

Deutsches Herzzentrum und
1. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Thrombozyten induzierte vaskuläre Inflammation
– ein Initialmechanismus in der Atherogenese –**

Kathrin Hemler

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. St. Maßberg

2. Univ.-Prof. A. Kastrati

Die Dissertation wurde am 29.06.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.11.2005 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	3
1.1	Morphologie der intakten Arterienwand	3
1.2	Pathophysiologie der Atherosklerose	4
1.3	Interaktionen zwischen Thrombozyten und der Gefäßwand	9
1.3.1	Antithrombozytäre Endothelfunktion	9
1.3.2	Thrombozytenadhäsion	10
1.3.2.1	Thrombozyten-Subendothel-Interaktion	10
1.3.2.2	Thrombozyten-Endothel-Interaktion	11
1.3.3	Thrombozytenaktivierung und Granulasekretion	11
1.3.4	Thrombozyten und Inflammation	13
1.4	Mausmodell der Atherosklerose	14
2	Zielsetzung	17
3	Material und Methodik	19
3.1	Vorbemerkung	19
3.2	Versuchstiere	19
3.3	In Vivo Fluoreszenzmikroskopie	19
3.3.1	Intravitalmikroskopie	19
3.3.2	Thrombozytenpräparation	23
3.4	Histologie und Immunhistologie	24
3.4.1	A. carotis	24
3.4.2	Herz mit Aortensinus und Koronararterien	25
3.4.3	Aorta	27
3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
3.6	Versuchsablauf	28
3.6.1	Thrombozyten- und Leukozyteninteraktion im zeitlichen Verlauf der Atherosklerose	28
3.6.1.1	Thrombozyten-Endothel-Interaktion <i>in vivo</i>	28
3.6.1.2	Charakterisierung der intimalen Entzündungsreaktion	29
3.6.2	Mechanismen der initialen Thrombozytenadhäsion	29
3.6.3	Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression und die vaskuläre Inflammation	30
3.6.3.1	Thrombozyten und Atheroprogression	30
3.6.3.2	Thrombozyten und vaskuläre Inflammation	31
3.7	Statistische Analyse	31

4	Ergebnisse	32
4.1	Thrombozyten- und Leukozyteninteraktion im zeitlichen Verlauf der Atherosklerose	32
4.1.1	Thrombozyten-Endothel-Interaktion in vivo	32
4.1.2	Charakterisierung der intimalen Entzündungsreaktion	34
4.2	Mechanismen der initialen Thrombozytenadhäsion	36
4.3	Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression und die vaskuläre Inflammation	38
4.3.1	Thrombozyten und Atheroprogression	38
4.3.2	Thrombozyten und vaskuläre Inflammation	42
5	Diskussion	45
5.1	Diskussion von Material und Methoden	45
5.1.1	Versuchstiere	45
5.1.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	46
5.1.3	Histologie und Immunhistologie	47
5.2	Diskussion der Ergebnisse	49
5.2.1	Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion im zeitlichen Verlauf der Atherosklerose	49
5.2.2	Mechanismen der initialen Thrombozytenadhäsion	50
5.2.3	Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression und die vaskuläre Inflammation	53
6	Zusammenfassung	57
7	Schlussfolgerungen	58
8	Literatur	60
9	Dank	73
10	Abkürzungen	74

1 Einleitung

Die Atherosklerose, eine krankhafte Veränderung der Arterien, die mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung einhergeht, ist eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industriestaaten. Allein 2003 starben in Deutschland 194481 Personen an atherothrombotischen Komplikationen (Statistisches Bundesamt Deutschland 2003, <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.php>). Somit liegt die Atherosklerose in der Todesstatistik noch vor den malignen Erkrankungen.

Epidemiologische Studien konnten belegen, dass viele verschiedene Umweltfaktoren, sowie genetische Risikofaktoren eine wichtige Rolle in der Atherogenese spielen. Auf Grund der Komplexität der Krankheit entwickelt sich das Verständnis für die verschiedenen beteiligten zellulären und molekularen Interaktionen nur langsam. Im letzten Jahrzehnt hat jedoch die Verfügbarkeit neuer Untersuchungsmethoden, genetisch veränderte Mausmodelle der Krankheit mit eingeschlossen, dazu geführt, die molekularen Mechanismen, die die veränderten Cholesterinmetabolismen und andere Risikofaktoren mit der Plaqueentstehung verknüpfen, besser zu verstehen. Es ist inzwischen deutlich geworden, dass Atherosklerose nicht einfach nur eine mit dem Alter einhergehende degenerative Erkrankung ist, sondern ein chronisch entzündlicher Prozess, der durch arterielle Thrombose und Plaqueruptur zum akuten klinischen Problem werden kann.

1.1 Morphologie der intakten Arterienwand

Die Arterienwand kann in drei Schichten unterteilt werden. Die innerste, an das Gefäßlumen angrenzende Schicht, ist die Intima. Diese besteht aus einem einschichtigen Verband flacher, durch „tight junctions“ miteinander verknüpfter Endothelzellen, die auf einer Basalmembran ruhen, sowie dem subendothelialen Bindegewebe, welches aus Kollagenfasern, Proteoglykanen und einem feinen Netz elastischer Fasern (Membrana elastica interna) aufgebaut ist. Die unversehrte, an das Gefäßlumen grenzende Endothelschicht besitzt eine antiadhäsive Funktion und bietet so einen wichtigen Schutzmechanismus vor Blutzellablagerungen und der Entstehung eines Thrombus.

Die an die Intima angrenzende Media besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagenfasern und elastischen Fasern und ist dadurch maßgeblich an der Regulierung der Gefäßweite und somit des Gefäßwiderstandes beteiligt.

In der äußersten Schicht, der Adventitia, durch die das Gefäß in der Umgebung verankert ist, findet man ein Netzwerk aus Kollagenfibrillen und elastischen Fasern, einzelne glatte Muskelzellen und Fibroblasten.

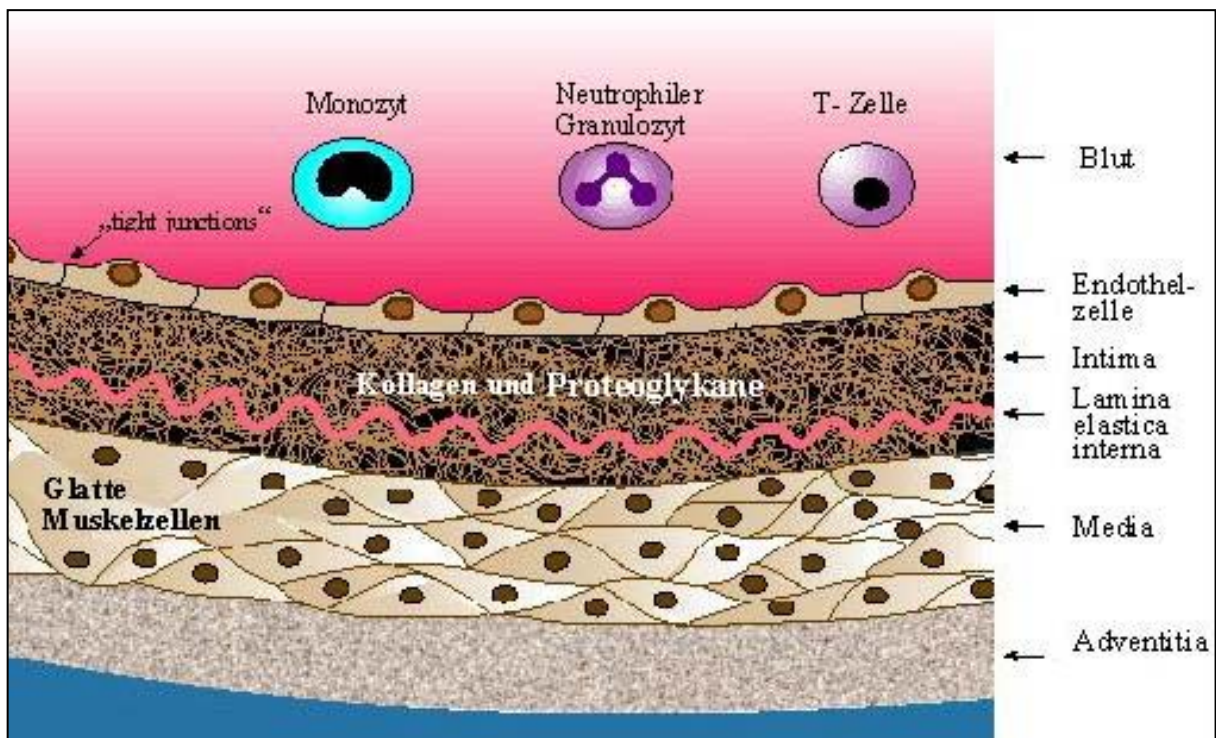


Abbildung 1:

Schematischer Aufbau einer Arterienwand nach Lusic (Lusic, 2000).

1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis ist, dass Endothelverletzung (Ross and Glomset JA, 1973) bzw. eine endotheliale Dysfunktion (Ross, 1999) am Anfang der Atherogenese stehen. An bestimmten vulnerablen Orten der Arterien, wie z.B. Bifurkationen und Gefäßabzweigungen, kommt es durch erhöhte Scherkräfte und verstärkte Turbulenzbildung

zu Veränderungen der Blutflussdynamik (Ross, 1999). Dieser gestörte laminare Blutfluss führt zu Formveränderungen der Endothelzellen und zu deren Aktivierung (Lusis, 2000).

Die Endothelzellaktivierung äußert sich in einer erhöhten Adhäsivität des Endothels gegenüber Leukozyten und Thrombozyten, in einer verstärkten Produktion von prokoagulatorischen Stoffen wie vasoaktiven Molekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Hansson, 2005) und in einer Permeabilitätserhöhung der Endothelbarriere (Ross, 1999). Durch die erhöhte Permeabilität des Endothels für Makromoleküle, wie z.B. LDL (low density lipoprotein), können diese passiv durch die Endothelzelljunctions diffundieren (Lusis, 2000). Es kommt zur verstärkten Ansammlung von Plasmabestandteilen, insbesondere von LDL, in der subendothelialen Matrix und somit zur weiteren Beeinträchtigung der Endothelfunktion. Diesen Stellen sind prädestiniert für die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen (Gimbrone, Jr., 1999).

LDL wird in der Gefäßwand durch Oxidation, Glykanierung (bei Diabetes), Lipolyse, Proteolyse und Aggregation modifiziert (Khoo et al., 1988; Khoo et al., 1992; Navab M. et al., 1996; Steinberg, 1997) und führt so zu Entzündungsreaktionen, Endothelverletzung und Schaumzellbildung (Griendling and Alexander, 1997; Khoo et al., 1992; Lusis, 2000; Morel et al., 1983; Navab M. et al., 1996). Nur stark oxidiertes („highly-oxidized“) LDL kann von Makrophagen, über Scavenger-Rezeptoren an ihrer Oberfläche aufgenommen und phagozytiert werden und so zur Umwandlung der Makrophagen in sogenannte Schaumzellen (=Lipid-phagozytierende-Makrophagen) führen (Griendling and Alexander, 1997; Han et al., 1997; Khoo et al., 1992; Libby, 2002; Lusis, 2000; Morel et al., 1983; Navab M. et al., 1996; Raines et al., 1996; Ross, 1999). An der Umwandlung des LDL zu „highly-oxidized“ LDL scheinen sowohl Stoffe aus Makrophagen, als auch aus Endothelzellen sowie diverse Enzyme (Myeloperoxidase, Sphingomyelinase, sekretorische Phospholipase) beteiligt zu sein (Lusis, 2000). Die Expression, der sich auf Makrophagen befindenden Scavenger-Rezeptoren SRA und CD36, welche das stark oxidierte LDL binden, wird u.a. durch Zytokine wie den Tumornekrose-Faktor α (TNF- α) aus Makrophagen und Interferon γ (INF- γ) aus T-Zellen reguliert (Tontonoz et al., 1998).

Im Gegensatz dazu haben Anhäufungen schwach oxidierten („minimally-oxidized“) LDLs in der subendothelialen Matrix eine stimulierende Wirkung auf die darüberliegenden Endothelzellen und regen diese zur Produktion von pro-inflammatorischer Faktoren, wie z.B.

dem Monozyten-chemotaktischen-Protein (MCP-1) (Leonard and Yoshimura, 1990), sowie zur erhöhten Expression von a) Adhäsionsmolekülen und b) Wachstumsfaktoren an (Lusis, 2000; Quinn et al., 1987; Rajavashisth et al., 1990).

a) Durch Adhäsionsmoleküle und verschiedene chemotaktische Faktoren kommt es zur Rekrutierung der Leukozyten an das Endothel (Hansson 2005; Lusis, 2000). Lymphozyten und Monozyten, die wahrscheinlich über ihren Rezeptor CCR2 und dessen Bindung an MCP-1 angelockt werden (Boisvert et al., 1998; Boring et al., 1998; Dawson et al., 1999; Gu et al., 1998), können über die erhöhte Expression von Endothelzellrezeptoren wie P-Selektin, E-Selektin, interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) und vaskulär-zelluläre Adhäsionsmoleküle (VCAM-1) an die Endothelwand binden (Collins et al., 2000; Dong and et al, 1998). Auf Monozyten und T-Zellen fungieren dabei Glykokonjugate und Integrine wie z.B. VLA-4 und β_2 -Integrin (Lusis, 2000) als Liganden. Über diese Bindungen kommt es zur Leukozytenadhäsion an das Endothel, man spricht auch vom Entlangrollen der Leukozyten („rolling of leukocytes“) an der Endothelzelloberfläche, bis schließlich die Leukozyten in die Intima eingewandert sind (Lusis, 2000).

b) Wachstumsfaktoren, wie der Makrophagen colony-stimulating-factor (M-CSF) stimulieren die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und deren Proliferation in der Intima (de Villiers et al., 1998; Hansson, 2005; Lusis, 2000; Qiao et al., 1997; Ross, 1999).

Diese subendothelialen Ablagerungen von Lipoproteinen, Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten, sogenannte „fatty streaks“ (Stary et al., 1994), sowie Ansammlungen von Schaumzellen sind eine der ersten histopathologisch nachweisbaren Alterationen der Arterienwand (Hansson 2005; Lusis, 2000; Ross, 1999).

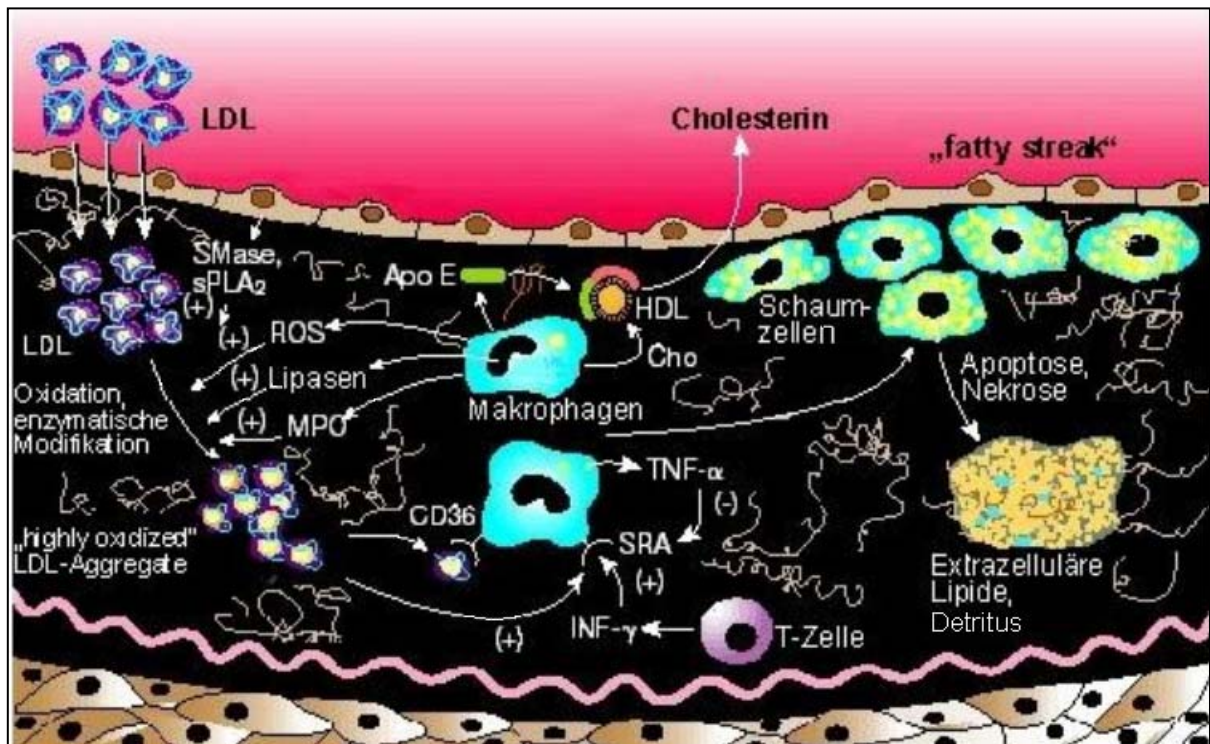


Abbildung 2:

Schaumzellbildung in der Arterienwand. Modifiziert nach Lusis (Lusis, 2000). ROS=Reaktive-Sauerstoff-Spezies; SMase=Sphingomyelinase; sPLA₂=sekretorische Phospholipase; MPO=Myeloperoxidase.

Durch Makrophagen, die Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1), proteolytische Enzyme (spezielle Metalloproteinasen) und Wachstumsfaktoren (z.B. platelet-derived-growth factor (PDGF), insulin-like growth factor) produzieren können (Ross, 1999), kommt es zur Migration und Proliferation glatter Muskelzellen sowie zur Produktion von extrazellulärer Matrix (Lusis, 2000). Aber auch T-Zellen, die über Antigen Präsentation (z.B. oxidiertes LDL (Stemme et al., 1995)) von Makrophagen oder glatten Muskelzellen aktiviert worden sind, können Zytokine (z.B. INT- γ , TNF- α und - β) sezernieren und so zur Bildung eines fibrösen Plaques mitbeitragen (Hansson et al., 1989; Raines et al., 1996). Des weiteren scheint der CD40 Rezeptor, der auf Makrophagen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Lymphozyten exprimiert wird, eine entscheidende Rolle bei der Genese atherosklerotischer Läsionen zu spielen (Hollenbaugh et al., 1995; Schonbeck et al., 2000). Gebunden an seinen Liganden CD40L, kommt es in den entsprechenden Zellen zur Bildung von inflammatorischen Zytokinen, matrixabbauenden Proteasen und Adhäsionsmolekülen (Mach et al., 1997;

Schönbeck et al., 1997; Schonbeck et al., 2000). Der fibröse Plaque formiert sich und kann sowohl in die Adventitia, als auch weit in das Gefäßlumen hinein vordringen. Typischerweise sind diese fortschreitenden Gefäßläsionen durch lipidreiche Nekroseherde mit Zellresten untergegangener Schaumzellen und Ansammlungen glatter Muskelzellen sowie dem Auftreten von extrazellulärer Matrix gekennzeichnet. Meist wird dieser lipidreiche Nekroseherd von einer fibrösen Kappe überlagert, die aus glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix besteht (Hansson 2005). Durch verschiedene proteolytische Enzyme, wie z.B. Metalloproteinasen (Libby, 2002), die aus aktivierten Leukozyten und Makrophagen freigesetzt werden, wird verstärkt extrazelluläre Matrix abgebaut. Die fibröse Kappe, die den Plaque umschließt, wird dünner und poröser, so dass es zur plötzlichen Plaqueruptur kommen kann. Sobald der Plaque rupturiert, gelangen zirkulierenden Blutzellen mit der subendothelialen Matrix in Kontakt, z.B. mit Thrombin und anderen Gerinnungsfaktoren. Die Gerinnungskaskade setzt ein, es kommt zur Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten und somit zur arteriellen Thrombusbildung, welche das Gefäßlumen weiter einengt. Folgen sind z.B. der akute Myokardinfarkt oder der ischämische Schlaganfall.

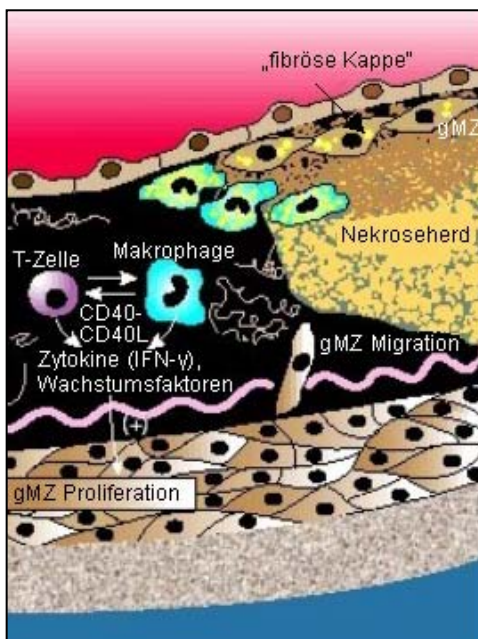


Abbildung 3:

Entstehung eines fibrösen Plaques. Modifiziert nach Lasis (Lasis, 2000).
gMZ=glatte Muskelzelle.

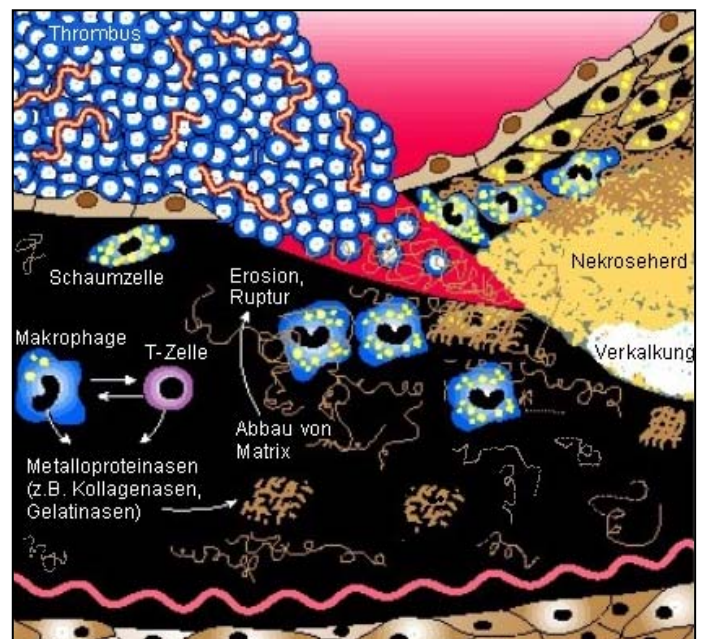


Abbildung 4:

Komplexe atherosklerotische Läsion und Thrombose. Modifiziert nach Lasis (Lasis, 2000).

Atherosklerose kann so als „Antwort auf eine Verletzung“ (response to injury hypothesis), als überschießende Wundheilung, gesehen werden, wobei Lipoproteine oder andere Risikofaktoren wie Nikotin, Diabetes mellitus oder Hypertonus das verletzende Agens darstellen (Lusis, 2000; Ross, 1999).

1.3 Interaktionen zwischen Thrombozyten und der Gefäßwand

1.3.1 Antithrombozytäre Endothelfunktion

Unter physiologischen Bedingungen ist die wichtigste Funktion des Endothels, die Thrombusbildung zu verhindern und so den reibungslosen Blutfluß zu gewährleisten. Dies geschieht einerseits, in dem durch die intakte Endothelzellschicht der Kontakt zwischen dem subendothelialen Bindegewebe und den im Blut zirkulierenden koagulatorischen Stoffen, wie auch den Thrombozyten, verhindert wird. Durch hohe Anteile von Heparansulfat und Chondroitinsulfat an den Membranproteinen besitzt intaktes, unstimuliertes Endothel luminal eine hohe negative Membranladung, die das Adhären der Thrombozyten an das Endothel erschwert (Gimbrone, Jr., 1999). Andererseits kann die Endothelzelle selbst bestimmte antikoagulatorische Faktoren, wie z.B. Prostaglandin I₂ (PGI₂) oder Stickstoffmonoxid (NO) sezernieren (Body, 1996), die bei intaktem Endothel antithrombozytär wirken. Indem PGI₂ und NO die cAMP- bzw. die cGMP-Konzentration in den Thrombozyten erhöhen und so die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration reduzieren, führen sie zur Thrombozyteninaktivierung. Zusätzlich wirken PGI₂ und NO als Vasodilatoren. Auch das Vorhandensein endothelialer ADPasen, die ADP zu AMP und Adenosin abbauen können, wirkt sich negativ auf die Thrombozytenaggregation aus.

Unter pathophysiologischen Bedingungen scheint dieses hämostatische Gleichgewicht zwischen Endothel und Thrombozyt jedoch gestört. Verletzung und Stimulation des Endothels führen zur Freisetzung koagulatorischer Faktoren sowie zu einer erhöhten Adhäsivität des Endothels für Leukozyten und Thrombozyten. Es kommt zur Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten. Erhöhtes und modifiziertes LDL, durch Zigarettenrauch generierte freie Radikale, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, erhöhte

Homocysteinkonzentrationen im Plasma, Infektionen durch Mikroorganismen wie Herpesviren und Chlamydien sowie angeborene genetische Veränderungen sind mögliche Ursachen für eine Endothelverletzung oder für eine endotheliale Dysfunktion (Ross, 1999).

1.3.2 Thrombozytenadhäsion

1.3.2.1 Thrombozyten-Subendothel-Interaktion

Gefäßwand- bzw. Endothelverletzung führen zur Freilegung subendothelialer Matrix. Aufgabe der Thrombozyten ist es, durch Adhäsion an den Läsionsort, den Defekt in der Gefäßwand zu schließen und somit den Blutverlust zu limitieren. Jedoch kann die Thrombozytenadhäsion und -aggregation, z.B. nach atherosklerotischer Plaqueruptur, auch den arteriellen Gefäßverschluß und irreversible Gefäßwandverletzungen zur Folge haben.

In der initialen Kontaktphase zwischen den im Blut zirkulierenden Thrombozyten und der subendothelialen Matrix, scheinen das auf Thrombozyten exprimierte Glykoprotein Iba (GPIb-V-IX) und das Glykoprotein VI (GPVI) entscheidend zu sein. Die Interaktion zwischen GPIb α mit an Kollagen verankertem von Willebrand Faktor (vWF) (Clemetson and Clemetson, 2001; Goto et al., 1998; Ruggeri, 1997; Sixma et al., 1995), sowie die Bindung von GPVI an fibrilläres Kollagen (Massberg et al., 2002), führen zur Rekrutierung von Thrombozyten aus dem Blutstrom an die verletzte Gefäßwand. Durch diese initiale „lose“ Adhäsion (Chen et al., 2002; Jandrot-Perrus et al., 2000; Kasirer-Friede et al., 2002) kommt es nun zur Aktivierung der Thrombozyten und weiterer thrombozytärer Adhäsionsrezeptoren wie GPIIb-IIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) und GPIa-IIa ($\alpha_2\beta_1$) (Gibbins et al., 1997; Kasirer-Friede et al., 2002; Nieswandt et al., 2000; Nieswandt et al., 2001b; Nieswandt et al., 2001a). Diese beiden Rezeptoren sind wesentlich für die „feste“ Adhäsion der Thrombozyten am Subendothel verantwortlich (Nieswandt et al., 2001a; Savage et al., 1998). GPIIb-IIIa, der mit vWF aber auch mit Fibrinogen interagieren kann, ist zusätzlich an der Thrombozytenaggregation beteiligt (Gawaz et al., 1991). Darüber hinaus scheinen auch GPIc-IIa ($\alpha_5\beta_1$), und dessen Ligand Fibronectin, sowie GPIc'-IIa ($\alpha_6\beta_1$), welches an Laminin binden kann, an der „festen“ Adhäsion der Thrombozyten am Subendothel mitzuwirken (Ruggeri, 1994).

1.3.2.2 Thrombozyten-Endothel-Interaktion

Während die molekularen Adhäsionsmechanismen der Thrombozyten an der subendothelialen Matrix bereits gut erforscht sind, bleibt die Interaktion zwischen Thrombozyt und Endothel noch weitgehend unklar.

Während Thrombozyten unter physiologischen Bedingungen nicht mit dem Endothel interagieren (May et al., 1999), können sie nach Stimulation der Endothelzelle an diese adhären (Kaplan et al., 1989). Je nach Aktivierungsgrad des Endothels oder der Thrombozyten sind verschiedene Rezeptoren in die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion involviert. An der initialen Rekrutierung der im Blut zirkulierenden Thrombozyten, d.h. an der „losen“ Adhäsion scheinen vor allem die auf Thrombozyten exprimierte Proteine GPIIb/IIIa (Romo et al., 1999; Theilmeyer et al., 2002) und PSGL-1 (P-Selektin Glykoproteinligand-1) (Frenette et al., 2000) von Bedeutung. In jüngster Zeit wurde gezeigt, dass GPIIb/IIIa sowohl mit P-Selektin (Romo et al., 1999) als auch mit vWF (Andre et al., 2000) interagiert (Theilmeyer et al., 2002), welche beide auf aktivierten Endothelzellen exprimiert werden. Aber auch eine Interaktion zwischen endothelalem P-Selektin und thrombozytärem PSGL-1 wurde von Frenette et al. (Frenette et al., 2000) beschrieben. Diese initiale, „lose“ Adhäsion könnte, wie es auch bei der Thrombozyt-Subendothel-Interaktion der Fall zu sein scheint, zur Aktivierung der Thrombozyten und weiterer Adhäsionsrezeptoren führen. Demnach würde thrombozytäres GPIIb-IIIa, durch diese initialen Adhäsionsvorgänge aktiviert, zur „festen“ Adhäsion des Thrombozyt mit der Endothelzelle beitragen (Li et al., 1996). Als möglicher Ligand könnte der auf dysfunktionellen Endothelzellen exprimierte vWF fungieren. Aber auch die Bindung von GPIIb-IIIa an endotheliales ICAM-1, mittels Fibrinogen, wäre denkbar (Bombeli et al., 1999). Als Quelle für die „festen“ Adhäsionsvorgänge zwischen Thrombozyt und Endothel stehen und bisher nur *in vitro* Studien zur Verfügung (Bombeli et al., 1998).

1.3.3 Thrombozytenaktivierung und Granulasekretion

Durch die Bindung der Thrombozyten an die Gefäßwand, bzw. durch die Bindung eines membrangebundenen Rezeptors an seinen Agonist (z.B. Thrombin, Collagen, Fibrinogen ADP, vWF, TxA₂) werden Thrombozyten aktiviert. Die Thrombozytenaktivierung zeigt sich,

indem die Thrombozyten ihre Form ändern, Glykoproteinrezeptorstrukturen verändern, ihre Granula sezernieren und bioaktive Substanzen freigesetzt werden (Siess, 1989). Dies geschieht über die Rezeptor-Agonist-Bindung, da durch diese Zellmembran-gebundene GTP-Proteine aktiviert und verschiedene „second messenger“, wie Inositol-Triphosphat (IP₃), Diacylglycerol (DAG) und ThromboxanA₂ (TxA₂) gebildet werden (Body, 1996):

Die Phospholipase C und IP₃ induzieren eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration und führen so zur Formänderung der Thrombozyten. Diese morphologische Veränderung resultiert in einer vergrößerten Oberfläche der Thrombozyten, die so verstärkt mit im Plasma vorhandenen koagulatorischen Stoffen interagieren können (Gawaz, 2001, S. 15).

Durch die Aktivierung der Proteinkinase C kommt es zur Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors (GPIIb-IIIa). Der aktivierte Rezeptor ist nun in der Lage die Thrombozyten untereinander zu vernetzen und führt so zur Thrombozytenaggregation (Body, 1996). Ferner kommt es über die Proteinkinase C zu intrazellulären Proteinphosphorylierung und zur Granulasekretion in die Umgebung der adhärenen Thrombozyten. Die α Granula der Thrombozyten enthalten viele Enzyme (z.B. α_1 -Antitrypsin, C1-Esteraseinhibitor), Adhäsionsproteine (z.B. Vitronectin, Thrombospondin, P-Selektin), Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF), Koagulationsfaktoren (z.B. Plasminogen, Protein S) sowie zytokinähnliche Proteine wie Interleukin-1 (IL-1), CD40 Ligand (CD40L), Plättchenfaktor 4 (PF4) und β -Thromboglobulin (Gawaz, 2001). β -Thromboglobulin, sowie PF4 könne die antikoagulatorische Aktivität des Heparins antagonisieren und wirken zusätzlich chemotaktisch auf Leukozyten und Fibroblasten. Der Wachstumsfaktor PDGF stimuliert die Mitose in den Fibroblasten die sich in der Umgebung der aktivierten Thrombozyten befinden und fördert so den proliferativen Prozess an der verletzten Gefäßwand (Gawaz, 2001, S.22). Weitere proinflammatorische Faktoren wie Interleukin-1 und der CD40 Ligand ändern die adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften des Endothels.

Zusätzlich wird über die Aktivierung eines G-Proteins, Phospholipase A₂ aus der Zellmembran abgespalten und führt, stimuliert durch erhöhtes intrazelluläres Ca²⁺, zur Bildung von Arachidonsäure und zur Entstehung von TxA₂ (Body, 1996). TxA₂ wirkt als ein starker Vasokonstriktor und fördert so im Bereich von Gefäßverkalkungen die Thrombusbildung. Daneben fungiert thrombozytäres TxA₂ als Thrombozytenagonist (Body, 1996), so dass es auch durch autokrine Mechanismen zur Thrombozytenaktivierung kommt.

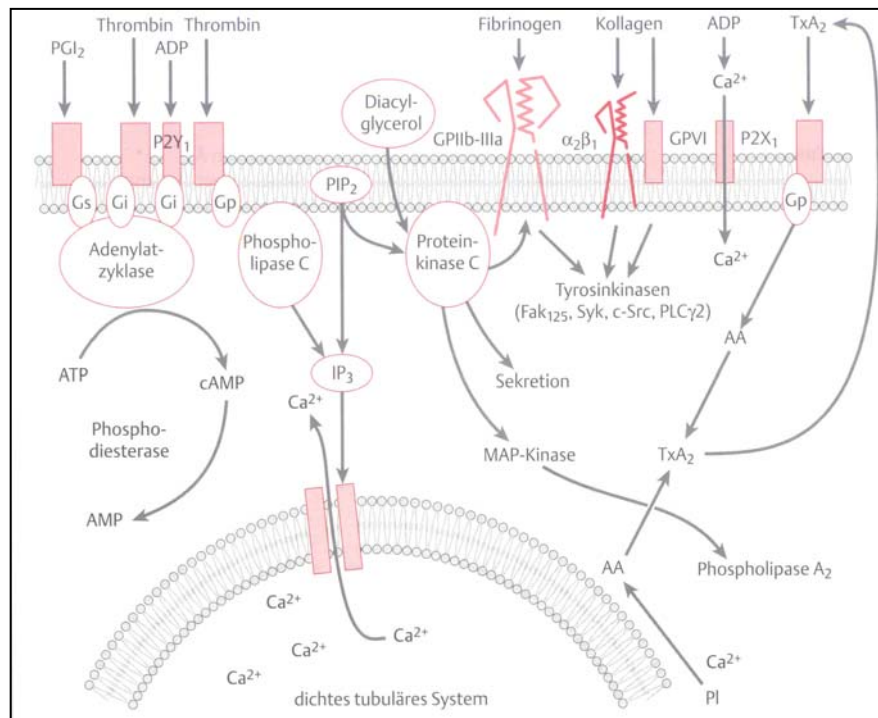


Abbildung 5:

Mechanismen der Signalübertragung bei der Thrombozytenaktivierung aus Gawaz (Gawaz, 2001, S.16), modifiziert nach Brass (Brass et al., 1997).

1.3.4 Thrombozyten und Inflammation

In vergangenen Studien (Frenette et al., 1996; Massberg et al., 1998; Massberg et al., 1999a) wurde gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten potente zytokinähnliche Substanzen (IL-1, CD40Ligand) sezernieren und so die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften des Endothels ändern (Dickfeld et al., 2001; Gawaz et al., 1998; Gawaz et al., 2000; Henn et al., 1998). Die aktivierten Thrombozyten können mittels IL-1 und CD40L die Expression des nukleären Transkriptionsfaktors NF-κB stimulieren und induzieren so die Transkription von NF-κB regulierten Genprodukten, wie z.B. MCP-1, VCAM, ICAM (Gawaz, 2001, S.98). MCP-1 ist einer der wichtigsten chemotaktischen Faktoren für Monozyten. Die Endothelrezeptoren ICAM-1 und VCAM-1 begünstigen die Adhäsion von angelockten

Monozyten an das Endothel. NF- κ B, MCP-1, ICAM-1 und VCAM-1 konnten in hohen Konzentrationen in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Brand et al., 1996; Gawaz et al., 2000). Zusätzlich stimulieren aktivierte Thrombozyten über die Produktion des platelet-derived growth factors (PDGF) die Migration von glatten Muskelzellen in die Gefäßwand (Gawaz, 2001, S.98).

Der beschriebene Kenntnisstand zeigt, dass die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktionen sehr komplex sind, und dass sie, über die Endotheladhäsion und die Aktivierung der Thrombozyten, sowie durch die Ausschüttung proinflammatorischer Faktoren, auf zahlreichen verschiedenen Wegen zur Entzündungsreaktion führen können. Indem sie durch ihre Endotheladhäsion Signale zur Anlockung und Einwanderung von Monozyten während der Plaqueentstehung generieren (Gawaz, 2001, S.98), könnten Thrombozyten bereits in der initialen Phase der Atheroskleroseentstehung von zentraler Bedeutung sein. *In vivo* ist die Relevanz der Thrombozyten in der Anfangsphase der Atherogenese jedoch noch nicht ausreichend belegt.

1.4 Mausmodell der Atherosklerose

Um die komplexen, multifaktoriellen Prozesse der Atheroprogression besser verstehen zu können, sowie die daran beteiligten zellulären und molekulären Interaktionen aufzufindig zu machen, benötigt es die Hilfe eines Tiermodells. Viele Arbeitsgruppen wählen für ihre experimentellen Untersuchungen die Maus, da diese auf molekular-genetischer Ebene bereits sehr gut erforscht ist und sie zu dem über eine gute Handbarkeit und Wirtschaftlichkeit verfügt.

Die Spezies Maus ist prinzipiell gegen Atherosklerose resistent, so dass es eines genetisch veränderten Mausmodells bedarf, welches die Maus für die Krankheit empfänglich macht. Durch gezielte Mutationen entstanden in den vergangenen Jahren verschiedene Mausmodelle, wie die Apolipoprotein E defiziente (ApoE^{-/-}), oder die low-density-lipoprotein-Rezeptor defiziente (LDLR^{-/-}) Maus. Diese können komplexe atherosklerotische Läsionen entwickeln und machen es so möglich, die Pathogenese der Atherosklerose am Tier zu erforschen

(Breslow, 1996; Plump, 1997; Smithies and Maeda, 1995) und die gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen.

Mit Hilfe von genetischen knock-out Techniken wurde 1992 in zwei Forschungsgruppen die Apolipoprotein defiziente Maus entwickelt (Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992). ApoE, welches hauptsächlich in der Leber gebildet wird, ist ein Oberflächenbestandteil von Lipoproteinpartikeln, wie Chylomikronen, VLDL (very-low-density-lipoprotein) und HDL (high-density-lipoprotein). Es transportiert die ansonsten wasserunlöslichen Lipide im Plasma und dient als Ligand zur Erkennung der Lipoproteine von ihren Lipoproteinrezeptoren (Knouff et al., 1999). Somit kann es, durch die Bindung der Lipoproteine an ihre Rezeptoren, die Clearance der Lipoproteine aus dem Plasma regulieren. Bei der ApoE defizienten Maus ist demnach die Aufnahme der Lipoproteine aus dem Plasma verzögert. Es kommt zur Akkumulation von Chylomikronenbestandteilen und VLDL-Partikeln, welche reich an verestertem und freiem Cholesterin sind. Die Folge ist, dass trotz einer normalen, d.h. einer cholesterin- und fettarmen Fütterung die Cholesterinspiegel im Plasma von ApoE knock-out Tieren auf über 400mg/dl ansteigen (Breslow, 1996), während bei normal gefütterten Wildtypmäusen Werte kleiner 100mg/dl gemessen werden. Dagegen steigen bei einer cholesterin- und fettreichen Kost, die mindestens 0,15% Cholesterin und 21% Fett („Western-type diet“) enthält, die Cholesterinspiegel in ApoE^{-/-} Tieren nochmals um das 3- bis 4-fache an, d.h. auf ca. 1500-2000 mg/dl (Breslow, 1996).

Den erhöhten Lipidspiegeln entsprechend kommt es bei allen ApoE^{-/-} Mäusen spontan zur Entwicklung von atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen. Wie auch beim Menschen werden als erstes die sogenannten „fatty streaks“ sichtbar, die sich im Laufe der Zeit zu fibrösen atherosklerotischen Läsionen ausdehnen und bei stark erhöhten Cholesterinspiegeln weiter an Größe und Komplexität zunehmen (Zhang et al., 1992; Nakashima et al., 1994; Reddick et al., 1994; Zhang et al., 1994). Diese atherosklerotischen Plaques ähneln sowohl vom Aufbau als auch vom Ort des Auftretens denen des Menschen (Nakashima et al., 1994; Reddick et al., 1994). Die typischerweise betroffenen Stellen des Gefäßsystems sind bei Mensch und Maus Orte wie Bifurkationen und Gefäßabzweigungen, an denen durch Störungen des laminaren Blutflusses Scherkräfte entstehen (Knowles, 2000).

Die ApoE^{-/-} Maus stellt somit ein ideales Atherosklerosemodell da, an hand dessen die komplexen zellulären und molekularen Interaktionen der Atheroprogression erforscht werden können.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Thrombozyten und deren Interaktionen mit dem Endothel in der Anfangsphase der Atheroskleroseentstehung zu untersuchen. Dabei galt es insbesondere zu klären, in wie weit Thrombozyten an dem initialen Prozess der Atherogenese beteiligt sind und welchen Einfluss sie auf das Fortschreiten der Atherosklerose haben. Folgende Fragen sollten im Detail geklärt werden:

1. Findet eine Thrombozyten-Endothel-Interaktion in der frühen Phase der Atherosklerose (vor der Entstehung atherosklerotischer Plaques) *in vivo* statt?
2. Welche molekularen Mechanismen liegen der Thrombozyten-Endothel-Interaktion zu Grunde?
3. Welche Bedeutung besitzt die Thrombozyten-Endothel-Interaktion in Bezug auf die Atheroprogession?

Dieses sollte mit Hilfe der ApoE-defizienten (ApoE^{-/-}) Maus untersucht werden. Die ApoE-knock-out-Maus entwickelt nach cholesterinreicher Fütterung ähnliche atherosklerotische Läsionen wie der Mensch.

Diesem Konzept folgend ließ sich die experimentelle Arbeit in drei Abschnitte gliedern.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo* in der A. carotis von ApoE^{-/-} Mäusen in frühen und späten Atherosklerosestadien untersucht werden. Dabei galt es einerseits zu definieren, in wie weit eine Thrombozytenadhäsion an die intakte Gefäßwand der ApoE^{-/-} Maus stattfindet und andererseits deren Auswirkungen auf die intimale Entzündungsreaktion zu untersuchen.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit sollte dann durch akute Inhibition der Thrombozyten-Endothel-Interaktion in ApoE^{-/-} Mäusen, die molekularen Mechanismen der Thrombozytenadhäsion an das Endothel bestimmt werden.

Im letzten Abschnitt der Arbeit galt es durch permanente Inhibition der Thrombozytenadhäsion, die Rolle der Thrombozyten in der Atheroprogression, sowie deren Auswirkung auf die vaskuläre Inflammation zu untersuchen. Dazu wurden die A. carotis, die Aorta sowie die Koronararterien der ApoE^{-/-} Maus exemplarisch ausgewählt.

3 Material und Methodik

3.1 Vorbemerkung

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes, durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an klinisch gesunden, männlichen C57BL/6-ApoE^{-/-} Mäuse (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) mit einem Gewicht von ca. 20g durchgeführt. Im Alter von 4 Wochen wurden diese von dem Muttertier abgesetzt und mit der Fütterung einer cholesterinreichen Diät (Western-type-diet, Harlan-Winkelmann, Niederlande) begonnen. Die Fütterungsdauer entsprach je nach Versuchsansatz 6, 14 oder 18 Wochen (n=20 pro Gruppe). Als Kontrolltiere wurden männliche C57BL/6J Wildtyp Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Diese Tiere erhielten herkömmliches Nagerfutter (Fa. Altromin, Lage, Deutschland).

Den ApoE-knock-out Mäusen, sowie den Wildtyp Mäusen standen Wasser und Futter nach belieben frei zur Verfügung. Beleuchtet wurden die Käfige mit maximal 500 Lux in geregelter Tag-Nacht-Rhythmus. Die Einstreu bestand aus entkeimten und entstaubten Weichholzgranulat (Tiereinstreu „Faser“, Fa. Altromin, Lage, Deutschland), welches zweimal wöchentlich gewechselt wurde. Die Raumtemperatur betrug bei konstantem Luftwechsel 20-25°C, die Luftfeuchtigkeit 60-70%.

3.3 In Vivo Fluoreszenzmikroskopie

3.3.1 Intravitalmikroskopie

Die Adhäsionsdynamiken der Thrombozyten und Leukozyten im Prozess der Atherogenese wurden *in vivo*, mit Hilfe der Video-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden 10

(n=20) und 22 (n=20) Wochen alte ApoE^{-/-} Mäuse, die dementsprechend 6 bzw. 18 Wochen eine cholesterinreiche Fütterung erhalten hatten, untersucht. Aus beiden Fütterungsgruppen wurden jeweils 10 ApoE^{-/-} Tiere, die anderen 10 ApoE^{-/-} Mäuse dienten als Thrombozyten Spendertiere, durch eine intraperitoneale Injektion anästhetisiert. Die applizierte Narkose bestand aus einer Kombination von Midazolam (5mg/kg Körpergewicht, Ratiopharm, Ulm, Deutschland), Medetomidin (0,5mg/kg Körpergewicht, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und Fentanyl (0,5mg/kg Körpergewicht, CuraMed Pharma GmbH, München, Deutschland). Nach Fixierung der Mäuse in Rückenlage auf einer Wärmematte (Fa. Dehner, München, Deutschland), wurde die rechte A. carotis communis vorsichtig ca. 3 mm distal und 7 mm proximal der Carotidenbifurkation freigelegt und zur Einstellung eines besseren Kontrasts ein Stück schwarze Folie zwischen das Gefäß und das umliegende Gewebe geschoben.



Abbildung 6:

Darstellung der für die Intravitalmikroskopie freigelegten Carotiden, der auf einer Wärmematte fixierten Maus.

Anschließend erfolgte die Implantation eines Polyethylenkatheter (SIMS Portex, Hythe, England) in die rechte V. jugularis, um über diesen die fluoreszenzgefärbten Thrombozyten, sowie den Fluoreszenzfarbstoff für die *in vivo* Färbung der Leukozyten injizieren zu können. Die Thrombozyten wurden wie unter 3.3.2. beschrieben isoliert und mit 2,7-Dichlordihydrofluorescein-Diacetat (DCF) markiert. Die Anfärbung der Leukozyten geschah *in vivo* durch intravenöse Injektion von 100µl 0,02% Rhodamine 6G (Molekularproben, Leiden, Niederlande).

Daraufhin wurde die A. carotis mit einem Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop (Axiotech^{vario} 100 HD, Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) und einer Quecksilber-Kurzbogenhöchstdrucklampe (Hg-Höchstdrucklampe, HBO 100 W, Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) betrachtet. Diese Lampe weist ein entsprechendes Strahlenspektrum für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe auf. Um die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe der Thrombozyten und Leukozyten sichtbar zu machen, verwendeten wir im Mikroskop unterschiedliche Filter (Filter für die Thrombozytendetektion: Filterset 09, Filter für die Leukozytendetektion: Filterset 15, beides Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland). So konnte die Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion, durch das Wechseln der Filter, gleichzeitig an einem Versuchstier untersucht werden. Zur Übersichtsdarstellung wurde die A. carotis anfänglich in 2,5-facher Vergrößerung mikroskopiert und zwei senkrechte Achsen durch den Ursprung der A. carotis interna und externa gezogen. Daraufhin konnte eine dritte Linie, die die zwei senkrechten Achsen an der Stelle, an der sie die Gefäßwand kreuzen miteinander verbindet, erstellt werden. Die Thrombozyten und Leukozytenadhäsion wurden unter 20-facher Vergrößerung in einem 200µm x 100µm großem Gebiet, Fläche A (siehe Abbildung 7), welches an diese dritte Linie angrenzt, bestimmt. Die Fläche A lag somit exakt an der Carotidenbifurkation, und damit an einer Stelle an der es durch Einwirkungen erhöhter Scherkräfte verstärkt zur arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen kommt (Prädilektionsstelle). In einem weiteren Versuchsansatz wurde zusätzlich eine Fläche B (keine Prädilektionsstelle für arteriosklerotische Läsionen) (siehe Abbildung 7), im proximalen Teil der A. carotis communis, ca. 500µm stromaufwärts der Carotidenbifurkation untersucht.

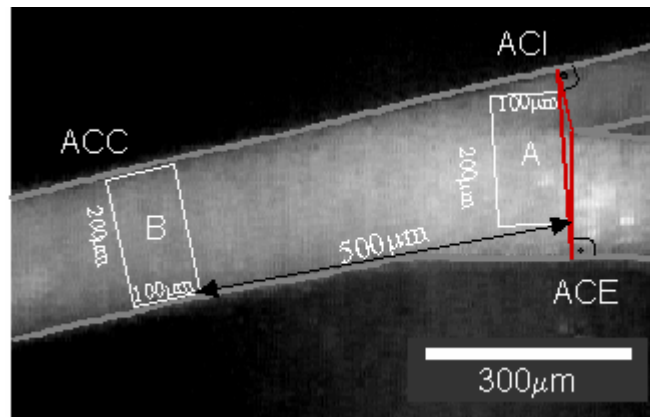


Abbildung 7:

Analyse der Thrombozytenadhäsion an die A. carotis.

Fläche A: Carotidenbifurkation (Prädilektionsstelle für atherosklerotische Läsionen).

Fläche B: 500µm proximal der Carotidenbifurkation (keine Prädilektionsstelle für atherosklerotische Läsionen).

ACC = Arteria carotis communis, ACE = Arteria carotis externa, ACI = Arteria carotis interna.

Alle mikroskopierten Bildsequenzen wurden mit einer „charge coupled device“ (CCD) - Kamera (FK 90-IQ-S, Fa. Pieper, Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen und mittels eines an eine Monitoreinheit angeschlossenen Videogerätes aufgezeichnet (Videogerät: Panasonic AG-7355, Monitor: Sony PVM-20M7MDE, beides Fa. Videocation, München, Deutschland). Anschließend erfolgte die Auswertung zeitlich unabhängig von der Intravitalmikroskopie, im Bild-zu-Bild-Verfahren. Dass heißt, alle Bilder wurden einzeln und nacheinander, durch ein Auswertungsprogramm (Cap Image 7.1, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland (Massberg et al., 1998; Massberg et al., 1999a)) beurteilt. Zeitweise adhärenente, d.h. „lose adhärenente“ Zellen wurden definiert als diejenigen Zellen, die eine imaginäre Achse durch das Gefäß bei einer signifikant niedrigeren Geschwindigkeit als die Geschwindigkeit im Zentrum des Gefäßes, kreuzten. Ihre Anzahl wurde in Zelle pro mm^2 Endothelzelloberfläche angegeben. Die Anzahl der „fest adhärenenten“ Zellen (Leukozyten oder Thrombozyten) wurde festgesetzt, in dem die Zellen, die sich nicht bewegten oder sich innerhalb von 20 sek. nicht von der endothelialen Oberfläche ablösten, gezählt wurden. Die Auszählung der Zellen erfolgte, indem auf den Bildschirm ein ausgemessenes Fenster aufgeklebt wurde. Dieses hatte bei 20-facher Vergrößerung eine definierte Seitenlänge von $100 \times 200 \mu\text{m}$. Daraus ergibt sich für die Anzahl der Zellen pro Gefäßoberfläche folgende Formel:

$$A = d \cdot \pi \cdot 2 \cdot \sin^{-1}\left(\frac{b}{d}\right) \cdot l$$

A=Anzahl der Zellen/Gefäßoberfläche

d= Gefäßdurchmesser [μm]

b= Breite des Messfensters [μm]

l= Länge des Messfensters [μm]

Wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte, entwickelten Wildtyp Mäuse über den gesamten Zeitraum der Untersuchungen keinerlei atherosklerotische Gefäßwandveränderungen. So dienten als Vergleichsgruppe für alle ApoE knock-out Versuche, jeweils acht Wochen gefütterte, das heißt 12 Wochen alte Wildtyp Mäuse.

3.3.2 Thrombozytenpräparation

Um die Thrombozytenadhäsion und -aggregation mittels Intravitalmikroskopie zu untersuchen, wurden von jeweils 10 ApoE^{-/-} Mäusen einer Gruppe, die zuvor durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene®, Abbott) anästhesiert worden waren, Blut entnommen. Ca. 1ml Vollblut wurde so durch vorsichtige kardiale Punktion gewonnen und mit 100 μl Citrat ungerinnbar gemacht. Diese Blutmenge wurde nun mit Tyrodes-Puffer (ph=6,5) auf ein Volumen von 2ml aufgefüllt und zentrifugiert. Der Tyrodes-Puffer setzte sich aus 0,4g bovinem Serumalbumin (A-8022, SIGMA Chemical, Steinheim, Deutschland) und 0,4g D(+)-Glucose zusammen, die in 40ml Tyrodes aufgelöst wurden und anschließend, auf ein Volumen von 400ml mit Aqua dest. aufgefüllt wurde. Die ph-Wert Einstellung erfolgte auf ph=6,5 und ph=7,4 mit HEPES Puffer und HCl. Nachdem das Blutgemisch 20 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert wurde (Haerus, Megafuge, Hanau, Deutschland) setzte man dem „plättchenreichem Plasma“ (PRP) 20 μl des Fluoreszenzfarbstoff DCF (2,7-Dichlorodihydrofourescin-Diacetat, Fa. Molecular Probes, USA) hinzu und füllte dieses mit Tyrodes-Puffer (ph=6,5) auf 4 ml auf. Nachdem das PRP-Farbstoff-Gemisch ca. 2 Minuten im Dunklen inkubiert wurde, begann man erneut, diesmal für 10 Minuten bei 2400 rpm, zu zentrifugieren und anschließend das dabei entstandene Thrombozyten-Pellet mit Tyrodes-Puffer (zu gleichen Anteilen mit ph=6,5 und ph=7,4) zu resuspendieren. Die mit DCF

markierte Thrombozytenlösung wurde dann auf eine endgültige Konzentration von 120.000 Thrombozyten/ μ l verdünnt und intravenös über den V. jugularis Katheter in die Empfängertiere injiziert.

Dieses Verfahren der Thrombozytenpräparation erfordert eine sehr vorsichtige und exakte Vorgehensweise, da sichergestellt werden muss, dass es dabei nicht zur Thrombozytenaktivierung kommt. In vergangenen Studien (Massberg et al., 1998) konnte allerdings bei entsprechender Vorgehensweise eine relevante Thrombozytenaktivierung ausgeschlossen werden.

3.4 Histologie und Immunhistologie

Um das Ausmaß und die Progredienz der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand darstellen zu können, wurden alle Mäuse nach Durchlaufen der Intravitalmikroskopie (auch die Thrombozyten-Spendertiere) durch Entbluten geopfert und der verbleibende Gefäßbaum in situ mit 4% Paraformaldehyd (ph=7) perfusionsfixiert. Anschließend wurden die Carotiden, Aorten und Herzen für die histomorphometrische Untersuchung nach einem standardisierten Protokoll wie folgt, entnommen.

3.4.1 A. carotis

Die heraus präparierten Carotiden wurden mit 4% Paraformaldehyd 24 h lang fixiert und anschließend über Nacht, 24 h entwässert (Geschlossener Gewebeeinbettautomat PC 1044-12V, Fa. Shandon, Frankfurt, Deutschland).

Ein Teil der Carotiden wurde für die histologische Untersuchung in Paraffin eingebettet. Dazu wurden die Carotiden „stehend“ mit Hilfe einer Pinzette, in die Mitte rechteckiger Einbettkassetten (EinbettSchälchen, Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland) platziert und mit flüssigem, 70°C warmen Paraffin übergossen. (Einbettautomat TBS 88, Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland). Von dem abgekühlten, festen Paraffinblock wurden mittels Mikrotom (HM 335E, Fa. Microm, Walldorf, Deutschland) 2 μ m dicke Serienschnitte, beginnend von der Mitte der A. carotis communis bis kurz nach der Bifurkation angefertigt. Zur Beurteilung der Plaqueausprägung wurden die 20 Schnitte stromabwärts der Carotidenbifurkation genutzt. Es

wurde eine Übersichts- (Hämatoxylin und Eosin) und eine Gefäßfärbung (Elastica-van-Giesson) angefertigt (Färbeautomat TST 50, Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland).

Bei einem anderen Teil der Carotiden wählten wir die SudanIII Färbung, um das Ausmaß der Atherosklerose in situ darzustellen. Diese Färbemethode dient zur Beurteilung der frühen Gefäßwandveränderungen, da hier alle Fetteinlagerungen in die Gefäßwand deutlich rot dargestellt werden. Aus jeder Gruppe wurden 5 Carotiden longitudinal eröffnet, nachdem sie für maximal 12 h in 4% Paraformaldehyd (pH=7) perfusionsfixiert und von jeglichem periadventitialen Fett und Bindegewebe befreit worden waren. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten in 70% Alkohol erfolgte die Anfärbung mit SudanIII (Sudan III C.I. 26100, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) für ca. 20-25 Minuten und nach mehrfacher Spülung in destilliertem Aqua die Fixierung der angefärbten Carotiden mittels Glycerol Gelatine (Aquatex, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) auf Objektträgern. Die histologischen Schnitte wurden mit einem digitalen Kamerasystem für Mikroskope (Axiovision, Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) abfotografiert und mit dem Computerprogramm Cap Image (Cap Image 7.4, Dr. Zeintl, Deutschland) ausgewertet, so dass die mit SudanIII angefärbte Plaqueoberfläche quantifiziert und die Plaqueausdehnung in μm^2 angegeben werden konnte.

3.4.2 Herz mit Aortensinus und Koronararterien

Von den heraus präparierten und 24h lang fixierten Herzen, mit erhaltendem Gefäßstumpf der Aorta ascendens, wurden nun von distal her 4 mm der Herzspitze, senkrecht zur Herzachse mit Lineal und Skalpell abgetrennt.

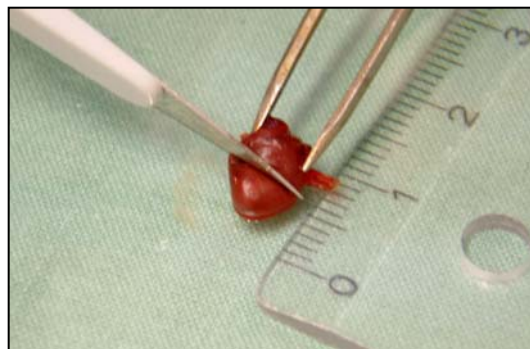


Abbildung 8:

Abtrennung der Herzspitze.

Nachdem die Herzen 24h lang entwässert wurden, erfolgte die Einbettung des proximalen Herzabschnittes (siehe 3.4.1). Von den Herzen wurden Serienquerschnitte von distal nach proximal angefertigt, die wie unter 3.4.1. beschrieben, angefärbt wurden. Um bei allen Herzen von einer standardisierten Stelle ausgehen zu können, wählten wir den Abgang der linken Koronararterie aus dem Aortensinus ca.1 mm oberhalb der Aortenklappe als Bezugspunkt.

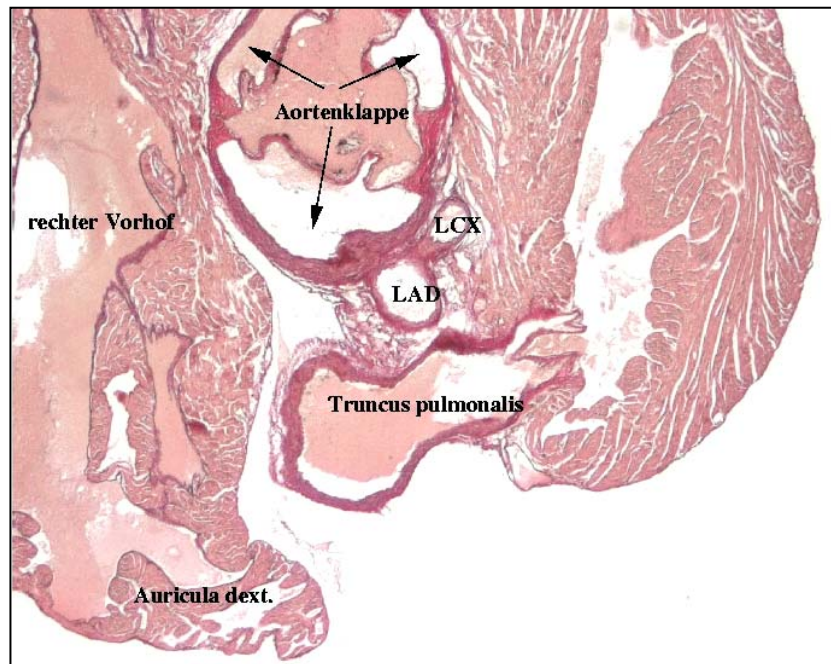


Abbildung 9:

Abgangsstelle der Koronararterien aus dem Aortensinus.

LAD = Arteria coronaria sinistra, LCX = Ramus circumflexus.

Von den 60 Serienquerschnitten à 2 µm Dicke, von denen 30 oberhalb und 30 unterhalb der besagten Stelle lagen, wurde zur Auswertung jeder dritte Schnitt, d.h. insgesamt 20 Schnitte verwendet. Jeder dieser Schnitte wurde bei 10-facher Vergrößerung mikroskopiert und mit einer, an den Computer angeschlossenen digitalen Kamera (Axiovision, Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) abfotografiert. Um die Plaquerfläche quantifizieren zu können, wurden die abfotografierten histologischen Bilder verblindet mit dem Auswertungsprogramm Cap Image beurteilt. Dabei wurde die Plaquerfläche ins Verhältnis zur „vessel area“ (von der Adventitia umgebene Fläche) gesetzt (Johnson et al., 1997; Methia et al., 2001), um eventuelle

Schwankungen in der Gefäßgröße auszugleichen. Die Plaquefläche des Gefäßes berechnete sich aus der Differenz der „intimal area“ und der „luminal area“ (siehe Abbildung 10). So ergibt sich für die Auswertung der Plaquefläche im Bezug auf die Gesamtgröße des Gefäßes folgende Formel:

$$\text{Plauefläche} = (\text{Intimal area} - \text{Luminal area}) / \text{Vessel area}$$

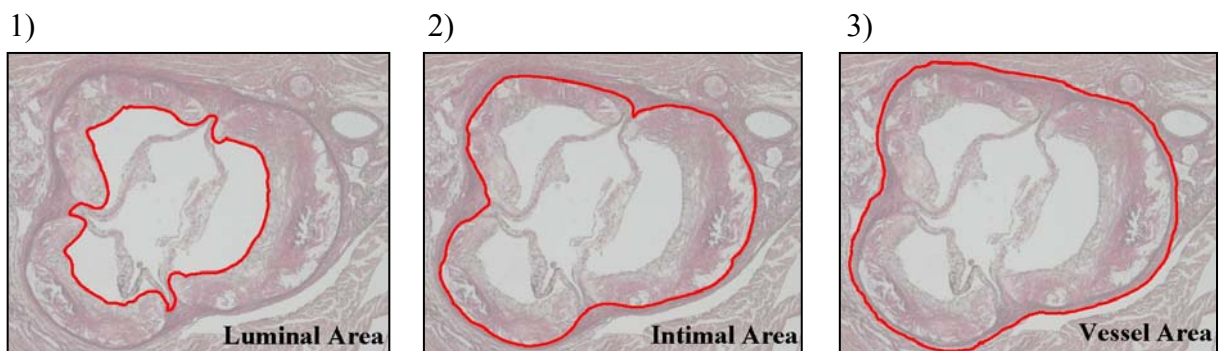


Abbildung 10:

Schematische Darstellung der histomorphometrischen Auswertung.

1) „Luminal Area“ = freies Gefäßlumen.

2) „Intimal Area“ = Fläche des von der Intima begrenzten Gefäßlumens.

3) „Vessel Area“ = Gesamtgröße des Gefäßes.

3.4.3 Aorta

Für immunhistologische Studien wurden aus den verschiedenen Fütterungsgruppen Aorten entnommen und in Kryoblock (Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland) eingebettet. Von den Aorten wurden 5µm dicke Seriengefrierschnitte angefertigt und mit anti-VCAM-1 (polyklonales Ratten IgG) oder anti-MCP-1 (polyklonles Ziegen IgG) angefärbt. Die Antikörper wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Kalifornien, USA) bezogen. Um die Antigene für die Antikörperfärbung zu demaskieren, wurden die Objektträger für ca. 10 Minuten in 4°C kaltes Aceton gelegt und anschließend mehrfach mit „phosphat buffered saline“ (PBS) gespült. Danach wurden sie 20 Minuten in einer Lösung aus 0,3% Wasserstoffperoxid und Methanol eingelegt, und schließlich wiederholt mit PBS gespült. Die Anfärbung der Objektträger mit den Antikörpern geschah maschinell

(Färbeautomat TechMate, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark; Programm PolyA25M, Vectastain Elite ABC-Kit, Fa. Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland). Die Auswertung der anti-VCAM-1 angefärbten Objektträger erfolgte subjektiv, je nach Stärke der Anfärbung. Dabei wurde nach Anfärbung „einzelner Zellen“ (+), „kleiner Zellgruppen“ (++) und „ganzer Zellverbände“ (+++) unterschieden.

3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die Rekrutierung von Monozyten in die Intima der A. carotis communis und der Aorta descendens zu bestimmen, wurden schock gefrorene Gewebeproben entnommen und mit Hilfe von RT-PCR (reverse Transkriptase-PCR) auf CD14 und CD11b mRNA Expression hin untersucht. Die dabei verwendeten Primer Paare waren: CD11b vorwärts: 5'-CTG GTC CAA AGC TTG GTT TT-3', CD11b rückwärts: 5'-AGC CAT CCA TTG TGA GAT CC-3', CD14 vorwärts: 5'-TAC CGA CCA TGG AGC GTG TG -3' und CD14 rückwärts: 5'-GCC GGT TAC CTC GAG ATT TT-3'. Die 18s ribosomale RNA wurde als Amplifikationskontrolle benutzt (vorwärts: 5'-CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA-3' und rückwärts: 5'-GCT GGA ATT ACC GCG GCT-3').

3.6 Versuchsablauf

3.6.1 Thrombozyten- und Leukozyteninteraktion im zeitlichen Verlauf der Atherosklerose

3.6.1.1 Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo*

Intravitalmikroskopisch wurde die Thrombozytenadhäsion am Endothel der A. carotis von ApoE^{-/-} Mäusen, direkt an der Carotidenbifurkation (Fläche A) untersucht. Dabei erfolgte die Präparation der Tiere, wie unter Abschnitt 3.3.1. beschrieben. Bei jungen (10 Wochen, n=10) und alten (22 Wochen, n=10) ApoE^{-/-} Mäusen wurde die Thrombozytenadhäsion an die

Carotidenbifurkation bestimmt. Als Vergleichsgruppe dienten 12 Wochen alte Wildtyp Mäuse.

In einem weiteren Versuchsansatz widmeten wir uns der Frage, ob die Thrombozytenadhäsion nur auf die Carotidenbifurkation (Prädilektionsstelle für atherosklerotische Läsionen) begrenzt ist, oder vielmehr im gesamten Verlauf der A. carotis zu finden ist. So wurde die Thrombozytenadhäsion an der Carotidenbifurkation (Fläche A, siehe Abbildung 7) und im proximalen Teil der A. carotis communis, ca. 500µm stromaufwärts der Carotidenbifurkation (Fläche B, siehe Abbildung 7) in jungen (10 Wochen, n=8) und in älteren ApoE^{-/-} Mäusen (22 Wochen, n=8) untersucht.

Die Auswertung erfolgte wie unter Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

3.6.1.2 Charakterisierung der intimalen Entzündungsreaktion

In diesem Versuchsansatz wendeten wir uns der intimalen Entzündungsreaktion und der Rekrutierung der Leukozyten an das Endothel der A. carotis von ApoE^{-/-} Mäusen zu. Wir bedienten uns der intravitale Fluoreszenzmikroskopie, um die Leukozytenadhäsion an die Carotidenbifurkation von jungen (10 Wochen) und alten (22 Wochen) ApoE knock-out Tieren zu bestimmen. Die Vorgehensweise, wie bereits unter 3.3.1. beschrieben, entsprach der, die auch bei der Untersuchung der Thrombozytenadhäsion angewandt wurde.

Nach der Intravitalmikroskopie wurden die Mäuse euthanisiert und der arterielle Gefäßbaum herausgelöst. Dieser konnte nun histologisch, sowie immunhistologisch, wie unter Abschnitt 3.4 erklärt, untersucht und ausgewertet werden. Um das Ausmaß und die Progression atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen beurteilen zu können, wurde ein Teil der Carotiden histologisch aufgearbeitet (H&E und SudanIII Färbungen). An der Aorta wurden immunhistologische Untersuchungen zur intimalen Entzündungsreaktion durchgeführt (anti-VCAM-1 Färbung).

3.6.2 Mechanismen der initialen Thrombozytenadhäsion

Um die molekularen Mechanismen der Thrombozytenadhäsion an das Endothel in dem frühen Stadium der Atherosklerose *in vivo* bestimmen zu können, gingen wir wie in Abschnitt 3.3.1

vor. Allerdings inkubierten wir die mit 2,7-Dichlordihydrofluorescein-Diacetat (DCF) markierten Thrombozyten vor Injektion in 10 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäuse mit einem Antikörper. Bei diesem Versuch wurden ausschließlich sechs Wochen gefütterte ApoE knock-out Mäuse verwendet, da diese, wie in Vorversuchen gezeigt werden konnte, bereits eine signifikant gesteigerte Adhäsion aufweisen, atherosklerotische Läsionen jedoch noch vollständig fehlen. Die auf eine Konzentration von 50×10^6 Thrombozyten/250 μ l verdünnte Fluoreszenz-Wildtyp-Thrombozytenlösung wurde je nach Indikation entweder mit 50 μ g/ml anti-GPIIb α (n=4; p0p/B-FAB, Arbeitsgruppe Nieswandt, Witten/Herdecke, Deutschland) oder 50 μ g/ml anti-GPIIb-IIIa (n=4; JON/A-F(ab)₂, Arbeitsgruppe Nieswandt, Witten/Herdecke, Deutschland (Nieswandt et al., 2001c)) versetzt und anschließend, nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten, in die rechte V. jugularis injiziert.

Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie unter Abschnitt 3.3.1. beschrieben mittels Intravitalmikroskopie. Als Bezugsgruppe dienten 10 Wochen alte ApoE-knock-out Tiere (n=4), denen gleichaltrige ApoE^{-/-} Thrombozyten, die mit einem irrelevanten monoklonalen Antikörper (gereinigtes monoklonales Ratten-IgG₁, Fa. BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) behandelt worden waren, intravenös injiziert wurden.

3.6.3 Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression und die vaskuläre Inflammation

3.6.3.1 Thrombozyten und Atheroprogression

Um die Relevanz der Thrombozytenadhäsion bei der Atheroprogression zu bestimmen, wurden 6 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen randomisiert entweder ein irrelevantes Ratten IgG (50 μ g, n=4; gereinigtes monoklonales Ratten-IgG₁, Fa. BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) oder ein Ratten anti-Maus GPIIb α (50 μ g, n=6; monoklonaler Antikörper p0p/B, Arbeitsgruppe Nieswandt, Witten/Herdecke, Deutschland) für jeweils 12 Wochen injiziert. Unbehandelte 18 Wochen alte ApoE^{-/-} Mäuse dienten als Kontrolle (n=6). Da in Vorversuchen an Antikörper unbehandelten ApoE^{-/-} Tieren nach 14 Wochen Fütterung bereits deutliche atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand erkennbar waren, erschien dieser Zeitpunkt ideal um die Reduktion der Plaquebildung durch Antikörpergabe, sichtbar zu

machen. Nach einer systemischen, durch intrakardiale Punktion verabreichten Anfangsdosis von 100 µg, wurden alle drei Tage jeweils 50 µg Antikörper intraperitoneal injiziert. Aufgrund seiner höheren Affinität und seiner signifikant verlängerten Halbwertszeit *in vivo*, verglichen mit dem für den Akut-Versuch verwendeten Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers, wurde für die Langzeitbehandlung das vollständige IgG von p0p/B gewählt. 3 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere anästhesiert und Blutproben aller Mäuse, zur Messung des zirkulierenden Ratten IgGs, mit Hilfe eines ELISA genommen. Daraufhin wurden alle Mäuse durch Entbluten getötet und die Carotiden, sowie die Herzen zur histomorphometrischen Untersuchung, wie unter Abschnitt 3.4. beschrieben, entnommen.

3.6.3.2 Thrombozyten und vaskuläre Inflammation

Um die Rolle der Thrombozyten bei der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, und somit beim atherosklerotischen Entzündungsprozess zu untersuchen, beurteilten wir die Leukozytenadhäsion bei 18 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen, welche 12 Wochen lang entweder mit einem irrelevanten Ratten IgG (50µg, n=4) oder mit Ratten anti-Maus GPIbα (50µg, mAK p0p/B, n=6) behandelt wurden (siehe 3.6.3.1). Als Kontrollen verwendeten wir unbehandelte ApoE^{-/-} Mäuse (n=6).

Die Leukozytenadhäsion an der Carotidenbifurkation wurde durch Intravitalmikroskopie, wie oben beschrieben, beurteilt. Anschließend untersuchten wir mit Hilfe von RT-PCR schockgefrorene Gewebeproben der Carotiden auf CD14 und CD11b mRNA Expression hin, um das Monozytenrekrutment in der Intima zu quantifizieren.

3.7 Statistische Analyse

Bei der vorliegenden Arbeit wurden die Vergleiche zwischen den Gruppen mit Hilfe des Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks durchgeführt. Als „post hoc“-Verfahren wurde der Dunn's Test angewandt. Die Abweichungen verstehen sich als Standardfehler SEM („standard error mean“). Alle angegebenen Zahlen sind Mittelwerte (MW) ± Standardfehler.

Als Signifikanzniveau wird die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Thrombozyten- und Leukozyteninteraktion im zeitlichen Verlauf der Atherosklerose

4.1.1 Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo*

Um die dynamischen Prozesse der Thrombozytenadhäsion im Verlauf der Atherosklerose bei jungen und alten Tieren *in vivo* darstellen zu können, wurde mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Thrombozyten-Endothel-Interaktion (Massberg et al., 1998) an der A. carotis communis von ApoE^{-/-} Mäusen *in situ* direkt sichtbar und quantifizierbar gemacht (Massberg et al., 1999b; Massberg et al., 1999a).

Alle ApoE^{-/-} Mäuse zeigten übereinstimmend eine Plaqueeentwicklung, welche der Pathomorphologie des Menschen sehr ähnelt (Celletti et al., 2001; Lutgens et al., 1999; Zhang et al., 1992). Schon bei jungen, 10 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen war die „lose“ und „feste“ Thrombozytenadhäsion an das Carotidenendothel deutlich vermehrt. Verglichen mit Wildtyp Mäusen ($p < 0,05$), bei denen keine relevante Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nachgewiesen wurde, war die „lose“ und „feste“ Thrombozytenadhäsion um das 12- bzw. um das 24-fache erhöht (siehe Abbildung 11). Trotz dieser signifikanten Thrombozytenadhäsion, wurden bei 10 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen keine atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen gefunden (siehe Abbildung 12, Mitte). Dagegen waren bei 22 Wochen alten ApoE knock-out Tieren, bei denen die „lose“ und „feste“ Thrombozytenadhäsion nochmals erheblich zugenommen hatte, deutliche atherosklerotische Läsionen am Endothel der Carotidenbifurkation feststellbar (siehe Abbildung 12, Rechts). So konnten wir, mit Hilfe der Histomorphometrie und die Intravitalmikroskopie zeigen, dass selbst bei vollständigen Fehlen früher Gefäßwandveränderungen (siehe Abbildung 12), die Anzahl der adhärenen Thrombozyten an das Carotidenendothel signifikant erhöht war (siehe Abbildung 11).

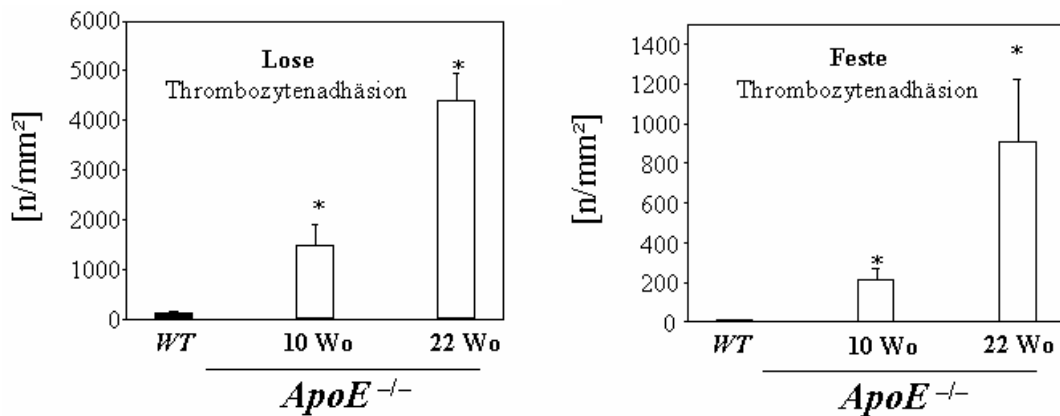


Abbildung 11:

Darstellung der „losen“ und „festen“ Thrombozytenadhäsion an das Endothel der *A. carotis communis* von Wildtyp Mäusen, sowie von 10 und 22 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen, nach Auswertung der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie.

n/mm² = Anzahl der adhärenenten Thrombozyten pro definierte Fläche; * = signifikant, p<0,05.

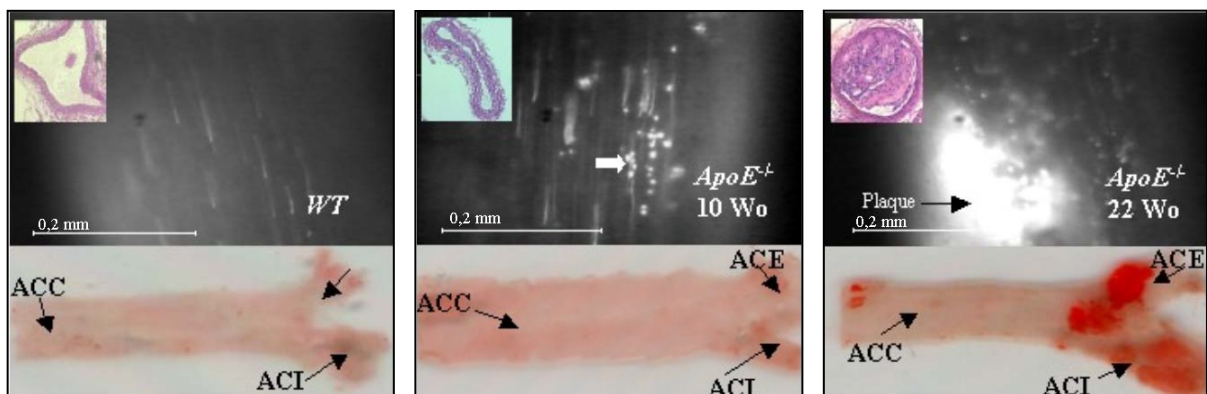


Abbildung 12:

Darstellung der Thrombozytenadhäsion und Plaqueausdehnung von Wildtypmäusen (Links), sowie von 10 Wochen (Mitte) und 22 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen (Rechts).

Auf den 3 Bildern ist jeweils zu sehen: Oben links: Histologischer Serienschnitt der *A. carotis communis* bei 10-facher Vergrößerung. Mitte: Intravitrale Fluoreszenzmikroskopie; der weiße Pfeil zeigt auf die adhärenenten Thrombozyten. Unten: SudanIII Färbung der *A. carotis*. Der schwarze Pfeil zeigt auf das Gebiet der „fatty-streak“-Bildung. Nur bei 22 Wochen alten ApoE^{-/-} Tieren (Rechts) sind deutliche „fatty streaks“ (schwarze Stellen) erkennbar. ACC = *A. carotis com.*, ACE = *A. carotis externa*, ACI = *A. carotis interna*.

Des weiteren trat das Thrombozytenrekrutment in jungen (10 Wochen) und alten ApoE^{-/-} Mäusen (22 Wochen) bevorzugt an atherosklerotischen Prädilektionsstellen auf, belegt durch die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten an der Carotidenbifurkation (Prädilektionsstelle),

verglichen mit der in der proximalen A. carotis (keine Prädilektionsstelle) bei 10 und 22 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen (siehe Abbildung 13).

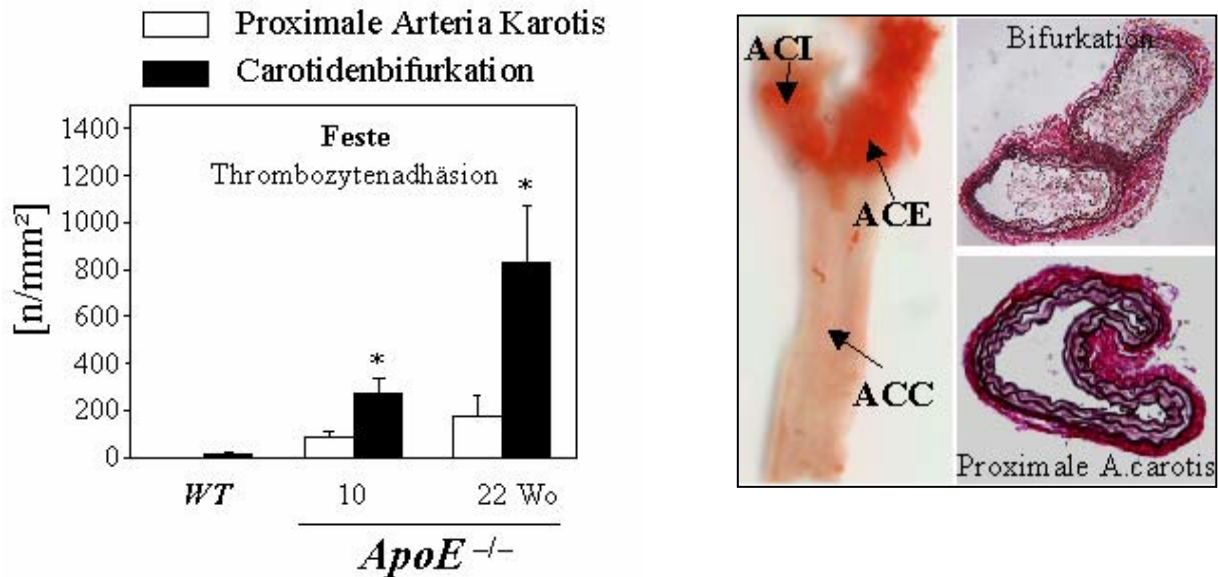


Abbildung 13:

Darstellung der Thrombozytenadhäsion an das Endothel der Carotidenbifurkation (Prädilektionsstelle für atherosklerotische Läsionen) und der proximalen A. carotis communis (keine Prädilektionsstelle) von 10 und 22 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen.

Links: Anzahl der adhärenenten Thrombozyten pro mm² Endothelzelloberfläche (an der Carotidenbifurkation und an einer Stelle 500µm proximal davon) in 10 und 22 Wochen alten Tieren, nach Auswertung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. * = signifikant, $p < 0,05$.

Rechts: Darstellung der A. carotis (SudanIII-Färbung) mit deutlich sichtbaren roten atherosklerotischen Läsionen an der Carotidenbifurkation. ACC = A. carotis com., ACE = A. carotis externa, ACI = A. carotis interna. Ganz rechts: Relevante histologische Serienschritte der Carotidenbifurkation und der proximalen A. carotis communis (Originalvergrößerung: 10-fach; Färbung nach Elastica-van-Giesson).

4.1.2 Charakterisierung der intimalen Entzündungsreaktion

Um eine intimale Entzündungsreaktion in der A. carotis von jungen und alten ApoE knock-out Mäusen nachzuweisen, wurden die Verfahren der Intravitalmikroskopie und der Immunhistologie angewandt. Das Adhäsionsmolekül VCAM-1 spielt eine wichtige Rolle bei der endothelialen Transmigration von Monozyten in die Gefäßwand und trägt so entscheidend zu der intimalen Entzündungsreaktion bei. Die mit Antikörpern gegen VCAM-1 behandelten Zellen stellen sich in der immunhistologischen Färbung braun dar (siehe Abbildung 14). In

den jüngeren ApoE^{-/-} Tieren, im Alter von 8 und 12 Wochen, sind keine oder nur vereinzelte VCAM-1-positive Zellen sichtbar. In den späteren Atherosklerosestadien, d.h. bei 22 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen, sind dagegen ganze Zellverbände und Geweberegionen positiv angefärbt.

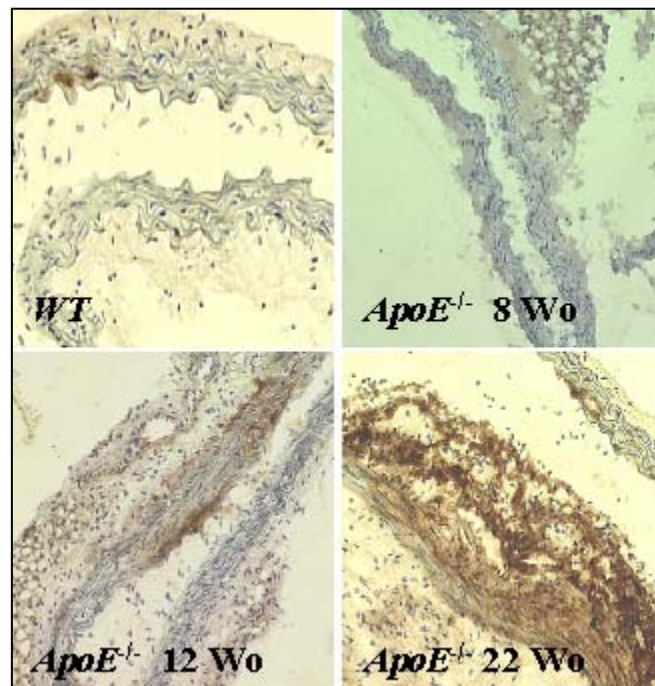


Abbildung 14:

Immunhistologische anti-VCAM-1 Färbung der A. carotis communis von ApoE^{-/-} Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten in der Atherogenese. VCAM-1-positive Zellen stellen sich braun dar.

Wie durch die Intravitalmikroskopie gezeigt werden konnte, haben wir in ApoE^{-/-} Mäusen keine signifikante Leukozytenadhäsion vor der Entwicklung initialer Gefäßläsionen gefunden (siehe Abbildung 15). In jungen Tieren (10 Wochen) waren kaum adhärenente Leukozyten detektierbar. Erst bei älteren ApoE^{-/-} Mäusen (22 Wochen) konnte eine signifikante Leukozytenadhäsion festgestellt werden, die mit dem Auftreten früher atherosklerotischer Läsionen korrelierte. Somit ging die Thrombozytenadhäsion stets dem Leukozytenrekrutment an der Arterienwand voraus.

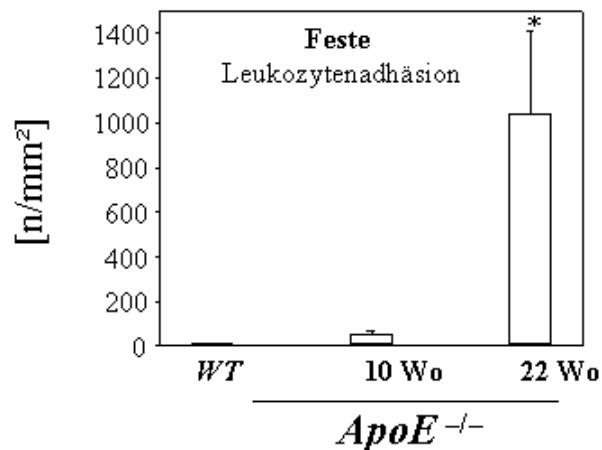


Abbildung 15:

Darstellung der „festen“ Leukozytenadhäsion an das Endothel der *A. carotis communis* von Wildtyp Mäusen, sowie von 10 und 22 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen, nach Auswertung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. n/mm^2 = Anzahl der adhärenenten Thrombozyten pro definierte Fläche; * = signifikant, $p < 0,05$.

4.2 Mechanismen der initialen Thrombozytenadhäsion

Zur Frage der molekularen Mechanismen der Thrombozytenadhäsion im frühen Stadium der Atherogenese vor der Entwicklung manifester Gefäßläsionen, konnte bereits Bombeli et al. (Bombeli et al., 1998) *in vitro* zeigen, dass die Thrombozytenrezeptoren GPIIb/IIIa und GPIIb-IIIa in hohem Maße an der endothelialen Thrombozytenadhäsion beteiligt sind. Somit stellten diese Rezeptoren ideale Angriffspunkte für die Thrombozyteninhibition dar. Wir verabreichten daher 10 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen syngene, fluoreszenzmarkierte Thrombozyten, welche mit funktionsblockierenden monoklonalen Antikörper entweder gegen GPIIb/IIIa oder gegen GPIIb-IIIa präinkubiert wurden.

Die Blockade des GPIIb/IIIa Rezeptors mit p0p/B-Fab reduzierte beides, die „lose“ und die „feste“ Thrombozytenadhäsion an die Gefäßoberfläche der *A. carotis communis* um 85% bzw. um 99% ($p < 0,05$) (Abbildung 16). Im Gegensatz dazu, zeigte die Inhibition des GPIIb-IIIa Rezeptors mit JON/A-F(ab)₂ (Nieswandt et al., 2001c) nur partielle Effekte auf die „lose“ Thrombozytenadhäsion, verhinderte aber fast vollständig die „feste“ Bindung der Thrombozyten an die Endothelzellen, *in vivo* (mit 95%, $p < 0,05$) (Abbildung 16).

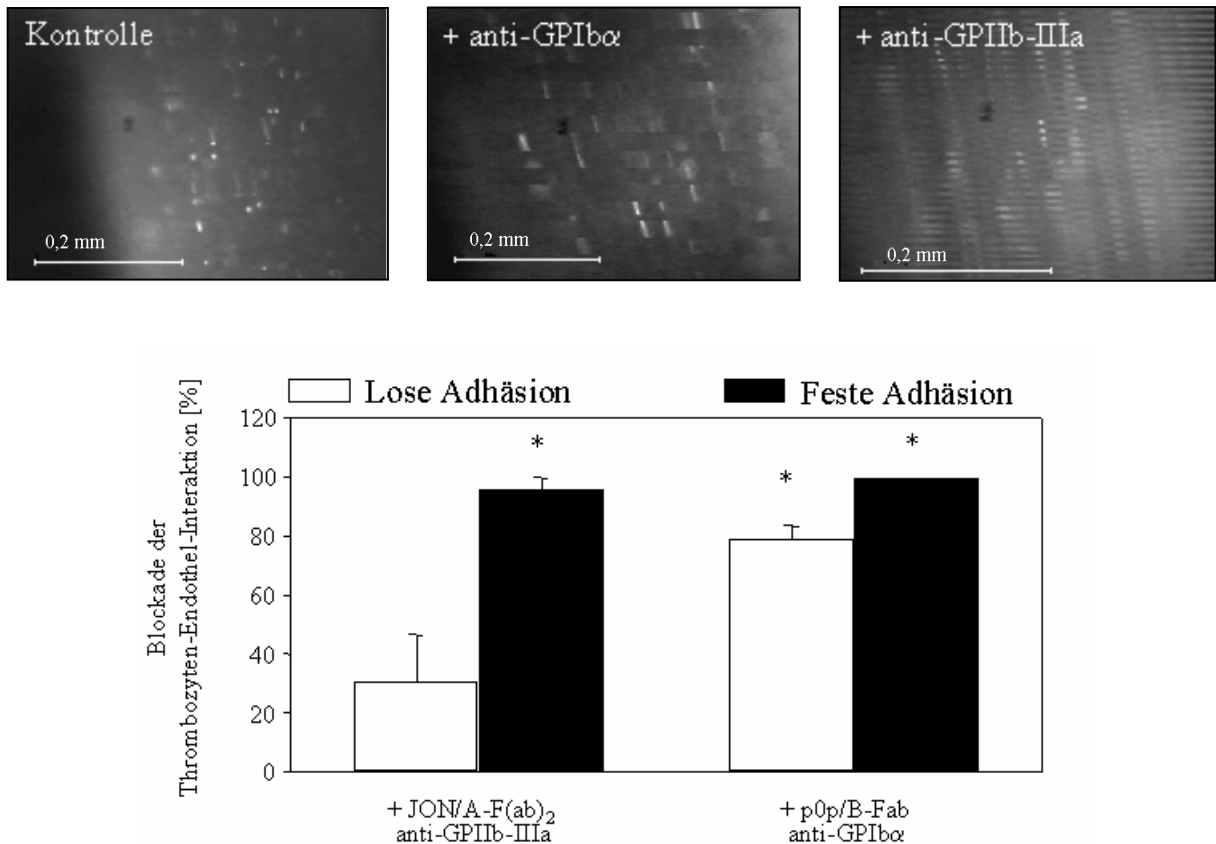


Abbildung 16:

Darstellung der „losen“ und der „festen“ Thrombozytenadhäsion nach Rezeptorblockade durch spezifische monoklonale Antikörper gegen GPIIb-IIIa und GPIb-IIIa. Als Kontrolle dienten gleich alte, mit einem irrelevanten monoklonalen Antikörper behandelte ApoE^{-/-} Mäuse.

Oben: Intravitalmikroskopische Momentaufnahme. Links: Viele adhärenente Thrombozyten (weiße Pünktchen) sind sichtbar. Mitte und Rechts: kaum adhärenente Thrombozyten sichtbar.

Unten: Darstellung der Inhibition der Thrombozyten-Endothel-Interaktion in Prozent, nach Auswertung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. * = signifikant, $p < 0,05$.

Somit haben wir *in vivo* zwei verschiedene Mechanismen identifiziert, die gemeinsam die Rekrutierung zirkulierender Thrombozyten an die dysfunktionelle, präatherosklerotische Gefäßwand im frühen Anfangsstadium der Atherogenese initiieren. Ähnlich wie die Thrombozytenadhäsion an die subendotheliale Matrix (Savage et al., 1996), ist GPIb-IIIa für den initialen thrombozyteneinfangenden Prozess verantwortlich, wohingegen GPIIb-IIIa eine entscheidende Rolle bei der festen Thrombozytenadhäsion an das Endothel zukommt.

4.3 Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogession und die vaskuläre Inflammation

4.3.1 Thrombozyten und Atheroprogession

Im dritten Abschnitt der Arbeit untersuchten wir, ob die langfristige Inhibition der Thrombozytenadhäsion die Atheroprogession in ApoE^{-/-} Mäusen verringern würde. Dazu wurden 6 Wochen alte ApoE^{-/-} Mäuse über einen Zeitraum von 12 Wochen wahlweise mit einem Antikörper gegen GPIb α (p0p/B, Arbeitsgruppe Nieswandt, Witten/Herdecke, Deutschland) oder mit einem irrelevanten Ratten IgG (gereinigtes monoklonales Ratten-IgG₁, Fa. BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) behandelt, wobei jeweils 50 μ g des Antikörpers zweimal pro Woche intraperitoneal injiziert wurden. Das vollständige IgG von p0p/B inhibiert die Bindung des von-Willebrand-Faktors an den GPIb α Rezeptor (Nieswandt et al., unpubliziert) und verhindert so durch Fc-unabhängige Mechanismen (Bergmeier et al., 2000), signifikant die Thrombozytenadhäsion *in vivo* (siehe Abbildung 16). Die Behandlung mit einem irrelevante Ratten IgG hatte dabei die Funktion den eventuellen Einfluss von Fremdproteinen auszuschließen. Wie schon Mach et al. (Mach et al., 1998) berichteten, konnten in beiden Gruppen der 12 Wochen lang mit Ratten IgG behandelten Mäuse (Kontroll IgG: 1,75 \pm 0,73 μ g/ml; anti-GPIb α : 1,20 \pm 0,90 μ g/ml), frei zirkulierende Antikörper mittels ELISA nachgewiesen werden. Dieses zeigte uns, dass das Ratten Immunglobulin nicht aus der Zirkulation eliminiert war.

Die 12 Wochen lange Inhibition der Thrombozytenadhäsion mit monoklonalen Antikörpern gegen GPIb α limitierte die atherosklerotische Läsionsbildung in 18 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen, verglichen mit unbehandelten 18 Wochen alten ApoE^{-/-} Tieren, signifikant. Bei den anti-GPIb α behandelten ApoE^{-/-} Mäusen konnte mit Hilfe von Auswertungsprogrammen eine Reduktion der mit SudanIII angefärbten „fatty streak“ Bildung von ungefähr 90% (siehe Abbildung 17) nachgewiesen werden.

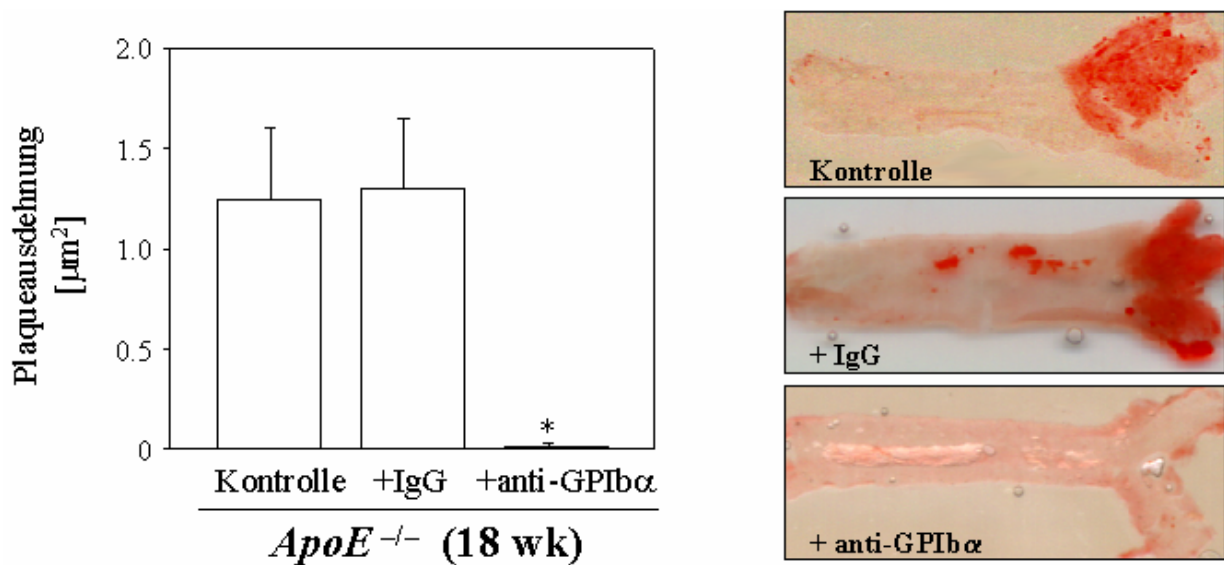


Abbildung 17:

Darstellung der Plaqueausdehnung, bzw. der „fatty streak“-Bildung in der *A. carotis* von 18 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen, die entweder mit einem irrelevanten IgG (+IgG), mit Antikörpern gegen GPIIb α (+anti-GPIIb α) oder nicht (Kontrolle) behandelt wurden.

Links: Darstellung der Plaqueausdehnung in μm^2 , nach histomorphometrischer SudanIII-Auswertung.

* = signifikant, $p < 0,05$.

Rechts: SudanIII-Färbung der *A. carotis*, mit deutlicher Anfärbung der atherosklerotischen Läsionen.

Weiterhin zeigten die anti-GPIIb α behandelten Tiere eine beträchtliche Abnahme der Querschnittsplaquefläche in den Carotiden (von 81%, $p < 0,05$) (siehe Abbildung 18). Im Gegensatz dazu war bei den ApoE^{-/-} Mäusen, die als Kontrollgruppe dienten und mit einem irrelevanten Ratten IgG behandelt wurden, die Atheroprogression im Vergleich zu unbehandelten ApoE^{-/-} Mäusen weder beschleunigt noch verlangsamt. Dies zeigt, dass die alleinige Gabe eines unspezifischen Antikörpers (Ratten IgG) keinen Effekt auf die atherosklerotische Plaquebildung besitzt, sondern die verminderte atherosklerotische Läsionsbildung nur auf die spezifische anti-GPIIb α Blockade zurückzuführen ist.

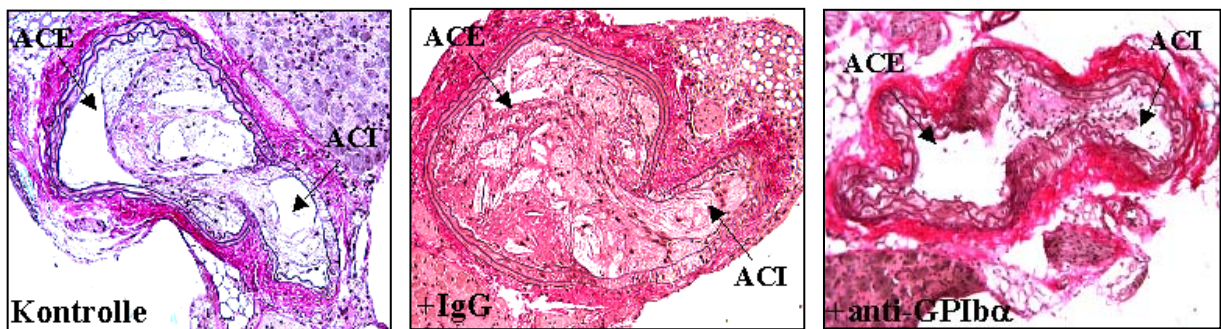
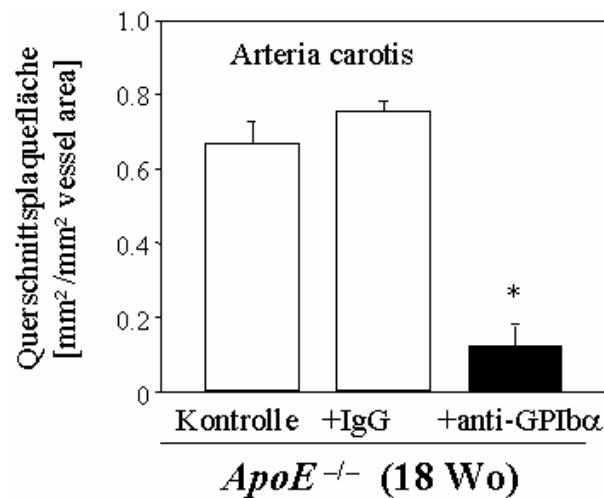


Abbildung 18:

Erfassung der Querschnittsplaquefläche in der *A. carotis communis* von 18 Wochen alten *ApoE^{-/-}* Mäusen.

Oben: Darstellung der Querschnittsplaquefläche, nach histomorphometrischer Auswertung der Serienschichten der *A. carotis communis*. * = signifikant, $p < 0,05$.

Unten: Repräsentative histologische Serienschichten der *A. carotis* (Originalvergrößerung: 10-fach; Färbung nach Elastica-van-Giesson). Links: Kontrolltier, keine Antikörperbehandlung. Mitte: Behandlung mit einem irrelevanten IgG. Rechts: Behandlung mit Antikörpern gegen GPIIb/IIIa. ACC = *A. carotis communis*, ACE = *A. carotis externa*, ACI = *A. carotis interna*.

Um auszuschließen, dass die Reduktion der atherosklerotischen Läsionsbildung, als Effekt der chronischen GPIIb/IIIa Inhibierung nur auf die *A. carotis* beschränkt war, untersuchten wir die Läsionsbildung in anderen Gefäßbetten, den Aortensinus sowie die linke und rechte Koronararterie mit eingeschlossen. Wie in Abbildung 19 und 20 gezeigt, reduzierte die langfristige Blockade der Thrombozytenadhäsion mittels Antikörper gegen GPIIb/IIIa, die atherosklerotische Plaquebildung sowohl im Aortensinus (um ca. 35%, $p < 0,05$) als auch und in den Koronararterien (um 63%, $p < 0,05$), verglichen mit unbehandelten Kontrollen, signifikant. Die mit einem irrelevanten Ratten IgG behandelten Tiere zeigten, wie die

unbehandelten ApoE^{-/-} Kontrolltiere, keinerlei Reduktion der atherosklerotisch veränderten Gefäßwandfläche.

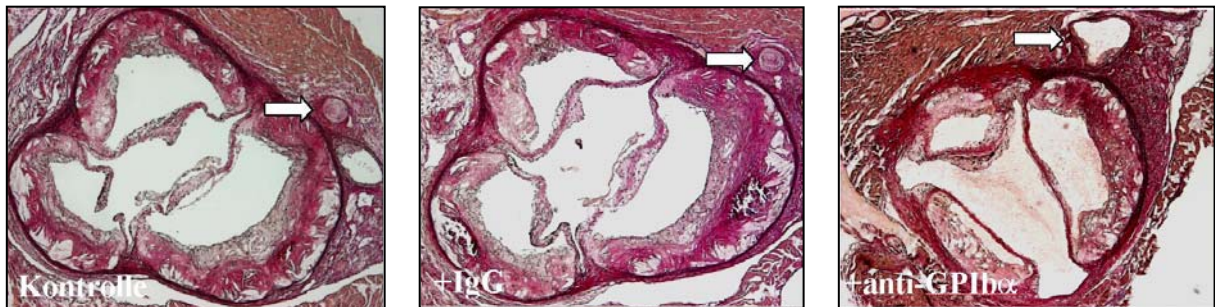
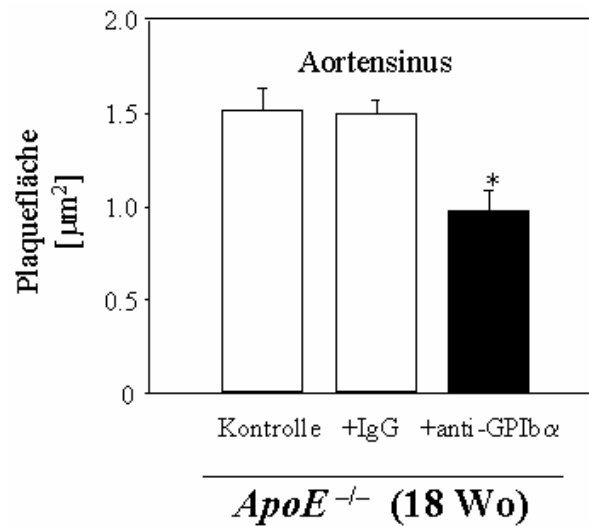


Abbildung 19:

Darstellung der Plaquetfläche im Aortensinus von unbehandelten 18 Wochen alten Kontrolltieren (Kontrolle), sowie 18 Wochen alten ApoE^{-/-} Mäusen, die entweder mit einem irrelevanten Antikörper (+IgG) oder anti-GPIb α (+anti-GPIb α) behandelt wurden.

Oben: Erfassung der Plaquetfläche des Aortensinus in µm², nach histomorphometrischer Auswertung der in Elastica-van-Giesson gefärbten Serienschnitte des Herzens. * = signifikant, p<0,05.

Unten: Repräsentative histologische Serienschnitte, die den Aortensinus, sowie die Koronarien zeigen (Originalvergrößerung: 10-fach; Färbung nach Elastica-van-Giesson). Links: Kontrolltier, keine Antikörperbehandlung. Mitte: Behandlung mit einem irrelevanten IgG. Rechts: Behandlung mit Antikörpern gegen GPIb α .

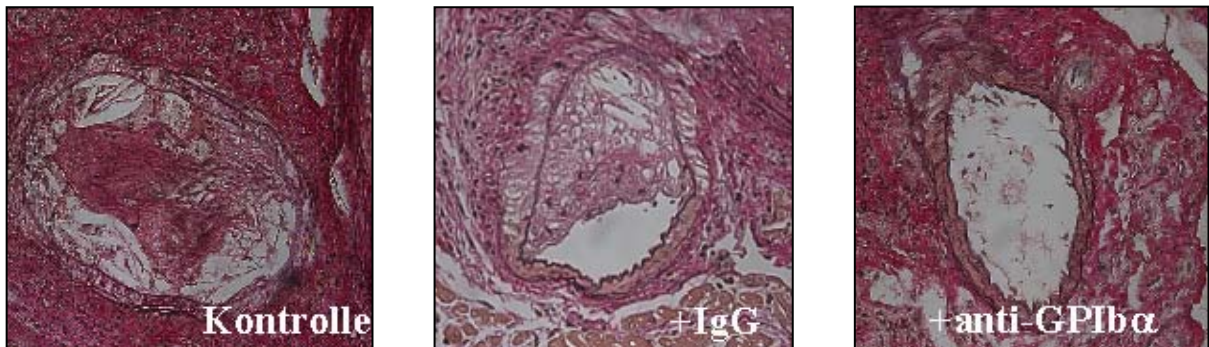
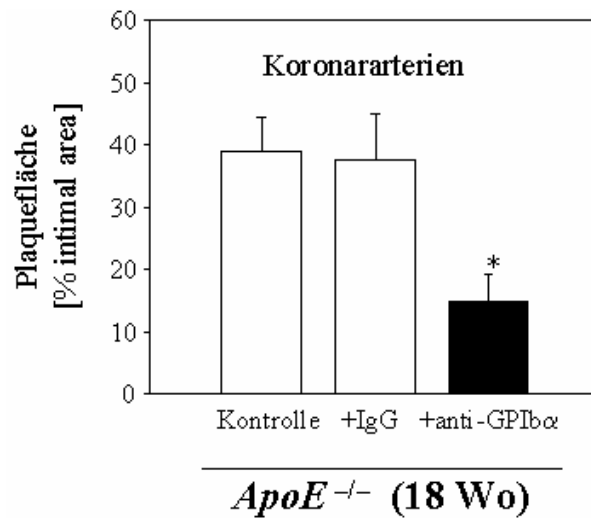


Abbildung 20:

Darstellung der Plaquetfläche in den Koronararterien von unbehandelten 18 Wochen alten Kontrolltieren (Kontrolle), sowie 18 Wochen alten *ApoE^{-/-}* Mäusen, die entweder mit einem irrelevanten Antikörper (+IgG) oder anti-GPIIb α (+anti-GPIIb α) behandelt wurden.

Oben: Erfassung der Plaquetfläche der Koronararterien, nach histomorphometrischer Auswertung der in Elastica-van-Giesson gefärbten Serienschritte des Herzens. Die Plaquetfläche wird als Prozent der Fläche, die von der Lamina elastica interna (intimal area) begrenzt ist angegeben. * = signifikant, $p < 0,05$.

Unten: Repräsentative histologische Serienschritte des Herzens, die die Koronararterien zeigen (Originalvergrößerung: 10-fach; Färbung nach Elastica-van-Giesson). Links: Kontrolltier, keine Antikörperbehandlung. Mitte: Behandlung mit einem irrelevanten IgG. Rechts: Behandlung mit Antikörpern gegen GPIIb α .

4.3.2 Thrombozyten und vaskuläre Inflammation

Um die pathophysiologische Rolle der Thrombozyten im atherosklerotischen Entzündungsprozess zu untersuchen, beurteilten wir die Adhäsions- und Migrationsvorgänge der Leukozyten an der Carotidenwand von 18 Wochen alten *ApoE^{-/-}* Mäusen. Diese wurden

wie bereits oben beschrieben, entweder mit einem anti-GPIIb α -IgG oder einem irrelevanten Ratten IgG behandelt. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, konnte das Leukozytenrekrutment an der Carotidenbifurkation *in vivo* beurteilt werden (siehe Abbildung 21). Zur Bestimmung der Monozytenmigration in die Intima untersuchten wir zusätzlich schock-gefrorene Gewebeproben mit RT-PCR auf CD14 und CD11b mRNA Expression hin (siehe Abbildung 22). Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, wiesen anti-GPIIb α , aber nicht Kontroll IgG behandelte Mäuse eine geringere Leukozytenadhäsion an das Gefäßendothel auf, verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren sogar um ca. 75% ($P < 0,05$). Auch die intimale Rekrutierung der Monozyten war signifikant vermindert, gemessen an der verringerten CD14 und CD11b mRNA Expression (siehe Abbildung 22).

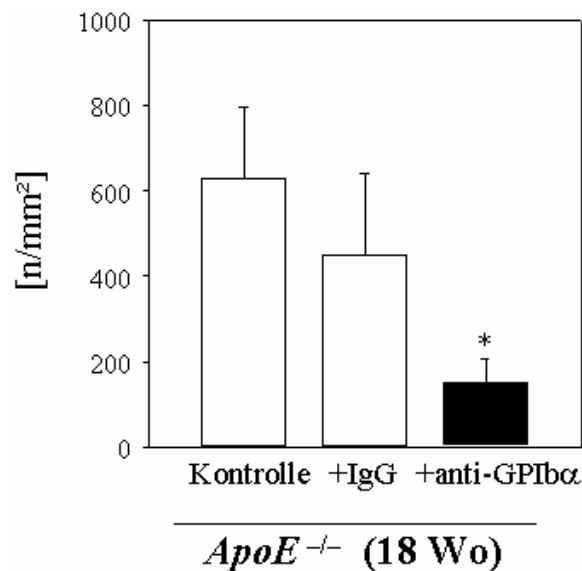


Abbildung 21:

Darstellung der adhärenenten Leukozyten an der Endothelzelloberfläche der *A. carotis communis* von 18 Wochen alten *ApoE*^{-/-} Mäusen, die entweder mit einem irrelevanten IgG (+IgG), mit Antikörpern gegen GPIIb α (+anti-GPIIb α) oder nicht (Kontrolle) behandelt wurden. Die Leukozytenadhäsion wurde mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie bestimmt.

n/mm^2 = Anzahl der adhärenenten Thrombozyten pro definierter Fläche; * = signifikant, $p < 0,05$.

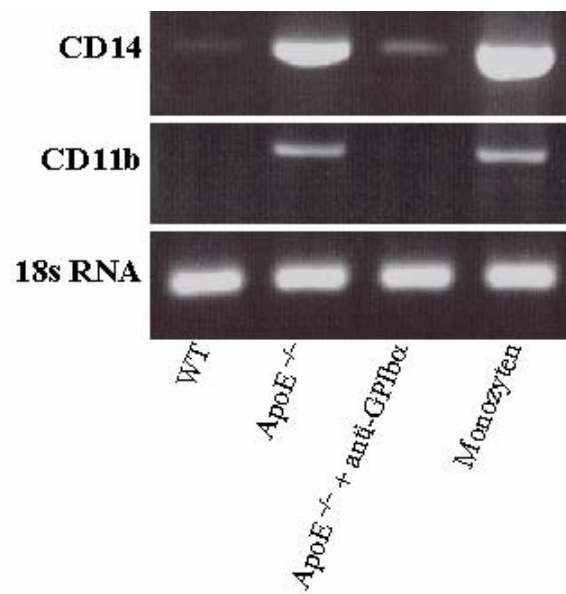


Abbildung 22:

Darstellung der RT-PCR zur Beurteilung der Leukozytenakkumulation, bzw. der CD11b und CD14 mRNA Expression, an der Gefäßwand der *A. carotis communis* von Wildtyp Mäusen, ApoE^{-/-} Mäusen, anti-GPIIb/IIIa behandelten ApoE^{-/-} Mäusen, sowie von Monozyten. Die 18sRNA läuft als Kontrolle. Es wird deutlich, dass bei anti-GPIIb/IIIa behandelten Mäusen die CD14 und CD11b mRNA Expression kaum vorhanden ist (weiße Balken nicht oder nur schwach erkennbar).

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methoden

5.1.1 Versuchstiere

Die Pathogenese der Atherosklerose unterliegt sehr komplexen multifaktoriellen und polygenetischen Bedingungen. Um zu verstehen, welche Zellen und Moleküle in den verschiedenen Atherosklerosestadien involviert sind und die daran beteiligten Gene und Umweltfaktoren zu identifizieren, bedarf es eines *in vivo* Modells, welches den Krankheitsverlauf im Menschen möglichst genau imitiert. Experimentelle Ansätze, die zu stark vom menschlichen Krankheitsbild abweichen oder sich zu sehr auf *in vitro* Systeme verlassen, können sich irreführend auf das Verständnis der Krankheit auswirken. Die früher angewandten Tiermodelle von Primaten und Hasen eigneten sich schlecht für Genanalysen und wiesen erhebliche Nachteile in Handhabung und Verfügbarkeit auf, so dass nach Alternativen gesucht werden musste. Die Maus ist prinzipiell sehr gut als Modell geeignet, mit dem entscheidenden Nachteil, trotz cholesterinreicher Nahrung nur kleine atherosklerotische Läsionen zu entwickeln. So entstanden in den letzten 18 Jahren viele genetisch veränderte Mausmodelle (Breslow, 1996), wie z.B. die ApoE-knock-out Maus. Diese entwickelt schon bei normaler, cholesterinreicher Fütterung („normal chow diet“) spontan atherosklerotische Plaques (Knowles, 2000; Nakashima et al., 1994; Piedrahita et al., 1992; Plump et al., 1992), welche nach cholesterinreicher Fütterung („Western-type diet“) noch an Größe und Ausprägung zunehmen. Mit der ApoE-defizienten Maus konnte somit ein krankheitsspezifisches Modell, welches den atherosklerotischen Läsionen des Menschen sehr ähnelt, etabliert werden.

So entschieden auch wir uns dafür, unsere experimentellen Versuche an hand der ApoE^{-/-} Maus durchzuführen. Diese ist inzwischen sehr gut erforscht, so dass bereits viele vorhandene Atherosklerosedaten zur Verfügung standen. Zusätzlich ist die Maus als Tiermodell gut geeignet, da sie relativ leicht zu handhaben ist (Größe, Platz, Fütterung, Haltung etc.) und eine gute Verfügbarkeit, Wirtschaftlichkeit sowie eine schnelle Nachzucht möglich ist. Außerdem sind bei der Maus bereits viele Gene bekannt und verschiedene Reagenzien, wie z.B.

Antikörper kommerziell erhältlich, was insbesondere für die Molekularbiologie von großem Vorteil ist.

Die Entscheidung unsere Versuchsreihen nur an männlichen ApoE^{-/-} Mäusen durchzuführen traf wir auf Grund von bereits vorhandenen Atherosklerosedaten an knock-out Mäusen (Dong et al., 2000). Diese zeigten, dass männliche ApoE^{-/-} Tiere wesentlich früher und auch ausgeprägtere atherosklerotische Läsionen entwickeln, als weibliche ApoE^{-/-} Mäuse und so besser, insbesondere bei der Thrombozyteninhibition, zur Hervorhebung atherosklerotischer Veränderungen geeignet sind. Da auch in anderen Arbeitsgruppen, (z.B. Nakashima et al., 1998) vornehmlich mit männlichen ApoE^{-/-} Tieren gearbeitet wird, stand uns mehr Datenmaterial zur Verfügung.

Um die atherosklerotisch veränderte Gefäßwand mit einer intakten physiologisch Arterienwand vergleichen zu können, erhielten die Wildtypmäuse normales, cholesterinarmes Nagerfutter. Die ApoE^{-/-} Tiere wurden dagegen cholesterinreich gefüttert, um so größt mögliche atherosklerotische Gefäßwandveränderungen zu erzeugen.

5.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Wie eingangs dargestellt, war es das Ziel des ersten Abschnitts dieser Arbeit, die Thrombozyten-Endothel-Interaktionen in der initialen Phase der Atherosklerose zu untersuchen. Um die adhäsiven und infiltrativen Vorgänge zwischen Blutbestandteilen und der Gefäßwand *in vivo* darstellen zu können, benötigten wir eine Methode, die die Visualisierung und Quantifizierung zellulärer Interaktionen am lebenden Organismus ermöglichte. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist in der Lage physiologische und pathophysiologische Zellinteraktionen darzustellen und zelluläre Phänomene quantitativ zu beurteilen. Darüber hinaus ist es möglich, Aussagen über den mikrovaskulären Blutfluss, sowie dessen Auswirkung auf die Hämodynamik zu machen. Der große Vorteil der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie gegenüber *ex vivo* Versuchen besteht darin, dass sich physiologische und pathophysiologische Prozesse direkt im lebenden Organismus darstellen lassen und die Zellen somit in ihrem physiologischen Milieu und unter den dort üblichen Bedingungen beobachtet werden können.

In dieser Arbeit sollten die Adhäsionsmechanismen in der initialen Phase der Atherosklerose, an den Carotiden, der Aorta und an den Koronargefäßen untersucht werden. Da die Aorta und die Koronarien schwer zugänglich sind und somit ein invasives Verfahren mit erheblichem chirurgischem Aufwand verbunden wäre, entschieden wir uns dafür, die intravitalmikroskopischen Untersuchungen an der operativ leicht zugänglichen A. carotis durchzuführen. Da atherosklerotische Läsionen an bevorzugten Stellen, wie Gefäßgabelungen auftreten, stellte die Carotisbifurkation, sowie eine Kontrollstelle 500µm stromaufwärts, ein geeignetes Untersuchungsgebiet dar.

Die Intravitalmikroskopie, eine weltweit etablierte und angewandte Methode, war somit bestens geeignet unsere Erkenntnisse über atherosklerotische und thrombotische Geschehnisse zu erweitern.

5.1.3 Histologie und Immunhistologie

Der Progression der Atherosklerose zeigt sich in Gefäßwandveränderungen, die sich auf histologischer Ebene gut darstellen lassen. Mikroskopisch wird als erstes eine Intimaverdickung mit Schaumzelleinlagerungen sichtbar, fortschreitend können eine Mediahypertrophie und cholesterinkristall-enthaltende Nekrosen festgestellt werden, was bis zu Plaqueruptur, Thrombusbildung und Gefäßverschluss führt. Histologie und speziell Immunhistologie sind daher besonders zur Beurteilung von Ausmaß und Progredienz der Atherosklerose auf zellulärer und molekularer Ebene geeignet. Darüber hinaus ist es mit Hilfe von Auswertungsprogrammen möglich, atherosklerotische Gefäßwandveränderungen zu quantifizieren. Die verschiedenen Pathomechanismen und die funktionellen Auswirkungen auf den Gesamtorganismus lassen sich durch die Histologie, die eine *ex vivo* Methode ist, jedoch nur schlecht beurteilen.

Für die histologische Untersuchung war die Wahl des zu untersuchenden Gefäßabschnittes von immenser Bedeutung. Der für die Auswertung vorgesehene Gefäßabschnitt musste zum einen quantifizierbar sein und somit an einer morphologisch standardisierten Stelle liegen und zum anderen den Ort der stärksten atherosklerotischen Läsionsbildung widerspiegeln. Aus bereits vorhandenen Studien wurde deutlich, dass die atherosklerotische Plaquebildung

bevorzugt an den Stellen des arteriellen Gefäßbettes auftritt, an denen es zu besonders starken Wirbelbildungen und Scherkräften kommt, d.h. an Stellen wie Bifurkationen, Gefäßabgängen und Klappen. So entschieden wir uns einerseits für die Auswertung der Carotidenbifurkation, und andererseits für den Aortensinus mit seinen Taschenklappen, sowie für die Abgangsstelle der Koronarien aus der Aorta.

Mit Hilfe von Serienschritten war es möglich die komplette Ausdehnung der Plaque zu erfassen, sie durch histomorphometrische Auswertungen zu quantifizieren und einem Vergleich zu unterziehen.

Versuchsabhängig wurden unterschiedliche Färbetechniken angewandt. Für reine Übersichtsbilder der atherosklerotischen Plaqueausprägung in der A. carotis verwendeten wir die Hämatoxylin und Eosin Färbung.

Die Serienschritte der A. carotis, der Aorta und der Koronarien, bei denen das Ausmaß der Plaquefläche mit Hilfe eines computergesteuerten Analysierungsprogramms zum prozentualen Vergleich ausgewertet werden sollte, wurden mit Elastica-van-Giesson angefärbt. Diese Färbung kann die unterschiedlichen Gefäßstrukturen, wie Intima, Media und Adventitia am differenziertesten darstellen und erleichtert somit die Erkennung der für die Auswertung benötigten Strukturen.

Mit der SudanIII Färbung können dagegen schon kleinste Fetteinlagerungen in der Gefäßwand sichtbar gemacht werden, so dass diese Methode vor allem in den Anfangsstadien der Atherosklerose von Bedeutung ist. Außerdem bietet diese Färbemethode die Möglichkeit den gesamten Gefäßbaum darzustellen, so dass eine hervorragende Übersicht über die Ausbreitung und das Gesamtausmaß der atherosklerotischen Gefäßwandveränderung gegeben werden kann.

Immunhistochemische Färbetechniken sind dazu geeignet, antigene Komponenten mittels spezifischer Antikörper, die durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert sind, nachzuweisen und zu identifizieren. Eine wesentliche Voraussetzung für den Wert dieser Methode ist die Spezifität der verwendeten Antikörper und die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Determinanten. Die Gefrierschnitttechnik besitzt den Vorteil guter Antigenerhaltung und ist gleichzeitig einfach und schnell in der Durchführung.

Das für die Auswertung herangezogene computergesteuerte Analysierungsprogramm „Cap Image“ ist ein schnelles und ausreichend genaues Verfahren um die digitalisierten Serienschnitte, möglichst unabhängig von dem Untersucher auszuwerten. Da wir uns zusätzlich für eine verblindete Auswertung der histologischen Gefäßschnitte entschieden, konnte eine Fremdbeeinflussung der Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden. Dieses Auswertungsprogramm ist demnach optimal geeignet, bei einer Vielzahl von Serienschnitten atherosklerotische Gefäßwandveränderungen zu quantifizieren und mit der Plaquebildung in verschiedenen Gefäßen, von Mäusen oder anderen Spezies zu vergleichen. Von Nachteil ist die fehlende Dreidimensionalität der Methode.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit, sowie früherer Studien stützen die Hypothese, dass Thrombozyten eine bedeutende Rolle in der frühen Anfangsphase der Atheroskleroseentstehung, noch vor dem Auftreten atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen, spielen.

5.2.1 Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion im zeitlichen Verlauf der Atherosklerose

Die große Bedeutung der Thrombozyten im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose bei Plaqueruptur, Thrombusbildung und Gefäßverschluß, ist weithin bekannt. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten jedoch die Hypothese bestätigen, dass die Thrombozyten auch in dem initialen Entstehungsprozess der Atherosklerose entscheidend mitwirken.

Durch vergangene Studien (Frenette et al., 1995) und durch unsere *in vivo* Ergebnisse an jungen ApoE^{-/-} Mäusen konnten wir zeigen, dass es schon vor dem Auftreten manifester Endothelläsionen zur Thrombozytenadhäsion an das intakte Endothel kommt (Frenette et al., 1995; Massberg et al., 1998; Massberg et al., 1999a). Allerdings scheint die Bindung der Thrombozyten an die unverletzte endotheliale Gefäßoberfläche nur unter hohen Scherraten möglich, belegt durch die verstärkte Adhäsion an der Carotidenbifurkation, den Koronararterienabzweigungen, sowie in der Aortenklappenebene. Des weiteren konnten wir

zeigen, dass Thrombozyten noch vor den Leukozyten an die Arterienwand adhäreren. Dieses legt den Verdacht nahe, dass Thrombozyten als Trigger für die Leukozytenadhäsion wirken, und so die atherosklerotische Entzündungsreaktion initiieren. Diese Vermutung wird auch durch *in vitro* Studien (Gawaz et al., 1998; Gawaz et al., 2000; Henn et al., 1998) gestützt, bei denen gezeigt werden konnte, dass durch Thrombozyten stimulierte Endothelzellen vermehrt Chemokine und Adhäsionsmoleküle sezernieren und somit zur gesteigerten Leukozytenadhäsion an das Endothel führen. Die vermehrte Leukozytenadhäsion an das Endothel, als Zeichen von Inflammation, trägt entscheidend zu den entzündlich-proliferativen Gefäßwandveränderungen der Atherosklerose bei. In dieser Arbeit wurde jedoch deutlich, dass eine vermehrte Leukozytenadhäsion erst mit dem Auftreten von histologisch und immunhistologisch nachweisbaren atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen feststellbar ist. In Übereinstimmung mit unseren Erkenntnissen, beobachtete auch Eriksson et al. keine Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Aorta von ApoE^{-/-} Mäusen bei denen atherosklerotische Läsionen fehlten, demonstrierte jedoch eine signifikante Leukozytenadhäsion bei Tieren mit erkrankten Arterien (Eriksson et al., 2001b; Eriksson et al., 2001a). Somit scheint die Leukozytenadhäsion erst spät, d.h. im fortgeschritten Stadium der Atherosklerose von Bedeutung zu sein. Die Thrombozytenadhäsion tritt jedoch schon früher auf, d.h. noch vor der Leukozyten-Endothel-Interaktion und muss eine entscheidende Rolle in der initialen Phase der Atherosklerose, noch vor dem Auftreten atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen, spielen.

5.2.2 Mechanismen der initialen Thrombozytenadhäsion

Die molekularen Mechanismen der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion sind noch nicht vollständig bekannt. Wie an Hand von *in vitro* Versuchen (Andre et al., 1996) gezeigt werden konnte, scheinen sowohl GPIb α , als auch GPIIb-IIIa von großer Wichtigkeit bei der Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel zu sein (Bergmeier et al., 2000; Bombeli et al., 1998). Die Relevanz dieser Rezeptoren in der initialen Phase der Atherosklerose konnte in dieser Arbeit erstmalig *in vivo* dargestellt werden.

Die Blockade der Thrombozytenadhäsion mittels Antikörpergabe gegen GPIb α verursachte eine Reduktion der „losen“ und „festen“ Adhäsion an das Endothel von ApoE^{-/-} Mäusen.

Dagegen war bei anti-GPIIb-IIIa behandelten Mäusen vornehmlich nur die „feste“ Thrombozytenadhäsion vermindert. So kommt es, durch die *in vivo* Ergebnisse dieser Studie, zu der Vermutung, dass der GPIb α Rezeptor einen größeren Effekt auf die „lose“ Thrombozytenadhäsion an das Endothel besitzt, als der GPIIb-IIIa Rezeptor. Der GPIb α Rezeptor ist somit hauptsächlich für die erste Kontaktphase der im Blut zirkulierenden Thrombozyten mit dem Endothel verantwortlich, wohingegen der GPIIb-IIIa Rezeptor, maßgeblich an der darauffolgenden permanenten, „festen“ Adhäsion der Thrombozyten am Endothel beteiligt ist. Es ist denkbar, dass durch die initiale Bindung des GPIb-V-IX Komplex an das Endothel Thrombozyten aktiviert werden und es so zur Aktivierung des sich auf diesem befindenden GPIIb-IIIa Proteins kommen kann (Kasirer-Friede et al., 2002).

Bisher sind 5 Gruppen von thrombozytären Zelladhäsionsmolekülen (Kieffer and Phillips, 1990; Nurden, 1994), die an der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligt sind, beschrieben: die Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulingruppe (ICAM-1, PECAM-1), die leuzinreichen-Glykoproteine (GPIb-V-IX), die Selektine (P-Selektin), die Integrine (GPIIb-IIIa) und die lysosomalen, integralen Membranproteine (GP53).

In dieser Arbeit wurde besonders auf die thrombozytären Glykoproteinrezeptoren GPIb-V-IX, sowie GPIIb-IIIa eingegangen, die hier näher erläutert werden sollen.

GPIb-V-IX

Der zur Gruppe der leuzinreichen Glykoproteine gehörende GPIb-V-IX Rezeptor ist aus vier Untereinheiten, GPIb α , GPIb β , GPV und GPIX aufgebaut. GPV, dessen Funktion noch weitgehend ungeklärt ist, bildet den Kern des Rezeptors, der von zwei GPIb sowie von zwei GPIX Proteinen umgeben ist, welche alle nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Nur GPIb β und GPIb α sind durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft (Gawaz, 2001, S.37). Für die Rezeptorfunktion ist die GPIb α Untereinheit von zentraler Bedeutung, da sich dort an der extrazellulären Domäne die Bindestellen für den vWF, für Thrombin, P-Selektin (Romo et al., 1999) sowie für Ritsozetin befinden (Gawaz, 2001, S.38). Unter hohen Scherkräften, wie sie im Bereich arterieller Turbulenzen vorkommen, ist die bisher

angenommene Hauptfunktion des Rezeptors, die „lose“ Adhäsion zirkulierender Thrombozyten an den im subendothelialen Bindegewebe verankerten vWF zu fördern (De Meyer et al., 1999; Ruggeri, 1999). Verschiedene Studien, sowie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass es unter bestimmten Voraussetzungen auch zur Thrombozyteninteraktion mit dem intaktem Endothel kommen kann. GPIb α könnte so unter hohen Scherraten (Ruggeri, 1997) die Thrombozytenadhäsion an das Endothel vermitteln, indem es vWF und P-Selektin bindet, welche beide auf aktivierten Endothelzellen zu finden sind (Andre et al., 2000; Romo et al., 1999).

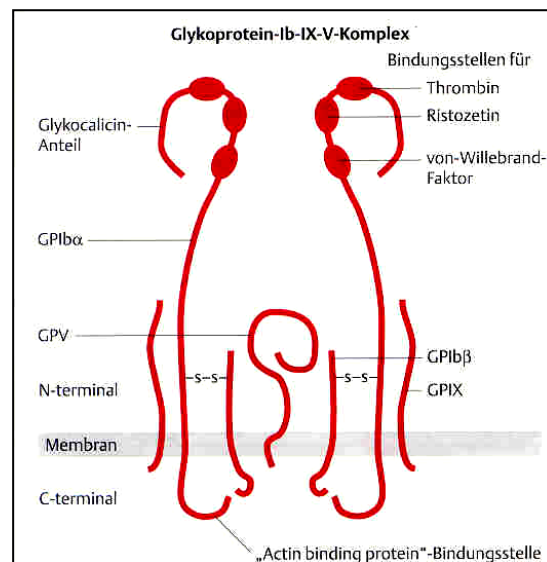


Abbildung 23:

Schematische Darstellung des GPIb-V-IX Rezeptors nach Gawaz (Gawaz, 2001, S.38).

GPIIb-IIIa

Der GPIIb-IIIa Rezeptor, welcher zur Gruppe der Integrine gehört, ist aus einer α_{IIb} und einer β_3 Untereinheit aufgebaut und besitzt je nach Thrombozytenaktivität unterschiedliche Bindungsmöglichkeiten. Befindet sich der Thrombozyt in einem nicht-aktivierten Zustand, so ist der GPIIb-IIIa Rezeptor auf seiner Zelloberfläche ebenfalls inaktiviert. In diesem nicht-aktivierten „Ruhezustand“ kann der Thrombozyt nur an immobilisiertes, d.h. an Matrix

gebundenes Fibrinogen adhären (Gawaz et al., 1991; Phillips et al., 1988; Phillips et al., 1991). Durch Thrombozytenaktivierung, z.B. durch Thrombin, ADP oder Epinephrine, ändert der GPIIb-IIIa Rezeptor seine Konformation und die Fibrinogenbindestelle, die nun auch lösliches Fibrinogen, Kollagen, VWF sowie Thrombospondin binden kann, wird freigelegt (Plow et al., 1992; Plow and Ginsberg, 1989; Sims et al., 1991). Die Bindung des löslichen Fibrinogens führt zur Vernetzung der Thrombozyten miteinander, da mehrere Thrombozyten an ein Fibrinogenmolekül binden können. Es kommt zur Thrombozytenaggregation.

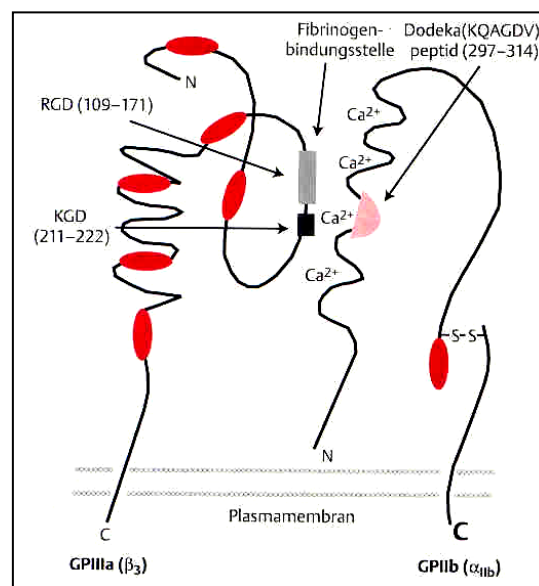


Abbildung 24:

Schematische Darstellung des GPIIb-IIIa Rezeptors nach Gawaz (Gawaz, 2001, S.35).

5.2.3 Bedeutung der Thrombozytenadhäsion für die Atheroprogression und die vaskuläre Inflammation

Die Ergebnisse der antikörpervermittelten Reduktion der „losen“ und „festen“ Thrombozytenadhäsion an das Endothel, ließen die Frage aufkommen, ob eine längerfristige Inhibition der Thrombozytenadhäsion das Fortschreiten der Atherosklerose in ApoE^{-/-} Mäusen

beeinflussen kann. Dazu sollte der erste zelluläre Kontakt der Thrombozyten mit dem Endothel vermieden werden, welches basierend auf unseren *in vivo* Ergebnissen und vergangener *in vitro* Studien, durch die Blockade des GPIIb/IIIa Rezeptors geschehen musste. Die permanente Inhibition des GPIIb-V-IX Rezeptors erfolgte durch funktionsblockierende monoklonale Antikörper gegen die GPIIb/IIIa Untereinheit. So konnte durch die GPIIb/IIIa Blockade die Rolle der adhärenen Thrombozyten bei der atherosklerotische Entzündungsreaktion näher bestimmt werden. Durch den histologischen Vergleich der Carotiden, der Koronarien sowie des Aortensinus wurde deutlich, dass unter GPIIb/IIIa Inhibition, d.h. durch fehlende Thrombozytenadhäsion, die atherosklerotische Plaquettenentstehung und somit auch die Rekrutierung von Entzündungszellen deutlich reduziert war. Dieses lässt darauf schließen, dass die fehlende Bindung des Thrombozyten an seinen endothelialen Liganden zur Unterbrechung der intrazellulären Signalübertragung führt. Durch die Rezeptor-Ligandenbindung und die folgende Signaltransduktionskette kommt es in den Thrombozyten normalerweise zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, welche die Granulasekretion und die Freisetzung lokaler Entzündungsmediatoren in die Umgebung der adhärenen Thrombozyten zur Folge hat. Auf diesem Weg könnten Thrombozyten am Prozess der Atherogenese mitwirken. Bisher wurden zwei Zytokine, CD40L und Interleukin-1 β (Gawaz et al., 2000) in Thrombozyten identifiziert, die die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften des Endothels verändern können. Indem sie die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B erhöhen, induzieren sie die Expression von endothelialen Adhäsionsrezeptoren wie VCAM-1, sowie die Ausschüttung von Chemokinen wie MCP-1 (Gawaz et al., 1998; Henn et al., 1998; Lindemann et al., 2001). Beide, VCAM-1 und MCP-1 initiieren das Monozytenrekrutment und die folgende Transmigration der Monozyten über die Endothelschicht in die Intima (Gu et al., 1998; Ramos et al., 1999) und spielen so eine zentrale Rolle in der atherosklerotischen Plaquettenentstehung (Boring et al., 1998; Cybulsky et al., 2001). Interessanterweise reduziert auch die Inhibition von CD40L (Mach et al., 1998) oder das Fehlen der CD40L Expression (Lutgens et al., 1999) die atherosklerotische Plaquettenbildung in Mäusen mit Hypercholesterinämie beträchtlich.

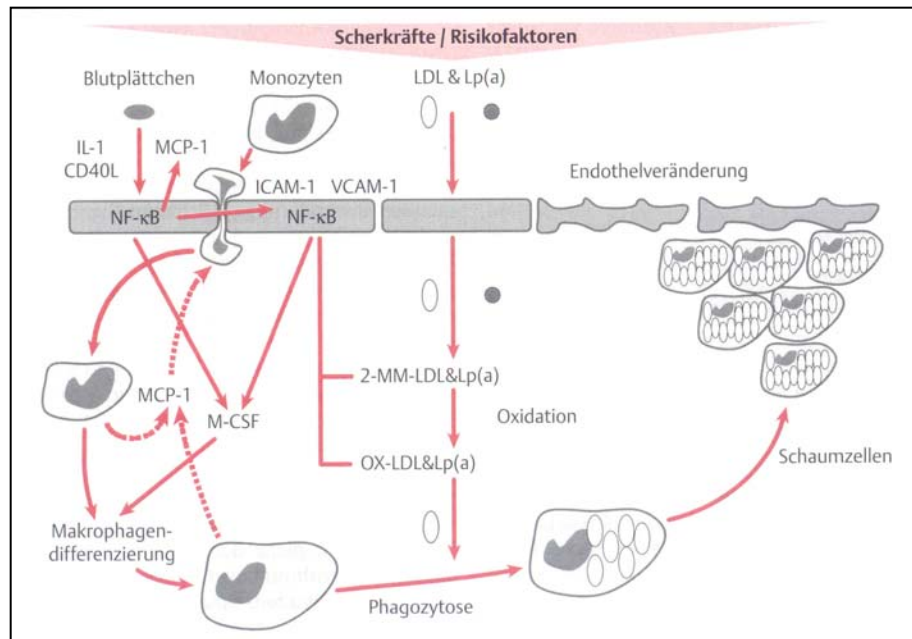


Abbildung 21:

Die Bedeutung der Thrombozyten für die Atherogenese, nach Gawaz (Gawaz, 2001, S.100).

Da bei anti-GPIIb α behandelten Mäusen die „fatty streak“ Bildung in histologischen mit SudanIII angefärbten Carotidenschnitten (um ca. 90%), sowie die Plaquerfläche im Aortensinus (um ca. 35%) und in den Koronarien (um ca. 63%) signifikant reduziert waren, kann davon ausgegangen werden, dass die Thrombozytenadhäsion über den GPIIb α Rezeptor, maßgeblich am frühen inflammatorischen Prozess beteiligt sein muss, der zur atherosklerotischen Plaquerentstehung führt. Dies wurde auch durch unsere Untersuchungen zum Leukozytenrekrutment nach thrombozytärer GPIIb α Blockade deutlich. Sowohl die verminderte CD14 und CD11b mRNA Expression von Antikörper behandelten Mäusen, als auch die signifikant reduzierte Leukozytenadhäsion (um ca. 75%) bei der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zeigen die Relevanz der Thrombozytenadhäsion für die vaskuläre Entzündungsreaktion auf.

Hier wurde zum ersten Mal *in vivo* gezeigt, welche bedeutsame Rolle die frühe Thrombozytenadhäsion an das Endothel, beim initialen Prozess, der zur Atherosklerose führt, einnimmt. Die Resultate dieser Studie erweitern unser Wissen über die frühen Ereignisse im

atherosklerotischen Entstehungsprozess und weisen auf die Bedeutung der Thrombozyten als Angriffspunkt neuer Antiatherosklerosetherapien hin.

6 Zusammenfassung

Die Rolle der Thrombozyten im Pathomechanismus der Atherosklerose ist nach wie vor noch nicht vollständig bekannt. In dieser Arbeit konnte jedoch ein weiterer Beitrag zum Verständnis der an der Atheroskleroseentstehung beteiligten Thrombozyteninteraktionen geleistet werden.

Experimentell wurde *in vivo* nachgewiesen, dass Thrombozyten in ApoE-knock-out Mäusen noch vor dem Auftreten manifester atherosklerotischer Läsionen an die Gefäßwand der A. carotis adhäreren. An der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion sind die thrombozytären Glykoproteine GPIIb/IIIa und GPIIb-IIIa maßgeblich beteiligt, wobei GPIIb/IIIa vermutlich noch vor GPIIb-IIIa an die Endothelzellschicht bindet und dadurch zu der für die Adhäsion nötigen Konformationsänderung des GPIIb-IIIa Rezeptors beiträgt. Der Thrombozytenadhäsion an das Endothel folgt die erhöhte Genexpression von Entzündungszellmediatoren und Adhäsionsrezeptoren wie MCP-1 und VCAM-1. Diese führen zum Leukozytenrekrutment an die Gefäßwand und tragen so zur Entstehung einer atherosklerotischen Plaque bei. Die permanente Blockade der Thrombozytenadhäsion an das Endothel durch kontinuierliche Antikörpergabe gegen den GPIIb/IIIa Rezeptor, führte in ApoE^{-/-} Mäusen zur signifikanten Reduktion der Leukozytenakkumulation in der intimalen Arterienwand und verminderte die atherosklerotische Läsionsbildung in der Carotidenbifurkation, dem Aortensinus und in den Koronararterien beträchtlich. Dieser Ergebnisse belegen eindeutig die Relevanz der Thrombozyten und deren essentielle Rolle in dem initialen Prozess der Atherogenese.

Somit sprechen die vorliegenden Ergebnisse dafür, dass Thrombozyten nicht nur im späten Stadium der Atherosklerose von Bedeutung sind, sondern auch bei intakter Gefäßwand atherosklerotische Prozesse in der ApoE^{-/-} Maus begünstigen.

7 Schlussfolgerungen

Trotz zunehmender Erfolge in der Therapie kardiovaskulärer Krankheiten, sind Myokardinfarkt und Apoplex als Folge von Atherosklerose nach wie vor die häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Um den Krankheitsprozess der Atherosklerose verhindern, aufhalten oder gar rückbilden zu können, ist es von immenser Bedeutung, die Pathogenese der Atherosklerose und die involvierten zellulären und molekularen Mechanismen zu erforschen. Nur wenn wir die komplexen Zusammenhänge dieser Krankheit verstehen, können wir gezielt in den Pathomechanismus der Krankheit eingreifen und neue Therapieansätze generieren. Mit dieser experimentellen Arbeit ist es gelungen, dem Verständnis der Atheroskleroseentstehung einen bedeutenden Schritt näher zu kommen.

In vorangegangenen Studien wurde bereits die Rolle der Thrombozyten vor allem bei der Thrombusbildung im späten Atherosklerosestadium beleuchtet. Die daraus entstandenen Therapieansätze gingen davon aus, dass die Thrombozyten erst bei manifesten atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen, insbesondere bei der Plaqueruptur, arterieller Thrombose und dem Gefäßverschluß von Bedeutung sind. So konzentrierte man sich darauf, durch die Blockade und Inhibition von Enzymen, Adhäsionsmolekülen oder Thrombozytenmembranrezeptoren die Thrombozyten-Subendothel-Interaktion, aber auch die Sekretion thrombogener Substanzen, die zur Aktivierung der Thrombozyten führen, zu verhindern. Eine besondere Bedeutung erlangte dabei die Acetylsalicylsäure (Aspirin[®]), die durch irreversible Hemmung der Cyclooxygenase in Thrombozyten die Thromboxansynthese und damit die Thrombozytenaktivierungs- und aggregation verhindern kann. Aber auch Clopidogrel (Plavix[®]), welches die ADP-abhängige Thrombozytenaktivierung hemmt, und die Inhibition des GPIIb-IIIa Rezeptors durch den Antikörper Abciximab (ReoPro[®]) gewannen in der kardiovaskulären Therapie an Relevanz.

Mit dieser Arbeit ist jedoch erstmalig ein theoretischer Therapieansatz vorstellbar, der in den initialen Entstehungsprozess der Atherosklerose eingreift, und so bei gesunden Risikopatienten mit erhöhten LDL-Cholesterinwerten, das Auftreten von atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen gänzlich verhindern könnte. Angriffspunkt antithrombozytärer Pharmaka wäre demnach nicht nur die Inhibition der Thrombozyten-Subendothel-Interaktion,

sondern auch die Verhinderung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion. Auf diesem Weg könnten Thrombozyten zukünftig nicht mehr nur Ziel therapeutischer Ansätze sein, sondern auch im Focus präventiver Strategien stehen. Die Beteiligung der Thrombozyten an der initialen Phase der Atherogenese könnte auch die hervorragenden Ergebnisse der zur Sekundärtherapie entwickelten Medikamente in der Primärprophylaxe kardiovaskulärer Krankheiten erklären. In der 1989 veröffentlichten „Physicians’ Health Study“ (The Physicians’ Health Study, 1989), einer prospektiven klinischen Studie zur Primärprophylaxe der koronaren Herzkrankheit, konnte unter anderem gezeigt werden, dass die regelmäßige Einnahme von Acetylsalicylsäure die Inzidenz des akuten Myokardinfarktes signifikant reduziert. Fraglich bleibt, zu welchem Zeitpunkt die Thrombozyteninhibition den größten Effekt auf das atherogene Geschehen besitzt und somit zur Reduktion des Auftretens des akuten Myokardinfarktes führt. Unsere Ergebnisse, die die frühe Beteiligung der Thrombozyten in der Entstehungsphase der Atherosklerose nachweisen konnten, stützen die Annahme, dass die Inhibition der Thrombozyten-Endothel-Interaktion für diese positiven Resultate in der Primärprävention verantwortlich ist. Somit scheinen bekannte antithrombozytäre Medikamente der Sekundärtherapie auch als Primärprophylaxe relevant zu sein. Für die Zukunft stellt sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt und bei welchen Risikofaktoren mit der Einleitung einer antithrombozytären Therapie begonnen werden sollte, oder ob diese neuen Erkenntnisse Anlass für eine generelle Empfehlung zur Primärprophylaxe mit antithrombozytären Pharmaka geben. Zur Klärung dieser Fragen und zur Frage der Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf den Menschen sind weitere prospektive klinische Studien nötig.

8 Literatur

1. Andre,P, B Arbeille, V Drouet, P Hainaud, C Bal dit Sollier, J P Caen, L O Drouet, 1996, Optimal antagonism of GPIIb/IIIa favors platelet adhesion by inhibiting thrombus growth. An ex vivo capillary perfusion chamber study in the guinea pig: *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 16, p. 56-63.
2. Andre,P, C V Denis, J Ware, S Saffaripour, R O Hynes, Z M Ruggeri, D D Wagner, 2000, Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins: *Blood*, v. 96, p. 3322-3328.
3. Bergmeier,W, K Rackebrandt, W Schroder, H Zirngibl, B Nieswandt, 2000, Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies: *Blood*, v. 95, p. 886-893.
4. Body,SC, 1996, Platelet activation and interactions with the microvasculature: *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, v. 27 Suppl 1, p. S13-25.
5. Boisvert,WA, R Santiago, L K & T R A Curtiss, 1998, A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice.: *J Clin.Invest*, v. 101, p. 353-363.
6. Bombeli,T, B R Schwartz, J M Harlan, 1998, Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha: *J.Exp.Med.*, v. 187, p. 329-339.
7. Bombeli,T, B R Schwartz, J M Harlan, 1999, Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets: *Blood*, v. 93, p. 3831-3838.
8. Boring,L, J Gosling, M Cleary, I F Charo, 1998, Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis: *Nature*, v. 394, p. 894-897.

9. Brand,K, S Page, G Rogler, A Bartsch, R Brandl, R Knuechel, M Page, C Kaltschmidt, P A Baeuerle, D Neumeier, 1996, Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion: *J.Clin.Invest*, v. 97, p. 1715-1722.
10. Brass,LF, D R Manning, K Cichowski, C S Abrams, 1997, Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond: *Thromb.Haemost.*, v. 78, p. 581-589.
11. Breslow,JL, 1996, Mouse models of atherosclerosis: *Science*, v. 272, p. 685-688.
12. Celletti,FL, J M Waugh, P G Amabile, A Brendolan, P R Hilfiker, M D Dake, 2001, Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression: *Nat.Med.*, v. 7, p. 425-429.
13. Chen,H, D Locke, Y Liu, C Liu, M L Kahn, 2002, The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion: *J Biol.Chem.*, v. 277, p. 3011-3019.
14. Clemetson,KJ, J M Clemetson, 2001, Platelet collagen receptors: *Thromb.Haemost.*, v. 86, p. 189-197.
15. Collins,RG, R Velji, N V Guevara, M J Hicks, L Chan, A L Beaudet, 2000, P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice: *J.Exp.Med.*, v. 191, p. 189-194.
16. Cybulsky,MI, K Iiyama, H Li, S Zhu, M Chen, M Iiyama, V Davis, J C Gutierrez-Ramos, P W Connelly, D S Milstone, 2001, A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis: *J.Clin.Invest*, v. 107, p. 1255-1262.
17. Dawson,TC, W A Kuziel, T A Osahar, N Maeda, 1999, Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.: *Arteriosclerosis*, v. 143, p. 205-211.

-
18. De Meyer,GR, M F Hoylaerts, M M Kockx, H Yamamoto, A G Herman, H Bult, 1999, Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis: *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, v. 19, p. 2524-2534.
 19. de Villiers,WJS, J D Smith, M Miyata, H M Dansky, E Darley, S Gordon, 1998, Macrophage phenotype in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 18, p. 631-640.
 20. Dickfeld,T, E Lengyel, A E May, S Massberg, K Brand, S Page, C Thielen, K Langenbrink, M Gawaz, 2001, Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via a p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis: *Cardiovasc.Res.*, v. 49, p. 189-199.
 21. Dong,ZM, A A Brown, D D Wagner, 2000, Prominent Role of P-Selectin in the Development of Advanced Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice: *Circulation*, v. 101, p. 2290-2295.
 22. Dong,ZM, S M Chapman, A A Brown, P S Frenette, R O Hynes, D D Wagner, 1998, The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis: *J.Clin.Invest*, v. 102, p. 145-152.
 23. Eriksson,EE, X Xie, J Werr, P Thoren, L Lindbom, 2001a, Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins: *FASEB J.*, v. 15, p. 1149-1157.
 24. Eriksson,EE, X Xie, J Werr, P Thoren, L Lindbom, 2001b, Importance of primary capture and l-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo: *J.Exp.Med.*, v. 194, p. 205-218.
 25. Frenette,PS, C V Denis, L Weiss, K Jurk, S Subbarao, B Kehrel, J H Hartwig, D Vestweber, D D Wagner, 2000, P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo: *J.Exp.Med.*, v. 191, p. 1413-1422.

-
26. Frenette,PS, R C Johnson, R O Hynes, D D Wagner, 1995, Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., v. 92, p. 7450-7454.
 27. Frenette,PS, T N Mayadas, H Rayburn, R O Hynes, D D Wagner, 1996, Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins: Cell, v. 84, p. 563-574.
 28. Gawaz,M, 2001, Blood platelets - physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases, New York, Thieme.
 29. Gawaz,M, K Brand, T Dickfeld, G Pogatsa-Murray, S Page, C Bogner, W Koch, A Schomig, F Neumann, 2000, Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis: Atherosclerosis, v. 148, p. 75-85.
 30. Gawaz,M, F J Neumann, T Dickfeld, W Koch, K L Laugwitz, H Adelsberger, K Langenbrink, S Page, D Neumeier, A Schomig, K Brand, 1998, Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells: Circulation, v. 98, p. 1164-1171.
 31. Gawaz,MP, J C Loftus, M L Bajt, M M Frojmovic, E F Plow, M H Ginsberg, 1991, Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIB- IIIA) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions: J.Clin.Invest, v. 88, p. 1128-1134.
 32. Gibbins,JM, M Okuma, R Farndale, M Barnes, S P Watson, 1997, Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain: FEBS Lett., v. 413, p. 255-259.
 33. Gimbrone,MA, Jr., 1999, Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis.: Am J Pathol, v. 155, p. 1-5.

-
34. Goto,S, Y Ikeda, E Saldivar, Z M Ruggeri, 1998, Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions: *J.Clin.Invest.*, v. 101, p. 479-486.
 35. Griending,KK, R W Alexander, 1997, Oxidative stress and cardiovascular disease: *Circulation*, v. 96, p. 3264-3265.
 36. Gu,L, Y Okada, S K Clinton, C Gerard, G K Sukhova, P Libby, B J Rollins, 1998, Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice: *Mol.Cell*, v. 2, p. 275-281.
 37. Han,J, D P Hajjar, M Febbraio, A C Nicholson, 1997, Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36.: *J Biol Chem*, v. 272, p. 21654-21659.
 38. Hansson,GK, 2005, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease.: v. 352, p. 1685-1695.
 39. Hansson,GK, L Jonasson, P S Seifert, S Stemme, 1989, Immune mechanisms in atherosclerosis.: *Arteriosclerosis*, v. 9, p. 567-578.
 40. Henn,V, J R Slupsky, M Grafe, I Anagnostopoulos, R Forster, G Müller-Berghaus, R A Kroccek, 1998, CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells: *Nature*, v. 391, p. 591-594.
 41. Hollenbaugh,D, N Mischel-Petty, C P Edwards, J C Simon, R W Denfeld, R A Kiener, A Aruffo, 1995, Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells.: *J Exp Med*, v. 182, p. 33-40.
 42. Jandrot-Perrus,M, S Busfield, A H Lagrue, X Xiong, N Debili, T Chickering, J P Le Couedic, A Goodearl, B Dussault, C Fraser, W Vainchenker, J L Villeval, 2000, Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily: *Blood*, v. 96, p. 1798-1807.

43. Johnson,RC, S M Chapman, Z M Dong, J M Ordovas, T N Mayadas, J Herz, R O Hynes, E J Schaefer, D D Wagner, 1997, Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice: *J.Clin.Invest.*, v. 99, p. 1037-1043.
44. Kaplan,JE, D G Moon, L K Weston, F L Minnear, P J Del Vecchio, J M Shepard, J W and Fenton, 1989, Platelets adhere to thrombin-treated endothel cells in vitro.: *Am.J.Physiol*, v. 257, p. H423-H433.
45. Kasirer-Friede,A, J Ware, L Leng, P Marchese, Z M Ruggeri, S J Shattil, 2002, Lateral clustering of platelet GP Ib-IX complexes leads to up-regulation of the adhesive function of Integrin alphaIIbbeta3: *J.Biol.Chem.*, v. 277, p. 11949-11956.
46. Khoo,JC, E Miller, P McLoughlin, D Steinberg, 1988, Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation.: *Arteriosclerosis*, v. 8, p. 348-358.
47. Khoo,JC, E Miller, F Pio, D Steinberg, J L Witztum, 1992, Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates.: *Arterioscler Thromb*, v. 12, p. 1258-1266.
48. Kieffer,N, D R Phillips, 1990, Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions.: *Annu Rev Cell Biol*, v. 6, p. 329-357.
49. Knouff,C, M E Hinsdale, H Mezdour, M K Altenburg, M Watanabe, S H Quarfordt, P M & M N Sullivan, 1999, Apo E structure determines VLDL clearance and atherosclerotic risk in mice.: *J Clin.Invest*, v. 103, p. 1579-1586.
50. Knowles,JW&MN, 2000, Genetic Modifiers of Atherosclerosis in Mice.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 20, p. 2336-2345.
51. Leonard,EJ, T Yoshimura, 1990, Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): *Immunol.Today*, v. 11, p. 97-101.
52. Li,JM, R S Podolsky, M J Rohrer, B S Cutler, M T Massie, M R Barnard, A D Michelson, 1996, Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa: *J.Surg.Res.*, v. 61, p. 543-548.

-
53. Libby,P, 2002, Inflammation in atherosclerosis.: Nature, v. 420, p. 868-874.
 54. Lindemann,S, N D Tolley, D A Dixon, T M McIntyre, S M Prescott, G A Zimmerman, A S Weyrich, 2001, Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis: J.Cell Biol., v. 154, p. 485-490.
 55. Lusis,AJ, 2000, Atherosclerosis: Nature, v. 407, p. 233-241.
 56. Lutgens,E, L Gorelik, M J Daemen, E D de Muinck, I S Grewal, V E Kotliansky, R A Flavell, 1999, Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis: Nat.Med., v. 5, p. 1313-1316.
 57. Mach,F, U Schonbeck, J Y Bonnefoy, J S Pober, P Libby, 1997, Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor: Circulation, v. 96, p. 396-399.
 58. Mach,F, U Schonbeck, G K Sukhova, E Atkinson, P Libby, 1998, Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling: Nature, v. 394, p. 200-203.
 59. Massberg,S, G Enders, R Leiderer, S Eisenmenger, D Vestweber, F Krombach, K Messmer, 1998, Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin: Blood, v. 92, p. 507-515.
 60. Massberg,S, G Enders, F C Matos, L I Tomic, R Leiderer, S Eisenmenger, K Messmer, F Krombach, 1999a, Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo.: Blood, v. 94, p. 3829-3838.
 61. Massberg,S, M Gawaz, S Grüner, V Schulte, I Konrad, U Heinzmann, B Nieswandt. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. J.Exp.Med. 2002.
Ref Type: In Press

-
62. Massberg,S, M Sausbier, P Klatt, M Bauer, A Pfeifer, W Siess, R Fassler, P Ruth, F Krombach, F Hofmann, 1999b, Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I: *J.Exp.Med.*, v. 189, p. 1255-1264.
 63. May,AE, F J Neumann, K T Preissner, 1999, The relevance of blood cell-vessel wall adhesive interactions for vascular thrombotic disease.: *Thromb Haemost*, v. 82, p. 962-970.
 64. Methia,N, P Andre, C V Denis, M Economopoulos, D D Wagner, 2001, Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor- deficient mice: *Blood*, v. 98, p. 1424-1428.
 65. Morel,DW, J R Hessler, G M Chisholm, 1983, Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid: *J Lipid Res.*, v. 24, p. 1070-1076.
 66. Nakashima,Y, A S Plump, E W Raines, J L Breslow, R Ross, 1994, ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree.: *Arterioscler Thromb*, v. 14, p. 133-140.
 67. Nakashima,Y, E W Raines, A S Plump, J L Breslow, R Ross, 1998, Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse: *Arterioscler.Thromb Vasc.Biol.*, v. 18, p. 842-851.
 68. Navab,M, J A Berliner, A D Watson, S Y Hama, M C Territo, A J Lusis, D M Shih, B J Van Lenten, J S Frank, L L Demer, P A Edwards, A M Fogelman, 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*, v. 16, p. 831-842.
 69. Nieswandt,B, W Bergmeier, V Schulte, K Rackebrandt, J E Gessner, H Zirngibl, 2000, Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain: *J Biol.Chem.*, v. 275, p. 23998-24002.

-
70. Nieswandt,B, C Brakebusch, W Bergmeier, V Schulte, D Bouvard, R Mokhtari-Nejad, T Lindhout, J W Heemskerk, H Zirngibl, R Fassler, 2001a, Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen: EMBO J, v. 20, p. 2120-2130.
 71. Nieswandt,B, V Schulte, W Bergmeier, R Mokhtari-Nejad, K Rackebrandt, J P Cazenave, P Ohlmann, C Gachet, H Zirngibl, 2001b, Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice: J Exp Med, v. 193, p. 459-469.
 72. Nieswandt,B, V Schulte, W Bergmeier, R Mokhtari-Nejad, K Rackebrandt, J P Cazenave, P Ohlmann, C Gachet, H Zirngibl, 2001c, Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice: J.Exp.Med., v. 193, p. 459-469.
 73. Nurden,A. Human platelet glycoproteins. In Haemostasis and Thrombosis. 3rd edn., Bloom,A., Forbes,C.D., eds., New York: Churchill Livingstone. 259-285. 1994.
Ref Type: Generic
 74. Phillips,DR, I F Charo, L V Parise, L A Fitzgerald, 1988, The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex: Blood, v. 71, p. 831-843.
 75. Phillips,DR, I F Charo, R M Scarborough, 1991, GPIIb-IIIa: the responsive integrin: Cell, v. 65, p. 359-362.
 76. Piedrahita,JA, S H Zhang, R Hagan, P M & M N Oliver, 1992, Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells.: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 89, p. 4471-4475.
 77. Plow,EF, S E D'Souza, M H Ginsberg, 1992, Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report.: Semin Thromb Hemost, v. 18, p. 324-332.
 78. Plow,EF, M H Ginsberg, 1989, Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor.: Prog Haemost Thromb, v. 9, p. 117-156.

-
79. Plump,A, 1997, Atherosclerosis and the mouse: a decade of experience.: *Ann.Med.*, v. 29, p. 193-198.
 80. Plump,AS, J D Smith, T Hayek, K Aalto-Setala, A Walsh, J G Verstuyft, E M Rubin, J L Breslow, 1992, Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice created by homologous recombination in ES cells: *Cell*, v. 71, p. 343-353.
 81. Qiao,J-H, J Tripathi, N K Mishra, Y Cai, S Tripathi, X P Wang, S Imes, M C Fischbein, S K Clinton, P Libby, A J Lusis, 1997, Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice.: *Am J Pathol*, v. 150, p. 1687-1699.
 82. Quinn,MT, S Parthasarathy, L G Fong, D Steinberg, 1987, Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 84, p. 2995-2998.
 83. Raines,EW, M E Rosenfeld, R Ross, 1996, The role of macrophages. In: Fuster V., Ross R., Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease.*: Vol.1.Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 539-555.
 84. Rajavashisth,TB, A Andalibi, M C Territo, J A Berliner, M Navab, A M Fogelman, A J Lusis, 1990, Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins.: *Nature*, v. 344, p. 254-257.
 85. Ramos,CL, Y Huo, U Jung, S Ghosh, D R Manka, I J Sarembock, K Ley, 1999, Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E- deficient mice: *Circ.Res.*, v. 84, p. 1237-1244.

-
86. Reddick,RL, S H Zhang, N Maeda, 1994, Atherosclerosis in mice lacking apoE: evaluation of lesional development and progression.: *Arterioscler Thromb*, v. 14, p. 141-147.
 87. Romo,GM, J-F Dong, A Schade, E E Gardiner, G S Kansas, Li C.Q., L V McIntire, M C Berndt, J A López, 1999, The glykoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin: *J.Exp.Med.*, v. 190, p. 803-813.
 88. Ross,R, 1999, Atherosclerosis--an inflammatory disease: *N Engl J Med*, v. 340, p. 115-126.
 89. Ross,R, J A Glomset, 1973, Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis: *Science.*, v. 180, p. 1332-1339.
 90. Ruggeri,ZM, 1994, New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation: *Semin.Hematol.*, v. 31, p. 229-239.
 91. Ruggeri,ZM, 1997, Mechanisms initiating platelet thrombus formation: *Thromb.Haemost.*, v. 78, p. 611-616.
 92. Ruggeri,ZM, 1999, Structure and function of von Willebrand factor.: *Thromb Haemost*, v. 82, p. 576-584.
 93. Savage,B, F Almus-Jacobs, Z M Ruggeri, 1998, Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow: *Cell*, v. 94, p. 657-666.
 94. Savage,B, E Saldivar, Z M Ruggeri, 1996, Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor: *Cell*, v. 84, p. 289-297.
 95. Schonbeck,U, G K Sukhova, K Shimizu, F Mach, P Libby, 2000, Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 7458-7463.

-
96. Schönbeck,U, F Mach, G K Sukhova, C Murphy, J Y Bonnefoy, R P Fabunmi, P Libby, 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*, v. 81, p. 448-454.
 97. Siess,W, 1989, Molecular mechanisms of platelet activation: *Physiol.Rev.*, v. 69, p. 58-178.
 98. Sims,PJ, M H Ginsberg, E F Plow, S J Shattil, 1991, Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa receptor: *J Biol Chem*, v. 266, p. 7345-7352.
 99. Sixma,JJ, G H van Zanten, J D Banga, H K Nieuwenhuls, P G de Groot, 1995, Platelet adhesion: *Semin.Hematol.*, v. 32, p. 89-98.
 100. Smithies,O, N Maeda, 1995, Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 5266-5672.
 101. Stary,HC, A B Chandler, S Glasgow, J R Guyton, W Insull Jr, M E Rosenfeld, S A Schaffer, C J Schwartz, W D Wagner, R W Wissler, 1994, A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association: *Circulation*, v. 89, p. 2462-2478.
 102. Steinberg,D, 1997, Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance: *J Biol Chem*, v. 272, p. 20963-20966.
 103. Stemme,S, B Faber, J Holm, O Wiklund, J L Witztum, G K Hansson, 1995, T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 3893-3897.

-
104. The Physicians' Health Study 1989. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group: *N Engl J Med*, v. 321, p. 129-133.
 105. Theilmeier,G, C Michiels, E Spaepen, I Vreys, D Collen, J Vermynen, M F Hoylaerts, 2002, Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis- prone sites in response to hypercholesterolemia: *Blood*, v. 99, p. 4486-4493.
 106. Tontonoz,P, L Nagy, J L Alvarez, V A Thomazy, R M Evans, 1998, PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL: *Cell*, v. 93, p. 241-252.
 107. Zhang,SH, R L Reddick, B Burkey, N Maeda, 1994, Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption.: *J Clin.Invest*, v. 94, p. 937-945.
 108. Zhang,SH, R L Reddick, J A Piedrahita, N Maeda, 1992, Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E: *Science*, v. 258, p.468-471.

9 Dank

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz. Durch die Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe im Institut für Experimentelle Kardiologie des Deutschen Herzzentrums der Technischen Universität München ermöglichte er mir in kooperativer und motivierender Atmosphäre wissenschaftlich zu arbeiten.

Besonders danke ich Herrn PD Dr. med. Steffen Massberg. Mit seinem umfassenden fachübergreifendem Wissen und großem persönlichem Engagement gelang es ihm, mich für die experimentelle Medizin zu begeistern. Bei Fragen und Problemen stand er mir stets mit viel Geduld und Verständnis zur Seite. Unter seiner Anleitung und konstruktiver Kritik lernte ich wissenschaftliches Arbeiten, von der Durchführung und Auswertung der Experimente bis hin zur Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. med. vet. Ildiko Konrad bedanken, die mich geduldig und kompetent in die Technik der Erstellung der histologischen Präparate einwies und mir stets ein hilfreicher und sachkundiger Ansprechpartner war.

Auch bei Dr. med. Thomas Richter und den medizinisch-technischen Assistentinnen des Instituts für Pathologie des Klinikums rechts der Isar möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten, sowie für die fachkundigen Hinweise bedanken.

Des weiteren möchte ich mich bei Julia Kersting für die gute Zusammenarbeit bedanken, sowie bei allen anderen, die mit vielen Anregungen und Ratschlägen ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen haben.

10 Abkürzungen

A.:	Arteria (lat.)
ADP:	Adenosindiphosphat
AMP:	Adenosinmonophosphat
ApoE:	Apolipoprotein E
Ca ²⁺ :	2-wertiges Calcium
CD40L:	CD40 Ligand
cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP:	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG:	Diacylglycerol
DCF:	Dichlordihydrofluorescein-Diacetat
ELISA:	Enzym-Linked Immuno Sorbent Assay
Fa.:	Firma
Fab:	fragment antigen binding; Antigenbindender Teil eines Antikörpers
Fc:	fragment constant; konstanter Teil eines Antikörpers
GP:	Glykoprotein
GTP:	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HE:	Hämatoxylin/Eosin
HDL:	high-density lipoprotein
ICAM:	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL:	Interleukin
INT γ :	Interferon γ
IP ₃ :	Inositol-(1,4,5)-Triphosphat
LDL:	low density lipoprotein
LDLR:	low density lipoprotein receptor
mAK:	monoklonaler Antikörper
MCP:	monocyt chemoattractant protein
M-CSF:	macrophage colony stimulating factor

mRNA:	messenger RNA
n:	Anzahl
NF- κ B:	nukleärer Transkriptionsfaktor κ B
NO:	Stickstoffmonoxyd
PCR:	Polymerase Kettenreaktion
PDGF:	platlet derived growth factor
PECAM-1:	platelet endothelial cellular adhesion molecule
PGI ₂ :	Prostaglandin I ₂
RT-PCR:	Reverse Transkriptase PCR
PSGL-1:	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
SEM:	standard error mean
TNF:	Tumornekrose Faktor
TxA ₂ :	Thromboxan A ₂
V.:	Vena (lat.)
VCAM:	vaskulär-zelluläres Adhäsionsmolekül
VLDL:	very low density lipoprotein
vWF:	von-Willebrand-Faktor