

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

Einfluss der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen auf die
Matrixkomposition atherosklerotischer Läsionen im Mausmodell

Dissertation

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

vorgelegt von
Helena Miriam Schäffer
2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Zweitgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Zusammenfassung

Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen stellen die häufigsten Todesursachen weltweit dar. Neben den etablierten Risikofaktoren wie Alter, Rauchen, Diabetes mellitus, Übergewicht, arterielle Hypertonie und Fettstoffwechselstörungen rücken andere Einflussgrößen wie chronische Entzündungsprozesse zunehmend in den Fokus der Forschung.

Erkrankungen, die mit einer chronischen Entzündungsreaktion einhergehen, sind mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbunden. Auch für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) zeigen aktuelle Studien eine Assoziation zu vermehrtem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen und erhöhter kardiovaskulärer Mortalität. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der CED auf die Matrixkomposition atherosklerotischer Läsionen zu untersuchen. Hierfür wurden die beiden etablierten murinen Modelle des *ApoE-Knockouts* zur akzelerierten Atheroskleroseentwicklung und der Dextran-Natriumsulfat-induzierten Kolitis miteinander kombiniert.

Die Matrix atherosklerotischer Plaques setzt sich aus zellulären und extrazellulären Anteilen zusammen. Neben Lipiden und Makrophagen als wichtigen Initiatoren der Atherogenese spielen die Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) eine entscheidende Rolle. Hierzu zählen insbesondere Kollagen, Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA), aber auch Proteoglykane wie Biglykan und Decorin. Die Zusammensetzung der Plaquematrix beeinflusst sowohl die Atherogenese als auch die Plaquestabilität und ist von entscheidender Bedeutung für die klinische Relevanz der Atherosklerose.

Im Mausmodell erwiesen sich das Ausmaß der Atherosklerose und die Veränderung der Läsionsverteilung bei begleitender CED über verschiedene Abschnitte der Aorta als variabel. Vor allem im abdominellen Bereich war eine höhere Atheroskleroselast bei Tieren mit Kolitis gegenüber der Kontrolle zu beobachten, während die separate Betrachtung des Aortenursprungs keinen Unterschied zwischen Kontroll- und Kolitisgruppe ergab. Folglich kann vermutet werden, dass atherosklerotische Läsionen und deren Manifestation in bestimmten Abschnitten des Gefäßbaums und zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch CED moduliert werden.

Bei Untersuchungen der Plaquekomposition des Aortenursprungs zeigte sich in der Kolitis-Gruppe eine signifikant niedrigere Lipideinlagerung und eine erhöhte Expression von Decorin, sodass sich auch eine veränderte Stabilität der Plaques vermuten lässt.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit mit dem kombinierten *ApoE^{-/-}*-DSS-Modell ein Untersuchungsrahmen geschaffen werden, mit dem der spezifische Einfluss der CED auf die Atherogenese und -progression im Mausmodell detailliert untersucht werden kann. Zudem konnten deutliche Unterschiede der Matrixkomposition im Vergleich zu Kontrolltieren ohne begleitende Kolitis detektiert werden, was sowohl ein spezifisches Risikoprofil unter diesen Bedingungen verdeutlicht als auch mögliche spezifische therapeutische Optionen eröffnet.

Abstract

Atherosclerosis and its secondary diseases are the leading cause of death worldwide. Besides established risk factors such as age, smoking, diabetes mellitus, obesity, arterial hypertension and dyslipidemia other influencing variables like chronic inflammation are brought into focus.

Diseases, that are accompanied with chronic inflammation, are associated with a higher cardiovascular risk. For inflammatory bowel disease (IBD) recent studies show significant interaction resulting in an increased risk for cardiovascular diseases and higher cardiovascular mortality. Aim of this study was to analyse the impact of IBD on the matrix composition in atherosclerotic lesions. Therefore, the two established murine models *ApoE* knockout for accelerated development of atherosclerosis, and dextran sodium sulfate induced colitis were combined.

The matrix of atherosclerotic plaques consists of cellular and extracellular components. Besides lipids and macrophages, that are known as important initiators of atherogenesis, elements of the extracellular matrix play a crucial role. These include collagen, hyaluronan, and proteoglycans such as biglycan and decorin. The composition of the plaque matrix influences therefore both atherogenesis and plaque stability, and plays an important role in the clinical significance of atherosclerosis.

The degree of atherosclerosis and the distribution of lesions with concomitant IBD in the murine model varied in different sections of the aorta. Especially in the abdominal part a higher degree of atherosclerosis in animals with colitis could be observed while on the other hand, no differences were verifiable, when the aortic root is examined. This may allow the assumption that atherosclerotic lesions and their manifestation in distinct sections of the vascular system and their progress over time are modulated by IBD.

When examining the composition of the plaque in the aortic root, the colitis-group showed significantly less lipid accumulation, and enhanced expression of decorin, suggesting alterations in plaque stability.

In summary, the present study provides with the combined *ApoE*^{-/-}-DSS-model a scope to study specific influences of IBD on atherogenesis and -progression in detail in a murine model. Furthermore, significant differences in the matrix composition compared to control animals without concomitant colitis could be detected, which both points out a specific risk profile under these conditions and opens up possible specific therapeutic options.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AF	<i>area fraction</i> (positive Fläche)
Apoe	Apolipoprotein E
BMI	<i>body mass index</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (bovines Serumalbumin)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
cIMT	<i>carotis intima-media-thickness</i> (Intima-Media-Dicke der A. Carotis)
cm	Zentimeter
CRP	C-Reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidin
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Deoxynukleosid 5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
DSS	<i>dextran sodium sulfate</i> (Dextran-Natriumsulfat)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FC	<i>fold change</i> (Vielfaches der Kontrolle)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HA	<i>hyaluronic acid</i> (Hyaluronsäure)
HABP	HA-Bindeprotein
HCl	Salzsäure
HDL	<i>high density lipoprotein</i> (Lipoprotein hoher Dichte)
HE	Hämalaun Eosin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> (interzelluläres Adhäsionsmolekül)

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN-γ	Interferon-gamma
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
L.	Lamina
LDL	<i>low density lipoprotein</i> (Lipoprotein niedriger Dichte)
LDLR	<i>low density lipoprotein</i> Rezeptor
mM	millimolar
MCP	Monozyten Chemotaktisches Protein
mg	Milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
ÖRO	Öl Rot O
oxLDL	oxidiertes <i>low density lipoprotein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (relative Zentrifugalkraft)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (radikale Sauerstoffspezies)
RT-PCR	<i>real time PCR</i> (Echtzeit PCR)
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
TBS	<i>tris buffered saline</i> (mit Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNFα	Tumor Nekrose Faktor-alpha
WD	<i>Western Diet</i> (westliche Diät)
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i> (glatte Gefäßmuskelzellen)
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Welt Gesundheitsorganisation)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Atherosklerose	1
1.1.1 Pathohistologie	1
1.1.2 Pathogenese	1
1.1.3 Atherosklerose im Mausmodell durch <i>ApoE</i> -Defizienz.....	4
1.2 Extrazelluläre Matrix und Plaquekomposition	5
1.2.1 Hyaluronsäure.....	5
1.2.2 Biglykan und Decorin.....	7
1.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	8
1.3.1 Pathohistologie	8
1.3.2 Pathogenese	8
1.4 CED und Atherosklerose	10
1.4.1 Einfluss chronischer Entzündungen.....	10
1.4.2 Einfluss von CED	10
1.5 Ziele der Arbeit.....	11
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Tierversuche	13
2.2 Schweregrad der Kolitis.....	14
2.2.1 Körpergewicht als Indikator für das Kolitisausmaß	14
2.2.2 Anfertigung und Färben von Gefrierschnitten.....	14
2.2.3 Makroskopischer und mikroskopischer Kolitis-Schweregrad	15
2.3 Gesamt-RNA Isolation aus Darmproben.....	16
2.4 cDNA-Synthese und quantitative <i>Real-Time</i> -PCR.....	17
2.4.1 cDNA-Synthese	17
2.4.2 Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR	17
2.5 Quantifizierung der Atherosklerose – Lipidfärbung der Aorta.....	18
2.5.1 Präparation und Färbung.....	18
2.5.2 Dokumentation und Auswertung	18
2.6 Plaquekomposition – (Immun-)Histochemische Färbungen.....	19
2.6.1 Kryokonservierung und Anfertigung von Gefrierschnitten.....	19
2.6.2 Anfertigung von (immun-)histochemischen Färbungen.....	19

2.6.3 Dokumentation und Auswertung	21
2.7 Statistische Auswertung.....	22
3 Ergebnisse.....	23
3.1 Versuchsaufbau.....	23
3.2 Einfluss von DSS auf die Entwicklung und den Verlauf der chronischen Kolitis	23
3.2.1 Gewichtsverlauf.....	23
3.2.2 Makroskopisches Ausmaß der Kolitis	24
3.2.3 Histologisches Ausmaß der Kolitis	26
3.2.4 mRNA-Expression.....	27
3.3 Atherosklerose und Plaquekomposition unter WD.....	28
3.3.1 Quantifizierung der Atherosklerose.....	28
3.3.2 Plaquekomposition am Aortenursprung	31
3.4 Atherosklerose und Plaquekomposition unter Normalfutter	35
3.4.1 Quantifizierung der Atherosklerose.....	35
3.4.2 Plaquekomposition am Aortenursprung	38
4 Diskussion.....	43
4.1 Beurteilung des Schweregrades der Kolitis	44
4.2. Effekte der hochkalorischen Diät auf die Atherogenese und -progression bei Kolitis	45
.....	
4.3 Einfluss der Plaque-Lokalisation	46
4.4 Effekte der chronischen Kolitis auf die EZM der atherosklerotischen Läsionen .	47
4.4.1 Lipide.....	47
4.4.2 Entzündungszellen	48
4.4.3 Proteoglykane und GAGs	48
4.5 Schlussfolgerung.....	49
5 Literatur- und Quellenverzeichnis	51

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Pathohistologie

Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) versteht unter Atherosklerose einen inflammatorischen Prozess der Blutgefäße, der mit Veränderungen der *Intima* einhergeht. Bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen kommt es zu einer Akkumulation von Lipiden mit nachfolgender Einwanderung von Immunzellen wie Makrophagen, die durch die Aufnahme der Lipide zu so genannten Schaumzellen werden. Im Zuge der Plaquebildung kommt es weiterhin zur Migration von glatten Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) in die atherosklerotischen Läsionen, sowie der Produktion und Ansammlung von Kollagen (1). Diese Prozesse resultieren in einer chronischen Wandentzündung mit Fibrosierung und Hyperplasie der *Intima* und führen zu einer stetigen Verengung des Gefäßlumens mit Gefahr der Thrombosierung bei Plaqueruptur, was wiederum akute oder chronische, potentiell lebensbedrohliche Ischämien zur Folge haben kann. Die Komplikationen der Atherosklerose manifestieren sich am Herzen als koronare Herzkrankheit (KHK) mit der Gefahr eines Myokardinfarkts oder der ischämischen Kardiomyopathie, im zerebralen Gefäßsystem als ischämischer Schlaganfall, in den Extremitäten als periphere arterielle Verschlusskrankheit und in abdominalen Gefäßen als mesenteriale Ischämie, Nierenschädigung durch Minderperfusion oder als Aortenaneurysma. Diese Komplikationen der Atherosklerose sind die häufigste Todesursache in der westlichen Gesellschaft (2). Neben den klassischen Modellen zur Pathophysiologie rücken neue Erkenntnisse zu inflammatorischen und immunologischen Prozessen als Schlüsselrolle der Atherogenese in den Vordergrund der aktuellen Forschung (3).

1.1.2 Pathogenese

1.1.2.1 Fettstoffwechsel

Aus der Nahrung werden Lipide als Triglyceride, Fettsäuren und Cholesterin über die Darmzellen resorbiert und mittels Chylomikronen im Serum zur Leber transportiert. Die nach Abgabe von Fettsäuren an periphere Körperzellen entstehenden sogenannten *Remnants*, werden von Hepatozyten aufgenommen. Von der Leber aus wird sowohl exogen aufgenommenes, sowieso von den Hepatozyten synthetisiertes Cholesterin über die Lipoproteine VLDL (*very low density lipoprotein*) und LDL (*low density lipoprotein*) zusammen mit Triglyceriden im Körper

verteilt. Über das Protein ApoB100 wird die Aufnahme von Triglyceriden in Fett- und Muskelzellen vermittelt und die Dichte der Lipoproteine sinkt – die triglyceridreichen VLDL werden zu cholesterinreichen LDL. Über die Wechselwirkung des LDL-Rezeptors (LDLR) des peripheren Gewebes mit ApoB100 gelangen LDLs in die Zellen. Die Expression des LDLR unterliegt hierbei einem cholesterinabhängigen negativen Feedbackmechanismus (4) – mit steigendem Cholesteringehalt intrazellulär wird der für die Resorption verantwortliche Rezeptor LDLR vermindert an der Zelloberfläche exprimiert und somit wird weniger LDL-Cholesterin aufgenommen. Aus peripherem Gewebe wird Cholesterin über *High Density Lipoprotein* (HDL) zurück zur Leber transportiert.

Insbesondere erhöhte LDL-Cholesterin-Plasmaspiegel erhöhen das Risiko für die Entstehung von Atherosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen (5).

1.1.2.2 Initiierung der Atherosklerose

Die Atherogenese beginnt mit einer Endothelschädigung und daraus resultierender endothelialer Dysfunktion („*response-to-injury*“-Hypothese von Russell Ross (6)). Seit Jahrzehnten bekannte endothelschädigende Faktoren sind unter anderem oxidierte LDLs (oxLDL) (7), freie Radikale durch Zigarettenkonsum (8), Diabetes (9), genetische Disposition und Infektionserreger (10). Des Weiteren ist arterielle Hypertonie ein eigenständiger Risikofaktor für eine Schädigung der Arterienwand. Hypertone Kreislaufstörungen stellen eine Form des mechanischen Stresses dar und resultieren in vermehrtem oxidativen Stress, sowie erhöhter Konzentration glatter Muskelzellen in der Gefäßwand (11).

Zu Beginn der Atherogenese steht die Akkumulation von Lipiden und Immunzellen. Hierbei ist unter anderem die Einwanderung von Makrophagen in die Gefäßwand ein Treiber der Atherosklerose. Migrationsstimuli wie Monozyten-Chemotaktisches-Protein (MCP-1) und Makrophagen-*colony stimulating factor* (M-CSF), welcher durch modifizierte LDL induziert werden kann, spielen hierbei eine essentielle Rolle. (12). Daneben sind die Adhäsionsmoleküle *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und PECAM (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) sowie P- und E-Selektine maßgeblich an der Migration von Immunzellen wie Makrophagen und Leukozyten in die Gefäßwand beteiligt. (13). Die vom geschädigten Endothel exprimierten Selektine induzieren ein langsames Fließen bis hin zum Rollen der Leukozyten über die Gefäßwand, wodurch schließlich die Bindung an Zell-Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM, PECAM) möglich ist.

1.1.2.3 Schaumzellbildung

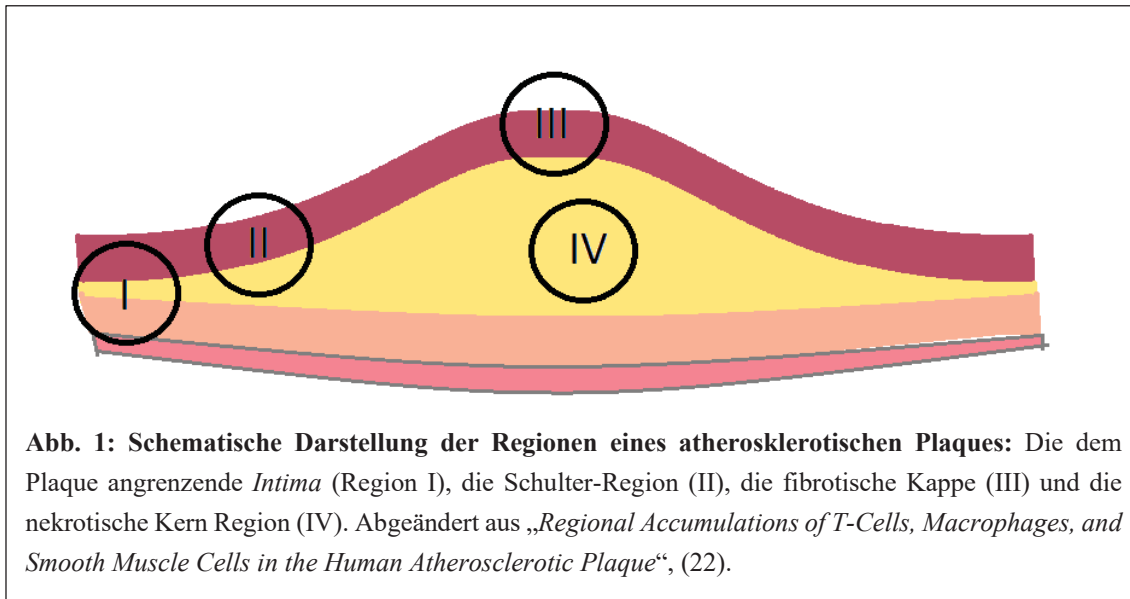
Die erste Stufe der Atherosklerose sind die sogenannten „*fatty streaks*“ – Einlagerungen von Lipiden und nachfolgender Infiltration von Makrophagen in der *Intima*, die schon in fetalen Aorten nachgewiesen werden konnten (14).

Fettstoffwechselstörungen, wie beim metabolischen Syndrom, führen zu einer Dysregulation des LDL- und damit Cholesterinstoffwechsels und tragen so zur Entstehung von atherosklerotischen Läsionen bei. Bei Einlagerung in die Arterienwand wird LDL-Cholesterin durch radikale Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) zu oxLDL oxidiert. Im Zuge der inflammatorischen Prozesse der Atherogenese kommt es zu einer Dysbalance zwischen endogenen antioxidativen Systemen und der Produktion von ROS durch Oxidasen (15). OxLDL kann nicht mehr über den LDLR resorbiert werden, sondern wird über sogenannte *Scavenger*-Rezeptoren in Makrophagen aufgenommen. Von Bedeutung sind hierbei insbesondere die Rezeptoren CD36, Makrophagen-*Scavenger*-Rezeptor-A (MSR-A) und LOX-1 (*lectin-like oxLDL receptor-1*) (16). Es konnte gezeigt werden, dass neben Makrophagen auch glatte Muskelzellen die aufgenommenen Cholesterinester in Form von Lipidtropfen (*lipid droplets*) einlagern und so zu der Bildung sogenannter Schaumzellen führen (17).

1.1.2.4 Plaquereifung

Sowohl Makrophagen als auch glatte Muskelzellen übernehmen somit eine entscheidende Funktion während der Atherogenese. Bereits 1973 zeigten Ross und Glomset in einem *in vivo* Experiment, dass es nach einer endothelialen Schädigung durch einen intravasalen Ballon-Katheter zu einer Proliferation glatter Muskelzellen in der *Intima* kommt. *In vitro* dokumentierten sie, dass unter anderem LDL ein Proliferationsstimulus ist, und intrazellulär akkumuliert (18).

Untersuchungen der Zellzusammensetzung in humanen Plaques bestätigen die führende Bedeutung von Makrophagen und glatten Muskelzellen. Durch monoklonale Antikörperfärbungen konnte der histologischen Einteilung der Plaques in Kern, fibrotische Kappe und Schulterregion, die verantwortlichen Zellpopulationen zugeordnet werden (Abb. 1). In der nekrotischen, lipidreichen Kernregion finden sich vor allem Makrophagen bzw. untergegangene Schaumzellen (19), in der fibrotische Kappe akkumulieren vorrangig glatte Muskelzellen und T-Lymphozyten (20). Diese T-Zellen können durch den Mediator Interferon- γ (IFN- γ) sowohl antiatherogen als auch proatherogen wirken, insbesondere fördern oder hemmen die verschiedenen Subgruppen der T-Zellen in unterschiedlicher Weise die Atherogenese (21).



1.1.2.5 Plaquestabilität

Die Plaquestabilität wird unter anderem durch Lipid- und Makrophagenakkumulation und der Verteilung der glatten Muskelzellen moduliert. So präsentierten Davies *et al.*, dass bei erhöhtem Lipidanteil die Tendenz zur Plaquetrombose steigt. Zudem enthielten thrombosierende Plaques weniger glatte Muskelzellen und mehr Makrophagen als intakte Plaques (23).

Neben einem großen, zellarmen Lipidkern, fördert die Sekretion von Matrixmetalloproteasen (MMP) aus Makrophagen und glatten Muskelzellen und die damit verbundene Degradierung der extrazellulären Matrix (EZM) die Plaquestabilität (24). Nachfolgend besteht die Gefahr einer Plaqueruptur und damit verbunden eine akute Ischämie wie beispielsweise bei einem Myokardinfarkt (25), wodurch die große klinische Relevanz der Plaquestabilität unterstrichen wird.

1.1.3 Atherosklerose im Mausmodell durch *ApoE*-Defizienz

Apolipoprotein-E (ApoE) übernimmt eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel. Nahrungsfette werden als Bestandteil von Chylomikronen und endogene Fette durch Lipoproteine mit Hilfe von ApoE transportiert und verteilt. Nach Abgabe von Lipiden an periphere Körperzellen verbleiben Chylomikronen *Remnants*, welche über Interaktion von ApoE mit dem LDLR und dem Chylomikronen-*Remnant*-Rezeptor (LRP, LDLR-related protein) vor allem in Hepatozyten aufgenommen werden (26). Um ein Mausmodell zur Untersuchung von Atherosklerose zu entwickeln, wurde die *ApoE*-defiziente (*ApoE*^{-/-}) Maus entwickelt. Diese Tiere zeigen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe bei Untersuchungen im Alter von 6-40 Wochen sowohl unter einer hochkalorischen *Western Diet* (WD, westliche Diät), als auch unter

Normalfutter erhöhte Serumcholesterinspiegel und eine höhere Atheroskleroselast in der gesamten Aorta und ihren Hauptästen (27). Die Läsionen zeigen einen ähnlichen Progress wie humane Läsionen (28), wobei die Zusammensetzung der Plasmalipide dem humanen Lipid-Profil weniger ähnelt als bei einigen anderen Tiermodellen (29). So zeigen *ApoE*^{-/-} Mäuse hohes Gesamtcholesterin, VLDL und LDL, sowie sehr niedrige HDL Konzentrationen unter einer normalen Diät und stark erhöhte Werte für Gesamtcholesterin, Triglyceride und LDL mit minimalen Veränderungen der VLDL und HDL Konzentrationen unter WD.

1.2 Extrazelluläre Matrix und Plaquekomposition

Die EZM stellt neben den beteiligten zellulären Komponenten einen wichtigen Bestandteil atherosklerotischer Plaques dar und ist von Bedeutung für Stabilität, Proliferation, Migration und Adhäsion.

Zu den Faserbestandteilen der EZM gehören zum einen die zugfesteren Proteinstrukturen aus der Familie der Kollagene und andererseits elastische Fasern, bestehend aus den Proteinen Elastin und Fibrillin. Wichtiger Bestandteil der Arterienwand sind Kollagenfasern Typ I und III. Eine potenziell antiatherogene Wirkung zeigen Kollagenfibrillen durch die Hemmung glatter Muskelzellproliferation (30), proatherogene Effekte zeigt andererseits Kollagen I, dessen Hemmung zu einer Modulation der VSMC-Migration und -Proliferation einhergehend mit einer Abnahme der *carotis intima media thickness* (cIMT) führt (31).

Des Weiteren stellen wasserbindende Glykosaminoglykane (GAGs) und Proteoglykane einen wichtigen Bestandteil dar, welcher weiterhin die Komplexität und Interaktionsstruktur der Matrix mit diversen Zellpopulationen erhöht. GAGs sind Disaccharid-Kohlenhydratketten bestehend aus Uronsäure und Aminozucker, welcher oft sulfatiert ist (32). Ihre negative Ladung ist verantwortlich für ihre Eigenschaft Wasser zu binden und ein wässriges Milieu zu generieren. Weiterhin können GAGs als Seitenketten mit einem *Core*-Protein sogenannte Proteoglykane bilden.

Im Rahmen der Atherosklerose sind hier insbesondere die Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA) als wichtiges GAG, sowie die zu den *small leucin-rich proteoglycans* (SLRP) gehörenden Proteoglykane Biglykan und Decorin bedeutsam.

1.2.1 Hyaluronsäure

HA findet sich in allen Wandschichten humaner Arterien (33) und wird durch die HA Synthasen HAS1-3 vor allem von VSMC und Endothelzellen synthetisiert (34). Bei Störung der endothelialen Integrität (zum Beispiel durch eine Ballonkatheter-Untersuchung) wird HA

vermehrt in der *Intima* und *Media* von Ratten exprimiert (35), wohingegen im Zuge der Plaquereifung der HA-Anteil in humanen Koronararterien wieder abnimmt (36).

Als Bestandteil der endothelialen Glykokalyx ist HA zudem Teil einer selektiven Barriere für Makromoleküle. In Bezug auf Atherogenese konnte gezeigt werden, dass an Prädispositionsstellen für Atherosklerose, wie Gefäß-Bifurkationen, die Glykokalyxdicke abnimmt (37). Durch Entfernen der Glykokalyx z.B. mit Hyaluronidase verändert sich die Permeabilität, wodurch das Eindringen größerer Moleküle in die Gefäßwand ermöglicht wird (38) und nachfolgend durch Adhäsion und Migration von Immunzellen inflammatorische Prozesse und damit die Progression der Atherosklerose gefördert werden. ROS und die Bildung von oxLDL können ebenfalls zu einer Funktionsstörung der Glykokalyx führen, was mit einer erhöhten Gefäßwandadhäsion für Blutzellen einhergeht (39). Die Bedeutung von HA für die Glykokalyxintegrität und das damit einhergehende antiatherogene Potential wiesen Nagy *et al.* in einem *Apoe*^{-/-} Mausmodell nach. Hier zeigte sich eine Aggravation der Atherosklerose mit Störung der Glykokalyx durch Hemmung der HA Synthese (40).

Aus Zellversuchen ist bekannt, dass VSMC HA produzieren (35). HA interagiert mit VSMC durch Bildung einer perizellulären Matrix, welche Migration, Proliferation und den Zellphänotyp der VSMC beeinflusst (41). Weiterhin konnte eine Inhibition der Proliferation der VSMC durch HA Fragmente, sowie eine Induktion der Migration festgestellt werden (42,43).

Ein proatherogener Effekt von HA konnte bereits in einem transgenen Mausmodell mit HA-Überproduktion in Gefäßmuskelzellen mit *Apoe*^{-/-} Hintergrund gezeigt werden (44). Auch die Untersuchungen der HAS-Isoformen HAS2 und HAS3 kommen zu diesem Ergebnis. Homann und Grandoch *et al.* zeigten, dass HAS3 in atherosklerotischen Läsionen durch aktivierte Makrophagen vermehrt durch VSMC gebildet wird und ein kombinierter *HAS3-Apoe-Knockout* zu signifikant weniger atherosklerotischen Plaques führt (45). Auch eine Überexpression von HAS2 in VSMC geht mit einem erhöhten Progress der Atherosklerose einher (46). Die Rolle der HAS1 mit geringerer enzymatischer Aktivität bleibt weiter zu untersuchen (47).

Vor allem die Größe der HA-Moleküle scheint für den atherosklerotischen Prozess von Bedeutung zu sein. Die durch Hyaluronidasen entstehende Fragmente, sogenannte *low molecular weight* HA-Moleküle (HA Moleküle mit geringem Molekulargewicht, LMW-HA), entwickeln sich in inflammatorischem Gewebe und induzieren inflammatorische Gene von Makrophagen (48).

Bisher ließ sich keine Korrelation zwischen HA-Gehalt und Plaquestabilität zeigen, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass die LMW-HA-Konzentration in reiferen, instabileren Plaques erhöht ist. Zudem korreliert die MMP-9 Aktivität mit LMW-HA Expression. Auch *in vitro* zeigte sich, dass eine Stimulation von Makrophagen mit LMW-HA zu einem Anstieg der MMP-9 Aktivität führt (49).

Somit scheint die Rolle von HA in atherosklerotischen Prozessen durchaus variabel zu sein und je nach Zelltyp und Lokalisation scheinen sowohl pro- als auch antiatherogene Effekte möglich.

1.2.2 Biglykan und Decorin

Neben HA sind für die Atherosklerose die SLRP Biglykan und Decorin bedeutsam (50). Diese spielen unter anderem eine Rolle in inflammatorischen Prozessen. In einem Nephritismodell kam es zu einem Anstieg der Biglykanexpression durch infiltrierende Makrophagen. Decorin hingegen zeigte in diesem Inflammationsmodell einen protektiven Effekt (51). Seine proinflammatorische Wirkung erzielt Biglykan mitunter als Ligand des TLR-2 (*Toll-like* Rezeptor) und TLR-4 auf Makrophagen (52) und durch Interaktionen mit dem Makrophagen SR-A, der auch LDL im Zuge der Atherogenese bindet (53).

Während Decorin sich vor allem in der Adventitia gesunder Arterien befindet, wird Biglykan in allen Wandschichten, insbesondere jedoch in der Intima, nachgewiesen (54,55). In atherosklerotischen Plaques kommen beide SLRP besonders in kollagenreichen Anteilen vor (55).

Die *response-to-retention* Hypothese von Tabas und Williams sieht die Retention von Lipoproteinen als zentrales Ereignis der Atherogenese und postuliert, dass Proteoglykane, darunter insbesondere Decorin und Biglykan, maßgeblich an diesem Prozess beteiligt sind (56,57). Zwar konnte in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass auch Decorin an Kollagen-1 bindet und so eine Rolle bei der Lipoproteinretention spielt (58), jedoch deuten viele Untersuchungen darauf hin, dass Biglykan das entscheidende Proteoglykan ist. So zeigten Analysen eine Co-Lokalisation von Biglykan und Apolipoproteinen in atherosklerotischen Läsionen (59,60). Über eine Bindung der Lipoproteine mit den Biglykan-Seitenketten trägt das Proteoglykan zur Lipidretention in Plaques bei (61).

Der mutmaßliche proatherogene Effekt von Biglykan konnte in einem transgenen Tiermodell bestätigt werden. Biglykanüberexpression von SMC auf einem *LDLR^{-/-}* Hintergrund führte zu vermehrter Expression vaskulären Biglykans, verstärkter Atherosklerose und einem Anstieg der Lipidretention (61). Im Umkehrschluss wies eine Biglykan-Defizienz jedoch keinen protektiven Effekt auf, eine kompensatorische Hochregulation der vaskulären Perlecan-Expression wird hier diskutiert (62). Biglykan und andere Vertreter der SLRP regulieren weiterhin maßgeblich die Organisation der EZM und die Organisation der Strukturmodule des Kollagens und tragen so zur Modulation der atherosklerotischen Plaques bei (63,64).

Decorin hingegen scheint eine duale Rolle zu spielen. In *ApoE^{-/-}* Mäusen konnte einerseits eine Verminderung der atherosklerotischen Läsionen, sowie geringere Makrophageneinwanderung und MMP-Aktivität in Plaques durch Decorinüberexpression gezeigt

werden (65). Andererseits fördert Decorin die Kalzifizierung von VSMC der Aorta (66). Als EZM-Komponente spielt Decorin eine entscheidende Rolle in der Kollagenese. Ein Decorin-*Knockout* führt im Mausmodell zu verminderter Hautstabilität und Ausdünnung aufgrund abnormer Morphologie und Organisation von Kollagenfibrillen (67). Passend zur kollagenstabilisierenden Wirkung konnte Decorin vor allem in den dichten, kollagenreichen fibrotischen Regionen atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden (55) und kann somit von Bedeutung für die Plaquestabilität sein.

1.3 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Weltweit litten 2017 6,8 Million Menschen an CED, wobei die Prävalenz in höher entwickelten Ländern am höchsten war (68). Die Bezeichnung CED umfasst die beiden Hauptpathologien Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa. Männer und Frauen erkranken etwa gleichhäufig mit der höchsten Inzidenz bei jüngeren Patienten in der zweiten bis vierten Lebensdekade (69).

1.3.1 Pathohistologie

Morbus Crohn kann jeden Abschnitt des Gastrointestinaltraktes betreffen, kommt aber oft im Dün- und Dickdarm vor. Makroskopisch fällt das segmentale, transmurale Auftreten auf, wobei befallene und gesunde Abschnitte nebeneinander liegen. Typische Befunde sind Strikturen, Ulzerationen und Pflastersteinrelief, welches durch Ödeme und Fissuren entsteht. Im histologischen Bild finden sich Granulome, vermehrtes Auftreten von Follikeln, sowie Fistelbildung.

Im Gegensatz zum Morbus Crohn beginnt die Colitis Ulcerosa im distalen Rektum und kann sich nach proximal bis zu einer Pankolitis ausbreiten. Typisch sind makroskopisch erkennbare ödematöse Schwellungen und Erosionen bis hin zu Ulzerationen. Histologisch kommt es zur Infiltration von Leukozyten und massiven Ödemen sowie Veränderung der Drüsenstruktur und der Ausbildung von Kryptenabszessen (70).

Durch die chronische Entzündung besteht ein erhöhtes Risiko für Epitheldysplasien und die Entwicklung von kolorektalen Karzinomen (71).

1.3.2 Pathogenese

Die Ätiologie der CED ist bislang nur teilweise verstanden. Diskutierte Faktoren sind familiäre Belastung und genetische Disposition sowie Umweltfaktoren wie Rauchen, Infektionen und Ernährung, Epithelbarriere- und Immunregulationsstörungen (*as reviewed by Zhang und Li (72)*).

1.3.2.1 Genetik

CED treten nicht nur familiär gehäuft auf, auch bei individuellen klinischen Aspekten und Verlaufsformen finden sich familiäre Häufungen (73). Prädisponierende Gene sind als *IBD1-9 (inflammatory bowel disease)* benannt (74). Für Morbus Crohn wurde als erstes Gen *NOD2 (nucleotide-binding-oligomerisation-domain) = IBD1* identifiziert. Mutationen in diesem Gen können zu einer Überaktivierung von NF (*nuclear factor*)- κ B (Schlüsselprotein der angeborenen Immunabwehr) führen oder das *NOD2*-Genprodukt durch *Missense*-Mutation ausschalten (75,76).

1.3.2.2 Umweltfaktoren

Ein naheliegender Faktor zur Beeinflussung der Pathogenese ist die Ernährung. Diskutiert werden unter anderem hoher Zucker- und Fettkonsum und geringe Ballaststoffaufnahme, eindeutige Ergebnisse gibt es jedoch nicht (77).

Ausführlich wurde der Einfluss des Zigarettenrauchens untersucht. Auf Colitis Ulcerosa hat Rauchen einen protektiven Effekt, für Morbus Crohn hingegen zählt es zu den Risikofaktoren (78). Psychischer Stress wirkt sich negativ auf den Krankheitsverlauf der CED aus und erhöht das Risiko für einen Krankheitsschub (*as reviewed by Sun et al. (79)*).

1.3.2.3 Immunregulationsstörungen

Das komplexe Zusammenspiel der Immunreaktion der Darmwand ist bei CED in verschiedenen Aspekten gestört. Die Darmwand baut in den ersten Lebensjahren eine orale Toleranz gegenüber Antigenen der normalen Darmbakterien auf (80). Dieser Vorgang der Kolonisation ist wichtig für „*Nährstoffverwertung, Epithelbarriere, Fremdstoffstoffwechsel, Angiogenese und postnatale Darmreifung*“ (81). Eine Störung dieser oralen Toleranz führt zu Entzündungsreaktionen.

Den ersten Kontakt mit den Antigenen der Außenwelt haben die Darmepithelzellen. Sie sind geschützt durch eine Schleimschicht, dessen Zusammensetzung bei CED verändert ist (82). Die Epithelbarriere ist weiterhin durch erhöhte Permeabilität geschädigt (auch bei nicht-CED-Patienten mit familiärem Risiko) (83,84), sodass AG in direkten Kontakt mit Immunzellen der *Lamina Propria (L. Propria)* treten können.

Durch Störungen der Expression sogenannter *pattern recognition* Rezeptoren wie TLR und NOD auf Epithel- (85) und dendritischen Zellen (86), lösen AG der Bakterien der natürlichen Darmflora eine Entzündungskaskade aus und aktivieren unter anderem Makrophagen, T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen und Granulozyten (80). T-Helferzellen reifen und werden gegenüber zahlreichen Apoptosesignalen resistent (87). Das Verhältnis regulatorischer und (über)aktivierter T-Zellen gerät aus dem Gleichgewicht. Die Folge sind die Akkumulation von

Interleukinen und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) produzierenden Makrophagen und die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen aus dem Blut (80).

1.4 CED und Atherosklerose

1.4.1 Einfluss chronischer Entzündungen

Wie bereits beschrieben, spielt eine zugrunde liegende, chronische Inflammation bei der Atherogenese eine entscheidende Rolle. Auch andere chronisch-entzündliche Krankheiten selbst sind als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen anerkannt. Besondere Beachtung fanden hier die Krankheiten des rheumatischen Formenkreises wie rheumatoide Arthritis und systemischer Lupus erythematodes (SLE) (*as reviewed by Roifman et al.* (88)). Diverse Studien der letzten Jahre haben die Inflammation als eigenständigen Risikofaktor der Atherosklerose identifiziert, unabhängig vom Lipoproteinprofil und der Cholesterinbelastung (CANTOS (89); COLCOT (90)).

Die Prävalenz des metabolischen Syndroms, bestehend aus Fettleibigkeit, Bluthochdruck, gestörter Glukosetoleranz und Fettstoffwechselstörung, ist bei Patienten, die unter chronischen Entzündungen des rheumatischen Formenkreises leiden – anders als bei CED-Patienten – erhöht (91,92). Dennoch bleibt das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei der rheumatischen Patientengruppe auch weiterhin erhöht, wenn traditionelle Risikofaktoren, wie fortgeschrittenes Alter, Rauchen, Diabetes mellitus, erhöhter *Body-Mass-Index* (BMI), arterielle Hypertonie und Hypercholesterinämie adjustiert werden. (93). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass systemische Entzündungen zur endothelialen Dysfunktion beitragen können (94,95).

1.4.2 Einfluss von CED

Zu den traditionellen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen gehören nach dem *Framingham Risk Score* Alter, männliches Geschlecht, Rauchen, erhöhtes Gesamtcholesterin, erniedrigtes HDL, Übergewicht, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus. Bisläng untersuchten erst wenige Studien die Gewichtung dieser Faktoren vor dem Hintergrund CED. Patienten mit CED scheinen eine geringere Ausprägung traditioneller Risikofaktoren aufzuweisen, bei gleichzeitig erhöhtem kardiovaskulären Risiko (96–98). So ist die cIMT als Indikator für subklinische Atherosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen (99) bei CED-Patienten erhöht (100).

Große Studien und Meta-Analysen fanden lange kein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko für CED (101–103). In neueren Studien, die die variable Krankheitsaktivität während der

entzündlichen Schübe berücksichtigt, werden nun jedoch zunehmend signifikante Zusammenhänge zwischen CED und kardiovaskulären Erkrankungen und Mortalität aufgezeigt.

So wiesen mehrere landesweite Studien in Dänemark, Frankreich und Südkorea ein erhöhtes Risiko für KHK und arterielle thromboembolische Ereignisse nach (104–106). Auch eine Meta-Analyse erläuterte ein mäßig-erhöhtes Risiko für KHK und Schlaganfall, insbesondere für Frauen (107).

Ein erhöhtes Risiko besteht somit vor allem während der Krankheitsschübe und bei der chronisch-aktiven Form der CED. Dies dokumentierten dänische Studien für Herzinsuffizienz (108), Myokardinfarkt, Schlaganfall und kardiovaskuläre Mortalität (109).

Ein erhöhtes Risiko für venöse Thrombembolien wiesen unter anderem Grainge *et al.* in einer großen Kohortenstudie mit 13 756 CED-Patienten und 71 672 Kontrollen nach (110). Auch hier scheint die Krankheitsaktivität das Risiko weiter zu steigern.

Insgesamt zeigen vor allem junge (unter 50 Jahren), weibliche CED-Patientinnen in aktiven Krankheitsphasen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (*as reviewed by Bigeh et al.* (111))

1.5 Ziele der Arbeit

Als eine der häufigsten Todesursachen weltweit bildet die Atherosklerose und die damit einhergehenden Folgeerkrankungen und Komplikationen einen wichtigen Forschungsschwerpunkt. Der Einfluss chronischer Entzündungsprozesse auf die Atherogenese und -progression ist vor allem für rheumatoide Erkrankungen untersucht. Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Einordnung der Rolle der CED leisten.

Ziel der Arbeit war es, an einem geeigneten Tiermodell den Einfluss von CED auf die Komposition atherosklerotischer Läsionen zu untersuchen. Die Zusammensetzung atherosklerotischer Plaques bedingt deren Stabilität und stellt in Bezug auf das Auftreten von Folgeerkrankungen wie dem Myokardinfarkt oder Schlaganfall eine herausragende Rolle dar.

Die Komposition der Plaques, welche neben der Stabilität auch Proliferation, Migration und Adhäsion beteiligter Zellpopulationen wie Immunzellen, Muskelzellen und Bindegewebszellen beeinflusst und umgekehrt auch selbst zu beeinflussen vermag, ist damit maßgeblich an der Entstehung und Progression der Atherosklerose beteiligt.

Diese Arbeit untersuchte des Weiteren die Relevanz der Diät, um die Effekte der chronischen Entzündung durch DSS-Kolitis untersuchen zu können. So können die eigentlichen Auswirkungen der Kolitis durch den starken proatherogenen Stimulus der hochkalorischen WD maskiert werden. Ursächlich kann eine durch die WD selbst ausgelöste systemische Entzündung

sein. Bei Fütterung einer Normaldiät hingegen kann der spezifische Einfluss der CED untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuche

Männliche *ApoE*^{-/-} Mäuse (Taconic M&B, Lille Skensved, Denmark) wurden unter standardisierten Bedingungen in einem klimatisierten Raum gehalten. Alle Tiere wurden im zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen bzw. in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten (Aktenzeichen des LANUV: 87-51.04.2010.A142).

Die Induktion der chronischen Kolitis erfolgte durch Dextran-Natriumsulfat (*dextran sodium sulfate*, DSS) nach dem Protokoll von Wirtz *et al.* (112)

Die Wirkung von DSS wird unter anderem über Komplexbildung mit mittellangen Fettsäuren vermittelt, welche von den Darmepithelzellen aufgenommen werden. In diesen wirkt DSS toxisch und führt zu einer Barrierestörung (113). Besonders der distale Abschnitt des Kolons nimmt DSS auf und zeigt das typische Bild einer Kolitis durch Störung der intestinalen Barriere mit konsekutiver Infiltration von Darmbakterien (114).

Klinisch zeigen die Tiere Diarrhoen, blutigen Stuhl und Gewichtsabnahme. Das Kolon verkürzt sich und in der Darmwand kommt es zu Erosionen, Kryptenverlust und Einwanderung von Entzündungszellen (115).

Die Tiere erhielten ab einem Alter von durchschnittlich sechs Wochen WD (21 % Butterfett und 0,15 % Cholesterin) oder Standard-Normalfutter. Ein Teil der Tiere erhielt Trinkwasser, dem DSS 2% zugefügt wurde. Um eine chronische Darmentzündung hervorzurufen, wurde den Tieren DSS in Zyklen verabreicht: sechs Tage DSS gefolgt von zwei Wochen DSS-freiem Trinkwasser (Wirtz, 2007) (Abb. 2).

Zum Versuchs-Endpunkt wurden den Tieren die Aorta bis zu den Beinarterien, Herz und der untere Darmabschnitt zur weiteren Untersuchung von Frau Nina Pasch und Dr. rer. nat. Yanina Ostendorf entnommen. Für diese Arbeit wurden von der Autorin keine Prozeduren an den Tieren selbst durchgeführt. Es erfolgte die Verarbeitung der bereits entnommenen Organe.

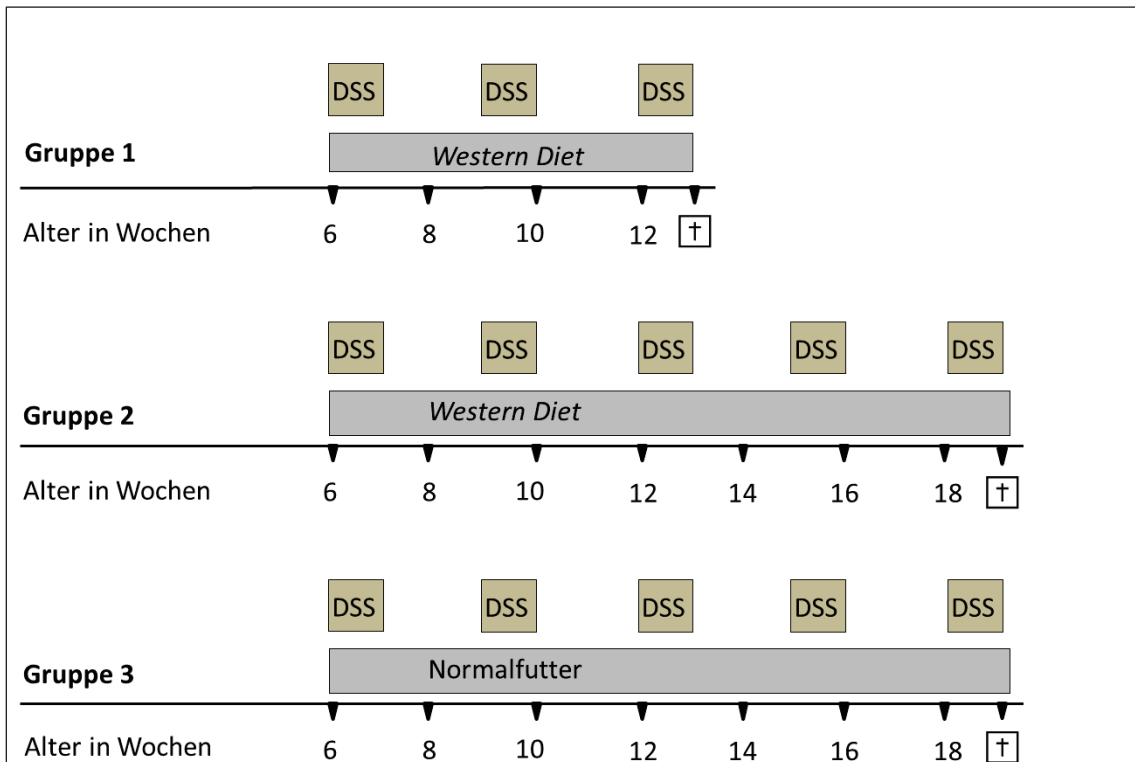


Abb. 2: Versuchsaufbau.

Gruppe 1: Männliche, sechs Wochen alte *Apoe*^{-/-} Mäuse erhielten eine Fütterung mit WD und wurden für 3 Zyklen DSS, bestehend aus je sechs Tagen mit bzw. ohne DSS und zwei Wochen DSS-freiem Intervall, bis zum Endalter von 13 Wochen behandelt.

Gruppe 2: Männliche, sechs Wochen alte *Apoe*^{-/-} Mäuse erhielten eine Fütterung mit WD und wurden für 5 Zyklen DSS, bestehend aus je sechs Tagen mit bzw. ohne DSS und zwei Wochen DSS-freiem Intervall, bis zum Endalter von 19 Wochen behandelt.

Gruppe 3: Männliche, sechs Wochen alte *Apoe*^{-/-} Mäuse erhielten eine Fütterung mit Normalfutter und wurden für 5 Zyklen DSS, bestehend aus je sechs Tagen mit bzw. ohne DSS und zwei Wochen DSS-freiem Intervall, bis zum Endalter von 19 Wochen behandelt.

2.2 Schweregrad der Kolitis

2.2.1 Körpergewicht als Indikator für das Kolitisausmaß

Für die Untersuchung des Einflusses von DSS auf die Gewichtszunahme, wurde das Gewicht vor und nach jedem Zyklus auf das Ausgangsgewicht in Prozent bezogen. In der Kontrollgruppe wurde das Gewicht an den entsprechenden Tagen verwendet.

2.2.2 Anfertigung und Färben von Gefrierschnitten

Die gewonnenen Darmabschnitte wurden direkt in *Tissue Tek*[®] Medium (Satura Finetek, Staufen) eingebettet und bei -80 °C gelagert.

Zum Anfertigen von Schnittpräparaten wurden die Proben auf -20 °C erwärmt und mit einem Kryostaten (Leica CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar) 14 µm dick geschnitten. Die Objektträger wurden nach dem Trocknen bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Die Färbung der Schnitte des unteren Darmabschnitts erfolgte mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt) und Eosin 1 % (Sigma Aldrich, Steinheim) (Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung).

2.2.3 Makroskopischer und mikroskopischer Kolitis-Schweregrad

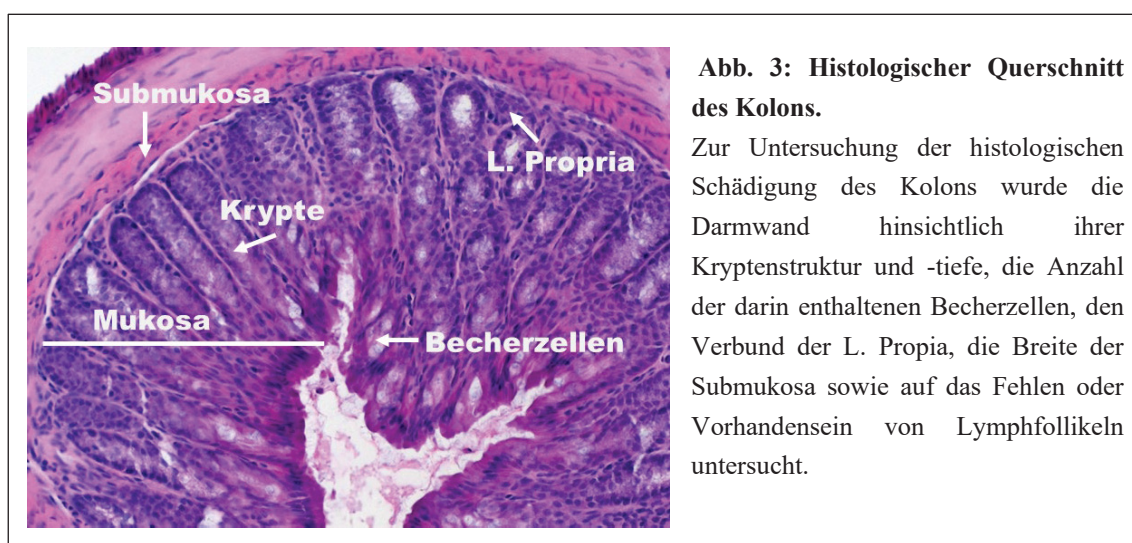
2.2.3.1 Makroscore

Bei der Beurteilung der makroskopischen Entzündungszeichen wurde der Quotient aus Darmgewicht zu Darmlänge (Makroscore) berechnet unter der Annahme, dass eine Entzündung zu einer Verkürzung des Darms führt und gleichzeitig die Masse aufgrund von Zelleinwanderung und veränderter Permeabilität zunimmt.

2.2.3.1 Histoscore

Die HE gefärbten Darmschnitte wurden bezüglich des Ausmaßes der Darmentzündung durch einen Kolitis-Score evaluiert (institutsintern entwickelt durch Dr. med. Anette von Glinski, Tabelle 1). Dabei wurde sowohl Kryptentiefe als auch -struktur, Breite/Zellzahl der *L. Propria*, Dicke der Submukosa, Zelluntergang, Auftreten von Follikeln und Anteil der Becherzellen bewertet. Je höher der Score, desto geschädigter war die Darmwand, die Maximalpunktzahl lag bei 18. Fehler aufgrund von Voreingenommenheit oder Subjektivität der Bewertung und wurden durch eine blinde, von drei unabhängigen Untersuchern durchgeführte Auswertung minimiert.

Der histologische Aufbau der Darmwand ist in Abbildung 3 dargestellt.



Parameter	Punkte	Beschreibung
Kryptentiefe	0	Normal
	1	Auf 2/3 der Tiefe reduziert bei < 10 % der Darmwand
	2	Auf 2/3 der Tiefe reduziert bei > 10 % der Darmwand
	3	Auf 1/3 der Tiefe reduziert Verlust der Krypten
Kriptenstruktur	0	Normal (tubulär, scharf abgrenzbar)
	1	Bis 10 % entformt
	2	10-70 % entformt
	3	> 70 % entformt/völliger Verlust der Struktur
Breite der Submukosa	0	Kompakt, dünn
	1	Bindegewebe aufgelockert/Zellen vermehrt
	2	Zusätzlich vollständige Absetzung zur Mukosa
Einwanderung mononuklearer Zellen in <i>L. Propria</i>	0	Homogenes Gewebe
	1	Oberflächenepithel verstärkt abgelöst
	2	Apoptotische Anteile, keine klare Abgrenzung
	3	Gesamte Darmwand zerstört
Lymphfollikel	0	Keine Lymphfollikel
	1	1 Lymphfollikel
	2	> 1 Lymphfollikel
Becherzellen	0	Füllen Krypten nahezu aus
	1	< 50 % der Krypten
	2	< 10 % der Krypten

Tabelle 1: Punktescore zur Beurteilung des histologischen Ausmaßes der Kolitis

2.3 Gesamt-RNA Isolation aus Darmproben

Die RNA aus den gewonnenen Darmproben wurden mit Hilfe des *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit*[®] (Qiagen, Hilden) isoliert. Das Kit isoliert RNA, die größer als 200 Nukleotide ist und erreicht somit einen hohen Anteil an mRNA (siehe Produktbeschreibung).

Die Proben wurden im ersten Schritt mit einem Gemisch aus 1:100 β -Mercaptoethanol und RLT-Puffer lysiert (maximal 30 mg auf 300 μ l) und mit RNase-freiem Wasser (590 μ l/Probe) und Proteinase K (10 μ l/Probe) bei 55 °C zehn Minuten inkubiert und anschließend drei Minuten bei 10,000 rcf (*relative centrifugal force*, relative Zentrifugalkraft) zentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit 0,5 Volumenmenge 100 % Ethanol, auf das *RNeasy Mini Spin Column*[®] übertragen, welches in ein Sammelröhrchen eingelassen war. Die Probe wurde ein weiteres Mal für 15 Sekunden bei 8000 rcf zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dabei bindet die RNA an eine Membran im *RNeasy*-Röhrchen. Es folgte ein Waschschriff mit RW1-Puffer, bevor *DNase I Incubation Mix* hinzugegeben und 15 Minuten inkubiert wurde, um die RNA von Kontaminationen zu befreien.

Abschließend folgte ein erneuter Waschschriff mit RW1-Puffer, sowie RPE-Puffer, bevor die Probe mit RNase-freiem Wasser eine Minute mit 8000 rcf eluiert wurde.

Die RNA-Konzentration wurde im Folgenden photometrisch mittels NanoDrop 1000 (Peqlab) bestimmt.

2.4 cDNA-Synthese und quantitative *Real-Time*-PCR

2.4.1 cDNA-Synthese

Für die Herstellung von cDNA wurde das *Superscript II*™ *Reverse Transcriptase Kit* (Invitrogen, Waltham, USA) verwendet. Zur cDNA-Synthese wurden 1 µg RNA mit 10 µl zweifach destilliertem Wasser und 1 µl Oligonukleotide und 1 µl 10 mM dNTP-Mix (2'-Deoxynukleosid 5'-Triphosphat) fünf Minuten bei 65 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 4 µl 5x *First Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl 0,1M DTT (Dithiothreitol) und 1 µl RNasin (40 U/µl, Promega) hinzugegeben und weitere zwei Minuten bei 42 °C inkubiert. Danach folgte die Inkubation mit *Superscript II-Mix* (1 µl) für 50 Minuten bei 42 °C, zehn Minuten bei 72 °C und Abkühlen auf 4 °C bevor jede Probe mit 100 µl H₂O verdünnt wurde.

2.4.2 Quantitative *Real-Time*-PCR

Die PCR (*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion) dient der Vervielfältigung von DNA. In cDNA umgewandelte mRNA aus Darmproben kann so mittels Echtzeitmessung quantifiziert (quantitative *real time*-PCR, RT-PCR) werden. Als Referenzgene diente *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase). Die Durchführung erfolgte mit *SYBR*® *Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit 10 µl *Master Mix*, 5 µl cDNA und 2,5 µl Primer, welche mit der Primer3-Software erstellt wurde. Die Genexpression wurde mit der $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ Methode ermittelt.

2.5 Quantifizierung der Atherosklerose – Lipidfärbung der Aorta

2.5.1 Präparation und Färbung

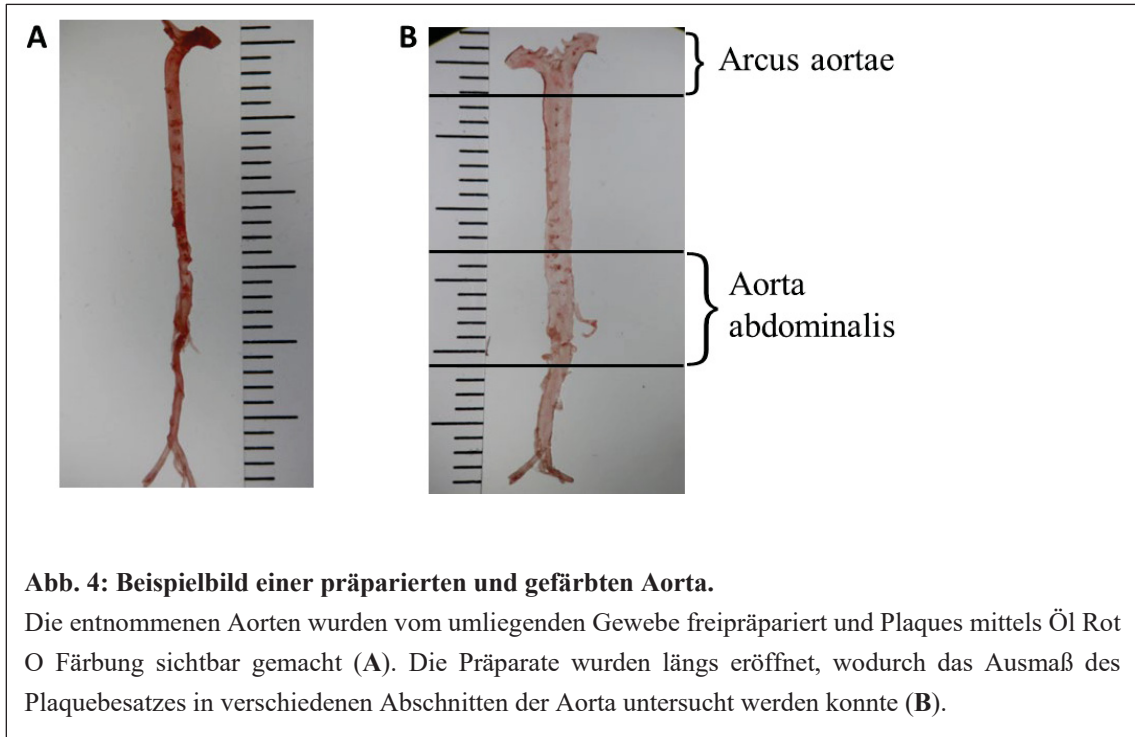


Abb. 4: Beispielbild einer präparierten und gefärbten Aorta.

Die entnommenen Aorten wurden vom umliegenden Gewebe freipräpariert und Plaques mittels Öl Rot O Färbung sichtbar gemacht (A). Die Präparate wurden längs eröffnet, wodurch das Ausmaß des Plaquebesatzes in verschiedenen Abschnitten der Aorta untersucht werden konnte (B).

Die in 4 % Formalin gelagerten Aorten wurden unter Vergrößerung durch ein Binokular (Zeiss Stemi 2000 C, Jena) in PBS (*phosphate buffered saline*, Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) von umliegendem Gewebe, freipräpariert und anschließend 24 Stunden in PBS gelagert. Die Detektion der atherosklerotischen Plaques erfolgte mit Öl Rot O (ÖRO) Färbelösung. Dazu wurden 10 ml 1 M NaOH zu je 35 ml frisch hergestellter Stammlösung (0,4 g Öl Rot O und 80 ml technisches Methanol (99,9 %)) gegeben. In 6- bis 24-Well-Platten wurden die Aorten vor dem Färben fünf Minuten in 78 % Methanol gelegt. In der ÖRO Färbelösung verblieben die Proben 90 Minuten. Der nicht gebundene Farbstoff wurde durch erneute Überführung in 78 % Methanol über die Dauer von fünf Minuten entfernt. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte bei 4 °C in PBS. Die Untersuchung der Aorten erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Nina Pasch.

2.5.2 Dokumentation und Auswertung

Die Aorten wurden mit einer Canon G10 Kamera und dem Programm *Zoombrowser Ex* aufgenommen, nachdem sie entlang des konkaven Randes (mausseitig rechts) von dem Aortenbogen bis zu den Beinarterien aufgeschnitten wurden (Abb. 4). Zusätzlich wurde der

Aortenbogen auf der konvexen Seite (durch die Abgänge der Halsarterien) gespalten, die Proben konnten so aufgeklappt fotografiert werden.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von *ImageJ* (National Institutes of Health). Die Ränder der aufgeschnittenen Aorta wurden umfahren und das Bild in 8 Bit Format (Graustufen) konvertiert. Der Schwellenwert wurde manuell so ausgewählt, dass wirkliche Plaques (im Vergleich mit dem Originalbild) markiert wurden, Verschattungen und andere Verfälschungen jedoch ausgespart blieben. Der Schwellenwert wurde bei der jeweiligen Färbereihe möglichst konstant gehalten. Die Auswertung erfolgte als *Area Fraction* (AF, prozentualer Anteil) für die Gesamt-Aorta (bis 20 mm nach Abgang der dritten Halsarterie), den Aortenbogen (bis 2 mm nach Abgang der dritten Halsarterie) und die abdominelle Aorta (8 mm um den Bereich der Nierenarterienabgänge).

2.6 Plaquekomposition – (Immun-)Histochemische Färbungen

2.6.1 Kryokonservierung und Anfertigung von Gefrierschnitten

Die entnommenen Herzen wurden nach 24-stündiger Lagerung in Saccharose-Lösung in *Tissue Tek*[®] Medium (Sakura Finetek, Staufen) bzw. *KP-Cryocompound* (Klinipath, Duiven, Niederlande) eingebettet, nachdem der Apex parallel zur Herzklappenebene abgetrennt wurde. Die Proben wurden bis zum Erstarren des Mediums bei -20 °C gekühlt und anschließend bei -80 °C gelagert.

Zum Anfertigen der Schnittpräparate wurden die Proben auf -20 °C erwärmt und mit einem Kryostaten (Leica CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar) 10 µm dick in der Ebene des Aortenursprungs geschnitten. Die Objektträger wurden nach dem Trocknen bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.6.2 Anfertigung von (immun-)histochemischen Färbungen

Die Gefrierschnitte wurden auf Raumtemperatur aufgetaut und mittels Ethanol absolut (HA), 70 % Ethanol (Siriusrot), Aceton (Makrophagen) oder 10 % Formalin (Biglykan, Decorin, ÖRO-Lipidfärbung) fixiert und anschließend dreimal fünf Minuten mit 1x PBS bzw. *Aqua dest.* (ÖRO) gewaschen.

Die Färbung der Schnitte des unteren Darmabschnitts erfolgte als HE-Färbung. Nach 15-minütiger Fixierung in Formalin 10 % und zwei Waschgängen à fünf Minuten in 1x PBS erfolgte die Kernfärbung mittels filtrierter Hämalaun-Lösung nach Mayer (Merck, Darmstadt) für eine Minute, Differenzierung durch 1 % HCl (einmal Eintauchen) und bläuen durch Überführen in

fließendes Leitungswasser für fünf Minuten. Daraufhin erfolgt die Färbung mit Eosin 1 % für eine Minute. Zum Eindecken wurden die Präparate mittels aufsteigender Alkoholreihe (je zwei Minuten 70 % Ethanol – 95 % Ethanol – Ethanol absolut) entwässert, anschließend fünf Minuten in *Roticlear*[®] (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) überführt und mittels *Roti*[®] *Mount* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) eingedeckt.

Zur Anfertigung immunhistochemischer Färbungen des Aortenursprungs von HA, Makrophagen (Mac2), Biglykan und Decorin wurden die Schnitte nach der Fixierung eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1x TBS + 10 % FCS (*fetal calf serum*, fetales Kälberserum) +1 % BSA (*bovine serum albumin*, bovines Serumalbumin) blockiert um unspezifische Bindungen mit dem Erst-Antikörper zu verhindern.

Zusätzlich wurde bei der HA-Färbung zuvor sämtliches endogene Biotin (Vitamin B7) blockiert. Hierbei bindet im ersten Schritt Avidin an Bindungsstellen des endogenen Biotins. Im zweiten Schritt werden die Proben mit einer Biotinlösung inkubiert, um freie Biotin-Bindungsstellen des Avidins zu besetzen (Biotin-Avidin-Block, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Für die Freilegung der AK-Bindungsstellen zum Nachweis der Proteoglykane Biglykan und Decorin wurden die Präparate vor der Blockierung mit Chondroitinase-ABC-Puffer (1/100, Sigma Aldrich, Steinheim) verdaut.

Nach der Blockierung wurde auf jeden Objektträger 25 µl Erst-Antikörper in Verdünnung mit 1 % BSA in 1x PBS gegeben, bzw. reines 1 % BSA in 1x PBS für die Negativ-Kontrolle. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Zur Detektion von HA wurde Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP, Calbiochem, Darmstadt) verwendet, für Makrophagen Mac-2 (Cedarlane, Kanada), für Biglykan rBiglykan LF159 und für Decorin hDecorin LF136 (Larry Fisher).

Nach erneutem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Blockierung der Peroxidase mit H₂O₂ (3 % in 1x PBS, Merck, Darmstadt) eine Stunde bei Raumtemperatur, gefolgt von einem weiteren Waschvorgang.

Die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper erfolgte durch Zugabe von je 25 µl Antikörper (verdünnt 1:200 in 1xPBS) auf den zu färbenden Schnitt und die Negativkontrolle. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer wurde der Antikörper mittels Diaminobenzidin (DAB, Zytomed Systems, Berlin) Farbreaktion detektiert. Als Zweit-Antikörper wurde für HA Streptavidin Peroxidase (Sigma, Steinheim), für Makrophagen Anti-rat IgG2a HRP (Novus Biologicals) und für Proteoglykane Anti-rabbit IgG HRP (Santa Cruz, USA) verwendet.

Die Kernfärbung erfolgte mittels Hämalaun-Lösung (siehe Färbung der unteren Darmabschnitte). Nach abstoppen mit *Aqua dest.* wurden die Schnitte wie bei der einfachen Hämalaun-Färbung entwässert und eingedeckt.

Zur Färbung des Aortenursprungs mit ÖRO wurden die Schnitte nach dem Fixieren und Waschen zwölf Minuten in 100 % Propylenglykol (Sigma Aldrich, Steinheim) überführt und anschließend acht Minuten in Öl Rot O (Sigma Aldrich, Schelldorf) bei 60 °C im Wasserbad gefärbt, gefolgt von 15 Minuten Waschen in 85 % Propylenglykol. Nach der Kernfärbung (siehe oben) wurden die Präparate in *Aquatex*[®] (Merck, Darmstadt) eingebettet.

Die Kollagenfärbung erfolgte mittels Picro-Siriusrot-Lösung über einen Zeitraum von sieben Minuten, zuvor wurden bereits die Kerne mit Celestineblau (Sigma Aldrich, Steinheim) sieben Minuten angefärbt.

2.6.3 Dokumentation und Auswertung

Die Bilder zur Dokumentation und Auswertung der Plauekcomposition am Aortenursprung wurden mit 10-facher bzw. 5-facher Vergrößerung mittels eines *Zeiss Axio Imager.M2* Mikroskops mit einer *AxioCam MRc* aufgenommen. Die Kollagenfärbung wurde nativ sowie unter polarisiertem Licht fotografiert.

Die Auswertung erfolgte mit der Software *AxioVision* (Carl Zeiss Mikroskopie) zur Bestimmung der Plauegröße. Dafür wurde der Plauebesatz aller drei Aortenklappensegel in μm^2 addiert. Die Messung erfolgte jeweils auf der Schnitthöhe, in der alle drei Segel ausgeprägt waren. Die Auswertung erfolgte als Mittelwert aus mindestens drei aufeinanderfolgenden Schnitten eines Aortenursprungs, um Artefakte und Messfehler zu minimieren.,

Der prozentuale Anteil (AF) an Biglykan, Decorin, Kollagen, Fett, Makrophagen und HA wurde mit der Software *ImageJ* (National Institutes of Health) bestimmt. Durch die Funktion „*Color Deconvolution*“ können Farbkanäle getrennt werden und die AK-Färbung ohne Hintergrund-Störung ausgewertet werden. Der Schwellenwert zur Auswertung wurde manuell festgelegt und bei der jeweiligen Färbereihe beibehalten. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der AF aller drei Klappen eines Schnitts gebildet.

Die Auswertung der Siriusrot-Färbung erfolgte, wie oben beschrieben, als Nativbild zur Quantifizierung des Gesamt-Kollagengehaltes. Zur Bestimmung des Anteils von dicht-gepacktem und locker-gepacktem Kollagen wurde das zugehörige polarisierte Bild ausgewertet. Dicht-gepacktes Kollagen, welches am ehesten Kollagen Typ I entspricht, erscheint hier orange-rot, lockere, dünne Kollagenfasern grün. Mit Hilfe von *ImageJ* können die Anteile getrennt bewertet werden („*split channels*“ Funktion).

2.7 Statistische Auswertung

Die aufgeführten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) aufgeführt. Daten der Experimental- und Kontrollgruppe wurden bei zwei Gruppen mittels ungepaartem T-Test auf Unterschiede analysiert, nachdem mittels *Grubbs*-Test Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen wurden. Die statistische Analyse des Gewichts im Zeitverlauf erfolgte mit *Two-Way ANOVA*. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der *GraphPad Prism 5.0/8.0 Software* (Graphpad Software, La Jolla, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Versuchsaufbau

Das Modell *Apoe*-defizienter Mäuse ist eine gängige Methode zur Untersuchung von atherosklerotischen Läsionen. Dieser Genotyp wurde ausgewählt, da die Mäuse innerhalb weniger Wochen spontan Plaques entwickeln. Ziel war es hierbei, ein Mausmodell zu entwickeln, mit dem zusätzlich der Einfluss der CED auf die Entstehung von Atherosklerose untersucht werden kann. Die Fütterung mit WD diente hierbei der gezielten Akzeleration der Atherogenese und -progression ähnlich der fett- und cholesterinreichen Ernährung im Menschen. Die untersuchten Tiere wurden in drei Gruppen untergeteilt:

Gruppe 1: WD mit bzw. ohne drei Zyklen DSS, mit einem Endalter von 13 Wochen

Gruppe 2: WD mit bzw. ohne fünf Zyklen DSS, mit einem Endalter von 19 Wochen

Gruppe 3: Normalfutter mit bzw. ohne fünf Zyklen DSS, mit einem Endalter von 19 Wochen

3.2 Einfluss von DSS auf die Entwicklung und den Verlauf der chronischen Kolitis

Zur Auslösung einer chronischen Entzündung des Darms wurden die Tiere der Kolitisgruppe mit 2 % DSS Trinkwasser behandelt. Um die schubförmige Verlaufsform der Entzündung zu simulieren, wurden sechstägige Zyklen DSS mit anschließender zweiwöchiger Pause kombiniert und zur Validierung des Modells makroskopische und mikroskopische Entzündungsmerkmale, sowie die mRNA-Expression der inflammatorischen Marker *Mcp* und *Tnfa* untersucht. Weiterhin wurde eine Stagnation der Gewichtszunahme bzw. eine Gewichtsabnahme während der DSS-Zyklen als Zeichen einer florierenden Entzündung gewertet.

3.2.1 Gewichtsverlauf

In WD-gefütterten, DSS-behandelten Tieren zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ab dem dritten Zyklus DSS ein Gewichtsverlust, sowie die anschließende Erholung (Gewichtszunahme) während der zweiwöchigen Pause. Wie in Abbildung 5 dargestellt, zeigten die Mäuse nach der Behandlung mit DSS ab dem dritten DSS Zyklus eine signifikant geringere prozentuale Gewichtszunahme vom Ausgangsgewicht im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe [n=10-36; p<0,05 – p<0,01].

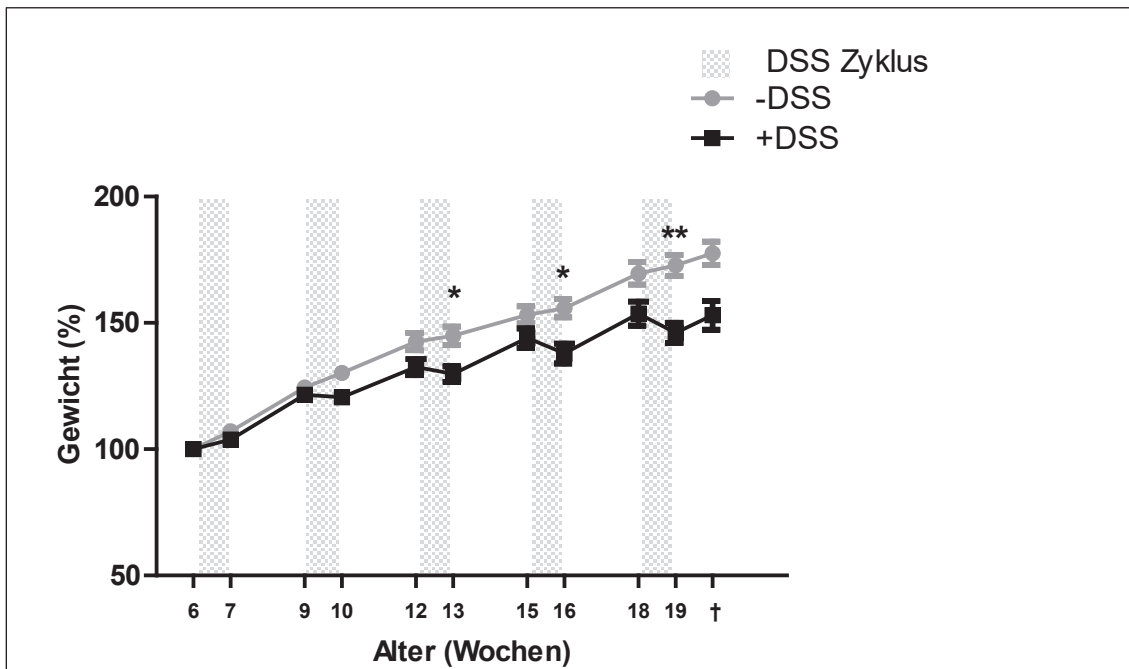


Abb. 5: DSS-behandelte *Apoe*^{-/-} Mäuse weisen eine geringere Gewichtszunahme im Vergleich zu Tieren ohne Kolitis auf.

Männliche, sechs Wochen alte Mäuse erhielten WD und wurden mit bzw. ohne DSS für 3 Zyklen bis zum Endalter von 13 Wochen bzw. 5 Zyklen bis zum Endalter von 19 Wochen behandelt.

Dargestellt ist die prozentuale Gewichtszunahme nach Behandlung mit bzw. ohne DSS in Bezug auf das Ausgangsgewicht.

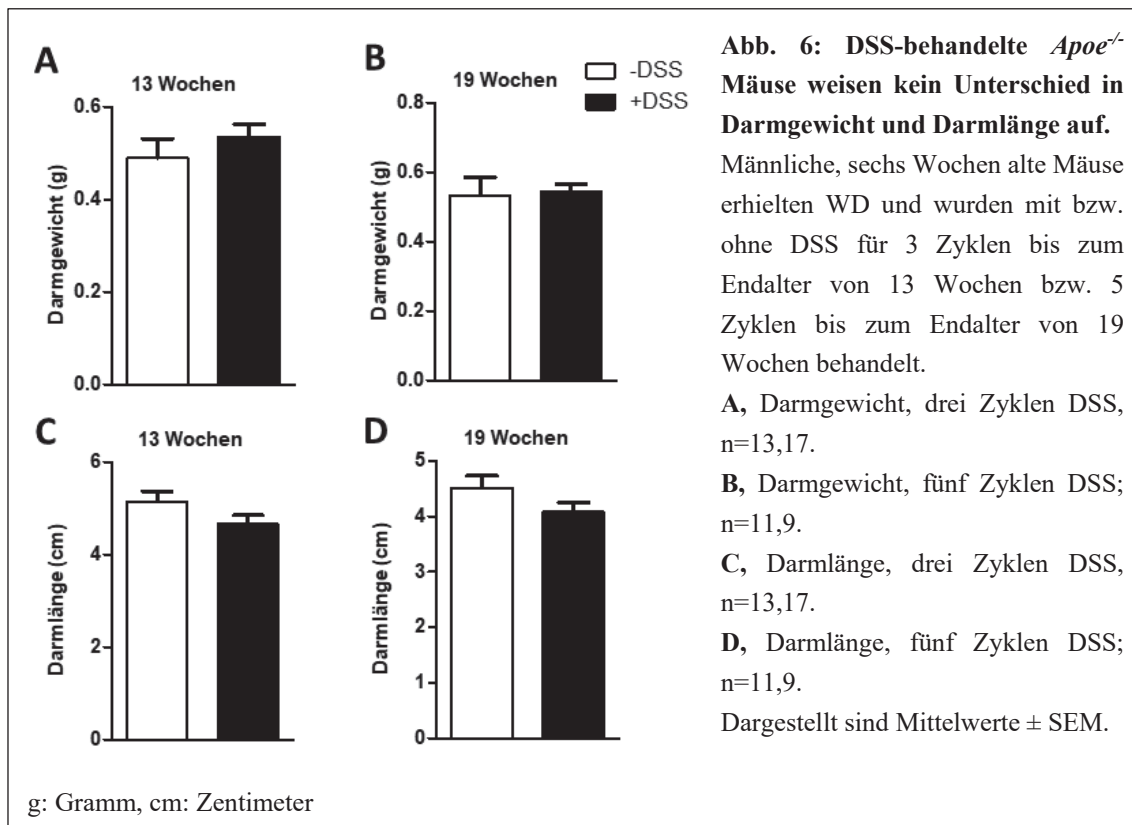
n=10-36. 13 Wochen (3. DSS Zyklus): *p<0,05; 16 Wochen (4. DSS Zyklus): *p<0,05; 19 Wochen (5. DSS Zyklus): **p<0,01.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. Signifikanzen wurden mit *Two-Way ANOVA* berechnet.

3.2.2 Makroskopisches Ausmaß der Kolitis

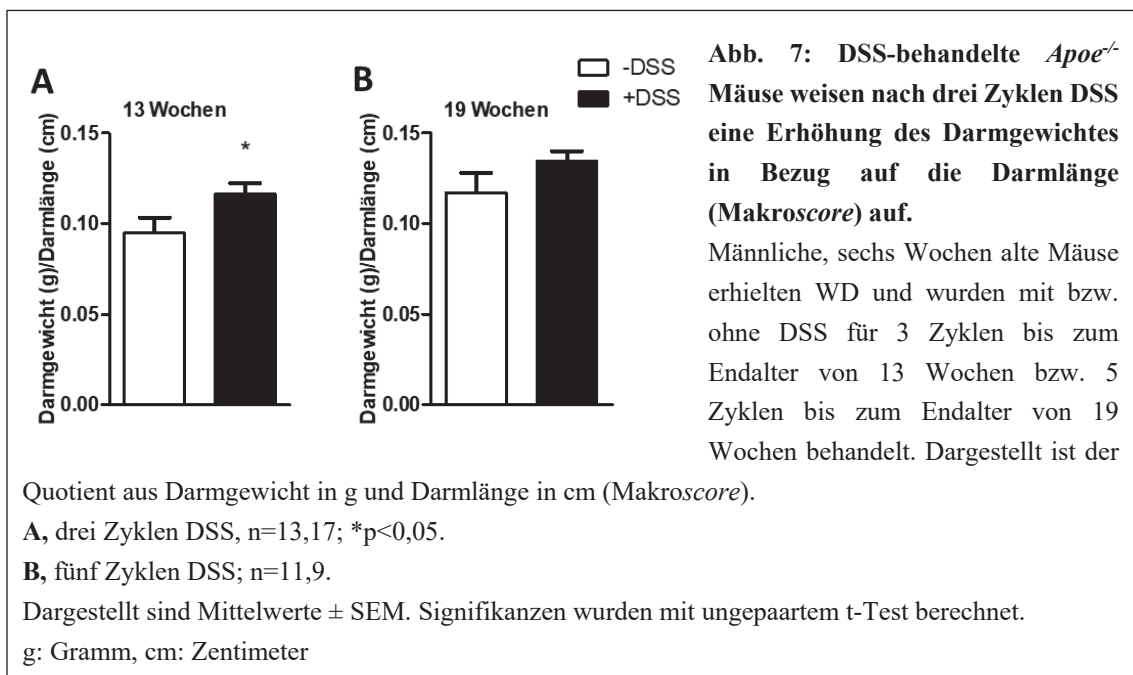
Das makroskopische Ausmaß der Kolitis wurde durch Evaluierung der Darmlänge und des Darmgewichts quantifiziert. Je entzündeter der Darm ist, desto schwerer und kürzer wird er durch die Zunahme der Zellen und Extrazellulärflüssigkeit.

Wie in Abbildung 6 dargestellt zeigte sich bei der Betrachtung der einzelnen Marker „Darmgewicht“ und „Darmlänge“ kein Unterschied zwischen DSS- und Kontrollgruppe.



Deutlich hingegen wird der Einfluss der DSS-Kolitis bei Betrachtung des Darmgewichtes in Bezug auf die Darmlänge: Der Quotient (Darmgewicht zu Darmlänge) bildet den Makroscore und dient der genaueren Quantifizierung der Entzündungsintensität.

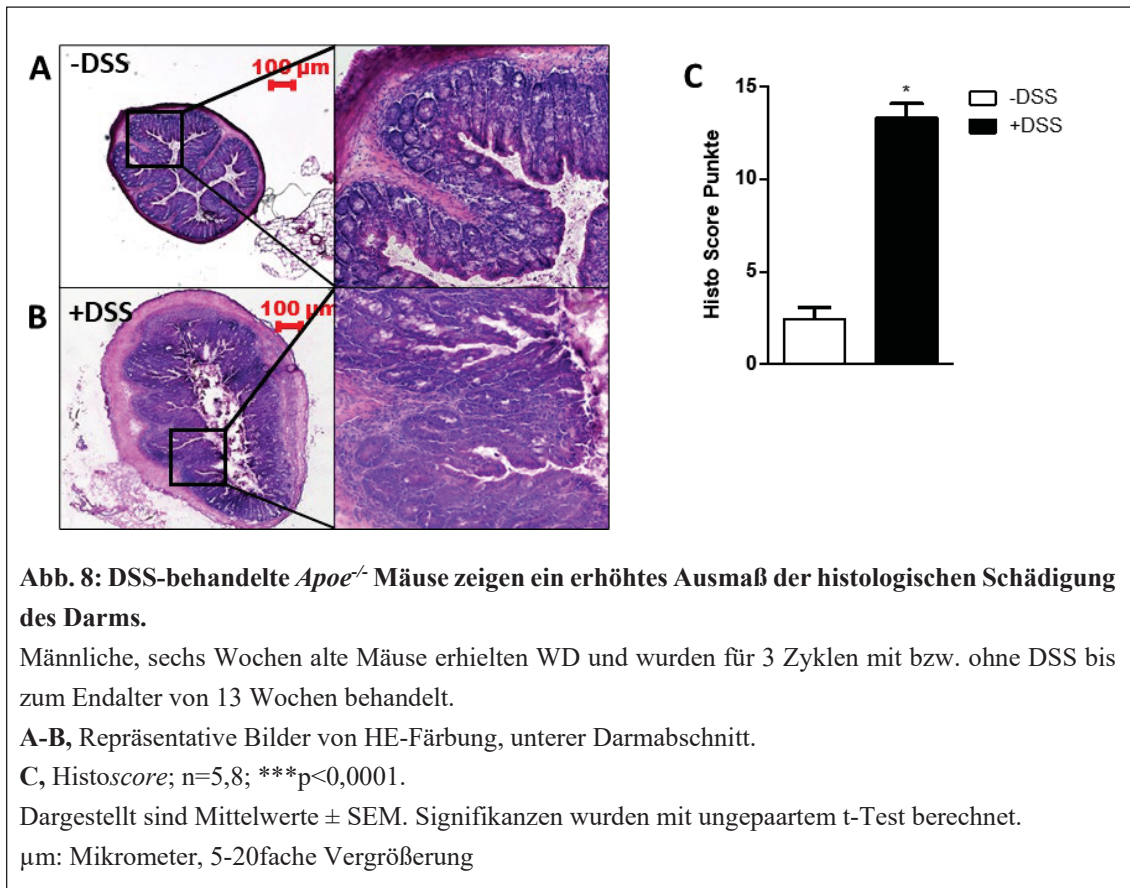
Abbildung 7 zeigt die Veränderung des Makroscores nach drei bzw. fünf Zyklen DSS. Dabei zeigte sich nach drei Zyklen DSS eine signifikante Erhöhung des Makroscores [Kontrolle: $0,1 \pm 0,01$ vs. DSS: $0,12 \pm 0,01$, n=13,17, $p < 0,05$], (Abb. 7A). Nach fünf Zyklen zeigte sich hingegen keine signifikante Erhöhung des Quotienten mehr [Kontrolle: $0,12 \pm 0,01$ vs. DSS: $0,13 \pm 0,01$, n=11,9], (Abb. 7B).



3.2.3 Histologisches Ausmaß der Kolitis

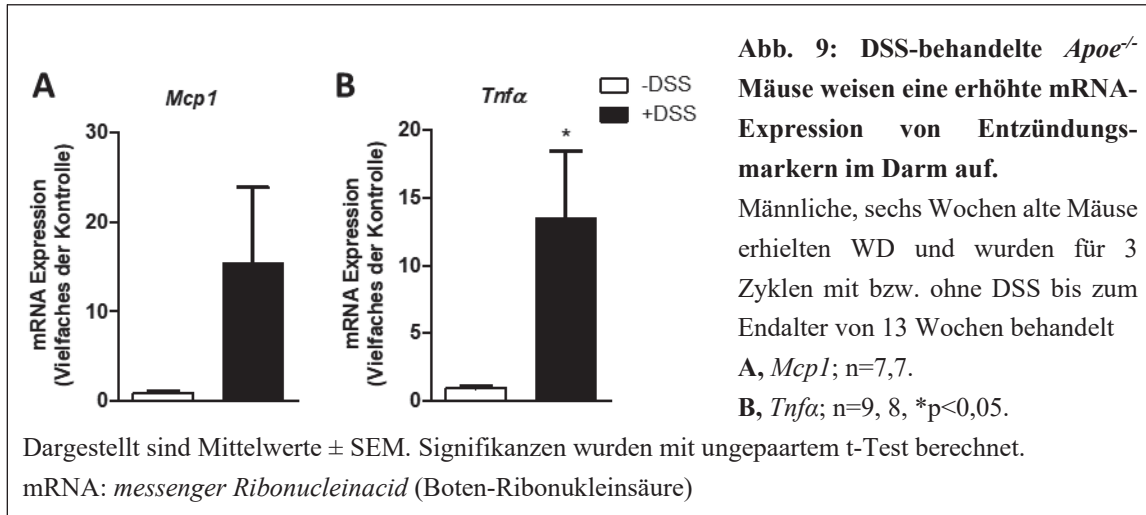
Als histologisches Maß für die Intensität der Entzündung diente die Beurteilung der Integrität der Kryptenstruktur, Veränderung der Zellzusammensetzung und Zellzahl (Histoscore). Die Abbildungen 8 A-B zeigen beispielhaft den Verlust der Kryptenstruktur in DSS-behandelten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe.

Bereits nach drei DSS-Zyklen (Gruppe 1) zeigte sich ein mehr als vervierfachter Wert im histologischen *Scoring* im Vergleich zur Kontrollgruppe, sodass auf Untersuchungen an Tieren der Gruppe 2 und 3 verzichtet wurde [Kontrolle: $2,5 \pm 0,6$ vs. DSS: $11,9 \pm 1,6$, n=5,7, p<0,001], (Abb. 8C).



3.2.4 mRNA-Expression

Um die Frage zu beantworten, inwieweit sich die oben beobachteten Effekte auf Ebene der Genexpression widerspiegeln, wurde mRNA der Inflammationsmarker *Mcp1* und *Tnfa* aus Darmproben der Gruppe 1 isoliert und mittels qPCR quantifiziert. Wie in Abbildung 9 dargestellt, blieb ein positiver Trend zu erhöhter *Mcp1*-Expression auf mRNA-Ebene im Darm nicht signifikant, während der Entzündungsmarker *Tnfa* sich um ein Vielfaches signifikant erhöht zeigte [*Tnfa* Kontrolle: $0,9 \pm 0,2$ vs. DSS: $13,5 \pm 5,0$ (Vielfaches der Kontrolle FC (*fold change*)) n=9,8, p<0,05,], [*Mcp1* Kontrolle: $0,9 \pm 0,2$ vs. DSS: $15,4 \pm 8,5$ (FC), n=7,7].



3.3 Atherosklerose und Plaquekomposition unter WD

3.3.1 Quantifizierung der Atherosklerose

Zur Untersuchung der Frage, inwiefern sich eine chronische Entzündung des Darms auf die Entstehung und Entwicklung von Atherosklerose auswirkt, wurde nachfolgend die Atheroskleroselast in der Aorta und am Aortenursprung als Prädilektionsstellen für atherosklerotische Läsionen untersucht. Dabei wurden frühe Effekte nach drei Zyklen DSS und späte Effekte nach fünf Zyklen DSS zunächst unter gleichzeitiger Fütterung einer hochkalorischen WD analysiert.

3.3.1.1 Frühe Effekte der DSS-induzierten Kolitis unter WD-Fütterung (Gruppe 1)

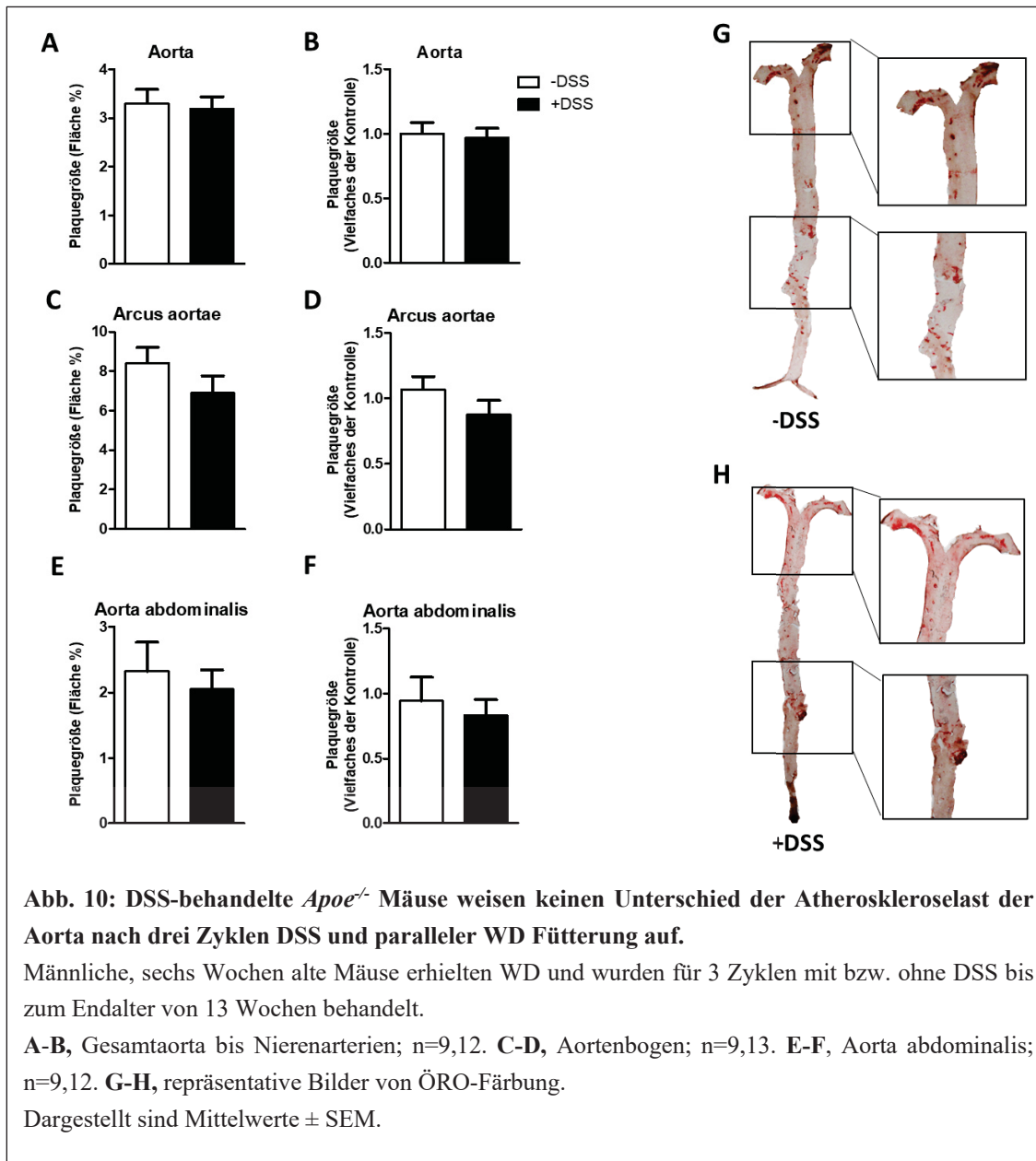
Bei Fütterung von WD und nach drei Zyklen DSS zeigte die Auswertung der Plaquegröße bei Betrachtung der gesamten Aorta keine Unterschiede zwischen DSS- und nicht DSS-behandelten Tieren (Abb. 10A-B), [AF in Prozent: Kontrolle: $3,30 \pm 0,29$ vs. DSS: $3,19 \pm 0,24$ und AF als FC: Kontrolle: $1,00 \pm 0,09$ vs. DSS: $0,97 \pm 0,07$, n=9,12].

Auch bei Betrachtung einzelner Abschnitte, wie des Aortenbogens und der Bauchaorta, fanden sich keine Unterschiede.

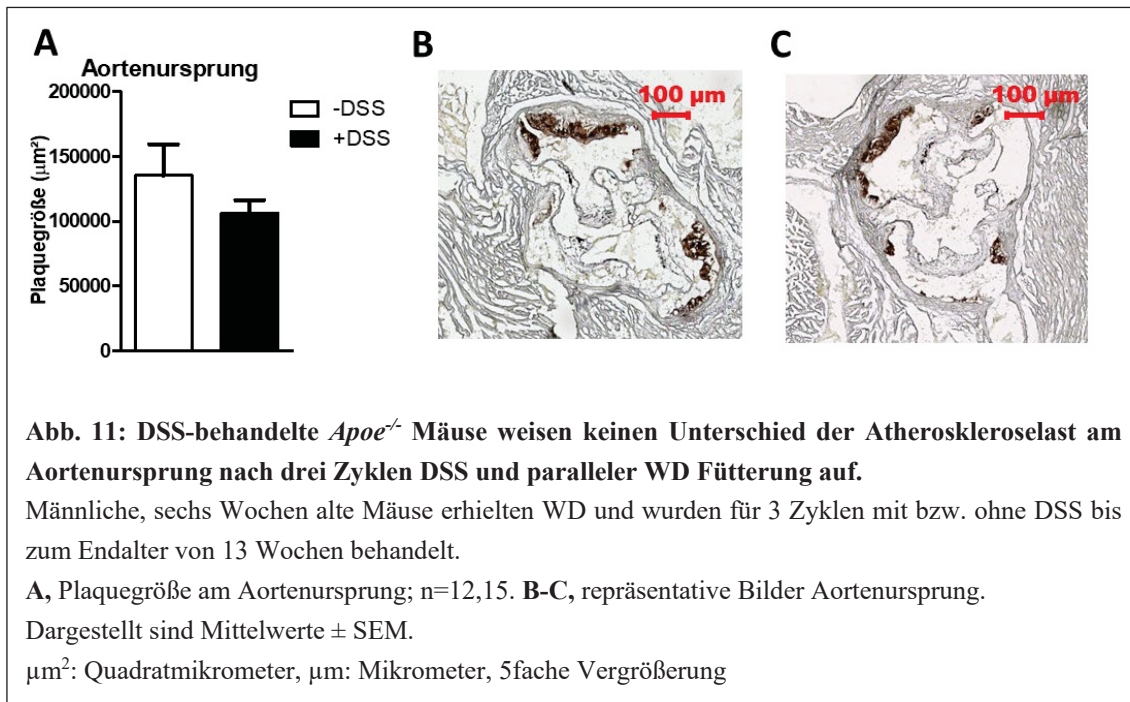
Zur Untersuchung der Plaquegröße am Aortenbogen wurde der Bereich vom Aortenursprung bis 2 mm distal des Abgangs der dritten Halsarterie ausgewertet. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe [AF in Prozent: Kontrolle: $8,41 \pm 0,79$ vs. DSS: $6,91 \pm 0,85$ und AF als FC: Kontrolle: $1,07 \pm 0,10$ vs. DSS: $0,88 \pm 0,11$, n=9,13] (Abb. 10C-D).

Die abdominale Aorta wurde in einem Bereich von jeweils vier mm proximal und distal des Abgangs der Nierenarterien ausgewertet und wies keine Unterschiede zwischen

DSS und Kontrolle auf [AF in Prozent: Kontrolle: $2,32 \pm 0,45$ vs. DSS: $2,05 \pm 0,29$ und AF als FC: Kontrolle: $0,94 \pm 0,18$ vs. DSS: $0,83 \pm 0,12$, n=9,12] (Abb. 10E-F). Die Abbildungen 10 G und H zeigen repräsentative Bilder der gefärbten Aorta und der beurteilten Abschnitte.



Auch bei der Auswertung der Plaquegröße am Aortenursprung konnte zum Endpunkt von 13 Wochen kein Unterschied zwischen DSS-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden [Plaquerfläche in μm^2 : Kontrolle: 135100 ± 24150 vs. DSS: 106000 ± 10190 , n=12,15], (Abb. 11).



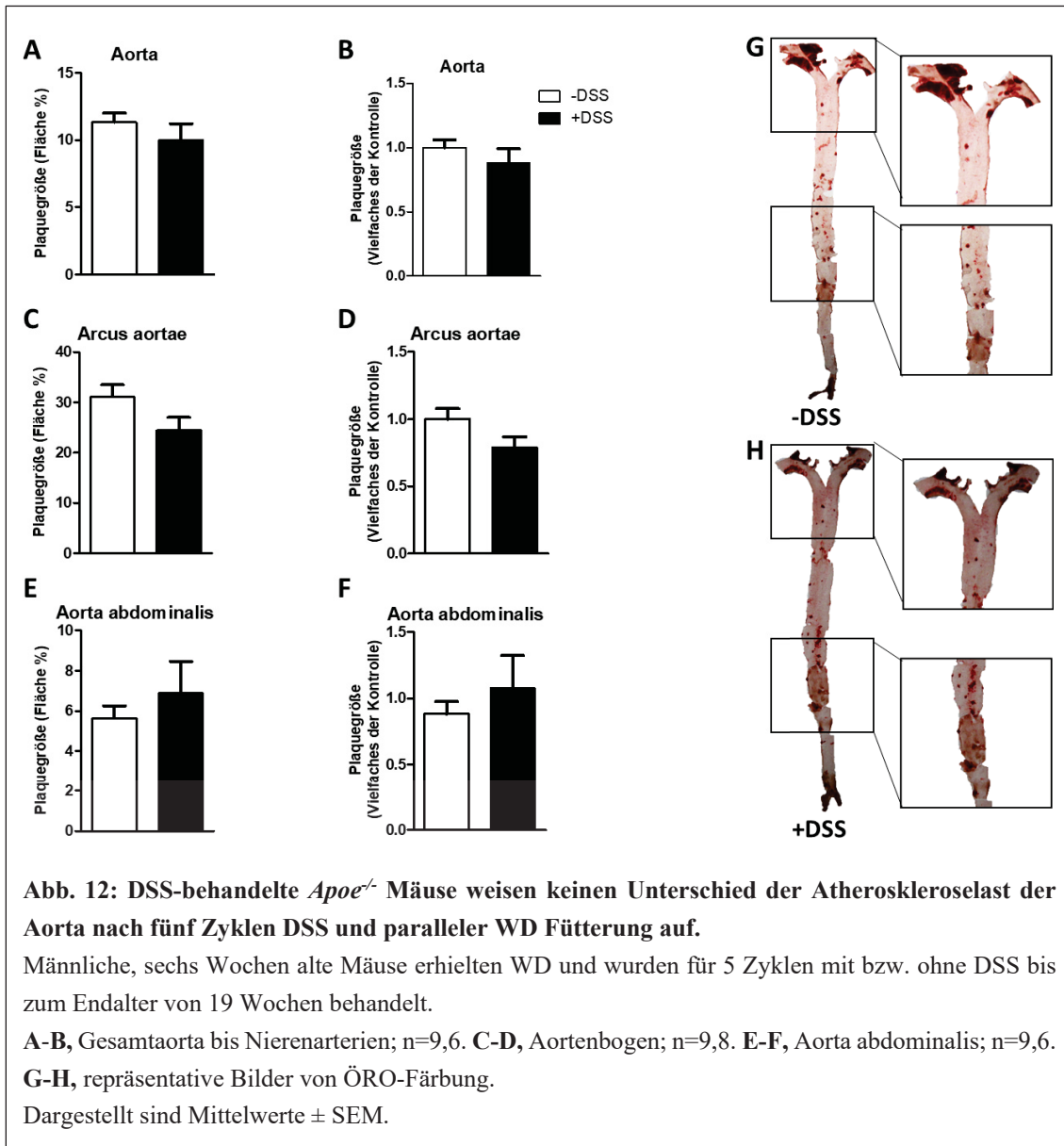
3.3.1.2 Späte Effekte der DSS-induzierten Kolitis unter WD-Fütterung (Gruppe 2)

Da nach drei Zyklen DSS keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden konnten, wurde der Endpunkt im Folgenden auf 19 Wochen und zwei weitere Zyklen DSS verlängert (Gruppe 2), um einen möglichen späten Effekt in Bezug auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen in DSS-behandelten Tieren zu untersuchen. Repräsentative Bilder der gefärbten Aorta und der beurteilten Abschnitte sind in den Abbildungen 12 G und H dargestellt.

In der Gesamtaorta fanden sich auch in dieser Gruppe keine Unterschiede in der Öl Rot O Färbung zur Darstellung lipidreicher Plaques [AF in Prozent: Kontrolle: $11,32 \pm 0,68$ vs. DSS: $10,00 \pm 1,21$ und AF als FC: Kontrolle: $1,00 \pm 0,06$ vs. DSS: $0,88 \pm 0,11$, n=9,6], (Abb. 12A-B).

Zwar zeigte sich auch hier ein möglicher Trend zu kleineren Plaques im Aortenbogen bei DSS-behandelten Mäusen, ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht gezeigt werden [AF in Prozent: Kontrolle: $31,1 \pm 2,4$ vs. DSS: $24,5 \pm 2,5$ und AF als FC: Kontrolle: $1,00 \pm 0,08$ vs. DSS: $0,79 \pm 0,08$, n=9,8], (Abb. 12C-D).

Im abdominellen Bereich der Aorta zeigten die DSS-behandelten Tiere keine signifikanten Unterschiede in der Atheroskleroselast [AF in Prozent: Kontrolle: $5,6 \pm 0,6$ vs. DSS: $6,9 \pm 1,6$ und AF als FC: Kontrolle: $0,88 \pm 0,09$ vs. DSS: $1,08 \pm 0,25$, n=9,6], (Abb. 12E-F).

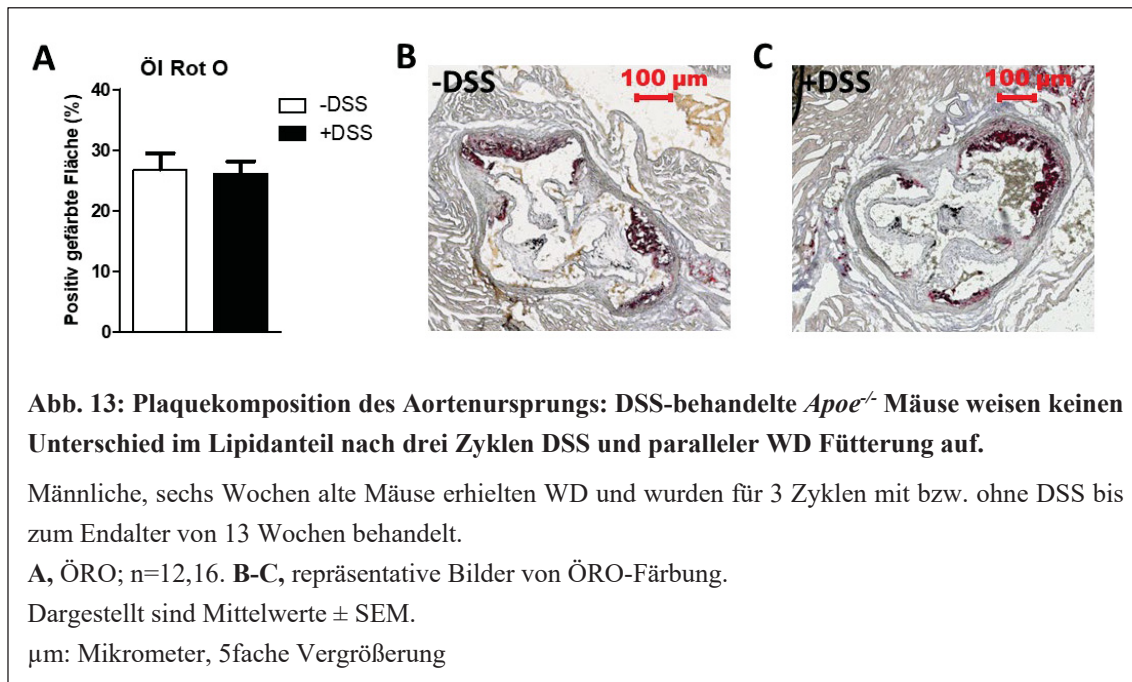


3.3.2 Plaquekomposition am Aortenursprung

Um Effekte der chronischen Entzündung auf die Komposition der Plaques hinsichtlich unterschiedlicher Bestandteile zu untersuchen, wurde der Aortenursprung der Versuchsgruppe 1 (Fütterung von WD mit paralleler Gabe von drei Zyklen DSS, Endalter 13 Wochen) histologisch ausgewertet.

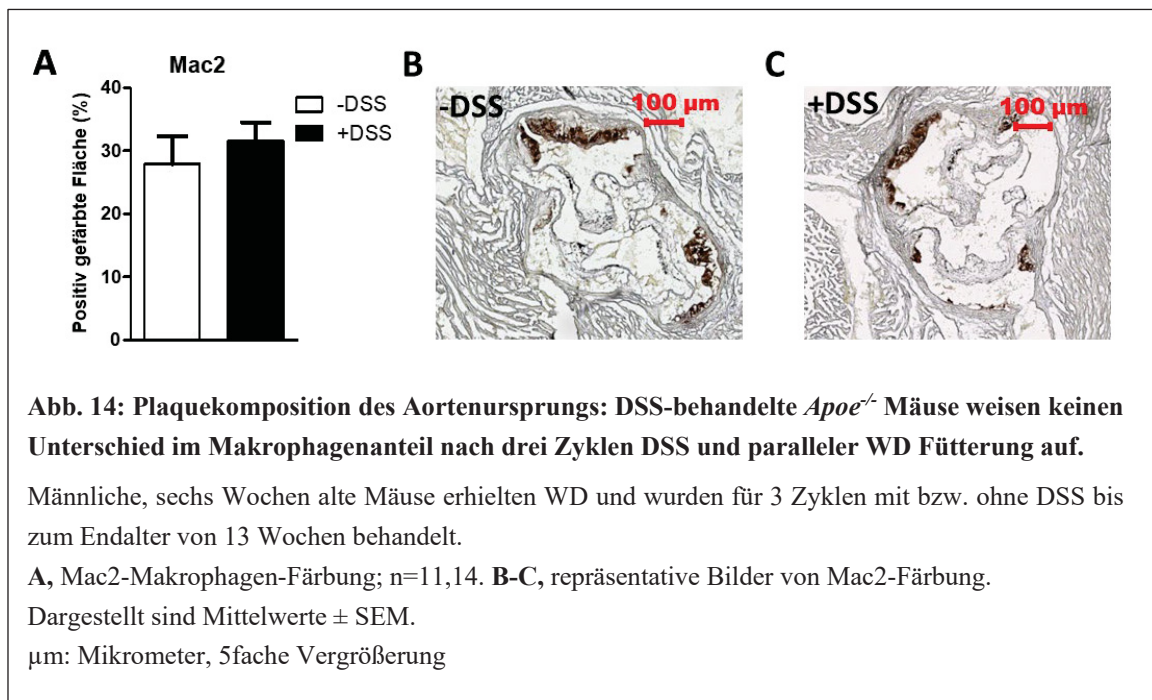
3.3.2.1 Lipide

Zur Untersuchung der Lipidretention als eines der zentralen Ereignisse in der Atherogenese wurde der Lipidanteil an der EZM der Plaques mittels Öl Rot O Färbung analysiert und war im Vergleich von DSS- und Kontroll-Gruppe nach drei Zyklen DSS nicht verändert [AF in Prozent: Kontrolle: $26,8 \pm 2,7$ vs. DSS: $26,1 \pm 2,0$ n=12,16], (Abb. 13).



3.3.2.2 Makrophagen

Der Anteil der schon früh an der Bildung atherosklerotischer Plaques beteiligten Makrophagen zeigte in der Mac2-Färbung in der DSS-Gruppe zu dem hier untersuchten Zeitpunkt von 13 Wochen keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe [AF in Prozent: Kontrolle: $27,9 \pm 4,5$ vs. DSS: $31,5 \pm 2,9$ n=11,14], (Abb. 14).



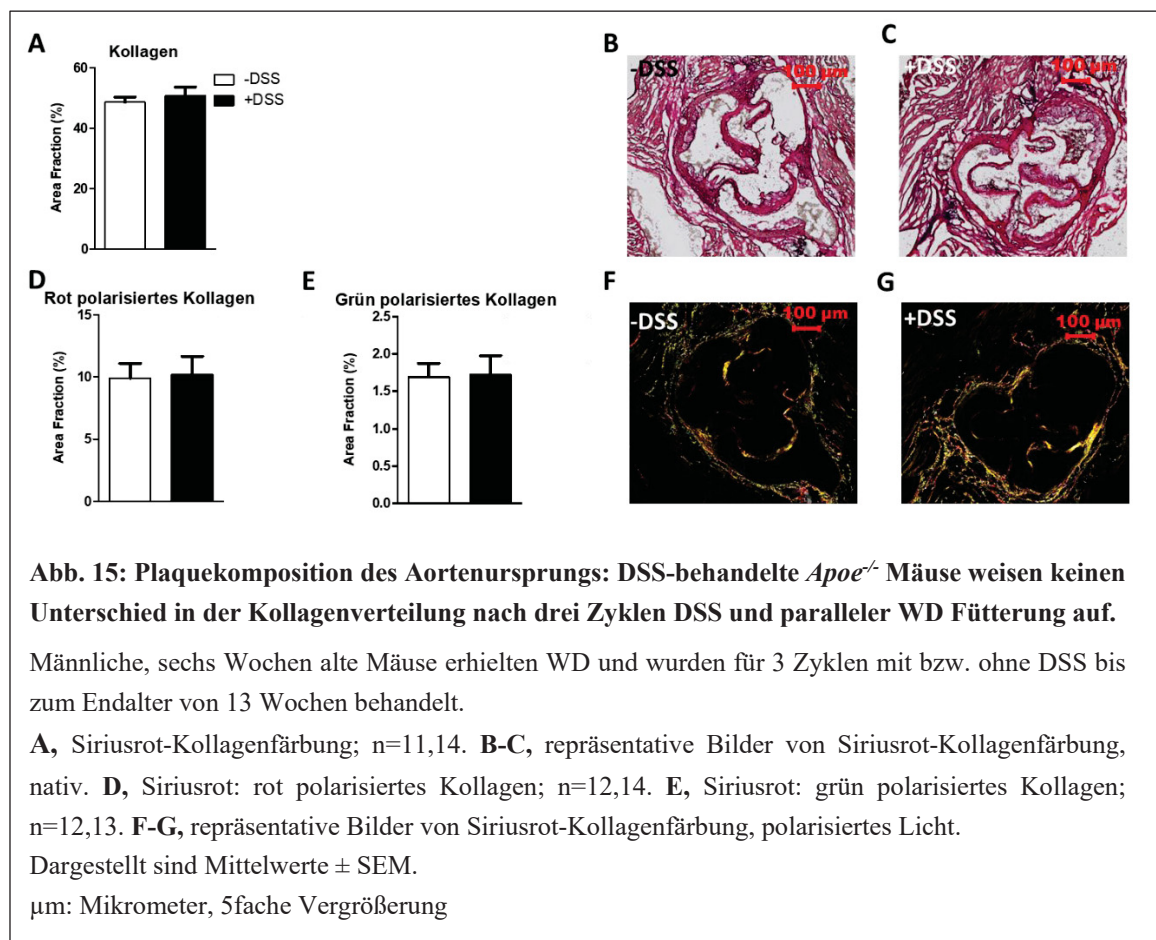
3.3.2.3 Kollagen

Im Zuge der Atherogenese und Plaquereifung spielt unter anderem die Organisation verschiedener Kollagenfasern als Strukturmoleküle der EZM eine Rolle. Zur Untersuchung des Kollagengehaltes und der Kollagenzusammensetzung erfolgte die Auswertung der Sirius-Rot-Färbungen des Aortenursprungs.

Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen DSS-behandelten Tieren und Kontrollgruppe bezüglich des Gesamt-Kollagenanteils in den Plaques beobachtet werden. Die Abbildung 15 A-C zeigt die Quantifizierung des Gesamtkollagens [AF in Prozent: Kontrolle: $48,6 \pm 1,7$ vs. DSS: $50,7 \pm 2,9$ n=11,14].

Die nachfolgende Analyse mittels polarisierten Lichts ließ dicht gepacktes Kollagen rot erscheinen; dies entspricht am ehesten Fasern des dicht gepackten Kollagen Typs I. Ein Unterschied zeigte sich zwischen den DSS-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe nicht [AF in Prozent: Kontrolle: $9,9 \pm 1,2$ vs. DSS: $10,2 \pm 1,5$ n=12,14], (Abb. 15D, repräsentative Bilder Abb. 15F-G).

Grün polarisiertes Kollagen zeigt dünne, retikuläre Fasern, am ehesten Kollagen Typ III entsprechend. Auch hier waren keine Unterschiede zur Kontrollgruppe ohne DSS-induzierte Kolitis nachweisbar [AF in Prozent: Kontrolle: $1,7 \pm 0,2$ vs. DSS: $1,7 \pm 0,3$ n=12,13], (Abb. 15E).



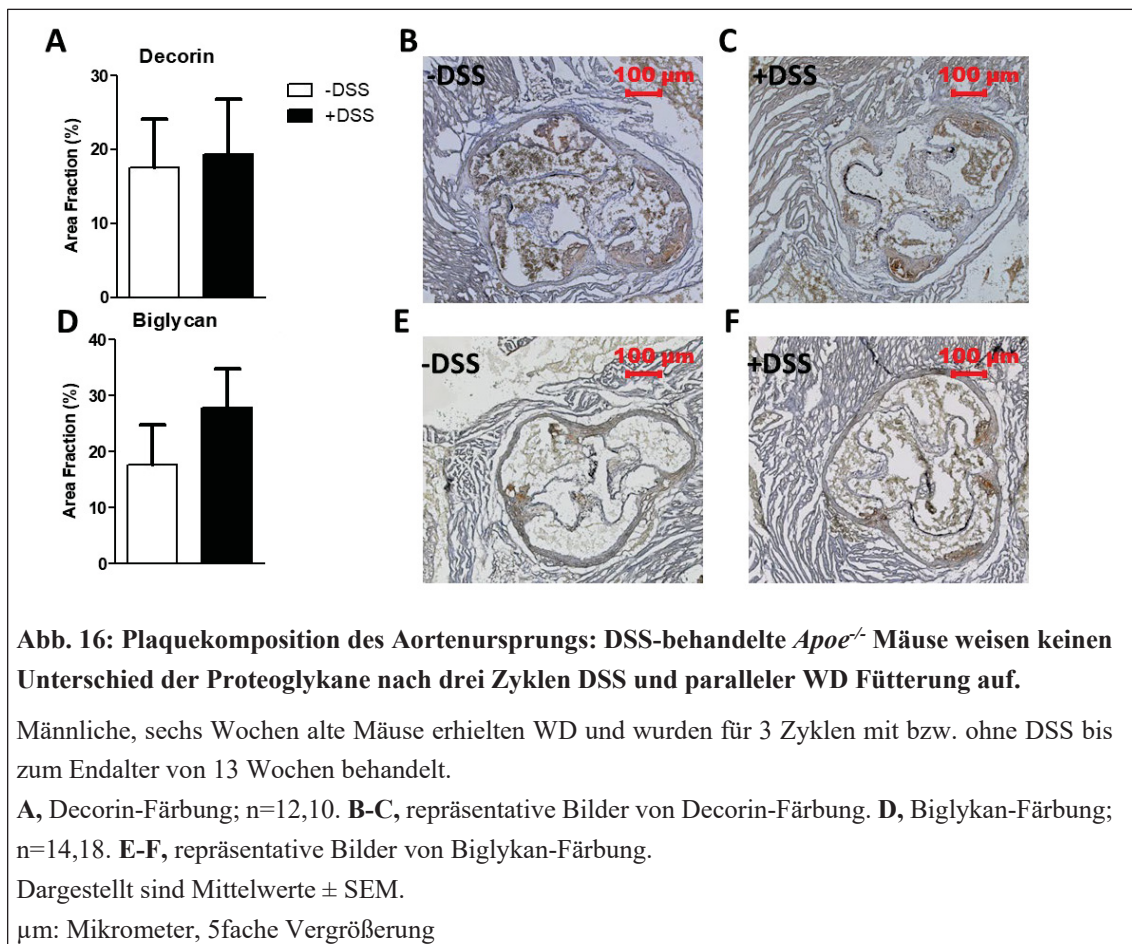
3.3.2.4 Proteoglykane und GAGs

Zur Untersuchung der Zusammensetzung der Proteoglykane in den Plaques des Aortenursprungs, wurden die EZM Bestandteile Decorin und Biglykan immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. Die beiden SLRP spielen in inflammatorischen Prozessen eine Rolle und beeinflussen als Bestandteil der EZM atherosklerotischer Läsionen Lipidretention, Plaquestabilität und Zelleinwanderung.

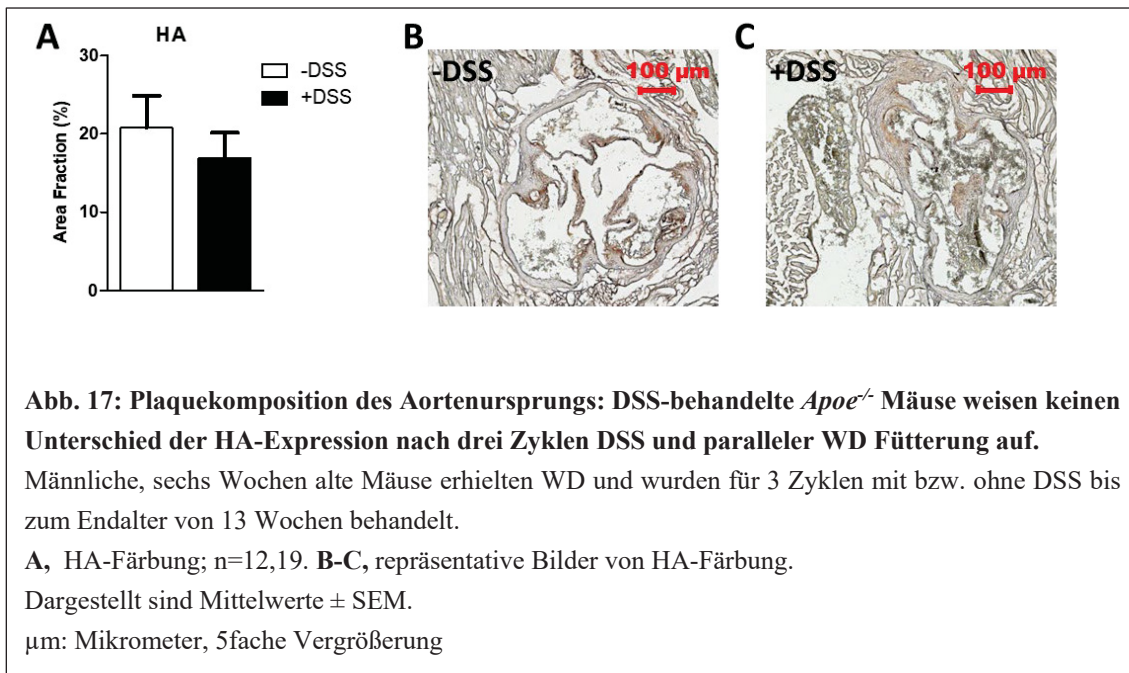
Wie in Abbildung 16 dargestellt, ergaben sich bei der Untersuchung des Aortenursprungs nach 13 Wochen keine Unterschiede im Anteil der SLRP zwischen den DSS-behandelten und -unbehandelten Tieren.

Decorin: [AF in Prozent: Kontrolle: $17,5 \pm 6,7$ vs. DSS: $19,3 \pm 7,5$ n=12,10], (Abb. 16A-C).

Biglykan: [AF in Prozent: Kontrolle: $17,6 \pm 7,1$ vs. DSS: $27,9 \pm 6,9$ n=14,18], (Abb. 16D-F).



Auch bei der Untersuchung des GAG HA, welches in vielfältiger Weise die Atherogenese modulieren kann, zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen [AF in Prozent: Kontrolle: $20,7 \pm 4,1$ vs. DSS: $16,9 \pm 3,2$ n= 12,19], (Abb. 17).



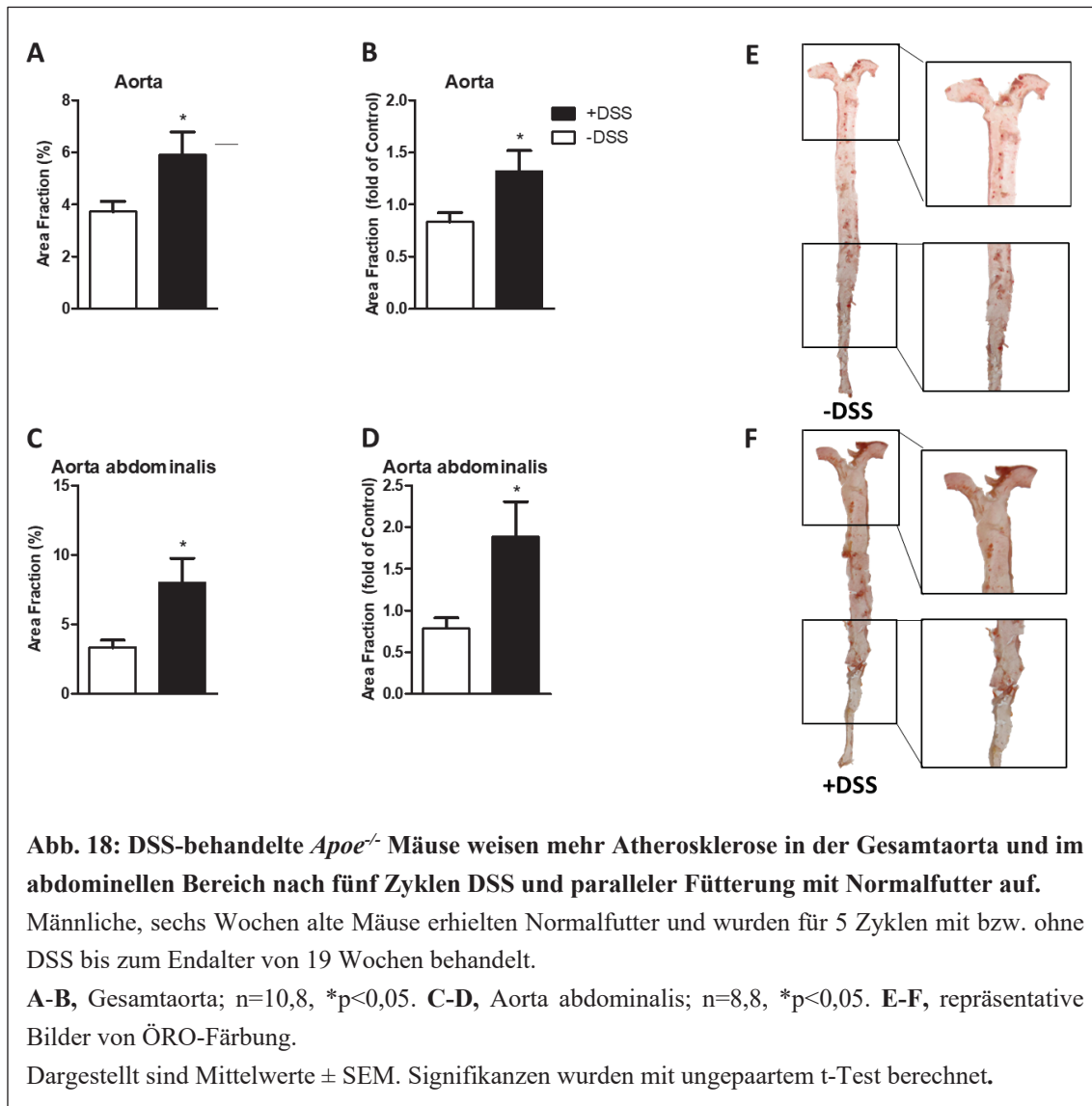
3.4 Atherosklerose und Plaquekomposition unter Normalfutter

Unter der hochkalorischen WD konnten in den ersten Untersuchungen dieser Arbeit keine Unterschiede zwischen Kolitis- und Kontrollgruppe detektiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse, wurde die These entwickelt, dass der Stimulus WD für die Entwicklung von Atherosklerose zu stark war, und einen möglichen proatherogenen Effekt der chronischen Kolitis überdeckte. Als Konsequenz wurde der Einfluss von DSS an einer Versuchsgruppe überprüft, welche statt WD Normalfutter und fünf Zyklen DSS bekam.

3.4.1 Quantifizierung der Atherosklerose

Die Quantifizierung der atherosklerotischen Plaques in der Gesamtaorta zeigte in der Versuchsgruppe nach fünf Zyklen DSS eine signifikante Zunahme der Plaquegröße [AF in Prozent: Kontrolle: $3,7 \pm 0,4$ vs. DSS: $5,9 \pm 0,9$ und AF als FC: Kontrolle: $0,8 \pm 0,1$ vs. DSS: $1,3 \pm 0,2$ n=10,8, p<0,05], (Abb. 18A-B).

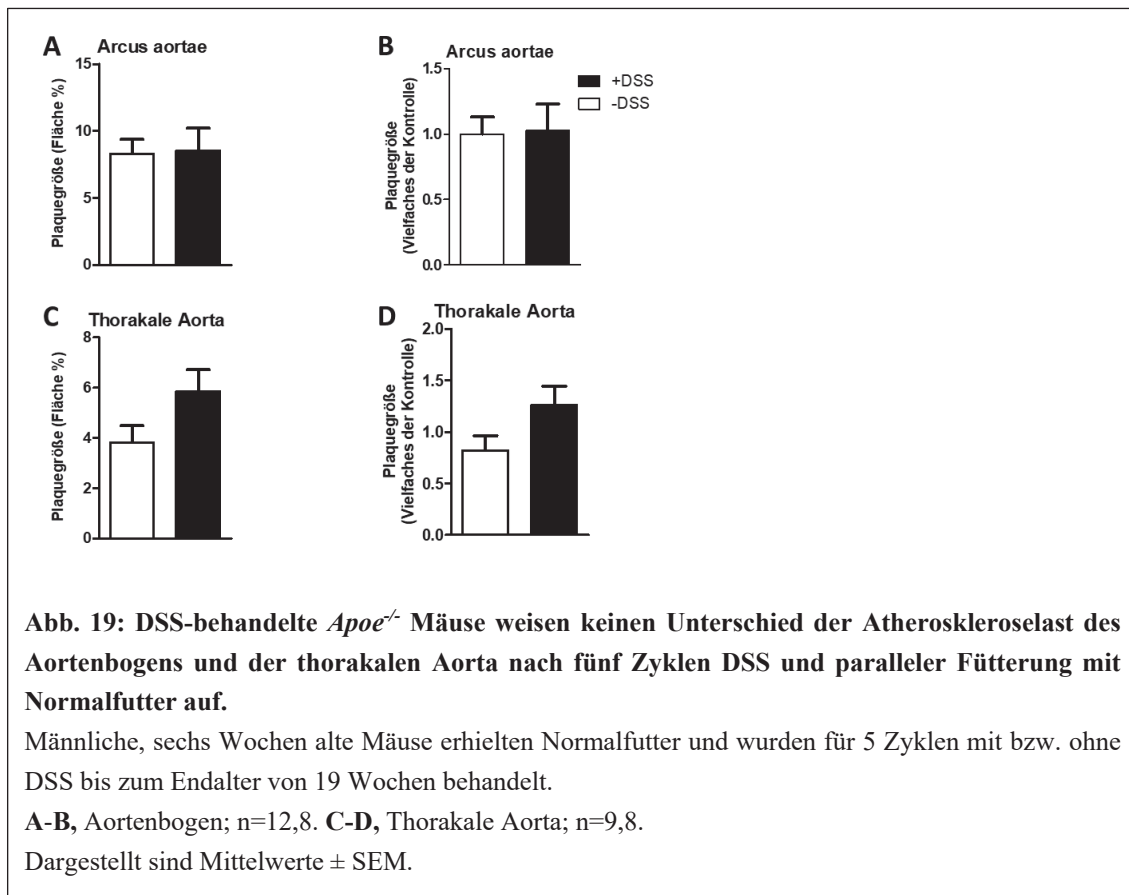
Noch deutlicher wurde dies bei Betrachtung des abdominalen Bereichs der Aorta. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme des Plaquescores auf mehr als das Doppelte in DSS-behandelten Tieren [AF in Prozent: Kontrolle: $3,3 \pm 0,5$ vs. DSS: $8,0 \pm 1,8$ und AF als FC: Kontrolle: $0,8 \pm 0,1$ vs. DSS: $1,9 \pm 0,4$, n=8,8, p<0,05], (Abb. 18C-D).



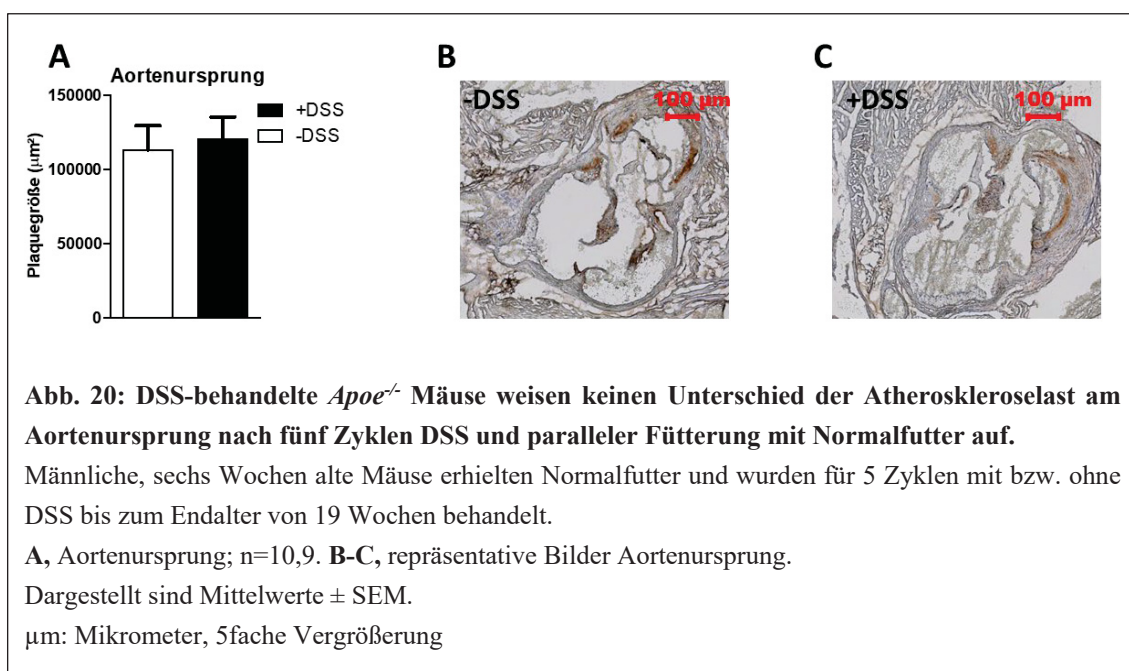
Die Untersuchung anderer isolierter Abschnitte der Aorta ergab keinen Unterschied zwischen DSS-behandelten Mäusen und Kontrolle. Abbildung 19 zeigt die Auswertung der Bereiche Aortenbogen und thorakale Aorta.

Aortenbogen: [AF in Prozent: Kontrolle: $8,3 \pm 1,1$ vs. DSS: $8,5 \pm 1,7$ und AF als FC: Kontrolle: $1,0 \pm 0,1$ vs. DSS: $1,0 \pm 0,2$, n=12,8]

Thorakale Aorta: [AF in Prozent: Kontrolle: $3,8 \pm 0,7$ vs. DSS: $5,9 \pm 0,9$ und AF als FC: Kontrolle: $0,8 \pm 0,1$ vs. DSS: $1,3 \pm 0,2$, n=9,8].



Auch bei der isolierten Betrachtung der Atheroskleroselast des Aortenursprungs zeigte sich kein Unterschied zwischen DSS-behandelten Mäusen und den jeweiligen Kontrolltieren (Abb. 20) [Aortenursprung: Plaquefläche in μm^2 Kontrolle: 113100 ± 16290 vs. DSS: 120300 ± 14990 , n=10,9].

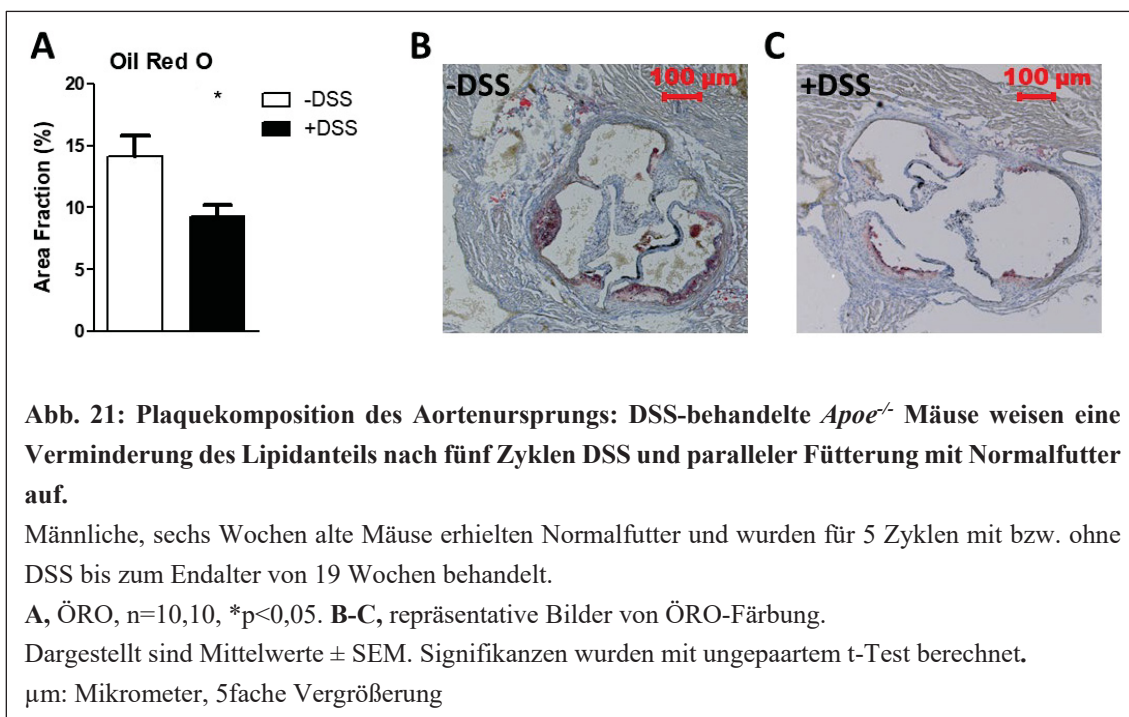


3.4.2 Plaquekomposition am Aortenursprung

Da unter WD kein eindeutiger Einfluss der chronischen Entzündung auf die Plaquezusammensetzung gezeigt werden konnte, wurde der Aortenursprung der Normalfutter-Gruppe (Gruppe 3) auf Effekte der DSS-Behandlung untersucht (fünf Zyklen DSS).

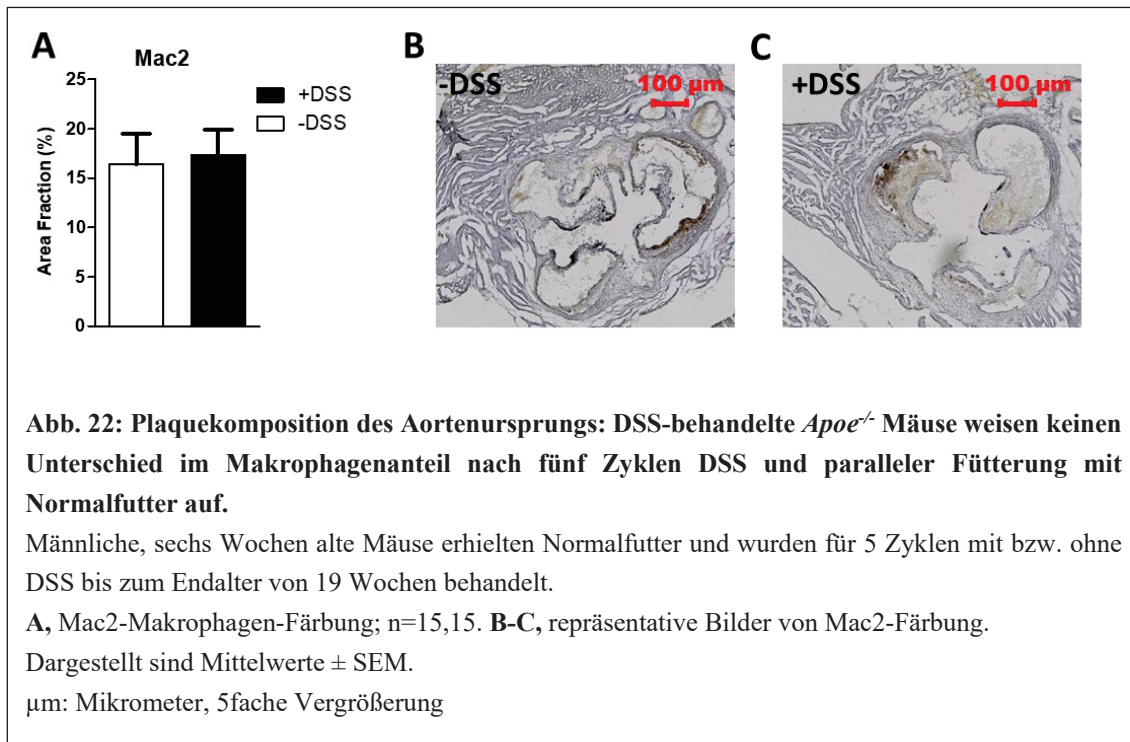
3.4.2.1 Lipide

Die Lipidretention als Schlüsselprozess der Atherogenese wies deutliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Kolitisgruppe unter Normalfutter auf. So zeigte sich bei DSS-behandelten Tiere ein signifikanter Abfall der Lipidakkumulation im Vergleich zur Kontrolle [AF in Prozent: Kontrolle: $14,1 \pm 1,7$ vs. DSS: $9,3 \pm 1,0$, $n=10,10$, $p<0,05$], (Abb. 21).



3.4.2.2 Makrophagen

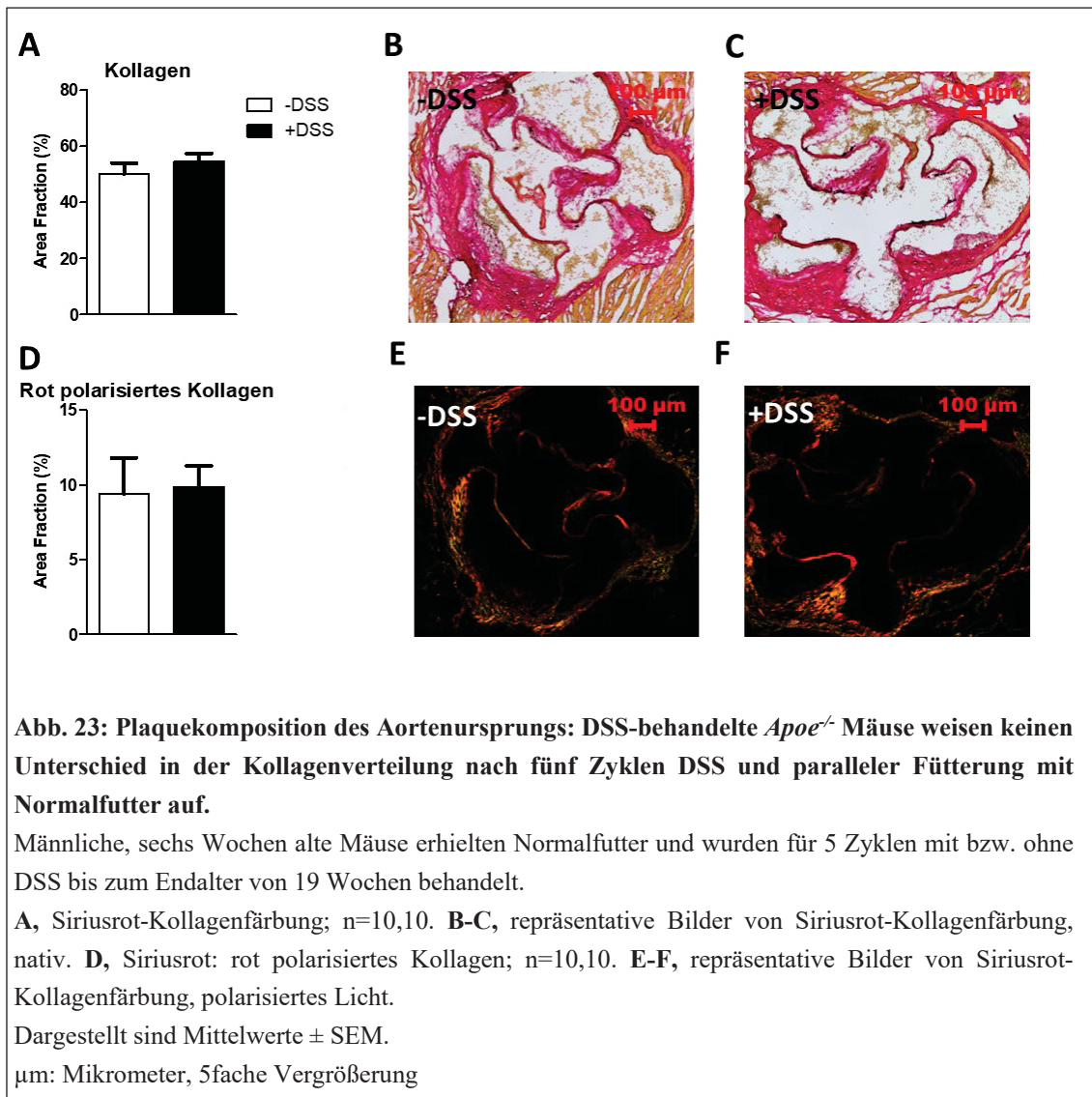
Auch bei der Untersuchung der Normalfuttergruppe zeigte sich kein Unterschied im Anteil der für die Atheroskleroseentwicklung bedeutsamen Makrophagen zwischen den Versuchsgruppen [AF in Prozent: Kontrolle: $16,4 \pm 3,1$ vs. DSS: $17,3 \pm 2,6$ $n=15,15$], (Abb. 22).



3.4.2.3 Kollagen

Es bestand kein signifikant veränderter Kollagengehalt in den Plaques der DSS-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe [AF in Prozent: Kontrolle: $50,0 \pm 3,9$ vs. DSS: $54,6 \pm 2,8$, n=10,10], (Abb. 23A-C).

Auch bei Betrachtung des dicht gepackten, im polarisierten Licht roten, Kollagens zeigte sich kein Unterschied [AF in Prozent: Kontrolle: $9,4 \pm 2,4$ vs. DSS: $9,9 \pm 1,4$, n=10,10], (Abb. 23D-F). Der Anteil der grün polarisierten Fasern war in allen Tieren (Kontrolle und DSS-behandelte Mäuse) unterhalb des messbaren Bereichs.

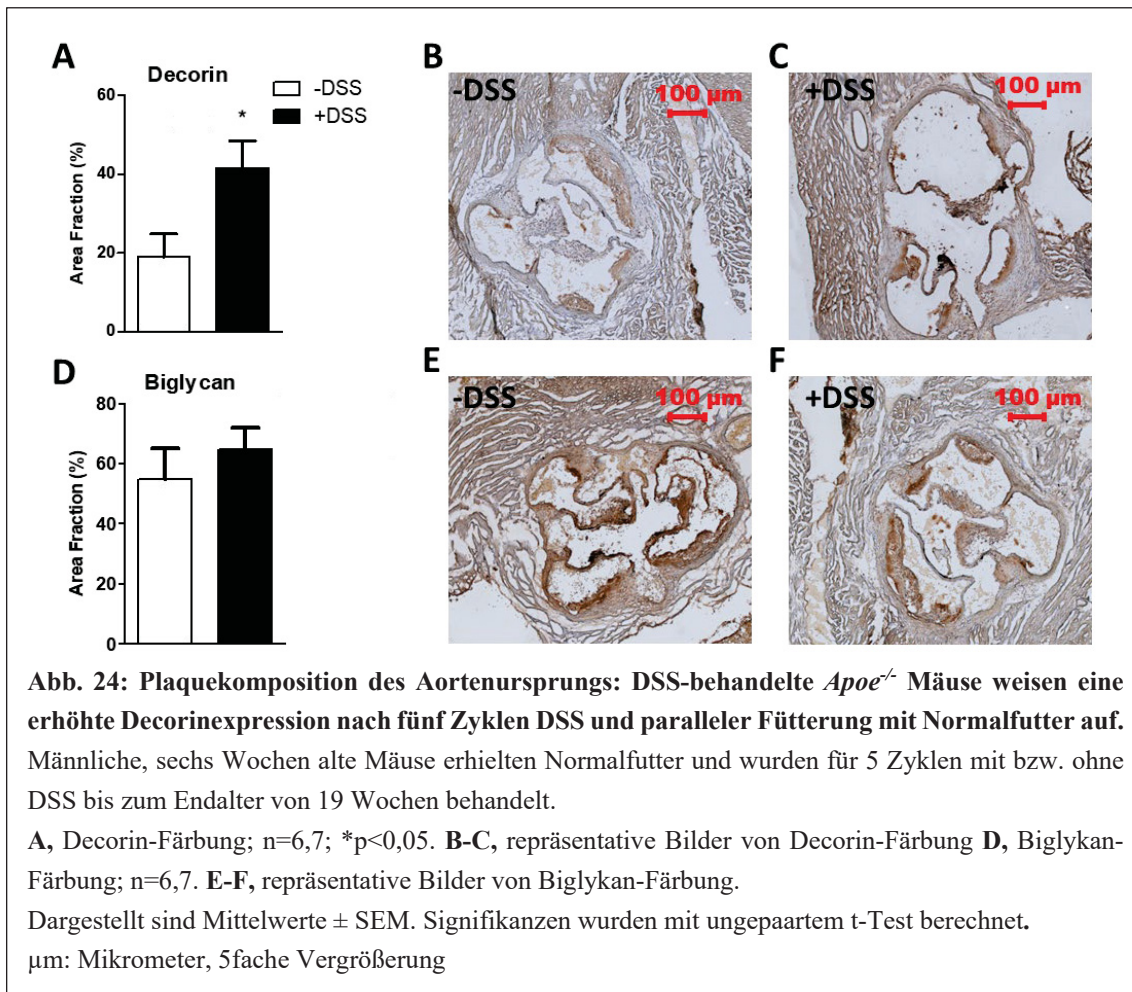


3.4.2.4 Proteoglykane und GAGs

3.4.2.4.1 Proteoglykane

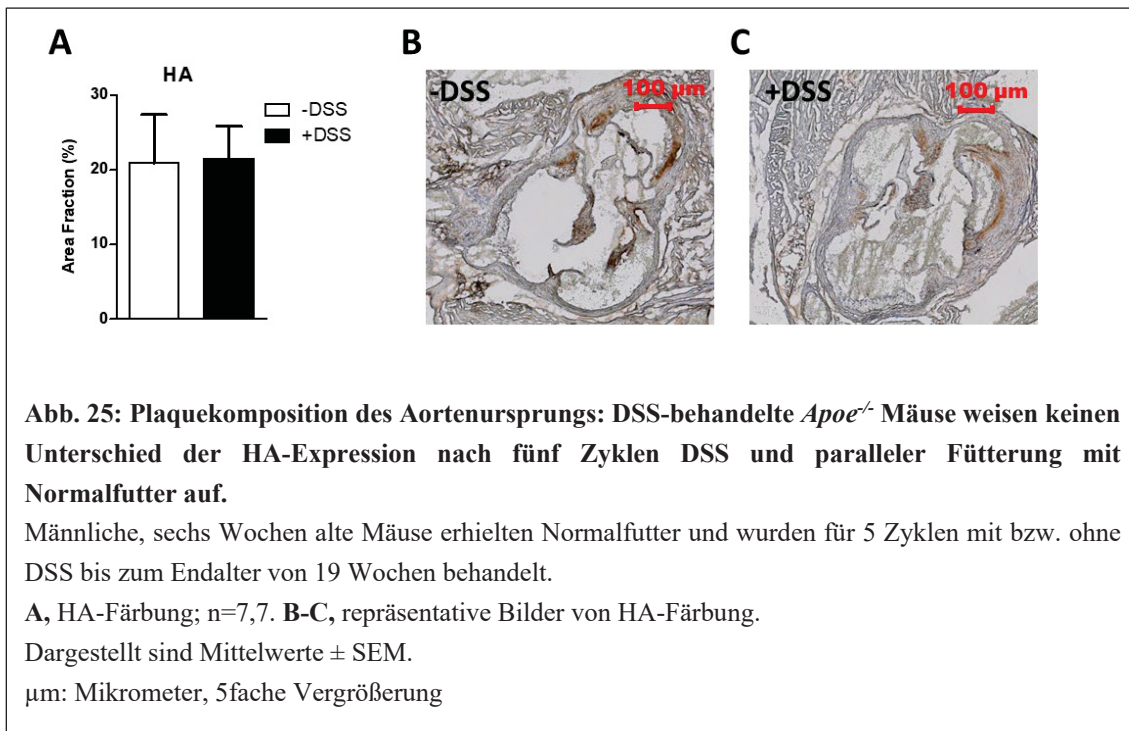
Die Untersuchung der SLRP in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs in der Normalfuttergruppe ergab einen doppelt so hohen Anteil von Decorin in Mäusen mit Kolitis gegenüber der Kontrollgruppe [AF in Prozent: Kontrolle: $19,0 \pm 5,9$ vs. DSS: $41,5 \pm 6,9$, n=6,7, $p < 0,05$], (Abb. 24A-C).

Biglykan war in der DSS-Gruppe nicht signifikant erhöht [AF in Prozent: Kontrolle: $54,8 \pm 10,3$ vs. DSS: $64,6 \pm 7,3$, n=6,7], (Abb. 24D-F).



3.4.2.4.2 Hyaluronsäure

Auch unter Normalfutter zeigte sich der HA-Anteil in atherosklerotischen Plaques im Vergleich von DSS- und Kontroll-Gruppe nicht verändert [AF in Prozent: Kontrolle: $20,9 \pm 6,5$ vs. DSS: $21,5 \pm 4,3$, n=7,7], (Abb. 25).



4 Diskussion

CED sind, wie andere Erkrankungen des chronisch-entzündlichen Formenkreises, mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert. Maßgeblich beteiligt an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen sind atherosklerotische Läsionen. Das Zusammenwirken der Plaquematrix beeinflusst dabei Stabilität, Proliferation, Migration und Adhäsion und ist somit von entscheidender Bedeutung für die klinische Relevanz der Atherosklerose.

Zur Untersuchung des Einflusses der Kolitis auf die Matrixkomposition atherosklerotischer Läsionen wurden in dieser Arbeit die beiden etablierten Modelle der „*ApoE* defizienten Maus“ zur Atheroskleroseinduktion und der chemisch-induzierten Kolitis durch DSS im Mausmodell kombiniert.

Neben DSS gibt es noch weitere Kolitis-Modelle, die zur Verfügung stehen. Morris *et al.* entwickelten 1989 das TNBS (Trinitrobenzolsulfonsäure)-Modell, bei dem intraluminales Ethanol zum Aufbruch der Epithelbarriere genutzt wird und TNBS als Hapten dient, welches eine Immunreaktion auslöst (116). Die entstehenden pathohistologischen Veränderungen zeigen einen chronischen Verlauf und ähneln denen des Morbus Crohn (117). Mit der TNBS-induzierten Kolitis können bis zu acht Wochen nach Administration typische Darmwandveränderungen nachgewiesen werden (116), sofern die individuell richtige Konzentration gewählt wird. Auch bei der *Oxazolone*-induzierten Kolitis, kommt es durch die topische Exposition mit einem Hapten (*Oxazolone*) zu einer Immunantwort der Darmmukosa. Die Entzündungsreaktion tritt akut auf und ist histopathologisch mit den Veränderungen der Colitis Ulcerosa vergleichbar (117). In beiden Modellen hängt das Ausmaß der Entzündung dabei maßgeblich von der Anfälligkeit des Mausstamms ab, sodass die Dosis individuell abgestimmt werden muss. Die Agenzien müssen außerdem rektal eingebracht werden (112,117). Die beschriebenen methodischen Schwierigkeiten im TNBS- und *Oxazolone*-Modell ergeben sich bei der Behandlung mit DSS nicht. Außerdem wird durch die zyklische DSS Administration, der schubweise Verlauf der Erkrankung simuliert.

Der *ApoE-Knockout* führt zu erhöhten Cholesterin-Plasmaspiegeln und darüber hinaus zu atherosklerotischen Läsionen, die in ihrer Progression humanen Läsionen ähneln (28). In diesem Modell wird die Atherogenese daher vor allem durch Cholesterinbelastung untersucht. Weiterhin werden Lipoprotein-unabhängige antiatherogene Effekte unterbunden. So schilderte Raffai *et al.*, dass ApoE unabhängig von dem Cholesterinspiegel die Rückbildung von Plaques bewirkt (118). Das Modell ist dahingehend vorteilhaft, als dass vergleichbare Läsionen schnell entstehen, jedoch – bedingt durch den großen Cholesterin-Effekt – der Komplexität der Atherogenese nur zum Teil Rechnung getragen wird. Durch Fütterung mit Normalfutter statt mit WD wird die Cholesterindominanz etwas abgeschwächt.

Die *ApoE*-Defizienz wirkt zusätzlich proinflammatorisch durch die Beeinträchtigung der Clearance apoptotischer Zellen und Erhöhung von $\text{TNF}\alpha$ (119), was bei der Untersuchung simulierter systemischer Entzündungen, wie dem DSS-Kolitis-Modell, zu berücksichtigen ist.

Als alternatives Atherosklerose Modell dient die *Ldlr*-defiziente Maus. ApoE bindet den LDLR und den Chylomikronen-Remnant-Rezeptor, sodass *ApoE*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu *LDLR*^{-/-} Mäusen unter normaler Diät erhöhte Plasmacholesterinspiegel (120) und früher ausgeprägtere atherosklerotischen Läsionen zeigen (121), wodurch die Atheroskleroselast im *ApoE*^{-/-}-Modell präziser zu untersuchen ist.

4.1 Beurteilung des Schweregrades der Kolitis

In einem ersten Schritt wurde die aktive Kolitis in den Mausmodellen anhand des Nachweises der inflammatorischen Genexpression verifiziert.

Im Darm der Kolitisgruppe konnten erhöhte Werte für mRNA von $\text{TNF}\alpha$ und ein möglicher positiver Trend zu vermehrter *Mcp1=Ccl2* (*CC-Chemokinligand*)-Expression nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den beobachteten pathologischen Veränderungen der Histologie des Darms und der geringeren Gewichtszunahme in der Kolitisgruppe.

In humaner Darmmukosa von CED-Patienten werden erhöhte MCP1-Werte gemessen (122) und auch im Mausmodell wirkt eine Hemmung der MCP1-Synthese protektiv auf die Entwicklung einer chemisch-induzierten Kolitis (123). Anti-TNF-Therapien zeigen bei CED-Patienten, die eine klinische Verbesserung durch Anti-TNF erfahren (*Therapie-Responder*), auch geringere MCP1 Spiegel (124).

Auch in atherosklerotischen Läsionen, nicht aber in normalen Arterien, befindet sich MCP1 (125). Bei Fehlen des Zytokins wird Atherosklerose im *Ldlr*^{-/-}-Modell reduziert (126). Dies ist insofern nicht überraschend, da Atherosklerose als inflammatorischer Prozess verstanden wird und Makrophagen als Schaumzellen eine entscheidende Rolle spielen.

In der murinen Darmwand zeigte sich weiterhin eine Hochregulation des Zytokins $\text{TNF}\alpha$. $\text{TNF}\alpha$ wird membrangebunden oder löslich vor allem von CD14⁺ Makrophagen der Mukosa bei CED gebildet (127) und kann über eine Dysregulation der *Tight Junctions* des Mukosaepithels zu einer Barriestörung beitragen (128). Aufgrund seiner entscheidenden Funktion als Mediator bei der Kolitis rückt $\text{TNF}\alpha$ in den Mittelpunkt intensiver pharmakologischer Forschung. Nicht nur in DSS-induzierter Kolitis führt eine $\text{TNF}\alpha$ -Blockade zur Reduktion der Entzündung (129), sondern auch bei Morbus Crohn (130) und Colitis Ulcerosa (131) sind $\text{TNF}\alpha$ -Inhibitoren wie Infliximab zur Remissionsinduktion und -Erhaltung effektiv.

Die Rolle von $\text{TNF}\alpha$ (bzw. dessen Hemmung) in der Atherogenese ist nicht eindeutig verstanden, jedoch scheinen $\text{TNF}\alpha$ -Inhibitoren bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises einen kardioprotektiven Effekt zu haben (Tam, Kitas und González-Gay (132),

Dulai *et al.* (133), Jacobsson *et al.* (134)). Studien beschreiben eine verbesserte arterielle Elastizität unter TNF α -Inhibitor Therapie (135) und eine große dänische landesweite Studie wies ein geringeres kardiovaskuläres Risiko bei TNF α -Inhibitor Gebrauch nach (104). Eine andere, wesentlich kleinere Studie schildert jedoch eine erhöhte Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse von TNF α -Inhibitor behandelten CED-Patienten (136). Der Einsatz von TNF α -Inhibitoren kommt vor allem bei schweren Schüben zum Einsatz und kann somit ein Surrogat-Parameter für die Schwere des Gesamtverlaufes sein. So bleibt unklar, ob das hier geschilderte erhöhte kardiovaskuläre Risiko wirklich auf eine Anti-TNF α -Therapie zurückzuführen ist, oder vielmehr auf die höhere Entzündungslast bei schweren Krankheitsschüben.

Einer näheren Betrachtung lohnenswert erscheinen unter anderem Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 und der für systemische Entzündungsgeschehen etablierte Marker C-reaktives Protein (CRP). IL-1 β ist ein inflammatorisches Zytokin, das bei CED-Patienten vermehrt in der Darmwand produziert wird (137). Den Bezug zur Atherosklerose schildert die Arbeit von Bhaskar *et al.*, die erörtert, wie IL-1 β -Antikörper die Progression der Atherosklerose verhindern (138).

IL-6 wird in CED vermehrt von dendritischen Zellen produziert (139) und erhöht, wie CRP, die kardiovaskuläre Mortalität. Weiterhin ist CRP an der Induktion endothelialer Dysfunktion über Aktivierung entzündlicher Reaktionen des perivaskulären Fettgewebes beteiligt (140).

Somit modulieren diese Zytokine (MCP1, TNF α , IL-1 β , IL-6) sowohl atherosklerotische Prozesse, als auch den inflammatorischen Verlauf der CED (*as reviewed by Yan et al.* (141)). In wie weit diese Prozesse sich gegenseitig beeinflussen und welche Rolle ein pharmakologischer Eingriff im Sinne einer antientzündlichen CED-Therapie auch in Bezug auf die Atherogenese hat, bleibt zu untersuchen. Das DSS-*Apoe*^{-/-}-Modell kann hierbei Grundlage zur Analyse dieser Wechselwirkung sein.

4.2. Effekte der hochkalorischen Diät auf die Atherogenese und -progression bei Kolitis

Die Versuche mit WD zeigten auch nach Erhöhung der Zahl der Kolitis-Schübe von drei auf fünf keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe in Bezug auf die Atheroskleroselast. Hingegen war bei Gabe einer Normaldiät der proatherogene Effekt der DSS-Behandlung ersichtlich. Zur Untersuchung der Auswirkung der chronischen Entzündung durch die Kolitis auf die Entwicklung der Atherosklerose, ist somit die Futtermittelwahl von entscheidender Bedeutung.

Christ *et al.* konnten eine durch WD ausgelöste systemische Entzündung, sowie eine langfristige Aktivierung des angeborenen Immunsystems nachweisen. Sowohl das Entzündungsgeschehen an sich, als auch die Aktivierung des Immunsystems, tragen zur

Entstehung und Reifung atherosklerotischer Läsionen bei (142). Der große Effekt der WD auf Entzündungsprozesse, als auch auf die Atherogenese selbst, kann subtilere Veränderungen, die durch CED ausgelöst werden, kaschieren. Hinzu kommt der Einfluss von WD auf CED selbst: Neben des Entzündungspotenzials, stört WD die mikrobiotische Homöostase des Darms und kann so das Risiko für CED erhöhen (*as reviewed by Rizello et al. (143)*).

Als Konsequenz wurde der Einfluss von DSS an *ApoE*^{-/-} Mäusen untersucht, die statt WD Normalfutter erhielten. Sowohl das Ausmaß der Atherosklerose war in diesem Versuchsaufbau bei Kolitis-Tieren erhöht, als auch die Plaquekomposition verändert.

Die chronische Kolitis wirkt im Modell unter WD womöglich protektiv auf die Entwicklung von Atherosklerose. Ursächlich kann eine mutmaßlich geringere Resorption des Atherosklerose-Stimulus der hochkalorischen Diät durch Inflammation und Diarrhoen sein. So zeigte die DSS Gruppe eine deutlich geringere Gewichtszunahme als Zeichen der Malabsorption. Der Effekt einer chronischen Darmentzündung auf das atherogene Risikoprofil kann somit unter WD aufgrund von geringerer Resorption des Atherosklerose-Stimulus, sowie durch das inflammatorische Potenzial der WD selbst, überlagert sein. Werden die Tiere hingegen mit Normalfutter gefüttert, hat die Veränderung des Atheroskleroserisikos durch fett- und kalorienreiche Ernährung einen geringeren Stellenwert und die Gruppen lassen sich eher auf den Einfluss der chronischen Entzündung untersuchen. Da auch CED-Patienten weniger an traditionellen Risikofaktoren wie erhöhten Cholesterinspiegeln oder erhöhtem BMI leiden und dennoch ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko zeigen (97–99), erscheint die Analyse des Einflusses der CED unter Normalfutterbedingungen wohl auch am ehesten den Bedingungen in Patienten.

4.3 Einfluss der Plaque-Lokalisation

Prädispositionsstellen für Atherosklerose sind Gefäßabschnitte mit turbulenter Strömung, wie Klappen und Gefäßabzweigungen. In *ApoE*^{-/-} Mäusen werden zuerst am Aortenursprung und Aortenbogen Läsionen beobachtet (144,145), dann an Abgängen der Bauchaorta und der Beinarterienbifurkation und finden sich bei ausgeprägter Atherosklerose in der gesamten Aorta (28). Entsprechend bietet sich neben der Beurteilung des Plaquebesatzes der Gesamtaorta die Untersuchung des Aortenursprungs, des Aortenbogens und der Bauchaorta an.

Unter WD zeigten sich keine Unterschiede im Ausmaß der Atherosklerose. Unter Normalfutter hingegen konnte signifikant mehr Atherosklerose in der Gesamtaorta und prozentual mehr als doppelt so viel Plaque im Bereich der Bauchaorta als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dieser Effekt trat in der proximalen Aorta nicht auf. Zusammenfassend scheint es einen Unterschied des abdominalen Anteils und der davon proximalen Bereiche der Aorta zu geben. Mögliche Ursachen für diese Beobachtungen bedürfen weiteren Untersuchungen.

In CED kommt es zur Hypertrophie mesenterialen Fettes, was mit der Krankheitsaktivität korreliert (146) und lokale Adipozyten produzieren vermehrt Entzündungsmediatoren wie TNF α (147). Dass Fettgewebe enthält einen Anteil von weniger differenzierten Präadipozyten, die in der Lage sind, sich in Makrophagen-ähnliche Zellen zu entwickeln und so eine Bedeutung in inflammatorischen Prozessen spielen können (148). Weiterhin ist viszerales Fettgewebe Quelle zahlreicher Zytokine, wie IL-1, IL-6, MCP1 und TNF α , die in der Pathogenese der CED, als auch der Atherosklerose eine entscheidende Rolle spielen, wie auch weiterer Mediatoren wie Adiponectin (*as reviewed by Juge-Aubry* (149)). Somit könnte die enge anatomische Nähe zwischen mesenterialem Fett und Darm eine Rolle für die beobachteten vermehrten atherosklerotischen Läsionen im abdominalen Bereich der Aorta spielen.

Eine weitere mögliche Verbindung zu der hier dargestellten Beobachtung, dass vor allem im Bereich der Bauchaorta die Atherosklerose bei CED zunimmt, ist das perivaskuläre Fettgewebe (PVAT, *perivascular adipose tissue*). Dies ähnelt in Mäusen braunem Fettgewebe (150) und wird beim Menschen als sogenanntes „beiges Fettgewebe“ beschrieben – bestehend aus Zellen mit Eigenschaften von sowohl weißem als auch braunem Fett (151).

Endotheliale Verletzungen, beispielsweise durch einen Ballonkatheter, führen zur Entzündungsreaktion des PVAT (152,153). Auch eine fettreiche Ernährung als Atheroskleroseinduktor führt im PVAT zu vermehrter Inflammation und verminderter Zelldifferenzierung (154). Am *ApoE*^{-/-}-Modell konnte gezeigt werden, dass PVAT zu endothelialer Dysfunktion und beschleunigter Atherosklerose führt (155).

4.4 Effekte der chronischen Kolitis auf die EZM der atherosklerotischen Läsionen

Vor dem Hintergrund der Hypothese, dass CED zum Teil unabhängig von traditionellen Risikofaktoren die Atherosklerose begünstigen, wurde die Plaquekomposition in Hinblick auf Lipidakkumulation, Entzündungsgeschehen und EZM-Modulation untersucht.

4.4.1 Lipide

Während im SLE-Mausmodell bei 24 Wochen alten Mäusen auf *ApoE*^{-/-} Hintergrund auf Normalfutter ein erhöhter Anteil von Lipid an atherosklerotischen Plaques gezeigt wurde (156), war in den hier dargestellten Ergebnissen ein signifikant geringerer Lipidanteil im Kolitismodell unter Normalfutter zu beobachten. Beide Erkrankungen führen zu einer systemischen, chronischen Entzündung, sodass ein ähnlicher Einfluss auf die Plaquekomposition zu erwarten wäre. Andererseits kann durch CED die primäre Lipidaufnahme im Darm verändert sein und so zu niedrigerer Lipidakkumulation führen. Hingegen weisen Untersuchungen der

Lipoproteinspiegel in humanen CED-Patienten auf ein verändertes Lipidprofil mit erhöhten LDL- und erniedrigten HDL-Konzentrationen hin (157). Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen und Ursachen der verschiedenen Ergebnisse sowie Veränderung des Lipidanteils im Zuge der Plaquereifung bleiben zu untersuchen.

4.4.2 Entzündungszellen

Im Sinne einer vermehrten Entzündungsreaktion in der Kolitisgruppe, kann eine zunehmende Makrophageneinwanderung in die atherosklerotischen Plaques erwartet werden. Liu *et al.* zeigten, dass IL-34, welches bei CED und anderen chronisch-inflammatorischen Erkrankungen erhöht ist, die Schaumzellbildung fördert (158). In der Untersuchung der WD-Gruppe konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden, sondern nur einen Trend hin zu mehr Läsions-ständigen Makrophagen in der Kolitisgruppe. Auch in der Normalfutter-Gruppe blieb der Nachweis eines Unterschiedes aus. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten von Stanic *et al.*, die in 24 Wochen alten *LDLR*^{-/-} Mäusen in SLE-Modellen keine Unterschiede im Makrophagenanteil der Plaques fanden. Vielmehr scheinen in diesem Modell bzw. zu diesem Zeitpunkt T-Zellen eine Rolle zu spielen (159). Die Untersuchung der T-Zell-Populationen im DSS-Modell können zukünftig zur Einordnung der Rolle dieser Entzündungszellen beitragen.

4.4.3 Proteoglykane und GAGs

Im Rahmen der Atherosklerose sind insbesondere die Proteoglykane und GAGs HA, Biglykan und Decorin bedeutsam und modulieren vielfältig den Progress der Atherogenese.

4.4.3.1 Decorin

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen eine signifikant erhöhte Decorinexpression in Kolitis-Tieren unter Normalfutter nach 19 Wochen Fütterung. Decorin spielt in Bezug auf Atherosklerose eine ambivalente Rolle. Zum einen findet es sich gehäuft in der fibrotischen Kappe der Plaques (55), wirkt kollagenstabilisierend (67) und kann so von Bedeutung für die Plaquestabilität sein. Zum anderen kann es durch Unterstützung inflammatorischer Prozesse proatherogen wirken (*as reviewed by* Hultgårdh-Nilsson, Borén, und Chakravarti (160)). Im hier eingesetzten Modell ist die Frage nach möglichen weiteren Induktoren der Decorinexpression, wie zum Beispiel durch Adiponectin (161), zu klären.

Auch scheinen weitere Untersuchungen zum Verlauf des Decorinanteils über verschiedene Reifegrade der atherosklerotischen Plaques und zum Einfluss auf die Plaquestabilität sind in Zukunft sinnvoll.

4.4.3.2 Biglykan

Biglykan wird im inflammatorischen Milieu vermehrt von Makrophagen exprimiert und wirkt selbst proinflammatorisch (51,52). Weiterhin ist Biglykan an der Retention von Lipoproteinen als zentrales Ereignis der Atherogenese beteiligt (61,162). Zu erwarten wäre, bedingt durch die systemische Entzündung der Kolitis, eine erhöhte Biglykanexpression und damit einhergehend ein erhöhter Anteil von Biglykan-induzierter Lipidretention in atherosklerotischen Plaques. Dieser Effekt zeigte sich jedoch in den CED Tieren nicht. Die Lipidakkumulation war, wie bereits beschrieben, sogar vermindert. Biglykan zeigte keinen Unterschied zwischen der Kolitis- und der Kontroll-Gruppe. Zukünftig bleibt zu untersuchen, ob im *ApoE*^{-/-}-DSS-Modell Biglykan vermehrt exprimiert wird und zu welchem Zeitpunkt dies bei der Atherogenese eine Rolle spielt.

4.4.3.3 Hyaluronsäure

Untersuchungen zur HA-Verteilung in atherosklerotischen Läsionen sind insbesondere aufgrund der variablen Rolle von HA im Zuge der Atherogenese interessant. So hat HA als Glykokalyxbestandteil antiatherogenes Potential, wird bei Störung der endothelialen Integrität aber auch vermehrt in der *Intima* und *Media* exprimiert und wirkt bei Überproduktion in Gefäßmuskelzellen proatherogen. Ebenso divers ist die Bedeutung von HA für CED, durch eine vielseitige Modulation inflammatorischer Prozesse (163).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen keinen Unterschied im Gesamt-HA-Anteil der Plaques. Eine Untersuchung der Expression speziell des LMW-HA könnte jedoch weitere Informationen zum Einfluss der Kolitis auf die Atherosklerose geben. In inflammatorischem Gewebe akkumuliert vermehrt LMW-HA, welche Makrophagen zu stimulieren und den inflammatorischen Prozess weiter zu fördern vermag (48,49).

4.5 Schlussfolgerung

Zusammengefasst zeigt die hier vorliegende Arbeit die Etablierung eines murinen Modells zur Kombination der Pathologien Atherosklerose und chronische Kolitis. Hierbei erwies sich die Fütterung einer WD als sehr starker atherogener Stimulus, welcher mögliche Effekte der chronischen Darmentzündung wahrscheinlich überdeckte. Tatsächlich zeigen neuere Arbeiten, dass die WD selbst ein inflammatorisches Potenzial besitzt. Bei den untersuchten 13 und 19 Wochen alten Tiere unter WD zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Atheroskleroselast. Die Tiere der älteren Gruppe von 19 Wochen zeigten mögliche Trends, wenn auch keine signifikanten Unterschiede, sodass für die weiteren Versuche ein Endpunkt von 19

Wochen und fünf Zyklen DSS mit Normalfutter festgelegt wurde. In diesem Setting zeigten sich sowohl signifikante Unterschiede in der Atheroskleroselast, als auch in der Plaquekomposition.

Bemerkenswert war die regionale Verteilung der Plaques in der Aorta. Durch Induktion einer chronischen Darmentzündung in *ApoE*^{-/-} Mäusen können zu dem von uns untersuchten Zeitpunkt auch regionale, parakrine Effekte der Atherogenese eine Rolle spielen. Als Bindeglied könnte Fettgewebe von Bedeutung sein, welches als mesenteriales Fettgewebe bei CED Entzündungsmediatoren bildet und als PVAT zur Atherosklerose speziell der Bauchorta beiträgt.

Die systemische Auswirkung der chronischen Entzündung, vor allem der Einfluss auf die Plaquezusammensetzung, bedarf weiteren Untersuchungen. Unklar bleiben die Ursachen und Folgen von geringerer Lipideinlagerung und erhöhter Decorinexpression, wie es die hier dargestellten Experimente zeigten. Die Plaquekomposition zu verschiedenen Zeitpunkten der Atherogenese sowie beteiligte Zellpopulationen können weitere Aufschlüsse über die Pathophysiologie geben. Auch dürften die hier erhobenen Befunde einen Einfluss der CED auf die Plaquestabilität und die Gefahr einer Plaqueruptur nahelegen, was klinisch von größter Relevanz ist. Weiterhin steht der Vergleich mit anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie SLE, sowie die Untersuchung des Einflusses klassischer Risikofaktoren (z.B. Lipidprofile) aus.

Zusammenfassend erweist sich Das *ApoE*^{-/-}-DSS-Modell unter Normalfutter zur Untersuchung des Einflusses der CED auf die Entwicklung von Atherosklerose als vielversprechendes, einfach zu handhabendes Modell mit potentiell weitreichenden Untersuchungsmöglichkeiten.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Mendis S, Puska P, Norrving B, World Health Organization, World Heart Federation, World Stroke Organization, editors. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva: World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization; 2011. 155 p.
2. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):503–16.
3. Schaftenaar F, Frodermann V, Kuiper J, Lutgens E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27(3):209–15.
4. Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*. 1977;46:897–930.
5. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*. 2017 Aug 21;38(32):2459–72.
6. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115–26.
7. Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res*. 1983 Aug;24(8):1070–6.
8. Ding N, Sang Y, Chen J, Ballew SH, Kalbaugh CA, Salameh MJ, et al. Cigarette Smoking, Smoking Cessation, and Long-Term Risk of 3 Major Atherosclerotic Diseases. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Jul 30;74(4):498–507.
9. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*. 1979 May 11;241(19):2035–8.
10. Campbell LA, Rosenfeld ME. Infection and Atherosclerosis Development. *Arch Med Res*. 2015 Jul;46(5):339–50.
11. Loperena R, Harrison DG. Oxidative Stress and Hypertensive Diseases. *Med Clin North Am*. 2017 Jan;101(1):169–93.
12. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 1990 Mar 15;344(6263):254–7.
13. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003 Oct;170(2):191–203.
14. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997 Dec 1;100(11):2680–90.
15. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017 Sep 18;19(11):42.
16. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. 2016 Jan;20(1):17–28.
17. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2015 May;214(1):33–50.
18. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973 Jun 29;180(4093):1332–9.
19. Hegyi L, Skepper JN, Cary NR, Mitchinson MJ. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J Pathol*. 1996 Dec;180(4):423–9.

20. Gown AM, Tsukada T, Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1986 Oct;125(1):191–207.
21. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2020 Jul;17(7):387–401.
22. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Dallas Tex.* 1986 Apr;6(2):131–8.
23. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J.* 1993 May;69(5):377–81.
24. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, et al. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation.* 1995 Sep 15;92(6):1565–9.
25. Newby AC. Metalloproteinase production from macrophages - a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. *Exp Physiol.* 2016 Nov 1;101(11):1327–37.
26. Plump AS, Breslow JL. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:495–518.
27. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 1992 Oct 16;71(2):343–53.
28. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol Am Heart Assoc.* 1994 Jan;14(1):133–40.
29. Yin W, Carballo-Jane E, McLaren DG, Mendoza VH, Gagen K, Geoghagen NS, et al. Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. *J Lipid Res.* 2012 Jan;53(1):51–65.
30. Koyama H, Raines EW, Bornfeldt KE, Roberts JM, Ross R. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell.* 1996 Dec 13;87(6):1069–78.
31. Lee T-H, Sottile J, Chiang H-Y. Collagen inhibitory peptide R1R2 mediates vascular remodeling by decreasing inflammation and smooth muscle cell activation. *PloS One.* 2015;10(2):e0117356.
32. Bertelsen S. Chemical studies on the arterial wall in relation to atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1968 Nov 21;149(2):643–54.
33. Lévesque H, Girard N, Maingonnat C, Delpech A, Chauzy C, Tayot J, et al. Localization and solubilization of hyaluronan and of the hyaluronan-binding protein hyaluronectin in human normal and arteriosclerotic arterial walls. *Atherosclerosis.* 1994 Jan;105(1):51–62.
34. Wight TN. Arterial remodeling in vascular disease: a key role for hyaluronan and versican. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2008 May 1;13:4933–7.
35. Chajara A, Levesque H, Courel MN, Chauzy C, Maingonnat C, Bertrand P, et al. Hyaluronan and hyaluronectin production in injured rat thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1996 Sep 6;125(2):193–207.
36. Otsuka F, Kramer MCA, Woudstra P, Yahagi K, Ladich E, Finn AV, et al. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atherosclerosis.* 2015 Aug;241(2):772–82.
37. Cancel LM, Ebong EE, Mensah S, Hirschberg C, Tarbell JM. Endothelial glycocalyx, apoptosis and inflammation in an atherosclerotic mouse model. *Atherosclerosis.* 2016;252:136–46.
38. Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol.* 1999 Aug;277(2 Pt 2):H508-514.

39. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation*. 2000 Apr 4;101(13):1500–2.
40. Nagy N, Freudenberger T, Melchior-Becker A, Röck K, Ter Braak M, Jastrow H, et al. Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis. *Circulation*. 2010 Nov 30;122(22):2313–22.
41. Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Apr;19(4):1004–13.
42. Chajara A, Raoudi M, Delpech B, Levesque H. Inhibition of arterial cells proliferation in vivo in injured arteries by hyaluronan fragments. *Atherosclerosis*. 2003 Nov;171(1):15–9.
43. Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Eickelberg O, Perruchoud AP, Block LH, Roth M. A 340 kDa hyaluronic acid secreted by human vascular smooth muscle cells regulates their proliferation and migration. *Glycobiology*. 1998 Aug;8(8):821–30.
44. Chai S, Chai Q, Danielsen CC, Hjorth P, Nyengaard JR, Ledet T, et al. Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis. *Circ Res*. 2005 Mar 18;96(5):583–91.
45. Homann S, Grandoch M, Kiene LS, Podsvyadek Y, Feldmann K, Rabausch B, et al. Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2018;66:67–80.
46. Kashima Y, Takahashi M, Shiba Y, Itano N, Izawa A, Koyama J, et al. Crucial role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury. *PloS One*. 2013;8(3):e58760.
47. Siiskonen H, Oikari S, Pasonen-Seppänen S, Rilla K. Hyaluronan synthase 1: a mysterious enzyme with unexpected functions. *Front Immunol*. 2015;6:43.
48. Noble PW. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2002 Jan;21(1):25–9.
49. Bot PT, Pasterkamp G, Goumans M-J, Strijder C, Moll FL, de Vries J-P, et al. Hyaluronic acid metabolism is increased in unstable plaques. *Eur J Clin Invest*. 2010 Sep;40(9):818–27.
50. Neame PJ, Choi HU, Rosenberg LC. The primary structure of the core protein of the small, leucine-rich proteoglycan (PG I) from bovine articular cartilage. *J Biol Chem*. 1989 May 25;264(15):8653–61.
51. Schaefer L, Macakova K, Raslik I, Micegova M, Gröne H-J, Schönherr E, et al. Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction. *Am J Pathol*. 2002 Mar;160(3):1181–91.
52. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser H-J, Baliova M, Krzyzankova M, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*. 2005 Aug;115(8):2223–33.
53. Santiago-García J, Kodama T, Pitas RE. The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 2003 Feb 28;278(9):6942–6.
54. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 1990 Nov;38(11):1549–63.
55. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol*. 1994 May;144(5):962–74.
56. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995 May;15(5):551–61.
57. Neufeld EB, Zadrozny LM, Phillips D, Aponte A, Yu Z-X, Balaban RS. Decorin and biglycan retain LDL in disease-prone valvular and aortic subendothelial intimal matrix. *Atherosclerosis*. 2014 Mar;233(1):113–21.

58. Kovanen PT, Pentikäinen MO. Decorin links low-density lipoproteins (LDL) to collagen: a novel mechanism for retention of LDL in the atherosclerotic plaque. *Trends Cardiovasc Med.* 1999 May;9(3-4):86-91.
59. Kunjathoor VV, Chiu DS, O'Brien KD, LeBoeuf RC. Accumulation of biglycan and perlecan, but not versican, in lesions of murine models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 Mar 1;22(3):462-8.
60. Thompson JC, Tang T, Wilson PG, Yoder MH, Tannock LR. Increased atherosclerosis in mice with increased vascular biglycan content. *Atherosclerosis.* 2014 Jul;235(1):71-5.
61. O'Brien KD, Lewis K, Fischer JW, Johnson P, Hwang J-Y, Knopp EA, et al. Smooth muscle cell biglycan overexpression results in increased lipoprotein retention on extracellular matrix: implications for the retention of lipoproteins in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2004 Nov;177(1):29-35.
62. Tang T, Thompson JC, Wilson PG, Yoder MH, Müller J, Fischer JW, et al. Biglycan deficiency: increased aortic aneurysm formation and lack of atheroprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Oct;75:174-80.
63. Hultgårdh-Nilsson A, Borén J, Chakravarti S. The small leucine-rich repeat proteoglycans in tissue repair and atherosclerosis. *J Intern Med.* 2015 Nov;278(5):447-61.
64. Chen S, Birk DE. The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. *FEBS J.* 2013 May;280(10):2120-37.
65. Al Haj Zen A, Caligiuri G, Sainz J, Lemitre M, Demerens C, Lafont A. Decorin overexpression reduces atherosclerosis development in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2006 Jul;187(1):31-9.
66. Fischer JW, Steitz SA, Johnson PY, Burke A, Kolodgie F, Virmani R, et al. Decorin promotes aortic smooth muscle cell calcification and colocalizes to calcified regions in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Dec;24(12):2391-6.
67. Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J.* 2002 Jun;19(4-5):249-55.
68. GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2020;5(1):17-30.
69. M'Koma AE. Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem. *Clin Med Insights Gastroenterol.* 2013;6:33-47.
70. Feakins RM. Ulcerative colitis or Crohn's disease? Pitfalls and problems. *Histopathology.* 2014 Feb;64(3):317-35.
71. Yashiro M. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014 Nov 28;20(44):16389-97.
72. Zhang Y-Z, Li Y-Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014 Jan 7;20(1):91-9.
73. Santos MPC, Gomes C, Torres J. Familial and ethnic risk in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol.* 2018 Feb;31(1):14-23.
74. Rodriguez-Bores L, Fonseca G-C, Villeda M-A, Yamamoto-Furusho J-K. Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol WJG.* 2007 Nov 14;13(42):5560-70.
75. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001 May 31;411(6837):599-603.
76. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001 May 31;411(6837):603-6.
77. Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004 May;126(6):1504-17.
78. Berkowitz L, Schultz BM, Salazar GA, Pardo-Roa C, Sebastián VP, Álvarez-Lobos MM, et al. Impact of Cigarette Smoking on the Gastrointestinal Tract Inflammation: Opposing Effects in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Front Immunol.* 2018;9:74.

79. Sun Y, Li L, Xie R, Wang B, Jiang K, Cao H. Stress Triggers Flare of Inflammatory Bowel Disease in Children and Adults. *Front Pediatr.* 2019;7:432.
80. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet.* 2007 May 12;369(9573):1627–40.
81. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science.* 2001 Feb 2;291(5505):881–4.
82. Buisine MP, Desreumaux P, Leteurtre E, Copin MC, Colombel JF, Porchet N, et al. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease. *Gut.* 2001 Oct;49(4):544–51.
83. Gitter AH, Wullstein F, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barrier defects in ulcerative colitis: characterization and quantification by electrophysiological imaging. *Gastroenterology.* 2001 Dec;121(6):1320–8.
84. Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology.* 2000 Dec;119(6):1740–4.
85. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* 2000 Dec;68(12):7010–7.
86. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2005 Jul;129(1):50–65.
87. Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1999 Jul 15;163(2):1081–90.
88. Roifman I, Beck PL, Anderson TJ, Eisenberg MJ, Genest J. Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review. *Can J Cardiol.* 2011 Apr;27(2):174–82.
89. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 2017 Sep 21;377(12):1119–31.
90. Tardif J-C, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med.* 2019 Dec 26;381(26):2497–505.
91. Chung CP, Avalos I, Oeser A, Gebretsadik T, Shintani A, Raggi P, et al. High prevalence of the metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus: association with disease characteristics and cardiovascular risk factors. *Ann Rheum Dis.* 2007 Feb;66(2):208–14.
92. Chung CP, Oeser A, Solus JF, Avalos I, Gebretsadik T, Shintani A, et al. Prevalence of the metabolic syndrome is increased in rheumatoid arthritis and is associated with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2008 Feb;196(2):756–63.
93. del Rincón ID, Williams K, Stern MP, Freeman GL, Escalante A. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum.* 2001 Dec;44(12):2737–45.
94. El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y, Durrington PN, Mackness M, Walker M, et al. Systemic lupus erythematosus: an independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation.* 2004 Jul 27;110(4):399–404.
95. Steyers CM, Miller FJ. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):11324–49.
96. Sappati Biyyani RSR, Fahmy NM, Baum E, Nelson KM, King JF. Inflammatory bowel disease and coronary artery disease. *Indian J Gastroenterol Off J Indian Soc Gastroenterol.* 2009 Feb;28(1):28–30.
97. Aggarwal A, Atreja A, Kapadia S, Lopez R, Achkar J-P. Conventional risk factors and cardiovascular outcomes of patients with inflammatory bowel disease with confirmed coronary artery disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Sep;20(9):1593–601.

98. Yarur AJ, Deshpande AR, Pechman DM, Tamariz L, Abreu MT, Sussman DA. Inflammatory bowel disease is associated with an increased incidence of cardiovascular events. *Am J Gastroenterol*. 2011 Apr;106(4):741–7.
99. Bots ML, Dijk JM, Oren A, Grobbee DE. Carotid intima-media thickness, arterial stiffness and risk of cardiovascular disease: current evidence. *J Hypertens*. 2002 Dec;20(12):2317–25.
100. Wu G-C, Leng R-X, Lu Q, Fan Y-G, Wang D-G, Ye D-Q. Subclinical Atherosclerosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Angiology*. 2017 May;68(5):447–61.
101. Osterman MT, Yang Y-X, Brensinger C, Forde KA, Lichtenstein GR, Lewis JD. No increased risk of myocardial infarction among patients with ulcerative colitis or Crohn’s disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2011 Oct;9(10):875–80.
102. Dorn SD, Sandler RS. Inflammatory bowel disease is not a risk factor for cardiovascular disease mortality: results from a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2007 Mar;102(3):662–7.
103. Ha C, Magowan S, Accortt NA, Chen J, Stone CD. Risk of arterial thrombotic events in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2009 Jun;104(6):1445–51.
104. Rungoe C, Basit S, Ranthe MF, Wohlfahrt J, Langholz E, Jess T. Risk of ischaemic heart disease in patients with inflammatory bowel disease: a nationwide Danish cohort study. *Gut*. 2012 Sep 26;
105. Kirchgessner J, Beaugerie L, Carrat F, Andersen NN, Jess T, Schwarzingner M, et al. Increased risk of acute arterial events in young patients and severely active IBD: a nationwide French cohort study. *Gut*. 2018;67(7):1261–8.
106. Choi YJ, Lee DH, Shin DW, Han K-D, Yoon H, Shin CM, et al. Patients with inflammatory bowel disease have an increased risk of myocardial infarction: a nationwide study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019;50(7):769–79.
107. Singh S, Singh H, Loftus EV, Pardi DS. Risk of cerebrovascular accidents and ischemic heart disease in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2014 Mar;12(3):382–393.e1: quiz e22.
108. Kristensen SL, Ahlehoff O, Lindhardsen J, Erichsen R, Lamberts M, Khalid U, et al. Inflammatory bowel disease is associated with an increased risk of hospitalization for heart failure: a Danish Nationwide Cohort study. *Circ Heart Fail*. 2014 Sep;7(5):717–22.
109. Kristensen SL, Ahlehoff O, Lindhardsen J, Erichsen R, Jensen GV, Torp-Pedersen C, et al. Disease activity in inflammatory bowel disease is associated with increased risk of myocardial infarction, stroke and cardiovascular death--a Danish nationwide cohort study. *PloS One*. 2013;8(2):e56944.
110. Grainge MJ, West J, Card TR. Venous thromboembolism during active disease and remission in inflammatory bowel disease: a cohort study. *Lancet Lond Engl*. 2010 Feb 20;375(9715):657–63.
111. Bigeh A, Sanchez A, Maestas C, Gulati M. Inflammatory bowel disease and the risk for cardiovascular disease: Does all inflammation lead to heart disease? *Trends Cardiovasc Med*. 2020 Nov;30(8):463–9.
112. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007;2(3):541–6.
113. Laroui H, Ingersoll SA, Liu HC, Baker MT, Ayyadurai S, Charania MA, et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PloS One*. 2012;7(3):e32084.
114. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. *J Vet Med Sci Jpn Soc Vet Sci*. 1999 Jan;61(1):67–70.
115. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. 1990 Mar;98(3):694–702.

116. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989 Mar;96(3):795–803.
117. Wirtz S, Popp V, Kindermann M, Gerlach K, Weigmann B, Fichtner-Feigl S, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2017 Jul;12(7):1295–309.
118. Raffai RL, Loeb SM, Weisgraber KH. Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Feb;25(2):436–41.
119. Grainger DJ, Reckless J, McKilligin E. Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Nov 15;173(10):6366–75.
120. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in “knockout” mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 10;91(10):4431–5.
121. von der Thüsen JH, van Berkel TJ, Biessen EA. Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2001 Feb 27;103(8):1164–70.
122. Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn’s disease. *J Pathol*. 2003 Jan;199(1):28–35.
123. Bhatia M, Landolfi C, Basta F, Bovi G, Ramnath RD, de Joannon AC, et al. Treatment with bindarit, an inhibitor of MCP-1 synthesis, protects mice against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. 2008 Oct;57(10):464–71.
124. Magnusson MK, Strid H, Isaksson S, Bajor A, Lason A, Ung K-A, et al. Response to infliximab therapy in ulcerative colitis is associated with decreased monocyte activation, reduced CCL2 expression and downregulation of Tenascin C. *J Crohns Colitis*. 2015 Jan;9(1):56–65.
125. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*. 1991 Oct;88(4):1121–7.
126. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998 Aug;2(2):275–81.
127. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest*. 2008 Jun;118(6):2269–80.
128. Su L, Nalle SC, Shen L, Turner ES, Singh G, Breskin LA, et al. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. *Gastroenterology*. 2013 Aug;145(2):407–15.
129. Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Männel DN, Andus T, Schölmerich J, et al. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol*. 1997 Feb;107(2):353–8.
130. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn’s disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 2002 May 4;359(9317):1541–9.
131. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005 Dec 8;353(23):2462–76.
132. Tam L-S, Kitas GD, González-Gay MA. Can suppression of inflammation by anti-TNF prevent progression of subclinical atherosclerosis in inflammatory arthritis? *Rheumatol Oxf Engl*. 2014 Jun;53(6):1108–19.

133. Dulai R, Perry M, Twycross-Lewis R, Morrissey D, Atzeni F, Greenwald S. The effect of tumor necrosis factor- α antagonists on arterial stiffness in rheumatoid arthritis: a literature review. *Semin Arthritis Rheum*. 2012 Aug;42(1):1–8.
134. Jacobsson LTH, Turesson C, Gülfe A, Kapetanovic MC, Petersson IF, Saxne T, et al. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2005 Jul;32(7):1213–8.
135. Zanolli L, Rastelli S, Inserra G, Lentini P, Valvo E, Calcagno E, et al. Increased arterial stiffness in inflammatory bowel diseases is dependent upon inflammation and reduced by immunomodulatory drugs. *Atherosclerosis*. 2014 Jun;234(2):346–51.
136. Thapa SD, Hadid H, Schairer J, Imam W, Jafri S-M. Effect of Inflammatory Bowel Disease-Related Characteristics and Treatment Interventions on Cardiovascular Disease Incidence. *Am J Med Sci*. 2015 Sep;350(3):175–80.
137. Ranson N, Veldhuis M, Mitchell B, Fanning S, Cook AL, Kunde D, et al. NLRP3-Dependent and -Independent Processing of Interleukin (IL)-1 β in Active Ulcerative Colitis. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 23;20(1).
138. Bhaskar V, Yin J, Mirza AM, Phan D, Vanegas S, Issafras H, et al. Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011 Jun;216(2):313–20.
139. Ng SC, Benjamin JL, McCarthy NE, Hedin CRH, Koutsoumpas A, Plamondon S, et al. Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota, and disease activity in Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Oct;17(10):2027–37.
140. Chen Y, Wang X, Mai J, Zhao X, Liang Y, Gu M, et al. C-reactive protein promotes vascular endothelial dysfunction partly via activating adipose tissue inflammation in hyperlipidemic rabbits. *Int J Cardiol*. 2013 Oct 3;168(3):2397–403.
141. Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS One*. 2009;4(6):e6073.
142. Christ A, Günther P, Lauterbach MAR, Duewell P, Biswas D, Pelka K, et al. Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell*. 2018 11;172(1–2):162–175.e14.
143. Rizzello F, Spisni E, Giovanardi E, Imbesi V, Salice M, Alvisi P, et al. Implications of the Westernized Diet in the Onset and Progression of IBD. *Nutrients*. 2019 May 8;11(5).
144. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol Am Heart Assoc*. 1994 Jan;14(1):141–7.
145. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992 Oct 16;258(5081):468–71.
146. Maconi G, Greco S, Duca P, Ardizzone S, Massari A, Cassinotti A, et al. Prevalence and clinical significance of sonographic evidence of mesenteric fat alterations in Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 Nov;14(11):1555–61.
147. Desreumaux P, Ernst O, Geboes K, Gambiez L, Berrebi D, Müller-Alouf H, et al. Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn’s disease. *Gastroenterology*. 1999 Jul;117(1):73–81.
148. Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Penicaud L, et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):9850–5.
149. Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;19(4):547–66.
150. Fitzgibbons TP, Kogan S, Aouadi M, Hendricks GM, Straubhaar J, Czech MP. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Oct;301(4):H1425–1437.

151. Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):366–76.
152. Takaoka M, Suzuki H, Shioda S, Sekikawa K, Saito Y, Nagai R, et al. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Aug;30(8):1576–82.
153. Okamoto E, Couse T, De Leon H, Vinten-Johansen J, Goodman RB, Scott NA, et al. Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Circulation*. 2001 Oct 30;104(18):2228–35.
154. Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res*. 2009 Feb 27;104(4):541–9.
155. Öhman MK, Luo W, Wang H, Guo C, Abdallah W, Russo HM, et al. Perivascular visceral adipose tissue induces atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*. 2011 Nov;219(1):33–9.
156. Ma Z, Choudhury A, Kang S-A, Monestier M, Cohen PL, Eisenberg RA. Accelerated atherosclerosis in ApoE deficient lupus mouse models. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2008 May;127(2):168–75.
157. Sappati Biyyani RSR, Putka BS, Mullen KD. Dyslipidemia and lipoprotein profiles in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Lipidol*. 2010 Dec;4(6):478–82.
158. Liu Q, Fan J, Bai J, Peng L, Zhang T, Deng L, et al. IL-34 promotes foam cell formation by enhancing CD36 expression through p38 MAPK pathway. *Sci Rep*. 2018 26;8(1):17347.
159. Stanic AK, Stein CM, Morgan AC, Fazio S, Linton MF, Wakeland EK, et al. Immune dysregulation accelerates atherosclerosis and modulates plaque composition in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 2;103(18):7018–23.
160. Hultgårdh-Nilsson A, Borén J, Chakravarti S. The small leucine-rich repeat proteoglycans in tissue repair and atherosclerosis. *J Intern Med*. 2015 Nov;278(5):447–61.
161. Yamamoto C, Urano A, Fujiwara Y, Kaji T. Adiponectin as an inducer of decorin synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Life Sci*. 2008 Sep 12;83(11–12):447–52.
162. Olin-Lewis K, Krauss RM, La Belle M, Blanche PJ, Barrett PHR, Wight TN, et al. ApoC-III content of apoB-containing lipoproteins is associated with binding to the vascular proteoglycan biglycan. *J Lipid Res*. 2002 Nov;43(11):1969–77.
163. Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan in inflammatory bowel disease: Cross-linking inflammation and coagulation. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2019 May;78–79:314–23.

Danke,

liebe Maria, dass Du diesen Weg mit mir gegangen bist. Dein Zuspruch hat mich beflügelt.

Vielmals bedanken möchte ich mich weiterhin bei Nina Pasch und Dr. Yanina Ostendorf für die stets kollegiale und herzliche Zusammenarbeit.