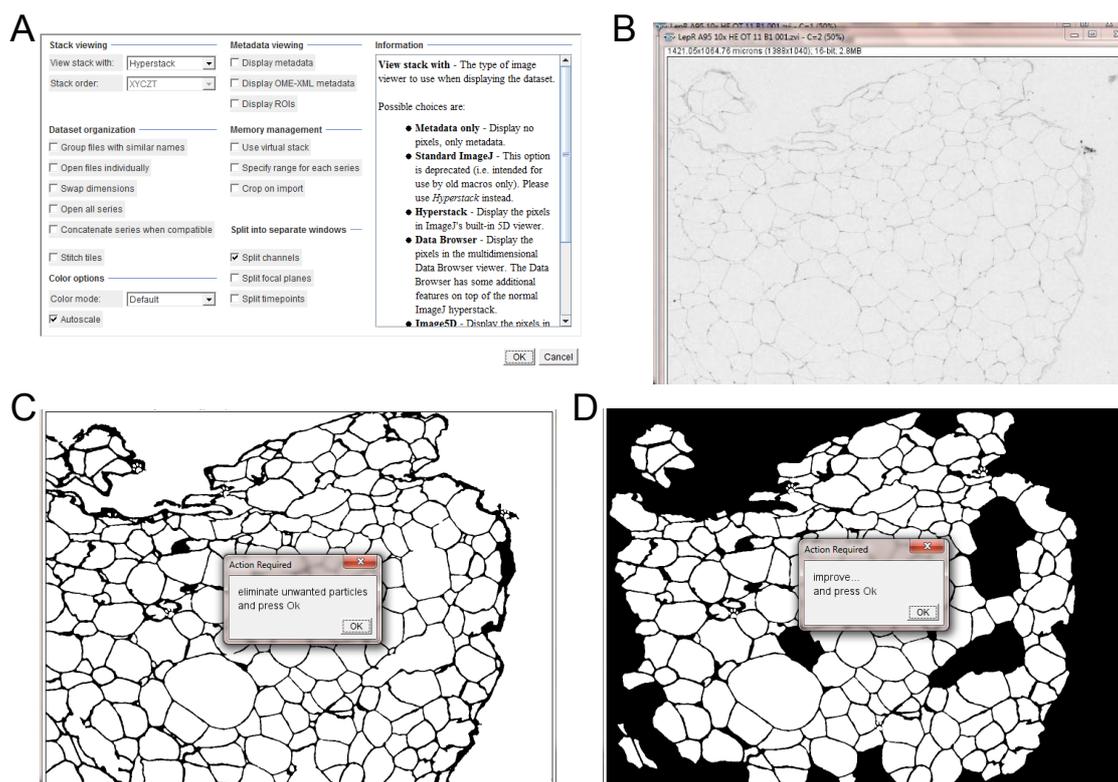


Abbildung 9 Auswertungsschritte des *Fiji*-Makros für Adipozyten

Dargestellt sind verschiedene Auswertungsschritte des *Fiji*-Makros. Nachdem das Bild eingefügt wurde, werden die Farbkanäle des Bildes mit Hilfe des *Bio format plugins* aufgespalten (A). Die einzelnen Kanäle sind in (B) dargestellt. Unter (C) ist der erste manuelle Sortierschritt gezeigt. In (D) wurden bereits randständige Adipozyten ausgeschlossen und eine erneute manuelle Überprüfung, ob alle defekten Adipozyten ausgeschlossen wurden, durchgeführt.

2.10.3 Viszerales Fettgewebe

Um substanz- und modellspezifische Unterschiede einer pharmakologischen Thrombin-Inhibition auf die Morphologie und Inflammation des Fettgewebes festzustellen, wurde im viszeralen Fettgewebe von *Ldlr*^{-/-}- und *LepR*^{db/db}-Tieren die Größe der Adipozyten und das Vorkommen von Makrophagen an HE- und MAC2-gefärbten Schnitten untersucht.

Mittels *Axiovision Software* (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) wurden die Schnitte mikroskopiert und bei gleicher Belichtungszeit, Raumhelligkeit und Vergrößerung Aufnahmen angefertigt. In zehnfacher Vergrößerung wurden jeweils drei Bilder pro Schnitt für die Färbungen MAC2 und HE angefertigt. Mittels des programmierten Makros fand die Auswertung der Adipozytengröße und der Anzahl der Adipozyten statt. *Crown-like structures* wurden manuell pro Bild ausgezählt und zur besseren Vergleichbarkeit auf eine Anzahl pro 100 Fettzellen berechnet. Die Aufnahmen und Auswertungen erfolgten zu jeder Zeit verblindet.

2.10.3.1 Adipozytengröße

Um die Adipozytengröße zu ermitteln, wurde das unter 2.10.2 beschriebene Makro verwendet. Alle randständigen und zerrissenen Adipozyten und Risse im Paraffinblock gingen nicht in die Auswertung mit ein. Die Adipozytengrößen wurden anschließend in Excel weiterverarbeitet und mittels der Histogramm-Funktion nach Größe (in μm^2) klassifiziert. Eine Darstellung der Ergebnisse erfolgte zur besseren Veranschaulichung zusätzlich prozentual. Sowohl die totale Anzahl, als auch die prozentual ermittelte Verteilung der Adipozytengröße wurde in *GraphPad PRISM 6.0* (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) eingetragen und als Graph dargestellt.

2.10.3.2 Crown-like structures

In fünffacher Vergrößerung wurden Aufnahmen vom viszeralen Fettgewebe angefertigt und anhand der MAC2 gefärbten Schnitte die Anzahl der CLS ausgezählt. Drei Bilder wurden pro Schnitt angefertigt und ausgezählt. Randständige CLS und zerrissene CLS sind nicht mit in die Zählung eingegangen. Die Auszählung erfolgte stets verblindet und für alle gefärbten Proben am gleichen Tag, um eine unbewusste Beeinflussung zu vermeiden.

2.10.3.3 Beige und braune Fettzellinseln

In fünffacher Vergrößerung wurden Aufnahmen von HE-gefärbten Schnitten des viszeralen Fettgewebes gemacht. Jeder Schnitt wurde komplett auf Fettzellinseln mit der Morphologie von beigem oder braunem Fettgewebe untersucht. Es wurde für jeden Schnitt eine Stichprobe von drei Bildern in fünffacher Vergrößerung angefertigt.

2.10.4 Aortaler Ursprung

Von den Herzen wurden konsekutive Schnitte ab der Aortenursprungsebene bis zum Verlassen der Klappenebene angefertigt. In den Schnitten wurden vier Ebenen im Abstand von 30 μm für die folgenden Färbungen benutzt (**Abbildung 7**).

2.10.4.1 Plaqueanteil

Das in Paraffin eingebettete, geschnittene und gefärbte Herzgewebe wurde für jede Färbung mit der gleichen Belichtungszeit, Raumhelligkeit und Vergrößerung mikroskopiert und fotografiert. Dabei wurden Übersichtsaufnahmen mit fünffacher Vergrößerung und zusätzlich Detailaufnahmen von jeder Taschenklappe mit zehnfacher Vergrößerung mit der *ZEN 2 pro Software* (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen.

Die anschließende Auswertung erfolgte für jede Färbung am gleichen Tag vollständig und verblindet, um eine Reliabilität zu gewährleisten.

Mittels *Fiji-Software* wurden der Aortenursprung und die Plaques umrandet, um anschließend die Gesamtfläche des Aortenursprungs und die Plaquefläche zu berechnen. Diese wurde für alle vier verschiedenen Färbungen am gleichen Tag nach denselben Kriterien ausgewertet. Durch den Quotienten aus der Plaquegesamtfläche und der Aortenursprungsfläche (in μm^2) wurde der prozentuale Anteil der Plaquefläche im Aortenursprung ermittelt.

2.10.4.2 Kollagen

Über die *Fiji-Funktion split channels* wurden die einzelnen Farbkanäle der Aufnahmen unter polarisiertem Licht jeder Taschenklappe getrennt. Der blaue Kanal wurde verworfen und nur die rot- und grün-polarisierten Kanäle wurden ausgewertet. Der rot-polarisierte Kanal entspricht dicht gepacktem, älterem Kollagen. Der grün-polarisierte Kanal stellt hingegen locker gepacktes, neues Kollagen dar. Für jede Taschenklappe wurde einzeln der Kollagenanteil sowohl im grünen als auch im roten Kanal ermittelt und mit der Plaquefläche verrechnet (in Prozent).

2.10.4.3 Biglykan und MAC2

Über das *Color Deconvolution Tool* von *Fiji* konnte bei der MAC2 Färbung der Anteil an Makrophagen und bei der Biglykan Färbung der Anteil von Biglykan ermittelt werden. Dafür wurde in zehnfacher Vergrößerung jede Taschenklappe einzeln ausgewertet und anschließend der Anteil an Makrophagen und an Biglykan im Plaque (in Prozent) berechnet.

2.10.5 Aorten

Die Auswertung fand mittels *Fiji* statt. Dabei wurde für alle Aorten ein gemeinsamer Schwellenwert festgelegt. Die ausgewertete Fläche beinhaltete bei allen Proben die *Aorta ascendens*, *Aorta descendens* und *Aorta abdominalis* bis knapp distal der Abgänge der *Aa. renales*. Anhand des festgelegten Schwellenwerts konnte der Plaqueanteil (in Prozent) der Fläche der Aorta berechnet werden.

2.11 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit der Software *GraphPad PRISM 6.0* (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) ausgewertet. Ausreißer wurden mittels *Grubbs test* ermittelt. Die Datensätze wurden mittels ungepaarten, doppelseitigem t-Test oder nicht-parametrischem *Mann-Whitney test* auf Signifikanz getestet. Die Häufigkeiten der braunen oder beigen Fettzellinseln wurden anhand von Kontingenztabelle bestimmt und mittels *Fisher's exact test* statistisch ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem Wert $p < 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Die Effekte einer Thrombin-Inhibition im Adipositasmodell (*LepR^{db/db}*-Tiere)

3.1.1 Einfluss einer Thrombin-Inhibition mittels Argatroban oder Dabigatran auf das Gewicht in *LepR^{db/db}*-Tieren

Um eine Beeinflussung einer Thrombin-Inhibition auf das Körpergewicht und den BMI auszuschließen, wurden die *LepR^{db/db}*-Tiere wöchentlich gewogen (**Abbildung 10**). Bei allen Behandlungsgruppen konnte am Ende der Versuchsreihen kein signifikanter Unterschied in Gewicht, Länge und ermitteltem BMI festgestellt werden (**Abbildung 11**).

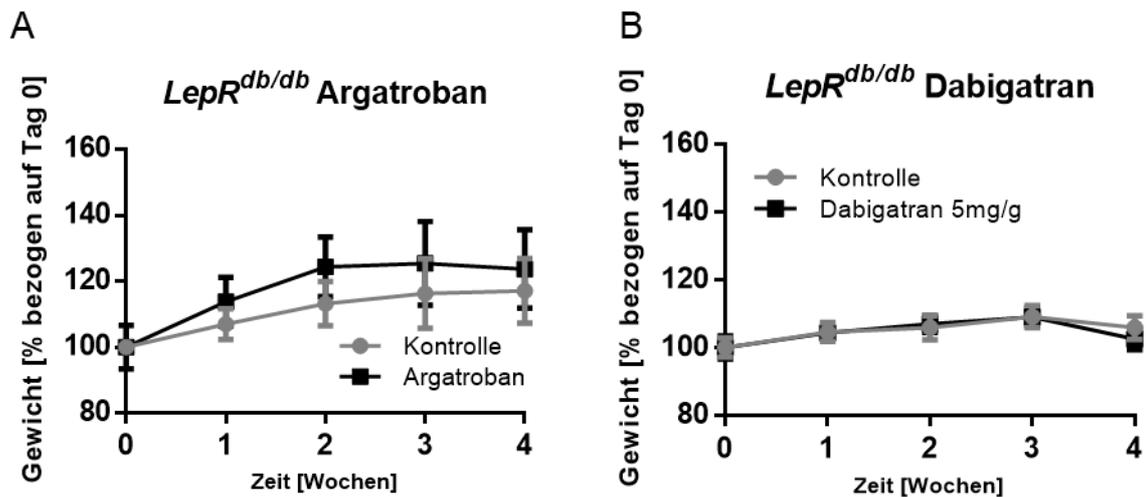
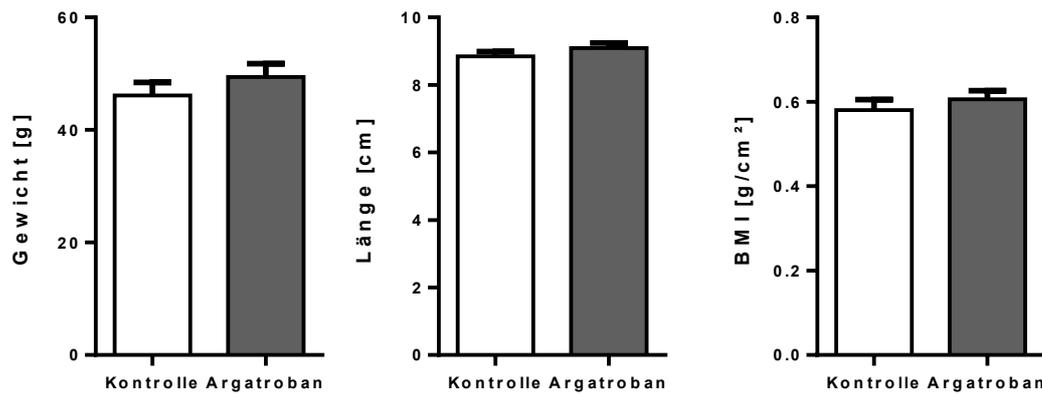


Abbildung 10 Kein Effekt der Thrombin-Inhibition auf das Gewicht der *LepR^{db/db}*-Tiere

Weibliche, 10 Wochen alte *LepR^{db/db}*-Tiere wurden für 4 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) bzw Dabigatran (5mg/g Futter) behandelt. Dargestellt sind die Gewichtsverlaufskurven in % bezogen auf Tag 0 von (A) *LepR^{db/db}*-Tieren unter Argatroban-Behandlung, n = 3,3 und (B) *LepR^{db/db}*-Tieren unter Dabigatran-Behandlung, n = 7,8.

A *LepR^{db/db}* Argatroban



B *LepR^{db/db}* Dabigatran

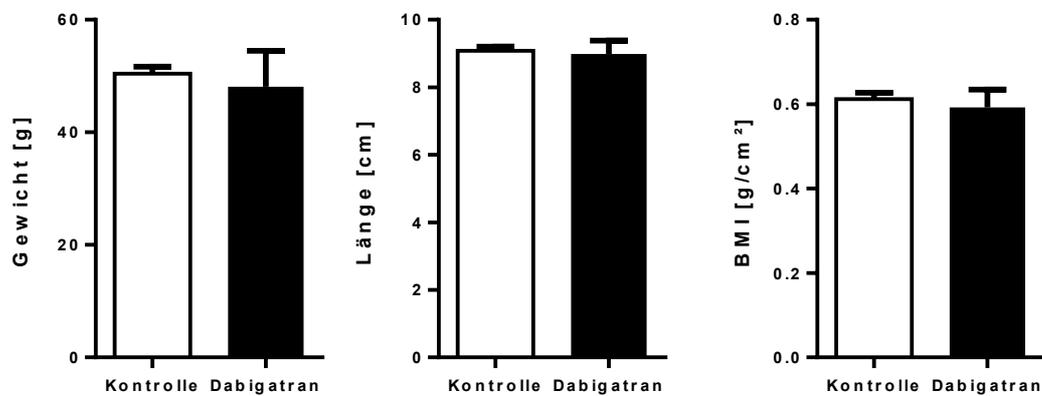


Abbildung 11 Kein Effekt einer Thrombin-Inhibition auf das Gewicht, die Länge oder den BMI bei *LepR^{db/db}*-Tieren am Ende der Versuchsreihen

Weibliche, 10 Wochen alte *LepR^{db/db}*-Tiere wurden für 4 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) bzw Dabigatran (5mg/g Futter) behandelt. Am Versuchsende wurden das Endgewicht [g], die Endlänge [cm] und der daraus ermittelte BMI [g/cm²] in (A) *LepR^{db/db}* unter Argatroban-Behandlung im Alter von 14 und in (B) *LepR^{db/db}* unter Dabigatran-Behandlung im Alter von 14 Wochen bestimmt. Mittelwert \pm SEM, (A) n = 7,8; (B) n = 10,11; p < 0,05

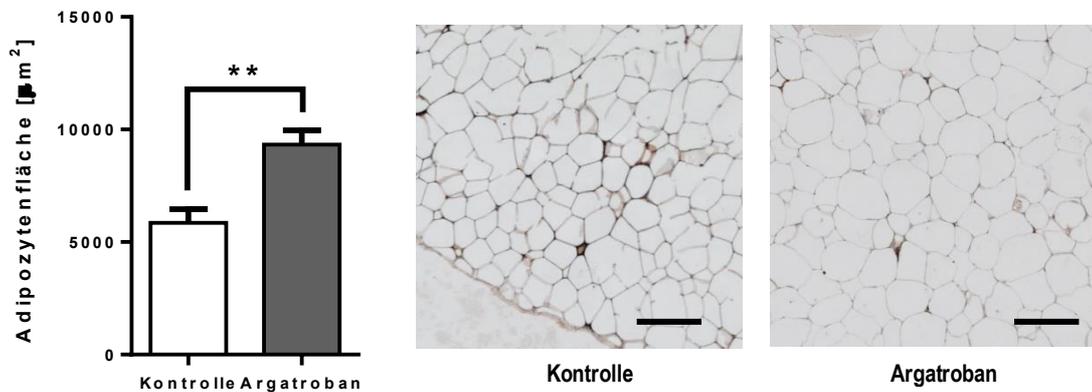
3.1.2 Einfluss auf die Adipozytenmorphologie in *LepR^{db/db}*-Tieren

Um den Einfluss von Thrombin auf die Fettzellgröße und die Veränderung auf zellulärer Ebene im viszeralen Fettgewebe zu untersuchen, wurde das Diabetesmodell (*LepR^{db/db}*-Tiere) mit direkten Thrombin-Inhibitoren, wie im Material und Methodenteil beschrieben, behandelt.

Als erstes wurde der Effekt von Thrombin auf die Adipozytenmorphologie untersucht. Dazu wurden HE Färbungen von viszeralem Fettgewebe angefertigt und eine quantitative Auswertung mittels eines Makros vorgenommen (**Abbildung 12**).

Bei $LepR^{db/db}$ -Mäusen unter Argatroban-Behandlung stellte sich ein signifikanter Anstieg der Adipozytenfläche [in μm^2] im Vergleich zu den Placebotieren dar. Bei $LepR^{db/db}$ -Mäusen ($p=0,0059$) unter Dabigatran-Behandlung konnte dagegen kein signifikanter Unterschied ($p=0,5487$) in Bezug auf die Größe der Adipozytenfläche festgestellt werden.

A $LepR^{db/db}$ Argatroban



B $LepR^{db/db}$ Dabigatran

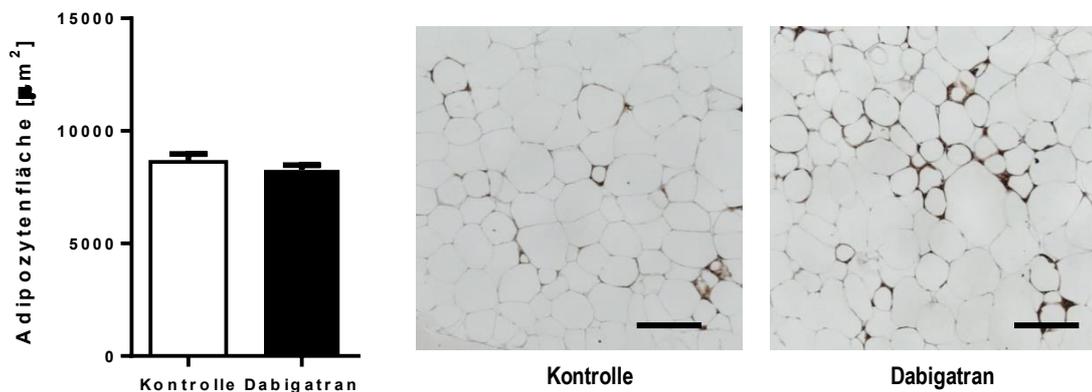


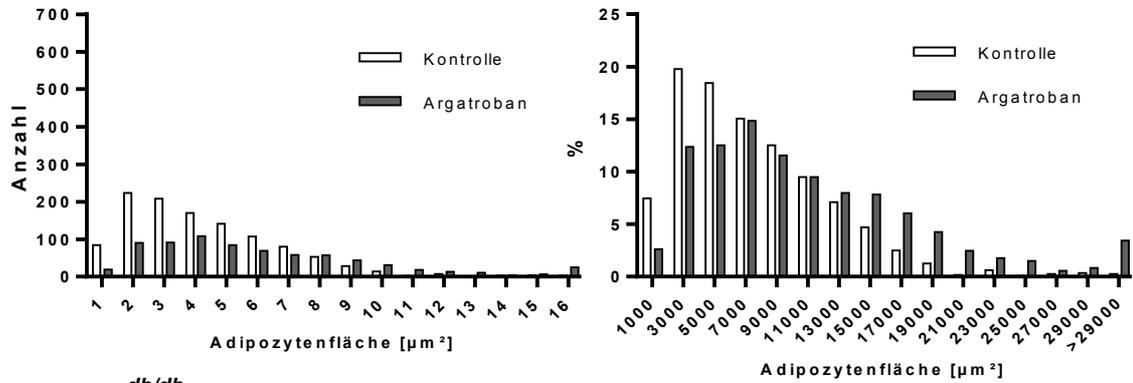
Abbildung 12 Unterschiedliche Effekte auf die Adipozytengröße unter Behandlung mit Argatroban und Dabigatran bei $LepR^{db/db}$ -Tieren

Weibliche, 10 Wochen alte $LepR^{db/db}$ -Tiere wurden für 4 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) bzw Dabigatran (5mg/g Futter) behandelt. Gezeigt sind die durchschnittliche Adipozytenfläche in μm^2 und repräsentative Bilder des viszeralen Fettgewebes in MAC2 Färbung von (A) $LepR^{db/db}$ unter Argatroban-Behandlung und (B) $LepR^{db/db}$ unter Dabigatran-Behandlung. Maßstabsbalken: 200 μm , 10x Vergrößerung, Mittelwert \pm SEM, (A) $n = 7,8$; (B) $n = 10,11$; $**P < 0,01$

Ebenfalls ergab sich in der prozentualen Verteilung der Adipozytenfläche von $LepR^{db/db}$ -Mäusen eine Verschiebung zu größeren Adipozyten unter Argatroban-Behandlung (**Abbildung 13**). Die Placebotiere wiesen eine Fläche um 3000 – 11000 μm^2 auf, wohingegen bei den behandelten Tieren eine Fläche von 3000 – 17000 μm^2 beobachtet werden konnte. Die $LepR^{db/db}$ -Mäuse unter Dabigatran-Behandlung zeigten keinen

Unterschied in der prozentualen Verteilung und der Streuung der Adipozyten zwischen den Tieren.

A *LepR^{db/db}* Argatroban



B *LepR^{db/db}* Dabigatran

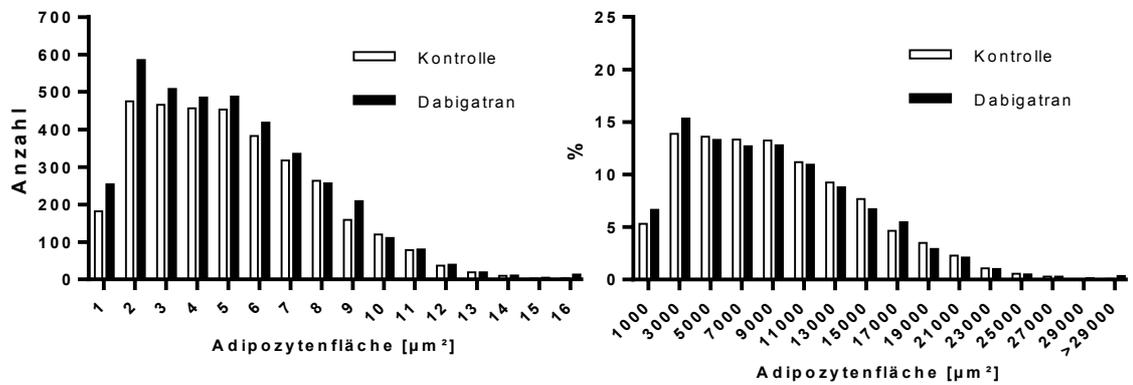


Abbildung 13 Absolute und prozentuale Verteilung der Adipozytengrößen

Weibliche, 10 Wochen alte *LepR^{db/db}*-Tiere wurden für 4 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) bzw Dabigatran (5mg/g Futter) behandelt. Dargestellt ist die absolute und die relative Verteilung der Adipozytenfläche des viszeralen Fettgewebes von (A) *LepR^{db/db}* unter Argatroban-Behandlung und (B) *LepR^{db/db}* unter Dabigatran-Behandlung. Mittelwert \pm SEM, (A) n = 7,8; (B) n = 10,11; p < 0,05

3.1.3 Crown-like structures in $LepR^{db/db}$ -Tieren

Um den Einfluss von Thrombin auf das Vorkommen von Immunzellen im viszeralen Fettgewebe zu untersuchen, wurde eine Makrophagen-spezifische immunhistochemische MAC2 Färbung angefertigt (**Abbildung 14**). Im Fettgewebe sammeln sich Makrophagen um apoptotische Adipozyten an. Die charakteristische Färbung dieser Ansammlungen wird in der Literatur als *Crown-like structures* (CLS) bezeichnet, da die Makrophagen die Adipozyten wie eine Krone umgeben ¹¹⁶.

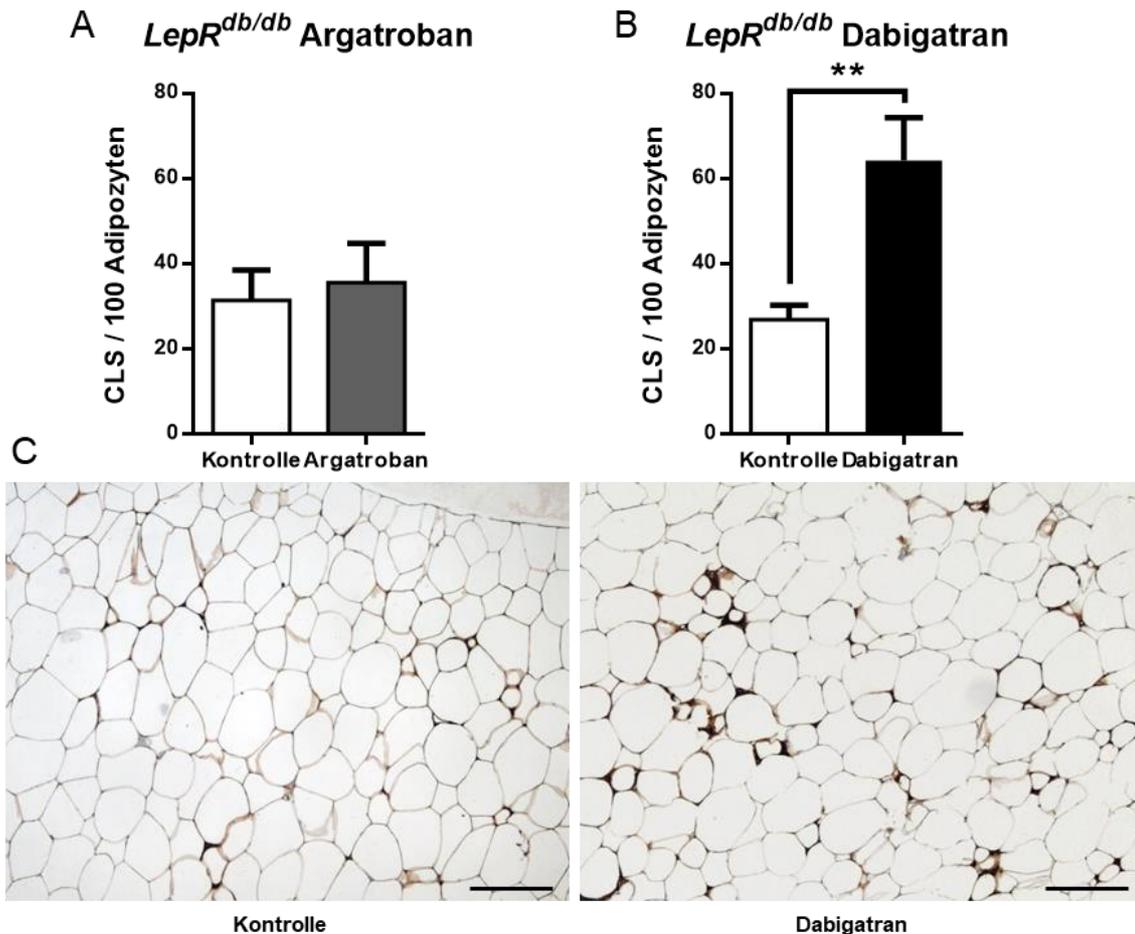


Abbildung 14 Signifikanter Anstieg der *Crown-like structures* (CLS) pro 100 Adipozyten unter Dabigatranbehandlung in $LepR^{db/db}$ -Tieren

Weibliche, 10 Wochen alte $LepR^{db/db}$ -Tiere wurden für 4 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) bzw Dabigatran (5mg/g Futter) behandelt. Gezeigt ist die Anzahl der CLS pro 100 Adipozyten in (A) $LepR^{db/db}$ unter Argatroban-Behandlung und (B) $LepR^{db/db}$ unter Dabigatran-Behandlung. In (C) ist eine repräsentative MAC2 Färbung des viszeralen Fettgewebes der mit Placebo (Bild links) oder Dabigatran (Bild rechts) behandelten $LepR^{db/db}$ -Tiere dargestellt. Maßstabsbalken: 200 μ m, 10x Vergrößerung, Mittelwert \pm SEM, (A) n = 7, 8; (B) n = 10, 11; p < 0,05

Auch hier gab es deutliche Unterschiede zu beobachten: während $LepR^{db/db}$ -Tiere unter Dabigatran-Behandlung eine signifikant höhere Anzahl an CLS aufwiesen (p=0,0045), war bei $LepR^{db/db}$ -Tieren unter Argatroban-Behandlung hinsichtlich des Vorkommens von CLS

im Vergleich zu den Placebotieren ($p=0,8454$) kein signifikanter Unterschied zu beobachten.

3.2 Die Effekte einer Thrombin-Inhibition im atherosklerotischen Mausmodell (*Ldlr*^{-/-}-Tiere)

3.2.1 Einfluss einer Thrombin-Inhibition auf das Gewicht in *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatrobanbehandlung

Im Verlauf der Behandlung wurden die Tiere gewogen (**Abbildung 15**). Bei allen Behandlungsgruppen konnte am Ende der Versuchsreihen kein signifikanter Unterschied in Gewicht, Länge und ermitteltem BMI festgestellt werden

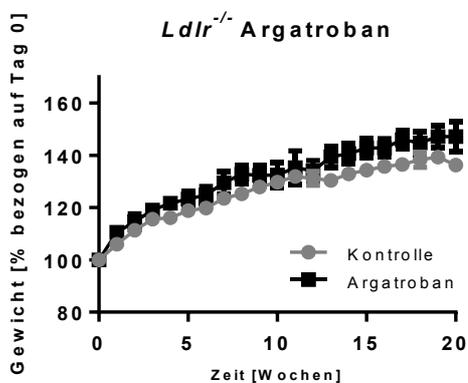


Abbildung 15 Kein Effekt der Thrombin-Inhibition auf das Gewicht der Tiere

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Dargestellt ist die Gewichtsverlaufskurve in % bezogen auf Tag 0 von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung, n = 13,13.

3.2.2 Einfluss auf die Adipozytenmorphologie im *Ldlr*^{-/-}-Modell

Um den Einfluss von Thrombin auf die Fettzellgröße und die Veränderung auf zellulärer Ebene im viszeralen Fettgewebe zu untersuchen, wurden beide Mauslinien mit direkten Thrombin-Inhibitoren, wie im Material und Methodenteil beschrieben, behandelt.

Als erstes wurde der Effekt von Thrombin auf die Adipozytenmorphologie untersucht. Dazu wurden HE Färbungen von viszeralem Fettgewebe angefertigt und eine quantitative Auswertung mittels eines Makros vorgenommen (**Abbildung 16**).

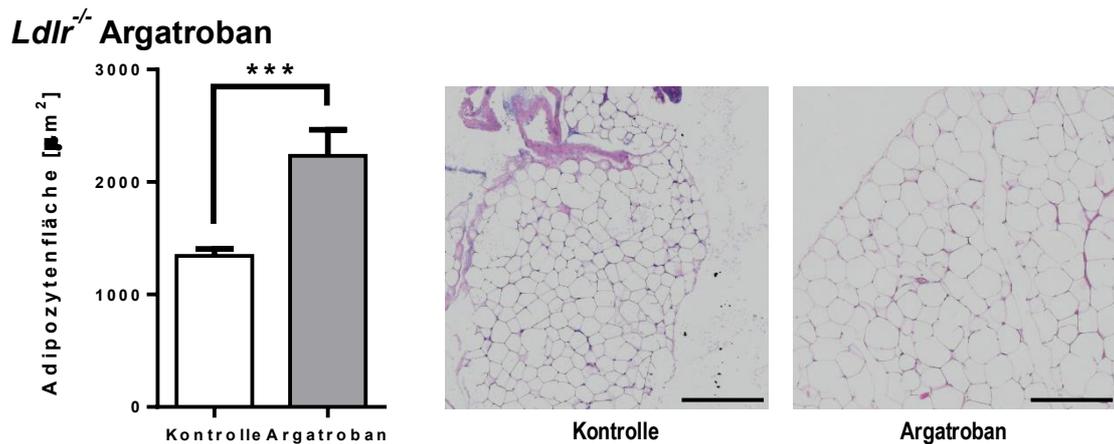


Abbildung 16 Signifikanter Effekt auf die Adipozytengröße unter Behandlung mit Argatroban in *Ldlr*^{-/-}-Tieren

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Gezeigt ist die durchschnittliche Adipozytenfläche in μm^2 und repräsentative Bilder des viszeralen Fettgewebes in HE Färbung von *Ldlr*^{-/-} unter Argatroban-Behandlung. Maßstabsbalken: 200 μm , 10x Vergrößerung, Mittelwert \pm SEM, n = 14,13 ***P<0.001

Ein signifikanter Anstieg der Adipozytenfläche [in μm^2] im Vergleich zu den Placebotieren zeigte sich unter Argatroban-Behandlung bei *Ldlr*^{-/-}-Mäusen (p=0,0002).

Hinsichtlich der Verteilung der Adipozytenfläche stellte sich unter Behandlung von *Ldlr*^{-/-}-Mäusen mit dem Wirkstoff Argatroban eine Verschiebung der Adipozytengröße zu größeren Adipozyten ein. Die Adipozytenfläche lag bei den Placebotieren um 500 – 3000 μm^2 , wohingegen die Fläche bei den behandelten Mäusen um 1000 – 4000 μm^2 lag (**Abbildung 17**).

Ldlr^{-/-} Argatroban

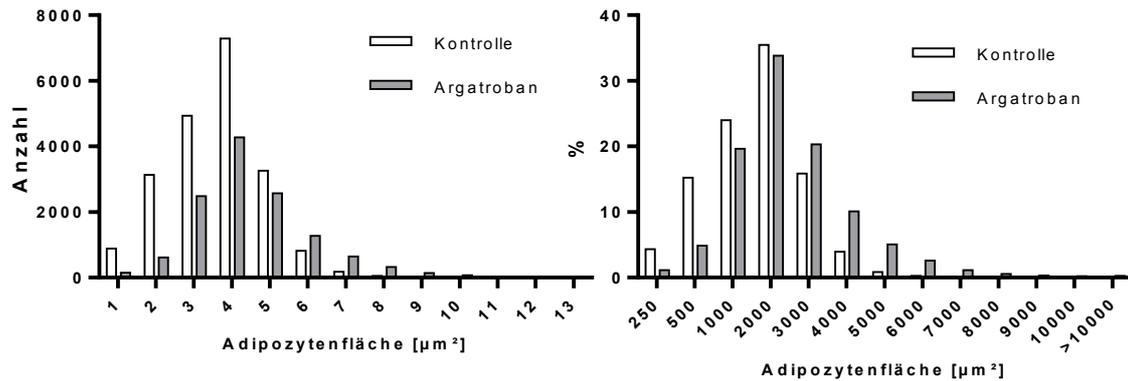


Abbildung 17 Absolute und prozentuale Verteilung der Adipozytengrößen bei *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatrobanbehandlung

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Dargestellt ist die absolute und die relative Verteilung der Adipozytenfläche des viszeralen Fettgewebes von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung. Mittelwert ± SEM, n=14,13; p < 0,05

3.2.3 Crown like structures in *Ldlr*^{-/-}-Tieren

Um den Einfluss von Thrombin auf das Vorkommen von Immunzellen im viszeralen Fettgewebe zu untersuchen, wurde eine Makrophagen-spezifische immunhistochemische MAC2 Färbung angefertigt (**Abbildung 18**). Im Fettgewebe sammeln sich Makrophagen um apoptotische Adipozyten an. Die charakteristische Färbung dieser Ansammlungen wird in der Literatur als *Crown-like structures* (CLS) bezeichnet, da die Makrophagen die Adipozyten wie eine Krone umgeben ¹¹⁶.

Die *Ldlr*^{-/-}-Tiere unter der Behandlung mit Argatroban wiesen signifikant weniger CLS auf (p=0,0046).

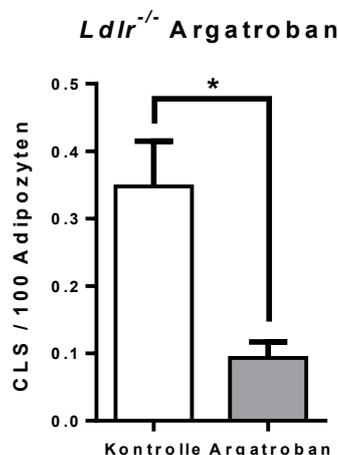


Abbildung 18 Signifikanter Abfall der *Crown-like structures* (CLS) pro 100 Adipozyten unter Argatrobanbehandlung in *Ldlr*^{-/-}-Tieren

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Gezeigt ist die Anzahl der CLS pro 100 Adipozyten in *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung. Mittelwert ± SEM, n = 14,13; p < 0,05

3.2.4 Lipidprofil in *Ldlr*^{-/-}-Tieren

In den *Ldlr*^{-/-}-Tieren wurde zusätzlich der HDL, VLDL/LDL und Gesamtcholesterinanteil ermittelt (**Abbildung 19**), um Unterschiede in der Zusammensetzung der Bluffettwerte und damit die Beeinflussung der Atheroskleroseentwicklung zu erfassen. Hierbei stellte sich in den Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied ein.

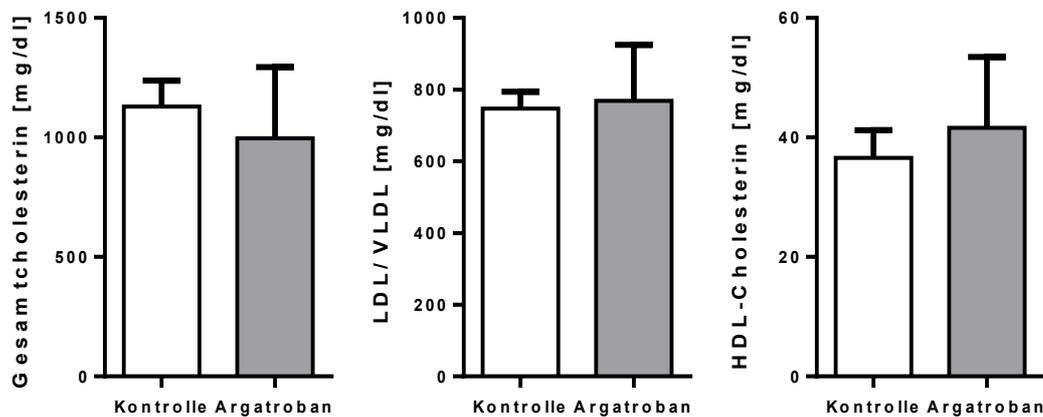


Abbildung 19 Kein Effekt des Cholesterin-ELISA von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Dann wurde ein ELISA zur Ermittlung des Gesamtcholesterins [mg/dl], des LDL/VLDL-Verhältnisses [mg/dl] und des HDL-Cholesterins [mg/dl] durchgeführt. Mittelwert \pm SEM, n = 5,5; p < 0,05

3.2.5 Blutzellzusammensetzung in *Ldlr*^{-/-}-Tieren

Ebenso konnte bei den untersuchten Tieren kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der im Blut zirkulierenden Leukozyten (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) (**Abbildung 20**) festgestellt werden.

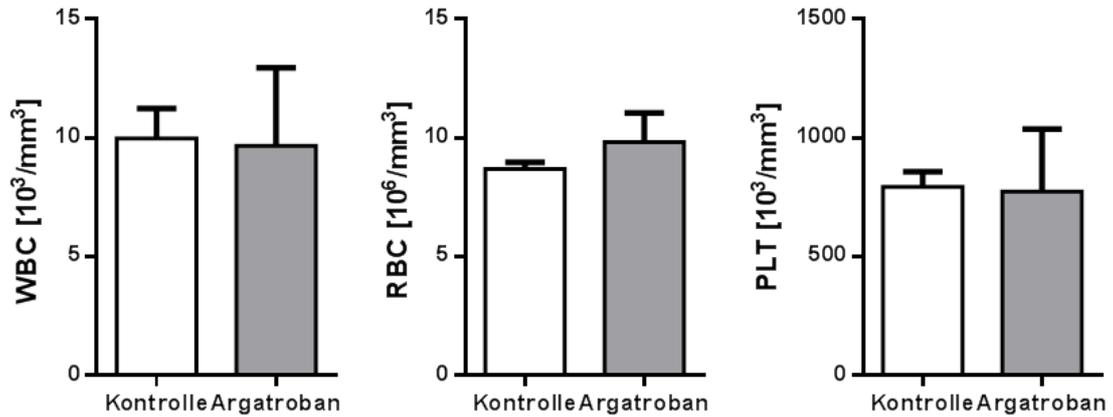


Abbildung 20 Kein Effekt auf die Anzahl der Blutzellpopulationen von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Dargestellt sind weiße Blutzellen (WBC), Erythrozyten (RBC) und Thrombozyten (PLT) unter Behandlung mit Argatroban bei *Ldlr*^{-/-}-Tieren. Mittelwert \pm SEM, n = 9,7; p < 0,05

3.2.6 Atherosklerotische Läsionen unter Einfluss einer Thrombin-Inhibition in *Ldlr*^{-/-}-Tieren

3.2.6.1 Plauefläche der präparierten Aorta in *Ldlr*^{-/-}-Tieren

Bei der Untersuchung der Plauefläche in den präparierten Aorten aus den *Ldlr*^{-/-}-Tieren konnte ein marginaler Trend ($p=0,2486$) zu einer verkleinerten Plauefläche in den mit Argatroban behandelten Tieren beobachtet werden (**Abbildung 21**).

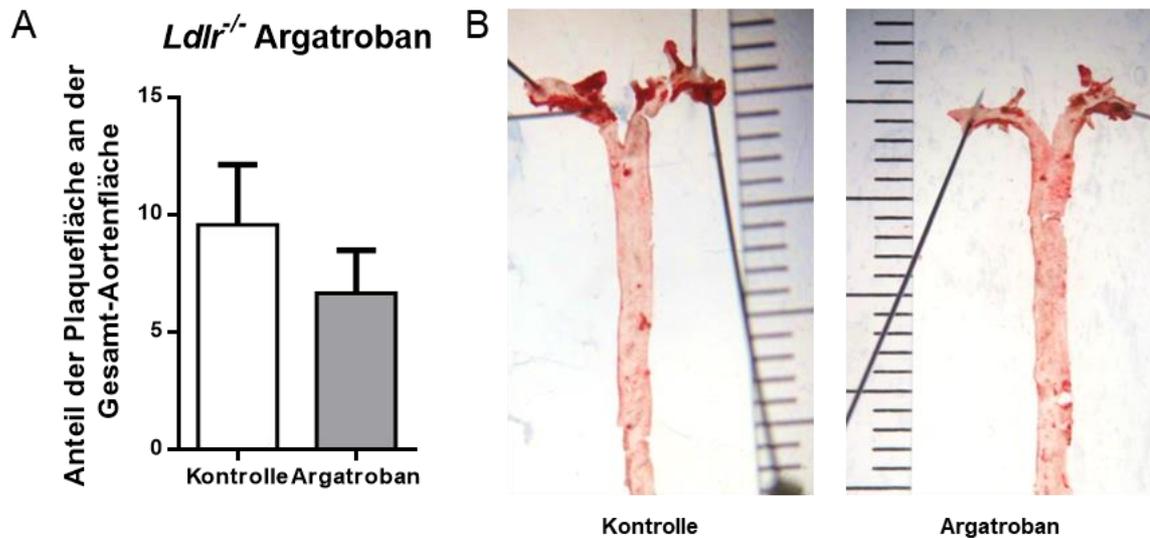


Abbildung 21 Kein Effekt von Argatroban auf die aortale Plauefläche in *Ldlr*^{-/-}-Tieren

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Gezeigt ist (A) der Anteil der Plauefläche an der Gesamt-Aortenfläche gemessen von der *Aorta ascendens* bis zu den Abgängen der *Aa. renales* in Prozent und (B) repräsentative Bilder einer Öl-Rot-O-Färbung von Kontrolltieren und mit Argatroban behandelten *Ldlr*^{-/-}-Tieren. Mittelwert \pm SEM, $n = 10,11$; * $p < 0,05$

3.2.6.2 Morphologie und Zellzusammensetzung aortaler Ursprünge in *Ldlr*^{-/-}-Tieren

Aus *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban- oder Placebo-Behandlung wurden Herzen entnommen, um diese auf Ebene der Aortenklappe zu untersuchen (**Abbildung 7**). Hierbei sollte der Einfluss von Thrombin auf die Plaque-Morphologie und die Plaque-Zusammensetzung untersucht werden.

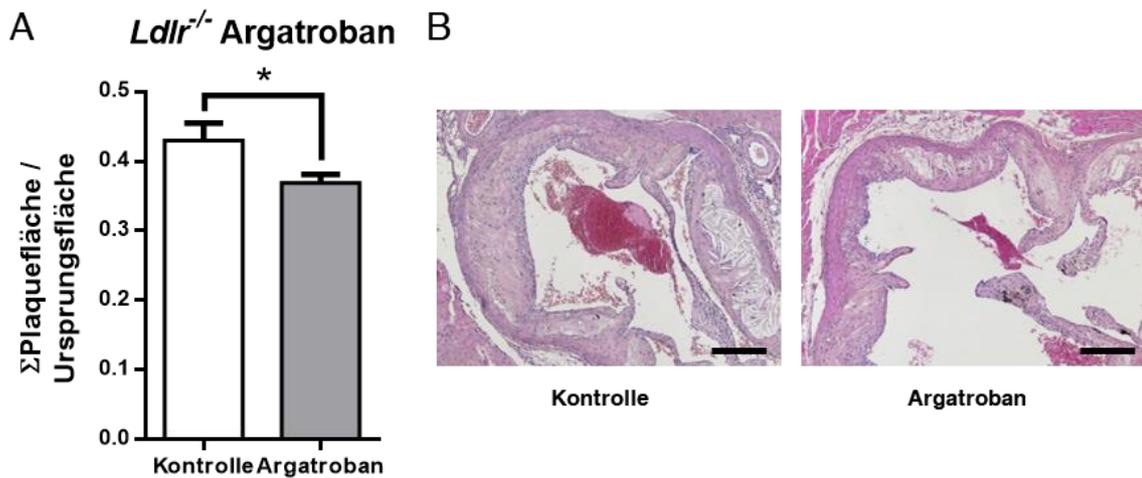


Abbildung 22 Signifikante HE Färbung des Aortenursprungs von *Ldlr*^{-/-}-Tieren

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Gezeigt sind (A) der prozentuale Anteil der Plaquefläche an der Gesamtursprungsfläche und (B) repräsentative Bilder der HE Färbung des Aortenursprungs von *Ldlr*^{-/-}-Mäusen unter Argatroban-Behandlung. Maßstabsbalken: 200 μm , 5x Vergrößerung, Mittelwert \pm SEM, n = 6, 9; p < 0,05

In der HE-Färbung konnte unter Argatroban-Behandlung eine signifikant (p=0,02) kleinere Plaquefläche bezogen auf die Ursprungsfläche [in %] festgestellt werden (**Abbildung 22**). Dieses Ergebnis stellte sich in allen vier untersuchten Ebenen mit einem jeweiligen Abstand von 30 μm der verschiedenen Färbungen dar (**Abbildung 23**).

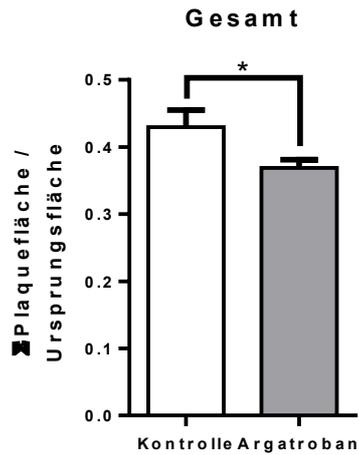


Abbildung 23 Signifikant geringere Plaquegröße in allen untersuchten Ebenen der Ursprungsfläche unter Argatrobanbehandlung in *Ldlr*^{-/-}-Tieren

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. In den Färbungen aller Ebenen zeigte sich jeweils eine signifikante Abnahme der Summe der Plaquefläche geteilt durch die Summe der Ursprungsfläche [in %]; $p < 0,05$

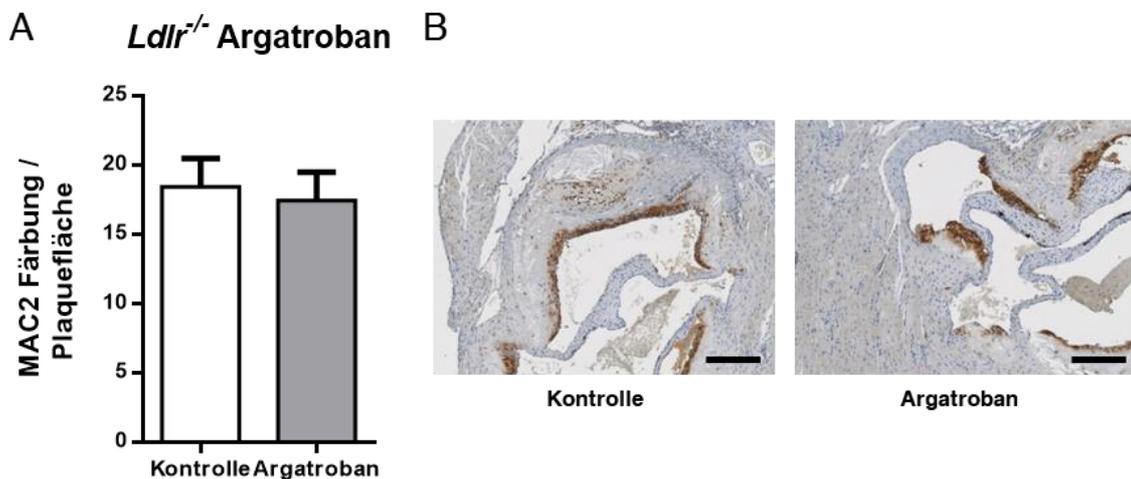


Abbildung 24 Kein Effekt der MAC2 Färbung im Aortenursprung von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatrobanbehandlung

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Gezeigt sind (A) der prozentuale Anteil der MAC2-gefärbten Fläche an der Gesamtplaquefläche und (B) repräsentative Bilder der MAC2 Färbung des Aortenursprungs von *Ldlr*^{-/-}-Mäusen unter Argatroban-Behandlung. Maßstabsbalken: 200 μm , 5x Vergrößerung, Mittelwert \pm SEM, $n = 6, 9$; $p < 0,05$

Durch die Anfärbung von Makrophagen mittels MAC2 wurden das Vorkommen und die Verteilung von Makrophagen im Plaque untersucht. Die Verteilung der Makrophagen im Plaque zeigte keinen Unterschied zwischen den behandelten Tieren und den Placebotieren. Die Makrophagen waren insbesondere auf der Plaquekappe, proximal zum Gefäßlumen, lokalisiert. Im Gesamtvorkommen der Makrophagen zeigte sich kein Effekt ($p=0,7652$) (**Abbildung 24**).

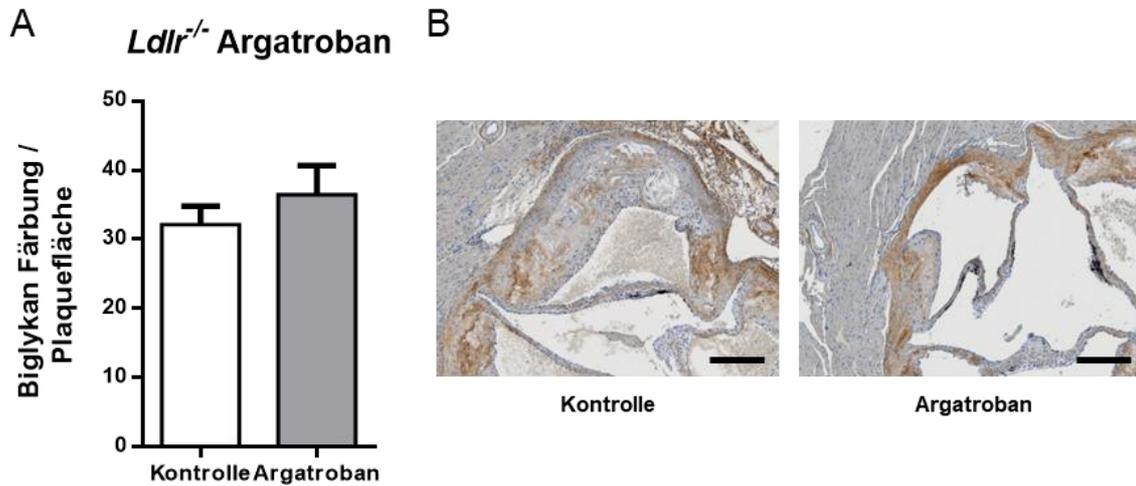


Abbildung 25 Kein Effekt der Biglykan Färbung der Plaquerfläche im Aortenursprung von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatrobanbehandlung

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Gezeigt sind (A) der prozentuale Anteil der Biglykan-gefärbten Fläche an der Plaquerfläche und (B) repräsentative Bilder der Biglykan Färbung des Aortenursprungs von *Ldlr*^{-/-}-Mäusen unter Argatroban-Behandlung. Maßstabsbalken: 200 μ m, 5x Vergrößerung, Mittelwert \pm SEM, n = 6, 9; p < 0,05

Hier wurden die Verteilung und das Gesamtvorkommen von Biglykan im Plaque untersucht. In der Verteilung von Biglykan konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen festgestellt werden. Keine Tendenz ($p=0,6549$) von prozentual mehr angefärbter Biglykan-Fläche zeigte sich in den mit Argatroban behandelten Tieren (**Abbildung 25**).

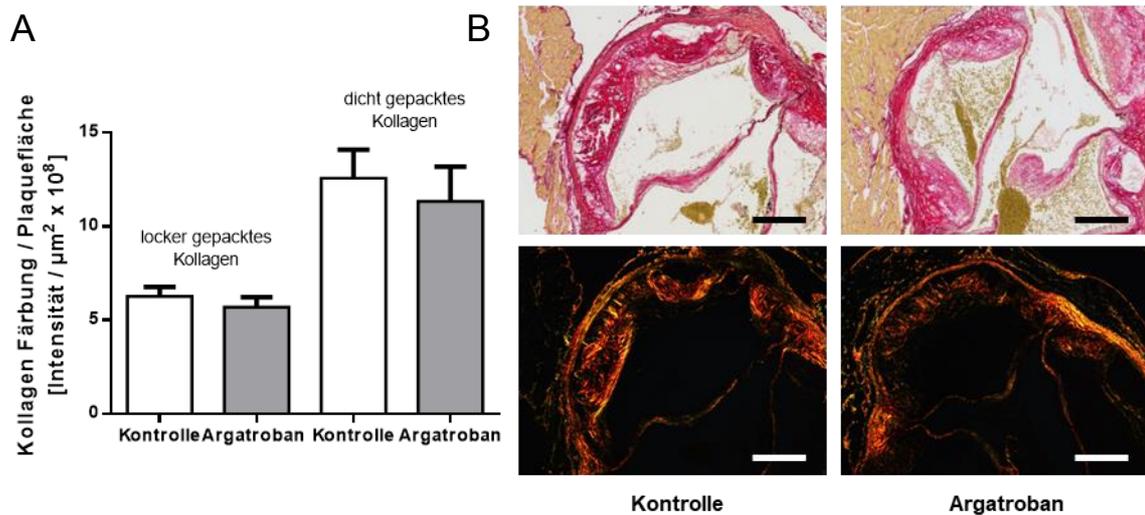


Abbildung 26 Kollagen Färbung des Aortenursprungs von *Ldlr*^{-/-}-Tieren

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Gezeigt sind (A) das Vorkommen von locker (grün) und dicht (rot) gepacktem Kollagen innerhalb der Plaques und (B) repräsentative Bilder der Kollagen Färbung unter nicht-polarisiertem (oben) und polarisiertem (unten) Licht des Aortenursprungs von *Ldlr*^{-/-}-Mäusen unter Argatroban-Behandlung. Maßstabsbalken: 200 μm , 5x Vergrößerung, Mittelwert \pm SEM, n = 6, 9; **P* < 0,05

Es konnte kein Unterschied in dem Vorkommen und der Verteilung von dicht und locker gepacktem Kollagen festgestellt werden (**Abbildung 26**).

3.2.7 Einfluss einer Thrombin-Inhibition auf das *beiging* in *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatrobanbehandlung

Zusätzlich wurde das viszerale Fettgewebe von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung auf das Vorkommen von Inseln mit gehäuftem Auftreten von multilokulären Fettzellen untersucht. Hier zeigte sich in der HE Färbung ein signifikant höheres Auftreten (*p*=0,0052) an Fettzellinseln mit der typischen Morphologie brauner Fettzellen unter Thrombin-Inhibition durch Argatroban versus Placebo (**Abbildung 27**).

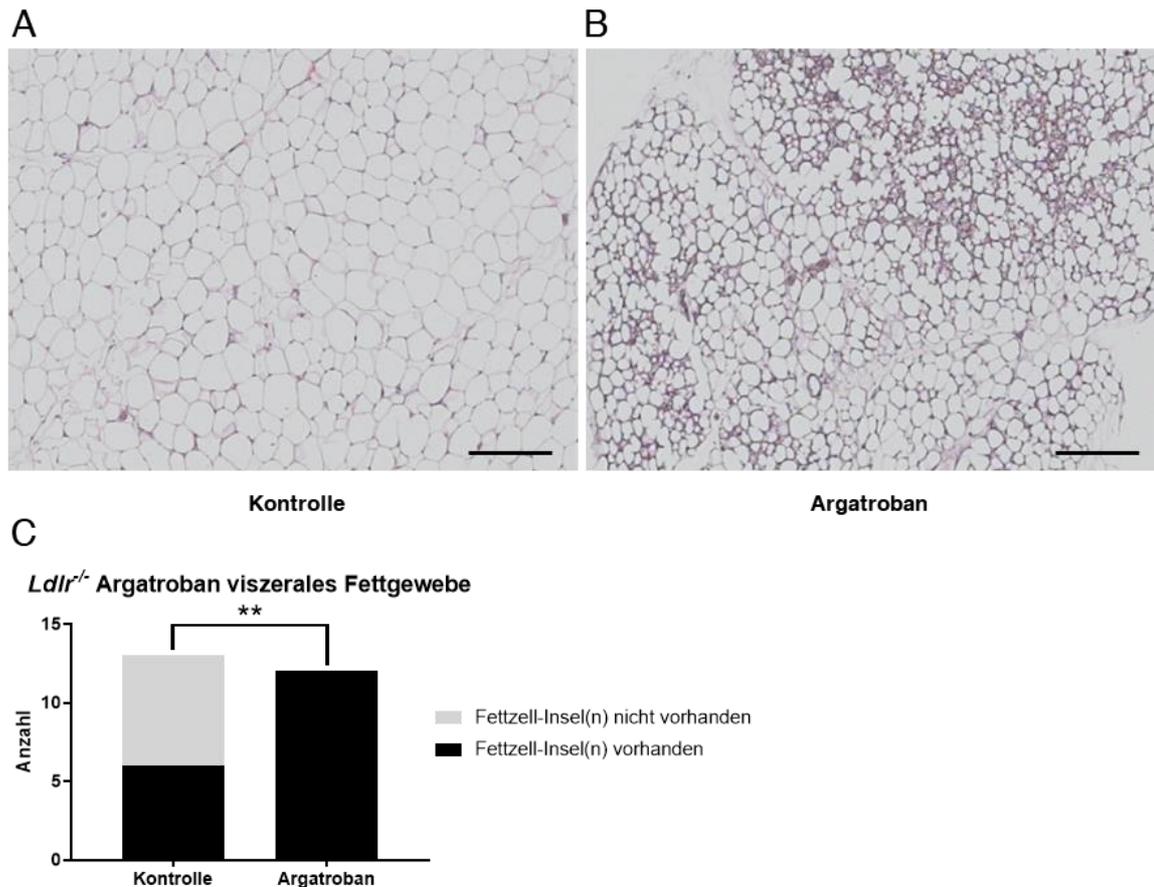


Abbildung 27 Vermehrtes Auftreten multilokulärer Fettzellinseln in *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. Viszerales Fettgewebe von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung wurde auf das Vorkommen von beigen oder braunen Fettzellinseln untersucht. In (A) ist eine repräsentative HE Färbung eines Placebotieres und in (B) eine repräsentative HE Färbung eines Tieres unter Argatroban-Behandlung dargestellt. Die statistische Auswertung (C) ergibt ein signifikant häufigeres Vorkommen von gefärbten Fettzellinseln unter Argatroban-Behandlung. Maßstabsbalken: 200 µm, 10x Vergrößerung, Mittelwert ± SEM, n = 13,12; p=0,0052

3.2.7.1 Die UCP-1-Färbung von Fettgewebe

In Schnitten des viszeralen Fettgewebes von *Ldlr*^{-/-}-Tieren fanden sich Fettzellinseln, die eine ähnliche Morphologie wie beiges oder braunes Fettgewebe zeigten. Das Vorkommen von braunen oder beigen Adipozyten im viszeralen Fettgewebe ist eher ungewöhnlich¹¹⁷ und ein *browning* von weißem Fettgewebe ist vor allem für subkutanes Fett beschrieben. Aus diesem Grund wurde nachfolgend das subkutane Fettgewebe von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung und unter Dabigatran-Behandlung auf das Vorkommen von *browning* untersucht. Hierzu wurden nach dem gleichen Schema wie bereits für das viszerale Fettgewebe histologische Schnitte angefertigt und auf den spezifischen Marker für braunes Fettgewebe, UCP-1, gefärbt, welcher in der Mitochondrienmembran des braunen Fettgewebes exprimiert wird.

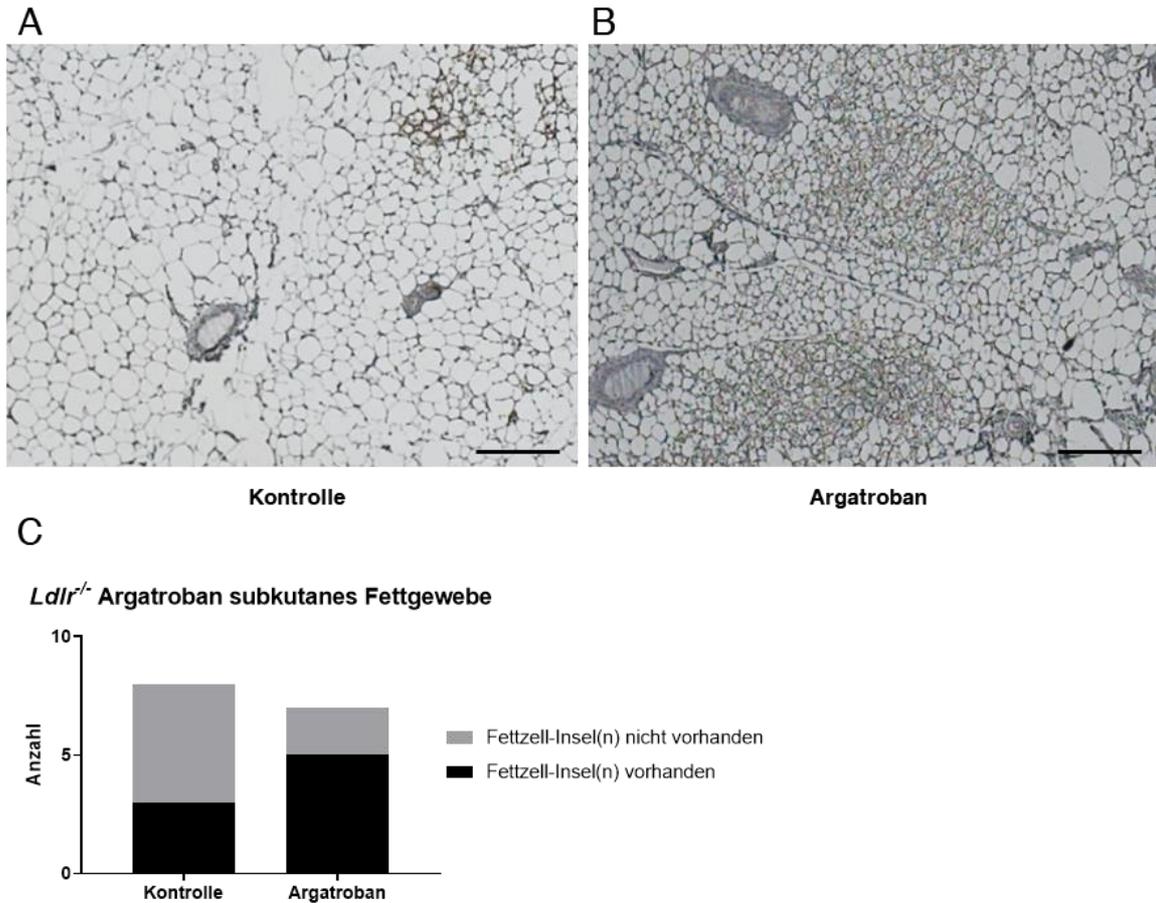


Abbildung 28 Trend zu mehr UCP-1 positiven Fettzellinseln des subkutanen Fettgewebes von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Argatroban (0,6 mg/kg KG/d) behandelt. In (A) ist eine repräsentative UCP-1 Färbung eines Placebotieres und in (B) eine repräsentative UCP-1 Färbung eines Tieres unter Argatroban-Behandlung gezeigt. In (C) stellt sich ein Trend zu mehr Fettzellinseln unter Argatroban-Behandlung dar. Maßstabsbalken: 200 µm, 10x Vergrößerung, Mittelwert ± SEM, n = 8,7; p > 0,05

Im subkutanen Fettgewebe von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung konnte ein Trend zu mehr Fettzellinseln unter Argatroban-Behandlung gesehen werden (**Abbildung 28**).

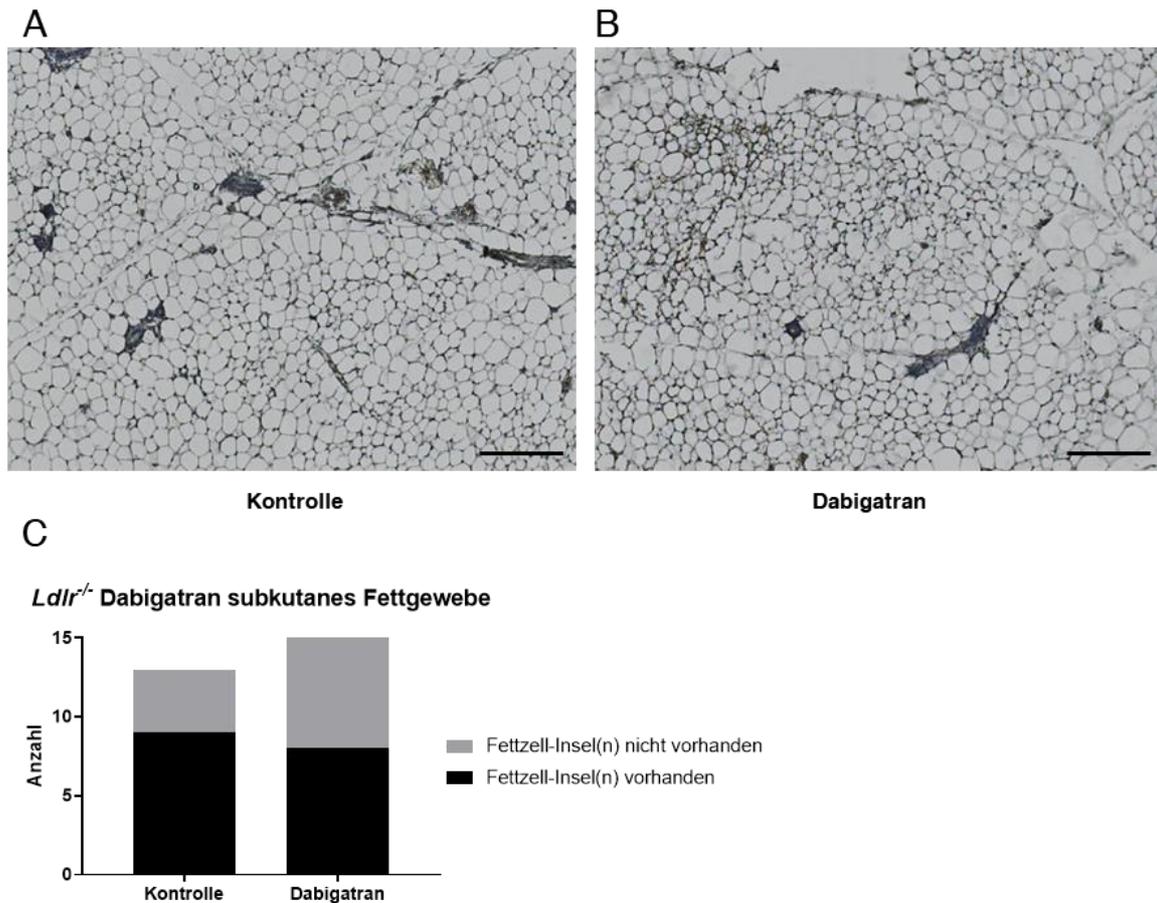


Abbildung 29 Kein Effekt in der UCP-1 Färbung des subkutanen Fettgewebes von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Dabigatran-Behandlung

Weibliche, 10 Wochen alte *Ldlr*^{-/-}-Tiere wurden für 20 Wochen mit Dabigatran (5mg/g Futter) behandelt. In (A) ist eine repräsentative UCP-1 Färbung eines Placebotieres und in (B) ist eine repräsentative UCP-1 Färbung eines Tieres unter Dabigatran-Behandlung gezeigt. In (C) stellt sich kein Trend unter Dabigatran-Behandlung dar. Maßstabsbalken: 200 μ m, 10x Vergrößerung, Mittelwert \pm SEM, n = 13,15; p > 0,05

Hingegen konnte bei *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Dabigatran-Behandlung im subkutanen Fettgewebe kein Trend festgestellt werden. Hier zeigte sich zwar sowohl bei Placebotieren als auch behandelten Tieren morphologisch beiges Fettgewebe, was jedoch in der Mehrzahl der Fälle nicht charakteristisch gruppiert, sondern über die Fettprobe verteilt vorlag. Nur in zwei Tieren fand sich die charakteristische Gruppierung des beigen Fettgewebes (**Abbildung 29**).

In *LepR*^{db/db}-Tieren unter Argatroban- und unter Dabigatran-Behandlung konnten hingegen keine Fettzellinseln im viszeralen Fettgewebe beobachtet werden.

4 Diskussion

4.1 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich im *LepR^{db/db}*-Modell Substanz-spezifische Effekte der beiden direkten Thrombininhibitoren: Während es unter Argatroban zu einer signifikanten Adipozytengrößenzunahme kam, zeigte eine Behandlung mit Dabigatran keinen signifikanten Unterschied in der Adipozytengröße von *LepR^{db/db}*-Mäusen.

Unter Argatrobanbehandlung stellte sich kein Effekt auf das Vorkommen an CLS im viszeralen Fettgewebe ein, hingegen kamen unter Dabigatranbehandlung signifikant mehr CLS im viszeralen Fettgewebe vor.

Der Argatroban-vermittelte Effekt auf die Morphologie der Fettgewebszellen ließ sich auch in *Ldlr^{-/-}*-Tieren bestätigen: trotz einer signifikanten erhöhten Adipozytengröße war das Fettgewebe eher antiinflammatorisch gekennzeichnet mit einem signifikant geringerem Vorkommen an Makrophagen und vermehrtem Vorkommen an beigen Fettzellinseln innerhalb des weißen Fettgewebes. Interessanterweise ließ sich hier auch eine signifikante Reduktion der Plaquegröße im aortalen Ursprung feststellen, so dass der antiinflammatorische Effekt der Argatroban-vermittelten Thrombin-Inhibition nicht ausschließlich Fettgewebs-spezifisch zu sein scheint.

Es trat kein Unterschied in der Körpergröße, Körperlänge und dem BMI zwischen allen Tiergruppen auf.

4.2 Das *LepR^{db/db}*-Modell unter Thrombin-Inhibition

4.2.1 Einfluss auf die Adipozytenmorphologie im *LepR^{db/db}*-Modell

Ob Thrombin bei immunologischen Prozessen und morphologischen Veränderungen eine wichtige Rolle im viszeralen Fettgewebe zukommt, wurde bereits 2010 von Mihara *et al.* untersucht ¹⁰³. In dieser Studie wurden männliche *LepR^{db/db}*-Tiere für vier Wochen mit 0,3 mg/kg pro Argatroban pro Tag behandelt. Hierbei trat bei adipösen Mäusen eine verstärkte Expression von Faktor VII im viszeralen Fettgewebe auf. Mihara *et al.* schlussfolgerten, dass es zu einer verstärkten Thrombinaktivierung im adipösen Organismus kommt. Unter Thrombin-Inhibition durch Argatroban wiesen Mihara *et al.*, wie auch Versuche in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Grandoch, einen antiinflammatorischen Effekt im Fettgewebe nach ¹¹⁸.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen stellten Mihara *et al.* unter Thrombin-Inhibition durch Argatroban eine signifikante Reduktion der Adipozytengröße fest. Dazu ermittelten Mihara *et. al* aus 5 Adipozyten innerhalb eines Gewebeschnittes die durchschnittliche Adipozytengröße. Der Unterschied zu den Ergebnissen der vorliegenden

Arbeit könnte durch die Auswertungsmethode von Mihara *et al.* bei der Bestimmung der Adipozytengröße bedingt sein. Die Forschungsgruppe benutzte ein Auswertungsverfahren, bei denen sie pro Gesichtsfeld 5 Adipozyten auswerteten. Diese Auswahl geschah willkürlich und kann eine unterbewusste Vorauswahl der ausgewerteten Adipozyten nicht ausschließen. Ein weiteres Problem dieser Auswertungsmethode ist die fehlende Berücksichtigung der Inhomogenität des Fettgewebes, die sich zum einen durch die unterschiedlichen Hypertrophiegrößen einzelner Adipozyten und zum anderen durch die dreidimensionale Raumanordnung von Adipozyten und damit einhergehender Anschnitte von Adipozyten ergibt. Im Unterschied zu Mihara *et al.* habe ich in der vorliegenden Arbeit versucht eine weniger fehleranfällige Auswertungsmethode zu entwickeln und mittels Fiji Software eine halbautomatische Auswertungsmethode programmiert, die die Größe aller erfassten intakten Adipozyten innerhalb eines *field of view* (FOV) ermittelt, damit eine größere Anzahl an Adipozyten ausgewertet werden konnte. Zusätzlich wurde eine unterbewusste Beeinflussung bei der Adipozytenauswahl und damit der systematische Fehler minimiert. Durch die größere Anzahl an ausgewerteten Adipozyten konnte die Heterogenität der Probe bezüglich der Adipozytengrößen durch z.B. Anschnitte ausgeglichen werden. Zusätzlich wurden pro Tier alle intakten Adipozyten aus 3 FOVs bezüglich der Adipozytengröße ausgewertet, sodass der Größendurchschnitt der Adipozyten durchschnittlich anhand 1200 Adipozyten im Gegensatz zu 5 Adipozyten pro Tier errechnet wurde.

Durch dieses halbautomatische Verfahren zeigte sich bei dieser Arbeit unter Argatroban-Behandlung eine signifikante Zunahme der Adipozytengröße, was ein konträres Ergebnis zu den Vorarbeiten von Mihara *et al.* darstellt.

Die vorliegende Arbeit und die Studie von Mihara *et al.*, wie auch weitere Untersuchungen der Forschungsgruppe von Frau Prof. Grandoch, konnten jedoch unter Thrombin-Inhibition im *Ldlr*^{-/-}-Modell einen antiinflammatorischen Effekt zeigen. Daraus lässt sich schließen, dass kein geschlechtsspezifischer Unterschied des antiinflammatorischen Einflusses durch eine Thrombin-Inhibition besteht.

Vorarbeiten in unserem Institut, durchgeführt von Frau Dr. Feldmann, wiesen unter Dabigatranbehandlung ebenfalls eine Adipozytenhypertrophie und einen antiinflammatorischen Effekt der Thrombin-Inhibition im *Ldlr*^{-/-}-Modell nach. Im Gegensatz dazu ergab eine Behandlung mit dem direkten Thrombininhibitor Dabigatran keinen signifikanten Unterschied in der Adipozytengröße von *LepR*^{db/db}-Mäusen. Wie unter 1.2.1 beschrieben, hypertrophieren Adipozyten unter fettreicher Diät, bis sie eine kritische Grenze erreichen ²⁴. Da in diesem Modell in der Kontrollgruppe bereits eine mittlere Adipozytenfläche von 8620 μm^2 vorlag, ist davon auszugehen, dass die kritische Grenze

bereits durch die fettreiche Diät erreicht wurde, so dass im Gegensatz zu den weitaus weniger adipösen *Ldlr*^{-/-}-Tieren hier keine weitere Steigerung der Fettzellgröße induzierbar war. Die mehrfache Implantation und Explantation der osmotischen Minipumpen hatte in den Argatroban-behandelten Tieren dagegen einen hemmenden Effekt auf die Gewichtszunahme, so dass die maximale Adipozytengröße nicht erreicht werden konnte und der Effekt der Thrombin-Inhibition sichtbar wurde.

4.2.2 Crown-like structures im *LepR*^{db/db}-Modell

Eine Adipozytenhypertrophie wird in der Literatur mit einem Anstieg von inflammatorischen Zytokinen und damit einer vermehrten Inflammation im viszeralen Fettgewebe in Verbindung gebracht ¹⁶. Unter der Argatroban-Behandlung stellte sich in *LepR*^{db/db}-Mäusen jedoch trotz deutlicher Adipozytenhypertrophie kein Effekt auf die in Form von CLS organisierten Makrophagen ein.

Hingegen erzeugte eine Dabigatran-Behandlung trotz fehlenden Effektes auf die Fettzellgröße ein signifikant vermehrtes Vorkommen von CLS.

Diese Beobachtung scheint für das *LepR*^{db/db}-Modell spezifisch zu sein, zumal in *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Dabigatran kein Effekt auf das Vorkommen von CLS im viszeralen Fettgewebe gesehen werden konnte ¹¹⁸. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass es durch die Leptinrezeptordefizienz zu einem erhöhten Plasmaspiegel an Leptin kommt. Leptin steigert als proinflammatorisches Adipokin die Proliferation und die proinflammatorische Zytokinsekretion von Makrophagen ¹¹⁹. Hier könnte ein Anstieg von M1 Makrophagen und damit proinflammatorischen Bedingungen unter hohen Leptinspiegeln in Kombination mit einer Thrombin-Inhibition ursächlich sein. Ein Zusammenhang zwischen veränderten Thrombinspiegeln und Leptinspiegeln wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben, scheint hier jedoch möglich zu sein, da ein vermehrtes Vorkommen von Makrophagen im viszeralen Fettgewebe trotz erhöhter Leptinspiegel nur in den mit Thrombininhibitoren behandelten Tieren beobachtet werden konnte. Ursächlich für den fehlenden Effekt der Argatrobanbehandlung auf das Vorkommen von CLS in *LepR*^{db/db}-Tieren könnte die geringere Gewichtszunahme, die in kleineren Fettzellen resultiert und damit einhergehend unterschiedliche Leptinspiegel im Vergleich zu den Tieren unter Dabigatranbehandlung sein.

4.3 Das *Ldlr*^{-/-}-Modell unter Thrombin-Inhibition

4.3.1 Einfluss auf die Adipozytenmorphologie im *Ldlr*^{-/-}-Modell

Die Behandlung mit dem Thrombininhibitor Argatroban erzeugte auch in *Ldlr*^{-/-}-Tieren eine signifikante Adipozytenhypertrophie im Vergleich zu der entsprechenden Placebogruppe.

Dieses Ergebnis wurde durch eine Klassifizierung der Adipozytengrößen in Prozent bestätigt. Ein Unterschied im Körpergewicht oder dem BMI der Tiere konnte hingegen nicht festgestellt werden.

In der Forschungsgruppe von Prof. Grandoch wurde anhand von Vorarbeiten in *Ldlr*^{-/-}-Mäusen unter Behandlung mit dem direkten Thrombininhibitor Dabigatran ebenfalls eine signifikante Vergrößerung der Adipozyten gezeigt (Feldmann et al., *Atherosclerosis*, *Atherosclerosis* 2019).

4.3.2 Crown like structures im *Ldlr*^{-/-}-Modell

Wie weiter oben erwähnt, wird eine Adipozytenhypertrophie in der Literatur mit einem Anstieg von inflammatorischen Zytokinen und damit einer vermehrten Inflammation im viszeralen Fettgewebe in Verbindung gebracht ¹⁶. Bei *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung konnten trotz der Zunahme der Adipozytengröße signifikant weniger CLS und damit weniger Makrophagen im viszeralen Fettgewebe beobachtet werden.

Unter Behandlung mit dem direkten Thrombininhibitor Dabigatran konnte in Vorarbeiten der Forschungsgruppe von Frau Prof. Grandoch keine Veränderungen in der Anzahl der CLS beobachtet werden (Feldmann et al., *Atherosclerosis* 2019).

Bei einer genaueren Untersuchung wurde in einer durchflusszytometrischen Analyse der Makrophagensubpopulationen eine stabile Anzahl der residenten M2 Makrophagen und eine Reduktion von M1 Makrophagen im viszeralen Fettgewebe der behandelten Tiere gefunden ¹¹⁸. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Strande *et al.*, die eine gesteigerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach PAR-4-Aktivierung durch Thrombin von Adipozyten feststellten ⁹⁸. Diese proinflammatorischen Zytokine stimulieren wiederum die Polarisation zu M1 Makrophagen, wie auch die Monozyteninvasion in das Fettgewebe ⁷². Eine Thrombin-Inhibition müsste demnach zu einer Reduktion von M1 Makrophagen führen.

Eine Erklärung für das signifikant geringere Vorkommen von CLS in *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Argatroban-Behandlung könnte also eine Argatroban-vermittelte Reduktion an M1 Makrophagen ohne Veränderungen in der M2 Population im Fettgewebe sein. Weiter bestünde die Möglichkeit der Veränderung des sekretorischen Profils unter einer Thrombin-Inhibition, die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht adressiert wurde. Somit könnte eine Thrombin-Inhibition in *Ldlr*^{-/-}-Tieren sowohl einen Einfluss auf das sekretorische Profil als auch auf die Inflammation im viszeralen Fettgewebe haben.

4.3.2.1 **Browning** im viszeralen und subkutanen Fettgewebe im *Ldlr*^{-/-}-Modell

Im viszeralem Fettgewebe von *Ldlr*^{-/-}-Tieren stellten sich signifikant mehr Fettzellinseln mit der Morphologie von braunem oder beigem Fettgewebe unter Thrombin-Inhibition mittels Argatroban dar. Diese Fettzellinseln konnten im *LepR*^{db/db}-Modell weder unter Argatroban- noch Dabigatranbehandlung beobachtet werden. Warum keine braunen oder beigen Fettzellinseln im viszeralem Fettgewebe der *LepR*^{db/db}-Mauslinie beobachtet werden konnten, könnte daran liegen, dass braunes und beiges Fettgewebe unter einem adipösen Phänotyp per se weniger stark aktivierbar und zudem das *whitening* unter einer Fettdiät begünstigt wird^{117,120}. Ebenfalls könnten die hohen Leptin-Spiegel in *LepR*^{db/db}-Mäusen, durch ihre reziproke Korrelation zu Adiponektin-Spiegeln zu einer Effektminderung der Thrombin-Inhibition führen.

Ergänzend zum viszeralem Fettgewebe wurde daher basierend auf der Beobachtung im viszeralem Fett auch subkutanes Fettgewebe von *Ldlr*^{-/-}-Tieren als typisches Depot für das Auftreten von beiging Effekten unter Argatrobanbehandlung auf das Auftreten dieser multilokulären Fettzellinseln untersucht. Hier zeigte sich unter Argatroban-Behandlung lediglich ein Trend zu mehr Fettzellinseln mit der Morphologie von braunem oder beigem Fettgewebe. Im subkutanen Fettgewebe von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Dabigatran-Behandlung konnte hingegen kein Unterschied beobachtet werden.

In der Literatur ist im experimentellen Tiermodell ein *browning* im viszeralem Fettgewebe unter einer Fett-Diät und Kältestimulation von Mäusen und unter Kältestimulation von schwarzlipprigen Pfeifhasen beschrieben^{67,121}. Auch im Menschen ist ein *browning* im viszeralem Fettgewebe möglich¹²².

Alle Tiergruppen wurden unter standardisierten Bedingungen bei konstanter Raumtemperatur von 21°C gehalten, so dass der Effekt einer Stimulation des *brownings/beigings* durch Kälte ausgeschlossen werden konnte. Auch eine erhöhte Sympathikusaktivierung, die zu einer verstärkten Aktivierung des *brownings/beigings* führen kann wurde aufgrund der identischen Haltungsbedingungen und einem identischen operativen Vorgehen ausgeschlossen.

Für Glitazone (Thiazolidinone), die klinisch zur Behandlung eines Diabetes mellitus Typ 2 genutzt werden, konnte bereits ein Effekt auf das *browning* und damit eine Beeinflussung der Insulinsensitivität gezeigt werden^{123,124}. Daher lässt sich ableiten, dass eine Thrombin-Inhibition durch Argatroban möglicherweise über eine Induktion des *brownings/beigings* vorteilhafte Effekte auf metabolische Prozesse haben könnte.

Aktuell existieren verschiedene Theorien über die metabolischen Effekte des *brownings*. Die Entwicklung von braunem Fettgewebe im weißen Fettgewebe soll zu einer Reduzierung

von Triglyzerid- und Cholesterin-Spiegeln führen, wodurch die Entstehung von atherosklerotischen Plaques reduziert wird. Die Theorie dabei ist, dass der Adipozyt während des *brownings* alle intrazellulären Triglyzeridvorräte für die Thermogenese verbraucht und die Vorräte durch Internalisierung von extrazellulären Triglyzeriden wieder auffüllt ¹²⁵. Da kein Unterschied im Lipidprofil in den Versuchen detektiert wurde, konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden.

In einigen Publikationen kam es während des *brownings* von WAT durch eine verstärkte Lipolyse zu erhöhten Plasmalipidspiegeln ¹²⁶. Es wird argumentiert, dass es dabei zum Anstieg von LDL und VLDL kommt und dadurch die Plaque-Bildung gefördert wird ¹²⁷. Diesen Unterschied in den Plasmalipidspiegeln konnte in der durchgeführten Versuchsreihe unter Behandlung mit Argatroban nicht beobachtet werden.

Als wichtige Modulatoren des *brownings* werden in der Literatur Adipokine beschrieben, die auch von braunem Fettgewebe selbst sezerniert werden können. Ein aktuell untersuchtes Adipokin, dem eine positive Beeinflussung des *brownings* und zusätzlich der Glucose-Insulin-Homöostase zugesprochen wird ist CXCL14 ¹²⁸.

Interessant wäre eine Untersuchung des sekretorischen Profils des Fettgewebes, insbesondere der Adipokin-Spiegel in den verwendeten Mauslinien unter Versuchsbedingungen. Möglicherweise könnte eine Thrombin-Inhibition die Sekretion von *browning/beiging*-fördernder Adipokine positiv beeinflussen. Es wäre auch eine direkte Steigerung des *browning*-Prozesses im Adipozyt unter Thrombin-Inhibition bei Raumtemperatur denkbar.

Ob sich diese Effekte auch metabolisch manifestieren und u.U. metabolische Prozesse positiv beeinflussen, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Hinsichtlich der Ergebnisse, dass unter einer Thrombin-Inhibition ein verstärktes *browning/beiging* in *Ldlr*^{-/-}-Mäusen und gleichzeitig weniger aortale Plaques beobachtet wurden, könnte auf einen positiven Einfluss einer Thrombin-Inhibition auf das Fettgewebe als auch auf die Beeinflussung von Atherosklerose hindeuten.

4.4 Atherogenese unter Thrombin-Inhibition im *Ldlr*^{-/-}-Modell

In dieser Arbeit konnte unter einer Thrombin-Inhibition eine signifikant geringere Plaquegröße in aortalen Ursprüngen beobachtet werden. Aufgrund des mit 20 Wochen spät gewählten Versuchsendes könnte in Korrelation mit den in der Literatur beschriebenen Zeitverlauf der Makrophageninvasion innerhalb eines Plaques kein Unterschied in der Anzahl an Makrophagen detektiert werden. Eine Thrombin-Inhibition durch Argatroban hatte weder einen Einfluss auf das Lipidprofil noch auf die Thrombozytenanzahl.

4.4.1 Lipidprofil und Blutzellzusammensetzung im *Ldlr*^{-/-}-Modell

Eine Thrombin-Inhibition durch Argatroban unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen und der Versuchsdauer übte keinen Einfluss auf das Lipidprofil der Tiere aus. Auch gab es keinen Einfluss auf die Anzahl der Erythrozyten, weißen Blutkörperchen oder Thrombozyten zwischen den behandelten und den nicht behandelten Tieren. Ein Einfluss auf die Atheroskleroseentwicklung und das Auftreten von atherosklerotischen Läsionen unter Thrombin-Inhibition über die Veränderung des Lipidprofils oder über die Veränderung der Anzahl der Thrombozyten ist ebenfalls nicht in der Literatur beschrieben.

4.4.1.1 Atherosklerotische Läsionen der aortalen Wand und Ursprünge im *Ldlr*^{-/-}-Modell

Im Gegensatz zum *LepR*^{db/db}-Modell, das auch unter einer Fettdiät keine Plaque-Entstehung zeigt, konnte im *Ldlr*^{-/-}-Modell die aortale Plaquegröße und -zusammensetzung untersucht werden ¹²⁹.

Da Thrombin die Rezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4 aktiviert, hat es somit eine Auswirkung auf das Endothel, auf glatte Muskelzellen und auf das Fettgewebe ⁷⁰. In der Literatur wurde unter einer Aktivierung von PAR-4 auf Endothelzellen eine verstärkte Migration von Leukozyten und eine verstärkte Entzündungsreaktion beschrieben ^{72,73}. Ähnliche Veränderungen sind durch die Aktivierung von PAR-4 im Fettgewebe beschrieben worden. Eine Inhibition von Thrombin müsste demnach zu einer reduzierten Leukozyten-Migration und Entzündungsreaktion im Bereich der Endothelzellen und im Fettgewebe führen. Die dadurch verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine dürfte in der Atherosklerose-Entwicklung zu einer verminderten Einwanderung von Entzündungszellen, einer reduzierten Endothelpermeabilität und schlussendlich zu einer verminderten Plaquebildung führen ⁷⁹⁻⁸¹.

Immunhistologisch wurden aortale Ursprünge von *Ldlr*^{-/-}-Mäusen untersucht, sowie zusätzlich Aorten bis zur Iliakalbifurkation längspräpariert. Ausgewertet wurde die aortale Fläche von der *Aorta ascendens* inklusive der Abgänge der *Aa. renales*. Dabei ergab sich eine signifikante Reduktion der Plaquegröße im aortalen Ursprung bei Tieren unter Behandlung mit dem direkten Thrombininhibitor Argatroban. Lediglich einen Trend zu weniger Plaque konnte in der aortalen Fläche (ausgeschlossen des aortalen Ursprungs) gesehen werden, was vermutlich an den höheren Druckverhältnissen im aortalen Ursprung im Vergleich zu *Aorta abdominalis* und damit einhergehend der stärkeren Belastung des Gefäßendothels mit einer daraus resultierenden zusätzlichen Prädisposition für die Entstehung von Plaque liegt. Um eine vergleichbare und möglichst kontinuierliche Untersuchung über das Plaquevolumen zu erhalten, wurden definierte Ebenen des aortalen

Ursprungs untersucht. Trotz signifikant kleinerer Plaques in Argatroban-behandelten Tieren konnte kein signifikanter Unterschied des prozentualen Makrophagenvorkommens, Biglykan- oder Kollagenanteils in den atherosklerotischen Läsionen beobachtet werden. Unter einer Thrombin-Inhibition kommt es zu einer reduzierten Aktivierung des Rezeptors PAR4 und damit zu einer Reduktion der Gefäßpermeabilität für Entzündungszellen, weswegen eine geringere Makrophagenanzahl im Plaque zu erwarten gewesen wäre. Es ist jedoch bekannt, dass die Makrophageninvasion in das Gefäßendothel und in den Plaque zeitabhängig ist und ihren Zenit in den ersten 3 Wochen der Plaqueentstehung hat. Ye *et. al* beobachteten in ihren Versuchsreihen einen Abfall von 75% der absoluten Makrophagenanzahl innerhalb des Plaques in den Wochen 5-9 und einen darauffolgenden weiteren kontinuierlichen Abfall bis zum Versuchsende, was der Woche 12 entsprach ¹³⁰. Da der Untersuchungszeitpunkt der aortalen Ursprünge mit 20 Wochen in Relation zu den Versuchen von Ye *et. al* mit maximal 12 Wochen spät gewählt wurde, ist es wahrscheinlich, dass sich die Anzahl der Makrophagen innerhalb des Plaques unter einer Thrombin-Inhibition der Makrophagenanzahl unter Einfluss von Thrombin angeglichen hat.

Eine durchflusszytometrische Analyse der Makrophagenpopulationen wurde während dieser Dissertation nicht durchgeführt, gäbe jedoch Auskunft darüber, ob trotz unveränderter Anzahl an Gesamtmakrophagen in den mit Argatroban behandelten Tieren ein Unterschied der Makrophagen-Subpopulationen in den Plaques zu finden sei. Ein vermehrtes Vorkommen von antiinflammatorischen M2 Makrophagen zeigt in Bezug auf die Gewebereparatur des Endothels und die Plaquestabilität einen protektiven Effekt. Hingegen würden proinflammatorische M1-Makrophagen die Plaqueentstehung begünstigen ¹³¹.

Eine neue Theorie beschreibt das Vorkommen von stammzellähnlichen proliferativen Makrophagen (CX3CR1+ Monozyten-Vorläuferzellen) innerhalb eines Plaque, die abhängig von dem vorliegenden Milieu an Zytokinen ein möglicher ortsansässiger Ursprung von proinflammatorischen Makrophagen darstellt ¹³².

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Grandoch konnte bei durchflusszytometrischen Analysen der Makrophagenpopulationen in der Aortenwand von *Ldlr*^{-/-}-Tieren unter Dabigatran-Behandlung eine signifikante Reduktion von M1 Makrophagen beobachtet werden ¹¹⁸. In diesem Ergebnis könnte sich die Auswirkung einer verminderten PAR-1 oder PAR-4 Aktivierung unter Thrombin-Inhibition widerspiegeln. Ähnliche Ergebnisse finden sich in der Literatur im Rahmen einer Reduktion der Plaquegröße, einer Reduktion proinflammatorischer Zytokine und einer Verbesserung der Plaquestabilität unter Dabigatran-Behandlung ¹³³

Ausgehend von der positiven Beeinflussung einer Thrombin-Inhibition auf atherosklerotischen Plaques bei unbeeinflussten Cholesterinwerten, konnten also ähnliche Effekte wie von Hoeke *et al.* gefunden werden¹²⁵. Der Zusammenhang zwischen Thrombin-Inhibition, *beiging* und metabolischen Effekten sollte weiter untersucht werden. Die hier dargestellten Ergebnisse könnten in der Klinik für Patienten unter Thrombin-Inhibition einen Vorteil hinsichtlich der positiven Beeinflussung von metabolischen Erkrankungen bedeuten.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Stevens GA, Singh GM, Lu Y, et al. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. *Popul Health Metr* 2012;10:22.
2. Lenz M, Richter T, Muhlhauser I. The morbidity and mortality associated with overweight and obesity in adulthood: a systematic review. *Dtsch Arztebl Int* 2009;106:641-8.
3. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000;404:635-43.
4. Kohler HP. Insulin resistance syndrome: interaction with coagulation and fibrinolysis. *Swiss Med Wkly* 2002;132:241-52.
5. Romano M, Guagnano MT, Pacini G, et al. Association of inflammation markers with impaired insulin sensitivity and coagulative activation in obese healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5321-6.
6. Kalz J, ten Cate H, Spronk HM. Thrombin generation and atherosclerosis. *J Thromb Thrombolysis* 2014;37:45-55.
7. Azevedo A, Ramos E, von Hafe P, Barros H. Upper-body adiposity and risk of myocardial infarction. *J Cardiovasc Risk* 1999;6:321-5.
8. Huang Y, Xu M, Xie L, et al. Obesity and peripheral arterial disease: A Mendelian Randomization analysis. *Atherosclerosis* 2016;247:218-24.
9. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-28.
10. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev* 2005;26:19-39.
11. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001;344:1343-50.
12. Tremmel M, Gerdtham UG, Nilsson PM, Saha S. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. *Int J Environ Res Public Health* 2017;14.
13. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998;78:783-809.
14. Park A, Kim WK, Bae KH. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 2014;6:33-42.
15. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci* 2013;9:191-200.
16. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell* 2014;156:20-44.
17. Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol* 2012;13:707-12.
18. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006;444:847-53.
19. Enerback S. Human brown adipose tissue. *Cell Metab* 2010;11:248-52.
20. Lean ME. Brown adipose tissue in humans. *Proc Nutr Soc* 1989;48:243-56.
21. Rosenwald M, Wolfrum C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte* 2014;3:4-9.
22. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* 2013;15:659-67.
23. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 2008;29:2959-71.
24. Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* 1983;72:1150-62.

25. Chu NF, Spiegelman D, Hotamisligil GS, Rifai N, Stampfer M, Rimm EB. Plasma insulin, leptin, and soluble TNF receptors levels in relation to obesity-related atherogenic and thrombogenic cardiovascular disease risk factors among men. *Atherosclerosis* 2001;157:495-503.
26. Harwood HJ, Jr. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 2012;63:57-75.
27. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 2012;165:622-32.
28. Koh KK, Park SM, Quon MJ. Leptin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. *Circulation* 2008;117:3238-49.
29. Meister B. Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm* 2000;59:265-304.
30. Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK, Flier JS. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* 1999;140:4923-31.
31. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001;411:480-4.
32. Hausberg M, Morgan DA, Mitchell JL, Sivitz WI, Mark AL, Haynes WG. Leptin potentiates thermogenic sympathetic responses to hypothermia: a receptor-mediated effect. *Diabetes* 2002;51:2434-40.
33. Simonds SE, Pryor JT, Ravussin E, et al. Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. *Cell* 2014;159:1404-16.
34. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548-56.
35. Licinio J, Caglayan S, Ozata M, et al. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4531-6.
36. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 2007;83:S192-203.
37. Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 2010;316:129-39.
38. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64:355-65.
39. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 2006;27:762-78.
40. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796-808.
41. Coppack SW. Adipose tissue changes in obesity. *Biochem Soc Trans* 2005;33:1049-52.
42. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1785-8.
43. Ferrante AW, Jr. The immune cells in adipose tissue. *Diabetes Obes Metab* 2013;15 Suppl 3:34-8.
44. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175-84.

45. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 1994;93:2438-46.
46. Boden G, She P, Mozzoli M, et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* 2005;54:3458-65.
47. Itani SI, Ruderman NB, Schmedier F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes* 2002;51:2005-11.
48. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005;46:2347-55.
49. Feuerer M, Herrero L, Cicolletta D, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* 2009;15:930-9.
50. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta* 2013;417:80-4.
51. Chadt A, Scherneck S, Joost HG, Al-Hasani H. Molecular links between Obesity and Diabetes: "Diabesity". In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., eds. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
52. Furtado LM, Somwar R, Sweeney G, Niu W, Klip A. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol* 2002;80:569-78.
53. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:171-6.
54. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41.
55. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 2014;58:515-23.
56. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-24.
57. Haberland ME, Fless GM, Scanu AM, Fogelman AM. Malondialdehyde modification of lipoprotein(a) produces avid uptake by human monocyte-macrophages. *J Biol Chem* 1992;267:4143-51.
58. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000;105:1049-56.
59. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997;386:292-6.
60. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2013;424:245-52.
61. Dzau VJ. Atherosclerosis and hypertension: mechanisms and interrelationships. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990;15 Suppl 5:S59-64.
62. Yoo HJ, Choi KM. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. *World J Diabetes* 2014;5:357-63.
63. Roever LS, Resende ES, Diniz AL, et al. Abdominal Obesity and Association With Atherosclerosis Risk Factors: The Uberlandia Heart Study. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e1357.
64. Reardon CA, Lingaraju A, Schoenfelt KQ, et al. Obesity and Insulin Resistance Promote Atherosclerosis through an IFNgamma-Regulated Macrophage Protein Network. *Cell Rep* 2018;23:3021-30.

65. Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *Eur J Immunol* 2010;40:616-9.
66. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010;49:1603-16.
67. Yang X, Li Y, Li Y, et al. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front Physiol* 2017;8:600.
68. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006;189:47-60.
69. Caunt M, Huang YQ, Brooks PC, Karpatkin S. Thrombin induces neoangiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J Thromb Haemost* 2003;1:2097-102.
70. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000;407:258-64.
71. Giri S, Jennings LK. The spectrum of thrombin in acute coronary syndromes. *Thromb Res* 2015;135:782-7.
72. Naldini A, Carney DH, Pucci A, Pasquali A, Carraro F. Thrombin regulates the expression of proangiogenic cytokines via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *Gen Pharmacol* 2000;35:255-9.
73. Shankar R, de la Motte CA, Poptic EJ, DiCorleto PE. Thrombin receptor-activating peptides differentially stimulate platelet-derived growth factor production, monocytic cell adhesion, and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 1994;269:13936-41.
74. Naldini A, Pucci A, Carney DH, Fanetti G, Carraro F. Thrombin enhancement of interleukin-1 expression in mononuclear cells: involvement of proteinase-activated receptor-1. *Cytokine* 2002;20:191-9.
75. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2054-61.
76. Zhang C, Hein TW, Wang W, et al. Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *Hypertension* 2004;44:935-43.
77. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res* 2009;82:392-403.
78. Orbe J, Zudaire M, Serrano R, et al. Increased thrombin generation after acute versus chronic coronary disease as assessed by the thrombin generation test. *Thromb Haemost* 2008;99:382-7.
79. Bian ZM, Elnor SG, Elnor VM. Thrombin-induced VEGF expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2738-46.
80. Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamashita A, Asada Y. Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:1-8.
81. Rauch BH, Scholz GA, Baumgartel-Allekotte D, et al. Cholesterol enhances thrombin-induced release of fibroblast growth factor-2 in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:e20-5.
82. Kadoglou NP, Moustardas P, Katsimpoulas M, et al. The beneficial effects of a direct thrombin inhibitor, dabigatran etexilate, on the development and stability of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice : dabigatran etexilate and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012;26:367-74.

83. Lee IO, Kratz MT, Schirmer SH, Baumhake M, Bohm M. The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;343:253-7.
84. Preusch MR, Ieronimakis N, Wijelath ES, et al. Dabigatran etexilate retards the initiation and progression of atherosclerotic lesions and inhibits the expression of oncostatin M in apolipoprotein E-deficient mice. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:5203-11.
85. Blokhin IO, Lentz SR. Mechanisms of thrombosis in obesity. *Curr Opin Hematol* 2013;20:437-44.
86. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004;84:579-621.
87. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991;64:1057-68.
88. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5255-60.
89. Molino M, Barnathan ES, Numerof R, et al. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 1997;272:4043-9.
90. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9208-12.
91. Sukriti S, Tauseef M, Yazbeck P, Mehta D. Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulm Circ* 2014;4:535-51.
92. Johnson K, Choi Y, DeGroot E, Samuels I, Creasey A, Aarden L. Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J Immunol* 1998;160:5130-5.
93. Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE, et al. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv Exp Med Biol* 1996;416:297-304.
94. Weiss EJ, Hamilton JR, Lease KE, Coughlin SR. Protection against thrombosis in mice lacking PAR3. *Blood* 2002;100:3240-4.
95. Asfaha S, Cenac N, Houle S, et al. Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation. *Br J Pharmacol* 2007;150:176-85.
96. Bretschneider E, Kaufmann R, Braun M, Nowak G, Glusa E, Schror K. Evidence for functionally active protease-activated receptor-4 (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2001;132:1441-6.
97. Kataoka H, Hamilton JR, McKemy DD, et al. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood* 2003;102:3224-31.
98. Strande JL, Phillips SA. Thrombin increases inflammatory cytokine and angiogenic growth factor secretion in human adipose cells in vitro. *J Inflamm (Lond)* 2009;6:4.
99. Vergnolle N, Derian CK, D'Andrea MR, Steinhoff M, Andrade-Gordon P. Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol* 2002;169:1467-73.

100. Kassel KM, Sullivan BP, Cui W, Copple BL, Luyendyk JP. Therapeutic administration of the direct thrombin inhibitor argatroban reduces hepatic inflammation in mice with established fatty liver disease. *Am J Pathol* 2012;181:1287-95.
101. Kopec AK, Joshi N, Towery KL, et al. Thrombin inhibition with dabigatran protects against high-fat diet-induced fatty liver disease in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2014;351:288-97.
102. Lim J, Iyer A, Liu L, et al. Diet-induced obesity, adipose inflammation, and metabolic dysfunction correlating with PAR2 expression are attenuated by PAR2 antagonism. *FASEB J* 2013;27:4757-67.
103. Mihara M, Aihara K, Ikeda Y, et al. Inhibition of thrombin action ameliorates insulin resistance in type 2 diabetic db/db mice. *Endocrinology* 2010;151:513-9.
104. Opal SM, Kessler CM, Roemisch J, Knaub S. Antithrombin, heparin, and heparan sulfate. *Crit Care Med* 2002;30:S325-31.
105. Walker CP, Royston D. Thrombin generation and its inhibition: a review of the scientific basis and mechanism of action of anticoagulant therapies. *Br J Anaesth* 2002;88:848-63.
106. Dahm AE, Sandset PM, Rosendaal FR. The association between protein S levels and anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor type 1. *J Thromb Haemost* 2008;6:393-5.
107. Rigby AC, Grant MA. Protein S: a conduit between anticoagulation and inflammation. *Crit Care Med* 2004;32:S336-41.
108. Mitsubishi Tanabe Pharma GmbH. Fachinformation Argatra 1mg/ml Infusionslösung. 2017.
109. Boehringer Ingelheim. Fachinformation Pradaxa 150mg Hartkapseln. 2017.
110. Corsi A, Xu T, Chen XD, et al. 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.
111. Grandoch M, Kohlmorgen C, Melchior-Becker A, et al. Loss of Biglycan Enhances Thrombin Generation in Apolipoprotein E-Deficient Mice: Implications for Inflammation and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:e41-50.
112. Braganza DM, Bennett MR. New insights into atherosclerotic plaque rupture. *Postgrad Med J* 2001;77:94-8.
113. Miller JD. Arterial calcification: Conscripted by collagen. *Nat Mater* 2016;15:257-8.
114. Thompson JC, Tang T, Wilson PG, Yoder MH, Tannock LR. Increased atherosclerosis in mice with increased vascular biglycan content. *Atherosclerosis* 2014;235:71-5.
115. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9:676-82.
116. Murano I, Barbatelli G, Parisani V, et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 2008;49:1562-8.
117. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009;360:1500-8.

118. Feldmann K. Einfluss einer Thrombininhibition durch Dabigatran auf Entzündungsprozesse im Rahmen von Übergewicht und Atherosklerose: Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf; 2016.
119. Fernandez-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, et al. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm* 2010;2010:568343.
120. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:24-36.
121. Bai Z, Wuren T, Liu S, et al. Intermittent cold exposure results in visceral adipose tissue "browning" in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2015;184:171-8.
122. Zuriaga MA, Fuster JJ, Gokce N, Walsh K. Humans and Mice Display Opposing Patterns of "Browning" Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Front Cardiovasc Med* 2017;4:27.
123. Quinn CE, Hamilton PK, Lockhart CJ, McVeigh GE. Thiazolidinediones: effects on insulin resistance and the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2008;153:636-45.
124. Wankhade UD, Shen M, Yadav H, Thakali KM. Novel Browning Agents, Mechanisms, and Therapeutic Potentials of Brown Adipose Tissue. *Biomed Res Int* 2016;2016:2365609.
125. Hoeke G, Kooijman S, Boon MR, Rensen PC, Berbee JF. Role of Brown Fat in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Circ Res* 2016;118:173-82.
126. Abdullahi A, Jeschke MG. White Adipose Tissue Browning: A Double-edged Sword. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27:542-52.
127. Dong M, Yang X, Lim S, et al. Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis. *Cell Metab* 2013;18:118-29.
128. Cereijo R, Gavaldà-Navarro A, Cairo M, et al. CXCL14, a Brown Adipokine that Mediates Brown-Fat-to-Macrophage Communication in Thermogenic Adaptation. *Cell Metab* 2018;28:750-63 e6.
129. Kennedy AJ, Ellacott KL, King VL, Hasty AH. Mouse models of the metabolic syndrome. *Dis Model Mech* 2010;3:156-66.
130. Ye D, Zhao Y, Hildebrand RB, et al. The dynamics of macrophage infiltration into the arterial wall during atherosclerotic lesion development in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Am J Pathol* 2011;178:413-22.
131. Bobryshev YV, Ivanova EA, Chistiakov DA, Nikiforov NG, Orekhov AN. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. *Biomed Res Int* 2016;2016:9582430.
132. Lin JD, Nishi H, Poles J, et al. Single-cell analysis of fate-mapped macrophages reveals heterogeneity, including stem-like properties, during atherosclerosis progression and regression. *JCI Insight* 2019;4.
133. Henri M.H. Spronk JIB, Oliver Soehnlein, Rory Koenen, Rene van Oerle, Sylvia Heeneman, Mat J.A.P. Daemen, Charles T Esmon, Jay L. Degen, Hartmut Weiler, Joanne van Ryn and Hugo Ten Cate. Thrombin Inhibition Prevents Against Severe Atherosclerosis Progression in Prothrombotic Mice. *Blood* 2012;120:103.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Substanzen	17
Tabelle 2 Verwendete Lösungen.....	17
Tabelle 3 Verwendete Färbelösungen.....	18
Tabelle 4 Verwendete Puffer.....	18
Tabelle 5 Verwendete Erstantikörper	18
Tabelle 6 Verwendete Zweitantikörper	18
Tabelle 7 Verwendete Geräte	19

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Weißes Fettgewebe	3
Abbildung 2 <i>browning</i> und <i>whitening</i>	4
Abbildung 3 <i>crown-like structures</i>	7
Abbildung 4 Der Zusammenhang zwischen Adipositas und Atherogenese	12
Abbildung 5 Behandlungsart der verwendeten Mäuse	21
Abbildung 6 Schnittschema von Fettgewebe und Aortenursprüngen	22
Abbildung 7 Aortenklappe mit Plaque	23
Abbildung 8 Präparation der Aorten	26
Abbildung 9 Auswertungsschritte des <i>Fiji</i> -Makros für Adipozyten.....	28
Abbildung 10 Kein Effekt der Thrombin-Inhibition auf das Gewicht der <i>LepR^{db/db}</i> -Tiere... 32	
Abbildung 11 Kein Effekt einer Thrombin-Inhibition auf das Gewicht, die Länge oder den BMI bei <i>LepR^{db/db}</i> -Tieren am Ende der Versuchsreihen	33
Abbildung 12 Unterschiedliche Effekte auf die Adipozytengröße unter Behandlung mit Argatroban und Dabigatran bei <i>LepR^{db/db}</i> -Tieren.....	34
Abbildung 13 Absolute und prozentuale Verteilung der Adipozytengrößen	35
Abbildung 14 Signifikanter Anstieg der <i>Crown-like structures</i> (CLS) pro 100 Adipozyten unter Dabigatranbehandlung in <i>LepR^{db/db}</i> -Tieren.....	36
Abbildung 15 Kein Effekt der Thrombin-Inhibition auf das Gewicht der Tiere	37

Abbildung 16 Signifikanter Effekt auf die Adipozytengröße unter Behandlung mit Argatroban in <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren	38
Abbildung 17 Absolute und prozentuale Verteilung der Adipozytengrößen bei <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren unter Argatrobanbehandlung	39
Abbildung 18 Signifikanter Abfall der <i>Crown-like structures</i> (CLS) pro 100 Adipozyten unter Argatrobanbehandlung in <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren	39
Abbildung 19 Kein Effekt des Cholesterin-ELISA von <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren unter Argatroban-Behandlung	40
Abbildung 20 Kein Effekt auf die Anzahl der Blutzellpopulationen von <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren unter Argatroban-Behandlung	41
Abbildung 21 Kein Effekt von Argatroban auf die aortale Plauefläche in <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren ...	42
Abbildung 22 Signifikante HE Färbung des Aortenursprungs von <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren	43
Abbildung 23 Signifikant geringere Plauegröße in allen untersuchten Ebenen der Ursprungsfläche unter Argatrobanbehandlung in <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren	44
Abbildung 24 Kein Effekt der MAC2 Färbung im Aortenursprung von <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren unter Argatrobanbehandlung	44
Abbildung 25 Kein Effekt der Biglykan Färbung der Plauefläche im Aortenursprung von <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren unter Argatrobanbehandlung	45
Abbildung 26 Kollagen Färbung des Aortenursprungs von <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren	46
Abbildung 27 Vermehrtes Auftreten multilokulärer Fettzellinseln in <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren unter Argatroban-Behandlung	47
Abbildung 28 Trend zu mehr UCP-1 positiven Fettzellinseln des subkutanen Fettgewebes von <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren unter Argatroban-Behandlung	48
Abbildung 29 Kein Effekt in der UCP-1 Färbung des subkutanen Fettgewebes von <i>Ldlr</i> ^{-/-} -Tieren unter Dabigatran-Behandlung	49

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Grandoch für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation in Ihrer Forschungsgruppe, Ihr immer offenes Ohr und die vielen anregenden und kreativen Ideen. Frau Dr. Kathrin Feldmann danke ich für die Betreuung. Frau Prof. Dr. Krüger danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und Kollegen, die mich während dieser Dissertation begleitet und stets unterstützt haben.