

**Untersuchungen an murinen Atherosklerose-Modellen  
zum Einfluss von Statinen und Cyclooxygenase-  
Hemmstoffen auf die vaskuläre Extrazellulärmatrix**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf



vorgelegt von

Andrea Marzoll  
aus Essen

Düsseldorf

2007

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. JW. Fischer

Koreferent: Prof. Dr. P. Proksch

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Entstehung und Progression der Atherosklerose.....	2
1.2	ApoE <sup>-/-</sup> -Mäuse als <i>in vivo</i> -Atherosklerose-Modell .....	3
1.3	Stabilität von atherosklerotischen Läsionen.....	4
1.4	Extrazelluläre Matrix von atherosklerotischen Läsionen.....	6
1.5	Statine.....	8
1.6	COX und Prostaglandine in der Atherosklerose .....	12
1.7	Fragestellung .....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1	Puffer und Lösungen .....	19
2.2	Farbstoffe und Farbstofflösungen .....	22
2.3	Substanzen und Arzneistoffe.....	24
2.4	Antikörper .....	26
2.5	Geräte .....	28
2.6	Zellkultur.....	29
2.7	Tiere und Futter.....	29
2.7.1	Futtermischungen .....	29
2.8	Studiendesign .....	30
2.8.1	Rosuvastatin.....	30
2.8.2	COX-Inhibitoren.....	30
2.8.3	Neointimahyperplasie und COX-Inhibitoren .....	31
2.9	Humane atherosklerotische Plaques aus Karotis-Endarterektomien.....	32
2.10	Operativer Eingriff zur Erzeugung der Neointimahyperplasie an Mäusen.....	32
2.11	Präparation der Mäuse zur weiteren Analyse.....	32
2.11.1	Herz und Aorta .....	32
2.11.2	<i>en face</i> Präparation der Aorta .....	33
2.11.3	<i>Arteria brachiocephalica</i> .....	33
2.11.4	<i>Arteria carotis</i> nach Ligatur .....	33
2.12	Plasmapräparation .....	33
2.13	Lipidanalyse .....	34
2.14	Bestimmung von Prostaglandin- und Thromboxanmetaboliten im Mäuseurin .....	34
2.14.1	Gewinnung von Urin .....	34
2.14.2	Analyse der Metaboliten von PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> und Thromboxan .....	34
2.15	Isolierung und Analyse von RNA aus Aorten und hSMC .....	34
2.15.1	Isolierung der RNA.....	34

2.15.2	Quantifizierung der RNA .....	35
2.16	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und quantitative <i>real-time</i> -RT-PCR (qRT-PCR) .....	35
2.16.1	Primer .....	35
2.16.2	Durchführung der RT-PCR und qRT-PCR.....	36
2.16.3	Densitometrische Auswertung.....	36
2.17	Isolierung und Analyse von Proteoglykanen aus Aorten .....	36
2.17.1	Isolierung der Proteoglykane.....	36
2.17.2	Enzymatischer Abbau der Proteoglykan-Seitenketten von Biglycan und Decorin .....	37
2.17.3	Auftrennung der Proteine mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	37
2.17.4	Proteintransfer.....	37
2.17.5	Hybridisierung und Detektion der Proteine.....	37
2.17.6	Entfernung von Primär- und Sekundärantikörpern von Nitrozellulosemembranen ( <i>Strippen</i> ).....	38
2.18	Histologische Analyse der atherosklerotischen Plaques .....	38
2.18.1	Paraffinschnitte .....	38
2.18.2	Gefrierschnitte .....	39
2.18.3	<i>en face</i> Lipidfärbung.....	39
2.18.4	Öl-Rot-O-Färbung von Gefrierschnitten .....	39
2.18.5	Siriusrot-Färbung.....	39
2.18.6	Kalziumfärbung nach von Kossa.....	39
2.18.7	Eisennachweis bei Einblutungen in atherosklerotische Plaques mittels Berliner Blau.....	40
2.18.8	Pentachromfärbung nach Movat.....	40
2.18.9	Orcein-Färbung für elastische Fasern.....	40
2.18.10	Immunhistochemische und affinitätshistochemische Färbungen .....	40
2.18.11	<i>In-situ</i> -Zymographie im Aortenursprung .....	41
2.19	Auswertung von histologischem Material.....	41
2.19.1	Mikroskop.....	41
2.19.2	Quantitative Auswertung mittels <i>ImageJ</i> .....	42
2.19.3	Histologische Analyse der Neointimahyperplasie.....	42
2.20	Statistik.....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Rosuvastatin-Behandlung von ApoE- <i>knockout</i> -Mäusen .....	45
3.1.1	Körpergewicht und Lipidgehalt des Plasmas .....	46
3.1.2	Quantifizierung der Atherosklerose und des Lipidgehaltes.....	47
3.1.3	Morphometrie der atherosklerotischen Läsionen im Aortenursprung.....	49

3.1.4	Matrix-Analyse: Einfluss von Rosuvastatin auf Kollagen in den atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs .....	51
3.1.5	Einfluss von Rosuvastatin auf die Expression der kleinen leucinreichen Proteoglykane Biglycan und Decorin .....	56
3.1.6	Einfluss von Rosuvastatin auf die Hyaluronsäure-Akkumulation in atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs .....	60
3.1.7	Einfluss von Rosuvastatin auf die COX-2-Expression im Aortenursprung .....	63
3.1.8	Einfluss von Rosuvastatin auf Versican und Perlecan .....	66
3.1.9	Analyse der Zellen in den atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs	68
3.1.10	Kalzifizierung der atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs .....	70
3.1.11	Einblutungen in atherosklerotische Läsionen des Aortenursprungs.....	71
3.1.12	Einfluss von Rosuvastatin auf vaskuläre atherosklerotische Läsionen der <i>Arteria brachiocephalica</i> .....	72
3.2	<i>In vitro</i> Versuche an hSMC mit Rosuvastatin und Ascorbinsäure.....	74
3.3	Vergleich mit humanen atherosklerotischen Läsionen Statin-behandelter Patienten .....	76
3.4	Einfluss von COX-Inhibitoren auf die murine Atherosklerose.....	78
3.4.1	Genexpression der Hyaluronsäure-Synthasen in Aorten COX-Inhibitor-behandelter ApoE <sup>-/-</sup> -Mäuse.....	80
3.5	Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Atherosklerose und Neointimahyperplasie an einem kombinierten Atherosklerose-Maus-Modell .....	82
3.5.1	Veränderung der Größe der atherosklerotischen Läsionen durch die Behandlung mit Rofecoxib und Indometacin .....	83
3.5.2	Thromboseneigung .....	85
3.5.3	Einfluss von COX-Inhibitoren auf die COX-2-Expression in der Neointimahyperplasie .....	87
3.5.4	Einfluss von COX-Inhibitoren auf den Hyaluronsäuregehalt in der Neointimahyperplasie .....	88
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>91</b>
4.1	Wirkungen von Rosuvastatin an einem murinen Atherosklerose-Modell .....	91
4.1.1	Auswirkungen auf Lipidparameter .....	91
4.2	Auswirkungen von Rosuvastatin auf die Größe der atherosklerotischen Läsionen.	92
4.3	Auswirkungen von Rosuvastatin auf die Zusammensetzung der EZM .....	93
4.3.1	Kollagen - Hinweis auf mögliche Stabilisierung der atherosklerotischen Läsionen.....	93
4.3.2	Proteoglykane .....	95
4.3.3	Versuche an humanen glatten Muskelzellen mit Rosuvastatin .....	99
4.3.4	Kollagenunabhängige Hinweise auf eine Stabilisierung der atherosklerotischen Läsionen durch Rosuvastatin .....	100
4.3.5	Einfluss von Rosuvastatin auf die Hyaluronsäure-Akkumulation.....	101

4.3.6	Rosuvastatin-Behandlung reduziert COX-2-Expression in atherosklerotischen Läsionen.....	102
4.4	Wirkung von Statinen auf die extrazelluläre Matrix von humanen atherosklerotischen Läsionen .....	104
4.5	COX-Inhibitor vermittelte Hemmung der HAS1-Transkription <i>in vivo</i> .....	107
4.6	Auswirkungen der COX-Hemmung auf die Hyaluronsäure-Akkumulation der Neointimahyperplasie von ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	108
4.7	Schlussfolgerungen und mögliche therapeutische Konsequenzen.....	112
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>113</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>127</b>
7.1	Tagungen und Kongresse .....	127
7.2	Veröffentlichungen in Fachzeitschriften.....	128
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>129</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>130</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>131</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ApoE<sup>-/-</sup></b>	Apolipoprotein E- <i>knockout</i>
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>cDNA</b>	<i>complementary</i> DNA
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>DEAE</b>	Diethylaminoethyl
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DEPC</b>	Diethyl-Pyrocarbonat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>FCS</b>	Fötale Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>G-Protein</b>	Guanylnukleotid-bindendes Protein
<b>HA</b>	Hyaluronsäure
<b>HABP</b>	Hyaluronsäure-Bindeprotein
<b>HAS</b>	Hyaluronsäure-Synthase
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
<b>hSMC</b>	humane glatte Muskelzellen ( <i>human smooth muscle cells</i> )
<b>HYAL</b>	Hyaluronidase
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>Indo</b>	Indometacin
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LDL</b>	<i>low density lipoprotein</i>
<b>LDLR<sup>-/-</sup></b>	<i>low density lipoprotein</i> -Rezeptor- <i>knockout</i>
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase
<b>mRNA</b>	<i>messenger</i> RNA
<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PGE-M</b>	Prostaglandin E-Metabolit
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandin I <sub>2</sub>

<b>PGI-M</b>	Prostaglandin I-Metabolit
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>Rofe</b>	Rofecoxib
<b>Rosu</b>	Rosuvastatin
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<b>qRT-PCR</b>	quantitative <i>Real-time</i> -PCR
<b>s.c.</b>	subcutan
<b>SDS</b>	Natrium-Dodecylsulfat
<b>SLRP</b>	<i>small leucine rich repeat proteoglycan</i>
<b>SMC</b>	glatte Muskelzellen ( <i>smooth muscle cells</i> )
<b>TIMP</b>	<i>Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases</i>
<b>Tris</b>	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
<b>Tween 20</b>	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Thromboxan-A <sub>2</sub>
<b>TX-M</b>	Thromboxan-Metabolit
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VLDL</b>	<i>very low density lipoprotein</i>

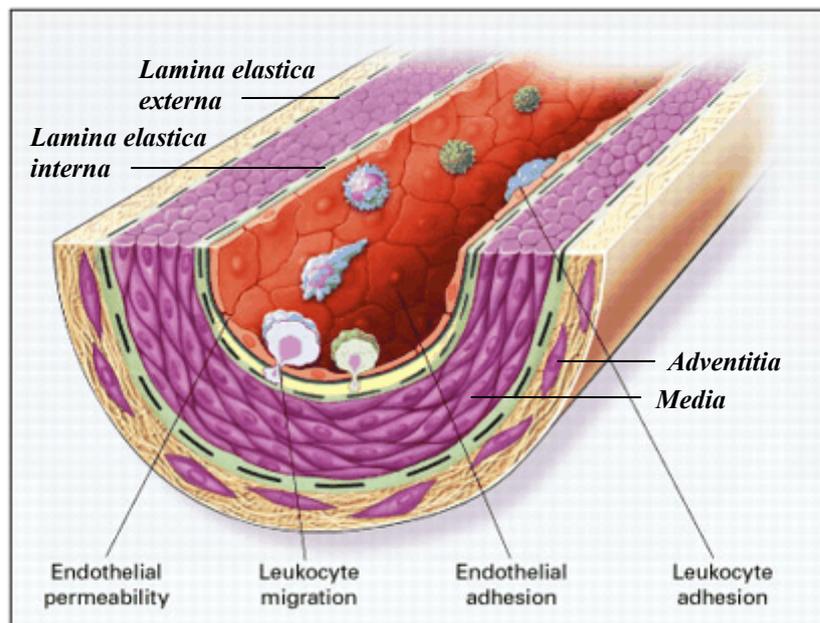
# 1 Einleitung

Die Atherosklerose und ihre Folgeerscheinungen stellen eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Nationen dar. Die Arbeiten von Ross *et al.*<sup>1</sup> führten zu der Erkenntnis, dass die Atherosklerose eine chronische Entzündung der Gefäßwand ist. Auslöser für diese entzündliche Reaktion sind Interaktionen zwischen oxidativ veränderten Lipoproteinen mit Makrophagen, T-Zellen und anderen im gesunden Gefäß vorkommenden zellulären Bestandteilen wie z.B. glatten Muskelzellen (SMC). Letztendlich führt dieser Prozess zur Ausbildung von komplexen atherosklerotischen Läsionen, die unter bestimmten Bedingungen einreißen (Ruptur) und zur Bildung eines Thrombus führen<sup>2</sup>. Ein Thrombus kann zum Verschluss eines gesamten Gefäßes führen. Dies kann z.B. einen akuten Myokardinfarkt oder Schlaganfall auslösen. Risikofaktoren, welche die Atherogenese begünstigen, sind ein gestörter Lipidstoffwechsel, wie z.B. bei der Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, freie Radikale durch Rauchen sowie *Diabetes mellitus*. Mit diesen Risikofaktoren geht die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion<sup>3</sup> einher. Stickstoffmonoxid (NO), ein zur Relaxation des Gefäßes führender Faktor, wird vermindert in Endothelzellen gebildet. Die verringerte Bildung stellt ein entscheidendes Merkmal dieser Dysfunktion dar. Das Endothel kann bei einer Dysfunktion auch andere wichtige Funktionen wie die Bildung von antithrombotisch wirksamen Prostaglandinen (PGI<sub>2</sub>) sowie die Kontrolle der Monozyteninvasion nicht mehr ausüben. Die medikamentöse Behandlung der Risikofaktoren stellt eine wichtige Maßnahme zur Hemmung des Fortschreitens der Atherosklerose dar und reduziert dadurch Folgeerkrankungen und resultierende klinische Komplikationen. Von einigen Arzneistoffen ist bekannt, dass sie das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse senken. So wird das Thromboserisiko schon seit Jahren effektiv durch Hemmung der Thrombozytenaggregation reduziert. Die Verringerung des zirkulierenden *low density lipoprotein* (LDL) durch Statine vermindert die Progression einer bestehenden Atherosklerose<sup>4</sup>. Neben der Hemmung der direkten über Cholesterol vermittelten Effekte, zeigt diese Arzneistoffklasse weiterhin verschiedene pleiotrope Effekte, die sich positiv auf die Reduktion des kardiovaskulären Risikos auswirken<sup>5</sup>. Im Gegensatz dazu sind bei einer anderen Gruppe von Arzneistoffen, den selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren, vermehrt thromboembolische Ereignisse aufgetreten<sup>6</sup>. Dies führte zur Rücknahme der Zulassung von Rofecoxib und Valdecoxib. Celecoxib, Parecoxib und Etoricoxib sind jedoch weiterhin auf dem Markt. Zusätzlich wurde mit Lumiracoxib ein neuer Vertreter dieser Substanzgruppe zugelassen. Allerdings ruht seit November 2007 die Zulassung von Lumiracoxib aufgrund des Verdachts auf hepatotoxische Wirkungen. Daher ist die detaillierte Analyse der Wirkungen der COX-2-Inhibition auf die Zusammensetzung von atherosklerotischen von zentraler Bedeutung, um mögliche Effekte dieser Substanzklasse auf die Stabilität von atherosklerotischen Läsionen zu erfassen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von

Rosuvastatin, einem neuen Vertreter aus der Gruppe der Statine und Rofecoxib, einem selektiven Inhibitor der Cyclooxygenase-2 (COX-2) auf die extrazelluläre Matrix (EZM) von atherosklerotischen Läsionen in der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus untersucht.

## 1.1 Entstehung und Progression der Atherosklerose

Ein gesundes arterielles Gefäß besteht aus drei verschiedenen Schichten. Eine Schicht aus SMC bildet die Media, an die zur luminalen Seite das Endothel angrenzt. Zur äußeren Seite hin haftet der Media fibroblastenhaltiges Bindegewebe an. Dieses als Adventitia bezeichnete Gewebe wird von der Media durch eine Reihe elastischer Fasern, der *Lamina elastica externa* abgegrenzt. Zum Endothel hin ist die Media durch eine vergleichbare Struktur, die *Lamina elastica interna* abgegrenzt. Das Endothel selber stellt die Grenze zwischen der Gefäßwand und dem Blut dar (s. Abb. 1). Verletzungen des Endothels führen zu einem direkten Kontakt zwischen thrombogenen Bestandteilen des Blutes und der Gefäßwand. Derartige Verletzungen entstehen einerseits durch mechanische Belastung, z.B. an Stellen, wo die Strömung des Blutes ein turbulentes Fließverhalten annimmt oder durch exogene Einflüsse wie bei der Eröffnung eines bereits verschlossenen Gefäßes durch einen Ballon-Katheter (perkutaner transluminaler Koronarangioplastie, PTCA)<sup>7</sup>. Die endotheliale Dysfunktion oder andere Endothelschäden initiieren die Atherosklerose. Dieser Vorgang wird als *response-to-injury*-Theorie bezeichnet<sup>1</sup>.



**Abbildung 1:** Aufbau eines vaskulären Gefäßes zum Beginn der Atherogenese. Bearbeitetes Original aus Ross et al<sup>1</sup>.

Auf die Schädigung reagiert das Endothel mit einer verstärkten Permeabilität und Freisetzung von Wachstumsfaktoren (PDGF = *platelet derived growth factor*, TGF- $\beta$  = *transforming growth factor*). Auf diese Weise kommt es zum Anhaften von T-Lymphozyten und Monozyten, die zu Makrophagen differenzieren und Zytokine (IL-1 = Interleukin-1, TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) freisetzen<sup>8</sup>. Dieses erste Stadium einer atherosklerotischen Läsion wird als *fatty streak* bezeichnet. Makrophagen nehmen oxidiertes LDL auf, wodurch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen weiter verstärkt wird. Diese wiederum verändern den Phänotyp der in der Media lokalisierten SMC vom kontraktilen zum sekretorischen Typ. Diese entdifferenzierten SMC sind zur Migration und Proliferation sowie zur Synthese von EZM in der Lage. Es kommt zu einem Umbau der atherosklerotischen Läsion hin zu einem organisierten komplexen Netzwerk, bestehend aus einer fibrotischen Kappe aus EZM und SMC, welche die atherosklerotischen Läsion bedeckt und einem fettreichen, nekrotischen Kern<sup>9</sup>.

## 1.2 ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse als *in vivo*-Atherosklerose-Modell

Bis Anfang der 90-er Jahre wurde die Atherosklerose hauptsächlich in Primaten oder in Kaninchen bzw. LDL-Rezeptor defizienten Kaninchen untersucht. Mit einem *knockout* des Gens für Apolipoprotein E (ApoE) wurde 1992 ein Atherosklerose-Modell in Mäusen entwickelt<sup>10</sup>. ApoE wird hauptsächlich in der Leber gebildet. Es ist ein Bestandteil von Lipoproteinpartikeln. ApoE ist für die Lipoprotein-Rezeptor-vermittelte

Endozytose von *very low density lipoprotein* (VLDL) und Chylomikron-remnants verantwortlich. Mäuse, die durch das Fehlen von ApoE gekennzeichnet sind, zeigen eine verschlechterte *Clearance* für Lipoproteine und erhöhte Spiegel von VLDL und Chylomikronen. Dies führt zu einer spontanen Bildung von atherosklerotischen Läsionen. Da diese Mäuse keine erhöhten LDL-Plasmakonzentrationen zeigen, reagieren sie auf eine Behandlung mit Statinen auch nicht mit einer Senkung des LDL-Cholesterolspiegels. ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen, u.a. durch die Atherosklerose bedingt, eine verkürzte Lebenserwartung von ca. einem Jahr. Für die mechanische Schädigung eines Gefäßes, wie sie beim Menschen durch die Öffnung einer durch Stenose oder Thrombose verschlossenen Koronararterie mittels perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) entsteht, stehen ebenfalls Nagermodelle zur Verfügung. Durch Einführung eines Ballonkatheters in ein arterielles Gefäß kann in Ratten ein Endothelschaden erzeugt werden, wie von Clowes *et al.*<sup>11</sup> beschrieben wurde. In der Maus hat sich das Anlegen einer Ligatur an der *Carotis communis* als Modell mit reproduzierbaren Ergebnissen zur Erzeugung einer konzentrischen Neointima durch Endothelschaden erwiesen<sup>12</sup>. Eine klinisch bedeutende Komplikation stellt die Erosion oder Ruptur einer atherosklerotischen Läsion und der nachfolgende thrombotische Verschluss eines Gefäßes dar. Nager zeigen eine natürliche Resistenz gegenüber Plaquerupturen und thromboembolischen Komplikationen. In nur einem Modell konnte bisher eine spontane Ruptur von atherosklerotischen Läsionen in der Arteria brachiocephalica an 60 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden<sup>13</sup>. Rupturen atherosklerotischer Läsionen sind ansonsten nur bei Primaten zu finden.

### 1.3 Stabilität von atherosklerotischen Läsionen

Atherosklerotische Läsionen bestehen nicht nur aus Cholesterolem und den genannten zellulären Komponenten. Eine wichtige Rolle im Umbau zu komplexen atherosklerotischen Läsionen und der Progression kommt dabei der EZM und ihren einzelnen Bestandteilen zu. Die EZM besteht aus verschiedenen Proteoglykanen, Glykoproteinen und Kollagen. Kollagen wird durch Zusammenlagerung von drei  $\alpha$ -Ketten Tropokollagen zu einer Tripelhelix gebildet. Verbinden sich mehrere Tripelhelices entlang der Lateralachse, so entsteht eine monomere Fibrille. Diese kann sich weiter mit mehreren Fibrillen zu einer Faser zusammenlagern. Zur Ausbildung der Tripelhelixstruktur sind die Aminosäuren Hydroxylysin und -prolin im Tropokollagen erforderlich, welche durch Hydroxylasen gebildet werden. Ascorbinsäure und Sauerstoff dienen als Co-Faktoren für die Hydroxylierungsreaktion. Sie bilden mit den Hydroxylasen einen Komplex. Bei der Hydroxylierung wird nur ein Sauerstoffatom benötigt. Das zweite Atom aus dem molekularen Sauerstoff wird auf Ascorbinsäure übertragen, welche dadurch zu Dehydroascorbinsäure und Wasser oxidiert wird. Ascorbinsäure ist für die korrekte Ausbildung von Kollagenfasern essentiell. Weiter beeinflussen Proteoglykane die Fibrillogenese von Kollagen. Der Kollagengehalt einer atherosklerotischen Läsion wird nicht nur durch die Synthese sondern auch durch den

Abbau beeinflusst. So spalten die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 (Matrixmetalloproteinase-2 und -9) Kollagen vom Typ I. Kollagen I zeichnet sich durch extreme Zugfestigkeit aus. Es verleiht der fibrotischen Kappe und der gesamten Plaque Stabilität gegenüber mechanischer Belastung. Die Instabilität einer dünnen fibrotischen Kappe kann zu Rupturen und somit zur Ausbildung eines Thrombus und seinen Komplikationen führen.

In der Klinik werden zwei Phänotypen von Plaques beschrieben: die symptomatische und die asymptomatische Plaque. Die symptomatische Plaque ist durch das Vorliegen einer Ruptur und eines kardiovaskulären Ereignisses gekennzeichnet. Dies ist hauptsächlich die Folge von mangelnder Stabilität. Gegenüber asymptomatischen Plaques zeichnen sich diese durch eine dünne fibrotische Kappe und einen verminderten Kollagengehalt aus (Cipollone *et al.*<sup>14</sup>). Besonders in den Schulterregionen besitzen symptomatische Plaques einen hohen Gehalt an Makrophagen und MMP. In diesen Regionen sind auch weitere Entzündungsmerkmale wie die Expression von COX-2 besonders stark ausgeprägt. Ein weiteres Merkmal, welches symptomatische, instabile von asymptomatischen, stabilen atherosklerotischen Läsionen unterscheidet, ist die Expression von TGF- $\beta$ . Cipollone *et al.*<sup>14</sup> zeigten, dass TGF- $\beta$  ein Parameter ist, der auf die Stabilität von atherosklerotischen Läsionen schließen lässt.

Ein Parameter, der zur Instabilität von atherosklerotischen Läsionen führt, ist die mit dem Alter der atherosklerotischen Läsion ansteigende Kalzifizierung. Auslöser der Kalzifizierung sind inflammatorische Zellen und Zytokine. In der Nähe des nekrotischen Kerns lagert sich Calcium-Hydroxylapatit ab. Physiologisch betrachtet, könnte dies als Barriere für eine Ausbreitung inflammatorischer Stimuli in Bereichen chronischer Entzündung dienen<sup>15</sup>. Abedin *et al.*<sup>15</sup> beschreiben, dass an der Schnittstelle eines kalzifizierten Bereiches zu weichem, nicht kalzifiziertem Gewebe ein Areal mechanischer Instabilität entsteht. Dies kann die Ruptur der Plaque begünstigen.

Rupturen müssen nicht zwangsläufig zu klinischen Ereignissen führen. Oft verläuft das Einreißen der fibrotischen Kappe „stumm“, was zu Plaqueeinblutungen führt. Der Schaden an der fibrotischen Kappe wird durch die Auflagerung einer neuen Intima über die defekte Kappe kompensiert. Derartige Plaques zeigen eine Schicht von glatten Muskelzellen innerhalb der atherosklerotischen Läsion, die als versteckte fibrotische Kappe bezeichnet wird. Durch die Plaqueeinblutungen ist vermehrt Eisen aus Hämoglobin in diesen Plaques nachweisbar, wie Kolodgie *et al.*<sup>16</sup> zeigten.

Die Progression zu instabilen atherosklerotischen Läsionen und die klinischen Folgen von Rupturen wie Myokardinfarkte und Apoplex bedingen das große Interesse an pharmakologischen Maßnahmen zur Stabilisierung von atherosklerotischen Läsionen. Die Untersuchung von Rupturen atherosklerotischer Läsionen ist durch das Fehlen repräsentativer Tiermodelle erschwert.

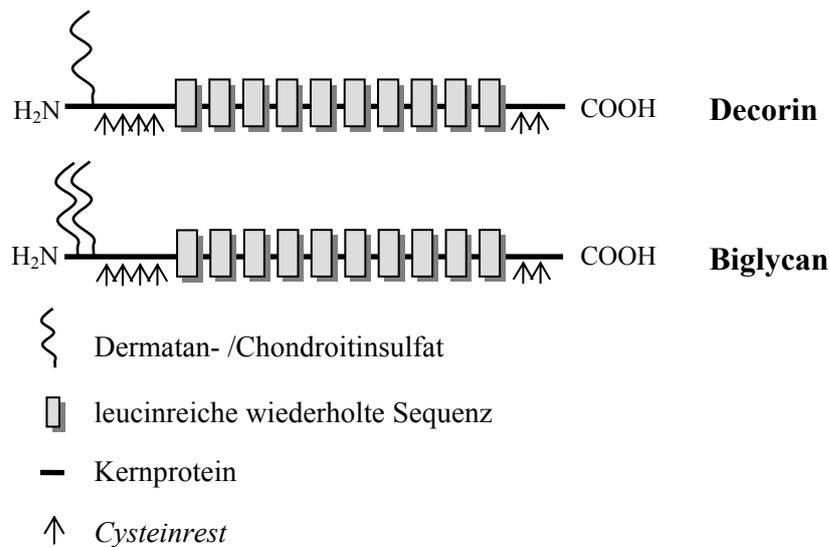
## 1.4 Extrazelluläre Matrix von atherosklerotischen Läsionen

Die EZM stellt das Grundgerüst für die in ihr befindlichen Zellen dar. Die EZM besteht aus zwei verschiedenen Fasertypen, den fibrillären Fasern, welche von Kollagen gebildet werden und den elastischen Fasern des Elastins. Mit den fibrillären Komponenten der Matrix sind Proteoglykane assoziiert. Die EZM ist jedoch nicht nur das Gerüst für die in ihr befindlichen Zellen. Die verschiedenen Bestandteile beeinflussen ferner die Funktion bzw. den Phänotyp der Zellen, so sind sie essentiell für Migration und Proliferation<sup>17,18</sup>. In der Atherosklerose sezernieren Endothelzellen und SMC Matrixmoleküle in den interzellulären Raum der Plaque. SMC kommt dabei die quantitativ bedeutendste Rolle zu, wodurch diese einen besonderen Stellenwert für *in vitro* Untersuchungen erhalten.

Die Bestandteile der EZM lassen sich außerdem nach strukturellen Merkmalen unterscheiden. Proteoglykane sind glykosylierte Proteine. Sie bestehen aus einem Kernprotein (*core-protein*) und sind kovalent an sulfatierte Glykosaminoglykane (GAG) gebunden. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen den einzelnen Proteoglykanen besteht in ihren gebundenen GAG-Ketten. Sie werden in Chondroitinsulfat-Proteoglykane, Dermatansulfat-Proteoglykane und Heparansulfat-Proteoglykane unterteilt. GAG-Ketten sind sulfatierte Polysaccharide, die aus Disaccharideinheiten bestehen. Die Disaccharide bestehen wiederum aus Hexuronsäure und einem Aminozucker. Ein weiteres bedeutendes Glykosaminoglykan der EZM ist Hyaluronsäure (HA). Im Gegensatz zu den anderen GAG ist HA nicht an ein Kernprotein gebunden.

Die wichtigsten in der Atherosklerose von humanen Plaques beschriebenen Proteoglykane sind Versican, Perlecan, Biglycan und Decorin<sup>19</sup>.

Biglycan und Decorin gehören zu einer Untergruppe der kleinen leucinreichen Proteoglykane (SLRP). Diese Gruppe besitzt in ihrem Kernprotein wiederholt, leucinreiche Sequenzen und zeigt dadurch eine große Homologie der Kernproteine. Biglycan und Decorin besitzen 10 leucinreiche Sequenzen, die jeweils 14 Aminosäuren lang sind; ihre Kernproteine sind annähernd gleich groß (~ 40 kDa). Am N-terminalen Ende besitzen Decorin und Biglycan vier und in der C-terminalen Region zwei Cysteinreste, die an diesen Stellen Disulfidbrücken bilden können. Die Aminosäuresequenz des Kernproteins von bovinem Biglycan ist zu 55 % identisch mit der Sequenz des Kernproteins von bovinem Decorin. Unterschiede zeigen sich hauptsächlich in der N-terminalen Region und den Glykosaminoglykan-Seitenketten<sup>20</sup>. Decorin enthält eine GAG-Seitenkette und Biglycan zwei, die jeweils an Serinreste am N-Terminus des Kernproteins gebunden sind. Über die GAG-Ketten werden Funktionen wie z.B. die Interaktion mit Kollagen vermittelt. Die Interaktion von Biglycan und Decorin mit Kollagen wird zusätzlich durch ihren Proteinanteil bestimmt. Beide Kernproteine besitzen eine spezifische Bindungsstelle für Kollagen Typ I und III.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung von Decorin und Biglycan.

Von Decorin ist bekannt, dass es die Fibrillogenese von Kollagen beeinflusst. Decorin bindet an Kollagenfibrillen und verzögert ihre laterale Anordnung<sup>21</sup>. Dadurch entstehen im Querschnitt kleinere, aber gleichmäßige Fasern. Decorin übt demnach eine entscheidende Kontrollfunktion auf die Anordnung der Fibrillen aus, die für die mechanische Stabilität von Kollagen erforderlich ist. Weiterhin ist von Decorin bekannt, dass es eine Neointimahyperplasie im Tiermodell hemmt<sup>22</sup>.

Biglycan ist das zweite SLRP, welches im Zusammenhang mit Kollagen in atherosklerotischen Läsionen zu erwähnen ist. Die Biglycan-*knockout*-Maus zeigt eine Störung in der Anordnung der Kollagenfibrillen durch eine gestörte Ossifikation der Knochen<sup>23</sup>. Sowohl Biglycan als auch Decorin regulieren die Proliferation von SMC *in vitro*<sup>24</sup>, so dass die Vermutung nahe liegt, dass sie einen Einfluss auf die Atherogenese und Progression von atherosklerotischen Plaques haben.

Die Expression des Proteoglykans Versican wird bald nach Schädigung des Endothels durch zahlreiche Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren heraufreguliert. Versican wird hauptsächlich von SMC synthetisiert. Versican bindet ferner an Wachstumsfaktoren und verschiedene Enzyme, aber auch an Lipoproteine und HA. Zusammen mit HA führt es zur Ausbildung einer ausgedehnten, viskoelastischen perizellulären Matrix, welche für die Proliferation und Migration von SMC entscheidend sind. Versican ist nicht nur im frühen Stadium der atherosklerotischen Läsion von Bedeutung. Durch die Bindung an Lipoproteine, das Auftreten in der Nähe des nekrotischen Kerns von fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen sowie die Lokalisation im Grenzbereich zwischen atherosklerotischer Plaque und Thrombus, wird ein Einfluss auf die Retention von Lipiden, die Entzündung und Thrombose vermutet<sup>25</sup>.

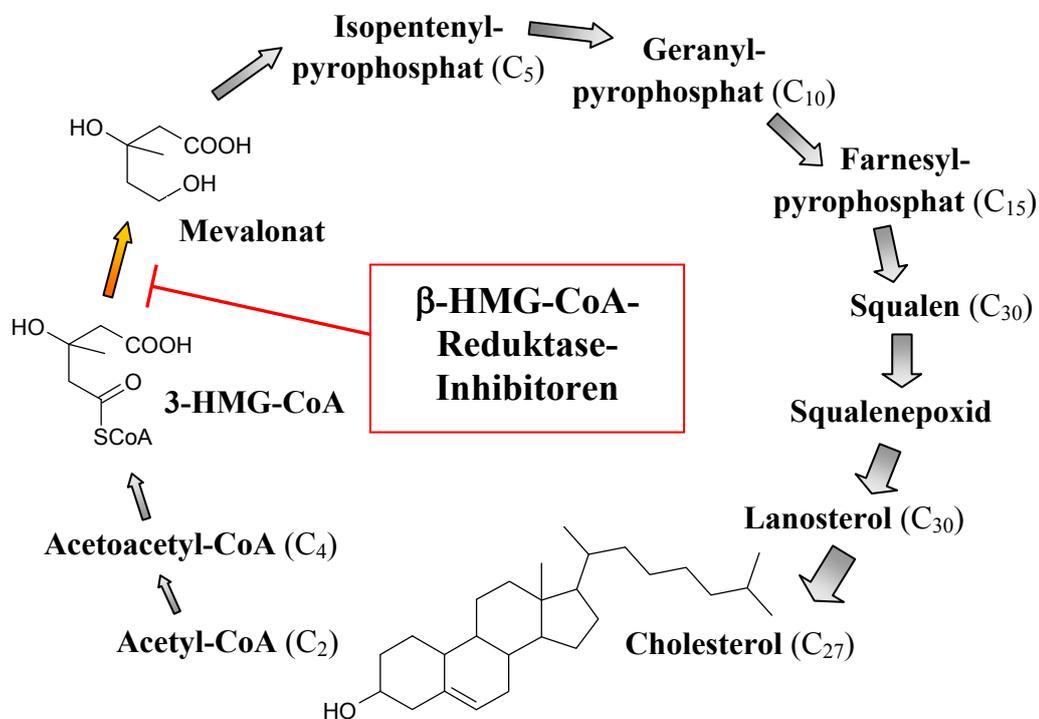
Perlecan führt - dem Versican ähnlich - ebenfalls zu einer starken Ausdehnung der EZM. An dieser Stelle ist es das quantitativ bedeutendste Heparansulfat-Proteoglykan<sup>26</sup>. Perlecan wird durch atherogene Moleküle negativ reguliert und besitzt selber anti-atherosklerotische Wirkungen wie z.B. die Hemmung der Proliferation von SMC<sup>27</sup>. In humanen atherosklerotischen Plaques tritt es weniger stark auf als in murinen atherosklerotischen Plaques<sup>28</sup>.

HA ist ein weiterer Bestandteil der EZM, welcher sowohl in primären als auch in restenotischen Läsionen vorzufinden ist. Das hochmolekulare Polysaccharid wird aus alternierenden Einheiten  $\beta$ -1,3-verknüpfter D-Glukuronsäure und  $\beta$ -1,4-verknüpftem N-Acetylglukosamin gebildet. Die Synthese erfolgt durch drei membranständige Enzyme, die HA-Synthasen 1-3 (HAS1-3)<sup>29</sup>, wobei HAS3 zusätzlich in einer zweiten Variante (HAS3v2) vorkommt. Die Größe der vorliegenden HA wird sowohl durch ihre einzelnen Synthesen beeinflusst als auch durch Hyaluronidasen, welche HA enzymatisch spalten und abbauen. Durch HAS1 bis 3 werden hochmolekulare HA-Einheiten mit einer Größe von  $2 \times 10^6$  Da (HAS1/2) und  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  Da (HAS3) synthetisiert. Die abbauenden Enzyme HYAL1 und 2 spalten hochmolekulare HA-Ketten in niedermolekulare von 100 (HYAL2)<sup>30</sup> bzw. vier Saccharideinheiten (HYAL1). Die Größe der HA-Einheiten ist für ihre Eigenschaften in der EZM von Bedeutung. So ist niedermolekulare HA proliferationsfördernd, steigert die Angiogenese und ist ein Merkmal für verstärkte Entzündung des Gewebes<sup>31</sup>. Hochmolekulare HA zeigt eine hohe Aufnahmefähigkeit für Wasser und führt dadurch zu einer verstärkten Volumenexpansion. Zusätzlich weist hochmolekulare HA angiogenesehemmende Eigenschaften auf<sup>32</sup>. Die Polymergröße allein scheint ausschlaggebend für die Funktion von HA zu sein<sup>33</sup>. Die Eigenschaften von HA hängen weiterhin von der Interaktion mit bestimmten EZM-Bestandteilen, den so genannten Hyaladhärienen ab. Zu dieser Gruppe gehören Versican, Inter- $\alpha$ -Trypsin-Inhibitor ( $\text{I}\alpha\text{I}$ ) und *tumor necrosis factor stimulated gene 6* (Tsg-6)<sup>34</sup>. Durch die Bindung an Versican akkumuliert HA in atherosklerotischen Plaques an den Stellen, wo Versican exprimiert wird. Die HA-Expression ist weiter mit Bereichen vermehrter Proliferation und Migration glatter Muskelzellen assoziiert, was einen Einfluss auf diese Vorgänge nahe legt. Besonders stark ist dies im Rahmen der Restenose nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) nachweisbar, wie von Riessen *et al.*<sup>35</sup> gezeigt wurde.

## 1.5 Statine

Eine Dyslipidämie, im Speziellen ein erhöhter LDL-Plasmaspiegel, ist der Hauptrisikofaktor der Atherosklerose. Erhöhte Cholesterolspiegel im Plasma lassen sich effektiv mit Statinen, Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), behandeln. Statine reduzieren die Synthese von Cholesterol in der Leber durch Hemmung der Reduktase, welche HMG-CoA zu Mevalonat reduziert. Dies stellt den limitierenden Schritt in der Biosynthese des

Cholesterols dar<sup>36</sup> (s. Abb. 3). Die eigentliche Senkung des zirkulierenden LDLs wird allerdings durch eine kompensatorische Gegenregulation in Form einer gesteigerten Aufnahme von LDL in die Leber durch vermehrte Expression von LDL-Rezeptoren<sup>37</sup> erzielt. Durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase wird auch die Bildung von Isoprenoid-Intermediaten der Cholesterolsynthese wie Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat gehemmt. Von diesen Substanzen ist bekannt, dass sie die posttranskriptionelle Modifikation von kleinen GTPase-bindenden Proteinen wie Rho und Ras regulieren. Durch die Hemmung der Synthese der oben genannten Isoprenoid-Intermediaten inhibieren Statine die Aktivierung von Rho und Ras in SMC und verhindern die für die Signaltransduktion wichtige Lokalisation dieser Signalproteine an der Membran<sup>38,39</sup>.

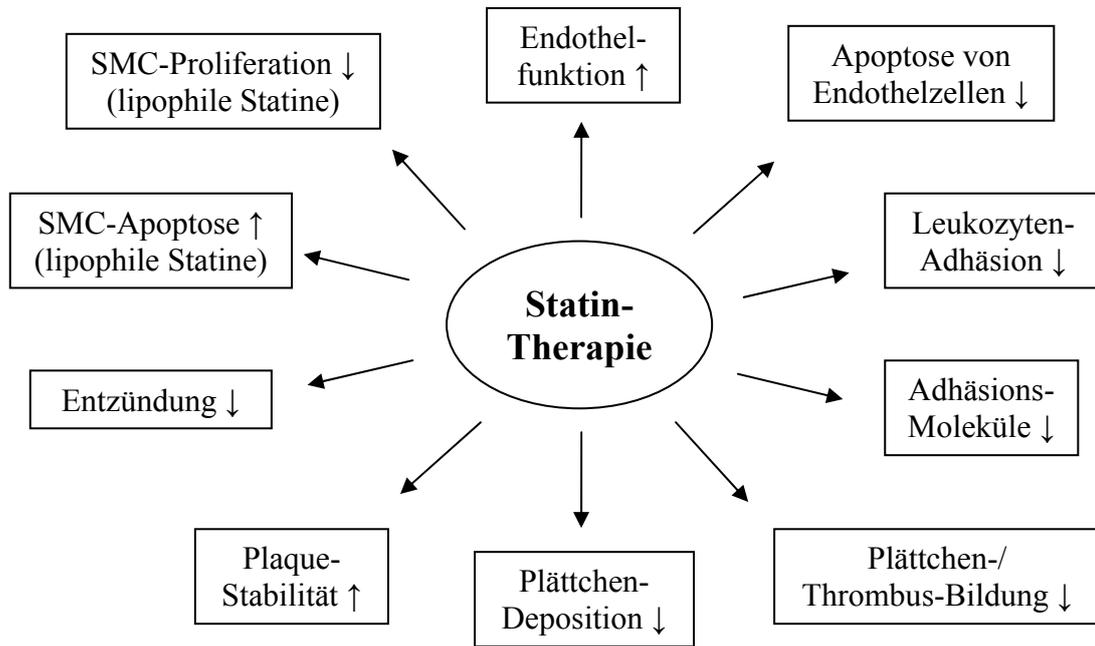


**Abbildung 3:** Synthese von Cholesterol und Wirkmechanismus der  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren; 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA ( $\beta$ -HMG-CoA).

Statine binden durch eine große Anzahl von van der Waals Bindungen besonders stark an das katalytische Zentrum der HMG-CoA-Reduktase. Die Bindungsstärke unterscheidet sich zwischen den Statinen. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen den einzelnen Substanzen ist ihre Lipophilie, welche sich in teilweise unterschiedlichen Effekten auf Apoptose und Proliferation äußert. Pravastatin und

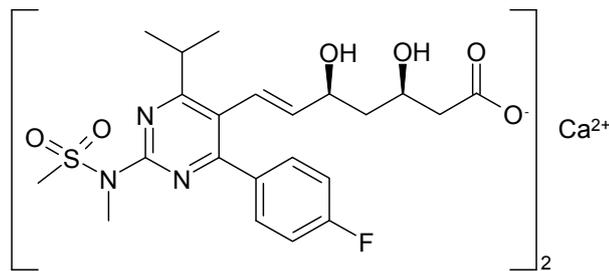
Rosuvastatin sind relativ hydrophil, während Simvastatin und Atorvastatin zu den lipophileren Vertretern gehören. Aufgrund der stärkeren Bindung an die HMG-CoA-Reduktase zeigt besonders Rosuvastatin, ein neueres synthetisches Statin, welches in Deutschland bis 2007 noch nicht zugelassen wurde, eine deutlich ausgeprägte Hemmung des LDL-Cholesterols. Im Vergleich zu dem in Deutschland zugelassenen potentesten Statin, Atorvastatin, welches den LDL-Plasmaspiegel um bis zu 55 % senken kann<sup>40</sup>, reduziert Rosuvastatin das zirkulierende LDL um bis zu 63 %<sup>41</sup>.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Statine die kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit erhöhtem Serumcholesterol senken<sup>40</sup>. In der 4S-Studie (*Scandinavian Simvastatin Survival Study*)<sup>4</sup> wurde dies erstmals an 4444 Patienten mit koronarer Herzkrankheit nachgewiesen. Statine vermögen auch in Patienten mit normalem Serumcholesterol die Mortalität aufgrund von kardiovaskulären Ereignissen zu senken<sup>42</sup>. Obwohl die positiven Effekte eindeutig mit der Senkung des zirkulierenden LDLs korrelieren<sup>40</sup>, wird angenommen, dass Statinen über so genannte pleiotrope Effekte zusätzlich zur Senkung des kardiovaskulären Risikos beitragen. Diese Effekte sind in Abb. 4 zusammengefasst. Dazu gehört die Verbesserung der endothelialen Dysfunktion u.a. durch Steigerung der Bioverfügbarkeit von vasodilatierendem NO<sup>43</sup>. Dieser Effekt ist, wie die meisten anderen pleiotropen Effekte, abhängig von der Reduktion der Isoprenoide durch Hemmung der Bildung von Mevalonat und der nachgeschalteten Hemmung der Isoprenoid-Membranverankerung von Rho und Ras. Statine reduzieren weiterhin die Synthese und Präsentation Adhäsionsmoleküle wie z.B. E- und P-Selektin sowie *intercellular adhesion molecule (ICAM-1)*<sup>44</sup>, welche nach einer Störung der Endothelfunktion die Rekrutierung von Leukozyten veranlassen. Statine vermindern weiter die Inflammation, was durch Reduktion der Plasmakonzentration von C-reaktivem Protein<sup>45</sup> deutlich wird. In Bezug auf den Umbau der EZM von atherosklerotischen Läsionen ist von einigen Statinen bekannt, dass sie zur Stabilisierung von bestehenden Plaques beitragen. Cipollone *et al.*<sup>46</sup> zeigten, dass Simvastatin zur Steigerung der Kollagenmenge und Reduktion von matrixdegradierenden Metalloproteinasen in humanen atherosklerotischen Läsionen führt. Ob Statine einen Einfluss auf weitere Bestandteile der EZM, wie z.B. Proteoglykane und Hyaluronsäure *in vivo* haben, ist bisher nicht bekannt.



**Abbildung 4:** Pleiotrope Effekte einer Statintherapie in der Atherosklerose.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Rosuvastatin auf die EZM untersucht. Die Struktur von Rosuvastatin weist den allen Statinen gemeinsamen HMG-Rest auf (s. Abb. 5). Rosuvastatin verursacht eine leberspezifische Hemmung der HMG-CoA-Reduktase. So hemmt Rosuvastatin die HMG-CoA-Reduktase in Ratten-Hepatozyten 1000-fach stärker als in Ratten-Fibroblasten<sup>47</sup>. Als Vorteil in Bezug auf mögliche Arzneimittelinteraktionen ist die geringe Metabolisierung<sup>48</sup> über Cytochrom P 450 zu sehen.



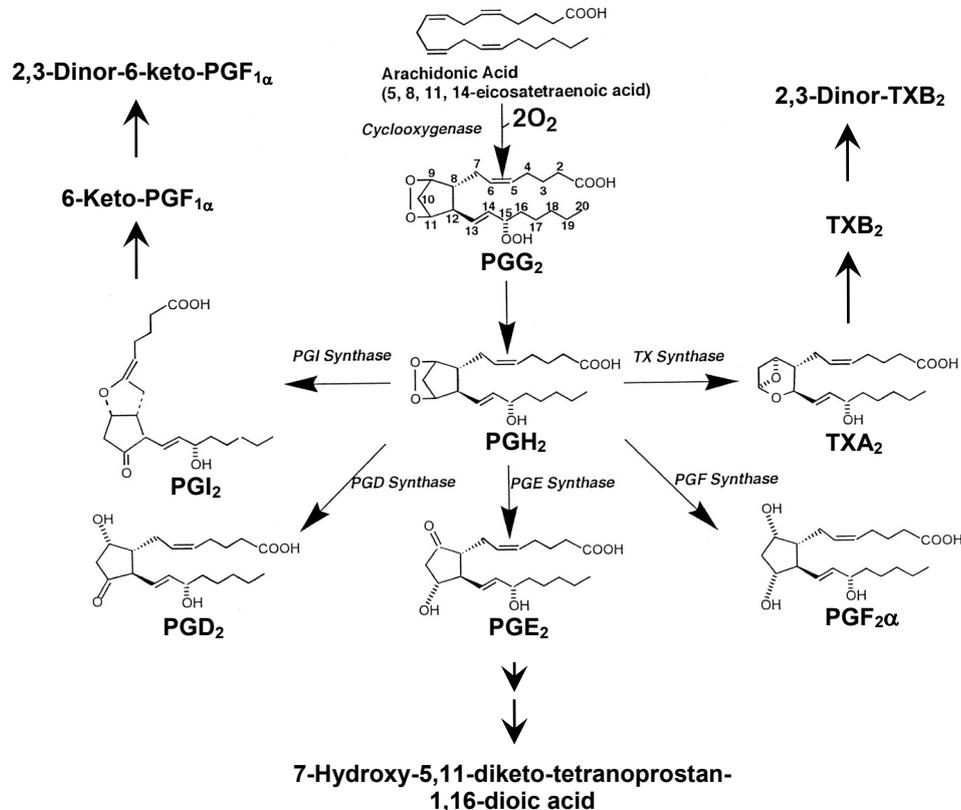
**Abbildung 5:** Strukturformel von Rosuvastatin-Calcium.

Von Rosuvastatin ist bereits bekannt, dass es anti-inflammatorisch wirkt<sup>49</sup>, die Funktion der NO-Synthase verbessert<sup>50,51</sup> und Plaqueausbildung reduziert<sup>52</sup>. Um mögliche pleiotrope Effekte von Statinen auf die EZM zu untersuchen, wurde dieses neue Statin ausgewählt und die Wirkungen nach oraler Applikation im Atherosklerosemodell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus analysiert.

## 1.6 COX und Prostaglandine in der Atherosklerose

Cyclooxygenasen setzen Arachidonsäure in Prostanoiden um. Seit Anfang der 90er Jahre sind zwei Isoformen der COX bekannt: COX-1 und COX-2<sup>53-55</sup>. Sie unterscheiden sich in der Gewebeverteilung und der Regulation ihrer Expression. COX-1 wird konstitutiv in fast allen Geweben exprimiert und ist für die Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen wie z.B. die schützende Wirkung auf die Mucosa des Magens verantwortlich. COX-2 ist im Gegensatz zu COX-1 mit wenigen Ausnahmen nicht konstitutiv exprimiert und wird durch Stimuli wie inflammatorische Zytokine<sup>56</sup> induziert. So wird COX-2 verstärkt in aktivierten SMC und inflammatorischen Zellen, wie Makrophagen exprimiert<sup>57,58</sup>. In Abb. 6 werden die nachfolgend erklärten Synthese- und Metabolisierungsvorgänge verdeutlicht. Beide Cyclooxygenasen katalysieren zwei Reaktionen, welche Arachidonsäure in Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) und Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) überführen. Von nachgeschalteten Synthasen wird PGH<sub>2</sub> gewebespezifisch in PGI<sub>2</sub> (Synonym: Prostacyclin), PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) überführt. TXA<sub>2</sub> wird in Thrombozyten gebildet und induziert ihre Aggregation. Es hat weiterhin eine vasokonstriktive Wirkung. Prostacyclin ist das Hauptprodukt des Prostaglandinstoffwechsels im Endothel<sup>59</sup> und bindet an IP-Rezeptoren. Prostacyclin ist durch seine vasodilatierenden Eigenschaften und die Hemmung der Thrombozytenaggregation ein funktioneller Gegenspieler von TXA<sub>2</sub>. Die gegensätzlichen Funktionen von PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> spiegeln sich auch in der unterschiedlichen Synthese wider. PGI<sub>2</sub> ist neben PGE<sub>2</sub> das Hauptprodukt von COX-2 im vaskulären System, während TXA<sub>2</sub> von COX-1 gebildet wird. PGE<sub>2</sub> wird durch Prostaglandin-E-Synthase (PGES) aus PGH<sub>2</sub> synthetisiert. PGES existiert in drei Varianten: der mikrosomalen PGES-1 (mPGES-1)<sup>60</sup> und mPGES-2<sup>61</sup> sowie der zytosolischen PGES-1<sup>62</sup>. PGE<sub>2</sub> wird von Monozyten, SMC und Endothelzellen gebildet und aktiviert vier verschiedene Rezeptoren mit teilweise gegensätzlichen Funktionen. Diese Rezeptoren werden EP-Rezeptoren genannt. EP-Rezeptoren sind G-Protein (GTP-bindendes Protein) gekoppelte Rezeptoren. PGI<sub>2</sub> ist durch seine Vinyletherpartialstruktur sehr instabil und wird im Plasma schnell zu 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> hydrolysiert<sup>63</sup> und im Harn schließlich als 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> ausgeschieden. PGE<sub>2</sub> wird im Urin als 7-Hydroxy-5,11-diketo-tetranoprostan-1,16-dioic acid ausgeschieden. Sowohl PGE<sub>2</sub> als auch PGI<sub>2</sub> hemmen die Proliferation von SMC<sup>64,65</sup>; PGI<sub>2</sub> besitzt zusätzlich migrationshemmende Eigenschaften in SMC<sup>66</sup>. Thromboxan A<sub>2</sub>

ist ebenfalls sehr instabil und wird im Plasma schnell zu TXB<sub>2</sub> umgewandelt und als 2,3-Dinor-TXB<sub>2</sub> im Urin ausgeschieden.



**Abbildung 6:** Biosyntheseweg und Metabolisierung der Prostanoiden. Angelehnt an Narumiya et al.<sup>67</sup>

Schönbeck et al.<sup>58</sup> zeigten, dass COX-2 nur in der Neointima von atherosklerotischen Läsionen vorkommt, während COX-1 konstitutiv in SMC der Media exprimiert ist. Im gesunden Zustand zeigen SMC keine COX-2 Expression<sup>68</sup>. Eine gesteigerte Expression von COX-2 in SMC wird durch inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukine und *tumor necrosis factor α* (TNF $\alpha$ ) vermittelt. Aus der Degranulation von Thrombozyten freigesetzte Wachstumsfaktoren wie *platelet derived growth factor BB* (PDGF-BB) stimulieren ebenfalls die Expression von COX-2. In symptomatischen Plaques ist eine erhöhte COX-2-Expression besonders in Bereichen mit hoher Makrophagendichte in den Schulterregionen, zu finden<sup>69</sup>. Hier ist COX-2 bevorzugt mit mPGES-1 assoziiert und steigert darüber die Synthese von PGE<sub>2</sub>. Cipollone et al.<sup>69</sup> fanden außerdem, dass in humanen atherosklerotischen Läsionen Bereiche erhöhter COX-2 / mPGES-Expression mit verstärkter MMP-Aktivität in Makrophagen assoziiert sind.

COX-2-Inhibitoren (Coxibe) wurden Ende der 90er Jahre in den Markt eingeführt, um das gastrointestinale Risiko einer Therapie mit *nonsteroidal antiinflammatory drugs* (NSAID) zu reduzieren. Sie sind deshalb für eine symptomatische Langzeitbehandlung

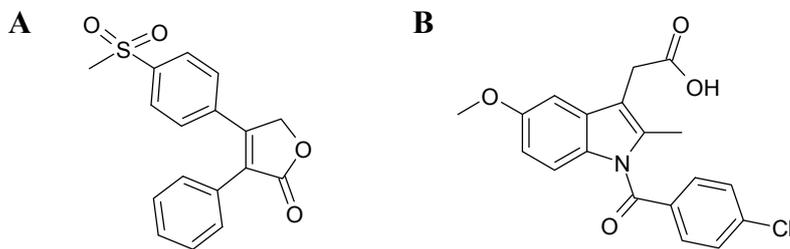
der Osteoarthritis und rheumatoiden Arthritis indiziert. Der gastrointestinale Nutzen dieser Arzneistoffklasse durch Erhaltung der protektiven Wirkung von COX-1 in der Mucosa des Magens wurde durch klinische Studien belegt<sup>70</sup>. Allerdings zeigte sich bereits fünf Jahre nach der Markteinführung von Rofecoxib (1999) eine Erhöhung des kardiovaskulären Risikos durch vermehrt auftretende thromboembolische Ereignisse<sup>71</sup>. Diese Ereignisse waren besonders stark bei bestehenden Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen vorzufinden<sup>72,73</sup>. 2004 führten schließlich die Ergebnisse der APPROVe-Studie<sup>71</sup> zur Rücknahme von Rofecoxib und ein Jahr später zur Rücknahme von Valdecoxib. Darüber hinaus wurden Celecoxib, Parecoxib sowie die später zugelassenen Coxibe Etoricoxib und Lumiracoxib in der Indikation beschränkt. Zurückgeführt werden diese unerwünschten Wirkungen auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Prostacyclin und TXA<sub>2</sub>. Antithrombotisch wirksames Prostacyclin wird durch Inhibition von COX-2 vermindert gebildet, so dass die Wirkungen des prothrombotischen TXA<sub>2</sub> überwiegen. In verschiedenen transgenen Mausmodellen wurden diese Einflüsse auf die Atherosklerose überprüft. Cheng *et al.*<sup>74</sup> untersuchten das Ausmaß der Atherosklerose in IP-Rezeptor-defizienten Mäusen. Hier zeigte sich nach einer Gefäßschädigung eine gesteigerte Proliferation der SMC in der Intima und eine verstärkte Thrombozytenaktivierung. Ein zusätzlicher *knockout* für den Thromboxan-Rezeptor hob diese Effekte wieder auf. In Mäusen, die ausschließlich Thromboxan-Rezeptor defizient sind, zeigte sich in dieser Studie eine Verminderung der Atherosklerose nach Gefäßschädigung. In einer neueren Studie von Wang *et al.*<sup>75</sup> zeigten mPGES-1 und LDL-Rezeptor-doppel-*knockout*-Mäuse eine erhöhte Stabilität der atherosklerotischen Läsionen durch verstärkte Akkumulation von Kollagen. Des Weiteren wiesen diese Mäuse eine reduzierte Atherogenese und dadurch kleinere atherosklerotische Läsionen auf. Wang *et al.* erklären dies durch eine Verschiebung zu erhöhter Umsetzung von PGH<sub>2</sub> in Richtung PGI<sub>2</sub>.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz der beschriebenen Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub>. Die pathophysiologische Rolle einer COX-2-Hemmung im Rahmen der Atherosklerose erscheint ambivalent. Kurzfristig steht möglicherweise das Ungleichgewicht zwischen TXA<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> im Vordergrund und verursacht ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Komplikationen. Langfristige Hemmung der COX-2-Aktivität könnte dagegen durch anti-inflammatorische Wirkung und die Reduktion von MMP-Aktivität die Progression der Atherosklerose hemmen.

Der vaskuläre Umbau von atherosklerotischen Läsionen wird von COX-2 nicht nur durch eine gesteigerte MMP-Aktivität gesteuert. Meyer-Kirchrath *et al.*<sup>76</sup> zeigten, dass Prostacyclin in humanen SMC die Expression von HAS-2 mRNA steigert. Sussmann *et al.*<sup>77</sup> zeigten an SMC, dass diese Stimulation cAMP- und PKA-vermittelt ist. Außerdem zeigten sie, dass nicht nur Prostacyclin die HAS-2-Expression in SMC induziert, sondern auch PGE<sub>2</sub>. Dies wird über den EP<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt. HAS-1 wird ebenfalls durch PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> in einer cAMP-abhängigen Signaltransduktion über den

IP- und EP<sub>2</sub>-Rezeptor stimuliert<sup>78</sup>. HA selber wird, wie bereits erwähnt, durch seine proliferations- und migrationsfördernden Eigenschaften als pro-atherosklerotisch betrachtet. Die Untersuchung, ob endogene, vasodilatierende Prostaglandine die HA-Synthese auch *in vivo* stimulieren, steht noch aus.

Um dies zu untersuchen wurden in dieser Arbeit die Cyclooxygenasen in atherosklerotischen Mäusen pharmakologisch inhibiert. In einer früheren Studie von Riendeau *et al.*<sup>79</sup> wurde die Selektivität für COX-2 von Rofecoxib und Indometacin getestet. Ausgedrückt wurde dies als Quotient der IC<sub>50</sub> für COX-1 / COX-2, welche für Rofecoxib 35,0 und für Indometacin 0,4 betrug. Deshalb wurden in dieser Arbeit ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Rofecoxib (Abb. 7A) als selektivem COX-2-Inhibitor und mit dem unselektiven Inhibitor Indometacin (Abb. 7B) behandelt.



**Abbildung 7:** Strukturformeln von (A) Rofecoxib und (B) Indometacin.

## 1.7 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von zwei Arzneistoffgruppen, Statinen und COX-Inhibitoren, auf die Atherosklerose an ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Dabei lag der Fokus der Untersuchungen auf der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM).

Pharmakologische Interventionen in den *circulus vitiosus* der Atherosklerose stellen in den westlichen Nationen wichtige lebensverlängernde Maßnahmen dar. Neben der Behandlung von Surrogatparametern wie *Diabetes mellitus* und Hypertonie, ist die Kontrolle der Serumlipide und der inflammatorischen Prozesse das wichtigste Ziel der Therapie der Atherosklerose. Die Auswirkungen einer Statinbehandlung auf die extrazelluläre Matrix sind bisher nur begrenzt an *in vivo* Modellen beschrieben worden. Daher war das Ziel der nachfolgend geschilderten Untersuchungen die Analyse des Einflusses von Rosuvastatin auf die EZM von atherosklerotischen Läsionen. Effekte von Rosuvastatin auf die Atherosklerose und die EZM wurden im Atherosklerosemodell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus bezüglich folgender Punkte untersucht:

1. Progression von bereits bestehenden atherosklerotischen Läsionen
2. Zusammensetzung der EZM in Bezug auf Proteoglykane, Hyaluronsäure (HA) und Kollagen
3. Hinweise auf Plaquestabilität
4. COX-2-Expression als Marker für inflammatorische Prozesse
5. Zelluläre Zusammensetzung
6. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humane atherosklerotische Läsionen.

Im zweiten Teil der Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung des Einflusses von vasodilatierenden Prostaglandinen auf den Umbau der EZM. Bisher sind COX-2-Inhibitor-vermittelte Effekte auf die Atherosklerose nicht gänzlich geklärt. Sie scheinen vielmehr eine duale Rolle durch das vermehrte Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse einerseits und die Reduktion entzündlicher Prozesse andererseits einzunehmen. Um den Effekt einer Senkung von PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> *in vivo* in atherosklerotischen Läsionen zu untersuchen, wurde ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen Rofecoxib (Vioxx<sup>®</sup>) als spezifischer Inhibitor für COX-2 verabreicht. Die Effekte von Rofecoxib wurden mit denen von Indometacin als unspezifischen Inhibitor der beiden Cyclooxygenasen im Atherosklerosemodell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus und in Kombination mit einer durch Endothelschädigung ausgelösten Atherosklerose verglichen und bezüglich folgender Punkte analysiert:

1. Ausmaß der Hemmung der Synthese von Prostacyclin und Thromboxan A<sub>2</sub>
2. Progression der atherosklerotischen Läsionen nach Endothelschädigung
3. Expression von COX-2 in den atherosklerotischen Läsionen

4. Zusammensetzung der EZM in Bezug auf HA-Synthase-Expression und HA-Akkumulation.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Substanzen wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

*Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen in der Protein-Analyse*

<b>Puffer bzw. Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>10x Laufpuffer</b>	250 mM Tris 1,9 mM Glycin 0,1 % SDS
<b>4x Auftragspuffer</b>	40 % Glycerol 8 % SDS 0,25 M Tris 0,4 M DTT 0,04 % Bromphenolblau 5 % $\beta$ -Mercapto-EtOH pH 6,8
<b>4x Sammelgelpuffer</b>	0,5 mM Tris-HCl 0,4 % SDS pH 8,8
<b>4x Trenngelpuffer</b>	1,5 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0
<b>Blockierlösung</b>	2 % (w/v) <i>ECL Advanced Blocking Reagenz</i> 1x TBST
<b>Blot-Puffer</b>	1x Laufpuffer ohne SDS 20 % Methanol
<b>10x TBS</b>	100 mM Tris-HCl 1,5 mM NaCl pH 7,4
<b>TBST</b>	1x TBS 0,1 % Tween 20

**Tabelle 2:** *Verwendete Puffer und Lösungen zur Analyse der Proteoglykane*

<b>Puffer bzw. Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>10x Proteinaseinhibitoren-Mix</b> (Chondroitinase-Verdau)	1 M 6-Aminohexansäure 1 M Benzamidin 1 mM PMSF
<b>6x ABC-Puffer</b> (Chondroitinase-Verdau)	109 mM Tris-HCl 15 % BSA 18 mM Na-Acetat pH 8,0
<b>8 M Harnstoffpuffer</b> (für Sephadex G50)	8 M Harnstoff 0,05 M Na-Acetat 0,5 % Triton X100
<b>Carrier-Lösung</b> (Proteoglykan-Fällung)	1 % (w/v) Chondroitinsulfat A
<b>DEAE-Elutionspuffer</b> (Proteoglykan-Isolierung)	3 M NaCl DEAE-Puffer
<b>DEAE-Puffer</b> (Proteoglykan-Isolierung)	8 M Harnstoff 2 mM EDTA 50 mM Tris 0,5 % Triton X100 pH 7,5
<b>DEAE-Waschpuffer</b> (Proteoglykan-Isolierung)	0,25 M NaCl DEAE-Puffer
<b>EtOH/K-Acetat-Lsg.</b> (Proteoglykan-Fällung)	1,3 % K-Acetat 95 % EtOH
<b>Proteoglykan-Extraktionspuffer</b> (Proteoglykan-Isolierung)	4 M Guanidin-HCl 0,05 M Na-Acetat 2 % Triton X100 pH 6

**Tabelle 3:** *Verwendete Puffer und Lösungen zur Gewebepräparation und Histologie*

<b>Puffer bzw. Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>4 % Formalin nach Lillie</b> (Gewebefixierung)	46 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (wasserfrei) 29 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 4 % Formalin
<b>4 % PFA</b> (Gewebefixierung)	1x PBS 4 % PFA pH 7,4
<b>Sucrose-Lösung</b> (Kryoprotektion)	1 x PBS 20 % Sucrose pH 7,4
<b>PBS</b>	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4

**Tabelle 4:** *Sonstige Puffer und Lösungen*

<b>Puffer bzw. Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>10x TAE (DNA-Gel)</b>	40 mM Tris 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA pH 7,8
<b>10x Blaumarker</b>	30 % Glycerol 0,04 % Bromphenol-Blau
<b>DEPC-Wasser (RNA-Präparation)</b>	0,1 % (v/v) Diethyl-pyrocbonat
<b>EDTA-Lösung (Plasmapräparation)</b>	100 mM EDTA 0,9 % NaCl pH 7,0

## 2.2 Farbstoffe und Farbstofflösungen

*Tabelle 5: Verwendete Farbstoffe und Farbstofflösungen (Movats)*

<b>Farbstoff</b>	<b>Färbelösung</b>
Alcian Blau	1 % Alcian Blau 8GX
Bouins Lösung	70 % gesättigte Pikrinsäurelösung 25 % Formaldehydlösung (40 %) 5 % Eisessig
Crocein-Scarlet 7B	Crocein-Scarlet Stammlösung: 1 % (w/v) Crocein-Scarlet 0,5 % (v/v) Eisessig → 4:1 mit Fuchsin-Stammlösung verdünnen
Fuchsin	Fuchsin-Stammlösung 0,1 % (w/v) saures Fuchsin 0,5 % (v/v) Eisessig → 1:4 mit Crocein-Scarlet Stammlösung verdünnen
Musto-Elastin-Färbung	Alkoholische Hämatoxylin-Lösung: 2 % (w/v) Hämatoxylin 95 %-iger EtOH  Eisenchlorid-Lösung: 2,48 % (w/v) Eisenchlorid-Hexahydrat 5 % (v/v) konzentrierte HCl  Iod-Lösung: 4 % KI 2 % Iod  Musto-Elastin-Färbelösung: 3:2:1
Safran	6 % (w/v) Safran-Fäden 100 %-iger EtOH

*Tabelle 6: Verwendete Farbstoffe und Farbstofflösungen (Picro-Siriusrot)*

<b>Farbstoff</b>	<b>Färbelösung</b>
Picro-Siriusrot	0,1 % (w/v) Picro-Siriusrot gesättigte Pikrinsäurelösung
Cölestinblau	4,4 % (w/v) $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 0,4 % (w/v) Cölestinblau 12,3 % (v/v) Glycerin

**Tabelle 7: Verwendete Farbstoffe und Farbstofflösungen – sonstige Färbungen**

<b>Farbstoff</b>	<b>Färbelösung</b>
Hämalaun nach Mayer (Immunhistochemie)	<i>gebrauchsfertig von Merck</i>
Neutralrot (von Kossa-Färbung)	1 % (w/v) Neutralrot 1 % (v/v) Eisessig
Öl-Rot-O (Lipid-Färbung)	Öl-Rot-O- Färbelösung ( <i>en-face</i> ): 10 ml NaOH (1 M) 35 ml Öl-Rot-O-Lösung (0,5 %-ig in MeOH)  Öl-Rot-O-Färbelösung (Gefrierschnitte): 0,5 % (w/v) Öl-Rot-O Propylenglykol
Orcein (Färbung elastischer Fasern)	0,5 % (w/v) Orcein 70 %-iger EtOH

## 2.3 Substanzen und Arzneistoffe

*Tabelle 8: Verwendete Substanzen*

<b>Substanzen</b>	<b>Hersteller</b>
1,10-Phenanthrolin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
100 bp DNA Ladder	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 40 %	BioRad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Aquatex	Merck, Darmstadt
Cholesterin-CH 200 Kit	Randox Laboratories, Krefeld
Chondroitin ABC Lyase	ICN Biomedicals, Ohio, USA
DEAE Sephacel	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diaminobenzidin (DAB)	Zytomed Systems, Berlin
DQ™ Gelatine FITC konjugiert	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
ECL Advanced Blocking Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Entellan® (Eindeckmedium)	Merck, Darmstadt
Hoechst 33324	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lumi.Light Western Blotting Substrat	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Protein-Standard)	Fermentas, St.Leon-Rot
QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Sephadex G50	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SuperScript™ III First Strand cDNA Synthesis Kit	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green® PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
TIMP-1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TissueTek-Einbettmedium	Leica Microsystems, Wetzlar
Triglyceride-TR210 Kit	Randox Laboratories, Krefeld
TRIZOL® Reagenz	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories, CA, USA

**Tabelle 9:** *Verwendete Arzneistoffe*

<b>Wirkstoffe</b>	<b>Arzneimittel-Name</b>
Buprenorphin	Temgesic <sup>®</sup> Amp., Essex Pharma München
Esketamin	Ketanest <sup>®</sup> S 25 mg/ml, Pfizer, Karlsruhe
Indometacin	Reinsubstanz, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rofecoxib	Vioxx <sup>®</sup> Tbl., Merck, Darmstadt
Rosuvastatin-Ca	Reinsubstanz, AstraZeneca, London
Xylazin-HCl	Rompun <sup>®</sup> 2 %-ige Inj. Lösung ad us vet., Bayer, Leverkusen

## 2.4 Antikörper

*Tabelle 10: In der Immunhistochemie und im Western-Blot verwendete Antikörper*

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
$\alpha$ -Aktin, polyklonal	DAKO, Hamburg	1:200
Biglycan LF106, polyklonal (Immunhistochemie)	von Larry Fisher (NIH, USA) zur Verfügung gestellt	1:1000 (Maus), 1:800 (Mensch)
Biglycan LF106, polyklonal (Western-Blot)	s.o.	1:500
Maus-COX-2, polyklonal	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA	1:300
Decorin LF113, polyklonal (Immunhistochemie)	von Larry Fisher (NIH, USA) zur Verfügung gestellt	1:1000 (Maus), 1:200 (Mensch)
Decorin LF113, polyklonal (Western-Blot)	s.o.	1:1000
Hyaluronsäurebindeprotein, biotinyliert	Seikagaku, Tokyo, Japan	2 $\mu$ g/ml
Kollagenneopeptide C1,2C, polyklonal	IBEX Technologies, Montreal, Quebec	1:100
Mac 2, polyklonal	CEDARLANE Laboratories, Burlington, Ontario, Canada	1:400
MMP 2, polyklonal	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	1:250
MMP 9 (C-20), polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:50
Perlecan (anti-heparan sulfate proteoglycan), monoklonal	Seikagaku, Tokyo, Japan	1:50
Versican GAG $\alpha$ -Domäne, polyklonal (AB1032)	Chemicon International, Temecula, CA, USA	1:50

**Tabelle 11:** In der Immunhistochemie und im Western-Blot verwendete Sekundärantikörper

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

## 2.5 Geräte

*Tabelle 12: Verwendete Geräte*

Elektrophorese (Protein)	Mini-PROTEAN <sup>®</sup> 3 Electrophoresis Cell, PowerPac 200 + 300 Power Supply	BioRad, München
Elektrophorese (RNA)	Sub-Cell <sup>®</sup> GT Elektrophoresekammer	BioRad, München
Filmauswertung (Scanner und Software)	GS-800 Calibrated Densitometer Quantity One <sup>®</sup> Version 4.4.1	Umax Systems GmbH, Willich BioRad, München
Gefriertrocknung	Gefriertrocknungsanlage Beta I	Christ, Osterode am Harz
Gelauswertung	GelDoc 1000 <sup>™</sup> mit Quantity One <sup>®</sup> Version 4.1-Software	BioRad, München
Kaltlichtquelle (Sektionen)	Schott KL 1500 <sub>LCD</sub>	Schott, Mainz
Kamera (Stereomikroskop)	Power Shot G6	Canon Inc., Tokio
Kamera + Software	Colorview II Kamera mit Soft Imaging System-Software	Soft Imaging System, Münster
Kryostat	Leica CM 1850	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlplatte (Paraffinblöcke)	Leica EG 1150c	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop	Olympus BX 50	Olympus, Hamburg
Operationsbesteck	Aesculap	Aesculap AG, Tuttlingen
Paraffinstreckbad	Medax 25900	Medax, Kiel
Protein-Transfer (Western-Blot)	Semidry Blotting Apparatur	BioRad, München
RNA-Messung	Genequant II DNA/RNA Calculator	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rotationsmikrotom	Leica RM 2255	Leica Microsystems, Wetzlar
RT-PCR	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
qRT-PCR	Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt

Stereomikroskop	Stemi 2000	Zeiss, Oberkochen
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R (kühlbar)	Eppendorf, Hamburg

## 2.6 Zellkultur

Humane glatte Muskelzellen (hSMC) aus Koronararterien wurden nach Standardbedingungen in hSMC-Medium mit 5 % FCS kultiviert. Für die Versuche wurden 8.000 Zellen/cm<sup>2</sup> Kulturschale ausgesät und nach 24 Stunden (h) mit 1 µM Rosuvastatin und 56 µg/ml Ascorbinsäure stimuliert. Die Inkubation mit den Stimuli erfolgte für 24 h oder 5 Tagen (d), wobei das Medium bei der 5-tägigen Inkubation nach 2 Tagen ausgetauscht wurde.

## 2.7 Tiere und Futter

Mäuse mit einem homozygoten *knockout* für das Apolipoprotein E (ApoE<sup>-/-</sup>) wurden über Taconic M&B (Dänemark) bezogen und in der Tierversuchsanstalt der Universitätsklinik Düsseldorf gezüchtet. Diese Tiere haben einen gemischten C57BL/6 x 129 genetischen Hintergrund. Die Tiere wurden in einem konstanten 12 h Tag- und Nachtrhythmus gehalten. Futter und Wasser wurde *ad libitum* verabreicht, wobei der mittlere Futterverbrauch pro Tag als Grundlage für die Arzneistoffdosierung diente. Für die folgenden Versuche wurden nur männliche Tiere verwendet.

### 2.7.1 Futtermischungen

Für die Fütterung der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde eine spezielle Futtermischung der Firma ssniff aus Solingen verwendet. Alle Mäuse erhielten ssniff<sup>®</sup>NM (Alleinfuttermittel für die Zucht und Haltung von Nacktmäusen). Diesem Futter wurden die verschiedenen Arzneistoffe wie folgt beigemischt und verpresst:

Arzneistoffkonzentration im Futter	Dosierung [mg/kg*d]
160 mg/kg Rosuvastatin-Calcium	20 mg Rosuvastatin
16 mg/kg Rosuvastatin-Calcium	2 mg Rosuvastatin
375 mg/kg Rofecoxib	50 mg Rofecoxib
22,5 mg/kg Indometacin	3 mg Indometacin.

Im Neointimahyperplasie-Modell wurde ab dem Datum der Ligatur der linken *A. carotis* eine fettreiche Westerndiät ssniff<sup>®</sup>EF NM, die 21 % Butterfett und 0,15 % Cholesterin enthält, gefüttert. Da der pro-Tag-Verbrauch dieses Futters vom normalen Nacktmausfutter abwich, wurden Rofecoxib und Indometacin, um die gleiche

Dosierung wie eingangs erwähnt zu erreichen, mit 300 mg/kg Westerndiät und 18 mg/kg Westerndiät verpresst.

## 2.8 Studiendesign

### 2.8.1 Rosuvastatin

ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden bis zum Alter von 20 Wochen mit Nacktmausfutter gefüttert. Danach erhielten sie bis zum Alter von 52 Wochen Rosuvastatin in den Dosierungen 2 mg und 20 mg/kg\*d, bzw. Kontrollfutter. Danach wurde den Tieren Blut zur Lipidbestimmung und Herz, Aorta und die *A. brachiocephalica* für histochemische Untersuchungen entnommen. Zusätzlich wurde von einigen Tieren die Aorta zur Analyse von RNA und Proteinexpression entnommen.

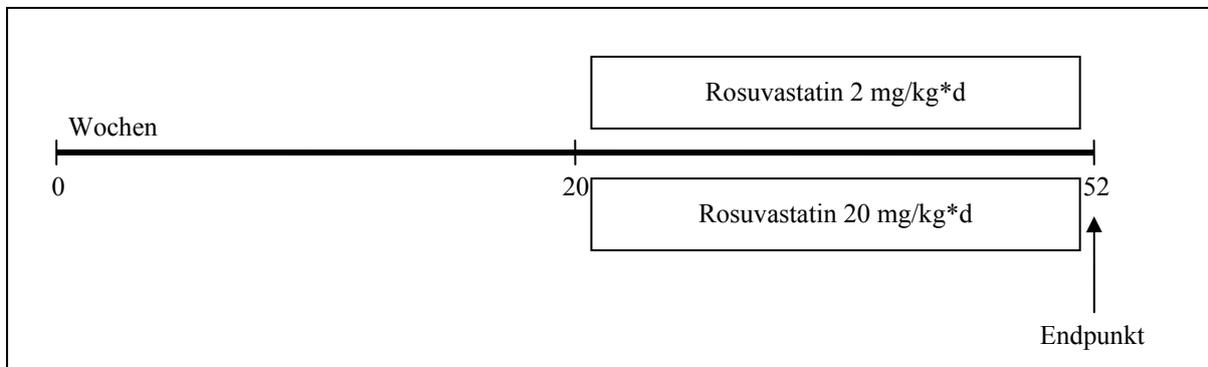


Abbildung 8: Zeitplan für die Fütterung mit Rosuvastatin

### 2.8.2 COX-Inhibitoren

ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden bis zum Alter von 15 Wochen mit Nacktmausfutter gefüttert und danach in 2 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt ab der 15. Woche bis zur 23. Woche 3 mg Indometacin/kg\*d oder 50 mg Rofecoxib/kg\*d bzw. weiterhin Kontrollfutter (normales Nacktmausfutter). Danach wurde den Tieren das Herz für immunhistochemische Untersuchungen und die Aorta zur RNA-Präparation entnommen. Die zweite Gruppe erhielt ab der 15. Woche bis zur 25. Woche weiterhin Kontrollfutter. Ab der 25. bis 33. Woche wurden die oben erwähnten COX-Inhibitoren in den genannten Dosierungen gefüttert. Es folgten die gleichen Untersuchungen wie in der ersten Gruppe.

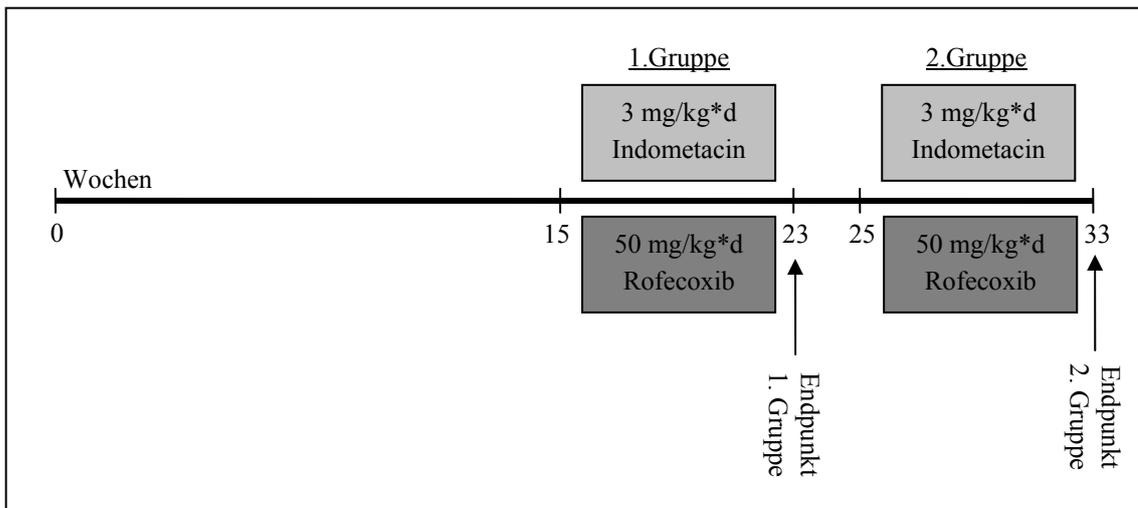


Abbildung 9: Zeitplan für die Fütterung mit COX-Inhibitoren

### 2.8.3 Neointimahyperplasie und COX-Inhibitoren

ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden bis zum Alter von 10 Wochen mit normalem Nacktmausfutter gefüttert. In der 10. Woche wurde an der linken *A. carotis* eine Ligatur zur Erzeugung einer Neointimahyperplasie gelegt. Nach der Ligatur wurden die Tiere mit einer fettreichen Westerndiät gefüttert, die Rofecoxib in einer Dosierung von 50 mg/kg\*d und Indometacin in einer Dosierung von 3 mg/kg\*d enthielt. Kontrolltiere erhielten Westerndiät ohne Arzneistoff. Die Tiere, die arzneistoffhaltiges Futter erhielten bekamen dieses bereits 4 Tage vor dem operativen Eingriff. In der 14. Woche wurden die Tiere getötet und die Karotiden zur Analyse der Neointimahyperplasie entnommen.

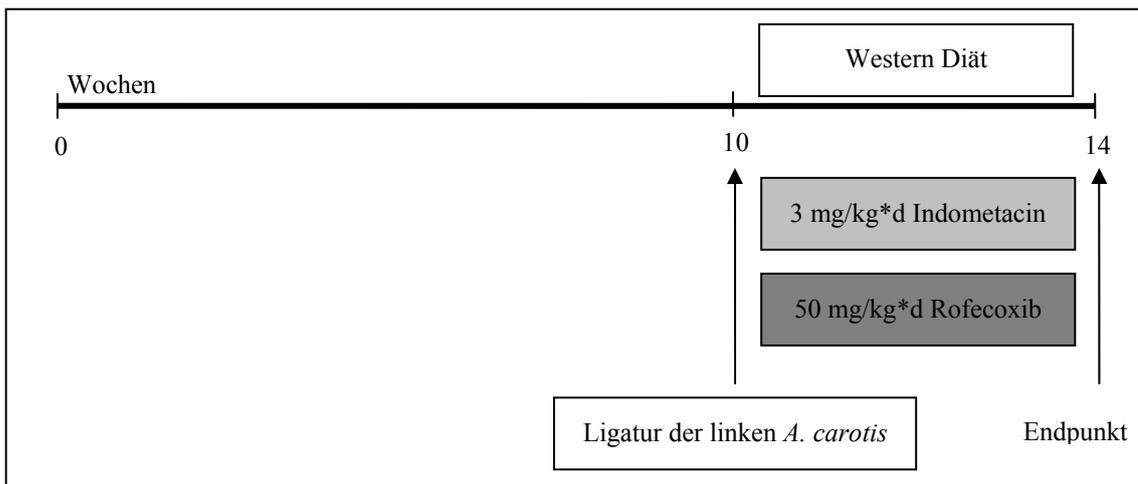


Abbildung 10: Zeitplan für die Fütterung mit COX-Inhibitoren nach Ligatur der linken *A. carotis*.

## **2.9 Humane atherosklerotische Plaques aus Karotis-Endarterektomien**

Gefrierschnitte atherosklerotischer Plaques aus Endarterektomien der *Arteria carotis* wurden von Professor Francesco Cipollone (Istituto di Fisiopatologia Medica, Università degli Studi G. D'Annunzio, Chieti, Italien) zur Verfügung gestellt. Die Patienten hatten eine 70 %-ige symptomatische Stenose der Karotis. Es wurden atherosklerotische Plaques von Patienten, die zuvor mindestens einen Monat lang mit Simvastatin, Atorvastatin oder Pravastatin behandelt worden waren mit denen von Patienten ohne Statintherapie verglichen.

## **2.10 Operativer Eingriff zur Erzeugung der Neointimahyperplasie an Mäusen**

10 Wochen alte ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit Xylazin und Ketanest für die Dauer des Eingriffs per *i.p.*-Injektion betäubt. Die Dosierung entsprach 115 mg Ketanest/kg Mausgewicht und 6,7 mg Xylazin/kg Mausgewicht. Die Methode wurde analog der von Kumar *et al.*<sup>12</sup> beschriebenen Prozedur durchgeführt. Es wurde an der linken *A. carotis* in Höhe der Bifurkation zur *A. carotis interna* und *externa* eine Ligatur gelegt. Nach dem Eingriff erfolgte eine Analgesie mit Buprenorphin in einer Dosierung von 0,05 – 0,08 mg/kg Mausgewicht *s.c.* die nach 6 h wiederholt wurde.

## **2.11 Präparation der Mäuse zur weiteren Analyse**

### **2.11.1 Herz und Aorta**

Für die Entnahme der Herzen wurden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> getötet und der Brustkorb geöffnet. Das Herz wurde in Höhe des Aortenbogens von der Aorta getrennt. Die nicht perfundierte Aorta wurde *in situ* von anhaftendem Gewebe (Adventitia) grob befreit. Die thorakale und abdominale Aorta wurde einschließlich des Aortenbogens bis zu den Nierenabgängen von der Wirbelsäule getrennt und in sterilem 1x PBS auf Eis von restlichem noch anhaftendem Bindegewebe befreit. Für die weiteren Präparationen (RNA, Protein) wurden die Aorten bei -80 °C gelagert. Die Präparation der Aorta zur Gewinnung von RNA erfolgte innerhalb von maximal 8 min nach Öffnung des Brustkorbes bis zur Lagerung bei -80 °C. Nach Überschreiten der 8 min wurde eine Degradierung der RNA durch RNasen festgestellt. Speziell für diese Präparation wurde steriles, RNase freies Besteck verwendet um zusätzliche Degradierung auszuschließen.

### **2.11.2 *en face* Präparation der Aorta**

Für die *en face* Untersuchungen der atherosklerotischen Plaques in der Aorta wurden die Mäuse mit einer Kombination aus Ketamin (115 mg/kg) und Xylazin (6,7 mg/kg) durch *i.p.* Injektion getötet, der Brustkorb geöffnet und durch den linken Ventrikel mit 1x PBS und 4 % PFA zur Fixierung der atherosklerotischen Plaques perfundiert. Zum Druckausgleich wurde die *Arteria femoralis* geöffnet. Anschließend wurde die Aorta analog der oben beschriebenen *in situ* Methode präpariert, vom Herz getrennt und für weitere 2 h bei Raumtemperatur in 4 % PFA nachfixiert. Die Lagerung bis zur *en face* Lipidanalyse erfolgte bei 4 °C in 1x PBS.

### **2.11.3 *Arteria brachiocephalica***

Für die Präparation der *A. brachiocephalica* wurde wie oben beschrieben perfundiert. Im Gegensatz zur Aorta wurde die *A. brachiocephalica* nicht von anhängendem Gewebe befreit um die atherosklerotischen Plaques im Inneren nicht zu beschädigen oder zu verändern. Anschließend wurden die Aorten über Nacht bei 4 °C in 4 % PFA nachfixiert und bis zur weiteren Prozessierung in 1x PBS bei 4 °C gelagert.

### **2.11.4 *Arteria carotis* nach Ligatur**

Die Mäuse wurden analog der in 2.11.2 beschriebenen Methode mit Ketamin/Xylazin getötet und durch den linken Ventrikel mit 1x PBS und 4 % PFA perfundiert. Oberhalb der Ligatur in der linken Karotis wurde ein kleines Loch zum Druckausgleich in die Arterie geschnitten. Beide Karotiden wurden unter einem Stereomikroskop einschließlich des Aortenbogens bis zur Bifurkation in *Carotis externa* und *Carotis interna* ohne weiteres Entfernen des anhaftenden Gewebes herauspräpariert. Für die darauf folgende Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Karotiden über Nacht bei 4 °C in 4 % PFA fixiert und anschließend in 1x PBS bei 4 °C gelagert.

## **2.12 Plasmapräparation**

Mittels Herzpunktion wurde den Mäusen zwischen 0,3 und 0,5 ml Blut mit einer Spritze, die als Antikoagulanzen 100 mM EDTA in 0,9 % NaCl (pH 7,0) enthielt, entnommen. Plasma wurde wie von Sommeijer *et al.*<sup>80</sup> beschrieben präpariert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

## 2.13 Lipidanalyse

Zur Analyse der Triglyzeride und des Gesamtcholesterolgehaltes des Plasmas wurden kommerzielle Kits (Randox Laboratories, Krefeld) benutzt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und mittels einer kolorimetrischen Methode die Extinktion der Proben gegen einen Standard bei 500 nm vermessen.

## 2.14 Bestimmung von Prostaglandin- und Thromboxanmetaboliten im Mäuseurin

### 2.14.1 Gewinnung von Urin

Die Mäuse wurden für 48 h in Stoffwechselfäfigen gehalten und so der Sammelurin dieser Zeit aufgefangen. Bis zur weiteren Analyse wurden die Urinproben bei -80 °C gelagert.

### 2.14.2 Analyse der Metaboliten von PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und Thromboxan

Die vorherrschenden Metaboliten von PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> im Mäuseurin sind ihre β-Oxidationsprodukte 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1α</sub> (PGI-M) und 2,3-Dinor-TXB<sub>2</sub> (TX-M). Diese beiden Metaboliten sowie 7-Hydroxy-5,11-diketotetranorprostan-1,16-dioic acid (PGE-M), ein Metabolit von Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), und das Isoprostan 8,12-Iso-iPF<sub>2α</sub>-VI, ein nicht enzymatisches Lipidperoxidationsprodukt der Arachidonsäure und Indikator für oxidativen Stress *in vivo*, wurden mittels Flüssigchromatographie und nachgeschalteter Massenspektrometrie (LC-MS/MS) durch Zugabe von definierten Mengen der radioaktiv markierten Metaboliten gemessen. Zur Quantifizierung der endogenen Metaboliten wurde der Quotient aus den *peak*-Flächen des Analyten und den entsprechenden internen Standards gebildet. Die Daten wurden auf im Urin enthaltenes Kreatinin normiert. Diese Analysen wurden von Dr. Tilo Grosser, Institute for Translational Medicine, Philadelphia, durchgeführt.

## 2.15 Isolierung und Analyse von RNA aus Aorten und hSMC

### 2.15.1 Isolierung der RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA aus murinen Aorten und hSMC erfolgte mittels TRIZOL<sup>®</sup> Reagenz. Es wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren. Nach der Pulverisierung der -80 °C kalten Aorta wurde diese in 500 µl TRIZOL<sup>®</sup> suspendiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das entstehende Lysat wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll weiterbehandelt. Die Isolierung der RNA aus

Zellen erfolgte analog der beschriebenen Methode, wobei 1 ml TRIZOL<sup>®</sup>/cm<sup>2</sup> konfluenten Zellen verwendet wurde und die Zellen für 10 min lysiert wurden.

### 2.15.2 Quantifizierung der RNA

Reinheit und Konzentration der RNA wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm im Genequant II DNA/RNA Calculator bestimmt.

Um die Qualität der präparierten RNA und der angewendeten Präparationsmethode aus der Maus noch genauer abschätzen zu können, wurde die RNA zusätzlich mittels LabChip<sup>™</sup> Technologie des Agilent Bioanalyzer 2100 analysiert. Degradierete und teilweise degradierte RNA wurde verworfen.

## 2.16 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und quantitative *real-time*-RT-PCR (qRT-PCR)

### 2.16.1 Primer

*Tabelle 13: Primer für qRT-PCR*

Gen	Primer-Sequenz
murine HAS1	5'-CTATGCTACCAAGTATACCTCG-3' 5'-TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC-3'
murine HAS2	5'-CGGTCGTCTCAAATTCATCTG-3' 5'-ACAATGCATCTTGTTCAGCTC-3'
murine HAS3	5'-GATGTCCAAATCCTCAACAAG-3' 5'-CCCACTAATACATTGCACAC-3'
murine HYAL1	5'-AAGTACCAAGGAATCATGCC-3' 5'-CTCAGGATAACTTGGATGGC-3'
murine HYAL2	5'-GGTGGACCTTATCTCTACCAT-3' 5'-TATTGGCAGGTCTCCATACTT-3'
GAPDH	5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3' 5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'
humanes Biglycan	5'-CTCCTCCAGGTGGTCTATCT-3' 5'-GGTTGTTGAAGAGGCTGATG-3'
humanes Decorin	5'-TCAATGGACTGAACCAGATGA-3' 5'-CCTTGAGGAATGCTGGTGAT-3'

**Tabelle 14:** Primer für RT-PCR

Gen	Primer-Sequenz	Hybridisierungs-Temperatur [°C]	Zyklus-Zahl
murine COX2	5'-GGGTGATGAGCAACTATTCC-3' 5'-GCAGGGTACAGTTCCATGAC-3'	59,0	35
GAPDH	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3' 5'-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT -3'		

### 2.16.2 Durchführung der RT-PCR und qRT-PCR

Die RT-PCR der RNA aus Aorten wurde unter Verwendung des Qiagen® *OneStep-RT-PCR Kits* durchgeführt. Es wurden 100 ng Gesamt-RNA pro Ansatz verwendet und entsprechend den Herstellerangaben weiter verfahren.

Um quantitative Aussagen über die Expressionslevel der betreffenden Gene machen zu können wurden diese zusätzlich mittels qRT-PCR untersucht. Die Quantifizierung der gebildeten doppelsträngigen DNA erfolgte mittels Fluoreszenzmessung innerhalb bzw. am Ende des PCR-Zyklus. Die Fluoreszenz nimmt proportional zu den gebildeten PCR-Produkten zu. Für die quantitative *real-time*-PCR wurden Aliquots von 1000 ng Gesamt-RNA zur Synthese von cDNA mittels des *Superscript™III First-Strand synthesis* – Systems (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Reaktionen der PCR wurden auf einer Opticon 1 (MJ-Research, Waltham, MA, USA) Platte mittels *SYBR Green® PCR Master Mix* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt anhand derer die Anzahl der amplifizierten Produkte überprüft wurde. Zum Vergleich der relativen Expressionslevel wurde die  $2^{[\Delta\Delta C(T)]}$  Methode benutzt. Jede Probe wurde als Dreifachbestimmung analysiert und die mittleren Werte daraus verglichen.

### 2.16.3 Densitometrische Auswertung

Die RT-PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in 2 %-igen Ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen analysiert und densitometrisch ausgewertet. GAPDH wurde als interner Standard koamplifiziert und das Verhältnis zwischen den Intensitäten der Banden für das jeweilige Gen und der GAPDH-Intensität gebildet.

## 2.17 Isolierung und Analyse von Proteoglykanen aus Aorten

### 2.17.1 Isolierung der Proteoglykane

Die von anhängendem Gewebe befreite thorakale und abdominale Aorta wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und lyophilisiert. Um die Menge an isolierten Proteoglykanen auf das Gesamtgewicht zu normalisieren, wurde das Trockengewicht der einzelnen Aorten bestimmt. Aus den trockenen, homogenisierten Aorten wurde mit

1 ml Extraktionspuffer für 12 h bei 4 °C Protein extrahiert. Zum Austausch des Lösungsmittels wurde der guanidinhaltige Extrakt per Gelfiltration über 4 ml Sephadex G50 Säulen eluiert. Die Säulen wurden zuvor mit 9 ml 8 M Harnstoffpuffer äquilibriert und mit 1,5 ml Harnstoff-Elutionspuffer eluiert. Der Harnstoffextrakt wurde analog der von Kinsella *et al.*<sup>81</sup> beschriebenen Methode zur Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Säulen appliziert. Western-Blots für Decorin und Biglycan wurden ebenfalls analog zu Kinsella *et al.*<sup>81</sup> wie im Folgenden beschrieben angefertigt. Es wurden jeweils auf das Gesamtrockengewicht bezogen gleiche Mengen Proteoglykane aufgetragen.

### **2.17.2 Enzymatischer Abbau der Proteoglykan-Seitenketten von Biglycan und Decorin**

Da die beiden Antikörper LF106 und LF113 gegen Biglycan und Decorin an das Kernprotein binden, musste dieses durch Verdau der Chondroitinsulfat-Seitenketten zugänglich gemacht werden. Dazu wurden die isolierten Proteoglykane mit Chondroitin ABC Lyase (EC 4.2.2.4, Seikagaku), einer Exoglykosidase, die spezifisch Chondroitinsulfat und Dermatansulfat in Disaccharide spaltet, verdaut. Die isolierten Proteoglykane wurden über einen Zeitraum von 3 h bei 37 °C verdaut.

### **2.17.3 Auftrennung der Proteine mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung der Proteoglykane erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli<sup>82</sup>. Zur Fokussierung wurde für 15 min eine Spannung von 120 V angelegt, die anschließend auf 160 V erhöht wurde. Die Acrylamid-Konzentration des Sammelgels betrug 5 % und die des Trenngels 10 %. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Elektrophoresekammer mit 1x Laufpuffer, der 0,1 % SDS enthielt. Als Molekulargewichtsmarker diente ein Proteinstandard (~10-180 kDa; Fermentas, St. Leon-Roth).

### **2.17.4 Proteintransfer**

Die Proteine wurden mittels einer *Semi-Dry-Blotting*-Apparatur auf eine Protran Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Der Transfer erfolgte mit Blot-Puffer bei 15 V für 30 min.

### **2.17.5 Hybridisierung und Detektion der Proteine**

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran für 1 h bei RT mit *ECL-Advanced Blocking Reagenz* in TBST prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit dem Primärantikörper, ebenfalls verdünnt in *ECL-Advanced Blocking Reagenz*-Lösung bei 4 °C über Nacht. Um überschüssigen, nicht gebundenen Primärantikörper von der Membran zu entfernen wurde mit TBST gewaschen und

darauf folgend für eine Stunde bei RT mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in TBST hybridisiert. Dieser wurde ebenfalls mit TBST ausgewaschen und die Proteine mittels *Lumi-Light* Western Blotting Substrat nach Angaben des Herstellers detektiert. Die resultierende Chemilumineszenz an Stellen der Hybridisierung führt zur Belichtung eines Röntgenfilms (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und wird nach Entwicklung und Fixierung als dunkle Bande sichtbar.

Nach Scannen der belichteten Filme erfolgte die quantitative Auswertung durch densitometrische Analyse der Banden mit der *Quantity One*<sup>®</sup> Software.

### **2.17.6 Entfernung von Primär- und Sekundärantikörpern von Nitrozellulosemembranen (*Strippen*)**

Um das Verhältnis von Biglycan zu Decorin innerhalb einer Probe abschätzen zu können, wurde nach der Detektion des Sekundärantikörpers die Membran getrocknet. Zur erneuten Hybridisierung mit einem weiteren Primärantikörper (LF113) wurde die Membran von den zuvor gebundenen Primär- und Sekundärantikörpern befreit. Dies erfolgte durch Erhitzen auf 65 °C in *Stripping*-Puffer für 40-50 min. Die Membran wurde in TBST gewaschen und zur Sättigung unspezifische Bindungsstellen wie oben beschrieben mit *ECL-Advanced Blocking Reagenz* prähybridisiert. Die weitere Hybridisierung und Detektion der Proteine erfolgte ebenfalls analog der oben beschriebenen Methode.

## **2.18 Histologische Analyse der atherosklerotischen Plaques**

### **2.18.1 Paraffinschnitte**

Das Gewebe wurde für 6 h in Lillie-Puffer fixiert und anschließend maschinell im Autotechnikon dehydriert und in Paraffin eingebettet. Für anschließende Färbungen wurden 3 µm dicke aufeinander folgende Schnitte vom gesamten Aortenursprung angefertigt. Von der gesamten *Arteria brachiocephalica* wurden ebenfalls Serienschnitte in 3 µm Dicke angefertigt. Für die Herstellung von Paraffinschnitten der Neointimahyperplasie der linken Karotis wurden beide Karotiden senkrecht in Paraffin gebettet und 5 µm dicke Serienschnitte des gesamten Gefäßes angefertigt. Dabei wurden jeweils 5 Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen. Vor der weiteren Lagerung wurden die Schnitte bei 60 °C hitzefixiert um ein späteres Ablösen während der Färbeprozedur zu verhindern.

### **2.18.2 Gefrierschnitte**

Gewebe für Gefrierschnitte wurde in 4 % PFA für maximal 4 h fixiert und danach für kurze Zeit zur Kryoprotektion in Sucrose-Lösung (20 % in PBS) gelagert. Um Risse im Gewebe zu vermeiden wurden die Gewebeprobe in *TissueTek*-Einbettmedium bei konstant -40 °C in Isopentan eingefroren. Bis zur Anfertigung der Schnitte wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Die entsprechenden Schnitte vom Aortenursprung (14 µm) wurden bei -20 °C angefertigt. Um Feuchtigkeitsniederschläge auf den Objektträgern zu verhindern, wurden diese unter kaltem Luftstrom getrocknet und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung unter Ausschluss von Feuchtigkeit gelagert.

### **2.18.3 en face Lipidfärbung**

Öl-Rot-O ist ein Farbstoff, der Lipide im Gewebe rot anfärbt und somit zur Darstellung lipidreicher atherosklerotischer Plaques geeignet ist. Die fixierten Aorten wurden in 78 % MeOH gewaschen um PFA-Reste zu entfernen und für 90 min in Öl-Rot-O-Färbelösung gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch erneutes Waschen mit 78 % MeOH entfernt. Die gefärbten Aorten wurden bis zur Dokumentation in 1x PBS bei 4 °C für wenige Tage gelagert. Die Dokumentation erfolgte mittels Stereomikroskop und dazugehöriger Kamera.

### **2.18.4 Öl-Rot-O-Färbung von Gefrierschnitten**

Die Gefrierschnitte wurden in 10 % eiskaltem Formalin nachfixiert und in Propylenglykol dehydriert, für 8 min in 60 °C warmer Öl-Rot-O-Lösung gefärbt und in Propylenglykol und destilliertem H<sub>2</sub>O entfärbt. Kerne wurden mit Hämalaun nach Meyer angefärbt. Abschließend wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt.

### **2.18.5 Siriusrot-Färbung**

Zur Darstellung des Kollagens im Gewebe von Paraffin- und Gefrierschnitten wurde mit Picro-Siriusrot nach der von Puchtler *et al.*<sup>83</sup> beschriebenen Methode gefärbt. Mit dieser Färbung lässt sich sowohl Kollagen selber als auch die Dichte der Faseranordnung bestimmen. Dicht angeordnete Fasern erscheinen im polarisierten Licht rot, locker angeordnete Fasern erscheinen grün.

### **2.18.6 Kalziumfärbung nach von Kossa**

Die Methode wurde zur Darstellung von kalzifiziertem Gewebe verwendet. Kalziumionen aus Karbonaten und Phosphaten werden in dieser Methode gegen Silberionen ausgetauscht, welche anschließend zu metallischem Silber reduziert werden. Paraffinschnitte wurden unter direkter Lampenbeleuchtung für eine Stunde in einer 5 % AgNO<sub>3</sub>-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Restliches, nicht reagiertes

Silber wurde durch Waschen in Natriumthiosulfatlösung entfernt. Kerne wurden mit Neutralrot gefärbt und die Schnitte mit Aquatex eingebettet.

### **2.18.7 Eisennachweis bei Einblutungen in atherosklerotische Plaques mittels Berliner Blau**

Eisenablagerungen in Form von Hämosiderin wurden mittels eines blauen Komplexes aus  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  dargestellt. Dazu wurden Paraffinschnitte in einer sauren Lösung von  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  für 15 min inkubiert. Kerne wurden mit Neutralrot gefärbt und die Schnitte in Aquatex eingebettet.

### **2.18.8 Pentachromfärbung nach Movat**

Um die Gesamtdeposition der EZM im Zusammenhang beurteilen und Thrombosen der *A. carotis sinistra* histochemisch definieren zu können, wurden Paraffinschnitte nach Movats<sup>84</sup> gefärbt. Proteoglykane wurden mit 1 % Alcian-Blau-Lösung gefärbt. Kerne und elastische Fasern wurden mit Musto-Elastin-Lösung schwarz gefärbt. Glatte und quer gestreifte Muskulatur sowie Fibrin wurden mit Crocein Scarlet/Fuchsinsäure-Lösung rot angefärbt und mit Phosphowolframsäure differenziert. Kollagenfasern wurden mit alkoholischer Safranlösung angefärbt.

### **2.18.9 Orcein-Färbung für elastische Fasern**

Die *Lamina elastica interna*, eine Schicht elastischer Fasern, stellt die Grenze zwischen Media und Intima dar. Um die Größe der Neointima im Neointimahyperplasie-Modell genau bestimmen zu können, wurde diese Grenze mittels Orcein-Färbung definiert. Dazu wurden die hydrophilisierten Schnitte für 30 min bei 37 °C in Orcein-Färbelösung gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde mit 70 %-igem EtOH entfernt und die Kerne mit Hämalan nach Meyer gegengefärbt.

### **2.18.10 Immunhistochemische und affinitätshistochemische Färbungen**

Paraffinschnitte wurden hydrophilisiert, Gefrierschnitte in Formalin nachfixiert. Zur Blockierung endogener Peroxidasen, für den Nachweis mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Zweitantikörpern, wurden die Schnitte mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung inkubiert. Zur Reduktion des Hintergrundes in den Färbungen wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1 % BSA und 10 % FCS abgesättigt.

Die Schnitte wurden mit den entsprechenden Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte entweder über HRP-konjugierte Zweitantikörper und mittels der durch Peroxidase katalysierten Farbreaktion mit Diaminobenzidin (DAB), oder direkt durch Fluorochrom markierte Zweitantikörper. Die Kerne wurden bei nicht fluoreszierenden Zweitantikörpern mit Hämalan und bei fluoreszierenden Antikörpern mit Hoechst 33342 gefärbt.

Die Schnitte wurden anschließend entweder in Aquatex (bei DAB) oder in Vectashield Antifade Mounting Medium (bei Fluoreszenzfärbungen) eingebettet.

Um das Antigen für den Erstantikörper bei Proteoglykan-Färbungen zugänglich zu machen, wurden die Chondroitinsulfatketten vergleichbar der Prozedur beim Western-Blot mit Chondroitin ABC Lyase verdaut. Um die durch Formalinfixierung und Paraffineinbettung maskierte Antigenität von Kollagenneoepitopen, Mac 2 und Perlecan wieder zu erlangen, wurden die betreffenden Schnitte vor Inkubation mit dem Erstantikörper in Citratpuffer (pH 6) gekocht.

### **2.18.11 *In-situ*-Zymographie im Aortenursprung**

Die gelatinolytische Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen wurde an unfixierten Gefrierschnitten (10 µm) durch Modifikation der Methode nach Gallis *et al.*<sup>85</sup> nachgewiesen. Die Schnitte wurden zur Blockierung der MMP-Aktivität vor Inkubation mit *dye-quenched* Gelatine (FITC konjugierte DQ™ Gelatine) für 1 h entweder mit den MMP-Inhibitoren 10 mM 1,10-Phenanthrolin oder 10 µM TIMP-1 behandelt oder als weitere Negativkontrolle bei 4 °C mit DQ™ Gelatine inkubiert. Bei dieser Temperatur sind MMPs inaktiv. Nach Vorinkubation mit oder ohne Inhibitoren wurden die Schnitte mit DQ™ Gelatine überschichtet, die zusätzlich Hoechst 33342 als Kernfarbstoff und den jeweiligen Inhibitor enthielt, und für 72 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Gelatinolytische Aktivität wurde durch FITC-Emission angezeigt. In Bereichen gespaltener Gelatine kam es zur räumlichen Trennung von *Quencher* und FITC, so dass hier das Fluoreszenzsignal detektierbar wurde.

## **2.19 Auswertung von histologischem Material**

### **2.19.1 Mikroskop**

Alle lichtmikroskopischen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Olympus BX 50 Mikroskop mit aufgesetzter Colorview II Kamera gemacht. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden die der Färbung entsprechenden Filter verwendet und die Bilder mit Hilfe der *Soft Imaging System*-Software übereinander gelagert. Die Größe der atherosklerotischen Plaques sowie die weitere Gefäßmorphometrie wurden ebenfalls mit der *Soft Imaging System*-Software analysiert.

Zur Darstellung der Packungsdichte der Kollagenfasern in der Siriusrotfärbung wurde ein Polarisationsfilter in den Lichtkanal des Mikroskops geschoben.

Die *en face*-Lipidfärbung der gesamten Aorta wurde mittels Zeiss Stemi 2000C Stereomikroskop mit einer geringeren Vergrößerung und einer *Canon Power Shot G6*-Kamera dokumentiert.

### 2.19.2 Quantitative Auswertung mittels *ImageJ*

Zur quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen sowie der anderen histologischen Untersuchungen wurde *ImageJ 1.37v software*<sup>1</sup> verwendet. Mittels dieser Software wurden die Farbkanäle für die Kernfärbung von denen für die jeweilige Zielstruktur getrennt. So konnte das Farbsignal der Zielstruktur einzeln quantitativ ausgewertet werden. Die jeweils spezifisch gefärbten Bereiche wurden über einen manuell festgelegten Schwellenwert definiert. Durch diese Schwelle wurden oberhalb des Wertes liegende Bereiche als positiv gefärbt definiert und in Prozent der Oberfläche der atherosklerotischen Plaques inklusive Media ausgedrückt. Unter dem Schwellenwert liegende Werte wurden als Hintergrund eliminiert. Der Schwellenwert wurde für alle Schnitte einer Färbung konstant gehalten.

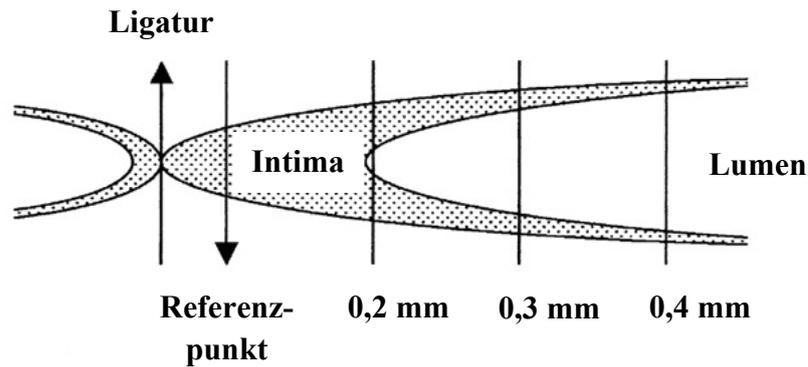
Da die Färbungen in humanem Gewebe stark schwankende Intensitäten des Farbsignals zeigten, wurde die Intensität des positiven Farbsignals in die Auswertung mit einbezogen. Dafür wurden die Parameter „Prozent Fläche“ und „mittlere Intensität“ multipliziert und normalisiert. Der Parameter „Prozent Fläche“ ist definiert als die angefärbte Fläche geteilt durch die Gesamtfläche. Die „mittlere Intensität“ ergibt sich aus der mittleren Intensität des jeweiligen Farbsignals.

### 2.19.3 Histologische Analyse der Neointimahyperplasie

Da die Dicke der nach der Ligatur der linken Karotis entstehenden Neointima von der Ligatur aus betrachtet kontinuierlich abnimmt (s. Abb.11), muss diese an verschiedenen Stellen der Karotis bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde, wie in Abschnitt 2.18.1 erwähnt, die gesamte Karotis ab dem Referenzpunkt geschnitten und je fünf Schnitte auf einen Objektträger gezogen. Der Referenzpunkt ist als der erste Schnitt, der frei von Nahtmaterial ist definiert. Zum Vergleich der Größe der Neointimafläche der einzelnen Tiere, wurden ab dem Referenzpunkt alle 500 µm vermessen. Von den resultierenden Werten wurde der Mittelwert gebildet und verglichen.

---

<sup>1</sup> (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)



**Abbildung 11:** Schematische Übersicht der Neointima entlang der Arteria carotis communis nach Erzeugung einer Neointimahyperplasie durch Ligatur an der Bifurkation zur A. carotis interna und A. carotis externa. Abbildung aus de Waard et al<sup>86</sup>.

## 2.20 Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Das Signifikanzniveau P für  $\alpha$  wurde mit 0,05 festgelegt. Signifikante Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen ( $\geq 3$ ) wurden mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche überprüft. Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mittels ungepaartem „Student’s t-Test“ überprüft. Das Konfidenzintervall wurde mit 95 % festgelegt. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit *GraphPad Prism-Software* (Version 4.00, GraphPad Software, San Diego, USA).

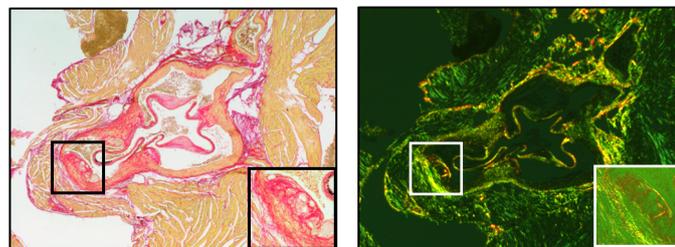


## 3 Ergebnisse

### 3.1 Rosuvastatin-Behandlung von ApoE-knockout-Mäusen

Ziel der Studie war die Untersuchung des Einflusses von Rosuvastatin auf die Matrix sowie die Progression atherosklerotischer Läsionen im Mausmodell. Zu diesem Zweck wurde das Modell der ApoE-knockout-Maus gewählt. In diesem Modell entwickeln die Mäuse spontan ab einem Alter von 4–5 Wochen atherosklerotische Plaques. Fibrotische Plaques entstehen ab einem Alter von 20 Wochen in der *A. brachiocephalica* und dem Aortenursprung<sup>87</sup>. Im Rahmen der Statinbehandlung beim Menschen ist davon auszugehen, dass bei Behandlungsbeginn bereits atherosklerotische Läsionen im arteriellen System vorliegen. Um diese klinischen Bedingungen zu imitieren, wurden die Mäuse ab einem Zeitpunkt, an dem bereits definierte atherosklerotische Läsionen vorlagen, sehr langfristig behandelt.

Die Tiere wurden ab einem Alter von 20 Wochen mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin pro Tag gefüttert. Zu diesem Zeitpunkt haben sich bereits kleine atherosklerotische Plaques im Aortenursprung der noch unbehandelten Tiere gebildet (s. Abb.12). Diese weisen eine lockere Kollagenmatrix (Typ III Kollagen) auf, was an der Grünfärbung im polarisierten Licht zu erkennen ist. Rot-orange gefärbte Gebiete deuten auf eine erhöhte Packungsdichte (Typ I Kollagen) hin, wie es von Burke *et al.*<sup>88</sup> beschrieben wurde.



lichtmikroskopisch

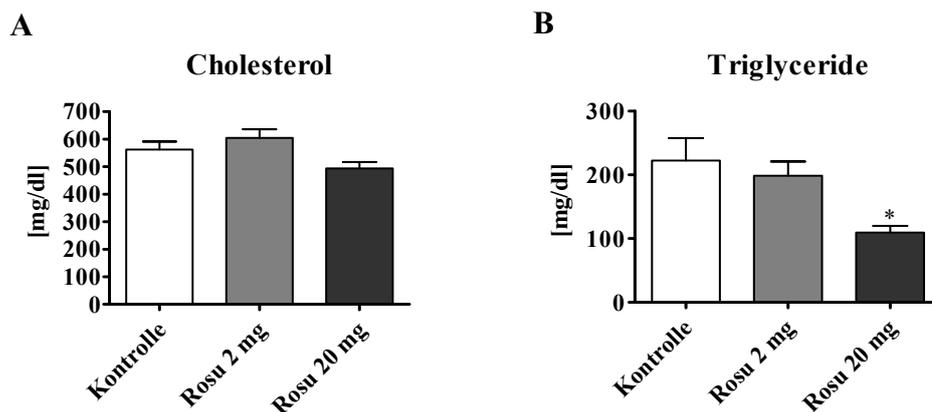
unter polarisiertem Licht

**Abbildung 12:** Mit Picro-Siriusrot gefärbte atherosklerotische Plaques im Aortenursprung von unbehandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 20 Wochen, 40-fache Vergrößerung; Ausschnitte in 200-facher Vergrößerung zeigen die atherosklerotischen Plaques. Links lichtmikroskopisch und rechts unter polarisiertem Licht betrachtet. In rot ist im rechten Bild Kollagen dargestellt. Die Grünfärbung im polarisierten Licht deutet auf eine lockere Packungsdichte der Kollagenfasern hin.

Im Folgenden werden die Ergebnisse beschrieben, welche nach einer Behandlungsdauer von 32 Wochen mit Rosuvastatin erhoben wurden.

### 3.1.1 Körpergewicht und Lipidgehalt des Plasmas

Rosuvastatin wird beim Menschen zur Senkung des Cholesterolspiegels im Blut eingesetzt. Verschiedene atheroprotektive, pleiotrope Effekte der gesamten Gruppe der Statine beruhen jedoch nicht auf der Senkung des Cholesterols. ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse sind für die Untersuchung der pleiotropen Effekte besonders geeignet, da Statine in diesen Tieren keine Senkung des Plasmacholesterolspiegels hervorrufen. Aus diesem Grund wurden der Lipidgehalt des Plasmas sowie das Körpergewicht der Tiere zum Ende der Behandlungszeit verglichen. Behandelte Tiere zeigten in beiden Dosierungen eine signifikant erhöhte Körpermasse im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle: 30,38 g ± 0,46 g; Rosu 2 mg: 32,44 g ± 0,58 g; Rosu 20 mg: 32,38 g ± 0,50 g; n = 18 – 39 Tiere; p < 0,05). Der Cholesterolplasmaspiegel war jedoch nicht erhöht (Abb. 13A). Allerdings zeigte sich in der Gruppe der Tiere, die mit 20 mg Rosuvastatin behandelt wurden, eine Senkung der Triglyceridkonzentration im Plasma (Abb. 13B).

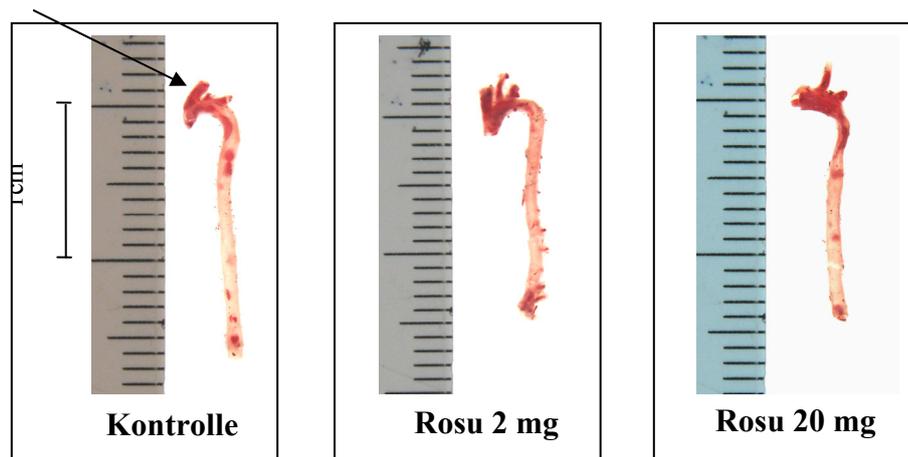


**Abbildung 13:** Analyse der Lipidkonzentrationen im Plasma von unbehandelten Tieren und nach 32 Wochen Behandlung mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin. **A**, Cholesterolkonzentration im Plasma von mg/dl von n = 11 - 17 Tieren. **B**, Triglyceridkonzentration im Plasma von mg/dl von n = 10 - 17 Tieren. \*, p < 0,05 vs. Kontrolle.

### 3.1.2 Quantifizierung der Atherosklerose und des Lipidgehaltes

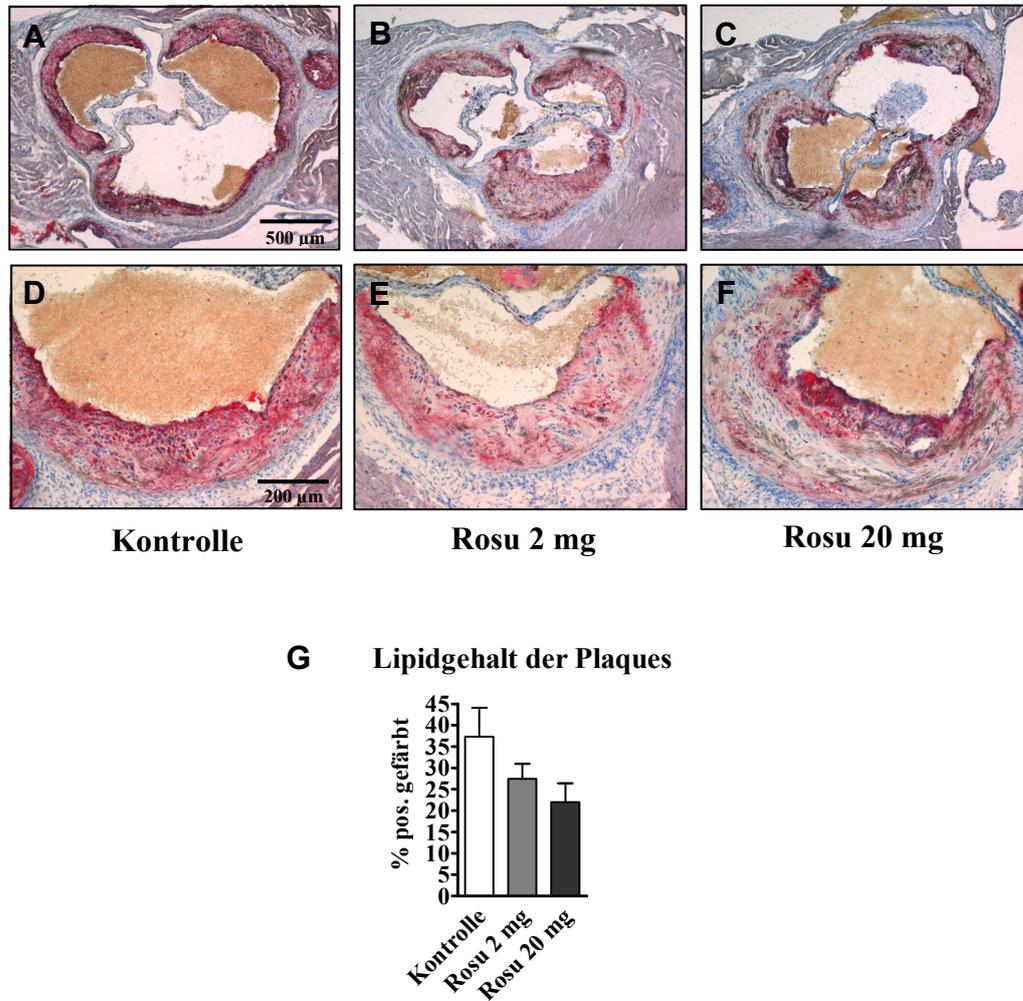
Mittels Öl-Rot-O-*en face*-Färbung konnte die Verteilung der atherosklerotischen Plaques entlang der Aorta und des Aortenbogens ermittelt werden. Die rot gefärbten Areale deuten auf eine Ansammlung lipidreichen Gewebes und somit auf atherosklerotische Plaques hin. Im Bereich des Aortenbogens zeigte sich die stärkste Anhäufung von lipidreichen atherosklerotischen Plaques, was auf die besonderen Flussbedingungen in diesem Bereich zurückzuführen ist. Der restliche Bereich der thorakalen und abdominalen Aorta zeigte sporadisch auftretende atherosklerotische Plaques, die nicht an fest definierten Stellen auftraten. Aus diesem Grund wurden für weitere histochemische Analysen der atherosklerotischen Plaques der Bereich des Aortenursprungs und der *A. brachiocephalica* (s. Pfeil in Abb. 14) gewählt. In Abb. 14 ist exemplarisch die Plaqueverteilung dargestellt. Innerhalb der einzelnen Gruppen zeigte sich kein Unterschied in Größe und Anzahl der atherosklerotischen Plaques.

*A. brachiocephalica*



**Abbildung 14:** Verteilung der atherosklerotischen Plaques entlang der thorakalen und abdominalen Aorta von unbehandelten und mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. Mittels Öl-Rot-O-*en face*-Färbung wurde fettreiches Plaquegewebe rot dargestellt. Exemplarische Darstellung für  $n = 3$  Aorten. Der Großteil der atherosklerotischen Plaques wurde im Aortenbogen und den Abgängen wie der *A. brachiocephalica* (s. Pfeil) gefunden.

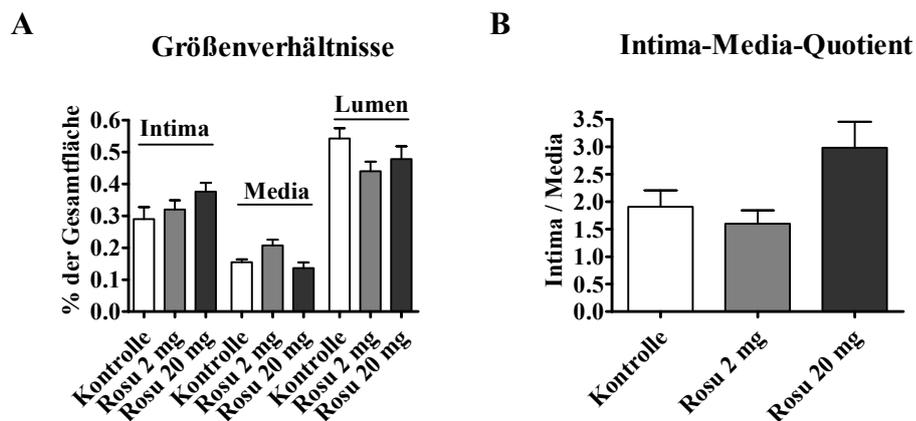
Bei genauerer Analyse des Lipidgehaltes der atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs zeigte sich ein Trend zu einer konzentrationsabhängigen Senkung nach Rosuvastatin-Behandlung (Abb. 15). Dazu wurden Gefrierschnitte mit Öl-Rot-O, ähnlich der Methode für die gesamte Aorta, gefärbt.



**Abbildung 15:** Lipidgehalt der atherosklerotischen Plaques im Aortenursprung im Alter von 52 Wochen. Öl-Rot-O-Färbung stellt den Lipidgehalt der atherosklerotischen Plaques in rot dar. **A,B,C** 40x vergrößert; **D,E,F** 100x vergrößert. Exemplarische Darstellung aus  $n = 4 - 5$  Tieren. **G**, Bildanalytische Quantifizierung durch ImageJ.

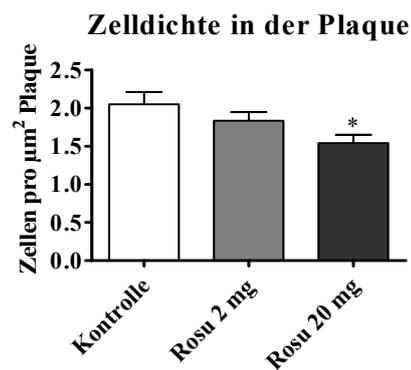
### 3.1.3 Morphometrie der atherosklerotischen Läsionen im Aortenursprung

Anhand der Öl-Rot-O-Färbung ist die Grenze zwischen Intima und Media gut erkennbar, so dass an dieser Färbung eine morphometrische Analyse des Aortenursprungs vorgenommen wurde. Die Größe der Fläche von Media, Intima und des Lumens zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 16A). Die Größe der Aortenursprünge verschiedener Tiere unterlag starken Schwankungen, wodurch die Größe der atherosklerotischen Plaques aufgrund dieser interindividuellen Schwankungen nicht direkt verglichen werden konnte. Die Einführung eines unabhängigen Parameters, das Verhältnis aus Intima und Media (Intima-Media-Quotient), erlaubte eine standardisierte Beurteilung der Plaquegröße im Aortenursprung. Bei Tieren, die mit 20 mg Rosuvastatin behandelt wurden zeigte sich ein deutlicher Trend zu einem erhöhten Intima-Media-Quotienten. Dies ist ein Hinweis auf größere atherosklerotische Plaques im Verhältnis zu den mit 2 mg behandelten sowie den unbehandelten Tieren (Abb. 16B).



**Abbildung 16:** *A*, Größe der atherosklerotischen Plaques, der Media und des Lumens im Aortenursprung von unbehandelten und mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren im Alter von 52 Wochen. Vergleich von  $n = 3 - 5$  Tieren. *B*, Bestimmung des Intima-Media-Quotienten von unbehandelten und mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren,  $n = 4 - 5$ , als normalisierter Vergleich der Plaquegröße.

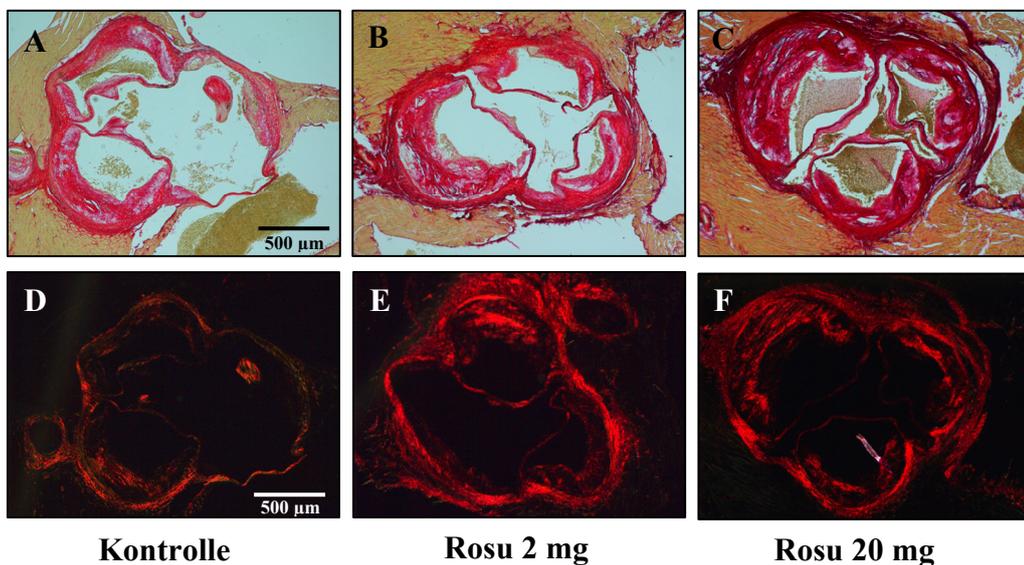
In der Öl-Rot-O-Färbung sind des Weiteren Zellkerne innerhalb der Intima besonders gut zu erkennen. Aus diesem Grund wurde anhand dieser Färbung die Zellzahl der atherosklerotischen Plaques im Aortenursprung bestimmt und auf die Fläche der Plaques bezogen. Die so resultierende Zelldichte gibt erste Hinweise über die Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaque. Rosuvastatin behandelte Tiere zeigten eine konzentrationsabhängig reduzierte Zelldichte in der atherosklerotischen Plaque (Abb. 17), die bei den mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren signifikant war.

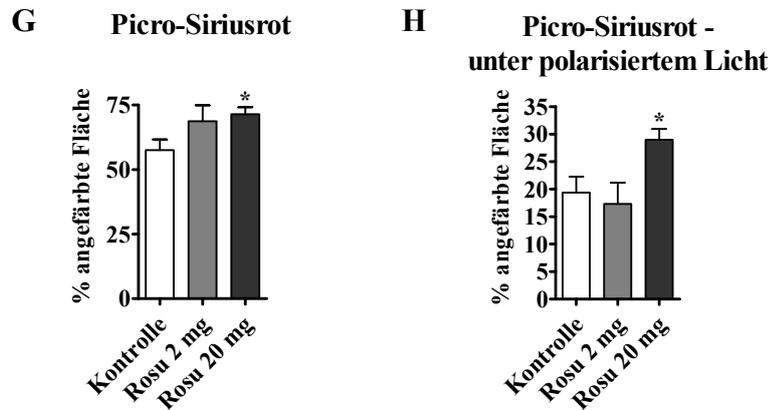


**Abbildung 17:** Zelldichte der atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs von mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren im Alter von 52 Wochen. Darstellung von  $n = 10$  atherosklerotischen Plaques. \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

### 3.1.4 Matrix-Analyse: Einfluss von Rosuvastatin auf Kollagen in den atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs

Kollagen stellt den mengenmäßig wichtigsten Protein-Bestandteil der EZM dar. In vorangegangenen Studien mit anderen Statinen konnte u.a. von Crisby *et al.*<sup>89</sup> gezeigt werden, dass es unter Statinbehandlung zu einer vermehrten Akkumulation von Kollagen kommt. Um zu überprüfen, ob dies auch für Rosuvastatin zutrifft, wurden atherosklerotische Plaques des Aortenursprungs mit Picro-Siriusrot gefärbt. Dieser rote Farbstoff lagert sich zwischen die Kollagenfibrillen und zeigt im polarisierten Licht den Dichtegrad der Fibrillen an. Im Alter von 52 Wochen hatte sich der Kollagengehalt aller atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs im Vergleich zum Behandlungsbeginn stark erhöht (Abb. 18). Aber nicht nur die Quantität des Kollagens veränderte sich während des Behandlungszeitraums, so zeigte sich auch eine erhöhte Packungsdichte der Kollagenfasern aller atherosklerotischen Plaques, wie an der Rotfärbung im polarisierten Licht deutlich wurde (Abb. 18D, E). Außerdem zeigte die Behandlung mit Rosuvastatin eine verstärkte Akkumulation von Kollagen (Abb. 18G). Auch die Dichte der Kollagenfasern in den behandelten Tieren stieg stark an (Abb. 18H). Diese Effekte waren am stärksten in der Gruppe der mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tiere ausgeprägt. Sowohl der Kollagengehalt als auch die Packungsdichte war in dieser Gruppe signifikant erhöht.



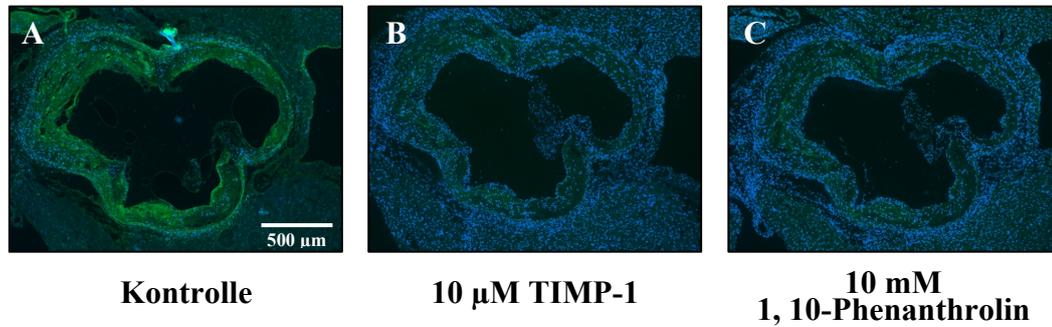


**Abbildung 18:** Exemplarische Darstellung Picro-Siriusrot-gefärbter Schnitte des Aortenursprungs von 52 Wochen alten Tiere, die mit 2 oder 20 mg Rosuvastatin oder Vehikel behandelt wurden. **A-C**, lichtmikroskopische Aufnahme in 40-facher Vergrößerung; hellrot gefärbte Bereiche stellen Gesamtkollagen dar. **D-F**; Betrachtung der oberen Bilder unter polarisiertem Licht. Rot gefärbte Bereiche zeigen speziell Kollagenfasern mit erhöhter Packungsdichte. **G**, Auswertung der in **A-C** dargestellten Versuche,  $n = 7 - 18$ ; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, **H**, Auswertung der in **D-F** dargestellten Versuche,  $n = 7 - 18$ ; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

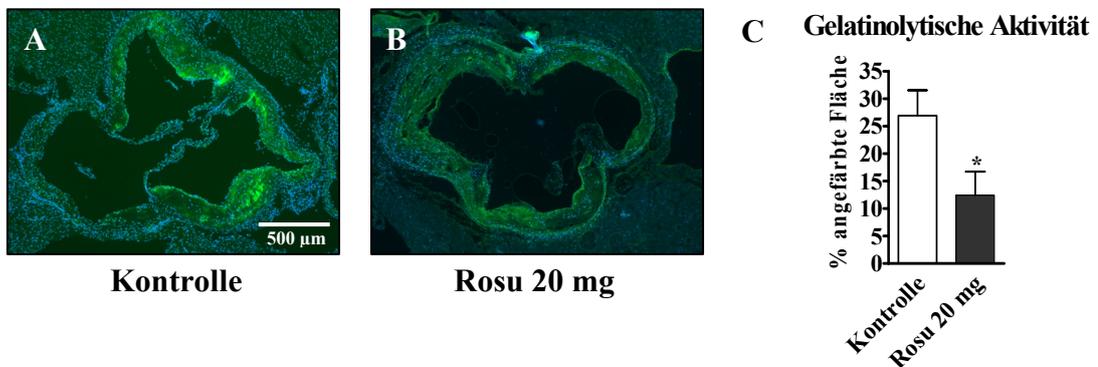
Da sich der stärkste Effekt in der Dosierung von 20 mg Rosuvastatin zeigte, wurde im Folgenden auf eine Behandlung mit 2 mg Rosuvastatin verzichtet.

Die in Abb. 18 dargestellten Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass der Abbau von Kollagen im Rahmen des Umbaus der Matrix in der Atherosklerose durch Rosuvastatin beeinflusst sein könnte. Um dies zu klären, wurde zunächst die Aktivität von Kollagen-abbauenden Gelatinasen bestimmt. Um die Aktivität genau lokalisieren zu können und um die Auswertungen auf atherosklerotische Plaques des Aortenursprungs zu konzentrieren, wurde das Verfahren der *in-situ*-Zymographie gewählt. Stellen erhöhter MMP-Aktivität wurden durch die Spaltung von *dye-quenched*-Gelatine dargestellt. Bereiche mit hoher gelatinolytischer Aktivität der MMPs erscheinen, aufgrund der Konjugation der Gelatine mit FITC, grün. Zur Überprüfung der Spezifität dieser Methode wurde die Aktivität der MMPs mit MMP-Inhibitoren blockiert. Dazu wurden die Proben mit 10  $\mu$ M TIMP-1 oder 10 mM 1,10-Phenanthrolin inkubiert. Es zeigte sich in konsekutiven Schnitten ein Ausbleiben der FITC-Emission durch die Behandlung mit den Inhibitoren (Abb. 19).

Die atherosklerotischen Plaques der mit Rosuvastatin behandelten Tiere zeigten eine signifikante Reduktion der Aktivität der Gelatinasen innerhalb der Plaques des Aortenursprungs (Abb. 20A-B). Die Aktivität wurde in Prozent der grün gefärbten Fläche relativ zur Gesamtplaqueeoberfläche dargestellt (Abb. 20C).

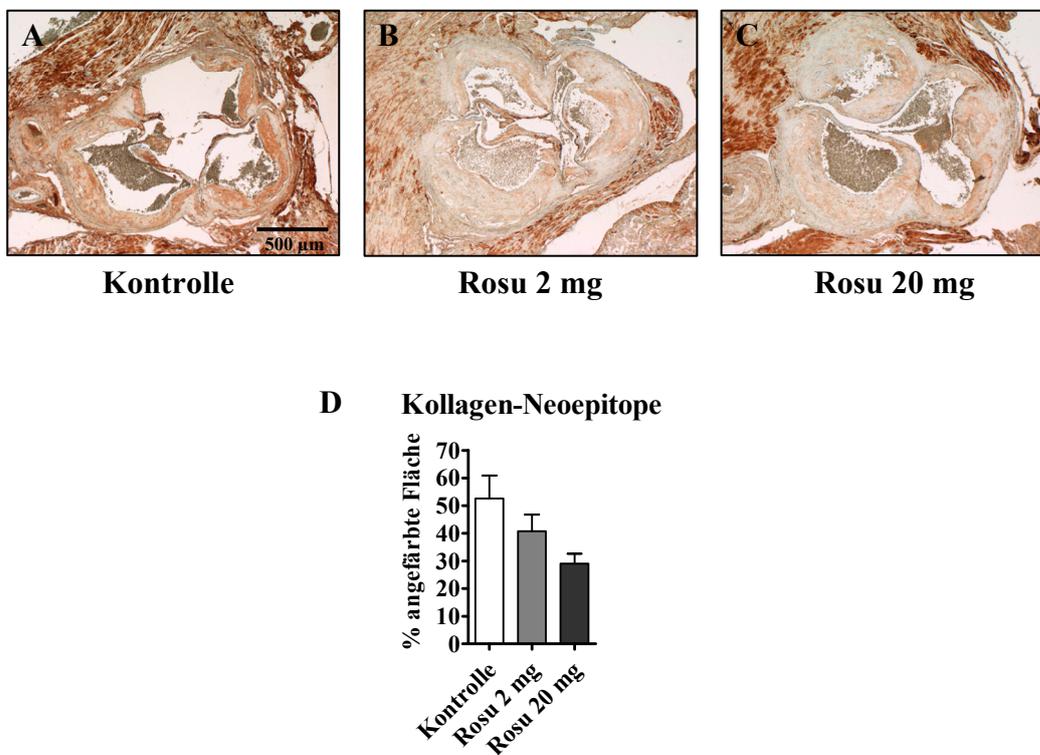


**Abbildung 19:** Überprüfung der Spezifität der in-situ-Zymographie an Gefrierschnitten des Aortenursprungs. Mit „dye-quenched“-Gelatine detektierte gelatinolytische Aktivität (FITC-Emission, grün) (A) wurde durch Inkubation mit den MMP-Inhibitoren TIMP-1 (B) und 1,10-Phenanthrolin (C) gehemmt.



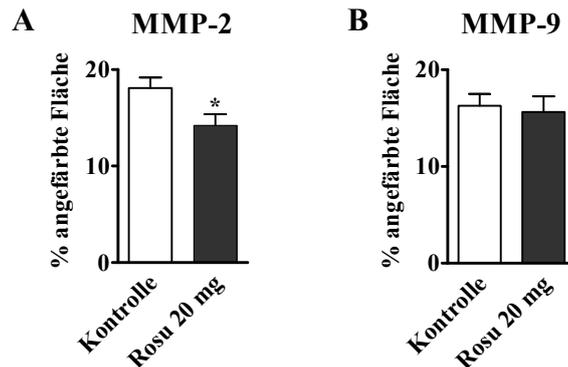
**Abbildung 20:** A-B, Bestimmung der gelatinolytischen Aktivität mittels in-situ-Zymographie in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs von unbehandelten und mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. Exemplarische Darstellung der Aortenursprünge von  $n = 8 - 9$  Tieren. C, Analytische Auswertung der Bilder mittels ImageJ; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Die Reduktion der Aktivität der MMPs durch Rosuvastatin in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs gibt allerdings noch keinen genauen Aufschluss über die zeitlich zurückliegende tatsächliche Spaltung von Kollagen. Für eine genauere Untersuchung wurde die Akkumulation so genannter Kollagenneoepitope nachgewiesen. Dies sind Produkte, die aus einer Spaltung durch MMPs resultieren und deshalb ebenfalls durch Rosuvastatin beeinflusst sein könnten. Dazu wurde für die immunhistochemische Analyse ein polyklonaler Antikörper verwendet, der Spaltprodukte von Kollagen Typ I und II detektiert. Genauer gesagt werden Fragmente am Carboxylende des nach Spaltung durch MMP-1, -8, -13 entstehenden  $\frac{3}{4}$ -Teiles der  $\alpha$ -Kette detektiert. Hier zeigte sich, dass auch die Akkumulation der gebildeten Kollagenneoepitope durch Rosuvastatin-Behandlung, wenn auch nicht signifikant, so doch mit einer deutlichen Tendenz reduziert wurde (Abb. 21).



**Abbildung 21:** A-C, Expression von Kollagenneoepitopen in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs von unbehandelten und mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. Exemplarische Darstellung von  $n = 4 - 5$  Aortenursprüngen. D, Auswertung der positiv gefärbten Areale (braun) bezogen auf die Gesamtplaquefläche mittels ImageJ.

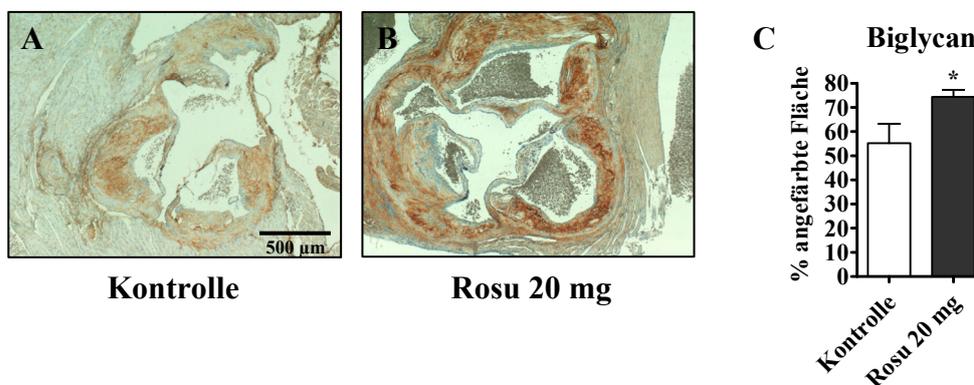
In der *in-situ*-Zymographie kann nicht zwischen verschiedenen MMPs unterschieden werden. Deshalb wurde die Expression der Gelatinasen A und B (MMP-2 und -9), die hauptsächlich für die Spaltung von Kollagen I verantwortlich sind, im Folgenden mittels immunhistochemischer Analyse untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von MMP-2 durch Rosuvastatin-Behandlung. Die Expression von MMP-9 dagegen blieb unbeeinflusst (Abb. 22).



**Abbildung 22:** Immunhistochemische Analyse der Expression von MMP-2 und -9 in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs von unbehandelten und mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. **A**, Darstellung der analytischen Auswertung der Bilder von atherosklerotischen Plaques mittels ImageJ von  $n = 10 - 12$  Aortenursprüngen für MMP-2; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle. **B**, Auswertung der positiv gefärbten Bereiche von  $n = 8 - 12$  Aortenursprüngen für MMP-9.

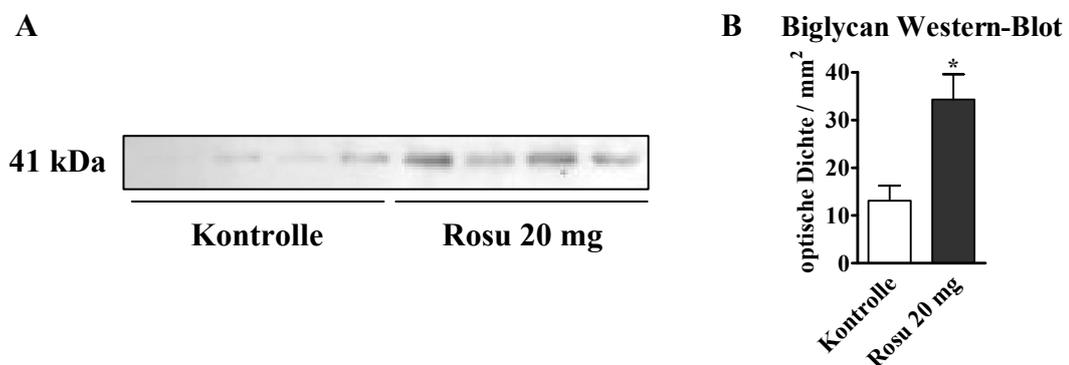
### 3.1.5 Einfluss von Rosuvastatin auf die Expression der kleinen leucinreichen Proteoglykane Biglycan und Decorin

Weitere wichtige Bestandteile der EZM, die im Verlauf der Atherosklerose eine Rolle spielen, sind Proteoglykane. Im Speziellen stellen die kleinen leucinreichen Proteoglykane (SLRP) eine Gruppe von Proteoglykanen dar, die mit Kollagen assoziiert sind. So besitzen die beiden SLRP Decorin und Biglycan eine Bindungsstelle für Kollagen im Kernprotein und können außerdem über ihre Glykolsaminoglykanseitenketten mit Kollagen in Wechselwirkung treten. Wie von Riessen *et al.*<sup>90</sup> beschrieben, sind diese beiden Proteoglykane an den gleichen Stellen wie Kollagen in atherosklerotischen Plaques exprimiert. Über einen Zusammenhang zwischen einer Behandlung mit Statinen und Veränderungen der Expression von SLRP ist bisher nichts bekannt. Aus diesem Grund wurde die Expression von Decorin und Biglycan in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert. Die Expression von Biglycan wurde durch die Behandlung mit Rosuvastatin signifikant erhöht (Abb. 23). Da sich die Expression im Aortenursprung nicht allein auf die Intima beschränkte, wurde zur Quantifizierung die Fläche der Media mit eingeschlossen.



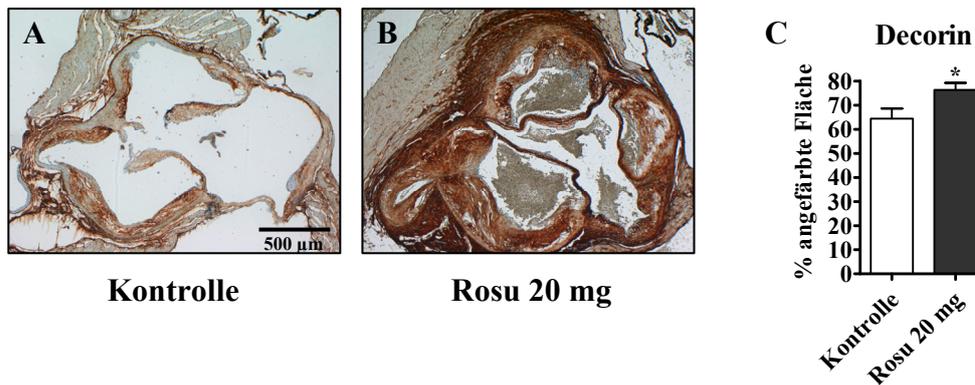
**Abbildung 23:** *A-B*, Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse der Expression von Biglycan in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs von unbehandelten und mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. Biglycan exprimierende Bereiche sind braun dargestellt. *C*, Analytische Auswertung der Bilder mittels ImageJ für  $n = 9 - 10$  Aortenursprünge. \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Zur weiteren Sicherung des Befundes einer verstärkten Expression von Biglycan in vaskulären atherosklerotischen Plaques von Rosuvastatin-behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, wurde die Expression in Homogenaten aus Aorten von behandelten und unbehandelten Tieren bestimmt. Es wurden Proteoglykane aus der thorakalen und abdominalen Aorta isoliert und mittels Western-Blot analysiert. Dazu wurden, auf das Trockengewicht der Aorta bezogen, gleiche Mengen Protein analysiert. Biglycan wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Kernprotein detektiert. Die entsprechende Bande erscheint auf dem Röntgenfilm in einer Laufhöhe von 41 kDa. Die Expression von Biglycan in der Aorta wurde signifikant durch die Behandlung mit Rosuvastatin erhöht (Abb. 24).



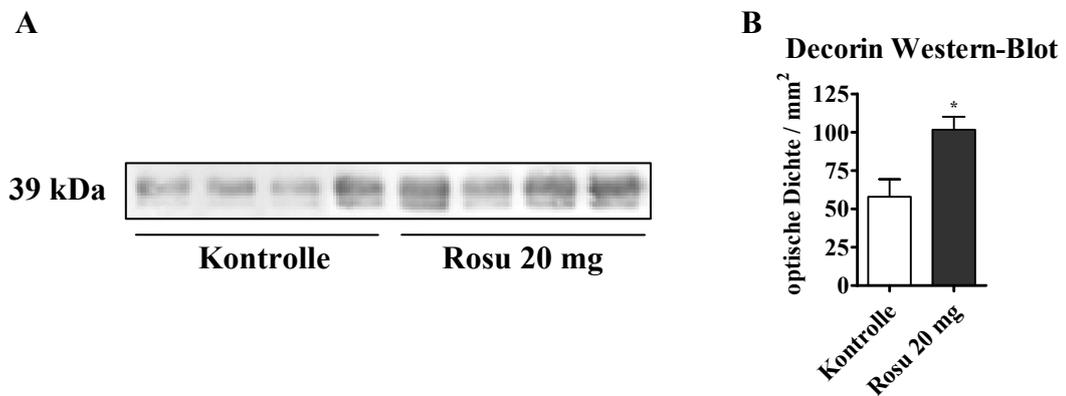
**Abbildung 24:** Protein-Expression des Kernproteins von Biglycan in Aorten von unbehandelten (Kontrolle) und mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren im Alter von 52 Wochen. **A**, Exemplarischer Western-Blots aus Aortenextrakten für Biglycan. **B**, Quantifizierung der Protein-Expression für  $n = 4$  Aorten; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Analog der Expression von Biglycan wurde die Expression von Decorin mittels immunhistochemischer Färbung des Aortenursprungs und Western-Blot aus Aortenhomogenaten bestimmt. In atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs mit Rosuvastatin behandelte Tiere wurde Decorin gegenüber der Kontrolle signifikant stärker exprimiert (Abb. 25).



**Abbildung 25:** *A-B*, Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Analyse der Expression von Decorin in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs von unbehandelten und mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. *C*, Quantifizierung der positiv gefärbten Bereiche (braun) mit ImageJ für  $n = 8 - 10$  Tiere. \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

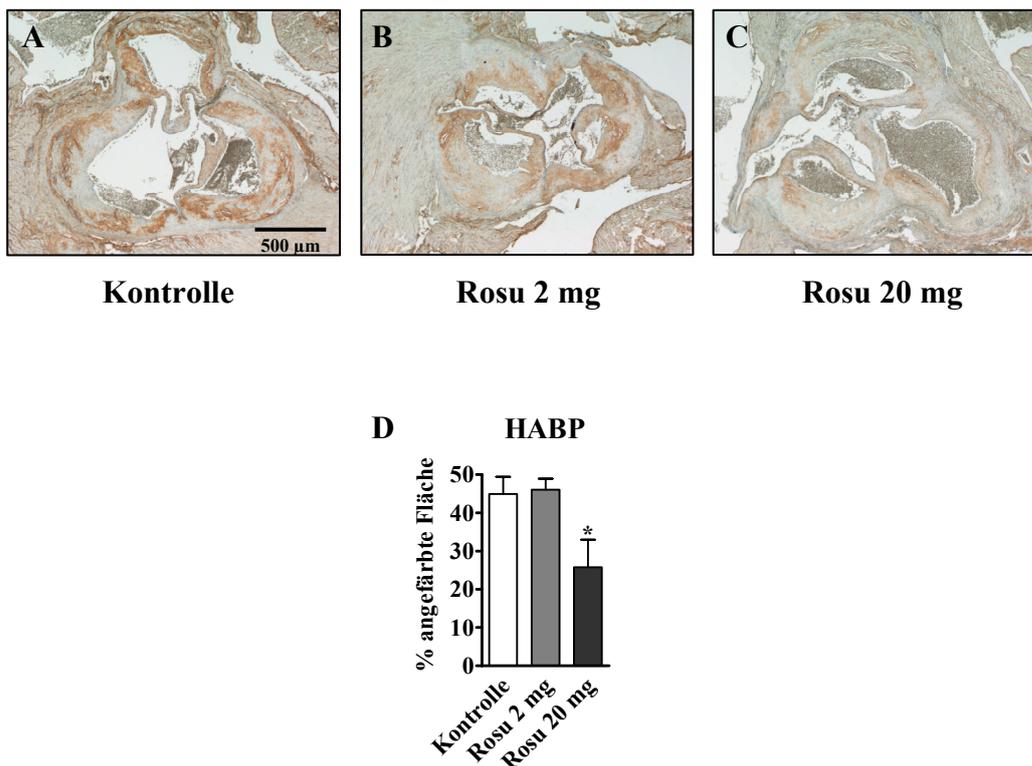
Die Expression des Kernproteins von Decorin in vaskulären atherosklerotischen Plaques aus Aortenhomogenaten wurde ebenfalls durch Western-Blot bestimmt. Decorin wurde in vergleichsweise höherer Konzentration als Biglycan in den atherosklerotischen Plaques der Mäuse exprimiert. Aus diesem Grund wurden die Nitrozellulosemembranen des Western-Blots für Biglycan von gebundenem Antikörper befreit und das verbleibende Protein hinsichtlich der Expression von Decorin analysiert. Diese Methode wurde gewählt um einen genaueren Vergleich zwischen Biglycan und Decorin zu erhalten. Decorin wurde ebenfalls mit einem polyklonalen Antikörper, welcher das Kernprotein detektiert, nachgewiesen. Die Kernproteine von Biglycan und Decorin sind annähernd gleich groß, so dass die entsprechende Bande für Decorin in einer Laufhöhe von 39 kDa als Doppelbande erscheint. Aus der Western-Blot-Analyse ergab sich eine signifikant erhöhte Expression von Decorin in den Aorten mit Rosuvastatin behandelte Tiere (Abb. 26).



**Abbildung 26:** Protein-Expression des Kernproteins von Decorin in Aorten von unbehandelten (Kontrolle) und mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren im Alter von 52 Wochen. **A**, Exemplarischer Western-Blots aus Aortenextrakten für Decorin. **B**, Quantifizierung der Protein-Expression für  $n = 4 - 5$  Aorten; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

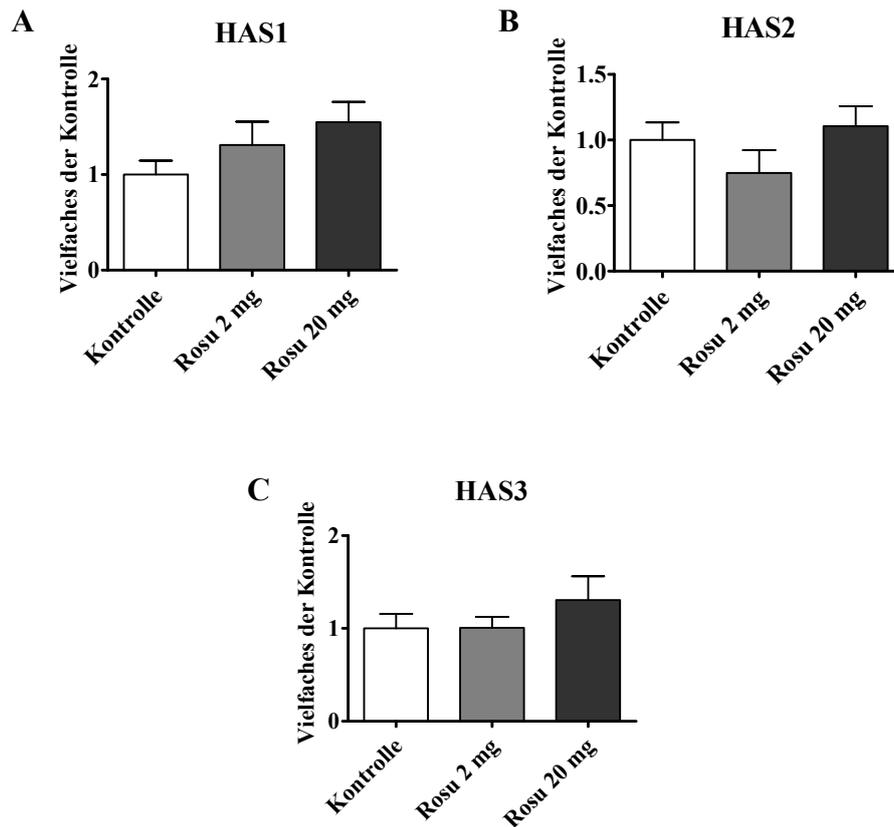
### 3.1.6 Einfluss von Rosuvastatin auf die Hyaluronsäure-Akkumulation in atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs

Das Glykosaminoglykan Hyaluronsäure (HA) ist ein weiterer Bestandteil der EZM atherosklerotischer Plaques. Es ist in diesen stark exprimiert und beeinflusst die Progression der Atherosklerose entscheidend durch die Bereitstellung einer proliferations- und migrationsfördernden Matrix. In humanen atherosklerotischen Plaques konnte von Wight *et al.*<sup>91</sup> gezeigt werden, dass HA vermehrt in Bereichen mit geringer Kollagendichte akkumuliert. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurden atherosklerotische Plaques des Aortenursprungs mittels Affinitätshistochemie für das HA-Bindeprotein (HABP) gefärbt (Abb. 27A-C). Von der Expression des HABP lässt sich direkt auf die Akkumulation von HA schließen. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von HA in der Intima der mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tiere (Abb. 27D). Weiterhin waren im Bereich der Media und der fibrotischen Kappe nur geringe Mengen HA akkumuliert.



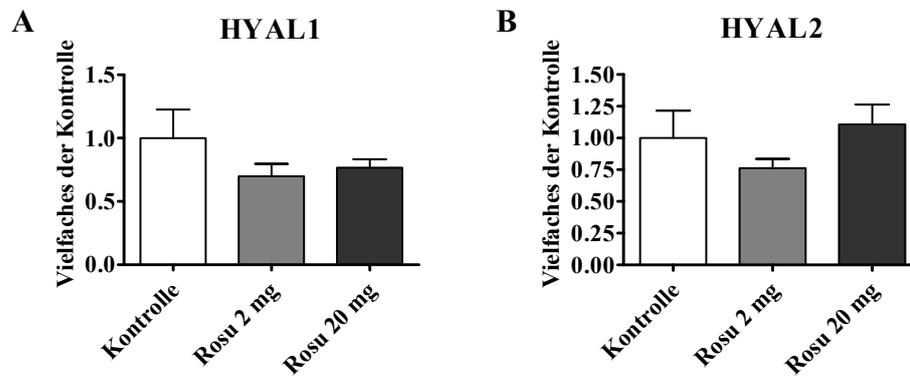
**Abbildung 27:** Affinitätshistochemie für HA in Aortenursprüngen von unbehandelten (Kontrolle) und mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. HA wurde über die Detektion des HA-Bindeproteins (HABP) nachgewiesen. **A-C,** Exemplarische Darstellung der affinitätshistochemischen Färbung im Aortenursprung. **D,** Quantifizierung der positiv gefärbten Bereiche (braun) von  $n = 5 - 6$  Aortenursprüngen mittels ImageJ; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Die an einem bestimmten Ort vorliegende Menge an HA wird durch die Expression der Hyaluronsäure-Synthasen einerseits und die Hyaluronidasen andererseits bestimmt. Deshalb wurde in der Aorta der dynamische Prozess des Auf- und Abbaus der HA auf Ebene der Genexpression mittels qRT-PCR untersucht. Keine der drei HA-Synthasen wurde von einer Behandlung mit Rosuvastatin beeinflusst (Abb. 28).



**Abbildung 28:** Quantitative real-time PCR zur Bestimmung der Genexpression von HAS-Isoformen aus mRNA-Extraktionen der thorakalen und abdominalen Aorta von unbehandelten (Kontrolle) und mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. **A**, HAS1-Expression. **B**, HAS2-Expression und **C**, HAS3-Expression,  $n = 7 - 10$ .

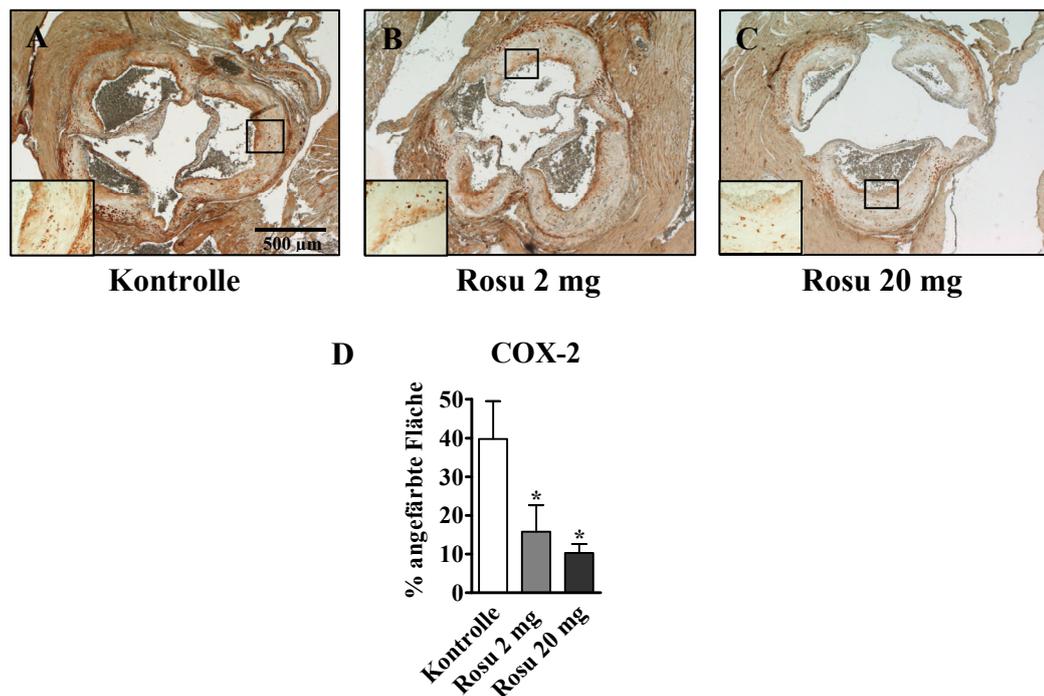
Die Expression der mRNA der beiden wichtigsten HA-abbauenden Enzyme, Hyal1 und Hyal2, in der Aorta ist in Abb. 29 dargestellt. Es konnte keine Beeinflussung der HYAL1 und -2-Expression festgestellt werden.



**Abbildung 29:** *Quantitative real-time PCR zur Bestimmung der Genexpression der HYAL-Isoformen aus mRNA-Extraktionen der thorakalen und abdominalen Aorta von unbehandelten (Kontrolle) und mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. A, HYAL1-Expression und B, HYAL2-Expression, n = 5 – 8.*

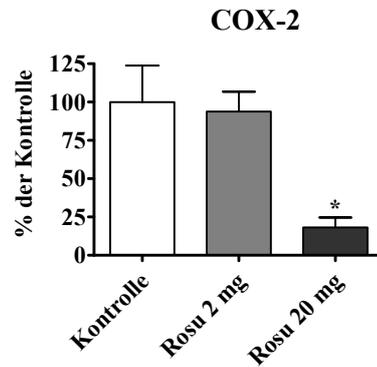
### 3.1.7 Einfluss von Rosuvastatin auf die COX-2-Expression im Aortenursprung

Da die Atherosklerose einen entzündlichen Prozess darstellt, sind Enzyme, die Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine freisetzen, von besonderem Interesse. Von der induzierbaren Isoform der Cyclooxygenase (COX) ist bekannt, dass sie durch Statine in humanen atherosklerotischen Plaques beeinflussbar ist. So konnte von Cipollone *et al.*<sup>46</sup> gezeigt werden, dass Simvastatin die Expression von COX-2 in humanen atherosklerotischen Plaques reduziert. Zur Überprüfung, ob COX-2 auch durch Rosuvastatin bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen reguliert wird, wurden Schnitte des Aortenursprungs immunhistochemisch im Hinblick auf die Expression von COX-2 analysiert. Sowohl in der Gruppe der mit 2 mg Rosuvastatin als auch in der mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tiere zeigte sich eine signifikante Reduktion der COX-2-Expression in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs (Abb. 30A-C). Die stärkste Expression zeigte sich im Bereich der fibrotischen Kappe, wo vermehrt SMC anzutreffen sind, wie in der höheren Vergrößerung deutlich zu erkennen ist.



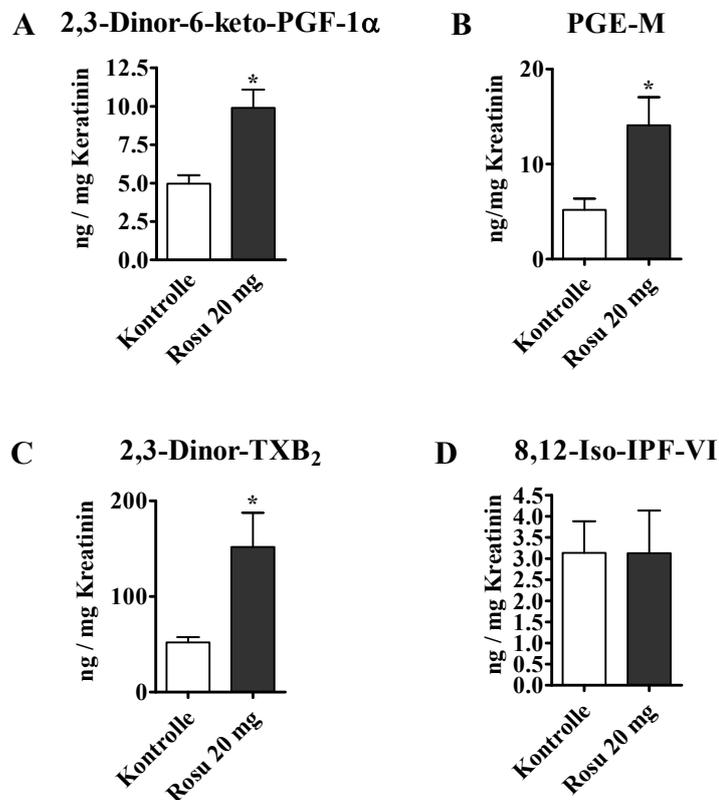
**Abbildung 30:** Immunhistochemische Analyse der COX-2-Expression in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs von unbehandelten (Kontrolle) und mit 2 mg oder 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. A-C, Exemplarische Darstellung von n = 4 – 6 Aortenursprüngen. Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung; Ausschnitte in 200-facher Vergrößerung. D, Quantifizierung der positiv gefärbten Bereiche (braun) mittels ImageJ, \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Zur Analyse der mRNA-Expression von COX-2 wurde ebenfalls die RNA aus Aorten präpariert und mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. In der Gruppe der mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tiere zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression (Abb. 31).



**Abbildung 31:** RT-PCR von COX-2 aus mRNA-Extraktionen der thorakalen und abdominalen Aorta von unbehandelten (Kontrolle) und mit 2 mg und 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. Darstellung der Expression in  $n = 7 - 10$  Aorten; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle und Rosu 2 mg.

Prostaglandine besitzen eine extrem kurze Halbwertszeit und sind im lipidreichen Plasma von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen praktisch nicht messbar. Aus diesem Grund wurden ihre Metaboliten zur Überprüfung des Ausmaßes der COX-Hemmung im Sammelurin von 48 h untersucht. Wie in Abb. 32A dargestellt, zeigte sich in den mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren ein signifikanter Anstieg der Konzentration von 2,3-Dinor-6-keto-PGF-1 $\alpha$ , welches ein Metabolit von PGI<sub>2</sub> ist. Die Konzentration von 2,3-Dinor-TXB<sub>2</sub>, ein Metabolit von TXA<sub>2</sub>, war ebenfalls signifikant in der behandelten Gruppe erhöht (Abb. 32C). Auch die Konzentration des Metaboliten von PGE<sub>2</sub> stieg signifikant an (Abb. 32B). 8,12-Iso-IPF2 $\alpha$ -VI, ein nicht enzymatisches Lipidperoxidationsprodukt der Arachidonsäure, ist ein Marker für oxidativen Stress *in vivo*. Durch Rosuvastatin-Behandlung wurde 8,12-Iso-IPF2 $\alpha$ -VI nicht beeinflusst (Abb. 32D).

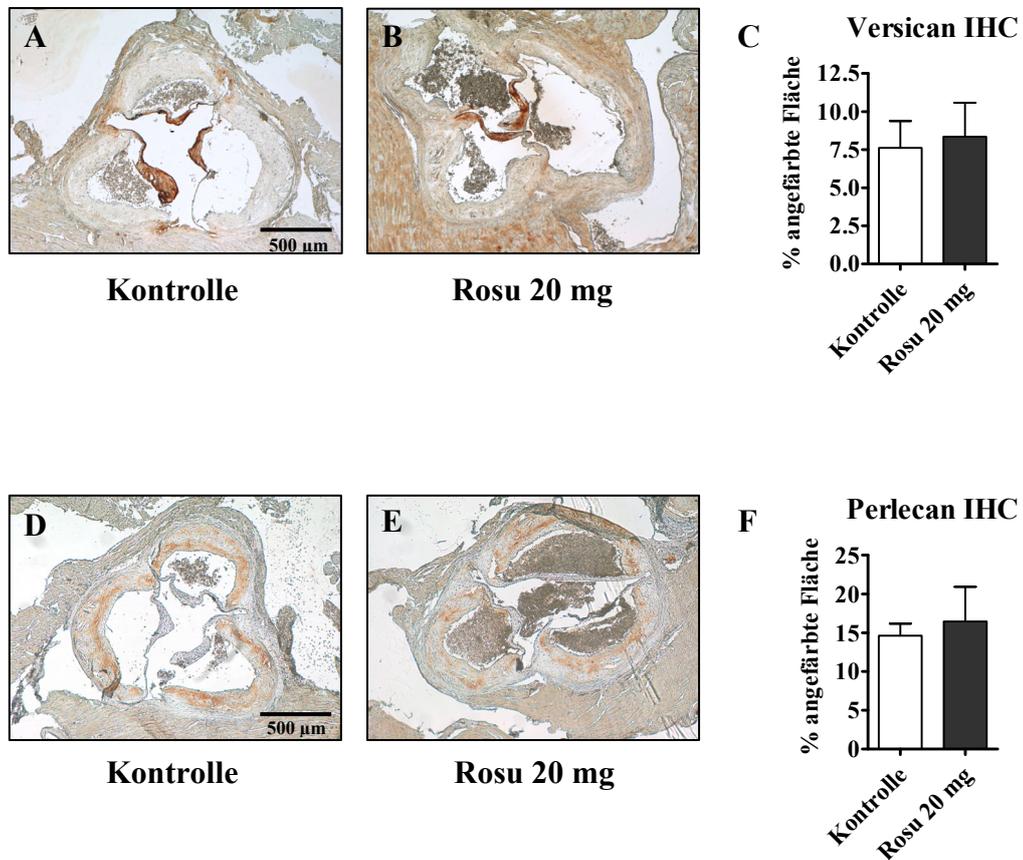


**Abbildung 32:** Bestimmung der Aktivität der Cyclooxygenasen durch Analyse ihrer Prostaglandin-Metaboliten im 48 h-Sammelurin von unbehandelten (Kontrolle) und mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. **A**, Konzentrationsbestimmung des Metaboliten von PGI<sub>2</sub>, **B**, Konzentrationsbestimmung des Metaboliten von PGE<sub>2</sub> und **C**, Bestimmung der Konzentration des TXA<sub>2</sub>- Metaboliten. **D**, Konzentrationsbestimmung von Isoprostan 8,12-Iso-iPF2 $\alpha$ -VI als Maß für oxidativen Stress *in vivo*. **A-D**, Darstellung der auf Kreatinin bezogenen Konzentrationen aus Urin von n = 5 – 6 Tieren. \*, p < 0,05 vs. Kontrolle.

### 3.1.8 Einfluss von Rosuvastatin auf Versican und Perlecan

Zwei weitere Proteoglykane, die in der Atherosklerose eine wichtige Rolle einnehmen, sind zum einen das Chondroitinsulfat-Proteoglykan Versican und zum anderen das Heparansulfat-Proteoglykan Perlecan. Versican stellt das in humanen atherosklerotischen Plaques im weniger fortgeschrittenen Stadium am stärksten vertretene Proteoglykan dar<sup>92</sup>. Perlecan hingegen spielt in humanen atherosklerotischen Plaques eher eine untergeordnete Rolle<sup>25</sup>. Es ist jedoch in murinen atherosklerotischen Plaques das vorherrschende Proteoglykan. Sowohl Perlecan als auch Versican besitzen keine Affinität bzw. Bindungsstellen für Kollagen. Mittels Immunhistochemie für Versican und Perlecan sollte untersucht werden, ob sich der in Abschnitt 3.1.5 beschriebene Effekt von Rosuvastatin auf Kollagen bindende Proteoglykane beschränkt. Versican wurde mit einem Antikörper gegen die Glykosaminoglykan- $\alpha$ -Kette des Moleküls detektiert. Innerhalb der Intima der atherosklerotischen Plaques im Aortenursprung war die Akkumulation Versican nur schwach ausgeprägt, große Depositionen waren jedoch in den Aortenklappen detektierbar (Abb. 33A-B). Die Behandlung mit Rosuvastatin hatte keinen Einfluss auf die Akkumulation von Versican (Abb. 33C).

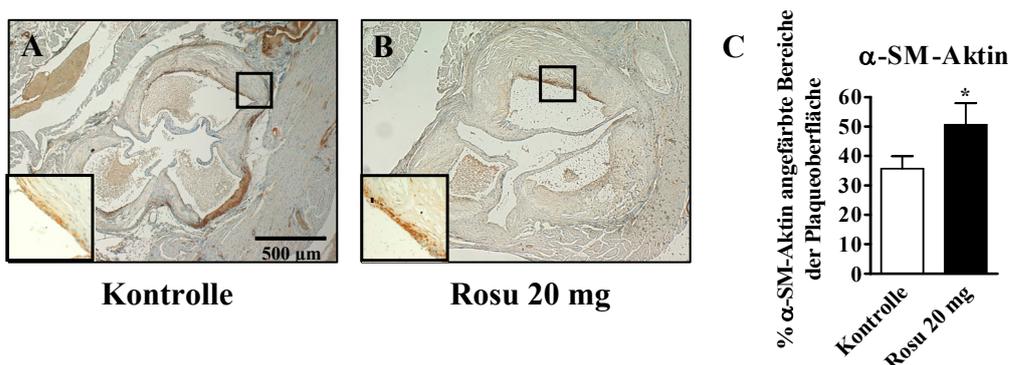
Perlecan akkumulierte stark in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs (Abb. 33D-E). Auch hier zeigte sich kein Einfluss von Rosuvastatin auf die Akkumulation (Abb. 33F).



**Abbildung 33:** A-C, Darstellung der immunhistochemischen Analyse von Versican in atherosklerotischen Plaques. C, Quantifizierung der positiv gefärbten Bereiche (braun) von  $n = 8$  Aortenursprüngen von unbehandelten (Kontrolle, A) und mit 20 mg Rosuvastatin (B) behandelten Tieren mittels ImageJ. D-F, Darstellung der immunhistologischen Analyse von Perlecan. F, Quantifizierung der positiv gefärbten Bereiche (braun) in  $n = 5 - 6$  Aortenursprüngen von unbehandelten (Kontrolle, D) und mit 20 mg Rosuvastatin (E) behandelten Tieren mittels ImageJ.

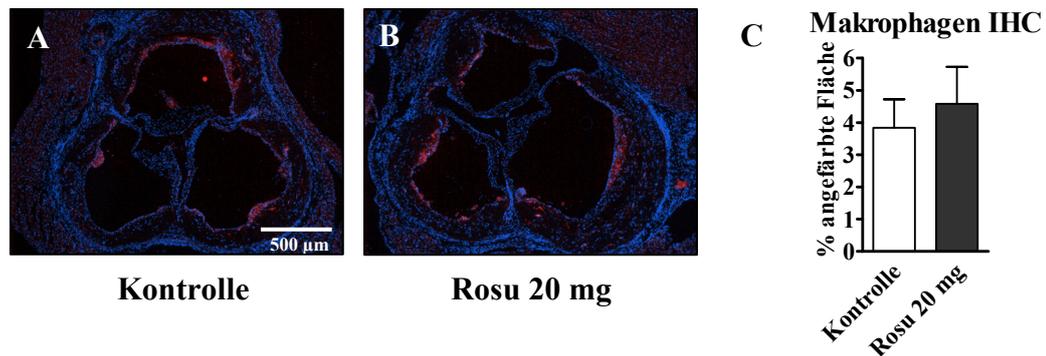
### 3.1.9 Analyse der Zellen in den atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs

Nicht nur Proteoglykane, Glykosaminoglykane und Kollagen geben Aufschluss über den Zustand der atherosklerotischen Plaque, sondern auch die Ansammlung der in der atherosklerotischen Plaque befindlichen Zellen. So deutet eine ausgeprägte Schicht glatter Muskelzellen in der fibrotischen Kappe auf ein vermindertes Risiko zur Plaqueruptur hin<sup>93</sup>. Mittels immunhistochemischer Detektion von  $\alpha$ -SM-Aktin wurden glatte Muskelzellen in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs dargestellt (Abb. 34A-B).  $\alpha$ -SM-Aktin stellt einen Marker für nicht-entdifferenzierte SMC dar. Diese waren in der fibrotischen Kappe der atherosklerotischen Plaques von mit Rosuvastatin behandelten Tieren verstärkt nachweisbar. Es zeigte sich eine kontinuierliche Schicht, die durchschnittlich mehr als 50 % der Oberfläche der atherosklerotischen Plaques einnahm. Nicht behandelte Kontrolltiere zeigten eher diskontinuierliche Bereiche an SMC auf der Plaqueoberfläche (Abb. 34C).



**Abbildung 34:** *A-B*, Immunhistochemie für  $\alpha$ -SM-Aktin von unbehandelten (Kontrolle, *A*) und mit 20 mg Rosuvastatin (*B*) behandelten Tieren. Exemplarische Darstellung der Färbungen im Aortenursprung. Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung; Ausschnitte in 200-facher Vergrößerung. *C*, Vergleich der Länge des SMC-reichen Anteils (positiv für  $\alpha$ -SM-Aktin, braun gefärbt) der gesamten Plaqueoberfläche,  $n = 11 - 12$ ; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

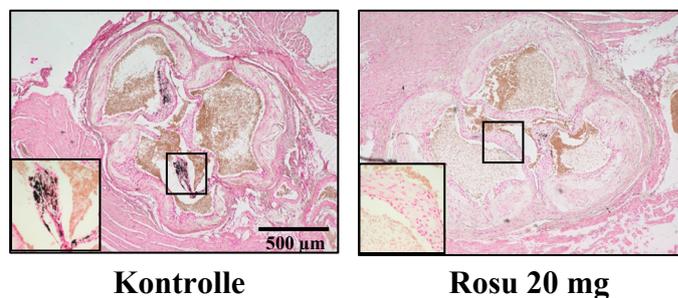
Die Menge an Makrophagen gibt weiterhin Aufschluss über den entzündlichen Zustand der Intima. Sie wurden mittels immunhistochemischer Detektion des Oberflächenantigens Mac-2 nachgewiesen. Die rote Fluoreszenz stellt die für Makrophagen positiv gefärbten Bereiche dar. Diese waren verstärkt an der Oberfläche der atherosklerotischen Plaques und an den Plaqueschultern zu finden (Abb. 35A-B). Es zeigte sich jedoch keine Veränderung des Makrophagen-Gehaltes der atherosklerotischen Plaques durch Behandlung mit Rosuvastatin (Abb. 35C).



**Abbildung 35:** *A-B*, Immunhistochemische Analyse des Maus-Makrophagen-Antigens Mac-2 in atherosklerotischen Plaques von unbehandelten (Kontrolle, *A*) und mit 20 mg Rosuvastatin (*B*) behandelten Tieren. Exemplarische Darstellung der Makrophagen in  $n = 7 - 9$  Aortenursprüngen. *C*, Quantifizierung der positiv gefärbten Bereiche (rot) mittels ImageJ.

### 3.1.10 Kalzifizierung der atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs

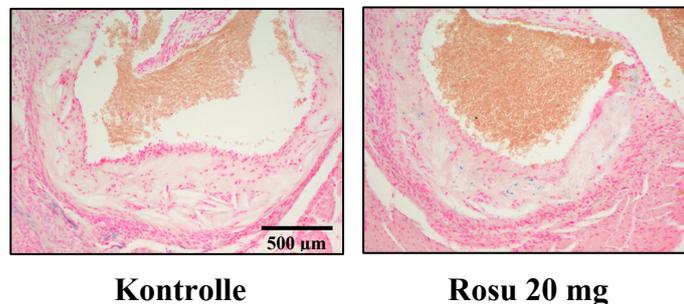
Atherosklerotische Plaques können in fortgeschrittenem Stadium knochenähnliche Strukturen annehmen und kalzifizieren. Dies bedeutet, dass Kalziumhydroxylapatit in die EZM der Intima eingelagert wird. Rattazzi *et al.*<sup>94</sup> beschreiben, dass im Alter von 45 bis 75 Wochen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse reproduzierbare Kalzifizierungen der atherosklerotischen Plaques zeigen. Die atherosklerotischen Plaques der mit Rosuvastatin und der unbehandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten im Alter von 52 Wochen keine Kalziumablagerung innerhalb der Neointima des Aortenursprungs. Allerdings schienen die Aortenklappen der unbehandelten Tiere vermehrt kalzifiziert zu sein (Abb. 36), was aber von der Behandlung mit Rosuvastatin unbeeinflusst blieb.



**Abbildung 36:** Exemplarische Darstellung der Kalzifizierung im Aortenursprung von unbehandelten und mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren. Kalzifizierte Bereiche erscheinen in der Färbung nach von Kossa für  $n = 4$  Tiere schwarz. Aufnahmen in 40-facher Vergrößerung; Einsätze in 200-facher Vergrößerung.

### 3.1.11 Einblutungen in atherosklerotische Läsionen des Aortenursprungs

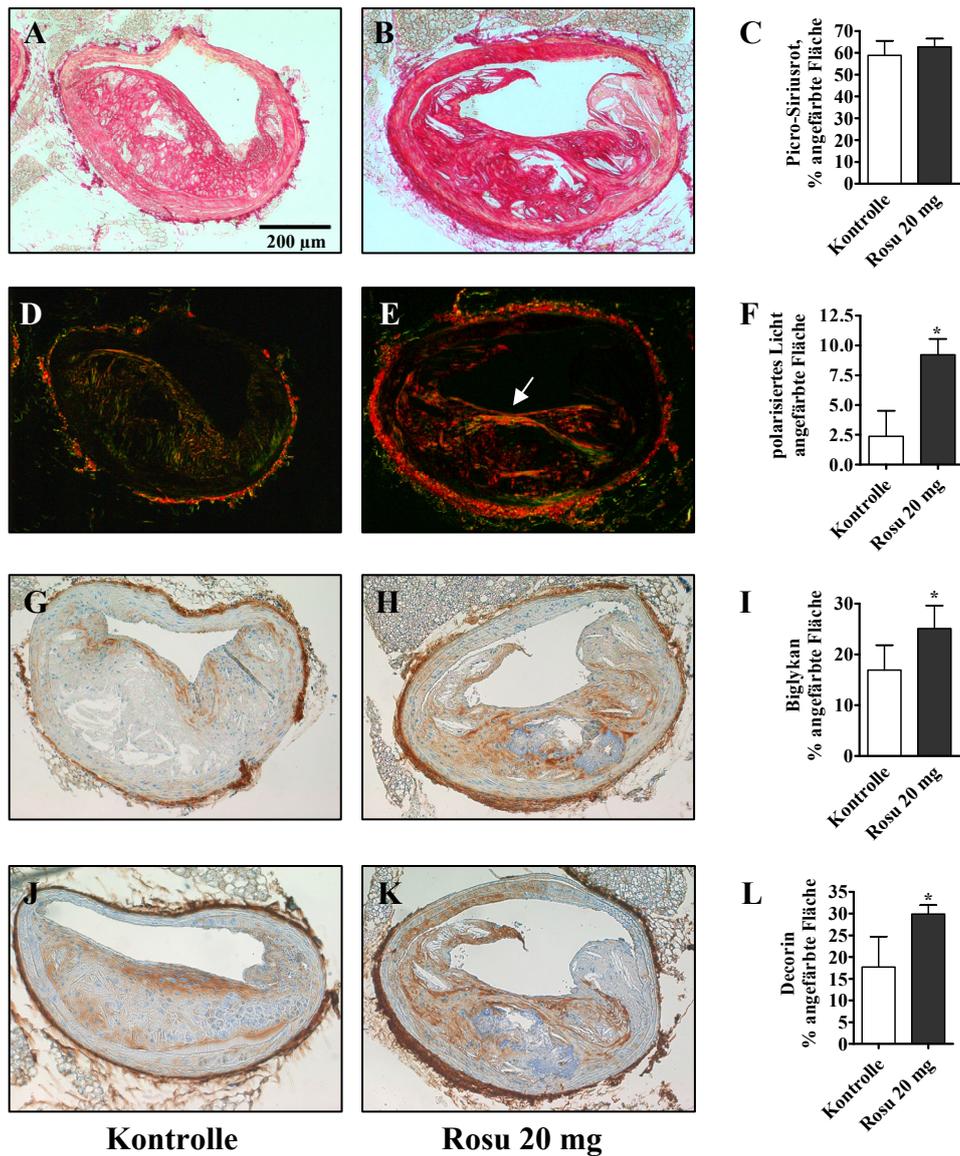
Einblutungen in atherosklerotische Läsionen geben Aufschluss über die Stabilität der fibrotischen Kappe der atherosklerotischen Läsionen im fortgeschrittenen Stadium. Risse in der SMC-Schicht führen zur Einlagerung von Eisen aus Hämoglobin als Hämosiderin. Mittels Berliner-Blau-Färbung wurden Eisenablagerungen in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs dargestellt. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den behandelten und den unbehandelten Tieren. In beiden Gruppen befanden sich nur sehr geringe Mengen Eisen innerhalb der atherosklerotischen Plaques.



*Abbildung 37: Plaqueeinblutungen: Eisennachweis des Hämosiderins in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs mittels Berliner Blau. Exemplarische Darstellung der atherosklerotischen Plaques von n = 4 Tieren.*

### 3.1.12 Einfluss von Rosuvastatin auf vaskuläre atherosklerotische Läsionen der *Arteria brachiocephalica*

Die *Arteria brachiocephalica* stellt einen kleinen, abgegrenzten Bereich im Gefäßsystem der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus dar, in dem sich sehr früh atherosklerotische Plaques bilden. Diese Plaques sind rein vaskulärer Natur. Es entsteht eine einzige atherosklerotische Plaque, die sich auf den gesamten Bereich der Arterie ausbreitet. Um die in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs immunhistochemisch erhobenen Befunde bezüglich des Kollagens und der Kollagen-bindenden Proteoglykane in rein vaskulären atherosklerotischen Plaques zu überprüfen, wurden atherosklerotische Läsionen der *A. brachiocephalica* diesbezüglich histochemisch analysiert. Abb. 38A und B zeigt exemplarisch die Akkumulation von Gesamtkollagen, welches mittels Picro-Siriusrot-Färbung dargestellt wurde. Es zeigte sich keine Veränderung durch Rosuvastatin-Behandlung (Abb. 38C). In Abb. 38D-E sind dicht angeordnete Kollagenfasern mittels Betrachtung der Picro-Siriusrot-Färbung unter polarisiertem Licht in rot dargestellt. Die Anordnung der Fasern wurde durch Rosuvastatin-Behandlung signifikant beeinflusst. Rosuvastatin führte gegenüber der Kontrolle zu einer signifikant größeren Anzahl von Bereichen mit dicht angeordneten Kollagenfasern (Abb. 38F). Abb. 38G-H zeigt exemplarisch die Expression von Biglycan. In behandelten Tieren kam es zu einer signifikant vermehrten Expression von Biglycan in der Intima (Abb. 38I). Auch Decorin war in der Intima der *A. brachiocephalica* durch Rosuvastatin-Behandlung signifikant vermehrt akkumuliert (Abb. 38L). Abb. 38J-K stellt dies exemplarisch dar.

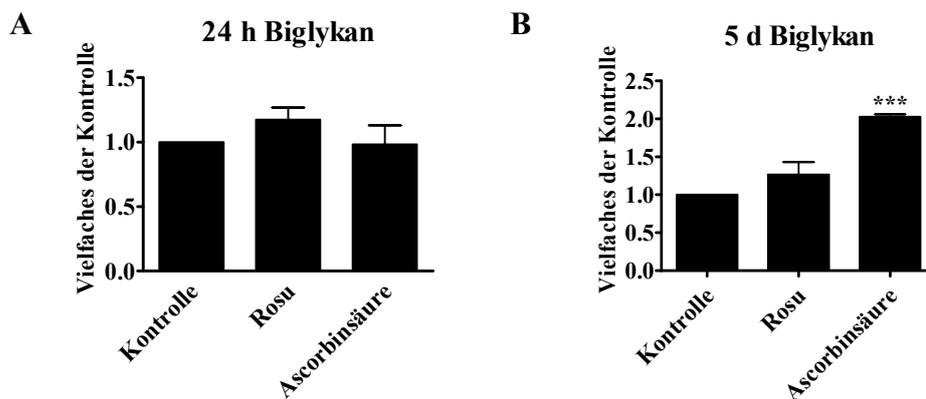


**Abbildung 38:** Vaskuläre atherosklerotische Plaques in der Arteria brachiocephalica von unbehandelten (Kontrolle, A,D,G,J) und mit 20 mg Rosuvastatin (B,E,H,K) behandelten Tieren im Alter von 52 Wochen. **A-B**, Picro-Siriusrot-Färbung für Gesamtkollagen, **C** Quantifizierung der rot gefärbten Bereiche von  $n = 4 - 11$  atherosklerotischen Plaques mittels ImageJ. **D-E**, zur Darstellung der Dichte der Kollagenfasern wurden die in **A** und **B** repräsentativ dargestellten atherosklerotischen Plaques unter polarisiertem Licht betrachtet. Der Pfeil in **E** zeigt einen Bereich besonders hoher Kollagendichte an. **F**, Quantifizierung der Bereiche mit besonders hoher Kollagendichte in  $n = 3 - 12$  atherosklerotischen Plaques. **G-H**, Immunhistochemische Färbung von Biglycan,  $n = 3 - 9$ . **I**, Quantifizierung der positiv gefärbten Bereiche (braun) in der atherosklerotischen Plaque der in **G-H** exemplarisch dargestellten Färbungen. **J-K**, Immunhistochemischen Analyse von Decorin und **(L)** Quantifizierung der positiv gefärbten Bereiche (braun),  $n = 4 - 10$ . **C,F,I,L** \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

### 3.2 *In vitro* Versuche an hSMC mit Rosuvastatin und Ascorbinsäure

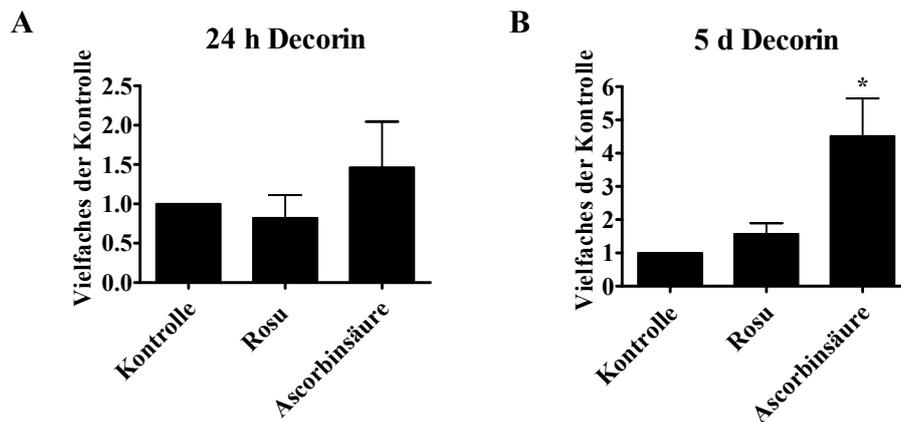
Bisher wurde gezeigt, dass Rosuvastatin-Fütterung in atherosklerotischen Mäusen zu einem Anstieg von Kollagen und den beiden Kollagen-bindenden Proteoglykanen Biglycan und Decorin in der Matrix von atherosklerotischen Plaques führt. In wie weit die gefundenen Ergebnisse, die erhöhte Akkumulation von Kollagen und die Behandlung mit Rosuvastatin selber, einen Einfluss auf die Expression von Biglycan und Decorin *in vitro* ausüben, sollte nun an SMC geklärt werden.

Konfluente SMC wurden für 24 Stunden (h) mit 1  $\mu$ M Rosuvastatin oder 56  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure, zur *in vitro*-Synthese von Kollagen, stimuliert. Im Anschluss daran wurde die mRNA-Expression von Biglycan und Decorin mittels qRT-PCR bestimmt. Nach 24 stündiger Inkubation zeigten sich keine Unterschiede der Biglycan-Expression durch Inkubation mit Rosuvastatin und Ascorbinsäure (Abb. 39A). Nachdem die Zellen 5 Tage (d) lang stimuliert wurden, stieg die Expression von Biglycan durch die Inkubation mit Ascorbinsäure hochsignifikant an (Abb. 39B) während Rosuvastatin keinen signifikanten Effekt hatte.



**Abbildung 39:** Analyse der Biglycan-mRNA-Expression mittels real-time quantitativer PCR in humanen SMC (A) nach 24 h Stimulation und (B) nach 5 Tagen Stimulation mit 1  $\mu$ M Rosu und 56  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure. Darstellung von jeweils  $n = 3$  unabhängigen Experimenten; \*\*\*,  $p < 0,001$  vs. Kontrolle.

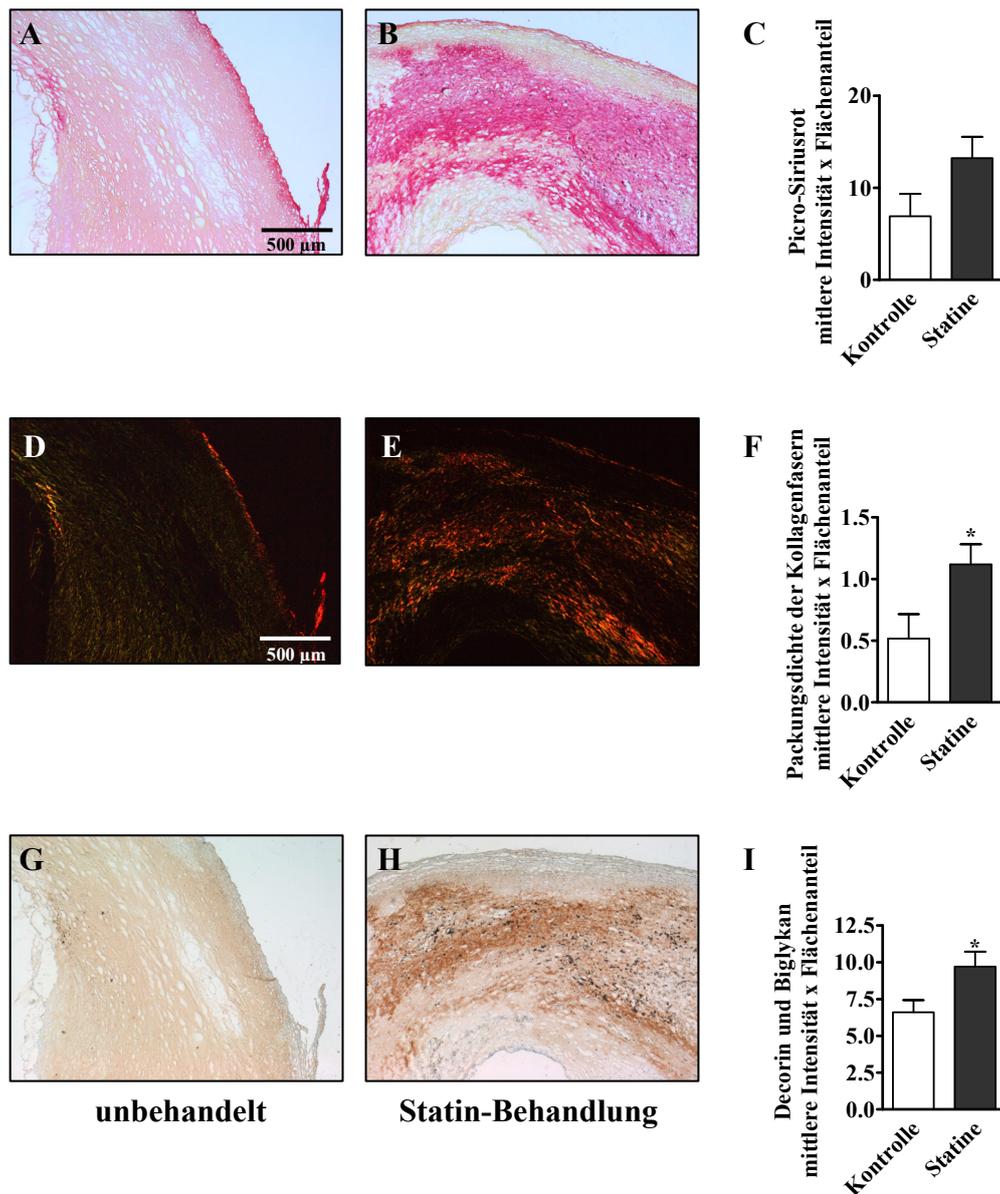
Die Expression von Decorin wurde nach 24 Stunden Inkubation mit Rosuvastatin und Ascorbinsäure nicht verändert (Abb. 40A). Nach 5 Tagen Stimulation zeigte sich allerdings auch eine signifikant erhöhte Expression von Decorin in Anwesenheit von Ascorbinsäure (Abb. 40B), Rosuvastatin zeigte keine signifikante Beeinflussung der Expression von Decorin.



**Abbildung 40:** Analyse der Decorin-mRNA-Expression mittels real-time quantitativer PCR in humanen SMC (A) nach 24 h Stimulation und (B) nach 5 Tagen Stimulation mit 1  $\mu$ M Rosu und 56  $\mu$ g/ml Ascorbinsäure. Darstellung von jeweils  $n = 3$  unabhängigen Experimenten; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

### **3.3 Vergleich mit humanen atherosklerotischen Läsionen Statin-behandelter Patienten**

In der Vergangenheit ist u.a. von Cipollone *et al.*<sup>46</sup> eine vermehrte Kollagenakkumulation in humanen atherosklerotischen Plaques nach Behandlung mit Simvastatin gezeigt worden. Ob dies jedoch mit einer verstärkten Expression von Biglycan und Decorin einhergeht, ist in der Literatur bisher für kein Statin beschrieben worden. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt zum einen für Rosuvastatin spezifisch ist und ob zum anderen dieser Effekt auf humane atherosklerotische Plaques übertragbar ist, wurden atherosklerotische Plaques aus humanen Karotiden analysiert. Zu diesem Zweck wurden atherosklerotische Plaques durch Endarterektomie aus einer Kohorte von unbehandelten und mit verschiedenen Statinen behandelten Patienten gewonnen. Rosuvastatin wurde in dieser Kohorte nicht appliziert. Die atherosklerotischen Plaques wurden hinsichtlich der Akkumulation von Kollagen sowie Biglycan und Decorin histochemisch untersucht. Bei Betrachtung des durch Picro-Siriusrot angefärbten Kollagens unter polarisiertem Licht zeigte sich eine signifikant erhöhte Ansammlung von dicht angeordneten Kollagenfasern in der Gruppe der mit Statinen behandelten Patienten gegenüber der unbehandelten Kontroll-Gruppe (Abb. 41D-F). Auch der Gesamtkollagengehalt der atherosklerotischen Plaques wurde durch Statinbehandlung wenn auch nicht signifikant fast verdoppelt (Abb. 41A-C). Durch kombinierte immunhistochemische Färbung von Biglycan und Decorin wurde der Gesamtgehalt der SLRP, die in dieser Untersuchung von Interesse waren, dargestellt. Die Behandlung mit Statinen führte zu einer, gegenüber der Kontrolle, signifikant vermehrten Akkumulation von Biglycan und Decorin (Abb. 41G-H).

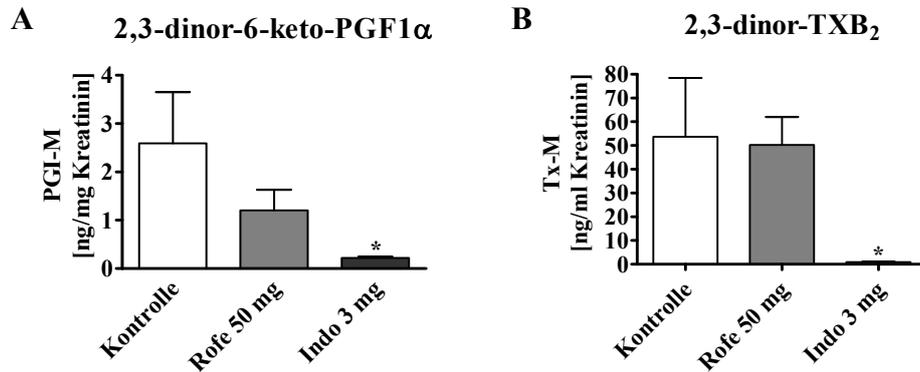


**Abbildung 41:** A-F, Picro-Siriusrot-Färbung für Kollagen in Folgeschnitten des gleichen humanen atherosklerotischen Plaques aus der A. carotis unbehandelter und mit verschiedenen Statinen behandelter Patienten. A-B, Gesamtkollagengehalt; C Quantifizierung der hellrot gefärbten Bereiche in atherosklerotischen Plaques von n = 7 – 9 Individuen. D-E, Exemplarische Darstellung der unter polarisiertem Licht betrachteten Färbung zur Beurteilung der Kollagendichte. F, Quantifizierung der Areale mit hoher Kollagendichte (rot) von n = 7 – 9 Individuen mittels ImageJ, \*, p < 0,05 vs. unbehandelt. G-H, Kombinierte immunhistochemische Analyse von Biglykan und Decorin. Exemplarische Darstellung von atherosklerotischen Plaques aus n = 7 – 9 Individuen. I, Quantifizierung der braunen Farbintensität mittels ImageJ; \*, p < 0,05 vs. unbehandelt.

### 3.4 Einfluss von COX-Inhibitoren auf die murine Atherosklerose

Im Modell der mit Rosuvastatin behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Maus wurde ein Zusammenhang zwischen verminderter COX-2-Expression und verminderter HA-Akkumulation in den atherosklerotischen Plaques postuliert. Um diesen Zusammenhang näher zu untersuchen, wurde ein weiteres Versuchsmodell gewählt, welches unabhängig von der Statinbehandlung war und speziell auf die Frage des Zusammenspiels von COX-2 und HA fokussiert war. Zu diesem Zweck wurden ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse über einen Zeitraum von 8 Wochen mit COX-Inhibitoren gefüttert. Es wurde zu zwei Zeitpunkten behandelt, da aufgrund der Zeitverläufe zum einen vor Beginn der COX-2- und HA- Expression, mit Beginn der 15. Woche, behandelt werden sollte. Zum anderen sollte mit der zweiten Behandlung, ab der 25. Woche, während der ersten frühen Phase der HA- und COX-2- Expression behandelt werden (s. Abschnitt 2.8.2).

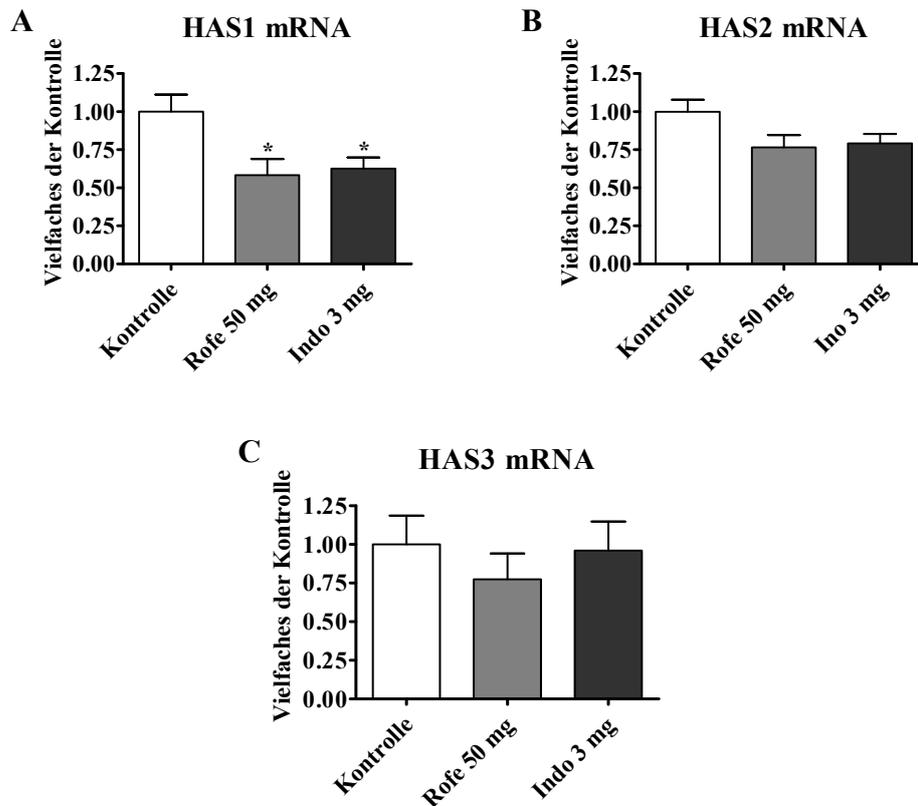
Zur Überprüfung der Spezifität von Rofecoxib und Indometacin für COX-1 und COX-2 unter den gewählten Dosierungen, wurden im Urin Metaboliten von Produkten von COX-1 und COX-2 bestimmt und auf den Gehalt an Kreatinin bezogen. Zur Beurteilung der COX-2-Hemmung wurde die Konzentration von 2,3-dinor-6-keto-PGF1 $\alpha$  gemessen. 2,3-dinor-6-keto-PGF1 $\alpha$  ist der im Urin zu findende Metabolit von Prostacyclin, sodass die Konzentration dieses Metaboliten sowohl von dem COX-2 selektiven Inhibitor Rofecoxib (nicht signifikant) als auch von dem unselektiven Inhibitor Indometacin im Vergleich zur Kontrolle gesenkt wurde (Abb. 42A). Das Ausmaß der COX-1-Hemmung wurde mittels Konzentrationsbestimmung von 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub> analysiert. 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub> ist der im Urin analysierbare Metabolit von TXA<sub>2</sub>. Der COX-2 selektive Inhibitor Rofecoxib erzielte erwartungsgemäß keine Reduktion der Konzentration von 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub>, was die COX-2-Selektivität bestätigte. Indometacin, welches ein unselektiver Inhibitor der COX ist und somit auch die COX-1 hemmt, senkte die Konzentration von 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub> signifikant bis fast zur vollständigen Hemmung (Abb. 42B).



**Abbildung 42:** Überprüfung des Ausmaßes und der Selektivität der COX-Hemmung durch Bestimmung der Metaboliten von PGI $_2$  und TXA $_2$  im 48 h-Sammelurin von unbehandelten und mit Rofecoxib und Indometacin behandelten Tieren. **A**, Konzentration des Metaboliten von PGI $_2$ , 2,3-dinor-6-keto-PGF1 $\alpha$ , im Urin von  $n = 3 - 5$  Tieren. **B**, Konzentration des Metaboliten von TXA $_2$ , 2,3-dinor-TXB $_2$ , im Urin von  $n = 3 - 5$  Tieren. \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle. Alle Konzentrationen wurden auf die im Urin enthaltene Menge Kreatinin bezogen.

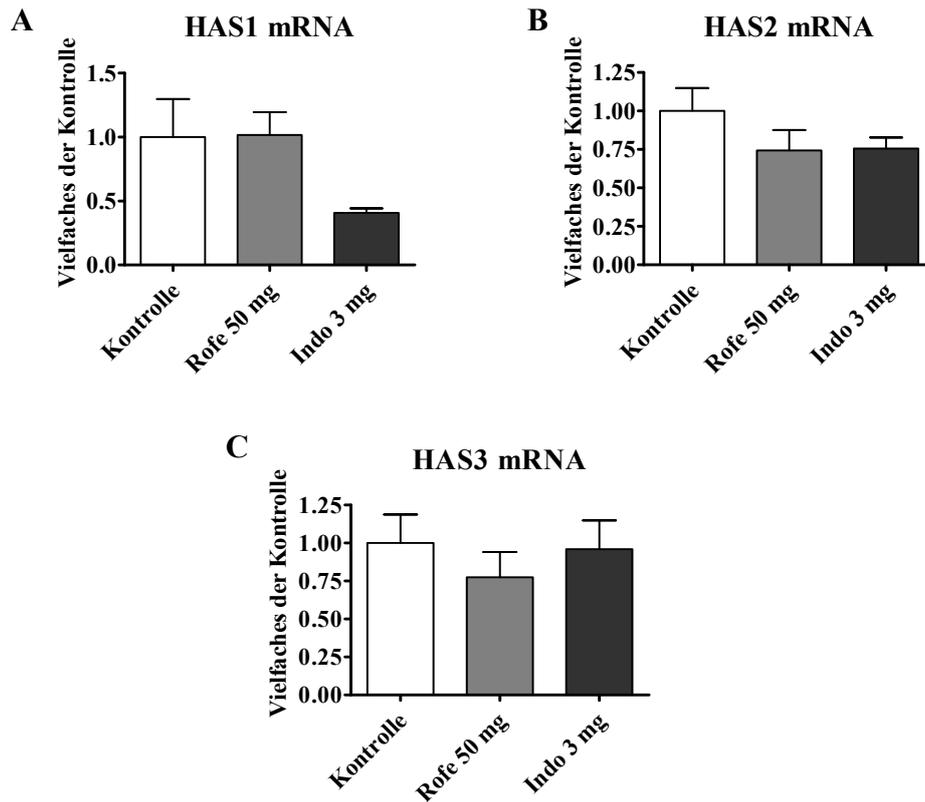
### 3.4.1 Genexpression der Hyaluronsäure-Synthasen in Aorten COX-Inhibitor-behandelter ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse

Der Einfluss der COX-Hemmung auf die Synthese von HA wurde mittels mRNA-Expressionsanalyse der Hyaluronsäure-Synthasen 1-3 bestimmt. In Aorten von 23 Wochen alten Mäusen, die mit Indometacin oder Rofecoxib behandelt wurden, ergab sich eine signifikante Senkung der Expression von HAS1. HAS2 und HAS3 wurden nicht beeinflusst (Abb. 43).



**Abbildung 43:** Einfluss der COX-Inhibitoren auf die Genexpression der HAS-Isoformen in Aorten von 23 Wochen alten unbehandelten (Kontrolle) oder für acht Wochen mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Bestimmung der Genexpression von **A**, HAS1 in n = 10 – 12 Aorten; \*, p < 0,05 vs. Kontrolle und **B**, HAS2 in n = 10 – 12 Aorten sowie **C**, HAS3 in n = 8 – 11 Aorten mittels real-time quantitativer PCR..

Die zweite Gruppe wurde nach 33 Wochen analysiert. Es wurde ebenfalls die Expression der mRNA der Hyaluronsäure-Synthasen 1–3 in der Aorta mittels qRT-PCR analysiert. Die Expression von HAS1 stieg im Vergleich zum früheren Zeitpunkt durch Rofecoxib wieder auf Kontrollniveau an und zeigte durch Indometacin einen Trend zur gesenkten Expression (Abb. 44A). Die Expression von HAS2 und HAS3 wurde nicht beeinflusst (Abb. 44B-C).



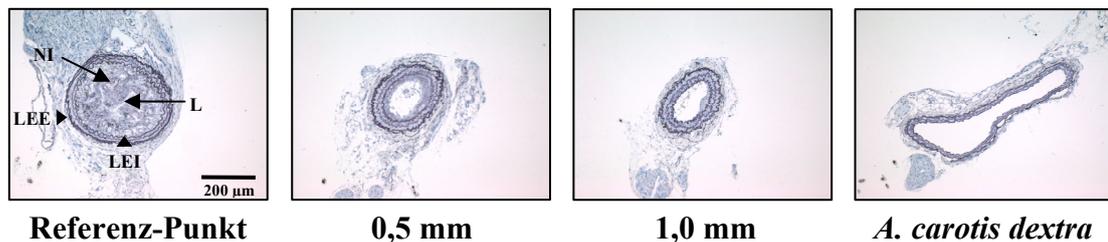
**Abbildung 44:** Einfluss der COX-Inhibitoren auf die Genexpression der HAS-Isoformen in Aorten von 33 Wochen alten unbehandelten (Kontrolle) oder für acht Wochen mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. **A**, HAS1, n = 8 - 11. **B**, HAS2, n = 8 - 11. **C**, HAS3, n = 8 - 11. Die Expressionsanalyse erfolgte mittels quantitativer real-time PCR.

### **3.5 Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Atherosklerose und Neointimahyperplasie an einem kombinierten Atherosklerose-Maus-Modell**

Harmon *et al.*<sup>95</sup> konnten zeigen, dass mittels Ligatur der linken *A. carotis* in verschiedenen Mausstämmen innerhalb weniger Wochen eine Neointimahyperplasie erzeugt werden kann. Die so entstandenen atherosklerotischen Plaques lassen sich sehr gut bezüglich der Größe der Neointima untersuchen. In Mausstämmen, die von sich aus keine spontane Atherogenese zeigen, bleibt die Hyperplasie jedoch weniger stark ausgeprägt und es entstehen zellreiche atherosklerotische Plaques, die sich durch den fehlenden Fettanteil von humanen atherosklerotischen Läsionen stark unterscheiden. Kombiniert man dieses Modell der Neointimahyperplasie mit dem Modell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus für Atherosklerose, so entsteht eine konzentrische Neointima, die humanen atherosklerotischen Plaques sehr ähnlich ist. Um den Einfluss der COX-Hemmung auf die HA-Expression innerhalb der Neointima und auf die Plaquergröße zu untersuchen, wurde eine Ligatur an der linken Karotis von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen angelegt und die dadurch entstandenen Plaques 4 Wochen später histochemisch analysiert. Die Mäuse wurden nach der Ligatur 4 Wochen lang mit Rofecoxib und Indometacin zur Hemmung der COX behandelt (s. Abschnitt 2.8.3). Auf eine erneute Bestimmung der Prostaglandin-Metaboliten im Urin wurde an dieser Stelle verzichtet, da die Arzneistoffkonzentrationen im Futter den in Abschnitt 3.19 untersuchten entsprachen.

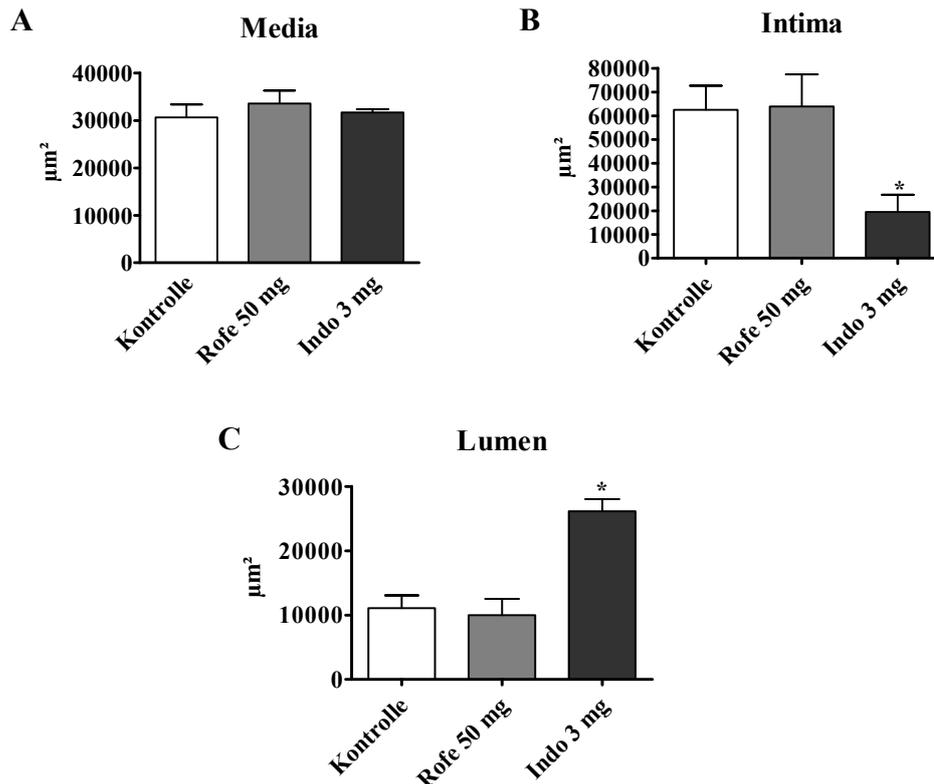
### 3.5.1 Veränderung der Größe der atherosklerotischen Läsionen durch die Behandlung mit Rofecoxib und Indometacin

Die Größe der atherosklerotischen Plaques wurde anhand der Färbung der *Lamina elastica interna* (LEI) mit Orcein bestimmt. Die LEI stellt die Abgrenzung zwischen gebildeter Neointima und Media dar. In Abb. 45 ist die Größe der entstandenen Neointima entlang der *A. carotis* exemplarisch alle 500 µm ab dem Referenzpunkt dargestellt. Die *A. carotis dextra* ohne Ligatur diente dabei als Kontrolle, die keine Neointimabildung zeigt.



**Abbildung 45:** Exemplarische Darstellung der Neointima entlang der Carotis sinistra von 14 Wochen alten *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Ligatur. Als Kontrolle ohne Neointimabildung ist der Querschnitt der Carotis dextra abgebildet. Mittels Orcein-Färbung wurden die Laminae elasticae dargestellt. LEE, Lamina elastica externa, LEI, Lamina elastica interna, NI, Neointima und Lumen. Der Referenzpunkt stellt den ersten Schnitt, der frei von Nahtmaterial ist, dar.

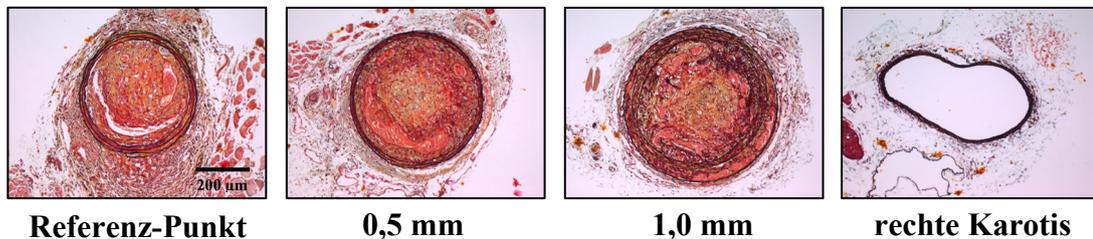
Abb. 46A zeigt den Vergleich der Mittelwerte für die Fläche der Media, die am Referenzpunkt, 0,5 mm und 1,0 mm von der Ligatur entfernt gemessen wurde. Die Behandlung mit beiden COX-Inhibitoren hatte keinen Einfluss auf die Flächengröße der Media. Die Flächengröße der Neointima (Abb. 46B) wurde durch die Behandlung mit Rofecoxib nicht verändert. Indometacin senkte dagegen die Größe signifikant bis auf 1/3 der Größe der Kontrolle.



**Abbildung 46:** Morphometrische Analyse der *A. carotis sinistra* von unbehandelten (Kontrolle) und mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten *ApoE<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach Ligatur. Es wurde jeweils am Referenzpunkt sowie 0,5 mm und 1,0 mm davon entfernt gemessen. Die Mittelwerte aus diesen drei Messungen wurden jeweils verglichen. **A**, Fläche der Media,  $n = 7 - 10$ , **B**, Intimafläche,  $n = 7 - 10$ ; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle und **C**, Lumen,  $n = 7 - 10$ ; \*,  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

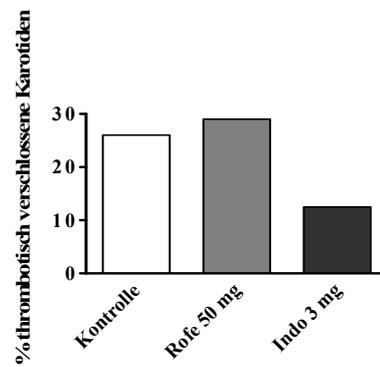
### 3.5.2 Thromboseneigung

Von COX-Inhibitoren, im Speziellen Rofecoxib, ist seit der VIGOR-Studie<sup>6</sup> bekannt, dass sie das kardiovaskuläre Risiko durch verstärkte Thromboseneigung erhöhen. Erfahrungsgemäß kommt es bei einem Teil der Tiere nach Ligatur der Karotis zu einem thrombotischen Verschluss des abgebundenen Gefäßes. Um dies nicht nur optisch zu bestimmen, wurden die vermeintlich thrombosierte Karotiden nach Movats gefärbt. In dieser Färbung lässt sich anhand der hellroten Färbung für Fibrin ein Thrombus identifizieren, wie in Abb. 47 exemplarisch dargestellt ist. Durch Thromben verschlossene Gefäße wurden von der weiteren Analyse der atherosklerotischen Plaques ausgeschlossen.



*Abbildung 47: Beurteilung der vermeintlichen Thrombosen mittels Movats Pentachromfärbung. Exemplarische Darstellung einer thrombosierte Karotis. Fibrin erscheint hier rot.*

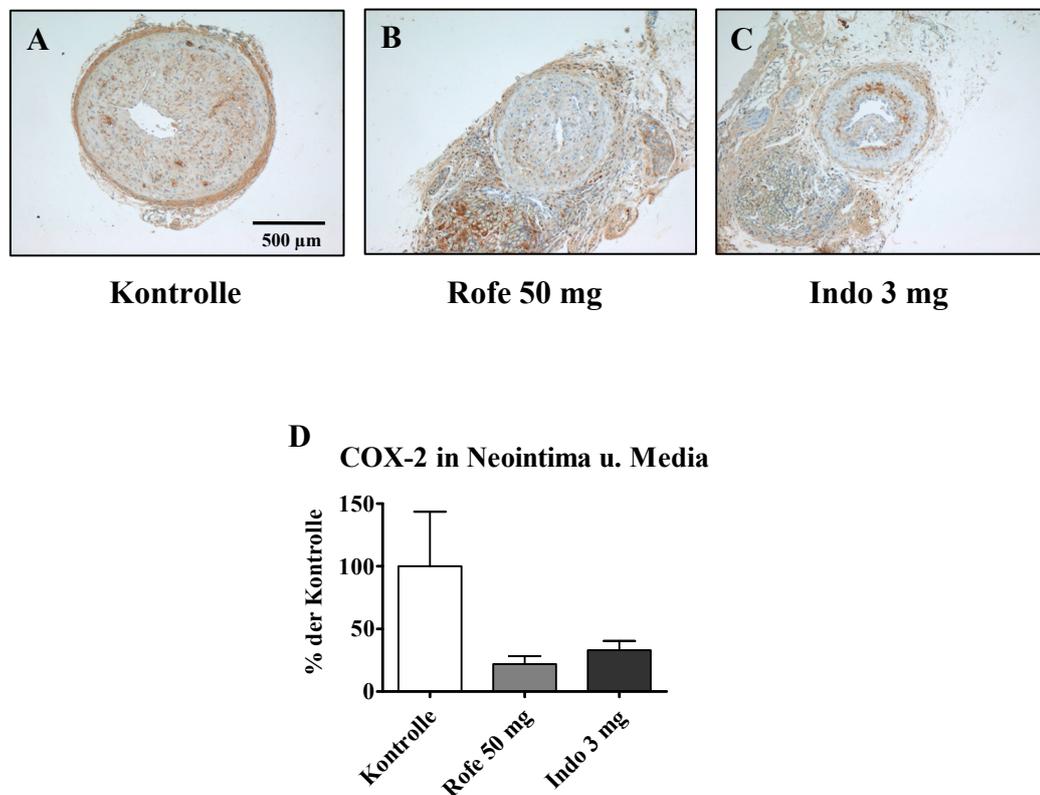
Die Thrombose-Inzidenz in der *A. carotis sinistra* nach Ligatur ist in Abb. 48 dargestellt. Durch die Behandlung mit Rofecoxib kam es statistisch gesehen zu einer minimal erhöhten Thrombose-Inzidenz; Indometacin verminderte dagegen das Auftreten von Thrombosen im abgebundenen Gefäß.



**Abbildung 48:** Thrombose-Inzidenz in der *A. carotis sinistra* nach Ligatur von unbehandelten (Kontrolle) oder mit Rofecoxib oder Indometacin behandelten  $ApoE^{-/-}$ -Mäusen,  $n = 9 - 20$ .

### 3.5.3 Einfluss von COX-Inhibitoren auf die COX-2-Expression in der Neointimahyperplasie

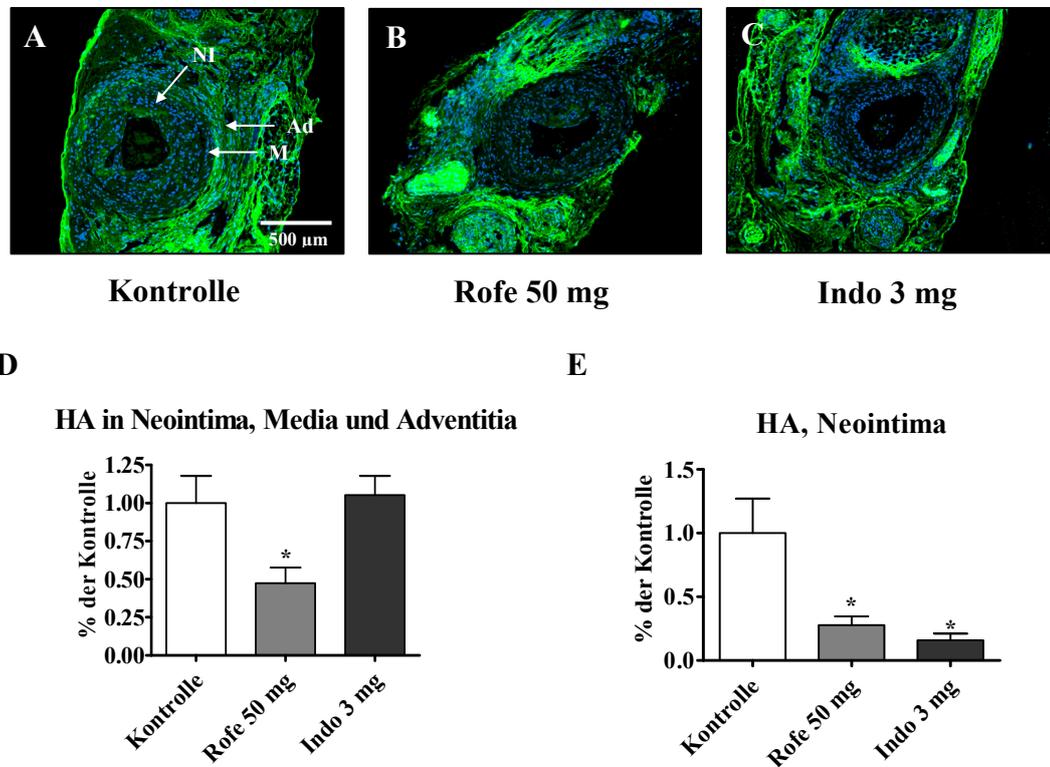
Der Einfluss der COX-2-Aktivität auf die Akkumulation von HA sollte in den durch Ligatur entstandenen atherosklerotischen Plaques analysiert werden. Des Weiteren wurde untersucht, ob Rofecoxib und Indometacin zusätzlich einen Einfluss auf die Expression von COX-2 in der Neointima haben. Aus diesem Grund wurde die Expression mittels immunhistochemischer Färbung analysiert. Rofecoxib und Indometacin reduzierten beide nicht signifikant die Expression von COX-2 in der Neointima.



**Abbildung 49:** A-C, Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung von COX-2 in der Nähe des Referenzpunktes der *A. carotis sinistra* von unbehandelten (Kontrolle, A) und mit Rofecoxib (B) oder Indometacin (C) behandelten *ApoE<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach Ligatur. D, Quantifizierung der für COX-2 positiv gefärbten Bereiche (braun) in der Neointima und Media mittels ImageJ,  $n = 5$ . Untersucht wurde die Expression an zwei Punkten der *A. carotis sinistra*. Die Mittelwerte daraus wurden verglichen.

### 3.5.4 Einfluss von COX-Inhibitoren auf den Hyaluronsäuregehalt in der Neointimahyperplasie

In der spontan gebildeten Atherosklerose der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus kam es, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, zu einer Reduktion der mRNA von HAS1. Um den Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Akkumulation von HA innerhalb der Neointima zu analysieren wurden im kombinierten Atherosklerose-Neointimahyperplasie-Modell die atherosklerotischen Plaques affinitätshistochemisch untersucht. Mittels FITC-markiertem Streptavidin wurde HA in der Adventitia, der Media und der Neointima der linken Karotis nahe dem Referenzpunkt und in 0,5 mm Entfernung von der Ligatur grün gefärbt. Abb. 50A-C zeigen exemplarisch die beschriebene Färbung am Referenzpunkt von Kontrolltieren und mit Rofecoxib sowie Indometacin-behandelten Tieren. Die Bilder wurden mittels ImageJ-Analyse bezüglich der grün gefärbten Bereiche ausgewertet. In Abb. 50D sind sowohl die Neointima, die Media, als auch ein fest definierter Bereich der Adventitia um die Media herum in die Auswertung mit einbezogen. Hier führte Rofecoxib im Gegensatz zu Indometacin zu einer signifikanten Senkung der HA-Akkumulation. In Abb. 50E wurde ausschließlich der Gehalt an HA in der Neointima bestimmt. Sowohl die Behandlung mit Rofecoxib als auch mit Indometacin führte zu einer signifikanten Reduktion des HA-Gehaltes in der Neointima im Vergleich zur Kontrolle.



**Abbildung 50:** A-C, Exemplarische Darstellung der Affinitätshistochemie für HA in der A. carotis sinistra von unbehandelten (Kontrolle, A) und mit Rofecoxib (B) oder Indometacin (C) behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Ligatur. HA-Expression wurde über die Detektion des HA-Bindeproteins (HABP) dargestellt. (Ad) Adventitia, (I) Intima, (M) Media. **D**, Quantifizierung der für HABP positiv gefärbten Bereiche (grün) von Neointima, Media und Adventitia mittels ImageJ, n = 5 – 6; \*, p < 0,05 vs. Kontrolle. **E**, Quantifizierung der HABP positiv gefärbten Bereiche in der Neointima, n = 6 – 7; \*, p < 0,05 vs. Kontrolle.



## 4 Diskussion

Das Ziel einer medikamentösen Atherosklerosetherapie ist es einerseits, Risikofaktoren für die Entstehung zu minimieren und andererseits die Progression der Atherosklerose zu vermindern. Dies bedeutet, dass Komplikationen, die zu schwerwiegenden Ereignissen wie Myokardinfarkten oder Apoplex führen können, zu reduzieren sind. Erfolgreich wird dies bereits seit langem durch eine antikoagulatorische Therapie mit niedrig dosierter Acetylsalicylsäure, einem Inhibitor der Cyclooxygenase-1 (COX-1), durchgeführt<sup>96</sup>. Statine besitzen neben der Verminderung des *low density lipoproteins* (LDL) auch pleiotrope Effekte, welche möglicherweise dazu beitragen das kardiovaskuläre Risiko zu reduzieren.

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) übt im Rahmen der Progression und Restenose von atherosklerotischen Läsionen entscheidende Funktionen aus. Bisher ist der genaue Einfluss von Statinen auf Matrixbestandteile wie Proteoglykane und Hyaluronsäure (HA) *in vivo* nicht bekannt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde unter Verwendung des hydrophilen Statins Rosuvastatin im Modell der atherosklerotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Maus die Zusammensetzung der EZM analysiert. Im zweiten Teil wurde auf die Regulation der pro-atherosklerotisch wirkenden HA durch vasodilatierende Prostaglandine eingegangen.

### 4.1 Wirkungen von Rosuvastatin an einem murinen Atherosklerose-Modell

#### 4.1.1 Auswirkungen auf Lipidparameter

Bei den mit Rosuvastatin behandelten Tieren zeigte sich ein erhöhtes Körpergewicht. Die Mäuse zeigten jedoch keine Veränderung des Gesamtcholesterols im Plasma. Diese Ergebnisse entsprechen den publizierten Daten, dass Statine in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen Einfluss auf den LDL-Spiegel haben<sup>97,98</sup>, da diese Mäuse niedrige LDL-Plasmaspiegel aufweisen. LDL-Rezeptor-*knockout*-Mäuse (LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse) hingegen zeigen bei einer Behandlung mit Statinen eine Verminderung des Cholesterolsplasmaspiegels<sup>99</sup>. Diese Mäuse sind ein weiteres Modell zur Untersuchung der Atherosklerose. ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln unter normalen Fütterungsbedingungen mit fettarmem Futter einen Gesamtcholesterolgehalt von 400 - 600 mg/dl<sup>100</sup>, was mit den hier gezeigten Ergebnissen übereinstimmt. Die Atherosklerose entwickelt sich in diesen Tieren spontan. LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen jedoch erst durch Fütterung mit fettreichem Futter eine Bildung von atherosklerotischen Plaques<sup>101</sup>. Der Unterschied in der Ausbildung der Atherosklerose dieser beiden Mauslinien ist in den unterschiedlichen Lipoproteinen, die zur Atherogenese in den Mäusen führen, begründet. Die Atherogenese wird in der LDLR<sup>-/-</sup>-Maus durch erhöhte LDL-Plasmakonzentrationen initiiert<sup>101</sup>. Die LDL-

Plasmakonzentration ist in dieser Maus, in einem zur Bildung von Atherosklerose ausreichenden Maß, nur nach Fütterung einer lipidreichen Westerndiät ausreichend hoch. Die Atherogenese in der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus wird hingegen durch erhöhte Chylomikronen- und VLDL-Konzentrationen (*very low density lipoprotein*) initiiert. In ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen liegen Chylomikronen und VLDL, welche sonst an ApoE gebunden zur Leber transportiert und dort durch rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen werden, vermehrt frei im Plasma vor<sup>100</sup>. Durch die *per se* unterschiedlich hohen LDL-Plasmakonzentrationen in beiden Modellen ist auch die unterschiedliche Wirkung von Statinen auf den Plasmacholesterolspiegel zu erklären. Rosuvastatin senkt allerdings die Cholesterolspiegel *in vivo* beim Menschen derart stark, dass es sogar in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer Senkung des Plasmacholesterols kommen kann<sup>102</sup>. In dem gewählten Modell lag keine Senkung des LDL-Spiegels vor. Dies ermöglichte die Untersuchung von Effekten, die Statine unabhängig von der LDL-Senkung auf die EZM von atherosklerotischen Plaques haben. In der 32 Wochen dauernden, chronischen Behandlung kam es durch Rosuvastatin zu einer dosisabhängigen Senkung der Triglyceride im Plasma und zu einer zusätzlichen Reduktion des Lipidgehaltes der atherosklerotischen Plaques im Aortenursprung. Auch mit Simvastatin wurde eine Senkung des Cholesterolgehaltes von Aorten gezeigt<sup>98</sup>. Der verminderte Lipidgehalt der atherosklerotischen Plaques im Aortenursprung könnte auf die Effekte von Rosuvastatin auf die EZM zurückzuführen sein. Von Proteoglykanen ist aus Versuchen mit kultivierten glatten Muskelzellen (SMC) bekannt, dass sie in Gegenwart von Statinen eine reduzierte Kapazität zur Bindung von LDL-Partikeln aufweisen<sup>103</sup>. In der vorliegenden Studie könnte dies von Bedeutung sein.

## **4.2 Auswirkungen von Rosuvastatin auf die Größe der atherosklerotischen Läsionen**

Die Größe der atherosklerotischen Plaques ist ein wichtiger Faktor um die Progression der atherosklerotischen Läsionen *in vivo* zu bestimmen. Sie stellt ein Maß für die restenotische Verengung eines Gefäßes nach mechanischer Schädigung des Endothels, welche z.B. durch perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) hervorgerufen wird, dar. Durch diese Verengung des Gefäßes steigt der Flusswiderstand an. Eine reduzierte Größe der atherosklerotischen Plaque ist jedoch nicht allein ausschlaggebend für das Ausbleiben von Folgekomplikationen. In der Beurteilung der Verteilung der atherosklerotischen Läsionen entlang der thorakalen und abdominalen Aorta sowie der Abgänge des Aortensinus ergab sich kein Unterschied in der Größe und Häufigkeit bei mit Rosuvastatin behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrolle. Auch in der Größe der atherosklerotischen Läsionen im Aortenursprung war keine signifikante Veränderung der Intimafläche durch Rosuvastatin erkennbar. Die Größe der Mediafläche blieb ebenfalls unbeeinflusst. Um ein bei allen Tieren vergleichbares Maß für die Plaquegröße einzuführen, wurde der Quotient zwischen Intima und Media bestimmt. In der Gruppe der mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tiere ergab sich ein deutlicher

Trend zu vergrößerten Quotienten im Vergleich zur Kontrolle, was für größere atherosklerotische Plaques spricht. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Bea *et al.*<sup>97</sup>. Sie verwendeten ein ähnliches Versuchsprotokoll und behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ab der 30. Woche für 24 Wochen mit Simvastatin.

Um weitere Aussagen bezüglich der Beschaffenheit der größeren atherosklerotischen Plaques machen zu können, wurde die Zelldichte in den atherosklerotischen Plaques bestimmt. Die Behandlung mit 20 mg Rosuvastatin ergab eine signifikante Reduktion der Zelldichte der atherosklerotischen Plaques. Dies ist ein Hinweis auf eine vermehrte Akkumulation von EZM im interzellulären Raum. Da, wie zuvor beschrieben, Rosuvastatin zu keiner vermehrten Retention von Lipiden in den atherosklerotischen Plaques führte, kann dies als Ursache für eine reduzierte Zelldichte ausgeschlossen werden.

### **4.3 Auswirkungen von Rosuvastatin auf die Zusammensetzung der EZM**

Dem Hinweis auf eine vermehrte Akkumulation von EZM durch Rosuvastatin-Behandlung wurde durch eine Analyse, der in atherosklerotischen Plaques vorkommenden EZM-Bestandteile nachgegangen.

#### **4.3.1 Kollagen - Hinweis auf mögliche Stabilisierung der atherosklerotischen Läsionen**

Kollagen stellt insgesamt ca. 1/3 der gesamten Proteinmasse des Körpers dar. Es bildet den größten Teil der EZM von atherosklerotischen Plaques. In den atherosklerotischen Plaques selber ist Kollagen vermehrt in der fibrotischen Kappe zu finden. In der EZM von atherosklerotischen Plaques sind hauptsächlich zwei Arten Kollagen vertreten: Kollagen Typ I und Typ III; beides sind fibrilläre Kollagene. Kollagen Typ I zeichnet sich durch eine besonders starke Zugfestigkeit aus und verleiht dem Gewebe, in dem es vorkommt, Stabilität.

Zu Beginn der Behandlung mit Rosuvastatin, im Alter von 20 Wochen, zeigten die im Aortenursprung bereits vorhandenen atherosklerotischen Plaques eine lockere Kollagenmatrix, welche vermehrt Kollagen III enthielt. Kollagen III besitzt eine geringere Dichte der einzelnen Fibrillen und ist ein Hinweis auf neu gebildetes Kollagen<sup>88</sup>. Im Alter von 52 Wochen waren die atherosklerotischen Plaques zu komplexen, differenzierten Läsionen entwickelt, welche eine fibrotische Kappe besaßen. Diese Läsionen enthielten Kollagen vom Typ I. Durch Behandlung mit Rosuvastatin über den langen Zeitraum von 32 Wochen wurde dosisabhängig in der gesamten atherosklerotischen Läsion vermehrt Kollagen exprimiert. Das an dieser Stelle akkumulierende Kollagen war hauptsächlich vom Typ I, wie durch die Betrachtung im polarisierten Licht deutlich wurde. Hier zeigte sich weiter, dass nicht nur der Gesamtkollagengehalt der atherosklerotischen Plaques durch Rosuvastatin beeinflusst wurde, sondern auch die Beschaffenheit des Kollagens. So führte die Behandlung mit

der höheren Dosierung von 20 mg/d zu einer signifikant vermehrten Anhäufung von Kollagen Typ I in der gesamten atherosklerotischen Läsion. Die niedrigere Dosierung von 2 mg zeigte keinen Unterschied bezüglich der Menge an Kollagen Typ I im Vergleich zur Kontrolle. Typ I Kollagen zeichnet sich weiter durch eine dichtere Anordnung der Fibrillen aus. Die gezeigten Ergebnisse entsprechen den Befunden von Crisby *et al.*<sup>89</sup> für Pravastatin am Menschen und Fukumoto *et al.*<sup>104</sup> an Kaninchen. Die durch verschiedene Statine induzierte Expression von Kollagen in humanen atherosklerotischen Plaques konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden<sup>105</sup> und stellt einen gruppenspezifischen pleiotropen Effekt dar. Schäfer *et al.*<sup>106</sup> zeigten eine vermehrte Akkumulation von Gesamtkollagen durch eine Rosuvastatin-Behandlung in atherosklerotischen Plaques von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, definierten dieses aber nicht näher.

Verschiedene Studien führten zu der Schlussfolgerung, dass die vermehrte Akkumulation von Kollagen nach einer Behandlung mit Statinen nicht allein durch eine Verstärkung der Expression, sondern auch durch eine Beeinflussung des Abbaus von Kollagen zu begründen ist. Kollagenspaltende Enzyme, so genannte Matrix-Metalloproteinasen (MMP), sind zerstören die Stabilität einer Kollagenmatrix durch Degradation. Von Pravastatin wurde gezeigt, dass es im Kaninchen die Expression von MMP-1, -3 und -9 hemmt<sup>104</sup>. Für die Stabilität der EZM von atherosklerotischen Läsionen ist Kollagen Typ I besonders kennzeichnend und wurde durch Rosuvastatin-Behandlung vermehrt angehäuft. Aus diesem Grund sind die beiden Kollagen Typ I spaltenden Gelatinasen A (MMP-2) und -B (MMP-9) von besonderem Interesse. Cipollone *et al.*<sup>46</sup> konnten in humanen atherosklerotischen Plaques sowohl eine verminderte Expression als auch eine reduzierte Aktivität dieser beiden MMPs unter Behandlung mit Simvastatin nachweisen. Mit *in-situ*-Zymographien wurde die Aktivität der Gelatinasen in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs von Kontroll- und mit 20 mg Rosuvastatin behandelten Tieren bestimmt. Um die Spezifität dieses Systems zu kontrollieren wurde zuvor durch Verwendung von zwei spezifischen MMP-Inhibitoren, TIMP (*Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases*) und 1,10-Phenanthrolin, geklärt, ob das auftretende Farbsignal abhängig von der Aktivität der MMPs ist. Rosuvastatin senkte in einer Dosierung von 20 mg/d\*kg Mausgewicht signifikant die gelatinolytische Aktivität. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Akkumulation auf einem verminderten Abbau durch MMPs beruht. Nicht nur die Aktivität der Gelatinasen war von Interesse, auch ihre differenzielle Expression wurde mittels immunhistochemischer Analyse untersucht. So zeigte sich nach Rosuvastatin-Behandlung eine signifikant verminderte Expression von MMP-2, aber kein Unterschied im Expressions-Niveau von MMP-9 in atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs. Dies ist vergleichbar mit den von Crisby *et al.*<sup>89</sup> publizierten Daten, die durch Pravastatin ausschließlich eine Reduktion von MMP-2 zeigten. Diese Ergebnisse könnten auf substanzspezifische Effekte hindeuten, da Rosuvastatin und Pravastatin hydrophiler sind als die anderen Statine. Die Reduktion der MMP-2-Expression war zwar signifikant, aber lange nicht so stark ausgeprägt, wie die Senkung

der Aktivität der Gelatinasen. Aus diesem Grund scheint die reduzierte gelatinolytische Aktivität der entscheidende Faktor in der Beeinflussung des Kollagengehaltes zu sein. Kontrovers erscheinen in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Aikawa *et al.*<sup>107</sup>. Sie zeigten, dass allein durch eine cholesterolare Diät die Aktivität von MMP-2, -3, und -9 reduziert sowie der Kollagengehalt der atherosklerotischen Plaques von Kaninchen gesteigert wird. Die in diesem System gezeigte Stabilisierung der atherosklerotischen Plaques wurde durch vermindertes zirkulierendes LDL vermittelt, kann aber in dem vorliegenden Modell nicht der Auslöser für die oben genannten Effekte sein, da die Mäuse keine verringerten LDL-Spiegel zeigten.

Rosuvastatin beeinflusste ferner die Akkumulation von Kollagenspaltprodukten in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs. Aus der Spaltung durch MMP-1, -8 und -13 entstandene Neoepitope wurden dosisabhängig nach Behandlung mit Rosuvastatin gesenkt. Geng *et al.*<sup>108</sup> zeigten, dass Kollagenase-3 (MMP-13) und Kollagenase-1 (MMP-1) vermittelte Spaltung von Kollagen-I- und -II-Fibrillen durch Zugabe von rekombinanten kleinen leucinreichen Proteoglykanen (SLRP) wie z.B. Decorin, Biglycan, Fibromodulin und Lumican, verhindert werden konnte. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass SLRP an der Regulation des Abbaus der Kollagenmatrix in der vorliegenden Studie von Bedeutung sein könnten.

#### 4.3.2 Proteoglykane

SLRP zeigen nicht nur Übereinstimmungen bezüglich der Struktur des Kernproteins. Weiterhin besitzen sie als gemeinsames Merkmal die Fähigkeit mit Kollagen zu interagieren. Riessen *et al.*<sup>90</sup> zeigten, dass SLRP in den gleichen Regionen wie Kollagen in humanen atherosklerotischen und restenotischen Plaques akkumulieren. Weiterhin beschrieben sie, dass diese Bereiche durch eine vermehrte Akkumulation von Kollagen gekennzeichnet sind. Für das vorliegende Modell der 52 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>-Maus konnte dieser Befund bestätigt werden. Sowohl in den atherosklerotischen Läsionen der mit Rosuvastatin behandelten Tiere als auch in Kontrollläsionen zeigte sich eine vermehrte Anreicherung von Biglycan und Decorin in Bereichen hoher Kollagendichte. Ob jedoch Statine die Expression von SLRP beeinflussen, war bisher nicht bekannt.

Rosuvastatin erhöhte in der vorliegenden Studie nicht nur die Akkumulation von Kollagen, es zeigte sich außerdem eine deutlich erhöhte Akkumulation von Biglycan und Decorin. Diese beiden Proteoglykane sind in der Lage, Kollagen Typ I und III im Kernprotein zu binden. Die Erhöhung der Akkumulation war sowohl mittels immunhistochemischer Färbung der atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs und der *A. brachiocephalica*, als auch durch Westernblot-Analyse der thorakalen und abdominalen Aorta nachweisbar. Decorin wird von MMP-2, -3 und -7 gespalten, wie Imai *et al.*<sup>109</sup> zeigten. Von Biglycan ist bekannt, dass es durch MMP-13 degradiert wird<sup>110</sup>. Die durch Rosuvastatin-Behandlung verminderte Expression von MMP-2 einschließlich der reduzierten Aktivität der Gelatinasen könnte für die vermehrte

Akkumulation von Decorin verantwortlich sein. Kollagenneoepitope, die u.a. durch MMP-13-Spaltung entstehen, wurden vermindert in den atherosklerotischen Plaques der mit Rosuvastatin behandelten Tiere nachgewiesen. Dies könnte auf eine verminderte Aktivität von MMP-13 hindeuten und ein Grund für die verstärkte Anhäufung von Biglycan sein. Weiterhin konnte von Luan *et al.*<sup>111</sup> für Lovastatin, Cerivastatin und Simvastatin gezeigt werden, dass sie die Sekretion von MMP-1, -2, -3 und -9 dosisabhängig in SMC und Makrophagen senken. Von Furman *et al.*<sup>112</sup> wurde für Rosuvastatin eine verminderte Sekretion von MMP-7 aus humanen Makrophagen gezeigt. MMP-7 ist u.a. für die Spaltung von Decorin verantwortlich.

Biglycan und Decorin besitzen durch das vermehrte Auftreten von leucinreichen Sequenzen in ihren Kernproteinen, eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz und die angehängten Glykosaminoglykane Dermatan- und Chondroitinsulfat eine auffällig ähnliche Struktur. Sie unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre Expressionsorte. Von den jeweiligen Geweben hängt weiter ab, welches Glykosaminoglykan angehängt ist. Beide kommen vermehrt in Haut, Herz und Knochen vor. Die Funktion von Biglycan wurde in der vaskulären Biologie noch nicht vollständig geklärt. Es zeigten sich aber einige interessante Ergebnisse bei der *knockout*-Maus, die weitere Hypothesen im Zusammenhang mit Kollagen zulassen. So weisen Biglycan-*knockout*-Mäuse eine Beeinflussung von Kollagen auf, die sich in einer gestörten Ossifikation der Knochen zeigt<sup>113</sup>. Besonders im Alter manifestiert sich ein Phänotyp mit verminderter Knochenmasse. Diese Mäuse zeigen außerdem eine geringere Dehnbarkeit ihrer Sehnen. In einer neueren Arbeit von Heegaard *et al.*<sup>114</sup> wurden Biglycan-*knockout*-Mäuse mit einem genetischen Hintergrund von BALB/cA-Mäusen gezüchtet. Die männlichen Tiere erlitten spontane Aortenrupturen innerhalb der ersten drei Lebensmonate. Diese Tiere besaßen Strukturanomalien in ihren Kollagenfibrillen: der Durchmesser der einzelnen Fibrillen schwankte stark, so dass im Querschnitt sowohl verstärkt dickere als auch dünnere Fibrillen zu finden waren. Die Ergebnisse dieser Studie legen die Schlussfolgerung nahe, dass Biglycan für die Stabilität der Kollagen-Matrix von Bedeutung ist und sich auch in der Stabilisierung von atherosklerotischen Plaques positiv auswirken könnte.

Decorin ist im Gegensatz zu Biglycan verstärkt *in vivo* und *in vitro* in der vaskulären Biologie untersucht worden. So ist bekannt, dass Decorin die Fibrillogenese von Kollagen hemmt<sup>115</sup>, welche sich in einer verminderten Größe der Fasern äußert. Des Weiteren ist bekannt, dass Decorin mit einer hohen Affinität ( $K_D = 10^{-10}$  M) an Kollagen Typ I bindet<sup>116</sup>. Genauere Auswirkungen von Decorin auf die Fibrillogenese *in vivo* zeigt die Decorin-*knockout*-Maus. Ähnlich der Biglycan-*knockout*-Maus zeigt sie eine Beeinträchtigung der Fibrillenstruktur. Dies manifestiert sich allerdings nicht in einem Phänotyp der Knochen sondern in einem besonders auffälligen Phänotyp der Haut. Durch eine gestörte Anordnung der Kollagenfibrillen, welche durch unterschiedliche Dicke entlang der Lateralachse gekennzeichnet ist, resultiert eine verminderte Zugfestigkeit der Kollagenfasern von Haut und Sehnen<sup>117</sup>. Dieses

Phänomen der Decorin-*knockout*-Maus zeigte sich auch im Herzen nach experimentellem Myokardinfarkt. Auch hier ergaben sich Störungen der Fibrillogenese und daraus resultierend eine verschlechterte hämodynamische Funktion der Herzen<sup>118</sup>. Außerdem konnte von Fischer *et al.*<sup>22</sup> gezeigt werden, dass nach Endothelschädigung der Gentransfer von Decorin in die Neointima zu einer kondensierten Kollagen-Matrix in Ratten führt. Diese ist durch eine verstärkte Expression und Dichte von Kollagen gekennzeichnet. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde in Versuchen mit SMC aus Ratten, welche bovines Decorin überexprimierten und eine verstärkte Fähigkeit zur Kontraktion von Kollagengelen aufwiesen, hergestellt. Järveläinen *et al.*<sup>119</sup> führten dies auf eine vermehrte Genexpression von Kollagen Typ I durch Decorin zurück. Allerdings induziert Decorin auch die Kalzifizierung von vaskulärer EZM<sup>120</sup>. Kalzifizierte Bereiche begünstigen Komplikationen in komplexen atherosklerotischen Läsionen.

Biglycan und Decorin üben nicht nur Einfluss auf die Anordnung der Kollagenfasern und die Fibrillogenese aus. Sie beeinflussen zusätzlich den weiteren Umsatz (*turnover*) von Kollagen, indem sie Kollagenfibrillen vor einem Abbau durch MMP-1 und MMP-13 schützen<sup>108</sup>. Somit führte die Behandlung mit Rosuvastatin in der vorliegenden Studie möglicherweise über die vermehrte Akkumulation von Biglycan und Decorin in atherosklerotischen Läsionen zu einem reduzierten Abbau von Kollagen. Statine vermindern demnach den Abbau von Kollagen nicht nur durch eine Senkung der Aktivität von MMPs, sondern möglicherweise auch durch die protektive Wirkung von SLRP.

Ein weiterer Faktor, der im Zusammenhang mit Decorin und Biglycan in der Atherosklerose Einfluss auf die Beschaffenheit der EZM ausübt, ist der Wachstumsfaktor *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ). Er bindet sowohl an Biglycan als auch an Decorin. Dadurch wird die weitere Signaltransduktion von TGF- $\beta$  gehemmt<sup>121</sup>. TGF- $\beta$  wird besonders in asymptomatischen, atherosklerotischen Plaques exprimiert und, wenn gleichzeitig eine vermehrte Akkumulation von Prokollagen assoziiert ist, als Marker für Stabilität postuliert<sup>14</sup>. Die Eigenschaften von TGF- $\beta$  werden jedoch kontrovers diskutiert. Zu den weiteren anti-atherosklerotischen Eigenschaften von TGF- $\beta$  gehört die Produktion des entzündungshemmenden Zytokins Interleukin-10 (IL-10) in Makrophagen<sup>122</sup>. TGF- $\beta$  hemmt ferner die Aktivierung von SMC über den Signalüberträger Smad3<sup>123</sup> und damit die Fähigkeit der Zellen zur Migration und Proliferation. Außerdem fördert TGF- $\beta$  die Differenzierung von SMC und die Expression von  $\alpha$ -Aktin<sup>124</sup>, welche für die Ausbildung einer stabilen fibrotischen Kappe von Bedeutung sind. In ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen führt die Hemmung der TGF- $\beta$ -Signalkaskade durch einen neutralisierenden Antikörper zu einer verstärkten Ausbildung von atherosklerotischen Plaques mit einem Anstieg von entzündlichen Komponenten und vermindertem Kollagengehalt<sup>125</sup>. Zusätzlich zu den genannten anti-atherosklerotischen Eigenschaften vermittelt TGF- $\beta$  auch pro-atherosklerotische Effekte, indem es die Fibrose fördert und die Regeneration des Endothels hemmt<sup>126</sup>.

Eine gesteigerte Expression von Biglycan und Decorin und die damit verbundene Hemmung von TGF- $\beta$ -vermittelter Signaltransduktion hätte demnach ein Wegfallen der anti-atherosklerotischen Effekte von TGF- $\beta$  zur Folge. TGF- $\beta$  übt seine Effekte hauptsächlich auf SMC oder Monozyten aus. Cipollone *et al.*<sup>14</sup> zeigten, dass die Expression von TGF- $\beta$  in SMC und Makrophagen von humanen atherosklerotischen Plaques lokalisiert ist. In der vorliegenden Studie befand sich die Akkumulation von SMC in der fibrotischen Kappe der atherosklerotischen Plaques. In diesem Bereich akkumulierten weder Decorin noch Biglycan. Im Bereich der Media waren ebenfalls  $\alpha$ -SM-Aktin-positive SMC zu finden. Hier wurden Biglycan und Decorin jedoch nur geringfügig exprimiert. Im Inneren der atherosklerotischen Plaques, wo die Lokalisation der beiden SLRP hauptsächlich zu finden war, befanden sich sehr wenige Zellen, die weder positiv für  $\alpha$ -Aktin waren, noch Makrophagen-Antigene exprimierten. Daher ist eine Bindung von TGF- $\beta$  durch Biglycan und Decorin in der vorliegenden Studie eher von untergeordneter Bedeutung, zumal anti-atherosklerotische Effekte wie eine vermehrte Expression von Kollagen besonders in der fibrotischen Kappe von Rosuvastatin nicht gehemmt wurden. Die beschriebenen Interaktionen der SLRP mit Kollagen lassen den Schluss zu, dass die hier beobachtete Akkumulation von Decorin und Biglycan zu einem möglicherweise stabileren Phänotyp von atherosklerotischen Plaques beiträgt.

Perlecan und Versican sind zwei weitere Proteoglykane, die in humanen atherosklerotischen Plaques akkumulieren. Versican ist vermehrt im Bereich des nekrotischen Kerns zu finden und akkumuliert in Bereichen, die durch eine geringere Kollagendichte gekennzeichnet sind. Versican bindet auch im Gegensatz zu Biglycan und Decorin nicht an Kollagen. Kunjathoor *et al.*<sup>28</sup> beschreiben, dass in der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus keine Akkumulation von Versican in den atherosklerotischen Plaques nachweisbar ist. Analog dazu war Versican innerhalb der atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs in den Mäusen der vorliegenden Studie ebenfalls nicht nachweisbar. Allerdings zeigten die Aortenklappen eine starke Deposition von Versican, welche jedoch durch Rosuvastatin nicht beeinflusst wurde. Da Hyaluronsäure (HA) ebenfalls innerhalb der Klappen exprimiert wurde, liegt der Schluss nahe, dass HA vermutlich im Zusammenhang mit Versican eine viskoelastische Matrix bildet, die eine Elastizität der Klappen sichert. Perlecan akkumuliert in murinen atherosklerotischen Plaques an Stelle des Versicans verstärkt. Es hat ebenso wie Versican keine Affinität zu Kollagen und wurde durch Rosuvastatin-Behandlung nicht beeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Effekt, den Rosuvastatin auf Proteoglykane in der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus ausübt, auf die beiden Kollagen-bindenden SLRP Biglycan und Decorin beschränkt blieb.

### 4.3.3 Versuche an humanen glatten Muskelzellen mit Rosuvastatin

Die zentralen Befunde der vorliegenden Statin-Studie an Mäusen waren die vermehrte Akkumulation von Biglycan und Decorin, assoziiert mit vermehrter Kollagenakkumulation. Ob dieser Effekt auf direkte transkriptionelle Effekte zurück zu führen ist, wurde an humanen glatten Muskelzellen (hSMC) untersucht. Ascorbinsäure ist als Co-Faktor für die Ausbildung des Tropokollagens durch Hydroxylierung der Aminosäuren Lysin und Prolin essentiell. In kultivierten Zellen führt Ascorbinsäure zu einer signifikant erhöhten Kollagen-Synthese der Zellen<sup>127</sup> und verstärkt die Polymerisierung des gebildeten Kollagens. Nach 24 h Stimulation mit Rosuvastatin ergab sich keine erhöhte Expression der mRNA von Biglycan und Decorin. Im gleichen Versuchsaufbau zeigte sich auch für Ascorbinsäure keine Steigerung der Expression von Biglycan und Decorin. Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression der beiden SLRP nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen erneut überprüft. Diese längere Stimulationszeit ist den chronischen *in vivo* Versuchen ähnlicher als eine Inkubation von 24 h. Nach fünf Tagen Stimulation mit Rosuvastatin wurden sowohl Biglycan als auch Decorin weiterhin nicht beeinflusst. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu beachten, dass eine Stimulationszeit von fünf Tagen nicht das Ausmaß einer chronischen Behandlung von 32 Wochen im komplexeren Tiermodell imitieren kann. Von Schwartz *et al.*<sup>128</sup> wurde gezeigt, dass Ascorbinsäure zeitabhängig die Synthese von Kollagen in SMC steigert. Ein Anstieg des Gehaltes an polymerem Kollagen durch Zugabe von Ascorbinsäure könnte für die signifikant erhöhte Expression von Biglycan verantwortlich sein. Auch die mRNA-Expression von Decorin wurde nach fünf Tagen signifikant durch Zugabe von Ascorbinsäure gesteigert. Polymeres Kollagen scheint also möglicherweise die Expression der beiden Kollagen-bindenden SLRP zu stimulieren. Dieser Zusammenhang ist für SMC bisher noch nicht beschrieben worden. Schwartz *et al.*<sup>128</sup> zeigten jedoch in ihrer Arbeit, dass Ascorbinsäure zusätzlich zu einem Anstieg von Kollagen, die Synthese von Fibronectin und Proteoglykanen stimuliert. Die in *in vitro*-Experimenten beobachtete stärkere Stimulation der Decorin-Expression im Vergleich zur Biglycan-Expression entspricht den in der Maus gefundenen Expressionsniveaus. Auch dort ist Decorin im Vergleich zu Biglycan ebenfalls verstärkt exprimiert. Von Decorin ist weiter bekannt, dass die Expression in Osteoblasten-ähnlichen Zellen<sup>129</sup> und Chondrozyten<sup>130</sup> nach Stimulation mit Ascorbinsäure steigt. Ob dieser Effekt direkt über Ascorbinsäure vermittelt wird oder von der Bildung des Kollagens abhängt, bleibt weiterhin spekulativ. Da es aber durch die Behandlung mit Rosuvastatin zu einem starken Anstieg von Kollagen in der EZM der atherosklerotischen Läsionen in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen kam, liegt die Vermutung nahe, dass Kollagen die Expression von Biglycan und Decorin beeinflusst.

#### 4.3.4 Kollagenunabhängige Hinweise auf eine Stabilisierung der atherosklerotischen Läsionen durch Rosuvastatin

Es ist bekannt, dass Decorin die Kalzifizierung induziert. In SMC führte eine retrovirale Überexpression von Decorin zu einer vermehrten Ablagerung von Kalziumhydroxylapatit, wie Fischer *et al.*<sup>120</sup> zeigten. Weiter wurde von ihnen gezeigt, dass in humanen atherosklerotischen Läsionen Decorin in Bereichen verstärkter Kalzifizierung lokalisiert ist. Wie bereits erwähnt, deutet die Kalzifizierung von atherosklerotischen Plaques auf ein erhöhtes Risiko für koronare Ereignisse hin und beeinträchtigt konzentrationsabhängig die Stabilität von atherosklerotischen Plaques<sup>15</sup>. In der vorliegenden Studie wurde sowohl bei mit Rosuvastatin behandelten als auch bei unbehandelten Tieren keine Kalzifizierung der atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs nachgewiesen.

Ein weiterer Hinweis auf vorangegangene Fissuren oder Einblutungen stellt die Ablagerung von Eisen innerhalb der atherosklerotischen Plaques dar. Eisen war jedoch nur in sehr geringer Menge innerhalb der atherosklerotischen Plaques nachweisbar. Auch diesbezüglich konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Kolodgie *et al.*<sup>16</sup> postulieren, dass Einblutungen innerhalb einer atherosklerotischen Plaque eine mögliche Quelle für freies Cholesterin im nekrotischen Kern darstellen könnten. Sie begründen ihre Hypothese durch den ungewöhnlich hohen Gehalt an freiem Cholesterin in der Erythrozytenmembran. In einem experimentellen Modell zeigten sie an atherosklerotischen Läsionen im Kaninchen, dass intramurale Blutungen die Menge an Cholesterolkristallen im Vergleich zur Kontrolle steigern und damit den nekrotischen Kern ausdehnen und zur Destabilisierung der atherosklerotischen Läsion führen. In den Tieren dieser Untersuchung waren keine atherosklerotischen Plaques zu finden, welche Reste fibrotischer Kappen innerhalb der Plaque aufwiesen, was auf frühere Rupturen der Kappe hingewiesen hätte.

Die Menge bzw. Anordnung von SMC ist neben der Menge an Kollagen ein wichtiger Marker für die Stabilität einer fibrotischen Kappe. Symptomatische atherosklerotische Plaques zeigen eine geringere Anzahl SMC als asymptomatische atherosklerotische Plaques sowie eine dünne fibrotische Kappe<sup>93</sup>. In der vorliegenden Untersuchung waren die atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs der unbehandelten Tiere mit einer dünnen, diskontinuierlichen Schicht  $\alpha$ -SM-Aktin-positiver SMC bedeckt. Im Vergleich dazu wiesen die atherosklerotischen Plaques der mit Rosuvastatin behandelten Tiere kontinuierlichere Kappen auf. Deutlich wird dies im Vergleich des Verhältnisses der fibrotischen Kappe zur Gesamtplaqueoberfläche, welches durch die Behandlung mit Rosuvastatin signifikant erhöht wurde. Da die Akkumulation von SMC in den Schulterregionen von humanen atherosklerotischen Plaques die Wahrscheinlichkeit für Rupturen reduziert, stellt der durch Rosuvastatin beeinflusste Umbau der fibrotischen Kappe einen weiteren wichtigen Hinweis für die Stabilisierung atherosklerotischer Läsionen dar.

Für die genaue Untersuchung von Rupturen in atherosklerotischen Läsionen von Mäusen fehlt bisher ein experimentelles Modell mit physiologischen Bedingungen. Bisher konnte nur unter einer spezifischen Bedingung eine spontane Plaqueruptur gezeigt werden. Williams *et al.*<sup>13</sup> zeigten, dass 50 % der von ihnen untersuchten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einem gemischten genetischen Hintergrund für C57BL6 und 129SvJ und einer cholesterolreichen Diät, im Alter von 60 Wochen eine Ruptur der atherosklerotischen Plaques in der *Arteria brachiocephalica* zeigten. Aus Modellen, wie dem vorliegenden, bei denen auf eine Westerndiät verzichtet wurde, sind daher nur Hinweise, die auf die Stabilisierung von atherosklerotischen Plaques hindeuten zu entnehmen.

#### 4.3.5 Einfluss von Rosuvastatin auf die Hyaluronsäure-Akkumulation

Neben den genannten Proteoglykanen kommen dem Glykosaminoglykan HA weitere wichtige Funktionen zu. HA wird durch seine proliferations- und migrationsfördernden Eigenschaften als pro-atherogen betrachtet. Bisher ist kein Einfluss von Statinen auf die Synthese von HA bekannt. Eine Rosuvastatin-Behandlung von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen reduzierte in der vorliegenden Studie signifikant den HA-Gehalt der atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs. In einer Arbeit von Sussmann *et al.*<sup>77</sup> konnte gezeigt werden, dass endogen gebildete Prostaglandine wie PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> die Sezernierung von HA in SMC stimulieren. Dies erfolgt über die Stimulation der IP- und EP-Rezeptoren. Diese stimulieren wiederum die HAS2-Expression, was zu einer verstärkten Freisetzung von HA in den extrazellulären Raum führt. In wie weit dieser Zusammenhang *in vivo* eine Rolle spielt, ist bisher noch nicht genau geklärt. Sussmann *et al.*<sup>77</sup> konnten allerdings eine Kolo-kalisierung von HA und COX-2, welche PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> bildet, in humanem Gewebe feststellen. Da von Statinen bekannt ist, dass sie die Expression von COX-2 in der atherosklerotischen Plaque senken, liegt die Vermutung nahe, dass durch Rosuvastatin eine ähnliche Signalkaskade in Gang gesetzt wurde. Eine genaue Analyse der mRNA-Expression der einzelnen HA-Synthase-Isoformen (HAS1-3) in der Aorta zeigte allerdings keine Verminderung derselbigen durch Rosuvastatin. Die Expression von HAS1, HAS2 und HAS3 wurde von Rosuvastatin nicht beeinflusst. Auch über eine Steigerung der Expression der HA-abbauenden Enzyme, HYAL1 und HYAL2, ließ sich die Verringerung der HA-Akkumulation nicht erklären. Die Expression von HYAL1 und HYAL2 blieb unbeeinflusst. Die Regulation des HA-Gehaltes der atherosklerotischen Plaques scheint also an dieser Stelle komplexeren Mechanismen zugrunde zu liegen. Eine mögliche Erklärung könnte eine Gegenregulation sein, die aufgrund der bereits reduzierten Akkumulation von HA innerhalb der atherosklerotischen Plaques zu einem ausgeglichen Niveau der Auf- und Abbau-beeinflussenden Enzyme führt.

#### 4.3.6 Rosuvastatin-Behandlung reduziert COX-2-Expression in atherosklerotischen Läsionen

Ein Teil der Plaque-stabilisierenden Effekte von Statinen werden auf ihr Potential zur Reduktion der Inflammation innerhalb der atherosklerotischen Plaques durch Wirkungen auf SMC und Monozyten zurückgeführt. So zeigten Cipollone *et al.*<sup>46</sup>, dass durch eine Behandlung von Patienten mit Simvastatin die Expression von COX-2 und mPGES innerhalb humaner atherosklerotischer Plaques gesenkt wird. Sie zeigten weiter, dass die gleichzeitige Reduktion der Anzahl von Makrophagen in der fibrotischen Kappe zu einer PGE<sub>2</sub>-abhängigen Verringerung der Expression und Aktivität von MMP-2 und -9 führt. Auch Martin-Ventura *et al.*<sup>131</sup> zeigten eine Reduktion der Expression von COX-2 und der Anzahl an Makrophagen durch Atorvastatin innerhalb humaner atherosklerotischer Plaques. Für Rosuvastatin sind keine Daten bezüglich der Expression von COX-2 in atherosklerotischen Läsionen bekannt. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Expression von COX-2 sowohl durch die niedrige Konzentration von 2 mg Rosuvastatin als auch durch 20 mg signifikant in den atherosklerotischen Läsionen des Aortenursprungs gesenkt. Auch hier war die COX-2-Expression in Bereichen mit hoher SMC- und Makrophagendichte der fibrotischen Kappe lokalisiert. Dies entspricht den zuvor genannten Ergebnissen anderer Studien. Allerdings blieb die Anzahl der Makrophagen durch Rosuvastatin unbeeinflusst bzw. wurde geringfügig erhöht. Makrophagen waren nur im Bereich der fibrotischen Kappe und dort nur in geringer Anzahl nachweisbar. Der geringe Basalwert der Makrophagenanzahl in den atherosklerotischen Plaques unbehandelter Tiere könnte eine Erklärung für das Ausbleiben einer Verminderung durch Rosuvastatin darstellen. Ein verringerter Basalwert könnte seinerseits durch das Fehlen einer fettreichen atherogenen Diät bedingt sein. Somit würde an dieser Stelle der Großteil der COX-2-Synthese aus den SMC stammen. In den atherosklerotischen Plaques der Aorta konnte weiter eine verminderte Expression von COX-2-mRNA nachgewiesen werden. Kim *et al.*<sup>132</sup> zeigten in einer kürzlich erschienenen Arbeit, dass Rosuvastatin in Endothelzellen die Expression verschiedener Entzündungsmarker einschließlich COX-2 nach Stimulation mit Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) senkt. Die Reduktion der inflammatorischen Antwort durch Rosuvastatin in dieser Arbeit wird über eine Hemmung von *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase, und *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF $\kappa$ B) vermittelt. JNK ist ein wichtiger Mediator der Entzündungsantwort und Aktivator in der NF $\kappa$ B-vermittelten Signaltransduktion. Der Rosuvastatin-vermittelte Effekt ist abhängig von der Hemmung der  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase und ist mit Mevalonsäure umkehrbar, was auf eine Hemmung der kleinen GTPase RhoA und ihrer Kinase (ROCK) schließen ließ. Auch Hernandez-Presa *et al.*<sup>133</sup> zeigten im Kaninchen, dass die verminderte COX-2-Expression nach Atorvastatin-Behandlung über eine gesenkte Aktivität von NF $\kappa$ B vermittelt ist. Cipollone *et al.*<sup>46</sup> weisen in einer weiteren Arbeit nach, dass in Monozyten die statinvermittelte Verringerung des COX-2 abhängig gebildeten PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub>

ebenfalls von der Hemmung der  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase abhängig ist. Vergleichbar mit dem eingangs gezeigten Ergebnis, dass Rosuvastatin die Lipidmenge in den atherosklerotischen Plaques des Aortenursprungs senkte, zeigten Cipollone *et al.*<sup>46</sup> eine Reduktion des Lipidgehaltes durch Simvastatin in humanen atherosklerotischen Plaques. Sie diskutierten damit eine Abhängigkeit der Verminderung von COX-2 in den atherosklerotischen Plaques. Im Gegensatz zu der weitaus häufiger publizierten Senkung von COX-2 durch Statine zeigten Degraeve *et al.*<sup>134</sup>, dass Mevastatin und Lovastatin die Expression von COX-2 in SMC *in vitro* durch eine Rho-Hemmung erhöhten. Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf die unterschiedliche Beeinflussung der COX-2-Regulation durch verschiedene Statine zurückzuführen.

Im Gegensatz zu der gesenkten COX-2-Expression in den atherosklerotischen Plaques wurde im Urin der mit Rosuvastatin behandelten Tiere keine Senkung der Metaboliten-Konzentration von PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> gefunden. Stattdessen waren sowohl 2,3-Dinor-6-keto-PGF-1 $\alpha$  (PGI-M) als auch PGE-M signifikant durch Rosuvastatin-Behandlung erhöht. Diese Daten stehen im Einklang mit den von Birnbaum *et al.*<sup>135</sup> publizierten kardioprotektiven Effekten von Atorvastatin gegen Ischämie-Reperfusionsschädigung. So zeigten sie eine verminderte Infarktgröße durch Atorvastatin, welche über eine gesteigerte Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) sowie eine in der Signalkaskade nachgeschaltete Steigerung von COX-2, PGE<sub>2</sub>-Synthase und PGI<sub>2</sub>-Synthase vermittelt wurde. So verdeutlichen die gesteigerten Konzentrationen der Metaboliten von PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> im Urin, dass die Senkung der COX-2-Expression auf atherosklerotische Plaques beschränkt bleibt und sich nicht, wie bei einer Hemmung durch COX-Inhibitoren, auf das gesamte System auswirkt. PGI<sub>2</sub> bleibt demnach auch bei einer Rosuvastatin-Behandlung in der Lage, seine vasodilatierenden Eigenschaften im Endothel und Myokard auszuüben. Dies stellt einen enormen Vorteil dar, zumal bekannt ist, dass es durch die Hemmung des atheroprotektiven PGI<sub>2</sub> durch COX-2-Inhibitoren vermehrt zu kardiovaskulären Ereignissen kommen kann, wie die VIGOR-Studie<sup>6</sup> zeigte. Des Weiteren zeigte sich ein erhöhter Spiegel von 2,3-Dinor-TXB<sub>2</sub>. Dieser korreliert meist mit einer Erhöhung des oxidativen Stresses. Durch Rosuvastatin-Behandlung ließ sich jedoch keine Erhöhung des oxidativen Stresses *in vivo* durch Bestimmung von 8,12-Iso-IPF-VI als Parameter bestimmen. Dies lässt auf antioxidative Eigenschaften von Rosuvastatin schließen, die den zu erwartenden oxidativen Stress ausgleichen. Grosser *et al.*<sup>136</sup> zeigten, dass Rosuvastatin die Hämoxygenase-1, einen Mediator antioxidativer Effekte, in Endothelzellen heraufreguliert. Dieser Effekt könnte eine mögliche Erklärung für die unveränderte Konzentration von 8,12-Iso-IPF-VI sein, auch wenn die Konzentration von 2,3-Dinor-TXB<sub>2</sub> im Urin erhöht war.

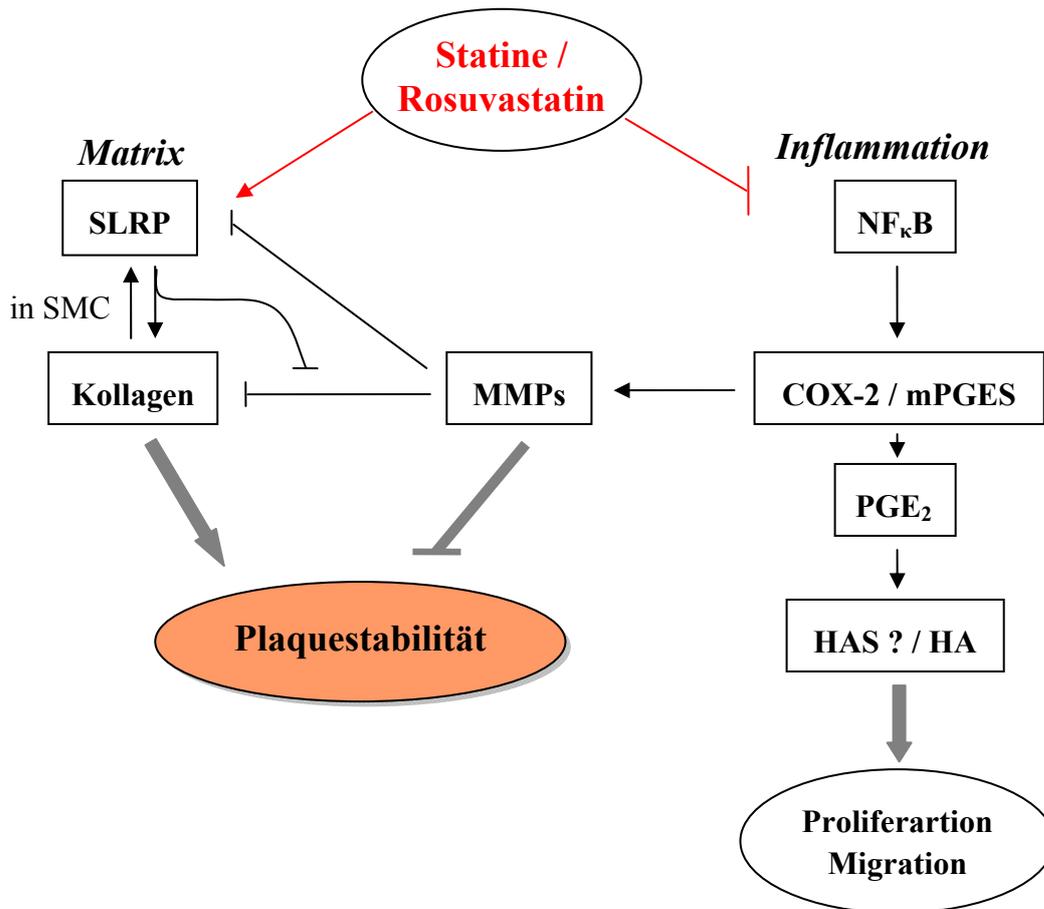
#### 4.4 Wirkung von Statinen auf die extrazelluläre Matrix von humanen atherosklerotischen Läsionen

Den zentralen Befund der Untersuchung mit Rosuvastatin stellt die vermehrte Akkumulation von Kollagen durch die beiden Kollagen-bindenden SLRP Biglycan und Decorin dar. Inwieweit sich dieser Effekt auf Rosuvastatin beschränkte und ob sich die im Mausmodell gezeigten Effekte auch auf humane atherosklerotische Plaques übertragen ließen, wurde anhand der atherosklerotischen Läsionen einer kleinen Patientenkohorte bestimmt. Es wurden atherosklerotischen Läsionen von Patienten analysiert, die zuvor mit Simvastatin, Atorvastatin oder Pravastatin behandelt wurden. Die atherosklerotischen Plaques der mit Statinen behandelten Patienten wiesen einen erhöhten Kollagengehalt auf, auch wenn dies im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant war. Die Dichte der Kollagenfasern war jedoch in der Gruppe der behandelten Patienten signifikant erhöht. Des Weiteren wurde der zuvor beschriebene Zusammenhang zwischen Biglycan und Decorin in humanen atherosklerotischen Plaques untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass je nach Art des vorkommenden Gewebes Decorin unterschiedlich stark akkumuliert. Restenotische Plaques mit lockerem fibroproliferativem Gewebe zeigen eine sehr geringe Akkumulation von Decorin. In primären atherosklerotischen Läsionen ist dagegen eine verstärkte Akkumulation von Decorin nachweisbar, wie Riessen *et al.* zeigten<sup>90</sup>. In Vorversuchen in humanen atherosklerotischen Plaques der *A. carotis* (Daten nicht gezeigt) war die Akkumulation von Decorin nur schwach ausgeprägt. Im eingangs beschriebenen Mausmodell waren jedoch sowohl Biglycan als auch Decorin nach der Behandlung mit Rosuvastatin vermehrt in den atherosklerotischen Läsionen nachweisbar. Zusätzlich akkumulierten sie in den gleichen Bereichen wie Kollagen. Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde eine Doppelfärbung von Decorin und Biglycan in den humanen atherosklerotischen Plaques durchgeführt. Durch eine Behandlung mit den drei verschiedenen Statinen wurde auch hier die Menge an akkumulierendem Biglycan und Decorin signifikant erhöht.

Daraus lässt sich schließen, dass die vermehrte Akkumulation von Biglycan und Decorin und die gleichzeitig dichtere Anordnung der Kollagenfibrillen möglicherweise auch in Patienten und durch weniger hydrophile Vertreter der Statine verursacht werden könnte.

Zusammengefasst lassen sich folgende Kernzusammenhänge zwischen Statinen, im Speziellen Rosuvastatin, in atherosklerotischen Läsionen herleiten. Statine stabilisieren atherosklerotische Läsionen über eine vermehrte Akkumulation von Kollagen und eine Reduktion der Inflammation. Nach einer Behandlung mit Rosuvastatin ist die qualitative Anordnung der Kollagenfasern zu einem dichteren Netzwerk und einer stabileren Kollagenmatrix nachweisbar. Dies kann durch die Beeinflussung der Fibrillogenese und durch einen reduzierten Abbau begründet werden. Die Behandlung mit Statinen verstärkte in atherosklerotischen Läsionen die Akkumulation der SLRP

Biglycan und Decorin, welche essentiell für die Anordnung von Kollagenfibrillen zu stabilen Fasern sind. SLRP verhindern zusätzlich den Abbau der Fibrillen durch MMPs. Rosuvastatin beeinflusste weiter den Abbau von Kollagen durch eine verminderte gelatinolytische Aktivität der MMPs und eine reduzierte Akkumulation von MMP-2 in atherosklerotischen Plaques. *In vitro*-Experimente an SMC zeigten eine Stimulation der mRNA von Biglycan und Decorin durch polymeres Kollagen. Dieser positive Rückkopplungsmechanismus trägt möglicherweise auch *in vivo* zur vermehrten Expression von Biglycan und Decorin bei. Die gesenkte Aktivität von MMPs ist durch eine Statin-vermittelte Reduktion der Inflammation innerhalb der atherosklerotischen Läsionen begründet. Rosuvastatin senkte die Expression und Akkumulation von inflammatorisch wirkender COX-2. Dieser Effekt ist möglicherweise über eine Hemmung von NF $\kappa$ B über RhoA/ROCK vermittelt. Die reduzierte Aktivierung von Rho ist wiederum von der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase abhängig, da dadurch die Isoprenoid-Membranverankerung von Rho verhindert wird. Mit der verminderten Expression von COX-2 ist möglicherweise eine reduzierte Expression von mPGES assoziiert, die wiederum zu einer verminderten PGE<sub>2</sub>-Synthese beiträgt. PGE<sub>2</sub> stimuliert die Synthese von HA. Die Reduktion der PGE<sub>2</sub>-Synthese durch Rosuvastatin innerhalb der atherosklerotischen Plaques könnte der Grund für einen verminderten HA-Gehalt der atherosklerotischen Plaques nach Rosuvastatin-Behandlung sein. HA trägt über migrations- und proliferationsfördernde Eigenschaften möglicherweise zur Initiation und Progression von atherosklerotischen Plaques bei. Alle Einflüsse von Rosuvastatin auf die EZM deuten auf eine vermehrte Stabilisierung der atherosklerotischen Läsionen hin und sind schematisch in Abb. 51 dargestellt.



**Abbildung 51:** Zusammenfassung der Einflüsse, die Rosuvastatin auf die EZM und Inflammation in atherosklerotischen Läsionen ausüben könnte. Statine führen zu einer vermehrten Synthese von Matrixbestandteilen und zu einer Hemmung der Inflammation in atherosklerotischen Läsionen. Rosuvastatin führt zu einer vermehrten Akkumulation von kleinen leucinreichen Proteoglykanen (SLRP) in atherosklerotischen Läsionen. SLRP wiederum erhöhen die Akkumulation von Kollagen, indem sie Kollagen binden und dadurch den Abbau von Kollagen durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) verringern. Kollagen führt in vitro in glatten Muskelzellen (SMC) zu einer verstärkten Expression von SLRP. Über eine verminderte Aktivität von NF $\kappa$ B reduziert Rosuvastatin die Expression sowie die Aktivität von COX-2 und der mikrosomalen Prostaglandin-E-Synthase (mPGES). Die dadurch bedingte verminderte Inflammation in der atherosklerotischen Plaque ist assoziiert mit einer gesenkten MMP-Aktivität. Dies führt zu einem verminderten Abbau von SLRP und Kollagen. Vermehrte Kollagen-Akkumulation und reduzierte MMP-Aktivität sind Hinweise auf eine mögliche Plaquestabilisierung. Durch die gesenkte Aktivität von COX-2 und mPGES bedingt werden geringere Mengen Prostaglandin E $_2$  (PGE $_2$ ) freigesetzt. Reduzierte PGE $_2$ -Konzentrationen senken möglicherweise die Hyaluronsäure-Synthase-Expression (HAS) und die Synthese von HA in atherosklerotischen Plaques. Hyaluronsäure (HA) vermittelte Migration und Proliferation von SMC in den atherosklerotischen Plaques wäre dadurch gehemmt.

#### 4.5 COX-Inhibitor vermittelte Hemmung der HAS1-Transkription *in vivo*

In Arbeiten von Sussmann *et al.*<sup>77</sup> und von van den Boom *et al.*<sup>78</sup> wurde gezeigt, dass HAS1 und HAS2 durch PGI<sub>2</sub> über den IP-Rezeptor und PGE<sub>2</sub> über den EP<sub>2</sub>-Rezeptor cAMP- und PKA-abhängig stimuliert werden. Sie zeigten weiter, dass diese Induktion der HAS spezifisch für G<sub>s</sub>-gekoppelte Rezeptoren ist, da der G<sub>q</sub>-gekoppelte EP<sub>1</sub>-Rezeptor sowie der G<sub>i</sub>-gekoppelte EP<sub>3</sub>-Rezeptor in diese Regulation nicht involviert sind. Da in dem Modell der Rosuvastatin behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Maus dieser direkte Zusammenhang zwischen verminderter COX-2-Expression, welche eine verringerte Synthese von PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> bedingt, und einer Hemmung der Transkription von HAS nicht gezeigt werden konnte, wurde der *in vitro* beschriebene Effekte in einem weiteren Tiermodell unabhängig von einer Behandlung mit Statinen untersucht. In diesem Modell wurden ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Indometacin und Rofecoxib behandelt. Zur Beurteilung der COX-1- und COX-2-Hemmung wurden die Metaboliten von PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> im Urin der Mäuse bestimmt. Rofecoxib hemmte ausschließlich die Bildung von 2,3-Dinor-6-keto-PGF<sub>1</sub>α, dem Metaboliten von PGI<sub>2</sub>, wodurch belegt ist, dass in der gewählten Dosierung Rofecoxib auch im Tiermodell nur COX-2 hemmte, da COX-2 für den Hauptanteil der PGI<sub>2</sub>-Synthese verantwortlich ist. Diese Hemmung war zwar mit einer eindeutigen Tendenz zu erkennen, war allerdings nicht signifikant. Indometacin hemmte PGI-M hingegen signifikant und inhibierte zusätzlich signifikant die Bildung von 2,3-Dinor-TXB<sub>2</sub>. Die Hemmung der Isoformen der COX durch Indometacin war in diesem Versuch gänzlich unspezifisch. In LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten Pratico *et al.*<sup>137</sup> eine ähnlich stark ausgeprägte Hemmung des Prostacyclinmetaboliten für Indometacin. Daher wurde also eine komplette COX-1/COX-2-Hemmung mit Indometacin und eine spezifische COX-2-Inhibition durch Rofecoxib erreicht.

Es ist seit langem bekannt, dass Prostaglandine eine transkriptionelle Aktivierung der HAS-Isoformen in verschiedenen Zellen hervorrufen. So zeigten z.B. Yaron *et al.*<sup>138</sup> eine Stimulation der HA-Synthese durch PGE<sub>2</sub> in Fibroblasten. In vaskulären SMC konnte eine Stimulation der HAS2-Expression durch Prostacyclin erstmals von Meyer-Kirchrath *et al.*<sup>76</sup> gezeigt werden. HA ist sowohl in frühen als auch in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen anzutreffen. In welchem Stadium der Einfluss der von COX-2 gebildeten Prostaglandine auf die Synthese von HA entscheidend ist, konnte in den *in vitro* Versuchen nicht geklärt werden. Aus diesem Grund wurde die Behandlung der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse zu zwei verschiedenen Zeitpunkten begonnen. Im Alter von 15 Wochen, zu Beginn der ersten Behandlung, treten in der Aorta bei normaler Diät keine ausgeprägten atherosklerotischen Läsionen auf. Dies bedeutet, dass an dieser Stelle die pharmakologische Intervention durch Hemmung der COX bereits vor der Entstehung der ersten atherosklerotischen Läsionen und somit vor der Akkumulation von HA und COX-2 einsetzte. Der spätere Zeitpunkt wurde mit 25 Wochen so gewählt, dass bereits erste atherosklerotischen Läsionen zum Beginn der

Behandlung bestanden und in die frühe Phase der HA-Synthese eingegriffen werden konnte. Die mRNA-Expression von HAS1, -2 und -3 wurde aus Extrakten der thorakalen und abdominalen Aorta bestimmt. Nach 8 Wochen Behandlung mit Indometacin und Rofecoxib wurde in der ersten Gruppe im Alter von 23 Wochen die Expression von HAS1 signifikant durch beide COX-Inhibitoren gehemmt. Die Expression von HAS2 und HAS3 wurde durch Rofecoxib im Vergleich zur Kontrolle nicht beeinflusst. Die Expression der HAS-Isoenzyme zeigte zu einem späteren Zeitpunkt, im Alter von 33 Wochen, keine Unterschiede gegenüber der Kontrolle. Daraus ergibt sich, dass eine Inhibition der COX-2 noch vor der Bildung von atherosklerotischen Plaques einsetzen muss um die Transkription von *has1* zu regulieren.

#### **4.6 Auswirkungen der COX-Hemmung auf die Hyaluronsäure-Akkumulation der Neointimahyperplasie von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Das Fehlen von vasodilatierenden Prostaglandinen führte wie oben erläutert zu einer Hemmung der Transkription von *has1* in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. In wie weit sich die Hemmung von COX auch auf die Akkumulation von HA in atherosklerotischen Plaques auswirkt, wurde am Modell der Neointimahyperplasie in der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus untersucht. Dieses Modell hat den Vorteil, dass es zwei Initiationsprozesse der Atherosklerose kombiniert. Einerseits wird durch die Ligatur eine Schädigung des Endothels hervorgerufen und andererseits werden durch den *knockout* des Apolipoprotein E atherogene Stimuli in Form von vermehrtem VLDL und Chylomikronen erzeugt. Die atherosklerotischen Läsionen in diesem Modell sind durch die Kombination mit der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus humanen atherosklerotischen Läsionen ähnlicher als die atherosklerotischen Plaques in einem Modell, welches ausschließlich auf der Schädigung des Endothels beruht.

Die histochemische Analyse der Flächengröße von Media, Neointima und Lumen, ergab eine signifikante Reduktion der Neointimafläche durch Indometacin. Rofecoxib zeigte keinen Einfluss auf die Größe der Neointimafläche. In der Größe der Media ergaben sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Das Lumen der mit Indometacin behandelten Tiere war, durch die Reduktion der Plauegröße bedingt, signifikant erhöht. Bezüglich der Beeinflussung der Plauegröße durch COX-2-Inhibitoren sind in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse zu finden. Diese unterschiedlichen Daten sind wahrscheinlich auf die Unterschiede im Studiendesign zurückzuführen. Zum einen werden unterschiedliche COX-2-Inhibitoren verwendet. Außerdem sind der Beginn und die Dauer der Behandlung verschieden. Zum anderen werden Tiere mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen als Atherosklerosemodell verwendet. Hauptsächlich sind dies ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse oder LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse, welche zusätzlich mit Futter unterschiedlichen Fettgehaltes (normale Diät oder Westerndiät) gefüttert wurden. Diese Vielzahl an Unterschieden führte dazu, dass

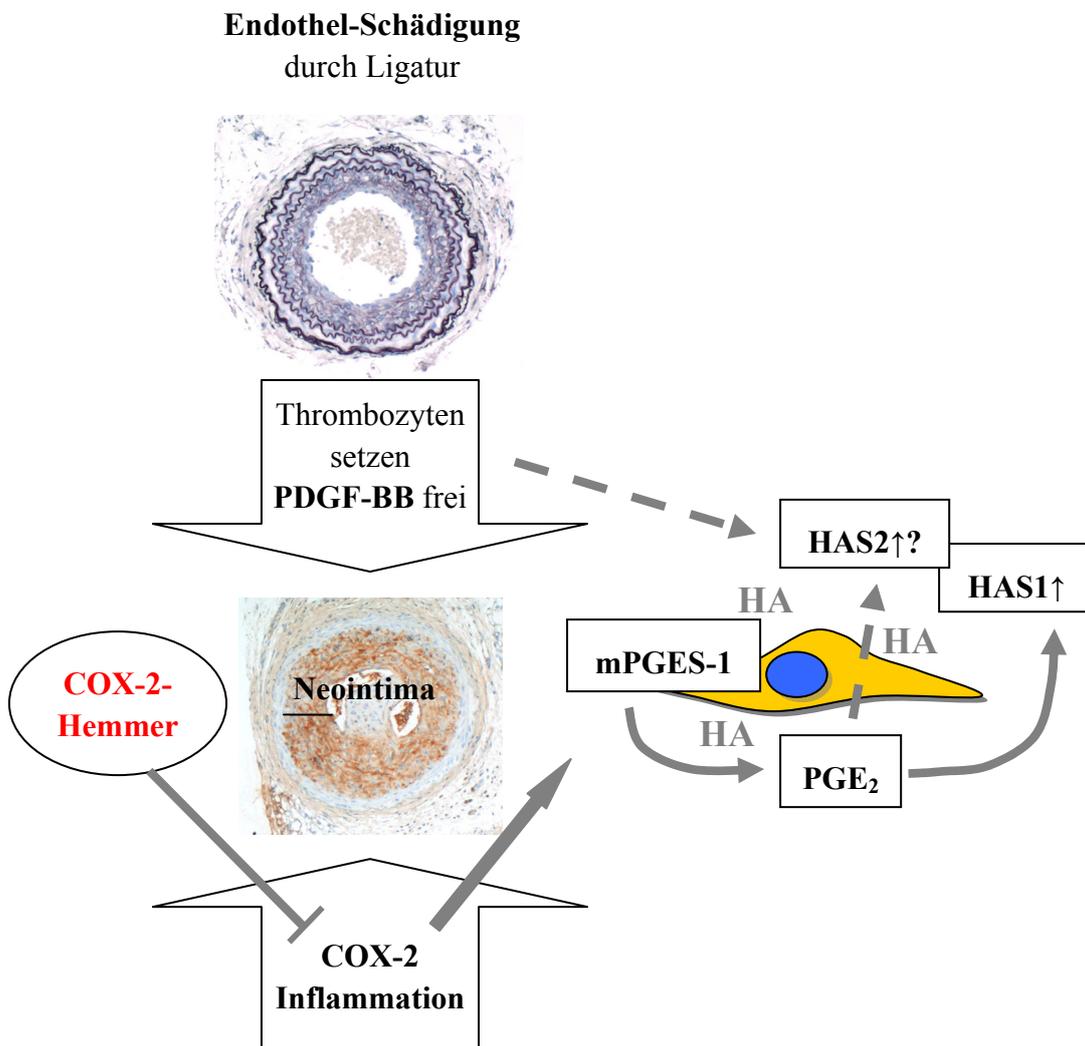
Bea *et al.*<sup>139</sup> keinen Unterschied in der Zusammensetzung und Größe der atherosklerotischen Plaques nach 15 Wochen Behandlung mit Celecoxib in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen fanden. Burleigh *et al.*<sup>140</sup> fanden dagegen in jungen LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen eine Reduktion der Atherosklerose durch Behandlung mit Rofecoxib. Für die Behandlung mit Rofecoxib in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten Metzner *et al.*<sup>141</sup> eine Tendenz zur Reduktion der Plaquergröße. Im Gegensatz zu den z.T. widersprüchlichen Resultaten einer COX-2-Hemmung führte die Hemmung von COX-1 und die damit verbundene Reduktion der TXA<sub>2</sub>-Konzentration zu einer eindeutigen Reduktion der Atherosklerose. Kobayashi *et al.*<sup>142</sup> zeigten, dass ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse, die gleichzeitig einen *knockout* für den TXA-Rezeptor besitzen, eine Reduktion der Atherosklerose im Vergleich zu ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen aufweisen. Ein *knockout* des Rezeptors für Prostacyclin (PGI-Rezeptor) führte dagegen zu einer Verstärkung der Atherosklerose in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Pratico *et al.*<sup>137</sup> zeigten daher auch speziell für Indometacin eine Reduktion der Plaquergröße in LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen, was den hier gezeigten Ergebnissen in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen entspricht. Für Acetylsalicylsäure wurde der gleiche Befund in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen von Paul *et al.*<sup>143</sup> erhoben. Die Verminderung TXA<sub>2</sub> übt ihre anti-atherosklerotischen Effekte hauptsächlich durch die Aggregationshemmung von Thrombozyten aus. Die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten führt zu einem ansteigenden Plaqueswachstum und Thrombose sowie den daraus resultierenden Komplikationen. Thrombozyten besitzen weiterhin die Fähigkeit PDGF-BB (*platelet derived growth factor* BB) auszuschütten, welcher einer der bedeutendsten Stimuli der Atherosklerose ist. PDGF-BB fördert die Migration und Proliferation von SMC und initiiert die Synthese von EZM.

Wird durch COX-2-Inhibitoren die Balance zwischen Thromboxan und Prostacyclin in der Akutsituation der beginnenden Behandlung gestört, so können besonders bei Risikopatienten vermehrt Thrombosen entstehen (APPROVe Studie<sup>71</sup>). Dies führte dazu, dass einige COX-2-Hemmer vom Markt genommen wurden. Es kommt erfahrungsgemäß bei einem Teil der Tiere, die einer Ligatur der linken Karotis unterzogen wurden, zu der Ausbildung einer Thrombose in dem beschädigten Gefäß. Dies wurde mittels einer Färbung nach Movat nachgewiesen. In den mit Rofecoxib behandelten Tieren trat eine derartige Thrombose im Vergleich zur Kontrolle tendenziell vermehrt auf. Die Behandlung mit Indometacin zeigte erwartungsgemäß ein verringertes Auftreten von Thrombosen in diesem Modell im Vergleich zur Kontrolle, was auf die Hemmung der Thrombozytenaggregation zurückzuführen ist.

Neben dem Einfluss einer COX-Inhibitor-Behandlung auf die Aktivität der COX-2, war die generelle Expression dieses Entzündungsparameters in der Neointima nach Ligatur von Interesse. Sowohl Indometacin als auch Rofecoxib hemmten nicht nur die enzymatische Aktivität von COX-2 sondern auch die Expression. Dieser Effekt war bei beiden Arzneistoffen deutlich, wenn auch nicht signifikant ausgeprägt. Eine Senkung der Expression von COX-2 wurde in der Literatur bisher nur im Zusammenhang mit einer Behandlung des Barrett Ösophaguskarzinoms von Kaur *et al.*<sup>144</sup> beschrieben. Ähnlich der Expression in der Atherosklerose zeigt gesundes Ösophagusgewebe keine

Expression von COX-2. Diese ist nur in entarteten Zellen zu finden. Durch Applikation von Rofecoxib konnten Kaur *et al.* zeigen, dass die Expression von COX-2 in Biopsien des karzinogen Gewebes um 77 % gegenüber dem Basalwert sank. Da die Hemmung der Expression von COX-2 in der Neointima nicht signifikant war, konnte an dieser Stelle nicht bestimmt werden, ob es sich um einen direkten COX-Inhibitor-vermittelten Effekt handelte oder ob eine komplexere positive Beeinflussung der gesamten entzündlichen Situation im Mausorganismus vorlag.

Anschließend an diese histologischen Untersuchungen wurde die Akkumulation von HA in der Neointima und der Adventitia bestimmt. Bei gemeinsamer Betrachtung der Neointima und Adventitia wurde die Akkumulation von HA nur durch Rofecoxib signifikant gesenkt. Indometacin zeigte keine Auswirkungen auf die Akkumulation von HA in Adventitia und Neointima. Betrachtet man dagegen HA ausschließlich in der Neointima, so reduzierten beide COX-Inhibitoren den HA-Gehalt signifikant. Somit zeigte sich auch an dieser Stelle, dass eine verminderte COX-2-Expression und -Aktivität mit einer gesenkten HA-Synthese in atherosklerotischen Läsionen einhergeht. Da die Expression von HAS1 durch die Hemmung von PGI<sub>2</sub> und PGE<sub>2</sub> mittels Indometacin und Rofecoxib vermindert wurde, konnten die an SMC *in vitro* von Sussmann *et al.*<sup>77</sup> und van den Boom *et al.*<sup>78</sup> gefundenen Ergebnisse *in vivo* für HAS1 bestätigt werden. Indometacin und Rofecoxib hemmen beide die Aktivität der COX-2. Da in dem vorliegenden Tiermodell Indometacin und Rofecoxib die gleichen Effekte auf HA und HAS1 zeigen, kann daraus geschlossen werden, dass COX-2 das verantwortliche Enzym für diese Effekte ist. TXA<sub>2</sub> und COX-1 tragen nur wenig dazu bei. Diese Ergebnisse sind im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Sussmann *et al.* an SMC zu betrachten. Sie konnten zeigen, dass die mRNA-Expression von HAS2, zusätzlich zu einer Stimulation durch PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>, durch PDGF-BB stimuliert wurde, was für HAS1 nicht gezeigt werden konnte. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann deshalb aus dem stärkeren Effekt einer COX-2-Hemmung auf HAS1 im Vergleich zu HAS2 geschlossen werden, dass offensichtlich andere Mechanismen die HAS2-Expression in der Neointima stimulieren. Dagegen scheint HAS1 tatsächlich von vasodilatierenden Prostaglandinen reguliert zu werden. In dem nachstehenden Diagramm sollen die gefundenen Ergebnisse noch einmal zusammengefasst und verdeutlicht werden.



**Abbildung 52:** Mechanismus der COX-2-abhängigen HA-Induktion in vivo. Verändert nach Fischer et al.<sup>145</sup>. Durch eine Schädigung des Endothels infolge einer Ligatur kommt es zur Adhäsion von Plättchen, die PDGF-BB freisetzen. PDGF-BB stimuliert HAS2 in VSMC in vitro (gestrichelte Pfeile für in vitro Effekte). Inflammatorische Prozesse induzieren COX-2/mPGES-1 und darüber die Synthese von PGE<sub>2</sub>. Nachgeschaltet aktiviert PGE<sub>2</sub> G<sub>s</sub>-gekoppelte EP<sub>2</sub>-Rezeptoren, welche die Transkription von has2 und has1 in VSMC in vitro initiieren. PGE<sub>2</sub> reguliert in vivo nur die Transkription von has1, has2 wird nicht beeinflusst. HAS1 und HAS2 steigern die Synthese von HA, welche die Migration und Proliferation von VSMC begünstigt. Dadurch könnte HA möglicherweise zur Entstehung und Progression von atherosklerotischen Läsionen beitragen. Durch die Hemmung von COX-2 und die dadurch bedingte verminderte Synthese von PGE<sub>2</sub> werden die oben beschriebenen Effekte auf HAS1 und HA in vivo blockiert.

#### **4.7 Schlussfolgerungen und mögliche therapeutische Konsequenzen**

Von Statinen sind vielseitige pleiotrope Effekte bekannt. Inwiefern sie aber einen Effekt auf andere Bestandteile als Kollagen der EZM ausüben, war bisher nicht bekannt. Die vorliegende Langzeitstudie an ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte, dass die Kollagen-bindenden Proteoglykane Biglycan und Decorin nach Behandlung mit Rosuvastatin vermehrt synthetisiert werden. Dieser Effekt könnte Kollagen-vermittelt oder auch direkt über Statine vermittelt sein. Außerdem zeigte Rosuvastatin eine verminderte Akkumulation von pro-atherosklerotischer Hyaluronsäure und inflammatorischer COX-2. Biglycan und Decorin scheinen somit zwei neue Zielstrukturen für pleiotrope, plaquestabilisierende Effekte von Statinen zu sein.

Die Analyse der Inhibition von inflammatorischer COX-2 in zwei unterschiedlichen Atherosklerose-Mausmodellen zeigte eine Reduktion von pro-atherosklerotisch wirkender Hyaluronsäure. Zudem ergab sich zusätzlich eine Senkung des Expressionsniveaus von COX-2. COX-2-Inhibitoren werden besonders in der Langzeittherapie der Osteoarthritis und rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Das fortgeschrittene Alter der Patienten, die an Erkrankungen wie Arthritis leiden, ist der Grund für eine häufig auftretende gleichzeitige Erkrankung an Atherosklerose. Die Senkung des Hyaluronsäuregehaltes in atherosklerotischen Läsionen könnte in diesen Patienten eine neue mögliche Zielstruktur in der pharmakologischen Behandlung der Atherosklerose darstellen.

## 5 Zusammenfassung

Die Atherosklerose und die daraus resultierenden Folgeerscheinungen gehören zu einer der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen und Japan. Die Atherosklerose wird mittlerweile als entzündlicher Prozess und kompensatorische Antwort auf Noxen, die eine Schädigung des Endothels hervorrufen, betrachtet. Zu diesen Noxen gehört u.a. ein erhöhter *low density lipoprotein* (LDL)-Spiegel. Deshalb tragen 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase-Inhibitoren (Statine) zu einer Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei. Statine zeigen unabhängig von der Reduktion des zirkulierenden LDL auch pleiotrope anti-atherosklerotische Effekte. So wird vermutet, dass Statine über eine verstärkte Akkumulation von Kollagen zur Stabilisierung von humanen atherosklerotischen Plaques beitragen und damit Folgekomplikationen wie Plaquerupturen verhindern. Weitere Einflüsse der Statine auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM) atherosklerotischer Läsionen sind nicht bekannt. Der Zusammensetzung der EZM kommt eine besondere Rolle in der Progression und der Stabilität von atherosklerotischen Plaques zu, da sie den Phänotyp der in ihr befindlichen Zellen hinsichtlich Migration und Proliferation, die mechanische Stabilität und die pro-thrombotischen Eigenschaften bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell der atherosklerotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Maus *in vivo* mittels Rosuvastatin der Einfluss von Statinen auf die EZM untersucht. Im Speziellen wurde die Akkumulation von Proteoglykanen, Kollagen und Hyaluronsäure (HA) analysiert. Rosuvastatin führte zur Ausbildung einer kondensierten kollagen-reichen Matrix in den atherosklerotischen Läsionen. Damit assoziiert war eine verstärkte Akkumulation der beiden Kollagen-bindenden Proteoglykane Biglycan und Decorin. Im Gegensatz dazu wurden Perlecan und Versican, welche nicht mit Kollagen interagieren, nicht beeinflusst. Der Abbau von Kollagen wurde durch Rosuvastatin gehemmt, was von einer verminderten Aktivität der Gelatinasen innerhalb der atherosklerotischen Läsionen sowie durch eine reduzierte Expression von Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) und einer gesenkten Akkumulation von Kollagenspaltprodukten abgeleitet werden konnte. Weiterhin könnten die Kollagenfibrillen möglicherweise zusätzlich durch die Interaktion mit Biglycan und Decorin vor einem Abbau durch MMP geschützt werden. *In vitro* zeigte sich an glatten Muskelzellen eine Stimulation der mRNA-Expression von Biglycan und Decorin durch polymeres Kollagen. Es könnte also ein „positiver Rückkopplungsmechanismus“ vorliegen, der die Synthese von Biglycan und Decorin verstärkt, was seinerseits die Kollagenfibrillogenese beeinflusst und den Abbau von Kollagen hemmt. Rosuvastatin-Behandlung reduzierte die Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und die Akkumulation pro-atherosklerotischer HA. Alle beschriebenen Effekte waren unabhängig von einer Senkung des Plasma-Cholesterolspiegels. Die Befunde für Biglycan, Decorin und Kollagen konnten in humanen atherosklerotischen Plaques von mit Statinen behandelten Patienten bestätigt werden.

Um die Korrelation zwischen der reduzierten Expression von COX-2 und verminderter HA-Akkumulation näher zu untersuchen, wurde durch COX-Inhibition mittels Rofecoxib und Indometacin der Einfluss von COX-2-abhängiger Prostaglandinsynthese auf die HA in zwei verschiedenen Atherosklerosemodellen getestet. Indometacin und Rofecoxib senkten beide die mRNA-Expression von HAS1 im Zuge einer Behandlung von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, die noch vor der ersten Ausbildung von atherosklerotischen Plaques initiiert wurde. Beide COX-Inhibitoren führten auch im zweiten Atherosklerosemodell zur Senkung des HA-Gehaltes innerhalb einer Neointimahyperplasie, die durch Ligatur der *A. carotis* in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen hervorgerufen wurde. Abschließend betrachtet stellen Biglycan und Decorin möglicherweise neue Zielstrukturen einer Behandlung mit Statinen dar, die zur Ausbildung von stabilen kollagen-reichen atherosklerotischen Plaques führen. Die COX-2-Hemmung durch Coxibe könnte in Bezug auf eine reduzierte HA-Akkumulation einen anti-atherosklerotischen Effekt ausüben.

## Summary

Atherosclerosis and the resulting complications are the most common causes of death in the western industrial nations and Japan. Atherosclerosis is believed to be an inflammatory process following endothelial injury or dysfunction. Elevated low density lipoprotein (LDL) is a major risk factor for atherosclerosis. Statins, inhibitors of 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, appear to have positive effects on cardiovascular morbidity and mortality. Beyond cholesterol lowering, statins show additional pleiotropic anti-atherosclerotic effects. It has been shown that statins contribute to stabilizing plaques by increasing the collagen content, which in turn inhibits plaque rupture and subsequent clinical complications. Additional effects of statins on extracellular matrix (ECM) of atherosclerotic lesions are not known so far. The composition of ECM plays a role in the progression and stability of plaques because of its importance for the phenotype of cells within the matrix and the mechanical properties of the plaques.

This study was aimed to analyse the effects of statins on ECM using rosuvastatin in an *in vivo* model of atherosclerosis, the ApoE deficient mouse. Especially, the influence on proteoglycans, collagen and hyaluronan (HA) accumulation was analyzed. Rosuvastatin led to the formation of a condensed collagen rich matrix in atherosclerotic lesions. Furthermore, the increase in expression of the two collagen binding proteoglycans biglycan and decorin was associated with the augmentation of collagen deposition. In contrast, perlecan and versican, two proteoglycans not interacting with collagen, were not affected. Collagen turnover was reduced by a decrease of activity of gelatinases within the lesions. In addition, Rosuvastatin diminished the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and the accumulation of products resulting from collagen cleavage. Collagen cleavage by MMP might also be prevented by protective interaction of collagen fibrils with biglycan and decorin. Experiments in smooth muscle cells showed a stimulation of biglycan and decorin mRNA expression by polymeric collagen. Taken together, the current findings suggest that after rosuvastatin treatment a “positive feedback mechanism” could be in place: Increased collagen deposition due to decreased MMP-activity might stimulate decorin and biglycan expression which in turn inhibit collagen cleavage and subsequent the establishment of a dense collagen matrix. The key findings concerning biglycan, decorin and collagen were confirmed in human plaques of statin treated patients. Increased expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and accumulation of HA were also reduced by statin treatment. All results were independent of cholesterol lowering.

In order to study the correlation between a reduction of COX-2 and reduced HA levels, the effects of COX inhibition by indomethacin and rofecoxib were analyzed in two different mouse models of atherosclerosis. Indomethacin and rofecoxib reduced HA-synthase1 (HAS1) mRNA expression when administered before initiation of plaques occurs suggesting a key role of COX-2. In the second model of neointimahyperplasia, induced by carotid artery ligation in ApoE deficient mice, both inhibitors reduced the accumulation of HA and expression of HAS1 mRNA.

In conclusion, biglycan and decorin appear to be new targets of statin treatment which contribute to formation of stable plaques by stabilizing the collagen matrix. Additionally, COX-2 inhibition by coxibs reduces accumulation of HA in atherosclerotic lesions in mice which might result in inhibition of atherosclerosis after chronic use.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
2. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-74.
3. Ross R, Fuster V. *The pathogenesis of atherosclerosis*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996.
4. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383-9.
5. Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation*. 2004;109:III39-43.
6. Curfman GD, Morrissey S, Drazen JM. Expression of concern: Bombardier et al., "Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis," *N Engl J Med* 2000;343:1520-8. *N Engl J Med*. 2005;353:2813-4.
7. Ferns GA, Stewart-Lee AL, Anggard EE. Arterial response to mechanical injury: balloon catheter de-endothelialization. *Atherosclerosis*. 1992;92:89-104.
8. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-16.
9. Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J*. 1993;69:S30-7.
10. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258:468-71.
11. Clowes MM, Lynch CM, Miller AD, Miller DG, Osborne WR, Clowes AW. Long-term biological response of injured rat carotid artery seeded with smooth muscle cells expressing retrovirally introduced human genes. *J Clin Invest*. 1994;93:644-51.
12. Kumar A, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2238-44.
13. Williams H, Johnson JL, Carson KG, Jackson CL. Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:788-92.
14. Cipollone F, Fazia M, Mincione G, Iezzi A, Pini B, Cuccurullo C, Uccchino S, Spigonardo F, Di Nisio M, Cuccurullo F, Mezzetti A, Porreca E. Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques. *Stroke*. 2004;35:2253-7.
15. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1161-70.

16. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003;349:2316-25.
17. Zhu Y, Boros DL. Fibronectin co-stimulates via the alpha 5 beta 1 receptor IL-2, IL-4 production by splenic, granuloma lymphocytes of *Schistosoma mansoni* infected mice. *Scand J Immunol*. 1996;43:633-9.
18. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69:11-25.
19. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Wight TN, Virmani R. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1642-8.
20. Neame PJ, Choi HU, Rosenberg LC. The primary structure of the core protein of the small, leucine-rich proteoglycan (PG I) from bovine articular cartilage. *J Biol Chem*. 1989;264:8653-61.
21. Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J*. 1984;223:587-97.
22. Fischer JW, Kinsella MG, Clowes MM, Lara S, Clowes AW, Wight TN. Local expression of bovine decorin by cell-mediated gene transfer reduces neointimal formation after balloon injury in rats. *Circ Res*. 2000;86:676-83.
23. Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P, Young MF. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res*. 2002;17:1180-9.
24. Fischer JW, Kinsella MG, Levkau B, Clowes AW, Wight TN. Retroviral overexpression of decorin differentially affects the response of arterial smooth muscle cells to growth factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:777-84.
25. Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res*. 2004;94:1158-67.
26. Iozzo RV, Pillarisetti J, Sharma B, Murdoch AD, Danielson KG, Uitto J, Mauviel A. Structural and functional characterization of the human perlecan gene promoter. Transcriptional activation by transforming growth factor-beta via a nuclear factor 1-binding element. *J Biol Chem*. 1997;272:5219-28.
27. Karnovsky MJ, Wright TC, Jr., Castellot JJ, Jr., Choay J, Lormeau JC, Petitou M. Heparin, heparan sulfate, smooth muscle cells, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1989;556:268-81.
28. 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;22:462-8.
29. Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*. 1997;272:13997-4000.

30. Lepperdinger G, Strobl B, Kreil G. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem.* 1998;273:22466-70.
31. Powell JD, Horton MR. Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol Res.* 2005;31:207-18.
32. Feinberg RN, Beebe DC. Hyaluronate in vasculogenesis. *Science.* 1983;220:1177-9.
33. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol.* 2006;85:699-715.
34. Day AJ, Prestwich GD. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem.* 2002;277:4585-8.
35. Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C, Isner JM. Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation.* 1996;93:1141-7.
36. Endo A, Tsujita Y, Kuroda M, Tanzawa K. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro and in vivo by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Eur J Biochem.* 1977;77:31-6.
37. Bilheimer DW, Grundy SM, Brown MS, Goldstein JL. Mevinolin stimulates receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes. *Trans Assoc Am Physicians.* 1983;96:1-9.
38. Liao JK. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol.* 2005;96:24F-33F.
39. Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res.* 1998;83:490-500.
40. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation.* 2000;101:207-13.
41. Olsson AG, Pears J, McKellar J, Mizan J, Raza A. Effect of rosuvastatin on low-density lipoprotein cholesterol in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol.* 2001;88:504-8.
42. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2002;360:7-22.
43. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998;97:1129-35.
44. Seljeflot I, Tonstad S, Hjermann I, Arnesen H. Reduced expression of endothelial cell markers after 1 year treatment with simvastatin and atorvastatin in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2002;162:179-85.
45. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation.* 1999;100:230-5.

46. Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Zucchelli M, Pini B, De Cesare D, Uchino S, Spigonardo F, Bajocchi G, Bei R, Muraro R, Artese L, Piattelli A, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans. *Circulation*. 2003;107:1479-85.
47. McTaggart F, Buckett L, Davidson R, Holdgate G, McCormick A, Schneck D, Smith G, Warwick M. Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Am J Cardiol*. 2001;87:28B-32B.
48. Carswell CI, Plosker GL, Jarvis B. Rosuvastatin. *Drugs*. 2002;62:2075-85; discussion 2086-7.
49. Kleemann R, Princen HM, Emeis JJ, Jukema JW, Fontijn RD, Horrevoets AJ, Kooistra T, Havekes LM. Rosuvastatin reduces atherosclerosis development beyond and independent of its plasma cholesterol-lowering effect in APOE\*3-Leiden transgenic mice: evidence for antiinflammatory effects of rosuvastatin. *Circulation*. 2003;108:1368-74.
50. Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res*. 2002;942:23-30.
51. Pelat M, Dessy C, Massion P, Desager JP, Feron O, Balligand JL. Rosuvastatin decreases caveolin-1 and improves nitric oxide-dependent heart rate and blood pressure variability in apolipoprotein E-/- mice in vivo. *Circulation*. 2003;107:2480-6.
52. Crouse JR, 3rd, Grobbee DE, O'Leary DH, Bots ML, Evans GW, Palmer MK, Riley WA, Raichlen JS. Measuring Effects on intima media Thickness: an Evaluation Of Rosuvastatin in subclinical atherosclerosis--the rationale and methodology of the METEOR study. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2004;18:231-8.
53. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*. 1993;268:9049-54.
54. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*. 1991;266:12866-72.
55. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:2692-6.
56. Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, Robbins RA, Kwon OJ, Croxtall J, Barnes PJ, Vane JR. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol*. 1994;113:1008-14.
57. McGeer PL, McGeer EG, Yasojima K. Expression of COX-1 and COX-2 mRNAs in atherosclerotic plaques. *Exp Gerontol*. 2002;37:925-9.

58. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1999;155:1281-91.
59. Woditsch I, Schror K. Prostacyclin rather than endogenous nitric oxide is a tissue protective factor in myocardial ischemia. *Am J Physiol.* 1992;263:H1390-6.
60. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:7220-5.
61. Murakami M, Kudo I. Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer. *Curr Pharm Des.* 2006;12:943-54.
62. Pini B, Grosser T, Lawson JA, Price TS, Pack MA, FitzGerald GA. Prostaglandin E synthases in zebrafish. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:315-20.
63. Schror K, Ahland B, Darius H, Weiss P. Stimulation of vascular PGI<sub>2</sub> by organic nitrates and its significance for the antianginal effect. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1984;173:33-40.
64. Bulin C, Albrecht U, Bode JG, Weber AA, Schror K, Levkau B, Fischer JW. Differential effects of vasodilatory prostaglandins on focal adhesions, cytoskeletal architecture, and migration in human aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:84-9.
65. Zucker TP, Bonisch D, Hasse A, Grosser T, Weber AA, Schror K. Tolerance development to antimitogenic actions of prostacyclin but not of prostaglandin E<sub>1</sub> in coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 1998;345:213-20.
66. Blindt R, Bosserhoff AK, vom Dahl J, Hanrath P, Schror K, Hohlfeld T, Meyer-Kirchrath J. Activation of IP and EP(3) receptors alters cAMP-dependent cell migration. *Eur J Pharmacol.* 2002;444:31-7.
67. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999;79:1193-226.
68. Smith WL. Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:251-62.
69. Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazio M, De Cesare D, Iezzi A, Uchino S, Boccoli G, Saba V, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation.* 2001;104:921-7.
70. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med.* 2000;343:1520-8, 2 p following 1528.

71. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanas A, Konstam MA, Baron JA. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med*. 2005;352:1092-102.
72. Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, Langford RM, Hoelt A, Parlow JL, Boyce SW, Verburg KM. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med*. 2005;352:1081-91.
73. Ott E, Nussmeier NA, Duke PC, Feneck RO, Alston RP, Snabes MC, Hubbard RC, Hsu PH, Saidman LJ, Mangano DT. Efficacy and safety of the cyclooxygenase 2 inhibitors parecoxib and valdecoxib in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;125:1481-92.
74. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>. *Science*. 2002;296:539-41.
75. Wang M, Zukas AM, Hui Y, Ricciotti E, Pure E, FitzGerald GA. Deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 augments prostacyclin and retards atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:14507-12.
76. Meyer-Kirchrath J, Debey S, Glandorff C, Kirchrath L, Schror K. Gene expression profile of the Gs-coupled prostacyclin receptor in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol*. 2004;67:757-65.
77. Sussmann M, Sarbia M, Meyer-Kirchrath J, Nusing RM, Schror K, Fischer JW. Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. *Circ Res*. 2004;94:592-600.
78. van den Boom M, Sarbia M, von Wnuck Lipinski K, Mann P, Meyer-Kirchrath J, Rauch BH, Grabitz K, Levkau B, Schror K, Fischer JW. Differential regulation of hyaluronic acid synthase isoforms in human saphenous vein smooth muscle cells: possible implications for vein graft stenosis. *Circ Res*. 2006;98:36-44.
79. Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dube D, Ethier D, Falgueyret JP, Friesen RW, Gordon R, Greig G, Guay J, Mancini J, Ouellet M, Wong E, Xu L, Boyce S, Visco D, Girard Y, Prasit P, Zamboni R, Rodger IW, Gresser M, Ford-Hutchinson AW, Young RN, Chan CC. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;296:558-66.
80. Sommeijer DW, van Oerle R, Reitsma PH, Timmerman JJ, Meijers JC, Spronk HM, ten Cate H. Analysis of blood coagulation in mice: pre-analytical conditions and evaluation of a home-made assay for thrombin-antithrombin complexes. *Thromb J*. 2005;3:12.
81. Kinsella MG, Fischer JW, Mason DP, Wight TN. Retrovirally mediated expression of decorin by macrovascular endothelial cells. Effects on cellular migration and fibronectin fibrillogenesis in vitro. *J Biol Chem*. 2000;275:13924-32.
82. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-5.

83. Puchtler H, Waldrop FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol.* 1973;150:174-87.
84. Movat HZ. Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA Arch Pathol.* 1955;60:289-95.
85. Galis ZS, Sukhova GK, Libby P. Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *Faseb J.* 1995;9:974-80.
86. de Waard V, Arkenbout EK, Carmeliet P, Lindner V, Pannekoek H. Plasminogen activator inhibitor 1 and vitronectin protect against stenosis in a murine carotid artery ligation model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1978-83.
87. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science.* 1996;272:685-8.
88. Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, Weber DK, Malcom GT, Smialek J, Virmani R. Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression. *Circulation.* 2001;103:934-40.
89. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation.* 2001;103:926-33.
90. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol.* 1994;144:962-74.
91. Wight TN, Lara S, Riessen R, Le Baron R, Isner J. Selective deposits of versican in the extracellular matrix of restenotic lesions from human peripheral arteries. *Am J Pathol.* 1997;151:963-73.
92. Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, Wight TN, Virmani R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation.* 2004;110:940-7.
93. Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1859-67.
94. Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, Kirk EA, Ricks JL, Speer M, Schwartz SM, Giachelli CM, Rosenfeld ME. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1420-5.
95. Harmon KJ, Couper LL, Lindner V. Strain-dependent vascular remodeling phenotypes in inbred mice. *Am J Pathol.* 2000;156:1741-8.
96. Gonzalez ER. Antiplatelet therapy in atherosclerotic cardiovascular disease. *Clin Ther.* 1998;20 Suppl B:B18-41.
97. Bea F, Blessing E, Bennett B, Levitz M, Wallace EP, Rosenfeld ME. Simvastatin promotes atherosclerotic plaque stability in apoE-deficient mice independently of lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1832-7.

98. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, Rosa R, Hermanowski-Vosatka A, Wang PR, Zhang D, Peterson L, Detmers PA, Chao YS, Wright SD. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:115-21.
99. Galman C, Ostlund-Lindqvist AM, Bjorquist A, Schreyer S, Svensson L, Angelin B, Rudling M. Pharmacological interference with intestinal bile acid transport reduces plasma cholesterol in LDL receptor/apoE deficiency. *Faseb J.* 2003;17:265-7.
100. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 1992;71:343-53.
101. Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest.* 1994;93:1885-93.
102. Chen J, Li D, Schaefer RF, Mehta JL. Inhibitory effect of candesartan and rosuvastatin on CD40 and MMPs expression in apo-E knockout mice: novel insights into the role of RAS and dyslipidemia in atherogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44:446-52.
103. Meyers CD, Tannock LR, Wight TN, Chait A. Statin-exposed vascular smooth muscle cells secrete proteoglycans with decreased binding affinity for LDL. *J Lipid Res.* 2003;44:2152-60.
104. Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC, Enomoto M, Hirouchi Y, Shiomi M, Aikawa M. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation.* 2001;103:993-9.
105. Scharf M, Bocksch W, Koschyk DH, Voelker W, Karsch KR, Kreuzer J, Hausmann D, Beckmann S, Gross M. Use of intravascular ultrasound to compare effects of different strategies of lipid-lowering therapy on plaque volume and composition in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001;104:387-92.
106. Schafer K, Kaiser K, Konstantinides S. Rosuvastatin exerts favourable effects on thrombosis and neointimal growth in a mouse model of endothelial injury. *Thromb Haemost.* 2005;93:145-52.
107. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE, Sukhova GK, Libby P. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation.* 1998;97:2433-44.
108. Geng Y, McQuillan D, Roughley PJ. SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol.* 2006;25:484-91.
109. Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J.* 1997;322 ( Pt 3):809-14.

110. Monfort J, Tardif G, Reboul P, Mineau F, Roughley P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloprotease-13: identification of a new biglycan cleavage site. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:R26.
111. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:769-75.
112. Furman C, Copin C, Kandoussi M, Davidson R, Moreau M, McTaggart F, Chapman MJ, Fruchart JC, Rouis M. Rosuvastatin reduces MMP-7 secretion by human monocyte-derived macrophages: potential relevance to atherosclerotic plaque stability. *Atherosclerosis.* 2004;174:93-8.
113. Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG, Young MF. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet.* 1998;20:78-82.
114. Heegaard AM, Corsi A, Danielsen CC, Nielsen KL, Jorgensen HL, Riminucci M, Young MF, Bianco P. Biglycan deficiency causes spontaneous aortic dissection and rupture in mice. *Circulation.* 2007;115:2731-8.
115. Neame PJ, Kay CJ, McQuillan DJ, Beales MP, Hassell JR. Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:859-63.
116. Nareyeck G, Seidler DG, Troyer D, Rauterberg J, Kresse H, Schonherr E. Differential interactions of decorin and decorin mutants with type I and type VI collagens. *Eur J Biochem.* 2004;271:3389-98.
117. Ameye L, Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology.* 2002;12:107R-16R.
118. Weis SM, Zimmerman SD, Shah M, Covell JW, Omens JH, Ross J, Jr., Dalton N, Jones Y, Reed CC, Iozzo RV, McCulloch AD. A role for decorin in the remodeling of myocardial infarction. *Matrix Biol.* 2005;24:313-24.
119. Jarvelainen H, Vernon RB, Gooden MD, Francki A, Lara S, Johnson PY, Kinsella MG, Sage EH, Wight TN. Overexpression of decorin by rat arterial smooth muscle cells enhances contraction of type I collagen in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:67-72.
120. Fischer JW, Steitz SA, Johnson PY, Burke A, Kolodgie F, Virmani R, Giachelli C, Wight TN. Decorin promotes aortic smooth muscle cell calcification and colocalizes to calcified regions in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2391-6.
121. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J.* 1994;302 ( Pt 2):527-34.
122. Maeda H, Kuwahara H, Ichimura Y, Ohtsuki M, Kurakata S, Shiraishi A. TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. *J Immunol.* 1995;155:4926-32.

123. Feinberg MW, Watanabe M, Lebedeva MA, Depina AS, Hanai J, Mammoto T, Frederick JP, Wang XF, Sukhatme VP, Jain MK. Transforming growth factor-beta1 inhibition of vascular smooth muscle cell activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem.* 2004;279:16388-93.
124. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:767-801.
125. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* 2001;89:930-4.
126. Singh NN, Ramji DP. The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17:487-99.
127. Murad S, Grove D, Lindberg KA, Reynolds G, Sivarajah A, Pinnell SR. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:2879-82.
128. Schwartz E, Bienkowski RS, Coltoff-Schiller B, Goldfischer S, Blumenfeld OO. Changes in the components of extracellular matrix and in growth properties of cultured aortic smooth muscle cells upon ascorbate feeding. *J Cell Biol.* 1982;92:462-70.
129. Takeuchi Y, Matsumoto T, Ogata E, Shishiba Y. Effects of transforming growth factor beta 1 and L-ascorbate on synthesis and distribution of proteoglycans in murine osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 1993;8:823-30.
130. Hering TM, Kollar J, Huynh TD, Varelas JB, Sandell LJ. Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension. *Arch Biochem Biophys.* 1994;314:90-8.
131. Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gomez-Hernandez A, Munoz-Garcia B, Vega M, Serrano J, Ortega L, Hernandez G, Tunon J, Egido J. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke.* 2005;36:1796-800.
132. Kim YS, Ahn Y, Hong MH, Kim KH, Park HW, Hong YJ, Kim JH, Kim W, Jeong MH, Cho JG, Park JC, Kang JC. Rosuvastatin suppresses the inflammatory responses through inhibition of c-Jun N-terminal kinase and Nuclear Factor-kappaB in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;49:376-83.
133. Hernandez-Presa MA, Martin-Ventura JL, Ortego M, Gomez-Hernandez A, Tunon J, Hernandez-Vargas P, Blanco-Colio LM, Mas S, Aparicio C, Ortega L, Vivanco F, Gerique JG, Diaz C, Hernandez G, Egido J. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2002;160:49-58.
134. Degraeve F, Bolla M, Blaie S, Creminon C, Quere I, Boquet P, Levy-Toledano S, Bertoglio J, Habib A. Modulation of COX-2 expression by statins in human aortic smooth muscle cells. Involvement of geranylgeranylated proteins. *J Biol Chem.* 2001;276:46849-55.

135. Birnbaum Y, Ye Y, Rosanio S, Tavackoli S, Hu ZY, Schwarz ER, Uretsky BF. Prostaglandins mediate the cardioprotective effects of atorvastatin against ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2005;65:345-55.
136. Grosser N, Erdmann K, Hemmerle A, Berndt G, Hinkelmann U, Smith G, Schroder H. Rosuvastatin upregulates the antioxidant defense protein heme oxygenase-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325:871-6.
137. Pratico D, Tillmann C, Zhang ZB, Li H, FitzGerald GA. Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3358-63.
138. Yaron M, Yaron I, Wiletzki C, Zor U. Interrelationship between stimulation of prostaglandin E and hyaluronate production by poly (I) . poly (C) and interferon in synovial fibroblast culture. *Arthritis Rheum*. 1978;21:694-8.
139. Bea F, Blessing E, Bennett BJ, Kuo CC, Campbell LA, Kreuzer J, Rosenfeld ME. Chronic inhibition of cyclooxygenase-2 does not alter plaque composition in a mouse model of advanced unstable atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2003;60:198-204.
140. Burleigh ME, Babaev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation*. 2002;105:1816-23.
141. Metzner J, Popp L, Marian C, Schmidt R, Manderscheid C, Renne C, Fisslthaler B, Fleming I, Busse R, Geisslinger G, Niederberger E. The effects of COX-2 selective and non-selective NSAIDs on the initiation and progression of atherosclerosis in ApoE(-/-) mice. *J Mol Med*. 2007;85:623-33.
142. Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, Arai H, Oida H, Yurugi-Kobayashi T, Yamashita JK, Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S. Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004;114:784-94.
143. Paul A, Calleja L, Camps J, Osada J, Vilella E, Ferre N, Mayayo E, Joven J. The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci*. 2000;68:457-65.
144. Kaur BS, Khamnehei N, Irvani M, Namburu SS, Lin O, Triadafilopoulos G. Rofecoxib inhibits cyclooxygenase 2 expression and activity and reduces cell proliferation in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 2002;123:60-7.
145. Fischer JW, Schror K. Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2007;98:287-95.



## 7 Veröffentlichungen

### 7.1 Tagungen und Kongresse

Marzoll A, Levkau B, Keul P, Fischer JW. Stimulation of hyaluronic acid synthesis by bioactive lysophospholipids in human vascular smooth muscle cells. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 130 (2005) Suppl. 4

A. Marzoll, J.W. Fischer (2006) Rosuvastatin Decreases Cyclooxygenase-2 Expression and Induces Collagen Accumulation in Atherosclerotic Lesions of ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26; e53-e107; e-85

A. Marzoll, J.W. Fischer (2006) Chronic Treatment of ApoE-Deficient Mice with Rosuvastatin Changes Plaque Extracellular Matrix Composition: Implications for Plaque Stability. *Circulation* 114, 18 (Suppl.)

A. Marzoll, J.W. Fischer (2006) Chronic Rosuvastatin-Treatment of ApoE-deficient Mice Increases Accumulation of Collagen and Collagen-binding Proteoglycans in Atherosclerotic Lesions. *Atherosclerosis* Suppl. Vol. 7, No 3, (245)

C. Glandorff, A. Marzoll, J. Meyer-Kirchrath, K. Schrör, J.W. Fischer (2006) Prostacyclin Inhibits Calcification of Human Vascular Smooth Muscle Cells in Culture. *Atherosclerosis* Suppl. Vol. 7, No 3, (247)

A. Marzoll, G.Dai, J.W. Fischer (2007). Decreased Inflammation and ECM-Remodelling by Long Time Treatment with Rosuvastatin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375 Suppl 1:61(281)

A. Marzoll, J.W. Fischer (2007). Extracellular matrix composition in ApoE deficient mice after long time treatment with rosuvastatin. *Hämostaseologie*; 27:A91

Freudenberger T, Oppermann M, Marzoll A, Heim HK, Kojda G, Schrör K, Fischer JW (2007) Der Verlust von endogenem Estradiol nach bilateraler Ovariectomie zeigt in ApoE-defizienten Mäusen anti-atherogene Effekte und verbessert die Endothelfunktion. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 132 (2007) Suppl. 1

Wördehoff L, Marzoll A, Fischer JW (2007) Einfluss von Cyclooxygenase-Inhibitoren auf die Zusammensetzung Atherosklerotischer Plaques. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **132** (2007) Suppl. 1

A. Marzoll, L. Wördehoff, G. Dai, S. Fries, T. Grosser, K. Schrör, J.W. Fischer (2007) Cyclooxygenase 2 Inhibitors Reduce Hyaluronan Synthesis in Murine Atherosclerosis. *Circulation* **116**, 16 (Suppl.)

## **7.2 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften**

Andrea Marzoll, Ariane Melchior, Francesco Cipollone, Jens W. Fischer. Chronic rosuvastatin treatment induces accumulation of small leucine-rich proteoglycans in atherosclerotic lesions of ApoE<sup>-/-</sup>-mice; (submitted).

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. JW. Fischer für die Überlassung des Themas und die konsequente Unterstützung dieser Arbeit sowie für zahlreiche motivierende Gespräche und Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. K. Schrör danke ich für die herzliche Aufnahme in das Institut.

Herrn Prof. Dr. Proksch danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Frau Dr. Emde danke ich für die hilfreichen Informationen bezüglich der histologischen Analysen und ihre stetige Hilfsbereitschaft. Herrn Dr. Lindner möchte ich für die Einweisung in die operative Technik der Karotis-Ligatur und die schöne Zeit in Maine danken. Herrn Dr. Grosser und Frau Dr. Fries danke ich für die Analyse der Prostaglandin-Metaboliten im Mäuseurin.

Frau Marra-Mann danke ich für die Organisation des Laboralltags und die Hilfe bei den Zellversuchen.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich herzlich für die Organisation des Institutslebens.

Allen Kollegen danke ich für die sehr nette Arbeitsatmosphäre am Institut, die sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Gernot Kaber, Sören Twarock und Marcel Treml möchte ich für die Hilfe bei Computerproblemen jeglicher Art danken. Ari Melchior danke ich für wertvolle Diskussionen und Anregungen. Ein besonderer Dank gilt Sören Twarock und Gernot Kaber für allgemeine pharmakologische und wissenschaftliche Diskussionen.

AstraZeneca danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei meiner Mutter und meiner Schwester für die emotionale Unterstützung während der Promotionszeit bedanken.

## 9 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 27.11.2007

Andrea Marzoll

## 10 Lebenslauf

### **Person:**

Name: Andrea Marzoll  
Geburtsdatum: 30.03.1979  
Geburtsort: Essen  
Nationalität: deutsch

### **Promotion:**

seit 12/2003 Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. J.W. Fischer am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universität Düsseldorf

### **Studium:**

1998-2002 Pharmaziestudium an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
2002-2003 Praktische Jahr  
12/2003 Approbation zur Apothekerin

### **Schulische Ausbildung:**

1985-1989 Barbara-Grundschule, Essen  
1989-1998 Gymnasium am Stoppenberg, Essen  
1998 Abitur

Düsseldorf, den 27.11.2007