

# **Technische Universität München**

**1. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar  
Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen  
Deutsches Herzzentrum München und  
des Freistaates Bayern**

## **Das Funktionsverhalten von Thrombozyten und Leukozyten im Zuge der Neointimaformation**

—

### **Die Rolle von Sphingosinkinase 1 und 2**

**Faridun Daniel Rahimi Nedjat**

Vollständiger Abdruck 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. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. St. Massberg  
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 05.02.2014 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.11.2014 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b>                            | <b>V</b>  |
| <b>2 EINLEITUNG</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2.1 MORPHOLOGIE UND FUNKTION VON ARTERIELLEN BLUTGEFÄßEN</b> | <b>2</b>  |
| <b>2.2 ATHEROSKLEROSE</b>                                       | <b>4</b>  |
| <b>2.3 HÄMOSTASEOLOGIE</b>                                      | <b>6</b>  |
| 2.3.1 THROMBOZYT  | 6         |
| 2.3.2 PRIMÄRE HÄMOSTASE   | 7         |
| 2.3.3 SEKUNDÄRE HÄMOSTASE                                       | 8         |
| 2.3.4 FIBRINOLYSE   | 8         |
| <b>2.4 ENDOTHELZELLEN</b>                                       | <b>8</b>  |
| <b>2.5 NEOINTIMAFORMATION/ GEFÄßREMODELING</b>                  | <b>10</b> |
| <b>2.6 DISSEKTION</b>   | <b>12</b> |
| <b>2.7 LEUKOZYTEN</b>   | <b>12</b> |
| 2.7.1 NEUTROPHILE GRANULOZYTEN                                  | 13        |
| 2.7.2 BASOPHILE GRANULOZYTEN                                    | 13        |
| 2.7.3 EOSINOPHILE GRANULOZYTEN                                  | 13        |
| 2.7.4 MONOZYTEN/MAKROPHAGEN                                     | 14        |
| 2.7.5 LYMPHOZYTEN   | 14        |
| <b>2.8 SPHINGOLIPIDE</b>  | <b>16</b> |
| 2.8.1 SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT                                     | 16        |
| 2.8.2 S1P-REZEPTOREN  | 18        |
| 2.8.3 SPHINGOSINKINASEN   | 19        |
| 2.8.4 SPHINGOSINKINASE1 UND 2 -KNOCKOUT MAUSLINIEN              | 19        |
| 2.8.5 S1P UND ENDOTHELZELLEN                                    | 20        |
| 2.8.6 S1P UND LEUKOZYTEN  | 21        |
| 2.8.7 S1P UND GLATTE GEFÄßMUSKELZELLEN                          | 22        |
| 2.8.8 S1P UND THROMBOZYTEN                                      | 22        |
| 2.8.9 S1P UND NEOINTIMAFORMATION                                | 22        |
| <b>3 PROBLEMSTELLUNG</b>  | <b>24</b> |
| <b>4 MATERIAL UND METHODEN</b>                                  | <b>25</b> |
| <b>4.1 SUBSTANZEN</b>   | <b>25</b> |
| 4.1.1 ACRIDIN ORANGE  | 25        |
| 4.1.2 RHODAMIN B  | 25        |
| 4.1.3 PUFFER  | 25        |
| <b>4.2 TIERMODELL</b>   | <b>26</b> |
| 4.2.1 VERWENDETE VERSUCHSTIERE                                  | 26        |
| 4.2.2 NARKOSE   | 28        |
| 4.2.3 OPERATIONSTECHNIK   | 30        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.2.4 AKUTE VERSUCHSREIHE  | 30        |
| 4.2.5 CHRONISCHE VERSUCHE  | 34        |
| 4.2.6 MIKROSKOP  | 35        |
| 4.2.7 FÄRBEPROTOKOLL <i>EX VIVO</i>  | 37        |
| 4.2.8 FÄRBEMETHODE <i>IN VIVO</i>  | 38        |
| 4.2.9 ORGANENTNAHME  | 39        |
| <b>4.3 AUSWERTUNG</b>  | <b>39</b> |
| 4.3.1 AUSWERTUNG DER INTRAVITALMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN   | 39        |
| 4.3.2 HISTOLOGIE   | 41        |
| <b>4.4 ÜBERSICHTLICHE DARSTELLUNG DER VERSUCHSGRUPPEN</b>  | <b>44</b> |
| <b>4.5 VERSUCHSPROTOKOLLE UND EXPERIMENTELLE GRUPPEN</b>   | <b>45</b> |
| 4.5.1 ETABLIERUNG DES MODELS DER ARTERIELLEN GEFÄßWANDDENUDATION   | 46        |
| 4.5.2 DAS ZELLULÄRE ADHÄSIONSV ERHALTEN NACH DENUDATION DER ARTERIELLEN<br>GEFÄßWAND BEI C57BL6/J-WILD TYP   | 47        |
| 4.5.3 ROLLE VON SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT BEI DER NEOINTIMAHYPERPLASIE UND BEIM ZELLULÄREN<br>ADHÄSIONSV ERHALTEN  | 48        |
| 4.5.4 DAS ZELLULÄRE VERHALTEN NACH DER DENUDATION DER ARTERIELLEN GEFÄßWAND BEI SPHK1 <sup>-/-</sup> UND SPHK2 <sup>-/-</sup><br>UND DEREN GEGENÜBERSTELLUNG MIT DEM C57/BL6J-WILD TYP     | 48        |
| <b>5 ERGEBNISSE</b>  | <b>50</b> |
| <b>5.1 ETABLIERUNG DES MODELS DER ARTERIELLEN GEFÄßWANDDENUDATION</b>  | <b>50</b> |
| <b>5.2 DAS ZELLULÄRE ADHÄSIONSV ERHALTEN NACH DENUDATION DER ARTERIELLEN GEFÄßWAND<br/>BEI C57BL6/J-WILD TYP</b>   | <b>55</b> |
| <b>5.3 DIE ROLLE VON SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT BEI DER NEOINTIMAHYPERPLASIE</b>  | <b>64</b> |
| <b>5.4 DAS ZELLULÄRE VERHALTEN NACH DER DENUDATION DER ARTERIELLEN GEFÄßWAND BEI<br/>SPHK1<sup>-/-</sup> UND SPHK2<sup>-/-</sup> UND DEREN GEGENÜBERSTELLUNG MIT DEM C57/BL6J-WILD TYP</b> | <b>65</b> |
| <b>5.6 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</b>  | <b>71</b> |
| 5.6.1 BEWEIS DER DENUDATION UND NEOINTIMAFORMATION BEI C57BL6/J-WILD TYP   | 71        |
| 5.6.2 DAS ZELLULÄRE ADHÄSIONSV ERHALTEN NACH DENUDATION DER ARTERIELLEN GEFÄßWAND<br>BEI C57BL6/J-WILD TYP   | 71        |
| 5.6.3 EINFLUSS DER SPHINGOSINKINASE 1 UND 2 AUF DIE NEOINTIMAFORMATION   | 72        |
| 5.6.4 DAS ZELLULÄRE ADHÄSIONSV ERHALTEN NACH DENUDATION DER ARTERIELLEN GEFÄßWAND<br>BEI SPHK1 <sup>-/-</sup> UND SPHK2 <sup>-/-</sup>   | 72        |
| 5.6.5 DER EINFLUSS DER SPHINGOSINKINASEN 1 UND 2 AUF DAS ZELLULÄRE VERHALTEN NACH DER<br>DENUDATION IM VERGLEICH MIT WILD TYP  | 72        |
| 5.6.6 SCHLUSSFOLGERUNG   | 73        |
| <b>6 DISKUSSION</b>  | <b>74</b> |
| <b>6.1 DAS TIERMODEL DER NEOINTIMAFORMATION</b>  | <b>74</b> |
| <b>6.2 ETABLIERUNG DES TIERMODELLS DER NEOINTIMAFORMATION</b>  | <b>75</b> |
| <b>6.3 ZELLULÄRES VERHALTEN IM PROZESS DER INFLAMMATION NACH DER VERLETZUNG<br/>DER ARTERIELLEN GEFÄßWAND</b>  | <b>79</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>6.4 DIE ROLLE VON SPHK1 UND SPHK2 FÜR DIE NEOINTIMAPROLIFERATION NACH<br/>VERLETZUNG DER ARTERIELLEN GEFÄßWAND</b>                 | <b>85</b>  |
| <b>6.5 DIE ROLLE VON SPHK1 UND SPHK2 FÜR DIE REGULIERUNG INFLAMMATORISCHER<br/>PROZESSE NACH VERLETZUNG DER ARTERIELLEN GEFÄßWAND</b> | <b>86</b>  |
| <b>6.6 SCHLUSSFOLGERUNG</b>   | <b>88</b>  |
| <b>6.7 AUSBLICK</b>   | <b>88</b>  |
| <b>7 ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>90</b>  |
| <b>8 SUMMARY</b>  | <b>92</b>  |
| <b>9 LITERATURVERZEICHNIS</b>   | <b>94</b>  |
| <b>10 TABELLENVERZEICHNIS</b>   | <b>104</b> |
| <b>11 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>   | <b>105</b> |
| <b>12 DANKSAGUNG</b>  | <b>107</b> |



## 1 Verzeichnis der Abkürzungen

|                 |  |
|-----------------|--|
| A. fem. superf. | Arteria femoralis superficialis                  |
| AC              | Adenylatcyclase                                  |
| ADP             | Adenosindiphosphat                               |
| ATP             | Adenosintriphosphat                              |
| bzw.            | beziehungsweise                                  |
| CD              | Cluster of differentiation                       |
| cm              | centimeter                                       |
| d               | day  |
| DES             | Drug eluting stent                               |
| EC              | endothelial cell                                 |
| EGF             | endothelial growth factor                        |
| ERK             | extracellular signal-regulated kinase            |
| FGF             | fibroblast growth factor                         |
| GM-CSF          | granulocyte macrophage colony-stimulating factor |
| GP              | Glykoprotein                                     |
| HDL             | high density lipoprotein                         |
| HE              | Hämatoxilin-Eosin                                |
| HWZ             | Halbwertszeit                                    |
| i.v.            | intravenös                                       |
| ICAM-1          | intracellular adhesion molecule-1                |
| Ig              | Immunglobulin                                    |
| IL              | Interleukin                                      |
| IVM             | Intravitalmikroskopie                            |
| $\lambda$       | lambda   |
| LDL             | low density lipoprotein                          |
| MCP-1           | monocyte chemotactic protein-1                   |
| M-CSF           | macrophage colony-stimulating factor             |
| MHC             | Major Histocompatibility Complex                 |
| ml              | milliliter                                       |
| MPS             | Mononukleäres Phagozyten-System                  |
| $\mu\text{m}$   | mikrometer                                       |
| $\mu\text{l}$   | mikroliter                                       |
| nm              | nanometer  |
| NO              | Stickstoffmonoxid                                |
| oxLDL           | oxidized low density lipoprotein                 |
| PAF             | platelets activating factor                      |

## Verzeichnis der Abkürzungen

---

|                    |  |
|--------------------|--|
| PDGF               | platelets derived growth factor                    |
| PG                 | Prostaglandin                                      |
| PI3                | Phosphatinositol 3-Phosphat                        |
| prim.              | primär   |
| PSGL-1             | P-Selectin Glycoprotein Ligand-1                   |
| PTCA               | perkutane transluminale Koronarangioplastie        |
| RANTES             | regulated and normal T cell expressed and secreted |
| S1P                | Sphingosin-1-Phosphat                              |
| s.c.               | subcutan   |
| sek.               | sekundär   |
| SM $\alpha$ -actin | smooth muscle $\alpha$ -actin                      |
| SphK               | Sphingosinkinase                                   |
| TF                 | tissue factor                                      |
| TNF- $\alpha$      | tumor necrosis factor- $\alpha$                    |
| TxA <sub>2</sub>   | Thromboxan A <sub>2</sub>                          |
| u./o.              | und / oder   |
| usw.               | und so weiter                                      |
| u.v.m.             | und vieles mehr                                    |
| V. fem. superf.    | Vena femoralis superficialis                       |
| VCAM-1             | vascular adhesion molecule-1                       |
| VEGF               | vascular endothelial growth factor                 |
| vG                 | van Gieson   |
| VSMC               | vascular smooth muscle cell                        |
| vWF                | von Willebrand Faktor                              |
| z.B.               | zum Beispiel                                       |
| ZNS                | Zentrales Nervensystem                             |

## 2 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind gegenwärtig die Haupttodesursache in der westlichen Welt und wissenschaftlichen Schätzungen zufolge werden sie ab dem Jahre 2020 weltweit an erster Stelle stehen (Murray & Lopez 1997). Zu diesen Erkrankungen zählen laut der WHO unter anderem koronare Herzerkrankungen, zerebrovaskuläre Erkrankungen und periphere arterielle Verschlusskrankheiten (World Health Organisation 2011). Die Hauptursache ist die Atherosklerose, eine entzündliche Erkrankung der Gefäßwand. Der Entzündungsprozess führt zu einer Verengung des Gefäßlumens durch einen atherosklerotischen Plaque u./o. der Bildung eines Thrombus nach Plaqueruptur mit einhergehendem Endothelschaden, wodurch eine ausreichende Blutversorgung nicht mehr stattfinden kann. Die Behandlung der atherosklerotisch erkrankten Gefäße treibt nun schon seit Jahrzehnten die Forschung an, therapeutische Lösungen zu finden.

Im Jahre 1977 wurde mit der erstmaligen Anwendung der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) die interventionelle Kardiologie begründet (Ishiwata et al. 2000). Nun war es möglich arterielle Gefäße, die durch artherosklerotische Veränderungen verengt waren, mit der Hilfe eines Ballons zu erweitern bzw. zu öffnen und somit wieder einen ausreichenden Blutfluss zu gewährleisten. Die absolute Lösung war damit allerdings noch nicht erreicht. Bei ca. 34% der Patienten wurde im Zuge der Behandlung eine Restenose durch Remodeling innerhalb der ersten sechs Monate beobachtet (Holmes, JR et al. 1984). Die Restenose entstand als Folge einer überschießenden Wundheilungsreaktion ausgelöst durch die PTCA, die zu pathophysiologischen Veränderungen innerhalb der Gefäßwand und somit zu einer Wandverdickung und Lumeneinengung führte. Ein erneuter Eingriff wurde somit erforderlich. Dennoch hat sich die PTCA als effektive Therapie zur Behandlung von Patienten mit Akutem Koronarem Syndrom (ACS) bewährt.

Mitte der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die Herzkatheteruntersuchung mit der Anwendung der Stent-Technik erneut revolutioniert (Dotter et al. 1983). Mit dieser elastisch expandierenden Endoprothese war nicht nur die Möglichkeit gegeben, Gefäßengpässe zu erweitern, sondern auch ein Zusammensinken der Gefäße sowie die Restenose nach der PTCA zu verhindern. Zwar wurde dadurch die Anzahl der benannten Komplikationen immens gesenkt, jedoch war das Problem der Restenose nicht komplett behoben. Denn ungefähr 22% der gestenteten Patienten entwickelten eine In-Stent Restenose (Fischman et al. 1994; Serruys et al. 1994). Untersuchungen machten dafür eine quasi neue Ursache ausfindig, nämlich die Neointimahyperplasie (Wong & Chan 2004). Diese ist als eine überschießende Wundheilungsreaktion der Intima, durch die Stentimplantation zugefügte Verletzung der Endothelschicht zu verstehen und ist im eigentlichen Sinne dem Gefäßwandremodeling zuzuordnen. Um dieser pathologischen Reaktion therapeutisch zu begegnen, wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Ansatzpunkte verfolgt. Die wohl bedeutendste Innovation war die Entwicklung des sogenannten „Drug Eluting Stents“ (DES), dem medikamentenbeschichteten Stent. Durch den Einsatz von Beschichtungen

unterschiedlichster Zusammensetzung zur Hemmung von Migration und Proliferation glatter Muskelzellen, erhoffte man sich nun endlich die Achillessehne der Intimahyperplasie gefunden zu haben. Und gerade Medikamente wie Sirolimus und Paclitaxel wiesen sehr gute Ergebnisse auf (Colombo et al. 2003; Moses et al. 2003; Schampaert et al. 2004; Schofer et al. 2003). Zwar ist die Zahl der Komplikationen um ein weiteres gesenkt worden, Restenosen treten jedoch weiterhin bis heute auf, gerade auch bei Patienten mit Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus. Und ein weiteres Problem ist durch die DES aufgetreten, nämlich die späte Stent-Thrombose, als deren Ursache die langsame Reendothelialisierung der antithrombotisch wirkenden Intima angesehen werden kann (Ishiwata et al. 2000).

Das Bestreben therapeutische Mittel gegen Remodeling und besonders gegen die Neointimahyperplasie zu entwickeln, hat zu einer Vielzahl an Forschungsrichtungen geführt. Ein recht vielversprechender Ansatz scheint das bioaktive Lipidmolekül Sphingosin-1-phosphat zu sein, welches durch die Enzyme Sphingosinkinase-1 und Sphingosinkinase-2 gebildet wird. Dieses steuert eine Vielzahl unterschiedlicher, physiologischer Prozesse, wie Inflammation, Migration von Zellen, Angiogenese, Immunität u. v. m. Gerade aufgrund der Vielfalt und Verschiedenheit seiner Funktionen sieht man in letzter Zeit die Möglichkeit, die überschießende Inflammation und Reorganisation, die durch Artherosklerose, PTCA oder Stenting in einem Gefäßabschnitt hervorgerufen werden kann, beeinflussen zu können.

Viele bisherige erfolgsversprechende Ergebnisse beruhen auf *in vitro* Versuchen. Jedoch ist es nicht ausreichend möglich, trotz der ausgefeilten Modelle, gleichzeitig hämodynamisches und lokal zelluläres Verhalten und deren Interaktion *in vitro* zu analysieren, was allerdings *in vivo* möglich wäre. Noch immer werden dementsprechend große Anstrengungen unternommen, um gute *in vivo* Modelle zu entwickeln, die im Fokus des Interesses stehenden pathophysiologische Vorgänge wiedergeben können. Im Zuge dessen entwickelten im Jahre 2000 Sata et al. ein Mausmodell, welches die Möglichkeit bot durch eine Gefäßdenudation eine Neointimahyperplasie zu induzieren (Sata et al. 2000). Dieses Modell könnte die Möglichkeit bieten den Prozess des Gefäßremodelings, wie auch der Neointimaformation besser zu analysieren.

Ziel dieser Arbeit war es, dieses Modell in Verbindung mit der Untersuchung der Triggerfunktionen von Sphingosin-1-Phosphat, als einen neuen Ansatzpunkt in der Problemlösung des Remodeling zu erforschen.

### **2.1 Morphologie und Funktion von arteriellen Blutgefäßen**

Arterielle Blutgefäße besitzen einen mehrschichtigen Wandaufbau. Dieser wird eingeteilt in die Tunica intima (Intima), die Tunica media (Media) und die Tunica adventitia (Adventitia) oder externa (Lüllmann-Rauch 2003).

Die Tunica intima ist die innerste Schicht des Gefäßes und besteht aus dem Endothel, der Basallamina und einer dünnen subendothelialen Lamina. Das Endothel ist eine einschichtige und lückenlose Schicht polygonaler Zellen, deren Längsachse parallel zum Blutstrom ausgerichtet ist (Lüllmann-Rauch 2003). Die Funktion dieser Endothelzellen ist die Regulation

der Gefäßweite, der vaskulären Permeabilität, die Kontrolle der Blutgerinnung und der Zelladhäsion und Zellmigration (Hirase & Node 2012). Detaillierte Angaben dazu folgen im Abschnitt 2.4.

Zwischen der Tunica intima und media befindet sich die Membrana elastica interna. Diese Membran ist ein „zweidimensionales Flechtwerk aus elastischen Fasern“<sup>1</sup>, die große Poren besitzt, so dass Stoffe vom Gefäßlumen aus in das Gewebe diffundieren können.

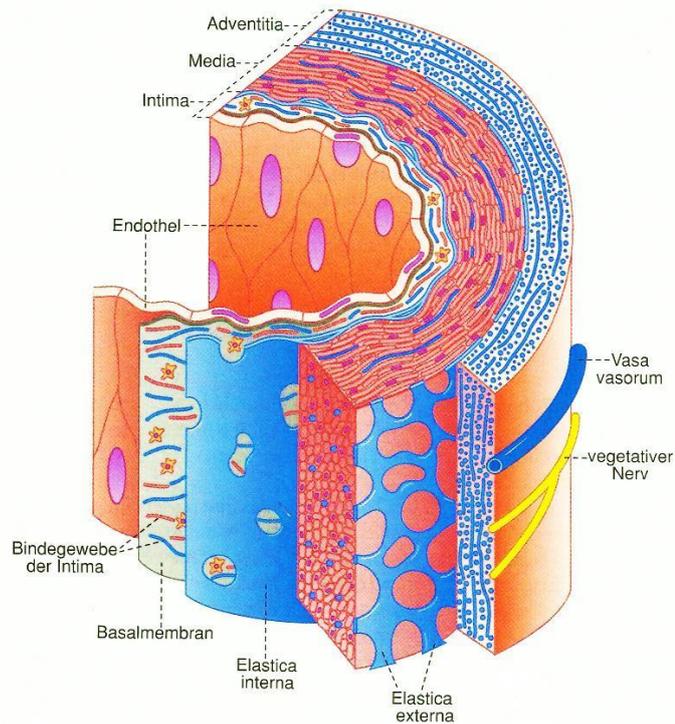
Die Tunica media besteht aus der extrazellulären Matrix und zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen, die funktionell aneinander angeschlossen sind. Durch aktive Spannungsentwicklung können die Zellen zu einer Kontraktion des Gefäßes führen und somit die Weite des Gefäßlumens bestimmen. Gesteuert werden sie dabei durch unterschiedliche Substanzen, wobei NO als die wichtigste zu nennen ist. Durch diese Kontraktion der Gefäße kann der Blutdruck jeweils verändert werden, wobei der arterielle Kreislauf das Hochdrucksystem des Blutkreislaufes ausmacht (Lüllmann-Rauch 2003; Hirase & Node 2012). Die Media und die Adventitia werden durch die Membrana elastica externa getrennt. Diese ist ebenfalls ein Flechtwerk aus elastischen Fasern und nur bei größeren Arterien zu erkennen.

Die Adventitia ist eine Bindegewebsschicht, die hauptsächlich aus Fibroblasten, Kollagenfibrillen und elastischen Fasern besteht und deren Aufgabe die Fixierung des Gefäßes mit der Umgebung ist, um diese zu stabilisieren. Außerdem beinhaltet sie Gefäßwand-versorgende Gefäße (Vasa vasorum), die Teile der Intima mitversorgen (Lüllmann-Rauch 2003). Neueren Erkenntnissen zur Folge dient die Adventitia als Reserve für Fibroblasten, die bei entzündlichen Prozessen in der Gefäßwand aktiviert und rekrutiert werden können (Shi et al. 1996b).

Die arterielle Gefäßwand ist ein multifunktionales, dreidimensionales Gebilde, welches die Fähigkeit besitzt sich den Veränderungen des Blutdrucks, des Blutflusses und der Scherkräfte anzupassen, seien sie nun physiologischen oder pathologischen Ursprungs. Dieses funktionelle Verhalten verdankt es der speziellen Kombination zellulärer und extrazellulärer Komponenten der bereits erwähnten drei Schichten: Intima, Media und Adventitia. Veränderungen der Gefäßwand werden meist durch pathologische Stimuli hervorgerufen, die entweder nur einzelne oder alle Schichten betreffen. An beiden Enden der Gefäßwand findet ein Reparaturmechanismus statt, der den Untergang von Gewebszellen, die Infiltration von Entzündungszellen, lokale Zellproliferation und Neovaskularisation umfasst. Diese Vorgänge führen durch strukturelle Veränderungen zu einem Gefäßremodeling, das bei positivem Verlauf die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion gewährleistet (Sartore et al. 2001b).

---

<sup>1</sup> Lüllmann-Rauch (2003)



**Abbildung 1: Wandaufbau der Arterie. Schematische Darstellung der Arterie vom muskulären Typ**  
aus (Welsch 2010)

## 2.2 Atherosklerose

Die Artherosklerose ist eine von der WHO vorgeschlagene Bezeichnung der Schlagaderverkalkung.

Nach neuem Erkenntnisstand wird sie als eine Gefäßerkrankung meist großer bis mittelgroßer Arterien betrachtet, die von der Intima des Gefäßes auf die Media übergreift und zu pathologischen Veränderungen führt (Riede, Werner & Schaefer 2004). Zu den Risikofaktoren gehören das Alter, gestörter Blutfettstoffwechsel, Zigarettenkonsum, Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und bestimmte bakterielle oder virale Infektionen (Kher & Marsh 2004; Riede, Werner & Schaefer 2004).

Die Atherosklerose wird zum besseren Verständnis des Pathomechanismus in unterschiedliche Läsionstypen eingeteilt (Stary et al. 1995). Diese werden im Folgenden beschrieben.

### *Typ-1 Läsion = Initiailläsion*

Nach heutigem Kenntnisstand stellt die Endothelschädigung den Anfang einer pathologischen Kettenreaktion dar, die durch die bereits beschriebenen Risikofaktoren initiiert wird (Riede, Werner & Schaefer 2004).

Die Dysfunktion der Endothelzellen (EC) hat zur Folge, dass vermehrt Rezeptoren, wie LDL (=low density lipoprotein) spezifische Rezeptoren, VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1) und ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), an der Zelloberfläche exprimiert werden

und zu einer vermehrten Akkumulation des Lipidmoleküls LDL und Leukozyten beitragen. Die einwandernden Monozyten wandeln sich in Makrophagen um und phagozytieren das LDL-Molekül (Kher & Marsh 2004). Durch die Sekretion von Botenstoffen, wie PDGF (platelet derived growth factor), IL-1 (interleukin-1) und TNF  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), die zur Chemotaxis beitragen, verstärken Leukozyten und Endothelzellen gegenseitig diesen Vorgang (Ross 1993).

### *Typ-2 Läsion = Fettstreifen (fatty streak)*

Das LDL wird durch Radikale seitens Endothelzellen und Makrophagen oxidiert (oxLDL), was zur vermehrten Phagozytose seitens Makrophagen führt und wodurch sich diese zu Schaumzellen (=Lipophagen) entwickeln. Das Resultat einer solchen Ansammlung von Schaumzellen wird als „fatty streaks“ bezeichnet (Riede, Werner & Schaefer 2004). Die verstärkte Dysfunktion und der Untergang von Endothelzellen führen zu einer vermehrten Adhäsion von Thrombozyten an die Gefäßwand, die vermehrt PDGF ausschütten. Beide Faktoren führen zu einer gesteigerten Migration und Proliferation von Myozyten, die mit der Produktion von extrazellulärer Matrix beginnen (Versari, Lerman & Lerman 2007; Ross 1993).

### *Typ-3/-4 Läsion = Lipidplaque*

Lipophagen kristallisieren LDL aus und gehen kurz darauf durch den Einfluss von T-Lymphozyten durch die Apoptose zugrunde. Dieses „Makrophagengrab“, das aus einem flüssigen Fettbrei mit Cholesterinkristallen besteht, wird als Atherom (Typ 4 Läsion) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine instabile Plaque (Riede, Werner & Schaefer 2004).

### *Typ-5 Läsion= Fibroatheroma*

Die eingewanderten Myozyten produzieren Bindegewebe, vor allem Kollagenfasern, die in die Gefäßwand eingebaut werden und zur Stabilität des Atheroms beitragen (stabile Plaque).

### *Typ-6 Läsion= komplizierte Läsion*

Makrophagen, eingewanderte Muskelzellen und Endothelzellen sezernieren unterschiedliche Zytokine und Enzyme, die proteolytisch das fibrotische Material aufweichen, so dass die Plaque bei mechanischer Beanspruchung, wie z.B. bei erhöhten Scherkräften, aufreißen kann (Garcia-Touchard et al. 2005). Durch diese „Plaquesfissur“ gelangt Plaquematerial in den Blutkreislauf und kann zu embolischen Verschlüssen der nachfolgenden Gefäße führen. Das durch den Riss freigelegte thrombogene Bindegewebe initiiert die Entstehung eines kleinen oder okklusiven Thrombus. Durch die Wundheilung kommt es daraufhin zu der Organisation des Thrombus und im Zuge dessen zu einer Neointimaformation, wobei durch diese das Lumen noch weiter eingeengt wird (Fuster et al. 1992; Riede, Werner & Schaefer 2004).

Zur Vermeidung dessen werden mit großer Anstrengung viele Ansätze im Prozess der Atherosklerose verfolgt, um der Krankheit so gut wie möglich Einhalt gebieten zu können.

### 2.3 Hämostaseologie

Unter physiologischen Bedingungen fließt das Blut im Gefäßsystem, ohne dass es zum Austritt in das umliegende Gewebe oder zum Sistieren kommt (Klinke & Bauer 2005). Verletzungen allerdings, die die Integrität des Blutgefäßsystems aufheben und somit zum Blutverlust in den extravasalen Raum führen, müssen schnell und zuverlässig abgedichtet werden. Aus diesem Grund kommt es bei Traumen zu einer Aktivierung der Hämostase. Diese umfasst eine Interaktion zwischen dem Gefäßendothel und Thrombozyten, sowie aus dem Blutplasma und verletztem Gewebe stammenden Gerinnungsfaktoren, welche zur Bildung eines hämostatischen Pfropfes führen, wodurch die Wandläsion abgedichtet und die Blutstillung erreicht wird. Die Hämostase wird in drei Stadien – primäre, sekundäre und Fibrinolyse – eingeteilt (Gawaz 1999).

#### 2.3.1 Thrombozyt

Ihren Ursprung haben Thrombozyten im Knochenmark, wo sie von Megakaryozyten abgeschnürt werden. Ihre Konzentration beträgt 170 000 bis 400 000 pro  $\mu\text{l}$  Blut und mit einem Durchmesser von 2-4  $\mu\text{m}$  sind sie die kleinsten korpuskulären Bestandteile des peripheren Blutes (Klinke & Bauer 2005; Gawaz 1999). Blutplättchen haben keinen Zellkern und die restliche mRNA und DNA, die sie besitzen, stammen noch vom Megakaryozyt und den Mitochondrien. Ihre physiologische Überlebenszeit beträgt 7 Tage, wonach sie im retikuloendothelialen System der Leber und Milz abgebaut werden. Durch die Aktivierung kann der Thrombozyt seine diskoide Form verändern („shape change“) und eine größere Oberfläche erlangen, was der besseren Abdichtung von Läsionen dienlich ist.

Ihre Ultrastruktur wird in vier morphologische Bereiche eingeteilt – periphere Zone, strukturelle Zone, Zone der Organellen und Membransystem.

Die periphere Zone beinhaltet die Zytoplasmamembran, in der eine große Anzahl an integrierten Rezeptoren für lösliche Agonisten (ADP, Thrombin usw.) oder Adhäsionsproteine (Fibrinogen, von Willebrand Faktor usw.) gelagert sind.

Die strukturelle Zone weist eine Vielzahl an Mikrotubuli und kontraktilen Filamenten, wie Aktin und Myosin auf, die für das Aufrechterhalten der ursprünglichen Form eines inaktiven Thrombozyten zuständig sind. Wird die Zelle aktiviert, so sind sie aktiv an der Formveränderung beteiligt.

Die Zone der Organellen besteht unter anderem aus Glykogenspeicher, Mitochondrien und drei unterschiedlichen Typen von Granula: dichte Granula,  $\alpha$ -Granula, und Lysosomen. Diese Granula besitzen Substanzen, die für die Funktion des Thrombozyten zuständig sind. Die dichten Granula beinhalten aggregationsfördernde Substanzen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ , ADP, ATP und Serotonin. Die  $\alpha$ -Granula weisen Substanzen auf, die für die Adhäsion, Aggregation, Proliferation, Inflammation, Chemotaxis und Koagulation zuständig sind. Die Lysosomen enthalten hydrolytische Enzyme (Gawaz 1999; Dörner 2006).

### 2.3.2 Primäre Hämostase

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt nicht unter physiologischen Umständen, sondern unter pathologischen, wie z.B. bei einer Dysfunktion des Endothels oder durch eine Gefäßwandverletzung. Eine Dysfunktion der Intima wird bei Erkrankungen, wie der Atherosklerose beobachtet. Hierbei geht man davon aus, dass die Endothelzellen nach Aktivierung vermehrt Rezeptoren wie P-Selektin exprimieren, was zu einer vermehrten Adhäsion – geregelt durch das thrombozytäre Integrin GP Ib und dem Selektin PSGL-1 - und Aktivierung von Thrombozyten führt (Frenette et al. 1995). Durch die Verletzung der Gefäßwand wird die subendotheliale Matrix freigelegt, und dadurch adhäsive Moleküle wie Fibronectin, von Willebrand-Faktor und Laminin (Massberg et al. 2002). Das Anhaften von noch inaktiven Blutplättchen an die Läsion wird als primäre Adhäsion bezeichnet. Der erste Kontakt mit der Gefäßwand wird über den von-Willebrand-Faktor (vWF) und dem zugehörigen Glykoprotein Ib-V-IX (GPIb-V-IX) Rezeptorkomplex hergestellt (=Kontaktphase), wobei neueren Ergebnissen zur Folge beim initialen Kontakt die Interaktion von thrombozytärem Glykoprotein VI (GPVI) und Kollagen ebenfalls eine wichtige Rolle spielt (Ruggeri 2002; Massberg et al. 2002). Die vWF-GPIb- Bindung besitzt eine hohe Affinität, was von essentieller Bedeutung für den Widerstand gegen den Blutstrom ist, und dient als initialer Kontakt zur langsamen Translokation der Thrombozyten an die Gefäßwand. Die GPVI-Kollagen-Bindung hat ebenfalls die Translokation als Funktion, aber auch die Aktivierung von thrombozytären adhäsiven Rezeptoren, wie dem Integrin  $\alpha_2\beta_1$  (Nieswandt et al. 2001). Die Stabilisierung der Plättchenadhäsion vollziehen die der Rezeptorfamilie der Integrine zugehörigen Kollagen-, Fibronectin- und den Lamininrezeptoren (=Phase der Stabilisierung) mit den zugehörigen Liganden (Gawaz 1999). Mit der Aktivierung beginnen die Blutplättchen mit der Sekretion der Granula, wodurch sie den Vorgang der Aktivierung verstärken und weitere Thrombozyten anlocken. Unter anderem werden ADP und Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) freigesetzt, welches auch eine vasokonstriktorische Wirkung aufweist, so dass die dadurch hervorgerufene Verlangsamung des Blutstroms die Adhäsion weiterer Blutplättchen erleichtert.

Die Interaktion von Thrombozyten miteinander wird als Aggregation bezeichnet. Durch den Aktivierungsvorgang kommt es innerhalb des Blutplättchens zu einer erhöhten Konzentration von Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Diese führen sowohl zu einer Formveränderung („shape change“) der Zelle, als auch zu einer vermehrten Expression des Glykoproteins GP IIb/IIIa, dem fibrinspezifischen Rezeptor. Dieses Fibrin, erstellt durch die sekundäre Hämostase, verbindet die einzelnen Thrombozyten untereinander, so dass ein stabiles Plättchen-Fibrin-Konglomerat entsteht. Zwar sind diese Querverbindungen zunächst noch reversibel (=prim. Aggregation), aber nach kurzer Zeit erlangen sie eine irreversible Stabilisierung (sek. Aggregation) (Klinke & Bauer 2005; Gawaz 1999).

### 2.3.3 Sekundäre Hämostase

Die endgültige Stabilität erlangt das plättchenreiche Aggregat durch die sekundäre Hämostase. Diese wird unterteilt in das intrinsische und extrinsische System. Beides sind Gerinnungskaskaden mit dem Endprodukt Fibrin, welches durch die Bindung an den GPIIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozyten für Querverbindungen zwischen den Zellen sorgt. Das intrinsische System sorgt über die Faktoren Kallikrein, Faktor XIIa und Faktor XIa für die Aktivierung der Gerinnungskaskade. Das extrinsische System wird durch das bei einer Verletzung freigesetzte Gewebethromboplastin Tissue factor (TF) aktiviert. Hierbei wird die Gerinnungskaskade über die Aktivierung von Faktor VIIa und Xa in Gang gesetzt. Endstrecke beider Systeme ist die Aktivierung von Thrombin aus Prothrombin und dessen Wirkung auf Fibrinogen, woraus Fibrin entsteht. Die löslichen Fibrinmonomere erlangen erst durch Faktor XIII ihre volle Wirkung (Klinke & Bauer 2005; Gawaz 1999).

### 2.3.4 Fibrinolyse

Im intakten Gefäßsystem herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Blutgerinnung und der Fibrinolyse, so dass ständig entstehende Gerinnsel erneut abgebaut werden, um das Blut im flüssigen Zustand zu halten. Bei Verletzungen allerdings wird das Gerinnungssystem verstärkt aktiviert, wodurch es zu einem Überwiegen von Fibrin an der betroffenen Stelle kommt. Aber auch hier ist das fibrinolytische System aktiv, um eine überschießende Reaktion zu verhindern.

Von Bedeutung sind hierbei hemmende Rückkopplungsmechanismen in der Gerinnungskaskade und das Plasmin, eine Serinprotease, welche die Faktoren Va und VIIIa, Fibrin und Fibrinogen spaltet. Plasmin entsteht aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen, aktiviert durch die Faktoren Kallikrein, Urokinase, Streptokinase und dem von den Endothelzellen freigesetzten t-Pa (= tissue factor plasminogen activator).

Eine weitere wichtige Substanz ist das Antithrombin III, welches die Faktoren IXa, Xa und Thrombin inaktiviert, wobei dessen Wirksamkeit durch die Interaktion mit dem von den Endothelzellen ausgeschüttetem Heparin um ein Vielfaches gesteigert werden kann. Ebenfalls von den Endothelzellen ausgeschüttet wird das Thrombomodulin, das durch die Aktivierung von Protein C und S die Faktoren Va und VIIIa inaktiviert. Zusammen mit Antithrombin III bildet es die Kontrollschleife für die Thrombinentstehung (Klinke & Bauer 2005; Dörner 2006).

## 2.4 Endothelzellen

Wie bereits erwähnt, bilden Endothelzellen gemeinsam mit der Basallamina die Gefäßintima. Für eine sehr lange Zeit wurde den Endothelzellen lediglich die Aufgabe zugesprochen, als

anatomische Barriere zwischen den Intravasal- und Extravasalraum zu dienen. Forschungsergebnisse der letzten 20 Jahre haben allerdings diese Ansicht radikal verändert. Das Endothel wird nun als die parakrine, endokrine und autokrine Schaltstelle für vaskuläre Hämostase angesehen (Versari, Lerman & Lerman 2007). So besitzen Endothelzellen viele unterschiedliche Funktionen, zu denen die Aufrechterhaltung der Integrität von Blutgefäßen, die Regulation des Gefäßtonus, der Gefäßpermeabilität, der Gefäßwandinflammation und die antithrombogene Wirkung gezählt werden.

Endothelzellen sind untereinander durch Verbindungsmoleküle, wie tight junctions (zonula occludens) und adhering junctions (VE-cadherin) verbunden, wodurch sie zur Kontrolle über den Durchtritt von Plasmabestandteilen aus dem Blut in den Extravasalraum befähigt sind (Lüllmann-Rauch 2003).

### Einfluss auf Myozyten

Je nach den an der Gefäßwand vorherrschenden Umgebungsbedingungen, ist das Endothel zur Produktion von vasoaktiven Substanzen, von denen NO (=Stickstoffmonoxid) der Hauptvertreter ist, befähigt. So steigen die Synthese und Sekretion von NO bei einer erhöhten Scherkraft an der Gefäßwand an. Stickstoffmonoxid verringert die kontraktile Wirkung von Myozyten der Media, was eine Dilatation des Gefäßes und somit zu einer Senkung des Blutdrucks zur Folge hat (Koller et al. 1994; Koller & Huang 1994).

Zusätzlich hemmt das NO die Proliferation von Myozyten (Versari, Lerman & Lerman 2007). Diese Wirkung ist bei der Atherosklerose oder dem Zustand nach interventionellen Gefäßeingriffen, die zu einer Endotheldysfunktion führen, vermindert, so dass es im Zuge der Pathophysiologie und Wundheilungsreaktion zu einer Intimaverdickung kommen kann. Zudem produziert dysfunktionelles Endothel vermehrt Endothelin-1, TxA<sub>2</sub> und Angiotensin II, welche alle vasokonstriktive Wirkungen besitzen.

### Einfluss auf Thrombozyten

Wie bereits beschrieben besitzen Endothelzellen eine antithrombogene Wirkung. So verhindert die kontinuierliche Synthese von NO und Prostaglandin (PGI<sub>2</sub>) eine Aktivierung der Thrombozyten. Eine Dysfunktion oder eine komplette Abtragung der Intima würde somit zu einer vermehrten Adhäsion von Blutplättchen an die Gefäßwand und Aktivierung führen. Detaillierte Angaben dazu sind im Kapitel 2.3.2 vorzufinden.

### Einfluss auf Leukozyten

Zur Kontrolle der Zelladhäsion und -migration, synthetisierten Endothelzellen NO und IL-10 (=Interleukin-10). Diese hemmen die Adhäsion und Aktivierung von Leukozyten (Kupatt et al. 1996). Eine Inflammation u./o. endotheliale Dysfunktion, z.B. im Rahmen der Atherosklerose, würde nicht nur zu einer verminderten Synthese der protektiven

Substanzen, sondern auch zu einer vermehrten Expression von P-Selektin, vWF und später von E-Selektin und ICAM-1 führen. Diese initiieren die frühe und späte Leukozyten-Rekrutierung in die Gefäßwand, wobei die Selektine (Mayadas et al. 1993; Bullard et al. 1996) für die initiale Adhäsion und das Rollen an der Intima zuständig sind und ICAM-1 für das Leukozytenrollen und die transzelluläre Migration in den subendothelialen Raum (Millan et al. 2006).

Die interventionelle Kardiologie kann allerdings eine Zerstörung von Intimaarealen zur Folge haben, so dass für die Gefäßwand-Zell-Interaktion teilweise veränderte Konditionen vorliegen. So können Leukozyten keine direkte Verbindung mehr mit der Intima über das Endothel eingehen.

Die Abtragung des Endothels sorgt für die Freilegung der subendothelialen Matrix. Das Kollagen gilt dabei als der größte Trigger für die arterielle Thrombusformation. So kommt es über die Kollagen-vWF-GPIIb/IIIa Bindung zum initialen Kontakt zwischen Thrombozyt und Gefäßwand. Die darauffolgende Aktivierung der Zelle sorgt unter anderem für die Entleerung der  $\alpha$ -Granula. Die sich darin befindlichen P-Selektine werden vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert. Dies wiederum fördert die Kontaktbildung zwischen Leukozyten und Blutplättchen über den PSGL-1 Rezeptor (Larsen et al. 1989; Moore et al. 1992). Zusätzlich können nun weitere Leukozyten über die PSGL-1 - L-Selektin Verbindung miteinander Kontakt aufnehmen (Sperandio et al. 2003).

Beim folgenden Heilungsprozess der Intima kommt es zu einer Vermehrung von umliegenden Endothelzellen, die in das geschädigte Areal einwandern. Dies macht allerdings nur einen kleinen Anteil aus. Die meisten in den verwundeten Bereich einwandernden Endothelzellen stammen aus dem Knochenmark (Lin et al. 2000).

### 2.5 Neointimaformation/ Gefäßremodeling

Die atherosklerotisch bedingte Stenose des Gefäßlumens und die daraus folgenden ischämischen Komplikationen machen ein therapeutisches Eingreifen erforderlich. Interventionelle Eingriffe, wie die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) und die Stentimplantation sind weitgehend anerkannte Methoden zur Behandlung symptomatischer Koronararterienerkrankungen. Bei der Mehrheit der behandelten Patienten gelingt es durch die Gefäßerweiterung eine Reperfusion der okkludierten Gefäße herzustellen. Allerdings kann es bei einem Teil der Patienten als Komplikation im Krankheitsverlauf zu einer Restenose kommen, die bei der PTCA 34% und bei der Stentimplantation ca. 22% beträgt (Holmes, JR et al. 1984; Serruys et al. 1994).

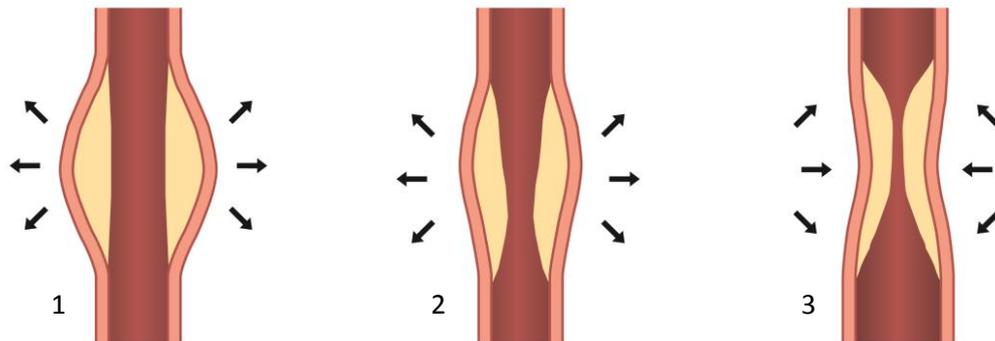
Die Restenose ist bedingt durch das restriktive Remodeling und die Neointimahyperplasie. Die Definition des **Gefäßremodelings** bedeutet im weitesten Sinne die Veränderung des arteriellen Gefäßdurchmessers über eine gewisse Zeit, gemessen an der Fläche, die von der Membrana elastica externa eingeschlossen ist (Schwartz et al. 1998). Allerdings gibt es auch Definitionen, die alle Schichten des Gefäßes mit einbeziehen, so dass bei einem Remodeling

eine Neointimahyperplasie, eine Mediaverdickung u./o. eine Fibrosierung der Adventitia vorliegen kann (Schober & Zerneck 2007).

Eingriffe, wie die PTCA und das Stenting, oder auch eine Plaqueruptur, im Zuge der atherosklerotischen Erkrankung, führen zu einem Endothelschaden der arteriellen Gefäßwand mit anschließendem Wundheilungsprozess. Mit der Verletzung der Intima oder auch Teile der Media, wird die subendotheliale Matrix freigelegt, wodurch sich durch bereits beschriebene Prozesse ein Thrombus aus Thrombozyten, Fibrin und roten Blutzellen bildet (thrombogene Phase). Dieser enthält chemotaktische, wie auch mitogene Substanzen, wodurch Leukozyten einwandern, die wiederum chemotaktisch wirken und mit der Organisation des Thrombus beginnen. Es erfolgt eine Aktivierung und Proliferation von glatten Muskelzellen (VSMC), die von der Media in die verwundete Region einwandern und mit der Produktion von extrazellulärer Matrix beginnen (Zargham 2008). Die in der Adventitia befindlichen Fibroblasten wandeln ihren Phänotyp in Myofibroblasten um und gelangen durch die Media in die Neointimaregion (Shi et al. 1996a; Sartore et al. 2001a). Die Chemotaxis erzeugt des Weiteren die Akkumulation von Progenitorzellen in der Wundregion, womit die Neointima aus VSMCs, Fibromyozyten, Progenitorzellen und der extrazellulären Matrix besteht (Rekrutierungs- und Proliferationsphase) (Sata et al. 2002; Zargham 2008). Dieser Prozess wird als **Neointimaformation** bezeichnet und führt zur Entstehung einer neuen antithrombogen wirkenden Intima. In einigen Fällen allerdings kommt es im Zuge einer überschießenden Wundheilungsreaktion zu einer Neointimahyperplasie mit der Folge einer Gefäßrestenose. Dies macht einen erneuten therapeutischen Eingriff erforderlich. Die Neointimaformation gehört dem Prozess des Gefäßremodelings an und ist eine normale Gewebereaktion mit unterschiedlich starker Ausprägung auf die jeweiligen Stimuli. So ist bei der PTCA die Neointimahyperplasie weniger ausgeprägt, als das konstriktive Remodeling. Wohingegen bei Stenting und der Plaqueruptur die Neointimahyperplasie hauptverantwortlich für die Restenose ist (Wong & Chan 2004).

Es werden zwei Arten des Remodelings unterschieden, nämlich das positive (favorable remodeling) und das negative/konstriktive (unfavorable remodeling). Beim positiven Remodeling kommt es an der Stelle der Gefäßwandverdickung zu einer Erweiterung des Gefäßes, so dass die Lumeneinengung gering ausfällt, wohingegen beim konstriktiven Remodeling eine Gefäßeschnürung an der verdickten Stelle vorliegt (Schwartz et al. 1998).

Der Pathomechanismus dieser Prozesse ist sehr komplex und viele Vorgänge sind noch nicht ausreichend geklärt. Man geht davon aus, dass während der Rekrutierungs- und Proliferationsphase der Neointimaformation zunächst durch die hohe Scherkraft des Blutes eine Gefäßweiterung zu beobachten ist. Jedoch kommt es nach 21 Tagen zunächst auf der medialen Seite der Neointima zu einer Akkumulation kontraktiler Elemente, wie SM  $\alpha$ -actin,  $\alpha$ 8-Integrin, Kollagen und Fibronectin (Zargham, Pepin & Thibault 2007). Später sind die Elemente in der ganzen Neointima verteilt vorzufinden, wodurch es zu einer vermehrten Kontraktion des Gefäßes und somit zu einer Gefäßverengung kommt (=konstriktives Remodeling). Dieser Prozess ist genauso wie die Neointimahyperplasie beteiligt an der Restenose des behandelten Gefäßes (Zargham 2008).



**Abbildung 2: Die unterschiedlichen Formen des Remodelings**

- 1: Perfektes Remodeling; Die Arterie expandiert, so dass es zu keiner Einengung des Lumens kommt.
- 2: Positives Remodeling; Arterie expandiert zum Teil. Die Folge ist eine geringe Einengung des Lumens.
- 3: Negatives Remodeling: Die Arterie konstringiert, wodurch das Lumen weitestgehend eingeengt ist.

## 2.6 Dissektion

Die Dissektion beschreibt einen pathologischen Zustand im Gefäß, bei dem es zu einem Einriss der Intima kommt. Dadurch gelangt das Blut mit Druck in die Media und sorgt für eine longitudinale Aufspaltung. Es entstehen 2 Gefäßlumen, wobei es sich bei dem „wahren“ Lumen um das ursprüngliche handelt, das noch von der Intima umgeben ist. Das „falsche“, neu entstandene Lumen hingegen ist von der Media und Adventitia begrenzt. Als Ursache sind die Atherosklerose, Hypertonie, degenerative Erkrankungen der Media (Marfan-Syndrom) und invasive Eingriffe, wie bei der interventionelle Kardiologie, heranzuführen (Siewert & Brauer 2007).

## 2.7 Leukozyten

Die Leukozyten werden unterteilt in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, die wiederum in drei unterschiedliche Typen (neutrophile, basophile und eosinophile) eingeteilt werden. Die Funktion dieser Zellen, die meist im Interstitium und weniger im Blut ausgeübt wird, ist die Abwehr, „z.B. gegen pathogene Mikroorganismen und ihre Toxine, gegen abgestorbene körpereigene Zellen, artfremde Proteine, Virus-infizierte, entartete und fremde Zellen“<sup>2</sup>. Zu diesem Zweck verlassen sie das Blut nach kurzer Zirkulationszeit, wandern zum Wirkungsort und verbleiben im Extravasalraum bis zum Lebensende. Besonders hohe Leukozytenzahlen sind in der Lamina propria der Schleimhäute von

---

<sup>2</sup> Lüllmann-Rauch (2003)

Verdauungs- und Atemtrakt und den lymphatischen Organen vorzufinden (Lüllmann-Rauch 2003).

### **2.7.1 Neutrophile Granulozyten**

Granulozyten sind Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr. Neutrophile Granulozyten besitzen eine Größe von 9-16µm, haben einen segmentierten Kern und erscheinen in der Pappenheim-Färbung blass rosa bis fliederfarben. Im Zytoplasma der ausgereiften Zelle sind fünf unterschiedliche Granula feststellbar, die Enzyme und bakterizide Stoffe enthalten.

Reife Neutrophile haben im Rahmen der Abwehr eine Vielzahl an Funktionen, die durch an der Oberfläche der Zelle exprimierte Moleküle vermittelt werden. Das befähigt sie zur Chemotaxis, Phagozytose, Sekretion der Granula und Bildung toxischer Sauerstoffderivate. Im Verlauf einer Entzündung können sie innerhalb kürzester Zeit auf chemotaktische Reize hin das Gefäßbett verlassen und gerichtet ins Gewebe einwandern, wo sie Immunkomplexe und Erreger phagozytieren. Die Einwanderung an den Ort der Entzündung erfolgt so lange, bis die Bereitstellung der chemotaktischen Substanz sistiert. Die Neutrophilen bilden somit die erste Angriffsfront, erst später folgen die Monozyten und andere Leukozyten. Nach der Phagozytose mehrerer Bakterien stirbt der Neutrophile ab (Lüllmann-Rauch 2003; Barthlott et al. 2006).

### **2.7.2 Basophile Granulozyten**

Dieser Zelltyp besitzt grobe Granula, die durch die Pappenheim-Färbung dunkelblau-violett erscheinen, und einen weniger segmentierten Zellkern. Der basophile Granulozyt wird vermehrt im peripheren Blut, aber auch im Gewebe verschiedener Organe vorgefunden. Es wird sowohl für die Infektabwehr, als auch für die IgE-vermittelte allergische Reaktion durch das Ausschütten von Zytokinen und Histaminen verantwortlich gemacht (Lüllmann-Rauch 2003; Barthlott et al. 2006).

### **2.7.3 Eosinophile Granulozyten**

Das Eosinophile hat einen aus meist zwei Segmenten bestehenden Kern und große Granula. Durch die Pappenheim-Färbung erscheint die Zelle mit einer ziegelroten Färbung. Sie ist am häufigsten in den Schleimhäuten des Verdauungs- und Atemtraktes vertreten, während sich nur ein kleiner Teil im peripheren Blut aufhält. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Vernichtung von mehrzelligen Parasiten. Außerdem haben sie Einfluss auf die Pathogenese allergischer Erkrankungen (Lüllmann-Rauch 2003; Barthlott et al. 2006).

### 2.7.4 Monozyten/Makrophagen

Die Gesamtheit der Makrophagen des Körpers, die Promonozyten des Knochenmarks, Monozyten des zirkulierenden Blutes sowie die typischerweise gewebeständigen Makrophagen und dendritischen Zellen umfasst, werden als das Mononukleäre Phagozyten-System (MPS) bezeichnet. Jedes Organ wie Leber, Lunge, Milz, Lymphknoten und Knochenmark besitzt seinen eigenen Makrophagen. Gemeinsames Merkmal allerdings sind deren Abstammung vom Monozyten, die Phagozytose von Fremdorganismen und Geweberesten und deren Interaktion mit dem spezifischen Abwehrsystem. Weitere Funktionen sind die Sekretion von Mediatoren und regulatorisch aktiver Substanzen der Inflammation, des Wachstums und der Differenzierung.

Die Monozyten sind mit einem Durchmesser von bis zu 20µm die größten Zellen unter den Leukozyten. Diese besitzen einen nierenförmigen Zellkern und deren Zytoplasma ist gefüllt mit einer hohen Anzahl an Lysosomen. Monozyten sind allerdings keine Endzellen. Nach einer Zirkulationszeit von 1-3 Tagen differenzieren sie sich durch eine entsprechende Stimulierung zu Makrophagen. Ihre vielfältigen Funktionen werden durch die Expression von unterschiedlichen Effektormolekülen auf der Zelloberfläche und der Synthese von bis zu 100 biologisch aktiven Substanzen wiedergespiegelt. So gehört nicht nur die Phagozytose zum Aufgabenbereich, sondern auch die Sekretion von chemotaktisch wirkenden Substanzen (MCP1 und Rantes), von Wachstumsfaktoren (M-CSF und GM-CSF), von Interleukinen (IL-1, -6, -8, etc.), Interferonen und TNF- $\alpha$ . Schließlich nehmen Makrophagen auch Einfluss auf Entzündungsvorgänge, indem sie den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF), Prostaglandine und Leukotriene bilden.

Von besonderer Bedeutung für reparative Prozesse ist der geordnete Ablauf der Vorgänge Neoangiogenese, der Entstehung von Granulationsgewebe und der Re-Epithelialisierung. Die für diese Vorgänge wichtigen Faktoren PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epithelial growth factor) und FGF (fibroblast growth factor) werden von aktivierten Makrophagen bereitgestellt.

Durch die Antigenpräsentation interagieren sie mit dem spezifischen Immunsystem (Lüllmann-Rauch 2003; Barthlott et al. 2006).

### 2.7.5 Lymphozyten

Die Mehrzahl der im Blutkreislauf befindlichen Lymphozyten sind kleine Zellen mit einem Durchmesser von 6-10µm.

Nur ein geringer Anteil der Lymphozytenpopulation zirkuliert im Blut. Die Mehrzahl hält sich im Knochenmark, in lymphatischen Organen, oder als freie Zellen im Bindegewebe auf. Von dort aus treten sie in regelmäßigen Abständen, teils direkt durch die Blutgefäßwand, teils über die Lymphgefäße, wieder zurück ins Blut. Auf diese Weise patrouillieren sie ständig im Organismus, um Antigene aufzuspüren.

Lymphozyten sind auf die Produktion von Antikörpern und auf die Gedächtnisfunktion des Immunsystems spezialisiert (=spezifische Abwehrreaktion).

Vorstufen werden im Knochenmark gebildet und anschließend auf ein bestimmtes Antigen spezialisiert, was als Prägung bezeichnet wird. Je nachdem, in welchem Organ die Prägung der Zelle stattfindet, werden zwei Haupttypen von Lymphozyten unterschieden:

1. T-Lymphozyten, die im Thymus geprägt werden.
2. B-Lymphozyten, die im Knochenmark ihre Prägung erfahren (Barthlott et al. 2006).

Alle Typen erscheinen zunächst als kleine Lymphozyten und sind morphologisch nicht unterscheidbar. Jedoch lassen sie sich immunologisch nach unterschiedlichen Zytodifferenzierungs-Antigenen, die sie auf der Oberfläche tragen, und die man nach der CD-Klasse (cluster of differentiation) einteilt, unterscheiden (Welsch 2010).

### T-Lymphozyten

Die Fähigkeit des Erkennens einer größtmöglichen Anzahl von Antigenen wird den T-Lymphozyten zugesprochen. Dadurch ermöglichen sie die Regulation der humoralen Immunantwort, die zellvermittelte Zytotoxizität und die Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp. Diese differenzierten Effektorzellen erkennen und binden Antigene nicht direkt, sondern nur, wenn diese in Form von Oligopeptiden mit dem MHC-Molekül (Major Histocompatibility Complex) durch die antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden (Barthlott et al. 2006). Es gibt zwei unterschiedliche MHC-Moleküle. Das MHC I-Protein befindet sich in einer großen Dichte auf jeder kernhaltigen Körperzelle und präsentiert zelleigene Antigenpeptidbruchstücke, die das „Selbst“ aufzeigen. Das MHC II-Protein wird bei antigenpräsentierenden Zellen vorgefunden, mit der Aufgabe Antigenbruchstücke zu binden, die von der jeweils dazu passenden T-Zelle erkannt werden kann (Welsch 2010).

Die T-Lymphozyten werden unterteilt in CD4-positive, CD8-positive und regulatorische T-Zellen. Die CD4-positiven T-Lymphozyten werden in TH1 und TH2 Zellen unterteilt. Erstere aktivieren Makrophagen und induzieren auf diese Weise die Abtötung phagozytierter Krankheitserreger. Die TH2 Zellen aktivieren CD8-positive T-Lymphozyten und zudem B-Lymphozyten, welche sich dann zu Plasmazellen differenzieren.

CD8-positive Zellen (=zytotoxische Lymphozyten) töten durch Viren und Bakterien infizierte aber auch entartete Zellen ab. Die regulatorischen T-Lymphozyten besitzen eine immunsuppressive Wirkung (Barthlott et al. 2006).

### B-Lymphozyten

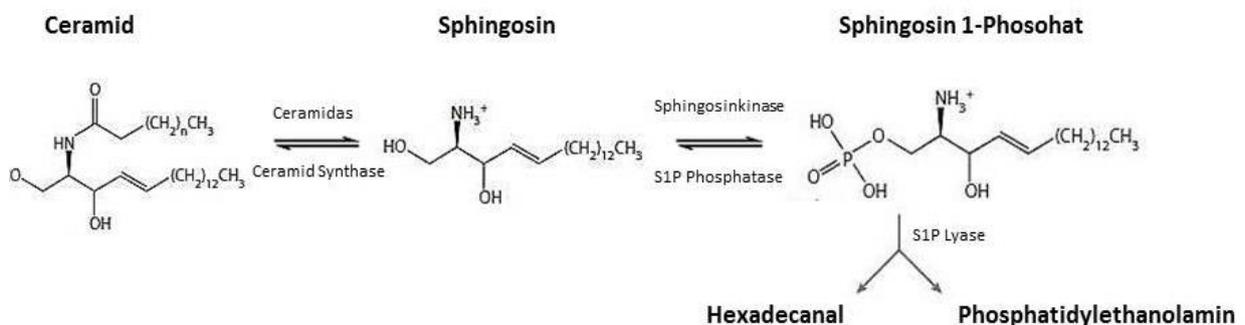
Die B-Lymphozyten machen ca. 20% der Blutlymphozyten und 80% der Milzlymphozyten aus, wobei sie im Lymphknoten und in der Milz nur wenige Tage am Leben bleiben, im Knochenmark jedoch Monate bis Jahre. Sie sind für die spezifische Immunantwort verantwortlich und deren primäre Funktion ist die Synthese von Antikörpern.

Nach der Reifung im Knochenmark wandert die B-Zelle zu den sekundären lymphatischen Organen, wobei sie in diesem Entwicklungsstadium an der Zelloberfläche Immunglobuline

(IgD und IgM) exprimiert. Aktiviert wird sie durch die Interaktion mit einer antigenpräsentierenden Zelle, die das zu ihr speziell passende Antigen präsentiert. Zur vollständigen Aktivierung ist allerdings eine weitere Interaktion mit einem T-Lymphozyt von Nöten. Das aufgenommene Antigen wird von speziellen Organellen der B-Zelle zunächst aufgearbeitet und dann vom MHC II-Molekül oberflächlich präsentiert. Erkennt die T-Zelle das Antigen, so beginnt sie mit der Synthese und Sekretion von CD40-Liganden und Interleukin-4 (IL-4). Dies löst die klonale Selektion der B-Zelle, die Synthese der Antikörper und die Entwicklung der Zelle zur Plasmazellen aus. Mit den Plasmazellen entstehen auch B-Gedächtniszellen, die eine lange Lebenszeit haben und bei einer Reinfektion für eine schnellere Immunantwort sorgen (Barthlott et al. 2006; Welsch 2010).

## 2.8 Sphingolipide

In den letzten Jahren sind Sphingolipide immer mehr ins Zentrum des Forschungsinteresses gerückt. Zu den Sphingolipidmetaboliten gehören Ceramid, Ceramid-1-Phosphat, Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat. Dabei sind diese in allen eukaryotischen Zellen vertreten und beeinflussen als bioaktive Signalmoleküle Prozesse, die das Zellverhalten und die Zellfunktion betreffen. Von entscheidender Bedeutung sind die Zellmigration, die Inflammation, die Zelldifferenzierung und Angiogenese.



**Abbildung 3: Sphingosin-1-Phosphat Syntheseweg**  
(modifiziert nach Hugh Rosen)

Im Zentrum dieser Arbeit steht das Lipidmolekül Sphingosin-1-Phosphat. Im Folgenden wird ein Teil seines Wirkungsspektrums beschrieben, der für die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit relevant ist.

### 2.8.1 Sphingosin-1-Phosphat

Der Lipidmediator Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Molekül, das in der Natur weit verbreitet ist. Gebildet wird es durch die Phosphorylierung von Sphingosin durch die Sphingosinkinasen 1 und 2. Es bindet mit hoher Affinität an fünf verschiedene G-Proteingekoppelte Rezeptorsubtypen (S1P1-5), von denen jeder eine unterschiedliche

Signalwirkkette aufweist und durch die es an vielen zellulären Prozessen, wie der Proliferation und Migration, beteiligt ist (Sanchez & Hla 2004). Während S1P intrazellulär die Mitose, Apoptose, Kalziummobilisation, Motilität und Mobilisation der Zelle beeinflusst, ist seine extrazelluläre Wirkung auf die Angiogenese, die Herzentwicklung, die Zellmigration und das Immunsystem ausgedehnt (Limaye 2008; Kupperman et al. 2000; Schwab et al. 2005).

Die de novo Synthese von Sphingosin erfolgt im endoplasmatischem Retikulum aus dem Abbau von Ceramiden. Dabei wird das Ceramid durch das Enzym Ceramidase zunächst zu Sphingosin umgebaut und dann durch die Sphingosinkinasen zu S1P phosphoryliert. Der Abbau von S1P kann auf unterschiedliche Arten erfolgen. Zum einen kann es durch die Sphingosin-1-Phosphat-Phosphatase 1 und 2 in Sphingosin rückgewandelt werden. Zum anderen kann S1P irreversibel durch die Sphingosin-1-Phosphat-Lyase abgebaut werden (Fyrst & Saba 2010).

Die Halbwertszeit (HWZ) beträgt 15 Minuten (Venkataraman et al. 2008). Die S1P-Konzentration in einer Zelle ist somit abhängig vom Aktivitätsgrad der auf- und abbauenden Enzyme. Wie bereits erwähnt ist S1P für das Zellwachstum und -überleben zuständig, Ceramid und Sphingosin hingegen für die Apoptose und den Wachstumsstopp. Die Sphingosinkinase ist für das Gleichgewicht dieser Lipidmediatoren zuständig, was als Ceramid/S1P Rheostat bezeichnet wird.

Die intravasale Konzentration von S1P beträgt ca. 330-420 nmol/l, die im Gewebe 0,5-0,75 pmol/mg (Tolle et al. 2007). Dieser Konzentrationsunterschied wird dabei als vaskulärer S1P Gradient bezeichnet und ist für das Auswandern von Lymphozyten vom Gewebe in das Blut von entscheidender Bedeutung. Der Lipidmediator wird durch die hämatopoetischen Zellen, wie Thrombozyten, Erythrozyten und auch durch vaskuläre Endothelzellen, sowie, neuesten Erkenntnissen zur Folge, auch durch endotheliale Progenitorzellen (EPC) ausgeschüttet (Yatomi et al. 1997a; Venkataraman et al. 2008; Pappu et al. 2007). Den größten Beitrag zur intravasalen Konzentration leisten Erythrozyten, durch eine konstante Abgabe, und ECs (Ito et al. 2007; Venkataraman et al. 2008). Wohingegen Thrombozyten S1P erst nach einer Aktivierung mit Thrombin oder einer Erhöhung der Scherrate ausschütten (Yatomi et al. 1997b; Aoki et al. 2007). Der größte Anteil des Lipidmediators im Blut liegt in gebundener Form vor. Und zwar hauptsächlich an Albumin und Lipoproteinen (ca. 60%), wobei unter den Lipoproteinen HDL (high density lipoprotein) den größten Anteil bindet (Murata et al. 2000). Ein wichtiges S1P-Analogon ist das FTY720 (=Fingolimod). Dieses ist ein chemisches Derivat des Wirkstoffs Myriocin vom Pilz *Isaria sinclairii* und wird bereits schon in der Klinik zur Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt. Näheres dazu in Kapitel 2.8.6. Fingolimod wird durch die Sphingosinkinase Typ 2 phosphoryliert und kann an die Sphingosinrezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3-5</sub> binden und somit wichtige Prozesse, wie die Migration von Zellen mitbeeinflussen (Kharel et al. 2005a; Mandala et al. 2002; Brinkmann et al. 2002).

### 2.8.2 S1P-Rezeptoren

Dem Sphingosinlipid S1P werden fünf unterschiedliche Rezeptoren namens S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> zugeordnet. Die Bindung an die Rezeptoren ruft unterschiedliche Signalwege via der heterotrimeren G-Proteine Gi, Gq, Gi/0, G<sub>12</sub> und G<sub>13</sub> hervor.

Dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptor wird das Gi –Protein zugeordnet und den Rezeptoren S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> Gi, Gq und G<sub>13</sub> (Lee, Evans & Hla 1996). Neuesten Ergebnissen zur Folge, geht man bei S1P<sub>4</sub> davon aus, dass es eine Verbindung zu Gi besitzt und S1P<sub>5</sub> wird eine Kopplung an Gi/0 und G<sub>12</sub> zugesprochen (van Brocklyn et al. 2000; Malek et al. 2001).

Der Rezeptor vom Gq- Typ führt zur Aktivierung der Phospholipase C und zur Kalziummobilisation. Der Gi-Typ führt zu der Hemmung der Adenylatcyclase (AC), der Aktivierung von ERK (extracellular signal-related kinase) und der Phospholipase C. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation der PI3-Kinase (Phosphatinositol 3-Phosphat), womit die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht und das Rac-Protein aktiviert wird. G<sub>12/13</sub> aktiviert die Rho-Kinase, welche für die Regulation von Aktin im Zytoskelett und Zellmobilität zuständig ist.

Die Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> werden im gesamten Körper unterschiedlich stark exprimiert. Wohingegen S1P<sub>4</sub> nur im lymphatischen und hämatopoetischen Gewebe und S1P<sub>5</sub> nur im zentralen Nervensystem vorkommen (ZNS) (Sanchez & Hla 2004).

Die S1P-Rezeptoren sind an einer großen Anzahl von physiologischen Vorgängen beteiligt, wie der Angiogenese, Regulierung der Gefäßpermeabilität, Regulierung des Blutdrucks, der Herzfunktion und der Immunantwort. Dazu sind die Rezeptoren bei Säugetieren auf einer großen Anzahl von unterschiedlichen Zellen und im Gewebe verteilt vorzufinden.

Bei einigen bedeutenden Versuchen mit Sphingosinrezeptor Knock-out Mäusen, konnten wichtige Kenntnisse gewonnen werden.

So sind die Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> bei der Angiogenese von entscheidender Bedeutung. Mäuse, bei denen der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor ausgeknockt wurde, sind nicht überlebensfähig. Ursache dafür sind massive Hämorrhagien ab Tag 13.5 der Embryogenese aufgrund einer inadäquaten Abdeckung der Gefäße durch Muskelzellen (Liu et al. 2000). Sind alle drei Rezeptoren ausgeknockt, so sterben die Embryonen früher ab und der Schaden am Gefäßsystem ist noch größer. Dies zeigt auf, dass S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> zwar mitentscheidend für die Entwicklung des Gefäßsystems und der Hämodynamik sind, allerdings beeinflusst das alleinige Ausschalten des jeweiligen Rezeptors die Lebensfähigkeit des Embryos nicht (Ishii et al. 2001; Ishii et al. 2002).

Der wohl am besten untersuchte Rezeptor ist S1P<sub>1</sub>. Dieser ist bei Lymphozyten für das Verlassen vom Thymus, wie auch sekundären lymphatischen Organen von entscheidender Bedeutung (Matloubian et al. 2004). Nähere Angaben dazu finden sich im Kapitel 2.8.6.

### 2.8.3 Sphingosinkinasen

Die Phosphorylierung von Sphingosin erfolgt durch die ubiquitär vorkommenden Sphingosinkinasen Typ1 und Typ2 (SphK1 & SphK2). SphK1 wird hauptsächlich im Zytosol der Zellen vorgefunden und ist intrazellulär aktiv. Zum Teil kann das Enzym auch extrazellulär sezerniert werden (Ancellin et al. 2002). Forschungsergebnissen zur Folge, sichert eine erhöhte Aktivität des Enzyms das Überleben der Zelle, es erhöht die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und VCAM-1 bei Endothelzellen und weist eine onkogene Wirkung auf (Xia et al. 1999; Xia et al. 1998; Xia et al. 2000). SphK2 hingegen ist vermehrt im endoplasmatischen Retikulum und im Nucleus vorzufinden. Dem Enzym wird der Einfluss auf mehrere Prozesse zugesprochen. So ist es an der Apoptose der Zelle und der Inhibierung der Zellproliferation beteiligt (Liu et al. 2003). Zum anderen ist es durch die Förderung der Histonacetylierung mitverantwortlich für die Regulierung der Transkription (Hait et al. 2009). Außerdem beeinflusst es die im Zuge von Tumorerkrankungen assoziierte Polarisation der Makrophagen (Weigert et al. 2009).

### 2.8.4 Sphingosinkinase 1 und 2 -Knockout Mauslinien

Sphingosinkinase defiziente Mausstämme weisen nach Untersuchungen der Organe, des Blutes und der Zellen folgende Charakteristika auf.

Sowohl bei SphK1-KO, als auch bei SphK2-KO Mäusen verläuft die Embryogenese unauffällig und die Tiere erreichen ein normales Lebensalter. Bei beiden Mauslinien ist durch das jeweilige Ausschalten eines Enzyms die Gesamtaktivität der Sphingosinkinasen verringert, zudem ist keine vermehrte Synthese der noch funktionsfähigen Kinase zu beobachten. Interessanterweise ist die S1P-Konzentration in beinahe allen Organen beider Stämme im Vergleich zu Wildtypen unverändert. Kein Organ zeigt bei der histologischen Untersuchung phänotypische Veränderungen auf (Allende et al. 2004; Mizugishi et al. 2005).

Die Serumkonzentration des Lipidmediators weist bei beiden Stämmen unterschiedliche Konzentrationen auf. Bei der SphK1-KO Linie ist S1P um 50% im Vergleich zum Wildtyp und SphK2-KO vermindert (Allende et al. 2004). SphK2-KO Mäuse hingegen haben von den drei Gruppen die höchste Konzentration von S1P im Serum (Olivera et al. 2007; Sensken et al. 2010). Interessanterweise ist in den Thrombozyten des SphK1-KO Stammes keine Veränderung der S1P-Konzentration feststellbar.

Im Lymph- und Blutkreislauf, sowie in den Organen werden keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl und Verteilung der Blutzellen festgestellt (Allende et al. 2004; Kharel et al. 2005b).

Zudem konnte ein normales Funktionsverhalten der neutrophilen Granulozyten bei *in vitro* und *in vivo* Versuchen analysiert werden (Zemann et al. 2007).

Es wird davon ausgegangen, dass die noch verbliebene Sphingosinkinase ausreichend S1P produziert und zusätzlich der Abbau gedrosselt wird, so dass eine ausreichende

Konzentration von S1P aufrechterhalten werden kann, um die Lebensfähigkeit des Tieres zu garantieren (Allende et al. 2004; Kharel et al. 2005b).

Sind beide Kinasen ausgeknockt, so versterben die Embryonen in einem frühen Alter aufgrund schwerer Gefäßdeformitäten und neuronaler Defekte. Es wird somit davon ausgegangen, dass die Sphingosinkinasen und S1P entscheidend für die Angiogenese und Neurogenese sind (Mizugishi et al. 2005).

Wie bereits erwähnt, hat S1P als Lipidmediator ein großes Wirkspektrum, das die Zellmigration, Zelldifferenzierung, die Inflammation, die Angiogenese, Kalzium-Homeostase, die Embryogenese, Kardiogenese, Gewebsregeneration und kardiovaskuläre Physiologie, um nur einige wichtige Bereiche zu nennen, beeinflusst. Im Folgenden wird detailliert auf die für diese Arbeit wichtigen Vorgänge eingegangen.

### **2.8.5 S1P und Endothelzellen**

#### Einfluss von S1P auf Endothelzellen und der Angiogenese

Vaskuläre Endothelzellen exprimieren verschiedene S1P Rezeptoren, wobei die am häufigsten vorkommenden S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> sind. Durch deren Aktivierung werden unterschiedliche Prozesse, wie der Morphogenese, Proliferation, Überleben, Zytoskelettveränderung und Migration von Endothelzellen, sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen getriggert. Je nach dem welche Rezeptoren in welcher Konzentration auf der Zelle exprimiert werden, fällt die Antwort auf S1P aus. Das Expressionsmuster ist dabei abhängig von Faktoren wie Zytokinen, S1P-Plasmakonzentration und dem Blutfluss. Dies wird als Grund für die Variation der S1P-Rezeptorexpression in Arterien, Venen und Kapillaren der unterschiedlichen Organe angesehen.

Für die Angiogenese ist vor allem die Interaktion von S1P mit S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> von entscheidender Bedeutung (Liu et al. 2000; Ishii et al. 2002).

Im Gegensatz zu humanen Endothelzellen weisen murine Zellen nicht den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor auf. S1P, wie auch EGF (endothelial growth factor) binden stattdessen an die S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren. Untersuchungen zur Folge, besitzt der S1P<sub>2</sub>-Rezeptor eine hemmende Wirkung auf die Angiogenese, der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor hingegen eine steigernde (Inoki et al. 2006).

Die Ergebnisse einiger Versuchsreihen sprechen dem S1P eine gewichtigere chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen zu als VEGF oder FGF-2. Die extrazelluläre Aktivierung von S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> führt zu Umbauvorgängen des Zytoskeletts durch den Rho und Rac Signalweg, die für die Chemotaxis bedeutend sind (Paik et al. 2001).

S1P ist ebenfalls entscheidend an der Morphogenese endothelialer Zellen, die zur Bildung tubulärer, kapillarähnlicher Strukturen führt, und aus denen später kapilläre Netzwerke hervorgehen, beteiligt (Lee et al. 1999). Dabei ermöglicht speziell die Expression von  $\beta_1$ -Integrinen und dem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin den Endothelzellen die Migration entlang der extrazellulären Matrix (Paik et al. 2001).

### Regulierung von endothelialer Permeabilität und Adhäsion

Die Wirkung von S1P auf die Gefäßwand führt zu einer Erniedrigung der Permeabilität und somit auch zur Reduzierung der Diapedese von Zellen in tiefere Wandschichten. Versuche haben aufgezeigt, dass S1P bei unterschiedlichen humanen und bovinen Endothelzellen zu einem erhöhten elektrischen Widerstand der Gefäßwand führt (Garcia et al. 2001). Die Ursache ist eine gesteigerte Barrierefunktion durch zytoskeletalen Umbau der ECs über die Aktivierung von S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub>. In der Folge wird vermehrt das tight-junction-assoziierten Protein Zonula occludens-1 (ZO-1), welches eine gewichtige Rolle in der endothelialen Chemotaxis und der Integrität der Gefäßbarriere spielt, aktiviert (Lee et al. 2006).

### **2.8.6 S1P und Leukozyten**

Eine physiologische Konzentration von S1P weist einen anti-inflammatorischen und anti-atherogenen Effekt auf. Bei zu hoher Plasmakonzentration kommt es zu einer vermehrten Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und E-Selektin durch Endothelzellen, wodurch die Leukozytenadhäsion erleichtert wird. Dies wird als einer der prädisponierenden Faktoren bei der Entstehung der Atherosklerose diskutiert (Bolick et al. 2005; Xia et al. 1998).

Sphingosin-1-Phosphat ist von entscheidender Bedeutung für das Auswandern von Lymphozyten aus dem Thymus wie auch aus den sekundären lymphatischen Organen. Einfluss nimmt hierbei der vaskuläre S1P Gradient, wonach die Lymphozyten vom Ort der niedrigen S1P-Konzentration im Gewebe zum Ort der höheren Konzentration im Blut wandern (Schwab et al. 2005). Für diesen Prozess wird, wie bereits erwähnt, der S1P<sub>1</sub>-Rezeptor benötigt. Es konnte aufgezeigt werden, dass dessen Ausschalten zu einer Akkumulation von unreifen T-Lymphozyten im Thymus und reifen in Lymphknoten führt. B-Lymphozyten konnten zwar das Knochenmark verlassen, aber auch sie waren zum Abgang aus den sekundären lymphatischen Organen nicht fähig (Matloubian et al. 2004). Im Zuge dessen wird Fingolimod als S1P-Analogon bereits als therapeutisches Mittel gegen Multiple Sklerose eingesetzt. So führt dessen Bindung an S1P<sub>1</sub> zu einer verminderten Expression des Rezeptors und somit zum verminderten Lymphozytenauswandern, wodurch der Demyelinisierungsprozess aufgehalten wird (Kappos et al. 2010; Cohen et al. 2010).

### 2.8.7 S1P und glatte Gefäßmuskelzellen

S1P zeigt ebenfalls einen großen Einfluss auf glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs). Dabei werden die zugehörigen Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> in einer großen Anzahl auf diesen Zellen exprimiert. Der S1P<sub>1</sub> Rezeptor induziert die Migration und Proliferation, wohingegen der S1P<sub>2</sub> Rezeptor diese Prozesse hemmt (Kluk & Hla 2001; Ryu et al. 2002). Dem S1P<sub>3</sub> Rezeptor wird eine Verbindung zum PDGF-Rezeptor der Zelle zugesprochen und damit eine gewichtige Funktion im Prozess der Chemotaxis (Baudhuin et al. 2004).

Die Expression der S1P-Rezeptoren zeigt eine große Variation auf, wobei im Gegensatz zu Endothelzellen bei adulten Muskelzellen in der Media vermehrt S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> und geringer S1P<sub>1</sub> vorzufinden sind (Alewijjnse, Peters & Michel 2004).

### 2.8.8 S1P und Thrombozyten

Die Konzentration von S1P in den Thrombozyten ist im Vergleich zu anderen Zellen sehr hoch, da diese eine ständig aktive SphK und das Fehlen der S1P-Lyase aufweist (Yatomi et al. 1997a; Stoffel, Heimann & Hellenbroich 1973). Der enorme Speicher ist hierbei nicht nur auf die Synthese aus zelleigenem Ceramid zurückzuführen, sondern auch auf die Aufnahme von Sphingosin aus dem Blutplasma. Dieses inkorporierte Sphingosin wird zu S1P durch die beiden Sphingosinkinasen phosphoryliert und kann nach der Aktivierung der Thrombozyten nach extrazelluläre sezerniert werden (Tani et al. 2005).

Die S1P-Freisetzung aus den Thrombozyten erfolgt durch die Stimulierung mit Thrombin und durch eine Erhöhung der Scherkräfte (Aoki et al. 2007). Die Aktivierung des Blutplättchens durch das eigene S1P kann nur extrazellulär erfolgen, wodurch die Formveränderung der Zelle und eine Mobilisation der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Reserven induziert werden (Yatomi et al. 1997b; Yatomi et al. 1995).

### 2.8.9 S1P und Neointimaformation

Wie bereits beschrieben, ist die Proliferation glatter Muskelzellen (SMCs) ein wichtiger Prozess bei der Entstehung der Neointimaformation. Die verschiedenen Zelllinien der vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) zeigen dabei unterschiedliche Variationen bei der Expression der S1P-Rezeptoren. Ist bei adulten Muskelzellen eine geringe Anzahl an S1P<sub>1</sub>, aber eine hohe an S1P<sub>2</sub> vorzufinden, so ist dies bei immaturren Muskelzellen umgekehrt. Muskelzellen sind durch die Hochregulierung von S1P<sub>1</sub> und der verminderten Expression von S1P<sub>2</sub>, zur Migration und vermehrten Proliferation befähigt (Kluk & Hla 2001). Diese Veränderung des Expressionsmusters wird ebenfalls bei der Neointimaformation vermutet. Analysen von Geweben der Neointima bei Patienten mit Zustand nach Stenting haben aufgezeigt, dass in der Neointima bis zu 70% Muskelzellen vorzufinden sind und dass eine

gesteigerte Synthese von S1P<sub>1</sub> vorliegt (Zohlhofer et al. 2001). Man vermutet, dass S1P bei einer pathologischen Wucherung der Intima eine wichtige Rolle spielen könnte.

### 3 Problemstellung

Die invasive Behandlung atherosklerotisch veränderter Gefäße hat das Gefäßremodeling und die Neointimahyperplasie zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit wird anhand der Anwendung von *in vivo* Modellen beabsichtigt, den Prozess der Neointimaformation besser zu verstehen und hieraus neue Therapiekonzepte entwickeln zu können.

Zielsetzung dieser Arbeit ist im ersten Schritt die Etablierung eines Mausmodells der Neointimahyperplasie. Hierbei wird an narkotisierten Mäusen die Gefäßwand der Arteria femoralis superficialis mittels eines flexiblen Drahtes denudiert. Wird die Wundheilungsstörung 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Denudation histologisch verifiziert, so kann dieses Modell als geeignet für die Untersuchung der Neointimaformation angesehen werden.

In einem zweiten Schritt soll durch den Einsatz der fluoreszenzbasierenden Intravitalmikroskopie zu den Zeitpunkten 10, 30, 50 Minuten und 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Denudation zusätzlich die induzierte Inflammation, hier speziell das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten und Leukozyten im geschädigten Gefäßareal analysiert werden.

Als letzter Schritt soll nach einer erfolgreichen Etablierung des Neointimahyperplasie-Modells an der Maus und der erfolgten Standardisierung der Wundheilungsstörung und des zellulären Adhäsionsverhaltens, die Rolle von S1P bei der Neointimahyperplasie anhand weiterführender Versuchsreihen untersucht werden.

Die anschließenden Versuchsreihen umfassen zwei transgene Mausstämme, nämlich SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> sowie die IVM und die histologischen Untersuchungen zu den bereits erwähnten Zeitpunkten nach der Gefäßwandverletzung. Damit erhofft man sich Antworten auf die Fragen, in wie fern die Sphingosinkinasen und Sphingosin-1-Phosphat selbst für die Neointimahyperplasie verantwortlich sind und welchen Einfluss sie auf das zelluläre Verhalten und deren Interaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung der Neointimahyperplasie haben.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Substanzen

#### 4.1.1 Acridin orange

Acridin orange ist ein häufig in der Intravitalmikroskopie verwendeter Fluoreszenzfarbstoff. Er besitzt eine leicht azidophile Eigenschaft, was zu einer vermehrten Akkumulation in Zellen durch das Anheften an Strukturen, wie Lysosomen, Endosomen, Golgi-Apparat, DNA und RNA führt. Zur Anregung des Farbstoffes wird ein Anregungslicht mit der Wellenlänge von  $\lambda = 470 \text{ nm}$  benötigt. Die dabei entstehende Emission weist eine Wellenlänge zwischen  $\lambda = 530 - 560 \text{ nm}$  auf. Dadurch besitzen die Zellen, bzw. die Zellstrukturen die Farbe Grün. Acridin orange kann bei einer zu langen oder regelmäßigen Anregung eine phototoxische Wirkung aufzeigen oder eine Veränderung von Zellverhalten hervorrufen. So sorgt das Anregungslicht bei Arteriolen zu einem Vasospasmus, so dass das zelluläre Verhalten im Lumen nicht mehr beurteilt werden kann. Die Beleuchtung eines venösen postkapillaren Gefäßes hingegen führt zu einer vermehrten Leukozytenadhäsion (Saetzler et al. 1997).

#### 4.1.2 Rhodamin B

Rhodamin B ist ein Fluoreszenzfarbstoff. Dieser bindet an die Mitochondrien der anzufärbenden Zellen. Zur Anregung des Farbstoffs ist eine Immission mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 554 \text{ nm}$  notwendig. Die dabei entstehende Emission besitzt eine Wellenlänge von  $\lambda = 627 \text{ nm}$ , wodurch die gefärbten Zellen rot erscheinen. {Rhodamine B Dye content ~95 % #89}

#### 4.1.3 Puffer

##### PBS-Puffer

Der PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) ist eine für die Zellen gut verträgliche isotone Lösung mit vielfältiger Eigenschaft. Durch ihre Anwendung ist das Arbeiten am Organismus oder mit Zellkulturen bei einem konstanten, physiologischen pH möglich. So dient sie dazu Organe oder Zellen kurzzeitig aufzubewahren, um sie danach weiterzubearbeiten.

### Tyrodes-Puffer

Tyrodes ist ein Puffer, der ebenfalls das Arbeiten bei einem konstanten pH ermöglicht. Anwendung findet er bei der Verarbeitung von Blutbestandteilen. Speziell bei dieser Versuchsreihe wird er zur Isolierung der Thrombozyten eingesetzt. Er wird an jedem Versuchstag neu hergestellt und während der Verarbeitung stets bei Raumtemperatur gehalten, um die Funktion der Blutzellen nicht zu beeinflussen.

Zur Herstellung werden jeweils 0,1 Gewichtsprozent der Trockensubstanzen bovines Serumalbumin (SIGMA, Taufkirchen) und D(+)-Glucose (SIGMA, Taufkirchen) in ein Becherglas gegeben. Hinzu kommen 90ml Aqua bidest, 10ml einer vorbereiteten sterilen Tyrodes-10x-Lösung und 1ml einer 1M HEPES-Lösung (Fa. Invitrogen, Endkonzentration 10mM). Diese Ingredienzen werden durchmischt und deren pH mittels einer Elektrode gemessen. Die Flüssigkeit wird durch die Zugabe von 2mM NaOH oder HCl auf einen pH von 7,4 geeicht, darauf die Hälfte entnommen und separat aufbewahrt. Die restlichen 50ml werden auf einen pH von 6,5 eingestellt. Beide Puffer können sofort zur Isolierung der Thrombozyten verwendet werden.

## 4.2 Tiermodell

Ziel dieser Arbeit ist die Methode der arteriellen Denudation mit der Folge der Neointimahyperplasie zu verifizieren und zu standardisieren. An Hand dessen sollen die Inflammation und die Neointimaformation analysiert und mit anderen Mauslinien verglichen werden.

### 4.2.1 Verwendete Versuchstiere

Als Versuchstier für die vorliegende Arbeit dient die Maus. Diese weist eine schnelle Generationszeit, eine problemlose Aufzucht, ein leichtes Handling und eine kostengünstige Haltung auf. Dadurch ist die Erstellung transgener Stämme vereinfacht und eine größere Möglichkeit zur Erforschung bestimmter Mechanismen und zur Vergleichsanalyse gegeben. Außerdem ist durch ihre geringe Größe die Intravitalmikroskopie problemlos durchzuführen. Die für die Versuche verwendeten Mäuse besitzen ein Alter zwischen 10 und 16 Wochen und weisen ein Gewicht zwischen 20 und 25g auf. Bei den Tieren handelt es sich sowohl um Weibchen, als auch um Männchen.

Für die Versuchsreihen sind folgende Stämme verwendet worden:

- C57Bl6/J (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld)
- SphK1<sup>-/-</sup>
- SphK2<sup>-/-</sup>

## Material und Methoden

---

Die Knock out-Stämme besitzen die C57Bl6/J-Mauslinie als Ursprung, wodurch dieser Hintergrundstamm als Kontrollgruppe dient. Alle erlangten Ergebnisse werden mit den von diesen Tieren erfassten Daten verglichen.

Das vorliegende Versuchsvorhaben ist von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierschG in der Fassung vom 25.05.1998) genehmigt.

### Haltung und Fütterung

Die Tiere werden im Deutschen Herzzentrum unter SPF-Konditionen (spezifisch pathogenfrei) gezüchtet und gehalten.

Die Mäuse befinden sich nach Gewicht und Stämmen getrennt in Gruppen von zwei bis sechs Tieren in Makrolonkäfigen vom Typ II (360cm<sup>2</sup>, Fa. Ehret GmbH, Emmendingen). Bei diesen handelt es sich um durchsichtige, leicht reinig- und sterilisierbare Käfige. Jeder Maus über 20g Körpergewicht stehen mehr als 100cm<sup>2</sup> Fläche zur Verfügung. Über ein Belüftungssystem sind die Tiere einer konstanten Temperatur von 20-24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 Prozent einem gesunden Mikroklima ausgesetzt. Eine Beleuchtungsanlage garantiert einen für die nachtaktiven, stressanfälligen Tiere wichtigen, geregelten zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus, mit 50-100 Lux im Käfig während der Tagesphase. Als Einstreu wird das saugfähige und weichbeschaffene Weichholzgranulat (Tiereinstreu „Faser“, Fa. Altromin, Lage) verwendet. Die Reinigung der Käfige erfolgt zweimal pro Woche, um der Ammoniakbelastung und der gesundheitsschädlichen Feuchtigkeit entgegenzuwirken. Zur Befriedigung der Spiel- und Nestbautriebe wird den Tieren in den Käfigen sterilisierter Zellstoff zur Verfügung gestellt. Pellertiertes Alleinfutter und sterilisiertes Leitungswasser stehen den Tieren (Nr.1324 Ratten-/Maushaltungs-Diät, 10mm, vierkant, Fa.Altromin, Lage) kontinuierlich ad libitum zur Verfügung.

### Kontrollstamm

Der Wildtypstamm C57Bl6/J ist ein für viele Experimente häufig verwendeter Inzuchtstamm. Er wurde durch Dr. C. C. Little generiert und stellt zur Erzeugung kongener und Generierung transgener Mäuse sehr häufig den Hintergrundstamm dar. Charakterisiert ist der Stamm durch eine rasche und problemlose Aufzucht mittels polygamer Verpaarung.

Für die eigene Zucht wurden kommerziell erworbene Geschwisterzuchtpaare (Fa. Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld) als genetischen Ursprung verwendet.

### Gendefiziente und transgene Mauslinien

SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup>:

Zur Untersuchung einer induzierten Inflammation der arteriellen Gefäßwand, dem Ausmaß der Neointimahyperplasie und der Funktionen von Thrombozyten und Leukozyten im Zuge der Neointimaformation kommt es zur Verwendung zweier Knock out-Mausstämme, nämlich SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup>.

Die SphK1<sup>-/-</sup>-Linie zeichnet sich durch das Fehlen der Sphingosinkinase 1 aus und die SphK2<sup>-/-</sup>-Linie wiederum durch das Fehlen der Sphingosinkinase 2. Als Kontrollgruppe wurden sowohl die SphK1<sup>-/-</sup>, als auch die SphK2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit C57Bl6/J zurückgekreuzt und die SphK1<sup>+/+</sup> und SphK2<sup>+/+</sup>-Tiere zur weiteren Zucht erneut verpaart.

### 4.2.2 Narkose

Die Allgemeinanästhesie wird definiert als eine reversible Dämpfung des zentralen Nervensystems, welches zur Ausschaltung der Rezeption und Reaktion auf schädliche äußere Stimuli führt. Dieser Zustand wird durch intravenöse (i.v.) u./o. volatile Anästhetika induziert. Ziel der Narkose ist das Ermöglichen chirurgischer Eingriffe ohne dauerhafte Beeinträchtigung des Patienten bzw. des Tieres. Dieses beruht auf mehreren Prinzipien, nämlich der Amnesie, dem Ausschalten des Bewusstseins, der Analgesie und der Muskelrelaxation, die durch die jeweiligen Medikamente induziert werden können (Larsen 2010).

Bei der Durchführung der Tierversuche kommen zwei unterschiedliche Narkosearten zur Anwendung.

Zum einen erfordern die intraperitoneale Applikation von Medikamenten und die kardialen Blutentnahme den Einsatz der Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Dreieich).

Zum anderen beginnt die Narkose für die operativen Eingriffe mit der Inhalationsanästhesie und wird mit der Injektionsanästhesie fortgesetzt.

#### Inhalationsnarkose

Die Inhalationsnarkose besteht aus Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Dreieich) und Sauerstoff, die beide über einen Verdampfer (Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen, eingerichtet von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen) ins Narkosesystem geleitet werden.

Auf diese Weise kann das Narkosegas schnell an- und abgeflutet werden, so dass diese Methode vorteilhaft für kurz dauernde Eingriffe ist. Durch die schwache analgetische Wirkung von Isofluran kann auf den zusätzlichen Einsatz von Analgetika verzichtet werden, sofern der Eingriff nur mit leichten Schmerzen verbunden ist. Bei größeren Eingriffen kann auf den zusätzlichen Einsatz der Injektionsnarkose nicht verzichtet werden.

#### Injektionsnarkose

Vor der Durchführung der Operation wird die Narkose mittels Inhalation des Isofluran-Sauerstoff-Gemisches eingeleitet.

Daraufhin erfolgt die Injektionsnarkose am schlafenden Tier, um das chirurgische Toleranzstadium (Stadium III) zu erreichen.

Zum Erfüllen der zu Beginn erwähnten Anforderungen an die Narkose wird eine Kombination von drei Medikamenten verwendet. Diese sogenannte Kombinationsnarkose hat den Vorteil, dass die Einzeldosierungen der Wirkstoffe reduziert werden können, wodurch das Auftreten von Nebenwirkungen minimiert werden kann. Die eingesetzten Medikamente sind Fentanyl, Midazolam und Medetomidin.

Fentanyl ist ein agonistisch wirkendes Opiat, das zur Analgesie eingesetzt wird. Bei der Anwendung muss neben der Atemdepression, als unerwartete Nebenwirkung, auch mit einem Abfall des Blutdrucks gerechnet werden. Midazolam gehört zur Wirkstoffklasse der Benzodiazepine und wirkt in diesem Fall myotonolytisch und narkotisch. Zusätzlich besitzt es eine atemdepressive Wirkung, so dass es in Kombination mit Fentanyl in einer niedrigen Dosis verabreicht werden muss.

Medetomidin ist ein im ZNS und im peripheren Gewebe wirkender  $\alpha_2$ -Agonist. Sein Wirkungsspektrum umfasst Sedation, Analgesie, Muskelrelaxation und Anxiolyse. Als unerwünschte Wirkungen sind Bradykardie, Arrhythmien und Hyper- und Hypotension bekannt (Lüllmann, Mohr & Hein 2006).

Die Mischung der Medikamente wird erstellt aus 5,0 mg/kg Midazolam (Midazolam ratiopharm®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe), 0,5 mg/kg Medetomidin (Dormitor®, Pfizer GmbH, Karlsruhe) und 0,05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl-Curamed®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe). Diese wird in zeitlichen Abständen intraperitoneal injiziert, was zur Vertiefung und Aufrechterhaltung der Narkose dient.

Zur Überwachung der Narkose werden bei der Maus in bestimmten zeitlichen Abständen die Atemfrequenz, der Atemtyp und die Körpertemperatur überprüft. Das Fehlen des Flexorenreflexes, welcher ebenfalls regelmäßig geprüft wird, dient als Parameter für die Narkosetiefe. Für das Aufrechterhalten einer konstanten Körpertemperatur wird eine Wärmematte (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner) verwendet. Die kontinuierliche Sauerstoffzufuhr für eine ausreichende Sauerstoffsättigung wird durch eine Narkosemaske gewährleistet. Über diese Maske ist es jederzeit möglich, Isofluran dem Sauerstoff beizumischen, falls keine ausreichende Narkosetiefe mehr vorliegen sollte.

Der chirurgische Eingriff bei einem akuten Versuch dauert ca. 5 Stunden und umfasst den Einsatz des Jugulariskatheters, die Gefäßwanddenudation und die Intravitalmikroskopie. Ein chronischer Versuch ist zweigeteilt und die Einheiten dauern jeweils 1 und 4 Stunden. In der ersten Einheit erfolgt die Gefäßwanddenudation und in der zweiten der Einsatz des Jugularisvenenkatheters und die Intravitalmikroskopie.

Bei der chronischen Versuchsreihe, erfolgt der zweite operative Eingriff nach 7, 14, 21 und 28 Tagen. Dies bedeutet, dass die Trippelnarkose nach dem ersten Eingriff antagonisiert werden muss. Dazu wird nach dem Wundverschluss eine Medikamentenkombination aus 1,2 mg/kg Naloxon (Narvanti®-Vet, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe), 0,5 mg/kg Flumazenil (Anexate®, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) und 2,5 mg/kg Atipamezol (Antisedan®, Pfizer GmbH, Karlsruhe) subkutan injiziert.

Naloxon ist ein reiner Opioid-Antagonist, das die Wirkung von Fentanyl aufhebt. Es wirkt innerhalb weniger Minuten. Flumazenil ist ein Antidot gegen Benzodiazepine und hebt in diesem Fall die Wirkung von Midazolam auf. Antipamezol ist ein  $\alpha_2$ -Adrenorezeptorantagonist und wirkt dadurch dem Medetomidin entgegen (Lüllmann, Mohr & Hein 2006). Beim zweiten Teil der chronischen Versuche werden erneut die Inhalations- und Injektionsnarkose durchgeführt. Nach diesem Eingriff wird das Tier durch Ausbluten in Narkose getötet.

### 4.2.3 Operationstechnik

Es gibt mittlerweile zahlreiche *in vitro* Versuche, um das Verhalten von pluripotenten Vorläuferzellen oder von Zellen der Gefäßwand, wie Endothelzellen, Myozyten oder Fibrozyten, im Zuge des Gefäßremodellings zu analysieren.

Die Ergebnisse dieser Modelle sind vielversprechend und konnten schon bereits zu einer fundierten Kenntnis über zelluläres Verhalten beitragen. Jedoch ist es nicht ausreichend möglich, trotz der ausgefeilten Modelle, gleichzeitig hämodynamisches und lokal zelluläres Verhalten und deren Interaktion *in vitro* zu analysieren. Wohingegen *in vivo* Versuche diesbezüglich optimale Konditionen aufweisen und somit geeigneter zur Analyse der pathophysiologischen Vorgänge im lebenden Organismus erscheinen. Das ideale Tiermodell hierbei sollte nicht zu teuer in der Beschaffung und leicht in der Handhabung sein. Außerdem sollte es ziemlich genau die pathophysiologischen Vorgänge im Menschen reproduzieren und imitieren.

Bei dieser Arbeit unterscheidet man zwei unterschiedliche Versuchseinheiten, nämlich die akute, sowie die chronische.

### 4.2.4 Akute Versuchsreihe

#### Vorbereitungen vor dem operativen Eingriff

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte bei der Durchführung der arteriellen Gefäßdenudation und der darauffolgenden intravitalmikroskopischen Analyse bei der Maus beschrieben.

Vor Beginn des chirurgischen Eingriffes wird die Maus wie in 4.2.2 beschrieben narkotisiert. Zur Vorbeugung einer Austrocknung der Cornea, wird auf die Augen Bepanthen-Augensalbe (Bepanthen® Augen- Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) gegeben. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wird der Zehenzwischenreflex zu Beginn und dann in regelmäßigen Abständen überprüft. Daraufhin wird das Tier in Rückenlage auf die Wärmematte positioniert, so dass sich die Nase in der bereits befestigten Narkosemaske befindet, wodurch eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet werden kann. Zur

## Material und Methoden

---

Fixierung der Glieder und des Schwanzes verwendet man ein Klebeband (Transpore™, 3M Health Care, Neuss). Danach erfolgt die Sterilisation der Operationsstelle in der Mandibularegion, zunächst durch Enthaarung mit der Hilfe einer Enthaarungscreme (Pilca® extra soft, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, Brühl), dann durch Reinigung mit Alkohol (Cutasept®F, Fa. Bode Chemie, Hamburg).

Die Operation erfolgt unter der Zuhilfenahme eines Stereomikroskopes (Stemi-2000.C, Fa. Zeiss, Göttingen). Als Lichtquelle dient eine Schwanenhalslampe (Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhalslichtleiter, Fa. Zeiss, Göttingen).

### Venöser Katheter über die Vena jugularis interna

Der erste Schritt der Operation ist die Platzierung eines venösen Verweilkatheters, der für die Applikation von Injektionen (Fluoreszenzfarbstoffe, Zellen und Puffer) während des Eingriffs von Bedeutung ist. Die bei der Maus geeignetste Vene ist die Vena jugularis interna. Zur Freilegung der Vene ist zunächst ein medianer Hautschnitt vom Kiefernwinkel (Ramus mandibularis) bis zum Sternum notwendig. Orthogonal dazu, ungefähr von der Mitte des vorherigen Schnittes ausgehend, erfolgt ein weiterer Schnitt mit einer Länge von ca. 5mm in das linke Operationsfeld der Maus. Dann wird die linke Speicheldrüse (Glandula mandibularis) der Maus vorsichtig freipräpariert und nach kranial weggeklappt, wodurch die linke Vena jugularis interna erkennbar wird. Von diesem Gefäß geht seitlich ein großer Venenast ab, welcher durch einen Faden (Prolene® Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) ligiert wird. Als nächstes wird eine Ligatur am kaudalen Ende der Vene vorgelegt, aber nicht zugezogen. Möglichst nah am Kiefernwinkel wird eine weitere Ligatur gesetzt und der Faden (Prolene® Polypropylen, 6-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) unter Zug mit einer Moskitoklemme fixiert. Durch diese Ligaturen ist nun der Blutfluss in der Vene auf ein Minimum reduziert. Mit einer mikrochirurgischen Schere wird ein Schnitt in das präparierte Gefäß durchgeführt. Der Polyethylene-Katheter (Katheterschlauch Portex®, Polythene Tubing, 0,28mm ID, Smiths Medical, Keene, NH, USA) wird nun durch die kleine Öffnung in die Vena jugularis interna eingeführt und mit der bereits vorgelegten Ligatur fixiert. Anschließend überprüft man die Durchgängigkeit des Katheters mit der Injektion einer isotonen Kochsalzlösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9%, Delta Pharm GmbH, Pfullingen). Um das Herausrutschen des Katheters zu vermeiden, wird dieser mit Klebeband an die drunterliegende Wärmematte fixiert.

### Darstellung und Präparation der Arteria femoralis superficialis

Zunächst wird die Wärmematte, auf dem das Tier fixiert ist, um 180° gedreht und so ausgerichtet, dass das Sichtfeld des Mikroskops den Oberschenkel und das Knie der Maus umfasst. Zur optimalen Darstellung der Arteria femoralis superficialis und zur optimalen Freilegung des arteriellen Seitenastes wird das linke Bein leicht nach außen torsiert und unter Zug fixiert.

Darauf erfolgt die Sterilisation des Operationsfeldes (iliacale Region bis hin zum meolus medialis) durch Enthaarung und Alkohol. Nach ausreichender Reinigung wird ein Längsschnitt von der distalen Knieregion bis hin zur proximalen Leistenregion durchgeführt, wodurch die oberflächlich verlaufenden Arteria femoralis, die Vena femoralis superf. und der Nervus femoralis sichtbar werden. Nun muss die Arterie von Binde- und Fettgewebe freipräpariert werden. Als nächstes legt man einen Faden (Prolene® Polypropylen, 6-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) so weit wie möglich proximal um die Arterie vor und fixiert ihn mit einer Moskitoklemme, um während der Denudation den arteriellen Blutfluss unterbinden zu können. Zum besseren Verständnis siehe Bild 5.

### Präparation des arteriellen Seitenastes

Um die Drahtdenudation durchführen zu können, muss als Eintrittskanal ein arterieller Seitenast, welcher von der A. fem. superf. abgeht, freipräpariert werden. Dieser befindet sich auf der Höhe der Knieregion, zwischen Patella und der A. fem. superf. und verläuft im distalen Teil des Musculus quadriceps femoris. An dieser Stelle sticht man mit zwei abgewinkelten Kanülen hinein und trifft bei einer Wundtiefe von ca. 0,25cm auf ein venöses und arterielles Gefäßpaar. Dieser arterielle Seitenast wird nun vorsichtig von der Vene freipräpariert und mit der Kanüle auf die Höhe der Schnittoberfläche angehoben. Der distale Teil des Gefäßes wird mit einem 7-0 Faden legiert, mit einer Moskitoklemme fixiert und unter Zug gesetzt. Proximal wird ein weiterer 7-0 Faden vorgelegt, mit einem einfachen Knoten versehen, aber nicht zugezogen, und die Kanüle entfernt.

Bei den akuten Versuchen erfolgt derselbe Vorgang am anderen Bein, mit dem Unterschied, dass dort keine Denudation erfolgt (Sham-OP). Dies dient zur Kontrolluntersuchung, so dass aufgezeigt werden kann, dass der chirurgische Eingriff ohne Durchführung einer Denudation keinen Einfluss auf die zellulären Vorgänge im Gefäß hat.

Nun kann die A. fem. superf. intravitalmikroskopisch gefilmt werden, um den Zustand im Gefäß vor der Denudation beurteilen zu können. Dies hat insofern eine Bedeutung, als dass Tiere, die vor dem Eingriff bereits schon eine Voraktivierung von Zellen aufweisen (z.B. durch Inflammation, Gefäßschädigung während der Operation usw.), nicht in die Versuchsreihe mitaufgenommen werden dürfen, da dies zu einer Verfälschung der Werte führen könnte.

Zudem wurden so physiologische Basalwerte des Thrombozyten- und Leukozytenadhäsionsverhaltens analysiert.

Zum besseren Verständnis siehe Bild 5.

### Denudation der Arteria femoralis superficialis

Nach der Intravitalmikroskopie erfolgt die Denudation der A. fem. superf.. Zunächst wird der Blutfluss in der A. fem. superf. vermindert, indem der proximal vorgelegte Faden unter kontinuierlichem Zug gesetzt wird. Auch die im distalen Anteil des arteriellen Muskelastes vorliegende Ligatur wird mit der Moskitoklemme durch Zug leicht gestreckt. Dadurch wird eine gewisse Blutleere in dem kleinen Gefäß erreicht, so dass eine Inzision mit wenig

Blutverlust einhergeht. Die Inzision erfolgt mit einer mikrochirurgischen Schere. Durch die Öffnung wird ein Angioplastiedraht (Floppy®II Guide Wire 0,01'' (0,36mm), Guidant Corporation, Diegem, Belgien) eingeführt und langsam in das Gefäß vorgeschoben. Dieser gelangt zunächst in die A. fem. superf. und dann mit der Spitze in die A. iliaca externa. In dieser Position wird der Draht für eine Minute belassen. Durch den großen Durchmesser des Drahtes (bei jedem Versuch größer als der Gefäßdurchmesser) und durch die rillenartige Oberfläche soll die Intima des Gefäßes beim Vorschieben abgetragen werden.



Abbildung 4: Angioplastiedraht zur Denudation

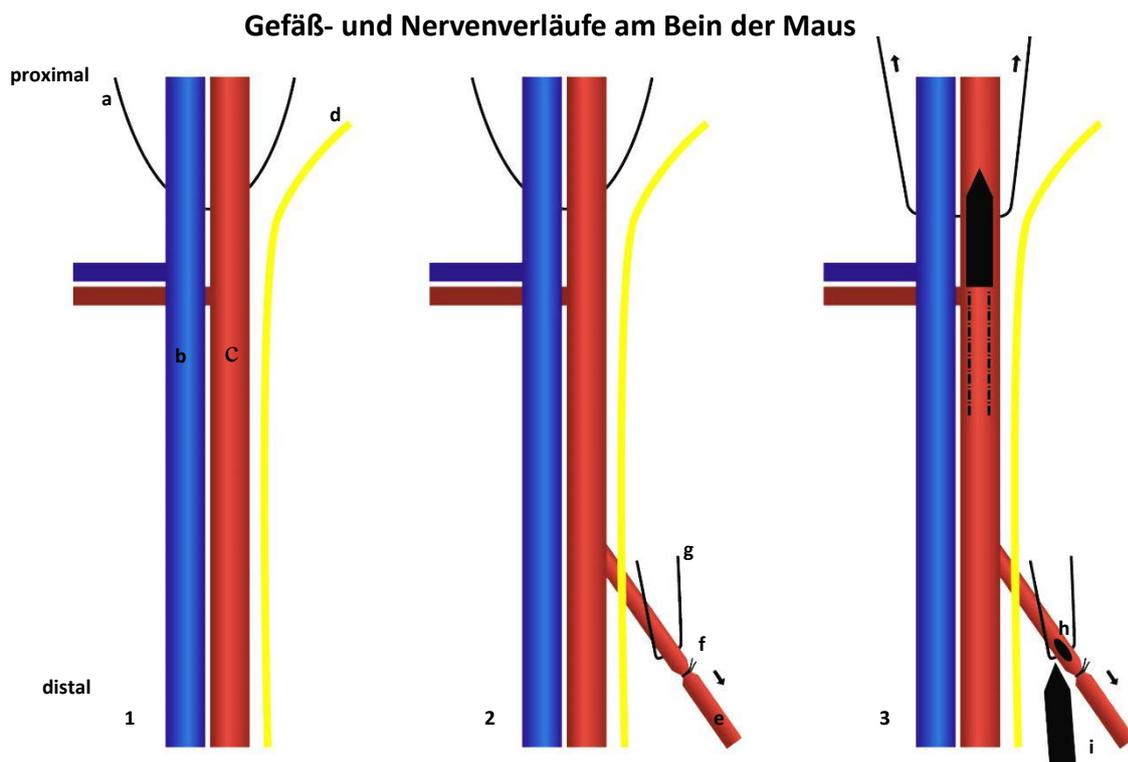


Abbildung 5: Darstellung des operativen Vorgangs zur Drahtdenudation der Arteria femoralis

- 1: Darstellung der A. fem. (c) zusammen mit der V. fem. (b) und dem N. fem. (d) nach Hautschnitt. Proximal wird der Faden (a) für die spätere temporäre Ligatur vorgelegt.
- 2: Freipräparation des arteriellen Seitenastes (e) mit Ligatur distal (f) und dem vorgelegtem Faden für die spätere Ligatur proximal (g).
- 3: Die proximale Ligatur um das Gefäßbündel wird angezogen, es erfolgt ein kleiner Schnitt in den arteriellen Seitenast (h) und der Draht (i) wird darüber eingeführt. Der Draht gelangt in die A.fem., wodurch er diesen denudiert und dilatiert. Nach 1 Minute wird es wieder herausgezogen und der vorgelegte Faden zugeschnürt.

Anschließend wird der Draht entfernt und der im proximalen Teil des Muskelastes vorgelegte Knoten zugezogen. Es folgt die Durchführung der Intravitalmikroskopie.

Nach der Beendigung des Versuches erfolgt die Euthanasie des Tieres und nach einer ausreichenden Durchspülung des Blutkreislaufes die Organentnahme. Detaillierte Angaben dazu unter dem Kapitel 4.2.9.

### 4.2.5 Chronische Versuche

#### Die Denudation als erster operativer Eingriff

Bei der chronischen Versuchsreihe werden insgesamt zwei Operationseinheiten durchgeführt. Am ersten Operationstag wird die Gefäßverletzung induziert und endet mit der Denudation und Wundversorgung. Die zweite Operation erfolgt, je nachdem zu welcher Versuchsgruppe das Tier gehört, nach 7, 14, 21 und 28 Tagen und besteht in der intravitalmikroskopischen Untersuchung des geschädigten Gefäßabschnittes.

Dabei unterscheidet sich der Denudationsvorgang für die der chronischen Versuche minimal von denen der akuten Versuchsreihen (siehe Versuchsgruppen 1). Bei der Denudation für die chronischen Versuche wird kein zusätzlicher Jugulariskatheter gelegt. Dieser wird erst beim zweiten operativen Eingriff gesetzt. Zur Freilegung des arteriellen Muskelastes und zur Positionierung des Fadens an der A. fem. superf., zur Erzeugung der Blutleere, werden lediglich zwei kleine Hautschnitte gemacht. Einer in der iliacalen Region und einer in der Knieregion. Die kleine Schnittführung hat den Vorteil, dass das Tier sich schneller erholen kann und das Bein nach kurzer Zeit belastbar ist. Diese Methode der zwei kleinen Hautschnitte ist in dieser Versuchsreihe entwickelt worden.

Nach der Denudation erfolgt die Hautnaht (Prolene® Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt), die postoperative Wundversorgung mit Betaisadona (Betaisadona® Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg) und die Injektion der bereits beschriebenen Medikamente zum Erwecken des Tieres. Die Wunden werden regelmäßig kontrolliert und die Fäden nach 7 Tagen gezogen. Zur analgetischen Versorgung des Tieres werden je nach Verfassung 0,05-0,1ml/Maus/d Temgesic (Fa. Essex Pharma, München) s.c. über zwei bis drei Tagen injiziert.

#### Die Intravitalmikroskopie als zweiter operativer Eingriff

Je nachdem, zu welcher Gruppe das Tier gehört, findet der zweite Teil der chronischen Versuche mit der Intravitalmikroskopie, wie bereits beschrieben, nach 7, 14, 21 oder 28 Tagen statt. Dazu wird das Tier erneut nach dem bereits beschriebenen Verfahren narkotisiert und auf der Wärmematte fixiert. Es folgen die operativen Eingriffe in der Mandibularegion zum Einsatz des venösen Verweilkatheters und ein großräumiger Hautschnitt am Oberschenkel der Maus von der Leistenregion bis unterhalb der Knieregion zur Darstellung der A. fem. superf.. Über den venösen Zugang werden die mit Rhodamin B

gefärbten Thrombozyten einer Spendermaus und Acridin orange, zur Darstellung der Leukozyten, des Endothels und der Muskelzellen, appliziert. Darauf folgen die intravitalmikroskopischen Aufnahmen.

Nach Beendigung des Versuches wird das Tier euthanasiert. Danach erfolgen das Spülen des Blutgefäßsystems und die Organentnahme zur histologischen Analyse.

### 4.2.6 Mikroskop

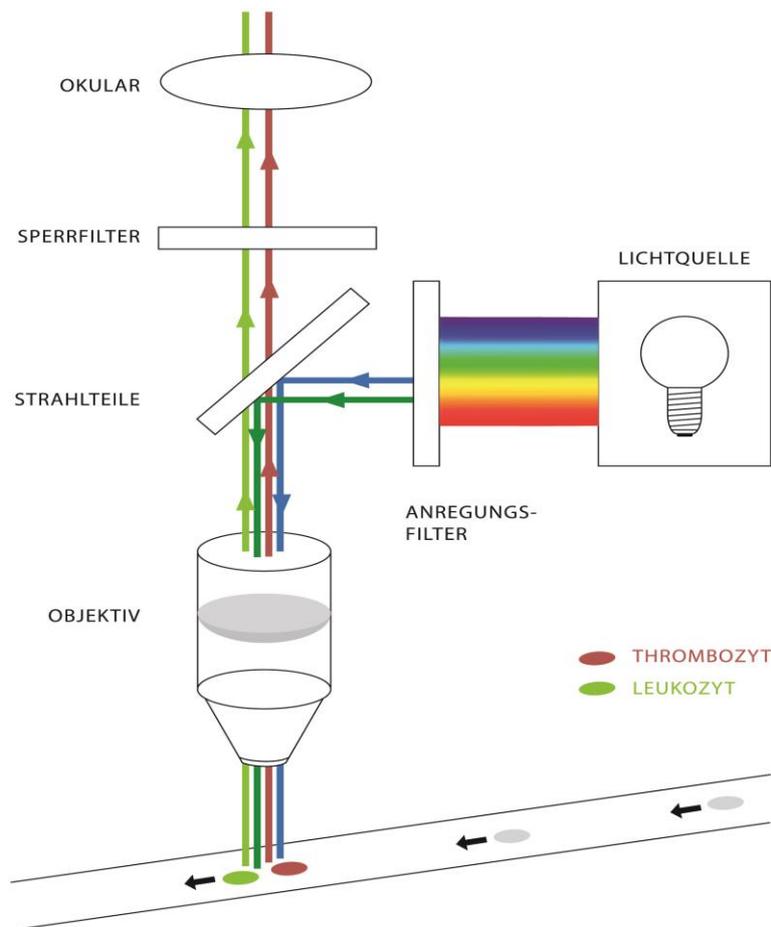
#### Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet die Möglichkeit mit der Hilfe von bestimmten Farbstoffen zelluläre Vorgänge innerhalb eines lebenden Organismus zu untersuchen. Bei dieser Versuchsreihe kann das Verhalten von bestimmten Zellen während der Inflammation und der Neoformation analysiert werden. Während der Mikroskopie werden Aufnahmen zur Datensicherung durchgeführt. Bei dem Mikroskop handelt es sich um ein Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop (Olympus BX51WI, Fa. Olympus, Hamburg).

Als Lichtquelle dient eine Quecksilber-Kurzbogen-Höchstdrucklampe (Hg-Höchstdrucklampe, HBO 100W, Fa. Zeiss, Göttingen), die kurzwelliges Licht, zur Visualisierung der Zellen *in vivo*, emittiert.

Das von der Lampe abgegebene Licht gelangt durch einen Anregungs- bzw. Exzitationsfilter, welches durch seine Beschaffenheit nur kurzwelliges Immissionslicht durchlässt, und passiert einen Strahlenleiter, bevor es auf die abzubildende Arterie trifft. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff absorbiert es, verändert seine Konformation und gibt es als Emissionslicht, welches eine 30-50nm größere Wellenlänge besitzt (Stokes-Verschiebung), erneut ab. Im Strahlengang des Mikroskops wird das Emissionslicht (langwellig) vom Immissionslicht (kurzwellig) getrennt. Dazu werden unterschiedliche Emissions- oder Sperrfilter eingesetzt, so dass störendes Anregungslicht abgefangen werden kann.

Durch den zusätzlichen Einsatz von speziellen Filtern ist es möglich, zwei Emissionslichter mit unterschiedlichen Wellenlängen gleichzeitig zu verarbeiten, so dass bei der bildgebenden Darstellung sowohl die mit Acridin orange, als auch die mit Rhodamin B gefärbten Zellen miteinander visualisiert werden können. Solch eine Fluoreszenzdoppelfärbung ist nur möglich, wenn die Emissionen der Farbstoffe Wellenlängen mit einer ausreichenden Differenz aufzeigen. Wie bereits beschrieben, besitzt die Emission von Acridin orange eine Wellenlänge von  $\lambda = 530-560\text{nm}$  und Rhodamin B  $\lambda = 627\text{nm}$ . Diese Differenz ist groß genug, um Doppelfärbungen einer Zelle und somit Verwechslungen zu vermeiden.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Epifluoreszenzmikroskops**

Die von der Lichtquelle stammende Immission gelangt über den Strahlteiler und das Objektiv zum Blutgefäß. Von den gefärbten Zellen geht die Emission ab und erreicht über das Sperrfilter und das Okular die Bildverarbeitende Einrichtung.

### Arbeitseinheit für das Epifluoreszenzmikroskop Olympus BX51WI (Fa. Olympus, Hamburg)

Das Emissionslicht wird mit der Hilfe des Realtime-Imaging-Station Cell® (Fa. Olympus, Hamburg) digital verarbeitet, auf dem Computer projiziert und aufgezeichnet. Das Herzstück dabei sind eine hoch präzise funktionierende Hardware, ein „All-in-one“-Beleuchtungssystem MT20 und eine sehr lichtempfindliche digitale Kamera. All diese Komponenten werden durch den Realtime-Controllersimultan reguliert und synchronisiert. Dadurch können komplexe Prozesse mit einer sehr exakten Genauigkeit durchgeführt werden.

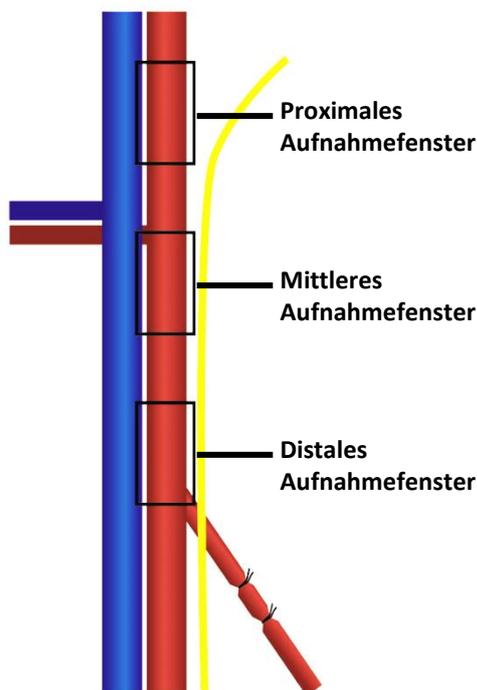
### Aufnahmemuster bei den unterschiedlichen Versuchsgruppen

Zu beachten ist, dass die Aufnahmen mit dem Intravitalmikroskop nahezu immer in denselben Regionen des Gefäßes durchgeführt wurden. Das erste Aufnahme Fenster liegt im proximalen Teil der A. fem. superf., knapp unterhalb der iliacalen Bifurkation. Das zweite

Aufnahmefenster befindet sich im mittleren Bereich des Gefäßes und die dritte im distalen Anteil, oberhalb der Eintrittsstelle des Denudationsdrahtes (siehe Bild 7).

Nach der Denudation erfolgt die intravitale Mikroskopie im 10 minütigen Abstand bis zum Zeitpunkt 50 Minuten. Somit ist es möglich bei der Analyse der Intravitalaufnahmen akuter Versuche, den Entzündungsprozess über den Zeitraum von ca. einer Stunde zu beobachten.

Bei den chronischen Versuchen sind die Positionen der drei Aufnahmefenster die selbigen, wie bei den akuten Versuchen, mit dem Unterschied, dass es nur einmalige Aufnahmen sind. Auch hier ist bei der Analyse der chronischen Versuche die Adhärenz der unterschiedlichen Zelltypen von Bedeutung.



**Abbildung 7: Intravitalmikroskopische Aufnahmemuster entlang der Arteria femoralis**

Zur Standardisierung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen erfolgt die Positionierung des Mikroskops immer an den gleichen Stellen des Gefäßes.

Das erste Aufnahmefenster befindet sich im proximalen Gefäßanteil, das nächste im mittleren und das letzte im distalen Abschnitt, knapp oberhalb der Bifurkation der A. fem. und des arteriellen Seitenastes.

Nach diesem Prinzip erfolgen sowohl die Untersuchungen der akuten, als auch der chronischen Versuchsreihen.

### 4.2.7 Färbeprotokoll *ex vivo*

Die Thrombozytenpräparation erfordert Vollblut von einer syngenen Spendermaus, das durch Herzpunktion gewonnen wird. Das Tier wird mittels Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Deieich), das zusammen mit Sauerstoff über einen Verdampfer (Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen, eingerichtet von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen) abgegeben wird, in Narkose versetzt. Intraperitoneal werden zusätzlich 0,05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl-Curamed®, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) appliziert und bis zu dessen Wirkungseintritt 5min abgewartet, um eine ausreichende Narkosetiefe zu erreichen. Dann erfolgt die Fixierung des Tieres in Rückenlage. Liegt kein Zehenzwischenreflex mehr vor, wird ein medianer thorakaler Hautschnitt durchgeführt. Die Region unmittelbar links vom Sternum, wo der Herzspitzenstoß am deutlichsten wahrzunehmen ist, wird freipräpariert. Die Punktion erfolgt mittels einer Kanüle, die senkrecht eingestochen wird. Bei dieser Art der

Punktion können bis zu 1,5-2ml Vollblut gewonnen werden. Um das Blut vor Gerinnung zu bewahren, wird es in einem Verhältnis von 10:1 mit Citrat (aus S-Monovetten, Sarstedt AG&Co., Nürnberg) vermischt. Durch den enormen Blutverlust, ist das Tier nicht mehr überlebensfähig, so dass es nach der Punktion euthanasiert werden muss.

Die weitere Vorgehensweise verlangt einen behutsamen Umgang mit dem Blut, das Verwenden frisch angesetzte Substanzen und, dass die Umgebungstemperatur stets der physiologischen Temperatur von 37°C entspricht. Außerdem soll beim Umfüllen, die Flüssigkeit stets an der Oberfläche der verwendeten Gefäße abfließen. Ansonsten droht eine Voraktivierung der Thrombozyten, was wiederum zu einer Verfälschung der Experimente führen könnte.

Das gewonnene Vollblut wird in ein Röhrchen gegeben und mit Tyrodes-Puffer pH 6,5 auf ein Gesamtvolumen von 2ml aufgefüllt. Das Röhrchen wird 20min lang bei einer Frequenz von 92g ohne Bremse zentrifugiert (Haereus, Megafuge, Hanau). Das gewonnene plättchenreiche Plasma (PRP) wird vorsichtig abpipettiert und in ein weiteres Röhrchen gegeben. Dieses wird mit Tyrodes-Puffer (pH 6,5) auf die Gesamtmenge von 4ml aufgefüllt und zusätzlich 6,5µl Rhodamin B beigemischt. Nach einer Inkubation von 3min bei Raumtemperatur erfolgt eine erneute Zentrifugation von 10min bei 1277g mit Bremse. Der sich gebildete Überstand wird abgeschüttelt, das am Grund haftende Pellet mit Tyrodes pH 6,5 resuspendiert, wiederum auf 4ml Tyrodes pH 6,5 aufgefüllt und erneut für 10min bei 1277g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgeschüttelt und das Pellet sowohl mit 250µl Tyrodes pH 6,5, als auch 250µl Tyrodes pH 7,4 resuspendiert.

Die gewonnene Thrombozytenzahl der hergestellten Zellsuspension wird mittels eines Zellzählgerätes (Sysmex Microcellcounter XE-2100, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt) festgestellt.

Zur Standardisierung der Versuchsreihe ist die Konzentration der zu injizierenden Thrombozyten auf  $150 \times 10^3$  TZ/µl festgelegt worden. Daher wird ein bestimmter Anteil der gewonnenen Thrombozytensuspension mit Tyrodes pH 6,5 auf eine Gesamtmenge von 250µl aufgefüllt, um die genannte Konzentration zu erreichen. Insgesamt werden somit  $375 \times 10^5$  TZ über den Venenkatheter in den Blutkreislauf der Maus injiziert, was ca. 10% der Gesamtthrombozytenmenge der Maus ausmacht. Mittels dieser Injektion kann man somit 10% der Thrombozyten des Versuchstieres durch die Intravitalmikroskopie sichtbar machen.

### **4.2.8 Färbemethode *in vivo***

Zur Darstellung sowohl von Endothelzellen und Muskelzellen der Gefäßwand, als auch von Leukozyten und deren Interaktion, wird der Fluoreszenzfarbstoff Acridin orange verwendet. Dessen Injektion erfolgt über den jugulären Venenkatheter. Die Gabe muss mehrfach erfolgen, da die Färbung nur einige Zeit anhält. Acridin orange ist eine phototoxische Substanz, die zum Gefäßspasmus und zu einer Voraktivierung oder zum Untergang von Zellen führen kann. Daher ist die Dauer der *in vivo* Aufnahme, bei der das Gefäß dem

Anregungslicht ausgesetzt ist, auf 5 sec limitiert. Mittels der Injektion von Acridin orange kann man somit 100% der Leukozyten des Versuchstieres mit der Intravitalmikroskopie sichtbar machen.

### 4.2.9 Organentnahme

Nach der Beendigung der Intravitalmikroskopie wird das Tier durch Ausbluten und anschließenden Genickbruch euthanasiert. Bei diesem Vorgang wird zunächst eine mediane Laparatomie des Abdomens durchgeführt, die Organe vorsichtig, ohne Verletzung einer Struktur, herausgelagert und die Vena cava inferior freipräpariert. Das Gefäß wird mit einem Faden (Prolene® Polypropylen, 7-0 metric, Fa. Ethicon, Norderstedt) legiert und distal durchtrennt. Nun erfolgt vorsichtig das Spülen des Gefäßsystems mit PBS über den Venenkatheter. Darauf wird die A. fem. superf. beidseits entnommen und für 24 Stunden in eine verdünnte und gepufferte Formaldehyd-Lösung (neutralgepufferte Formaldehyd-Lösung 4,5%, Otto Fischer GmbH, Saarbrücken) gegeben. Die Fixierung in Formaldehyd tötet Mikroorganismen, wie Bakterien ab, verhindert die Autolyse des Gewebes und sorgt für eine Eiweißfälltelung. Dadurch werden Prozesse, wie Gewebsabbau und Fäulnis verhindert, wodurch die Zelle in ihrem natürlichen Zustand erhalten bleibt. Zusätzlich erhält das Gefäß eine festelastische Konsistenz, die für die weitere Verarbeitung von Vorteil ist.

Nach 24 Stunden wird das Gefäß in eine 70%ige Ethanollösung (Fa. Merck, Darmstadt) gegeben, um es für das spätere Einbetten in Paraffin (medite tissuwax®, Fa. Medite, Burgdorf) zu konservieren.

## 4.3 Auswertung

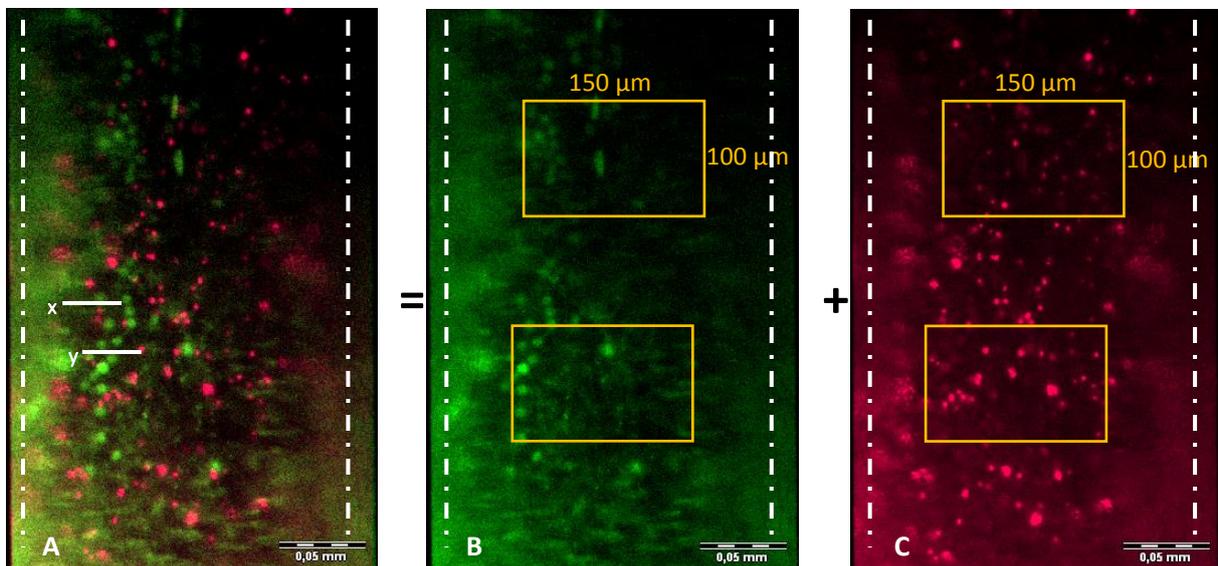
### 4.3.1 Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen

Mit der Hilfe der intravitalmikroskopischen Aufnahmen ist die Möglichkeit gegeben, das Verhalten von Thrombozyten und Leukozyten auf die Verletzung der Endothelschicht zu den Zeitpunkten 10, 30, 50 Minuten und 7, 14, 21, 28 Tagen zu analysieren. Im Fokus der Versuchsanalyse steht das Adhäsionsverhalten der Zellen an die denudierte Gefäßwand.

#### Auswertung adhärenter Thrombozyten und Leukozyten

Durch die unterschiedlichen Färbemethoden ist eine Differenzierung der Zellen möglich, um das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten und Leukozyten auswerten zu können. Dazu ist es allerdings erforderlich die Aufnahmen der jeweiligen Gefäßabschnitte in zwei unterschiedlichen Modi zu betrachten, eine Möglichkeit, die von der Arbeitseinheit für das

Mikroskop angeboten wird. So ermöglicht es das Rhodamin-Filter allein die Blutplättchen sichtbar machen zu können (rot aufleuchtend), wohingegen die Einstellung auf das NIBA-Filter nur die mit Acridin orange gefärbten Leukozyten, Muskelzellen und Endothelzellen erkennen lässt (grün aufleuchtend). Dadurch wird eine Vereinfachung der Auswertung erreicht. Zur Analyse werden in das Aufnahme Fenster zwei Rechtecke mit den Maßen  $150\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$  proximal und distal mit der Hilfe der Experimentmanagersoftware der Realtime-Imaging-Station Cell (Fa. Olympus, Hamburg) eingesetzt. Die Rechtecke dienen als standardisierte Auswertungsfenster. Jede intravitalmikroskopische Aufnahme hat eine Dauer von 5 Sekunden. Die Adhärenz einer Zelle wurde in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten bestimmt als das Haften an einer Struktur über einen definierten Zeitraum. In diesem Setting werden bei der Auswertung lediglich die Zellen als „fest adherent“ berücksichtigt, die über die gesamte Aufnahmedauer, von 5 sec, an der verletzten Gefäßwand haften bleiben. In dem jeweils eingestellten Modus können nun die Thrombozyten oder die Leukozyten, die sich in den Auswertungsfenstern befinden, ausgezählt werden. Alle Aufnahmen der akuten, wie auch chronischen Versuchsreihe, werden auf diese Weise ausgewertet. Die Werte werden zum Schluss gemittelt und mit denen anderer Zeitpunkte und Mausstämmen verglichen. Zu beachten ist, dass nur die Tiere in die Auswertung einbezogen wurden, die bei der Intravitalmikroskopie einen kontinuierlichen Blutfluss der A. fem. superf. aufwiesen. Jegliche Stagnation von Blut führt nach der Virchowschen Trias zu einer Veränderung des zellulären, vor allem des thrombozytären Verhaltens, wodurch die Auswertungsergebnisse verfälscht werden könnten.



**Abbildung 8: Auswertungsfenster der IVM-Aufnahmen**

- 1: Aufnahme Fenster mit Doppelfärbung; X = Leukozyt; Y = Thrombozyt; Maßstab =  $50\mu\text{m}$
- 2: Differenzierte Betrachtung der Leukozyten im Acridin orange Aufnahme Fenster mit zwei Rechtecken zur Auswertung; Maßstab =  $50\mu\text{m}$
- 3: Differenzierte Betrachtung der Thrombozyten im Rhodamin B Aufnahme Fenster mit zwei Rechtecken zur Auswertung; Maßstab =  $50\mu\text{m}$

### 4.3.2 Histologie

#### Einbetten

Zur Beurteilung der durch die Denudation induzierten Inflammation und Neointimaformation der präparierten Gefäße erfolgt eine histologische Analyse. Die in 70%igem Ethanol (Fa. Merck, Darmstadt) konservierten Gefäße werden dazu in einer Alkoholreihe von zunehmender Konzentration schrittweise entwässert. Das Präparat wird darauf mit zusätzlichen Lösungen wie Xylol behandelt, mit dem Ziel den Alkohol zu verdrängen und Paraffin in das Gewebe eindringen zu lassen. Dann folgt das Einbetten des Gefäßes in 60 °C warmem und flüssigem Paraffin (medite tissuwax®, Fa. Medite, Burgdorf). Damit eine schnelle Fixierung erfolgt, wird der Paraffinblock auf eine Kühlplatte gestellt. Das Präparat wird dabei so positioniert, dass beim anschließenden Schneiden immer das distale Ende der Arterie zu Beginn bearbeitet wird.

#### Schneiden

Die Erstellung histologischer Schnitte, erfordert den zusätzlichen Einsatz eines Rotationsmikrotoms (Microtom HM 335 E, MICROM GmbH, Walldorf). Dazu wird der Paraffinblock am Mikrotom eingespannt und die Schnittbreite auf 2µm eingestellt. Es erfolgen jeweils zehn aneinandergereihte Schnitte, die darauf in ein Warmwasserbad (Paraffin Streckbad TB 35, MEDITE Medizintechnik, Burgdorf) von 42°C zur Entfaltung gegeben werden. Je zwei dieser Schnittreihen werden dann auf einem fettfreien Objektträger (Superfrost®Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig) positioniert und anschließend, in einer Münchner-Mappe einsortiert, in den Brutschrank gegeben. Die histologischen Schnitte müssen mindestens 24 Stunden der Wärme von 70°C des Trockenschrankes zum Trocknen und zur Fixierung ausgesetzt sein. Anschließend stehen sie dem Färbeverfahren zur Verfügung.

Die Kennzeichnung der Objektträger wird nach folgendem Schema durchgeführt: Es erfolgt eine Nummerierung und Buchstabenbeschriftung der Reihe nach, wobei der Buchstabe den Verwendungszweck bestimmt. Z.B. 1a, 1b, 1c, 1d sind die ersten vier Träger, 2a, 2b, 2c, 2d sind die weiteren vier usw. . Der Buchstabe „a“ bestimmt, dass der Objektträger für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung bestimmt ist und „b“ steht für das van Gieson Färbeverfahren. Die Objektträger mit den Kennzeichnungen „c“ und „d“ werden als Reserve angesehen und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die arteriellen Gefäße besitzen im Durchschnitt eine Länge von 5 mm. Diese werden komplett geschnitten. Beginn des Schnitts ist, wie bereits beschrieben, das distale Ende der Arterie, also kurz vor dem Beginn des denudierten Areals. Somit hat man für die weitere Auswertung ein standardisiertes Verfahren, das die Möglichkeit zur besseren Analyse und zum besseren Vergleich der Gefäße untereinander bietet.

### Färbetechnik

Zur lichtmikroskopischen Analyse der histologischen Schnitte sind spezielle Färbungen notwendig. Dazu wird zunächst das Paraffin entfernt, die Objektträger in die jeweilige Färbelösung eingestellt und nach einem Spülgang mit einem Deckglas abgedeckt. Durch diese Standardfärbungen werden gewisse Strukturen eines Gewebes hervorgehoben.

Bei den hierbei verwendeten Verfahren handelt es sich um die van Gieson (vG) und Hämatoxilin-Eosin (HE) Färbungen.

### Hämatoxilin-Eosin (HE)

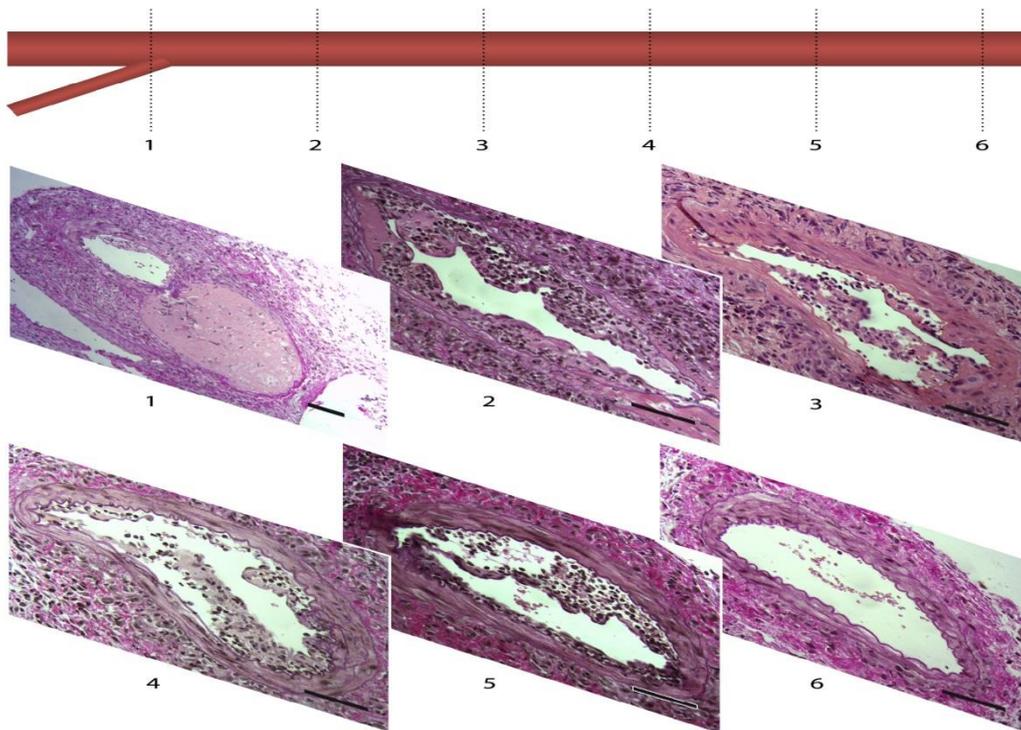
Das Oxidationsprodukt des Hämatoxilin, Hämatein, ist ein basischer (=kationisch) Farbstoff, der jeweils an die anionischen Komponenten (z.B. DNA und RNA) bindet. Es wird meist zur Kernfärbung verwendet. Das oft zur Zytoplasmafärbung eingesetzte Eosin ist ein saurer (=anionisch) Farbstoff, der an kationische Komponenten bindet. Dazu gehören zytoplasmatische Proteine, diverse Granula, Mitochondrien und Hämoglobin. Bei der lichtmikroskopischen Analyse von HE-Färbungen erscheinen der Zellkern blau, das Zytoplasma und die Kollagenfasern rot und die elastischen Fasern blass rot (Lüllmann-Rauch 2003).

### Van Gieson (vG)

Bei der van Gieson Färbung werden die Präparate zunächst mit Eisenhämatoxilin behandelt und dann mit Säurefuchsin bzw. Pikrinsäure gegengefärbt. Dadurch werden nicht nur der Kern, sondern auch kollagene Fasern differenziert sichtbar. Der Kern erscheint bei der lichtmikroskopischen Analyse braun-schwarz, das Zytoplasma gelb, die Kollagenfasern rot und elastische Fasern blass gelb(Lüllmann-Rauch 2003).

### Bildanalyse/Histomorphologische Quantifizierung

Die histomorphologische Quantifizierung bietet die Möglichkeit die histologischen Schnitte auf Neointimaformation zu untersuchen und auszumessen. Zum Photographieren der Gefäßquerschnitte verwendet man Leica DM RB (Leica Camera AG, Solms). Pro Objektträger werden mindestens drei Schnitte in der 10-, 20- und 40-fachen Vergrößerungen photographiert. Somit erhält man eine Visualisierung des kompletten Gefäßverlaufes.

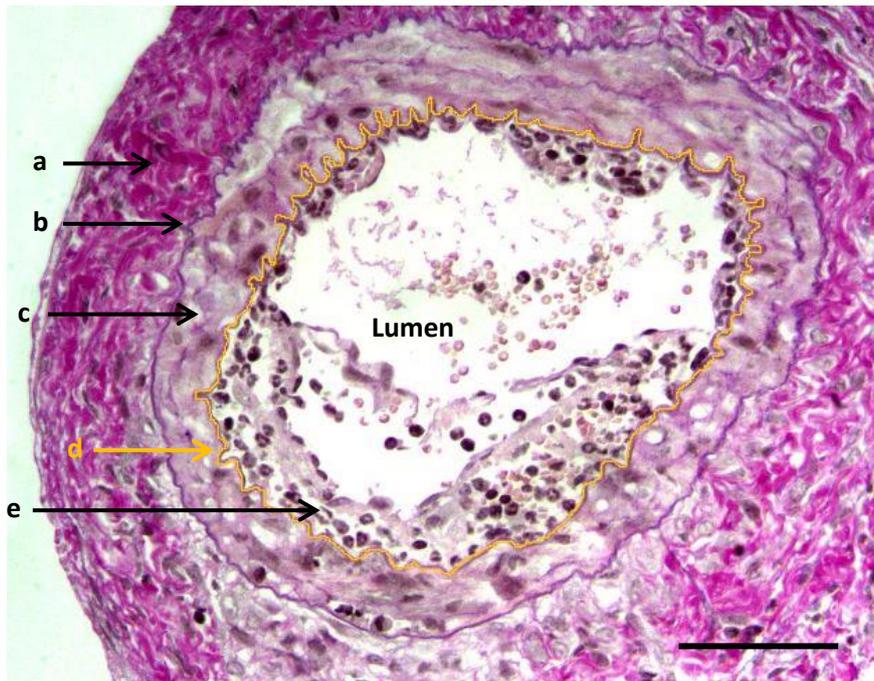


**Abbildung 9: Histologische Darstellung des Gefäßverlaufs der Arteria femoralis beim Wildtyp**

Hierbei sind histologische Bilder aus den jeweiligen Gefäßabschnitten aneinandergereiht, zum besserem Verständnis der Neointimaformation und ihrer Entwicklung im gesamten Gefäßverlauf. Maßstab = 100µm; Färbungen: Bild 3 = HE; Bild 1, 2, 4, 5, 6 = vG.

Wie bereits beschrieben, wird die Neointimaformation histologisch definiert als der Gefäßanteil, welcher zwischen dem Lumen und der Membrana elastica interna liegt, bzw. von der Membrana eingeschlossen wird.

Die Auswahl der Schnitte zur Auswertung muss nach einem standardisierten Verfahren erfolgen, wobei nach folgendem Schema vorgegangen wird: Da die präparierten Gefäße unterschiedliche Längen besitzen, muss ein Normverfahren erstellt werden. Wie bereits beschrieben beginnen die Schnitte der Präparate immer mit dem distalen Ende der Arterie. Bei der Analyse hat sich herausgestellt, dass an dieser Stelle bei fast allen Präparaten ein Thrombus vorliegt. Somit wird der erste Schnitt, der den Thrombus nicht mehr aufzeigt, sondern die Neointimaformation, als Anfangspunkt angesehen. Der Endpunkt ist der letzte proximale Schnitt, der noch Neointimaformation aufzeigt. Anhand des Anfangs- und Endpunktes kann nun die Länge des Gefäßabschnitts mit Neointima bestimmt werden. Diese Länge wird gemittelt und von dem erhaltenen Mittelpunkt werden sowohl proximal, als auch distal davon zwei Objektträger in die Analyse miteinbezogen. Pro Objektträger wird ein Schnitt einberechnet, so dass es pro Gefäß fünf Schnitte sind, die zur Ausmessung der Neointima genutzt werden. Durch dieses Auswahlverfahren erhält man eine standardisierte Methode, die es ermöglicht, alle Gefäße miteinander zu vergleichen, ganz gleich, welche Länge sie besitzen.



Wildtyp; A. fem. 2 W nach Denudation

### Abbildung 10: Histomorphometrische Auswertung der Arteria femoralis

Markierung der Membrana elastica interna zur Ausmessung der Neointima bei der A. fem. 2 Wochen nach der Denudation.

a) Adventitia; b) Membrana elastica interna; c) Media; d) Membrana elastica interna; e) Neointimaformation; Maßstab = 100µm; Färbung = vG

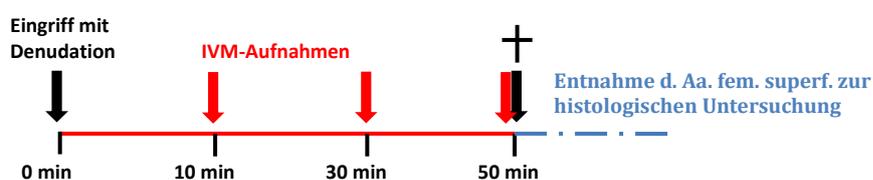
Zur Bestimmung der Neointimaformation wird das Programm ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health, United States) verwendet.

Jede Gruppe, sowohl der akuten, als auch chronischen Versuchsreihe, umfasst drei Tiere zur histologischen Ausmessung. Die Werte werden mit der Hilfe von ImageJ ausgemessen, gemittelt und verglichen.

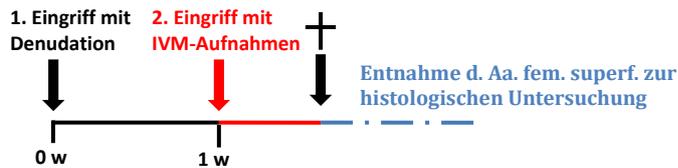
## 4.4 Übersichtliche Darstellung der Versuchsgruppen

Im Folgenden werden die experimentellen Gruppen der akuten, wie auch chronischen Versuche zur besseren Übersicht nochmals im zeitlichen Flussdiagramm graphisch dargestellt.

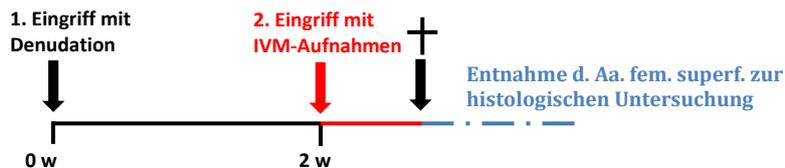
### Gruppe A



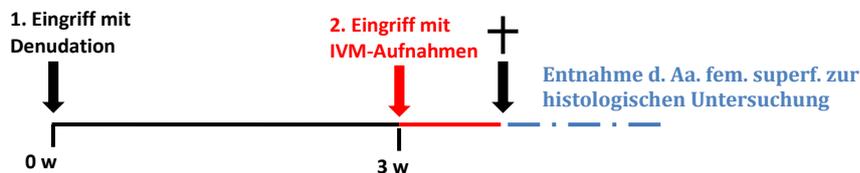
## Gruppe B



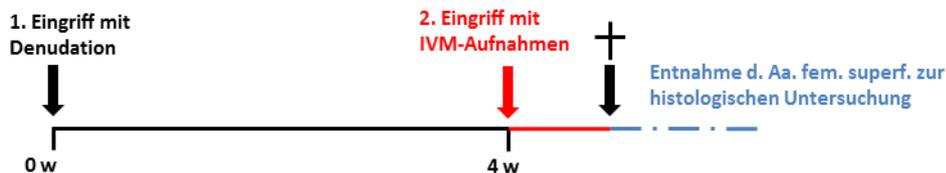
## Gruppe C



## Gruppe D



## Gruppe E



### Abbildung 11: Graphische Darstellung der akuten und chronischen Versuchsgruppen

Gruppe A: akute Versuchsreihe; Gefäßdenudation, IVM-Aufnahme und Gefäßentnahme erfolgen bei einem operativen Eingriff

Gruppe B, C, D und E: chronische Versuchsreihen; Gefäßdenudation, IVM-Aufnahme und Entnahme der Gefäße erfolgen bei zwei unterschiedlichen operativen Eingriffen;

†=Euthanasie der Versuchsm Maus

## 4.5 Versuchsprotokolle und experimentelle Gruppen

### 1. Etablierung des Modells der arteriellen Gefäßwanddenudation

- Verifizierung der Gefäßdenudation durch die histologische Analyse
- Analyse der Neointimaformation im zeitlichen Verlauf

### 2. Das zelluläre Adhäsionsverhalten nach Denudation der arteriellen Gefäßwand bei C57/Bl6J-Wildtyp

- Adhäsionsverhalten von Thrombozyten bei den akuten und chronischen Versuchsreihen
- Adhäsionsverhalten von Leukozyten bei den akuten und chronischen Versuchsreihen

### 3. Rolle von Sphingosin-1-Phosphat bei der Neointimahyperplasie und beim zellulären Adhäsionsverhalten

- Analyse der Neointimahyperplasie bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> und deren Gegenüberstellung mit C57Bl6/J-Wildtyp

### 4. Das zelluläre Verhalten nach der Denudation der arteriellen Gefäßwand bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> und deren Gegenüberstellung mit dem C57/Bl6J-Wildtyp

- Analyse der Thrombozytenadhäsion bei der akuten und chronischen Versuchsreihe
- Analyse der Leukozytenadhäsion bei der akuten und chronischen Versuchsreihe

#### 4.5.1 Etablierung des Modells der arteriellen Gefäßwanddenudation

Zur Verifizierung der Gefäßwanddenudation durch den Draht und der Analyse der darauffolgenden Neointimaformation werden unterschiedliche Versuchseinheiten durchgeführt.

##### Verifizierung der Gefäßdenudation durch die histologische Analyse

Bei dieser Fragestellung erfolgt der Vorgang der Denudation der A. fem. superf., wie sie bei der akuten Versuchsreihe beschrieben wurde. Die erforderliche Bestätigung der Intimaabtragung macht eine histologische Untersuchung der behandelten arteriellen Gefäße der Kontrollgruppe C57Bl6/J-Wildtyp notwendig.

**Tabelle 1: Versuchsprotokoll zur Verifizierung der Gefäßdenudation**

| <i>Stamm</i>            | <i>Versuchsreihe</i> | <i>Anzahl</i> | <i>Alter</i>          | <i>Geschlecht</i>  | <i>Auswertung</i>         |
|-------------------------|----------------------|---------------|-----------------------|--------------------|---------------------------|
| <i>C57Bl6/J-Wildtyp</i> | <i>akut</i>          | <i>n = 4</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Neointimaformation</i> |

##### Analyse der Neointimaformation im zeitlichen Verlauf

Hierbei erfolgt der Versuchshergang der Gefäßdenudation, wie bei der chronischen Versuchsreihe beschrieben, mit C57Bl6/J-Wildtyp Mäusen. Die Gefäße werden zur Ausmessung der Neointima, je nach Gruppenzugehörigkeit der Tiere, nach 7, 14, 21 und 28 Tagen entnommen. Zunächst wird, zur Erstellung eines Überblicks, eine histologische Analyse der Gefäße aller Gruppen und dann die quantitative Ausmessung der Gefäße der Mäuse 7 und 14 Tage durchgeführt.

**Tabelle 2: Versuchsprotokoll zur Analyse und Ausmessung der Neointima bei Wildtyp Mäusen**

| <i>Stamm</i>            | <i>Versuchsreihe</i>       | <i>Anzahl</i> | <i>Alter</i>          | <i>Geschlecht</i>  | <i>Auswertung</i>         |
|-------------------------|----------------------------|---------------|-----------------------|--------------------|---------------------------|
| <i>C57Bl6/J-Wildtyp</i> | <i>chronisch (7 Tage)</i>  | <i>n = 4</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Neointimaformation</i> |
| <i>C57Bl6/J-Wildtyp</i> | <i>chronisch (14 Tage)</i> | <i>n = 5</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Neointimaformation</i> |
| <i>C57Bl6/J-Wildtyp</i> | <i>chronisch (21 Tage)</i> | <i>n = 3</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Neointimaformation</i> |
| <i>C57Bl6/J-Wildtyp</i> | <i>chronisch (28 Tage)</i> | <i>n = 2</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Neointimaformation</i> |

### 4.5.2 Das zelluläre Adhäsionsverhalten nach Denudation der arteriellen Gefäßwand bei C57Bl6/J-Wildtyp

Zum Verständnis des Adhäsionsverhaltens von Thrombozyten und Leukozyten im Zuge einer induzierten Gefäßwandentzündung werden fünf verschiedene Versuchsgruppen gebildet und diese mit der Hilfe der Intravitalfluoreszenzmikroskopie untersucht. Jede dieser Gruppen repräsentiert einen bestimmten Zeitpunkt, bzw. Zeitraum. Der erste Zeitraum wird von der akuten Versuchsreihe repräsentiert und umfasst die ersten 50 Minuten nach der Denudation. Die weiteren Zeitpunkte werden durch die chronische Versuchsreihe aufgezeigt und umfassen 1, 2, 3 und 4 Wochen.

Zur Visualisierung werden vor bzw. nach der Denudation der Fluoreszenzfarbstoff Acridin orange und von einer syngenen Spendermaus gewonnene und Rhodamin-gefärbte homologe Thrombozyten in den Blutkreislauf der Maus appliziert. Darauf erfolgen die intravitalmikroskopischen Aufnahmen.

#### Adhäsionsverhalten von Thrombozyten bei den akuten und chronischen Versuchsreihen

Es wird die Adhäsion der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand untersucht.

#### Adhäsionsverhalten von Leukozyten bei den akuten und chronischen Versuchsreihen

Es erfolgt die Analyse des Adhäsionsverhaltens von Leukozyten an die denudierte Gefäßwand.

**Tabelle 3: Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Thrombozyten und Leukozyten bei den akuten und chronischen Versuchsreihen**

| <i>Stamm</i>            | <i>Versuchsreihe</i>       | <i>Anzahl</i> | <i>Alter</i>          | <i>Geschlecht</i>  | <i>Auswertung</i>                           |
|-------------------------|----------------------------|---------------|-----------------------|--------------------|---|
| <i>C57Bl6/J-Wildtyp</i> | <i>akut</i>                | <i>n = 5</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion</i> |
| <i>C57Bl6/J-Wildtyp</i> | <i>chronisch (7 Tage)</i>  | <i>n = 5</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion</i> |
| <i>C57Bl6/J-Wildtyp</i> | <i>chronisch (14 Tage)</i> | <i>n = 5</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion</i> |
| <i>C57Bl6/J-Wildtyp</i> | <i>chronisch (21 Tage)</i> | <i>n = 5</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion</i> |
| <i>C57Bl6/J-Wildtyp</i> | <i>chronisch (28 Tage)</i> | <i>n = 5</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion</i> |

### 4.5.3 Rolle von Sphingosin-1-Phosphat bei der Neointimahyperplasie und beim zellulären Adhäsionsverhalten

#### Analyse der Neointimahyperplasie bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> und deren Gegenüberstellung mit C57Bl6/J-Wildtyp

Hierbei steht im Zentrum des Interesses der Einfluss der Sphingosinkinasen 1 und 2 auf die Neointimaformation. Um dessen Ausmaß bestimmen zu können, werden unterschiedliche Tierstämme eingesetzt und folgende Methoden verwendet.

Ziel dieser Versuchseinheit ist die Bestätigung der Neointimahyperplasie bei den Mausstämmen SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup>. Die Versuchsvorgänge erfolgen nach dem oben beschriebenen Protokoll der Gruppe B. Die Gefäße werden nach 7 Tagen entnommen, histologisch untersucht und ausgemessen. Im Anschluss werden die ermittelten Ergebnisse der unterschiedlichen Tierstämme miteinander verglichen, um eine Aussage über den Einfluss der Sphingosinkinasen 1 und 2 auf die Neointimaformation zu erhalten.

**Tabelle 4: Versuchsprotokoll zur Analyse der Neointimaformation bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> Mäusen**

| <i>Stamm</i>               | <i>Versuchsreihe</i>      | <i>Anzahl</i> | <i>Alter</i>          | <i>Geschlecht</i>  | <i>Auswertung</i>         |
|----------------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|--------------------|---------------------------|
| <i>SphK1<sup>-/-</sup></i> | <i>chronisch (7 Tage)</i> | <i>n = 3</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Neointimaformation</i> |
| <i>SphK2<sup>-/-</sup></i> | <i>chronisch (7 Tage)</i> | <i>n = 3</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Neointimaformation</i> |

### 4.5.4 Das zelluläre Verhalten nach der Denudation der arteriellen Gefäßwand bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> und deren Gegenüberstellung mit dem C57/Bl6J-Wildtyp

Hierbei soll der Einfluss der Sphingosinkinasen 1 und 2 auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten und Leukozyten als Folge der Denudation der Gefäßwand analysiert werden. Dazu werden zwei unterschiedliche Gruppen gebildet, die akute, wie auch chronische Versuchsreihe. Die jeweiligen Versuchsvorgänge erfolgen nach den Protokollen der Versuchsgruppen A und B.

Zuletzt wird eine Gegenüberstellung der SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> Mausstämmen mit den Ergebnissen des Kontrollstammes durchgeführt.

#### Analyse des Thrombozyten Verhaltens bei der akuten und chronischen Versuchsreihe

Bei dieser Fragestellung liegt der Fokus auf dem Adhäsionsverhalten der Thrombozyten nach der Denudation der Gefäßwand bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> Mausstämmen.

### Analyse des Leukozyten Verhaltens bei der akuten und chronischen Versuchsreihe

Hierbei wird die Adhäsion der Leukozyten an die durch die Denudation verletzte Gefäßwand der SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> Mäuse analysiert.

**Tabelle 5: Versuchsprotokoll zur Untersuchung des zellulären Adhäsionsverhaltens nach der Denudation der arteriellen Gefäßwand bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup>**

| <i>Stamm</i>               | <i>Versuchsreihe</i>      | <i>Anzahl</i> | <i>Alter</i>          | <i>Geschlecht</i>  | <i>Auswertung</i>                           |
|----------------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|--------------------|---|
| <i>SphK1<sup>-/-</sup></i> | <i>akut</i>               | <i>n = 5</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion</i> |
| <i>SphK2<sup>-/-</sup></i> | <i>akut</i>               | <i>n = 3</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion</i> |
| <i>SphK1<sup>-/-</sup></i> | <i>chronisch (7 Tage)</i> | <i>n = 4</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion</i> |
| <i>SphK2<sup>-/-</sup></i> | <i>chronisch (7 Tage)</i> | <i>n = 3</i>  | <i>10 – 16 Wochen</i> | <i>sex matched</i> | <i>Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion</i> |

### 5 Ergebnisse

Das Tiermodell der arteriellen Gefäßwanddenudation zielt auf die Freilegung der subendothelialen Matrix ab, woraufhin Prozesse, wie die arterielle Thrombose und der Neointimaformation mit der nachfolgenden Ausheilung des Gefäßes von statten gehen. Der Einsatz unterschiedlicher Untersuchungsverfahren hilft dabei die induzierten biologischen Vorgänge besser zu verstehen.

Anhand histologischer Untersuchungen kann die Denudation des Gefäßes verifiziert und die Neointimaformation analysiert werden.

Kann die Neointimahyperplasie dadurch bestätigt werden, so stellt dieses Tiermodell eine ausgezeichnete Möglichkeit dar, die Zerstörung der antiadhäsiven Endothelzellschicht, wie sie in Koronargefäßen durch die interventionelle Kardiologie stattfindet, nachzuahmen. Mit der Intravitalmikroskopie, als weiteres Verfahren, können zudem zelluläre Interaktionen an der Gefäßwand und ihre Bedeutung im Zuge der induzierten Inflammation und der Neointimaformation untersucht werden.

Die Standardisierung der Methode bietet nun die Möglichkeit, durch den Einsatz verschiedener Tierstämme und der vergleichenden Analyse der Ergebnisse die pathophysiologischen Vorgänge besser zu erforschen.

#### 5.1 Etablierung des Modells der arteriellen Gefäßwanddenudation

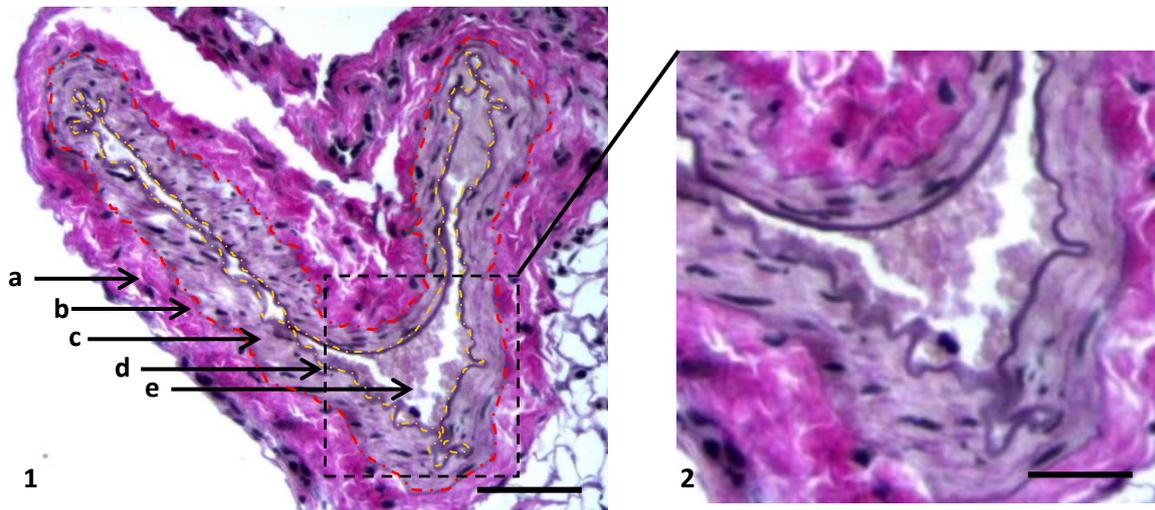
##### Verifizierung der Gefäßdenudation durch die histologische Analyse

Die Denudation des arteriellen Gefäßes durch einen Draht hat das Ziel die Intima abzutragen und das Gefäß zu dilatieren. Zur Bestätigung einer erfolgreichen Denudation, wird bei den akuten Versuchen bei jeder Maus das präparierte Gefäß sowohl in der HE-, als auch in der vG-Färbung histologisch dargestellt und auf das Vorhandensein von Endothelzellen untersucht. Zum Beweis der induzierten Gefäßdilatation erfolgt zusätzlich der Vergleich mit dem Sham-OP behandelten Gefäß der selbigen Maus.

Die Analyse wurde bei allen Tieren durchgeführt, hier wird allerdings in der Abbildung 18 nur ein Tier repräsentativ dargestellt. Die Untersuchungen weisen bei jedem Tier eine erfolgreiche Denudation des Gefäßes auf. Bei einigen Tieren liegt an der Stelle der Drahteinmündung vom arteriellen Gefäßast in die Arteria femoralis superficialis eine Dissektion vor. Weiter proximal wird erneut denudiertes Areal beobachtet, so dass man davon ausgehen kann, dass der Draht erneut in das Gefäßlumen eingetreten ist. Somit ist proximal der Einmündungsstelle bei jedem Tier die Denudation festzustellen, was bedeutet, dass zur weitergehenden Untersuchung nur diese Abschnitte berücksichtigt werden dürfen. Das durch eine Sham-OP behandelte Gefäß zeigt keinerlei Veränderungen auf, was beweist,

dass lediglich der Draht zur Abtragung der Endothelzellschicht und zur Dilatation des Gefäßes geführt hat.

Zusammenfassen lässt sich sagen, dass die Drahtdenudation zu einer Dilatation des Gefäßlumens und zu einer Abtragung der Endothelschicht führt, was durch histologische Untersuchungen zu beweisen ist.



**Wildtyp; A. fem. 50 min nach Denudation**

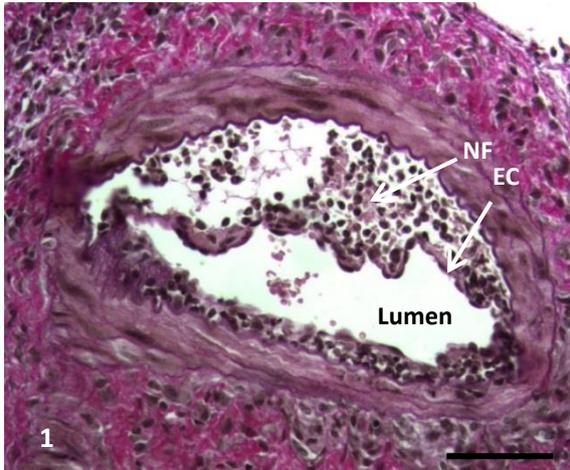
**Abbildung 12: Histologische Darstellung eines arteriellen Gefäßes der akuten Versuchsreihe**

- 1: a) Adventitia; b) Membrana elastica externa; c) Media; d) Membrana elastica interna; e) Thrombus an der Gefäßwand haftend; Maßstab = 100µm; Färbung = vG
- 2: Darstellung der denudierten Gefäßwand im vergrößerten Format. Es sind keine Endothelzellen mehr zu erkennen, was zur Entstehung von Abscheidungsthrombi an der verletzten Gefäßwand führt. Maßstab = 50µm; Färbung = vG

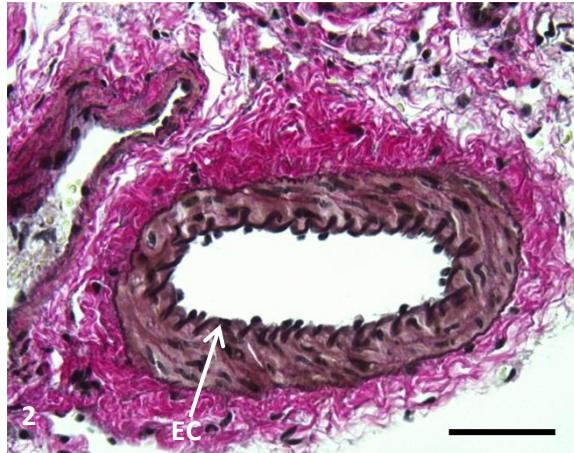
Analyse (histomorphometrisch) der Neointimaformation im zeitlichen Verlauf

Wie bereits beschrieben kommt es durch die Abtragung der Endothelzellschicht zur Entstehung einer arteriellen Thrombose und im Anschluss daran zu einer Neointimaformation. In manchen Fällen ist die Wundheilungsreaktion sehr stark, so dass eine Neointimahyperplasie die Folge sein kann. Ziel dieser Versuchsreihe ist die Bestätigung davon, so dass dies als Ausgangspunkt für weitere Versuche gelten kann. Die histologische Analyse der Neointima wird 1, 2, 3 und 4 Wochen nach der Denudation durchgeführt.

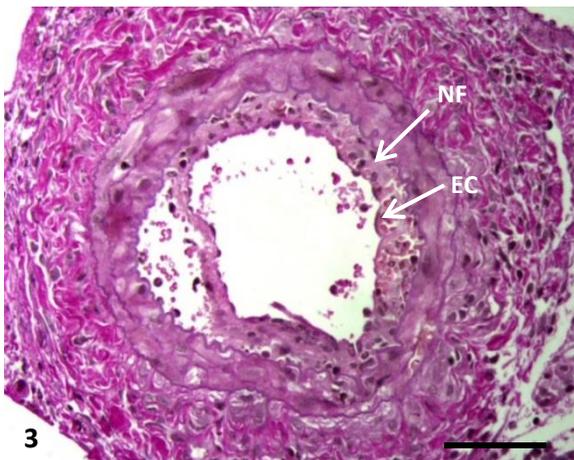
Die Abbildungen 13 und 14 zeigen beispielhaft eine Neointimahyperplasie, die bereits schon nach einer Woche festzustellen ist und im zeitlichen Verlauf verstärkt auftreten kann.



1 Wildtyp; A. fem. 1 W nach Denudation



2 Wildtyp; A. fem. 1 W nach Sham-Behandlung



3 Wildtyp; A. fem. 2 W nach Denudation



4 Wildtyp; A. fem. 2 W nach Sham-Behandlung

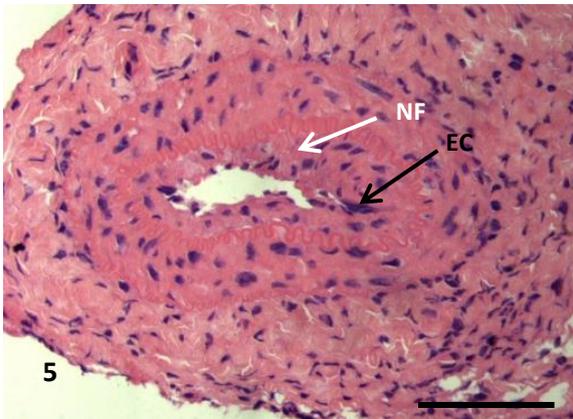
**Abbildung 13: Histologische Darstellung der Neointimaformation im zeitlichen Verlauf (1 u. 2 Wochen)**

1/2: Denudierte und sham-operierte Aa. fem. aus der Gruppe B; Maßstab: 100µm;

Färbung 1/2: vG

3/4: Denudierte und sham-operierte Aa. fem. aus der Gruppe C; Maßstab: 100µm;

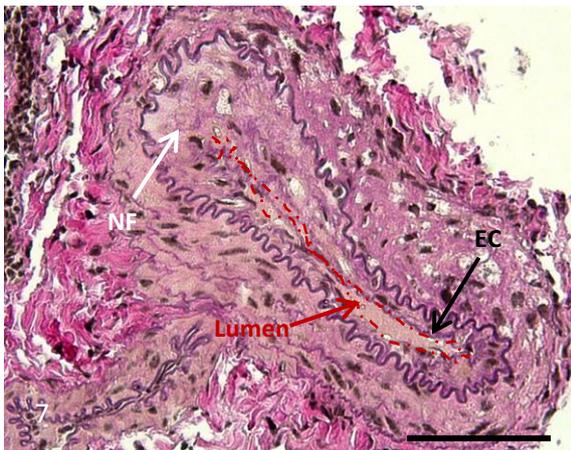
Färbung 3/4: vG/HE; NF = Neointimaformation; EC = Endothelzelle



Wildtyp; A. fem. 3 W nach Denudation



Wildtyp; A. fem. 3 W nach Sham-Behandlung



Wildtyp; A. fem. 4 W nach Denudation



Wildtyp; A. fem. 4 W nach Sham-Behandlung

## Abbildung 14: Histologische Darstellung der Neointimaformation im zeitlichen Verlauf (3 u. 4 Wochen)

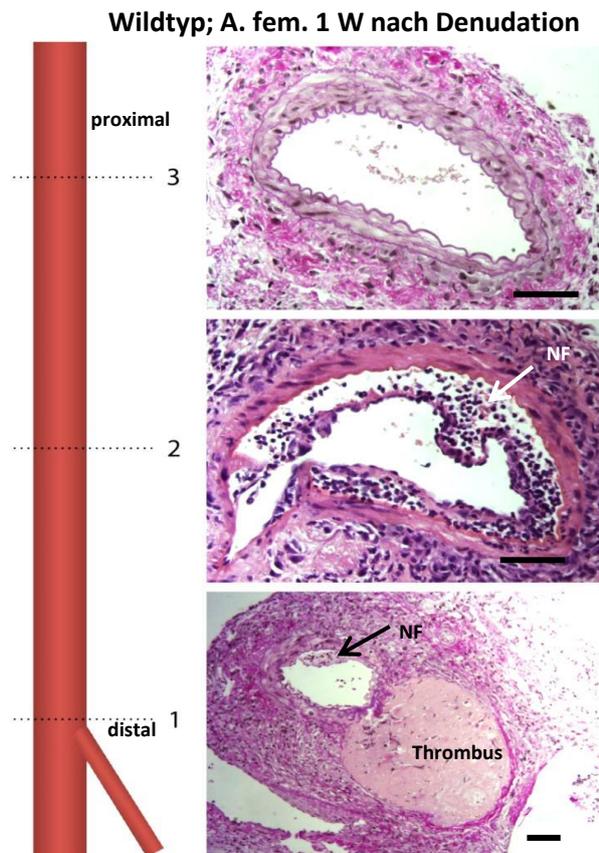
5/6: Denudierte und sham-operierte Aa. fem. aus der Gruppe D; Maßstab: 100µm;

Färbung 5/6: HE/vG

7/8: Denudierte und sham-operierte Aa. fem. aus der Gruppe E; Maßstab: 100µm;

Färbung 7/8: vG; NF = Neointimaformation; EC = Endothelzelle

Des Weiteren fällt auf, dass die Neointimaformation nicht im gesamten verletzten Abschnitt gleichmäßig ausfällt. So liegt im Bereich der Bifurkation der A. femoralis und des arteriellen Astes zunächst ein großer Thrombus vor. Darauf folgt der Abschnitt mit Neointimahyperplasie, der im proximalen Verlauf an Ausmaß verliert. Dieser Verlauf ist bei allen Versuchstieren ersichtlich (siehe Bild 15). In den seltensten Fällen kann die Neointimahyperplasie sogar diskontinuierlich sein, so dass zwischen den Hyperplasien ordnungsgemäße Neointima auffindig gemacht werden kann.



## Abbildung 15: Histologische Darstellung des Gefäßverlaufs zum Zeitpunkt

Die abgebildeten Schnitten stammen von der A. fem. des Wildtyps und sollen die unterschiedlich stark ausgeprägte Neointimaformation (**NF**) innerhalb des Gefäßes verdeutlichen.

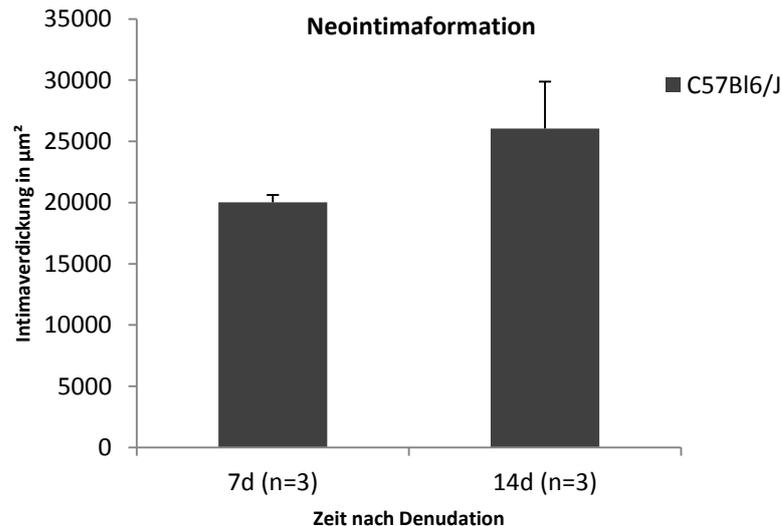
1: Thrombus an der Bifurkation der A. fem. und des arteriellen Muskelastes; Maßstab = 100µm; Färbung = vG

2: Neointima in der Mitte des denudierten Gefäßabschnittes; Maßstab = 100µm; Färbung = HE

3: Proximal gelegener denudierter Gefäßabschnitt; Maßstab=100µm; Färbung = vG

Zur Quantifizierung der Neointimahyperplasie wird diese bei Tieren der 1 und 2 Wochen-Gruppen histomorphometrisch ausgemessen. Das Ergebnis ist in der Abbildung 16 dargestellt.

Bereits eine Woche nach der Denudation ist eine stark in Erscheinung tretende Verdickung der arteriellen Neointima zu erkennen. Das Ergebnis zum Zeitpunkt 2 Wochen nach der Denudation weist auf eine im Verlauf zunehmende Hyperplasie hin. Allerdings liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten von 1 und 2 Wochen nach der Denudation vor. Die Ergebnisse der Sham-behandelten Gefäße werden im Diagramm nicht dargestellt, da diese keine pathologischen Veränderungen aufweisen und somit wie der Basalwert den Wert „0“ besitzen.



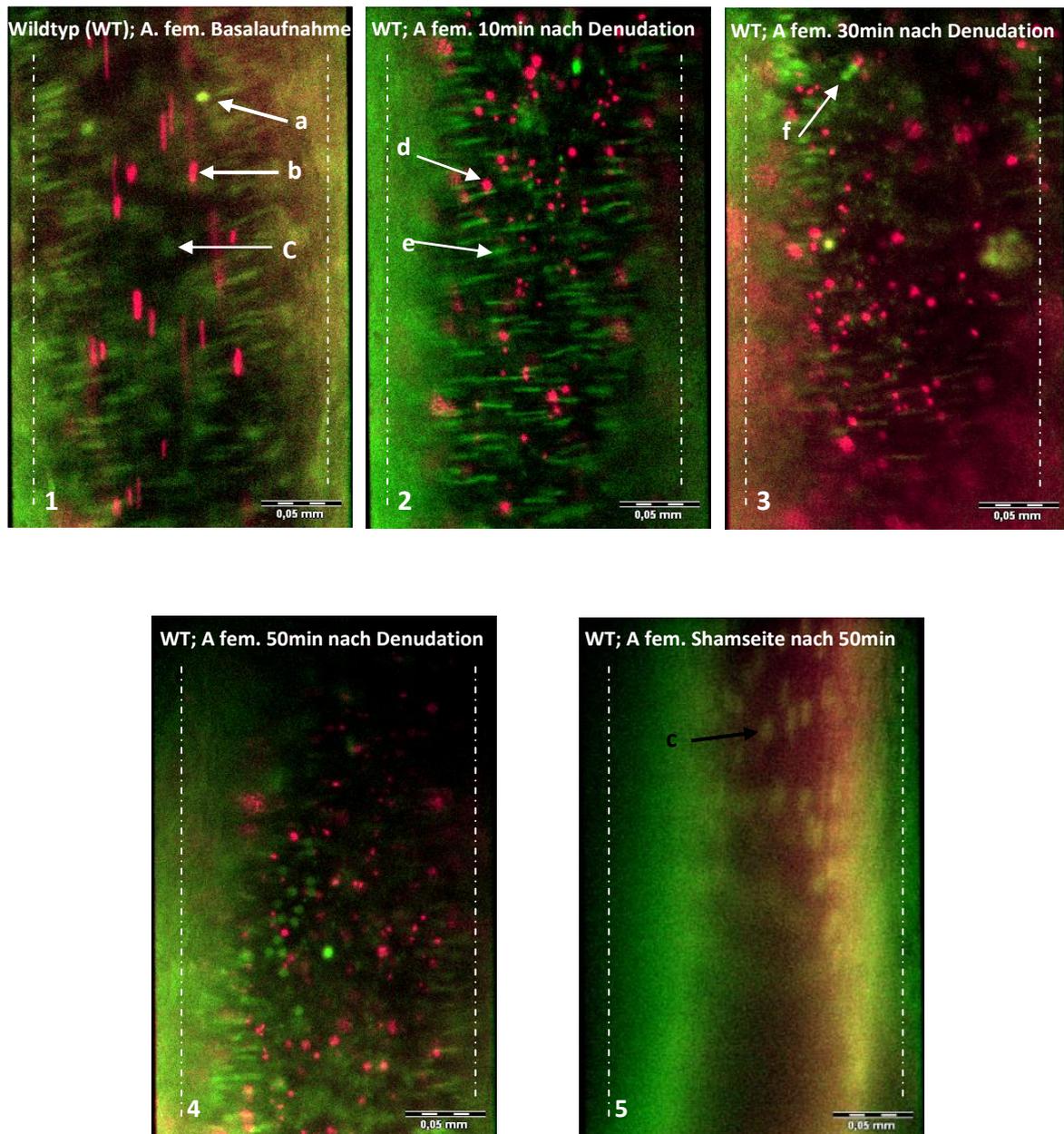
**Abbildung 16: Die quantitative Darstellung der Neointimahyperplasie 1 und 2 Wochen nach der Denudation**

Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Denudation der A. fem. eine Neointimahyperplasie induziert. Diese ist im zeitlichen Verlauf von 7, 14, 21 und 28 Tagen zunehmend. Zwischen den Zeitpunkten 1 und 2 Wochen ist allerdings histomorphometrisch kein signifikanter Unterschied erkennbar. Die Hyperplasie besitzt im gesamten Gefäß unterschiedliche Ausmaße. Im distalen Anteil ist sie am stärksten ausgeprägt und nimmt im proximalen Verlauf ab.

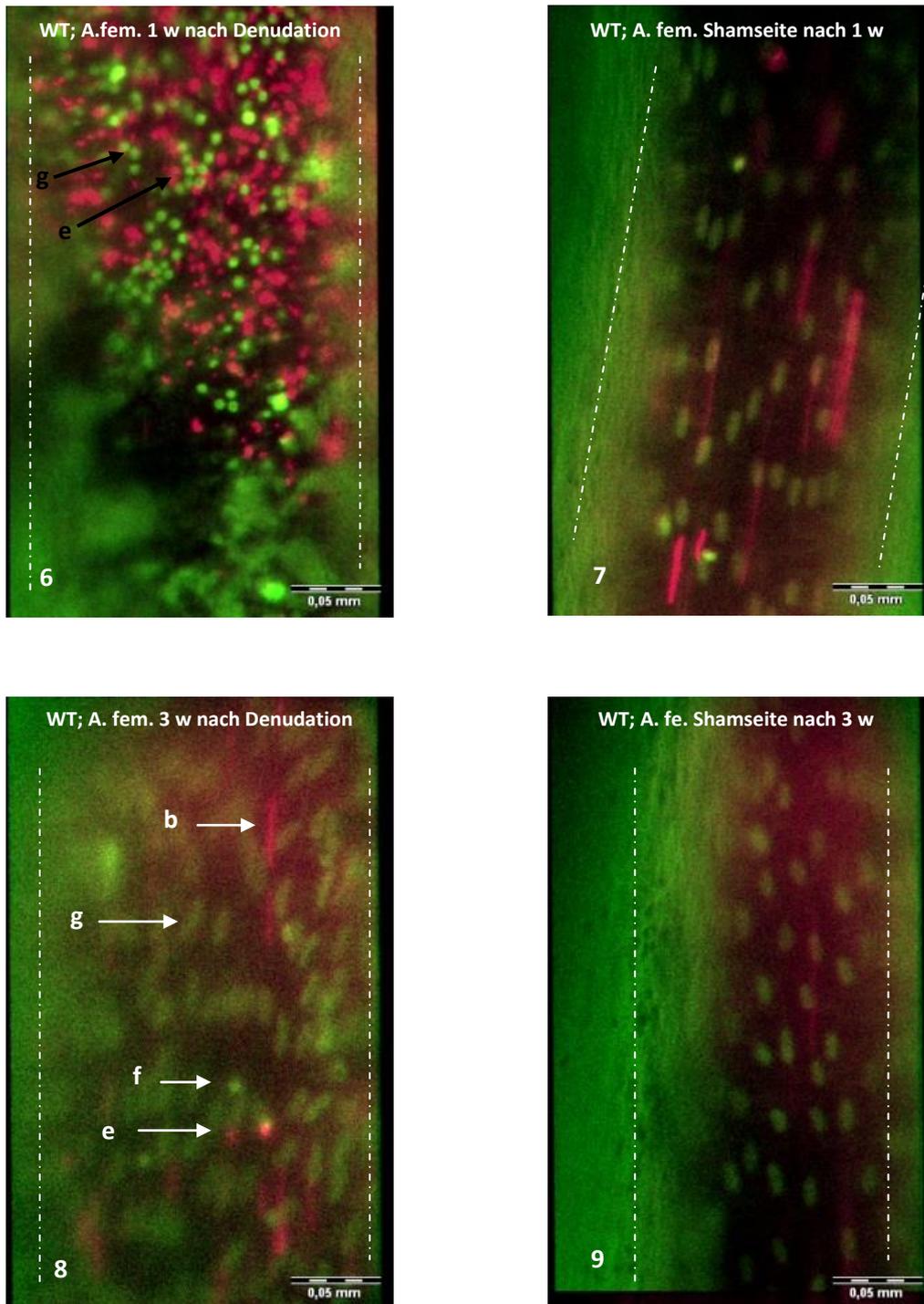
### 5.2 Das zelluläre Adhäsionsverhalten nach Denudation der arteriellen Gefäßwand bei C57Bl6/J-Wildtyp

Wie bereits beschrieben wird zur Analyse der zellulären Interaktion an der Gefäßwand die Intravitalmikroskopie eingesetzt. Zur Darstellung der Zellen werden diese mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Thrombozyten einer Spendermaus werden dabei mit Rhodamin B gefärbt (rote Färbung) und mittels eines Katheters in die Maus appliziert. Die Färbung der Leukozyten, Endothel- und Muskelzellen erfolgt durch Acridin orange (grüne Färbung). Danach erfolgen die Aufnahmen zu definierten Zeitpunkten vor, bzw. 10, 30, 50 Minuten und 1, 2, 3 und 4 Wochen nach der Denudation, und zwar sowohl am denudierten, wie auch am Sham-OP behandelten Gefäß. Das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten und Leukozyten wird analysiert und ausgewertet. Bei keinem der untersuchten Tiere wurde vor der Gefäßwandverletzung eine vermehrte Adhäsion von Zellen beobachtet. Und bei allen Tieren wurde durch die Intravitalmikroskopie ein kontinuierlicher Blutfluss des bereits denudierten Gefäßes beobachtet. Die Abbildungen 17 und 18 zeigen beispielhaft die unterschiedlichen Aufnahmen.



**Abbildung 17: Darstellung intravitalmikroskopischer Fluoreszenzaufnahmen der A. fem. aus der akuten Versuchsreihe**

- 1: Basale Aufnahme vor Denudation; **a)** rollender Leukozyt; **b)** vorbeifließender Thrombozyt; **c)** Endothelzelle; Maßstab = 50 $\mu$ m
- 2: IVM-Aufnahme 10 Minuten nach Denudation; **d)** adhärenter Thrombozyt; **e)** zirkuläre Muskelzelle der Media; Maßstab = 50 $\mu$ m
- 3: IVM-Aufnahme 30 Minuten nach Denudation; **f)** adhärente Leukozyten; Maßstab = 50 $\mu$ m
- 4: IVM-Aufnahme 50 Minuten nach Denudation; Maßstab = 50 $\mu$ m
- 5: IVM-Aufnahme des sham-operierten Gefäßes nach 50 Minuten; Maßstab = 50 $\mu$ m



**Abbildung 18: Darstellung intravitalmikroskopischer Fluoreszenzaufnahmen der A. fem. aus der chronischen Versuchsreihe**

6: IVM-Aufnahme 7 Tage nach Denudation; Maßstab = 50µm

7: IVM-Aufnahme des sham-operierten Gefäßes nach 7 Tage; Maßstab = 50µm

8: IVM-Aufnahme 21 Tage nach Denudation; g) Endothelzelle nach Reendothelialisierung; Maßstab = 50µm

9: IVM-Aufnahme des sham-operierten Gefäßes nach 21 Tage; Maßstab = 50µm

### Verifizierung der Denudation durch die Intravitalmikroskopie

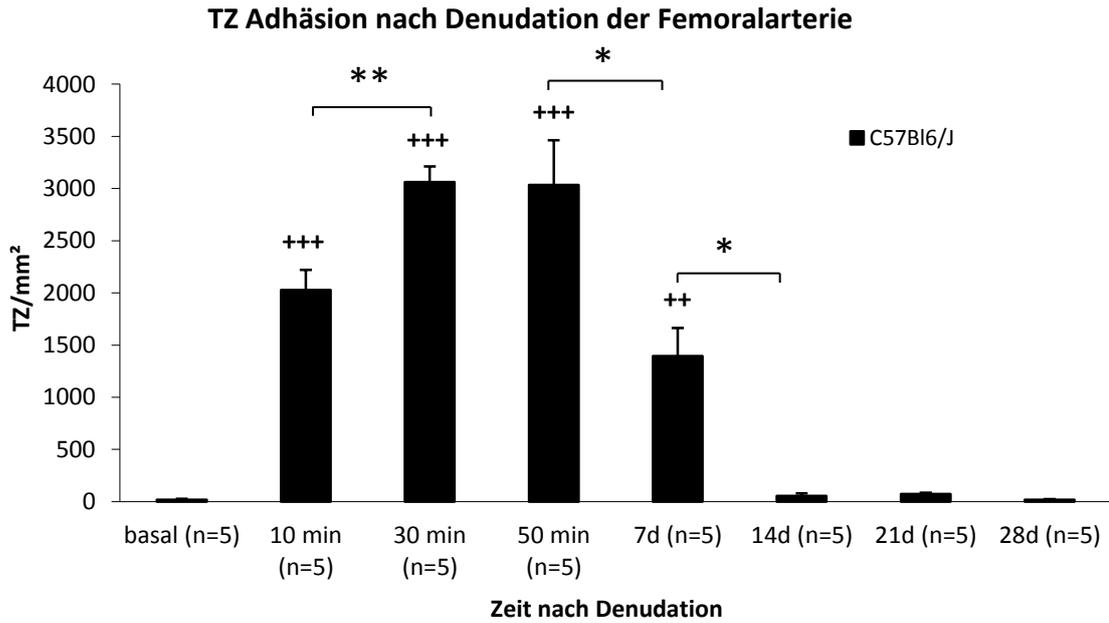
Die Verifizierung der Denudation kann ebenfalls anhand der Intravitalmikroskopie bei der akuten Versuchsreihe vorgenommen werden. Dabei werden die Aufnahmen nach der Denudation mit denen davor und mit der sham-operierten Seite verglichen. Die Endothelschicht, welche vor der Denudation noch eindeutig zu sehen war, ist danach nicht mehr zu erkennen. Nur noch vereinzelte und kleine Gruppen von Endothelzellen sind detektierbar. Das Gefäßlumen wird nur noch von den zirkulär angeordneten Muskelzellen der Media umgeben. Zusätzlich erscheint das Gefäß im Vergleich zur sham-operierten Seite, die keinerlei Veränderungen der Endothelschicht aufweist, dilatiert. Die Bilder 1, 2 und 5 aus der Abbildung 17 stehen repräsentativ dafür.

Aus den intravitalmikroskopischen Ergebnissen wird erkennbar, dass die Denudation zu einer Abtragung der Endothelzellen und zu einer Dilatation des Gefäßes führt.

### Adhäsionsverhalten von Thrombozyten bei den akuten und chronischen Versuchsreihen

Bei dieser Fragestellung steht das Verhalten der Thrombozyten vor und nach der Denudation im Zentrum der Betrachtungen. Deren Adhäsion an die arterielle Gefäßwand wird in den Zeitabständen 10, 30, 50 Minuten (akute Versuchsreihe) und 1,2,3 und 4 Wochen (chronische Versuchsreihe) beobachtet, ausgewertet und mit der sham-operierten Seite verglichen. Abbildung 19 gibt die ausgewerteten Ergebnisse wieder. Über den gesamten Versuchsverlauf, sowohl akut, wie auch chronisch, weisen die sham-operierten Gefäße nahezu identische Ergebnisse auf, wie die Auswertungsergebnisse der basal durchgeführten intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Daher werden in den folgenden Diagrammen nur die basalen Werte aufgeführt, welche in diesem Fall auch repräsentativ für die Werte der sham-operierten Seiten stehen.

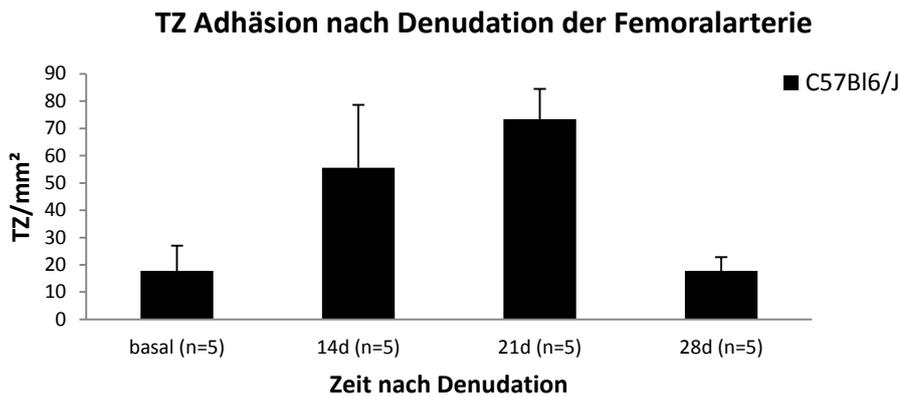
Bereits 10 Minuten nach der Denudation ist eine vermehrte Anzahl adhärenter Thrombozyten im Vergleich zum Basalwert zu beobachten (hoch signifikant). Die Anzahl der Adhäsionen steigt im zeitlichen Verlauf an, so dass nach 30 Minuten bereits schon ein sehr signifikanter Unterschied im Vergleich zum 10 Minuten-Wert festzustellen ist. Der Wert bleibt im weiteren Verlauf der akuten Versuchsreihe ungefähr konstant. Nach 1 Woche sinkt die Anzahl adhärenter Thrombozyten mit einem signifikanten Unterschied ab. Im Vergleich zu den Konditionen vor der Denudation (Basalwert) weisen die Zeitpunkte 10, 30, 50 Minuten und 7 Tage sehr bis hoch signifikante Unterschiede in Bezug auf adhärente Zellen auf. In den darauffolgenden Wochen sinkt die Anzahl kontinuierlich auf ein Minimum. Es sind keine signifikanten Unterschiede zu den basalen Werten erkennbar. Das sham-operierte Gefäß zeigt keinerlei pathologische Verhaltensveränderungen der Thrombozyten auf. Daraus lässt sich folgern, dass die Abtragung der Intima durch den Draht als Ursache für die Blutplättchenaktivierung angesehen werden kann.



**Abbildung 19: Quantitative Darstellung adhärenter Thrombozyten bei der akuten und chronischen Versuchsreihe**

Der basale Wert steht auch repräsentativ für die Sham behandelte Seite. + = Darstellung der Signifikanz beim Vergleich des jeweiligen Wertes mit dem Basalwert.

Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (+ =  $p < 0,05$ ; ++ =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; +++ =  $p \leq 0,001$ ), (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).



**Abbildung 20: Quantitative Darstellung adhärenter Thrombozyten bei der chronischen Versuchsreihe**

Zur besseren Übersicht und zum besseren Verständnis werden die Ergebnisse der Gruppen C, D, E nochmals dem basalen Wert gegenübergestellt. + = Darstellung der Signifikanz beim Vergleich des jeweiligen Wertes mit dem Basalwert. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (+ =  $p < 0,05$ ; ++ =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; +++ =  $p \leq 0,001$ ), (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

## Ergebnisse

---

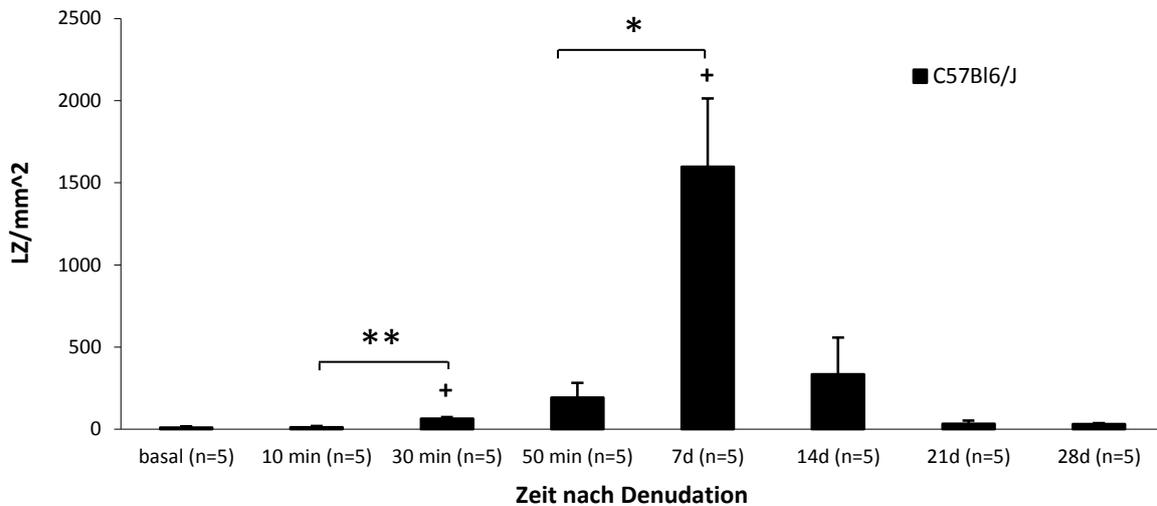
Zusammenfassend wird erkennbar, dass die Gefäßdenudation bereits nach 10 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der Thrombozytenadhäsion führt. Im weiteren akuten Verlauf ist eine steigende Tendenz erkennbar. Zum Zeitpunkt 7 Tage ist eine signifikant geringere Anzahl adhärenter Blutplättchen im Vergleich zu akuten Zahlen zu verzeichnen, ist allerdings im Vergleich zum Basalwert signifikant hoch. Danach sinkt die deren Anzahl weiter ab, es sind keine signifikanten Unterschiede zum Basalwert erkennbar. Nach 28 Tagen ist der basale Werte erreicht.

### Adhäsionsverhalten von Leukozyten bei den akuten und chronischen Versuchsreihen

Bei dieser Analyse stehen Leukozyten im Zentrum der Betrachtungen. Dabei wird deren Adhäsion an die arterielle Gefäßwand zu den Zeitpunkten vor Denudation, sowie 10, 30, 50 Minuten (akute Versuchsreihe) und 1,2,3 und 4 Wochen (chronische Versuchsreihe) beobachtet, ausgewertet und mit der Shamseite verglichen. Die Abbildung 21 gibt die berechneten Ergebnisse wieder.

Eine Veränderung des Zellverhaltens ist in der akuten Versuchsreihe durch eine kontinuierliche Zunahme der Adhäsion erkennbar. Das Maximum erreicht die Leukozytenadhäsion allerdings in der chronischen Versuchsreihe zum Zeitpunkt 1 Woche. Hierbei liegt ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Zeitpunkt 50 Minuten vor. Davor gibt es einen sehr signifikanten Unterschied zwischen Werten von 10 und 30 Minuten. Beim Vergleich zwischen dem basalen Wert und den Zeitpunkten 30 Minuten und 7 Tage signifikante Unterschiede vor. Nach 1 Woche sinkt die Anzahl adhärenter Zellen ab und strebt nach 4 Wochen das absolute Minimum an. Die sham-operierte Seite weist keinerlei Veränderungen des zellulären Adhäsionsverhaltens auf. Die Denudation kann somit als Ursache für die Veränderung des leukozytären Adhäsionsverhaltens gedeutet werden.

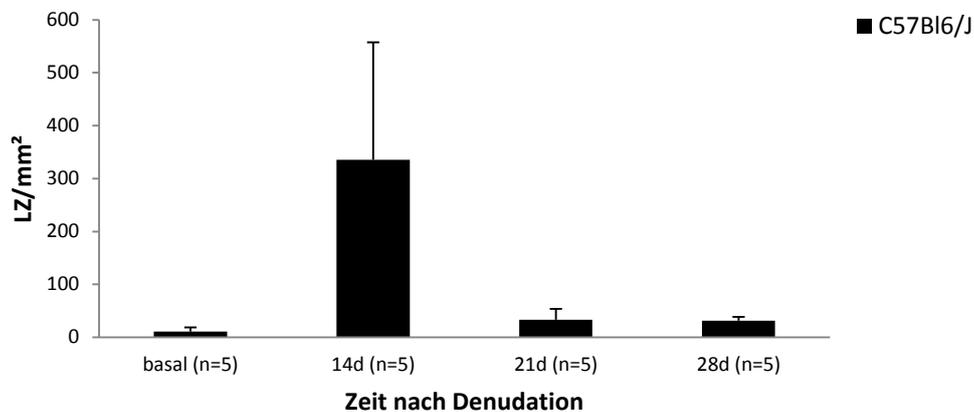
## LZ Adhäsion nach Denudation der Femoralarterie



**Abbildung 21: Quantitative Darstellung adhärenter Leukozyten bei der akuten und chronischen Versuchsreihe**

Der basale Wert steht auch repräsentativ für die Sham behandelte Seite. + = Darstellung der Signifikanz beim Vergleich des jeweiligen Wertes mit dem Basalwert. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (+ =  $p < 0,05$ ; ++ =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; +++ =  $p \leq 0,001$ ), (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

## LZ Adhäsion nach Denudation der Femoralarterie



**Abbildung 22: Quantitative Darstellung adhärenter Leukozyten bei der chronischen Versuchsreihe**

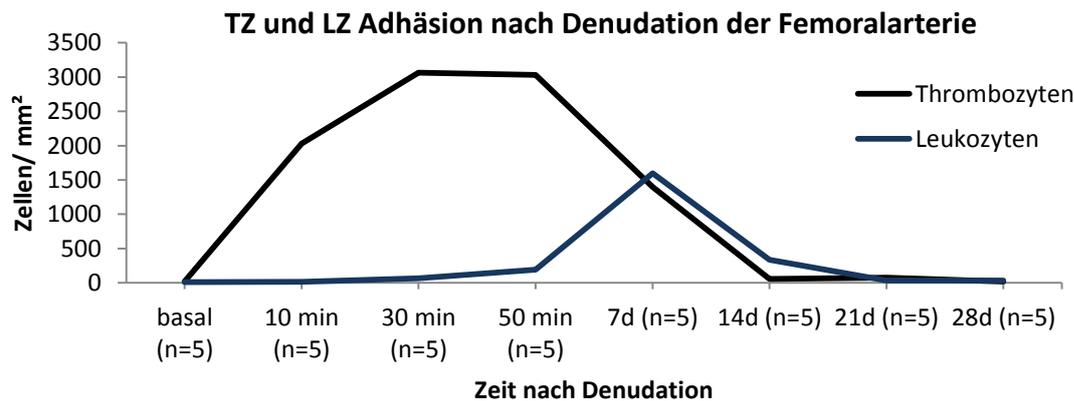
Zur besseren Übersicht und zum besseren Verständnis werden die Ergebnisse der Gruppen C, D, E nochmals dem basalen Wert gegenübergestellt. + = Darstellung der Signifikanz beim Vergleich des jeweiligen Wertes mit dem Basalwert. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (+ =  $p < 0,05$ ; ++ =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; +++ =  $p \leq 0,001$ ), (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Es ist somit erkennbar, dass die Intimaabtragung im akuten Verlauf zu einer zunächst, im Vergleich zur Thrombozytenadhäsion, langsam ansteigenden Leukozytenadhäsion führt. Erst nach 30 Minuten wird ein größerer Anstieg ersichtlich. Das Maximum wird im chronischen

## Ergebnisse

Zeitverlauf, nämlich nach 7 Tagen, erreicht. Hier liegt ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Basalwert vor. Im weiteren Verlauf sinkt die Anzahl der adhärenen Zellen ab und erreicht den basalen Ursprungswert.

Aus den bisherigen Auswertungen wird ersichtlich, dass die Thrombozyten unmittelbar nach der Denudation der Gefäßwand ein rapid steigendes Adhäsionsverhalten aufweisen. Die Anzahl der Leukozyten hingegen steigt verzögert an. Die Abnahme adhärerender Zellen erfolgt bei beiden Zelllinien ungefähr zeitgleich. Abbildung 23 verdeutlicht diese Entwicklungen.



**Abbildung 23: Quantitative Darstellung adhärenter Thrombozyten und Leukozyten nach Denudation**

Zum besseren Verständnis der unterschiedlichen Adhäsionsverhalten von Thrombozyten und Leukozyten werden die quantitativen Werte der Gruppen A-E hier gegenübergestellt.

### Analyse der Reendothelialisierung nach der Denudation bei C57Bl6/J-Wildtyp

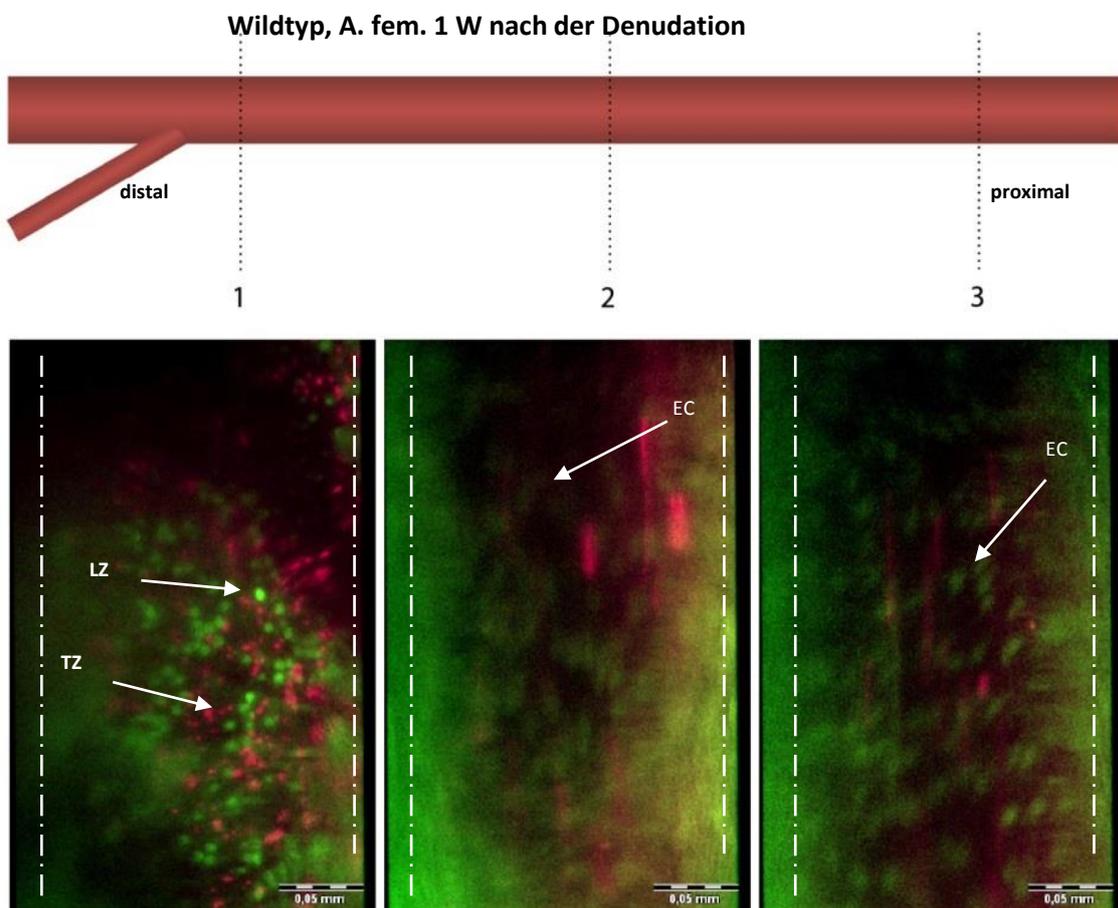
Im Zentrum der Betrachtungen des zellulären Verhaltens nach einer Verletzung der Gefäßwand stehen auch die Endothelzellen. Bei der akuten Versuchsreihe konnte anhand der Intravitalmikroskopie bisher die komplette Abtragung der Intima dargelegt werden. Im Folgenden dienen die Aufnahmen der chronischen Versuche, die zu den Zeitpunkten 1, 2, 3 und 4 Wochen nach der Denudation entstanden, die Gefäßwand auf das Vorhandensein von Endothelzellen im Rahmen einer Reendothelialisierung zu untersuchen.

Dabei wird deutlich, dass bereits nach 1 Woche im proximalen, wie auch mittleren Bereich der Arterie Endothelzellen zu beobachten sind (siehe Abbildung 24). Im distalen Areal hingegen erst ab der dritten Woche. Allerdings unterscheiden sich die Zellen in der Anordnung und Morphologie. Waren vor der Denudation die Zellen noch regelmäßig angeordnet und deren Form zumeist oval bis rund, so lassen sich zum Zeitpunkt 1 und 2 Wochen nach Denudation Endothelzellen mit einer länglichen Form und einer leicht schrägen Ausrichtung zur Flussrichtung beobachten. In den darauffolgenden Wochen nimmt der Anteil an Endothelzellen kontinuierlich zu, so dass nach 3 Wochen das komplette Gefäßlumen erneut mit einer Endothelschicht ausgekleidet ist. Die Zellen sind zu diesem Zeitpunkt mehrheitlich parallel zum Fluss ausgerichtet und besitzen eine längliche Form.

## Ergebnisse

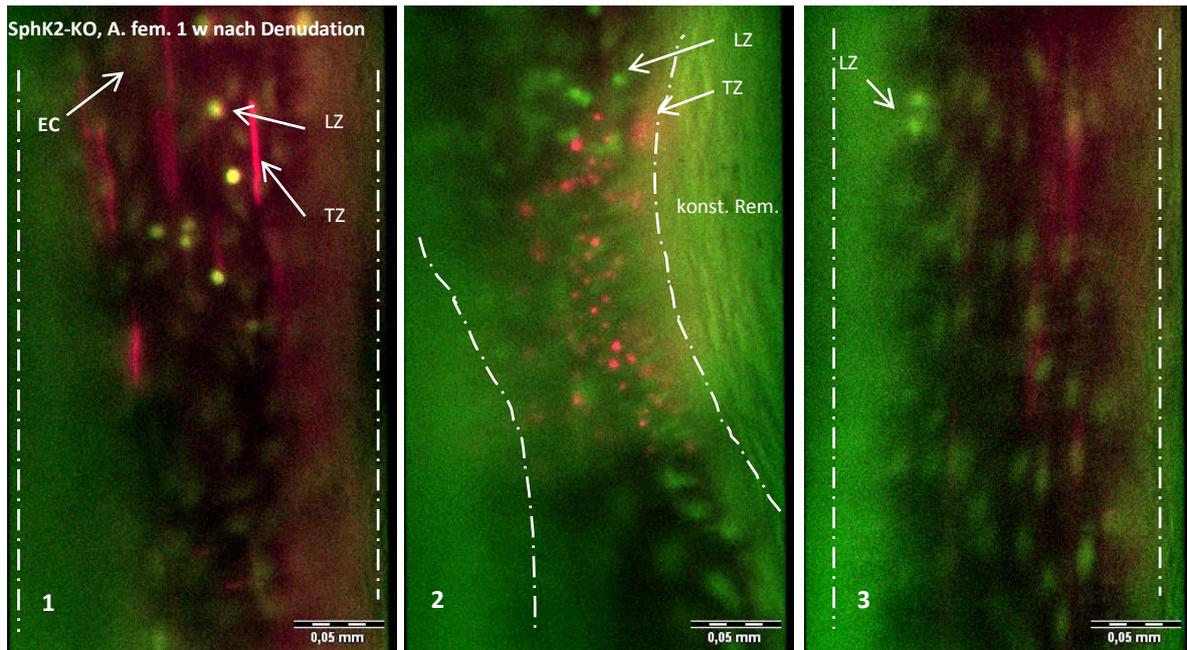
Interessanterweise sind bei den denudierten Gefäßen rundliche Endothelzellen im Bereich von Gefäßaufweitungen zu erkennen, so dass mit höchster Wahrscheinlichkeit die lokal vorherrschenden Scherkräfte des Blutflusses für die Form und Ausrichtung der Zellen verantwortlich sind. Das gleiche Phänomen lässt sich vor und kurz nach konstringierten Gefäßabschnitten beobachten.

Des Weiteren ist das Phänomen des konstriktiven Remodelings durch die IVM zu erkennen. Auf reendothelialisierte Areale folgen Einschnürungen des Gefäßes, die keine bis wenige Endothelzellen aber dafür zirkulär angeordnete Muskelzellen weiterhin aufzeigen. Hier ist eine erhöhte Anzahl adhärenter Thrombozyten, jedoch kein Leukozytenrollen zu beobachten. Wohingegen proximal und distal dieser Abschnitte vermehrtes Leukozytenrollen vorliegt. Adhärente Blutplättchen sind nicht zu verzeichnen (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 24: Darstellung der Gefäß-Auskleidung im Gefäßverlauf nach Denudation**

- 1: Proximal sind keine Endothelzellen (EC), dafür Leukozyten (LZ, hellgrün) und Thrombozyten (TZ, rot) erkennbar.
- 2: Es sind keine adhärenen LZ und TZ, hingegen eine mit EC (schwachgefärbt in grün durch das Acridin orange) besetzte Intima zu verzeichnen.
- 3: Es liegt eine hohe Dichte an EC (schwachgefärbt in grün durch das Acridin orange) vor. Es sind keine adhärenen TZ und LZ zu sehen. Maßstab = 50 µm



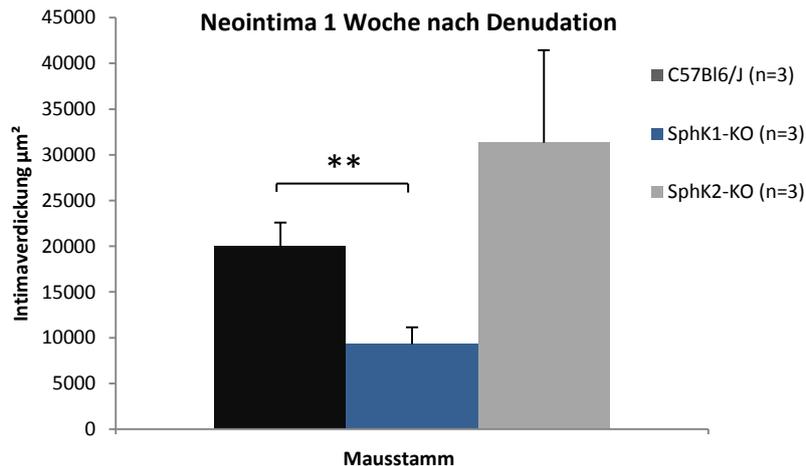
**Abbildung 25: Darstellung eines Gefäßabschnitts der A. fem. mit konstriktivem Remodeling**

- 1: Im proximalen Gefäßabschnitt vor der Verengung sind Endothelzellen (EC, schwachgefärbt in grün durch das Acridin orange) und vermehrte Leukozytenrollen (LZ, hellgrün) zu beobachten, aber keine adhärenenten Thrombozyten (TZ, rot). Maßstab = 50µm
- 2: Im Bereich der Konstriktion sind nur adhärenente TZ, keine LZ und EC, zu erkennen. Knapp oberhalb ist die Anzahl rollender LZ sehr hoch. Maßstab = 50µm
- 3: Unterhalb der Verengung sind nur noch rollende LZ und EC, keine TZ zu erkennen. Maßstab = 50µm

### 5.3 Die Rolle von Sphingosin-1-Phosphat bei der Neointimahyperplasie

#### Analyse der Neointima bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> und die Gegenüberstellung mit dem Wildtyp

Zum Vergleich des Ausmaßes der Neointimahyperplasie werden die unterschiedlichen Mauslinien gegenübergestellt. Die Abbildung 26 gibt die berechneten Ergebnisse wieder. Der Vergleich der Intimaverdickung von Wildtyp mit den SphK1<sup>-/-</sup> zeigt einen sehr signifikanten Unterschied auf. Das größte Ausmaß der Hyperplasie ist bei SphK2 defizienten Tieren festzustellen. Allerdings weist dieses Ergebnis aufgrund der hohen Standardabweichung keinen signifikanten Unterschied zu den anderen Stämmen auf. Die Sham-Gefäße der SphK1 und 2 defizienten Mäusen weisen keinerlei pathologische Veränderungen der Intima auf.



**Abbildung 26: Darstellung der Intimaverdickung von Bl6, SphK1- und SphK2-KO**

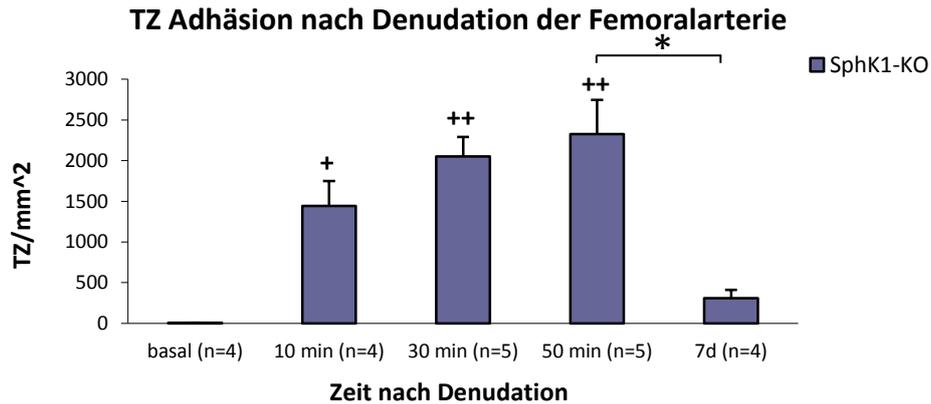
Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Zusammenfassend wird es erkennbar, dass das Ausschalten der Sphingosinkinase 1 zu einer signifikant verminderten Neointimahyperplasie im Vergleich zum Wildtyp führt. Die Sphingosinkinase 2 hingegen scheint keinen Einfluss auf die Hyperplasie zu haben. Diese ist im Vergleich zum Wildtyp und SphK1-KO am stärksten ausgeprägt.

### 5.4 Das zelluläre Verhalten nach der Denudation der arteriellen Gefäßwand bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> und deren Gegenüberstellung mit dem C57/Bl6J-Wildtyp

#### Analyse der Thrombozytenadhäsion bei der akuten und chronischen Versuchsreihe

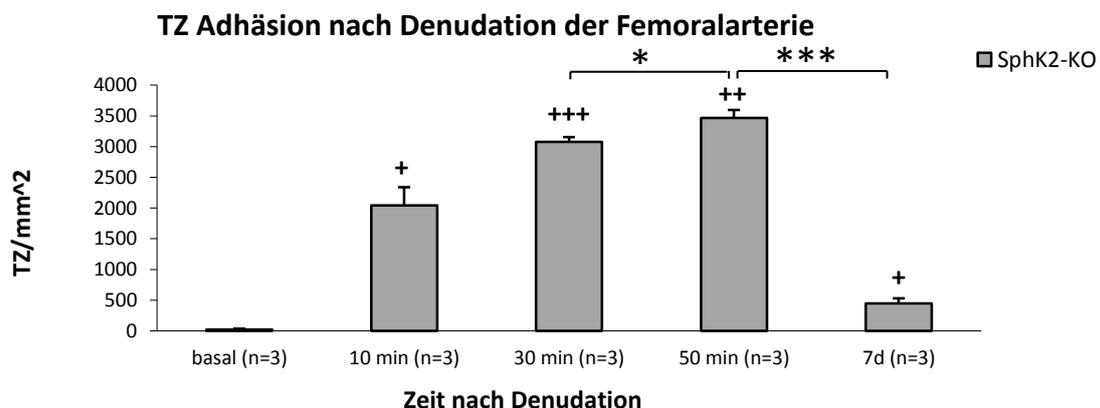
Bei den SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> Mauslinien wird die Veränderung des zellulären Verhaltens von Thrombozyten intravitalmikroskopisch zu den Zeitpunkten 10, 30 und 50 Minuten (akute Versuchsreihe) und 1 Woche (chronische Versuchsreihe) nach der Denudation untersucht. Da sich bei der Kontrollgruppe zeigt, dass die Thrombozyten-Gefäßwand-Interaktion noch 1 Woche nach der Denudation stattfand, und im Gegensatz dazu zu den späteren Zeitpunkten nach Verletzung nicht mehr zu beobachten war, wurde die Versuchsreihe zur Untersuchung der Knockout Tiere auf die Beobachtungsphase von 1 Woche limitiert. Die Abbildung 27 gibt die ausgewerteten Ergebnisse der SphK1<sup>-/-</sup> Mäuse wieder. Bereits nach 10 Minuten ist eine signifikant erhöhte Anzahl an adhärenenten Zellen festzustellen. Die Anzahl steigt kontinuierlich an und erreicht das Maximum bei 50 Minuten. Beim Vergleich der basalen Werte mit denen nach 30 und 50 Minuten werden (sehr) signifikante Unterschiede erkennbar. Nach 1 Woche hingegen sinkt der Wert signifikant ab. An der Sham-Seite weist auf keine Veränderung des Adhäsionsverhaltens der Zellen hin.



**Abbildung 27: Quantitative Darstellung adhärenter Thrombozyten bei der akuten und chronischen Versuchsreihe mit SphK1-KO Mäusen**

Der basale Wert steht auch repräsentativ für die Sham behandelte Seite. + = Darstellung der Signifikanz beim Vergleich des jeweiligen Wertes mit dem Basalwert. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (+ =  $p < 0,05$ ; ++ =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; +++ =  $p \leq 0,001$ ), (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Die Abbildung 28 zeigt das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten des SphK2<sup>-/-</sup> Mausstamms auf. Auch hier ist ein Anstieg adhärenter Zellen nach 10 Minuten feststellbar. Die Werte steigen kontinuierlich an und erreichen zum Zeitpunkt 50 Minuten ihr Maximum, wobei zwischen 30 und 50 Minuten ein signifikanter Unterschied zu erkennen ist. Bei 1 Woche nach der Denudation ist die Anzahl adhärenter Thrombozyten auf ein Minimum erniedrigt und zwar mit einem hoch signifikanten Unterschied im Vergleich zu 50 Minuten. Beim Vergleich mit dem basalen Ausgangswert, weisen die Werte aller errechneten Zeitpunkte signifikante Unterschiede auf. Auch hier sind keine pathologischen Adhäsionsverhaltensänderungen der Zellen am Sham behandelten Gefäß erkennbar.



**Abbildung 28: Quantitative Darstellung adhärenter Thrombozyten bei der akuten und chronischen Versuchsreihe mit SphK2-KO Mäusen**

Der basale Wert steht auch repräsentativ für die Sham behandelte Seite. + = Darstellung der Signifikanz beim Vergleich des jeweiligen Wertes mit dem Basalwert. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (+ =  $p < 0,05$ ; ++ =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; +++ =  $p \leq 0,001$ ), (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

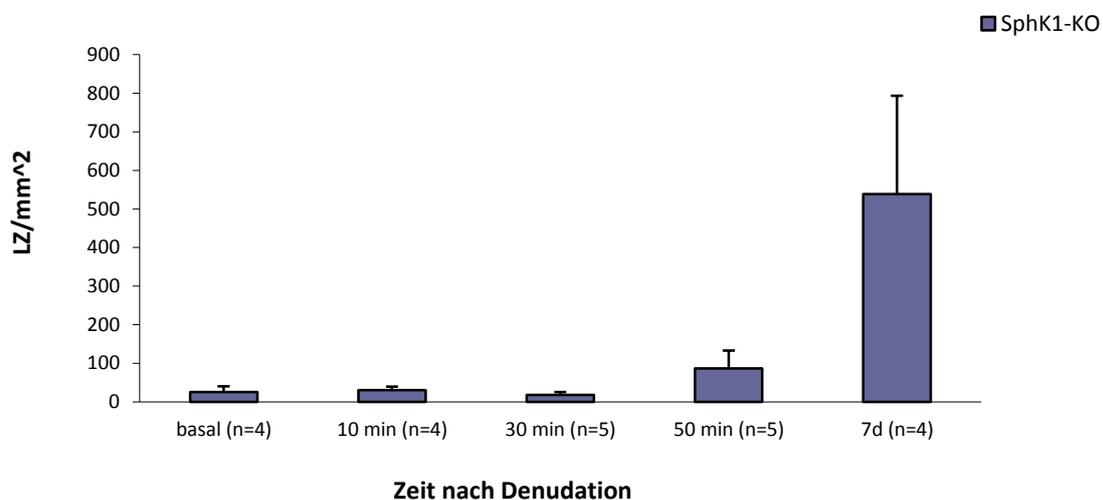
## Ergebnisse

Zusammenfassend wird erkennbar, dass die Intimadenudation sowohl bei der SphK1, als auch SphK2 defizienten Mäusen im akuten Verlauf bereits nach 10 Minuten zu einer signifikant ansteigenden Anzahl adhärenter Thrombozyten führt. Bei beiden Stämmen wird das Maximum zum akuten Zeitpunkt 50 Minuten beobachtet. Danach sinkt die Anzahl adhärenter Zellen bei 7 Tagen ab, ist allerdings bei den SphK2-KO Tieren, beim Vergleich mit dem Basalwert, immer noch signifikant erhöht.

### Analyse der Leukozytenadhäsion bei der akuten und chronischen Versuchsreihe

Wie bei der vorherigen Fragestellung erfolgt die Analyse des leukozytären Adhäsionsverhaltens nach der Gefäßwanddenudation zu bestimmten Zeitpunkten. Auch hierbei wurde auf die akuten Zeitpunkte, sowie 7d nach Verletzung fokussiert, da sich bei den Kontroll-Tieren gezeigt hatte, dass zu den späteren Zeitpunkten (2, 3, 4 Wochen nach Denudation) keine signifikante Leukozyten-Gefäßwand-Interaktion mehr stattfindet. Die Abbildung 29 gibt die ausgewerteten Ergebnisse der Versuchsreihen mit SphK1<sup>-/-</sup> wieder. Bereits 10 Minuten nach der Denudation ist ein annähernd kontinuierlicher Anstieg von adhärenter Leukozyten an die Gefäßwand feststellbar. Das Maximum wird zum Zeitpunkt 1 Woche erreicht. Allerdings ist kein signifikanter Anstieg erkennbar ( $p=0,222$ ). Die Sham-Seite zeigt keine Veränderung des leukozytären Adhäsionsverhaltens auf.

#### LZ Adhäsion nach Denudation der Femoralarterie



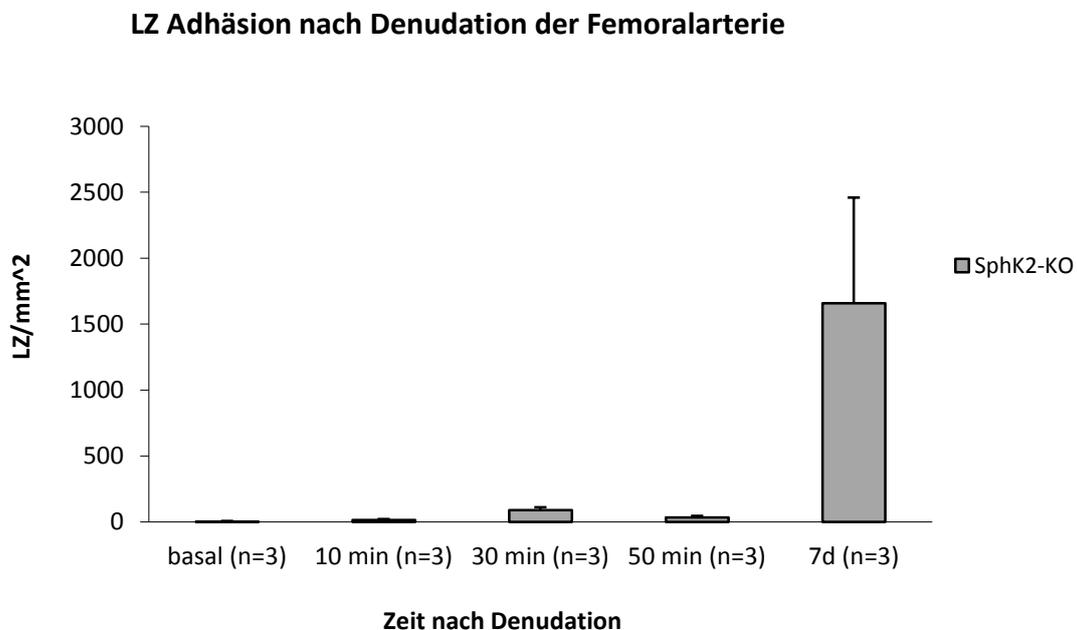
#### **Abbildung 29: Quantitative Darstellung adhärenter Leukozyten bei der akuten und chronischen Versuchsreihe mit SphK1-KO Mäusen**

Der basale Wert steht auch repräsentativ für die Sham behandelte Seite. + = Darstellung der Signifikanz beim Vergleich des jeweiligen Wertes mit dem Basalwert. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (+ =  $p < 0,05$ ; ++ =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; +++ =  $p \leq 0,001$ ), (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Die Abbildung 30 stellt die Ergebnisse adhärenter Leukozyten bei der SphK2<sup>-/-</sup> Versuchsreihe dar. Auch hier ist ein annähernd kontinuierlicher Anstieg adhärenter Leukozyten an die

## Ergebnisse

denudierte Gefäßwand festzustellen, der sein Maximum zum Zeitpunkt 1 Woche nach Denudation erreicht. Bei keinem der dargestellten Werte ist ein signifikanter Unterschied feststellbar. Die Sham behandelte Seite kann keine Adhäsionsverhaltensänderung der Leukozyten aufweisen.



**Abbildung 30: Quantitative Darstellung adhärenter Leukozyten bei der akuten und chronischen Versuchsreihe mit SphK2-KO Mäusen**

Der basale Wert steht auch repräsentativ für die Sham behandelte Seite. + = Darstellung der Signifikanz beim Vergleich des jeweiligen Wertes mit dem Basalwert. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (+ =  $p < 0,05$ ; ++ =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; +++ =  $p \leq 0,001$ ), (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

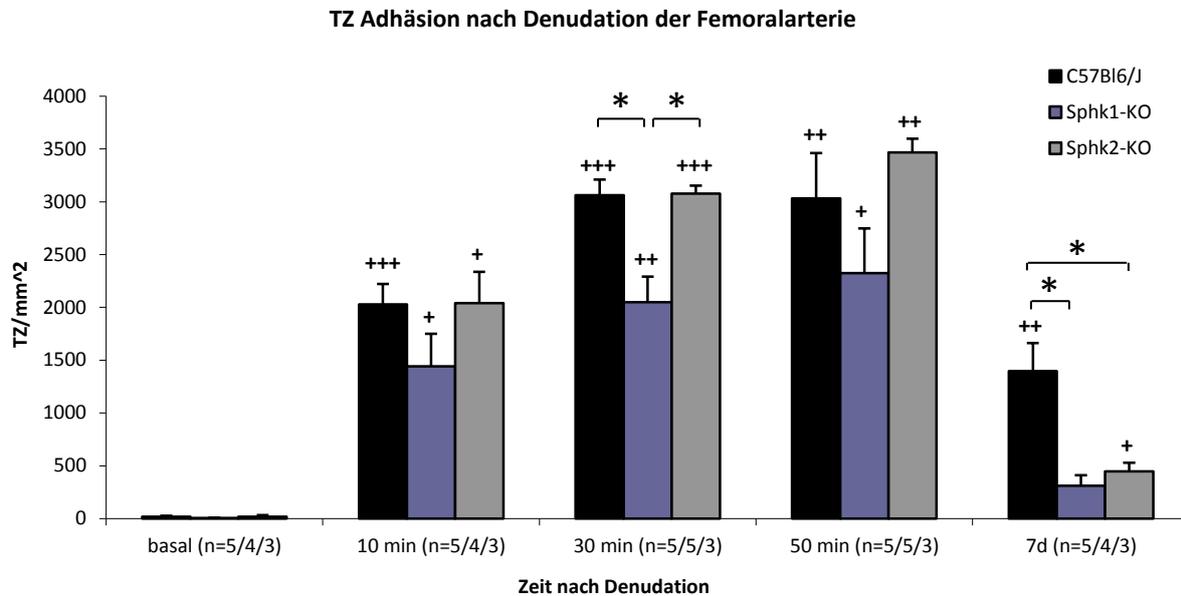
Zusammenfassend wird erkennbar, dass die Abtragung der Endothelzellschicht zu einer im akuten Verlauf ansteigenden Anzahl wandadhärenter Leukozyten Zahl bei SphK1 und 2 defizienten Mäusen führt. Das Maximum wird zum Zeitpunkt 7 Tage erreicht, wobei beim Vergleich beider Stämme die SphK1-KO Tiere weniger adhärenente Zellen aufzeigen.

### Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse der C57Bl6/J-Wildtyp, SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> Mausstämme

Um einen Unterschied im Adhäsionsverhalten der Thrombozyten und Leukozyten an die verletzte Gefäßwand, bedingt durch das Fehlen der Sphingosinkinasen Typ 1 und 2, erkennen zu können, werden die Ergebnisse mit der Kontrollgruppe verglichen. Die Abbildung 31 gibt die Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Thrombozyten an die denudierte Gefäßwand wieder. Es ist erkennbar, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten die Werte der SphK1<sup>-/-</sup> Tiere niedriger

## Ergebnisse

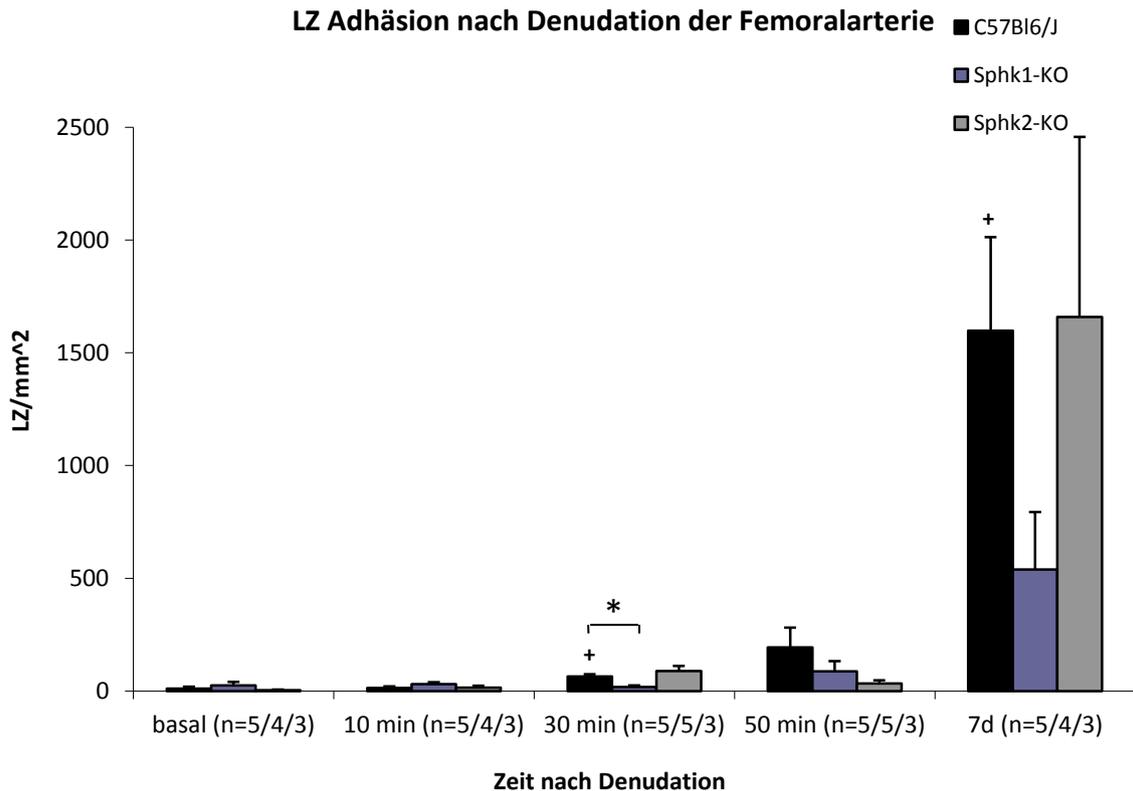
sind als die der beiden anderen Gruppen. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wert von SphK1<sup>-/-</sup> und den Werten von Wildtyp und SphK2<sup>-/-</sup> ist zum Zeitpunkt 30 Minuten berechenbar. Zum Zeitpunkt 1 Woche unterscheidet sich der Wert des Kontrollstamms signifikant von den Werten der SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> Mausstämme.



**Abbildung 31: Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse des thrombozytären Adhäsionsverhaltens bei C57BL6/J, SphK1- und SphK2-KO nach Gefäßwanddenudation**

Der basale Wert steht auch repräsentativ für die Sham behandelte Seite. + = Darstellung der Signifikanz beim Vergleich des jeweiligen Wertes mit dem Basalwert. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (+ =  $p < 0,05$ ; ++ =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; +++ =  $p \leq 0,001$ ), (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Die Abbildung 32 repräsentiert die Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse des Adhäsionsverhaltens von Leukozyten. Hierbei ist lediglich ein signifikanter Unterschied der Werte von Wildtyp und SphK1<sup>-/-</sup> zum Zeitpunkt 30 Minuten feststellbar. Zum Zeitpunkt 1 Woche liegt kein signifikanter Unterschied zwischen den Mausstämmen vor, da die Standardabweichungen hierbei zu hoch sind ( $p=0,099$  bei C57BL6/J-Wildtyp - SphK1<sup>-/-</sup>;  $p=0,372$  bei SphK1<sup>-/-</sup> - SphK2<sup>-/-</sup>).



**Abbildung 32: Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse des leukozytären Adhäsionsverhaltens bei SphK1<sup>+/+</sup> SphK2<sup>+/+</sup>, SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> nach Gefäßwanddenudation.**

Der basale Wert steht auch repräsentativ für die Sham behandelte Seite. + = Darstellung der Signifikanz beim Vergleich des jeweiligen Wertes mit dem Basalwert. Die statistische Signifikanz wurde durch den t-test bestimmt (+ =  $p < 0,05$ ; ++ =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; +++ =  $p \leq 0,001$ ), (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der Mausstämmen lässt einen Unterschied der Thrombozytenadhäsion zwischen SphK1-KO und Wildtyp und SphK2-KO zum Zeitpunkt 30 Minuten erkennen. Alle Stämme zeigen einen signifikanten Anstieg der Blutplättchenadhäsion nach 10 Minuten auf, im weiteren Verlauf allerdings bewegen sich die Werte bei den SphK1-KO Tieren auf einen niedrigeren Niveau als bei den beiden anderen Stämmen, welche im akuten Verlauf ähnliche Ergebnisse aufzeigen. 7 Tage nach der Denudation hingegen ist die Zahl wandadhärenter Zellen bei beiden transgenen Mausstämmen beim Vergleich mit dem Wildtyp signifikant erniedrigt.

Bei der Leukozytenadhäsion hingegen ist lediglich zu einem akuten Versuchszeitpunkt, nämlich 30 Minuten, ein Unterschied der SphK1 defizienten Mäuse mit dem Wildtyp erkennbar. Bei allen Gruppen ist der träge Anstieg der Zelladhäsion zu verzeichnen, wobei die Werte der SphK1-KO Tiere zumeist niedriger sind, als die der anderen Stämme.

### 5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit soll das Tiermodell der arteriellen Gefäßwanddenudation mit der darauffolgenden Inflammation und Neointimaformation verifiziert und standardisiert werden. Im Anschluss daran wird die Relevanz der Sphingosinkinasen Typ 1 und 2 im Rahmen der Inflammation und Neointimaformation anhand von Knock out-Stämmen untersucht. Zu diesem Zweck kommen sowohl die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Erforschung des Adhäsionsverhaltens von Thrombozyten und Leukozyten, als auch histologische Untersuchungsverfahren zur Darstellung der Intimahyperplasie zum Einsatz.

#### 5.6.1 Beweis der Denudation und Neointimaformation bei C57Bl6/J-Wildtyp

- a) Die arterielle Denudation mittels eines flexiblen Drahts erzeugt eine vollständige Abtragung der Intima, selten auch Teile der Media und eine Dilatation des Gefäßdurchmessers.
- b) Die Gefäßdenudation führt in den darauffolgenden Wochen im Zuge der Neointimaformation zu einer zunehmenden Intimahyperplasie mit unterschiedlicher Ausprägung im Gefäßverlauf.

#### 5.6.2 Das zelluläre Adhäsionsverhalten nach Denudation der arteriellen Gefäßwand bei C57Bl6/J-Wildtyp

- a) Anhand der Intravitalmikroskopie kann die Abtragung der Intima und die Gefäßaufweitung durch die Denudation bewiesen werden.
- b) Die Adhäsion von Thrombozyten nach der Denudation der Gefäßwand ist schon nach 10 min signifikant hoch zum Basalwert und zeigt sich im Verlauf der akuten Versuchsreihe stark zunehmend (ein Maximum wird nach 50 Minuten erreicht) und nimmt bei der chronischen Versuchsreihe nach 14 Tagen wieder ab.
- c) Die Adhäsion von Leukozyten nach der Denudation der Gefäßwand ist im Verlauf der akuten Versuchsreihe nach 30 Minuten signifikant und danach leicht zunehmend und erreicht ihr Maximum zum Zeitpunkt 1 Woche. Danach ist die Anzahl abfallend.
- d) Somit erfolgt im zeitlichen Verlauf nach der Denudation zuerst die Adhäsion von Thrombozyten (10 min) und erst danach die der Leukozyten (30 min). Beide Zelltypen zeigen nach 14 Tagen keine Gefäßwand-Interaktionen mehr
- e) Die neu entstandenen Endothelzellen beim Wildtyp besitzen eine veränderte längliche Form und Ausrichtung zum Blutfluss, im Vergleich zu den Zellen vor der induzierten Gefäßwandverletzung.

### 5.6.3 Einfluss der Sphingosinkinase 1 und 2 auf die Neointimaformation

- a) Die arterielle Denudation führt sowohl bei SphK1<sup>-/-</sup>, als auch bei SphK2<sup>-/-</sup> im Rahmen der Neointimaformation zu einer Intimahyperplasie.
- b) Das Fehlen der Sphingosinkinase Typ 1 in allen Zellen führt zu einer signifikanten Reduktion der Intimahyperplasie im Vergleich zum Wildtyp. Das Fehlen der Sphingosinkinase Typ 2 in allen Zellen hingegen scheint keinen Einfluss darauf zu haben.

### 5.6.4 Das zelluläre Adhäsionsverhalten nach Denudation der arteriellen Gefäßwand bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup>

- a) Die Adhäsion von Thrombozyten nach der Denudation der Gefäßwand ist bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> schon nach 10 Minuten signifikant hoch zum Basalwert und im Verlauf der akuten Versuchsreihe weiter zunehmend (Maximum bei 50 Minuten). Interessanterweise ist die Thrombozyten-Endothel-Interaktion 7 Tagen nach Verletzung bei SphK2<sup>-/-</sup>-Mäusen noch signifikant hoch im Vergleich zum Basalwert, jedoch bei SphK1<sup>-/-</sup> Tieren nicht mehr.
- b) Die Adhäsion von Leukozyten nach der Denudation der Gefäßwand ist bei SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> im Verlauf der akuten Versuchsreihe zwar moderat zunehmend und erreicht ihr Maximum zum Zeitpunkt 1 Woche. Jedoch war die Leukozyten-Adhäsion zu keinem Zeitpunkt signifikant im Vergleich zum Basalwert.

### 5.6.5 Der Einfluss der Sphingosinkinasen 1 und 2 auf das zelluläre Verhalten nach der Denudation im Vergleich mit Wildtyp

- a) Die SphK1<sup>-/-</sup> Tiere weisen beim Vergleich mit dem Wildtyp im akuten Verlauf (30 Minuten) und nach 7 Tagen eine signifikante Reduktion adhärenter Thrombozyten auf. Während die SphK2<sup>-/-</sup> Tiere erst im chronischen Verlauf, 1 Woche nach Verletzung, eine signifikant erniedrigte TZ-Adhäsion beim Vergleich mit dem Wildtyp aufzeigen.
- b) Während bei der Kontrollgruppe die Leukozyten-Adhäsion schon nach 30 Minuten signifikant zum Basalwert ist, zeigt sich bei den SphK1<sup>-/-</sup> und bei den SphK2<sup>-/-</sup> Tieren nur eine moderate jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikante Interaktion. Dabei weist 30 Minuten nach Verletzung die SphK1<sup>-/-</sup> Gruppe eine signifikante Reduktion der Leukozytenadhäsion an die verletzte Gefäßwand beim Vergleich mit dem Wildtyp auf. Zu den anderen Zeitpunkten ist kein eindeutiger Unterschied bei den unterschiedlichen Mauslinien erkennbar.

### 5.6.6 Schlussfolgerung

Die Denudation der arteriellen Gefäßwand führt zu einer Inflammation mit zunächst steigender Thrombozyten- und später Leukozytenadhäsion. Im Verlauf schwächt sich die Inflammation ab und im Rahmen dessen nimmt auch die Zelladhäsion nach einer Woche wieder ab. Die Zellen von SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> zeigen das gleiche Adhäsionsmuster, allerdings in unterschiedlich stark ausgeprägten Formen, bzw. die Leukozytenadhäsion ist bei diesen Tieren reduziert. So zeigt der nachgewiesene signifikant erniedrigte S1P-Plasmaspiegel bei Sphingosinkinase Typ 1-KO Mäusen einen eindeutigen Einfluss auf die Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion zum Zeitpunkt 1 Woche.

Die Folge der Denudation ist eine Neointimahyperplasie, die im Verlauf des Gefäßes unterschiedlich stark ausfällt. Diese nimmt in den darauffolgenden Wochen zu. SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> zeigen dasselbe Muster der Neointimaformation, allerdings mit unterschiedlichem Ausmaß. Die Sphingosinkinase Typ 1 zeigt einen eindeutigen Einfluss auf die Neointimahyperplasie, was sich in einer Reduktion dessen äußert.

### 6 Diskussion

#### 6.1 Das Tiermodell der Neointimaformation

Trotz großer Fortschritte in der Entwicklung von Strategien zur Senkung der Risiken von Herzerkrankungen, gehören der Myokardinfarkt und weitere ischämische Herzerkrankungen, ausgehend von der Atherosklerose, zu den häufigsten Todesursachen in der industrialisierten Welt.

Erreicht die atherosklerotische Plaque einmal eine Größe, welche zur Behinderung des Blutflusses führt, so sind etablierte Methoden zur Verhinderung des Gefäßverschlusses invasive Eingriffe, wie die perkutane transluminale Koronarangioplastie, Stentimplantation, direkte koronare Atherektomie oder eine koronare Bypassoperation. Eine Folgekomplikation dieser Eingriffe ist die Restenose durch die Neointimahyperplasie, im Zuge des Gefäßremodelings. Um Mittel dagegen ausfindig machen zu können, müssen Methoden zur Untersuchung dieses pathophysiologischen Prozesses entwickelt werden, wie z.B. Modelle an Tieren.

Es existieren unterschiedliche Methoden zur Induzierung der Neointimahyperplasie. Dabei wird der Prozess extra- oder auch intravasal in Gang gesetzt. So beschreiben Carmeliet et al. ein Tiermodell bei dem durch die extravasale Stromabgabe an die A. fem. es zur Intimadenudation mit anschließender Thrombusformation kommt (Carmeliet et al. 1997). Allerdings geht diese Art der Verletzung mit einer starken Nekrose der Media einher, so dass diese Methode als nicht spezifisch genug angesehen werden muss.

Ein weiterer Versuchsaufbau beschreibt den extravasalen Eingriff durch eine temporäre Ligatur der A. carotis (Kumar & Lindner 1997). In diesem Fall kommt es zwar zu einer Neointimaformation, diese wird aber auf die Blutstase zurückgeführt, da es zu keiner Deendothelialisierung kommt. Beide Methoden können allerdings den Wundheilungsprozess nach einer Gefäßintervention nicht wirklich imitieren, da sie extravasal erfolgen.

Zu den am häufigsten benutzten intravasalen Verletzungsmodellen zählt die Denudation der A. carotis. Hierbei erfolgt die Abtragung des Endothels mittels eines flexiblen Drahtes. In der Folge kommt es zu einer Neointimahyperplasie, jedoch fällt diese nicht stark aus und ist zudem aufgrund der punktuellen Verletzung auf eine kleine Fläche beschränkt (Lindner, Fingerle & Reidy 1993).

Diese Forschungsarbeit beschäftigt sich mit dem Mausmodell der Denudation der A. femoralis basierend auf einer Publikation von Sata et al. (Sata et al. 2000). Die Abtragung der Intima und die mechanische Dilatation des Gefäßes mittels eines flexiblen Drahtes, führen zu einer großflächigen Verletzung mit anschließender ausgeprägter Neointimaformation und -hyperplasie. Erweitert wird diese Methode durch die Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie, die der Analyse des zellulären Adhäsionsverhaltens im akuten Fall und im Zuge der chronischen Wundheilung dient. Dieser Versuch erscheint klinisch, da

hierbei eine großflächige Abtragung der Endothelzellschicht, wie sie bei der invasiven Katheteruntersuchung der Koronararterien oder weiterer Gefäße erfolgt, stattfindet.

### **6.2 Etablierung des Tiermodells der Neointimaformation**

Im Folgenden werden Fragestellungen in Hinblick auf die Etablierung des A. fem. Denudationsmodells, was als Grundlage für den weiteren Versuchsaufbau gilt, bearbeitet. Dabei wird zunächst auf die Standardisierung des operativen Eingriffs an sich und der Gefäßwandverletzung, mit der Denudation als Ursache, eingegangen. Danach erfolgt die Bestätigung der Neointimaformation und der –hyperplasie als Folge.

Das Model der Gefäßdenudation der A. fem. wird in einigen Publikationen herangezogen. Der operative Vorgang ist dabei identisch mit dem etablierten Grundmodel von Sata et al., so dass bei dieser Forschungsarbeit ebenfalls nach jenem beschriebenen Muster gearbeitet wird (Sata et al. 2000).

#### Aspekte zum operativen Eingriff

Die A. fem. ist bei der Maus ein oberflächlich verlaufendes Gefäß, was vom großen Vorteil ist. Ein Hautschnitt und eine leichte Gewebepreparation sind ausreichende Vorbereitungen für die anschließende Denudation. Die Schwierigkeit liegt eher in der Präparation des arteriellen Muskelastes, durch den der flexible Draht eingeführt wird. Dabei kann es während der Isolierung zur Schädigung der Gefäßwand, somit zum starken Blutverlust und zur Voraktivierung von Blutplättchen kommen, was eine Fortführung des Versuchs unmöglich macht. In diesem Fall werden die betroffenen Tiere aus der Versuchsreihe ausgeschlossen. Ein erfolgreicher operativer Vorgang und reproduzierbare Ergebnisse sind somit an der Geschicklichkeit des Operateurs gebunden. Allerdings ist dies bei der A. Carotis Denudation ebenfalls der Fall, womit folglich unterschiedlich starke Irritationen am Gefäß unterschiedlich stark ausfallende Ergebnisse präsentieren (Hui 2008).

Ein weiterer Aspekt, der für das Femoralis-Model spricht, ist die Lage des Gefäßes zum Herzen. Durch den weiten Abstand ist die Pulsation des Gefäßes gering, so dass qualitativ gute intravitalmikroskopische Aufnahmen erstellt werden können.

Zur Standardisierung des Modells kommt immer der gleiche Draht zum Einsatz. Zusätzlich müssen die Versuchstiere einigen wichtigen Kriterien, wie dem Alter und dem gleichen Gewicht entsprechen. Jede Versuchsgruppe weist sowohl Männchen, als auch Weibchen auf. Trotz dieser Kriterien weichen einige Gefäßdurchmesser, anatomisch bedingt, vom Durchschnitt ab. Aufgrund dessen stimmt das Verhältnis Draht- und Gefäßdurchmesser nicht immer überein, so dass die Verletzungen der Gefäße unterschiedliche Ausmaße annehmen können. Histologische Beobachtungen zeigen auf, dass eine größere Verletzung meist mit einem stärkeren Wundheilungsprozess und somit mit einer verstärkten Hyperplasie einhergeht. Dies kann bei einigen Versuchen eine starke Streuung der Ergebnisse bedeuten.

In diesem Fall wird der jeweilige Versuch aus der Auswertung genommen und erneut durchgeführt.

### Bestätigung der Denudation mit anschließender Gefäßwandinflammation

Aus der histologischen Untersuchung der akuten Versuchsreihe geht hervor, dass die Denudation eine Zerstörung der antithrombogenen Endothelzellschicht des Gefäßes und einen Abscheidungsthrombus entlang des verletzten Areals induziert. Intravitalmikroskopisch sind nach der Denudation wenige bis keine Endothezellen mehr erkennbar, sondern zirkulär angeordnete glatte Muskelzellen. Dies wird durch andere Modelle bestätigt. Roque et al. zeigen immunhistologisch an Hand eines Mausmodells der Femoralarteriendenudation und der A. epigastrica als Eintrittspforte auf, dass es durch den Einsatz des Drahtes zu einer kompletten Abtragung der Intima kommt (Roque et al. 2000). Linder et al. weisen bei ihrem Carotismodell ebenfalls nur noch wenige endothelialisierte Gefäßareale nach Drahtverletzung auf (Lindner, Fingerle & Reidy 1993).

An der Sham-Seite des Versuchstieres werden keine pathologischen Veränderungen festgestellt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Denudation für die Abtragung der Intima verantwortlich ist und die Ligatur des kleinen Gefäßastes keine Auswirkungen auf das Epithel der A. fem. hat.

Die Denudation der Femoralarterie erfolgt über den gesamten Gefäßverlauf. Die Histologie bestätigt die Abtragung des Endothels meist bis auf die Membrana elastica interna, in einigen Fällen auch Teile der Media, wodurch es zur Entstehung thrombotischen Materials entlang der gesamten verletzten Gefäßwand kommt. Dies ist insofern vorteilhaft, als dass der dadurch induzierte zelluläre Prozess über einen großen Gefäßabschnitt analysiert werden kann. Punktuell gesetzte Verletzungen, wie beim Carotis-Denudationsmodell, weisen lediglich kleine denudierte Areale auf (Lindner, Fingerle & Reidy 1993). Sind diese zu klein oder entsteht an der Stelle ein okkludierender Thrombus, so können sie nicht ausgewertet werden (Sata et al. 2000). Ein weiterer Aspekt, der für das Denudationsmodell der A. fem. spricht.

Durch die histologische Analyse der Schnitte wird ein weiterer Aspekt aufgedeckt, nämlich das Problem der ungewollt gesetzten Dissektion mittels Draht. Diese Art der Verletzung ist bei einigen Versuchstieren zu beobachten, und zwar immer an der Einmündungsstelle des Muskelastes in die A. fem., womit davon ausgegangen werden kann, dass die Spitze des Drahtes sich in die gegenüberliegende Wand reinbohrt. Dies zeigt auf, dass trotz der Flexibilität des Drahtes nicht immer die gezielte und gewünschte Art der Verletzung erfolgt. Histologisch kann allerdings aufgezeigt werden, dass der Draht weiter proximal wieder ins ursprüngliche Lumen zurückkehrt, womit die Denudation proximal der Einmündungsstelle erfolgreich stattfindet. Bisher wurde diese Problematik von keiner anderen Publikation, welche das Denudationsmodell der Femoralarterie als Arbeitsgrundlage hat, aufgegriffen. Entweder ist dieses Problem nie aufgetreten oder man hat die histologische Analyse des Gefäßes weiter proximal begonnen und somit die Dissektion übersehen.

Zur Standardisierung und aufgrund der Problematik der nicht „reinen“ Denudation muss hier das im Kapitel 4.3.2 erwähnte Normverfahren zur Ausmessung der Neointima erfolgen, wobei die dissektierten Areale ausgeschlossen werden. Die Neointimahyperplasie der denudierten und nicht „rein“ denudierten Gefäße unterscheiden sich bei der Analyse der Ergebnisse nicht, so dass die Problematik der Dissektion als nichtig angesehen werden kann, sofern diese nur im distalen Bereich und nicht im Bereich der Neointimahyperplasie vorliegt und nicht in die Auswertung miteinfließt.

### Verifizierung der Neointimahyperplasie im Zuge des Remodelings

Nach Gefäßwandverletzungen und der Bildung thrombotischer Komplexe folgt das Gefäßremodeling. Pathophysiologisch kommt es vor allem durch die zusätzliche Aktivität von Leukozyten zu einer Neuordnung des Thrombus und im Zuge dessen zu einer Neointimaformation mit kompletter Reendothelialisierung. Allerdings spielt auch die zelluläre Gefäßwandreaktion eine wichtige Rolle. Im Zuge der Ausschüttung verschiedener Faktoren und der damit eingeleiteten Chemotaxis, erfolgt in der Adventitia die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten mit anschließender Proliferation und Einwanderung in das verletzte Areal (Shi et al. 1996a; Sartore et al. 2001a). Auch in der Media vermehren sich die Myozyten und wandern in die verletzte Intima ein. Zusätzlich kommt es vom Blut her zu einer Anlagerung von epithelialen Progenitorzellen (Zargham 2008). Dieser Prozess führt in manchen Fällen zu einer Intimahyperplasie.

Der Wundheilungsprozess nach der Denudation der Gefäßwand kann bis zu einigen Wochen andauern. Sata et al. verwenden in ihrem Model zur Analyse der Neointimaformation die Zeitpunkte 1., 3. Tag und 1., 2., 3., 4. und 14. Woche nach der Denudation. Eine erstmalig sichtbare Hyperplasie ist erst nach 1 Woche wahrnehmbar (Sata et al. 2000). Roque et al. wiederum, welche sich ebenfalls auf das Denudationsmodell beziehen, bestimmen die Neointima nach 1, 24 Stunden und 1, 2 und 4 Wochen. Auch hier wird die Hyperplasie erst nach 1 Woche festgestellt (Roque et al. 2000). Aufgrund dessen werden in dieser Forschungsarbeit die Versuchsorgane zu den Zeitpunkten 50 Minuten und 7, 14, 21 und 28 Tage nach erfolgter Denudation untersucht. Der Zeitpunkt 50 Minuten dient der Denudationsbestätigung und ist für die IVM von größerer Bedeutung.

Die chronischen Untersuchungszeitpunkte scheinen für die Analysen gut gewählt zu sein. Die histologische Auswertung zeigt eine deutliche Neointimahyperplasie bei allen Versuchstieren zu den Zeitpunkten 7, 14, 21 und 28 Tagen.

Die Sham behandelte Seite hingegen weist keinerlei Verdickung der Intima auf, so dass die Denudation als Ursache für die Entstehung der Intimahyperplasie angesehen werden kann.

Die histomorphometrische Ausmessung der Neointima zu den Zeitpunkten 7 und 14 Tage zeigt eine im Verlauf zunehmende Tendenz der Intimaverdickung auf. Diese Entwicklung ist nicht nur beim Femoralismodell feststellbar, sondern auch nach der A. Carotis Denudation (Sata et al. 2000; Roque et al. 2000; Lindner, Fingerle & Reidy 1993).

Gerade in den ersten Wochen werden hier die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Reorganisation und die Umformung vom Thrombus zur Neointima gut aufgezeigt, was durch

Sata et al. ebenfalls bestätigt wird (Sata et al. 2000). Eine zelluläre Veränderung ist bereits nach 7 Tagen zu erkennen, so dass nicht mehr vom thrombotischen Material, sondern schon von einer Reorganisation, also von einer Neointima gesprochen werden muss. Die intravitalmikroskopischen Ergebnisse bestätigen die histologischen. So sind nach 7 Tage mit Leukozyten durchsetzte Areale zu erkennen, welche an dem Prozess beteiligt sind. Hinzu kommt eine weitere interessante Erkenntnis, nämlich eine unregelmäßige Reendothelialisierung der verletzten Gefäßabschnitte ebenfalls nach 1 Woche. Zumeist liegt bereits schon nach 21 Tagen eine komplett abdeckende Endothelschicht vor. Dies steht im Einklang mit anderen Arbeiten. So beschreiben Roque et al. eine einsetzende Reendothelialisierung nach bereits 24 Stunden, die nach 4 Wochen größten Teils abgeschlossen ist (Roque et al. 2000). Auch Sata et al. berichten von einer komplett erneuerten Endothelschicht nach 28 Tagen (Sata et al. 2000).

Hieraus wird eine Schwierigkeit des Modells erkennbar, nämlich die der Ergebnisanalyse, da gewisse pathophysiologische Prozesse ineinander übergehen. Zwar kann eine Differenzierung zwischen Neointima und einem Thrombus in einem frühen Stadium histologisch bewiesen werden, aber eine absolute Gewissheit wird erst durch die Immunhistologie erlangt, z.B. durch die Differenzierung von Endothel und Fibrin.

Die Analyse der histologischen Schnitte zur Verifizierung der Neointimahyperplasie, legen einige Schwierigkeiten zur Durchführung der Auswertung offen. So zeigen Untersuchungen der chronischen Versuchsreihen in der Regel einen Thrombus immer an der gleichen Stelle des Gefäßes auf. Nämlich an der Bifurkation der Femoralarterie und des arteriellen Muskelastes. Zwar kann histologisch selten ein durchgängiges Lumen beobachtet werden, jedoch weist man mit der Hilfe intravitalmikroskopischer Untersuchungen einen regelmäßigen und gutausgeprägten Blutfluss an der besagten Stelle nach und kann somit einen okkludierenden Thrombus ausschließen. Auch in anderen Publikationen wird von dem Vorhandensein von Thrombi gesprochen, jedoch machen diese einen geringen Prozentualen Anteil aus (5-6%) (Sata et al. 2000). Hier allerdings liegt in ca. 80% der Fälle ein Thrombus vor. Es bleibt zu überlegen, warum andere Veröffentlichungen eine so geringe Anzahl an Thrombi festgestellt haben, zumal deren Lokalisation auch nicht angegeben wird.

Dieser Thrombus ist insofern von Interesse, als dass er der Grund, oder das Resultat einer weiteren Beobachtung sein kann, nämlich der nicht konstant ausgeprägten Neointima.

Bei der histologischen Betrachtung des Gefäßverlaufs kann eine Unregelmäßigkeit des Wundheilungsprozesses festgestellt werden. Im Zuge des Gefäßremodelings, fällt die Neointimahyperplasie distal, also in der Nähe der Eintrittspforte, stärker aus und nimmt im proximalen Verlauf ab. Das spricht allerdings gegen die Ergebnisse von Sata et al, die bei allen Versuchstieren von einer gleichmäßigen Neointima berichten (Sata et al. 2000). Die Tiere in dieser Versuchsreihe sind mit 10 bis 16 Wochen jünger als bei Sata et al (16 und 20 Wochen) was somit dafür sprechen könnte, dass die älteren Tiere einen größeren Gefäßdurchmesser aufweisen und somit die Verletzung durch den Draht geringer ausfiel. Mäuse sind mit 12 Wochen in der Regel ausgewachsen und Gefäß- oder auch Knochenwachstum sind somit abgeschlossen. Die Versuchstiere dieser Arbeit haben in ein Durchschnittsalter von 14 Wochen und 3 Tage und sind somit als ausgewachsen anzusehen.

Daher kann die unterschiedliche Wahl des Alters-Intervalls nicht als Argument des beschriebenen Phänomens der unregelmäßigen Neointima herangeführt werden.

Bei der Betrachtung der histologischen Bilder der akuten und chronischen Versuchsreihe sind an der Einmündungsstelle des Drahtes in die A. fem. meist kleine bis größere Gefäßschäden, wie ein Teilabriss der M. e. i. bis hin zur Entfernung von einigen Bereichen der Media oder Dissektionen zu erkennen. Der größte Anteil des weiteren Gefäßverlaufs aber legt eine klassische Intimadenudation dar. So kann diese distale Wandverletzung zur Entstehung des bereits erwähnten Thrombus führen. Durch die Veränderung der Hämodynamik und dem Aufstau des Blutes kann es somit zu einem Abscheidungsthrombus kommen, welcher zum proximalen Verlauf hin abnimmt. Ein Grund für die später unregelmäßig ausgeprägte Neointimaformation.

Einige Versuchstiere ohne Abriss der M. e. i. weisen allerdings die gleiche Ausprägung der Wundheilung im Gefäßverlauf auf. Somit kämen zwei weitere Gründe in Betracht. Einerseits kann der Thrombus das Resultat des nach distal hin anwachsenden Abscheidungsthrombus sein. Andererseits könnte er, wie bereits erwähnt, aus dem seitlichen Muskelast, welcher Blind endet, stammen und nach proximal hin zur Aufstauung des Blutes führen.

Im gesamten Gefäßverlauf ist im Zuge der Wundheilung das Gefäßremodeling gut zu erkennen. Jedoch sind für diese Arbeit speziell die Areale der Neointimaformation von Bedeutung. Diese liegen, wie gerade dargelegt unregelmäßig vor. Auch eine größere Erfahrung und die mit ihr eingehende Geschicklichkeit des Operateurs, verändern dieses Wundheilungsmuster nicht.

Aufgrund dieser Problematik muss eigens für die morphometrische Auswertung ein spezielles Normierungsverfahren entwickelt werden, das im Kapitel 4.3.2 beschrieben ist. Dieses bietet die Möglichkeit thrombotische oder dissektierte Areale aus der Auswertung auszuschließen und nur reine Neointimaformation miteinzubeziehen. Dadurch weisen die Ergebnisse einheitliche Werte auf.

Diese Ergebnisse beweisen deutlich, dass die beschriebene Denudation der A. fem. mit einem flexiblen Draht zu der Abtragung der Intima und in einigen Fällen auch Teilen der Media führt. Der dadurch initiierte Wundheilungsprozess mündet in eine Neointimahyperplasie, die im zeitlichen Verlauf zunehmend zu sein scheint. Durch die Ausmessung der Neointima ist eine Standardisierung des Modells erfolgt, so dass im Anschluss weitere Versuche zur Untersuchung der Inflammation erfolgen können.

### **6.3 Zelluläres Verhalten im Prozess der Inflammation nach der Verletzung der arteriellen Gefäßwand**

#### Analyse des Thrombozytenadhäsionsverhaltens im akuten und chronischen Verlauf

Mit der Denudation der arteriellen Gefäßwand soll eine Verletzung der Intima induziert werden. Diesen Prozess gilt es bei dieser Versuchsreihe auf zellulärer Ebene zu analysieren.

In den bisherigen Veröffentlichungen wird von einer Inflammation berichtet, die zu einer Akkumulation von Thrombozyten und Leukozyten im denudierten Areal führt (Roque et al. 2000; Osaka et al. 2007). Bisher wurde nur das leukozytäre Adhäsionsverhalten intravitalmikroskopisch nach der Denudation der A. fem. untersucht. Zudem bezifferte sich der früheste Untersuchungszeitpunkt auf 4 Stunden nach Intimaverletzung (Osaka et al. 2007). Die Analyse des Adhäsionsverhaltens von Thrombozyten erfolgte bisher nur immunhistologisch, und zwar erst nach einer Stunde. Intravitalmikroskopische Aufnahmen existieren nur zur Untersuchung nach Denudation der A. Carotis (Massberg et al. 2002).

Durch diese Forschungsarbeit werden erstmalig sowohl Thrombozyten, als auch Leukozyten auf ihr Adhäsionsverhalten nach der Denudation der A. fem. mit Hilfe der Fluoreszenzdoppelfärbung intravitalmikroskopisch untersucht. Als weitere Neuheit kann die Untersuchung der akuten Phase nach der Denudation, nämlich der Zeitraum von der Denudation bis 50 Minuten, angesehen werden, um den initialen Prozess der Inflammation zu analysieren.

Unmittelbar nach der Denudation der Arterie ist ein signifikanter Anstieg adhärenter Thrombozyten festzustellen. Auch die darauf folgenden Zeitpunkte zeigen eine vermehrte Adhäsion auf, wobei eine steigende Tendenz zu erkennen ist. Roque et al., wie auch Osaka können eine vermehrte Thrombozytenadhäsion nach 1 bzw. 4 Stunden immunhistologisch nachweisen (Roque et al. 2000; Osaka et al. 2007). Dieses thrombozytäre Verhalten lässt sich erwartungsgemäß deuten. Die Zerstörung der antithrombogen wirkenden Endothelschicht führt zur Aktivierung der primären sowie sekundären Hämostase, mit dem Ergebnis eines Abscheidungsthrombus. Die Thrombozyten adhärieren an die subendotheliale Matrix und schütten verschiedene Granula aus, wodurch sie ihrerseits erneut weitere Thrombozyten anlocken und aktivieren (Gawaz 1999).

Dementsprechend ist die Zahl adhärenter Zellen im Verlauf zunehmend. Zwar liegt zum Zeitpunkt 50 Minuten die höchste Anzahl adhärenter Thrombozyten vor, doch die Fläche scheint in den intravitalmikroskopischen Aufnahmebildern nicht komplett abgedeckt zu sein. Hierbei muss aber vergegenwärtigt werden, dass nur 10% der Gesamtanzahl der im Blutkreislauf vorhandenen Blutplättchen visualisiert werden und somit die tatsächliche Zahl der Adhärenz weitaus höher liegt. Die Signifikanz zwischen den Zeitpunkten 10 und 30 Minuten verdeutlicht diesen Prozess und kann als das Anwachsen des Thrombus interpretiert werden.

Das Sham behandelte Gefäß weist keinerlei pathologisch veränderte Anzahl adhärenter Thrombozyten auf, so dass die Denudation als Ursache für die Verhaltensveränderung von Blutplättchen herangezogen werden kann.

Um das Verhalten der Zellen im Zuge der Neointimaformation ebenfalls analysieren zu können, werden 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Denudation ebenfalls intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wird ein signifikanter Abfall adhärenter Zellen zwischen den Zeitpunkten 50 Minuten und 7 Tagen erkennbar. Auch bei 14, 21 und 28 Tagen ist die Anzahl weiterhin sinkend.

Diese Entwicklung kann unterschiedliche Gründe besitzen.

Zum einen ist der Gegenmechanismus der Gerinnung, die Fibrinolyse, aktiv. In der Regel laufen die Prozesse der Gerinnung und der Lyse ständig und gleich stark im Blutgefäß ab. Bei Verletzungen gewinnen die prim. und sek. Hämostase überhand. Im Anschluss wird die Fibrinolyse stärker. Die Faktoren und Granulainhaltsstoffe, welche durch die induzierte Denudation akut freigesetzt wurden, sind nach 7 Tagen verbraucht oder durch die Lyse abgebaut. Dadurch wird die Funktion der Thrombozyten eingedämmt (Dörner 2006).

Zum anderen ist die subendotheliale Matrix im Bereich des Gefäßschadens, welche für die Gerinnung mitverantwortlich ist und an welche die Thrombozyten initial adhären, nach einer Woche zum größten Teil mit Zellen abgedeckt. Abgedeckt ist sie durch unterschiedliche Zellen, wie Endothezellen und bereits schon davor aktivierte Blutplättchen, welche mauseigen und nicht angefärbt sind und somit der fluoreszenzbasierenden Analyse entgehen (Roque et al. 2000). Bisher konnte der Prozess der Intimaregeneration bereits schon nach 24 Stunden beobachtet werden. Nach einer Woche waren bereits 28% des verletzten Areals reendothelialisiert (Roque et al. 2000). Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die Analyse der mikroskopischen Aufnahmen dieser Versuchsreihen. In den meisten Gefäßanteilen ist eine Teilreendothelialisierung der verletzten Gefäßwand bereits schon nach 7 Tagen erkennbar. Diese ist im Verlauf zunehmend, so dass nach 28 Tagen eine beinahe lückenlose Endothelabdeckung vorliegt. Der signifikante Abfall adhärenter Zellen in der chronischen Versuchsreihe ist daher ebenfalls auf das Aufkommen der Endothelzellen zurückzuführen. Ausgeheilte Intimaregionen weisen in der IVM keine bis kaum Thrombozytenadhäsionen auf. Zwar ist die Anzahl der neuen Endothelzellen nach 1 Woche noch vergleichsweise niedrig, jedoch ausreichen, um der Aktivierung von Thrombozyten, vor allem durch die Produktion von NO, entgegenzuwirken. Im Verlauf nimmt deren Zahl zu, so dass nach 28 Tagen fast keine Thrombozytenadhäsion mehr festgestellt werden kann.

Auch im chronischen Verlauf sind im Sham-operiertem Gefäß keine vermehrten Adhäsionen von Blutplättchen zu erkennen. Somit kann die Denudation ebenfalls als die Ursache für den chronischen Wundheilungsprozess angesehen werden.

### Analyse des Leukozytenadhäsionsverhaltens im akuten und chronischen Verlauf

Wie bereits beschrieben kommt es durch die Denudation zu einer Gefäßwandinflammation. Die durch die Chemotaxis angelockten Leukozyten interagieren mit bereits aktivierten und an die subendotheliale Matrix haftenden Thrombozyten oder Leukozyten, um an die verletzte Gefäßwand adhären zu können (Lindemann et al. 2007).

Die mikroskopischen Analysen der akuten Versuchsreihen vom Zeitpunkt 0 bis 50 Minuten lassen einen kontinuierlichen Anstieg der Leukozytenadhäsion an die denudierte Gefäßwand erkennen. Die sham-behandelte Seite hingegen weist keine vermehrte Adhäsion der Zellen auf. Diese Beobachtung des langsamen Anstiegs innerhalb der akuten Inflammationsphase bei diesem Tiermodell durch die IVM ist neu. Allerdings können Roque et al. histologisch bereits nach 1 Stunde eine vermehrte Anzahl adhärenter Leukozyten an der denudierten Gefäßwand feststellen. Immunhistologisch kann zusätzlich aufgezeigt werden, dass diese Interaktion mit aktivierten und an der Gefäßwand adhären den Thrombozyten stattfindet

(Roque et al. 2000). Eine intravitalmikroskopische Beobachtung erfolgt durch Osaka et al. (Osaka et al. 2007). Hierbei wird eine hohe Anzahl an Leukozyten nach 4 Stunden festgestellt. Beide Arbeiten identifizierten die Leukozyten als neutrophile Granulozyten und auch diese Forschungsarbeit bestätigt dies histologisch.

Die Leukozyten beginnen zunächst mit der Abtragung der Gewebsfragmente und im Verlauf mit der Thrombusreorganisation (Zargham 2008). Die Zellen ihrerseits führen zu einem vermehrten Anlocken Gleichartiger, so dass es im Zuge der Inflammation zu einer sehr hohen Anzahl adhärenter Leukozyten im Bereich der verletzten Gefäßwand kommt.

Die Ergebnisse zeigen somit auf, dass die Leukozyten mit einer, im Vergleich zu Thrombozyten, verzögerten Tendenz zur Adhäsion auf die Verletzung der Gefäßwand reagieren.

Dies kann auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass von der Freisetzung der Lockstoffe bis hin zum Ergebnis der Chemotaxis, nämlich der Leukozytenadhäsion und -migration in das verletzte Areal eine gewisse Zeit benötigt wird (Riede, Werner & Schaefer 2004). Roque et al. weisen die für die Interaktion der Leukozytenrezeptoren mit der denudierten Fläche wichtigen Moleküle P-Selectin, PECAM-1, ICAM-1 und VCAM-1 nach einer Stunde an der verletzten Gefäßwand nach. Dies war assoziiert mit der frühen Akkumulation der Leukozyten im denudierten Bereich (Roque et al. 2000). Gerade P-Selektin ist für die Förderung der Thrombozyten-Leukozyten Interaktion von Bedeutung. Für die Expression von ICAM-1 benötigen neutrophile Granulozyten zur Adhäsion an die verbliebenen Endothelzellen ca. 45 Minuten (Riede, Werner & Schaefer 2004).

Außerdem befindet sich die Mehrheit der Leukozyten im venösen System und nur eine im Vergleich zu den Thrombozyten geringere Anzahl fließt mit dem Blut und ist somit sofort einsatzbereit.

Zusätzlich ist zu beachten, dass die Leukozyten Blutplättchen für die Adhäsion an die subendotheliale Matrix benötigen (Larsen et al. 1989; Moore et al. 1992). Somit muss zunächst eine ausreichend große Fläche von aktivierten und P-Selektin präsentierenden Thrombozyten bedeckt sein, damit es zu einer wahrnehmbaren Zunahme der Leukozytenadhäsion mit der Hilfe von PSGL-1 kommen kann (Larsen et al. 1989; Moore et al. 1992). Sind ausreichend Leukozyten adhärent, so können weitere mit ihnen über den L-Selektin-PSGL-1 Rezeptorenkontakt weitere Bindungen eingehen (Sperandio et al. 2003).

Die Ergebnisse der chronischen Versuchsreihe zeigen den Hochpunkt der Anzahl adhärenter Leukozyten zum Zeitpunkt 7 Tage nach der Denudation auf. Im weiteren Verlauf ist die Zahl fallend und erreicht ihr Minimum nach 4 Wochen. Beim Sham behandelten Gefäß ist intravitalmikroskopisch keine vermehrte Adhäsion der Zellen ersichtlich, was wiederum dafür spricht, dass die Denudation für die Induzierung der Inflammation verantwortlich ist.

Nach Denudation beginnt der Prozess der Chemotaxis verzögert und gewinnt langsam an Kraft. Das höchste Ausmaß scheint, nach der vorhandenen Datenlage, nach 7 Tagen erreicht zu sein. Dabei ist die Anzahl haftender Leukozyten mit den Ergebnissen von Osaka et al. identisch. Allerdings zeigen sie mit den Untersuchungszeitpunkten 4, 24 und 72 Stunden nach Denudation eine zusätzliche Entwicklung auf. Die hohe Anzahl adhärenter Leukozyten, nach 4 Stunden beobachtet, sinkt kontinuierlich auf ein Minimum zum Zeitpunkt 72

Stunden, um erneut auf eine hohe Zahl nach 7 Tagen zu steigen (Osaka et al. 2007). Roque et al. berichten ebenfalls von einem Absinken der Leukozytenzahl nach 24 Stunden (Roque et al. 2000). Die Zusammensetzung der genannten Ergebnisse mit denen dieser Forschungsarbeit zeigen folgendes Leukozytenverhalten nach Denudation auf. Die Tendenz zur Adhäsion im Zeitraum von einer Stunde steigt verzögert an, erreicht, nach bisheriger Datenlage, ihr Maximum nach 4 Stunden, um dann erneut abzusinken. Vom Zeitpunkt 72 Stunden steigt sie erneut an und erreicht den zweiten Hochpunkt nach 1 Woche. Mit der voranschreitenden Wundheilung im Zuge der Neointimaformation der Gefäßwand sinkt das Ausmaß der Chemotaxis und mit ihr die Anzahl adhärenter Leukozyten, so dass nach 4 Wochen ein Minimum an adhärenenten Leukozyten beobachtet werden kann.

Die Erstinvasion erfolgt durch neutrophile Granulozyten. Die Anzahl der Makrophagen steigt erst zum Zeitpunkt 72 Stunden an (Roque et al. 2000; Osaka et al. 2007). Der Zeitpunkt 72 Stunden kann als eine Art Wachwechsel zwischen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen verstanden werden.

Die Zeitpunkte für die Untersuchungen scheinen in dieser Forschungsarbeit gut gewählt zu sein. Erstmals erfolgt bei diesem Tiermodell die intravitalmikroskopische Untersuchung des akuten Inflammationsprozesses zu so frühen Zeitpunkten, wie 10, 30 und 50 Minuten. Die weiteren mit 7, 14, 21 und 28 Tagen sind ebenfalls neu, da bisher lediglich durch Osaka et al. der Zeitraum von 4 Stunden bis 7 Tagen durch die IVM untersucht ist. Die gewonnenen Ergebnisse verschaffen einen guten Überblick über das zelluläre Verhalten der Thrombozyten und Leukozyten bei der gesamte Inflammationsentwicklung und Neointimaformation. Allerdings liefert der Zeitpunkt 28 Tage keine zusätzlich interessanten Informationen, so dass auf diesen, im Zuge weiterer Projekte, verzichtet werden könnte. Die intravitalmikroskopische Untersuchung zeigt auf, dass der Zeitraum zwischen 50 Minuten und 7 Tagen ein höchst wichtiger für die Verhaltensänderung der Zellen zu sein scheint – ein signifikanter Abfall der Thrombozytenadhäsion und eine signifikante Zunahme der Leukozytenadhäsion. Daher wäre es vom Interesse zur Untersuchung des thrombozytären Adhäsionsverhaltens den Untersuchungszeitpunkt 3. Tag einzubringen, da, wie bereits erwähnt, das leukozytäre Verhalten bereits bekannt ist.

Bei der Betrachtung der IVM geht folgendes hervor. Bei allen denudierten Gefäßen sind zum Zeitpunkt 1 Woche eine sehr hohe Konzentration adhärenter Leukozyten und eine hohe Anzahl von Thrombozyten im distalen Gefäßabschnitt zu erkennen. Im mittleren Bereich der Arterie verringert sich deren Anzahl, so dass im proximalen Bereich, nahe der A. iliaca, nur noch vereinzelt Zellen zu beobachten sind. Die Reendothelialisierung weist den umgekehrten Verlauf auf. Proximal ist die Intima beinahe komplett ausgeheilt, wohingegen distal vereinzelt Endothelzellen zu erkennen sind. Wird der Verlauf der Hyperplasie zusätzlich herangezogen, wird folgender Zusammenhang ersichtlich. Areale mit starker Inflammation gehen mit ausgeprägter Hyperplasie und wenigen Endothelzellen einher. Wohingegen umgekehrt eine geringe Inflammation mit einer geringen Hyperplasie und ausgeprägtes Endothelwachstum zusammengeht. Dies stimmt mit der Arbeit von Tanguay et al. überein, wonach sie den Zusammenhang zwischen chronischer Adhäsion von Leukozyten

und Thrombozyten und der Stärke der Instent-Restenose in einem Model am Schwein nachweisen konnten (Tanguay et al. 2003).

Der Wundheilungsprozess führt ebenfalls zu weiteren Phänomenen des Remodelings. So sind im Gefäßverlauf in einigen Fällen Einschnürungen zu erkennen, die auf die Akkumulation kontraktile Elemente, wie SM  $\alpha$ -actin,  $\alpha$ 8-Integrin, Kollagen und Fibronectin zurückgeführt werden könnten (kontraktiler Remodeling) (Zargham, Pepin & Thibault 2007). Somit kommt es im Zuge der unterschiedlich stark geprägten Einengungen des Lumens, zur Veränderung der Hämodynamik und Flussgeschwindigkeit innerhalb des Gefäßes und somit auch zu einer Verhaltensveränderung der Zellen. Proximal und distal der Einengungen sind dichte Endothelbewachungen und eine hohe Anzahl rollender Leukozyten zu beobachten. Das eingeeengte Areal hingegen zeigt hauptsächlich glatte Muskelzellen und kaum adhärenente Endothelzellen auf. Es sind selten rollende und adhärenente Leukozyten zu beobachten, aber dafür viele adhärenente Thrombozyten. Dies spricht für die These, dass Thrombozyten bei erhöhter Flussgeschwindigkeit und der damit verbundenen erhöhten Scherkraft eine erhöhte Tendenz zur Gefäßwandadhärenz besitzen (Jabbar et al. 2006). Allerdings scheinen diese Konditionen im verengten Abschnitt für die Leukozyten nicht optimal zu sein. Die Flussgeschwindigkeit scheint außerhalb des Intervalls zu liegen, indem das höchste Maß an Leukozytenrollen, durch L-Selektin vermittelt, zu beobachten ist (Yago et al. 2004). Was das Ausbleiben des Leukozytenrollens in diesen Regionen erklärt. Es bleibt die Frage zu klären, ob es für die Endothelzellen ebenfalls problematisch ist, in dem verletzten Areal unter den genannten Bedingungen eine ausreichend starke Adhärenz aufzubauen. Die beschriebenen Beobachtungen liegen schon nach 1 Woche vor, werden allerdings im Verlauf aufgrund der Reendothelialisierung seltener.

Aus den bisherigen gewonnen Erkenntnissen dieser Arbeit wird folgendes ersichtlich.

Die Gefäßwanddenudation der A. fem. ist ein Tiermodell, mit dem es möglich erscheint, eine Inflammation über den gesamten Gefäßverlauf hin zu induzieren. Ein Vorteil gegenüber Modellen mit kleinen Verletzungsflächen. Da der Operationsvorgang an der Geschicklichkeit und Erfahrung des Operateurs gebunden ist, kann es zu unterschiedlich stark ausgeprägten Verletzungen und somit zu unterschiedlich starken Wundheilungsreaktionen kommen. Daher ist viel Übung notwendig, um eine gute Standardisierung erreichen zu können. Entlang der Wand ist immer eine Neointimaformation erkennbar. Zusätzlich sind einige Gefäßabschnitte charakterisiert durch konstriktives Remodeling. Die Neointimahyperplasie kann morphometrisch standardisiert werden, wenn es auch, aufgrund der genannten Problematik zu starken Abweichungen kommen kann.

Andere Modelle, mit geringerem Verletzungsausmaß, wie die Carotisligatur oder Carotisclapping scheinen weniger kompliziert zu sein, besitzen allerdings nicht die Spezifität dieses Modells. Durch eine geschickte Wahl der Untersuchungszeitpunkte ist es möglich das Adhäsionsverhalten der zwei Zelllinien Thrombozyten und Leukozyten sowohl im akuten, als auch chronischen Verlauf zu erkennen und zu quantifizieren. Zwar gibt es Arbeiten, welche die IVM als Untersuchungsgrundlage zur Analyse der Inflammation verwenden, jedoch handelt es sich zumeist um kleine Gefäße mit dünner Wand und somit mit einer guten

Einsicht ins Gefäßlumen, wie der A. mesenterica oder postcapilärer Venen (Nabah et al. 2005; Stokes et al. 2001). Große Gefäße, wie die A. carotis oder A. fem., weisen andere Konditionen auf, wie z.B. die höhere Scherkraft, welche an der Gefäßwand durch den oszillierenden Blutfluss ausgelöst wird. Osaka et al. haben die Femoralarterie intravitalmikroskopisch nach einer Denudation untersucht. Allerdings handelte es sich um eine Einfachfärbung der Leukozyten und nach zwei Wochen war die Bildqualität aufgrund der Wandverdickung nicht mehr möglich (Osaka et al. 2007). In dieser Arbeit hingegen können durch die Doppelfärbung Muskelzellen, Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen über den Verlauf von drei bis vier Wochen hin qualitativ gut dargestellt und untersucht werden.

Aufgrund dessen kann man dieses Arbeitsmodell als gute, aber auch schwierige Methode, zur Imitation invasiver Eingriffe ansehen. Die Implantation eines Stents oder eine PTCA führen von der thrombotischen Phase, über die Rekrutierungsphase zur proliferativen Phase, welche zu einer Hyperplasie der neuentstandenen Intima führen kann. Prozesse, welche auch die Ergebnisse dieser Arbeit darlegen. Daher kann dieses Modell für die weitere Untersuchung der Neointimaformation an gendefizienten Mauslinien herangeführt werden.

### **6.4 Die Rolle von SphK1 und SphK2 für die Neointimaproliferation nach Verletzung der arteriellen Gefäßwand**

Für den Prozess der Neointimaformation und gerade auch der Neointimahyperplasie wird S1P eine wichtige Rolle zugesprochen. So beeinflusst der Lipidmediator das Verhalten der Endothelzellen im Zuge der Angiogenese. Es potenziert die Wirkung der Faktoren VEGF (Vascular endothelial growth factor) und FGF-2 (Fibroblast growth factor) (Lee et al. 1999). Außerdem hat es Einfluss auf die Zellmigration und Zelladhäsion. Auch die für den Wundheilungsprozess wichtigen Myozyten werden von S1P mitgesteuert. So sorgt das spezielle Expressionsmuster der Rezeptoren S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>3</sub> für die vermehrte Proliferation, Migration und Chemotaxis der Zellen aus der Media in die verletzte Gefäßwand (Kluk & Hla 2001; Baudhuin et al. 2004).

Durch das Ausschalten der Sphingosinkinasen 1 oder 2, die für die S1P-Synthese zuständig sind, erhofft man sich, den Prozess der Neointimahyperplasie beeinflussen zu können. Bisher ist aufgezeigt, dass das Ausknocken von SphK-1 zwar keine phänotypischen Veränderungen zur Folge hat, dass allerdings die S1P Konzentration im lymphatischen System um 90% und im Blutplasma um 50% reduziert sind (Allende et al. 2004). Das Ausschalten der SphK-2 hingegen führt zu einer Erhöhung der S1P-Plasmakonzentration im Vergleich zum Wildtyp (Olivera et al. 2007; Sensken et al. 2010).

Bei dieser Versuchsreihe erfolgt der Vergleich der Neointimahyperplasie des C57Bl6/J mit den SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup>-Mausstämmen zum Zeitpunkt 7 Tage nach der Denudation. Die Ergebnisse weisen auf einen signifikanten Unterschied der Hyperplasie im Vergleich zum Kontrollstamm hin, wenn die SphK-1 ausgeknockt ist. Am Sham-OP behandeltem Gefäß hingegen sind keinerlei pathologischen Verdickungen der Wand erkennbar. Die Denudation

kann als Ursache für die Hyperplasie der Intima angesehen werden. Es ist bekannt, dass die noch verbliebene Sphingosinkinase 2 ausreichend S1P produzieren und zusätzlich der Abbau des Lipidmediators gedrosselt werden kann. Dadurch wird eine ausreichende Konzentration von S1P aufrechterhalten, um die Lebensfähigkeit des Tieres zu garantieren (Allende et al. 2004; Kharel et al. 2005b). Das Ausschalten der SphK1 und die verminderte S1P-Plasmakonzentration scheinen einen Einfluss auf das Verhalten der Zellen zu haben, die an dem Wundheilungsprozess beteiligt sind. Welche Art der Zellen im Zuge der Neointimaformation nun davon beeinflusst sind, könnten durch die Immunhistologie und *in vitro* Versuche beantwortet werden. Die genaue lichtmikroskopische Untersuchung der histologischen Schnitte lässt allerdings eine geringere Zelldichte der Neointimaformation bei den SphK1-KO Tieren erkennen. Eventuell könnte auch die geringer ausfallende Inflammation wie sie bei den SphK1-KO Mäusen durch die IVM aufgezeigt wird, eine wichtige Rolle spielen. So ist das Ausmaß der Chemotaxis für die Gewebszellen wahrscheinlich geringer, wenn weniger Thrombozyten und Leukozyten aktiviert werden.

Die SphK2-KO Mauslinie zeigt das größte Ausmaß an Neointimahyperplasie auf. Allerdings ist aufgrund der starken Standardabweichung kein Unterschied zu den anderen Mausstämmen erkennbar. Die Sham-OP behandelte Seite weist keinerlei Veränderungen der Gefäßwand auf. Was wiederum dafür spricht, dass die Denudation für die Neointimaformation und deren Ausmaß verantwortlich ist. Das Ausschalten der SphK2 und die erhöhte S1P-Plasmakonzentration bei diesem Mausstamm könnten eine extrinsische oder intrinsische Wirkung auf die an der Neointimaformation beteiligten Zellen haben. Zumindest durch die IVM wird eine weit ausgebildete Endothelregeneration im Gefäßverlauf erkennbar. Zum anderen wird der SphK2 unter anderem eine wichtige Rolle in der Regulierung der Apoptose zugesprochen. Der Wegfall des Enzyms könnte die Proliferation positiv beeinflussen, so dass die SphK2-KO Mäuse eben das größte Ausmaß der Neointimaformation aufweisen. Ein besseres Verständnis über die zellulären Prozesse könnte durch die Immunhistologie, wie auch *in vitro* Versuche erlangt werden.

### **6.5 Die Rolle von SphK1 und SphK2 für die Regulierung inflammatorischer Prozesse nach Verletzung der arteriellen Gefäßwand**

S1P spielt beim Funktionsverhalten von Zellen im Zuge der Inflammation eine gewichtige Rolle. Die S1P-Konzentration ist in Thrombozyten aufgrund der Aktivität von SphK1 und 2 bei gleichzeitigem Fehlen S1P-degradierender Enzyme, wie z.B. der S1P-Lyase sehr hoch. Während des Aktivierungsprozesses wird der Speicher freigesetzt und induziert die Aktivierung weiterer Blutplättchen (Yatomi et al. 1997b). *In vivo*, wie auch *in vitro* Versuche konnten keine Veränderung im Funktionsverhalten neutrophiler Granulozyten bei SphK1- oder SphK2-KO Mäusen aufzeigen (Zemann et al. 2007). Durch den Einsatz der Intravitalmikroskopie erhofft man sich einen besseren Einblick in Bezug auf das Funktionsverhalten von Thrombozyten und Leukozyten im Zuge der Inflammation bei SphK1- und SphK2-KO Mauslinien.

Die Versuchsergebnisse zeigen auf, dass in der akuten Versuchsreihe kein Unterschied im Adhäsionsverhalten der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand erkennbar ist. Lediglich zum Zeitpunkt 30 Minuten unterscheidet sich der Wert vom SphK1-KO vom Kontrollstamm. Dieser verdeutlicht zwar, dass das Reaktionsausmaß bei den SphK1-KO Tieren in der akuten Versuchsreihe geringer ausfällt, der signifikante Unterschied kann allerdings als Zufallswert erachtet werden, der sich durch eine höhere Fallzahl relativieren könnte. Zum Zeitpunkt 7 Tage allerdings zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der SphK1- und SphK2-KO Tiere und dem Kontrollstamm. Das Ergebnis der SphK1-KO Tiere fällt wie gewohnt niedriger aus, das der SphK2-KO Mäuse allerdings, welches sich in der akuten Versuchsreihe auf dem Niveau des Kontrollstamms bewegt, weist nun einen signifikant niedrigen Wert auf.

Das Ausschalten der SphK1 scheint einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten im chronischen Verlauf zu haben. In der Akutphase hingegen, scheint S1P gegenüber anderen Mediatoren eine untergeordnete Rolle zu besitzen. Die Zellen tendieren zwar zu weniger Adhäsion, es ist aber kein Unterschied erkennbar. Da bis zum Zeitpunkt 50 Minuten keine wesentliche Differenz vorliegt, muss es zwischen dem Zeitpunkt 50 Minuten und 7 Tagen zu einer Erniedrigung des Adhäsionsverhaltens kommen. Somit wäre es auch hier von großem Interesse einen weiteren Untersuchungszeitpunkt einzubringen, um Erkenntnis über das thrombozytäre Adhäsionsverhalten zu erlangen. Das histologische Ergebnis spiegelt die Einsichten der intravitalmikroskopischen Aufnahmen wieder. Die geringe Thrombozytenaktivität mündet in eine geringere Thrombusformation und dementsprechend zu einer weniger ausgeprägten Neointimahyperplasie. Dies spricht erneut dafür, dass das Ausmaß der Thrombusformation und das Ausmaß der Neointimahyperplasie zusammenhängen.

Das Ergebnis der SphK2-KO Mauslinie zum Zeitpunkt 7 Tage erscheint hierbei als besonders. Während dem gesamten Verlauf ist die Anzahl adhärenter Thrombozyten sehr hoch. Auch die Neointimahyperplasie fällt sehr stark aus. Die geringe Tendenz zur Adhäsion lässt sich zum einen als eine Veränderung des Funktionsverhaltens im chronischen Verlauf deuten, die entweder auf die Zelle selber zurückzuführen ist oder auf veränderte äußere Konditionen.

Es muss daher hierbei auch in Erwägung gezogen werden, dass eventuell andere Zellen, wie Myozyten, Fibrozyten und Progenitorzellen, welche an der Neointimaformation beteiligt sind, in ihrer Funktion verändert sein könnten und somit die Adhäsion der Blutplättchen im chronischen Verlauf mitbeeinflussen. Eine beschleunigte Reendothelialisierung, wie sie bei dieser Mauslinie intravitalmikroskopisch beobachtet wird, könnte der Thrombozytenadhäsion entgegenwirken und diese These bestätigen.

Für ein besseres Verständnis des Ergebnisses sind weitere Nachforschungen notwendig.

Die Ergebnisse des Leukozytenadhäsionsverhaltens zeigen keine Unterschiede zwischen den Mausstämmen. Lediglich zum Zeitpunkt 30 Minuten ist ein signifikanter Unterschied zwischen der SphK1-KO Mauslinie und dem Kontrollstamm festzustellen. Dies kann allerdings im Gesamtzusammenhang der akuten Versuchsreihe als ein zufälliger Unterschied erachtet werden.

Zum Zeitpunkt 7 Tage sind die Ergebnisse der SphK2-KO Mauslinie und des Kontrollstammes auf einem gleichen Niveau. Wohingegen der SphK1-KO Stamm eine im Vergleich verringerte Tendenz aufzeigt. Das Ausmaß der chronischen Inflammation scheint bei der SphK1-KO Mauslinie geringer auszufallen. Die Ergebnisse des Thrombozyten- und Leukozytenadhäsionsverhaltens sprechen dafür. Bestärkt wird dies durch die weniger stark ausgeprägte Neointimahyperplasie.

Wie bereits erwähnt, haben *in vivo* und *in vitro* Versuche bisher keine Verhaltensveränderungen von neutrophilen Granulozyten bei den SphK1- und SphK2-KO Mauslinien aufzeigen können. Da ab dem Zeitpunkt 72 Stunden die Anzahl der Monozyten im denudierten Gebiet kontinuierlich ansteigt und nach 7 Tagen ihren Höhepunkt erreicht, bliebe es zu klären, ob das Ausschalten der SphK1 eine Verhaltensänderung der Monozyten hervorruft (Osaka et al. 2007). Das könnte durch den Einsatz der Immunhistologie und *in vitro* Versuchen erfolgen. Bisher konnte lediglich aufgezeigt werden, dass S1P<sub>3</sub> defiziente Mäuse eine verminderte Anzahl von Makrophagen in atherosklerotisch erkrankten Gefäßarealen aufweisen.

Aufgrund der Ergebnisse könnte man vermuten, dass Sphingosin-1-Phosphat im akuten Entzündungsprozess der verletzten Gefäßwand im Vergleich zu anderen proinflammatorischen Faktoren eine untergeordnete Rolle spielt. Im chronischen Verlauf hingegen könnte sie eine wichtige Rolle spielen, da sowohl die Inflammation, als auch die Hyperplasie bei einer zu niedrigen Konzentration von S1P vermindert ausfallen.

### 6.6 Schlussfolgerung

Die Drahtdenudation der A. fem. bei der Maus induziert eine Gefäßwandinflammation mit gesteigerter Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion. Die Verletzung hat das Gefäßremodeling zur Folge, wobei der dabei entstandene Thrombus durch die Neointimaformation umgebaut wird. Je stärker die Thrombusformation ausgeprägt ist, desto stärker fällt auch die Neointimahyperplasie aus. Das Modell kann, wenn auch schwierig, standardisiert werden und scheint somit für die nähere Analyse der Gefäßwandinflammation und der Neointimaformation geeignet zu sein.

Darauf aufbauende Versuche zeigen auf, dass der Ausfall der Sphingosinkinase 1 zu einer verminderten akuten und chronischen inflammatorischen Reaktion und zu einer geringer ausgeprägten Neointimaformation führt. Das Fehlen der Sphingosinkinase 2 mündet lediglich in eine geringer ausfallendes thrombozytäres Adhäsionsverhalten im chronischen Verlauf.

### 6.7 Ausblick

Eine in dieser Arbeit nicht untersuchte Zelllinie, nämlich der der Lymphozyten spielt bei der Neointimaformation eine bedeutende Rolle. So wäre es von Interesse deren Verhalten während des Wundheilungsprozesses der Gefäßwand bei behandelten Mäusen mit dem

bereits erwähnten FTY-720P zu untersuchen, ob Veränderungen vorliegen und welche Folge diese haben.

Das Modell der arteriellen Gefäßwanddenudation bietet einige interessante Ansatzpunkte für wissenschaftliche Untersuchungen.

Durch das Einbringen eines weiteren Untersuchungszeitpunktes könnte das Verhalten der Thrombozyten besser aufgezeichnet werden. Denn gerade der nicht untersuchte Zeitraum zwischen der akuten und chronischen Versuchsreihe scheint wichtig für die SphK1-KO Mauslinie zu sein.

Das Ergebnis des SphK1-KO Stamms lässt die Frage aufkommen, warum die Thrombozyten vermindert an die denudierte Gefäßwand adhären und weshalb die Neointimahyperplasie beim Vergleich mit dem Wildtyp geringer ausfällt. Im Zuge dessen wäre es vom Interesse, ob intrinsische oder extrinsische Unterschiede vorhanden sind. Außerdem muss die Untersuchung auf alle Zellen, welche an der Neointimaformation beteiligt sind, wie Myozyten, Fibrozyten, Progenitorzellen u.s.w. erweitert werden. Vom großen Interesse wäre ebenfalls die Klärung der Frage, warum Leukozyten im chronischen Verlauf bei SphK1 defizienten Mäusen zur geringeren Wandadhäsion tendieren.

Diese Ergebnisse könnten einen therapeutischen Ansatz zur Bekämpfung der Neointimahyperplasie im Zuge der interventionellen Kardiologie bieten.

Von besonderem Interesse wäre die genauere Untersuchung der verminderten Thrombozytenadhäsion bei SphK2-KO Mäuse in der chronischen Versuchsreihe.

Zusätzlich wären weitere Untersuchungen mit Sphingosinkinase 1 defizienten Endothelzellen notwendig. *In vitro*, wie auch zusätzliche *in vivo* Experimente könnten ein besseres Verständnis über die beobachtete verminderte Reendothelialisierung nach Denudation geben.

Es sind weitere Experimente gerade im chronischen Verlauf notwendig, um die Funktion und den Einfluss von S1P besser verstehen zu können.

Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Verbindung der histologischen und intravitalmikroskopischen Ergebnisse. Die Denudation führt zu einer Wundheilung unterschiedlichen Ausmaßes. Durch die Histologie kann ein dreidimensionales Bild der Gefäßinnenstruktur wiedergegeben werden. Die Intravitalmikroskopie bietet die Möglichkeit den Blutfluss, wie auch das zelluläre Verhalten in den jeweiligen Gefäßabschnitten zu untersuchen. Eine Verbindung dessen könnte eventuell zu einem besseren Verständnis des zellulären Verhaltens auf die Wirkung äußerer Konditionen beitragen. Eingeschlossen werden hierbei die Endothelzellen, welche in den Aufnahmen im zeitlichen Verlauf unterschiedliche morphologische Ausprägungsformen aufweisen. So kann man durch *in vitro* Experimente auch den Funktionszustand der Endothelzellen zum jeweiligen Zeitpunkt und zum jeweiligen Standort im Gefäß untersuchen.

### 7 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen werden in der westlichen Welt momentan als die Haupttodesursachen angesehen. Es gibt große therapeutische Anstrengungen dieser Entwicklung entgegenzutreten. Eine dieser ist die interventionelle Kardiologie, welche die Möglichkeit zur Behandlung atherosklerotisch erkrankter Gefäße mit der PTCA oder dem Einsatz von Stents bietet. Die herausragenden Ergebnisse werden allerdings begleitet von Folgekomplikationen, die bei einem Teil der behandelten Patienten auftreten können, nämlich die Neointimahyperplasie im Zuge des Remodelings. Diese überschießende Wundheilungsreaktion führt zu einem erneuten Verschluss der Gefäße, so dass ein weiterer Eingriff von Nöten ist.

Seit vielen Jahren werden verschiedene Ansatzpunkte zur näheren Erforschung der Neointimaprolieration verfolgt. Neben den verschiedenen (Wachstums)Faktoren stehen auch viele Zellen im Zentrum des Interesses. Gerade das Verhalten von Thrombozyten und Leukozyten und deren Einfluss auf die Hyperplasie, scheinen vielversprechende Ansätze zum besseren Verständnis der Formation zu bieten. Im Zuge dessen sind unterschiedliche *in vitro*, wie auch *in vivo* Modelle in Kombination mit verschiedenen Auswertungsmethoden entwickelt worden.

Diese Dissertation soll das Tiermodell der A. fem. Denudation in Kombination mit der histologischen, wie auch intravitalmikroskopischen Auswertung und dem Einsatz transgener Mausstämme etablieren und standardisieren. Somit wäre eine weitere und verbesserte Möglichkeit zur Analyse der Neointimaformation geboten. Man erhofft sich dadurch, therapeutische Ansätze zur Prävention der Hyperplasie nach vaskulärer Stentimplantation oder der PTCA möglich machen zu können.

Die Ergebnisse bestätigen eine Neointimahyperplasie nach Denudation der Femoralarterie, welche sich im zeitlichen Verlauf als ansteigend erweist. Die Analyse der induzierten Inflammation weist auf spezielle Verhaltensmuster der Thrombozyten und Leukozyten hinsichtlich ihrer Adhäsion im denudierten Gefäßabschnitt hin. So zeigen die Thrombozyten ein zunächst steigendes Adhäsionsverhalten als Reaktion auf die Verletzung der Gefäßwand, im weiteren Verlauf der Neointimaformation ist hingegen eine Abnahme adhärenter Thrombozyten erkennbar. Die Leukozyten zeigen ein ähnliches Verhalten, wobei beide Entwicklungsstadien zeitlich verzögert eintreten. Somit erweist sich dieses Tiermodell sowohl zur Analyse der Neointimahyperplasie der Gefäßwand, als auch zur Untersuchung des zellulären Verhaltens im Zuge der Inflammation und Wundheilungsreaktion als äußerst geeignet.

Der Vergleich der Gefäßwandformation der Kontrollgruppe mit denen der SphK1<sup>-/-</sup> und SphK2<sup>-/-</sup> zeigt eine signifikant erniedrigte Hyperplasie beim SphK1<sup>-/-</sup> Tierstamm auf, wohingegen die SphK2<sup>-/-</sup>-Linie keine Veränderung zum Wildtyp aufweist.

Das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten im akuten Verlauf ist sowohl bei SphK1<sup>-/-</sup>, als auch bei SphK2<sup>-/-</sup>-defizienten Tieren vergleichbar mit dem von Kontrolltieren. Allerdings ist die Anzahl adhärenter Thrombozyten bei SphK1<sup>-/-</sup> tendenziell vermindert, bei SphK2<sup>-/-</sup> hingegen nicht. Im chronischen Verlauf ist jedoch bei beiden Knock-out Stämmen ein signifikant vermindertes Adhäsionsverhalten im Vergleich zum Wildtyp erkennbar.

## Zusammenfassung

---

Auch beim Adhäsionsverhalten der Leukozyten lässt sich bei den SphK1<sup>-/-</sup>- und SphK2<sup>-/-</sup>-Mauslinien die gleiche Reaktion wie beim Kontrollstamm erkennen. Im chronischen Verlauf allerdings ist die Anzahl adhärenter Leukozyten bei SphK1<sup>-/-</sup> vermindert.

Durch diese Untersuchung wird aufgezeigt, dass die Sphingosinkinase 1 und somit S1P eine wichtige Rolle beim Adhäsionsverhalten von Blutplättchen an die verletzte Gefäßwand, wie auch bei der Entwicklung der anschließenden Neointimahyperplasie spielen könnten. Auch das leukozytäre Verhalten scheint im chronischen Verlauf von der Kinase beeinflusst zu sein. Der Sphingosinkinase 2 wird ein Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von Blutplättchen im chronischen Verlauf zugesprochen.

Daher erscheint es von besonderem Interesse das Verhalten der Thrombozyten und die Neointimaformation vor allem bei SphK1<sup>-/-</sup> zu untersuchen. Denn hier könnte ein neuer Ansatz zur Erstellung therapeutischer Mittel vorliegen, welche dazu beitragen könnten, die Komplikation Neointimahyperplasie zu verhindern.

### 8 Summary

Cardiovascular diseases are currently seen in the Western world as the main cause of death. There are great therapeutic efforts to counter this development. One of these is interventional cardiology, which offers the opportunity to treat atherosclerotic blood vessels with PTCA or with the application of stents. The outstanding results are however accompanied by complications, which can occur among a proportion of the treated patients, namely neointimal hyperplasia in the course of the remodeling. This excessive healing response leads to a renewed closure of the blood vessels, so that a further surgery is necessary.

Many years ago, various starting points for the closer investigation of neointimal proliferation were pursued. Along with the various growth factors, many cells are of central interest. To be precise, the behavior of the platelets and leukocytes, and their influence on the hyperplasia, seem to offer promising first signs of a better understanding of the formation. In the course thereof, different *in vitro*, as well as *in vivo* models, in combination with various methods of analysis, are developed.

The aim of this dissertation is to establish and standardise the animal model of the A. fem denudation with a flexible wire, in combination with the histologic, as well as the intravital-microscopic analysis and the use of transgenic mouse strains. Thus a further, improved method of analysis of neointima formation would be offered. It is thereby hoped that therapeutic approaches to the prevention of hyperplasia through vascular stenting could be made possible.

The results confirm a neointimal hyperplasia through denudation of the femoral artery, which proves to be increasing with the passing of time. The analysis of induced inflammation indicates special behaviour patterns of the platelets and the leukocytes with regard to their adhesion in the denuded vessel section. In this way the platelets show an initially increasing adhesion as a reaction to the trauma to the vessel wall. On the other hand, during the further course of neointimal formation, a decrease of adherent platelets is recognisable. The leukocytes behave similarly, whereby the occurrence of both stages of development is delayed. Thus this animal model proves to be adequately expressed, both for the analysis of neointimal hyperplasia of the vascular wall, as well as for the examination of cellular behaviour in the course of inflammation and wound healing response.

The comparison of the vascular walls of the control group with those of the SphK1<sup>-/-</sup> and SphK2<sup>-/-</sup> shows a significantly lowered hyperplasia on the SphK1<sup>-/-</sup> phylum, whereas the SphK2<sup>-/-</sup> line does not exhibit any change to the wildtype.

The adhesive behaviour of the platelets in the acute process is comparable with the control group in both the SphK1<sup>-/-</sup> and SphK2<sup>-/-</sup>-deficient animals. However, the number of adherent platelets tends to be reduced in SphK1<sup>-/-</sup> but not in SphK2<sup>-/-</sup>. In the chronic process however, a significantly reduced adhesion behaviour is recognisable by both knock-out strains in comparison to the wildtype.

In the adhesion behaviour of the leukocytes, the same reaction is recognised in the SphK1<sup>-/-</sup> and SphK2<sup>-/-</sup> as in the control strain. In the chronic process however, the number of adherent leukocytes is reduced in the SphK1<sup>-/-</sup> mouse strain.

This study will indicate that Sphingosine 1 and S1P play an important role in the adhesion performance of platelets on vascular wall trauma, as well as in the development of subsequent neointimal hyperplasia. Also, the leukocytic behaviour in the chronic process

## Summary

---

seems to be influenced by kinase. Sphingosine 2 is also attributed with an influence on the adhesive behaviour of platelets in the chronic process.

Therefore, it appears to be of central interest to research the behaviour of Thrombocytes and Leukocytes particularly on SphK1<sup>-/-</sup>. Because here a new approach could be available for the creation of therapeutical means, which could contribute to the reduction of neointimal hyperplasia.

## 9 Literaturverzeichnis

*Rhodamine B Dye content ~95 % | Sigma-Aldrich*. Available from:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r6626?lang=de&region=DE> [28 November 2012].

Alewijnse, AE, Peters, SLM & Michel, MC 2004, 'Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and other sphingomyelin metabolites', *British journal of pharmacology*, vol. 143, no. 6, pp. 666–684.

Allende, ML, Sasaki, T, Kawai, H, Olivera, A, Mi, Y, van Echten-Deckert, G, Hajdu, R, Rosenbach, M, Keohane, CA, Mandala, S, Spiegel, S & Proia, RL 2004, 'Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720', *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, no. 50, pp. 52487–52492.

Ancellin, N, Colmont, C, Su, J, Li, Q, Mittereder, N, Chae, S, Stefansson, S, Liau, G & Hla, T 2002, 'Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation', *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 8, pp. 6667–6675.

Aoki, S, Osada, M, Kaneko, M, Ozaki, Y & Yatomi, Y 2007, 'Fluid shear stress enhances the sphingosine 1-phosphate responses in cell-cell interactions between platelets and endothelial cells', *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 358, no. 4, pp. 1054–1057.

Barthlott, T, Keller, MP, Krenger, W & Piali, L 2006, *Immunologie. Grundlagen für Klinik und Praxis*, Elsevier, Urban & Fischer, München.

Baudhuin, LM, Jiang, Y, Zaslavsky, A, Ishii, I, Chun, J & Xu, Y 2004, 'S1P3-mediated Akt activation and cross-talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 18, no. 2, pp. 341–343.

Bolick, DT, Srinivasan, S, Kim, KW, Hatley, ME, Clemens, JJ, Whetzel, A, Ferger, N, Macdonald, TL, Davis, MD, Tsao, PS, Lynch, KR & Hedrick, CC 2005, 'Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 25, no. 5, pp. 976–981.

Brinkmann, V, Davis, MD, Heise, CE, Albert, R, Cottens, S, Hof, R, Bruns, C, Prieschl, E, Baumruker, T, Hiestand, P, Foster, CA, Zollinger, M & Lynch, KR 2002, 'The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors', *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 24, pp. 21453–21457.

Bullard, DC, Kunkel, EJ, Kubo, H, Hicks, MJ, Lorenzo, I, Doyle, NA, Doerschuk, CM, Ley, K & Beaudet, AL 1996, 'Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice', *The Journal of experimental medicine*, vol. 183, no. 5, pp. 2329–2336.

Carmeliet, P, Moons, L, Stassen, JM, Mol, M de, Bouche, A, van den Oord, JJ, Kockx, M & Collen, D 1997, 'Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice', *The American journal of pathology*, vol. 150, no. 2, pp. 761–776.

Cohen, JA, Barkhof, F, Comi, G, Hartung, H, Khatri, BO, Montalban, X, Pelletier, J, Capra, R, Gallo, P, Izquierdo, G, Tiel-Wilck, K, Vera, A de, Jin, J, Stites, T, Wu, S, Aradhye, S & Kappos, L 2010, 'Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis', *The New England journal of medicine*, vol. 362, no. 5, pp. 402–415.

Colombo, A, Drzewiecki, J, Banning, A, Grube, E, Hauptmann, K, Silber, S, Dudek, D, Fort, S, Schiele, F, Zmudka, K, Guagliumi, G & Russell, ME 2003, 'Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions', *Circulation*, vol. 108, no. 7, pp. 788–794.

Dörner, K 2006, *Klinische Chemie und Hämatologie. 69 Tabellen*, Thieme, Stuttgart ;, New York.

Dotter, CT, Buschmann, RW, McKinney, MK & Rosch, J 1983, 'Transluminal expandable nitinol coil stent grafting: preliminary report', *Radiology*, vol. 147, no. 1, pp. 259–260.

Fischman, DL, Leon, MB, Baim, DS, Schatz, RA, Savage, MP, Penn, I, Detre, K, Veltri, L, Ricci, D & Nobuyoshi, M 1994, 'A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators', *The New England journal of medicine*, vol. 331, no. 8, pp. 496–501.

Frenette, PS, Johnson, RC, Hynes, RO & Wagner, DD 1995, 'Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 16, pp. 7450–7454.

Fuster, V, Badimon, L, Badimon, JJ & Chesebro, JH 1992, 'The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)', *The New England journal of medicine*, vol. 326, no. 4, pp. 242–250.

Fyrst, H & Saba, JD 2010, 'An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators', *Nature chemical biology*, vol. 6, no. 7, pp. 489–497.

Garcia, JG, Liu, F, Verin, AD, Birukova, A, Dechert, MA, Gerthoffer, WT, Bamberg, JR & English, D 2001, 'Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement', *The Journal of clinical investigation*, vol. 108, no. 5, pp. 689–701.

Garcia-Touchard, A, Henry, TD, Sangiorgi, G, Spagnoli, LG, Mauriello, A, Conover, C & Schwartz, RS 2005, 'Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 25, no. 6, pp. 1119–1127.

Gawaz, MP 1999, *Das Blutplättchen. Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung : 31 Tabellen*, Thieme, Stuttgart ; New York.

Hait, NC, Allegood, J, Maceyka, M, Strub, GM, Harikumar, KB, Singh, SK, Luo, C, Marmorstein, R, Kordula, T, Milstien, S & Spiegel, S 2009, 'Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate', *Science (New York, N)*, vol. 325, no. 5945, pp. 1254–1257.

Hirase, T & Node, K 2012, 'Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure', *American journal of physiology*, vol. 302, no. 3, pp. H499–505.

- Holmes, DR, JR, Vlietstra, RE, Smith, HC, Vetrovec, GW, Kent, KM, Cowley, MJ, Faxon, DP, Gruentzig, AR, Kelsey, SF & Detre, KM 1984, 'Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute', *The American journal of cardiology*, vol. 53, no. 12, pp. 77C-81C.
- Hugh Rosen, PJGMGSaSB, 'Sphingosine 1-Phosphate Receptor Signaling' [11 July 2013].
- Hui, DY 2008, 'Intimal hyperplasia in murine models', *Current drug targets*, vol. 9, no. 3, pp. 251–260.
- Inoki, I, Takuwa, N, Sugimoto, N, Yoshioka, K, Takata, S, Kaneko, S & Takuwa, Y 2006, 'Negative regulation of endothelial morphogenesis and angiogenesis by S1P2 receptor', *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 346, no. 1, pp. 293–300.
- Ishii, I, Friedman, B, Ye, X, Kawamura, S, McGiffert, C, Contos, JJ, Kingsbury, MA, Zhang, G, Brown, JH & Chun, J 2001, 'Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3', *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 36, pp. 33697–33704.
- Ishii, I, Ye, X, Friedman, B, Kawamura, S, Contos, JJA, Kingsbury, MA, Yang, AH, Zhang, G, Brown, JH & Chun, J 2002, 'Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3', *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 28, pp. 25152–25159.
- Ishiwata, S, Robinson, K, Chronos, N, Crocker, IR & King, SB3 2000, 'Irradiation and postangioplasty restenosis: a recent overview', *Japanese heart journal*, vol. 41, no. 5, pp. 541–570.
- Ito, K, Anada, Y, Tani, M, Ikeda, M, Sano, T, Kihara, A & Igarashi, Y 2007, 'Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes', *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 357, no. 1, pp. 212–217.
- Jabbar, AA, Kazarian, T, Hakobyan, N & Valentino, LA 2006, 'Gangliosides promote platelet adhesion and facilitate neuroblastoma cell adhesion under dynamic conditions simulating blood flow', *Pediatric blood & cancer*, vol. 46, no. 3, pp. 292–299.
- Kappos, L, Radue, E, O'Connor, P, Polman, C, Hohlfeld, R, Calabresi, P, Selmaj, K, Agoropoulou, C, Leyk, M, Zhang-Auberson, L & Burtin, P 2010, 'A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis', *The New England journal of medicine*, vol. 362, no. 5, pp. 387–401.
- Kharel, Y, Lee, S, Snyder, AH, Sheasley-O'Neill, SL, Morris, MA, Setiady, Y, Zhu, R, Zigler, MA, Burcin, TL, Ley, K, Tung, KSK, Engelhard, VH, Macdonald, TL, Pearson-White, S & Lynch, KR 2005a, 'Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720', *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 44, pp. 36865–36872.
- Kharel, Y, Lee, S, Snyder, AH, Sheasley-O'Neill, SL, Morris, MA, Setiady, Y, Zhu, R, Zigler, MA, Burcin, TL, Ley, K, Tung, KSK, Engelhard, VH, Macdonald, TL, Pearson-White, S & Lynch, KR 2005b, 'Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720', *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 44, pp. 36865–36872.
- Kher, N & Marsh, JD 2004, 'Pathobiology of atherosclerosis--a brief review', *Seminars in thrombosis and hemostasis*, vol. 30, no. 6, pp. 665–672.
- Klinke, R & Bauer, C 2005, *Physiologie. Zahlreiche Tabellen*, Thieme, Stuttgart [u.a.].

- Kluk, MJ & Hla, T 2001, 'Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration', *Circulation research*, vol. 89, no. 6, pp. 496–502.
- Koller, A & Huang, A 1994, 'Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats', *Circulation research*, vol. 74, no. 3, pp. 416–421.
- Koller, A, Sun, D, Huang, A & Kaley, G 1994, 'Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles', *The American journal of physiology*, vol. 267, 1 Pt 2, pp. H326-32.
- Kumar, A & Lindner, V 1997, 'Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 17, no. 10, pp. 2238–2244.
- Kupatt, C, Zahler, S, Seligmann, C, Massoudy, P, Becker, BF & Gerlach, E 1996, 'Nitric oxide mitigates leukocyte adhesion and vascular leak after myocardial ischemia', *Journal of molecular and cellular cardiology*, vol. 28, no. 3, pp. 643–654.
- Kupperman, E, An, S, Osborne, N, Waldron, S & Stainier, DY 2000, 'A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development', *Nature*, vol. 406, no. 6792, pp. 192–195.
- Larsen, E, Celi, A, Gilbert, GE, Furie, BC, Erban, JK, Bonfanti, R, Wagner, DD & Furie, B 1989, 'PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes', *Cell*, vol. 59, no. 2, pp. 305–312.
- Larsen, R 2010, *Anästhesie. [mit d. Plus im Web] ; mit 290 Tabellen*, Urban & Fischer in Elsevier, München.
- Lee, J, Zeng, Q, Ozaki, H, Wang, L, Hand, AR, Hla, T, Wang, E & Lee, M 2006, 'Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity', *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 39, pp. 29190–29200.
- Lee, MJ, Evans, M & Hla, T 1996, 'The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway', *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 19, pp. 11272–11279.
- Lee, MJ, Thangada, S, Claffey, KP, Ancellin, N, Liu, CH, Kluk, M, Volpi, M, Sha'afi, RI & Hla, T 1999, 'Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate', *Cell*, vol. 99, no. 3, pp. 301–312.
- Limaye, V 2008, 'The role of sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate in the regulation of endothelial cell biology', *Endothelium : journal of endothelial cell research*, vol. 15, no. 3, pp. 101–112.
- Lin, Y, Weisdorf, DJ, Solovey, A & Hebbel, RP 2000, 'Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood', *The Journal of clinical investigation*, vol. 105, no. 1, pp. 71–77.
- Lindemann, S, Kramer, B, Seizer, P & Gawaz, M 2007, 'Platelets, inflammation and atherosclerosis', *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 5 Suppl 1, pp. 203–211.
- Lindner, V, Fingerle, J & Reidy, MA 1993, 'Mouse model of arterial injury', *Circulation research*, vol. 73, no. 5, pp. 792–796.

Liu, H, Toman, RE, Goparaju, SK, Maceyka, M, Nava, VE, Sankala, H, Payne, SG, Bektas, M, Ishii, I, Chun, J, Milstien, S & Spiegel, S 2003, 'Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis', *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 41, pp. 40330–40336.

Liu, Y, Wada, R, Yamashita, T, Mi, Y, Deng, CX, Hobson, JP, Rosenfeldt, HM, Nava, VE, Chae, SS, Lee, MJ, Liu, CH, Hla, T, Spiegel, S & Proia, RL 2000, 'Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation', *The Journal of clinical investigation*, vol. 106, no. 8, pp. 951–961.

Lüllmann, H, Mohr, K & Hein, L 2006, *Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen : ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker*, Georg Thieme, Stuttgart.

Lüllmann-Rauch, R 2003, *Histologie. Verstehen, Lernen, Nachschlagen ; 10 Tabellen*, Thieme, Stuttgart [u.a.].

Malek, RL, Toman, RE, Edsall, LC, Wong, S, Chiu, J, Letterle, CA, van Brocklyn, JR, Milstien, S, Spiegel, S & Lee, NH 2001, 'Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors', *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 8, pp. 5692–5699.

Mandala, S, Hajdu, R, Bergstrom, J, Quackenbush, E, Xie, J, Milligan, J, Thornton, R, Shei, G, Card, D, Keohane, C, Rosenbach, M, Hale, J, Lynch, CL, Rupprecht, K, Parsons, W & Rosen, H 2002, 'Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists', *Science (New York, N*, vol. 296, no. 5566, pp. 346–349.

Massberg, S, Gawaz, M, Gruner, S, Schulte, V, Konrad, I, Zohlnhofer, D, Heinzmann, U & Nieswandt, B 2002, 'A Crucial Role of Glycoprotein VI for Platelet Recruitment to the Injured Arterial Wall In Vivo', *Journal of Experimental Medicine*, vol. 197, no. 1, pp. 41–49.

Matloubian, M, Lo, CG, Cinamon, G, Lesneski, MJ, Xu, Y, Brinkmann, V, Allende, ML, Proia, RL & Cyster, JG 2004, 'Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1', *Nature*, vol. 427, no. 6972, pp. 355–360.

Mayadas, TN, Johnson, RC, Rayburn, H, Hynes, RO & Wagner, DD 1993, 'Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice', *Cell*, vol. 74, no. 3, pp. 541–554.

Millan, J, Hewlett, L, Glyn, M, Toomre, D, Clark, P & Ridley, AJ 2006, 'Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains', *Nature cell biology*, vol. 8, no. 2, pp. 113–123.

Mizugishi, K, Yamashita, T, Olivera, A, Miller, GF, Spiegel, S & Proia, RL 2005, 'Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development', *Molecular and cellular biology*, vol. 25, no. 24, pp. 11113–11121.

Moore, KL, Stults, NL, Diaz, S, Smith, DF, Cummings, RD, Varki, A & McEver, RP 1992, 'Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells', *The Journal of cell biology*, vol. 118, no. 2, pp. 445–456.

- Moses, JW, Leon, MB, Popma, JJ, Fitzgerald, PJ, Holmes, DR, O'Shaughnessy, C, Caputo, RP, Kereiakes, DJ, Williams, DO, Teirstein, PS, Jaeger, JL & Kuntz, RE 2003, 'Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery', *The New England journal of medicine*, vol. 349, no. 14, pp. 1315–1323.
- Murata, N, Sato, K, Kon, J, Tomura, H, Yanagita, M, Kuwabara, A, Ui, M & Okajima, F 2000, 'Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions', *The Biochemical journal*, 352 Pt 3, pp. 809–815.
- Murray, CJ & Lopez, AD 1997, 'Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study', *Lancet*, vol. 349, no. 9063, pp. 1436–1442.
- Nabah, YNA, Mateo, T, Cerda-Nicolas, M, Alvarez, A, Martinez, M, Issekutz, AC & Sanz, M 2005, 'L-NAME induces direct arteriolar leukocyte adhesion, which is mainly mediated by angiotensin-II', *Microcirculation (New York, N)*, vol. 12, no. 5, pp. 443–453.
- Nieswandt, B, Brakebusch, C, Bergmeier, W, Schulte, V, Bouvard, D, Mokhtari-Nejad, R, Lindhout, T, Heemskerk, JW, Zirngibl, H & Fassler, R 2001, 'Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen', *The EMBO journal*, vol. 20, no. 9, pp. 2120–2130.
- Olivera, A, Mizugishi, K, Tikhonova, A, Ciaccia, L, Odom, S, Proia, RL & Rivera, J 2007, 'The sphingosine kinase-sphingosine-1-phosphate axis is a determinant of mast cell function and anaphylaxis', *Immunity*, vol. 26, no. 3, pp. 287–297.
- Osaka, M, Hagita, S, Haraguchi, M, Kajimura, M, Suematsu, M & Yoshida, M 2007, 'Real-time imaging of mechanically injured femoral artery in mice reveals a biphasic pattern of leukocyte accumulation', *American journal of physiology*, vol. 292, no. 4, pp. H1876-82.
- Paik, JH, Chae, S, Lee, MJ, Thangada, S & Hla, T 2001, 'Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins', *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, no. 15, pp. 11830–11837.
- Pappu, R, Schwab, SR, Cornelissen, I, Pereira, JP, Regard, JB, Xu, Y, Camerer, E, Zheng, Y, Huang, Y, Cyster, JG & Coughlin, SR 2007, 'Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate', *Science (New York, N)*, vol. 316, no. 5822, pp. 295–298.
- Riede, U, Werner, M & Schaefer, H 2004, *Allgemeine und spezielle Pathologie*, Thieme, Stuttgart.
- Roque, M, Fallon, JT, Badimon, JJ, Zhang, WX, Taubman, MB & Reis, ED 2000, 'Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 20, no. 2, pp. 335–342.
- Ross, R 1993, 'The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s', *Nature*, vol. 362, no. 6423, pp. 801–809.
- Ruggeri, ZM 2002, 'Platelets in atherothrombosis', *Nature medicine*, vol. 8, no. 11, pp. 1227–1234.

- Ryu, Y, Takuwa, N, Sugimoto, N, Sakurada, S, Usui, S, Okamoto, H, Matsui, O & Takuwa, Y 2002, 'Sphingosine-1-phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells', *Circulation research*, vol. 90, no. 3, pp. 325–332.
- Saetzler, RK, Jallo, J, Lehr, HA, Philips, CM, Vasthare, U, Arfors, KE & Tuma, RF 1997, 'Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes', *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 45, no. 4, pp. 505–513.
- Sanchez, T & Hla, T 2004, 'Structural and functional characteristics of S1P receptors', *Journal of cellular biochemistry*, vol. 92, no. 5, pp. 913–922.
- Sartore, S, Chiavegato, A, Faggin, E, Franch, R, Puato, M, Ausoni, S & Pauletto, P 2001a, 'Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant', *Circulation research*, vol. 89, no. 12, pp. 1111–1121.
- Sartore, S, Chiavegato, A, Faggin, E, Franch, R, Puato, M, Ausoni, S & Pauletto, P 2001b, 'Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant', *Circulation research*, vol. 89, no. 12, pp. 1111–1121.
- Sata, M, Maejima, Y, Adachi, F, Fukino, K, Saiura, A, Sugiura, S, Aoyagi, T, Imai, Y, Kurihara, H, Kimura, K, Omata, M, Makuuchi, M, Hirata, Y & Nagai, R 2000, 'A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia', *Journal of molecular and cellular cardiology*, vol. 32, no. 11, pp. 2097–2104.
- Sata, M, Saiura, A, Kunisato, A, Tojo, A, Okada, S, Tokuhisa, T, Hirai, H, Makuuchi, M, Hirata, Y & Nagai, R 2002, 'Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis', *Nature medicine*, vol. 8, no. 4, pp. 403–409.
- Schampaert, E, Cohen, EA, Schluter, M, Reeves, F, Traboulsi, M, Title, LM, Kuntz, RE & Popma, JJ 2004, 'The Canadian study of the sirolimus-eluting stent in the treatment of patients with long de novo lesions in small native coronary arteries (C-SIRIUS)', *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 43, no. 6, pp. 1110–1115.
- Schober, A & Zerneck, A 2007, 'Chemokines in vascular remodeling', *Thrombosis and haemostasis*, vol. 97, no. 5, pp. 730–737.
- Schofer, J, Schluter, M, Gershlick, AH, Wijns, W, Garcia, E, Schampaert, E & Breithardt, G 2003, 'Sirolimus-eluting stents for treatment of patients with long atherosclerotic lesions in small coronary arteries: double-blind, randomised controlled trial (E-SIRIUS)', *Lancet*, vol. 362, no. 9390, pp. 1093–1099.
- Schwab, SR, Pereira, JP, Matloubian, M, Xu, Y, Huang, Y & Cyster, JG 2005, 'Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 309, no. 5741, pp. 1735–1739.
- Schwartz, RS, Topol, EJ, Serruys, PW, Sangiorgi, G & Holmes, DR, JR 1998, 'Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards', *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 32, no. 7, pp. 2087–2094.

- Sensken, S, Bode, C, Nagarajan, M, Peest, U, Pabst, O & Graler, MH 2010, 'Redistribution of sphingosine 1-phosphate by sphingosine kinase 2 contributes to lymphopenia', *Journal of immunology (Baltimore, Md)*, vol. 184, no. 8, pp. 4133–4142.
- Serruys, PW, Jaegere, P de, Kiemeneij, F, Macaya, C, Rutsch, W, Heyndrickx, G, Emanuelsson, H, Marco, J, Legrand, V & Materne, P 1994, 'A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group', *The New England journal of medicine*, vol. 331, no. 8, pp. 489–495.
- Shi, Y, O'Brien, JE, Fard, A, Mannion, JD, Wang, D & Zalewski, A 1996a, 'Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries', *Circulation*, vol. 94, no. 7, pp. 1655–1664.
- Shi, Y, Pieniek, M, Fard, A, O'Brien, J, Mannion, JD & Zalewski, A 1996b, 'Adventitial Remodeling After Coronary Arterial Injury', *Circulation*, vol. 93, no. 2, pp. 340–348.
- Siewert, JR & Brauer, RB 2007, *Basiswissen Chirurgie*, Springer-Medizin-Verl., Heidelberg.
- Sperandio, M, Smith, ML, Forlow, SB, Olson, TS, Xia, L, McEver, RP & Ley, K 2003, 'P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules', *The Journal of experimental medicine*, vol. 197, no. 10, pp. 1355–1363.
- Stary, HC, Chandler, AB, Dinsmore, RE, Fuster, V, Glagov, S, Insull, W, JR, Rosenfeld, ME, Schwartz, CJ, Wagner, WD & Wissler, RW 1995, 'A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 15, no. 9, pp. 1512–1531.
- Stoffel, W, Heimann, G & Hellenbroich, B 1973, 'Sphingosine kinase in blood platelets', *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*, vol. 354, no. 5, pp. 562–566.
- Stokes, KY, Clanton, EC, Russell, JM, Ross, CR & Granger, DN 2001, 'NAD(P)H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial cell adhesion', *Circulation research*, vol. 88, no. 5, pp. 499–505.
- Tanguay, J, Hammoud, T, Geoffroy, P & Merhi, Y 2003, 'Chronic platelet and neutrophil adhesion: a causal role for neointimal hyperplasia in in-stent restenosis', *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*, vol. 10, no. 5, pp. 968–977.
- Tani, M, Sano, T, Ito, M & Igarashi, Y 2005, 'Mechanisms of sphingosine and sphingosine 1-phosphate generation in human platelets', *Journal of lipid research*, vol. 46, no. 11, pp. 2458–2467.
- Tolle, M, Levkau, B, Kleuser, B & van der Giet, M 2007, 'Sphingosine-1-phosphate and FTY720 as anti-atherosclerotic lipid compounds', *European journal of clinical investigation*, vol. 37, no. 3, pp. 171–179.
- van Brocklyn, JR, Graler, MH, Bernhardt, G, Hobson, JP, Lipp, M & Spiegel, S 2000, 'Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6', *Blood*, vol. 95, no. 8, pp. 2624–2629.
- Venkataraman, K, Lee, Y, Michaud, J, Thangada, S, Ai, Y, Bonkovsky, HL, Parikh, NS, Habrukowich, C & Hla, T 2008, 'Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate', *Circulation research*, vol. 102, no. 6, pp. 669–676.

- Versari, D, Lerman, LO & Lerman, A 2007, 'The importance of reendothelialization after arterial injury', *Current pharmaceutical design*, vol. 13, no. 17, pp. 1811–1824.
- Weigert, A, Schiffmann, S, Sekar, D, Ley, S, Menrad, H, Werno, C, Grosch, S, Geisslinger, G & Brune, B 2009, 'Sphingosine kinase 2 deficient tumor xenografts show impaired growth and fail to polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype', *International journal of cancer*, vol. 125, no. 9, pp. 2114–2121.
- Welsch, U 2010, *Lehrbuch Histologie*, Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Wong, A & Chan, C 2004, 'Drug-eluting stents: the end of restenosis?', *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, vol. 33, no. 4, pp. 423–431.
- World Health Organisation 2011, *Cardiovascular diseases. What are cardiovascular disease?* Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> [24 December 2012].
- Xia, P, Gamble, JR, Rye, KA, Wang, L, Hii, CS, Cockerill, P, Khew-Goodall, Y, Bert, AG, Barter, PJ & Vadas, MA 1998, 'Tumor necrosis factor-alpha induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 24, pp. 14196–14201.
- Xia, P, Gamble, JR, Wang, L, Pitson, SM, Moretti, PA, Wattenberg, BW, D'Andrea, RJ & Vadas, MA 2000, 'An oncogenic role of sphingosine kinase', *Current biology : CB*, vol. 10, no. 23, pp. 1527–1530.
- Xia, P, Wang, L, Gamble, JR & Vadas, MA 1999, 'Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells', *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 48, pp. 34499–34505.
- Yago, T, Wu, J, Wey, CD, Klopocki, AG, Zhu, C & McEver, RP 2004, 'Catch bonds govern adhesion through L-selectin at threshold shear', *The Journal of cell biology*, vol. 166, no. 6, pp. 913–923.
- Yatomi, Y, Igarashi, Y, Yang, L, Hisano, N, Qi, R, Asazuma, N, Satoh, K, Ozaki, Y & Kume, S 1997a, 'Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum', *Journal of biochemistry*, vol. 121, no. 5, pp. 969–973.
- Yatomi, Y, Ruan, F, Hakomori, S & Igarashi, Y 1995, 'Sphingosine-1-phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets', *Blood*, vol. 86, no. 1, pp. 193–202.
- Yatomi, Y, Yamamura, S, Ruan, F & Igarashi, Y 1997b, 'Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid', *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 8, pp. 5291–5297.
- Zargham, R 2008, 'Preventing restenosis after angioplasty: a multistage approach', *Clinical science (London, England : 1979)*, vol. 114, no. 4, pp. 257–264.
- Zargham, R, Pepin, J & Thibault, G 2007, 'alpha8beta1 Integrin is up-regulated in the neointima concomitant with late luminal loss after balloon injury', *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, vol. 16, no. 4, pp. 212–220.
- Zemann, B, Urtz, N, Reuschel, R, Mechtcheriakova, D, Bornancin, F, Badegruber, R, Baumruker, T & Billich, A 2007, 'Normal neutrophil functions in sphingosine kinase type 1 and 2 knockout mice', *Immunology letters*, vol. 109, no. 1, pp. 56–63.

## Literaturverzeichnis

---

Zohlhofer, D, Richter, T, Neumann, F, Nuhrenberg, T, Wessely, R, Brandl, R, Murr, A, Klein, CA & Baeuerle, PA 2001, 'Transcriptome analysis reveals a role of interferon-gamma in human neointima formation', *Molecular cell*, vol. 7, no. 5, pp. 1059–1069.

### 10 Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>TABELLE 1:</b> VERSUCHSPROTOKOLL ZUR VERIFIZIERUNG DER GEFÄßDENUKATION   | 46 |
| <b>TABELLE 2:</b> VERSUCHSPROTOKOLL ZUR ANALYSE UND AUSMESSUNG DER NEOINTIMA BEI WILDTYP MÄUSEN   | 47 |
| <b>TABELLE 3:</b> VERSUCHSPROTOKOLL ZUR UNTERSUCHUNG DES ADHÄSIONSVERHALTENS VON THROMBOZYTEN UND LEUKOZYTEN BEI DEN AKUTEN UND CHRONISCHEN VERSUCHSREIHEN                              | 47 |
| <b>TABELLE 4:</b> VERSUCHSPROTOKOLL ZUR ANALYSE DER NEOINTIMAFORMATION BEI SPHK1 <sup>-/-</sup> UND SPHK2 <sup>-/-</sup> MÄUSEN   | 48 |
| <b>TABELLE 5:</b> VERSUCHSPROTOKOLL ZUR UNTERSUCHUNG DES ZELLULÄREN ADHÄSIONSVERHALTENS NACH DER DENUKATION DER ARTERIELLEN GEFÄßWAND BEI SPHK1 <sup>-/-</sup> UND SPHK2 <sup>-/-</sup> | 49 |

## 11 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>ABBILDUNG 1:</b> WANDAUFBAU DER ARTERIE. SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ARTERIE VOM MUSKULÄREN TYP                           | 4  |
| <b>ABBILDUNG 2:</b> DIE UNTERSCHIEDLICHEN FORMEN DES REMODELINGS  | 12 |
| <b>ABBILDUNG 3:</b> SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT SYNTHESWEG  | 16 |
| <b>ABBILDUNG 4:</b> ANGIOPLASTIEDRAHT ZUR DENUKATION  | 33 |
| <b>ABBILDUNG 5:</b> DARSTELLUNG DES OPERATIVEN VORGANGS ZUR DRAHTDENUKATION DER ARTERIA FEMORALIS                             | 33 |
| <b>ABBILDUNG 6:</b> SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES EPIFLUORESZENZMIKROSKOPS   | 36 |
| <b>ABBILDUNG 7:</b> INTRAVITALMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN ENTLANG DER ARTERIA FEMORALIS  | 37 |
| <b>ABBILDUNG 8:</b> AUSWERTUNGSFENSTER DER IVM-AUFNAHMEN  | 40 |
| <b>ABBILDUNG 9:</b> HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DES GEFÄßVERLAUFS DER ARTERIA FEMORALIS BEIM WILDTYP                            | 43 |
| <b>ABBILDUNG 10:</b> HISTOMORPHOMETRISCHE AUSWERTUNG DER ARTERIA FEMORALIS  | 44 |
| <b>ABBILDUNG 11:</b> GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER AKUTEN UND CHRONISCHEN VERSUCHSGRUPPEN  | 45 |
| <b>ABBILDUNG 12:</b> HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG EINES ARTERIELLEN GEFÄßES DER AKUTEN VERSUCHSREIHE                             | 51 |
| <b>ABBILDUNG 13:</b> HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER NEOINTIMAFORMATION IM ZEITLICHEN VERLAUF                                   | 52 |
| <b>ABBILDUNG 14:</b> HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DER NEOINTIMAFORMATION IM ZEITLICHEN VERLAUF                                   | 53 |
| <b>ABBILDUNG 15:</b> HISTOLOGISCHE DARSTELLUNG DES GEFÄßVERLAUFS ZUM ZEITPUNKT  | 54 |
| <b>ABBILDUNG 16:</b> DIE QUANTITATIVE DARSTELLUNG DER NEOINTIMAHYPERPLASIE  | 55 |
| <b>ABBILDUNG 17:</b> DARSTELLUNG INTRAVITALMIKROSKOPISCHER FLUORESZENZAUFNAHMEN DER A. FEM. AUS DER AKUTEN VERSUCHSREIHE      | 56 |
| <b>ABBILDUNG 18:</b> DARSTELLUNG INTRAVITALMIKROSKOPISCHER FLUORESZENZAUFNAHMEN DER A. FEM. AUS DER CHRONISCHEN VERSUCHSREIHE | 57 |
| <b>ABBILDUNG 19:</b> QUANTITATIVE DARSTELLUNG ADHÄRENTER THROMBOZYTEN BEI DER AKUTEN UND CHRONISCHEN VERSUCHSREIHE            | 59 |
| <b>ABBILDUNG 20:</b> QUANTITATIVE DARSTELLUNG ADHÄRENTER THROMBOZYTEN BEI DER CHRONISCHEN VERSUCHSREIHE                       | 59 |
| <b>ABBILDUNG 21:</b> QUANTITATIVE DARSTELLUNG ADHÄRENTER LEUKOZYTEN BEI DER AKUTEN UND CHRONISCHEN VERSUCHSREIHE              | 61 |
| <b>ABBILDUNG 22:</b> QUANTITATIVE DARSTELLUNG ADHÄRENTER LEUKOZYTEN BEI DER CHRONISCHEN VERSUCHSREIHE                         | 61 |
| <b>ABBILDUNG 23:</b> QUANTITATIVE DARSTELLUNG ADHÄRENTER THROMBOZYTEN UND LEUKOZYTEN NACH DENUKATION                          | 62 |
| <b>ABBILDUNG 24:</b> DARSTELLUNG DER GEFÄß-AUSKLEIDUNG IM GEFÄßVERLAUF NACH DENUKATION  | 63 |
| <b>ABBILDUNG 25:</b> DARSTELLUNG EINES GEFÄßABSCHNITTS DER A. FEM. MIT KONSTRIKTIVEM REMODELING                               | 64 |

## Abbildungsverzeichnis

---

|   |    |
|---|----|
| <b>ABBILDUNG 26:</b> DARSTELLUNG DER INTIMAVERDICKUNG VON BL6, SPHK1- UND SPHK2-KO  | 65 |
| <b>ABBILDUNG 27:</b> QUANTITATIVE DARSTELLUNG ADHÄRENTER THROMBOZYTEN BEI DER AKUTEN UND CHRONISCHEN VERSUCHSREIHE MIT SPHK1-KO MÄUSEN  | 66 |
| <b>ABBILDUNG 28:</b> QUANTITATIVE DARSTELLUNG ADHÄRENTER THROMBOZYTEN BEI DER AKUTEN UND CHRONISCHEN VERSUCHSREIHE MIT SPHK2-KO MÄUSEN  | 66 |
| <b>ABBILDUNG 29:</b> QUANTITATIVE DARSTELLUNG ADHÄRENTER LEUKOZYTEN BEI DER AKUTEN UND CHRONISCHEN VERSUCHSREIHE MIT SPHK1-KO MÄUSEN  | 67 |
| <b>ABBILDUNG 30:</b> QUANTITATIVE DARSTELLUNG ADHÄRENTER LEUKOZYTEN BEI DER AKUTEN UND CHRONISCHEN VERSUCHSREIHE MIT SPHK2-KO MÄUSEN  | 68 |
| <b>ABBILDUNG 31:</b> GEGENÜBERSTELLUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE DES THROMBOZYTÄREN ADHÄSIONSV ERHALTENS BEI C57BL6/J, SPHK1- UND SPHK2-KO NACH GEFÄßWANDDENUDATION  | 69 |
| <b>ABBILDUNG 32:</b> GEGENÜBERSTELLUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE DES LEUKOZYTÄREN ADHÄSIONSV ERHALTENS BEI SPHK1 <sup>+/+</sup> SPHK2 <sup>+/+</sup> , SPHK1 <sup>-/-</sup> UND SPHK2 <sup>-/-</sup> NACH GEFÄßWANDDENUDATION. | 70 |

### 12 Danksagung

Mein erster Dank richtet sich an Professor Dr. Massberg. Durch ihn bekam ich die Möglichkeit zur Durchführung einer experimentellen Forschungsarbeit. Seine Ideen und sein Enthusiasmus waren von Bedeutung für die Umsetzung dieses Projektes in der Erwachsenen Kardiologie des Deutschen Herzzentrums München.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. vet. Marie-Luise von Brühl, Dr. vet. Verena Barocke für die gute Betreuung und Dr. vet. Nicole Urtz für die konstruktive Zusammenarbeit über die letzten Jahre bedanken. Durch Ihre Ratschläge und Erfahrungen waren sie nicht nur eine große Hilfe bei der Durchführung der Experimente, sondern auch zusätzlich unermüdliche Motivatoren, wodurch mich die Arbeit im Labor noch mehr begeistert hat.

Hervorheben möchte ich hierbei ebenfalls Michael Lorenz, Dr. med. Rudelius und Anne-Maria Suhr, die mir bei der Durchführung und Auswertung der Versuche, wie auch bei der Verfassung der Doktorarbeit mit Rat und Tat stets zur Seite standen. Dies alles trug zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre bei.

An dieser Stelle ist es mir ein besonderes Anliegen Personen meinen Dank auszusprechen, die mich immer während der letzten Jahre im Hintergrund unterstützten, um dieses große Projekt zielstrebig fertigzustellen. Zu diesem ehrwürdigen Kreis gehören Lies Friedrich, vor allem wegen der Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen, Louis Reese, Dominik Rehm, Simon Lay und Felicitas Körner.

Zum Schluss aber nicht letztens geht mein größter und herzlichster Dank an die Familie. Aus ihrer schier unendlichen Unterstützung schöpfte ich stets die Kraft und Motivation, um die Herausforderungen, welche mit dieser Doktorarbeit einhergingen, anzunehmen und zu meistern. Die promotionsbedingten Schwierigkeiten mit denen ich sie konfrontierte, waren für sie nie ein „nolle me tangere“. Wegweisende Ratschläge halfen mir stets weiter, so dass gesagt werden muss: Nur durch meine Eltern und Geschwistern habe ich den jetzigen Stand erreichen können.