

**Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. Georg Ertl**

**Histologische Untersuchungen zur Entwicklung der Atherosklerose unter besonderer
Berücksichtigung der Elastin- und Kollagenkomponenten sowie der Inflammation der
Gefäßwand an ApoE-Knockout-Mäusen**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Christian Schrodtt
aus Arnstein-Büchold

Würzburg, Mai 2014**

Referent: Prof. Dr. Dr. Dipl. Phys. Wolfgang Rudolf Bauer

Korreferent: Prof. Dr. Thorsten Bley

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2014

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung der Atherosklerose	1
1.1.1 Historisches	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Risikofaktoren und Prävention	1
1.2 Atherogenese	2
1.3 Elastizität und Steifigkeit der Gefäßwand	3
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	4
1.4.1 Elastinfragmentierung	4
1.4.2 Kollagengehalt	6
1.4.3 Makrophageneinwanderung	6
2. Material und Methoden	7
2.1 Versuchstiere	7
2.2 Präparatvorbereitung	7
2.2.1 Präparatgewinnung	7
2.2.2 Schnittebenenauswahl	8
2.3 Färbemethoden	10
2.3.1 Elastika nach van Gieson	10
2.3.2 Pikro-Sirius-Rot nach Puchtler	11
2.3.3 Makrophagendarstellung mit CD68 Antikörper	11
2.4 Auswertungsmethoden	13
2.4.1 Elastinfragmentierung	13
2.4.2 Kollagenanteil	15
2.4.3 Makrophageneinwanderung anhand Anti-CD68-Quantifizierung	18
2.5 Statistik	22

3. Ergebnisse	23
3.1 Elastinfragmentierung	23
3.1.1 Aorta ascendens	23
3.1.2 Aorta abdominalis	24
3.2 Kollagenanteil	25
3.2.1 Aorta ascendens	26
3.2.2 Aorta abdominalis	28
3.3 Makrophageneinwanderung anhand Anti-CD68-Quantifizierung	29
3.3.1 Aorta ascendens	30
3.3.2 Aorta abdominalis	31
4. Diskussion	34
4.1 Elastinfragmentierung	34
4.1.1 Methodendiskussion	34
4.1.2 Ergebnisdiskussion	35
4.2 Kollagenanteil	37
4.2.1 Methodendiskussion	37
4.2.2 Ergebnisdiskussion	37
4.3 Makrophageneinwanderung anhand Anti-CD68-Quantifizierung	39
4.3.1 Methodendiskussion	39
4.3.2 Ergebnisdiskussion	40
5. Zusammenfassung	41
6. Literaturverzeichnis	44
7. Abbildungsverzeichnis	47
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

Aa.: Arteriae

Ak: Antikörper

Ao.: Aorta

ApoE(-/-): homozygotes Knockout-Gen für Apolipoprotein E

CD68: cluster of differentiation 68

CT: Computertomographie

DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol

FITC: Fluoresceinisothiocyanat

h: Stunde

IgG: Immunglobulin G

mm: Millimeter

µm: Mikrometer

mm²: Quadratmillimeter

MRT: Magnetresonanztomographie

ms: Millisekunde

m/s: Meter pro Sekunde

NRS: Normal Rabbit Serum

PBS-Puffer: phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)

PWV: pulse wave velocity (Pulswellengeschwindigkeit)

1. Einleitung

1.1 Bedeutung der Atherosklerose

1.1.1 Historisches

Die Atherosklerose ist nicht nur eine Erkrankung der Neuzeit: Einer der frühesten, nachgewiesenen Fälle von Atherosklerose reicht über 3000 Jahre zurück ins alte Ägypten. Abdelfattah et al. untersuchten die Mumie einer Frau, die um das Jahr 1570 v. Chr. gelebt hat, computertomographisch und konnten hierbei Hinweise auf atherosklerotische Prozesse im Arcus aortae finden.¹

1.1.2 Epidemiologie

Noch heute ist die Atherosklerose und deren Folgeerkrankungen ein weltweit verbreitetes Gesundheitsproblem. Vor allem in den Industrieländern sind sie nach wie vor die Hauptursache für Morbidität und Mortalität.²

Ein entsprechendes Bild zeigt die Todesursachenstatistik 2012 des Statistischen Bundesamtes Deutschlands: Im Jahr 2012 verstarben insgesamt 349.217 Menschen an den Folgen einer Krankheit des Kreislaufsystems (ICD10 I00-I99), was somit die häufigste Todesursache darstellt. Unter diesen sind als „wichtigste spezifische Todesursachengruppe“ die ischämischen Herzkrankheiten mit 128.171 Sterbefällen, bei denen die Atherosklerose eine bedeutende Rolle bezüglich ihrer Ätiologie spielt.³ Trotz Aufklärung und Kenntnisse über deren Gefahren haben sie nicht an Bedeutung verloren, sondern sind ein immer größer werdendes Gesundheitsrisiko.²

1.1.3 Risikofaktoren und Prävention

Da viele komplexe Zusammenhänge zur Atherogenese beitragen, konnte eine eindeutige Ätiologie der Atherosklerose bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Als Risikofaktoren gelten vorrangig arterielle Hypertonie, Übergewicht, Diabetes mellitus, Rauchen, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, Lebensalter, genetische Faktoren, unausgewogene Ernährung und ungünstige Lebensweise.^{2,4-8}

Früh wurde eine Abhängigkeit vom Blutfettspiegel, insbesondere HDL, LDL und Triglyceridspiegel, vermutet und in Untersuchungen belegt.^{4, 6, 9}

Problematisch ist, dass das Auftreten und Fortschreiten der Krankheit für den Betroffenen lange Zeit „stumm“, in Form einer subklinischen Atherosklerose verläuft, bis sich Symptome, wie kardiovaskuläre Beschwerden, abzeichnen. Mittels verschiedener bildgebender Verfahren, wie CT, MRT und Angiographie, ist es möglich, vorhandene atheromatöse Ablagerungen und Stenosen in Blutgefäßen darzustellen oder mit Hilfe des Knöchel-Arm-Indexes (ABI) auch periphere Gefäßstenosen zu erkennen. Jedoch bleibt trotz allem die große Herausforderung, die Bedeutung dieser Parameter richtig einzuschätzen und bereits vor einer Manifestation von Symptomen einzugreifen.²

Auf Grund dessen ist eine Identifizierung von Frühindikatoren einer beginnenden atherosklerotischen Veränderung ebenso essentiell wie effektive Präventionsmaßnahmen.

1.2 Atherogenese

Die Atherosklerose entsteht als Folge einer mehrstufigen, chronischen Entzündungsreaktion der Gefäßwand. Ausgehend von einem lokalen NO-Mangel in der durch multiple Faktoren geschädigten Gefäßwand, kommt es zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Endothels („Endotheliale Dysfunktion“). Hierdurch können insbesondere LDL-Moleküle und andere Plasmabestandteile eindringen.¹⁰

Makrophagen nehmen Scavenger-Rezeptor-vermittelt das in der Intima oxidierte LDL auf und wandeln sich zu typischen Schaumzellen um. Makroskopisch entstehen hierdurch subendotheliale Fetteinlagerungen („fatty streaks“)¹¹.

Außerdem werden lokal verschiedene Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle sowie Entzündungsmediatoren gebildet. Infolgedessen wandern Smooth-muscle-Zellen aus der Tunica media in die Tunica intima ein und proliferieren dort. Diese produzieren extrazelluläre Matrix, die die gebildete Fetteinlagerung umhüllt. Es entsteht ein Plaque, der sich zu unterschiedlichen Anteilen aus Fett und Bindegewebe zusammensetzen kann.^{12, 13}

Für die ursächliche Entstehung von atherosklerotischen Läsionen gibt es nun zwei verschiedene Hypothesen:

- Response-to-injury-Hypothese von R. Ross:

Als initiiertes Ereignis der Atherogenese wurde die Reaktion auf eine Endothelschädigung in mechanischer, chemischer oder immunologischer Weise¹³ oder „Endothelfreilegung“¹² angesehen.

In der heutigen, modifizierten Form dieser Hypothese wird die „endotheliale Dysfunktion“ als Auslöser der Atherosklerose angenommen.¹⁰

- „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“-Hypothese nach J. L. Goldstein¹⁴⁻¹⁶:

Die oxidative Modifizierung des in die Intima eingedrungenen LDLs ist hierbei die initiale Ursache der Atherogenese.

1.3 Elastizität und Steifigkeit der Gefäßwand

Die Elastizität der Gefäßwand ist eine Grundvoraussetzung für eine regelrechte Gefäß- und Herzfunktion. Laut der Windkessel-Theorie sind die großen zentralen Blutgefäße, insbesondere die Aorta, durch ihren hohen Anteil elastischer Gefäßwandschichten dazu in der Lage, die unterschiedlichen Druckverhältnisse während Systole und Diastole aufzufangen und einen geregelten Blutstrom an die peripheren Gefäße weiterzugeben.¹⁷

Atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand bedingen eine Verminderung der elastischen Eigenschaften des Gefäßes.¹⁸

Auch als physiologische Alterserscheinung nimmt die beschriebene Elastizität der Gefäßwand auf Grund von Beschädigungen und Desorganisation der elastischen Laminae ab, was die Wand steifer macht. Des Weiteren wird auch eine Verschiebung des Elastin-Kollagen-Verhältnisses beschrieben.^{19, 20}

Durch Zunahme der Gefäßsteifigkeit steigen die Belastung des Herzens, der systolische Blutdruck und damit das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen.^{21, 22}

Als physikalischer Parameter zur Beurteilung der Gefäßsteifigkeit wird die Pulswellengeschwindigkeit (PWV) verwendet. Sie ist definiert als Geschwindigkeit des

Druckpulses entlang einer Arterie. Die Veränderung der PWV scheint als Indikator eines beginnenden Gefäßleidens und dessen Folgen dienen zu können.²³⁻²⁶

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die interdisziplinäre Arbeitsgruppe Bauer, Herold, Jakob et al. (Medizinische Klinik und Poliklinik I, Lehrstuhl Experimentelle Physik V; Würzburg) führte Messungen der lokalen PWV und der Gefäßwanddicke an mehreren Messpunkten innerhalb der Aorta am ApoE(-/-)-Mausmodell durch. Eine Zunahme der lokalen PWV konnte durch Magnet-Resonanz-Tomographie nachgewiesen werden, bevor Veränderungen der Gefäßwanddicke oder atherosklerotische Plaques zu messen sind.

Dabei konnte in der oberen abdominalen Aorta ein signifikanter Anstieg der lokalen PWV zwischen sechs und 18 Wochen alten ApoE(-/-)-Mäusen nachgewiesen werden, ohne dass sich die Gefäßwand verdickt. Dies trat erst im Alter von 30 Wochen auf. Die lokale PWV entwickelte sich hier bei den ApoE(-/-)-Tieren von $2,0 \pm 0,1$ m/s (sechs Wochen) über $2,9 \pm 0,2$ m/s (18 Wochen) bis zu $3,1 \pm 0,3$ m/s (30 Wochen). In der Kontrolle ließ sich ein geringerer Anstieg messen: ($2,0 \pm 0,1$) m/s bei sechs Wochen, $2,2 \pm 0,2$ m/s (18 Wochen) bis zu $2,3 \pm 0,1$ m/s (30 Wochen).²⁷

Hieraus ergibt sich eine zentrale Fragestellung: Lässt sich für die frühzeitige Erhöhung der lokalen PWV ein histomorphologisches Korrelat finden?

Um diese Frage zu beantworten, werden folgende drei Parameter in vorliegender Arbeit über einen Zeitraum von 30 Wochen an der Aorta im Mausmodell untersucht:

1. Elastinfragmentierung der elastischen Laminae der Tunica media und intima
2. Kollagengehalt der gesamten Gefäßwand
3. Makrophageneinwanderung in die Gefäßwand

1.4.1 Elastinfragmentierung

Grundlage dieses Untersuchungsaspektes soll folgende Hypothese sein: Durch Brüche der elastischen Laminae beziehungsweise Desorganisation der elastischen Fasern innerhalb der Gefäßwand nimmt die Elastizität eines Gefäßes ab und dadurch dessen Steifigkeit zu, was sich in einer erhöhten Pulswellengeschwindigkeit manifestiert.

Die elastischen Laminae und deren Beschaffenheit zeigen sich in bisherigen Untersuchungen verschiedener Autoren am Tiermodell als wichtiger Einflussfaktor auf Gefäßsteifigkeit und mechanische Eigenschaften.^{20, 28, 29}

So postuliert O'Rourke, dass sich ein Zusammenhang zwischen Beschädigungen dieses elastischen Gefäßwandanteils und der entsprechenden Zunahme der Gefäßwandsteifigkeit ergibt.³⁰

Die Forschungsgruppe Santelices et al. nahm hierzu ex-vivo Messungen der Aorta vor, um deren Steifigkeit zu bestimmen und die Gründe hierfür zu untersuchen. Dabei stellten sie einen Anstieg der Gefäßsteifigkeit mit fortschreitendem Alter fest. Ebenso war eine Zunahme der Desorganisation und Beschädigung der elastischen Fasern in der Aortenwand mittels qualitativer Analysen transversaler Schnitte erkennbar.³¹

Wie in weiteren Veröffentlichungen beschrieben (Osborne-Pellegrin et al.²⁹), wird angenommen, dass die in der Gefäßwand enthaltene Lamina elastica interna (IEL) aus konzentrisch angeordneten Lagen vernetzter elastischer Fasern besteht. Osborne-Pellegrin et al. stellten in ihrer Arbeit die Lamina elastica interna in weiten, longitudinalen Schnittebenen eines Gefäßes dar und konnten so Rupturen der elastischen Laminae zeigen.²⁹

Derartige Rupturen werden auch bei Jones et al. in untersuchten ApoE(-/-)-Mäusen als initiale atherosklerotische Läsion beschrieben.²⁸

Während Santelices et al.³¹ die Elastinfragmentierung in qualitativer Weise bestimmten und anhand dessen einen Zusammenhang mit Atherogenese und Gefäßwandsteifigkeit im Mausmodell herstellten, wird in vorliegender Arbeit die Anzahl der Brüche der elastischen Laminae bezogen auf die Gefäßwandquerschnittsfläche quantitativ bestimmt. Das in der Gefäßwand enthaltene Elastin wird mit Hilfe einer histologischen Anfärbung hervorgehoben und Kontinuitätsunterbrechungen der Elastinlaminae zahlenmäßig in lokalen Abschnitten der Aorta ascendens sowie der Aorta abdominalis untersucht. Dies ermöglicht eine objektive Beurteilung der Elastinveränderung und damit eine bessere Vergleichbarkeit der Testgruppen.

Im Gegensatz zur longitudinalen Schnittführung von Osborne-Pellegrin et al.²⁹ werden in dieser Arbeit transversale, histologische Schnitte verwendet. Dies bringt den Vorteil,

dass der gesamte Gefäßwandquerschnitt bezüglich lokaler Elastinfragmentierung beurteilt werden kann. Damit können diese Veränderungen gezielt mit jenen Bereichen in Verbindung gebracht werden, in denen sich eine im MRT nachgewiesene lokale Pulswellengeschwindigkeitserhöhung messen ließ.

1.4.2 Kollagengehalt

Als weiterer mechanischer Parameter, der einen Beitrag zu einer Erhöhung der Gefäßsteifigkeit leisten kann, ist der Kollagenanteil der Gefäßwand untersucht und beschrieben.^{20, 23, 29, 32, 33}

Daher soll auch die Entwicklung des Gefäßkollagens und die möglicherweise erhöhte Bildung und Ablagerung solcher Fasern anhand von lokalen, histologischen, transversalen Schnitten bestimmt werden. Es soll überprüft werden, ob ein erhöhter Kollagenanteil die Gefäßwand auf restriktive Weise einschränkt oder versteift und letztlich die lokale PWV erhöht.

1.4.3 Makrophageneinwanderung

Bei dem im Zusammenhang mit der Atherogenese ablaufenden Entzündungsprozess und der Plaqueentstehung spielen in die Gefäßwand eingewanderte Makrophagen und deren Umwandlung in Schaumzellen eine bedeutende Rolle.^{10, 34-37} Entsprechend der „Lipoprotein-induced-atherosclerosis“-Hypothese nach J. L. Goldstein wird als initiierendes Ereignis der Atherogenese die Aufnahme von modifiziertem LDL durch Makrophagen und der daraus resultierenden Folgen angenommen.^{14, 15}

Durch den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbau mit nach Western-Typ-Diät gefütterten ApoE-Knockout-Mäusen werden rasch atherosklerotische Gefäßwandläsionen und Plaques provoziert. Nun soll untersucht werden, ob die Makrophagenbesiedelung der Gefäßwand in Zusammenhang mit der früh ansteigenden lokalen PWV steht. Die Makrophagen werden hierbei durch einen geeigneten Antikörper gegen das makrophagenspezifische CD68-Protein sichtbar gemacht und in oben beschriebener Schnittführung quantitativ als Besiedelungsfläche untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Auf Grund der für die Atherogeneseforschung passenden Eigenschaften wird die Maus als bewährtes Tiermodell ausgewählt.³⁸⁻⁴²

Für die vorliegende Arbeit werden Versuchstiere verwendet, bei denen bereits Pulswellengeschwindigkeit und Gefäßwanddicke bestimmt sind (Gotschy et al.²⁷). Alle Tiere wurden von Charles River Laboratories Germany GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

Insgesamt werden zwei Versuchstiergruppen unterschieden: Jede besteht aus drei gleich großen Untergruppen, die sechs, 18 und 30 Wochen alt sind. Die Testtiergruppe besteht aus 26 ApoE-Knockout-Mäusen (B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}; im Folgenden ApoE(-/-) genannt), die durch ihre homozygote Knockout-Modifikation der Gensequenz des Apolipoproteins E extrem zu Atheroskleroseentwicklung neigen. Dieser Gendefekt verursacht Fehlfunktionen in verschiedenen Lipoproteinen und an LDL-Rezeptoren, wodurch eine atherogene Dyslipidämie und stark erhöhte Cholesterinspiegel begünstigt werden. Um den Effekt noch weiter zu verstärken, erhalten die ApoE(-/-)-Mäuse von Versuchsbeginn an nur spezielles, besonders fett- und cholesterinreiches Futter (TD88137; ssniff GmbH, Soest, Deutschland) in Form einer Western-Typ-Diät.

Als Kontrollgruppe werden 24 „C57BL/6J“-Mäuse verwendet, die keine genetischen Veränderungen aufweisen und ausschließlich mit ausgewogenem Futter ernährt werden. Sie dienen als Referenzgruppe, um die Gefäßentwicklung während des physiologischen Alterungsprozesses zu charakterisieren.

Die unterschiedliche Ernährung und genetische Ausstattung der Tiere ist eine Notwendigkeit, um den für diese Arbeit zu untersuchenden Zustand zu induzieren.

2.2 Präparatvorbereitung

2.2.1 Präparatgewinnung

Die zuvor angesprochene Fragestellung soll an Abschnitten der Aorta ascendens sowie der Aorta abdominalis ex vivo erforscht werden. Hierzu werden die benötigten

Segmente nach dem Töten der Mäuse durch Präparation dargestellt, entnommen, zur Fixierung in Tissue Tec® O.C.T.TM Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet und bei -80° C tiefgefroren. Die Präparate werden so angepasst, dass jede Maus ein ähnlich konfiguriertes Gewebepreparat liefert. Dieses beinhaltet das Mäuseherz mit aufsteigendem Teil der Aorta, Aortenbogen und absteigendem Anteil sowie, parallel hierzu in den Präparatblock eingelassen, den Anteil der Aorta abdominalis, der aus dem Bereich zwischen Zwerchfelldurchtritt der Aorta und Abgang der Arteriae renales stammt. Von diesem gefrorenen, eingebetteten Gewebe werden anschließend bei -25° C mit Hilfe eines Kryotoms (Leica CM1850; Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) vom oberen Pol des Gewebeblocks beginnend und mit einer Schnitfführung quer zur Aortenlängsachse zehn 8 µm starke Schnitte erstellt, von denen jeder zweite verworfen wird. Die folgenden 500 µm des Gewebeblocks werden für diese Untersuchung nicht verwendet. Daraufhin wird nach vorhergehender Beschreibung eine weitere Serie 8 µm starker Schnitte erstellt. Diese beiden Vorgänge wiederholen sich abwechselnd bis der gesamte Präparatblock aufgearbeitet ist. Auf diese Weise erhält man pro Maus in meist 14 Höhenebenen, die jeweils 500 µm weit voneinander entfernt liegen, eine Serie von fünf gleichwertigen und 8 µm starken Gewebsschichten, die in Bezug zum fixierten Gewebe etwa auf gleicher Höhe liegen. Hierdurch kann die Aorta einer Maus mit bis zu fünf unterschiedlichen histologischen Färbeverfahren untersucht werden. Die Ergebnisse dieser verschiedenen Methoden können in nahezu identischer Ebene miteinander verglichen werden.

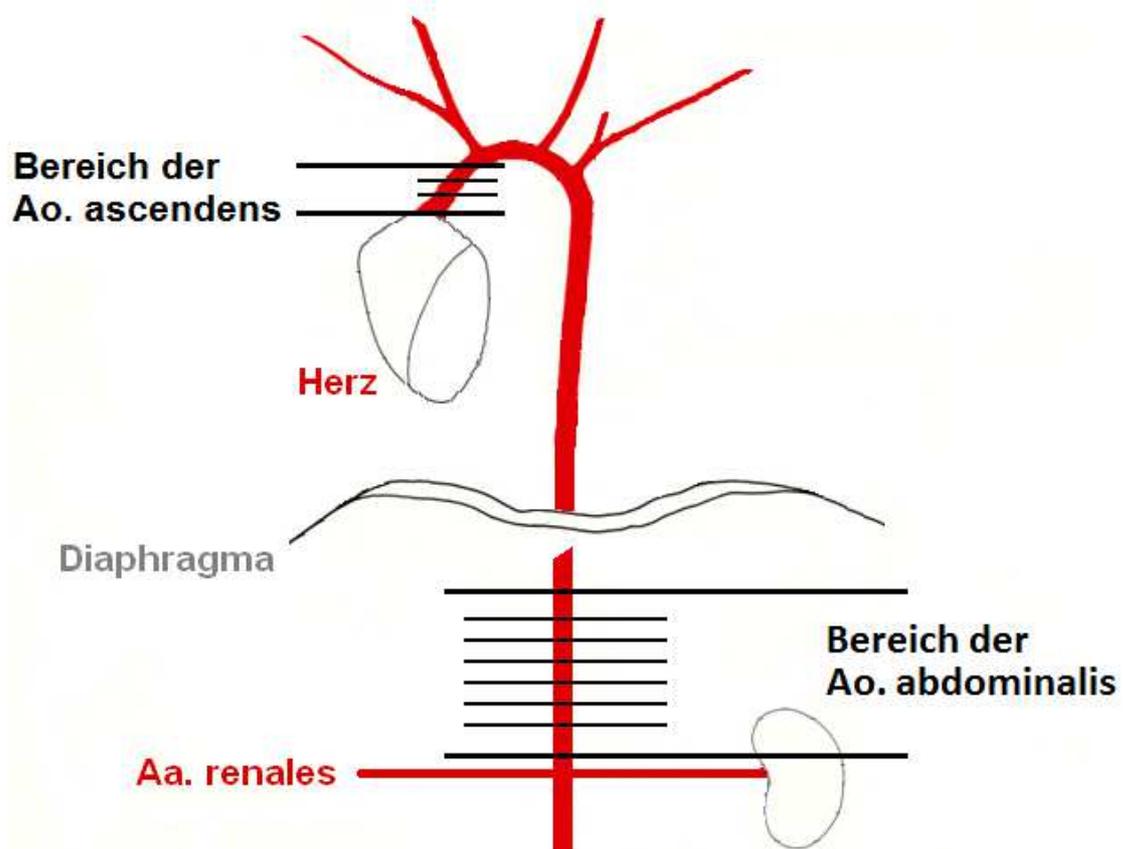
2.2.2 Schnittebenenauswahl

Um die Resultate der lokalen PWV-Messungen mit den histologischen Betrachtungen in Beziehung setzen zu können, soll möglichst dieser Bereich der Aorta histologisch betrachtet werden, an dem auch die MRT-Messungen der PWV erfolgten. Es werden die Aorta ascendens und die Aorta abdominalis analysiert:

Für die Aorta ascendens wird hierzu in ihrem Verlauf der Bereich zwischen Aortenwurzel und Aortenbogen betrachtet. Um diesen Bereich aussagekräftig zu repräsentieren werden drei Schnittebenen, die zwischen den beiden erwähnten

Grenzknoten liegen und zueinander einen gleichen Abstand aufweisen, ausgewählt und entsprechend der jeweiligen Fragestellung untersucht.

Gleichermaßen wird bei dem zu untersuchenden Anteil der Aorta abdominalis verfahren. Das relevante Untersuchungsareal für diese erstreckt sich von einer Ebene, die 2 mm kaudal des Zwerchfelldurchtritts der Aorta lokalisiert ist und zugleich auch als Messpunkt im MRT galt, bis zu einer hiervon 7 mm kaudal gelegenen Grenzmarke (Grafik 1).



Grafik 1: Schematische Darstellung untersuchter Bereiche innerhalb der Aorta

Da der Zwerchfelldurchtritt der Aorta individuell variabel ist und somit dieser Punkt bei histologischer Betrachtung nicht mit Eindeutigkeit lokalisiert werden kann, wird durch die Untersuchung dreier über diesen Bereich gleichmäßig verteilter Ebenen ein statistisch aussagekräftiges Mittel über die lokalen Verhältnisse angestrebt.

2.3 Färbemethoden

2.3.1 Elastika nach van Gieson

Zur histologischen Darstellung elastischer Laminae wird eine modifizierte Elastika-Färbung nach van Gieson gewählt. Für diese Methode wird eine Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert benötigt, die elastische Laminae in einer schwarzen bis dunkelvioletten Farbe erscheinen lässt. Die erforderliche Lösung wird einem Elastika van Gieson Kit (Art.-Nr. 1.15974.0001; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) entnommen. Es zeichnet sich in zahlreichen Färbereihen bei Verwendung dieser Komponenten mit Kryogewebepräparaten ab, dass sich bei ausschließlicher Nutzung der Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert Elastinlaminae und deren Fragmentierung am besten darstellen lassen. Auf ein Gegenfärben des umliegenden Gewebes durch die übrigen Bestandteile des Färbekits, wie Weigerts-Eisenhämatoxylin und Pikrofuchsin nach van Gieson, kann somit verzichtet werden.

Folgendes Färbeprotokoll kommt zur Anwendung: Vor Verwendung der auf Objektträger platzierten, gefrorenen Gewebeschnitte müssen diese bei Raumtemperatur mindestens 30 min lang auftauen. Danach folgt ein siebenminütiges Eintauchen in Aqua destillata. Nun werden die Schnitte genau 10 min in Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert angefärbt. Nach Abschluss des Färbevorgangs muss ein Spülen unter fließendem Leitungswasser für eine Minute erfolgen, woran sich ein kurzes Einbringen der Präparate in Aqua destillata anschließt. Dann folgt eine Entwässerung des Gewebes mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe. Hierzu werden die Präparate nacheinander in 50%-igem, 75%-igem und 96%-igem Ethanol für je eine Minute eingetaucht. Danach verweilt das Färbegut zu je 5 min der Reihe nach in einem Gemisch aus gleichen Teilen Xylol und Ethanol, in Xylol und in zwei verschiedenen Behältnissen mit Rotihistol. Abschließend wird das Gewebe mit einem Eindeckmedium (Entellan®; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert und durch ein Deckglas geschützt.

2.3.2 Pikro-Sirius-Rot nach Puchtler

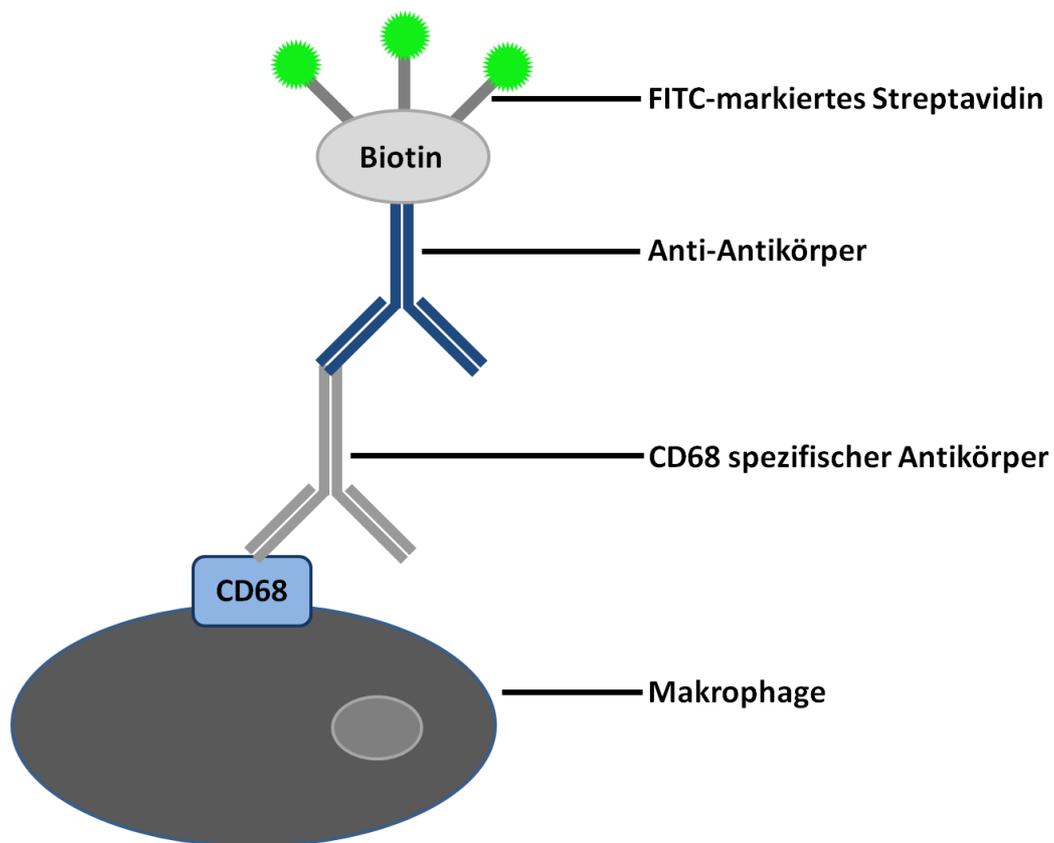
Um den Kollagenanteil der Präparate histologisch deutlich sichtbar zu machen, wird eine modifizierte, kollagenspezifische Pikro-Sirius-Rot-Färbung (nach Puchtler et al.⁴³) verwendet. Durch diese lässt sich Kollagen im Lichtmikroskop als rot angefärbte Struktur erkennen. Anfärbendes Reagenz bei dieser Methode ist ein Gemisch, das zu neun Teilen aus gesättigter Pikrinsäure (C.I.10305) und zu einem Teil aus 1%-igem Sirius-Rot (C.I.35780) besteht und erst nach einer Mindestdauer von 24 h nach Erstellung verwendet werden kann. Wie bei der vorherigen Färbemethode dargestellt, müssen die Präparate hierfür ebenso aufgetaut werden, um sie anschließend für genau 35 min in das Pikro-Sirius-Rot-Reagenz zu geben. Danach werden die Objektträger nacheinander in drei verschiedene, mit Aqua destillata befüllte Gefäße je dreimal eingetaucht. Die anschließende Entwässerung und Fixierung geschieht nach dem unter 2.3.1 beschriebenen Schema.

2.3.3 Makrophagendarstellung mit CD68 Antikörper

Die Makrophagen werden histologisch durch eine immunhistochemische Anfärbung des makrophagenspezifischen Proteins CD68 detektiert. Hierzu wird das Präparat mit Antikörpern gegen das CD68-Protein behandelt und dieses unter fluoreszierendem Licht sichtbar gemacht (Grafik 2).

Die Färbung wird nach folgendem Schema erstellt: Die gefrorenen Präparatschnitte werden eine Stunde lang bei Raumtemperatur aufgetaut und an der Luft getrocknet. Daraufhin werden diese in -20° C kaltem Aceton 10 min fixiert. Nachdem die Schnitte wiederum kurz an der Luft angetrocknet sind, werden sie dreimal zu je 5 min in PBS-Puffer gewaschen. Damit der im Folgenden aufgebrachte Antikörper nicht mit dem zweiten Schnitt auf dem gleichen Objektträger in Berührung kommt, werden diese mit Hilfe eines speziellen Markerstiftes (Imm EdgesTM Pen; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) durch eine Linie getrennt. Nun wird auf die Präparate ein 3%-iges Serum eines Hasen (Normal Rabbit Serum S-5000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) aufgebracht und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Dieses dient dazu, unspezifische Bindungen für den Antikörper gegen CD68

zu blockieren und das Gesamtergebnis so spezifischer zu machen. Anschließend wird auf einen der Schnitte jedes Objektträgers der Antikörper gegen CD68, der im Verhältnis 1:75 mit 3%-igem Normal Rabbit Serum (=NRS) verdünnt ist, aufgetragen. Auf die zweite Gewebeprobe eines jeden Objektträgers, die bei Auswertung als Kontrolle dient, wird lediglich 3%-iges NRS aufgebracht. Der Versuchsansatz muss nun über Nacht bei 4° C inkubieren.



Grafik 2: Schematische Darstellung der makrophagenspezifischen Färbung gegen CD68-Protein

Das verwendete Reagenz ist ein monoklonaler „Rat anti mouse CD68“-Antikörper vom Isotyp IgG2a des Herstellers „AbD Serotec“ (MCA1957, Bio-Rad AbD Serotec Limited, Kidlington, Oxfordshire, UK). Nach der Inkubation folgt ein dreimaliges Waschen in PBS-Puffer für jeweils 5 min. Danach werden alle Schnitte mit einem zweiten, im Verhältnis 1:100 mit 3%-igem NRS verdünnten, biotinyliertem Antikörper (Biotinylated Anti-Rat IgG (H+L) BA-4001; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA), der spezifisch gegen den CD68 Antikörper gerichtet ist und an diesem bindet, für eine

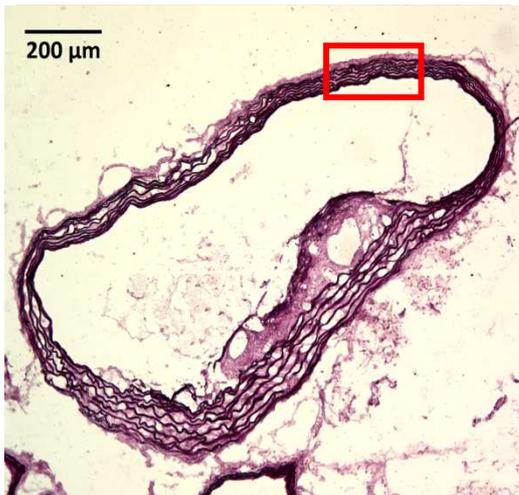
Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es schließt sich wiederum ein dreimaliges Waschen in PBS-Puffer für jeweils 5 min an. Nun wird im Verhältnis 1:100 verdünntes, FITC-markiertes Streptavidin (Streptavidin fluorescein SA-5001; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben. Nachdem sie dann für 5 min in PBS-Puffer gespült wurden, werden die Präparate abgetrocknet und die Zellkerne mit 1:1000 verdünntem DAPI für 15 min bei Raumtemperatur gegengefärbt. Anschließend wird nochmals für zweimal 3 min in PBS-Puffer gewaschen und die Schnitte auf den Objektträgern mit einem speziellen Eindeckmedium (Vectashield® - Mounting Medium for Fluorescence H-1000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) fixiert. Die angefärbten histologischen Präparate werden zur besseren Konservierung des Fluoreszenzeffektes kühl und dunkel gelagert.

2.4 Auswertungsmethoden

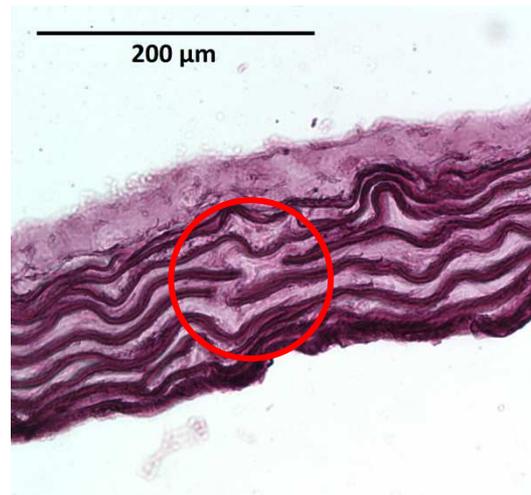
2.4.1 Elastinfragmentierung

Die Quantifizierung der Elastinfragmentierung wird wie folgt durchgeführt: Die einzelnen Schnittebenen, die zuvor mit dem Verfahren Elastika van Gieson angefärbt wurden, werden mit Hilfe eines Mikroskops des Modells „Axioskop 2 plus“ (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland), einer aufgesetzten Digitalkamera (Modell 14.2 Color Mosaic; SPOT Imaging Solutions, a division of Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, Michigan, USA) und der passenden Software „Spot Basic“ der Firma SPOT Imaging Solutions in der Version 4.0.9 digital aufgenommen (Grafik 3 und 4). Diese digitalen Aufnahmen werden anschließend mit dem Programm „Image J“ (Version 1.43m, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) am PC ausgewertet. Mit Hilfe dieser Softwareanwendung wird die Gefäßfläche auf der digitalen Aufnahme bestimmt, wobei zuvor für die passende Skalierung gesorgt wurde. Über die Funktion „Threshold“, die den Kontrast bestimmter Bildausschnitte verstärkt und festgelegte Farbbreiten hervorhebt, kann die auszumessende Gefäßfläche markiert und anschließend planimetrisch bestimmt werden. Durch das „Wand (tracing)

tool“-Auswahlwerkzeug wird so zuerst die Gesamtfläche des Gefäßes inklusive Lumen und anschließend dieses separat flächenmäßig berechnet. Diese beiden Werte werden dann subtrahiert, um so die reine Fläche des in der jeweiligen Schnittebene vorhandenen Gefäßquerschnitts zu erhalten. Die Plaquefläche fließt hierbei nicht in die Gefäßwandquerschnittsfläche ein.



Grafik 3: Aorta ascendens einer 30-wöchigen ApoE(-/-)-Maus bei 100-facher Vergrößerung; Elastika-van-Gieson



Grafik 4: Vergrößerte Darstellung des in Grafik 3 rot eingerahmten Areals; 400-fache Vergrößerung; Elastika-van-Gieson

Mit dem oben erwähnten Mikroskop wird der jeweilige Gefäßquerschnitt bei 1000-facher Vergrößerung betrachtet und die Elastinfragmentierung visuell bestimmt. Dabei wird jede Unterbrechung der Kontinuität einer Elastinlamina innerhalb des Gefäßwandquerschnitts als ein Bruch gewertet. In Grafik 4 werden zwei derartige Veränderungen durch einen roten Kreis markiert.

Nun werden die gemessenen Werte für den Gefäßquerschnitt und die Anzahl der Brüche für die jeweilige Schnittebene wie folgt zueinander in Beziehung gesetzt:

$$\text{Elastinfragmentierung} \left[\frac{n}{\text{mm}^2} \right] = \frac{n (\text{Anzahl der Elastinlaminarupturen})}{\text{Gefäßwandquerschnittsfläche} [\text{mm}^2]}$$

Als Ergebnis entsteht so ein Parameter mit der Einheit „Elastinlaminarupturen pro mm² Gefäßwandquerschnittsfläche“, der einen Vergleich der Elastinfragmentierung der untersuchten Aortenanteile ermöglicht.

Bei mikroskopischer Betrachtung der ersten beiden Schnittebenen der Aorta unmittelbar nach Abgang aus dem Herzen, fällt ein solch immenser Anstieg der Fragmentierungsrate der sichtbaren elastischen Laminae auf, dass diese nicht mit ausreichender Sicherheit bestimmt werden können und daher nicht ins Endergebnis der Untersuchung mit einfließen.

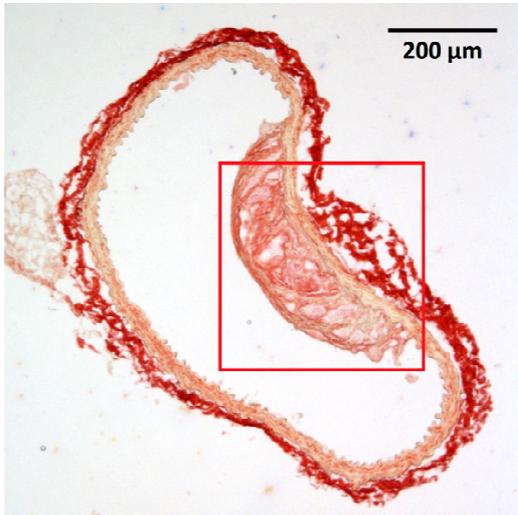
2.4.2 Kollagenanteil

Durch Pikro-Sirius-Rot ist eine Darstellung von Kollagen innerhalb von Geweben möglich, da es dieses anfärbt und seine doppelbrechende Eigenschaft erhöht. Da diese Färbung alleine Kollagen nicht spezifisch genug erkennen lässt, werden Sensitivität und Spezifität durch zusätzliche Verwendung von polarisiertem Licht erhöht.^{44, 45}

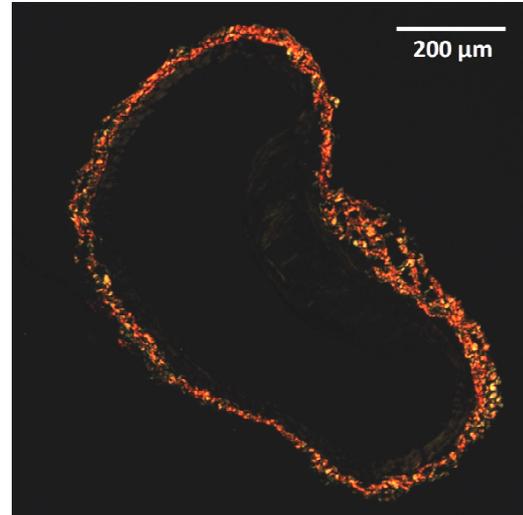
Whittaker et al. weisen nach, dass die Kollagendarstellung mittels dieser Methode durch Verwendung von zirkulär statt linear polarisiertem Licht noch verbessert werden kann. Das Kollagen wird hierdurch auf Grund seiner anisotropen Molekularstruktur und gerichteten Orientierung im Gewebe in höherem Maße hervorgehoben.⁴⁵

In vorliegender Arbeit wird deshalb zur Darstellung des Kollagenanteils der jeweiligen Schnittebenen zirkulär polarisiertes Licht während des Mikroskopierens und der digitalen Bildaufnahme verwendet. Zur digitalen Aufnahme der PSR-gefärbten Gewebeschnitte wird das gleiche Gerätesetting wie bei der zuvor beschriebenen Elastinauswertung benutzt. Um an diesem Aufbau mit zirkulär polarisiertem Licht untersuchen zu können, wird das erwähnte Mikroskop mit Hilfe eines entsprechenden Polfilters modifiziert. Die Erfassung und Auswertung des Kollagenanteils erfolgt nach einer modifizierten Methode etablierter Verfahren⁴⁶: Unter Verwendung des Programms „Spot Basic, Version 4.0.9“ werden die einzelnen Schnittebenen bei einer Belichtungszeit von 445,791 ms aufgenommen. Davor erfolgt ein Weißabgleich und Abgleich des durch das Okular sichtbaren Bildes mit dem auf dem PC dargestellten Mikroskopbildes. Als Ergebnis entsteht eine Darstellung des im Gewebe enthaltenen Kollagens, das je nach Faserdicke vor schwarzem Hintergrund in unterschiedlicher Farbgebung dargestellt wird. Größere Fibrillenkaliber erscheinen rot-orange, während

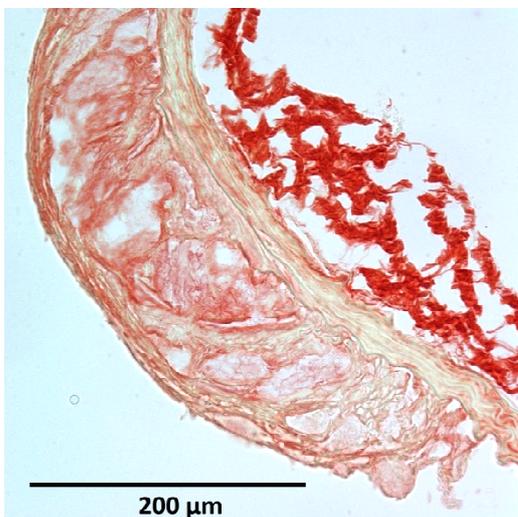
dünnere Fasern grün-gelb dargestellt werden.^{45, 46} Dies entspricht denen im Nachfolgenden als Dunkelbild bezeichneten Aufnahmen (Grafik 6 und 8).



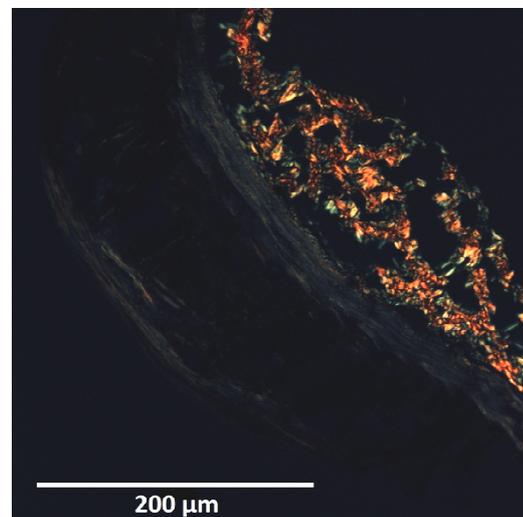
Grafik 5: Aorta abdominalis einer 30-wöchigen ApoE(-/-)-Maus bei 100-facher Vergrößerung; PSR, Durchlicht (Hellbild)



Grafik 6: Schnittebene aus Grafik 5 bei Durchleuchtung mit zirkulär polarisiertem Licht; PSR, Durchlicht mit Polfilter (Dunkelbild)



Grafik 7: Vergrößerte Darstellung des in Grafik 5 rot eingerahmten Areal; 400-fache Vergrößerung; PSR, Durchlicht (Hellbild)



Grafik 8: Vergrößerte Darstellung des in Grafik 5 rot eingerahmten Areal; 400-fache Vergrößerung; PSR, Durchlicht mit Polfilter (Dunkelbild)

Da sich der Hintergrund einer solchen Kollagendarstellung auf Grund von Artefakten und streuender Lichtstrahlen nicht stark genug von den Kollagenanteilen abhebt, muss

dieser durch digitale Nachbearbeitung optimiert werden. Dies geschieht mit Hilfe des wissenschaftlichen Bildbearbeitungsprogramms „Sigma Scan Pro“ (Version 5.0, Systat Software Inc., San Jose, Kalifornien, USA) in folgender Weise: Das Dunkelbild wird im Programm geöffnet und dupliziert. Eine Version der Aufnahme wird herangezogen und durch entsprechende Farbkanalseparation in ein Schwarz-Weiß-Bild überführt. Über die Funktion „Intensity Brightness“ wird die Helligkeit der Aufnahme nun soweit reduziert, bis nur noch die Umrisse des aufgenommenen Gewebes erkennbar sind. Mit Hilfe der Funktion „Image Math“ werden die Werte der einzelnen Pixel des modifizierten Schwarz-Weiß-Bildes vom unbearbeiteten Dunkelbild subtrahiert und es entsteht eine Kollagenaufnahme mit gutem Hintergrundkontrast und ausgeschalteten Störfaktoren.

Um den Kollagenanteil und einzelne Kollagenfibrillenkaliber quantitativ bestimmen zu können, wird das bearbeitete Bild durch die Funktion „Color Separation Typ HSV“ in Farbkanäle gesplittet. Hiervon wird als Einziger der Farbkanal „Hue“ benötigt, welcher die Intensität der Pixel eines digitalen Bildes hervorhebt. Die Pixelwerte dieser Hue-Modifikation können nun mittels eines Histogramms als Zahlenwertverteilung dargestellt werden. Unter zuvor erfolgter Zuordnung, welche Wertebandbreite des Histogramms welcher Kollagenfaserdicke entspricht, werden die Werte dieses Histogramms in eine mit „Microsoft Office Excel 2007“ (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) erstellte Tabelle überführt. Die Pixelanzahl der einzelnen Farbbereiche, die unterschiedliche Kollagenkaliber repräsentieren, wird jeweils in Relation zur Gesamtpixelanzahl des erfassten Kollagens gesetzt und so anteilig in Prozent aufgetragen.

Bis zu diesem Arbeitsschritt werden Gewebelücken und der Teil der Aufnahme, der nur Hintergrund zeigt, noch nicht für die endgültige Berechnung berücksichtigt. Um auch den Kollagenanteil bezogen auf die gesamte Gefäßwandquerschnittsfläche, zu der in diesem Untersuchungsmodus auch die Plauefläche zählt, zu berechnen, müssen die Gewebelücken noch separat bestimmt und in die Flächenberechnung einbezogen werden. Zu diesem Zweck wird zusätzlich zu jeder Aufnahme eines Präparates eine weitere in normalem Durchlicht, welches das gesamte Lichtspektrum enthält,

angefertigt. Diese Aufnahme wird im Folgenden als Hellbild bezeichnet und zeigt den gleichen Ausschnitt des Gefäßquerschnittes in identischer Vergrößerung und Position (Grafik 5 und 7).

In „Sigma Scan Pro“ wird das Hellbild geöffnet und über eine entsprechende Option in ein Graustufenbild umgewandelt, wodurch der Kontrast zum Hintergrund erhöht werden kann. Anschließend wird mit der Funktion „Intensity Threshold“ der Kontrast zwischen dargestelltem Gewebe und Hintergrund optimiert und dabei die Gewebelücken sowie der Hintergrund als rote Fläche dargestellt. Diese wird im darauffolgenden Schritt mittels „Scion Image“ (Version 4.0.3.2, Scion Corporation, Walkersville, Frederick, Maryland, USA) über eine entsprechende Funktion als prozentualer Anteil des Gesamtbildes ausgegeben. Die so bestimmten Hintergrund- und Gewebelückenanteile einer digitalen Aufnahme werden in oben genannter Tabelle mit eingebunden und der relative Kollagenanteil am Gewebe wird bestimmt.

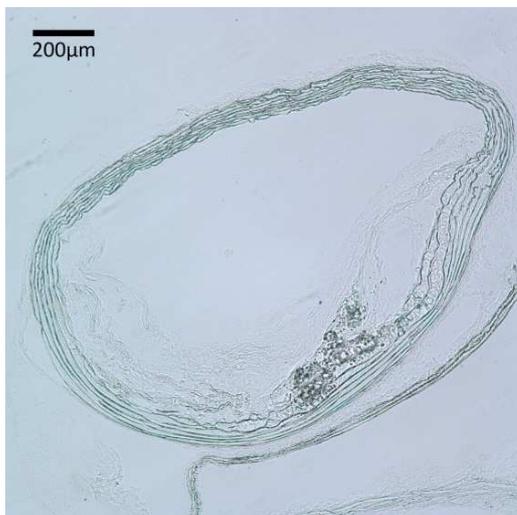
2.4.3 Makrophagenwanderung anhand Anti-CD68-Quantifizierung

Die im Rahmen der Entzündungsreaktion in die Gefäßwand eingewanderten Makrophagen sollen histologisch durch eine immunhistochemische Anfärbung des makrophagenspezifischen Proteins CD68 detektiert werden. Die grundlegende Methodik zur Anfärbung, Segmentierung und Auswertung wird an eine bereits von Burtea et al.⁴⁷ etablierte angelehnt.

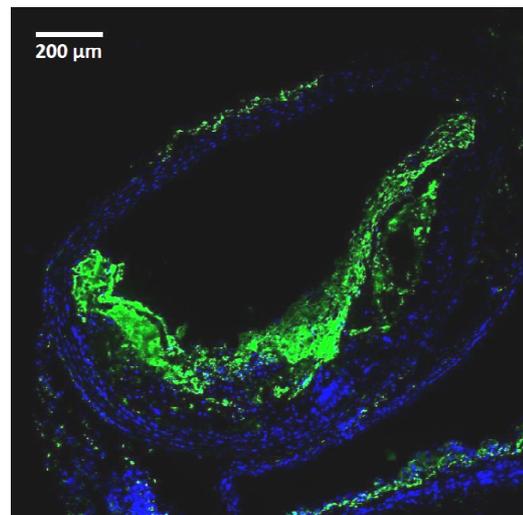
Im Laufe der histologischen Anfärbung werden unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper gegen das CD68-Protein im Gewebe geblockt. Es wird anschließend mit dem angesprochenen CD68-spezifischen Antikörper inkubiert, der daraufhin an Makrophagen binden kann. Da bis zu diesem Schritt noch kein auswertbares Signal entsteht, wird noch ein biotinylierter Anti-Antikörper eingesetzt, der an den vorangegangenen Antikörper bindet. Durch Ankopplung des Biotins sind nun mehr Bindungsstellen für das anschließend aufgebraute FITC-markierte Streptavidin vorhanden, wodurch eine Signalverstärkung erzeugt wird.

Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops kann das von FITC-markiertem Streptavidin ausgehende Signal erfasst werden, welches als Äquivalent der Makrophagedichte

angesehen wird. Um die strukturellen Verhältnisse im Gewebeschnitt besser darzustellen, werden die Kerne mittels einer DAPI-Färbung gegengefärbt. So erscheinen das CD68-Protein der Makrophagen grün und die Kerne aller Zellen blau (Grafik 10 und 11). In dieser Untersuchung wird ein Mikroskop des Modells „Axiovert 135“ von Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) verwendet. An diesem ist eine Fluoreszenzbeleuchtungseinheit „Fluo Arc“ angeschlossen, sowie eine digitale Kamera „AxioCam Mrm“, die beide ebenfalls von der Firma Zeiss produziert wurden. Durch den Aufbau und einem hieran angeschlossenen PC lassen sich digitale Aufnahmen der mit fluoreszierendem Licht beleuchteten Gewebeschnitte mit Hilfe des Computerprogramms „Axio Vision Rel. 4.5“ (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) zur weiteren Bearbeitung und Auswertung abspeichern. Hierbei werden sowohl ein separater Farbkanal für das DAPI-Signal, als auch für das FITC-Signal aufgenommen. Beide Farbkanäle werden hinterher durch das oben erwähnte Programm in einem Gesamtbild zusammengefügt.



Grafik 9: Aorta ascendens einer 30-wöchigen ApoE(-/-)-Maus bei 100-facher Vergrößerung; ungefärbt bei Durchlicht



Grafik 10: Schnittebene aus Grafik 9 unter fluoreszierendem Licht; 100-fache Vergrößerung; CD68-Immunfluoreszenz

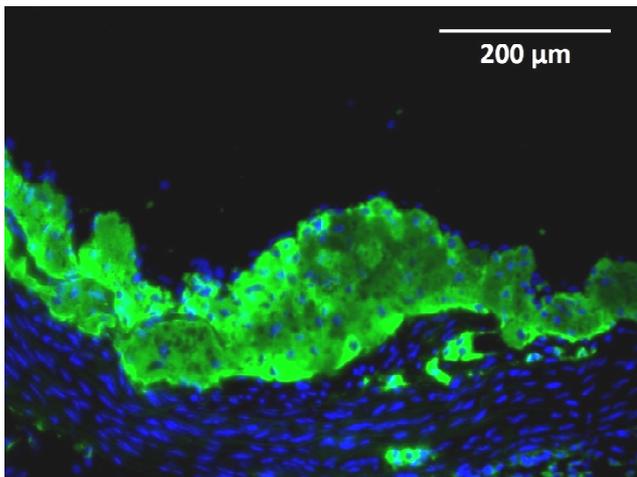
Bei allen Aufnahmen werden für die jeweiligen Vergrößerungen und Farbkanäle festgelegte und standardisierte Belichtungszeiten verwendet.

Damit die Untersuchungsergebnisse der einzelnen Ebenen miteinander verglichen werden können, muss auch für diese Färbemethode ein einheitlicher Parameter

gewählt werden. Hierzu wird ein Quotient verwendet, der die Fläche des entstehenden Signals des FITC-markierten Streptavidins in Beziehung zur jeweiligen Gefäßwandquerschnittsfläche, die in dieser Fragestellung die Plaquefläche miteinschließt, setzt:

$$\text{Makrophagenbesiedelung [\%]} = \frac{\text{CD68-markierte Fläche [mm}^2\text{]}}{\text{Gefäßwandquerschnittsfläche [mm}^2\text{]}}$$

So kann die Makrophagenbesiedelung des jeweiligen Gefäßabschnittes, welche hier als Äquivalent des fluoreszierenden Signals aufgefasst wird, anteilig an der gesamten Gefäßwandquerschnittsfläche angegeben werden. In ähnlicher Weise wird bei Sigovan et al.⁴⁸ eine Makrophagenbesiedelungsfläche in der Einheit mm² bestimmt. Um die einzelnen Ergebnisse in quantitativer Weise zu vergleichen, werden mit Hilfe der in digitalen Bildern festgehaltenen Signalanhebungen verschiedene Messwerte ermittelt. Dafür wird das digitale Foto, welches FITC- und DAPI- Signale zeigt, im Programm „Image J“ in der Version 1.43m geöffnet.



Grafik 11: Ausschnitt einer Aorta ascendens mit Plaque einer 30-wöchigen ApoE(-/-)-Maus bei 200-facher Vergrößerung unter fluoreszierendem Licht; CD68-Immunfluoreszenz

Zuvor muss jedoch das Programm mit einer Eichaufnahme eines Messobjektträgers, auf dem 1 mm aufgetragen ist, in seiner Messfunktion richtig skaliert werden. Dies wird erreicht, indem zuerst die digitale Aufnahme eines Messobjektträgers, die am gleichen Mikroskop wie die auszuwertenden Bilder unter gleichen Bedingungen aufgenommen wurde, mit „Image J“ geöffnet wird. Eine entsprechende Strecke, die der künftig verwendeten Einheit entspricht, wird als Linie markiert in Form von Pixeln bestimmt. Diese „Pixel-Strecke“ wird in der gewünschten Einheit als ein „mm“ festgelegt. So wird nun das Verhältnis der im Foto vorhandenen Pixel in Relation zur

tatsächlich vorhandenen Strecke gesetzt. Hiermit ist es dem Programm möglich, Flächenberechnungen in mm^2 auszugeben.

In der geöffneten Aufnahme wird über das Tool „Free hand selection“ manuell die äußere und innere Kontur des Gefäßquerschnitts markiert und mit Hilfe der Funktion „ROI Manager“ als Auswahl zwischengespeichert. Durch Subtraktion der durch die beiden Konturen umrissenen Flächen, ergibt sich die Netto-Gefäßwandquerschnittsfläche. Über die Funktion „Threshold“ wird der Unterpunkt Hue auf einen Wert von 110 gesetzt und hierdurch das Signal des DAPI ausgeschaltet. Nun können mit Hilfe von „Make Binary“ die restlichen Bildsignalwerte so segmentiert werden, dass nur noch die Signale als weiße Fläche auf schwarzem Hintergrund dargestellt werden, die sich auf Grund ihrer Signalstärke am deutlichsten vom Hintergrund abheben und dem durch das CD68-Protein verursachten Signal entsprechen. Über die zuvor im ROI-Manager zwischengespeicherten Flächenlokalisationen lässt sich daraufhin die Gefäßwandquerschnittsfläche im ganzen Bild separat auswählen. Über die Funktion „Analyze Particles“ werden dann alle relevanten Signalanhebungen innerhalb der markierten Fläche berechnet und aufsummiert. Jetzt können diese Signalanhebungen in Beziehung zur entsprechenden Querschnittsfläche der Gefäßwand in mm^2 und eine hieraus zu errechnende prozentuale Makrophagenbesiedelung, die dem CD68-Proteinanteil entspricht, angegeben werden. In dieser Weise werden sowohl der CD68-Proteinanteil an der gesamten Gefäßwandquerschnittsfläche, als auch an der eventuell vorhandenen, atheromatösen Fläche angeschnittener Plaques bestimmt.

Um die Messwertbestimmung weiter zu verbessern und eventuelle Fehler bei deren Erhebung deutlich zu machen, wird noch eine weitere Segmentierungsmethode angewandt und mit der erstbeschriebenen verglichen. Hierfür werden alle Schritte wie zuvor beschrieben inklusive der Anwendung der Threshold-Funktion durchgeführt. Dann wird das Bild durch „Image – Type – 8Bit“ in ein Schwarz-Weiß-Bild überführt. Anschließend geschieht die Segmentierung über die Funktion „Otsu Thresholding 8Bit“, die anhand des Schwarz-Weiß-Bildes eine Schwellwertberechnung durchführt. Die jetzt erhaltene Segmentierung wird wie bei der vorherigen Methode unter Verwendung des „ROI-Managers“ und „Analyze Particles“ flächenhaft bestimmt und

alle erwähnten Zahlenwerte auf die gleiche Weise errechnet. Diese Segmentierungsmethode erwies sich allerdings als weniger spezifisch und deutlich störanfälliger, weshalb nur die durch die erste Methode gewonnenen Ergebnisse angeführt werden.

2.5 Statistik

Alle dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Zur Überprüfung einer Normalverteilung wird der Shapiro-Wilk-Test herangezogen. Mit dem Levene-Test wird eine Homogenität der Varianzen kontrolliert. Zur Testung der Unterschiede zwischen ApoE(-/-) und Kontrollgruppen wird für normalverteilte Daten der zweiseitige Students t-Test und für nicht normalverteilte Daten der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Unterschiede innerhalb einer Untersuchungsgruppe im Zeitverlauf (Vergleich von jeweils drei Gruppen) werden mit Hilfe des ANOVA-Tests kombiniert mit einer Tukey-HSD-Korrektur (für normalverteilte Daten mit gleichen Varianzen) oder eines Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur (für nicht normalverteilte Daten und / oder ungleiche Varianzen) ermittelt. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant und $p < 0,01$ als statistisch hochsignifikant angesehen. Zur statistischen Analyse wird die Statistiksoftware „IBM® SPSS® Statistics“ (Version 20, IBM Corp., Armonk, New York, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Elastinfragmentierung

Da bisher in nur wenigen Untersuchungen, wie beispielsweise bei Jones et al.²⁸ im Speziellen für die Lamina elastica interna, quantitative Aussagen bezüglich der Entwicklung der Elastinfragmentierung im Mausmodell und deren Zusammenhang mit der Atherogenese getroffen wurden, erfolgt anhand der hier erhobenen Daten eine weitere quantitative Beschreibung dieses Effekts. Als vergleichbare Messgröße für den Grad der Elastinfragmentierung eines Gefäßabschnittes wird der Quotient „Elastinlaminarupturen pro mm² Gefäßwandquerschnittsfläche“ erstellt.

3.1.1 Aorta ascendens

Diagramm 1 stellt eine Übersicht über die gewonnenen Ergebnisse aus der Untersuchung der Aorta ascendens dar. Diese zeigt einen Anstieg der Elastinfragmentierung mit zunehmendem Alter in Test- und Kontrollgruppe.

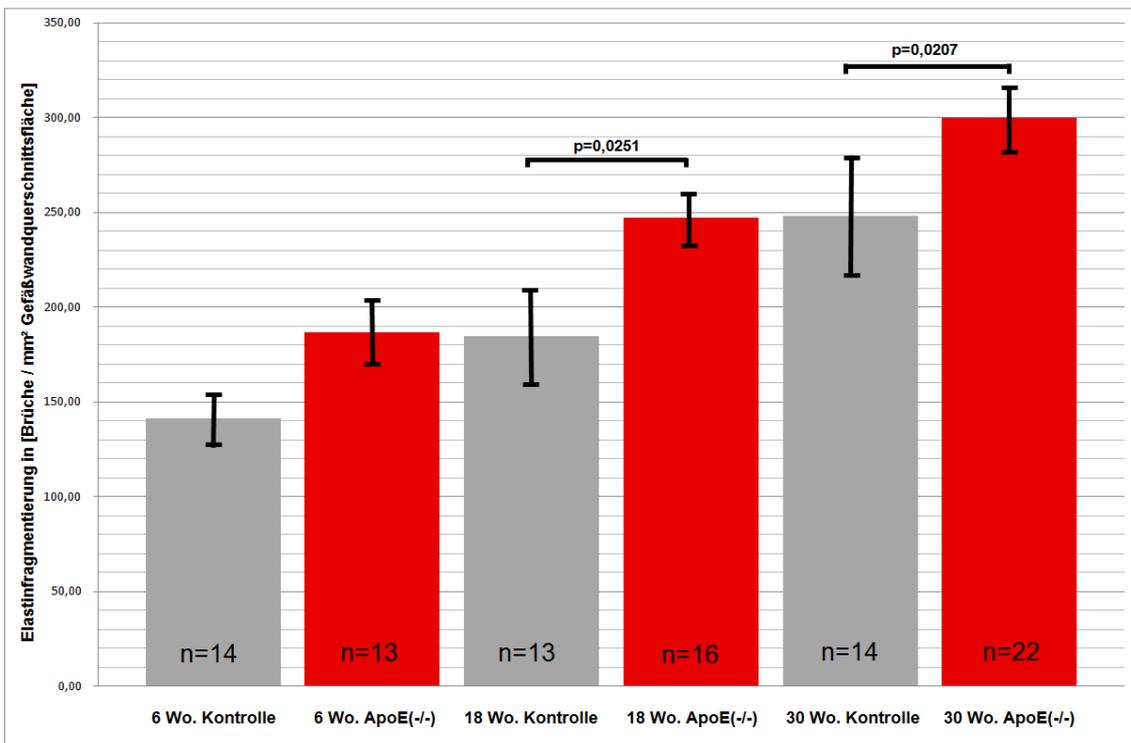


Diagramm 1: Entwicklung der Elastinfragmentierung der Aorta ascendens für ApoE(-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf; eingezeichnet sind jeweils die spezifischen Quotienten mit Standardfehler des Mittelwerts und entsprechendem Signifikanzniveau (= p); n = Anzahl untersuchter Schnittebenen pro Gruppe

Für die jüngsten Untersuchungsgruppen wird ein Quotient (im Folgenden und in 3.1.2 stets in der Einheit „Elastinlaminabrüche pro mm² Gefäßwandquerschnittsfläche“ angegeben) von 186,75±17,89 der ApoE(-/-)-Tiere und ein geringerer Ausgangswert von 141,27±13,67 der Kontrollen bestimmt. Im Verlauf steigt die Elastinfragmentierung bei 18 Wochen weiterhin an (ApoE(-/-): 247,04±14,04; „C57BL/6J“: 184,67±25,76). Die älteste Testgruppe der ApoE(-/-)-Tiere erreicht bei 30 Wochen mit einem Wert von 299,98±18,24 ein höheres Fragmentierungsniveau als die Kontrolltiere mit 248,17±32,05. Innerhalb der beiden Versuchsgruppen zeigt sich im Zeitverlauf kein eindeutig signifikanter Anstieg des beschriebenen Quotienten zwischen den Altersstufen.

Wohingegen beim Vergleich von Kontroll- und Testtieren ein statistisch signifikanter Zuwachs zwischen den 18-wöchigen Tieren mit $p = 0,0251$ und zwischen den 30-wöchigen mit $p = 0,0207$ zu verzeichnen ist. Hierbei ist, wie oben angeführt, jeweils die ApoE(-/-)-Gruppe mit einem höheren Elastinfragmentierungsgrad vertreten.

3.1.2 Aorta abdominalis

Ein eindeutigeres Ergebnisbild bietet sich bei Betrachtung der Untersuchung der Aorta abdominalis in Diagramm 2.

Auch hier steigt in beiden Gruppen mit zunehmendem Alter die Elastinfragmentierung an. Dieser Anstieg, beginnend auf einem niedrigeren Ausgangsniveau, verläuft jedoch deutlicher als in der Aorta ascendens. Die ApoE(-/-)-Mäuse zeigen durch alle Altersstufen hinweg eine höhere Fragmentierungsrate und beide Versuchsgruppen unterscheiden sich in der jeweiligen Altersstufe hinsichtlich der Dichte der auftretenden Elastinlaminabrüche. Bereits in der Altersgruppe von sechs Wochen ist bei der ApoE(-/-)-Testgruppe ein höheres Fragmentierungsniveau (96,46±8,19) gegenüber der Kontrollgruppe (79,20±5,67) zu erkennen. Dieser Trend setzt sich über die gesamte Entwicklung hinweg fort. Gegenüber den sechswöchigen Tieren ist der untersuchte Parameter bei den 18-wöchigen massiv angestiegen. So lassen die ApoE(-/-)-Tiere (221,49±14,09) ein ausgeprägteres Bild als die Kontrollen (150,91±8,93) erkennen. In der Altersgruppe von 30 Wochen zeigt sich ein ähnliches Entwicklungsverhalten (ApoE(-/-): 291,89±21,04; Kontrolle: 191,08±11,75).

Letztendlich liegt der Grad der Elastinfragmentierung in der ApoE(-/-)-Gruppe zu jeder Zeit höher als bei den Kontrollen. Ebenso ist jeweils ein größerer Quotientenanstieg im Laufe der Zeit zu erkennen.

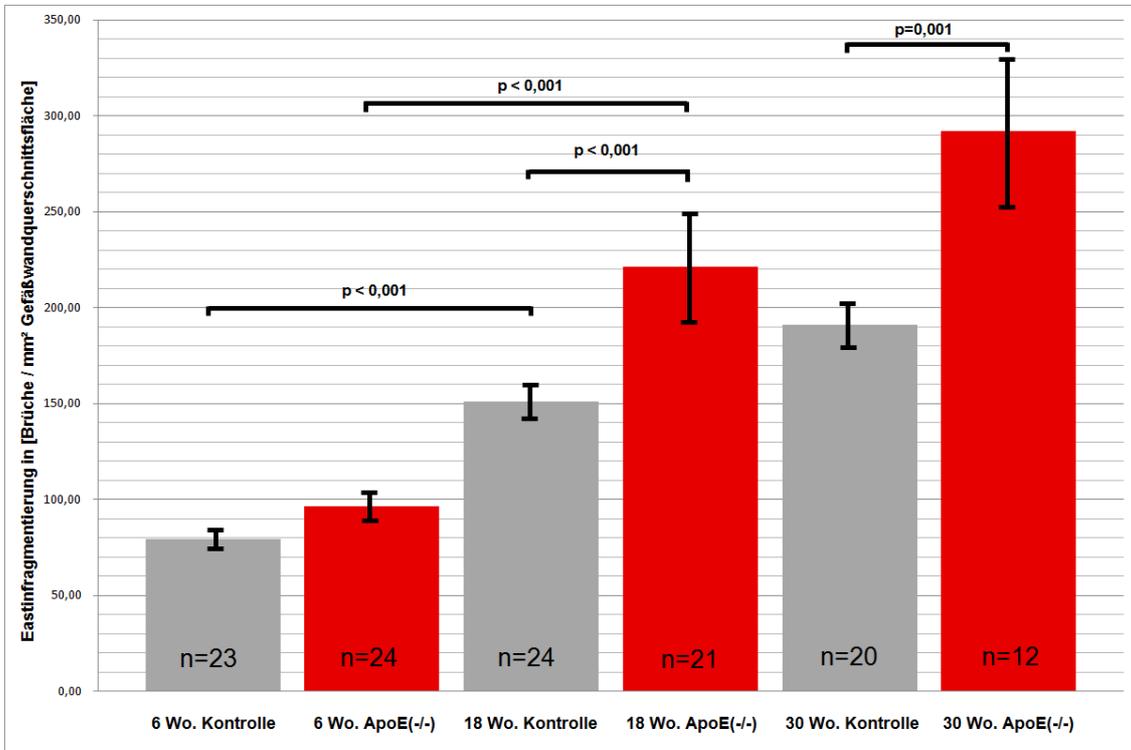


Diagramm 2: Entwicklung der Elastinfragmentierung der Aorta abdominalis für ApoE(-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf; eingezeichnet sind jeweils die spezifischen Quotienten mit Standardfehler des Mittelwerts und entsprechendem Signifikanzniveau (= p); n = Anzahl untersuchter Schnittebenen pro Gruppe

Besonders hervorzuheben ist, dass der Quotient für die 18-wöchigen Testtiere deutlich höher liegt als bei den Kontrollen und der Unterschied mit $p < 0,001$ statistisch hochsignifikant ist. Es stellt sich eine erhöhte Fragmentierung in der 30-wöchigen ApoE(-/-)-Gruppe gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe als ein signifikanter Unterschied von $p = 0,001$ dar.

3.2 Kollagenanteil

Zur Untersuchung des Einflusses des Kollagengehaltes der Gefäßwand auf deren Eigenschaften, wird dieser in Form des prozentualen Anteils des jeweils untersuchten Gefäßabschnittes histologisch analysiert. Für eine weitere Differenzierung wird der

bestimmte Gesamtkollagenanteil mittels polarisierten Lichts in die verschiedenen Fibrillendicken unterteilt.

3.2.1 Aorta ascendens

Bei der Untersuchung des prozentualen Kollagengehaltes der Aorta ascendens ist keine signifikante Zunahme mit dem Älterwerden der Untersuchungstiere, wie in Diagramm 3 zu erkennen ist, nachzuweisen.

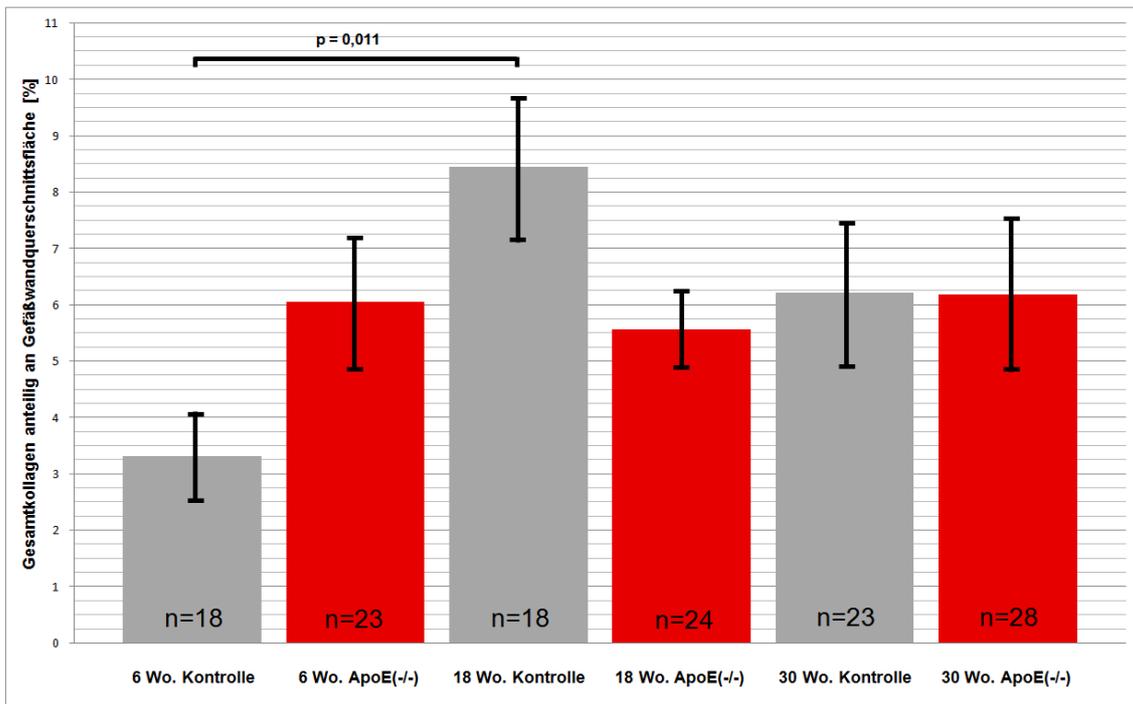


Diagramm 3: Entwicklung des prozentualen Kollagengehaltes der Aorta ascendens anteilig an der Gefäßwandquerschnittsfläche für ApoE(-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf; eingezeichnete Werte jeweils mit Standardfehler des Mittelwerts und entsprechendem Signifikanzniveau (= p); n = Anzahl untersuchter Schnittebenen pro Gruppe

Die sechswöchigen ApoE(-/-)-Mäuse weisen einen Kollagenanteil von 6,05±1,23 % auf, wohingegen bei der entsprechenden Kontrolle ein Wert von 3,32±0,80 % ermittelt wird. Mit dem Alter von 18 Wochen fällt nun der Wert der Kontrollgruppe mit 8,45±1,33 % höher als der entsprechende Vergleichswert von 5,56±1,16 % der gleichaltrigen ApoE(-/-)-Mäuse aus. Im Alter von 30 Wochen nimmt der

Gesamtkollagenanteil pro Gefäßebene in der ApoE(-/-)-Gruppe wieder zu (6,18±1,40 %), bei der Kontrolle jedoch wieder ab (6,22±1,02 %).

Wie bereits ersichtlich, liegen die erzielten durchschnittlichen Messwerte der beiden ältesten Gruppen der Kontrolltiere höher als bei den gleichaltrigen ApoE(-/-)-Tieren.

ApoE(-/-)							
Alter	Faserkaliber anteilig an Ges.-Koll. [%]				Koll.-Ant. ges. [%]	n	SEM
	rot	orange	gelb	grün			
6 Wochen	4,01	71,36	16,27	8,36	6,05	23	1,23
18 Wochen	6,33	66,45	17,40	9,82	5,56	24	1,16
30 Wochen	5,72	73,81	12,43	4,71	6,18	28	1,40

Kontrolle (C57BL/6J)							
Alter	Faserkaliber anteilig an Ges.-Koll. [%]				Koll.-Ant. ges. [%]	n	SEM
	rot	orange	gelb	grün			
6 Wochen	7,20	77,78	7,67	7,36	3,32	18	0,80
18 Wochen	11,80	62,16	14,56	11,48	8,45	18	1,33
30 Wochen	14,37	66,98	8,01	10,64	6,22	23	1,02

Tabelle 1: Messergebnisse der Aorta ascendens als Mittelwerte (Färbung PSR, ausgewertet unter polarisiertem Licht)

Faserkaliber anteilig an Ges.-Koll. [%] = prozentualer Anteil entsprechender Kollagenfibrillen am Gesamtkollagen, Koll.-Ant. ges. [%] = prozentualer Kollagenanteil an untersuchter Gefäßwandquerschnittsfläche, n = Anzahl untersuchter Schnittebenen pro Gruppe, SEM = Standardfehler des Mittelwerts

Die genauere Analyse der Kollagenuntertypen der beiden Versuchsgruppen zeigt keine klare Entwicklung im Zeitverlauf (Tabelle 1). Der orange Anteil stellt jeweils die größte Fraktion. Insgesamt fällt jedoch auf, dass sowohl in der Kontrollgruppe, als auch bei den ApoE(-/-)-Tieren alle Farbspektren beim zeitlichen Sprung von sechs auf 18 Wochen und letztlich auf 30 Wochen ein Muster erkennen lassen. Falls der Wert von sechs auf 18 Wochen ansteigt, fällt er bei 30 Wochen wieder. Nur in der orangenen Fraktion der Kontrollgruppe ist dies umgekehrt. Auch die Entwicklung des Rotanteils sticht hervor, da er im Zeitverlauf stetig zunimmt.

3.2.2 Aorta abdominalis

In Diagramm 4 werden die gewonnenen Ergebnisse bezogen auf den Gesamtkollagen-gehalt der Aorta abdominalis dargestellt.

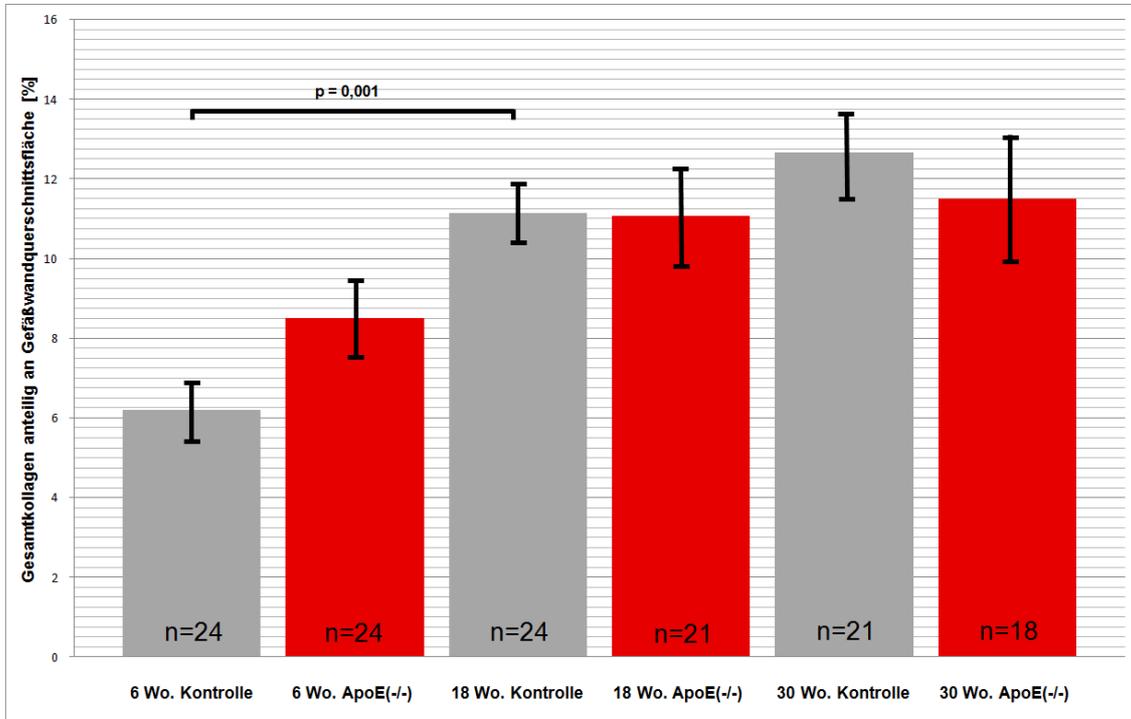


Diagramm 4: Entwicklung des prozentualen Kollagengehaltes der Aorta abdominalis anteilig an der Gefäßwandquerschnittsfläche für ApoE(-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf; eingezeichnete Werte jeweils mit Standardfehler des Mittelwerts und entsprechendem Signifikanzniveau (=p); n= Anzahl untersuchter Schnitt Ebenen pro Gruppe

Im Alter von sechs Wochen zeigt die Gruppe der ApoE(-/-)-Tiere einen durchschnittlichen Gesamtkollagenanteil von $8,51 \pm 0,96$ % an einer untersuchten Gefäßwandquerschnittsfläche gegenüber von $6,20 \pm 0,77$ % der Kontrollgruppe. Im weiteren Zeitverlauf entwickelt sich der Kollagengehalt der ApoE(-/-)-Gruppe über $11,08 \pm 1,32$ % (18 Wochen) bis zu $11,50 \pm 1,60$ % (30 Wochen). Die Kontrollgruppe weist eine etwas größere Zunahme dieses Wertes von $11,15 \pm 0,73$ % (18 Wochen) und $12,66 \pm 1,08$ % (30 Wochen) auf.

Im Gegensatz zu den Messwerten der Aorta ascendens steigt nun der Kollagengehalt in beiden Untersuchungsgruppen mit zunehmendem Alter an, jedoch zeigt die Kontrollgruppe wiederum einen höheren prozentualen Kollagengehalt in den beiden höchsten Altersstufen als die entsprechenden ApoE(-/-)-Vergleichsgruppen.

Bezüglich der Anteile der einzelnen Fibrillenkaliber am Gesamtkollagen herrscht, wie in der Aorta ascendens, eine gewisse Inkohärenz gemäß Tabelle 2 vor.

ApoE(-/-)							
Alter	Faserkaliber anteilig an Ges.-Koll. [%]				Koll.-Ant. ges. [%]	n	SEM
	rot	orange	gelb	grün			
6 Wochen	8,55	81,39	7,06	3,00	8,51	24	0,96
18 Wochen	7,85	74,48	11,49	6,17	11,08	21	1,32
30 Wochen	15,66	75,62	5,34	3,39	11,50	18	1,60

Kontrolle (C57BL/6J)							
Alter	Faserkaliber anteilig an Ges.-Koll. [%]				Koll.-Ant. ges. [%]	n	SEM
	rot	orange	gelb	grün			
6 Wochen	17,04	74,31	4,84	3,39	6,20	24	0,77
18 Wochen	12,04	76,72	8,08	3,16	11,15	24	0,73
30 Wochen	11,11	81,72	4,96	2,21	12,66	21	1,08

Tabelle 2: Messergebnisse der Aorta abdominalis als Mittelwerte (Färbung PSR, ausgewertet unter polarisiertem Licht); Abkürzungen gemäß Tabelle 1

Die jeweiligen Anteile entwickeln sich in keiner der Untersuchungsgruppen in eine bestimmte Richtung. Insgesamt ist ein ähnliches Muster wie im zuvor untersuchten Gefäßabschnitt erkennbar. Man kann jedoch feststellen, dass der größte Anteil am Gesamtkollagen zu jeder Zeit und in jeder Gruppe von der Fraktion gestellt wird, die im polarisiertem Licht orange erscheint, also einen relativ starken Fibrillendurchmesser besitzt. Im geringsten Maße ist jeweils die grüne Fraktion vertreten.

3.3 Makrophageneinwanderung anhand Anti-CD68-Quantifizierung

Für eine weitere Darstellung der bei der Atherogenese ablaufenden Prozesse der Aorta soll das Ausmaß eingewanderter Makrophagen, unter Zuhilfenahme des makrophagenspezifischen CD68-Proteins, quantifiziert werden.

Dabei werden im Folgenden die absolute Fläche des detektierten CD68-Proteins pro mm² Gefäßwandquerschnittsfläche sowie deren prozentualer Anteil bestimmt.

3.3.1 Aorta ascendens

In Tabelle 3 finden sich die Messwerte der CD68-Immunfluoreszenz der Aorta ascendens.

ApoE(-/-)					
Alter	n	CD68-Fläche absolut [mm ²]		Anteil CD68 [%]	
		Fläche	SEM	%	SEM
6 Wochen	22	0,00641	0,00229	2,13	0,48
18 Wochen	21	0,06308	0,01016	11,42	1,14
30 Wochen	26	0,06595	0,01044	8,34	0,97

Kontrolle (C57BL/6J)					
Alter	n	CD68-Fläche absolut [mm ²]		Anteil CD68 [%]	
		Fläche	SEM	%	SEM
6 Wochen	19	0,00020	0,00007	0,11	0,02
18 Wochen	20	0,00063	0,00016	0,39	0,10
30 Wochen	22	0,00137	0,00089	0,50	0,27

Tabelle 3: Messergebnisse der Aorta ascendens als Mittelwerte (Färbung: CD68 Ak-Immunfluoreszenz);

CD68-Fläche absolut [mm²] = CD68-angefärbte Fläche der ausgewerteten Gefäßebenen in mm², Anteil CD68-Fläche [%] = prozentualer Anteil der CD68-angefärbten Fläche an Gefäßwandquerschnittsfläche, n = Anzahl untersuchter Schnittebenen pro Gruppe, SEM = Standardfehler des Mittelwerts

Sie zeigt bezüglich der Entwicklung der absoluten Fläche bei der ApoE(-/-)-Gruppe nach einer Verzehnfachung von 0,00641±0,00229 mm² (sechs Wochen) auf 0,06308±0,01016 mm² (18 Wochen) einen geringeren Zuwachs bis zur 30. Lebenswoche (0,06595±0,01044 mm²). Die Kontrollgruppe entwickelt sich zwar hinsichtlich dieses Parameters ebenfalls weiter, bleibt jedoch insgesamt und im Verlauf (sechs Wo.: 0,00020±0,00007 mm²; 18 Wo.: 0,00063±0,00016 mm²; 30 Wo.: 0,00137±0,00089 mm²) weit hinter denen der ApoE(-/-)-Tiere zurück. Entsprechend zeigen die Kontrollen, ganz im Gegensatz zu der Testgruppe, unter mikroskopischer Betrachtung höchstens minimale atherosklerotische Plaques.

Der prozentuale Anteil (gemäß Tabelle 3 und Diagramm 5) entwickelt sich hier nicht in Form einer konsequent steigenden Messgröße. Während der Anteil im Alter von sechs Wochen bei $2,13 \pm 0,48$ % liegt und sich nach 18 Wochen auf $11,42 \pm 1,14$ % steigert, fällt er bei den 30-wöchigen Tieren wieder auf einen tieferen Wert von $8,34 \pm 0,97$ %. Die Daten der Kontrollgruppe stellen sich in ähnlicher Weise dar, wie die der entsprechenden absoluten Flächen.

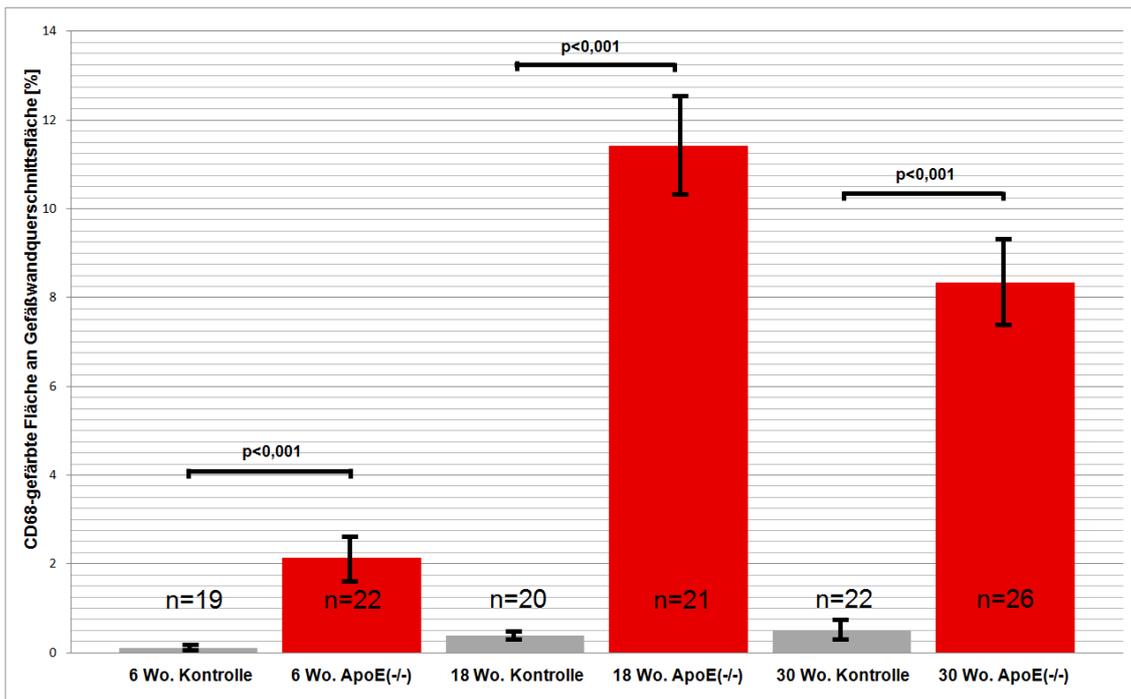


Diagramm 5: Entwicklung des prozentualen Anteils der mit CD68 Ak-gefärbten Fläche an der Gefäßwandquerschnittsfläche der Aorta ascendens für ApoE(-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf; Ergebnisse sind als Mittelwerte angegeben; p = entsprechendes Signifikanzniveau; n = Anzahl untersuchter Schnittebenen pro Gruppe

Die relativen Anteile der durch Makrophagen besiedelten Flächen bleiben bei der Kontrollgruppe, wie zuvor beim absoluten Anteil beschrieben, stets auf einem sehr niedrigen Niveau. Dennoch steigt dieser Parameter ebenso mit fortschreitendem Alter (sechs Wo.: $0,11 \pm 0,02$ %; 18 Wo.: $0,39 \pm 0,10$ %) immer weiter auf maximal $0,5 \pm 0,27$ % bei 30 Wochen an.

3.3.2 Aorta abdominalis

Den Messergebnissen der Aorta abdominalis in Diagramm 6 ist zu entnehmen, dass die CD68-markierte absolute und relative Fläche der untersuchten Aortenebenen mit

fortschreitendem Alter der Versuchstiere, besonders bei den ApoE(-/-)-Mäusen, deutlich zunimmt. Der prozentuale Anteil wächst von $0,50 \pm 0,13$ % (sechs Wochen) über $1,71 \pm 0,41$ % (18 Wochen) auf bis zu $7,23 \pm 0,69$ % (30 Wochen) an (Tabelle 4).

In der Kontrollgruppe ist ebenfalls ein Anstieg des Quotienten über die Zeit zu verzeichnen, jedoch fällt dieser im Vergleich zur Testgruppe ähnlich gering aus wie in der Aorta ascendens.

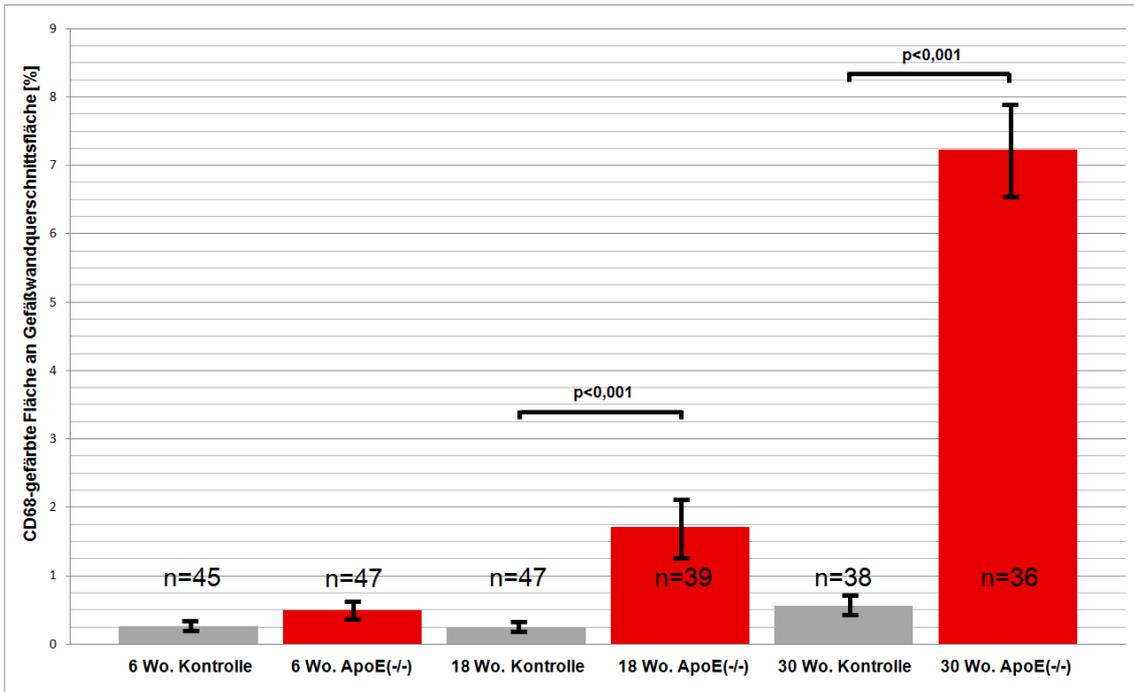


Diagramm 6: Entwicklung des prozentualen Anteils der mit CD68 Ak-gefärbten Fläche an der Gefäßwandquerschnittsfläche der Aorta abdominalis für ApoE(-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf; Ergebnisse sind als Mittelwerte angegeben; p = entsprechendes Signifikanzniveau; n = Anzahl untersuchter Schnittebenen pro Gruppe

Die Entwicklung hinsichtlich der relativen, von Makrophagen besiedelten Fläche zeigt sich, beginnend mit $0,27 \pm 0,06$ % im Alter von sechs Wochen, in der Kontrollgruppe in deutlich schwächerem Umfang. Nach einem Absinken bei den 18-wöchigen Kontrolltieren ($0,25 \pm 0,06$ %), steigt der Prozentsatz mit 30 Wochen auf ein Maximum von $0,57 \pm 0,13$ % an. Damit bleibt dieser prozentuale Anteil wie in der Aorta ascendens auf einem sehr niedrigen Niveau von weit unter 1 %.

Ein ähnliches Verhalten zeigt die Entwicklung der absoluten CD68-gefärbten Fläche. Besitzt die sechs Wochen alte Kontrollgruppe mit $0,00022 \pm 0,00005$ mm² einen etwas

höheren Wert als die 18 Wochen alte ($0,00019 \pm 0,00004 \text{ mm}^2$), steigt dieser mit dem Alter von 30 Wochen wieder auf $0,00055 \pm 0,00013 \text{ mm}^2$ an.

ApoE(-/-)					
Alter	n	CD68-Fläche absolut [mm^2]		Anteil CD68 [%]	
		Fläche	SEM	%	SEM
6 Wochen	47	0,00049	0,00013	0,50	0,13
18 Wochen	39	0,00299	0,00096	1,71	0,41
30 Wochen	36	0,01406	0,00204	7,23	0,69

Kontrolle (C57BL/6J)					
Alter	n	CD68-Fläche absolut [mm^2]		Anteil CD68 [%]	
		Fläche	SEM	%	SEM
6 Wochen	45	0,00022	0,00005	0,27	0,06
18 Wochen	47	0,00019	0,00004	0,25	0,06
30 Wochen	38	0,00055	0,00013	0,57	0,13

Tabelle 4: Messergebnisse der Aorta abdominalis als Mittelwerte (Färbung: CD68 Ak-Immunfluoreszenz); Abkürzungen gemäß Tabelle 3

Die Testgruppe zeigt wie zuvor einen weitaus steileren Anstieg (sechs Wo.: $0,00049 \pm 0,00013 \text{ mm}^2$; 18 Wo.: $0,00299 \pm 0,00096 \text{ mm}^2$), der in einer absoluten von Makrophagen besiedelten Fläche von $0,01406 \pm 0,00204 \text{ mm}^2$ endet. Das entspricht nahezu einer Verdreißigfachung des Ausgangswertes der sechswöchigen ApoE(-/-)-Gruppe.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die histologischen Veränderungen der Aortenwand während der Entwicklung einer Atherosklerose zu charakterisieren. Ebenso soll das Augenmerk auch darauf liegen, ob sich eine Korrelation zwischen dem Anstieg der lokalen Pulswellengeschwindigkeit und einer sich entwickelnden Atherosklerose sowie den damit in Zusammenhang stehenden histologischen Veränderungen in der Gefäßwand nachweisen lässt.

4.1 Elastinfragmentierung

Es ist im Folgenden zu diskutieren, inwieweit Brüche von elastischen Laminae auf eventuelle Artefakte während Präparation, Messung und Auswertung, auf einen physiologischen Alterungsprozess oder tatsächlich auf Vorgänge des atherosklerotischen Umbaus zurückzuführen sind.

4.1.1 Methodendiskussion

Zur Auswertung wird jede erkennbare Kontinuitätsunterbrechung der Elastinlaminae erfasst und in Beziehung zum Gefäßwandquerschnitt gesetzt. Hierbei sind verschiedene Ausprägungen der Rupturen aufgetreten:

Zum einen die, bei der unter mikroskopischer Sicht zwischen den beiden „gebrochenen“ Enden eine zelluläre Verbindung besteht. Diese Verbindung könnte als ein Reorganisationsprozess des Gewebes in Folge einer „pathologischen“ Fragmentierung zu deuten sein. Eine Bestimmung des rupturüberbrückenden Zellmaterials mittels durchgeführter Smooth-Muscle-Actin-Färbung erbrachte keine weiterführenden Ergebnisse. In-vivo-Untersuchungen könnten hierbei neue Erkenntnisse bringen.

Zum anderen lässt sich auch eine Variante des Elastinbruchs erkennen, bei der die rupturierte elastische Lamina wie abgeschnitten erscheint, ohne dass eine Verbindung der Enden auffällt. Es tritt eine Ruptur ohne entsprechendes Gegenstück auf, die am ehesten auf ein Verlassen der Schnittebene durch die Elastinlamina zurückzuführen ist.

Ebenso werden schon von Jones et al.²⁸ auf das Präparat einwirkende Scherkräfte während der Anfertigung histologischer Schnitte als ein möglicher Einflussfaktor auf die Entstehung von Elastinlaminarupturen diskutiert. Da die ApoE-Knockout- und die Kontrollgruppe während der Präparation identischen Kräften ausgesetzt sind, scheint es unwahrscheinlich, dass Scherkräfte die erhöhte Fragmentierungsrate bei den Testtieren hervorruft. Ob Atherogeneseprozesse die Gefäßwand mechanisch anfälliger werden lassen, bleibt weiterhin als Forschungsgegenstand zu klären. Außerdem ist dem entgegenzusetzen, dass es auszuschließen ist, dass während der Belastung im Zuge der Präparation selektiv die Integrität des Elastinnetzes beschädigt wird, obwohl in der Umgebung der Ruptur bei mikroskopischer Untersuchung die Gefäßwand vollkommen intakt ist.

Bezüglich der Auswirkung des Alterns der Versuchstiere auf die Ergebnisse, wird ein gewisses Maß an „physiologisch“ bedingter, artifizieller Fragmentierung vermutet. Hierzu ist bereits in der Literatur eine mit dem Alter der Versuchstiere korrelierende Desorganisation der elastischen, lamellären Schichten beschrieben.²⁰ Diese zunehmende Unordnung soll sich in Form einer weniger parallel ausgerichteten Formation der einzelnen Elastinfasern zueinander in den Laminae bemerkbar machen. Gestützt durch diese Hypothese kann angenommen werden, dass mit zunehmendem Alter einzelne Fasern beziehungsweise die elastischen Schichten vermehrt die transversale Schnittebene kreuzen, was unter Umständen mikroskopisch als Ruptur erscheint. Dieser Störfaktor kann ausgeschlossen werden, da alle Versuchstiere in vorliegender Arbeit dem gleichen Alterungsprozess ausgesetzt sind.

In vergleichbaren Forschungsarbeiten werden als weitere Gründe von Elastinrupturen eine enzymatische Proteolyse (v.a. durch MMP-7^{19, 28}) oder eine „biomechanische Ermüdung“²⁸ genannt. Eine derartige mechanische Ermüdung kann natürlich Läsionen der elastischen Laminae während der Präparation ebenso begünstigen.

4.1.2 Ergebnisdiskussion

Mit steigendem Alter der Versuchstiere ist in den angestellten Untersuchungen bei beiden Gruppen eine Zunahme des Elastinfragmentierungsgrades zu erkennen. Dieser Effekt fällt bei den C57BL/6J -Kontrollmäusen zwar wesentlich geringer aus als bei den

ApoE(-/-)-Tieren, ist jedoch ebenso vorhanden und in beiden untersuchten Aortenabschnitten zu messen. Besonders signifikant ist die Zunahme der Elastinfragmentierung in beiden Untersuchungsgruppen zwischen sechs und 18 Wochen in der Aorta abdominalis. In der Aorta ascendens lässt sich diese Signifikanz nicht eindeutig nachweisen.

Bezüglich des Vorliegens und der Entwicklung einer Elastinfragmentierung bestätigen sich die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen. Santelices et al.³¹ untersuchten ebenfalls in ex-vivo Messungen ApoE(-/-)-Mäuse und entsprechende Kontrolltiere in Hinblick auf die Entwicklung der Gefäßwandsteifigkeit, Elastinlaminarupturen, begleitende Atherogeneseeffekte auf die Aorta und deren Zusammenhänge. Sie stellen ihre Ergebnisse bezüglich des Verhaltens von Elastin als qualitativen Rangwert dar. Im Vergleich zu den in dieser Arbeit gewonnen Daten, die den Effekt in Form eines quantitativen Parameters beschreiben, weisen die Resultate bei Santelices et al. ein ähnliches Ergebnismuster auf. Sie können ebenfalls eine Zunahme des Fragmentierungsgrades mit dem Altern der Tiere in beiden Versuchsgruppen nachweisen. Ebenso kann ein erhöhtes Ausgangsniveau der ApoE(-/-)-Gruppe sowie ein höherer Fragmentierungsgrad im jeweiligen Altersgruppenvergleich gezeigt werden. Signifikante Ergebnisse können sie innerhalb der ApoE(-/-)-Gruppen zwischen acht und 34 sowie acht und 25 Wochen, zwischen acht und 34 Wochen innerhalb der Kontrollgruppe sowie zwischen den beiden ältesten Generationen der beiden Versuchsgruppen gewinnen.

Auch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten erreichen, vor allem innerhalb der Aorta abdominalis, jeweils zwischen den beiden Versuchsgruppen der 18 und 30 wöchigen Tiere ein statistisches Signifikanzniveau. Letztlich ist sicherlich ein Trend zu erkennen, der eine Zunahme der Elastinfragmentierung bei erhöhtem Atherosklerosepotenzial zeigt.

Insgesamt zeigen sowohl die Messwerte der Aorta ascendens, als auch die der Aorta abdominalis ein Bild, das mit der bei Gotschy et al.²⁷ MRT-bestimmten lokalen PWV hinsichtlich ihrer zeitlichen Entwicklung korreliert. Beide zeigen einen Anstieg während des Alterns und vor allem der fortschreitenden Atherosklerose. Die in vorliegender

Arbeit gefundenen Ergebnisse bestätigen ähnliche Erkenntnisse früherer Forschung^{23, 31} und weisen auf eine Beziehung zwischen der Zunahme der Elastinfragmentierung, der erhöhten lokalen Pulswelle und der steigenden Gefäßwandsteifigkeit hin.

4.2 Kollagenanteil

In diesem Teilaspekt soll betrachtet werden, welchen Einfluss die Veränderungen des Kollagengehaltes der Gefäßwand auf deren Eigenschaften haben. Hierzu werden der quantitative Kollagengehalt der Aortenwand sowie die Verteilung verschiedener Kollagenfaserdicken im Zeitverlauf an Test- und Kontrollgruppen bestimmt.

4.2.1 Methodendiskussion

Whittaker et al.⁴⁵ etablierten eine zur quantitativen histologischen Analyse geeignete Methode um die kollagendarstellende PSR-Färbung nach Puchtler unter Verwendung von zirkulär polarisiertem Licht noch spezifischer zu gestalten. Durch Austestung des oben genannten Verfahrens konnte der Vorteil dieser Methode nachvollzogen werden und wird deshalb in dieser Arbeit angewendet.

Die Aorta ascendens weist im Vergleich zur Aorta abdominalis ein stets undeutlicheres Bild auf. Dies liegt wohl daran, dass die auswertbaren Schnittebenen durch die anatomisch bedingte, geringere Länge dieses Gefäßabschnitts teils unter der entsprechenden Anzahl der Aorta abdominalis liegen. Hierdurch haben Schwankungen bei Messwerten größeren Einfluss. Außerdem ist noch zu beachten, dass die dort erhaltenen Schnittebenen in Form und Erscheinung meist sehr unterschiedlich sind, was eine größere Messwertstreuung nach sich zieht.

4.2.2 Ergebnisdiskussion

In einigen Arbeiten ist die Rolle der Kollagenverteilung und -entwicklung in der Gefäßwand in Zusammenhang mit Gefäßsteifigkeit und auch Atherosklerose erforscht worden. Dem Kollagen kommt hierbei neben der Ausprägung elastischer Laminae und Smooth-muscle-Zellen eine bedeutende Rolle für die mechanischen Gefäßwandeigenschaften zu.^{19, 20, 23, 32}

Die oben beschriebene Rolle des Kollagens kann in vorliegender Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Bei abschließender Betrachtung der gesamten Ergebnisse finden sich keine eindeutigen Anhaltspunkte, die auf eine Korrelation zwischen Atherogenese, Gefäßwandsteifigkeit und Kollagenbildung hindeuten.

Ebenso zeigt die Entwicklung des Kollagenanteils im Zeitverlauf keine der PWV-Erhöhung ähnliche Dynamik. Dieser Zusammenhang lässt sich bisher nur bei der Elastinfragmentierung erkennen. Insbesondere ist diese Korrelation in frühen Altersstufen ohne erkennbare atherosklerotische Gefäßveränderungen nicht zu belegen. In der Aorta abdominalis zeigt sich zwar, dass im Zeitverlauf der Kollagenanteil am Gesamtgefäß sowohl in der ApoE(-/-)- als auch in der Kontrollgruppe zunimmt, jedoch unterscheidet sich das Niveau der ermittelten Werte nicht statistisch signifikant. Daher ist diese Erscheinung als möglicher Alterungs- beziehungsweise Wachstumseffekt zu interpretieren.

Bei Betrachtung der transversalen Schnittpräparate ist gut zu erkennen, dass das hauptsächlich detektierte Kollagen bei dieser Analyse der dem Gefäß aufgelagerten, bindegewebigen Adventitia entstammt. In den restlichen Gefäßwandschichten ist stets nur wenig Kollagen (circa 1%) nachzuweisen. Dieser Wert ist in allen Alters- und Versuchstiergruppen annähernd konstant. Somit ist die von der Adventitia gestellte Kollagenmasse insgesamt im Verhältnis zu den Kollagenfasern der weiter innen liegenden Wandschichten und entstandenen Plaques so groß, dass diese zum größten Anteil das Gesamtergebnis bestimmt.

Hinsichtlich der Entwicklung der verschiedenen Fibrillendicken kann kein klarer Trend aus vorliegender Datenlage erkannt werden. Bei spezieller Betrachtung von atheromatösen Läsionen und Plaques lässt sich jedoch ein großer Anteil grüner Kollagenfibrillen sichtbar machen. Eine ähnliche Faserkonstellation findet sich bei Whittaker et al. im Narbenbildungsprozess nach Myokardinfarkt. Auch dort treten zuerst dünnere, grün erscheinende Fasern (Kollagen Typ III) und im weiteren Verlauf vermehrt Fasern stärkeren Kalibers (Kollagen Typ I), die rot-orange erscheinen, auf.⁴⁵ Der gefundene Grünanteil könnte damit eine Reaktion auf eine Beschädigung der Gefäßwand sein und auf eine atherogenesebedingte Kollagenneubildung hinweisen.

Diese unterschiedlichen Faserkaliber besitzen verschieden stark ausgeprägte stabilisierende Eigenschaften. So beschreiben Nadkarni et al. die Bedeutung dieser Ausprägungen für die Stabilität eines atheromatösen Plaques.⁴⁶

Gemäß der Teilanalyse besteht insbesondere die Adventitia aus orange-roten, großkalibrigen Kollagenfasern, die dem Gewebe mehr Stabilität verleihen und damit zur Gefäßwandsteifigkeit beitragen.

Zusammenfassend ist daher anzunehmen, dass die kollagenbedingten mechanischen Eigenschaften des gesamten Gefäßwandaufbaus hauptsächlich auf die Tunica adventitia und nur in geringem Maße auf die übrigen Wandschichten, selbst bei Vorliegen von atheromatösen Veränderungen, zurückzuführen sind.

So ist festzuhalten, dass die hier durchgeführte Untersuchung der Entwicklung des Kollagenanteils die zu untersuchende These aus oben genannten Gründen nicht verifizieren kann. Die Frage nach einer Atherogenese getriggerten Kollagenumverteilung oder -neubildung mit möglichem Einfluss auf die lokale Pulswellengeschwindigkeit mit Folge des bei Gotschy et al.²⁷ beschriebenen Effekts, kann somit noch nicht definitiv beantwortet werden.

4.3 Makrophageneinwanderung anhand Anti-CD68-Quantifizierung

Bei der frühen Entstehung atherosklerotischer Gefäßwanddefekte spielen Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle.^{10, 34-37} Aus diesem Grund wird die Immigration von Makrophagen in die Gefäßwand als Indikator dieser pathologischen Entwicklung betrachtet. Daher wird in vorliegender Forschungsarbeit untersucht, ob sich eine Makrophagenbesiedelung der Gefäßwand als Frühindikator atheromatöser Prozesse eignet. Eventuell können die ablaufenden histologischen Prozesse auch Einfluss auf die Gefäßwandsteifigkeit nehmen und damit eine Erklärung für die Erhöhung der lokalen PWV geben.

4.3.1 Methodendiskussion

Auch andere Forschungsgruppen haben Makrophagen mit Interaktionen an Gefäßwänden untersucht, jedoch selten in Form einer quantitativen Analyse wie in vorliegender Arbeit.

Beispielsweise untersuchten Sigovan et al. atherosklerotische Plaques hinsichtlich des altersbezogenen Entzündungsstatus im Zusammenhang mit fortschreitender Atherosklerose anhand spezifischer Kontrastmittel. Als Referenzfärbung für Makrophagen wird eine der in vorliegender Arbeit ähnlichen Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines CD68 Antikörpers herangezogen. Dort werden Gefäßentzündungen und deren histologisches Korrelat untersucht und diese mit einer MRT-Bildgebung kombiniert.⁴⁸

Außerdem analysierten Burtea et al. atherosklerotische Plaques unter anderem unter Verwendung eines Antikörpers gegen CD11b-positive Zellen. Sie bestätigen hierbei die wichtige Rolle der Makrophagen bei einer Plaquebildung.⁴⁷

4.3.2 Ergebnisdiskussion

In vorliegender Untersuchung wird gezeigt, dass eine größtenteils hoch signifikante Zunahme der relativen, von Makrophagen besiedelten Fläche im Zeitverlauf der ApoE(-/-)-Testgruppe im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe erfolgt. Der prozentuale Wert seitens der Kontrolltiere nimmt mit fortschreitendem Alter langsam zu, jedoch wird dieser in beiden Aortenanteilen durch die Testgruppe jeweils um ein Mehrfaches übertroffen. Besonders muss auf die bereits in den jüngsten Altersklassen auftretende höhere Makrophagendichte in den Gefäßwänden der ApoE(-/-)-Tiere geachtet werden. Dies kann als Indiz früher atherogenetischer Vorgänge gedeutet werden. In ähnlicher Weise konnten Jones et al.²⁸ eine Besiedelung früher atherosklerotischer Läsionen durch Makrophagen mittels des MOMA2-Antikörpers feststellen.

Sigovan et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen: Über den Zeitverlauf nehmen die Plaqueentwicklung und Makrophagenbesiedelung der Gefäßwand, ebenfalls in mm² gemessen, bei den ApoE(-/-)-Tiere deutlich zu. Die höchste Makrophagenbesiedelung, als Maß eines Entzündungsgeschehens, wird zwischen 16 und 24 Wochen alten Testtieren gefunden. Die Kontrolltiere in normaler Entwicklung bleiben ebenfalls in Hinblick auf eine Atherogenese relativ unauffällig und weisen auch bei bis zu 30 Wochen alten Tieren meist nur minimale Spuren von makrophagenspezifischem CD68-Protein auf.⁴⁸

Letztendlich kann gefolgert werden, dass die gewonnenen Daten sich gut mit Ergebnissen vorangegangener Forschung in Einklang bringen lassen. Sie bieten Hinweise darauf, in Zusammenhang mit der zu untersuchenden Korrelation von lokaler PWV und Gefäßsteifigkeit zu stehen, zumal eine, wie bei der hier bestimmten Elastinfragmentierung, zeitlich ähnliche Dynamik der Messwertentwicklung zu erkennen ist.

5. Zusammenfassung

Atherosklerose ist ein wichtiger Faktor bezüglich der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, indem sie Einfluss auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Gefäße nimmt. Wegen dieser Bedeutung ist es wichtig, diese Erkrankung und deren Zusammenhänge genau zu erforschen.

Einige Studien konnten zeigen, dass die Pulswellengeschwindigkeit mit Gefäßwand-eigenschaften, insbesondere deren Steifigkeit, zusammenhängt. So konnte in Untersuchungen von Gotschy et al.²⁷ eine Zunahme der lokalen Pulswellengeschwindigkeit, als Marker für Gefäßwandsteifigkeit, in Aortenanteilen von ApoE(-/-)-Mäusen im Zeitverlauf mittels MRT gezeigt werden, ohne dass makroskopische Veränderungen in frühen Stufen atherosklerotischer Entwicklung sichtbar waren. Dies wird nun als Ausgangspunkt herangezogen, um zu erforschen, durch welche histologischen Veränderungen des Gefäßes innerhalb der Atherogenese eine frühe Zunahme der lokalen PWV erklärt werden kann.

Hierzu wird zum einen die mit der Gefäßwandsteifigkeit in Zusammenhang gebrachte Elastinfragmentierung innerhalb der elastischen Laminae der Aorta ascendens und abdominalis mittels histologischer Untersuchung quantitativ bestimmt. Die elastischen Schichten werden durch modifizierte Elastika-van-Gieson-Färbung dargestellt. Zur vergleichenden Bestimmung wird ein Quotient aus der Anzahl bei mikroskopischer Betrachtung erkennbarer Brüche der elastischen Laminae und bestimmter Gefäßwandquerschnittsfläche erstellt. Die Ausprägung der Elastinfragmentierung unterscheidet sich signifikant in den zwei höchsten Altersklassen der Test- und Kontrollmäuse in beiden untersuchten Aortenabschnitten, wobei die ApoE(-/-)-Tiere stets den höheren Wert aufweisen. Anhand der Ähnlichkeit hinsichtlich der

Entwicklung der Messwerte von beschriebener lokalen PWV und der hier gezeigten Elastinfragmentierung kann vermutet werden, dass diese zu einer Erhöhung der Gefäßwandsteifigkeit beiträgt. Die gezeigten histologischen Parameter können so als Indikator für Veränderungen der Gefäßeigenschaften während der Atherogenese und als möglicher Grund einer Veränderung der Gefäßwandsteifigkeit mit konsekutiver Erhöhung der lokalen PWV angesehen werden.

Als weiterer Einflussfaktor auf die mechanischen Eigenschaften des Blutgefäßsystems wird die Entwicklung des Kollagengehaltes anteilig an der Aortenwand bestimmt. Es wurde in vielen Publikationen beschrieben, welchen großen Stellenwert Kollagenfasern für die Gefäßwandsteifigkeit haben. Auch wird das untersuchte Kollagen hinsichtlich seiner Faserdicken nochmals genauer untersucht. Die Kollagenfasern werden mittels Picro-Sirius-Rot gefärbt und anschließend unter zirkulär polarisiertem Licht analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen keinen eindeutigen Trend hinsichtlich ihrer Entwicklung. Sie lassen sich auch nicht mit der aufgestellten Hypothese in Übereinkunft bringen, da keine zeitliche Dynamik verglichen mit der Entwicklung der anderen Parameter nachgewiesen werden kann.

Um den beschriebenen entzündlichen Charakter der Atherogenese ebenso zu berücksichtigen, wird das Einwanderungsverhalten von Makrophagen in die Gefäßwand betrachtet. Es wird die relative Fläche der durch Makrophagen besiedelten Gefäßwandanteile bestimmt und als Indikator einer Entzündungsreaktion angesehen, welche direkt oder indirekt Einfluss auf Gefäßwandeigenschaften haben könnte. Mittels eines Antikörpers gegen das makrophagenspezifische Protein CD68 und Kombination mit anti-antikörpervermittelt bindenden fluoreszierenden Substanzen, werden Makrophagen in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und die besiedelte Fläche softwaregestützt bestimmt. Dabei kommt die vorliegende Untersuchung zu dem Ergebnis, dass sich die Makrophagenbesiedelung in beiden betrachteten Aortenabschnitten deutlich im Zeitverlauf bei den ApoE(-/-)-Tieren erhöht. Der relative Gefäßwandanteil der von Makrophagen besiedelten Flächen erreicht seinen höchsten Wert innerhalb der Aorta ascendens bei 18 Wochen alten ApoE(-/-)-Tieren; in der Aorta abdominalis bei 30 Wochen alten. Die absolute CD68-

Fläche in beiden Aortenabschnitten steigt bis zum Versuchsende hin an, wobei der stärkste Anstieg in der Zeit von sechs zu 18 Wochen geschieht. Dagegen zeigt die Kontrollgruppe eine sehr geringe Zunahme dieser beiden Messgrößen, wobei diese stets auf einem sehr niedrigen Niveau bleiben und keineswegs mit der Entwicklung der Testtiere zu vergleichen sind. Besonders zu beachten ist, dass bereits in der jüngsten Altersstufe von sechs Wochen ein höheres Maß an Makrophagenbesiedelung bei Aortenanteilen der ApoE(-/-)-Tiere zu verzeichnen ist, als bei den entsprechenden Kontrollen. Auf Grund dieser Beobachtung, lässt sich ein möglicher Zusammenhang mit der schon früh ansteigenden Gefäßsteifigkeit vor sichtbarer Plaqueentwicklung herstellen.

Bei der Klärung der zentralen Fragestellung dieser Arbeit nach einem histomorphologischen Korrelat für die frühzeitige Erhöhung der lokalen PWV zeigt sich folgendes Ergebnis: Insgesamt können die gemessenen histologischen Charakteristika, vor allem die Entwicklung der Elastinfragmentierung innerhalb der Gefäßwand und der Grad der Makrophagenbesiedelung, frühe Indikatoren für Veränderungen morphologischer und funktioneller Gefäßwandspezifikationen sein. Sie kommen daher als denkbare Ursache für den Anstieg der lokalen Pulswellengeschwindigkeit in Betracht, besonders da die zuvor erwähnten histologischen Parameter zeitlich wie diese einen ähnlichen Verlauf hinsichtlich ihrer Entwicklung zeigen.

Die Atherogenese und deren zahlreiche Einflussfaktoren bleiben weiterhin Forschungsgegenstand und es gilt mehr denn je mögliche Mechanismen aufzudecken, um eine Gefäßwandschädigung frühzeitig und effektiv verhindern zu können. Hiervon würde ein Großteil der Bevölkerung profitieren, da die Atherosklerose durch ihre Folgeerkrankungen nach wie vor, nicht nur in Deutschland, die Todesursachenstatistik anführt.

6. Literaturverzeichnis

- 1 A. Abdelfattah, A. H. Allam, S. Wann, R. C. Thompson, G. Abdel-Maksoud, I. Badr, H. A. Amer, A. E. El-Din, C. E. Finch, M. I. Miyamoto, L. Sutherland, J. D. Sutherland, and G. S. Thomas, 'Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Egyptian Women: 1570 Bce-2011 Ce', *Int J Cardiol* (2012).
- 2 A. S. Go, D. Mozaffarian, V. L. Roger, E. J. Benjamin, J. D. Berry, M. J. Blaha, S. Dai, E. S. Ford, C. S. Fox, S. Franco, H. J. Fullerton, C. Gillespie, S. M. Hailpern, J. A. Heit, V. J. Howard, M. D. Huffman, S. E. Judd, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, R. H. Mackey, D. J. Magid, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, D. K. McGuire, E. R. Mohler, 3rd, C. S. Moy, M. E. Mussolino, R. W. Neumar, G. Nichol, D. K. Pandey, N. P. Paynter, M. J. Reeves, P. D. Sorlie, J. Stein, A. Towfighi, T. N. Turan, S. S. Virani, N. D. Wong, D. Woo, M. B. Turner, Committee American Heart Association Statistics, and Subcommittee Stroke Statistics, 'Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2014 Update: A Report from the American Heart Association', *Circulation*, 129 (2014), 399-410.
- 3 Bundesamt für Statistik, 'Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12, Reihe 4', (2012).
- 4 J. M. Gaziano, 'Triglycerides and Coronary Risk', *Curr Cardiol Rep*, 1 (1999), 125-30.
- 5 J. O. Gebbers, 'Atherosclerosis, Cholesterol, Nutrition, and Statins--a Critical Review', *Ger Med Sci*, 5 (2007), Doc04.
- 6 J. R. Galyean, 3rd, 'Risk Factors for Coronary Heart Disease', *South Med J*, 71 (1978), 694-704.
- 7 R. A. Kronmal, R. L. McClelland, R. Detrano, S. Shea, J. A. Lima, M. Cushman, D. E. Bild, and G. L. Burke, 'Risk Factors for the Progression of Coronary Artery Calcification in Asymptomatic Subjects: Results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (Mesa)', *Circulation*, 115 (2007), 2722-30.
- 8 L. A. Solberg, and J. P. Strong, 'Risk Factors and Atherosclerotic Lesions. A Review of Autopsy Studies', *Arteriosclerosis*, 3 (1983), 187-98.
- 9 D. L. Sprecher, 'Triglycerides as a Risk Factor for Coronary Artery Disease', *Am J Cardiol*, 82 (1998), 49U-56U; discussion 85U-86U.
- 10 R. Ross, 'Atherosclerosis--an Inflammatory Disease', *N Engl J Med*, 340 (1999), 115-26.
- 11 H. C. Stary, A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner, and R. W. Wissler, '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', *Circulation*, 92 (1995), 1355-74.
- 12 R. Ross, and J. A. Glomset, 'Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell: Proliferation of Smooth Muscle Is a Key Event in the Genesis of the Lesions of Atherosclerosis', *Science*, 180 (1973), 1332-9.
- 13 R. Ross, 'The Pathogenesis of Atherosclerosis', *Mechanisms of Ageing and Development*, 9 (1979), 435-40.
- 14 J. L. Goldstein, and M. S. Brown, 'The Low-Density Lipoprotein Pathway and Its Relation to Atherosclerosis', *Annu Rev Biochem*, 46 (1977), 897-930.
- 15 J. L. Goldstein, 'Atherosclerosis: The Low-Density Lipoprotein Receptor Hypothesis', *Metabolism*, 26 (1977), 1257-75.
- 16 J. L. Goldstein, Y. K. Ho, S. K. Basu, and M. S. Brown, 'Binding Site on Macrophages That Mediates Uptake and Degradation of Acetylated Low Density Lipoprotein, Producing Massive Cholesterol Deposition', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (1979), 333-7.

- 17 G. G. Belz, 'Elastic Properties and Windkessel Function of the Human Aorta', *Cardiovasc Drugs Ther*, 9 (1995), 73-83.
- 18 J. Nurnberger, A. Kribben, T. Philipp, and R. Erbel, '[Arterial Compliance (Stiffness) as a Marker of Subclinical Atherosclerosis]', *Herz*, 32 (2007), 379-86.
- 19 S. J. Zieman, V. Melenovsky, and D. A. Kass, 'Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial Stiffness', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25 (2005), 932-43.
- 20 A. Avolio, D. Jones, and M. Tafazzoli-Shadpour, 'Quantification of Alterations in Structure and Function of Elastin in the Arterial Media', *Hypertension*, 32 (1998), 170-5.
- 21 W. W. Nichols, and D. G. Edwards, 'Arterial Elastance and Wave Reflection Augmentation of Systolic Blood Pressure: Deleterious Effects and Implications for Therapy', *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 6 (2001), 5-21.
- 22 W. W. Nichols, S. J. Denardo, I. B. Wilkinson, C. M. McEniery, J. Cockcroft, and M. F. O'Rourke, 'Effects of Arterial Stiffness, Pulse Wave Velocity, and Wave Reflections on the Central Aortic Pressure Waveform', *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 10 (2008), 295-303.
- 23 D. J. Farrar, H. D. Green, M. G. Bond, W. D. Wagner, and R. A. Gobbee, 'Aortic Pulse Wave Velocity, Elasticity, and Composition in a Nonhuman Primate Model of Atherosclerosis', *Circ Res*, 43 (1978), 52-62.
- 24 Y. X. Wang, M. Halks-Miller, R. Vergona, M. E. Sullivan, R. Fitch, C. Mallari, B. Martin-McNulty, V. da Cunha, A. Freay, G. M. Rubanyi, and K. Kauser, 'Increased Aortic Stiffness Assessed by Pulse Wave Velocity in Apolipoprotein E-Deficient Mice', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278 (2000), H428-34.
- 25 S. Zoungas, and R. P. Asmar, 'Arterial Stiffness and Cardiovascular Outcome', *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34 (2007), 647-51.
- 26 K. Yufu, N. Takahashi, F. Anan, M. Hara, H. Yoshimatsu, and T. Saikawa, 'Brachial Arterial Stiffness Predicts Coronary Atherosclerosis in Patients at Risk for Cardiovascular Diseases', *Jpn Heart J*, 45 (2004), 231-42.
- 27 A. Gotschy, E. Bauer, C. Schrodt, G. Lykowsky, Y. X. Ye, E. Rommel, P. M. Jakob, W. R. Bauer, and V. Herold, 'Local Arterial Stiffening Assessed by Mri Precedes Atherosclerotic Plaque Formation', *Circ Cardiovasc Imaging*, 6 (2013), 916-23.
- 28 G. T. Jones, F. Jiang, S. P. McCormick, and G. J. Dusting, 'Elastic Lamina Defects Are an Early Feature of Aortic Lesions in the Apolipoprotein E Knockout Mouse', *J Vasc Res*, 42 (2005), 237-46.
- 29 M. Osborne-Pellegrin, C. Labat, N. Mercier, P. Challande, and P. Lacolley, 'Changes in Aortic Stiffness Related to Elastic Fiber Network Anomalies in the Brown Norway Rat During Maturation and Aging', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299 (2010), H144-52.
- 30 M. F. O'Rourke, 'Arterial Aging: Pathophysiological Principles', *Vasc Med*, 12 (2007), 329-41.
- 31 L. C. Santelices, S. J. Rutman, R. Prantil-Baun, D. A. Vorp, and J. M. Ahearn, 'Relative Contributions of Age and Atherosclerosis to Vascular Stiffness', *Clin Transl Sci*, 1 (2008), 62-6.
- 32 K. J. Shields, D. Stolz, S. C. Watkins, and J. M. Ahearn, 'Complement Proteins C3 and C4 Bind to Collagen and Elastin in the Vascular Wall: A Potential Role in Vascular Stiffness and Atherosclerosis', *Clin Transl Sci*, 4 (2011), 146-52.
- 33 B. S. Fleenor, K. D. Marshall, J. R. Durrant, L. A. Lesniewski, and D. R. Seals, 'Arterial Stiffening with Ageing Is Associated with Transforming Growth Factor-Beta1-Related Changes in Adventitial Collagen: Reversal by Aerobic Exercise', *J Physiol*, 588 (2010), 3971-82.

- 34 K. J. Moore, and I. Tabas, 'Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis', *Cell*, 145 (2011), 341-55.
- 35 P. Libby, P. M. Ridker, and A. Maseri, 'Inflammation and Atherosclerosis', *Circulation*, 105 (2002), 1135-43.
- 36 J. Fan, and T. Watanabe, 'Inflammatory Reactions in the Pathogenesis of Atherosclerosis', *J Atheroscler Thromb*, 10 (2003), 63-71.
- 37 V. Z. Rocha, and P. Libby, 'Obesity, Inflammation, and Atherosclerosis', *Nat Rev Cardiol*, 6 (2009), 399-409.
- 38 R. L. Reddick, S. H. Zhang, and N. Maeda, 'Atherosclerosis in Mice Lacking Apo E. Evaluation of Lesional Development and Progression', *Arterioscler Thromb*, 14 (1994), 141-7.
- 39 S. H. Zhang, R. L. Reddick, B. Burkey, and N. Maeda, 'Diet-Induced Atherosclerosis in Mice Heterozygous and Homozygous for Apolipoprotein E Gene Disruption', *J Clin Invest*, 94 (1994), 937-45.
- 40 A. Nicoletti, S. Kaveri, G. Caligiuri, J. Bariety, and G. K. Hansson, 'Immunoglobulin Treatment Reduces Atherosclerosis in Apo E Knockout Mice', *J Clin Invest*, 102 (1998), 910-8.
- 41 B. Yeganeh, G. R. Moshtaghi-Kashanian, V. Declercq, and M. H. Moghadasian, 'Combination of Dietary Phytosterols Plus Niacin or Fenofibrate: Effects on Lipid Profile and Atherosclerosis in Apo E-Ko Mice', *J Nutr Biochem*, 16 (2005), 222-8.
- 42 K. von Holt, S. Lebrun, W. Stinn, L. Conroy, T. Wallerath, and R. Schlegel, 'Progression of Atherosclerosis in the Apo E^{-/-} Model: 12-Month Exposure to Cigarette Mainstream Smoke Combined with High-Cholesterol/Fat Diet', *Atherosclerosis*, 205 (2009), 135-43.
- 43 H. Puchtler, F. S. Waldrop, and L. S. Valentine, 'Polarization Microscopic Studies of Connective Tissue Stained with Picro-Sirius Red Fba', *Beitr Pathol*, 150 (1973), 174-87.
- 44 L. C. Junqueira, G. Bignolas, and R. R. Brentani, 'Picrosirius Staining Plus Polarization Microscopy, a Specific Method for Collagen Detection in Tissue Sections', *Histochem J*, 11 (1979), 447-55.
- 45 P. Whittaker, R. A. Kloner, D. R. Boughner, and J. G. Pickering, 'Quantitative Assessment of Myocardial Collagen with Picrosirius Red Staining and Circularly Polarized Light', *Basic Res Cardiol*, 89 (1994), 397-410.
- 46 S. K. Nadkarni, M. C. Pierce, B. H. Park, J. F. de Boer, P. Whittaker, B. E. Bouma, J. E. Bressner, E. Halpern, S. L. Houser, and G. J. Tearney, 'Measurement of Collagen and Smooth Muscle Cell Content in Atherosclerotic Plaques Using Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography', *J Am Coll Cardiol*, 49 (2007), 1474-81.
- 47 C. Burtea, S. Ballet, S. Laurent, O. Rousseaux, A. Dencausse, W. Gonzalez, M. Port, C. Corot, L. Vander Elst, and R. N. Muller, 'Development of a Magnetic Resonance Imaging Protocol for the Characterization of Atherosclerotic Plaque by Using Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Apoptosis-Targeted Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Derivatives', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32 (2012), e36-48.
- 48 M. Sigovan, A. Bessaad, H. Alsaïd, E. Lancelot, C. Corot, B. Neyran, N. Provost, Z. Majd, M. Breisse, and E. Canet-Soulas, 'Assessment of Age Modulated Vascular Inflammation in Apoe^{-/-} Mice by Uspio-Enhanced Magnetic Resonance Imaging', *Invest Radiol*, 45 (2010), 702-7.

7. Abbildungsverzeichnis

Grafiken:

- Grafik 1: Schematische Darstellung untersuchter Bereiche innerhalb der Aorta
- Grafik 2: Schematische Darstellung der makrophagenspezifischen Färbung gegen CD68-Protein
- Grafik 3: Aorta ascendens einer 30-wöchigen ApoE(-/-)-Maus bei 100-facher Vergrößerung; Elastika-van-Gieson
- Grafik 4: Vergrößerte Darstellung des in Grafik 3 rot eingerahmten Areal; 400-fache Vergrößerung; Elastika-van-Gieson
- Grafik 5: Aorta abdominalis einer 30-wöchigen ApoE(-/-)-Maus bei 100-facher Vergrößerung; PSR, Durchlicht (Hellbild)
- Grafik 6: Schnittebene aus Grafik 5 bei Durchleuchtung mit zirkulär polarisiertem Licht; PSR, Durchlicht mit Polfilter (Dunkelbild)
- Grafik 7: Vergrößerte Darstellung des in Grafik 5 rot eingerahmten Areal; 400-fache Vergrößerung; PSR, Durchlicht (Hellbild)
- Grafik 8: Vergrößerte Darstellung des in Grafik 5 rot eingerahmten Areal; 400-fache Vergrößerung; PSR, Durchlicht mit Polfilter (Dunkelbild)
- Grafik 9: Aorta ascendens einer 30-wöchigen ApoE(-/-)-Maus bei 100-facher Vergrößerung; ungefärbt bei Durchlicht
- Grafik 10: Schnittebene aus Grafik 9 unter fluoreszierendem Licht; 100-fache Vergrößerung; CD68-Immunfluoreszenz
- Grafik 11: Ausschnitt einer Aorta ascendens mit Plaque einer 30-wöchigen ApoE(-/-)-Maus bei 200-facher Vergrößerung unter fluoreszierendem Licht; CD68-Immunfluoreszenz

Diagramme

- Diagramm 1: Entwicklung der Elastinfragmentierung der Aorta ascendens für ApoE (-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf
- Diagramm 2: Entwicklung der Elastinfragmentierung der Aorta abdominalis für ApoE(-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf

Diagramm 3: Entwicklung des prozentualen Kollagengehaltes der Aorta ascendens anteilig an der Gefäßwandquerschnittsfläche für ApoE (-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf

Diagramm 4: Entwicklung des prozentualen Kollagengehaltes der Aorta abdominalis anteilig an der Gefäßwandquerschnittsfläche für ApoE (-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf

Diagramm 5: Entwicklung des prozentualen Anteils der mit CD68 Ak-gefärbten Fläche an der Gefäßwandquerschnittsfläche der Aorta ascendens für ApoE(-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf

Diagramm 6: Entwicklung des prozentualen Anteils der mit CD68 Ak-gefärbten Fläche an der Gefäßwandquerschnittsfläche der Aorta abdominalis für ApoE(-/-)- und Kontrollmäuse im Zeitverlauf

Tabellen

Tabelle 1: Messergebnisse der Aorta ascendens als Mittelwerte (Färbung PSR, ausgewertet unter polarisiertem Licht).

Tabelle 2: Messergebnisse der Aorta abdominalis als Mittelwerte (Färbung PSR, ausgewertet unter polarisiertem Licht).

Tabelle 3: Messergebnisse der Aorta ascendens als Mittelwerte (Färbung: CD68 Ak-Immunfluoreszenz)

Tabelle 4: Messergebnisse der Aorta abdominalis als Mittelwerte (Färbung: CD68 Ak-Immunfluoreszenz)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang R. Bauer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Thorsten Bley für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg Ertl für die Zustimmung zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Alexander Gotschy danke ich für seine unterstützenden Ratschläge zur Planung und Durchführung der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin. Insbesondere danke ich Frau Elisabeth Bauer für die sachkundige Einführung in die histologischen Färbetechniken und ihren bereitwilligen Einsatz bei dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Partnerin Eva für die stetige und verständnisvolle Unterstützung während des gesamten Studiums und der Erstellung dieser Arbeit.