



II. Medizinische Klinik, Abteilung für Nephrologie des Klinikums rechts der Isar

Stat1 Signalweg bei Atherosklerose

Sophia Brigitte Gaim

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende/-r der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Marcus Baumann
2. Prof. Dr. Hans-Henning Eckstein

Die Dissertation wurde am 19.12.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.07.2019 angenommen.

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis	4
2	Einleitung	5
2.1	Epidemiologie kardiovaskulärer Gefäßerkrankungen	5
2.2	Begriffsklärung Arteriosklerose.....	5
2.3	Pathogenese der Atherosklerose	5
2.3.1	Initiation.....	5
2.3.2	Angeborenes Immunsystem.....	6
2.3.3	Rolle der Endothelzellen	6
2.3.4	Erworbene Immunabwehr	7
2.3.5	Th1 Zellen und Interferon gamma	7
2.3.6	Proinflammatorische Wirkung von Interferon gamma	7
2.3.7	Plaquebildung und Interferon gamma.....	8
2.3.8	Jak/Stat1 Signalweg.....	9
2.3.9	Das Chemokin Monokine induced by Interferon gamma (Mig)	10
2.4	Fragestellung	11
3	Methodik	12
3.1	Probandenrekrutierung.....	12
3.2	Erfassung der Daten	12
3.3	Beschaffung der Biopsien.....	13
3.4	Immunhistochemische Färbung.....	13
3.4.1	Immunhistochemie	13
3.4.2	Verwendete Markierung: LSAB Methode.....	14
3.4.3	Durchführung der Markierung nach Standard Operating Procedure	14

3.5	Beurteilung der gefärbten Gefäßschnitte	17
3.6	Statistische Auswertung	19
4	Ergebnisse	20
4.1	Deskriptive Statistik	20
4.2	Bivariate Korrelationen	24
4.2.1	Zusammenhang zwischen Alter und Arteriosklerosegrad	24
4.2.2	Zusammenhang zwischen Alter und Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig im arteriellen Gefäß	25
4.2.3	Zusammenhang zwischen Ausprägung der Arteriosklerose und dem Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig im arteriellen Gefäß	26
4.2.4	Korrelation Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig im arteriellen Gefäß mit der Ausprägung der Arteriosklerose im Gefäß	28
4.2.5	Zusammenhang zwischen Ausprägung der Arteriosklerose und dem Probandenalter	30
4.2.6	Zusammenhang zwischen Risikofaktoren und dem Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig	30
4.3	Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)	31
4.3.1	Einfaktorielle Varianzanalyse Probandenalter – Ausprägung der Arteriosklerose	31
4.3.2	Einfaktorielle Varianzanalyse Probandenalter – Ausmaß der immunhistochemischen Anfärbung von Mig	32
4.3.3	Einfaktorielle Varianzanalyse: Gruppen Ausprägung der Arteriosklerose – Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig	32
4.3.4	Einfaktorielle Varianzanalyse Gruppen Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig – Ausprägung der Arteriosklerose	32

4.4	T-Test für unabhängige Stichproben	33
4.4.1	T-Test für unabhängige Stichproben mit Gruppierungsvariable Alter und Testvariable Arteriosklerosegrad.....	33
4.4.2	T-Test für unverbundene Stichproben mit Gruppierungsvariable Alter und Testvariable Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig	34
4.4.3	T-Test für unverbundene Stichproben mit Gruppierungsvariable Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig und Testvariable Arteriosklerosegrad.....	35
4.4.4	T-Test für unverbundene Stichproben mit Gruppierungsvariable Spender/Empfänger und Testvariable Arteriosklerosegrad	36
4.4.5	T-Test für unverbundene Stichproben mit Gruppierungsvariable Spender/Empfänger und Testvariable Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig	36
4.4.6	T- Test für unverbundene Stichproben mit Gruppierungsvariable Risikofaktor (ja/nein) und Testvariable Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig	37
5	Diskussion	38
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	38
5.2	Atherosklerose und Alter	39
5.3	Stat1/ Mig und Atherosklerose	40
5.4	Stat1/ Mig und Alter.....	42
5.5	Stat1/ Mig und arterielle Hypertonie	43
5.6	Stat1/ Mig und Diabetes	43
6	Zusammenfassung	45
7	Literaturverzeichnis.....	46
8	Abbildungsverzeichnis	51
9	Tabellenverzeichnis	52
10	Danksagung.....	53

1 Abkürzungsverzeichnis

LDL: Low Density Lipoprotein

LDLox: oxidiertes LDL

PRRs: Pattern-Recognition Rezeptoren

TLR: Toll like Rezeptor

Th1 Zellen: T Helferzellen der Gruppe eins

APC: Antigen präsentierende Zelle

MHC: Major histocompatibility complex

CD4: Cluster of differentiation 4

IFN γ : Interferon gamma

SMC: Smooth muscle cell

ICAM: Intercellular adhesion molecule

VCAM: Vascular cell adhesion protein

VSMC: Vascular smooth muscle cell

EZM: Extrazelluläre Matrix

Cxcl: Cxc Ligand

Stat: Signal Transducers and Activators of Transkription

Jak: Januskinase

GAS: Interferon gamma aktivierte Sequenzen

Mig: Monokine induced by Interferon gamma

LSAB: Labelled StreptAvidin Biotin

HRP-POD: Horseradish Peroxidase

TBS: Tris-buffered saline

D.m.: Diabetes mellitus

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Gefäßerkrankungen

Laut Statistischem Bundesamt war die chronisch ischämische Herzkrankheit (Klassifikation nach ICD-10: I25) 2013 mit 8,2 Prozent die häufigste Todesursache in Deutschland. Gefolgt vom Akuten Myokardinfarkt (ICD-10: I21) mit 5,8 Prozent. Der Schlaganfall (ICD-10: I64) war mit 2,1 Prozent auf Platz acht der häufigsten Todesursachen. Es befanden sich also drei Krankheiten unter den zehn häufigsten Todesursachen, deren Ursprung im Entstehen einer Arteriosklerose liegt. Die Lebenszeitprävalenz einer koronaren Herzkrankheit (in diesem Fall Sammelbegriff für Myokardinfarkt, Angina pectoris und andere Manifestationen der koronaren Herzkrankheit) beträgt in der Altersgruppe 40 bis 79 Jahre in Deutschland 9,3 (Gosswald, Schienkiewitz, Nowossadeck, & Busch, 2013), die des Schlaganfalls 2,9 Prozent (Busch, Schienkiewitz, Nowossadeck, & Gosswald, 2013). Bei beiden Krankheitsbildern nehmen die Prävalenzen mit steigendem Alter zu. Diese Zahlen zeigen die Häufigkeit der Manifestationen der Arteriosklerose auf und verdeutlichen die Wichtigkeit der Erforschung ihrer Ätiologie und möglicher Ansatzpunkte in der Therapie.

2.2 Begriffsklärung Arteriosklerose

Arteriosklerose ist in der Pathologie ein Sammelbegriff für verschiedene Gefäßerkrankungen, bei welchen es durch fibrotischen Umbau zu einer Verdickung und Verhärtung der Gefäßwand kommt, was zum Verlust ihrer Elastizität führen kann. Sie schließt die Atherosklerose, die Arteriosklerose und die Mönckeberg-Mediaverkalkung ein. In der Praxis wird jedoch Arteriosklerose oft synonym mit Atherosklerose verwendet, was auch bei dieser Arbeit der Fall ist.

2.3 Pathogenese der Atherosklerose

2.3.1 Initiation

Die Pathogenese der Atherosklerose beginnt mit einer Verletzung des Endothels eines arteriellen Gefäßes und einer daraus folgenden Dysfunktion. Diese Verletzung kann verschiedenste Ursachen haben, unter anderem pulsatilem Blutfluss und Scherstress

(Giannoglou, Antoniadis, Koskinas, & Chatzizisis, 2010) sowie Folgen durch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Arterieller Hypertonus, Hyperlipidämie, welche zur Anhäufung von LDL und anschließender Oxidation zu LDLox in der Arterienwand führen kann (Navab et al., 1996), Hyperglykämie und Rauchen (Salisbury & Bronas, 2014). Die darauffolgende Funktionsstörung der Endothelzellen äußert sich in Verlust der antithrombotischen Oberfläche sowie erhöhter Permeabilität (Chistiakov, Revin, Sobenin, Orekhov, & Bobryshev, 2015) und verschlechterter Vasodilatation und führt zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Expression von Adhäsionsmolekülen (Salisbury & Bronas, 2014). Die gesteigerte Permeabilität des Endothels und die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen führen zur Anziehung von Leukozyten (Monozyten), Neutrophilen und Thrombozyten.

2.3.2 Angeborenes Immunsystem

Monozyten translozieren in die Tunica Intima des Gefäßes und differenzieren zu Makrophagen (Hoeksema, Stoger, & de Winther, 2012). Diese sorgen für eine Hochregulierung von Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs), wie Scavenger Rezeptoren und Toll-like Rezeptoren (TLRs). Bindung von Molekülen an TLRs führt zu Signalkaskaden, die durch Ausschüttung vasoaktiver Moleküle, wie Endothelin, Eikosanoide und Stickoxid, Entzündungsprozesse in Gang setzen (Yan & Hansson, 2007). Über Scavenger Rezeptoren erkennen die Makrophagen das oxidierte LDL und phagozytieren es, was zur Entstehung von Schaumzellen führt (Hansson, Robertson, & Soderberg-Naucler, 2006). Die Akkumulation dieser Schaumzellen wird makroskopisch als „fatty streaks“ (Fettstreifen) sichtbar.

2.3.3 Rolle der Endothelzellen

Auch die Endothelzellen der arteriellen Gefäße arbeiten als Teil des Immunsystems. Sie besitzen TLRs (Faure et al., 2000), deren Bindung von Pathogenen zur Ausbildung von Adhäsionsmolekülen und Entzündungsmolekülen führt. Außerdem sind auch Scavenger Rezeptoren am Endothel zu finden, durch welche es unter anderem modifizierte Teile von LDL in sich aufnehmen kann (Hansson, Libby, Schonbeck, & Yan, 2002; Krieger, 1997).

2.3.4 Erworbene Immunabwehr

Nicht nur die angeborene, auch die erworbene Immunabwehr spielt eine Rolle bei der Pathogenese der Atherosklerose. Genauso früh wie Monozyten vorhanden, sind später bis zu 20 Prozent der in einem fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaque gefundenen Zellen T Lymphozyten (Hansson et al., 2002; Jonasson, Holm, Skalli, Bondjers, & Hansson, 1986). Viele dieser T Zellen sind Gedächtniszellen (Stemme, Holm, & Hansson, 1992), die durch Antigenpräsentation von Antigen präsentierenden Zellen (APCs) aktiviert werden. CD4 positive T Zellen werden häufig durch auf Makrophagen via MHC II präsentierte Partikel des phagozytierten LDLox aktiviert und somit zur Proliferation und Zytokinsekretion angeregt (Stemme et al., 1995).

2.3.5 Th1 Zellen und Interferon gamma

Eines der wichtigsten Zytokine in diesem Zusammenhang ist Interferon gamma (IFN γ) (Stemme et al., 1995). Durch IFN γ differenzieren sich die CD4 positiven T Zellen zu T-Helferzellen der Gruppe eins (Th1- Zellen) aus (Ait-Oufella, Sage, Mallat, & Tedgui, 2014), deren Aufgabe die Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene ist (Romagnani, 1994). Sie werden aber auch bei einigen Autoimmun- und Inflammatorischen Krankheiten gefunden (Ait-Oufella et al., 2014; Romagnani, 1994), unter anderem bei der Atherosklerose (Ait-Oufella et al., 2014). Th1 Zellen stellen den häufigsten T Zell Subtyp in atherosklerotischen Plaques dar (Frostegard et al., 1999). Interferon gamma ist das Zytokin, dessen Sekretion eine Th1 Zelle ausmacht (Robertson & Hansson, 2006). Es wird aber auch von weiteren Immunzellen der atherosklerotischen Plaques, wie Natürliche Killer T Zellen, Makrophagen und anderen APCs, ausgeschüttet (Chung et al., 2002).

2.3.6 Proinflammatorische Wirkung von Interferon gamma

IFN γ wirkt in der Pathogenese der Atherosklerose weitgehend proinflammatorisch und proatherogen. In Tierversuchen mit Mäusen zeigte sich, dass atherosklerotische Läsionen nach Injektion von IFN γ deutlich wuchsen (Whitman, Ravisankar, Elam, & Daugherty, 2000). Mäuse ohne einen IFN γ Rezeptor zeigten dagegen eine verminderte Atherosklerosebildung (Gupta et al., 1997). IFN γ trägt in vielerlei Hinsicht zur Progression der Atherosklerose bei.

Es vermindert den Cholesterin Efflux, unter anderem durch Inhibierung der Cholesterol 27-hydroxylase, ein Enzym, das das Ausschleusen von Cholesterin aus den Zellen fördert (Reiss et al., 2001). Außerdem fördert es die Aufnahme und Speicherung von LDL in der Zelle (Lusis, Mar, & Pajukanta, 2004; Panousis & Zuckerman, 2000) und die Hochregulierung von Scavenger Rezeptoren an Makrophagen und glatten Muskelzellen (smooth muscle cells = SMCs) der Aorta, was zu einer vermehrten LDL Aufnahme und somit erhöhten Makrophagen- und SMC- Schaumzellbildung führt (McLaren & Ramji, 2009). Des Weiteren trägt IFN γ zu der Anlockung von Immunzellen der angeborenen und der erworbenen Immunabwehr zum Ort der Atherogenese bei. Durch Interferon gamma sensitive Chemokine wird die Aktivität der Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche von Endothelzellen gesteigert, überdies wird die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 an Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur hochreguliert (Chung et al., 2002; Li, Cybulsky, Gimbrone, & Libby, 1993). Weitere IFN γ sensitive Chemokine wie Cxcl16 oder Cxcl 9, 10 und 11 sorgen für Anziehung und Akkumulation von Th1 Zellen (Charo & Taubman, 2004; McLaren & Ramji, 2009). Die Ausbildung von MHC II Molekülen auf Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen, welche zur Anziehung von T Lymphozyten, vor allem Th1 Zellen, führt, wird ebenfalls durch IFN γ vermehrt (Stemme, Fager, & Hansson, 1990; Wong, Clark-Lewis, McKimm-Breschkin, Harris, & Schrader, 1983). Rekrutierung von Zellen des erworbenen Immunsystems ist essentiell für die Progression der Atherosklerose (Hansson & Libby, 2006), was die wichtige Rolle von Interferon gamma in der Pathogenese der Atherosklerose verdeutlicht.

2.3.7 Plaquebildung und Interferon gamma

Zusätzlich gibt es einige Wirkungsweisen von Interferon gamma, die an Plaquebildung und Plaquestabilisierung beteiligt sind. Der Lipidplaque, der aus Zelltrümmern und einem lipidreichen, nekrotischen Kern besteht (Lusis et al., 2004), entsteht durch Zugrundegehen der Schaumzellen, was verschiedene Ursachen hat. Einerseits das Auskristallisieren des Cholesterins in der Zelle und andererseits proapoptotisch wirkende Perforine, ausgeschüttet von zytotoxischen T Lymphozyten (Riede, Werner, & Schaefer, 2004). Die toten

Schaumzellen akkumulieren in der Subintima zum Atherom (Riede et al., 2004). Interferon gamma fördert die Apoptose der Schaumzellen indem es proapoptotische Gene induziert (Bai et al., 2008; Rosner et al., 2006). Glatte Muskelzellen der Tunica Media werden durch proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, ausgeschüttet von noch lebenden Schaumzellen, zu Proliferation und Kollagenproduktion angeregt (Riede et al., 2004). Die Expression von Integrinen auf der Oberfläche von glatten Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells = VSMCs), IFN γ induziert, sorgt für eine Bindung von Fibronectin, was die VSMCs zur Proliferation anregt und zu ihrer Migration zur Läsion führt. So entsteht die fibröse Kappe der Lipidplaques (Barillari et al., 2001). Solange der Plaque stabil ist, stellt er noch keine große Gefahr für thromboembolische Ereignisse wie Schlaganfall oder Myokardinfarkt dar. Erst wenn sich das Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) zugunsten des Abbaus verschiebt, wird der Plaque instabil und droht zu rupturieren (McLaren, Michael, Ashlin, & Ramji, 2011). Interferon gamma kann die Produktion von Kollagen I und III der glatten Muskelzellen schwächen (Gupta et al., 1997; Hansson & Libby, 2006) und den Abbau der EZM durch Induktion der Freisetzung von Matrixmetalloproteasen (MMPs) aus Makrophagen und glatter Muskulatur fördern (Schonbeck et al., 1997).

2.3.8 Jak/Stat1 Signalweg

Die Wirkung von IFN γ ist Großteils Stat1 abhängig. Stats (Signal Transducers and Activators of Transkription) sind Transkriptionsfaktoren, die über einen Jak-Stat Signalweg funktionieren. Der Typ 2 Interferonrezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, an jeder Untereinheit sind jeweils eine Januskinase (Jak) Typ eins und eine Januskinase Typ zwei gebunden. Durch Bindung von Interferon gamma am Rezeptor werden die Untereinheiten dimerisiert und es kommt zur Phosphorylierung der Tyrosinreste der Jaks und somit zu ihrer Aktivierung und anschließend zur Phosphorylierung der Tyrosinreste des Interferonrezeptors und Erzeugen einer Bindungsstelle. Jeweils ein Stat1 Monomer aus dem Zytoplasma bindet mit seiner SH2 Domäne an die Bindungsstelle einer Untereinheit und wird wiederum durch die Januskinasen phosphoryliert. Anschließend folgt die Dissoziation des nun entstandenen

Stat Homodimers vom Rezeptor mit anschließender Translokation in den Nukleus und Bindung an Interferon gamma aktivierte Sequenzen (GAS) in der Promoter Region von IFN γ abhängigen Genen (Levy & Darnell, 2002; McLaren & Ramji, 2009; Moss & Ramji, 2015; Wesoly, Szweykowska-Kulinska, & Bluysen, 2007). Die Bindung kann aber auch an anderen Stellen passieren, was weitere Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren zur Folge hat (Sikorski et al., 2012). Mäuse mit einem Stat1 Defizit zeigten verminderte Atherosklerose- und Schaumzellentwicklung (Agrawal et al., 2007). (Lim et al., 2008) und (Torella et al., 2007) zeigten an Ratten in vitro und in vivo, dass die Hemmung von Stat1 die Proliferation und Neointima Bildung glatter Gefäßmuskelzellen nach Gefäßverletzung vermindert. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz dieses Signalwegs in der Pathogenese der Atherosklerose. Jedoch sind auch nicht alle Wirkungsweisen von Interferon gamma Stat1 abhängig (Gough, Levy, Johnstone, & Clarke, 2008).

2.3.9 Das Chemokin Monokine induced by Interferon gamma (Mig)

Ein Chemokin (chemotaktisches Zytokin), welches von Interferon gamma Stat1 abhängig induziert wird, ist das Monokine induced by Interferon gamma (Mig), auch als CXC Ligand 9 (Cxcl9) bekannt (Farber, 1997; Fenwick, Macedo, Kilty, Barnes, & Donnelly, 2015; Hardison et al., 2012; Liao et al., 1995). Mig wirkt durch den CXCR3 Rezeptor, der vor allem auf aktivierten Th1 Zellen (Kim et al., 2001), aber auch auf CD8 positiven T Zellen, Natürlichen Killer Zellen und NKT Zellen, exprimiert wird, chemotaktisch auf aktivierte T Lymphozyten und proinflammatorisch (Farber, 1997; Groom & Luster, 2011; Loetscher et al., 1996; Qin et al., 1998). Dass die Anziehung von Th1 Zellen ins periphere Gewebe Stat1 abhängig durch Mig und andere CXCR3 Liganden (Cxcl10 und Cxcl11) geschieht, zeigten Mikhak et al (Mikhak et al., 2006). Zu den Zellen, bei welchen die Produktion von Mig durch IFN γ induziert werden kann, gehören vor allem Antigen präsentierende Zellen (Park et al., 2002). Aber auch viele andere Zellen können Mig freisetzen, unter anderem bronchiale Epithelzellen (Sauty et al., 1999), Epithelzellen der proximalen Tubuli der Niere (Lin, Song, Zhu, Yang, & Zheng, 2013), Endothelzellen (Bodnar & Wells, 2015; Loos et al., 2006),

Fibroblasten (Proost et al., 2004) und vaskuläre glatte Muskelzellen (Chmielewski et al., 2014; Mach et al., 1999).

Untersuchungen atherosklerotischer Plaques von menschlichen Karotiden und Koronararterien zeigten eine deutliche Genhochregulierung von Mig (Sikorski, Wesoly, & Bluysen, 2014). Auch Mach et al. zeigten, dass in atherosklerotischen Plaques vermehrt Mig von den mit der Bildung des Atheroms verbundenen Zellen (Endothelzellen, Makrophagen und glatte Muskelzellen) produziert werden (Mach et al., 1999). Bei mit Interferon gamma behandelten VSMCs von Mäusen zeigte sich eine signifikante Genhochregulierung von Mig, die in Abwesenheit von Stat1 nicht zustande kam (Chmielewski et al., 2014).

2.4 Fragestellung

Die bisher gefundenen Daten sprechen alle dafür, dass der von Interferon gamma genutzte Stat1 Signalweg und die vermehrte Produktion von Mig eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen. Mig könnte, wenn sich die Daten bestätigen, gemeinsam mit anderen Faktoren, als Biomarker der nichtinvasiven Diagnostik von Atherosklerose dienen.

All diese Daten wurden jedoch vor allem an Tieren erhoben, die Fragestellung dieser Arbeit lautet daher:

Geht Atherosklerose auch beim Menschen mit vermehrter Chemokinproduktion (Mig-Produktion) einher und, da die Produktion von Mig eine Folge der Stat1 Aktivität darstellt, korreliert die Stat1 Aktivität mit dem Ausmaß der Atherosklerose im arteriellen Gefäß?

Um dies zu überprüfen, wurden humane Gefäßbiopsien pathologisch untersucht, um festzustellen, ob und wie ausgeprägt atherosklerotische Läsionen vorhanden waren.

Dieselben Proben wurden anschließend immunhistochemisch mit einem Mig- Antikörper markiert und das Ausmaß der Markierung in der Tunica media der Gefäße mit der Ausprägung der Atherosklerose verglichen, um festzustellen, ob eine weiter fortgeschrittene atherosklerotische Läsion wirklich mit einer vermehrten Färbung, also einer vermehrten

Chemokinproduktion, einhergeht im Vergleich zu Arterien ohne oder mit nur wenig atherosklerotischem Umbau.

3 Methodik

3.1 Probandenrekrutierung

Das Probandenkollektiv, bestehend aus 135 Probanden, setzt sich zusammen aus Nierentransplantierten, welchen im Zeitraum von 2010 bis 2013 im Klinikum Rechts der Isar eine Spenderniere transplantiert wurde und deren Organspendern. Die Voraussetzung war die Entnahme einer Biopsie eines arteriellen Gefäßes (Aorta, Arteria renalis oder Arteria iliaca) während der Transplantation und die anschließende Befundung der Biopsien durch die Pathologie des Klinikums Rechts der Isar. Allerdings konnte bei 6 der 135 Probanden nicht alle für die Arbeit nötigen Daten erfasst werden, weshalb am Ende nur Proben von 129 Probanden verwendet wurden.

3.2 Erfassung der Daten

Die Basisdaten Geschlecht und Alter bei Transplantation sowie die kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus der Transplantatempfänger und der Lebendspender wurden aus deren Patientenakten erhoben. Die Daten der Totspender wurden der Datenbank von Eurotransplant entnommen.

Die Befunde der Gefäßbiopsien wurden ebenfalls aus der Patientenakte erhoben und wie in Tabelle 1 gezeigt kategorisiert.

Tabelle 1: Einteilung der Biopsiebefunde für unterschiedliche Ausprägungen von Arteriosklerose

Kategorie	Ausprägung der Arteriosklerose im arteriellen Gefäß
0	Kein pathologischer Befund
1	Minimal
2	Geringgradig
3	Mäßiggradig
4	Mittelgradig
5	Hochgradig

3.3 Beschaffung der Biopsien

Die Biopsien wurden in Form von 145 Paraffinblöcken in der Pathologie des Klinikums Rechts der Isar aufbewahrt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Davon konnte bei einer Biopsie nicht ergründet werden, ob diese dem Organspender oder dem Empfänger entnommen worden war, deshalb wurde sie in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

3.4 Immunhistochemische Färbung

3.4.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient dem Nachweis zell- oder gewebespezifischer Antigene. Das Prinzip besteht darin, dass in einer Primärreaktion ein mono- oder polyklonaler Antikörper an ein Antigen bindet. Würde mit einer direkten Methode markiert werden, wäre der primäre Antikörper an ein Markermolekül gebunden und könnte bereits nach dem ersten Schritt detektiert werden. Bei den indirekten Methoden, wie sie auch für diese Arbeit verwendet wurde, bindet anschließend in einer Sekundärreaktion ein weiterer Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet und an ein Markermolekül gekoppelt ist, an den primären Antikörper. Je nachdem, welche Art Marker verwendet wurde, kann der Bindungsort dann mit Hilfe von Fluoreszenzlicht, Enzymhistochemie oder einem Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Seit Erfindung der indirekten Methode wird fast nur noch diese verwendet, da sie durch Signalverstärkung durch die verschiedenen aufeinanderfolgenden Schritte sensitiver als die direkte Methode ist. (Abb. 1) (Dako, 2013)

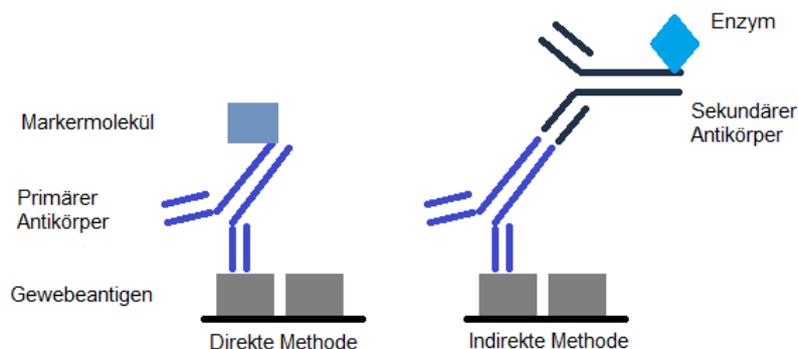


Abbildung 1: Direkte und indirekte Methode der Immunhistochemie

3.4.2 Verwendete Markierung: LSAB Methode

Die Biopsien wurden mit Hilfe der Labelled StreptAvidin Biotin (LSAB) Methode gefärbt. Streptavidin (von dem Bakterium *Streptomyces avidinii*) hat 4 Bindestellen für Biotin und somit eine hohe Affinität dafür. Diese Methode funktioniert, indem der primäre Antikörper, ein polyklonaler IgG Anti-Mig Antikörper vom Kaninchen an eine Sequenz der C Terminus Region des gesuchte Gewebeantigens Mig/Cxcl9 bindet. Der sekundäre biotynilierte Antikörper, Anti- Kaninchen IgG HRP-POD (Horseradish Peroxidase = Meerrettich Peroxidase) Antikörper, verbindet daraufhin den Primärantikörper mit einem Streptavidin Peroxidase Konjugat. Eine Peroxidase Substratlösung, hier DAB, wird hinzugefügt und durch die Peroxidase oxidiert, was zu der braunen Färbung und somit zum Sichtbarmachen des Antigens führt. (s. Abb 2) Anders als bei 3.4.1 beschrieben, sind in diesem Fall also noch weitere Reaktionen zwischen dem sekundären Antikörper, dem Peroxidase Konjugat und der Peroxidase Substratlösung notwendig, um das gesuchte Antigen detektieren zu können. Es handelt sich hierbei deshalb um eine immunenzymatische Färbung. (Dako, 2013)

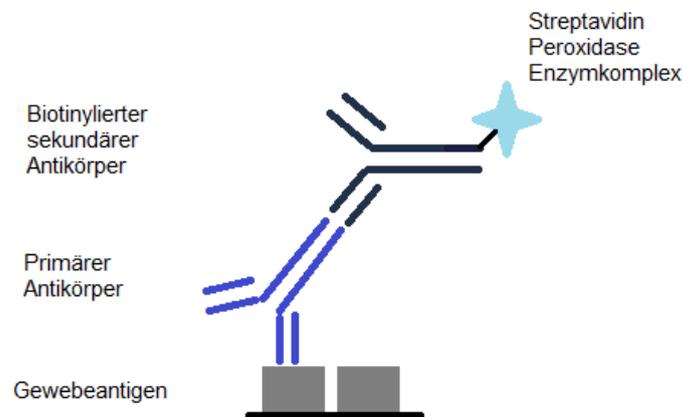


Abbildung 2: LSAB Methode

3.4.3 Durchführung der Markierung nach Standard Operating Procedure

Die Paraffinblöcke wurden geschnitten, die Paraffinschnitte auf Objektträger gelegt und bei 37 ° Celsius getrocknet. Anschließend wurden sie auf einem Ständer 10 Minuten in einen Behälter mit Xylene getaucht, um das Paraffin zu entfernen. Daraufhin wurden die Schnitte nacheinander jeweils 2 Minuten zuerst in 100 prozentiges, dann in 96 und 70 prozentiges

Ethanol getaucht, um das Ethanol zu entfernen und das Gewebe wieder zu hydrieren. Als nächstes folgten 2 Minuten in destilliertem Wasser, um das noch verbliebene Ethanol zu entfernen. Danach wurden die Schnitte in bei 750 Watt für 10 Minuten in der Mikrowelle vorgewärmter Target Retrieval Solution getaucht und darin dreimal für 5 Minuten bei 350 Watt in der Mikrowelle erwärmt. Es folgten die anschließende Abkühlung bis Raumtemperatur und Waschen in TBS Puffer. Die Schnitte wurden mit einem Pap Pen der Firma Kisker umkreist. Jeweils 100 Mikroliter DAKO Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Reagent wurden hinzugefügt, um die endogene Peroxidase und endogene alkalische Phosphatase zu hemmen. Anschließend wurden die Schnitte in eine feuchte Kammer platziert und darin 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten lang in TBS Puffer gewaschen. Ein Tropfen DAKO Avidin Blocking Reagent wurde auf jeden Schnitt appliziert, um unspezifische Reaktionen mit Avidin zu hemmen. Daraufhin erneute Inkubation 10 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer und anschließendes dreimaliges fünf Minuten langes Waschen in TBS Puffer. Das gleiche Vorgehen wurde mit einem Tropfen DAKO Biotin blocking Reagent und mit einem Tropfen Proteinblock Serum free DAKO durchgeführt, um unspezifische Reaktionen mit Biotin beziehungsweise Protein zu verhindern. Mit einem Papierhandtuch wurde alle Flüssigkeit von den Schnitten entfernt.

100 Mikroliter des ersten Antikörpers, Mig antibody Genetex GTX108422, 1:200 verdünnt in TBS Puffer wurden zu allen Schnitten hinzugefügt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten lang in TBS Puffer gewaschen.

Daraufhin wurden 100 Mikroliter des zweiten Antikörpers, biotinylated anti rabbit IgG HRP – POD conjugated, in einer 1:50 Verdünnung mit TBS Puffer auf jedem der Schnitte, inklusive der Negativkontrolle, verteilt und 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und wieder dreimal für 5 Minuten in TBS Puffer gewaschen.

Das gleiche Vorgehen wurde mit 100 Mikroliter HRP-POD- Streptavidin in einer Verdünnung mit TBS im Verhältnis 1:100 wiederholt.

Im Anschluss wurden 100 Mikroliter ImmPACT working solution hinzugefügt, die Schnitte fünf Minuten lang in der feuchten Kammer inkubiert, dann in Färbeständer plaziert und fünf Minuten lang in destilliertem Wasser gewaschen.

Daraufhin erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne, wofür die Schnitte zwei Minuten lang in Mayers Hämalaun getaucht und anschließend für fünf Minuten unter laufendem Leitungswasser gewaschen wurden, um die Färbung zu sichern und die Farbe von dunkelrot nach blau zu ändern.

In einer aufsteigenden Ethanolreihe, zuerst 70, dann 96 und am Schluss 100 Prozent für jeweils zwei Minuten wurden die Gewebeschnitte dehydriert und mit Ethanol versetzt, das darauffolgende fünfminütige Bad in Xylen entfernte das Ethanol anschließend wieder.

Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte in Roti Histokitt gelagert und über Nacht getrocknet.

Mit dieser Färbung erscheinen Zellkerne blau, Cxcl9/ Mig erscheint braun.

Alle verwendeten Reagenzien werden in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien für den Färbeporgang

Name des Reagenzes	Hersteller und Nummer	Menge pro Gewebeschnitt	Volumen pro Gewebeschnitt	Verdünnung
Peroxidase and Alkaline Phosphatase Blocking Reagent	DAKO S2003	1	100 µl	Ready to use
Target Retrieval Solution Citrate ph6	DAKO 2369	10	500 ml	100 ml 10xTRS mit 900 ml destilliertes Wasser
Biotin Blocking System: Avidin Solution	DAKO X0590	1	1 Tropfen	Ready to use
Biotin Blocking System: Biotin Solution	DAKO X0590	1	1 Tropfen	Ready to use
TBS Buffer: 24,2 g Tris (Roth AE15,2) 80,0 g Sodium Chloride (Sigma S7653)		10		Bis zu 1000 ml destilliertes Wasser bis pH 7,6 erreicht ist
TBS Buffer pH 7,6		10	10 ml	
Proteinblock Serum free	DAKO X0909	1	1 Tropfen	Ready to use

Mig antibody, Rabbit Polyclonal IgG antibody to Mig	GenetexGTX 108422	1	100 µl	1:200 mit 1x TBS Buffer
Biotinylated anti rabbit IgG HRP-POD (Horseradish Peroxidase) conjugated	Vector BA-1000	1	100 µl	1:50 mit 1x TBS Buffer
Horseradish Peroxidase Streptavidin	Vector SA-5004	1	100 µl	1:100 mit 1x TBS Buffer
ImmPACT DAB peroxidase substrate	Vektor SK-4150	1	100 µl	Working solution: 1ml ImmPACT Diluent + 1 Tropfen ImmPACT DAB Chromogen concentrate, gut vermischt
Mayers Hämalaun				Ready to use
70 % Ethanol				Ready to use
96 % Ethanol				Ready to use
100 % Ethanol				Ready to use
Xylene				Ready to use
Roti Histokitt	Roth T160.1			Ready to use

3.5 Beurteilung der gefärbten Gefäßschnitte

Unter einem Lichtmikroskop der Firma Olympus, Modell BX 40 wurden die gefärbten Gefäßschnitte mit 10-facher und 40-facher Vergrößerung betrachtet. In der Wandschicht der Tunica media wurde untersucht, bei wie vielen der Zellen eine braune Färbung erkennbar war. Die Gefäßschicht der Tunica media besteht vorwiegend aus glatter Muskulatur, elastischen Faser und Kollagenfasern. Bei der Erfassung der gefärbten Zellen kann also davon ausgegangen werden, dass es vorwiegend glatte Muskelzellen waren. Das Ergebnis wurde semiquantitativ in Form einer Skala von Null bis Drei eingeteilt. Die Bedeutung der Skala wird in Tabelle 3 erklärt.

Tabelle 3: Einteilung des Ausmaßes der Immunhistochemischen Färbung im arteriellen Gefäß

Kategorie	Bedeutung
0	Keine immunhistochemische = braune Färbung sichtbar
1	Bis zu 30 % der Zellen der Tunica media weisen eine braune Färbung nach
2	30 bis 70 % der Zellen der Tunica media weisen eine braune Färbung auf
3	Mehr als 70% der Zellen der Tunica media weisen eine braune Färbung auf

Nach drei Monaten wurde der Vorgang zur Verbesserung der Objektivierung wiederholt. Von den Ergebnissen beider Durchgänge wurden Mittelwerte gebildet. Diese Mittelwerte wurden für die Statistik genutzt. Zur Überprüfung der intraobserver Variability wurde ein Boxplotdiagramm erstellt und ein Vergleich von Median, 25. und 75. Perzentile der beiden Durchgänge und der Mittelwerte durchgeführt. Im ersten und im zweiten Durchgang sind alle Parameter gleich (25. Perzentile:1, Median: 2, 75. Perzentile: 2), bei den Mittelwerten unterscheidet sich nur der Median von 1,5 von den beiden Untersuchungsdurchgängen.

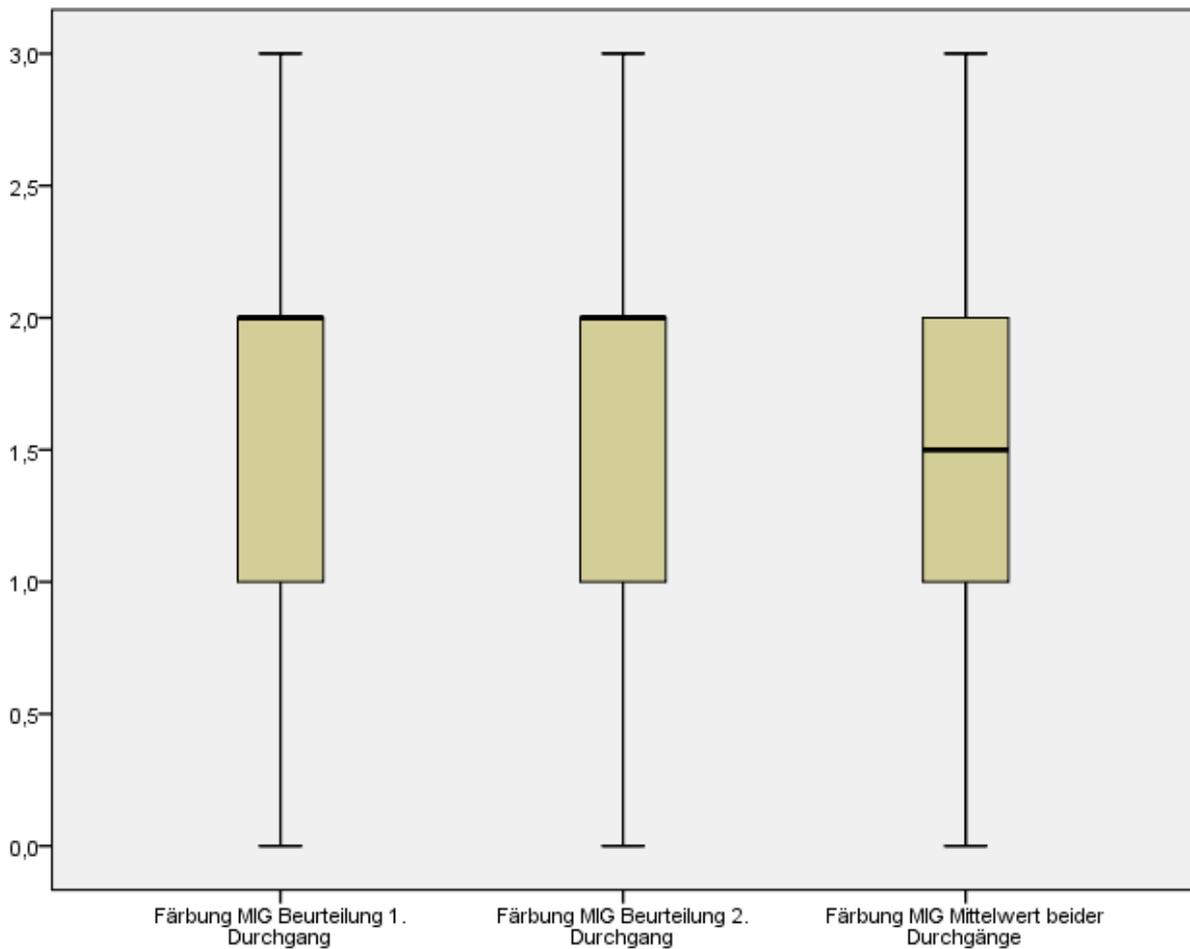


Abbildung 3: Boxplot- Diagramm zur Darstellung der Intraobserver Variability

Der linke und der mittlere Boxplot zeigen die Verteilung der Werte beider Beurteilungsdurchgänge. Der rechte Boxplot zeigt die Verteilung der aus dem ersten und dem zweiten Durchgang gebildeten Mittelwerte.

Tabelle 4: Vergleich der beiden Beurteilungsdurchgänge und den gebildeten Mittelwerten hinsichtlich Median, Varianz, Minimum, Maximum und Perzentilen

		Statistiken		
		Färbung MIG Beurteilung 1. Durchgang	Färbung MIG Beurteilung 2. Durchgang	Färbung MIG Mittelwert aus beiden Durchgängen
N	Gültig	144	143	145
	Fehlend	1	2	0
Median		2,00	2,00	1,500
Varianz		,920	,871	,764
Minimum		0	0	,0
Maximum		3	3	3,0
Perzentile	25	1,00	1,00	1,000
	50	2,00	2,00	1,500
	75	2,00	2,00	2,000

3.6 Statistische Auswertung

Die Beschreibung des Patientenkollektivs wurde durch Methoden der deskriptiven Statistik fertiggestellt. Häufigkeiten wurden mit Hilfe von Häufigkeits- und Kreuztabellen ermittelt. Zur Ermittlung von Normalverteilungen wurden Histogramme mit Normalverteilungskurven genutzt.

Zusammenhänge verschiedener Variablen wurden durch bivariate Korrelationsanalysen unter Gebrauch des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) ermittelt. Eine Korrelation wurde dann als gegeben angesehen, wenn r_s größer 0,2 beziehungsweise kleiner -0,2 war. Diese Werte wurden in den abgebildeten Tabellen fett markiert.

Zum Vergleich von Mittelwerten und Varianzanalysen zweier Fallgruppen wurde der T-Test von unverbundenen Stichproben zu Rate gezogen. Es wurden immer Mittelwertdifferenz, Standardabweichung (SD) und der p-Wert (p) angegeben. Bei mehr als zwei Fallgruppen wurden Mittelwerte mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Post-hoc Test nach Bonferroni ermittelt.

Der Signifikanzwert (p) wurde auf kleiner 0,05 festgelegt. Das heißt bei einem p-Wert von unter 0,05 ist ein Ergebnis als statistisch signifikant anzusehen.

Signifikante Werte wurden in Tabellen fett markiert.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

Das Probandenkollektiv umfasste 144 Proben, davon waren 46 von weiblichen und 98 von männlichen Probanden beziehungsweise 83 von Organspendern und 61 von Organempfängern.

Die Altersverteilung des gesamten Kollektivs war annähernd normalverteilt mit einem Mittelwert (MW) von 50,46 und einer Standardabweichung (SD) von 14,883. Die Altersverteilung bei Spendern und Empfängern war der des gesamten Patientenkollektivs sehr ähnlich, bei den Spendern ergab sich ein Mittelwert von 49,35 Jahren mit einer Standardabweichung von 16,627, bei den Empfängern war der Mittelwert 51,97 mit einer Standardabweichung von 12,087.

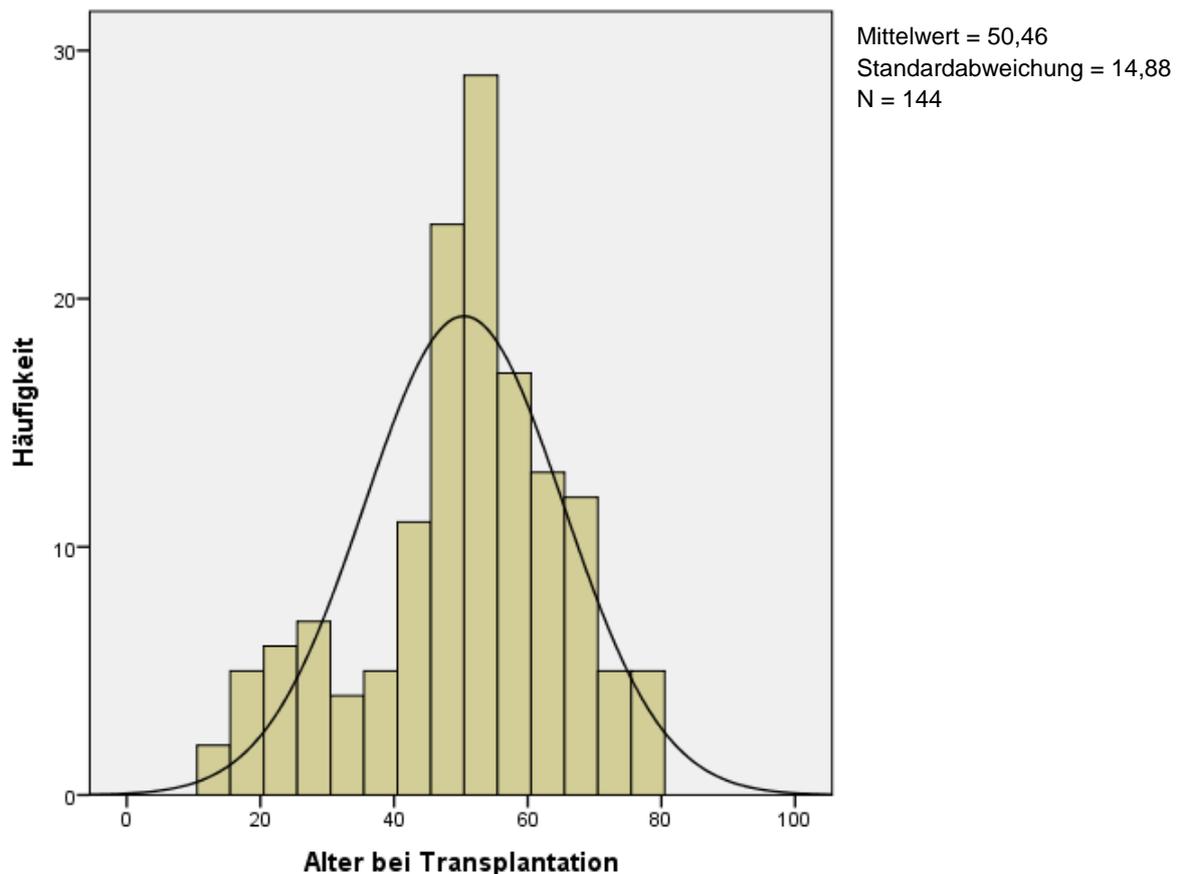


Abbildung 4: Altersverteilung des gesamten Probandenkollektivs

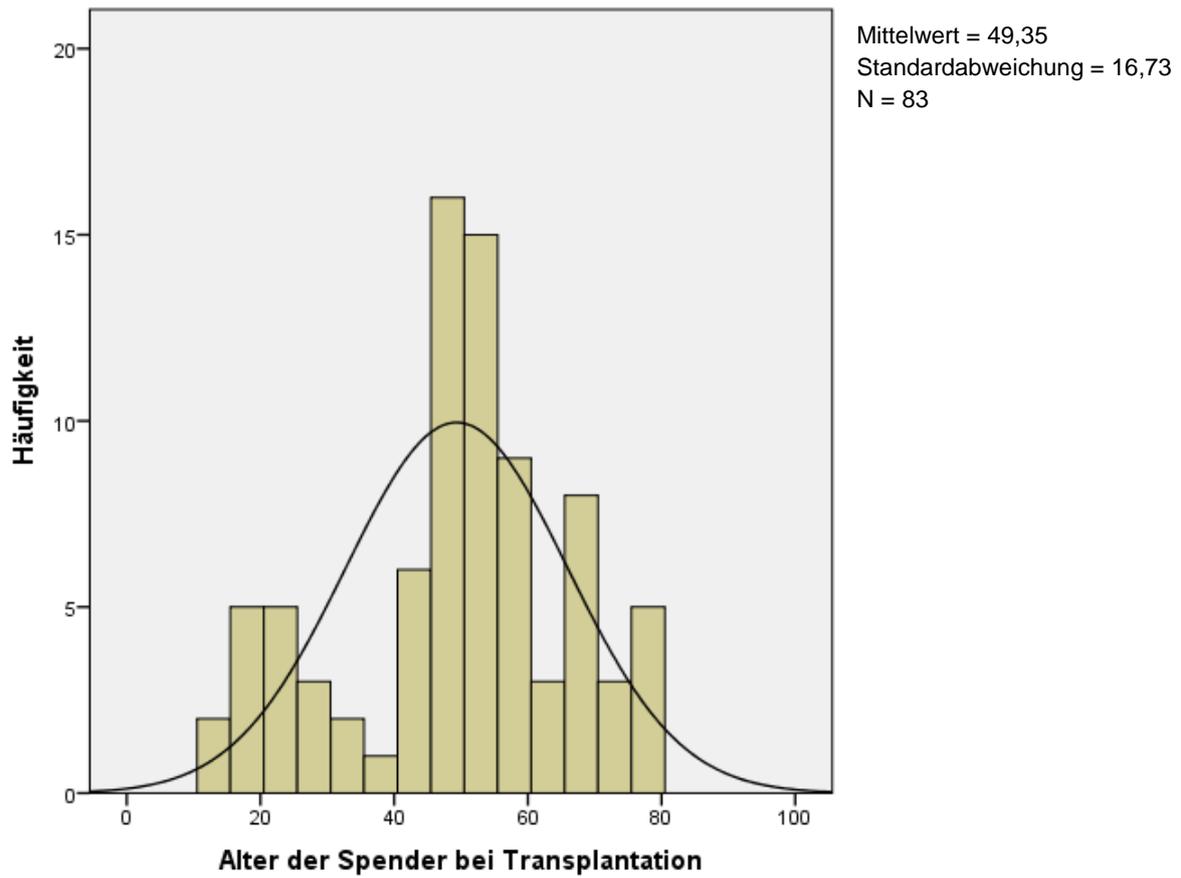


Abbildung 5: Altersverteilung der Spender

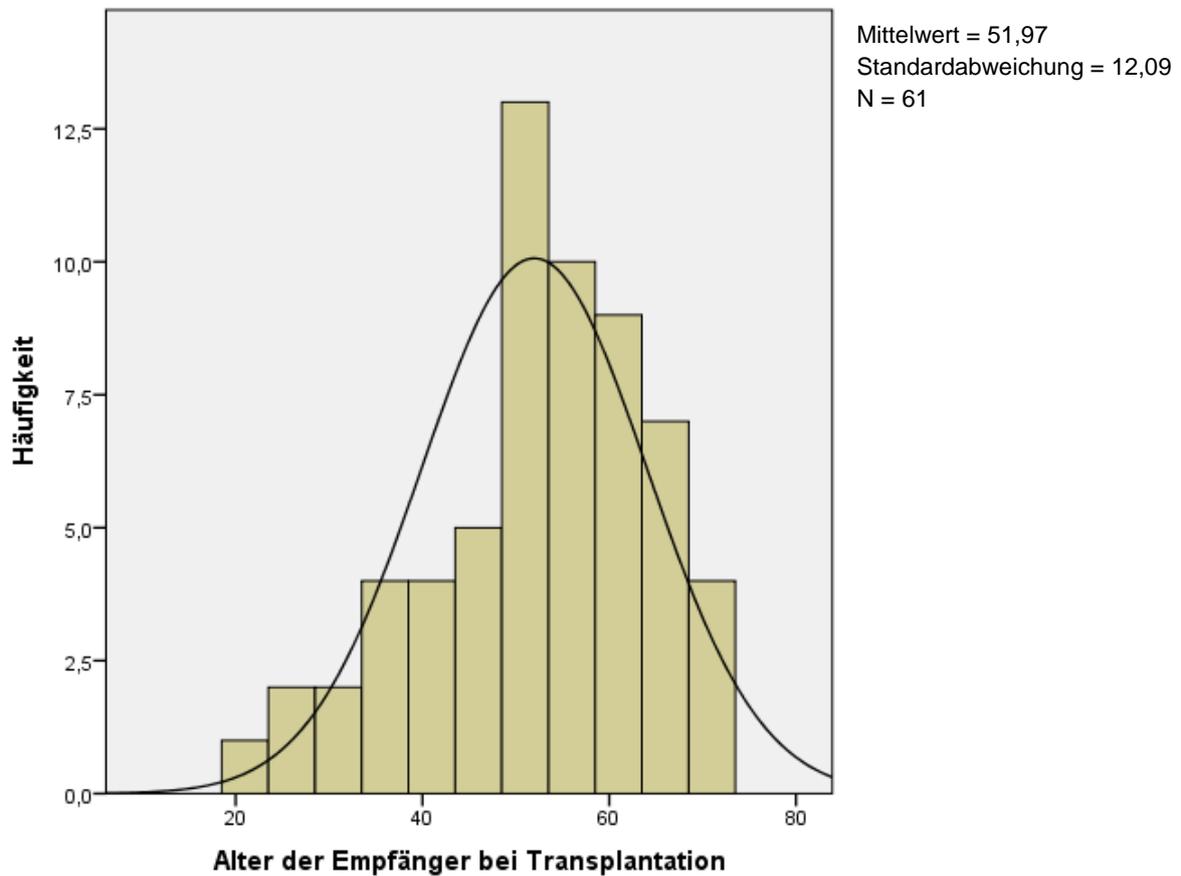


Abbildung 6: Altersverteilung der Empfänger

In Alterstertile unterteilt zeigten das gesamte Probandenkollektiv, sowie das Kollektiv der Spender beziehungsweise Empfänger ein ähnliches Bild. Im gesamten Probandenkollektiv lagen die Grenzen bei 47 und 57 Jahren, bei den Spendern bei 47 und 56 Jahren und bei den Empfängern bei 49 und 58 Jahren.

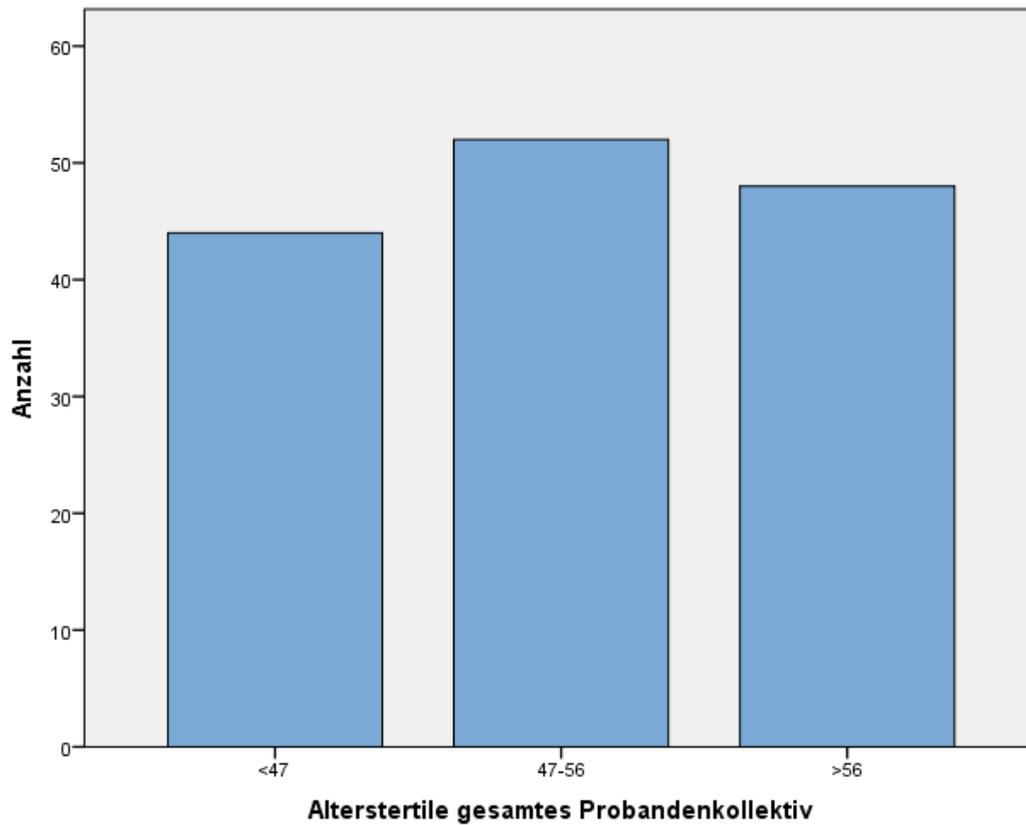


Abbildung 7: Säulendiagramm Alterstertile gesamtes Kollektiv

Der Altersmittelwert beträgt 50,46 Jahre. Die erste Tertile (33,3%) ist bis 47 Jahre, die zweite (66,6%) bis 56,67.

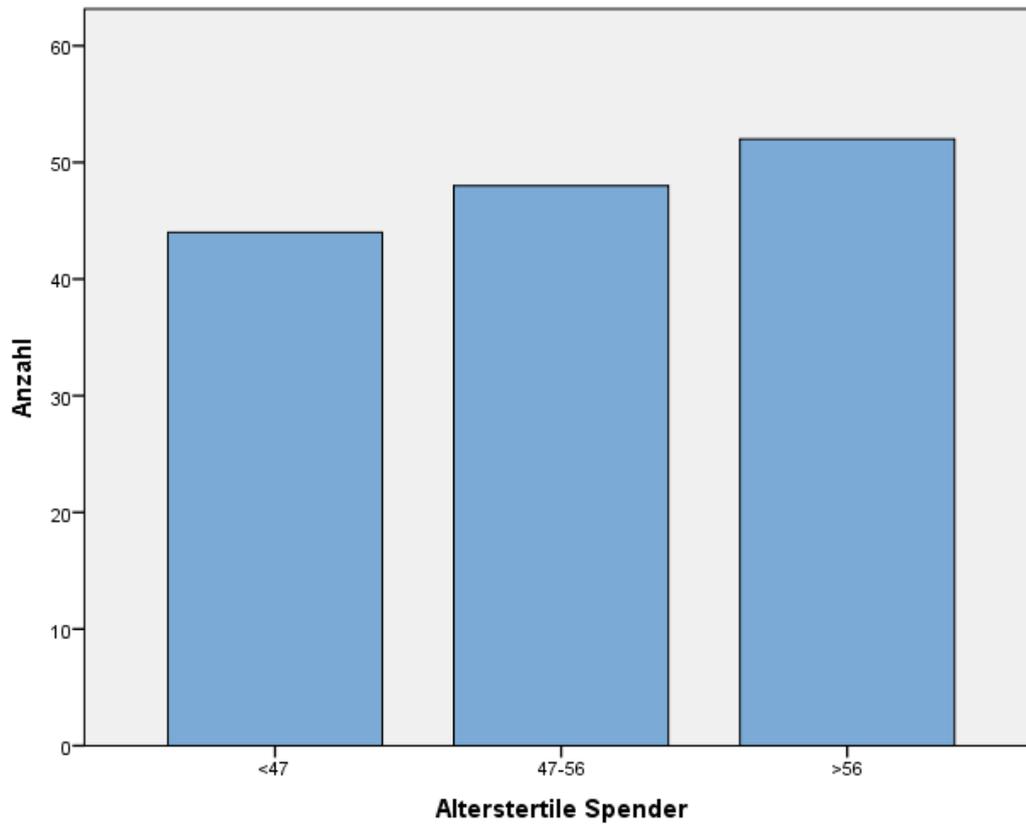


Abbildung 8: Säulendiagramm Alterstertile Spender

Der Altersmittelwert beträgt 49,35 Jahre. Die erste Tertile (33,3%) ist bis 47 Jahre, die zweite (66,6%) bis 56.

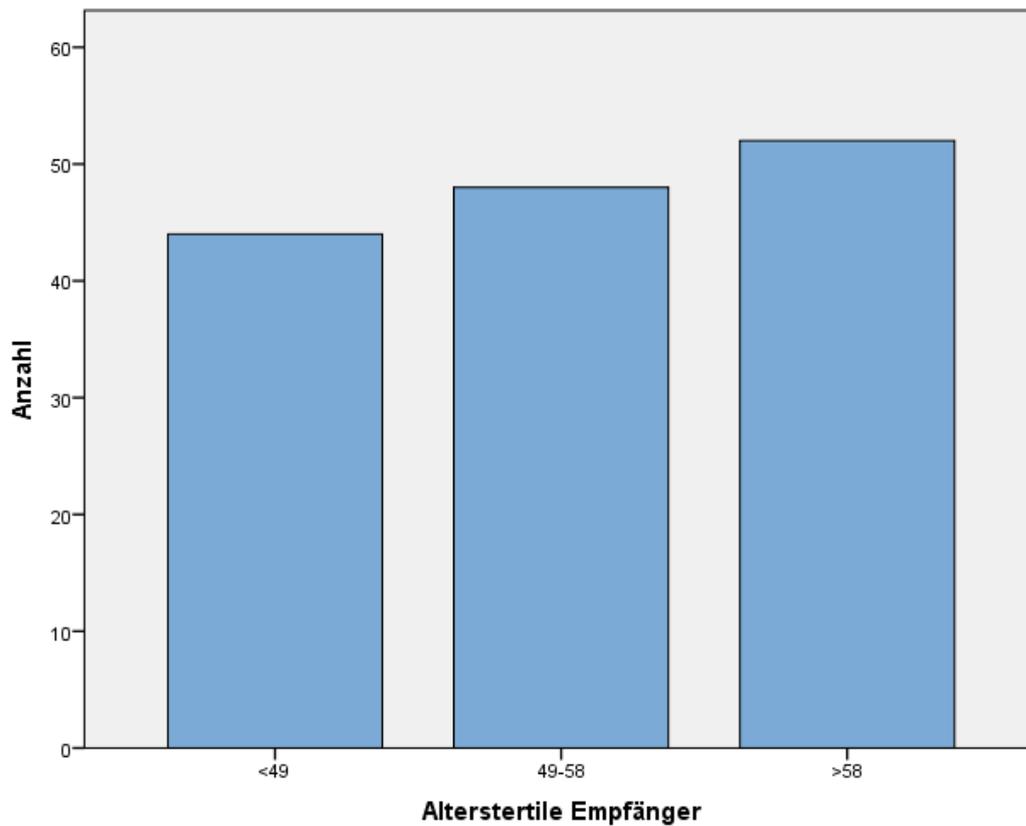


Abbildung 9: Säulendiagramm Alterstertile Empfänger

Der Altersmittelwert beträgt 51,97 Jahre. Die erste Tertile (33,3%) ist bis 49 Jahre, die zweite (66,6%) bis 58.

Es wurde die Häufigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus untersucht. Im gesamten Probandenkollektiv hatten 40,3% keinen Risikofaktor, 51,4% hatten einen und 8,3% hatten zwei.

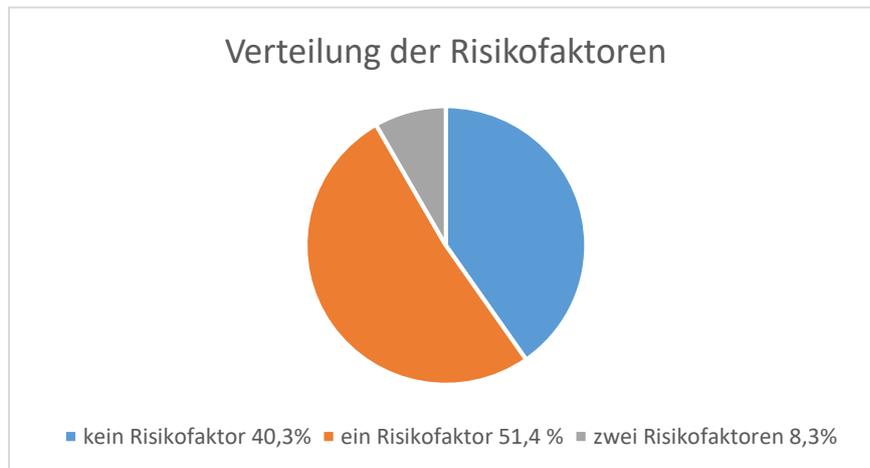


Abbildung 10: Verteilung der Risikofaktoren im Gesamtkollektiv

Hypertoniker waren 56,9%, bei den Spendern waren es 31,3%, bei den Empfängern 91,8%. An Diabetes mellitus litten 11,1%, 6% der Spender waren an Diabetes mellitus erkrankt und 18 % der Empfänger.

4.2 Bivariate Korrelationen

4.2.1 Zusammenhang zwischen Alter und Arteriosklerosegrad

Als erstes wurde der Zusammenhang zwischen Probandenalter und der Ausprägung von Arteriosklerose im arteriellen Gefäß untersucht. Dies geschah einerseits für das gesamte Probandenkollektiv, andererseits wurden auch Untergruppen wie Spender/Empfänger, Hypertoniker/nicht Hypertoniker und Diabetiker/ nicht Diabetiker gebildet.

Im gesamten Kollektiv zeigt sich eine signifikant positive Korrelation nach Spearman zwischen Alter und dem Arteriosklerosegrad ($r_s=0,222$ $p=0,008$).

In den Untergruppen gab es signifikant positive Korrelationen mit der Ausprägung der Arteriosklerose im arteriellen Gefäß bei den Spendern ($r_s=0,387$ $p=0,000$) und bei den Probanden ohne Hypertonie ($r_s=0,482$ $p=0,000$) und ohne Diabetes mellitus ($r_s=0,254$ $p=0,004$).

Das heißt im gesamten Kollektiv und besonders in den genannten Untergruppen wird die Ausprägung der Arteriosklerose mit zunehmendem Alter stärker.

Bei den restlichen Untergruppen (Empfänger, Hypertoniker, Diabetiker) konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Tabelle 5: Korrelation zwischen Alter und Arteriosklerosegrad;

Korrelationskoeffizient nach Spearman = r_s ; Signifikanzwert = p ; wenn Schrift fett und kursiv, dann $p < 0,05$ und $r_s > 0,2$ oder $< -0,2$

Patientenalter Probandengruppe	Korrelation mit Arteriosklerosegrad	P Wert
alle (n=144)	$r_s=0,222$	$p=0,008$
Spender (n=83)	$r_s=0,387$	$p<0,001$
Empfänger (n=61)	$r_s<0,001$	$p=0,999$
Hypertoniker (n=82)	$r_s=-0,002$	$p=0,984$
keine Hypertonie(n=62)	$r_s=0,482$	$P<0,001$
Diabetiker(n=16)	$r_s=-0,112$	$p=0,680$
kein D. m. (n=128)	$r_s=0,254$	$p=0,004$

4.2.2 Zusammenhang zwischen Alter und Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig im arteriellen Gefäß

Danach wurde der Zusammenhang zwischen Patientenalter und dem Ausmaß der immunhistochemischen Färbung betrachtet. Es wurden die gleichen Probanden-Untergruppen wie in Kapitel 4.2.1 gebildet: Empfänger, Spender, Hypertoniker, keine Hypertonie, Diabetiker, kein Diabetes Mellitus.

Hier ergab sich eine signifikante negative Korrelation zwischen Spenderalter und Färbung ($r_s=-0,303$ $p=0,005$) und in der Gruppe der Patienten ohne arterielle Hypertonie ($r_s=-0,270$ $p=0,034$).

Es ist also festzuhalten, dass in diesen beiden Untergruppen mit zunehmendem Patientenalter das Vorhandensein von Mig abnimmt.

Bei der Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs war das Ergebnis zwar signifikant, der Korrelationskoeffizient jedoch größer – 0,2 ($r_s=-0,191$ $p=0,022$), ebenso verhielt es sich in der Gruppe der Personen, die nicht an Diabetes mellitus litten ($r_s=-0,183$ $p=0,039$)

In den übrigen Untergruppen gab es keine signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 6: Korrelation Patientenalter mit Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig im Gefäß

Korrelationskoeffizient nach Spearman = rs; Signifikanzwert = p; wenn Schrift fett und kursiv, dann $p < 0,05$ und rs $> 0,2$ oder $< -0,2$

Patientenalter Probandengruppe	Korrelation mit Färbung Mig	P Wert
alle (n=144)	rs=-0,191	p=0,022
Spender (n=83)	rs=-0,303	p=0,005
Empfänger (n=61)	rs=-0,043	p=0,740
Hypertoniker (n= 82)	rs=-0,167	p=0,134
keine Hypertonie (n=62)	rs=-0,270	p=0,034
Diabetiker (n=16)	rs=0	p=1
keine Diabetiker (n=128)	rs=-0,183	p=0,039

4.2.3 Zusammenhang zwischen Ausprägung der Arteriosklerose und dem Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig im arteriellen Gefäß

Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern die Ausprägung von Arteriosklerose mit dem Ausmaß der immunhistochemischen Färbung im selben Gefäß korreliert. Dafür wurde der Arteriosklerosegrad in drei Untergruppen folgendermaßen aufgeteilt: geringe Ausprägung (0 und 1), mittlere Ausprägung (2 und 3), hohe Ausprägung (4 und 5).

Tabelle 7: Gebildete Gruppierungen des Arteriosklerosegrads

Bezeichnung in der Korrelationstabelle	Bedeutung für das arterielle Gefäß	Zusammengefasste Arteriosklerosegrade
niedrig	Kein oder nur minimaler atherosklerotischer Umbau	0 und 1
mittel	Geringer oder mäßiger atherosklerotischer Umbau	2 und 3
hoch	Mittelgradiger und starker atherosklerotischer Umbau	4 und 5

Dies wurde für das gesamte Patientenkollektiv und für Spender beziehungsweise Empfänger, Hypertoniker und Patienten ohne Hypertonie und Diabetiker und Patienten ohne Diabetes mellitus durchgeführt. Bei diesen Betrachtungen wurde kein statistisch signifikantes Ergebnis gefunden.

Tabelle 8: Korrelation zwischen Ausprägung der Arteriosklerose und Ausmaß der Färbung von Mig;

Korrelationskoeffizient nach Spearman = r_s ; Signifikanzwert = p ; wenn Schrift fett und kursiv, dann $p < 0,05$ und $r_s > 0,2$ oder $< -0,2$

Arteriosklerosegrad in Gruppen	Probandengruppe	Korrelation mit Ausmaß Färbung Mig	P Wert
Alle Gruppen	Alle (n=144)	$r_s = -0,083$	$p = 0,322$
Alle Gruppen	Spender (n=83)	$r_s = -0,152$	$p = 0,171$
Alle Gruppen	Empfänger (n=61)	$r_s = -0,001$	$p = 0,995$
Alle Gruppen	Hypertoniker (n=82)	$r_s = -0,024$	$p = 0,832$
Alle Gruppen	keine Hypertonie (n=62)	$r_s = -0,179$	$p = 0,164$
Alle Gruppen	Diabetiker (n=16)	$r_s = -0,136$	$p = 0,617$
Alle Gruppen	kein Diabetes (n=128)	$r_s = -0,069$	$p = 0,440$
Niedrig	alle (n=47)	$r_s = 0,126$	$p = 0,399$
Niedrig	Spender (n=22)	$r_s = 0,243$	$p = 0,275$
Niedrig	Empfänger (n=25)	$r_s = 0,069$	$p = 0,742$
Niedrig	Hypertoniker (n=29)	$r_s = 0,049$	$p = 0,803$
Niedrig	keine Hypertonie (n=18)	$r_s = 0,356$	$p = 0,147$
Niedrig	Diabetiker (n=5)	$r_s < 0,001$	$p = 1,000$
Niedrig	kein Diabetes (n=42)	$r_s = 0,173$	$p = 0,275$
Mittel	alle (n=74)	$r_s = -0,087$	$p = 0,462$
Mittel	Spender (n=47)	$r_s = -0,178$	$p = 0,232$
Mittel	Empfänger (n=27)	$r_s = -0,106$	$p = 0,598$
Mittel	Hypertoniker (n=39)	$r_s = 0,088$	$p = 0,593$
Mittel	keine Hypertonie (n=35)	$r_s = -0,189$	$p = 0,277$
Mittel	Diabetiker (n=6)	$r_s = 0,548$	$p = 0,261$
Mittel	kein Diabetes (n=68)	$r_s = -0,151$	$p = 0,220$
Hoch	alle (n=23)	$r_s = 0,063$	$p = 0,774$
Hoch	Spender (n=14)	$r_s = 0,132$	$p = 0,653$
Hoch	Empfänger (n=9)	$r_s = -0,192$	$p = 0,621$
Hoch	Hypertoniker (n=14)	$r_s = 0,295$	$p = 0,306$
Hoch	keine Hypertonie (n=9)	$r_s = -0,106$	$p = 0,786$
Hoch	Diabetiker (n=5)	$r_s < 0,001$	$p = 1,000$
Hoch	kein Diabetes (n=18)	$r_s = 0,158$	$p = 0,532$

4.2.4 Korrelation Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig im arteriellen Gefäß mit der Ausprägung der Arteriosklerose im Gefäß

Gleichermaßen wie bei 4.2.3 wurde anschließend das Ausmaß der Färbung von Mig in Untergruppen aufgeteilt und mit der Ausprägung der Arteriosklerose korreliert. Es wurde eine Gruppe mit sehr wenig Färbung (0 und 0,5), eine mittlere Gruppe (1 und 1,5) und eine Gruppe mit starker Färbung (2, 2,5 und 3) gebildet.

Tabelle 9: Gebildete Gruppierungen des Färbegrades

Bezeichnung in der Korrelationstabelle	Bedeutung	Zusammengefasste Kategorien des Ausmaßes der Färbung
Kaum Färbung	Keine/ kaum braun gefärbte Areale der Tunica media	0 und 0,5
Wenig Färbung	wenig braun gefärbte Areale der Tunica media	1 und 1,5
Viel Färbung	30% und mehr der Tunica Media sind braun gefärbt	2, 2,5 und 3

Der Zusammenhang wurde wie im vorherigen Kapitel für das gesamte Probandenkollektiv und für nur Spender beziehungsweise nur Empfänger, für Hypertoniker und Probanden ohne Hypertonie und Diabetiker und Probanden ohne Diabetes geprüft.

Nur in der Gruppe von ≥ 2 , das heißt die Gruppe, in der sich die Biopsien mit deutlicher Färbung befanden, konnten statistisch signifikante Korrelationen gefunden werden:

Zum einen bestand ein negativer Zusammenhang zwischen einem hohen Ausmaß der Färbung und dem Arteriosklerosegrad beim gesamten Patientenkollektiv ($r_s = -0,345$ $p = 0,005$). Das heißt, wies das Gefäß eine stärkere Färbung auf, war der Arteriosklerosegrad eher geringer.

Auch in der Gruppe der Spender konnte ein ähnlicher negativer Zusammenhang festgestellt werden ($r_s = -0,344$ $p = 0,046$).

Ebenso war es bei den Hypertonikern ($r_s = -0,395$ $p = 0,009$) und bei den Patienten ohne Diabetes mellitus ($r_s = -0,372$ $p = 0,004$).

Bei den Empfängern war der Korrelationskoeffizient nach Spearman von $-0,343$ bei einem p-Wert von $0,063$ nicht signifikant.

In allen anderen gebildeten Gruppen wurde kein signifikantes Ergebnis gefunden.

Tabelle 10: Korrelation zwischen Ausmaß der Färbung von Mig und der Ausprägung von Arteriosklerose im Gefäß;

Korrelationskoeffizient nach Spearman = rs; Signifikanzwert = p; wenn Schrift fett und kursiv, dann $p < 0,05$ und $r > 0,2$ oder $< -0,2$

Ausmaß Färbung Mig	Probandengruppe	Korrelation mit Arteriosklerosegrad	P Wert
Alle Gruppen	Alle (n=144)	rs=-0,083	p=0,322
Alle Gruppen	Spender (n=83)	rs=-0,152	p=0,171
Alle Gruppen	Empfänger (n=61)	rs=-0,001	p=0,995
Alle Gruppen	Hypertoniker (n=82)	rs=-0,024	p=0,832
Alle Gruppen	keine Hypertonie (n=62)	rs=-0,179	p=0,164
Alle Gruppen	Diabetiker (n=16)	rs=-0,136	p=0,617
Alle Gruppen	kein Diabetes (n=128)	rs=-0,069	p=0,440
Kaum Färbung	alle (n=34)	rs=0,082	p=0,646
Kaum Färbung	Spender (n=23)	rs=-0,007	p=0,975
Kaum Färbung	Empfänger (n=11)	rs=-0,076	p=0,825
Kaum Färbung	Hypertoniker (n=15)	rs=0,104	p=0,713
Kaum Färbung	keine Hypertonie (n=19)	rs=-0,040	p=0,871
Kaum Färbung	Diabetiker (n=7)	rs=-0,244	p=0,598
Kaum Färbung	kein Diabetes (n=27)	rs=0,200	p=0,316
Wenig Färbung	alle (n=46)	rs=-0,142	p=0,347
Wenig Färbung	Spender (n=26)	rs=-0,107	p=0,101
Wenig Färbung	Empfänger (n=20)	rs=-0,177	p=0,454
Wenig Färbung	Hypertoniker (n=24)	rs=-0,144	p=0,502
Wenig Färbung	keine Hypertonie (n=22)	rs=-0,119	p=0,596
Wenig Färbung	Diabetiker (n=4)	<i>konnte nicht berechnet werden</i>	
Wenig Färbung	kein Diabetes (n=42)	rs=-0,143	p=0,367
Viel Färbung	alle (n=64)	<i>rs=-0,345</i>	<i>p=0,005</i>
Viel Färbung	Spender (n=34)	<i>rs=-0,344</i>	<i>p=0,046</i>
Viel Färbung	Empfänger (n=30)	rs=-0,343	p=0,063
Viel Färbung	Hypertoniker (n=43)	<i>rs=-0,395</i>	<i>p=0,009</i>
Viel Färbung	keine Hypertonie (n=21)	rs=-0,210	p=0,360
Viel Färbung	Diabetiker (n=5)	<i>konnte nicht berechnet werden</i>	
Viel Färbung	kein Diabetes (n=59)	<i>rs=-0,372</i>	<i>p=0,004</i>

4.2.5 Zusammenhang zwischen Ausprägung der Arteriosklerose und dem Probandenalter

Die gleichen Gruppen wie in Tabelle 7 in Kapitel 4.2.3 dargestellt, wurden mit dem Probandenalter der jeweiligen Gruppe korreliert.

Hier ergab sich eine positive Korrelation zwischen mittlerer Ausprägung der Arteriosklerose (2,3) und Alter bei Untersuchung des gesamten Kollektivs ($r_s=0,280$ $p=0,015$) und bei den Spendern ($r_s=0,421$ $p=0,003$).

In den anderen Untergruppen konnten keine signifikanten Korrelationen gefunden werden.

Tabelle 11: Korrelation zwischen Ausprägung der Arteriosklerose und dem Patientenalter;

Korrelationskoeffizient nach Spearman = r_s ; Signifikanzwert = p ; wenn Schrift fett und kursiv, dann $p < 0,05$ und $r_s > 0,2$ oder $< -0,2$

Arteriosklerosegrad	Probandengruppe	Korrelation mit Patientenalter	P Wert
Alle Gruppen	alle (n=144)	$r_s=0,222$	$p=0,008$
Alle Gruppen	Spender (n=83)	$r_s=0,387$	$P < 0,001$
Alle Gruppen	Empfänger (n=61)	$R_s < 0,001$	$p=0,999$
Niedrig	alle (n=47)	$r_s=0,071$	$p=0,634$
Niedrig	Spender (n=22)	$r_s=0,258$	$p=0,246$
Niedrig	Empfänger (n=25)	$r_s=-0,114$	$p=0,589$
Mittel	alle (n=74)	$r_s=0,280$	$p=0,015$
Mittel	Spender (n=40)	$r_s=0,421$	$p=0,003$
Mittel	Empfänger (n=27)	$r_s=0,011$	$p=0,955$
Hoch	alle (n=23)	$r_s=-0,055$	$p=0,802$
Hoch	Spender (n=14)	$r_s=-0,038$	$p=0,899$
Hoch	Empfänger (n=9)	$r_s=-0,458$	$p=0,215$

4.2.6 Zusammenhang zwischen Risikofaktoren und dem Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig

Zuletzt wurde noch der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein/ Nichtvorhandensein von arterieller Hypertonie beziehungsweise von Diabetes mellitus und dem Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig im arteriellen Gefäß untersucht.

Hier ergaben sich zwar statistisch signifikante Ergebnisse, allerdings blieb der Korrelationskoeffizient bei den Hypertonikern unter 0,2 ($r_s=0,187$ $p=0,024$), somit konnte von keiner Korrelation gesprochen werden.

Beim Faktor Diabetes bestand eine signifikante negative Korrelation, das heißt Diabetiker hatten weniger Mig im Gefäß als Probanden ohne Diabetes mellitus.

Tabelle 12: Korrelation zwischen Risikofaktor ja/nein und dem Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig;

Korrelationskoeffizient nach Spearman = r_s ; Signifikanzwert = p ; wenn Schrift fett und kursiv, dann $p < 0,05$ und $r_s > 0,2$ oder $< -0,2$

Risikofaktor ja/nein	Korrelation mit Ausmaß Färbung Mig	P Wert
Arterielle Hypertonie (1=ja, 0=nein) (n=144)	$r_s=0,187$	$p=0,024$
Diabetes mellitus (1=ja, 0=nein) (n=144)	$r_s= -0,200$	$p=0,016$

4.3 Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)

4.3.1 Einfaktorielle Varianzanalyse Probandenalter – Ausprägung der

Arteriosklerose

Für diesen Test wurde das Probandenkollektiv anhand des Alters in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Als Trennlinien wurden die Alterstertile genutzt, wie sie in Kapitel 4.1 gebildet und beschrieben wurden. Eine Gruppe bestand somit aus den Probanden, die jünger als 47 Jahre alt bei Probenentnahme waren, eine Gruppe bildeten die 47 bis 56 jährigen und die dritte Gruppe bestand aus den über 56 Jahre alten Probanden.

Tabelle 13: Gebildete Alters- Subgruppen anhand der Alterstertile

Unteres Alterstertil	Jünger als 47 Jahre
Mittleres Alterstertil	Zwischen 47 und einschließlich 56 Jahre alt
Oberes Alterstertil	Älter als 56 Jahre

Die einfaktorielle Varianzanalyse zwischen dem Faktor Altersgruppe und der abhängigen Variablen Ausprägung der Arteriosklerose (Arteriosklerosegrad) war signifikant ($p=0,019$).

Im Post hoc Test nach Bonferroni ergab sich ein signifikanter Mittelwertunterschied von 0,917 (SD: 0,323; $p=0,016$) zwischen der Gruppe der unter 47jährigen (Mittelwert von 1,50) und der Gruppe der über 56jährigen (Mittelwert von 2,42).

Das heißt, das Tertil der ältesten Patienten weist signifikant mehr Arteriosklerose im arteriellen Gefäß auf als das Tertil der jüngsten Patienten.

4.3.2 Einfaktorielle Varianzanalyse Probandenalter – Ausmaß der immunhistochemischen Anfärbung von Mig

Die einfaktorielle Varianzanalyse zwischen dem Faktor Altersgruppe (Gruppeneinteilung wie bei 4.3.1 beschrieben) und der abhängigen Variable Ausmaß der Färbung von Mig war nicht signifikant ($p=0,079$).

Der post hoc Test nach Bonferroni zeigte einen Mittelwertunterschied von 0,410 (SD: 0,1802) zwischen der Gruppe der unter 47jährigen, welche mehr Färbung hatten, und der Gruppe der über 56jährigen. Dieser Unterschied war bei einem p-Wert von 0,073 jedoch nicht signifikant.

4.3.3 Einfaktorielle Varianzanalyse: Gruppen Ausprägung der Arteriosklerose – Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig

Für diesen statistischen Test wurde die Variable Arteriosklerosegrad wie in Kapitel 4.2.3 in Untergruppen (dargestellt in Tabelle 7) eingeteilt.

Hierbei wurde nachgeprüft, ob es einen signifikanten Mittelwertunterschied bei der Färbung von Mig zwischen den unterschiedlich starken Ausprägungen der Arteriosklerose gab. Das Ergebnis war, dass dies nicht der Fall ist. ($p= 0,508$).

4.3.4 Einfaktorielle Varianzanalyse Gruppen Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig – Ausprägung der Arteriosklerose

Wie in der vorherigen Varianzanalyse wurden auch bei diesem Test schon vorher beschriebene Gruppen verwendet. In diesem Fall die gebildeten Untergruppen aus Kapitel 4.2.4 der Färbung von Mig (siehe auch Tabelle 9).

Es wurde untersucht, ob sich die Mittelwerte des Arteriosklerosegrads innerhalb dieser Gruppen signifikant voneinander unterscheiden. Auch in diesem Fall war das Ergebnis nicht statistisch signifikant ($p= 0,836$).

4.4 T-Test für unabhängige Stichproben

4.4.1 T-Test für unabhängige Stichproben mit Gruppierungsvariable Alter und Testvariable Arteriosklerosegrad

Zunächst wurde im T-Test untersucht, ob es einen signifikanten Mittelwertunterschied des Arteriosklerosegrads zwischen verschiedenen Altersgruppen gibt. Als Trennwerte wurden zum einen der Altersmittelwert genommen, zum anderen die Alterstertile. Diese Betrachtungen wurden für das gesamte Patientenkollektiv sowie für Spender und Empfänger durchgeführt.

Tabella 14: Einteilung des gesamten Probandenkollektivs sowie von Spender und Empfänger in Alterstertile

	Gesamtes Probandenkollektiv	Spender	Empfänger
Unteres Alterstertil	Jünger als 47 Jahre	Jünger als 47 Jahre	Jünger als 49 Jahre
Mittleres Alterstertil	Zwischen 47 und 56 Jahre alt	Zwischen 47 und 56 Jahre alt	Zwischen 49 und 58 Jahre alt
Oberes Alterstertil	Älter als 56 Jahre	Älter als 56 Jahre	Älter als 58 Jahre
Altersmittelwert	50 Jahre	49 Jahre	52 Jahre

4.4.1.1 Betrachtung des gesamten Probandenkollektivs

Im gesamten Probandenkollektiv ergab sich ein signifikanter Mittelwertunterschied nur bei einem Trennwert von 56 Jahren. Der p- Wert betrug 0,034, die Mittelwertdifferenz 0,579 (SD: 0,271). Das bedeutet, dass der Arteriosklerosegrad des oberen Alterstertil signifikant höher ist als der der beiden unteren Alterstertile.

4.4.1.2 Betrachtung der Spender

Bei den Spendern konnten signifikante Mittelwertunterschiede bei einem Trennwert von 49 Jahren (Altersmittelwert) und einem Trennwert von 47 Jahren (unteres Alterstertil gegen obere zwei Alterstertile) gefunden werden.

Beim Altersmittelwert betrug der p- Wert 0,014 und die Mittelwertdifferenz 0,836 (SD: 0,334).

Beim Trennwert von 47 Jahren war der p-Wert gleich 0,005 und die Differenz betrug 1,112 (SD: 0,384).

Bei einem Trennwert von 56 Jahren war die Mittelwertdifferenz von 0,700 (SD: 0,386) bei

einem p-Wert von 0,074 nicht signifikant.

Auch hier ist also festzuhalten, dass sowohl beim Altersmittelwert als auch bei einer Trennung zwischen unterem Altersdrittel und oberen zwei Altersdrittel der Arteriosklerosegrad bei den älteren Altersgruppen signifikant höher ist als bei den jüngeren Gruppen.

4.4.1.3 *Betrachtung der Empfänger*

In der Gruppe der Empfänger waren keine signifikanten Mittelwertunterschiede festzustellen.

4.4.2 T-Test für unverbundene Stichproben mit Gruppierungsvariable Alter und Testvariable Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig

Ähnlich wie in Kapitel 4.4.1 wurden nun die Mittelwertunterschiede von der Färbung von Mig in den verschiedenen Altersgruppen (s. Tabelle 14, Kapitel 4.4.1) überprüft. Dies geschah wieder für das gesamte Probandenkollektiv sowie für Spender beziehungsweise für Empfänger.

4.4.2.1 *Betrachtung des gesamten Probandenkollektivs*

Im gesamten Probandenkollektiv war der Mittelwertunterschied bei einem Trennwert von 50 Jahren (Altersmittelwert) und einem Trennwert von 47 Jahren statistisch signifikant.

Die Mittelwertdifferenz bei 50 Jahren betrug -0,4653 (Standardabweichung 0,1436) mit einem p-Wert von 0,001. Die Differenz ist deshalb negativ, da die Gruppe mit dem höheren Altersdurchschnitt (älter als oder gleich 50 Jahre) einen geringeren Färbegrad (1,267) vorweist als die Gruppe mit dem niedrigeren Altersschnitt (jünger als 50 Jahre; Färbegrad: 1,733).

Ebenso verhält es sich mit der Gruppierung über/gleich 47 und unter 47 Jahren (Mittelwertdifferenz: -0,3105 Standardabweichung: 0,1563 p=0,049) und der Gruppierung über/gleich 56 Jahre und unter 56 Jahre (Mittelwertdifferenz: -0,3207 Standardabweichung: 0,1496 p=0,034).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die untersuchten Gefäße der unter 47-jährigen bzw. der unter 50-jährigen und der unter 56-jährigen signifikant mehr Mig aufwiesen als die der älteren Probanden.

4.4.2.2 *Betrachtung der Spender*

Bei den Spendern ergab sich ein signifikanter Mittelwertunterschied in allen drei Gruppierungen. Bei der Aufteilung jünger und älter als der Altersmittelwert 49 Jahre zeigte sich eine Differenz von -0,7172 (SD: 0,1752). Der p- Wert war 0,000.

Beim Trennwert 47 Jahre wurde ein Mittelwertunterschied von -0,5265 (SD: 0,1950) mit einem p- Wert von 0,008 gefunden.

Die Gruppierung untere zwei Altersdrittel gegen oberes Altersdrittel (Trennwert 56 Jahre) zeigte eine signifikante Mittelwertdifferenz von -0,4740 (SD: 0,1947; p=0,017).

Auch im Kollektiv der Spender war das Ausmaß der immunhistochemischen Färbung in den untersuchten arteriellen Gefäßen also in jüngeren Jahren größer als bei älteren Patienten.

4.4.2.3 *Betrachtung der Empfänger*

In der Gruppe der Empfänger zeigten sich keine signifikanten Mittelwertunterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

4.4.3 T-Test für unverbundene Stichproben mit Gruppierungsvariable Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig und Testvariable Arteriosklerosegrad

Ähnlich wie bei der einfaktoriellen Varianzanalyse wurden nun auch im T-Test Gruppen von der Variablen Färbung von Mig gebildet. Einmal mit dem Trennwert 1, das heißt in einer Gruppe waren alle Patienten, deren Gefäßschnitte keine oder nur sehr wenig Färbung aufgewiesen haben, in der anderen Gruppe waren die Patienten, bei denen definitiv Abschnitte angefärbt waren. Zwischen diesen beiden Gruppen gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied bei der Ausprägung der Arteriosklerose.

Anders verhielt es sich beim Trennwert 2,1. Eine Gruppe wurde also aus den Patienten gebildet, bei denen sehr große Teile des Gefäßes angefärbt worden waren, die andere

Gruppe bestand aus Patienten mit keiner, wenig oder mittlerer Färbung. Hier wurde ein Mittelwertunterschied von -0,835 (Standardabweichung: 0,341) mit einem p-Wert von 0,016 gefunden.

Das bedeutet, dass die Gruppe mit deutlicher Färbung (2,5 und 3) signifikant weniger stark ausgeprägte Arteriosklerose im Gefäß hatte als die andere Gruppe.

4.4.4 T-Test für unverbundene Stichproben mit Gruppierungsvariable

Spender/Empfänger und Testvariable Arteriosklerosegrad

Außerdem wurde überprüft, ob es signifikante Mittelwertunterschiede bei der Ausprägung der Arteriosklerose zwischen Spender und Empfänger gab. Dies wurde einerseits für alle Altersgruppen gemeinsam und andererseits für jede Altersgruppe einzeln durchgeführt.

In den Gruppen gesamtes Probandenkollektiv, Probanden unter 47 Jahre und Probanden über 56 Jahre konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

In der Gruppe der 47 bis 56-Jährigen war es jedoch so, dass bei den Spendern der Mittelwert um 0,830 (Standardabweichung: 0,403) höher war als bei den Empfängern ($p=0,045$). Gefäße der Spender dieser Altersgruppe wiesen also mehr atherosklerotischen Umbau auf als die der Empfänger.

4.4.5 T-Test für unverbundene Stichproben mit Gruppierungsvariable

Spender/Empfänger und Testvariable Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig

Wie im vorherigen Kapitel wurde überprüft, ob es signifikante Mittelwertunterschiede zwischen Spender und Empfänger gab, dieses Mal jedoch für die Testvariable Ausmaß der Färbung von Mig. Auch hier wurde zuerst das gesamte Kollektiv überprüft und anschließend in Altersgruppen aufgeteilt.

Jedoch konnte in keiner der gebildeten Gruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

In der Altersgruppe 57 Jahre und älter betrug die Mittelwertdifferenz 0,3958 (der Mig Wert war bei den Spendern niedriger als bei den Empfängern) mit einer Standardabweichung von 0,2336 und einem p Wert von 0,097.

4.4.6 T- Test für unverbundene Stichproben mit Gruppierungsvariable Risikofaktor (ja/nein) und Testvariable Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig

Zuletzt wurde untersucht, ob ein Mittelwertunterschied bei dem Ausmaß der Färbung von Mig zwischen Patienten mit einem bestimmten Risikofaktor und Patienten ohne diesen Risikofaktor bestand.

4.4.6.1 *Risikofaktor Arterielle Hypertonie*

Für den Risikofaktor Arterielle Hypertonie ergab sich eine Mittelwertdifferenz von 0,3463 mit einer Standardabweichung von 0,1440 und einem p- Wert von 0,018. Die Gruppe der Proben der Probanden mit arterieller Hypertonie hatte also ein signifikant größeres Ausmaß an Mig-Färbung als bei Probanden ohne Bluthochdruck.

4.4.6.2 *Risikofaktor Diabetes mellitus*

Bei der Gruppe der Proben der Probanden mit Diabetes mellitus im Vergleich zu denen von Probanden ohne Diabetes mellitus zeigte sich ein konträres Bild. Der Mittelwertunterschied betrug -0,5714 mit einer Standardabweichung von 0,2273, der p- Wert 0,013. Hier wurde also festgestellt, dass Diabetiker signifikant weniger Färbung von Mig in ihren arteriellen Gefäßen aufzeigen als Nicht- Diabetiker.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die statistische Analyse der erhobenen Daten ergab, dass bei den untersuchten 144 Gefäßbiopsien von 129 Probanden eine positive Korrelation zwischen Alter und Ausprägung der Arteriosklerose im gesamten Kollektiv, sowie in den Subgruppen Spender, Probanden ohne Hypertonie und Probanden ohne Diabetes mellitus bestand. Auch in der einfaktoriellen Varianzanalyse ergab sich ein signifikanter Mittelwertunterschied zwischen dem jüngsten (jünger als 47 Jahre) und dem ältesten (älter als 57) Drittel. Der Arteriosklerosegrad war bei den älteren deutlich höher. Die gleiche Tendenz war bei der Bestimmung von Mittelwertunterschieden im T-Test festzustellen. Im gesamten Kollektiv sowie bei den Spendern ergaben sich signifikante Mittelwertunterschiede zwischen älteren und jüngeren Probanden.

Keine statistisch signifikante Korrelation bestand zwischen der Stärke der Ausprägung der Arteriosklerose und dem Ausmaß der immunhistochemischen Färbung des Chemokins Mig/Cxcl9. Dies galt für das gesamte Probandenkollektiv sowie für gebildete Subgruppen (Spender, Empfänger, Hypertoniker, Patienten ohne Hypertonie, Diabetiker, Patienten ohne Diabetes). Auch in der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte kein signifikanter Unterschied beim Ausmaß der Färbung zwischen Gruppen mit unterschiedlich starken Ausprägungen in der Arteriosklerose gefunden werden.

Bei der Betrachtung, ob ein Zusammenhang zwischen starker beziehungsweise schwacher Färbung und dem Ausmaß der Arteriosklerose bestand, wurde im gesamten Kollektiv sowie in den Subgruppen Spender, Hypertoniker und Patienten ohne Diabetes ein negativer Zusammenhang zwischen großem Ausmaß der Färbung und dem Arteriosklerosegrad festgestellt. Wenn also große Teile des Gefäßes gefärbt worden waren, war der arteriosklerotische Umbau eher gering. Dies bestätigte sich auch im T-Test, im gesamten Kollektiv war bei einem Trennwert von 2,1 der Mittelwert des Arteriosklerosegrads bei den

Biopsien mit der geringeren Färbung signifikant höher als bei denen mit ausgeprägter Färbung.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in den Subgruppen Spender und Probanden ohne Hypertonie ein höherer Färbegrad mit niedrigerem Patientenalter zusammenhing.

Ähnliches ergab sich auch im T-Test, beim gesamten Patientenkollektiv war der Färbemittelwert der jüngeren Hälfte (unter 50 Jahren) deutlich höher als der der älteren Hälfte.

Zuletzt konnte noch gezeigt werden, dass es deutliche Mittelwertunterschiede beim Ausmaß der immunhistochemischen Färbung zwischen Probanden mit und ohne Risikofaktor gab.

Hypertoniker hatten deutlich mehr Mig im Gefäß als Probanden ohne Hypertonie. Im

Gegensatz dazu konnte bei Diabetikern signifikant weniger Färbung festgestellt werden als bei Probanden ohne Diabetes.

5.2 Atherosklerose und Alter

Die statistische Auswertung ergab, dass ein höheres Lebensalter mit ausgeprägteren atherosklerotischen Läsionen einhergeht, ebenso wie Gefäße jüngerer Patienten weniger atherosklerotischen Umbau zeigen. Dieses Ergebnis konnte bei Untersuchungen des gesamten Patientenkollektivs festgestellt werden, besonders deutlich aber wurde es bei den Subgruppen Organspender, Patienten ohne arterielle Hypertonie und Patienten ohne Diabetes mellitus. Das heißt besonders die Patientengruppen mit weniger Komorbiditäten wiesen eine altersabhängige Vermehrung von Atherosklerose auf.

Das Ergebnis, dass atherosklerotische Läsionen mit steigendem Alter zunehmen, deckt sich mit den Resultaten vieler anderer Studien. So zeigten Velican und Velican bereits 1983 durch die Untersuchung von Koronararterien von bei Unfällen ums Leben gekommener Menschen zwischen 16 und 45 Jahren unter einem Lichtmikroskop, dass atherosklerotische Läsionen sich mit steigendem Alter vermehrten beziehungsweise vermehrt auftraten (Velican & Velican, 1983). Auch in Japan wurden von Okumiya, Tanaka, Ueda und Omae 1985 281 obduzierten Menschen im Alter von 40 Jahren und mehr die Koronararterien untersucht und festgestellt, dass es ein altersabhängiges Voranschreiten atherosklerotischer Läsionen gab. In diesem Fall wurde als Maß der Ausprägung das Ausmaß der luminalen Stenose

genommen (Okumiya, Tanaka, Ueda, & Omae, 1985). Zhdanov, Sternby, Vikhert und Galakhov untersuchten Biopsien der Aorta abdominalis von obduzierten Männern und konnten signifikante Unterschiede, die Verbreitung intimaler Läsionen betreffend, zwischen den Altersgruppen 40 bis 49 und 50 bis 59 Jahre feststellen (Zhdanov, Sternby, Vikhert, & Galakhov, 1999). Auch Studien, die mit Hilfe von B- Mode Ultraschall atherosklerotische Läsionen in den Karotiden untersuchten, konnten einen positiven Zusammenhang zwischen Patientenalter und Ausmaß der Atherosklerose nachweisen (Ebrahim et al., 1999; Hillen et al., 2000; Prati et al., 1992). Tribouilloy et al konnten mit Hilfe transösophagealer Echokardiografie (TEE) zeigen, dass auch in der Aorta das Ausmaß von Arteriosklerose positiv mit dem Alter korreliert (Tribouilloy, Peltier, Andrejak, Rey, & Lesbre, 1998). Auch wenn in den genannten Veröffentlichungen meist Koronararterien und Karotiden und nicht Aorta, Iliakalgefäße und Nierenarterien untersucht wurden, sind sie dennoch ein Hinweis auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Untersuchungen. Dass die Korrelation in den Subgruppen Organspender, Patienten ohne Hypertonie und Patienten ohne Diabetes mellitus höher sind, könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Gruppen mehr einem Querschnitt durch alle Bevölkerungsgruppen entsprechen als multimorbide nephrologische Patienten, die mitunter schon Jahre dialysiert wurden. Somit sind besonders diese Untergruppen, aber auch die Gesamtheit des Kollektivs in dieser Dissertation durchaus mit anderen Studien vergleichbar, obwohl die Auswahl der Patienten scheinbar unwillkürlich, nur durch das Vorhandensein arterieller Gefäßbiopsien geschah.

5.3 Stat1/ Mig und Atherosklerose

Die Hypothese, dass ein weiter fortgeschrittener atherosklerotischer Umbau mit vermehrter Produktion von Mig einhergeht, konnte nicht bestätigt werden. Die statistische Auswertung ergab, dass in Gefäßen mit weniger ausgeprägter Atherosklerose Mig stärker exprimiert wird als in stark atherosklerotischen Gefäßen. In anderen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass in atherosklerotischen Plaques mehr Mig nachgewiesen werden konnte als in Kontrollen. So konnten (Sikorski et al., 2014) zeigen, dass in menschlichen Karotiden und Koronararterien verschiedene proinflammatorische Gene, darunter die von Mig, hochreguliert waren. Auch

(Mach et al., 1999) und (Chmielewski et al., 2014) zeigten mit Hilfe von Immunhistochemie, dass Mig auf mit dem atherosklerotischen Plaque assoziierten Zellen vermehrt exprimiert wird. Bezogen auf Stat1 wurde vor allem an Stat1 knock-out Mäusen und Mäusen/ Ratten, bei welchen Stat1 gehemmt wurde, demonstriert, dass atherosklerotischer Umbau auch Stat1 abhängig ist (siehe unter anderem (Agrawal et al., 2007; Lim et al., 2008; Torella et al., 2007)). Aufgrund dieser Erkenntnisse bestand die Vermutung, dass eine vermehrte Expressierung von Mig in direktem Zusammenhang mit weiter fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen gesehen werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten eher darauf hin, dass die vermehrte Expressierung von Mig, wenn sie im Zusammenhang mit Atherosklerose betrachtet wird, zu Beginn der Plaquebildung besteht und im weiteren Verlauf eher abnimmt.

Auch in den gebildeten Subgruppen konnte die Haupthypothese nicht bestätigt werden.

Signifikante Ergebnisse bei Spendern, Hypertonikern und Patienten ohne Diabetes mellitus zeigten die gleichen Tendenzen wie die Resultate im gesamten Patientenkollektiv.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann auch festgestellt werden, dass die Stat1 Aktivität, wenigstens was die Induktion von Mig betrifft, nicht im Verlauf der Pathogenese der Atherosklerose zunimmt.

Ein Grund dafür, dass die Hypothese, die besagt, dass mehr atherosklerotischer Umbau im Gefäß mehr Stat1 Aktivität und mehr Mig mit sich bringt, in dieser Arbeit nicht bestätigt wurde, könnte sein, dass die meiste Forschung, Interferon gamma, Stat1 und Mig betreffend, in vitro und am Tiermodell stattgefunden hat. Die Lebensdauer zum Beispiel einer Maus ist sehr viel kürzer als die des Menschen und da Arteriosklerose eine Krankheit ist, die sich über Lebensjahrzehnte entwickeln kann, ist das Mausmodell vielleicht nicht das geeignetste. Des Weiteren könnte es sein, und die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Stat1 Aktivität und die Expressierung von Mig vor allem zu Beginn der Läsionsbildung vermehrt ist. Es besteht also die Möglichkeit, dass die proinflammatorischen Wirkungen des Chemokins besonders für die Initiation und ersten Schritte der Atherosklerosebildung wichtig sind.

Hinweise darauf gibt es auch bei der Veröffentlichung von (Veillard et al., 2005). Hier wurde

festgestellt, dass mit der Deletion des Cxc Rezeptor 3 nur in frühen atherosklerotischen Läsionen eine verminderte Plaquebildung einhergeht, nicht aber in fortgeschritteneren Läsionen.

Außerdem muss beachtet werden, dass in der vorliegenden Analyse nur die Zellen der Tunica media, also vorwiegend glatte Gefäßmuskelzellen betrachtet wurden. Nachfolgende Untersuchungen sollten sich also noch mit anderen Teilen von humanen arteriellen Gefäßen, wie Endothel oder Adventitia befassen, um herauszufinden, ob auch in diesen Teilen der Arterienwand ähnliches festgestellt werden kann.

5.4 Stat1/ Mig und Alter

Bei der statistischen Auswertung fiel auf, dass vor allem beim Kollektiv der Spender, aber auch im gesamten Patientenkollektiv bei älteren Personen signifikant weniger immunhistochemische Färbung im Gefäß gefunden wurde als bei jüngeren Personen (Trennwert Altersmittelwert). Weniger Mig in den Zellen könnte für eine weniger ausgeprägte Immunreaktion sprechen. Es ist bekannt, dass höheres Alter mit einer erhöhten Infektanfälligkeit einhergeht (Powers, 1994; Treanor & Falsey, 1999). Dies wird unter anderem auf Verminderungen des T Zell Rezeptor Angebots aufgrund der altersbedingten Involution des Thymus (Kohler et al., 2005) und verminderte Telomeraseaktivität in Untergruppen der Lymphozyten (Marinova, Han, & Zheng, 2005) zurückgeführt. Inwiefern sich das Altern aber auf Th1- Zellen und Interferon gamma auswirkt, ist noch nicht abschließend geklärt, die Daten zu diesem Thema sind widersprüchlich. Es wurde ein altersabhängiger Rückgang der Produktion von IFN γ durch Leukozyten in Menschen und Tieren festgestellt (Mascarucci et al., 2001; Murasko & Goonewardene, 1990; Rink, Cakman, & Kirchner, 1998; Simioni, Costa, & Tamashiro, 2007), jedoch wurde auch von einer gleichbleibenden Aktivität der Interferon gamma Ausschüttung (Bektas et al., 2013) und auch von einer Steigerung (Born et al., 1995) berichtet. Da Mig aber ausschließlich durch Interferon gamma induziert wird und in dieser Arbeit das Vorkommen von Mig in den Zellen mit dem Alter der Patienten abnahm, deuten die Daten eher darauf hin, dass auch die Interferon gamma Produktion im Alter eher abnimmt.

5.5 Stat1/ Mig und arterielle Hypertonie

Bei der Überprüfung, ob es signifikante Unterschiede im Mig Aufkommen in Gefäßen von Hypertonikern und Patienten ohne arterielle Hypertonie gab, fiel auf, dass bei Hypertonikern die Gefäße mehr Färbung aufwiesen. Auch wenn es kaum Daten von Mig in Zusammenhang mit arterieller Hypertonie gibt, deutet zum aktuellen Zeitpunkt vieles darauf hin, dass arterielle Hypertonie mit einer verstärkten Entzündungsreaktion einhergeht. So zeigten (Guzik et al., 2007), dass die Induktion von Bluthochdruck durch Angiotensin 2 von T Zellen abhängig ist. Angiotensin 2 ist ein stark hyperton wirkendes Hormon (Timmermans et al., 1993), das im Renin- Angiotensin- Aldosteron System (RAAS) wirkt. Außerdem stimulieren dendritische Zellen hypertensiver Mäuse T Zellen zur Differenzierung in einen proinflammatorischen Phänotyp, so dass diese unter anderem vermehrt Interferon gamma produzieren (Kirabo et al., 2014). Eine Theorie von (Harrison et al., 2011) besagt, dass eine anfängliche, leichte Hypertension (Prähypertension), Entzündungsreaktionen hervorruft, welche den Bluthochdruck verschlimmern und manifestieren. Somit stützt das Ergebnis dieser Arbeit, dass in Gefäßzellen hypertoner Patienten mehr Mig und somit mehr entzündliche Aktivität gefunden wurde, die zuvor erwähnten Erkenntnisse.

Und auch eine andere Theorie zur Wirkungsweise von Angiotensin 2 ist mit den in dieser Arbeit gefundenen Erkenntnissen in Einklang zu bringen. (Marrero et al., 1995) legten dar, dass Angiotensin 2 in glatten Gefäßmuskelzellen über Bindung an den Angiotensinrezeptor 1 (AT1 Rezeptor) direkt die Phosphorylierung von Jak und Stat1 und Stat2 induziert. Die Hemmung von Stat1 führte zu einer Aufhebung der so induzierten Proliferation glatter Muskelzellen (Marrero et al., 1997). Da Mig Stat1 abhängig induziert wird, könnte auch dieser Signalweg die vermehrte Expression von Mig bei Hypertonikern im Vergleich zu Patienten ohne Bluthochdruck erklären.

5.6 Stat1/ Mig und Diabetes

Bei den Diabetikern stellte sich heraus, dass bei ihnen signifikant weniger Mig in den Gefäßen exprimiert war als bei Nicht- Diabetikern. Zu dem Zusammenhang zwischen der Expression von Mig oder Stat1 in arteriellen Gefäßen von Diabetikern ist nicht viel

veröffentlicht, jedoch gibt es einige Publikationen zum Zusammenhang zwischen Stat1 und Diabetes in nephropathischen Nieren. (Berthier et al., 2009) untersuchten, inwiefern sich die Regulierung des Jak/ Stat1 Signalwegs in humanen Nieren mit diabetischer Nephropathie im frühen und im fortgeschrittenen Stadium im Vergleich zu Kontrollen unterscheidet. Dies geschah an Zellen des Tubulointerstitiums und der Glomerula. Es konnte gezeigt werden, dass im Glomerulum, der Teil der Niere, der am ehesten mit Gefäßen vergleichbar ist, da viel Endothel vorhanden ist, der Stat1 Signalweg im fortgeschrittenen Stadium der diabetischen Nephropathie im Vergleich zu Kontrollen herunterreguliert war. Im Tubulointerstitium war Stat1 bei fortgeschrittener Nephropathie hochreguliert. Allerdings gibt es auch Studien, in denen Hyperglykämie als starker Induktor von Stat1 beschrieben wird. In Nieren von Ratten mit diabetischer Nephropathie (Banes et al., 2004), sowie auch in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten über Angiotensin 2 (Amiri et al., 1999) und in kultivierten Fibroblasten von Ratten (Dai et al., 2013) wurde eine Glukose- abhängige Steigerung der Phosphorylierung von Stat1 festgestellt. Die Erkenntnisse dieser Arbeit, die an humanen Zellen gefunden wurden, sprechen jedoch mehr dafür, dass Stat1 beim Diabetiker im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes wenigstens in arteriellen Gefäßen weniger exprimiert wird.

6 Zusammenfassung

Das Thema der vorliegenden Arbeit lautet Stat1 bei Atherosklerose. Sie beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob die Expression des Chemokins Mig, auch bekannt als Cxcl9, in stark atherosklerotisch umgebauten menschlichen Arterien signifikant ausgeprägter ist als in Gesunden beziehungsweise nur schwach atherosklerotisch umgebauten. Und somit mit der Frage, ob der Stat1 Signalweg in Verbindung mit Interferon gamma und der Expression von Mig eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt.

Hierfür wurden Schnitte menschlicher Arterien mittels Immunhistochemie mit der LSAB Methode mit einem polyklonalem Anti- Mig Antikörper gefärbt und anschließend unter dem Mikroskop semiquantitativ beurteilt und einem Wert von Null (keine immunhistochemische Färbung sichtbar) bis Drei (mehr als 70% der Zellen sind immunhistochemisch angefärbt) zugeteilt. Des Weiteren wurden die bereits in den Patientenakten vorliegenden Befunde der Gefäßbiopsien so kategorisiert, dass Null kein pathologischer Befund und Fünf einen hochgradigen atherosklerotischen Umbau des Gefäßes beschrieb.

Die statistische Auswertung ergab, dass ein höheres Alter, vor allem der eher gesunden Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren, mit einem mehr ausgeprägten atherosklerotischen Umbau der arteriellen Gefäße einherging. Dieses Ergebnis zeigt, dass das ausgewählte Probandenkollektiv mit der Grundgesamtheit vergleichbar ist.

Darüber hinaus konnte die Hypothese der Arbeit, dass in stark umgebauten Arterien die Expression von Mig höher ist als in gesünderen Gefäßen, nicht bestätigt werden. Es ergaben sich statistisch signifikante Hinweise, dass Mig in nur leicht atherosklerotisch umgebauten Gefäßen deutlich stärker exprimiert wird, als in Arterien mit hochgradig pathologischem Befund. Da die meisten Veröffentlichungen, die Fakten zugunsten der Ursprungshypothese liefern, Großteils Tierpräparate verwendeten, können die Ergebnisse dieser Arbeit ein Hinweis darauf sein, dass die Mechanismen der Pathogenese der Atherosklerose beim Menschen andere sind beziehungsweise nicht in gleichem Ausmaß eine Rolle spielen wie das bei anderen Spezies der Fall ist.

7 Literaturverzeichnis

- Agrawal, S., Febbraio, M., Podrez, E., Cathcart, M. K., Stark, G. R., & Chisolm, G. M. (2007). Signal transducer and activator of transcription 1 is required for optimal foam cell formation and atherosclerotic lesion development. *Circulation*, *115*(23), 2939-2947. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.696922
- Ait-Oufella, H., Sage, A. P., Mallat, Z., & Tedgui, A. (2014). Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circ Res*, *114*(10), 1640-1660. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302761
- Amiri, F., Venema, V. J., Wang, X., Ju, H., Venema, R. C., & Marrero, M. B. (1999). Hyperglycemia enhances angiotensin II-induced janus-activated kinase/STAT signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, *274*(45), 32382-32386.
- Bai, Y., Ahmad, U., Wang, Y., Li, J. H., Choy, J. C., Kim, R. W., Kirkiles-Smith, N., Maher, S. E., Karras, J. G., Bennett, C. F., Bothwell, A. L., Pober, J. S., & Tellides, G. (2008). Interferon-gamma induces X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 and Noxa expression and potentiates human vascular smooth muscle cell apoptosis by STAT3 activation. *J Biol Chem*, *283*(11), 6832-6842. doi:10.1074/jbc.M706021200
- Banes, A. K., Shaw, S., Jenkins, J., Redd, H., Amiri, F., Pollock, D. M., & Marrero, M. B. (2004). Angiotensin II blockade prevents hyperglycemia-induced activation of JAK and STAT proteins in diabetic rat kidney glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol*, *286*(4), F653-659. doi:10.1152/ajprenal.00163.2003
- Barillari, G., Albonici, L., Incerpi, S., Bogetto, L., Pistritto, G., Volpi, A., Ensoli, B., & Manzari, V. (2001). Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cells locomotion and growth by enhancing alpha5beta1 integrin expression and function. *Atherosclerosis*, *154*(2), 377-385.
- Bektas, A., Zhang, Y., Wood, W. H., 3rd, Becker, K. G., Madara, K., Ferrucci, L., & Sen, R. (2013). Age-associated alterations in inducible gene transcription in human CD4+ T lymphocytes. *Aging (Albany NY)*, *5*(1), 18-36.
- Berthier, C. C., Zhang, H., Schin, M., Henger, A., Nelson, R. G., Yee, B., Boucherot, A., Neusser, M. A., Cohen, C. D., Carter-Su, C., Argetsinger, L. S., Rastaldi, M. P., Brosius, F. C., & Kretzler, M. (2009). Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy. *Diabetes*, *58*(2), 469-477. doi:10.2337/db08-1328
- Bodnar, R. J., & Wells, A. (2015). Differential Regulation of Pericyte Function by the CXC Receptor 3. *Wound Repair Regen*. doi:10.1111/wrr.12346
- Born, J., Uthgenannt, D., Dodt, C., Nunninghoff, D., Ringvold, E., Wagner, T., & Fehm, H. L. (1995). Cytokine production and lymphocyte subpopulations in aged humans. An assessment during nocturnal sleep. *Mech Ageing Dev*, *84*(2), 113-126.
- Busch, M. A., Schienkiewitz, A., Nowossadeck, E., & Gosswald, A. (2013). [Prevalence of stroke in adults aged 40 to 79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, *56*(5-6), 656-660. doi:10.1007/s00103-012-1659-0
- Charo, I. F., & Taubman, M. B. (2004). Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*, *95*(9), 858-866. doi:10.1161/01.RES.0000146672.10582.17
- Chistiakov, D. A., Revin, V. V., Sobenin, I. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2015). Vascular endothelium: functioning in norm, changes in atherosclerosis and current dietary approaches to improve endothelial function. *Mini Rev Med Chem*, *15*(4), 338-350.
- Chmielewski, S., Olejnik, A., Sikorski, K., Pelisek, J., Blaszczyk, K., Aoqui, C., Nowicka, H., Zerneck, A., Heemann, U., Wesoly, J., Baumann, M., & Bluysen, H. A. (2014). STAT1-dependent signal integration between IFNgamma and TLR4 in vascular cells reflect pro-atherogenic responses in human atherosclerosis. *PLoS One*, *9*(12), e113318. doi:10.1371/journal.pone.0113318

- Chung, H. K., Lee, I. K., Kang, H., Suh, J. M., Kim, H., Park, K. C., Kim, D. W., Kim, Y. K., Ro, H. K., & Shong, M. (2002). Statin inhibits interferon-gamma-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Exp Mol Med*, 34(6), 451-461. doi:10.1038/emm.2002.63
- Dai, B., Cui, M., Zhu, M., Su, W. L., Qiu, M. C., & Zhang, H. (2013). STAT1/3 and ERK1/2 synergistically regulate cardiac fibrosis induced by high glucose. *Cell Physiol Biochem*, 32(4), 960-971. doi:10.1159/000354499
- Dako. (2013). Immuno Histochemical Staining Methods Educational Guide. Retrieved from http://www.dako.com/de/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_edu/immunohistochemical_staining_methods.htm
- Ebrahim, S., Papacosta, O., Whincup, P., Wannamethee, G., Walker, M., Nicolaides, A. N., Dhanjil, S., Griffin, M., Belcaro, G., Rumley, A., & Lowe, G. D. (1999). Carotid plaque, intima media thickness, cardiovascular risk factors, and prevalent cardiovascular disease in men and women: the British Regional Heart Study. *Stroke*, 30(4), 841-850.
- Farber, J. M. (1997). Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 61(3), 246-257.
- Faure, E., Equils, O., Sieling, P. A., Thomas, L., Zhang, F. X., Kirschning, C. J., Polentarutti, N., Muzio, M., & Arditi, M. (2000). Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem*, 275(15), 11058-11063.
- Fenwick, P. S., Macedo, P., Kilty, I. C., Barnes, P. J., & Donnelly, L. E. (2015). Effect of JAK Inhibitors on Release of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 from Human Airway Epithelial Cells. *PLoS One*, 10(6), e0128757. doi:10.1371/journal.pone.0128757
- Frostegard, J., Ulfgren, A. K., Nyberg, P., Hedin, U., Swedenborg, J., Andersson, U., & Hansson, G. K. (1999). Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*, 145(1), 33-43.
- Giannoglou, G. D., Antoniadis, A. P., Koskinas, K. C., & Chatzizisis, Y. S. (2010). Flow and atherosclerosis in coronary bifurcations. *EuroIntervention*, 6 Suppl J, J16-23. doi:10.4244/EIJV6SUPJA4
- Gosswald, A., Schienkiewitz, A., Nowossadeck, E., & Busch, M. A. (2013). [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56(5-6), 650-655. doi:10.1007/s00103-013-1666-9
- Gough, D. J., Levy, D. E., Johnstone, R. W., & Clarke, C. J. (2008). IFN-gamma signaling- does it mean JAK-STAT? *Cytokine Growth Factor Rev*, 19(5-6), 383-394. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.08.004
- Groom, J. R., & Luster, A. D. (2011). CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*, 317(5), 620-631. doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.017
- Gupta, S., Pablo, A. M., Jiang, X., Wang, N., Tall, A. R., & Schindler, C. (1997). IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest*, 99(11), 2752-2761. doi:10.1172/JCI119465
- Guzik, T. J., Hoch, N. E., Brown, K. A., McCann, L. A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C., & Harrison, D. G. (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*, 204(10), 2449-2460. doi:10.1084/jem.20070657
- Hansson, G. K., & Libby, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 6(7), 508-519. doi:10.1038/nri1882
- Hansson, G. K., Libby, P., Schonbeck, U., & Yan, Z. Q. (2002). Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*, 91(4), 281-291.
- Hansson, G. K., Robertson, A. K., & Soderberg-Naucler, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 1, 297-329. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100100

- Hardison, S. E., Herrera, G., Young, M. L., Hole, C. R., Wozniak, K. L., & Wormley, F. L., Jr. (2012). Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. *J Immunol*, *189*(8), 4060-4068. doi:10.4049/jimmunol.1103455
- Harrison, D. G., Guzik, T. J., Lob, H. E., Madhur, M. S., Marvar, P. J., Thabet, S. R., Vinh, A., & Weyand, C. M. (2011). Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension*, *57*(2), 132-140. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163576
- Hillen, T., Nieczaj, R., Munzberg, H., Schaub, R., Borchelt, M., & Steinhagen-Thiessen, E. (2000). Carotid atherosclerosis, vascular risk profile and mortality in a population-based sample of functionally healthy elderly subjects: the Berlin ageing study. *J Intern Med*, *247*(6), 679-688.
- Hoeksema, M. A., Stoger, J. L., & de Winther, M. P. (2012). Molecular pathways regulating macrophage polarization: implications for atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, *14*(3), 254-263. doi:10.1007/s11883-012-0240-5
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., & Hansson, G. K. (1986). Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, *6*(2), 131-138.
- Kim, C. H., Rott, L., Kunkel, E. J., Genovese, M. C., Andrew, D. P., Wu, L., & Butcher, E. C. (2001). Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest*, *108*(9), 1331-1339. doi:10.1172/JCI13543
- Kirabo, A., Fontana, V., de Faria, A. P., Loperena, R., Galindo, C. L., Wu, J., Bikineyeva, A. T., Dikalov, S., Xiao, L., Chen, W., Saleh, M. A., Trott, D. W., Itani, H. A., Vinh, A., Amarnath, V., Amarnath, K., Guzik, T. J., Bernstein, K. E., Shen, X. Z., Shyr, Y., Chen, S. C., Mernaugh, R. L., Laffer, C. L., Eljovich, F., Davies, S. S., Moreno, H., Madhur, M. S., Roberts, J., 2nd, & Harrison, D. G. (2014). DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension. *J Clin Invest*, *124*(10), 4642-4656. doi:10.1172/JCI74084
- Kohler, S., Wagner, U., Pierer, M., Kimmig, S., Oppmann, B., Mowes, B., Julke, K., Romagnani, C., & Thiel, A. (2005). Post-thymic in vivo proliferation of naive CD4+ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur J Immunol*, *35*(6), 1987-1994. doi:10.1002/eji.200526181
- Krieger, M. (1997). The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol*, *8*(5), 275-280.
- Levy, D. E., & Darnell, J. E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*(9), 651-662. doi:10.1038/nrm909
- Li, H., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A., Jr., & Libby, P. (1993). Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *Am J Pathol*, *143*(6), 1551-1559.
- Liao, F., Rabin, R. L., Yannelli, J. R., Koniaris, L. G., Vanguri, P., & Farber, J. M. (1995). Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med*, *182*(5), 1301-1314.
- Lim, W. S., Timmins, J. M., Seimon, T. A., Sadler, A., Kolodgie, F. D., Virmani, R., & Tabas, I. (2008). Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo. *Circulation*, *117*(7), 940-951. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.711275
- Lin, Q., Song, Y., Zhu, X., Yang, S., & Zheng, J. (2013). [Expressions of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in renal tubular epithelial cells induced by IFN-gamma]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, *29*(2), 137-140.
- Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S. A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., & Moser, B. (1996). Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med*, *184*(3), 963-969.
- Loos, T., Dekeyser, L., Struyf, S., Schutyser, E., Gijsbers, K., Gouwy, M., Fraeyman, A., Put, W., Ronsse, I., Grillet, B., Opdenakker, G., Van Damme, J., & Proost, P. (2006). TLR ligands and cytokines induce CXCR3 ligands in endothelial cells: enhanced CXCL9 in autoimmune arthritis. *Lab Invest*, *86*(9), 902-916. doi:10.1038/labinvest.3700453

- Lusis, A. J., Mar, R., & Pajukanta, P. (2004). Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 5, 189-218. doi:10.1146/annurev.genom.5.061903.175930
- Mach, F., Sauty, A., Iarossi, A. S., Sukhova, G. K., Neote, K., Libby, P., & Luster, A. D. (1999). Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest*, 104(8), 1041-1050. doi:10.1172/JCI6993
- Marinova, E., Han, S., & Zheng, B. (2005). Age-associated deficiency in activation-induced up-regulation of telomerase activity in CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol*, 140(2), 258-264. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02762.x
- Marrero, M. B., Schieffer, B., Li, B., Sun, J., Harp, J. B., & Ling, B. N. (1997). Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*, 272(39), 24684-24690.
- Marrero, M. B., Schieffer, B., Paxton, W. G., Heerdt, L., Berk, B. C., Delafontaine, P., & Bernstein, K. E. (1995). Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature*, 375(6528), 247-250. doi:10.1038/375247a0
- Mascarucci, P., Taub, D., Sacconi, S., Paloma, M. A., Dawson, H., Roth, G. S., Ingram, D. K., & Lane, M. A. (2001). Age-related changes in cytokine production by leukocytes in rhesus monkeys. *Aging (Milano)*, 13(2), 85-94.
- McLaren, J. E., Michael, D. R., Ashlin, T. G., & Ramji, D. P. (2011). Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res*, 50(4), 331-347. doi:10.1016/j.plipres.2011.04.002
- McLaren, J. E., & Ramji, D. P. (2009). Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20(2), 125-135. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.11.003
- Mikhak, Z., Fleming, C. M., Medoff, B. D., Thomas, S. Y., Tager, A. M., Campanella, G. S., & Luster, A. D. (2006). STAT1 in peripheral tissue differentially regulates homing of antigen-specific Th1 and Th2 cells. *J Immunol*, 176(8), 4959-4967.
- Moss, J. W., & Ramji, D. P. (2015). Interferon-gamma: Promising therapeutic target in atherosclerosis. *World J Exp Med*, 5(3), 154-159. doi:10.5493/wjem.v5.i3.154
- Murasko, D. M., & Goonewardene, I. M. (1990). T-cell function in aging: mechanisms of decline. *Annu Rev Gerontol Geriatr*, 10, 71-96.
- Navab, M., Berliner, J. A., Watson, A. D., Hama, S. Y., Territo, M. C., Lusis, A. J., Shih, D. M., Van Lenten, B. J., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., & Fogelman, A. M. (1996). The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(7), 831-842.
- Okumiya, N., Tanaka, K., Ueda, K., & Omae, T. (1985). Coronary atherosclerosis and antecedent risk factors: pathologic and epidemiologic study in Hisayama, Japan. *Am J Cardiol*, 56(1), 62-66.
- Panousis, C. G., & Zuckerman, S. H. (2000). Regulation of cholesterol distribution in macrophage-derived foam cells by interferon-gamma. *J Lipid Res*, 41(1), 75-83.
- Park, M. K., Amichay, D., Love, P., Wick, E., Liao, F., Grinberg, A., Rabin, R. L., Zhang, H. H., Gebeyehu, S., Wright, T. M., Iwasaki, A., Weng, Y., DeMartino, J. A., Elkins, K. L., & Farber, J. M. (2002). The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamma (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen in vivo. *J Immunol*, 169(3), 1433-1443.
- Powers, D. C. (1994). Effect of age on serum immunoglobulin G subclass antibody responses to inactivated influenza virus vaccine. *J Med Virol*, 43(1), 57-61.
- Prati, P., Vanuzzo, D., Casaroli, M., Di Chiara, A., De Biasi, F., Feruglio, G. A., & Touboul, P. J. (1992). Prevalence and determinants of carotid atherosclerosis in a general population. *Stroke*, 23(12), 1705-1711.
- Proost, P., Verpoest, S., Van de Borne, K., Schutyser, E., Struyf, S., Put, W., Ronsse, I., Grillet, B., Opdenakker, G., & Van Damme, J. (2004). Synergistic induction of CXCL9 and CXCL11 by Toll-like receptor ligands and interferon-gamma in fibroblasts

- correlates with elevated levels of CXCR3 ligands in septic arthritis synovial fluids. *J Leukoc Biol*, 75(5), 777-784. doi:10.1189/jlb.1003524
- Qin, S., Rottman, J. B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A. E., Moser, B., & Mackay, C. R. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest*, 101(4), 746-754. doi:10.1172/JC11422
- Reiss, A. B., Awadallah, N. W., Malhotra, S., Montesinos, M. C., Chan, E. S., Javitt, N. B., & Cronstein, B. N. (2001). Immune complexes and IFN-gamma decrease cholesterol 27-hydroxylase in human arterial endothelium and macrophages. *J Lipid Res*, 42(11), 1913-1922.
- Riede, U.-N., Werner, M., & Schaefer, H.-E. (2004). *Allgemeine und spezielle Pathologie* (Vol. 5): Georg Thieme Verlag.
- Rink, L., Cakman, I., & Kirchner, H. (1998). Altered cytokine production in the elderly. *Mech Ageing Dev*, 102(2-3), 199-209.
- Robertson, A. K., & Hansson, G. K. (2006). T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(11), 2421-2432. doi:10.1161/01.ATV.0000245830.29764.84
- Romagnani, S. (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol*, 12, 227-257. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.001303
- Rosner, D., Stoneman, V., Littlewood, T., McCarthy, N., Figg, N., Wang, Y., Tellides, G., & Bennett, M. (2006). Interferon-gamma induces Fas trafficking and sensitization to apoptosis in vascular smooth muscle cells via a PI3K- and Akt-dependent mechanism. *Am J Pathol*, 168(6), 2054-2063.
- Salisbury, D., & Bronas, U. (2014). Inflammation and immune system contribution to the etiology of atherosclerosis: mechanisms and methods of assessment. *Nurs Res*, 63(5), 375-385. doi:10.1097/NNR.000000000000053
- Sauty, A., Dziejman, M., Taha, R. A., Iarossi, A. S., Neote, K., Garcia-Zepeda, E. A., Hamid, Q., & Luster, A. D. (1999). The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 162(6), 3549-3558.
- Schonbeck, U., Mach, F., Sukhova, G. K., Murphy, C., Bonnefoy, J. Y., Fabunmi, R. P., & Libby, P. (1997). Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res*, 81(3), 448-454.
- Sikorski, K., Chmielewski, S., Olejnik, A., Wesoly, J. Z., Heemann, U., Baumann, M., & Bluysen, H. (2012). STAT1 as a central mediator of IFN γ and TLR4 signal integration in vascular dysfunction. *JAKSTAT*, 1(4), 241-249. doi:10.4161/jkst.22469
- Sikorski, K., Wesoly, J., & Bluysen, H. A. (2014). Data mining of atherosclerotic plaque transcriptomes predicts STAT1-dependent inflammatory signal integration in vascular disease. *Int J Mol Sci*, 15(8), 14313-14331. doi:10.3390/ijms150814313
- Simioni, P. U., Costa, E. H., & Tamashiro, W. M. (2007). Aging reduces the primary humoral response and the in vitro cytokine production in mice. *Braz J Med Biol Res*, 40(8), 1111-1120.
- Stemme, S., Faber, B., Holm, J., Wiklund, O., Witztum, J. L., & Hansson, G. K. (1995). T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9), 3893-3897.
- Stemme, S., Fager, G., & Hansson, G. K. (1990). MHC class II antigen expression in human vascular smooth muscle cells is induced by interferon-gamma and modulated by tumour necrosis factor and lymphotoxin. *Immunology*, 69(2), 243-249.
- Stemme, S., Holm, J., & Hansson, G. K. (1992). T lymphocytes in human atherosclerotic plaques are memory cells expressing CD45RO and the integrin VLA-1. *Arterioscler Thromb*, 12(2), 206-211.
- Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A., & Smith, R. D. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*, 45(2), 205-251.

- Torella, D., Curcio, A., Gasparri, C., Galuppo, V., De Serio, D., Surace, F. C., Cavaliere, A. L., Leone, A., Coppola, C., Ellison, G. M., & Indolfi, C. (2007). Fludarabine prevents smooth muscle proliferation in vitro and neointimal hyperplasia in vivo through specific inhibition of STAT-1 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(6), H2935-2943. doi:10.1152/ajpheart.00887.2006
- Treanor, J., & Falsey, A. (1999). Respiratory viral infections in the elderly. *Antiviral Res*, 44(2), 79-102.
- Tribouilloy, C., Peltier, M., Andrejak, M., Rey, J. L., & Lesbre, J. P. (1998). Correlation of thoracic aortic atherosclerotic plaque detected by multiplane transesophageal echocardiography and cardiovascular risk factors. *Am J Cardiol*, 82(12), 1552-1555, A1558.
- Veillard, N. R., Steffens, S., Pelli, G., Lu, B., Kwak, B. R., Gerard, C., Charo, I. F., & Mach, F. (2005). Differential influence of chemokine receptors CCR2 and CXCR3 in development of atherosclerosis in vivo. *Circulation*, 112(6), 870-878. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.520718
- Velican, C., & Velican, D. (1983). Progression of coronary atherosclerosis from adolescents to mature adults. *Atherosclerosis*, 47(2), 131-144.
- Wesoly, J., Szweykowska-Kulinska, Z., & Bluysen, H. A. (2007). STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses. *Acta Biochim Pol*, 54(1), 27-38.
- Whitman, S. C., Ravisankar, P., Elam, H., & Daugherty, A. (2000). Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Am J Pathol*, 157(6), 1819-1824.
- Wong, G. H., Clark-Lewis, I., McKimm-Breschkin, L., Harris, A. W., & Schrader, J. W. (1983). Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid, macrophage, and myeloid cell lines. *J Immunol*, 131(2), 788-793.
- Yan, Z. Q., & Hansson, G. K. (2007). Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev*, 219, 187-203. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00554.x
- Zhdanov, V. S., Sternby, N. H., Vikhert, A. M., & Galakhov, I. E. (1999). Development of atherosclerosis over a 25 year period: an epidemiological autopsy study in males of 11 towns. *Int J Cardiol*, 68(1), 95-106.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Direkte und indirekte Methode der Immunhistochemie.....	13
Abbildung 2: LSAB Methode.....	14
Abbildung 3: Boxplot- Diagramm zur Darstellung der Intraobserver Variability.....	18
Abbildung 4: Altersverteilung des gesamten Probandenkollektivs	20
Abbildung 5: Altersverteilung der Spender.....	21
Abbildung 6: Altersverteilung der Empfänger.....	21
Abbildung 7: Säulendiagramm Alterstertile gesamtes Kollektiv.....	22
Abbildung 8: Säulendiagramm Alterstertile Spender.....	23
Abbildung 9: Säulendiagramm Alterstertile Empfänger.....	23
Abbildung 10: Verteilung der Risikofaktoren im Gesamtkollektiv	24

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Biopsiebefunde für unterschiedliche Ausprägungen von Atherosklerose	12
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien für den Färbeprozess	16
Tabelle 3: Einteilung des Ausmaßes der Immunhistochemischen Färbung im arteriellen Gefäß	17
Tabelle 4: Vergleich der beiden Beurteilungsdurchgänge und den gebildeten Mittelwerten hinsichtlich Median, Varianz, Minimum, Maximum und Perzentilen	19
Tabelle 5: Korrelation zwischen Alter und Atherosklerosegrad;	25
Tabelle 6: Korrelation Patientenalter mit Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig im Gefäß.....	26
Tabelle 7: Gebildete Gruppierungen des Atherosklerosegrads.....	26
Tabelle 8: Korrelation zwischen Ausprägung der Atherosklerose und Ausmaß der Färbung von Mig;.....	27
Tabelle 9: Gebildete Gruppierungen des Färbegrades	28
Tabelle 10: Korrelation zwischen Ausmaß der Färbung von Mig und der Ausprägung von Atherosklerose im Gefäß;.....	29
Tabelle 11: Korrelation zwischen Ausprägung der Atherosklerose und dem Patientenalter; ..	30
Tabelle 12: Korrelation zwischen Risikofaktor ja/nein und dem Ausmaß der immunhistochemischen Färbung von Mig;.....	31
Tabelle 13: Gebildete Alters- Subgruppen anhand der Alterstertile.....	31
Tabelle 14: Einteilung des gesamten Probandenkollektivs sowie von Spender und Empfänger in Alterstertile	33

10 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn apl. Prof. Dr. Marcus Baumann für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. med. Gregor Babaryka für die freundliche Hilfe bei der Organisation der Biopsien.

Frau Sandra Haderer danke ich für die Unterstützung beim Schneiden und Färben der Biopsien.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern und bei Raphael für eure Unterstützung und Stärkung, die mich während meines ganzen Studiums und darüber hinaus begleitet hat.