

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Wirkung von Baicalein auf die  
inflammatorischen Zellen und Mediatoren  
des Aortenaneurysmas der Maus**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Adrian Alain Abele**  
Tierarzt aus Überlingen

Berlin 2021  
Journal-Nr.: 4263







**Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Wirkung von Baicalein auf die inflammatorischen Zellen und Mediatoren  
des Aortenaneurysmas der Maus**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

Adrian Alain Abele

**Tierarzt**

aus Überlingen

**Berlin 2021**

Journal-Nr.: **4263**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Erster Gutachter: PD Dr. Christoph Gabler  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Susanne Dihlmann  
Dritter Gutachter: PD Dr. Ulrike Lodemann

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*  
mice, animal models, inflammation, flavones, aorta, aneurysm

Tag der Promotion: 16.08.2021

*Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-132-2

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2021**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2021 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin  
verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

## Widmung

**„Est modus in rebus, sunt certi denique fines,  
quos ultra citraque nequit consistere rectum.“**

*Horaz: Sermones I, 1, 106-07*

Meiner Familie



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Abkürzungen.....	X
1. Einleitung .....	1
2. Literatur.....	2
2.1 Histologischer Aufbau der Aortenwand.....	2
2.2. Das abdominelle Aortenaneurysma .....	3
2.2.1 Definition .....	3
2.2.2 Epidemiologie.....	3
2.2.3 Pathophysiologie des abdominellen Aortenaneurysmas .....	3
2.2.4 Inflammasome im Aortenaneurysma .....	4
2.2.4.1 Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD .....	5
2.2.4.2 Nod-like receptor family pyrin domain containing 3 .....	6
2.2.4.3 Absent in Melanoma 2 .....	7
2.2.5 Diagnostik und Therapie des abdominellen Aortenaneurysmas.....	8
2.2.6 Mausmodelle zur Erforschung des Aortenaneurysmas .....	11
2.2.6.1 Unterschiede zu anderen Tiermodellen .....	11
2.2.6.2 Mausmodelle im Überblick .....	12
2.2.6.3 Das ApoE <sup>-/-</sup> -Angiotensin II-Mausmodell .....	16
2.3 Ziel der Arbeit.....	18
3. Material und Methoden .....	19
3.1 Material .....	19
3.1.1 Versuchstiere.....	19
3.1.2 Geräte.....	19
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	20
3.1.4 Osmotische Pumpe .....	20
3.1.5 Reagenzien .....	20
3.1.6 Primäre Antikörper.....	22
3.1.7 Sekundäre Antikörper .....	22
3.1.8 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	23

## Inhalt

---

3.1.9 Puffer und Lösungen .....	23
3.2 Methoden .....	26
3.2.1 Tierversuchsantrag .....	26
3.2.2 Versuchsaufbau .....	26
3.2.3 Pumpen und deren Befüllung .....	27
3.2.4 Sonographische Messung des Aortendiameters und der Fließgeschwindigkeit .....	28
3.2.5 Operation .....	31
3.2.6 Postoperative Betreuung .....	32
3.2.7 Tötung und Probenentnahme .....	32
3.2.8 Aufbereitung .....	33
3.3 Histologie .....	33
3.3.1 Verwendete Färbemethoden .....	33
3.3.2 Histologische Färbungen .....	33
3.3.2.1 Entparaffinierung und Rehydrierung .....	34
3.3.2.2 Masson-Goldner-Färbung .....	34
3.3.2.3 Elastica-von-Gieson-Färbung .....	34
3.3.2.4 Hämalaun-Färbung nach Mayer .....	35
3.3.2.5 Entwässerung und Eindeckprozess .....	36
3.3.3 Immunhistochemie .....	36
3.3.3.1 Antigendemaskierung und Peroxidaseblock .....	36
3.3.3.2 Immunologische Markierung (für ASC, AIM-2, NLRP3, CD45) .....	37
3.3.4 TUNEL-Assay zum Nachweis von Apoptose .....	39
3.4 Datenerhebung .....	39
3.4.1 Histologische Auswertung .....	39
3.4.2 Statistische Methoden .....	43
3.4.2.1 T-Test .....	43
3.4.2.2 Fisher-Exakt-Test .....	43
3.4.2.3 Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest .....	43
3.4.2.4 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test .....	44
3.4.2.5 Datenbearbeitung mittels Microsoft Excel .....	44
4. Ergebnisse .....	45
4.1 Ergebnisse zum Einfluss von Baicalein auf die Entstehung eines Aortenaneurysmas .....	45

## Inhalt

---

4.1.1 Mortalität.....	45
4.1.2 Inzidenz der Aneurysmen.....	47
4.1.3 Diameterentwicklung.....	49
4.1.4 Degeneration der Media.....	50
4.1.5 Mittlere Fließgeschwindigkeit.....	52
4.1.6 Systolischer Spitzenfluss.....	56
4.2 Ergebnisse zum Einfluss von Baicalein auf die Inflammation.....	61
4.2.1 CD45.....	62
4.2.2 Inflammasome.....	63
4.2.2.1 ASC.....	63
4.2.2.2 AIM2.....	64
4.2.2.3 NLRP3.....	66
4.2.3 TUNEL-Assay.....	67
4.3 Altersverteilung der Mäuse.....	68
4.3.1 Altersverteilung gesamt.....	68
4.3.2 Altersverteilung Versuchsgruppen.....	69
4.3.3 Aneurysmaspezifische Altersverteilung.....	72
5. Diskussion.....	73
5.1. Tiermodell und Methodik.....	73
5.2. Baicalein.....	76
5.3. Sonographie.....	76
5.4. Histologie und Immunhistologie.....	77
5.5. Fazit.....	80
5.6. Ausblick.....	81
6. Zusammenfassung.....	82
7. Summary.....	83
8. Literaturverzeichnis.....	84
Anhang.....	XIII
Publikationen.....	XXIII
Danksagung.....	XXIV
Selbständigkeitserklärung.....	XXV

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ausschnitt einer Aorta im Elastica-von-Gieson (EVG)-Schnitt mit Beschriftung der einzelnen Schichten (eigene Abbildung).....	2
Abbildung 2: Ablauf Inflammation: Durch äußere Stressoren kommt es zum Zelltod, was die Inflammation des Gewebes und dessen Regeneration auslöst. (eigene Abbildung).....	5
Abbildung 3: NLR-Inflammasome und AIM2-like receptor-Inflammasome interagieren mittels des Inflammasom-aktivierenden Sensor über PYD mit ASC. ASC interagiert mittels CARD mit der Casp-1. Es kommt zur Aktivierung von Casp-1. (NACHT = NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from <i>Podospora anserina</i> ) and TP1 (telomerase-associated protein)) (eigene Abbildung).....	6
Abbildung 4: Intrazelluläre Aktivierung von NLRP3 und AIM2 (eigene Abbildung).....	8
Abbildung 5: Strukturformel von Baicalein (eigene Abbildung).....	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Inaktivierung von Gensequenzen mittels homologer Rekombination (Braun und Willnow 1996). Mit freundlicher Genehmigung des Autors. ....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung von Knockout-Mäusen (Braun und Willnow 1996). Mit freundlicher Genehmigung des Autors. ....	14
Abbildung 8: Fast performance liquid chromatography (FPLC)-Einzelspektren des Cholesterinplasmaspiegels von Wildtyp-Mäusen, LDLR <sup>-/-</sup> -Mäusen und ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen. (Braun und Willnow 1996). Mit freundlicher Genehmigung des Autors.....	15
Abbildung 9: Aufbau der Osmotischen Pumpe inklusive Befüllungseinheit. Aus Theeuwes und Yum (1976). Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature. ....	17
Abbildung 10: Schematischer Ablauf des Versuchsaufbaus (eigene Abbildung) .....	27
Abbildung 11: Sonographische Darstellung der Aorta am Zwerchfelddurchtritt (eigene Abbildung) .....	29
Abbildung 12: Sonographische Darstellung der Aorta auf Höhe der kreuzenden Nierenvene (eigene Abbildung) .....	29
Abbildung 13: Messung der fünf Bereiche am Aneurysma (eigene Abbildung).....	30
Abbildung 14: Sonographische Darstellung des Geschwindigkeitszeitintegrals (velocity time integral, VTI) mit Messung der mittleren Fließgeschwindigkeit (mean velocity, Mean Vel) und der systolischen Spitzenflussgeschwindigkeiten (peak systolic velocity, PSV) (eigene Abbildung) .....	30

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 15: Maus mit implantierter Pumpe (Pfeil) nach Entfernen der Fäden (eigene Abbildung) .....	31
Abbildung 16: Präparierte Aorta mit Darstellung der drei Bereiche (eigene Abbildung) .....	32
Abbildung 17: Beispiele für die HE-, MG-, EVG- und die CD45- Färbung (eigene Abbildung) .....	35
Abbildung 18: Bewertungsschema Graduierung Mediadegeneration (HE-Färbung).....	40
Abbildung 19: Detailansicht Mediadegeneration Grad II und Grad III .....	40
Abbildung 20: Schema Lokalisierung der zur Auszählung verwendeten Areale .....	42
Abbildung 21: Mortalität im zeitlichen Verlauf für die mit NaCl behandelten Tier der Gruppen NaCl BAI- und NaCl BAI+ (je Anzahl (n) = 10) und die mit Ang II behandelten Tiergruppen Ang II BAI- und Ang II BAI+ (je n = 30) .....	45
Abbildung 22: Mortalität gesamt in Prozent für die mit NaCl behandelten Tiere der Gruppen (je n = 10) und die mit Ang II behandelten Tiergruppen (je n = 30).....	46
Abbildung 23: Aneurysma-spezifische Mortalität in Prozent für die mit NaCl behandelten Tiergruppen (je n = 10) und die mit Ang II behandelten Tiere der Gruppen (je n = 30) .	47
Abbildung 24: Inzidenz Aneurysmen Abschnitte 2 und 3 in Prozent für die mit NaCl behandelten Tiergruppen (je n = 10) und die mit Ang II behandelten Tiergruppen (je n = 30) .....	48
Abbildung 25 A: Histologischer HE-Schnitt eines Aneurysmas einer vorzeitig verstorbenen Maus. B: HE-Schnitt eines Aneurysmas einer Maus nach Ende des Experiments.....	48
Abbildung 26 A-C: SMC-Färbungen von Aortenaneurysmen .....	49
Abbildung 27: Diameterentwicklung der Aorten aller Mäuse in Millimeter für die mit NaCl behandelten Tiergruppen (je n = 10) und die mit Ang II behandelten Tiergruppen (je n = 30) * P < 0,05.....	49
Abbildung 28: Diagramm der Verteilung in den Gruppen die den jeweiligen Grad aufwiesen. A: Grad 0; B: Grad I; C: Grad II und D: Grad III .....	52
Abbildung 29: Mittlere Fließgeschwindigkeit (in mm/s) Woche 0 in Millimeter pro Sekunde für die Kontrollgruppen (NaCl BAI-/+ je n = 10 und Ang II BAI- n = 30) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 30).....	54
Abbildung 30: Mittlere Fließgeschwindigkeit (in mm/s) Woche 1 in Millimeter pro Sekunde für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 4, NaCl BAI+ n = 0 und Ang II BAI- n = 25) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 23).....	54
Abbildung 31: Mittlere Fließgeschwindigkeit (in mm/s) Woche 2 in Millimeter pro Sekunde für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 9, NaCl BAI+ n = 10 und Ang II BAI- n = 12) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 14).....	55

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 32: Mittlere Fließgeschwindigkeit (in mm/s) Woche 3 in Millimeter pro Sekunde für die Kontrollgruppen (NaCl BAI-/+ je n = 10 und Ang II BAI- n = 16) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 18).....	55
Abbildung 33: Mittlere Fließgeschwindigkeit (in mm/s) Woche 4 in Millimeter pro Sekunde für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 8, NaCl BAI+ n = 10 und Ang II BAI- n = 21) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 16), * P < 0,05 (T-Test).....	56
Abbildung 34: Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (PSV in mm/s) Woche 0 in Millimeter pro Sekunde für die Kontrollgruppen (NaCl BAI-/+ je n = 10 und Ang II BAI- n = 30) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 30).....	58
Abbildung 35: Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (PSV in mm/s) Woche 1 in Millimeter pro Sekunde für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 4, NaCl BAI+ n = 0 und Ang II BAI- n = 25) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 23) .....	58
Abbildung 36: Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (PSV in mm/s) Woche 2 in Millimeter pro Sekunde für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 10, NaCl BAI+ n = 8 und Ang II BAI- n = 14) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 14) .....	59
Abbildung 37: Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (PSV in mm/s) Woche 3 in Millimeter pro Sekunde für die Kontrollgruppen (NaCl BAI-/+ je n = 10 und Ang II BAI- n = 15) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 18).....	59
Abbildung 38: Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (PSV in mm/s) Woche 4 in Millimeter pro Sekunde für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 9, NaCl BAI+ n = 10 und Ang II BAI- n = 21) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 17), * P < 0,05 (T-Test).....	60
Abbildung 39: Repräsentative Darstellung der immunologischen Markierung von CD45, ASC, AIM2, NLRP3 und des TUNEL-Assay nach dem Schema der Abbildung 20.....	61
Abbildung 40: Anzahl CD45-positiver Zellen (Gruppe Ang II BAI- n = 7, Gruppe Ang II BAI+ n = 5) exklusive der vorzeitig während des Experimentes verstorbenen Mäuse (Mittelwert ± Standardabweichung). .....	62
Abbildung 41: Anzahl ASC-positiver Zellen (Gruppe Ang II BAI- n = 7, Gruppe Ang II BAI+ n = 6) exklusive vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse (Mittelwert ± Standardabweichung). .....	64
Abbildung 42: Anzahl AIM2-positiver Zellen (Gruppe Ang II BAI- n = 7, Gruppe Ang II BAI+ n = 5) exklusive vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse (Mittelwert ± Standardabweichung). .....	65
Abbildung 43: Anzahl NLRP3-positiver Zellen (Gruppe Ang II BAI- n = 7, Gruppe Ang II BAI+ n = 6) exklusive vorzeitig verstorbene Mäuse (Mittelwert ± Standardabweichung). .....	66
Abbildung 44: Anzahl apoptotischer Zellen (Gruppe Ang II BAI- n = 7, Gruppe Ang II BAI+ n = 6) exklusive vorzeitig verstorbene Mäuse (Mittelwert ± Standardabweichung).....	68

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 45: Alter der Versuchstiere (Gruppe NaCl BAI- und NaCl BAI+ je n = 10, Gruppe Ang II BAI- und Ang II BAI+ je n = 30, Gesamt n = 80) in Wochen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). .....	71
Abbildung 46: Die durchschnittliche Aneurysmaspezifische Altersverteilung der Gruppen Ang II BAI- (n = 12) und Ang II BAI+ (n = 10). Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.....	72
Abbildung 47: Wochenübersicht der mittleren Fließgeschwindigkeit (in mm/s) der drei Kontrollgruppen (NaCl BAI-, NaCl BAI+ und Ang II BAI-) und der Verumgruppe (Ang II BAI+) .....	XIV
Abbildung 48: Wochenübersicht des durchschnittlichen systolischen Spitzenflusses (PSV in mm/s) der drei Kontrollgruppen (NaCl BAI-, NaCl BAI+ und Ang II BAI-) und der Verumgruppe (Ang II BAI+).....	XIV
Abbildung 49: Mittelwerte der Anzahl CD45-positiver Zellen inklusive der vorzeitig während des Experimentes verstorbenen Mäuse ( $\pm$ Standardabweichung).....	XVI
Abbildung 50: Mittelwerte der Anzahl ASC-positiver Zellen inklusive vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse ( $\pm$ Standardabweichung) .....	XVII
Abbildung 51: Mittelwerte der Anzahl AIM2-positiver Zellen inklusive vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse ( $\pm$ Standardabweichung) .....	XVII
Abbildung 52: Mittelwerte der Anzahl NLRP3-positiver Zellen inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse ( $\pm$ Standardabweichung) .....	XVIII
Abbildung 53: Mittelwert der Anzahl TUNEL-positiver (apoptotischer) Zellen ( $\pm$ Standardabweichung) .....	XIX
Abbildung 54: Altersverteilung in Wochen Gesamt.....	XIX
Abbildung 55 Altersverteilung in Wochen der Gruppe NaCl BAI- und Gesamtanzahl Gruppe NaCl BAI- .....	XX
Abbildung 56: Altersverteilung in Wochen der Gruppe Ang II BAI- und Gesamtanzahl Gruppe Ang II BAI- .....	XX
Abbildung 57: Altersverteilung in Wochen der Gruppe Ang II BAI+ und Gesamtanzahl Gruppe Ang II BAI+ .....	XXI
Abbildung 58: Artefakte (Pfeile) in einem HE gefärbten Schnitt.....	XXI
Abbildung 59: Artefakt (Pfeile) in einem HE gefärbten Schnitt.....	XXII
Abbildung 60: Unvollständiges Gefäß in einem ungefärbten Präparat .....	XXII

Alle Abbildungen, bei denen keine anderweitigen Quellenangaben vorhanden sind, wurden durch den Doktoranden erstellt.

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsgruppen .....	27
Tabelle 2: Merkmale der Mediadegeneration.....	40
Tabelle 3: Mediadegeneration Gesamt und der einzelnen Gruppen .....	51
Tabelle 4: Mittelwert der Auszählung der Leukozyteninfiltration (CD45-positiven Zellen) exklusive der vorzeitig verstorbenen Mäuse $\pm$ Standardabweichung .....	63
Tabelle 5: Mittelwert der Expression von ASC exklusive vorzeitig verstorbenen Mäuse $\pm$ Standardabweichung.....	64
Tabelle 6: Mittelwert der Expression von AIM2 exklusive vorzeitig verstorbener Mäuse $\pm$ Standardabweichung.....	65
Tabelle 7: Mittelwert der Expression von NLRP3 exklusive der vorzeitig verstorbenen Mäuse $\pm$ Standardabweichung.....	67
Tabelle 8: Mittelwert der apoptotischen Zellen $\pm$ Standardabweichung .....	68
Tabelle 9: Verteilung des Alters der Mäuse in Wochen Gesamt $\pm$ Standardabweichung .....	69
Tabelle 10: Altersverteilung in Wochen der Gruppe NaCl BAI- $\pm$ Standardabweichung.....	69
Tabelle 11: Altersverteilung in Wochen der Gruppe NaCl BAI+ $\pm$ Standardabweichung.....	69
Tabelle 12: Altersverteilung in Wochen der Gruppe Ang II BAI- $\pm$ Standardabweichung .....	70
Tabelle 13: Altersverteilung in Wochen der Gruppe Ang II BAI+ $\pm$ Standardabweichung .....	70
Tabelle 14: Durchschnittliches Alter in Wochen $\pm$ Standardabweichung .....	71
Tabelle 15: Mortalität aller Versuchsgruppen (Gesamter Versuchszeitraum).....	XIII
Tabelle 16: Aneurysma-spezifische Mortalität .....	XIII
Tabelle 17: Inzidenz der Aneurysmen.....	XIII
Tabelle 18: Mittlere Fließgeschwindigkeit .....	XIII
Tabelle 19: Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss $\pm$ Standardabweichung.....	XIV
Tabelle 20: P-Wert CD45-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse.....	XV
Tabelle 21: P-Wert ASC-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse .....	XV
Tabelle 22: P-Wert AIM2-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse .....	XV
Tabelle 23: P-Wert NLRP3-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive während des Experiments verstorbenen Mäuse.....	XV
Tabelle 24: P-Wert apoptotischer Zellen in der Aorta aller Mäuse ohne vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse.....	XV
Tabelle 25: Mittelwert der Auszählung der Leukozyteninfiltration (CD45-positiven Zellen)....	XVI

## Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 26: Mittelwert der Expression von ASC inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse..... XVI

Tabelle 27: Mittelwert der Expression von AIM2 inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse.... XVII

Tabelle 28: Mittelwert der Expression von NLRP3 inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse XVIII

Tabelle 29: Mittelwert der apoptotischen Zellen inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse.... XVIII

## Abkürzungen

-/-	Knockout des vorangestellten Genes
AA	Aortenaneurysma
AAA	Abdomielles Aortenaneurysma
ACE	Angiotensin Converting Enzyme (Angiotensin-konvertierendes Enzym)
AIM2	Absent in Melanoma 2 (Abwesend in Hautkrebszellen 2)
Ang II	Angiotensin II
ApoE	Apolipoprotein E
ASC	Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD (Apoptose-assoziiertes Speck-ähnliches Protein mit CARD) auch PYCARD genannt
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAI	Baicalein
BAI-	Nicht mit Baicalein behandelte Gruppen
BAI+	Mit Baicalein behandelte Gruppen
BID	BH3 interacting-domain death agonist (BH3 interagierender Domänen- Tod-Agonist)
CARD	Caspase activation and recruitment domain (Caspase Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne)
Casp-1	Caspase 1
Casp-5	Caspase 5
CD45	Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C
CT	Computertomographie
DAP-1	Death-associated protein 1 (Todesassoziiertes Protein)
DGG	Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESVS	European Society for Vascular Surgery (Europäische Gesellschaft für Gefäßchirurgie)
EtOH	Ethanol
EVAR	Endovaskuläre Aneurysma Reparation
EVG	Elastica-von-Gieson Färbung
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötales Rinderserum)
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2)
FPLC	Fast protein liquid chromatography (Schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff (in H <sub>2</sub> O: Salzsäure)
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoprotein mit hoher Dichte)
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIN-200-Domäne	Hemopoietic expression, Interferon-inducibility, Nuclear localization, and characteristic 200 amino-acid Domain (Hämopoetische Expressions-, Interferon-Induzierbarkeits-, nukleare Lokalisations- und charakteristische 200 Aminosäure-Domäne)

## Abkürzungen

---

HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
i.p.	Intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IL6	Interleukin 6
IL18	Interleukin 18
IL1A	Interleukin 1 alpha
IL1B	Interleukin 1 beta
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (internationale Union für reine und angewandte Chemie)
KGW	Körpergewicht
Kontralat. S.	Kontralaterale Seite
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoprotein mit niedriger Dichte)
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor (Rezeptor für Lipoprotein mit niedriger Dichte)
LRR	Leucine-rich Repeat (Leucin-reiche Wiederholung)
Mean Vel	Mean Velocity (Mittlere Fließgeschwindigkeit)
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor (Makrophagenmigrationshemmfaktor)
min	Minute
mM	Millimol
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NACHT	NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from <i>Podospira anserina</i> ) and TP1 (telomerase-associated protein)
NaCl	Natriumchlorid
NB	Nucleotide-Binding Domain (Nukleotid-bindende Domäne)
NLR	Nod-like Receptor (Nod-ähnlicher Rezeptor)
NLRP1/NLRP3	Nod-like Receptor family Pyrin domain containing 1 / 3 (Nod-ähnliche Rezeptorfamilie mit der Pyrin-Domäne 1 / 3)
NSAID	Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug (Nichtsteroidale Antiphlogistika)
PAMPS	Pathogen-associated Molecular Patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	Pondus Hydrogenii
PK	Polyketide
Pro-	Inaktives Vorläuferprotein
PRR	Pattern Recognition Receptors (Muster-Erkennungsrezeptoren)
PSV	Peak systolic velocity (maximaler systolischer Spitzenfluss)
PYCARD	PYD- and CARD Domain-Containing Protein (PYD- und CARD Domäne-enthaltendes Protein) auch ASC genannt
PYD	Pyrin-Domäne
P-Wert	Probabilitas-Wert (Signifikanzwert)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)

## Abkürzungen

---

SMA	Smooth Muscle Actin (Glattes Muskelzellaktin)
SMC	Smooth Muscle Cells (Glatte Muskelzellen)
SPSS	Statistiksoftware IBM SPSS Statistics
SVS	Society for Vascular Surgery
TBS	TRIS-buffered Salt Solution (TRIS-gepufferte Salzlösung)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TdT-vermittelte dUTP-Biotin-Nick-End-Etikettierung)
UTP	Uridintriphosphat
UVB	Mittlere Ultraviolettstrahlung
VALT	Vaskular-associated lymphoid tissue (Vaskulär-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (Lipoprotein mit sehr niedriger Dichte)
VTI	Velocity time integral (Geschwindigkeitszeitintegral)
V/V	Volume by volume (Volumenprozent)
W/V	Weight by volume (Gewichtsprozent)
Wo	Woche

### 1. Einleitung

Aneurysmen sind krankhafte, lokale und dauerhafte Erweiterungen einer Arterie (Johnston et al. 1991). Beim Menschen stellt das Aortenaneurysma (AA) eine der häufigsten Formen kardiovaskulärer Erkrankungen dar (Peshkova et al. 2016). Besonders betroffen sind Männer über 65 Jahre (Laine et al. 2016). Sowohl die Progression und Entstehung von Aortenaneurysmen als auch die genaue Pathophysiologie der krankhaften Aufweitung der Aorta sind bis dato nicht hinreichend erforscht.

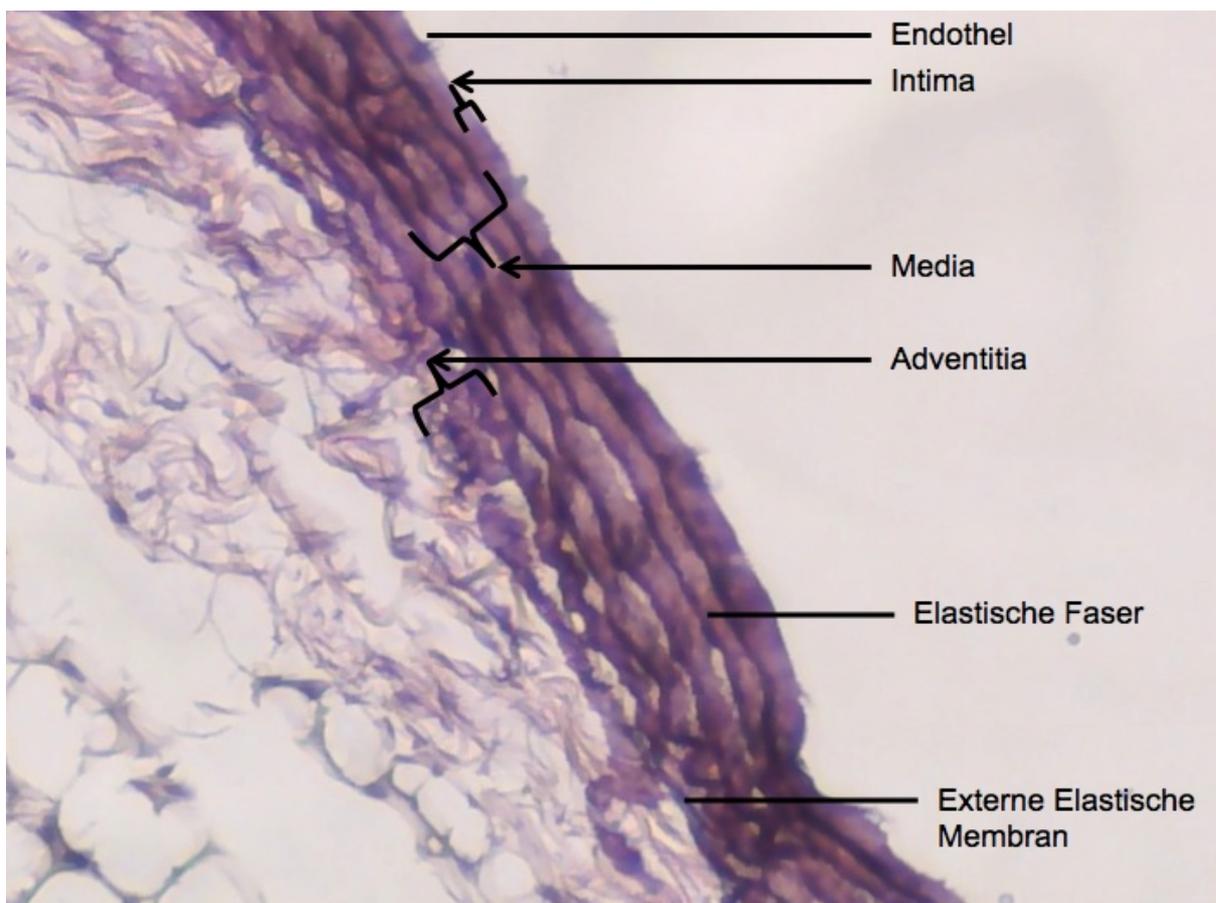
Auf Grund der Inzidenz dieser Erkrankung stellt sich somit die Frage, wie statt der Behandlung des Endstadiums beziehungsweise des rupturierten AAs bereits zu Beginn der Entstehung in die beitragenden Mechanismen therapeutisch eingegriffen werden kann. Hierzu gelten die mit einem AA einhergehenden inflammatorischen Prozesse als Ansatzpunkt. Wie stark dieses Thema die Wissenschaft beschäftigt, zeigt die Vielzahl der Veröffentlichungen (Powell 1991, Bergqvist 2011, Twine und Williams 2011, Peshkova et al. 2016). Einen Schwerpunkt der Forschung im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen bilden die Inflammasome. Diese intrazellulären Multiproteinkomplexe erkennen Pathogene und krankheits-assoziierte Strukturen und leiten Inflammation mit anschließender Geweberegeneration ein.

Die Erforschung des AAs im Mausmodell und dessen Beitrag zu einem besseren Verständnis und der Erforschung von Lösungsansätzen beim Menschen ist somit von entscheidendem Interesse. Einen dieser Lösungsansätze kann die Wirkung des Phytopharmakons Baicalein (BAI), einem Wirkstoff aus dem Baikal-Helmkraut, bieten. Dieses Flavonoid wird in der altchinesischen Medizin zur Behandlung von arterieller Hypertonie und Entzündungen eingesetzt. Eine präventive Wirkung gegen abdominelle Aortenaneurysmen wird postuliert (Wang et al. 2016). Dies soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

## 2. Literatur

### 2.1 Histologischer Aufbau der Aortenwand

Die Aorta stellt eine Arterie des elastischen Typs dar. Sie ist durch drei Schichten charakterisiert, die *Tunica interna* (Intima), die *Tunica media* (Media) und die *Tunica externa* (Adventitia). Die Intima besteht aus dem lumenseitigen Endothel und einem bindegewebigen *Stratum subendotheliale* mit einzelnen glatten Muskelzellen. Die Media mit ihren vielen elastischen Fasern und wenigen glatten Muskelzellen bildet die dickste der drei Schichten. Die Adventitia wirkt mit ihrer dichten Schicht kollagener und elastischer Fasern einer Wandüberdehnung in der Aorta entgegen. Sie geht nach außen hin in gelockertes Bindegewebe über und wird nach innen hin durch die externe elastische Membran (*Membrana elastica externa*) von der Media abgegrenzt (Weyrauch 2009) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Ausschnitt einer Aorta im Elastica-von-Gieson (EVG)-Schnitt mit Beschriftung der einzelnen Schichten (eigene Abbildung)

## 2.2. Das abdominelle Aortenaneurysma

### 2.2.1 Definition

Das Wort abdominelles Aortenaneurysma (AAA) kommt vom altgriechischen Wort *Ανεύρυσμα* und bezeichnet die irreversible Dilatation der Aorta. Der normale Diameter der infrarenalen *Aorta abdominalis* des Menschen wird in der Literatur mit einem mittleren computertomographisch gemessenen Durchmesser von 1,66 bis 2,16 cm bei der Frau und 1,99 bis 2,39 cm beim Mann angegeben. Sonographisch werden 1,19 bis 1,87 cm bei der Frau und 1,41 bis 2,05 cm beim Mann als Werte festgestellt (Johnston et al. 1991). Eine Dilatation um das 1,5 fache des normalen Durchmessers wird von Forschern und in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin (DGG) und der European Society for Vascular Surgery (ESVS) als abdominelles Aortenaneurysma definiert (Johnston et al. 1991, Moll et al. 2011, Kent 2014, Wanhainen et al. 2019).

### 2.2.2 Epidemiologie

Die Inzidenz des abdominellen Aortenaneurysmas beträgt laut den Leitlinien der DGG 40 pro 100.000 Einwohner pro Jahr ((D.G.G.) 2010). Dies zeigt in Verbindung mit 4,3 rupturierten AAAs pro 100.000 Einwohnern und einer Sterblichkeitsrate von 3,2 pro 100.000 Einwohnern (Laine et al. 2016), dass es sich hierbei zusammen mit Arteriosklerose um die häufigsten Formen kardiovaskulärer Erkrankungen handelt (Peshkova et al. 2016). Diese Erkrankung betrifft am häufigsten Männer über 65 Jahren (Laine et al. 2016). Als Risikofaktoren zählen neben dem Alter und dem Geschlecht unter anderem die Hypercholesterinämie und arterielle Hypertension (Chaikof et al. 2009, Chaikof et al. 2018). Als Ursache für ein erhöhtes AAA-Risiko gelten neben verschiedenen Genvariationen zirkulierende Biomarker wie die Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9), Interleukin 6 (IL6) und Fibrinogen (Golledge et al. 2008).

### 2.2.3 Pathophysiologie des abdominellen Aortenaneurysmas

Zum Verständnis der vorliegenden Arbeit ist die Pathophysiologie des AAAs von essentieller Bedeutung. Der sehr komplexe Vorgang der Entstehung eines AAAs wird von vielen Faktoren beeinflusst.

Derzeitig werden die entscheidenden Mechanismen bei der Entstehung eines AAAs noch weitergehend erforscht.

Einer dieser Mechanismen ist die **Degeneration der extrazellulären Matrix** durch Metalloproteasen und Serinproteasen (Busuttill et al. 1980). Dabei kommt es zu einer verringerten Dehnungsfähigkeit durch erhöhte Elastase-Aktivität im AAA.

Einen weiteren Mechanismus stellt der von Lopez-Candales et al. (1997) beschriebene **Verlust von glatten Muskelzellen in der Media** durch Apoptose dar.

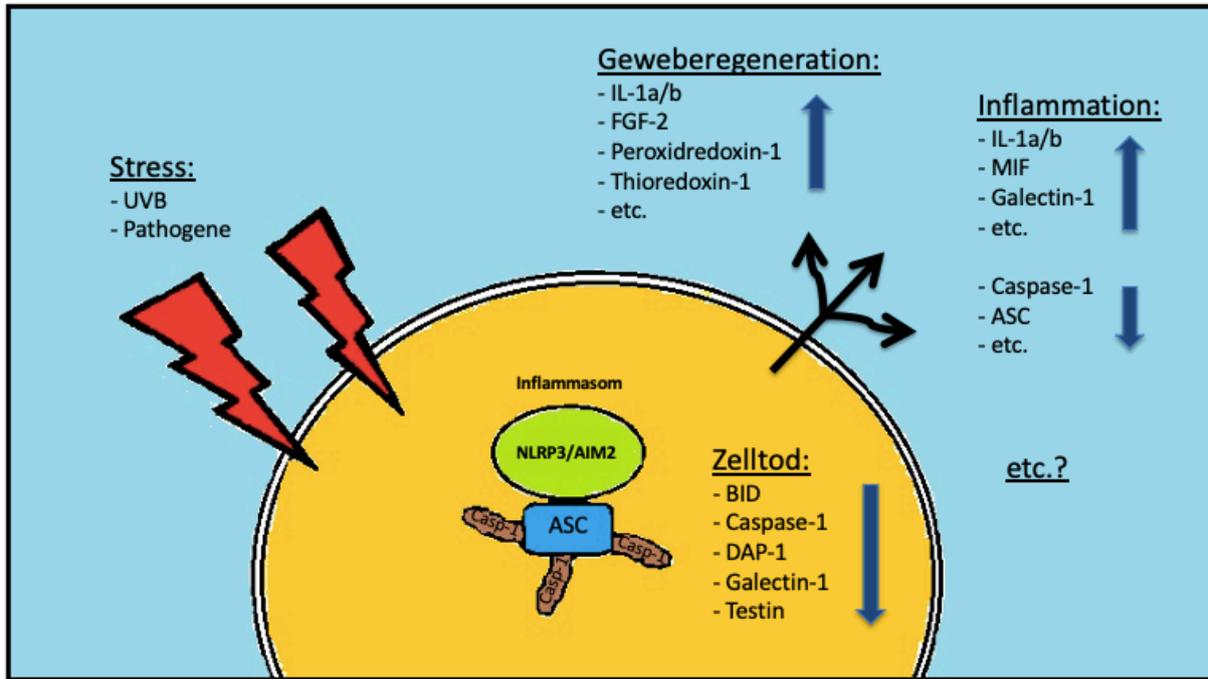
Neben den eben beschriebenen Effekten treten zusätzlich drei weitere Mechanismen auf, zum einen die oben beschriebene Degeneration von elastischen Fasern durch Entzündungsmechanismen, zum anderen die **arteriosklerotische Zerstörung der Intima** und die **mononukleare inflammatorische Einwanderung** mit Monozyten, Leukozyten und Immunglobulin-Aggregaten im Übergang der Media in die Adventitia (Brophy et al. 1991, Michel et al. 2011). Diese Infiltration führt durch T- und B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten zur Ausschüttung unterschiedlicher inflammatorischer Faktoren wie Chemokine, die Zytokine miteinschließt (Shimizu et al. 2006). Es bilden sich im Übergangsbereich der Adventitia zur Media als „Vaskular-associated lymphoid tissue“ (VALT) bezeichnete Ansammlungen dieser Zellen (Bobryshev und Lord 2001, Ocana et al. 2003). Die überwiegende Ansammlung von Makrophagen im Bereich der Adventitia an Stelle der Media konnte im Apolipoprotein E (ApoE)-Knockout-Mausmodell gezeigt werden (Gavrila et al. 2005). Diese von außen beginnende Entzündungsreaktion belegen neuere Erkenntnisse, nach denen sich der Entzündungsprozess von der Adventitia nach luminal ausbreitet (Maiellaro und Taylor 2007). Ebenso wird dies durch die Erkenntnis der Transformation von adventitiellen Fibroblasten zu Myofibroblasten gestützt (Maiellaro und Taylor 2007), welche wiederum durch Einwanderung in den geschädigten Gefäßbereich zu einer chronischen Entzündung führen.

### **2.2.4 Inflammasome im Aortenaneurysma**

Pathogene, oxidativer Stress und Zellschäden gelten als Stimuli für die Auslösung einer Inflammation. Die systemische und lokale Antwort auf diese Reize, die zur Inflammation führen, wird durch das Interleukin 1 beta (IL1B) ausgelöst (Dinarello 1998).

Die angeborene Immunabwehr erkennt auf und in der Zelle Pathogen-Bestandteile über Muster erkennende Rezeptoren, auch Pattern recognition receptors (PRRs) genannt (Janeway und Medzhitov 2002).

Zu diesen Rezeptoren zählen unter anderem die Nucleotide-binding domain (NB) und leucine-rich repeat (LRR) containing receptors, auch oft Nod-like receptors (NLRs) genannt (Franchi et al. 2009). Einer dieser NLRs stellen Nod-like receptor family pyrin domains (NLRPs), wie NLRP1 und NLRP3 dar. Durch Oligomerisation aktivieren NLRPs die Caspase 1-Kaskade und damit die Produktion von IL1B (Martinon et al. 2002).



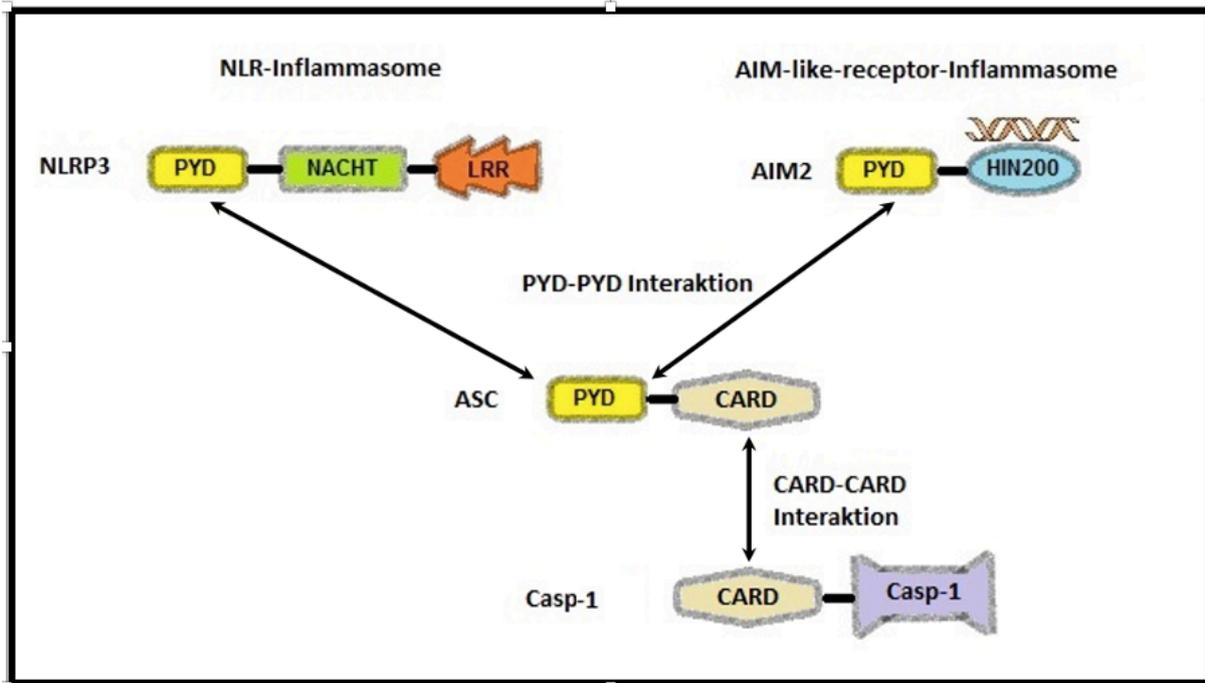
**Abbildung 2:** Ablauf Inflammation: Durch äußere Stressoren kommt es zum Zelltod, was die Inflammation des Gewebes und dessen Regeneration auslöst. (eigene Abbildung)

Der Begriff Inflammasom wurde zuerst von Martinon et al. (2002) geprägt und beschreibt einen intrazellulären Multiproteinkomplex bestehend aus der Cysteineprotease Caspase 1 (Casp-1), Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD, kurz ASC (PYCARD) und einem, das Inflammasom-aktivierenden, Sensor (Abbildung 2 und 3). Inflammasome lassen sich in zwei Gruppen einteilen, NLR-Inflammasome und Absent in Melanoma 2 (AIM2)-like receptor-Inflammasome. Diese unterscheiden sich in der Sensoreinheit.

### 2.2.4.1 Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD

ASC besteht aus einer Pyrin-Domäne (PYD) und einer Caspase activation and recruitment domain (CARD) (Masumoto et al. 1999) (Abbildung 3). Es stellt die Verbindung zwischen der, über PYD verbundenen Inflammasom-aktivierenden, Sensoreinheit und der, mittels CARD verbundenen, Casp-1 Einheit dar (Lu et al. 2014) (Abbildung 3).

Wie entscheidend der Anteil der ASC an der Aktivität der Inflammasome ist, veranschaulichten die Versuche von Mariathasan et al. (2004). Die hierbei verwendeten Makrophagen aus ASC-Knockout ( $ASC^{-/-}$ )-Mäusen zeigten eine deutlich geringere Sekretion von Casp-1 als der Wildtyp, was auf die Hemmung der Aktivierung von Casp-1 aus dessen Pro-Caspase hindeutet (Mariathasan et al. 2004).



**Abbildung 3:** NLR-Inflammasome und AIM2-like receptor-Inflammasome interagieren mittels des Inflammasom-aktivierenden Sensor über PYD mit ASC. ASC interagiert mittels CARD mit der Casp-1. Es kommt zur Aktivierung von Casp-1. (NACHT = NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospora anserina*) and TP1 (telomerase-associated protein)) (eigene Abbildung).

### 2.2.4.2 Nod-like receptor family pyrin domain containing 3

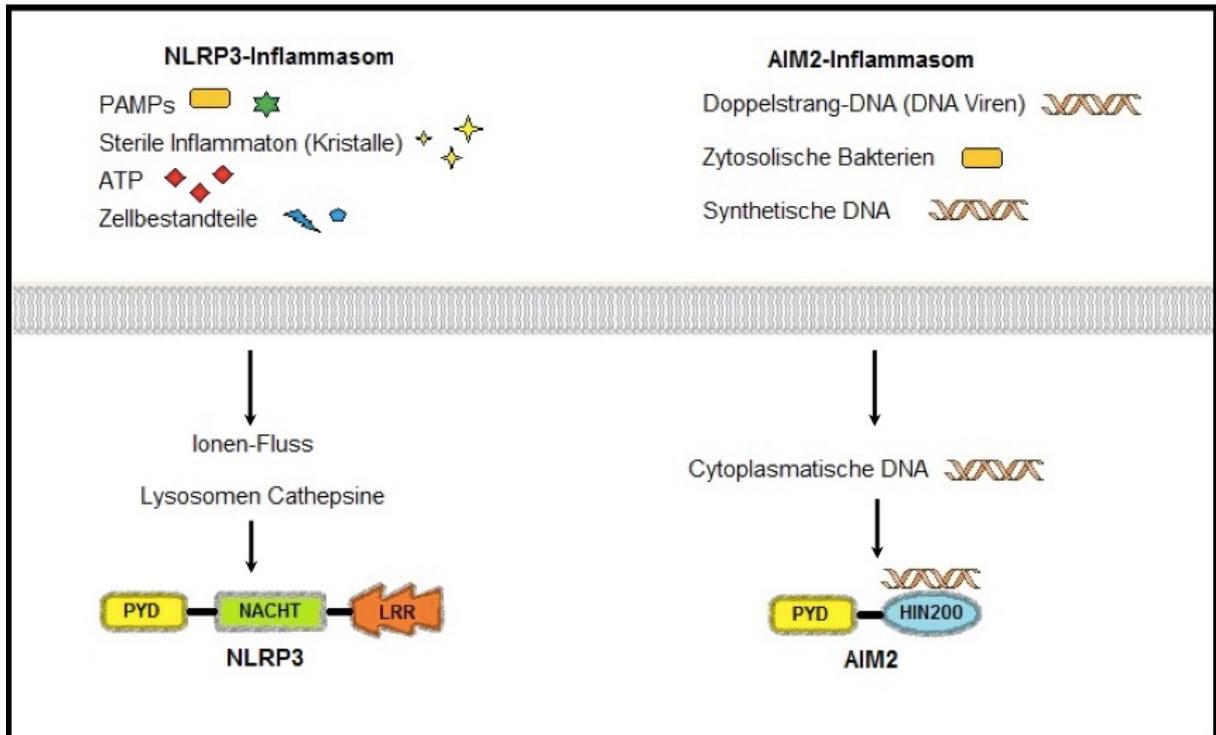
Das am besten charakterisierte Inflammasom ist NLRP3 (Schroder und Tschopp 2010). NLRP3 besteht aus einer PYD zur Bindung an ASC, einer NB zur Oligomerisation und einem, Pathogen-assoziierten molekularen Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) erkennenden, leucine-rich repeat (LRR) (Abbildung 3). Das Strukturmotiv LRR (Kobe und Deisenhofer 1994) in NLRP3 aktiviert die Oligomerisation auf Grund der Erkennung von vielen verschiedenen PAMPs. Hierzu zählen eine Vielzahl von Stimuli wie Bakterien und ihre Toxine und Viren wie Influenza A-Viren (Thomas et al. 2009) (Abbildung 4). LRR erkennt aber auch sterile Inflammation, welche durch Urat- und Cholesterin-Kristalle induziert wird (Martinon et al. 2006), Adenosintriphosphat (ATP) und Bestandteile zerstörter Zellen (Lamkanfi und Dixit 2012, Strowig et al. 2012) (Abbildung 4). Die Aktivierung von NLRP3 in vaskulären Endothelzellen ist zweistufig (Lin et al. 2016). Zuerst kommt es zur Transkription und Translation von NLRP3 und Pro-IL1B durch die Initiation mittels Bakterienbestandteilen, dann zur Aktivierung von NLRP3 durch ATP, virale Desoxyribonukleinsäure (DNA), Toxine und andere oben genannte Stimuli (Lin et al. 2016).

Mit der Aktivierung von NLRP3 wird durch Casp-1 die Pyroptose in Gang gesetzt (Lamkanfi und Dixit 2012). Die von Cookson und Brennan (2001) zuerst beschriebene Form des Casp-1 aktivierten Zelltodes führt zur Entfernung potentiell gefährlicher Zellen aus dem Organismus (Cookson und Brennan 2001). Dies ist oft im Zusammenhang mit einer pathogenen intrazellulären Infektion z.B. mit *Salmonella* zu beobachten (Cookson und Brennan 2001). Experimente mit ApoE-Knockout Mäusen (ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen) zeigten eine Beteiligung von NLRP3 an der Entstehung von Arteriosklerose (Wang et al. 2017).

### **2.2.4.3 Absent in Melanoma 2**

Namensgebend für die zweite Gruppe der AIM2-like-receptor-Inflammasome ist AIM2. Der zuerst von Deyoung et al. (1997) beschriebene Inflammasom-aktivierende Sensor AIM2 besteht aus einer hämopoetischen Expressions-, Interferon-Induzierbarkeits-, nuklearen Lokalisations- und charakteristischen 200 Aminosäure-Domäne (HIN-200-Domäne), die über eine PYD mit ASC interagiert (Fernandes-Alnemri et al. 2009) (Abbildung 3). AIM2 erkennt die Doppelstrang-DNA von DNA-Viren und bestimmten zytosolischen Bakterien wie *Francisella tularensis* und aktiviert Casp-1 über die PYD (Hornung et al. 2009, Rathinam und Fitzgerald 2010, Sauer et al. 2010, Teresa et al. 2010, Saiga et al. 2012) (Abbildung 4). Experimente von Hakimi et al. (2014) zeigten, dass es zu einem Anstieg der AIM2-Expression in Folge von inflammatorischen Signalen in den Endothelzellen der Intima und *Vasa vasorum* der Aorta sowie den vaskulären glatten Muskelzellen der arteriosklerotischen Läsionen und der normalen Media und Intima der Aorta kommt. Die gefundenen Ergebnisse in Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen wurden erstmals durch Dihlmann et al. (2014) in der erkrankten Aorta beschrieben.

So konnte zum einen ein erhöhtes Vorkommen von AIM2 und Caspase 5 (Casp-5) in Aortenwandbiopsien von AAAs mit erhöhtem Rupturrisiko gezeigt werden, zum anderen eine erhöhte Expression von ASC, Casp-1 und IL1B im AAA im Vergleich zu einer gesunden Aorta nachgewiesen werden (Dihlmann et al. 2014). Dies zeigt, dass eine Inflammasom-Aktivierung im AAA durch chronische Entzündungsreaktionen stattfindet (Dihlmann et al. 2014).



**Abbildung 4:** Intrazelluläre Aktivierung von NLRP3 und AIM2 (eigene Abbildung)

### 2.2.5 Diagnostik und Therapie des abdominellen Aortenaneurysmas

Aneurysmen werden durch Ultraschall oder bei Untersuchung mittels Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) diagnostiziert. Als Richtlinien für eine Therapie werden verschiedene Leitlinien herangezogen. Die Leitlinien der ESVS raten zu einer Therapie bei > 5,5 cm AAA-Durchmesser bei Männern bzw. > 5,0 cm AAA-Durchmesser bei Frauen, allen AAAs mit Symptomatik oder AAAs mit einer jährlichen Wachstumsrate von > 1 cm (Moll et al. 2011). In den von Chaikof et al. (2018) veröffentlichten Leitlinien der Society for Vascular Surgery (SVS) werden ähnliche Angaben gemacht, wobei auf die Morbidität des Patienten genauer eingegangen wird. So sollten junge, gesunde Patienten und Frauen bereits zwischen 5,0 cm und 5,5 cm des AAA-Durchmesser operiert werden, während Patienten mit einem schlechteren Gesundheitsstatus und Männer ab einem AAA-Durchmesser von 5,5 cm operiert werden sollten (Chaikof et al. 2018).

In der Klinik für Gefäßchirurgie und endovaskuläre Therapie der Universitätsklinik Heidelberg wurde die Operation aller Patienten mit einem AAA-Durchmesser > 5,0 cm je nach Gesundheitsstatus und Morbidität angedacht.

Als Therapie gibt es zwei Operationsmethoden für die Behandlung eines Aneurysmas, die offene Operation und die Operation mittels Endovaskulärer Aneurysma RepARATION (EVAR). Bei der offenen Operation eines Aneurysmas wird retro- bzw. transperitoneal mittels Schnittinzision der Bauchraum eröffnet (Eliason und Upchurch 2008). Nach Ligatur der

Gefäße wird das Aneurysma eröffnet und eine Gefäßstütze (Stent) von der normalen proximalen zur normalen distalen Aorta bzw. der *Arteria iliaca communis* eingebracht (Eliason und Upchurch 2008). Der Blutfluss wird durch Lösen der Ligatur hergestellt und der Aneurysma-Sack über den Stent geschlossen (Eliason und Upchurch 2008). Bei der EVAR wird der Stent endovaskulär in den Bereich des Aneurysmas verbracht (Eliason und Upchurch 2008). EVAR bildet laut den Leitlinien der SVS die beste Methode bei rupturierten Aneurysmen, sollte aber nur von Krankenhäusern mit großer Erfahrung und geringer Mortalität in diesem Bereich durchgeführt werden (Chaikof et al. 2018).

Wie von Bergqvist (2011) beschrieben, wird an einer pharmakologischen Verringerung der Expansion des AAA-Diameters geforscht. Als pharmakologische Therapien sind hier die Therapie mit Statinen, Nicht-steroidale Antiphlogistika (auch Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE)-Hemmern,  $\beta$ -Blockern, Makroliden und Blutdrucksenkern (Bergqvist 2011) zu nennen.

Statine sind Cholesterinsenker, die eine tragende Säule in der Therapie arteriosklerotischer Gefäßerkrankungen darstellen (Twine und Williams 2011). Obwohl Twine und Williams (2011) postulierten, dass in der Metaanalyse der bis dato veröffentlichten Studien kein signifikanter Effekt auf die Verringerung der Expansion des AAA-Diameters ersichtlich war, konnten sie eine verbesserte Überlebenschance bei der operativen Behandlung von AAAs nicht ausschließen. In den Leitlinien zum Umgang mit AAAs der ESVS wird somit für Statine die Empfehlung zur Gabe ab einem Monat vor Operation ausgesprochen (Moll et al. 2011).

NSAIDs werden auf Grund ihrer entzündungshemmenden Effekte bei AAAs eingesetzt. Karlsson et al. (2009) konnten zeigen, dass die Gabe von Acetylsalicylsäure (ASS) hemmend auf die Expansion des AAA-Diameters wirkt.

Daraus resultiert die Empfehlung in den Leitlinien zum Umgang mit AAAs der ESVS, nach der ASS in niedrigen Dosen bei Patienten mit AAAs zum Einsatz kommen sollte (Moll et al. 2011). Der Einsatz von ACE-Hemmern als Mittel gegen Bluthochdruck ist als pharmakologische Therapie zur Verhinderung von AAA-Rupturen nach widersprüchlichen Ergebnissen aus Kanada und dem Vereinigten Königreich eher ungeeignet (Bergqvist 2011).

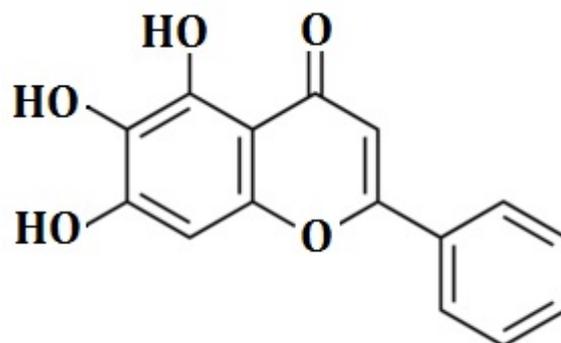
In den Leitlinien zum Umgang mit AAAs der ESVS werden  $\beta$ -Blocker, die zur Senkung des Blutdrucks und der Verringerung der Ruheherzfrequenz dienen, nur für kardiale Hochrisikopatienten mit ischämischer Problematik eingesetzt (Moll et al. 2011). Dabei sollte die Therapie einen Monat vor Eingriff begonnen werden (Moll et al. 2011).

Auch die Gabe von Makroliden sollte laut Bergqvist (2011) eine geeignete Therapie darstellen. Wobei in der Studie von Karlsson et al. (2009) kein signifikanter Effekt bei deren Gabe gezeigt werden konnte. Bei Makroliden handelt es sich um entzündungshemmende Antibiotika, die auch immunmodulatorische Effekte haben (Altenburg et al. 2010a, Altenburg et al. 2010b).

Im Hinblick auf die Senkung der Sterblichkeit empfehlen die Leitlinien zum Umgang mit AAAs der ESVS die Gabe von Blutdrucksenkern zur Kontrolle des Blutdruckes (Moll et al. 2011). So sollte der Blutdruck bei kleinen Aneurysmen vor einer operativen Behandlung unter einem Wert von 140/90 mmHg liegen (Moll et al. 2011).

Neben den klassischen Pharmazeutika werden Phytopharmaka aus der altchinesischen Medizin als mögliche Therapie für das AAA herangezogen. So ist in China seit der Antike die getrocknete Wurzel des Baikal-Helmkrauts, lateinisch *Scutellaria baicalensis* Georgi, bekannt, welche in Sibirien (am Baikalsee) beheimatet und in der Volksrepublik China weit verbreitet ist. In erstmals 1593 beschriebenen Selbstversuchen von Li Shizhen wurde es für die Behandlung von arterieller Hypertonie und Entzündungen verwendet (Zhao et al. 2016). Das Baikal-Helmkraut enthält mindestens 126 kleine Moleküle und 6 Polysaccharide aus der Gruppe der Polyketide (PK), neben Baicalin und Baicalein auch Wogonin, Oroxylin und Scutellarin, sowie ätherische Öle, Gerbstoffe und Harze, die antiallergen, entzündungshemmend und antibakteriell wirken (Chevallier 2001, Wang et al. 2018). Den größten pharmakologischen Bestandteil bilden die Flavonoide (Wang et al. 2018).

Flavonoide (Hauptklasse PK12 der Polyketide) bestehen aus zwei aromatischen Ringen, die durch einen Tetrahydropyran-Ring verbundenen sind und sich vom 2-Phenylchroman (=Flavan) ableiten. Bereits 1985 konnten die sechs Hauptflavonoide mittels Ionenpaar-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) nachgewiesen werden (Sagara et al. 1985). BAI ist eines dieser Flavonoide, das in einer Konzentration von 5,41 % des Trockengewichts in der Baikal-Helmkrautwurzel enthalten ist (Li-Weber 2009, Gandhi 2013). Dieses Flavonoid (5,6,7-Trihydroxyflavon) heißt in der Nomenklatur der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) 5,6,7-Trihydroxy-2-phenyl-chromen-4-on, seine chemische Zusammensetzung ist  $C_{15}H_{10}O_5$  (Abbildung 5) und es besitzt eine Molekülmasse von 270,24 g/mol (Pubchem 2020).



**Abbildung 5:** Strukturformel von Baicalein (eigene Abbildung)

Wie Li et al. (2017) zusammenfassten, zeigt der Wurzelextrakt neben der oben benannten entzündungshemmenden und Blutdruck-senkenden Wirkung auch antioxidative, antivirale, antithrombotische Eigenschaften und wirkt der Tumorbildung entgegen. Die antithrombotische Wirkung in Mäusen stellte Wang et al. (2015) fest, während Kimura et al. (1997) diesen Effekt in Endothelzellen der humanen Nabelvene nachwiesen. Auch eine starke antimikrobielle Wirkung konnte gezeigt werden (Wang et al. 2018). BAI ist die stärkste antioxidative Substanz der altchinesischen Kräutermischung (Hamada et al. 1993). In der traditionellen chinesischen Medizin ist es seit langem unter dem Namen „Huang qin“ bekannt und ein hochpotentes Antioxidans, das in der Lage ist, die schädigende Wirkung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) abzumildern (Gao et al. 1999). Wang et al. (2015) konnten seine positive Wirkung auf das Herzkreislaufsystem ebenfalls belegen. Somit zeigt BAI gegen die Symptome eines Aneurysmas wie die Thrombusbildung, die arterielle Hypertonie und die Inflammation durch oxidativen Stress vielversprechende Ergebnisse, wie die signifikante Verbesserung der arteriellen Angiotensin II (Ang II)-induzierten Hypertonie und kardialer Umbauprozesse (Wang et al. 2015). BAI zeichnet sich zusätzlich durch eine höhere intestinale Aufnahme als andere Bestandteile der Baikal-Helmkrautwurzel aus (Li et al. 2011).

Während dieser Arbeit erschien eine Studie von Wang et al. (2016), die für BAI eine präventive Wirkung gegen AAAs durch Hemmung der Aktivierung von MMPs und eine Verringerung der Akkumulation von inflammatorischen Zellen in der Aorta im Mausmodell zeigte.

### **2.2.6 Mausmodelle zur Erforschung des Aortenaneurysmas**

Um die Inflammation und die Mechanismen im AAA besser zu erforschen, werden Mausmodelle herangezogen. Genetisch definierte Kleintiermodelle gestatten ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit, was eine bessere klinische Beobachtung von in niedrigen Frequenzen auftretenden natürlichen Mutationen ermöglicht (Braun und Willnow 1996). Des Weiteren ist das Mausmodell auf Grund der einfachen Versorgung der Tiere, der geringen Kosten, guten Eignung für nicht-invasive Bildgebung, wie MRT, Positronen-Emissions-Tomographie (PET), CT und Ultraschall, sowie der relativ einfachen Manipulierbarkeit von Mausgenen für die Forschung prädestiniert (Zaragoza et al. 2011).

#### **2.2.6.1 Unterschiede zu anderen Tiermodellen**

In Abgrenzung dazu sind Tiermodelle mit Ratten, Kaninchen oder Schweinen auf Grund verschiedener Faktoren nicht geeignet. Ratten bilden keine atheromatösen Plaques und damit die Vorstufe von arteriosklerotischen Plaques aus (Zaragoza et al. 2011). Kaninchen sind teurer im Unterhalt als Mäuse und Ratten, haben einen erhöhten Platzbedarf, haben zwar eine ähnliche Reproduktionsrate, benötigen aber hohe Blut-Cholesterin-Werte und eignen sich

nicht als Plaque-Ruptur-Modell (Zaragoza et al. 2011). Die Verwendung von Schweinen als Tiermodell ist mit hohen Kosten und einem umfangreicheren Pflegeaufwand verbunden. Außerdem stehen für Schweine nur wenige genomische Werkzeuge zur Verfügung (Zaragoza et al. 2011).

### 2.2.6.2 Mausmodelle im Überblick

Das ideale Mausmodell sollte die oben beschriebenen Charakteristika eines AAs im Menschen nachstellen d.h. Arteriosklerose, Zerstörung der elastischen Fasern, Inflammation, erhöhte proteolytische Aktivität und die Ausbildung eines intraluminalen Thrombus (Carrell et al. 1999). Laut Powell (1991) lassen sich drei Gruppen von Aneurysmamodellen unterscheiden: Hämodynamisch induzierte Aneurysmamodelle, Modelle die mittels direkter Schädigung des Gefäßes Aneurysmen erzeugen und transgene Mausmodelle. Diese transgenen Knockout-Modelle konnten bereits 1989 mittels Entwicklung der embryonalen Stammzell-Technologie gezielt Gene bei Mäusen *in vivo* inaktivieren (Thompson et al. 1989).

Beim **hämodynamisch induzierten Mausmodell** wird die Aorta durch eine künstliche Stenose mittels partieller Ligatur zwischen den Nierenarterien verengt (Carrell et al. 1999). Dies führt zu einer Dilatation der Aorta und einer renovaskulären Hypertension (Carrell et al. 1999). Eine proximale Stenose ist in Aneurysmen aber selten zu finden (Carrell et al. 1999). Eine weitere Form stellt die Gabe des Peptidhormons Ang II dar, was durch Vasokonstriktion zu einer Erhöhung des Blutdruckes führt. Die Antwort des Gefäßes auf diese Veränderung des Druckes bildet aber alleine keine ausreichende Grundlage zur Erforschung eines Aneurysmas (Carrell et al. 1999).

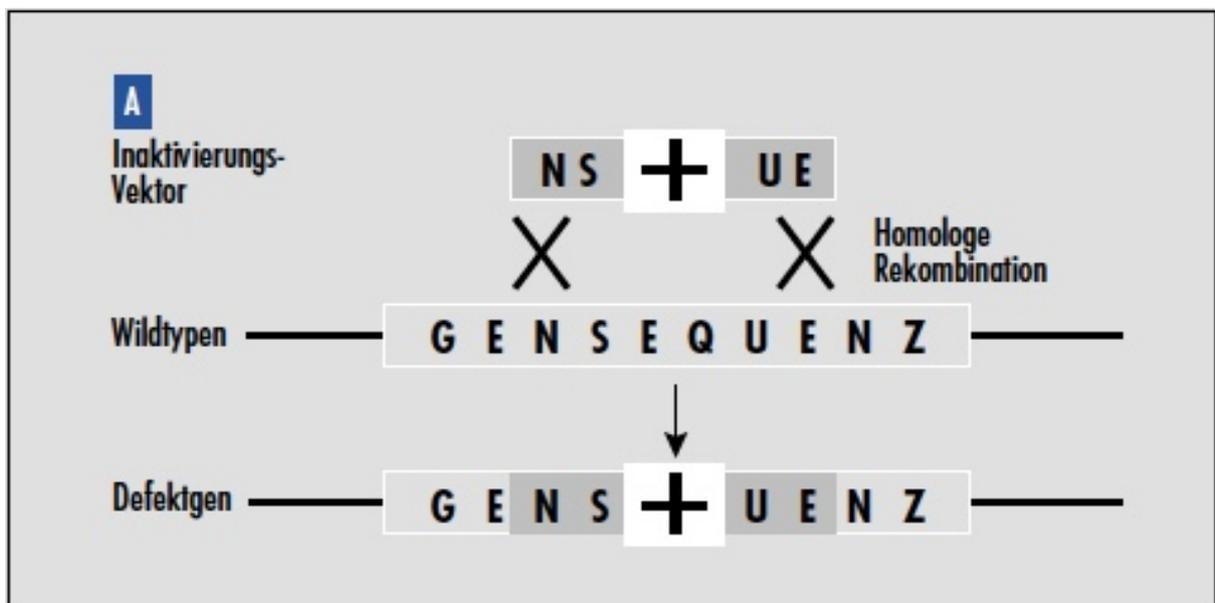
Bei den Mausmodellen mit direkter Schädigung des Gefäßes sind die chemisch induzierten Aneurysmamodelle mittels Elastase und Kalziumchlorid sowie chirurgische Modelle durch Inzision zu nennen (Carrell et al. 1999, Daugherty und Cassis 2004b, Zaragoza et al. 2011).

Bei der **chirurgisch induzierten Schädigung der Aorta** wird eine Inzision in das Gefäß bis in den Bereich der Media durchgeführt (Carrell et al. 1999). Es kommt zu einer Dilatation der Aorta und Versteifung des Gefäßes durch Reparatur- und Umbauprozesse in dem verletzten Bereich.

Zu den **chemisch induzierten Aneurysmamodellen** zählt die periaortale Applikation von Kalziumchlorid im perirenal Bereich (Carrell et al. 1999, Daugherty und Cassis 2004b, Zaragoza et al. 2011). Hierbei kommt es zu einer Dilatation des Gefäßes und der Ausbildung von Aneurysmen, was durch die Kombination mit Thioglycolat und eine cholesterinhaltige Fütterung der Tiere verstärkt werden kann (Freestone et al. 1997). Auch die von Pyo et al. (2000) bei Mäusen beschriebene Elastase-Perfusion der Maus-Aorta zählt zu den chemisch induzierten Aneurysmamodellen (Carrell et al. 1999, Daugherty und Cassis 2004b, Zaragoza et al. 2011). Diese führt zu einer Vergrößerung des Aortendiameters, einer Degeneration der

elastischen Fasern und der Inflammation in Media und Adventitia, aber keiner Aneurysmabildung (Carrell et al. 1999, Pyo et al. 2000, Daugherty und Cassis 2004b, Zaragoza et al. 2011). Des Weiteren kann bei diesem Modell im Bereich der zugefügten Verletzung die Expression von MMPs, Endoproteasen und anderen Proteasen beobachtet werden (Lizarbe et al. 2009). Das Elastase-induzierte Modell beschreibt somit den zeitlichen Ablauf der Aneurysma-Entwicklung inklusive dem Beginn der inflammatorischen Reaktion mit der Rekrutierung von Leukozyten und Mastzellen und die gesteigerte Expression von MMPs, Endoproteasen und anderen Proteasen, was der Mediadegeneration vorausgeht und zur Dilatation der Aorta führt (Zaragoza et al. 2011). Einen entscheidenden Nachteil stellt bei diesem Modell aber der mit der Aufbringung der Elastase verbundene mechanische Stress dar (Zaragoza et al. 2011).

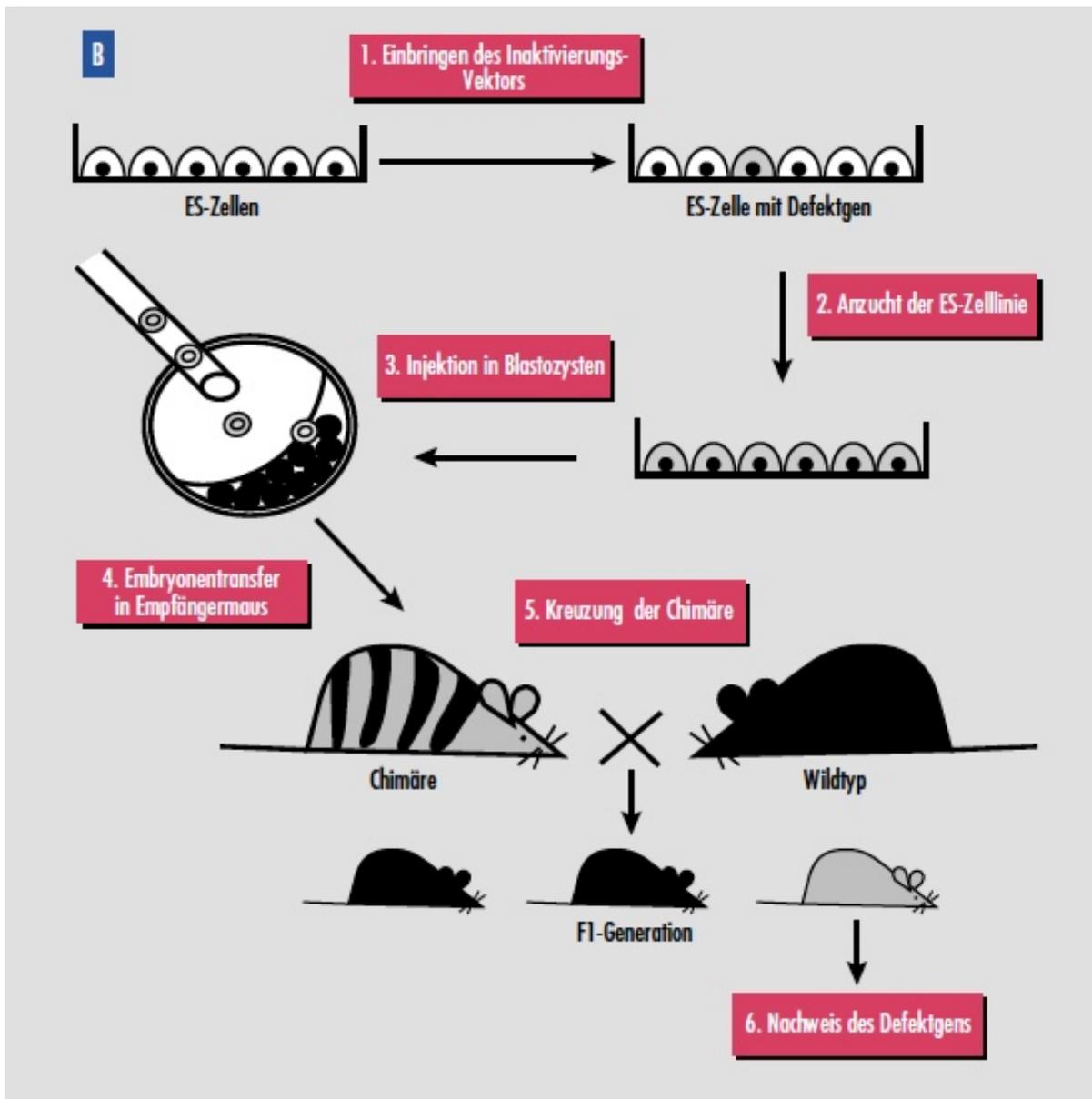
Bei den **genetisch modifizierten Mausmodellen** sind vor allem die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse und low-density lipoprotein Rezeptor (LDLR)-Knockout Mäuse (LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse) zu nennen. Das Prinzip der genetischen Modifikation von Knockout-Tieren geschieht auf Basis der homologen Rekombination (Braun und Willnow 1996). Hierbei wird ein rekombinantes DNA-Molekül (Vektor) mit homologen DNA-Regionen gegen die aktive Gensequenz im Chromosom ausgetauscht (Braun und Willnow 1996) (Abbildung 6). Es kommt zur Zerstörung der genetischen Information in diesem Bereich, was die Entstehung eines Defektgens zur Folge hat (Braun und Willnow 1996) (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Inaktivierung von Gensequenzen mittels homologer Rekombination (Braun und Willnow 1996). Mit freundlicher Genehmigung des Autors.

Im Anschluss erfolgt eine Selektion der genetisch modifizierten pluripotenten embryonalen Stammzellen in der Zellkultur durch eine mit dem Vektor eingebrachte Antibiotikaresistenz

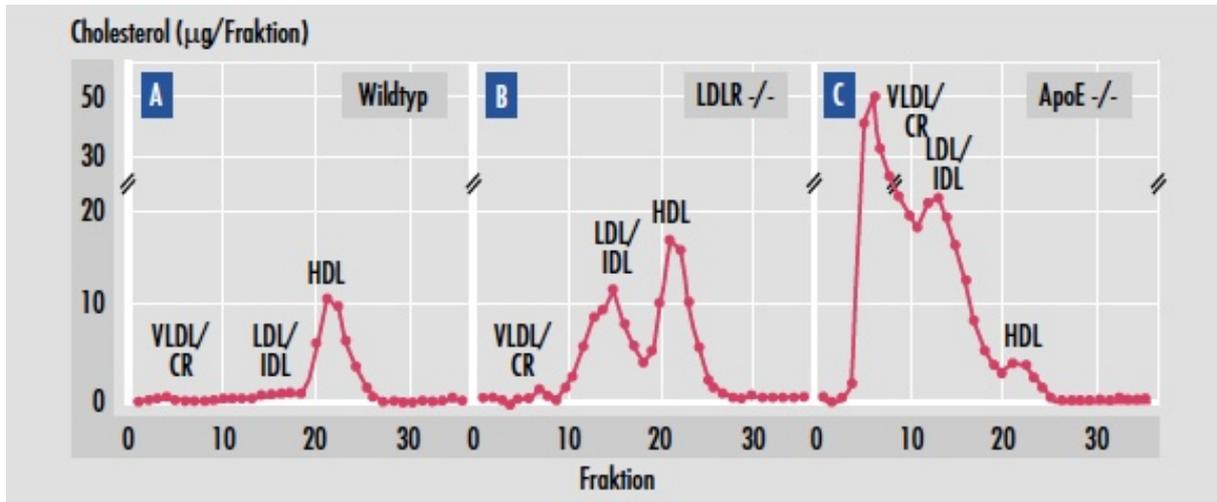
(Braun und Willnow 1996) (Abbildung 7). Nach Injektion in einen blastozystären Mausemryo entsteht eine Chimäre aus Zellen der Blastozyste und den heterozygotischen embryonalen Stammzellen (Braun und Willnow 1996) (Abbildung 7). Es handelt sich um heterozygotische embryonale Stammzellen, da die genetische Inaktivierung nur ein Allel betrifft (Braun und Willnow 1996). Diese Chimären werden mit dem Wildtyp gepaart und so entstehen die Knockout-Tiere (Braun und Willnow 1996) (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Generierung von Knockout-Mäusen (Braun und Willnow 1996). Mit freundlicher Genehmigung des Autors.

Bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen handelt es sich um Tiere, deren ApoE inaktiviert wurde (Piedrahita et al. 1992, Plump et al. 1992). ApoE ist ein Apolipoprotein, das Bestandteil von very low density Lipoproteinen (VLDLs) und high density Lipoproteinen (HDLs) ist. Es transportiert

Triacylglyceride von der Leber in die Peripherie. Des Weiteren ist es ein Bestandteil der Chylomikronen, welche fettlösliche Vitamine und Cholesterin zuerst in die Lymphbahn und dann ins Blut transportieren (Mahley 1988). Die Folgen der genetischen Inaktivierung sind ein starker Anstieg der VLDL- und low density Lipoprotein (LDL)-Spiegel und ein Abfall des HDL-Spiegels (Braun und Willnow 1996, Zaragoza et al. 2011) (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Fast performance liquid chromatography (FPLC)-Einzelspektren des Cholesterinplasmaspiegels von Wildtyp-Mäusen, LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen und ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen. (Braun und Willnow 1996). Mit freundlicher Genehmigung des Autors.

Die Tiere entwickeln neben der Mediadegeneration zusätzlich arteriosklerotische Plaques (Piedrahita et al. 1992, Plump et al. 1992). Diese bewirken ähnliche Läsionen und Reaktionen wie beim Menschen (Piedrahita et al. 1992, Plump et al. 1992).

LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse sind ein Mausstamm, bei dem es zu einer genetischen Inaktivierung von LDLR kommt, was zu einem starken Anstieg von LDL- und HDL-Spiegeln führt (Braun und Willnow 1996, Zaragoza et al. 2011) (Abbildung 8). Die Tiere entwickeln ebenfalls eine Mediadegeneration (Daugherty und Cassis 2004b, Zaragoza et al. 2011). Die Entwicklung von spontanen arteriosklerotischen Plaques wie bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zu beobachten ist, wird erst durch die Gabe einer cholesterinhaltigen Diät möglich (Braun und Willnow 1996, Daugherty und Cassis 2004b, Zaragoza et al. 2011). Während die Läsionen der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse durch arteriosklerotische Plaques mit denen des Menschen vergleichbar sind, zeigt der Plasmaspiegel der LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse größere Ähnlichkeit mit der von Menschen mit Fettstoffwechselstörung (Braun und Willnow 1996, Zaragoza et al. 2011). ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse und LDLR<sup>-/-</sup>-Mäuse bilden somit Modelle für Arteriosklerose, die aber ohne weitere Stimuli keine Aneurysmen ausbilden.

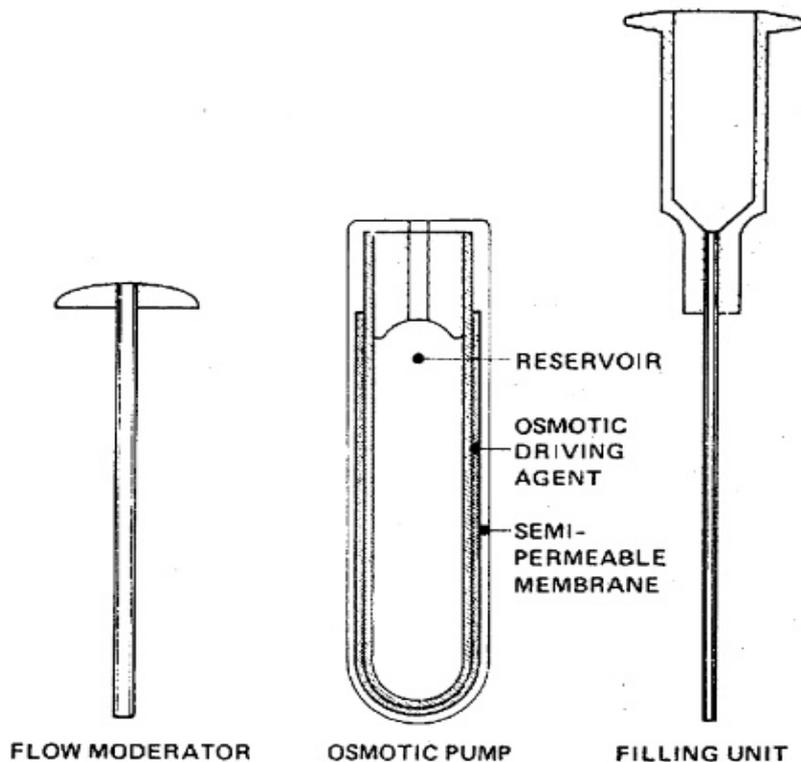
### 2.2.6.3 Das ApoE<sup>-/-</sup>-Angiotensin II-Mausmodell

Daugherty et al. (2000) kombinierten als erste ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einer Infusion von Ang II. Die Gabe des Peptidhormons Ang II führt durch Vasokonstriktion zu einer Erhöhung des Blutdruckes. Ang II stimuliert die Aldosteron-Sekretion, was zu einer Konstriktion der Arteriolen und durch diese Vasokonstriktion zu einer Erhöhung des Blutdruckes führt. Aldosteron bewirkt zusätzlich eine vermehrte Rückresorption von Natrium- und Chloridionen in der Niere und dadurch eine osmotische Volumenerhöhung, was eine Blutdruckerhöhung zur Folge hat (Alvarez et al. 2001). Durch den erhöhten Druck in Folge der Vasokonstriktion in Kombination mit arteriosklerotischen Läsionen treten bei diesem Modell neben Mediadegeneration und Arteriosklerose zusätzlich Inflammation, intraluminale Thromben und Aneurysmen auf (Daugherty et al. 2000).

Ähnliche Effekte erreichte eine Kombination aus LDLR<sup>-/-</sup>-Mäusen mit der Gabe von Ang II, hierbei zeigte sich aber die oben beschriebene Limitierung des Effektes auf die Notwendigkeit einer cholesterinhaltigen Diät (Braun und Willnow 1996, Daugherty et al. 2000, Daugherty und Cassis 2004b).

Bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden Versuche zur Fütterung mit cholesterinhaltigem Futter durchgeführt (Weiss et al. 2001). Dabei wurde eine ähnliche Ausbildung der arteriosklerotischen Plaques sowohl mit als auch ohne cholesterinhaltige Diät festgestellt (Weiss et al. 2001).

Zur Infusion mit Ang II wird eine osmotische Minipumpe, die der Maus unter die Haut implantiert wird, verwendet (Daugherty et al. 2000, Saraff et al. 2003, Cao et al. 2010, Wang et al. 2016). Bei der osmotischen Minipumpe handelt es sich um ein Applikationssystem zur längerfristigen gleichmäßigen Applikation von Flüssigkeiten für kleine Labortiere (Theeuwes und Yum 1976). Sie besteht aus einem Flüssigkeitsreservoir mit impermeabler Membran, welche von einer osmotischen Schicht umgeben ist (Theeuwes und Yum 1976) (siehe Abbildung 9). Diese Schicht wird von einer permeablen Membran umgeben, durch die bei Implantation der Pumpe Flüssigkeit von der osmotischen Schicht angezogen wird (Theeuwes und Yum 1976). Durch diese langsame und gleichmäßige Diffusion kommt es durch die Komprimierung des Reservoirs zur Applikation der enthaltenen Flüssigkeit (Theeuwes und Yum 1976).



**Abbildung 9:** Aufbau der Osmotischen Pumpe inklusive Befüllungseinheit. Aus Theeuwes und Yum (1976). Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Das Ang II - ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell zeigt deutliche Ähnlichkeiten zum humanen AAA (Bruemmer et al. 2011). So ist ein klarer Geschlechtsdimorphismus erkennbar. Männliche Mäuse sind deutlich anfälliger für die Aneurysmaentwicklung, was wie auch beim Menschen auf die Wirkung der Androgene zurückzuführen ist (Henriques et al. 2004). Die Inzidenz für Aortenaneurysmen lag bei männlichen mit Ang II- behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse im Bereich von 35 bis 73 Prozent (Trachet et al. 2015). Ebenso weist das Mausmodell Ähnlichkeiten mit dem AAA des Menschen in der Dilatation des Diameters, der Zerstörung der extrazellulären Matrix und Inflammation auf (Saraff et al. 2003). Der erhöhte Cholesterinplasmaspiegel und die entstehenden Läsionen wie die Degeneration der elastischen Fasern durch Entzündungsmechanismen, die inflammatorische Einwanderung und die arteriosklerotische Zerstörung der *Intima* ähneln denen im Menschen (Braun und Willnow 1996, Daugherty et al. 2000, Daugherty und Cassis 2004b).

Einen Unterschied stellt die Lokalisation der Aneurysmen in den verschiedenen Mausmodellen dar. So sind die Aneurysmen in der Maus *suprarenal* zu finden, während sie beim Menschen *infrarenal* lokalisiert sind (Daugherty und Cassis 2004b). Es wird ein Unterschied in der Elastizitätsveränderung des Gewebes und im Fließverhalten zu Grunde gelegt (Bruemmer et al. 2011).

Da die Entwicklung des Aneurysmas im Menschen nicht vollständig geklärt ist, bleibt ein Vergleich mit dem Mausmodell unvollständig (Bruemmer et al. 2011).

### 2.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieses Projektes war es, im Angiotensin II-Apolipoprotein E-Knockout-Tiermodell (Ang II-ApoE<sup>-/-</sup>-Tiermodell) den Einfluss einzelner inflammatorischer Signalwege bei der Entstehung des AAs besser zu verstehen. So könnte bereits zu Beginn der Entstehung eines AAs in die beitragenden Mechanismen therapeutisch eingegriffen werden. Die mit einem AA einhergehenden inflammatorischen Prozesse sind hierbei wichtige Ansatzpunkte. Pathogene, oxidativer Stress und Zellschäden gelten als Stimuli für die Auslösung einer Inflammation. In Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen bilden die Inflammasome den Schwerpunkt der wissenschaftlichen Untersuchungen.

Neben der Inflammation und der Apoptose sollte insbesondere der Effekt des anti-oxidativen Wirkstoffes BAI auf die Entstehung von Aortenaneurysmen sowie die Infiltration von Entzündungszellen und die Fließgeschwindigkeiten in der Aorta untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit sollte neben der Verteilung der Inflammasome AIM2 und NLRP3 sowie des Adaptermoleküls ASC der Anteil an apoptotischen Zellen mittels einer immunhistochemischen Färbung genauer betrachtet werden.

Bei der Entstehung eines AAs treten zusätzlich weitere Mechanismen auf, neben der Degeneration von elastischen Fasern durch Entzündungsmechanismen, auch die arteriosklerotische Zerstörung der *Intima* und die mononukleare inflammatorische Einwanderung mit Monozyten, Leukozyten und Immunglobulin-Aggregaten im Übergang der Media in die Adventitia. Um den Zusammenhang zwischen der Leukozyteninfiltration und der Expression dieser Inflammasome herzustellen, wurde eine Rezeptor-Typ Tyrosin-Proteinphosphatase C (CD45)-Färbung vorgenommen. Hierzu wurden die Tiere in vier Gruppen eingeteilt, von denen zwei Gruppen Angiotensin II und einer zusätzlich täglich BAI appliziert wurde. Die Tiere der zwei weiteren Kontrollgruppen erhielten über die Pumpe Natriumchlorid (NaCl)-Lösung und eine Gruppe davon ebenfalls täglich BAI. So wurden die im Aneurysma ablaufenden inflammatorischen Prozesse bei Gabe von BAI genauer untersucht.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Versuchstiere

Mausstamm	Anzahl	Alter	Bezugsquelle
B6 129- ApoE/tm1/Unc/J	100 Tiere	20-86 Wochen	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA

##### 3.1.2 Geräte

Gerätebezeichnung	Name	Bezugsquelle	Firmensitz
<b>Absaugpumpe</b>	Integra VacuSafe	Integra Bioscience	Biebertal
<b>Brutschrank</b>	NUAIRE	lbs/Tecnomara	Fernwald
<b>Dampfgarer</b>	MultiGourmet	Braun (Procter & Gamble Service)	Schwalbach am Taunus
<b>Elektronische Pipettierhilfe</b>	PeqMATE	Peqlab Biotechnologie	Erlangen
<b>Lichtmikroskop</b>	EVOS xl core	Advanced Microscopy Group	Mill Creek, WA, USA
<b>Magnetrührer</b>	D-6010	neoLab Migge	Heidelberg
<b>Microtom</b>	Reichert-Jung Mod. 1140/ Autocut Serie 4	Reichert-Jung	Somerville, MA, USA
<b>Mischbett-Wasser-Vollentsalzer</b>	DI 2800	TKA Wasseraufbereitungssysteme	Niederelbert
<b>Muffelofen</b>		Karl-Heinz Dosch	Heidelberg-Bergheim
<b>Operationsmikroskop</b>	Leica M651	Leica Microsystems	Wetzlar
<b>Perfusionssystem</b>	In Vivo Perfusion System	AutoMate Scientific	Berkeley, CA, USA
<b>pH-Meter</b>	PB-11	Sartorius	Göttingen
<b>Rasierapparat</b>	Aesculap Isis	Aesculap	Tuttlingen
<b>Schüttler (KEB)</b>	Tube-Shaker	Renner	Dannstadt-Schauernheim
<b>Schüttler (Labor)</b>	peqTWIST	Peqlab Biotechnologie	Erlangen
<b>Sterilwerkbank</b>	HeraSafe Heraeus	Thermo Scientific	Hanau
<b>Streckwasserbad</b>		MEDAX	Neumünster
<b>Ultraschallgerät</b>	Vevo 2100 Imaging	Visual Sonics	Toronto, ON, Kanada
<b>Veterinärnarkose-Verdampfer (Narkosegerät)</b>	Matrx VIP 3000 Isoflurane	Matrx	Orchard Park, NY, USA
<b>Waage</b>	EG 2200-2NM	Kern & Sohn	Balingen
<b>Wasserbad</b>	JB Aqua 12 Plus	Grant Instruments	Cambridge, UK
<b>Zentrifuge</b>	Hermle Z400K	M&S Laborgeräte	Wiesloch

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Bezeichnung	Bezugsquelle	Firmensitz
<b>Begrenzungsstift</b>	Super Pap Pen	Kisker Biotech	Steinfurt
<b>Deckgläser</b>	Deckgläser Kittel Glass	VWR	Darmstadt
<b>Einbettkassetten</b>		Sanova	Leimen
<b>Einmal-Pipetten</b>	Brand LDPE-Pasteurpipetten	Thermo Scientific	Hanau
<b>Eppendorf Reaktionsgefäße</b>	Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0.5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf	Hamburg
<b>Kanülen</b>	BD Microlance 3 Standard 20G; 22G; 27G;	Becton Dickinson	Heidelberg
<b>Objektträger</b>	Superfrost	Menzel	Braunschweig
<b>Pipettenspitzen</b>	DeckWorks Pipet Tips 0,1 - 10 µl; 1- 200 µl; 1000 µl	Corning	New York, NY, USA
<b>Pipettenspitzen mit Filter</b>	SafeSeal SurPhob Spitzen 10 µl steril	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf
<b>Skalpelle</b>	Feather disposable Scalpel No. 10	VWR	Darmstadt
<b>Spritzen</b>	Omnifix 1 ml; 2,5 ml; 5 ml	B. Braun	Melsungen
<b>Zentrifugenröhrchen</b>	Falcon High Clarity PP Centrifuge Tube 15 ml; 50 ml	Corning	New York, NY, USA

### 3.1.4 Osmotische Pumpe

Name	Bezeichnung	Bezugsquelle	Firmensitz
<b>Osmotische Pumpe</b>	MINI-OSMOTIC PUMP MODEL 2004	ALZET Osmotic Pumps	Cupertino, CA, USA

### 3.1.5 Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle	Firmensitz
<b>Angiotensin II, Human</b> (CAS 4474-91-3, A9525)	Sigma-Aldrich	Steinheim am Albuch
<b>Azophloxin</b> (CAS 3734-67-6)	Sigma-Aldrich	Steinheim am Albuch
<b>Baicalein</b> (CAS 491-67-8, 465119 Aldrich)	Sigma-Aldrich	Steinheim am Albuch
<b>Bepanthen Augen- und Nasensalbe</b>	Bayer Vital	Leverkusen
<b>Buprenorphin</b> (Buprenovet 0,3 mg/ml)	Bayer Vital	Leverkusen
<b>Citronensäure-Monohydrat</b> (1 kg ≥ 99,5 %, CAS 5949-29-1)	Carl Roth	Karlsruhe

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Firmensitz</b>
<b>Eisen-III-Chlorid-Hexahydrat</b> (CAS 10025-77-1)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Eisessig</b> (Essigsäure 100 %) (CAS 64-19-7)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Enthaarungscreme</b> (Veet Haarentfernungs-Creme Silk & Fresh, Sensible Haut mit Aloe Vera)	Reckitt Benckiser	Heidelberg
<b>Eosin</b> (C.I. 45380)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Ethanol</b> (≥ 99,8 %, p.a., CAS 64-17-5)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Ethanol</b> (70 %, redestilliert)	Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg	Heidelberg
<b>Ethanol</b> (96 %, redestilliert)	Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg	Heidelberg
<b>FBS</b> (Fetal Bovine Serum, qualified, heat inactivated, S.AMERICAN) (#10500-064)	Life Technologies Europe BV	Bleiswijk, Niederlande
<b>Formaldehyd</b> (Formaldehydlösung 4 %)	Otto Fischer	Saarbrücken
<b>Hämalaun-Lösung</b> (Mayers Hämalaun)	E. Merck	Darmstadt
<b>Hämatoxilin</b> (C.I. 75290)	E. Merck	Darmstadt
<b>Hautantiseptikum</b> (Kodan Tinktur forte farblos)	Schülke & Mayr	Norderstedt
<b>Histofluid</b> (Einbettmittel, Xylohaltig)	Paul Marienfeld	Lauda-Königshofen
<b>Isofluran</b> (HS-Isothesia, 900- 8932)	Henry Schein	Hamburg
<b>Lichtgrün SF</b> (C.I. 42095)	E. Merck	Darmstadt
<b>Lugolsche Lösung</b>	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Nahtmaterial</b> (Ethicon Prolene 4-0 8699H)	Johnson & Johnson Medical	Norderstedt
<b>Natriumchlorid</b> (NaCl, CAS 7647-14-5)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Natriumchloridlösung</b> <b>0,9 % Injektionslösung</b> (PZN 01957154)	B. Braun	Melsungen
<b>Natriumhydroxid-Plättchen</b> (1 kg ≥ 98 %, CAS 1310-73-2)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Orange G</b> (C.I. 16230)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Parosanillin</b> (C.I. 42500)	E. Merck	Darmstadt
<b>Pikrinsäure</b> (≥ 99 %)	Sigma-Aldrich	Steinheim am Albuch
<b>Resorcin</b> (Resorchinol)	E. Merck	Darmstadt
<b>Ringer Lösung</b>	B. Braun	Melsungen
<b>Salzsäure</b> (HCl, rauchend, 37 %, CAS 7647-01-0)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Säurefuchsin</b> (C.I. 42685)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Scharlach Rot</b> (C.I. 26105)	Chroma-Gesellschaft Schmid	Köngen
<b>Silber-Aluminium-Spray</b>	Henry Schein	Hamburg

Substanz	Bezugsquelle	Firmensitz
<b>TRIS</b> (Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan, CAS 77-86-1)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Wasserstoffperoxid</b> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 %, stabilisiert, CAS 7722-84-1)	Carl Roth	Karlsruhe
<b>Wolframatophosphor-säure-x-Hydrat</b> (CAS 12501-23-4)	E. Merck	Darmstadt
<b>Xylol</b> (redestilliert)	Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg	Heidelberg

### 3.1.6 Primäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Wirtstier	Bezugsquelle	Firmensitz
<b>AIM2 Antikörper</b> (Mouse Specific) (#13095)	Maus AIM2	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
<b>ASC (D2W8U) Rabbit mAb</b> (Mouse Specific) (#67824)	Maus ASC	Kaninchen Immunglobulin G (IgG), monoklonal	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
<b>Mouse CD45 Antikörper</b> (MAB114-100)	Maus CD45	Ratten IgG, monoklonal	R&D Systems	Wiesbaden- Nordenstadt
<b>NLRP3 (D4D8T) Rabbit mAb</b> (#15101)	Maus NLRP3	Kaninchen IgG, monoklonal	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
<b>Smooth Muscle Actin (SMA) Primärantikörper</b> (#M0851)	Maus SMA	Maus IgG, monoklonal	Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark

### 3.1.7 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Wirtstier	Bezugsquelle	Firmensitz
<b>Biotin-SP- conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)</b> (111-065-003)	IgG Kaninchen	Ziege, polyklonal	Jackson ImmunoResearch	West Grove, PA, USA
<b>Biotin-SP- conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)</b> (112-065-167)	IgG Ratte	Ziege, polyklonal	Jackson ImmunoResearch	West Grove, PA, USA

### 3.1.8 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Bezeichnung	Name	Bezugsquelle	Firmensitz
<b>ABC-Reagent</b>	R.T.U. VECTASTAIN Elite ABC-Peroxidase Staining Kit (PK-7100)	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
<b>Avidin/Biotin Blocking Kit</b>	Avidin/Biotin Blocking Kit (SP-2001)	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
<b>Click-iT Tunel Colorimetric ICH Detection Kit</b>	Click-iT TUNEL Colorimetric (C10623)	LifeTechnologies Corporation	Eugene, OR, USA
<b>Dako Kit</b>	Dako REAL Detection System, Peroxidase/AEC, Rabbit/Mouse (K5003)	Dako Denmark A/S	Glostrup, Dänemark
<b>ImmPACT AEC</b>	ImmPACT AEC Peroxidase (HRP) Substrate (SK-4205)	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA

### 3.1.9 Puffer und Lösungen

Färbelösungen	
<p><b>Alkoholisches Hämatoxin (2 %)</b></p> <p>10 g Hämatoxin 500 ml 96 % Ethanol Reifung eine Woche bei 4 °C</p>	<p><b>Goldner-Lösung I</b></p> <p>88 ml 0,2 % Essigsäure 7 ml Masson-Färbelösung 2 ml Azophloxin-Lösung</p>
<p><b>Azophloxin-Lösung</b></p> <p>0,5 g Azophloxin 100 ml vollentsalztes (VE)-Wasser 0,2 ml Eisessig</p>	<p><b>Goldner-Lösung II</b></p> <p>5 g Wolframatophosphorsäure-Hydrat 2 g Orange G 100 ml VE-Wasser anschließend filtrieren</p>
<p><b>Eisen-III-Chlorid-Lösung</b></p> <p>500 ml VE-Wasser 5 ml 37 % Salzsäure 12,4 g Eisen-III-Chlorid-Hexahydrat</p>	<p><b>Goldner-Lösung III</b></p> <p>0,2 g Lichtgrün SF 100 ml VE-Wasser 0,2 ml Eisessig Mischung anschließend filtrieren</p>
<p><b>Eosin Lösung (1 %)</b></p> <p>10 g Eosin 1000 ml VE-Wasser</p>	<p><b>HCl-Alkohol</b> <i>für Masson-Goldner-Färbung</i></p> <p>2 ml Salzsäure (HCl 37 %) 198 ml Ethanol (96 %)</p>

<b>Färbelösungen</b>	
<p><b>HCl-Alkohol (verdünnt)</b> <i>für Elastica-von-Gieson-Färbung</i></p> <p>1 ml Salzsäure (HCl, 37 %) 99 ml Ethanol (70 %)</p>	<p><b>Von-Gieson Gemisch</b></p> <p>5 ml Säurefuchsin (1 %) 100 ml Pikrinsäure</p>
<p><b>Masson-Färbelösung</b></p> <p>0,2 g Scharlach Rot 0,1 g Säurefuchsin 300 ml VE-Wasser - aufkochen 0,6 ml Eisessig entstandene Lösung filtrieren</p>	<p><b>Weigerts Eisenhämatoxilin-Lösung</b></p> <p>180 ml Alkoholisches Hämatoxilin (2 %) 120 ml Eisen-III-Chlorid-Lösung 60 ml Lugolsche Lösung</p>
<p><b>Säurefuchsin (1 %)</b></p> <p>1 g Säurefuchsin 100 ml VE-Wasser</p>	<p><b>Weigerts Fuchsin und Resorcin-Lösung</b></p> <p>2 g Pararosanillin 4 g Resorcin 200 ml VE-Wasser – im Wasserbad kochen 25 ml Eisen-III-Chlorid-Lösung 30 % fünf Minuten kochen entstandene Lösung abkühlen und filtrieren Gefäß und Faltenfilter bei 60 °C im Ofen trocknen entstandene Farbschicht mit 200 ml 95 % Ethanol durch Erhitzen lösen 4 ml 37 % Salzsäure dazugeben</p>
<p><b>VE-Wasser</b></p> <p>Das verwendete VE-Wasser wurde mittels des Mischbett-Wasser-Vollentsalters aus Leitungswasser generiert.</p>	

<b>Selbst hergestellte Reagenzien (Immunhistochemie)</b>
<p><b>TRIS-gepufferte Salzlösung (TBS) pH 7,6:</b></p> <p>2,42 g TRIS 8,0 g NaCl ad 1000 ml VE-Wasser auf pH 7,6 eingestellt</p>
<p><b>Peroxidase Block 3 %:</b></p> <p>20 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % ad 200 ml Leitungswasser</p>
<p><b>Natronlauge (10N NaOH):</b></p> <p>400g Natriumhydroxid-Plätzchen ad 1000ml VE-Wasser</p>
<p><b>Citratpuffer (100 mM pH 6,0):</b></p> <p>21,014 g Citronensäure-Monohydrat mit 750 ml VE-Wasser lösen pH Wert mit 10N NaOH auf pH 6,0 einstellen ad 1000 ml VE-Wasser</p>

<b>Selbst hergestellte Reagenzien (Immunhistochemie)</b>
<b>Citratpuffer (100 mM pH 6,0; 1:10):</b> 20 ml 100 mM Citratpuffer pH 6,0 ad 200 ml VE-Wasser
<b>Essigsäure 1 %ig:</b> 1 ml Eisessig ad 100 ml VE-Wasser
<b>10 %iges fötales Rinderserum (FBS) in TBS:</b> 100 ml FBS ad 1000 ml TBS

<b>Injektionslösungen</b>
<b>Lösungsmittel für Baicalein-Injektionslösung</b> 5,4 % Ethanol (EtOH $\geq$ 99,8 %, v/v) in physiologischer Kochsalzlösung 0,9 % Natriumchlorid (NaCl, w/v)
<b>Baicalein-Injektionslösung</b> Baicalein (1,5 mg/kg/Tag) in Lösungsmittel (5,4 % EtOH in NaCl 0,9 %)

<b>Füllung der osmotischen Pumpe</b>
<b>Natriumchloridlösung zur Füllung der osmotischen Pumpe</b> Natriumchloridlösung 0,9 % Injektionslösung (siehe Liste Reagenzien)
<b>Angiotensin II Lösung zur Füllung der osmotischen Pumpe</b> Angiotensin II (1500 ng/Kg KGW/min) (siehe Liste Reagenzien) in Natriumchloridlösung 0,9 % Injektionslösung

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tierversuchsantrag

Alle Arbeiten zum Tierversuchsvorhaben der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen des Forschungsprojekts „Inflammatorische Zellen und Mediatoren bei der Entstehung des Aortenaneurysmas“ unter der Leitung von Dr. Markus Wortmann durch das Regierungspräsidium Karlsruhe, Referat 35, mit der Nummer 35-9185.81/G-142/14 am 16.02.2015 genehmigt.

### 3.2.2 Versuchsaufbau

Die Tiere wurden unter Berücksichtigung der Tierzahlen im Tierversuchsantrag und einer möglichst gleichmäßigen Altersstruktur in vier Gruppen eingeteilt, wobei nur männliche Mäuse verwendet wurden. Allen Tieren der vier Gruppen wurde eine osmotische Pumpe subkutan im Bereich des Nackens implantiert. Zusätzlich erhielten die Tiere eine intraperitoneale (i.p.) Injektion. Die Tiere der Gruppen NaCl BAI-, NaCl BAI+ und Ang II BAI- stellten die Kontrollgruppen dar, Gruppe Ang II BAI+ die Verumgruppe. Gruppe NaCl BAI- und NaCl BAI+ dienten als Kontrollgruppe für die Ang II-Infusion.

Hierfür erhielten die Tiere beider Gruppen über die osmotische Pumpe 0,9 % Natriumchlorid (NaCl)-Lösung. Gruppe NaCl BAI- erhielt i.p. das reine Lösungsmittel aus 5,4 % EtOH in 0,9 % NaCl-Lösung, während Gruppe NaCl BAI+ 1,5 mg/kg/Tag BAI in diesem Lösungsmittel erhielt. Die Tiere der Gruppen Ang II BAI- und Ang II BAI+ bekamen mittels der Pumpe 1500 ng/kg/min Ang II verabreicht. Zur Differenzierung der Wirkung von BAI erhielten die Tiere der Gruppe Ang II BAI- wieder das reine Lösungsmittel, während die Tiere der Gruppe Ang II BAI+ i.p. BAI in Lösungsmittel verabreicht bekam. Die Tiere der Kontrollgruppen NaCl BAI- und NaCl BAI+ setzten sich aus jeweils 10 Tieren zusammen, während die Ang II- Gruppen aus jeweils 30 Tieren bestanden (Schema Tabelle 1).

Der Versuchsaufbau sah einen Zeitraum von 5 Wochen für die Experimente vor, da eine Woche vor der Implantation der osmotischen Pumpe bereits eine sonographische Untersuchung der Aorta und im gesamten Zeitraum täglich i.p. Injektionen entweder mit Lösungsmittel oder mit BAI bei jeder Maus erfolgten. Die sonographische Untersuchung der Aorta wurde im wöchentlichen Abstand wiederholt. Nach der ersten Woche bekamen die Mäuse die osmotische Pumpe implantiert. Vier Wochen nach der Implantation wurden die Versuchstiere nach der Sonographie getötet. Es erfolgte die Blutentnahme und Präparation der Aorta (Abbildung 10).

Tabelle 1: Versuchsgruppen

Versuchsgruppen			
Gruppe	Füllung der osmot. Pumpe (Wirkungsdauer 4 Wochen)	i.p. Injektion (täglich)	Anzahl Mäuse
NaCl BAI- (Kontrollgruppe)	NaCl 0,9 % w/v	Lösungsmittel (5,4 % EtOH in NaCl 0,9 %)	10
NaCl BAI+ (Kontrollgruppe)	NaCl 0,9 % w/v	Baicalein + Lösungsmittel (1,5 mg/kg/Tag in 5,4 % EtOH in NaCl 0,9 %)	10
Ang II BAI- (Kontrollgruppe)	Ang II (1500 ng/kg/min)	Lösungsmittel (5,4 % EtOH in NaCl 0,9 %)	30
Ang II BAI+ (Verumgruppe)	Ang II (1500 ng/kg/min)	Baicalein + Lösungsmittel (1,5 mg/kg/Tag in 5,4 % EtOH in NaCl 0,9 %)	30

In der folgenden Abbildung ist der Ablauf des Versuchsaufbaus aufgetragen.

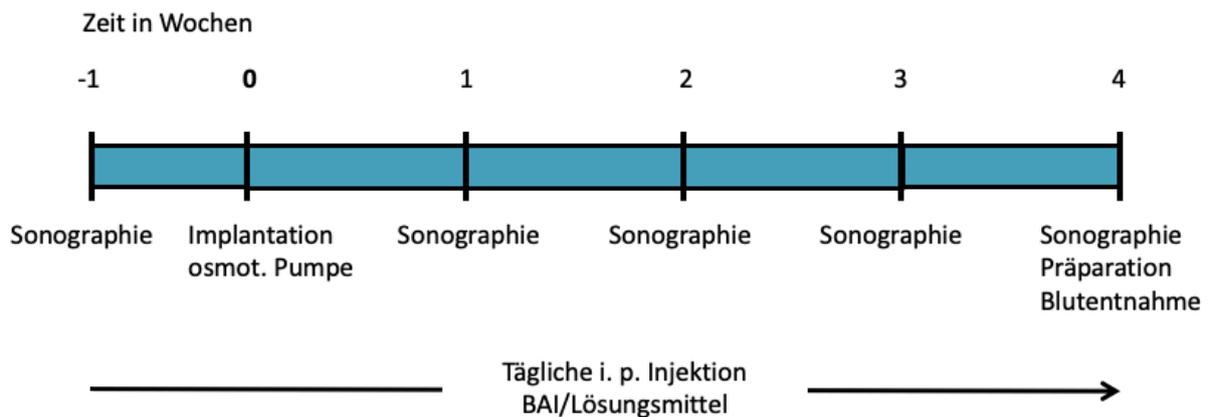


Abbildung 10: Schematischer Ablauf des Versuchsaufbaus (eigene Abbildung)

### 3.2.3 Pumpen und deren Befüllung

Die osmotischen Pumpen wiesen in der verwendeten Lot-Nummer ein Volumen von 231,7 µl mit einer Pumprate von 0,28 µl pro Stunde auf. Die Ang II-Ansatzlösung enthielt 20 mg/ml Ang II, was einer 0,019 molaren Lösung entspricht. Die Dosis für eine Maus betrug 1500 ng/kg/min.

Rechnung zur Befüllung:

$$50 \text{ mg Ang II in } 2,5 \text{ ml} = 20 \text{ } \mu\text{g Ang II in } 1 \text{ } \mu\text{l}$$

$$\frac{\text{Volumen Pumpe}}{\text{Pumprate}} = \frac{231,7 \text{ } \mu\text{l}}{0,28 \text{ } \mu\text{l/Stunde}} = 827,5 \text{ Stunde} = 49650 \text{ min}$$

$$\text{Dosis Maus} = 1500 \text{ ng/kg/min} = 1,5 \text{ mg/g/min}$$

$$1500 \text{ ng/kg/min} \times 49650 \text{ min} = 74475000 \text{ ng/kg} = 74475 \text{ ng/g}$$

$$74475 \text{ ng/g} : 20000 \text{ ng Ang II} = 3,72 \text{ } \mu\text{l/g}$$

$$3,72 \text{ } \mu\text{l/g} \times \text{Mausgewicht} = \text{Füllmenge Ang II der Pumpe}$$

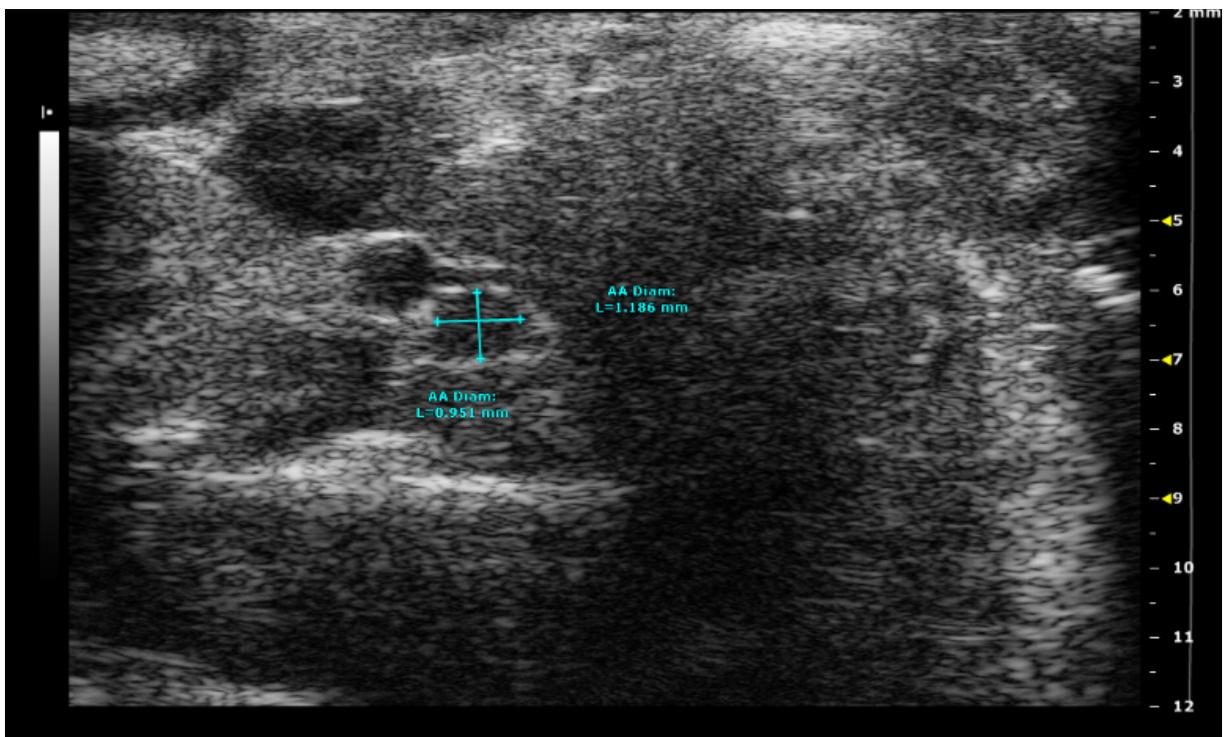
Zur Aktivierung der Pumpe musste diese vor der Implantation für 40 Stunden bei 37 °C mit Ringerlösung inkubiert werden.

### **3.2.4 Sonographische Messung des Aortendiameters und der Fließgeschwindigkeit**

Eine Woche vor Implantation der osmotischen Pumpe und an den Tagen 0, 7, 14, 21, 28 wurde der Aorten-Diameter duplex-sonographisch gemessen (Abbildung 10). Hierbei wurden transversal zwei Punkte der Aorta geschallt, zum einen der Zwerchfelldurchtritt (Abbildung 11) und zum anderen auf Höhe der kreuzenden Nierenvene (Abbildung 12). Es erfolgte ebenfalls eine sagittale Aufnahme der *Aorta abdominalis*, bei der nach Möglichkeit die fünf Bereiche mit dem maximalsten Durchmesser vergleichend gemessen wurden (Abbildung 13). Sowohl bei der transversalen wie der sagittalen sonographischen Darstellung wurden bei Auftreten eines AAAs der maximale Durchmesser verwendet. Auch wurde die durchschnittliche Fließgeschwindigkeit und bei 5 Messungen die systolische Spitzenflussgeschwindigkeit untersucht. Es wurden immer die 5 höchsten systolischen Spitzenflussgeschwindigkeiten gemessen (Abbildung 14).



**Abbildung 11:** Sonographische Darstellung der Aorta am Zwerchfelldurchtritt (eigene Abbildung)



**Abbildung 12:** Sonographische Darstellung der Aorta auf Höhe der kreuzenden Nierenvene (eigene Abbildung)

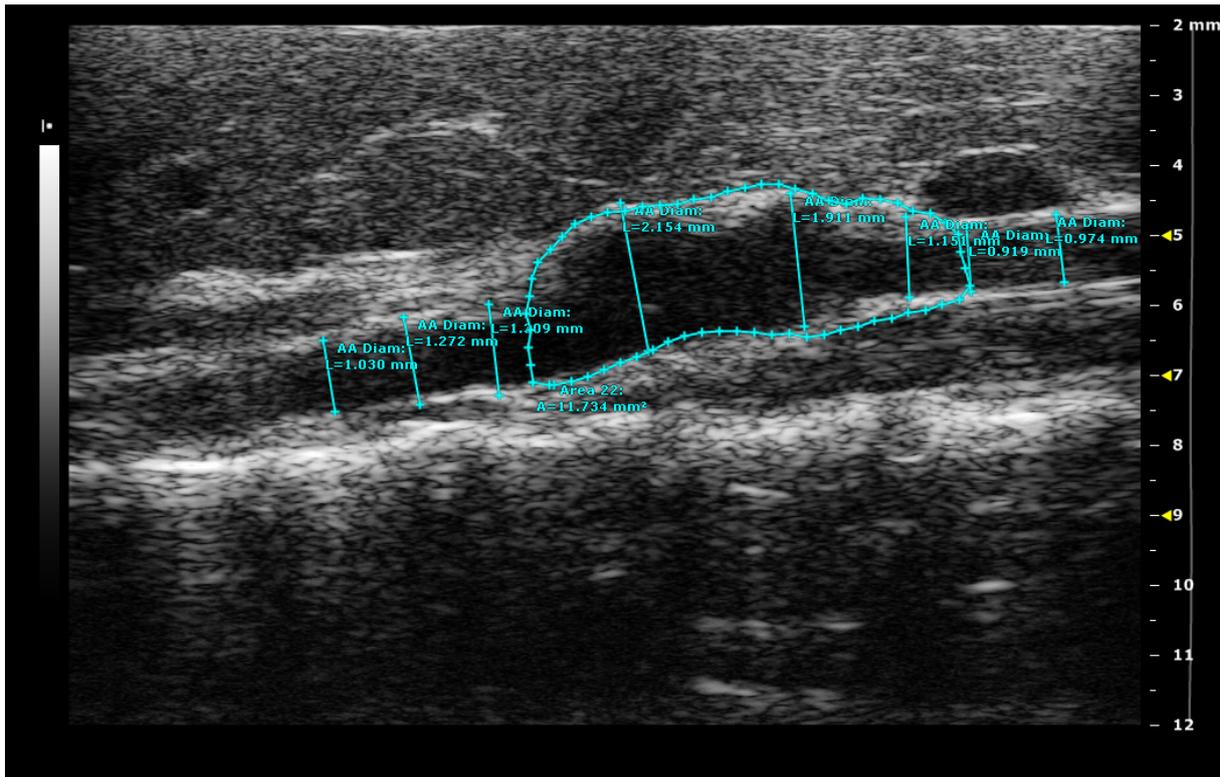


Abbildung 13: Messung der fünf Bereiche am Aneurysma (eigene Abbildung)

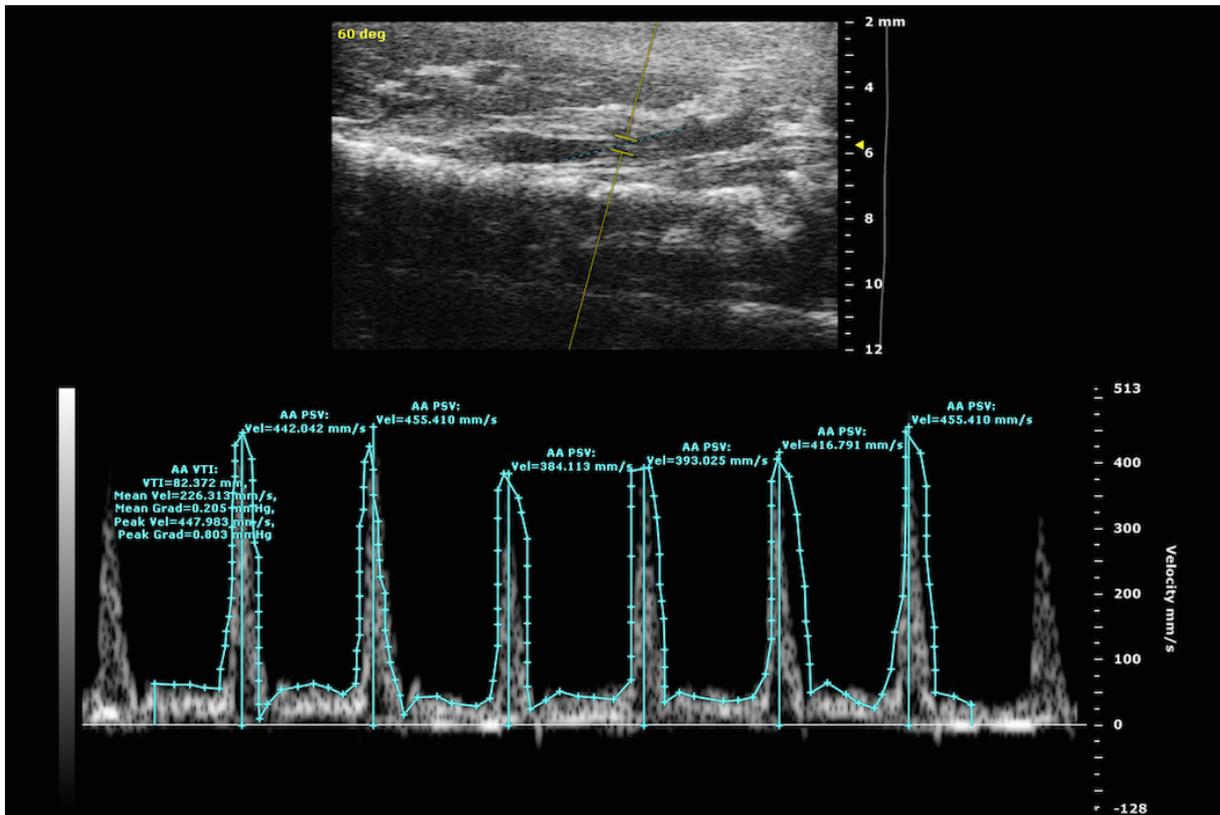
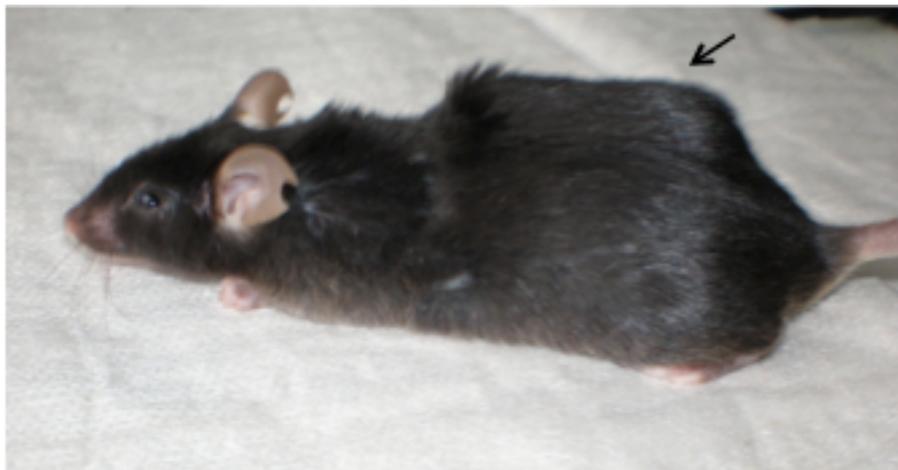


Abbildung 14: Sonographische Darstellung des Geschwindigkeitszeitintegrals (velocity time integral, VTI) mit Messung der mittleren Fließgeschwindigkeit (mean velocity, Mean Vel) und der systolischen Spitzenflussgeschwindigkeiten (peak systolic velocity, PSV) (eigene Abbildung)

### 3.2.5 Operation

Die Operation zur Implantation der osmotischen Pumpe begann mit der Narkotisierung der Maus. Hierzu wurde eine Kammer mit 3,5 % Isofluran-Sauerstoffgemisch gefüllt (Flussrate 600 ml/min Sauerstoff). Die so narkotisierte Maus wurde nun im Bereich des Nackens rasiert und zwecks besserem Ergebnis mit Enthaarungscreme behandelt. Es erfolgte eine Analgesie mittels i.p. Buprenorphin-Injektion. Hierzu wurde 0,1 mg/kg Buprenorphin i.p. injiziert. Die Maus wurde in Bauchlage mit einer Maske zur Aufrechterhaltung der Betäubung fixiert.

Es folgten nun die einzelnen Operationsschritte. Durch einen Scherenschnitt wurde die Haut im Bereich des Nackens circa 0,5 cm hinter einer gedachten Linie zwischen den Ohransätzen eröffnet. Mit Hilfe einer Schere erfolgte die Präparation einer Tasche. Dies geschah durch das vorsichtige Einführen der Schere parallel zur Rückenlinie der Maus und die Erweiterung durch das geringfügige Öffnen der selbigen. In die so entstandene Tasche wurde nun mittels einer Pinzette die osmotische Pumpe mit der Verschlusskappe in kaudaler Richtung eingebracht und bis auf circa 1 cm Entfernung vom Hautschnitt platziert (siehe Pfeil Abbildung 15). So sollte die Spannung auf der Hautnaht gesenkt werden, um das Risiko einer Nahtdehiszenz zu minimieren. Es erfolgte der Verschluss des Hautschnittes durch Einzelknopfhefte nach Lokalanästhesie und die Behandlung der verschlossenen Wunde mit Silber-Aluminium-Spray.



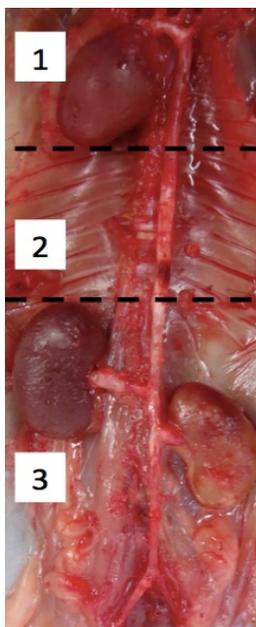
**Abbildung 15:** Maus mit implantierter Pumpe (Pfeil) nach Entfernen der Fäden (eigene Abbildung)

### 3.2.6 Postoperative Betreuung

Die Mäuse wurden täglich bei der Injektion (siehe Tabelle 1 der Versuchsgruppen) auf Nahtdehiszenz kontrolliert. Das Tierpfleger-Team der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung Heidelberg half durch die Versorgung der Tiere mit Futter und Einstreu und gab Rückmeldung im Falle von gesundheitlichen Problemen der Versuchstiere außerhalb der Behandlungszeiten. Nach 2 Wochen wurden die Fäden der Naht entfernt.

### 3.2.7 Tötung und Probenentnahme

Für diesen Versuch wurde die Methode der Perfusionsfixierung gewählt. Nach einer hochdosierten Narkose mit Isofluran erfolgte die Öffnung des Abdomens und des Thorax. Zur Gewinnung einer Blutprobe wurde eine Punktion des linken Ventrikels vorgenommen. Im Anschluss wurde über die Punktionsnadel nach Eröffnung des rechten Atriums 140 ml 4 %iges Formalin und darauffolgend 140 ml 0,9 %iges NaCl verabreicht. Zur Regulierung des benötigten Drucks wurde ein spezielles In Vivo Perfusion System benutzt. Dies musste in den physiologischen Grenzen erfolgen, damit es nicht zu einer Vergrößerung des Aneurysmas in Folge zu hohem Druck kam.



**Abbildung 16:** Präparierte Aorta mit Darstellung der drei Bereiche (eigene Abbildung)

Die Aorta wurde freigelegt. Das der Aorta anhaftende Fettgewebe und die Lymphknoten wurden entfernt und die Aorta von der Wirbelsäule gelöst. Die zu- und abführenden Gefäße, mit Ausnahme der Nierengefäße samt Nieren und dem Herz, wurden entfernt.

Die so freigelegte Aorta wurde in drei Abschnitte unterteilt. Den ersten Abschnitt bildeten Herz, Aortenbogen und *proximale Aorta descendens* bis auf Höhe der Herzspitze (vgl. 1 in Abbildung 16). Der zweite Abschnitt bestand aus *Aorta descendens* und dem *Viszeralsegment* der Aorta bis oberhalb des *infrarenalen* Bereichs (vgl. 2 in Abbildung 16). Den dritten Abschnitt stellte die *infrarenale Aorta* bis zur *Bifurkation* dar (vgl. 3 in Abbildung 16). Die drei Abschnitte wurden in 4 %igem Formalin eingelegt, was nach 24 Stunden die Fixierung des Gewebes zur Folge hatte.

### **3.2.8 Aufbereitung**

Die Aufbereitung der Probe erfolgte durch Frau Anja Spieler. Hierzu wurden die in 4 %igem Formalin 24 Stunden fixierten Proben im Pathologischen Institut der Universität Heidelberg prozessiert. Die Aorten-Stücke wurden senkrecht in eine Metallform gestellt und in Paraffin eingegossen. Danach erfolgte das Schneiden der ausgehärteten Paraffinblöcke mit dem Mikrotom und das Aufziehen der Schnitte auf einen Objektträger. Nach dem Trocknen der Schnitte für 24 Stunden konnten die histologischen und immunhistochemischen Färbungen erfolgen.

### **3.3 Histologie**

Die histologischen Schnitte und deren Färbung wurden zur Begutachtung und Bewertung verwendet. Für die Farbenherstellung und Färbeprotokolle kamen laborinterne Protokolle zum Einsatz. Die Protokolle der immunhistochemischen Färbungen wurden selbst entwickelt.

#### **3.3.1 Verwendete Färbemethoden**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Färbemethoden eingesetzt. Um die Lokalisation, Art des Gewebes sowie die Erkennbarkeit der einzelnen Strukturen sichtbar zu machen, wurden histologische Färbungen verwendet. Durch immunhistochemische Färbungen wurde die Lokalisation von Entzündungszellen, glatten Muskelzellen und Bestandteilen der Immunantwort genauer charakterisiert. Das verwendete VE-Wasser wurde mittels des Mischbett-Wasser-Vollentsalters aus Leitungswasser generiert.

#### **3.3.2 Histologische Färbungen**

Der Ablauf einer histologischen Färbung verlief immer gleich. So fand zuerst die Aufbereitung, danach die Entparaffinierung und Rehydrierung und im Anschluss der eigentliche Färbevorgang statt. Der Unterschied bestand in den unterschiedlichen Färbemitteln. Bei allen Färbungen schloss sich ein Entwässerungs- und Eindeckprozess an.

### **3.3.2.1 Entparaffinierung und Rehydrierung**

Die, wie unter 3.2.8 beschrieben, prozessierten histologischen Schnitte wurden in Glasschiffchen gesammelt und durchliefen einen Entparaffinierungsprozess. Dabei wurden die Proben zweimal sechs Minuten in Xylol getaucht. Es folgte die Prozessierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Begonnen wurde mit je zweimal drei Minuten in 100 %igem EtOH und dann in 96 %igem EtOH. Es schloss sich die dreiminütige Lagerung in 70 %igem Alkohol an. Im Anschluss erfolgte die Rehydrierung der histologischen Schnitte für drei Minuten in VE-Wasser.

Im Anschluss folgte der für jede Färbung charakteristische Färbevorgang.

### **3.3.2.2 Masson-Goldner-Färbung**

Bei der Masson-Goldner (MG)-Färbung handelt es sich um eine Trichromfärbung, welche Bindegewebe grün, Zellkerne schwarz und Muskulatur rot färbt (Abbildung 17). Durch die Färbung ist es möglich, die bindegewebige Durchbauung und den Abbau des Muskelgewebes in der Aorta zu visualisieren.

Der Färbevorgang wird nachfolgend beschrieben: Nach zwei Minuten in der Weigerts Eisenhämatoxin-Lösung wurden die Schnitte zum Bläuen zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Um eine Differenzierung des Gewebes zu erreichen, wurde der Objektträger mehrmals in HCl-Alkohol getaucht und ein weiteres Mal drei Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Nach sieben Minuten in Goldner-Lösung I wurden die Objektträger mit 1 %iger Essigsäure abgespült. Bis zur völligen Entfärbung des Bindegewebes wurden die Schnitte zur Differenzierung in Goldner-Lösung II getaucht, wobei dieser Vorgang 90 Sekunden dauerte. Einem weiteren Abspülprozess mit 1 %iger Essigsäure folgte die Gegenfärbung mit Goldner-Lösung III, was zwei Minuten in Anspruch nahm. Es schloss sich ein dreiminütiger Auswaschprozess und eine zweiminütige Fixation an.

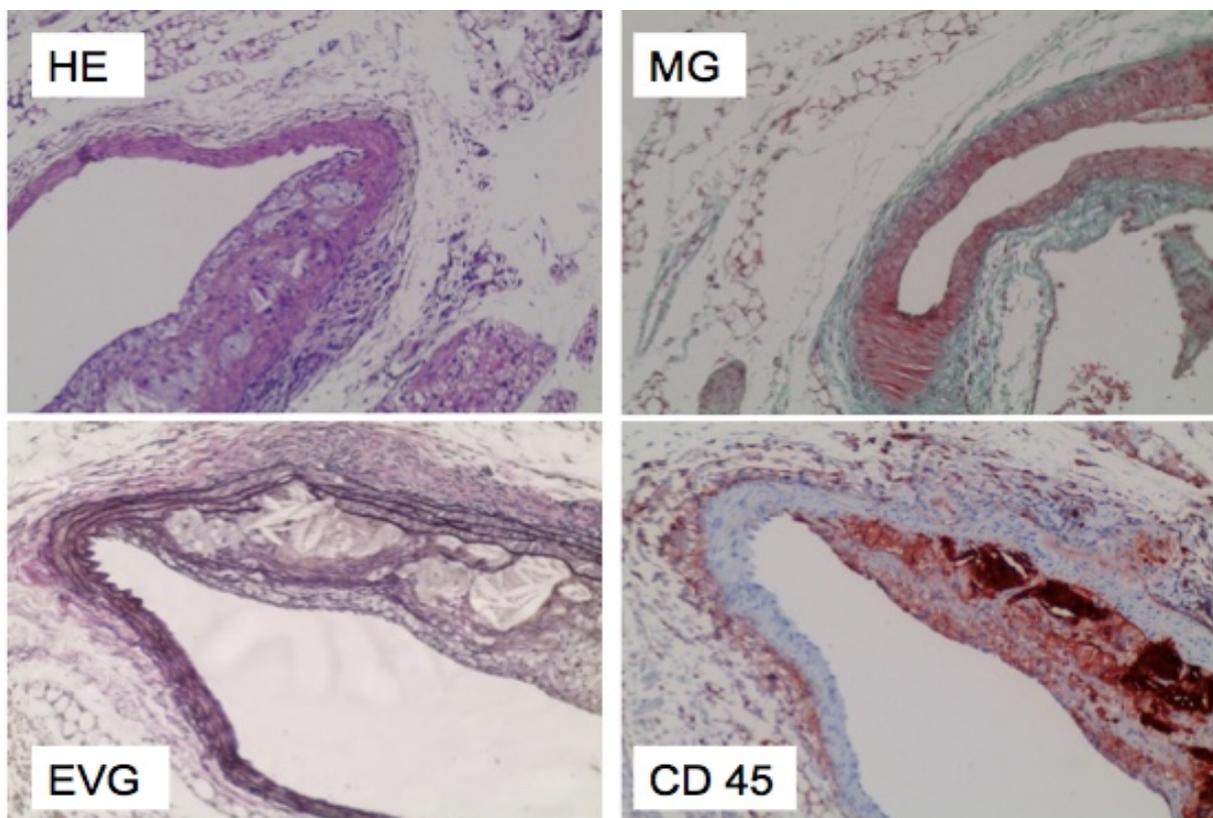
### **3.3.2.3 Elastica-von-Gieson-Färbung**

Die Elastica-von-Gieson (EVG)-Färbung ermöglicht durch die Färbung der elastischen Fasern in Schwarzlila die besonders deutliche Darstellung der Degeneration der elastischen Fasern in der Aorta (Abbildung 17). Die Färbung erfolgte durch den nachfolgenden Färbevorgang: Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Objektträger für eine Stunde in Weigerts Fuchsin und Resorcin-Lösung gefärbt. Es folgte ein kurzer Waschvorgang durch zweimaliges kurzes Eintauchen in 95 %igem EtOH. Zur Differenzierung wurden die Schnitte

in HCl-Alkohol (verdünnt) zweimal kurz eingetaucht und anschließend ebenfalls kurz in VE-Wasser getaucht. Es folgte als weiterer Färbeprozess eine fünfminütige Färbung in Eisenhämatoxylin-Lösung, dem sich eine ebenfalls fünf Minuten dauernde Bläuung unter fließendem Leitungswasser anschloss. Nach dem kurzen Abspülen der Schnitte mit VE-Wasser, wurden sie fünf Minuten in Von-Gieson Gemisch getaucht. Es folgte ein weiterer Spülvorgang mit VE-Wasser.

### 3.3.2.4 Häkalaun-Färbung nach Mayer

Die Häkalaun-Färbung nach Mayer, auch Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) genannt, stellt eine weitverbreitete Kontrastfärbung, durch die zahlreiche Strukturen wie zum Beispiel Zellkerne, elastische Fasern und Kollagen sichtbar gemacht werden können, dar. Hierbei werden die Zellkerne dunkellila gefärbt, während die übrigen Zellbestandteile in unterschiedlichen Rosatönen gefärbt werden (Abbildung 17 und 18). Der Färbeprozess läuft wie folgt ab: Zuerst werden die Objektträger für fünf Minuten in Häkalaun-Lösung gefärbt. Im Anschluss folgt drei Minuten das Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Als abschließender Färbeschritt kamen die Schnitte für 5 Minuten in 1 %iger Eosin-Lösung. Es folgte ein Spülvorgang mit VE-Wasser, dem 2-5 Tropfen Eisessig zugesetzt wurden.



**Abbildung 17:** Beispiele für die HE-, MG-, EVG- und die CD45- Färbung (eigene Abbildung)

### **3.3.2.5 Entwässerung und Eindeckprozess**

Im Anschluss an die verschiedenen Färbevorgänge wurden die histologischen Schnitte entwässert.

Hierzu wurden diese rasch jeweils zweimal in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70, 96 und 100 %igem Alkohol eingetaucht und für drei Minuten in Xylol gelagert.

Es schloss sich der Eindeckprozess an. Hierbei wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten mittels Histofluid mit einem Deckglas versehen. Dieser Vorgang stellte zusätzlich eine Konservierung dar, die mit einer Trocknungsphase von mindestens zwölf Stunden abgeschlossen wurde.

### **3.3.3 Immunhistochemie**

Es wurden immunhistologische Färbungen von glatten Muskelzellen (SMC), der Inflammation Präsenz (ASC, AIM2, NLRP3) und Lymphozyteninfiltration (CD45-Färbung, Abbildung 17) durchgeführt. Durch Negativ- und Positivkontrollen beim Färbeverfahren wurde eine mögliche Fehlfärbung oder Überfärbung ausgeschlossen.

Der Ablauf einer Immunhistochemie unterschied sich von der histologischen Färbung dadurch, dass keine Entwässerung stattfand und als Eindeckmedium Aquatex statt Histofluid verwendet wurde. Der Unterschied zwischen den einzelnen immunhistochemischen Verfahren bestand im unterschiedlichen Ablauf der immunologischen Markierung.

Nach der in 3.2.8 beschriebenen Aufbereitung folgte die im Abschnitt 3.3.2 beschriebene Entparaffinierung und Rehydrierung.

#### **3.3.3.1 Antigendemaskierung und Peroxidaseblock**

Die Schnitte wurden bei 100 °C für 30 Minuten in einer geschlossenen Box mit 200 ml 100 mM Citratpuffer (pH 6,0) im Dampfgarer inkubiert, um die Antigene zu demaskieren. Danach wurden die Schnitte in der Schachtel 25 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Schnitte wurden nun zweimal mit VE-Wasser abgespült. Anschließend wurden diese, um die Peroxidasen-basierten immunhistochemischen Färbungen nicht durch unspezifische Färbungen von, in den zu färbenden Paraffinschnitten anwesenden, Erythrozyten und endogenen Peroxidasen zu verfälschen, für fünf Minuten in 3 %igem Peroxidase-Block eingebracht, was der Neutralisierung der endogenen Peroxidaseaktivität dient.

Mit Ausnahme der SMC-Färbung und des TUNEL-Assay erfolgte eine weitere Blockierung mit 10 % FBS. Dazu wurden die Schnitte nach dem Peroxidase-Block zweimal fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Für eine Stunde wurde 10 %iges FBS in TBS-Puffer auf die Schnitte gegeben.

### 3.3.3.2 Immunologische Markierung (für ASC, AIM-2, NLRP3, CD45)

Nach dem Neutralisieren der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit TBS-Puffer. Für 45 Minuten wurde der in TBS-Lösung, die 10 %iges FBS enthielt, verdünnte Erstantikörper aufgetragen.

Für die **CD45 Immunhistochemiefärbung** wurde pro Paraffinschnitt ein Maus CD45 Primärantikörper (MAB114-100) in einer 1/50 Verdünnung verwendet. Dazu wurden 2 µl Maus CD45 Antikörper mit 0,1 ml 10 %iger FBS enthaltender TBS-Lösung gemischt.

Bei der **AIM-2 Immunhistochemiefärbung** wurde pro Paraffinschnitt eine immunologische Markierung mit AIM2 Erstantikörper (Mouse Specific, # 13095) in einer 1/100 Verdünnung verwendet. Hierzu wurden 1 µl AIM2 Antikörper mit 0,1 ml 10 %igem FBS enthaltendem TBS gemischt.

Für die **ASC Immunhistochemiefärbung** war als Erstantikörper je Paraffinschnitt ASC (D2W8U) Rabbit mAb in einer 1/100 Verdünnung im Einsatz. Dazu wurde 0,5 µl ASC Rabbit mAb mit 50 µl 10 %iger FBS enthaltender TBS-Lösung gemischt.

Als Erstantikörper für die **NLRP3 Immunhistochemiefärbung** wurde je Paraffinschnitt NLRP3 (D4D8T) Rabbit mAb in einer 1/200 Verdünnung verwendet. Hierbei wurden 0,25 µl NLRP3 Rabbit mAb mit 50 µl 10 %iger FBS enthaltender TBS-Lösung gemischt.

Danach erfolgte ein zweimal fünfminütiger Waschschrift mit TBS-Puffer. Die Applikation des Zweitantikörpers erfolgte für 10 Minuten.

Als Zweitantikörper für die **CD45 Immunhistochemiefärbung** wurde pro Paraffinschnitt der biotinylierte Antikörper aus der Ziege gegen Rattenantigene in einer 1/5000 Verdünnung verwendet. Hierzu wurde 0,02 µl Biotynilated Goat anti Rat (Jackson Immuno # 112-065-167) mit 0,1 ml 10 %iger FBS enthaltender TBS-Lösung gemischt.

Bei den **immunhistochemischen Färbungen von ASC, NLRP3 und AIM-2** wurden je Paraffinschnitt als Zweitantikörper biotinylierte Antikörper aus der Ziege gegen

Kaninchenantigene in einer 1/1000 Verdünnung verwendet. Dabei wurde 0,1 µl Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (111-065-003) mit 0,1 ml 10 %iger FBS enthaltender TBS-Lösung gemischt.

Dem schlossen sich zwei fünf Minuten dauernde Waschschriffe mit TBS-Puffer an. Vom ABC-Reagenz wurde 1 Tropfen pro Schnitt aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Ein erneuter Waschschriff mit zweimal fünf Minuten schloss sich an. Die Länge der nun folgenden Einwirkzeit der ImmPACT AEC Lösung variierte zwischen 10 und 30 Minuten abhängig von der Stärke der Farbreaktion. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser abgestoppt und mit VE-Wasser gespült.

Die bei der ASC Färbung notwendige Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun nach Mayer (Hämatoxilin). Um eine übermäßige Gegenfärbung zu vermeiden, wurden die Schnitte nur einmal eingetaucht und dann durch einmaliges Eintauchen in Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt.

Die **immunhistochemische Färbung von glatten Muskelzellen (Smooth Muscle Cells, SMC)** bei der die glatten Muskelzellen rot gefärbt werden, wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Nach der Neutralisierung der endogenen Peroxidaseaktivität durch zweimal 5 Minuten in TBS-Puffer erfolgte die Umrandung des Gewebes mit Fettstift. Es wurde dann der Primärantikörper aufgetragen und die Schnitte mit diesem bei 4 °C über Nacht inkubiert. Als Erstantikörper wurde pro Paraffinschnitt SMA Primärantikörper in einer 1 zu 2000 Verdünnung verwendet. Hierbei wurden 0,05 µl SMA Primärantikörper mit 0,1 ml TBS-Puffer gemischt. Als nächster Schritt schloss sich zweimal zweiminütiges Waschen mit TBS-Puffer an. Es folgte für 25 Minuten die Auftragung des Sekundärantikörpers aus dem Dako Kit (Reagenz A), welcher aus der Ziege stammte und biotyniliert war. Die Schnitte wurden zweimal fünf Minuten in TBS-Puffer gewaschen, anschließend mit einem 0,3 %igem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Block sieben Minuten inkubiert. Nach einem vierminütigen Waschschriff mit TBS-Puffer wurden die Schnitte mit Streptavidin HRP (Reagenz B aus dem Dako Kit) betropft und 25 Minuten inkubiert. Um die Immunreaktion sichtbar zu machen, wurde AEC-Reagenz (Reagenz C aus dem Dako Kit) nach vierminütigem Waschen in TBS-Puffer aufgetragen. Die Immunreaktion wird durch eine rötliche Färbung sichtbar. Die Schnitte zeigten nach 15 Minuten das beste Färbeergebnis. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser abgestoppt und mit VE-Wasser gespült. Wie bei der ASC Färbung erfolgte mit Hämalaun nach Mayer eine Gegenfärbung mit Hämatoxilin. Hierbei erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxilin für eine Minute und das

Abstoppen mit Leitungswasser für fünf Minuten. Anschließend wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten mittels Aquatex mit einem Deckglas versehen.

### **3.3.4 TUNEL-Assay zum Nachweis von Apoptose**

Der terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)-Assay wurde nach dem von Thermo Fisher Scientific veröffentlichten Protokoll „Click-iT TUNEL Colorimetric IHC Detection Kit“ (Pub. No. MAN0015677, Stand: 02.06.2019) durch Frau Anja Spieler angefertigt und stellt Zellkerne von apoptotischen Zellen dar. Durch diesen Assay werden die 3'-OH-Gruppen d.h. die an den Bruchenden freierwerdenden Hydroxygruppen der fragmentierten DNA im Zellkern angefärbt. Die Schnitte wurden entwässert, in dem sie rasch jeweils zweimal in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70, 96 und 100 %igem Alkohol eingetaucht und für drei Minuten in Xylol gelagert wurden. Anschließend erfolgte der Eindeckprozess mit Histofluid.

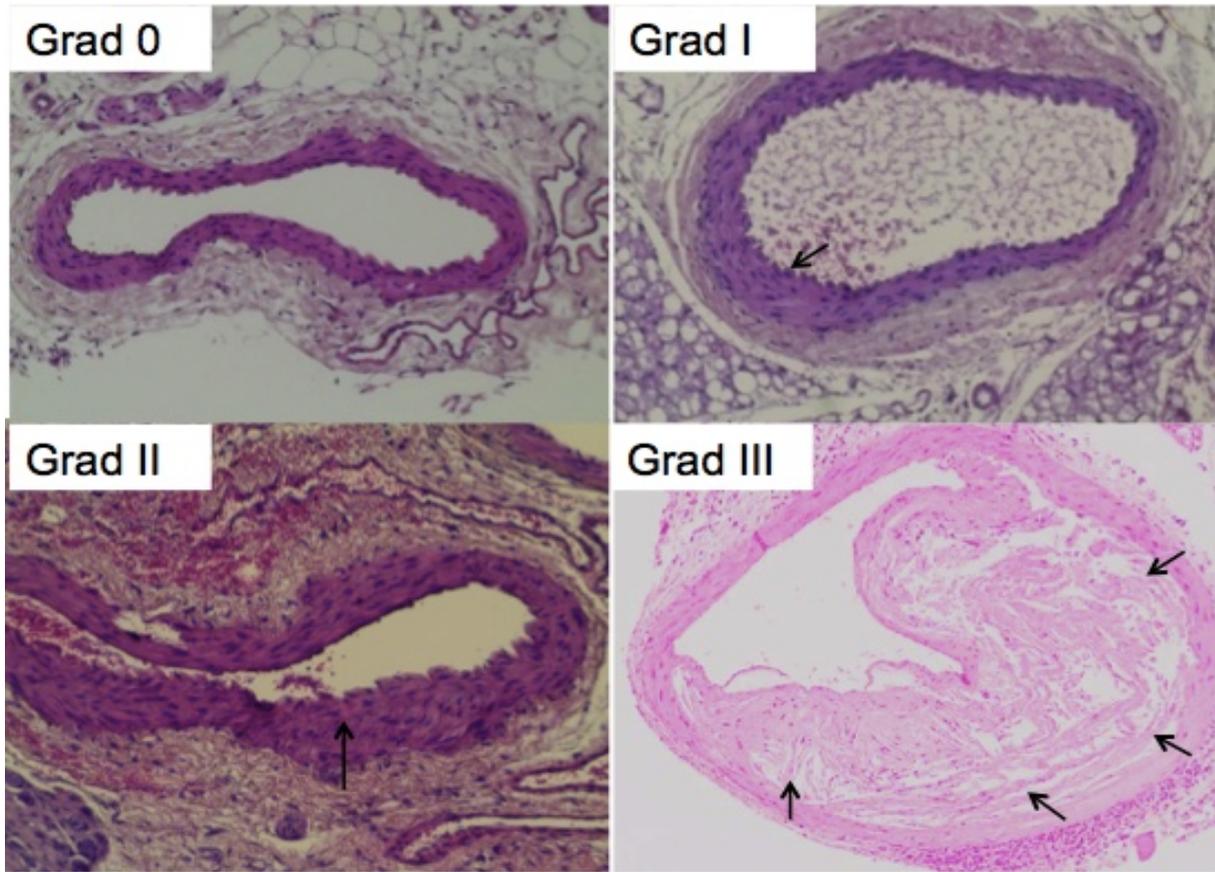
## **3.4 Datenerhebung**

### **3.4.1 Histologische Auswertung**

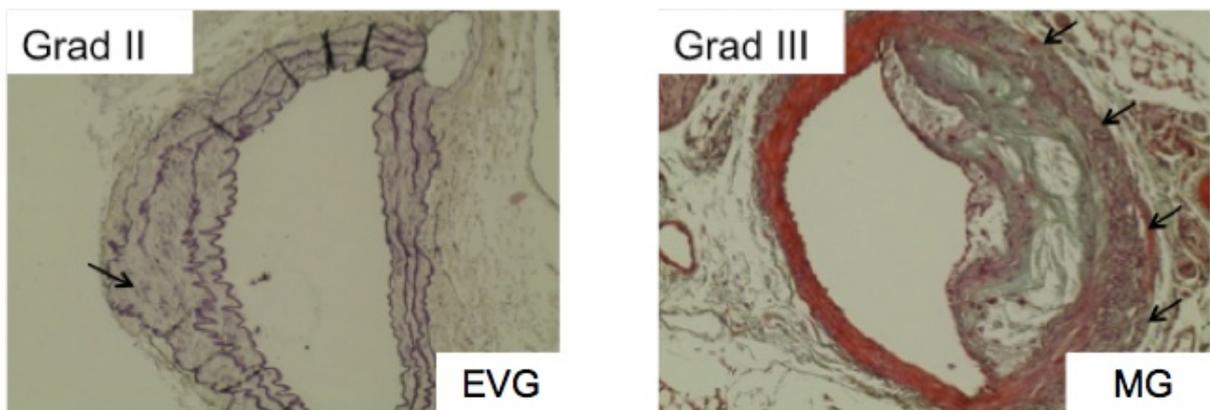
Um die histologische Graduierung zu verifizieren, wurde als weiterer Begutachter Dr. Markus Wortmann bestimmt. Dies stellt das im angelsächsischen Sprachraum als Second-Observer betitelt Prinzip dar. Der Vergleich mit den Ergebnissen zeigte eine sehr gute Übereinstimmung, was für eine gute Auswahl der Graduierungsmerkmale spricht.

### **Graduierung der Mediadegeneration**

Die Graduierung der Mediadegeneration erfolgte nach einem selbstentwickelten Bewertungsschema (Tabelle 2). Grad 0 zeigt eine Media ohne Auflösung des elastischen Faserverbandes und ohne Proliferation der Zellschicht (Abbildung 18). Grad I weist durch Proliferation verdickte Zellschicht auf (Pfeil) (Abbildung 18). Grad II zeigt eine Auflösung der elastischen Fasern (Pfeil) (Abbildung 18 und 19). Grad III liegt vor, sobald die Media von einer bindegewebigen Durchbauung betroffen ist, die an dieser Stelle der Media vollständig stattgefunden hat. (Pfeile, Abbildung 18 und 19).



**Abbildung 18:** Bewertungsschema Graduierung Mediadegeneration (HE-Färbung)



**Abbildung 19:** Detailansicht Mediadegeneration Grad II und Grad III

**Tabelle 2:** Merkmale der Mediadegeneration

Grad der Mediadegeneration	Merkmale
Grad 0	Media ohne Auflösung des elastischen Faserverbandes und ohne Proliferation der Zellschicht
Grad 1	verdickte Zellschicht
Grad 2	Auflösung der elastischen Fasern
Grad 3	Media von einer bindegewebigen Durchbauung betroffen

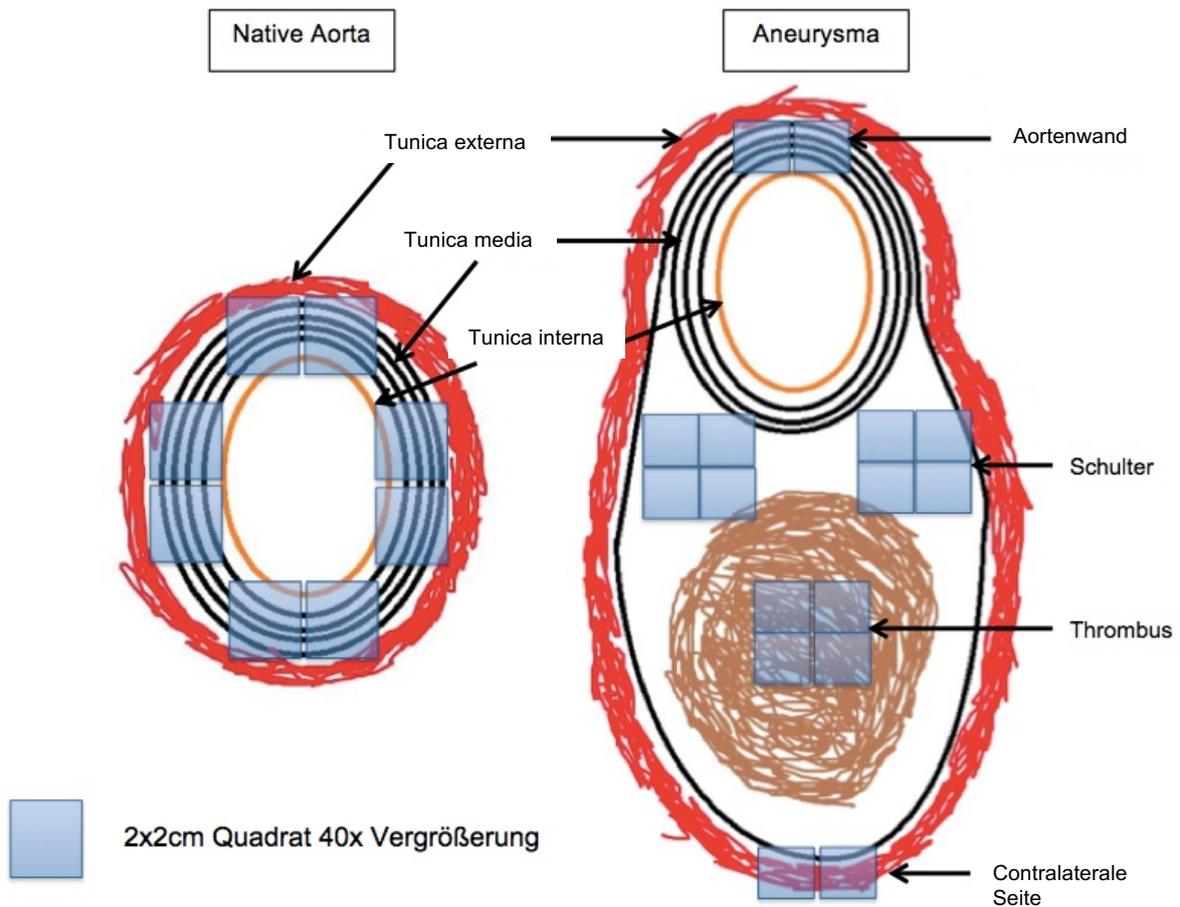
Für die Auswertung der histologischen Graduierung wurde mittels Excel ein Diagramm erstellt. Des Weiteren wurde die Signifikanz über den Fisher-Exakt-Test bestimmt.

### **Artefakte in den histologischen Schnitten**

Bei der histologischen Auswertung wurden Bereiche mit Artefakten unbeachtet gelassen. Sie wurden in die Auswertung nicht miteinbezogen. Besonders Artefakte wie Knicke durch das Aufziehen des wenige  $\mu\text{m}$  dicken Präparatschnittes auf einen Objektträger, Gefäßabgänge und unvollständige Gewebeanschnitte konnten leider nicht vermieden werden.

### **Auszählung angefarbter Zellen**

Die Auswertung mittels Auszählung der Zellen erfolgte für die folgenden Färbungen: CD45, AIM-2, ASC, NLRP3 und TUNEL-Assay. Hierfür wurde auf den Bildschirm des Lichtmikroskops eine Folie mit Quadraten der Größe 2 x 2 cm aufgebracht. Dies diente der besseren Auswertbarkeit. Bei 40-facher Vergrößerung wurden die Zellen wie in Abbildung 20 dargestellt ausgezählt. Dabei wurden bei einer nativen Aorta an den Positionen 12 Uhr, 3 Uhr, 6 Uhr und 9 Uhr je zwei nebeneinander liegende Quadrate ausgezählt (Abbildung 20). Beim Aneurysma wurde hierbei die Position 12 Uhr verwendet (Abbildung 20). Im Bereich der Schulter des Aneurysmas d.h. dem Beginn der Aufweitung des Gefäßes an der Aortenwand, wurden je vier Quadrate pro Seite ausgezählt (Abbildung 20). Im Thrombus wurden ebenfalls vier Quadrate ausgezählt (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Schema Lokalisierung der zur Auszählung verwendeten Areale

Das Ergebnis der Zählung wurde in eine Excel-Tabelle übertragen und der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Dabei wurde nach Aneurysma und nativer Aorta unterschieden. Als Aneurysma wurde die Aussackung des Gefäßes um das 1,5-fache gewertet. Während bei der nativen Aorta die positiven Zellen in 4x2 Quadraten ausgezählt wurden, wurde beim Aneurysma die in den oben beschriebenen Quadraten liegenden positiven Zellen nach den Abschnitten Aortenwand, Schulter, Thrombus und contralaterale Seite unterschieden.

Da sich bei den Färbungen für ASC, NLRP3 und TUNEL-Assay bei allen verstorbenen Mäusen keine Zellen erkennen und anfärben ließen, wurden diese ohne die verstorbenen Mäuse mittels T-Test ausgewertet. Ebenso erfolgte bei den Färbungen für CD45 und AIM-2 eine Auswertung mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Hierbei wurde die Auswertung mit und ohne die verstorbenen Mäuse durchgeführt und die nicht normalverteilten Werte der Auszählung in den verschiedenen Bereichen statistisch geprüft.

### **3.4.2 Statistische Methoden**

Bei einer Normalverteilung wurde als Methode zur Auswertung der T-Test mittels Microsoft Excel und bei geringen Stichprobenzahlen der Fisher-Exakt-Test angewandt. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewandt. Während T-Test und Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für kontinuierliche Messwerte verwendet werden, dient der Fisher-Exakt-Test zur Ermittlung von Häufigkeiten eines Merkmals. Alle Mittelwerte werden mit Standardabweichung angegeben.

#### **3.4.2.1 T-Test**

Mit dem T-Test wird der Unterschied der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben ermittelt. Dabei müssen die einzelnen Messwerte unabhängig voneinander und normalverteilt sein. So wurden die sonographischen Daten, wie der maximale Durchmesser der Mäuse, die mittlere Fließgeschwindigkeit und der systolische Spitzenfluss, sowie die Aneurysmaspezifische Altersverteilung mittels T-Test ausgewertet.

#### **3.4.2.2 Fisher-Exakt-Test**

Der Fisher-Exakt-Test als Signifikanztest auf Unabhängigkeit kann im Gegensatz zum Chi-Quadrat-Test ohne Voraussetzungen an den Stichprobenumfang durchgeführt werden. Deshalb liefert er auch bei einer geringen Stichprobenzahl zuverlässige Ergebnisse. Er kann für zweidimensionale Kontingenztafeln verwandt werden. Dabei müssen die einzelnen Messwerte unabhängig voneinander sein und aus unverbundenen Stichproben stammen. Hiermit wurden die Signifikanz der Mortalität der Mäuse und der Inzidenz des AAAs bestimmt. Der P-Wert wurde online über folgende Seite ermittelt:

<http://scistatcalc.blogspot.com/2013/11/fishers-exact-test-calculator.html> (Scistatcalc 2013)

#### **3.4.2.3 Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest**

Der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit, bei dem der Vergleich von Gruppen mittels einer Kreuztabelle möglich ist. Dabei müssen die Messwerte nominalskaliert und unabhängig voneinander sein. Der Stichprobenumfang bei jeder erwarteten Häufigkeit muss eine Mindestgröße von fünf aufweisen. Hiermit wurde mittels Microsoft Excel die Degeneration der Media bestimmt.

### **3.4.2.4 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test**

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test als Signifikanztest kann zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben durchgeführt werden. Dabei müssen die einzelnen Messwerte nicht normalverteilt sein. So konnte die Altersverteilung der Mäuse ausgewertet werden. Der P-Wert wurde online über folgende Seite ermittelt:

<https://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/default2.aspx> (Social\_Science\_Statistics 2020)

### **3.4.2.5 Datenbearbeitung mittels Microsoft Excel**

Mittels des Programms Excel wurde für die Mortalität ein Diagramm über die während des 4 wöchigen Versuchs verstorbenen Mäuse erstellt. Die Todesursache wurde bei jeder Maus ermittelt. Ebenso wurde ein Diagramm über die in der Histologie gefundenen abdominalen Aneurysmen erstellt. Die Ultraschalldaten wurden, wie in 3.2.4 beschrieben, gesammelt und in einer Excel-Tabelle zusammengestellt. Alle sonographischen Daten wurden mit dem T-Test ausgewertet. Beim maximalen Aortendiameter wurde ein Diagramm erstellt. Für fehlende Werte wurde der Wert der vorangegangenen Messung verwendet, da der maximale Aortendiameter nicht kleiner zu werden vermag. Für die mittlere Fließgeschwindigkeit und den systolischen Spitzenfluss wurden jeweils ein Diagramm und ein Boxplot mittels Microsoft Excel erstellt. Fehlende Werte wurden nicht ergänzt. Die Altersverteilung der Versuchstiere wurde in eine Excel-Tabelle übertragen und der Mittelwert und die Standardabweichung jeder Gruppe sowie aller Versuchstiere gebildet.

## 4. Ergebnisse

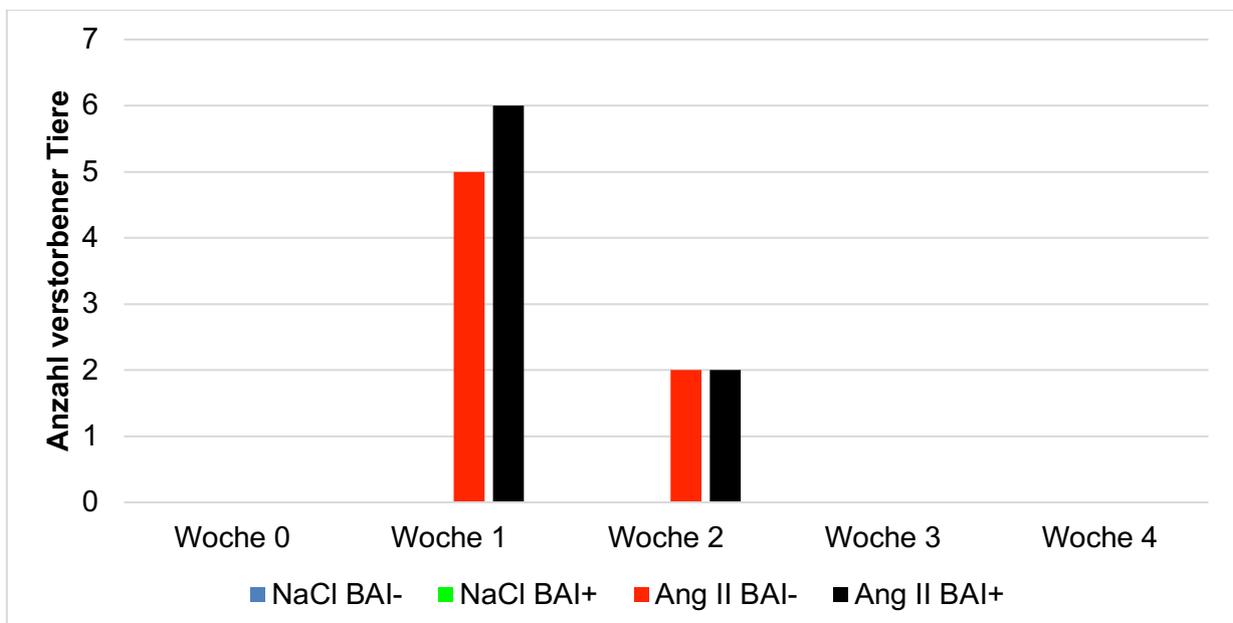
### 4.1 Ergebnisse zum Einfluss von Baicalein auf die Entstehung eines Aortenaneurysmas

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von BAI auf die Mortalität, die Inzidenz von Aneurysmen, die Diameterentwicklung und die Degeneration der Media untersucht, ebenso der Effekt auf den maximalen Durchfluss und die durchschnittliche Fließgeschwindigkeit der Aorta. Damit sollte ein Bild des Einflusses von BAI auf die Entstehung von Aortenaneurysmen entstehen.

#### 4.1.1 Mortalität

##### Mortalität gesamt

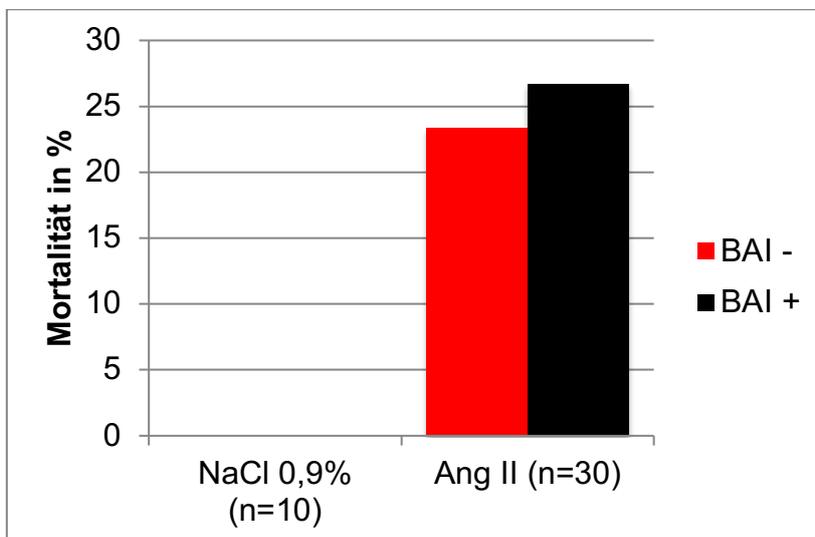
Alle während des Experimentes verstorbenen Mäuse wurden auf ihre Todesursache hin untersucht. Nur bei der Gabe von Ang II kam es zu Todesfällen durch Ruptur der Aorta im Bereich des Aortenbogens. Das Diagramm der Abbildung 21 zeigt, dass von den 30 Mäusen in Kontrollgruppe Ang II BAI- nach Ang II-Gabe in der ersten Woche 5 Mäuse und in der zweiten Woche weitere 2 Mäuse starben. In der Verumgruppe Ang II BAI+ starben in der ersten Woche nach Ang II-Gabe 6 Mäuse und in der zweiten Woche weitere 2 Mäuse.



**Abbildung 21:** Mortalität im zeitlichen Verlauf für die mit NaCl behandelten Tier der Gruppen NaCl BAI- und NaCl BAI+ (je Anzahl (n) = 10) und die mit Ang II behandelten Tiergruppen Ang II BAI- und Ang II BAI+ (je n = 30)

Im Diagramm der Abbildung 22 wurde die Gesamtmortalität während des Experiments aufgetragen. Hierbei zeigte sich, dass in den Kontrollgruppen NaCl BAI- und NaCl BAI+, die kein Ang II über die osmotische Pumpe bekamen, keine Todesfälle zu verzeichnen waren. Die Gruppengröße betrug hier 10 Tiere. Bei den Tieren in Kontrollgruppe Ang II BAI-, welche zwar Ang II mittels osmotischer Pumpe, aber kein BAI i.p. verabreicht bekam, waren 7 von 30 Tieren verstorben. Dies entspricht einer Mortalität von 23,33 %. Bei den Tieren der Verumgruppe Ang II BAI+, welche sowohl Ang II mittels osmotischer Pumpe als auch BAI i.p. verabreicht bekamen, waren 8 Todesfälle bei einer Gruppengröße von 30 Tieren zu beobachten. Das sind 26,67 Prozent der Tiere.

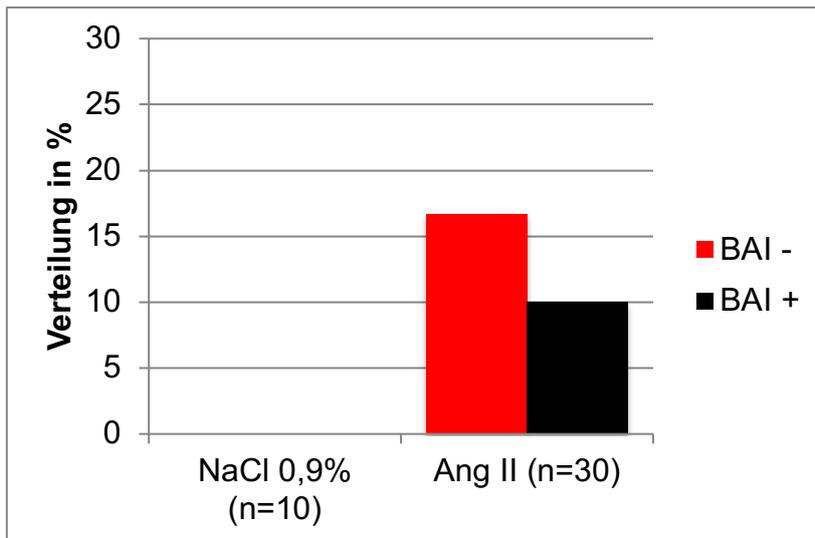
Während des Experimentes verstarb insgesamt die folgende Anzahl von Tieren:



**Abbildung 22:** Mortalität gesamt in Prozent für die mit NaCl behandelten Tiere der Gruppen (je n = 10) und die mit Ang II behandelten Tiergruppen (je n = 30)

### Aneurysma-spezifische Mortalität

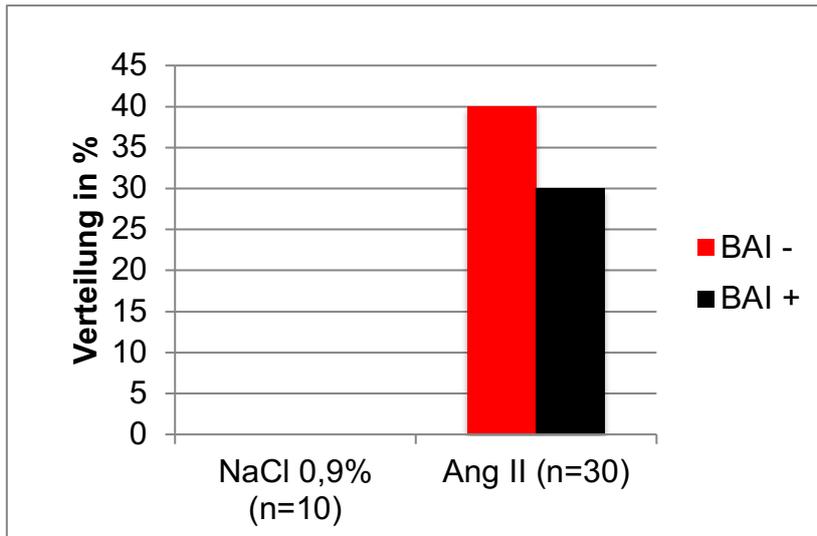
Da der Einfluss von BAI auf die Rupturrate von Aortenaneurysmen untersucht werden sollte, wurde neben der Gesamtzahl der während des Experimentes verstorbenen Mäuse auch die Aneurysma-spezifische Mortalität untersucht. Hierbei wurden nur die verstorbenen Mäuse, die ein Aneurysma aufwiesen, gewertet. Auch hier zeigten die Kontrollgruppen NaCl BAI- und NaCl BAI+ bei einer Gruppengröße von 10 Tieren keine Verluste. Bei Kontrollgruppe Ang II BAI- hatten 5 von 30 Tieren eine Aneurysma-spezifische Mortalität (Abbildung 23). Dies entsprach einem Prozentsatz von 16,67. Mit 3 Tieren der 30 Tiere zeigte die Verumgruppe Ang II BAI+ zwar weniger Todesfälle im Vergleich zu Kontrollgruppe Ang II BAI-, aber keinen signifikanten Effekt auf die Aneurysma-spezifische Mortalität durch eine Therapie mit BAI.



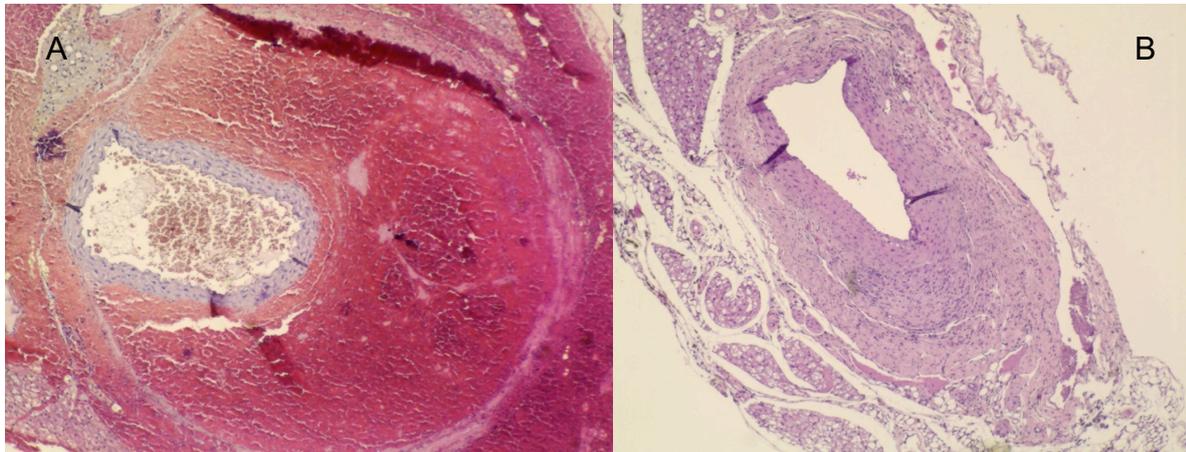
**Abbildung 23:** Aneurysma-spezifische Mortalität in Prozent für die mit NaCl behandelten Tiergruppen (je n = 10) und die mit Ang II behandelten Tiere der Gruppen (je n = 30)

#### 4.1.2 Inzidenz der Aneurysmen

Da die im Menschen auftretenden Aneurysmen überwiegend in den Abschnitten 2 und 3 zu finden sind, wurde der Fokus der Untersuchungen auf diese Abschnitte gelegt. In Kontrollgruppe NaCl BAI- und NaCl BAI+ wurden keine Aneurysmen festgestellt. Bei Kontrollgruppe Ang II BAI- wiesen 12 von 30 Tieren ein Aneurysma auf, während in Verumgruppe Ang II BAI+ 9 von 30 Tieren betroffen waren (Abbildung 24). Dies entspricht einer Inzidenz von 40 Prozent in Kontrollgruppe Ang II BAI- und einer Inzidenz von 30 Prozent in Verumgruppe Ang II BAI+. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Inzidenz der Aneurysmen der Abschnitte 2 und 3 bei Kontrollgruppe Ang II BAI- im Vergleich zu Verumgruppe Ang II BAI+ festgestellt werden. Es zeigte sich somit, dass es nur bei Behandlung mit Ang II zur Ausbildung von AA kam. Die Aneurysmen stellten sich je nach dem Zeitpunkt des Ablebens der Mäuse unterschiedlich dar. So wurden die vorzeitig verstorbenen Mäuse schnellstmöglich präpariert und deren Aorta fixiert. Dies hatte die Fixation des beginnenden Austrittes von Erythrozyten aus dem Gefäß zur Folge (Abbildung 25 A), was durch die Perfusionsfixierung am Ende des Experimentes verhindert wurde (Abbildung 25 B).

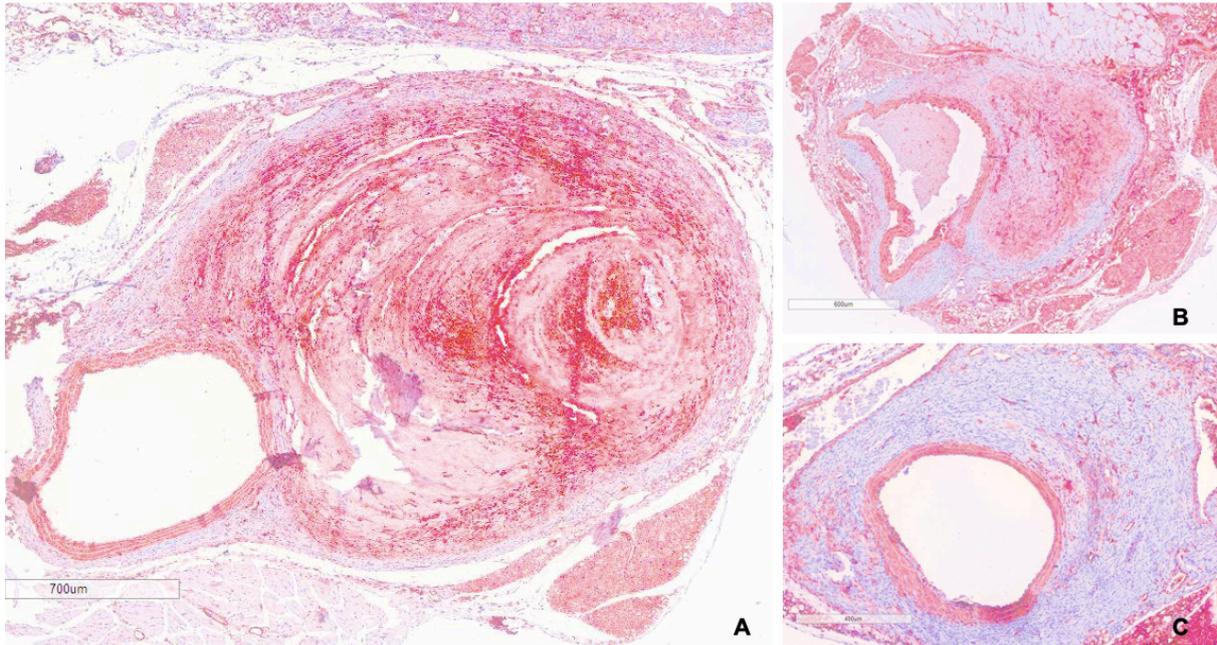


**Abbildung 24:** Inzidenz Aneurysmen Abschnitte 2 und 3 in Prozent für die mit NaCl behandelten Tiergruppen (je n = 10) und die mit Ang II behandelten Tiergruppen (je n = 30)



**Abbildung 25 A:** Histologischer HE-Schnitt eines Aneurysmas einer vorzeitig verstorbenen Maus. **B:** HE-Schnitt eines Aneurysmas einer Maus nach Ende des Experiments

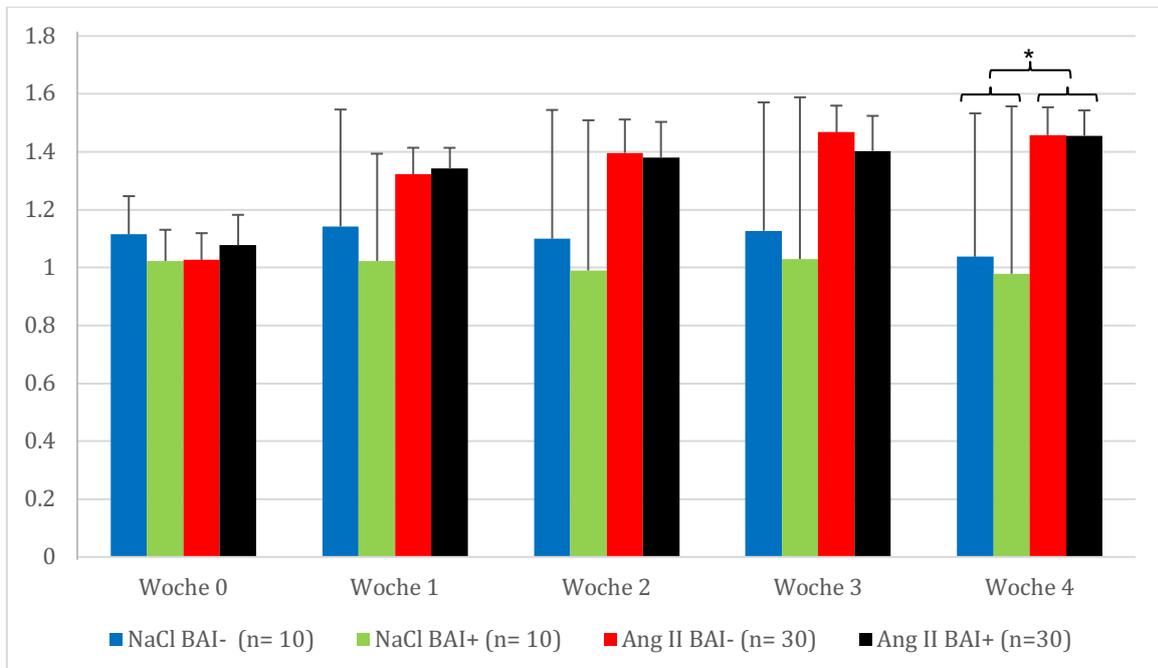
Zur besseren Beurteilung dieser Erkenntnis wurden die Aneurysmenschnitte mittels SMC-Färbung untersucht. Hierbei wurde der Verlauf der glatten Muskelzellen im Bereich der Media und Intima durch Rotfärbung sichtbar gemacht und die Zerstörung von SMCs in den einzelnen Schichten durch Apoptose genauer beobachtet (Abbildung 26). Während in Abbildung 26 A die Umbauprozesse im Thrombus noch nicht sehr weit fortgeschritten sind, hat in Abbildung 26 B der Umbauprozess schon begonnen und der Ausbau des Thrombus ist in Abbildung 26 C weitgehend abgeschlossen.



**Abbildung 26 A-C:** SMC-Färbungen von Aortenaneurysmen

### 4.1.3 Diameterentwicklung

Um Aufschluss über die Wachstumsrate der Aneurysmen zu erhalten, wurde die maximale Diameterentwicklung der Mäuse sonographisch ausgewertet.



**Abbildung 27:** Diameterentwicklung der Aorten aller Mäuse in Millimeter für die mit NaCl behandelten Tiergruppen (je n = 10) und die mit Ang II behandelten Tiergruppen (je n = 30) (Mittelwert ± Standardabweichung) \* P < 0,05

Die mit Ang II behandelten Tiere entwickelten einen signifikant höheren Aortendiameter im Vergleich zu den Tieren ohne Ang II-Gabe. Die BAI-Therapie hatte aber keinen signifikanten Einfluss auf die Diameterentwicklung (Abbildung 27). Somit konnte kein signifikanter Unterschied bei der Wachstumsrate der Aneurysmen bezüglich BAI in Form einer Minimierung ihres Wachstums gezeigt werden.

### **4.1.4 Degeneration der Media**

Die Auswertung der Mediadegeneration erfolgte nach den Graden 0 bis III anhand der HE-Färbung (Abbildung 18). Bei der Beurteilung der Auflösung der elastischen Fasern wurde die EVG-Färbung, bei der bindegewebigen Durchbauung die MG-Färbung zu Grunde gelegt (Repräsentative Beispiele siehe Abbildung 18 und 19).

Bei der Bewertung der Mediadegeneration mit Grad 0 zeigten die Tiere, die NaCl statt Ang II erhielten, einen prozentual höheren Anteil als die mit Ang II behandelten Tiere. So wiesen drei von zehn Tieren der Kontrollgruppe NaCl BAI- eine Mediadegeneration von Grad 0 auf. Eines von neun Tieren der Kontrollgruppe NaCl BAI+ zeigte ebenfalls den Mediadegenerationsgrad 0. Die mit Ang II behandelten Gruppen zeigten prozentual weniger Tiere mit Mediadegeneration Grad 0. Bei Kontrollgruppe Ang II BAI- wies eines von 28 Tieren Grad 0 auf, während keines der Tiere der Verumgruppe Ang II BAI+ den Mediadegenerationsgrad 0 zeigte. Somit wurde deutlich, dass die mit BAI behandelten Tiergruppen weniger Tiere des Mediadegenerationsgrades 0 aufwiesen (Tabelle 3 und Abbildung 28 A).

Beim Grad I der Mediadegenerationsgraduierung hatten alle vier Gruppen 2 Tiere vorzuweisen (Tabelle 3). Durch die unterschiedlichen prozentualen Anteile ergab sich in Abbildung 28 folgende Verteilung: Kontrollgruppe NaCl BAI- hatte mit zwei von zehn Tieren nur 20 Prozent Grad I-Tiere, während in Kontrollgruppe NaCl BAI+ mit zwei von neun Tieren 22,22 Prozent einen Grad I aufwiesen. Kontrollgruppe Ang II BAI- zeigte mit zwei von 30 Tieren d.h. 6,67 Prozent mit Grad I eine niedrigere Verteilung als die Verumgruppe Ang II BAI+ mit zwei von 28 Tieren also 7,14 Prozent (Abbildung 28 B).

Die Mediadegenerationsgraduierung des Grades II zeigte mit zwei von zehn Tieren in Kontrollgruppe NaCl BAI-, sechs von neun Tieren in Kontrollgruppe NaCl BAI+, vier von 30 Tieren in Kontrollgruppe Ang II BAI- und acht von 28 Tieren in Verumgruppe Ang II BAI+ einen hohen Anteil an Tieren, die diesen Mediadegenerationsgrad aufweisen (Tabelle 3). Wie in Abbildung 28 gezeigt, ist der prozentuale Anteil an Mediadegeneration Grad II der mit BAI behandelten Tiere höher als der Tiere ohne BAI-Behandlung (Abbildung 28 C).

## Ergebnisse

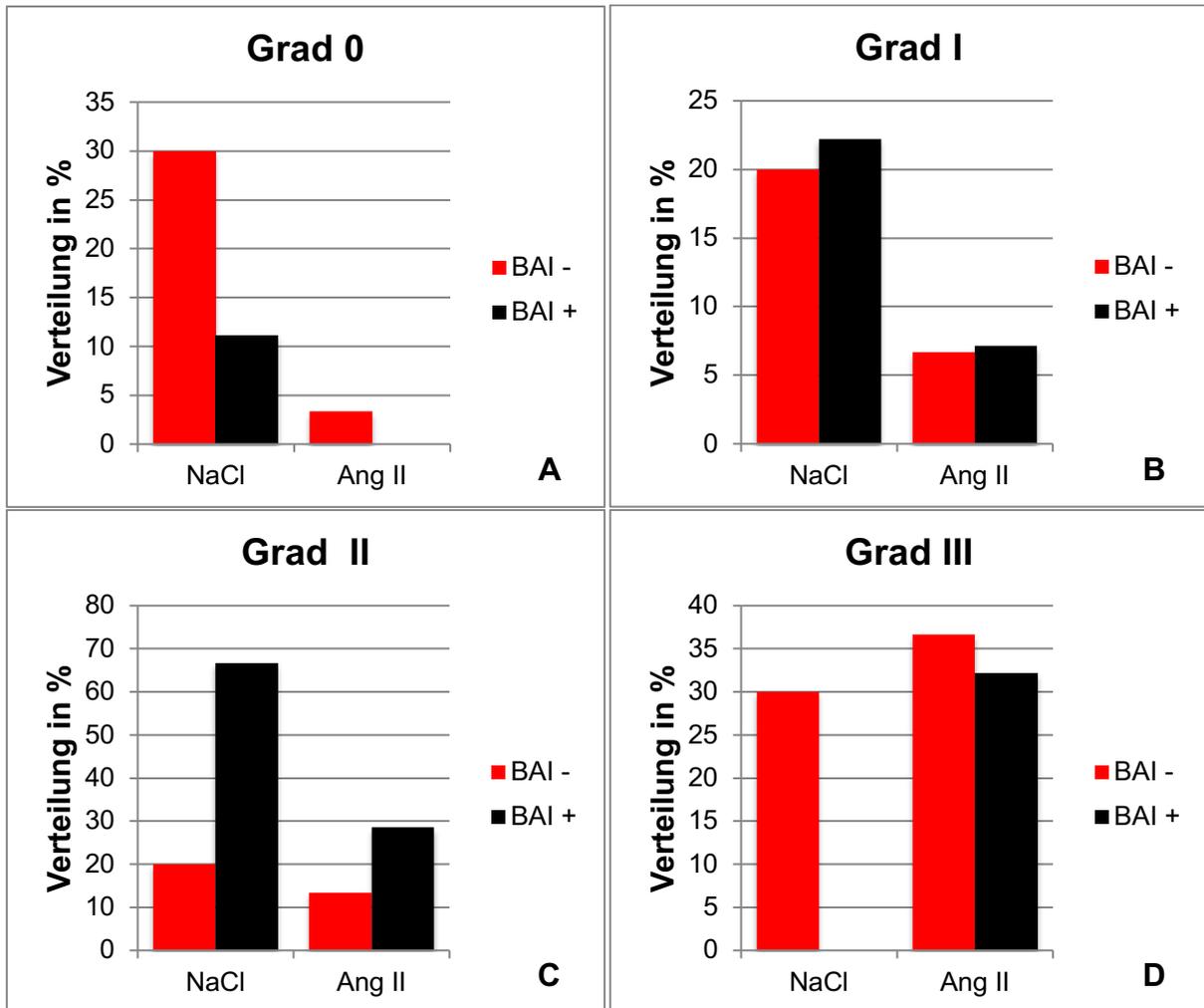
Der höchste Grad der Mediadegeneration war bei Kontrollgruppe NaCl BAI- in drei von zehn Tieren, in Gruppe Ang II BAI- bei 11 von 30 Tieren und bei neun von 28 Tieren in der Verumgruppe Ang II BAI+ zu finden (Tabelle 3). Die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI+ zeigten keine Mediadegeneration des Grades III. Im Unterschied zum Grad II präsentierte sich hier ein prozentual höherer Anteil der nicht mit BAI behandelten Tiere im Vergleich zu den BAI-Gruppen NaCl BAI+ und Ang II BAI+ (Abbildung 28 D).

Dies belegt deutlich eine Verschiebung der Mediadegeneration bei den Tieren der mit BAI behandelten Versuchsgruppe NaCl BAI+ von Grad III nach Grad II, was eine signifikante Abnahme der Mediadegeneration durch BAI bei dieser Gruppe im Grad III zeigt. Zusätzlich wiesen die Ang II-Tiere erhöhte Werte in Grad III auf. Der Anstieg bei den Tieren der Gruppe Ang II BAI+ in Grad II und III flacht stark aber nicht signifikant ab.

**Tabelle 3:** Mediadegeneration Gesamt und der einzelnen Gruppen

<b>Mediadegeneration</b>					
	NaCl BAI-	NaCl BAI+	Ang II BAI-	Ang II BAI+	Gesamt
Aneurysmen	0	0	12	9	21
Nicht auswertbar	0	1	0	2	3
Grad 0	3	1	1	0	5
Grad I	2	2	2	2	8
Grad II	2	6	4	8	20
Grad III	3	0	11	9	23
Gesamt	10	10	30	30	80

Die Auswertung der Mediadegeneration mittels Fisher-Exakt-Test zeigte für Grad 0 einen P-Wert von 0,5615. Somit ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Verteilung in den Gruppen (Abbildung 28 A). Die Gruppen waren bei Grad I nicht signifikant verteilt, was sich in einem P-Wert von 1 niederschlug (Abbildung 28 B). Bei Grad II lag der P-Wert mit 0,3905 über dem P-Wert von  $< 0,05$  und ist somit nicht signifikant (Abbildung 28 C). Grad III zeigte mit einem p-Wert von 0,00001 einen signifikanten Unterschied zwischen den mit und ohne Ang II behandelten Tieren der Gruppen. Dies weist im Zusammenhang mit der signifikanten Abnahme der Mediadegeneration der mit BAI behandelten Versuchsgruppe NaCl BAI+ von Grad III nach Grad II auf eine mögliche protektive Wirkung von BAI in Abwesenheit von Ang II hin (Abbildung 28 D).



**Abbildung 28:** Diagramm der Verteilung in den Gruppen die den jeweiligen Grad aufwiesen. A: Grad 0; B: Grad I; C: Grad II und D: Grad III

#### 4.1.5 Mittlere Fließgeschwindigkeit

Die mittlere Fließgeschwindigkeit ließ Rückschlüsse auf die Größe des Lumens der Aorta im lebenden Tier zu. In Tabelle 9 wurde hierzu der Wert pro Gruppe und Woche für die mittlere Fließgeschwindigkeit aufgeführt.

In Woche 0 wiesen die Tiere der Gruppen folgende Mittelwerte auf, Kontrollgruppe NaCl BAI- 355,86 mm/s  $\pm$  81,78 mm/s, Kontrollgruppe NaCl BAI+ 385,34 mm/s  $\pm$  106,75 mm/s, Kontrollgruppe Ang II BAI- 361,22 mm/s  $\pm$  104,42 mm/s und die Verumgruppe Ang II BAI+ 345,32 mm/s  $\pm$  87,58 mm/s (Abbildung 29).

In Woche 1 zeigten die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI- mit 279,12 mm/s  $\pm$  24,7 mm/s, Kontrollgruppe Ang II BAI- mit 301,59 mm/s  $\pm$  106,74 mm/s und die Tiere der Verumgruppe Ang II BAI+ mit 294,68 mm/s  $\pm$  93,5 mm/s eine niedrigere mittlere Fließgeschwindigkeit. Auf

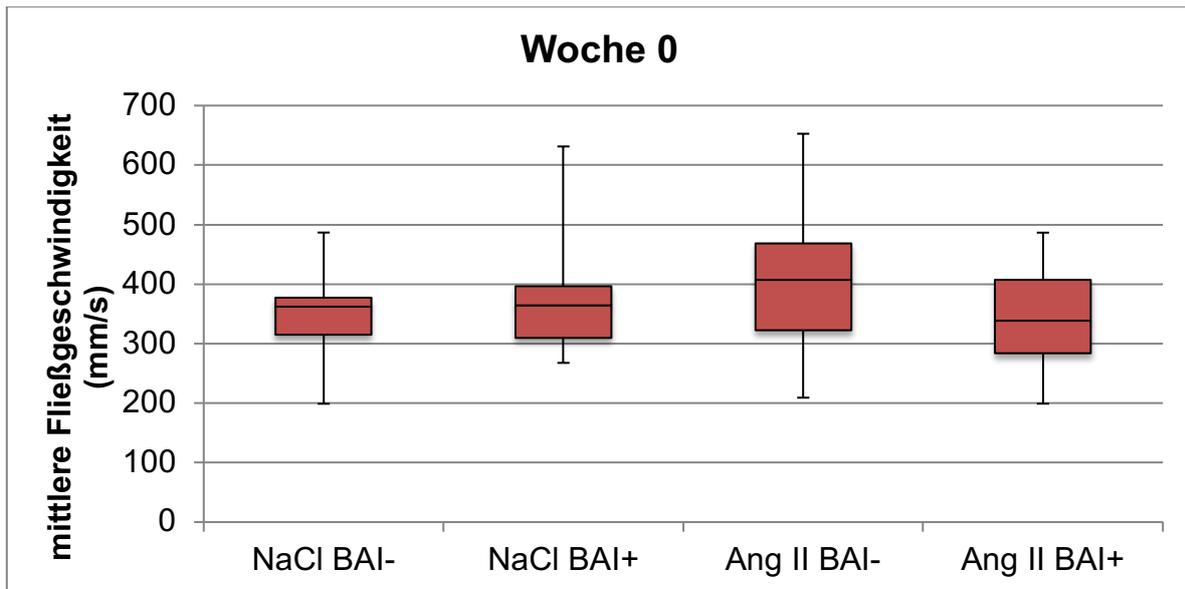
Grund eines technischen Defekts gingen die Werte der Kontrollgruppe NaCl BAI+ verloren (Abbildung 30).

Es kam in Woche 2 bei den Tieren in den ohne BAI behandelten Gruppen zu einer höheren mittleren Fließgeschwindigkeit. Bei den Tieren der Gruppe NaCl BAI- stieg der Wert auf  $386,13 \text{ mm/s} \pm 134,18 \text{ mm/s}$ , bei den Tieren der Gruppe Ang II BAI- auf  $392,5 \text{ mm/s} \pm 109,09 \text{ mm/s}$ . Die mit BAI behandelten Tiere der Gruppen NaCl BAI+ und Ang II BAI+ zeigten geringere mittlere Fließgeschwindigkeiten, die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI+ mit  $351,09 \text{ mm/s} \pm 57,53 \text{ mm/s}$  und der Verumgruppe Ang II BAI+ mit  $280,99 \text{ mm/s} \pm 100,63 \text{ mm/s}$  (Abbildung 31).

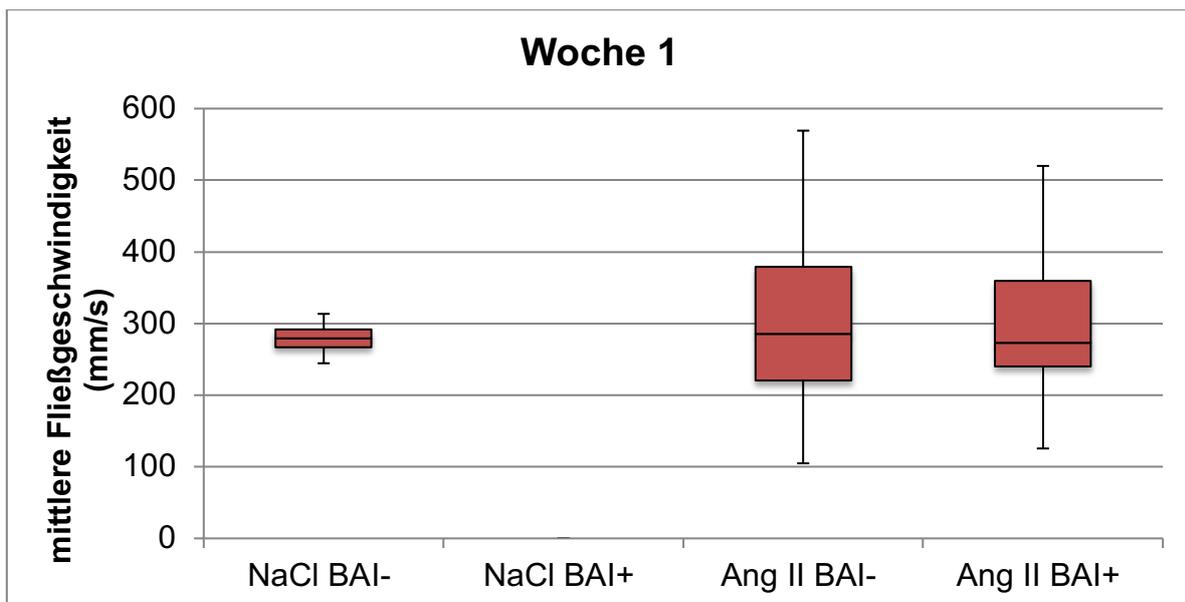
In Woche 3 hatten alle Tiergruppen geringere Werte im Verhältnis zu Woche 0, die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI- mit  $335,56 \text{ mm/s} \pm 70,84 \text{ mm/s}$ , die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI+ mit  $378,33 \text{ mm/s} \pm 117,41 \text{ mm/s}$ , die Tiere der Kontrollgruppe Ang II BAI- mit  $258,19 \text{ mm/s} \pm 72,1 \text{ mm/s}$  und der Verumgruppe Ang II BAI+ mit  $278,65 \text{ mm/s} \pm 98,2 \text{ mm/s}$  (Abbildung 32).

Mit  $419,35 \text{ mm/s} \pm 99,55 \text{ mm/s}$  bei den Tieren in Kontrollgruppe NaCl BAI- und  $459,83 \text{ mm/s} \pm 51,69 \text{ mm/s}$  bei den Tieren in Kontrollgruppe NaCl BAI+ ergab sich in Woche 4 eine Erhöhung der mittleren Fließgeschwindigkeit bei den nicht mit Ang II behandelten Tieren im Vergleich zu Woche 0. Ganz anders sah es bei den Tieren der mit Angiotensin behandelten Gruppen aus. Mit  $315,88 \text{ mm/s} \pm 115,99 \text{ mm/s}$  statt  $361,22 \text{ mm/s} \pm 104,42 \text{ mm/s}$  in Woche 0 bei den Tieren der Kontrollgruppe Ang II BAI- und  $293,44 \text{ mm/s} \pm 77,52 \text{ mm/s}$  anstelle von  $345,32 \text{ mm/s} \pm 87,58 \text{ mm/s}$  in der Verumgruppe Ang II BAI+ war eine deutliche Verringerung der mittleren Fließgeschwindigkeit bei den Tieren zu erkennen (Abbildung 33).

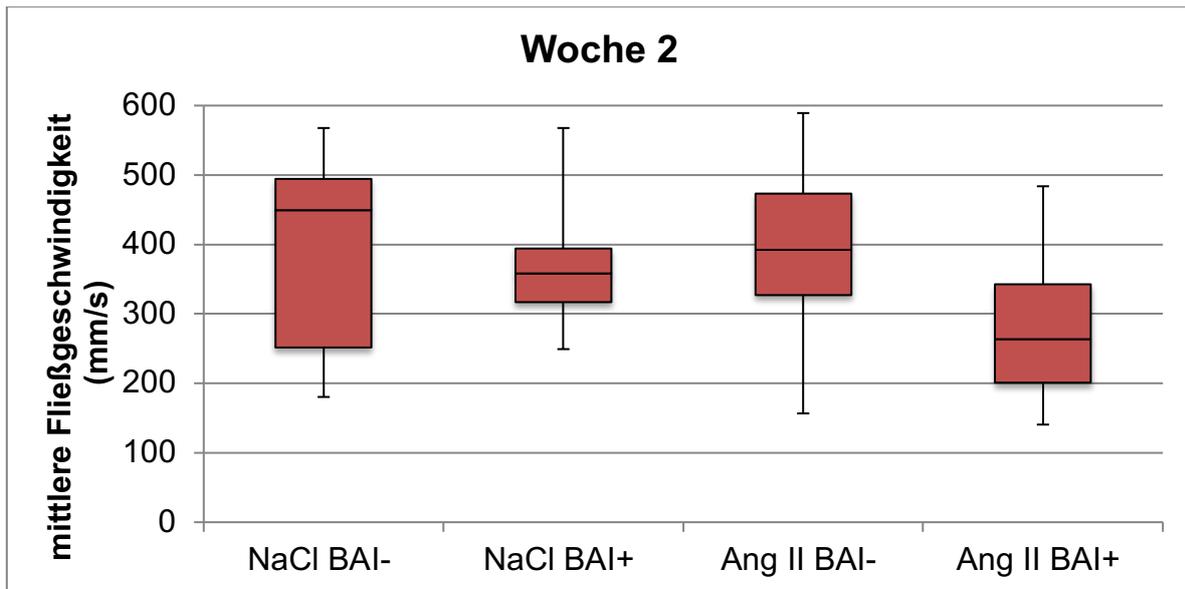
Da die Ausbildung von Aneurysmen in der Woche 4 abgeschlossen sein sollte, wurden die Werte in Woche 4 auf Signifikanz überprüft. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Gruppen mit und ohne Ang II Gabe. Der Unterschied zwischen den Tieren der Kontrollgruppe Ang II BAI- und der Verumgruppe Ang II BAI+ war nicht signifikant. Damit lässt sich keine signifikante Verminderung der mittleren Fließgeschwindigkeit bei Gabe von BAI erkennen. Es zeigte sich aber eine Verringerung der mittleren Fließgeschwindigkeit bei den mit Ang II behandelten Tieren. In Abbildung 29 bis 33 werden neben der Darstellung der mittleren Fließgeschwindigkeit in Form von Boxplots auch die Mittelwerte sowie den Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppen dargestellt. Eine Tabelle mit den genauen Werten ist im Anhang zu finden.



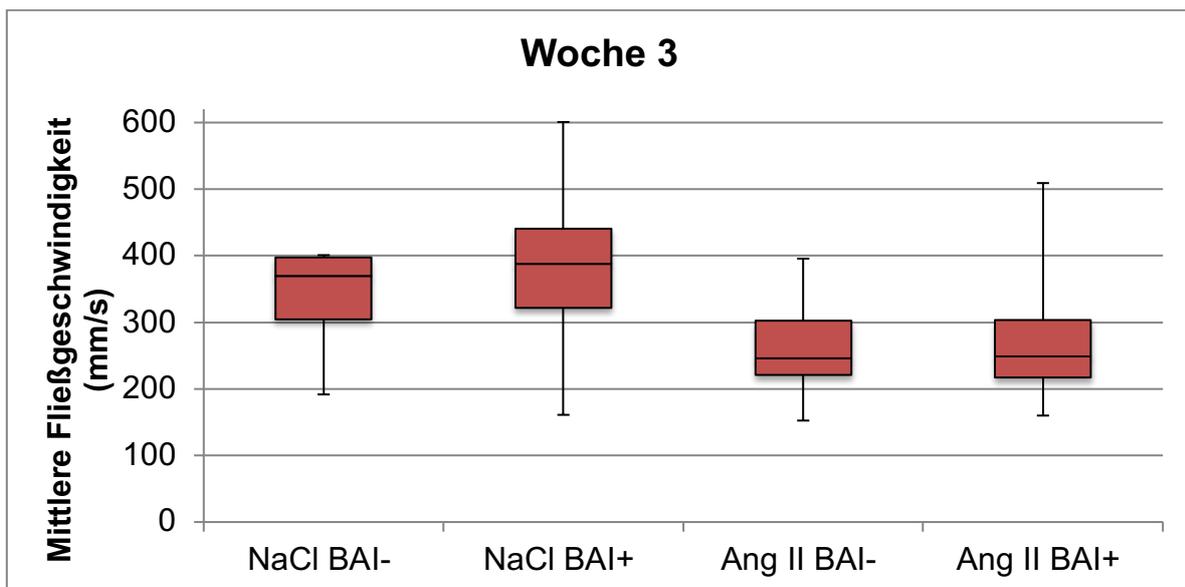
**Abbildung 29:** Mittlere Fließgeschwindigkeit (in mm/s) Woche 0 für die Kontrollgruppen (NaCl BAI-/+ je n = 10 und Ang II BAI- n = 30) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 30)



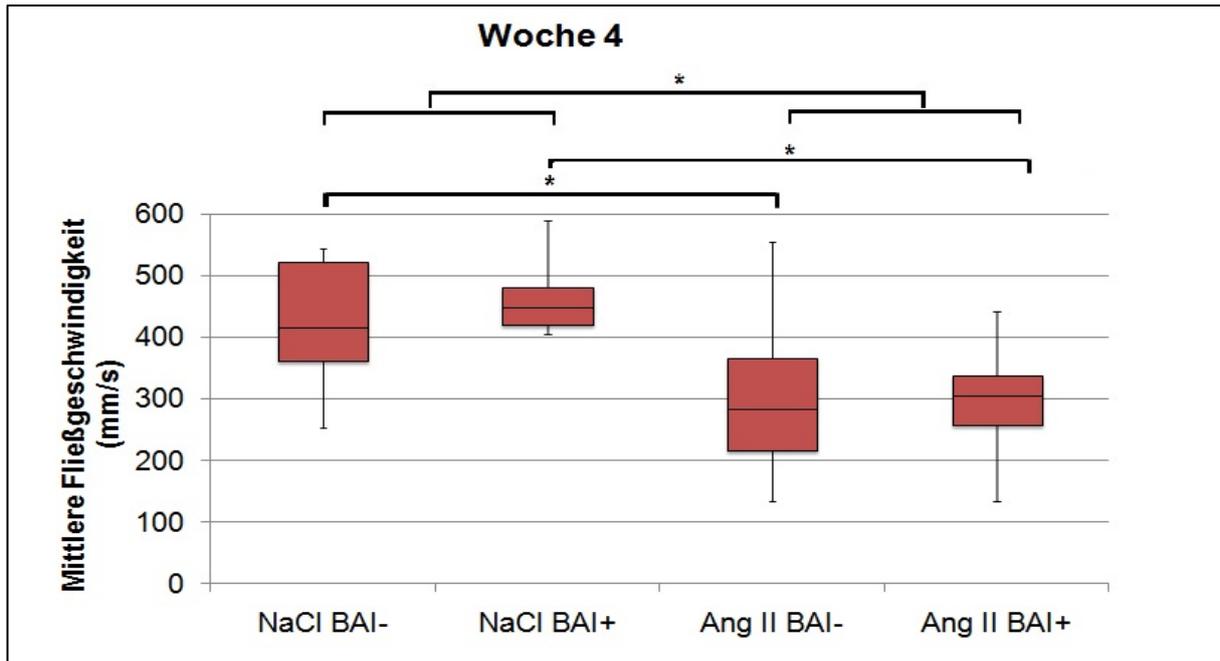
**Abbildung 30:** Mittlere Fließgeschwindigkeit (in mm/s) Woche 1 für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 4, NaCl BAI+ n = 0 und Ang II BAI- n = 25) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 23)



**Abbildung 31:** Mittlere Fließgeschwindigkeit (in mm/s) Woche 2 für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 9, NaCl BAI+ n = 10 und Ang II BAI- n = 12) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 14)



**Abbildung 32:** Mittlere Fließgeschwindigkeit (in mm/s) Woche 3 für die Kontrollgruppen (NaCl BAI-/+ je n = 10 und Ang II BAI- n = 16) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 18)



**Abbildung 33:** Mittlere Fließgeschwindigkeit (in mm/s) Woche 4 für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 8, NaCl BAI+ n = 10 und Ang II BAI- n = 21) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 16), \* P < 0,05 (T-Test)

Alle Tiergruppen zeigten ab der Implantation der Pumpe einen Anstieg der Werte. Bei den Kontrollgruppen ohne BAI-Gabe kam es nach dem ersten Abfall von Woche 0 zu Woche 1 zusätzlich zu einem Abfall der Werte in Woche 3. Dagegen wurde bei den Tieren der Gruppen mit BAI-Gabe nach dem anfänglichen Abfall eine kontinuierliche Entwicklung festgestellt. Außerdem war eine deutlich niedrigere mittlere Fließgeschwindigkeit bei den mit Ang II behandelten Gruppen zu erkennen.

#### 4.1.6 Systolischer Spitzenfluss

Um ein besseres Bild der Versteifung der Aorta und der Aneurysma-bedingten Abnahme des Durchflusses im lebenden Tier zu generieren, wurde sonographisch der systolische Spitzenfluss gemessen.

In Woche 0 wiesen die Tiere der Gruppen folgende Mittelwerte für den durchschnittlichen systolischen Spitzenfluss auf, die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI- 650,69 mm/s ± 148,05 mm/s, die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI+ 706,81 mm/s ± 185,79 mm/s, die Tiere der Kontrollgruppe Ang II BAI- 660,37 mm/s ± 183,33 mm/s und der Verumgruppe Ang II BAI+ 615,15 mm/s ± 153,29 mm/s (Abbildung 34).

In Woche 1 zeigten die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI- (500,97 mm/s ± 49,66 mm/s), der Kontrollgruppe Ang II BAI- (549,87 mm/s ± 193,53 mm/s) und der Verumgruppe Ang II BAI+ (542,51 mm/s ± 171,94 mm/s) einen niedrigeren systolischen Spitzenfluss. Auf Grund eines

technischen Defekts gingen die Werte der Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI+ verloren (Abbildung 35).

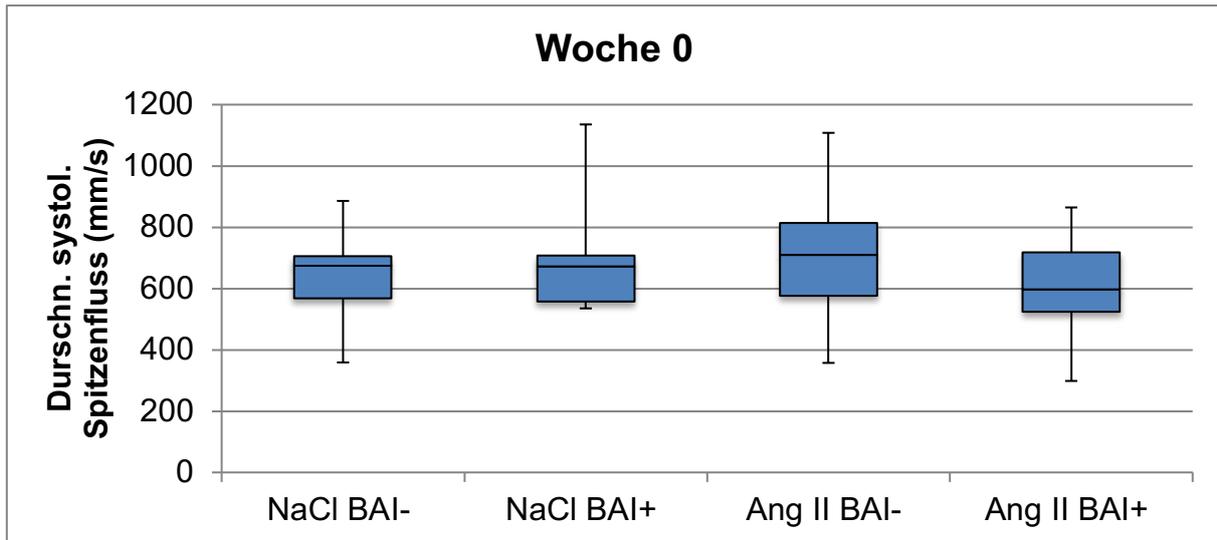
Wie in Abbildung 36 erkennbar, kam es in Woche 2 bei den nicht mit BAI behandelten Tieren zu einem höheren systolischen Spitzenfluss. Bei den Tieren der Gruppe NaCl BAI- stieg der Wert auf  $670,41 \text{ mm/s} \pm 217,26 \text{ mm/s}$ , bei den Tieren der Gruppe Ang II BAI- auf  $677,16 \text{ mm/s} \pm 212,3 \text{ mm/s}$ . Die mit BAI behandelten Tiere der Gruppen NaCl BAI+ und Ang II BAI+ wiesen einen niedrigeren systolischen Spitzenfluss auf: die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI+ mit  $627,79 \text{ mm/s} \pm 98,09 \text{ mm/s}$  und der Verumgruppe Ang II BAI+ mit  $516,91 \text{ mm/s} \pm 181,52 \text{ mm/s}$  (Abbildung 36).

In Woche 3 zeigten alle Tiergruppen geringere Werte im Verhältnis zu Woche 0, die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI- mit  $579,09 \text{ mm/s} \pm 111,39 \text{ mm/s}$ , die Tiere der Kontrollgruppe NaCl BAI+ mit  $681,08 \text{ mm/s} \pm 199,38 \text{ mm/s}$ , die Tiere der Kontrollgruppe Ang II BAI- mit  $504,31 \text{ mm/s} \pm 114,76 \text{ mm/s}$  und der Verumgruppe Ang II BAI+ mit  $522,94 \text{ mm/s} \pm 166 \text{ mm/s}$  (Abbildung 37).

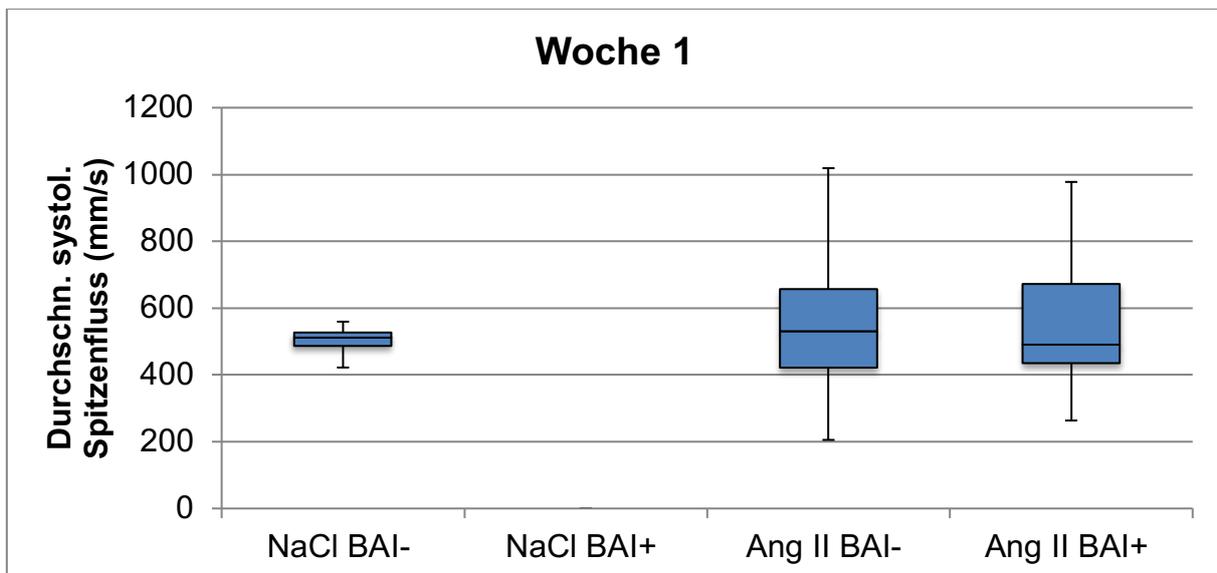
In Kontrollgruppe NaCl BAI- ( $700,16 \text{ mm/s} \pm 175,63 \text{ mm/s}$ ) und Kontrollgruppe NaCl BAI+ ( $770,55 \text{ mm/s} \pm 92,55 \text{ mm/s}$ ) ergab sich in Woche 4 ein höherer Wert des systolischen Spitzenflusses bei nicht mit Ang II behandelten Tieren im Vergleich zu Woche 0. Ganz anders sah es bei den mit Angiotensin behandelten Tieren aus, in Woche 0 war bei den Tieren der Kontrollgruppe Ang II BAI- ( $590,15 \text{ mm/s} \pm 214,59 \text{ mm/s}$  statt  $660,37 \text{ mm/s} \pm 183,33 \text{ mm/s}$ ) und in der Verumgruppe Ang II BAI+ ( $544,7 \text{ mm/s} \pm 134,05 \text{ mm/s}$  anstelle von  $615,15 \text{ mm/s} \pm 153,29 \text{ mm/s}$ ) ein niedrigerer systolischer Spitzenfluss zu erkennen (Abbildung 38).

Da man in dem verwendeten Mausmodell vom Abschluss der Ausbildung von Aneurysmen in der Woche 4 ausgeht, wurden die Werte in Woche 4 auf Signifikanz überprüft. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Gruppen mit und ohne Ang II-Gabe. Ebenso war eine Signifikanz zwischen den mit BAI behandelten Tieren der Versuchsgruppen NaCl BAI+ und Ang II BAI+ festzustellen. Dies zeigt eine signifikante Verminderung des systolischen Spitzenflusses durch die Gabe von Ang II. Es lässt sich aber keine signifikante Verminderung des systolischen Spitzenflusses bei Gabe von BAI erkennen.

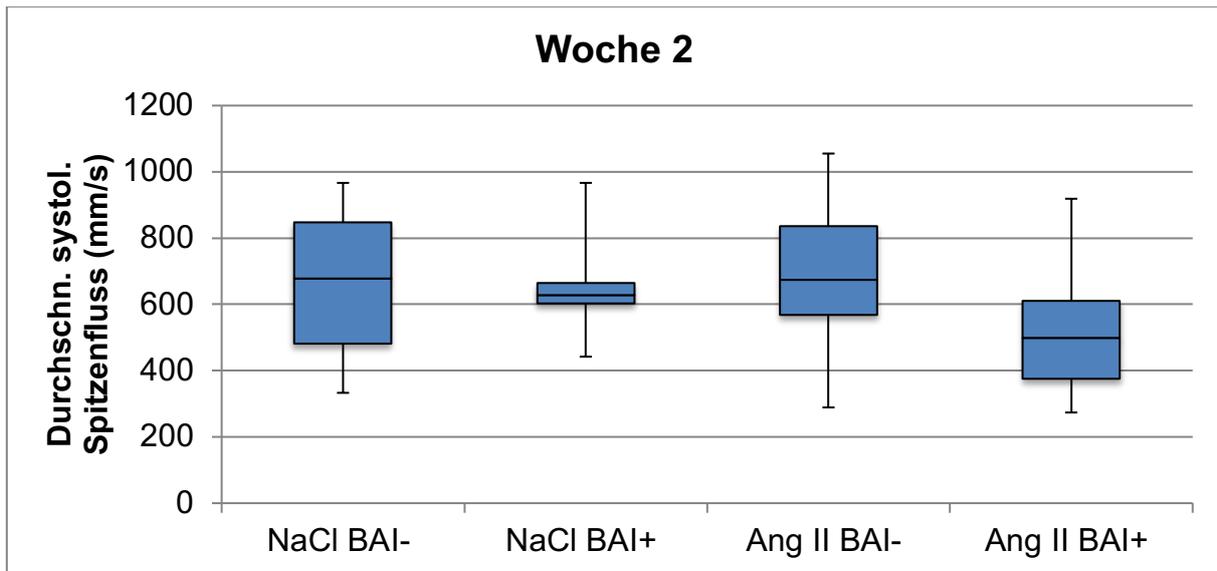
Abbildung 34 bis 38 zeigen neben der Darstellung des systolischen Spitzenflusses in Form von Boxplots auch die Mittelwerte sowie den Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Tiergruppen. Eine Tabelle mit den genauen Werten ist im Anhang zu finden.



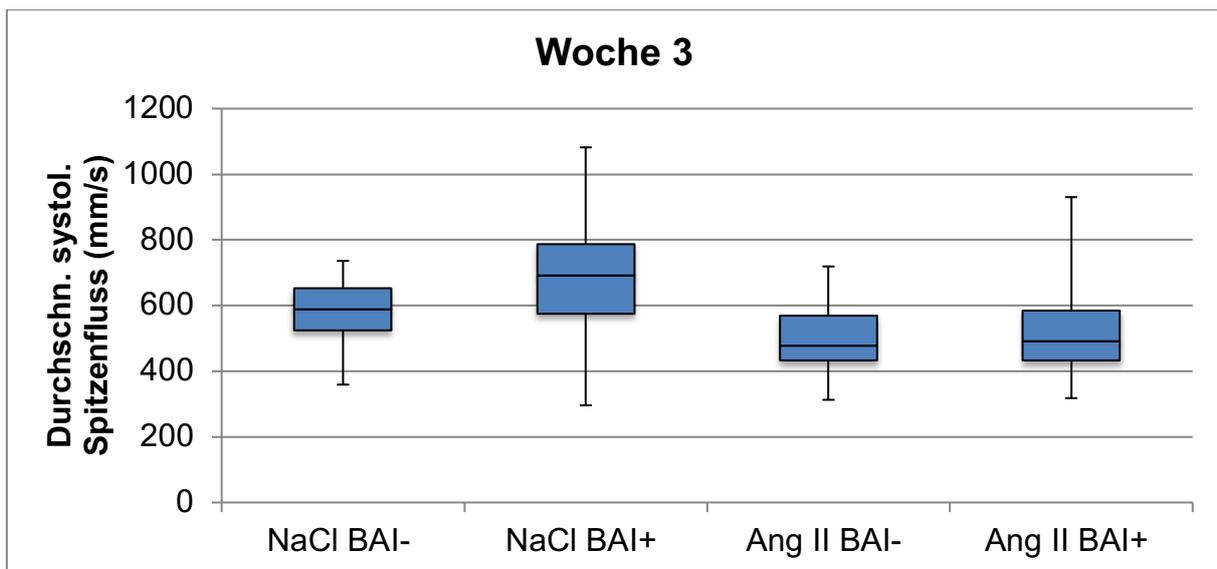
**Abbildung 34:** Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (PSV in mm/s) Woche 0 für die Kontrollgruppen (NaCl BAI-/+ je n = 10 und Ang II BAI- n = 30) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 30)



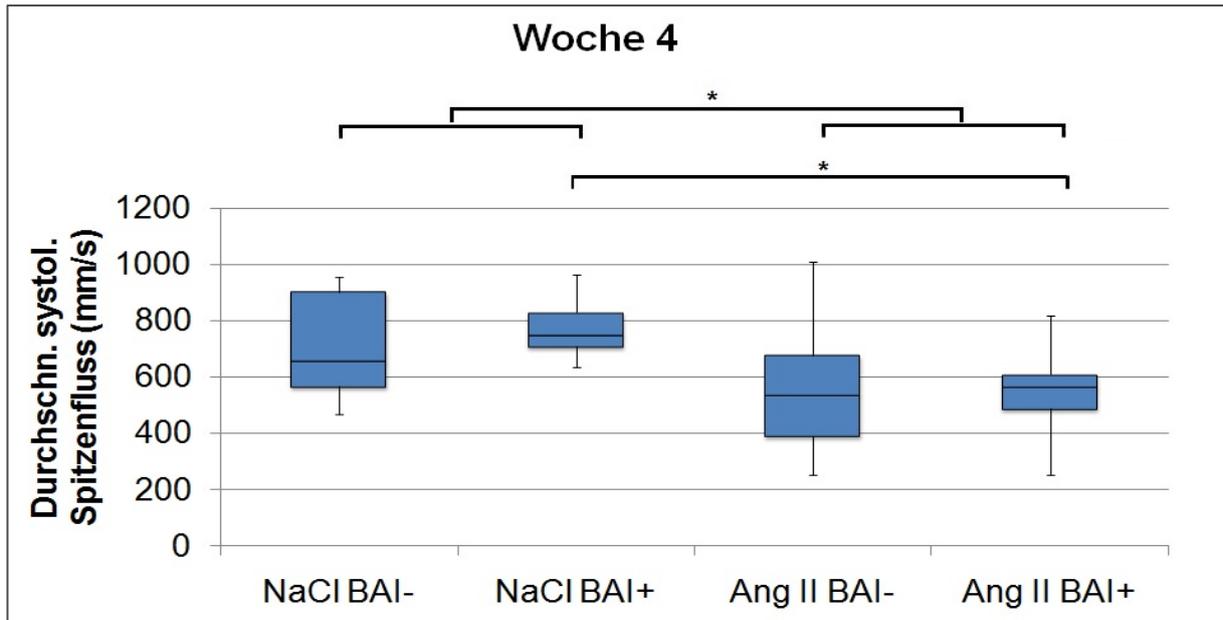
**Abbildung 35:** Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (PSV in mm/s) Woche 1 für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 4, NaCl BAI+ n = 0 und Ang II BAI- n = 25) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 23)



**Abbildung 36:** Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (PSV in mm/s) Woche 2 für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 10, NaCl BAI+ n = 8 und Ang II BAI- n = 14) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 14)



**Abbildung 37:** Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (PSV in mm/s) Woche 3 für die Kontrollgruppen (NaCl BAI-/+ je n = 10 und Ang II BAI- n = 15) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 18)

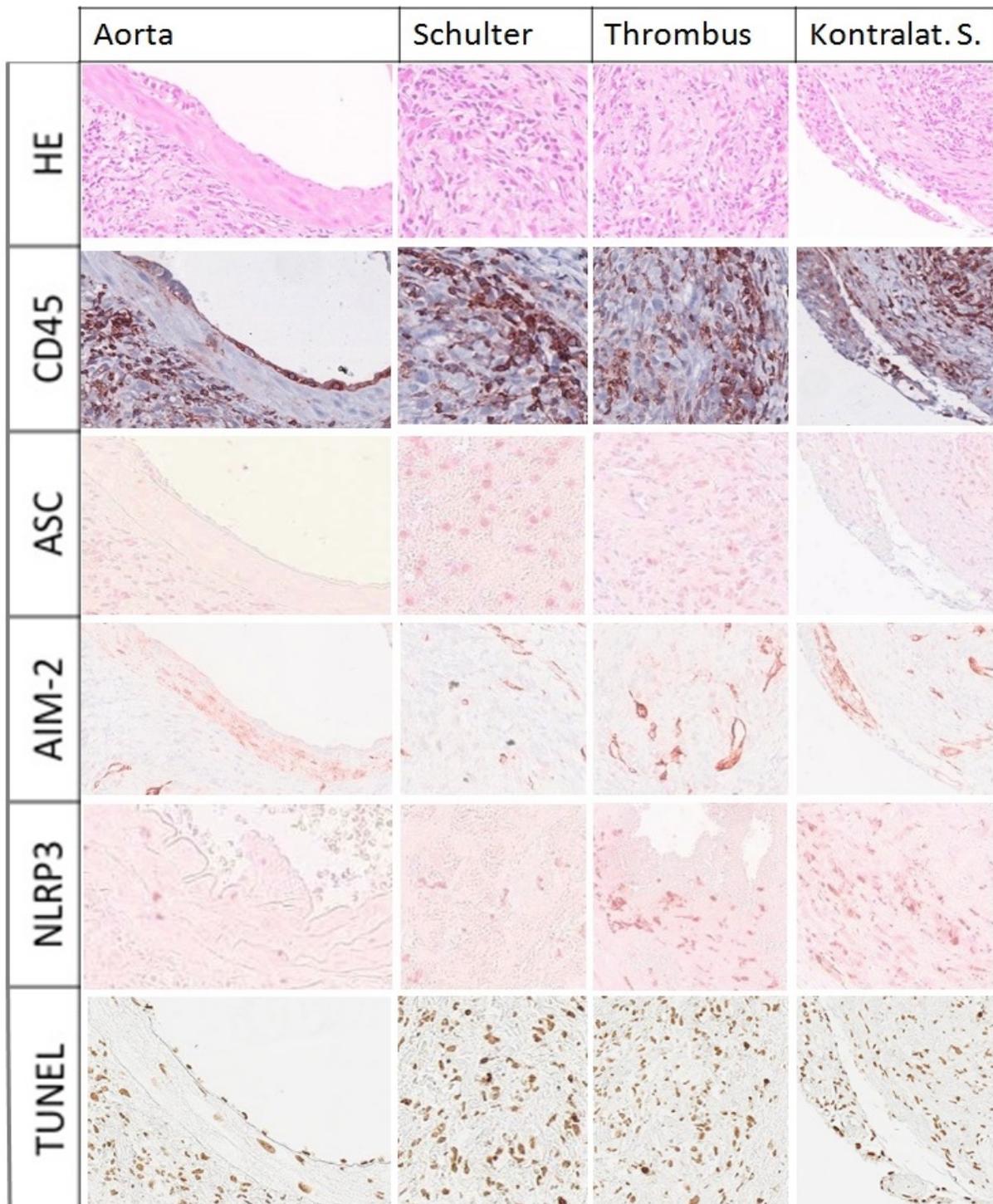


**Abbildung 38:** Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (PSV in mm/s) Woche 4 für die Kontrollgruppen (NaCl BAI- n = 9, NaCl BAI+ n = 10 und Ang II BAI- n = 21) und die Verumgruppe (Ang II BAI+ n = 17), \* P < 0,05 (T-Test)

Alle Tiere der Gruppen zeigten ab der Implantation der Pumpe einen Anstieg der Werte. Bei den Tieren der Kontrollgruppen ohne BAI-Gabe kam es nach dem ersten Abfall von Woche 0 zu 1 zusätzlich zu einem Abfall der Werte in Woche 3. Dagegen hatten die Tiere mit BAI-Gabe nach dem anfänglichen Rückgang der Werte eine kontinuierliche positive Entwicklung der Werte. Außerdem ist ein deutlich niedrigerer durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss bei den mit Ang II behandelten Tieren zu erkennen.

## 4.2 Ergebnisse zum Einfluss von Baicalein auf die Inflammation

Der Einfluss von BAI auf die Inflammation wurde durch die Expressionsanalyse von CD45, AIM2, NLRP3 und ASC in der Aneurysmawand sowie der TUNEL-Assay zur Darstellung von apoptotischen Zellen untersucht (Abbildung 39). Zu diesem Zweck wurden nur die mit Ang II behandelten Tiere verwendet.



**Abbildung 39:** Repräsentative Darstellung der immunologischen Markierung von CD45, ASC, AIM2, NLRP3 und des TUNEL-Assay nach dem Schema der Abbildung 20

### 4.2.1 CD45

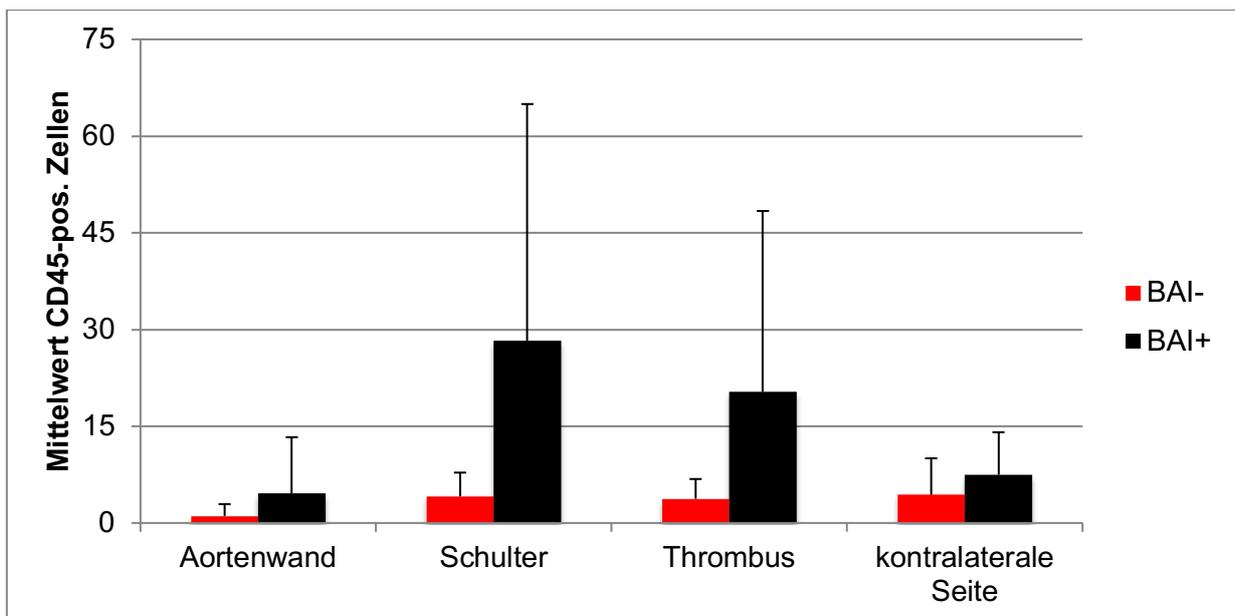
CD45 stellt als Oberflächenprotein einen Pan-Leukozytenmarker dar. Somit kann die Anzahl der Leukozyten im Gewebe dargestellt werden.

Bei der Auswertung wurden nur die Ergebnisse der Mäuse mit einem Aneurysma berücksichtigt. Dies schließt die vorzeitig verstorbenen Mäuse nicht mit ein.

Für die Kontrollgruppe Ang II BAI- ergaben sich folgende Mittelwerte der Auszählung: 1,08 CD45-positive Zellen wurden im Bereich der Aortenwand, 4,13 Zellen im Bereich der Schulter, 3,75 Zellen im Bereich des Thrombus und 4,38 Zellen im Bereich der kontralateralen Seite gefunden (Tabelle 4 und Abbildung 40).

Der Mittelwert der Anzahl der Leukozyten im analysierten Gewebe in der Verumgruppe Ang II BAI+ waren 4,60 Zellen im Bereich der Aortenwand, 28,25 Zellen im Bereich der Schulter, 20,33 Zellen im Bereich des Thrombus und 7,50 Zellen im Bereich der kontralateralen Seite (Tabelle 4 und Abbildung 40).

Die statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ergab für den Bereich Aortenwand einen nicht signifikanten Unterschied der Leukozyteninfiltration mit einem P-Wert von 0,96. Auch die Bereiche der Schulter mit einem P-Wert von 1, der Bereich des Thrombus mit einem P-Wert von 0,24 und der Bereich der kontralateralen Seite mit einem P-Wert von 0,83 wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Leukozyteninfiltration auf (Abbildung 40). Somit zeigten die Werte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe Ang II BAI- und der Verumgruppe Ang II BAI+ in den verschiedenen Bereichen des Aneurysmas. Die BAI-Gabe hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Leukozyteninfiltration.



**Abbildung 40:** Anzahl CD45-positiver Zellen (Gruppe Ang II BAI- n = 7, Gruppe Ang II BAI+ n = 5) exklusive der vorzeitig während des Experimentes verstorbenen Mäuse (Mittelwert ± Standardabweichung).

**Tabelle 4:** Mittelwert der Auszählung der Leukozyteninfiltration (CD45-positiven Zellen) exklusive der vorzeitig verstorbenen Mäuse  $\pm$  Standardabweichung

<b>Mittelwert der Auszählung der Leukozyteninfiltration (CD45-positive Zellen)</b>				
Gruppen	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
Ang II BAI- (n = 7)	1,08 $\pm$ 1,84	4,13 $\pm$ 3,69	3,75 $\pm$ 3,07	4,38 $\pm$ 5,66
Ang II BAI+ (n = 5)	4,60 $\pm$ 8,71	28,25 $\pm$ 36,72	20,33 $\pm$ 28,05	7,50 $\pm$ 6,58

## 4.2.2 Inflammasome

Die Beteiligung von NLRP3, AIM2 und ASC stellen einen wesentlichen Bestandteil der Aktivierung der Inflammationskaskade und der Aktivierung von IL1B dar (Latz et al. 2013, Usui et al. 2015). Anhand der Expressionsanalyse der Bestandteile ASC, AIM2 und NLRP3 sollte der Zusammenhang von Inflammation und Aneurysmenentstehung sowie der Einfluss von BAI auf die Inflammation genauer charakterisiert werden.

### 4.2.2.1 ASC

ASC bildet als Adapterprotein einen Hauptbestandteil von Inflammasome. Durch die histologische Untersuchung der ASC-Expression sollte die Inflammation genauer charakterisiert werden.

In der Auswertung der Ergebnisse wurden nur die Mäuse mit einem Aneurysma berücksichtigt, ohne die vorzeitig verstorbenen Mäuse.

Bei der Auszählung der durchschnittlichen ASC-positiven Zellen in den verschiedenen Bereichen des Aneurysmas fiel auf, dass im Bereich der Aortenwand mit 0,11 Zellen bei den Tieren der Kontrollgruppe Ang II BAI- und 0 Zellen bei den Tieren der Verumgruppe Ang II BAI+ sowie im Bereich des Thrombus mit 0,43 Zellen bei den Tieren der Kontrollgruppe Ang II BAI- und 0,60 Zellen bei den Tieren der Verumgruppe Ang II BAI+ nur eine geringe Anzahl an Zellen in diesen Bereichen vorhanden war (Tabelle 5 und Abbildung 41).

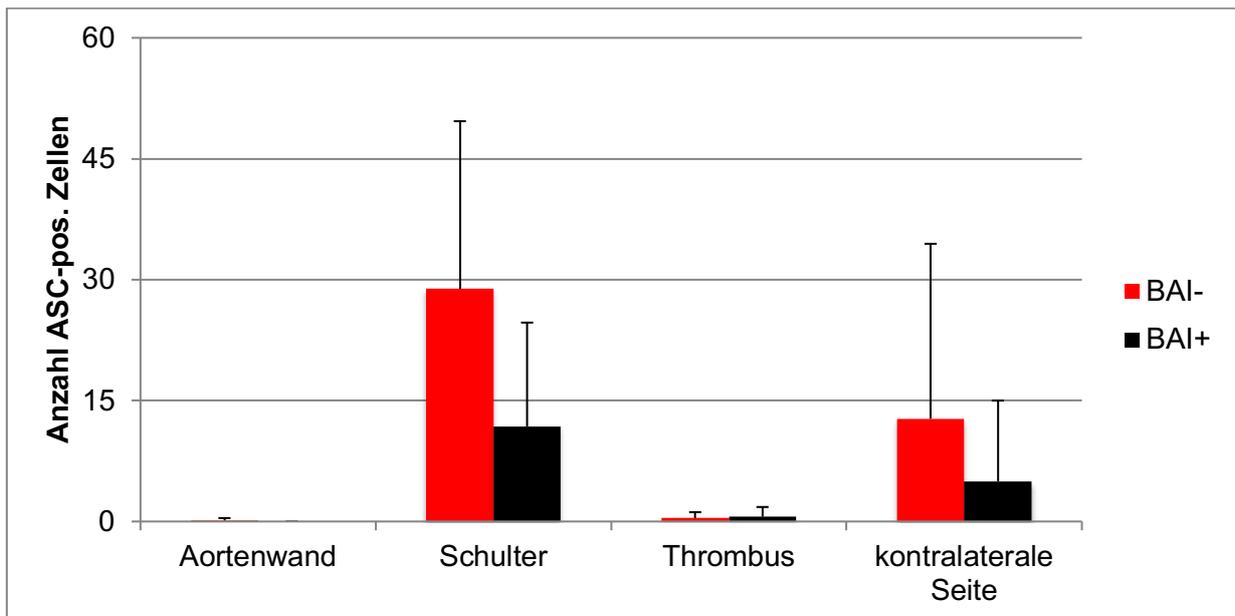
Im Bereich der Schulter fanden sich bei den Tieren der Gruppe Ang II BAI- 28,86 Zellen im Durchschnitt, während bei den Tieren der Gruppe Ang II BAI+ 11,80 Zellen zu finden waren (Tabelle 5 und Abbildung 41).

Die Auswertung des Bereiches der kontralateralen Seite zeigte 12,75 Zellen bei den Tieren der Gruppe Ang II BAI- und 5,00 Zellen bei den Tieren der Gruppe Ang II BAI+ (Tabelle 5 und Abbildung 41).

## Ergebnisse

Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe Ang II BAI- und Verumgruppe Ang II BAI+ in den verschiedenen Bereichen des Aneurysmas festgestellt. Im Bereich der Aortenwand lag der P-Wert bei 0,35, im Bereich der Schulter bei 0,14, im Bereich des Thrombus bei 0,81 und im Bereich der kontralateralen Seite bei 0,44 (Abbildung 41).

Es ergab sich somit kein signifikanter Unterschied in Folge der BAI-Gabe.



**Abbildung 41:** Anzahl ASC-positiver Zellen (Gruppe Ang II BAI- n = 7, Gruppe Ang II BAI+ n = 6) exklusive der vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

**Tabelle 5:** Mittelwert der Expression von ASC exklusive der vorzeitig verstorbenen Mäuse  $\pm$  Standardabweichung

Mittelwert der Expression von ASC (ASC-positive Zellen)				
Gruppen	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
Ang II BAI- (n = 7)	0,11 $\pm$ 0,31	28,86 $\pm$ 20,81	0,43 $\pm$ 0,73	12,75 $\pm$ 21,70
Ang II BAI+ (n = 6)	0	11,80 $\pm$ 12,88	0,60 $\pm$ 1,20	5,00 $\pm$ 10,00

### 4.2.2.2 AIM2

AIM2 ist als möglicher Proteinbestandteil des Inflammasoms mit hoher Wahrscheinlichkeit an der tumorgenetischen Reversion und der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt. Somit soll durch die histologische Untersuchung der Expression dieses Interferon-induzierbaren Proteins die Inflammation genauer charakterisiert werden.

## Ergebnisse

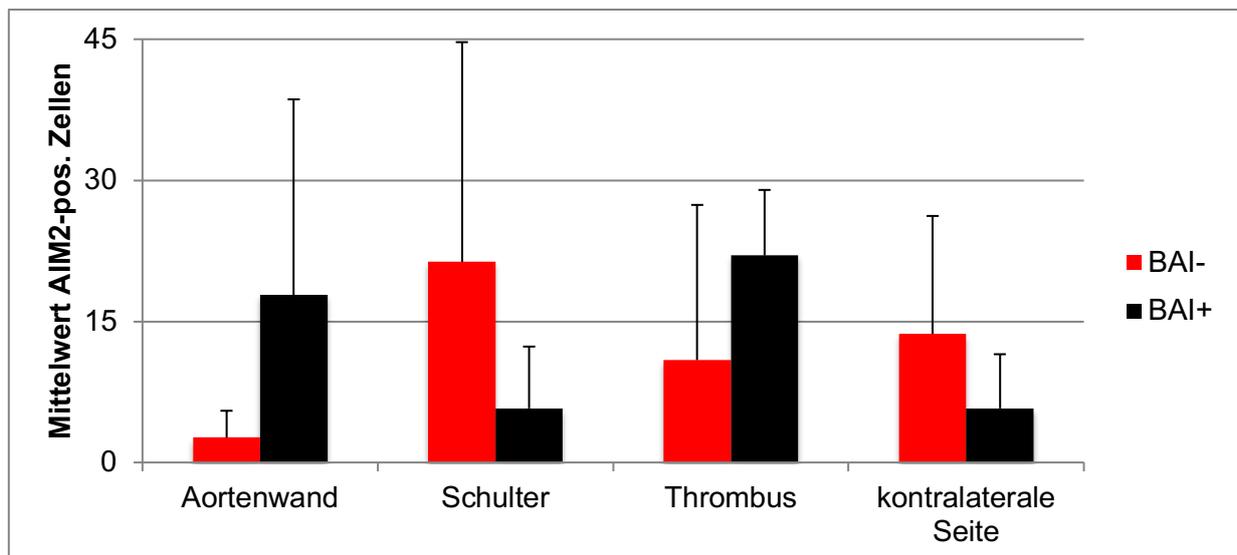
Bei Auswertung der Ergebnisse wurden nur die Ergebnisse der Mäuse mit einem Aneurysma berücksichtigt. Dies gilt ohne die vorzeitig verstorbenen Mäuse.

Im Bereich der Aortenwand fanden sich in der Kontrollgruppe Ang II BAI- im Mittel 2,65 Zellen, während in der Verumgruppe Ang II BAI+ 17,80 Zellen gezählt wurden.

In Kontrollgruppe Ang II BAI- wurden 21,33 Zellen und 5,75 Zellen in Verumgruppe Ang II BAI+ im Bereich der Schulter gezählt. Der Thrombus wies in Kontrollgruppe Ang II BAI- 10,89 Zellen auf. In der Verumgruppe Ang II BAI+ waren 22,00 Zellen im Mittel vorhanden.

Im Bereich der kontralateralen Seite ergab die Auswertung 13,67 Zellen in Kontrollgruppe Ang II BAI-. In Verumgruppe Ang II BAI+ wurden 5,75 Zellen gezählt (Tabelle 6 und Abbildung 42).

Mit P-Werten von 0,34 im Bereich der Aortenwand, 0,07 im Bereich der Schulter, 0,69 im Bereich des Thrombus und 0,23 im Bereich der kontralateralen Seite zeigte sich kein signifikanter Effekt von BAI auf die AIM2-Expression. (Abbildung 42)



**Abbildung 42:** Anzahl AIM2-positiver Zellen (Gruppe Ang II BAI- n = 7, Gruppe Ang II BAI+ n = 5) exklusive der vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse (Mittelwert ± Standardabweichung).

**Tabelle 6:** Mittelwert der Expression von AIM2 exklusive der vorzeitig verstorbenen Mäuse ± Standardabweichung

Mittelwert der Expression von AIM2 (AIM2-positive Zellen)				
Gruppen	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
Ang II BAI- (n = 7)	2,65 ± 2,85	21,33 ± 23,36	10,89 ± 16,50	13,67 ± 12,54
Ang II BAI+ (n = 5)	17,80 ± 20,81	5,75 ± 6,57	22,00 ± 6,98	5,75 ± 5,76

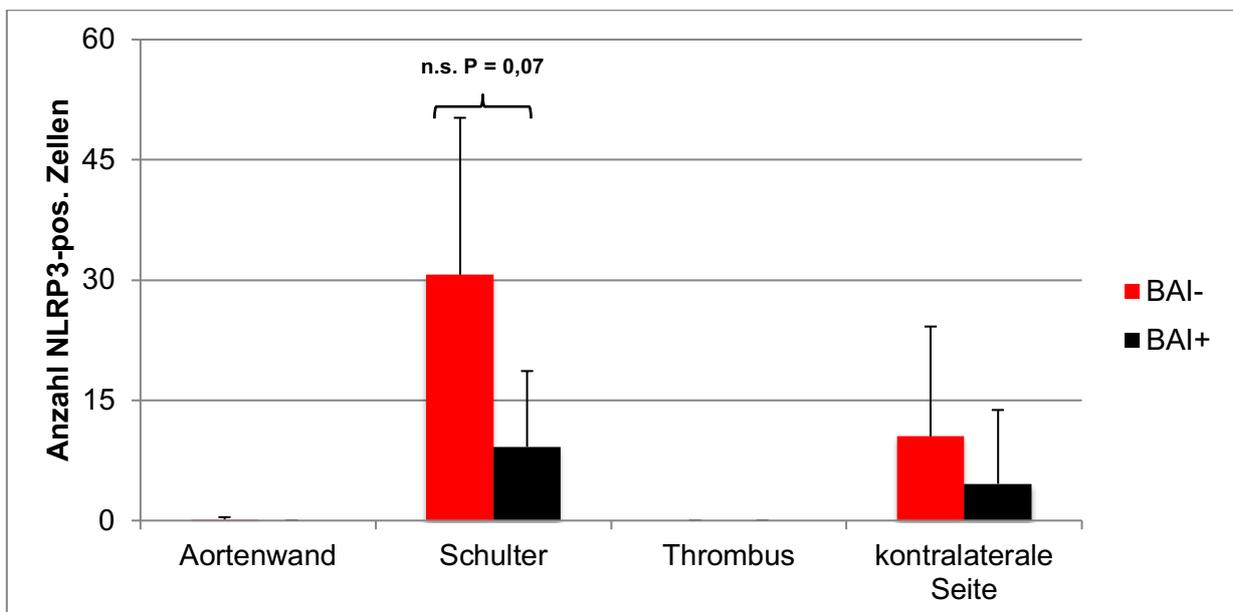
### 4.2.2.3 NLRP3

NLRP3 bildet als zentrales Gerüst einen Hauptbestandteil von Inflammasomen mit dessen Hilfe durch die histologische Untersuchung die Inflammation genauer charakterisiert werden sollte. Im Folgenden wurden nur die Ergebnisse der Mäuse mit einem Aneurysma berücksichtigt, ohne die vorzeitig verstorbenen Mäuse.

Für den Bereich der Aortenwand ergab sich eine sehr geringe NLRP3-Expression. In Kontrollgruppe Ang II BAI- waren es 0,11 Zellen, während in der Verumgruppe Ang II BAI+ keine Zellen gezählt wurden. Im Bereich der Schulter waren in Kontrollgruppe Ang II BAI- im Mittel 30,67 Zellen zu finden. Im Vergleich zeigte die Verumgruppe Ang II BAI+ nur einen Mittelwert von 9,20. Im Bereich des Thrombus waren keine Zellen erkennbar. Mit 10,50 Zellen in Kontrollgruppe Ang II BAI- und 4,60 Zellen in der Verumgruppe Ang II BAI+ präsentierte sich der Bereich der kontralateralen Seite (Tabelle 7 und Abbildung 43).

Es war in den verschiedenen Bereichen des Aneurysmas kein signifikanter Effekt durch die Gabe von BAI auf die Expression von NLRP3 zu beobachten. Aber im Bereich der Schulter zeichnete sich eine Tendenz ab (P-Wert 0,07).

Im Bereich der Aortenwand lagen der P-Wert bei 0,35, während im Bereich der Schulter ein P-Wert von 0,07 ermittelt werden konnte. Auf Grund des nicht Vorhandenseins von NLRP3-exprimierenden Zellen konnte für den Bereich Thrombus keine Signifikanz angegeben werden. Für die kontralaterale Seite ergab sich ein P-Wert von 0,46 (Abbildung 43).



**Abbildung 43:** Anzahl NLRP3-positiver Zellen (Gruppe Ang II BAI- n = 7, Gruppe Ang II BAI+ n = 6) exklusive der vorzeitig verstorbenen Mäuse (Mittelwert ± Standardabweichung).

**Tabelle 7:** Mittelwert der Expression von NLRP3 exklusive der vorzeitig verstorbenen Mäuse  $\pm$  Standardabweichung

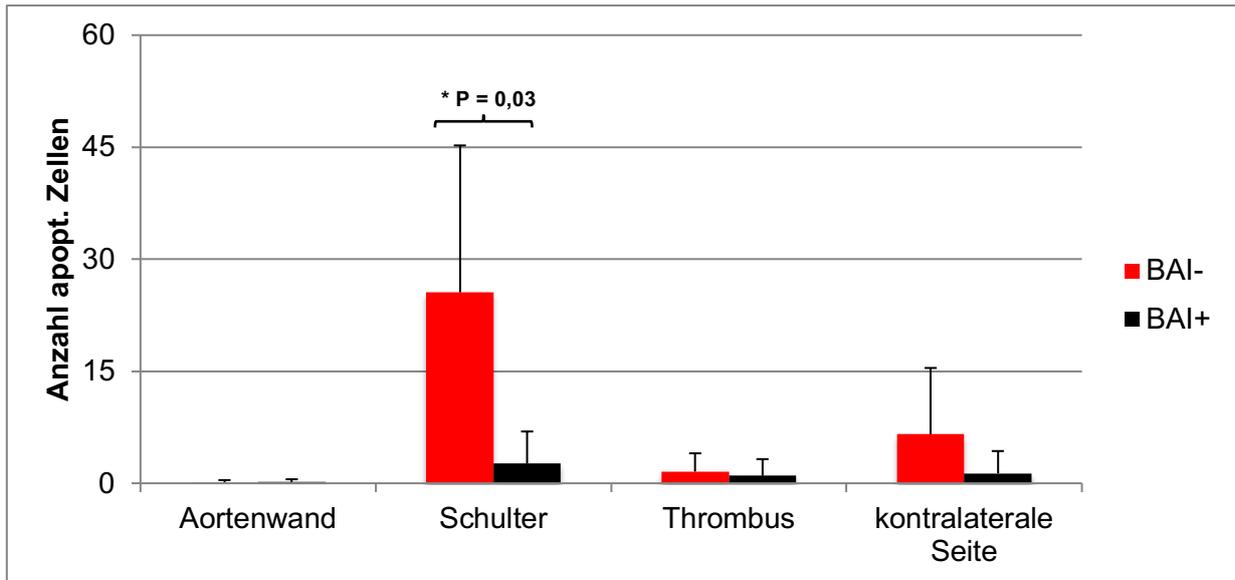
<b>Mittelwert der Expression von NLRP3 (NLRP3-positive Zellen)</b>				
Gruppen	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
Ang II BAI- (n = 7)	0,11 $\pm$ 0,31	30,67 $\pm$ 19,58	0	10,50 $\pm$ 13,71
Ang II BAI+ (n = 6)	0	9,20 $\pm$ 9,45	0	4,60 $\pm$ 9,20

### 4.2.3 TUNEL-Assay

TUNEL ist eine Methode zur Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen. Im Speziellen sollte damit der Abbauprozess von Zellen im Aneurysma genauer charakterisiert werden.

In die Auswertung der Ergebnisse flossen nur die Ergebnisse der Mäuse mit einem Aneurysma ein, dies beinhaltet nicht die vorzeitig verstorbenen Mäuse mit Aneurysmen. Für den Bereich Aortenwand waren, mit einem Mittelwert von 0,11 in Kontrollgruppe Ang II BAI- und 0,17 Zellen in der Verumgruppe Ang II BAI+, nur eine geringe Anzahl von Zellen bei der Auswertung erkennbar. Auch im Bereich des Thrombus zeigte sich, mit 1,57 Zellen in Kontrollgruppe Ang II BAI- und 1,00 Zellen in Verumgruppe Ang II BAI+, eine niedrige Rate gefärbter Zellen. Mit 25,57 Zellen in Kontrollgruppe Ang II BAI- und 2,67 Zellen in Verumgruppe Ang II BAI+ im Bereich der Schulter waren hier deutlich mehr Zellen zu erkennen. Für den Bereich der kontralateralen Seite ergab sich für Kontrollgruppe Ang II BAI- ein Mittelwert von 6,56 Zellen, während in der Verumgruppe Ang II BAI+ nur 1,33 Zellen zu finden waren (Tabelle 8 und Abbildung 44).

Mit einem P-Wert von 0,03 zeigte sich im Bereich der Schulter ein signifikanter Effekt des BAIs auf die Apoptose. Kein signifikanter Effekt der BAI-Gabe war hingegen mit einem P-Wert von 0,79 im Bereich der Aortenwand, 0,69 im Bereich des Thrombus und 0,16 im Bereich der kontralateralen Seite zu beobachten (Abbildung 44).



**Abbildung 44:** Anzahl apoptotischer Zellen (Gruppe Ang II BAI- n = 7, Gruppe Ang II BAI+ n = 6) exklusive der vorzeitig verstorbenen Mäuse (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

**Tabelle 8:** Mittelwert der apoptotischen Zellen  $\pm$  Standardabweichung

Mittelwert der apoptotischen Zellen				
Gruppen	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
Ang II BAI- (n = 7)	0,11 $\pm$ 0,31	25,57 $\pm$ 19,66	1,57 $\pm$ 2,44	6,56 $\pm$ 8,88
Ang II BAI+ (n = 6)	0,17 $\pm$ 0,37	2,67 $\pm$ 4,27	1,00 $\pm$ 2,24	1,33 $\pm$ 2,98

### 4.3 Altersverteilung der Mäuse

Die Korrelation zwischen dem Alter der Mäuse und der Inzidenz von Aneurysmen wurde auf Grund der Möglichkeit einer Verfälschung der Ergebnisse durch das Alter der Versuchstiere untersucht.

#### 4.3.1 Altersverteilung gesamt

Bei der Verteilung des Alters der Mäuse gab es eine sehr weite Streuung von 20 bis 86 Wochen. Es gab je eine Maus im Alter von 20, 33, 35, 37, 41, 42, 44, 46, 72, 74 und 86 Wochen. Zwanzig Tiere des Gesamtkollektivs waren 24 Wochen alt, danach folgten fünfzehn Tiere im Alter von 31 Wochen, je neun Tiere mit 29 und 34 Wochen, vier Tiere mit 27 Wochen und mit je drei Tieren die Wochen 28, 32, 47, und 76 (Tabelle 9). Dabei zeigt sich eine breite Fächerung des Versuchstieralters auf Grundlage der dem Tierschutz entsprechenden Nutzung aller männlicher Mäuse. Eine Normalverteilung des Alters der Versuchstiere war nicht gegeben.

**Tabelle 9:** Verteilung des Alters der Mäuse in Wochen Gesamt  $\pm$  Standardabweichung

Alter (Wochen) Gesamt																				
Wo	20	24	27	28	29	31	32	33	34	35	37	41	42	44	46	47	72	74	76	86
$\Sigma$	1	20	4	3	9	15	3	1	9	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1
Summe aller Mäuse	80																			
Durchschnitt Alter	33,78 $\pm$ 13,59																			

### 4.3.2 Altersverteilung Versuchsgruppen

In Kontrollgruppe NaCl BAI- verteilte sich das Alter der zehn Mäuse zwischen 24 und 47 Wochen. Fünf Mäuse waren 24 Wochen, je eine Maus 32 bzw. 33 Wochen und drei Mäuse 47 Wochen alt. Dies ergab ein durchschnittliches Alter von 32,60 Wochen  $\pm$  9,96 Standardabweichung (Tabelle 10). Die Werte der Kontrollgruppe NaCl BAI- sind nicht normalverteilt.

**Tabelle 10:** Altersverteilung in Wochen der Gruppe NaCl BAI-  $\pm$  Standardabweichung

Alter (Wochen) Gruppe NaCl BAI-								
Alter (Wochen)	24		32		33		47	
Summe ( $\Sigma$ )	5		1		1		3	
Summe aller Mäuse	10							
Durchschnitt Alter	32,60 $\pm$ 9,96							

Bei Kontrollgruppe NaCl BAI+ waren alle zehn Versuchstiere 24 Wochen alt (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Altersverteilung in Wochen der Gruppe NaCl BAI+  $\pm$  Standardabweichung

Alter (Wochen) Gruppe NaCl BAI+	
Alter (Wochen)	24
Summe ( $\Sigma$ )	10
Summe aller Mäuse:	10
Durchschnitt Alter:	24,00

Die Verteilung des Alters der 30 Tiere in Kontrollgruppe Ang II BAI- erstreckt sich von 24 bis 37 Wochen. Je eine Maus war 28, 35 und 37 Wochen alt. Je zwei Mäuse hatten ein Alter von 24, 27, 29 und 32 Wochen. Mit zehn Tieren hatte die größte Gruppe ein Alter von 31 Wochen, kurz gefolgt von neun 34 Wochen alten Mäusen. Der Altersdurchschnitt lag für die 30 Tiere

## Ergebnisse

der Gruppe Ang II BAI- bei 31,33 Wochen  $\pm$  3,05 Standardabweichung (Tabelle 12). Die Normalverteilung ist bei der Kontrollgruppe Ang II BAI- nicht gegeben.

**Tabelle 12:** Altersverteilung in Wochen der Gruppe Ang II BAI-  $\pm$  Standardabweichung

<b>Alter (Wochen) Gruppe Ang II BAI-</b>									
Alter (Wochen)	24	27	28	29	31	32	34	35	37
Summe ( $\Sigma$ )	2	2	1	2	10	2	9	1	1
Summe aller Mäuse	30								
Durchschnitt Alter	31,33 $\pm$ 3,05								

Die 30 Mäuse in Verumgruppe Ang II BAI+ wiesen eine Altersverteilung von 20 bis 86 Wochen auf. Je ein Tier war 20, 41, 42, 44, 46, 72, 74 und 86 Wochen alt. Mit der Alterskategorie 27 und 28 Wochen waren je zwei Tiere vertreten. Drei Tiere waren im Alter von 24 bzw. 76 Wochen. Im Alter von 31 Wochen waren fünf Tiere und sieben Tiere waren 29 Wochen alt. Dies ergab einen Altersdurchschnitt von 39,77 Wochen  $\pm$  19,40 Standardabweichung (Tabelle 13). Die Werte der Verumgruppe Ang II BAI+ sind nicht normalverteilt.

**Tabelle 13:** Altersverteilung in Wochen der Gruppe Ang II BAI+  $\pm$  Standardabweichung

<b>Alter (Wochen) Gruppe Ang II BAI+</b>														
Alter (Wochen)	20	24	27	28	29	31	41	42	44	46	72	74	76	86
Summe ( $\Sigma$ )	1	3	2	2	7	5	1	1	1	1	1	1	3	1
Summe aller Mäuse	30													
Durchschnitt Alter	39,77 $\pm$ 19,40													

Im Vergleich der Altersverteilung in Gruppen ergaben sich folgende durchschnittliche Alterswerte, für Kontrollgruppe NaCl BAI- waren es 32,60 Wochen  $\pm$  9,96 Standardabweichung, für Kontrollgruppe NaCl BAI+ waren es 24 Wochen, für Kontrollgruppe Ang II BAI- waren es 31,33 Wochen  $\pm$  3,05 Standardabweichung und die Verumgruppe Ang II BAI+ hatte ein durchschnittliches Alter von 39,77 Wochen  $\pm$  19,40 Standardabweichung. Der Altersdurchschnitt aller Versuchstiere lag bei 33,78 Wochen  $\pm$  13,59 Standardabweichung (Tabelle 14).

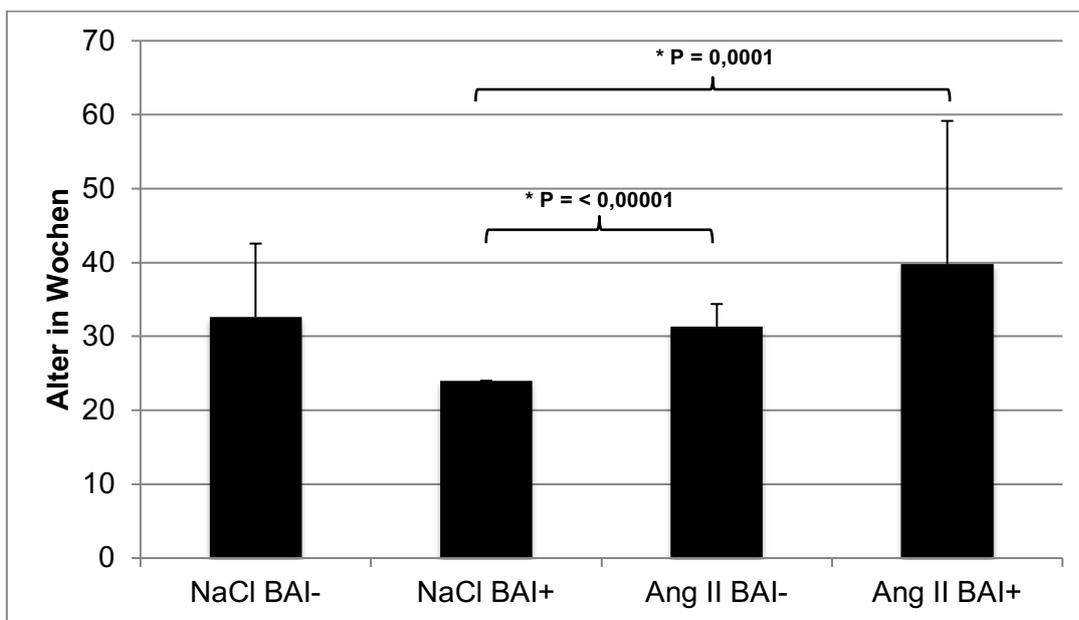
Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Altersdurchschnitt zwischen den Kontrollgruppen NaCl BAI- und NaCl BAI+, die NaCl statt Ang II erhielten. Auch zwischen den mit Angiotensin behandelten Gruppen, Kontrollgruppe Ang II BAI- und Verumgruppe Ang II BAI+ bestand mit einem P-Wert von 0,66 kein signifikanter Unterschied. Zwischen den Gruppen ohne BAI-Gabe, das heißt Kontrollgruppe NaCl BAI- und Ang II BAI-, mit einem

## Ergebnisse

P-Wert von 0,58 gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Ebenso ist mit einem P-Wert von 0,44 kein Altersunterschied zwischen Kontrollgruppe NaCl BAI- und Verumgruppe Ang II BAI+ zu erkennen. Zwischen der mit BAI behandelten Kontrollgruppe NaCl BAI+ und der Verumgruppe Ang II BAI+ bestand mit einem P-Wert von 0,0001 ein signifikanter Altersunterschied. Dies gilt auch für den signifikanten Altersunterschied zwischen Kontrollgruppe NaCl BAI+ und Ang II BAI- mit einem P-Wert von kleiner 0,00001 (Abbildung 45).

**Tabelle 14:** Durchschnittliches Alter in Wochen  $\pm$  Standardabweichung

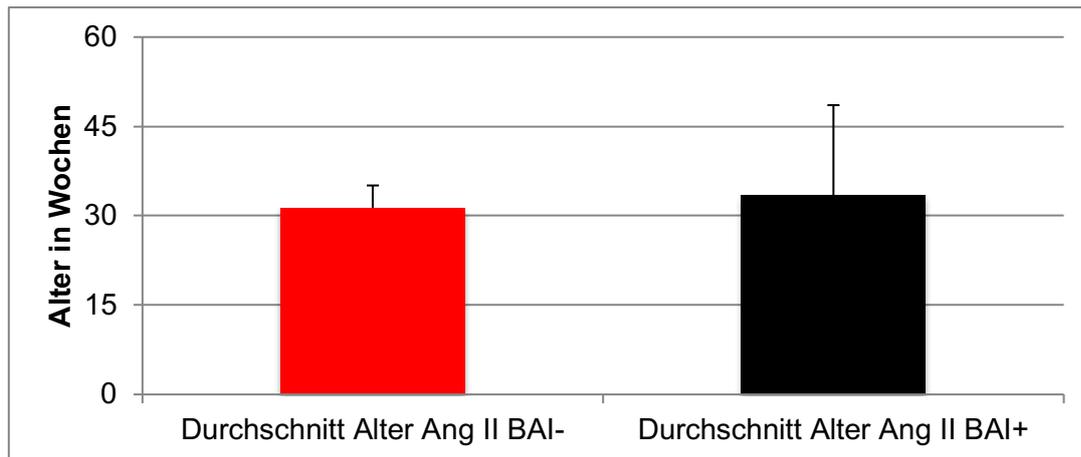
Durchschnittliches Alter der Mäuse (Wochen)					
Gruppe	NaCl BAI-	NaCl BAI+	Ang II BAI-	Ang II BAI+	Mäuse Gesamt
$\bar{x}$ Alter (Wo)	32,60 $\pm$ 9,96	24,00	31,33 $\pm$ 3,05	39,77 $\pm$ 19,40	33,78 $\pm$ 13,59



**Abbildung 45:** Alter der Versuchstiere (Gruppe NaCl BAI- und NaCl BAI+ je n = 10, Gruppe Ang II BAI- und Ang II BAI+ je n = 30, Gesamt n = 80) in Wochen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

### 4.3.3 Aneurysmaspezifische Altersverteilung

Die Tiere der Gruppen NaCl BAI- und NaCl BAI+ bildeten keine AAAs aus. Mit 31,33 Wochen  $\pm$  3,75 Standardabweichung in der Gruppe Ang II BAI- und 33,40 Wochen  $\pm$  15,17 Standardabweichung in Gruppe Ang II BAI+ zeigten die Mäuse mit Aneurysma keinen signifikanten altersspezifischen Effekt (Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Die durchschnittliche Aneurysmaspezifische Altersverteilung der Gruppen Ang II BAI- (n = 12) und Ang II BAI+ (n = 10). Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

### 5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit war es, im Tiermodell den Effekt des antioxidativen Wirkstoffes Baicalein auf die Entstehung von Aortenaneurysmen, die Infiltration von Entzündungszellen und die Fließgeschwindigkeiten zu untersuchen. Der Einfluss einzelner inflammatorischer Signalwege bei der Entstehung des Aortenaneurysmas durch die Verteilung der Inflammasome AIM2 und NLRP3 sowie des Adaptermoleküls ASC und auch den Anteil an apoptotischen Zellen mittels einer immunhistochemischen Färbung sollte damit besser verstanden werden.

#### 5.1. Tiermodell und Methodik

Um einen Vergleich zwischen dem in der Maus entstehenden AA und dem AA des Menschen zu gewährleisten, wurde das Tiermodell verwendet, welches die Pathogenese eines abdominalen AAs im Menschen und dessen klinische Charakteristika wie Mediadegeneration mit Zerstörung der extrazellulären Matrix, Arteriosklerose, Dilatation des Diameters, Inflammation, intraluminale Thromben und Aneurysmen am besten nachbildet (Carrell et al. 1999, Daugherty et al. 2000, Saraff et al. 2003, Daugherty und Cassis 2004a). Einen Unterschied stellt die Lokalisation der Aneurysmen dar, die im humanen Bereich infrarenal, während die Aneurysmen in der Maus suprarenal zu finden sind (Daugherty und Cassis 2004b). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls festgestellt werden. Bei der Sektion der vorzeitig verstorbenen Mäuse zeigte sich zusätzlich die in der Literatur beschriebene Lokalisation der rupturierten Aneurysmen im Bereich des Aortenbogens (Trachet et al. 2016). Auch wird ein unterschiedliches Fließverhalten und eine unterschiedliche Elastizitätsveränderung des Gewebes zu Grunde gelegt (Bruemmer et al. 2011). Eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse sollte möglich sein, da die pathogenetischen Vorgänge im Aneurysma durch das Mausmodell trotz der voneinander differierenden Lokalisation am besten dargestellt werden können. Im Zusammenhang mit dem sich bildenden Aneurysma entstanden die zu erwartenden Veränderungen des Gefäßes wie Mediadegeneration mit Zerstörung der extrazellulären Matrix, Arteriosklerose, Dilatation des Diameters, Inflammation, intraluminale Thromben und Aneurysmen, was sich auch in der histologischen Analyse der Aneurysmen bestätigte.

Die verwendete Dosis von 1500 ng/kg/min Ang II wurde auf Grundlage eigener Vorversuchsergebnisse und der Erkenntnisse in den Studien von Daugherty und Cassis

(2004b) sowie Daugherty et al. (2011) gewählt. Zum Zweck der Dosisermittlung wurden 12 Mäuse mit 1000 ng/kg/min Ang II behandelt. Es zeigte sich eine niedrigere Zahl von Aneurysmen. Infolge dieser Erkenntnis wurde die Dosis nach Literaturrecherche auf 1500 ng/kg/min erhöht. Die Ergebnisse von Wang et al. (2016), die während des Versuches mit einer Dosis von 1000 ng/kg/min Ang II veröffentlicht wurden, zeigen bei nicht mit BAI behandelten Mäusen eine Aneurysmaspezifische Inzidenz von 88 %, die womöglich auf das verwendete blutdrucksteigernde Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) zurückzuführen ist (Kollerup Madsen et al. 2018). In den hier beschriebenen Versuchen war nur eine Inzidenz von 40 Prozent in der nicht mit BAI behandelten Kontrollgruppe Ang II BAI- festzustellen. Auch war die von Wang et al. (2016) beschriebene starke Reduktion der Inzidenz von 88 % auf 47 % in der BAI behandelten Gruppe mit der hier im Experiment erforschten geringen Reduktion um 10 % bei der BAI behandelten Verumgruppe Ang II BAI+ auf 30 % der Inzidenz nicht erkennbar. Dies könnte aber möglicherweise ebenfalls ein Effekt von DMSO sein (Kollerup Madsen et al. 2018). Die Inzidenz für Aortenaneurysmen lag aber mit 40 % in Kontrollgruppe Ang II BAI- und 30 % in der Verumgruppe Ang II BAI+ im unteren Bereich der von 35 % bis 73 % reichenden Inzidenzraten für männliche mit Ang II- behandelte ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse in der Literatur (Trachet et al. 2015). Dies könnte auf die Altersverteilung der Mäuse in den betreffenden Gruppen zurückzuführen sein, handelt es sich hierbei doch mit im Durchschnitt 33,78 Wochen um „alte“ Mäuse nach Trachet et al. (2015).

Der Versuchszeitraum wurde, wie in den Veröffentlichungen des Mausmodells beschrieben, auf 4 Wochen nach Implantation der osmotischen Pumpe terminiert (Daugherty et al. 2000, Daugherty und Cassis 2004b). Die Versuche von Rateri et al. (2011) zeigten, dass eine längere Gabe von Ang II bis zu 84 Tagen ab dem 28. Tag keinen Unterschied im Serumcholesterolspiegel und praktisch keine Erhöhung des systolischen Blutdrucks zur Folge hat. In der vorliegenden Arbeit konnte aber eine gleichmäßigere Entwicklung der mittleren Fließgeschwindigkeit und des durchschnittlichen systolischen Spitzenflusses der mit BAI behandelten Gruppen festgestellt werden. Die bei Tieren der unbehandelten Gruppen festgestellten starken Anstiege und Abfälle könnten die höhere Mortalitäts- und Rupturrate erklären und den Einfluss von BAI auf diese bestätigen. So war eine weitere Erhöhung des AAA-Durchmesser erkennbar, die aber mit einer Erhöhung der Mortalität einherging (Rateri et al. 2011). Die signifikant niedrigere mittlere Fließgeschwindigkeit und der signifikant niedrigere durchschnittliche systolische Spitzenfluss der mit Ang II behandelten Versuchsgruppen im Vergleich zu den mit NaCl behandelten Gruppen lässt sich ebenfalls auf den höheren AAA-Durchmesser in den mit Ang II behandelten Gruppen zurückführen. Somit zeigte sich, dass die Auswahl der drei Kontrollgruppen und der Verumgruppe zur Erreichung von vergleichbaren Ergebnissen gut geeignet waren. Es konnte zum einen der Vergleich der NaCl behandelten

zu den Ang II behandelten Gruppen sowie der Vergleich der Gabe von BAI in Verbindung dergleichen erreicht werden. Für den Versuch wurden männliche Mäuse verwendet, da Männer ein höheres Risiko als Frauen aufweisen an Aneurysmen zu erkranken (Acosta et al. 2006, Chaikof et al. 2009, Bruemmer et al. 2011, Laine et al. 2016, Chaikof et al. 2018). Dies ist auch bei den Mäusen des vorliegenden Modells der Fall, wie die Studie von Trachet et al. (2015) zeigte.

Da auf Grund der begrenzten Zuchtplätze und der unterschiedlichen Fertilität der Zuchttiere das Alter der Versuchstiere variierte, wurde die Altersverteilung geprüft. Es zeichnete sich keine Korrelation zwischen dem Alter der Mäuse und der Inzidenz eines Aneurysmas ab. Um einen statistisch signifikanten Versuchsaufbau zu gewährleisten, wurde die Zusammenstellung und Größe der vier Versuchsgruppen, speziell der Verumgruppe Ang II BAI+ und deren direkter Kontrollgruppe mit 30 Tieren, gewählt. Die Auswertung der Altersstruktur der Gruppen ergab zwischen den mit Angiotensin behandelten Gruppen, Kontrollgruppe Ang II BAI- und Verumgruppe Ang II BAI+, mit einem P-Wert von 0,66 keinen signifikanten Unterschied. Mit einem durchschnittlichen Alter von 33,78 Wochen zählen die hier im Experiment verwendeten Mäuse laut Trachet et al. (2015) zu den älteren Tieren (>24 Wochen). Dies wird aus der Altersspanne der Mäuse ersichtlich, welche zwischen 20 und 86 Wochen liegt. Die Wahl von alten männlichen Mäusen soll auch die Übertragbarkeit auf den Menschen besser wiedergeben, sind von der Erkrankung doch hauptsächlich Männer über 65 Jahre betroffen (Laine et al. 2016).

Beim Vergleich mit der Literatur zeigten die verwendeten Versuchstiere in der Verumgruppe Ang II BAI+ (26.67 %) und bei der direkten Kontrollgruppe Ang II BAI- (23.33 %) eine der Literatur entsprechende Mortalität. So ermittelte der Review von Trachet et al. (2015) eine Mortalität von durchschnittlich 20 %. Bei der Untersuchung der Aneurysma-spezifischen Mortalität wurde neben der Gesamtmortalität auch der Anteil der verstorbenen Mäuse, bei denen ein abdominelles Aneurysma nachgewiesen wurde, ermittelt. Da alte Tiere mit Aneurysma möglicherweise weniger gut auf BAI reagieren als junge Tiere, könnten somit alte Tiere leichter Aneurysmen als junge Tiere nach Ang II-Gabe bekommen. Daher ist ein möglicher Grund für die Ergebnisse, dass die Verumgruppe Ang II BAI+ die ältesten Tiere enthielt. Daraus folgt, dass die nicht signifikanten Unterschiede nur bedingt auf eine zu niedrig dosierte Behandlung zurückführbar sind, vielmehr könnten die Untersuchungsergebnisse durch das Alter der Versuchstiere beeinflusst sein.

### 5.2. Baicalein

In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass BAI als Bestandteil des in der traditionellen chinesischen Medizin verwendeten Medikaments „Huangqin“ auf oxidativen Stress und die Inflammation wirkt und die Angiogenese und Tumorgenese durch BAI beeinflusst werden (Gao et al. 1999, Huang et al. 2005, Gandhi 2013, Wang et al. 2016). Wang et al. (2016) zeigten außerdem eine durch BAI reduzierte Aneurysmainzidenz *in vivo*. Die verwendete Dosis von BAI wird in der Studie von Wang et al. (2016) mit 30 mg/kg/Tag angegeben, wofür auch die Ergebnisse zur Wirkung von BAI auf die Entstehung von Aneurysmen sprechen. Bei der praktischen Umsetzung in dieser Arbeit kam ein Gemisch aus 1,5 mg/kg/Tag BAI in 5,4 % EtOH in NaCl 0,9 % zum Einsatz. Es zeigte sich bei Testapplikationen, dass höhere Dosen nicht nur durch die Viskosität schwer zu applizieren, sondern auch zu extremen Hautirritationen und intraperitonealen Entzündungen mit Beteiligung der inneren Serosa und den inneren Organen führte, was eine Verfälschung der Wirkung auf die Aneurysmenentwicklung zur Folge gehabt hätte. Im Vergleich dazu verwendeten Wang et al. (2016) DMSO als Lösungsmittel für das BAI. DMSO führt bereits alleine appliziert zu Hautirritationen und Ödemen (Kollerup Madsen et al. 2018) und könnte in Kombination mit BAI die oben beschriebene Wirkung noch verstärken. Die Zusammenfassung von Studienergebnissen von Kollerup Madsen et al. (2018) zeigte, dass DMSO zu einer Erhöhung des Blutdruckes führen kann. Somit wäre durch die verstärkten Entzündungsreaktionen die Wirkung von BAI in der vorliegenden Arbeit verfälscht worden.

### 5.3. Sonographie

Um die These, dass die Ang II-Gabe keine Wirkung auf den Blutdruck zeigt beziehungsweise nur ein moderater Anstieg des Blutdruckes erkennbar ist, in der Veröffentlichung von Daugherty und Cassis (2004b) zu überprüfen, wurde der durchschnittliche systolische Spitzenfluss und die mittlere Fließgeschwindigkeit mittels Sonographie ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass bei Gabe von Ang II eine signifikante Absenkung des durchschnittlichen systolischen Spitzenflusses und eine Verminderung der mittleren Fließgeschwindigkeit stattfindet. Daraus resultiert eine Reduktion des Blutdruckes. Somit konnte die These von Daugherty und Cassis (2004b) in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In einer neuen Versuchsreihe müsste dieses Ergebnis verifiziert werden. Um die Genauigkeit der Messung zu verifizieren wurde der durchschnittliche systolische Spitzenfluss bei 5 Messungen ermittelt und bei einer höheren Anzahl an Amplituden die 5 maximalen systolischen Spitzenflüsse verwendet. Die mittlere Fließgeschwindigkeit wurde an derselben Stelle wie die Messungen des maximalen Durchflusses ermittelt. Weil die Ermittlung der Werte

mittels Sonographie immer im Bereich zwischen Leber und Niere stattfand, kann ein Messfehler in diesem Teil des Versuchsaufbaus ausgeschlossen werden, da eine sonographische Untersuchung der Aorta nur im Bereich des Abdomens möglich ist. Alle Versuchstiere wurden am gleichen Tag und mit der gleichen Menge Isofluran betäubt, was das Fehlerrisiko minimiert.

Ebenfalls mittels Sonographie wurde die Auswirkung von Ang II und BAI auf den Aortendiameter ermittelt. Damit wurde die Wachstumsrate der Aneurysmen untersucht. So zeigte sich der gewünschte Anstieg des Diameters bei den mit Ang II behandelten Gruppen. Ein signifikanter Unterschied in der Diameterentwicklung bei der mit BAI behandelten Gruppe ergab sich nicht. Laut der Studie von Wang et al. (2016) wurde bei einer höheren Gabe von BAI eine Verringerung des Diameters gezeigt, allerdings verwendeten diese als Lösungsmittel DMSO, sowie eine deutlich höhere (20-fache) Dosis des Wirkstoffes BAI. Da die Ermittlung der Werte mittels Sonographie an den zwei festgelegten Punkten stattfand, kann nicht von einem Messfehler in diesem Teil des Versuchsaufbaus ausgegangen werden. Auch wurden, wie oben beschrieben, alle Versuchstiere am gleichen Tag und mit der gleichen Betäubungsmittelmenge untersucht.

### **5.4. Histologie und Immunhistologie**

Zur besseren Einschätzung des Effekts von BAI auf die im AA stattfindende Inflammation wurde eine Einstufung der Mediadegeneration entwickelt. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Degeneration der Media gelegt, da bei fortschreitender Inflammation eine Verdickung und Degeneration derselbigen im Menschen zu beobachten ist (Rijbroek et al. 1994). Da bei einer Einstufung klare Parameter den Grundsatz bilden (Klopfleisch 2013) und um die histologische Graduierung zu verifizieren, wurde als weiterer Begutachter Dr. Markus Wortmann bestimmt. Somit wurde gesichert, dass die bei der Graduierung zu Grunde gelegten Kriterien und die Auswertung der histologischen Schnitte eindeutig reproduzierbar sind. Auf Grund der geringen Schnittdicke und trotz möglichst genauer Positionierung beim Prozessieren kann es zu unvollständigen Anschnitten eines Gefäßes, dem Anschnitt eines Gefäßabgangs und Knicken im Präparat kommen. Diese Artefakte lassen eine Beurteilung eines solchen unvollständigen Schnittes nicht bzw. schwerlich zu. Aus diesem Grund wurden unvollständige Schnitte nicht zur Auswertung herangezogen. Aneurysmen wurden nicht in die Graduierung miteinbezogen, sondern separat histologisch untersucht. Es zeigte sich deutlich eine Verschiebung der Mediadegeneration bei den Tieren der mit BAI behandelten Versuchsgruppe NaCl BAI+ von Grad III nach Grad II. Dies deutet auf eine Wirkung von BAI auf die Degeneration der Media hin. Zusätzlich wiesen die mit Ang II behandelten Tiere erhöhte Werte in Grad III auf, wobei der Anstieg bei den Tieren der Gruppe Ang II BAI+ stark

abflachte. Ob eine deutlichere Wirkung bei höherer Gabe von BAI erkennbar wäre, muss noch untersucht werden.

Da in dieser Arbeit der Einfluss einzelner inflammatorischer Signalwege bei der Entstehung des Aortenaneurysmas besser verstanden werden sollte, wurden die histologischen Schnitte mittels immunhistochemischer Verfahren untersucht. Insbesondere sollte der Effekt des antioxidativen Wirkstoffes BAI auf die Entstehung von Aortenaneurysmen und die Infiltration von Entzündungszellen untersucht werden. Um eine bessere und möglichst exakte Auszählung der inflammatorischen und apoptotischen Zellen zu erreichen, wurde, wie unter 3.4.1. beschrieben, ein Raster und Zählschemata verwendet. Da nur eine begrenzte Anzahl an Schnitten von einem Präparat möglich war, wurden alle auswertbaren Schnitte benutzt. Waren mehrere Schnitte von einem Präparat gefärbt, wurden diese durch Nutzung des jeweils höheren Werts im entsprechenden Bereich kombiniert. Des Weiteren erfolgte hierbei die Verifizierung der Ergebnisse durch einen zweiten Begutachter.

Bei der Auswertung der Leukozyteninfiltration anhand der immunhistochemischen CD45-Färbung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe Ang II BAI- und der Verumgruppe Ang II BAI+. Es zeichnete sich aber ein Trend ab, wonach sich in allen Bereichen bei der Verumgruppe Ang II BAI+ eine höhere Leukozyteninfiltration erkennen lässt. Die Ergebnisse von Wang et al. (2016) widersprechen dem hier festgestellten Trend und zeigen eine Abnahme der inflammatorischen Zellen durch BAI. Um mögliche falschpositive Zellen auszuschließen wurde die CD45-Färbung durch Testfärbungen speziell an die Gegebenheiten angepasst. Somit zeigte die entwickelte Färbung eine hohe Spezifität für Leukozyten.

Wie in der Einführung beschrieben, stellen Inflammasome einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunantwort und führen auch zur Aktivierung von Interleukinen bei der Entstehung von Aneurysmen. Wie hier gezeigt wurde, könnten Inflammasome speziell NLRP3 als Angriffspunkt für ein neues Therapeutikum zur Prävention der Aneurysma Progression dienen (Usui et al. 2015). Die Ergebnisse von Usui et al. (2015) belegen, dass ApoE<sup>-/-</sup> NLRP3<sup>-/-</sup>, ApoE<sup>-/-</sup> ASC<sup>-/-</sup> und ApoE<sup>-/-</sup> Casp1<sup>-/-</sup> Mäuse einen deutlich erniedrigten IL1B-Spiegel im Bereich der suprarenalen Aorta aufwiesen. Dies führte zu einer Reduzierung der Degeneration der elastischen Fasern und intramuralen Hämatome im Bereich der Aorta bei den Versuchstieren. Somit wurden bei der Planung dieses Projektes besonders die Wirkung von BAI auf die Inflammasompräsenz speziell von NLRP3, AIM2 und ASC untersucht. Auch die Prüfung der Wirkung auf die inflammationsbedingte Apoptose im Aneurysma wurde beleuchtet.

Zur Ermittlung der Präsenz von NLRP3, AIM2 und ASC wurden modifizierte immunhistologische Verfahren verwendet. Um ein möglichst einheitliches und vergleichbares Ergebnis zu erhalten, wurden die jeweils zu färbenden Schnitte alle gemeinsam dem immunhistologischen Prozess unterzogen. Somit konnte einer Verfälschung durch die unterschiedlichen Gegebenheiten, wie zum Beispiel Alter der Färbelösungen oder Qualität der Entsalzungsanlage entgegen gewirkt werden. Des Weiteren wurde durch Negativ- und Positivkontrollen beim Färbeverfahren eine mögliche Fehlfärbung oder Überfärbung ausgeschlossen. Durch die Verifizierung mittels zweitem Beobachter wurde auch hier eine objektive Beurteilung der Ergebnisse gewährleistet. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass ein hoher Anteil an Zellen im Bereich der Schulter und der kontralateralen Seite NLRP3, AIM2 und ASC exprimiert, aber nur AIM2 zusätzlich in den Bereichen der Aortenwand und des Thrombus in größeren Mengen nachgewiesen werden konnte.

Das Auftreten einer erhöhten Präsenz von AIM2 in der Aortenwand bestätigen auch die Experimente von Hakimi et al. (2014), bei denen ein Anstieg der AIM2-Präsenz in der Intima und *Vasa vasorum* der Aorta durch inflammatorische Signale in den Endothelzellen von humanen Präparaten erkennbar war (Hakimi et al. 2014). Diese Experimente belegten auch eine erhöhte Präsenz von AIM2 in den vaskulären glatten Muskelzellen der arteriosklerotischen Läsionen (Hakimi et al. 2014).

Die Präsenz von NLRP3 im Bereich der arteriosklerotisch beanspruchten Regionen deckt sich mit den Ergebnissen der Experimente mit ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Wang et al. (2017). Hier zeigte sich eine Beteiligung von NLRP3 an der Entstehung von Arteriosklerose (Wang et al. 2017). Auch die Ergebnisse von Dihlmann et al. (2014) ergaben eine Aktivierung von Inflammasome im humanen AAA durch chronische Entzündungsreaktionen, was die in dieser Arbeit beschriebenen Präsenzanalysen bestätigten.

Aus den Ergebnissen des TUNEL-Assay ergab sich, dass in den Bereichen der Schulter und der kontralateralen Seite eine hohe Zahl an apoptotischen Zellen vorhanden war. Der Bereich der medialen Aortenwand zeigte keine, der Bereich des Thrombus nur eine geringe Zahl apoptotischen Zellen. Somit scheinen die NLRP3 und ASC Präsenz mit der Apoptose von Zellen in den Bereichen der Schulter und der kontralateralen Seite zu korrelieren. Dies lässt den Schluss zu, dass durch die Entlastung über das falsche Lumen nahezu keine Apoptose im Bereich der Aortenwand stattfand. Durch die bereits fortgeschrittenen Umbauprozesse war nur eine geringe Anzahl an apoptotischen Zellen im Thrombus nachzuweisen. Das Ergebnis der NLRP3 Präsenz kann aber auf eine bereits abgeschlossene Apoptose hinweisen, da das NLRP3-Inflammasom Bestandteile zerstörter Zellen erkennt (Lamkanfi und Dixit 2012, Strowig et al. 2012). Bei einer Dosis von 1,5 mg/kg/Tag BAI konnte somit keine Wirkung von BAI auf die Präsenz von NLRP3, AIM2 und ASC im Aneurysma der Maus gezeigt werden. Eine Hemmung der Zellproliferation ist hingegen nicht auszuschließen.

### 5.5. Fazit

Es wurde in dieser Arbeit erstmals der Effekt von BAI auf die Inflammasome NLRP3, AIM2 und das Adaptermolekül ASC im Aneurysma der Maus sowie deren Zusammenhang mit der Apoptose im Aneurysma untersucht. Die daraus resultierenden Ergebnisse zeigen, dass bei einer Dosis von 1,5 mg/kg/Tag BAI keine signifikanten Effekte auf die Expression von NLRP3, AIM2 und ASC im Aneurysma erkennbar sind. Durch den Versuchsaufbau wurde aber der Grundstein für die Erforschung von höheren BAI-Dosen und eines geeigneteren Lösungsmittels gelegt.

Auch ergaben sich bei einer Dosis von 1,5 mg/kg/Tag BAI keine signifikanten Effekte auf Diameter, Inzidenz und Mortalität der Mäuse mit AAs. Trotzdem ist eine tendenzielle Abnahme bei der Inzidenz und der Aneurysma-spezifischen Mortalität erkennbar.

Wie in vielen Veröffentlichungen beschrieben, entspricht der Aufbau des AAs im Ang II Modell der Pathogenese und dessen klinischer Charakteristika eines abdominalen AAs im Menschen. So sind Rückschlüsse auf das Verteilungsmuster im Menschen und dessen Verlauf möglich. Ein besseres Verständnis der Verteilung und damit den Angriffspunkten einer Therapie konnte aufgezeigt werden.

Die Daten belegen eine Reduktion der Mediadegeneration in der mit BAI behandelten Gruppe. In Verbindung mit der Abnahme der AAA-Inzidenz und der Verringerung des AAA-Diameters in den Ergebnissen von Wang et al. (2016) deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Wirkung von BAI auf die AAA-Entwicklung hin, was somit eine mögliche Präventivtherapie darstellen würde. Dies könnte Grundlage weiterer Untersuchungen sein.

### **5.6. Ausblick**

Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit und weiterer Veröffentlichungen besteht noch zusätzlicher Untersuchungsbedarf, um BAI zur Präventivmedikation bei Aneurysmata einzusetzen. Dies stellt in Anbetracht der hohen Mortalität dieser Erkrankung einen wichtigen Schritt dar. Durch noch genauere Ermittlung der Dosis und der Applikationsform bestände die Möglichkeit eine Medikamentenstudie zu etablieren. Auch die festgestellten Inflammationsmuster und die Wirkung von BAI auf die gleichmäßigere Entwicklung der mittleren Fließgeschwindigkeit und des durchschnittlichen systolischen Spitzenflusses können helfen, diese schwerwiegende Erkrankung erfolgreich zu bekämpfen und ein damit verbundenes Rupturrisiko zu verringern.

## 6. Zusammenfassung

### **Wirkung von Baicalein auf die inflammatorischen Zellen und Mediatoren des Aortenaneurysmas der Maus**

Abdominelle Aortenaneurysmen (AAA) sind eine krankhafte Aufweitung der Aorta, die einen potentiell letalen Verlauf haben und im Falle einer Ruptur mit einer Letalität von über 70 % einhergehen. Obwohl bekannt ist, dass inflammatorische Prozesse eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Progression von Aortenaneurysmen einzunehmen scheinen, ist die genaue Pathophysiologie weiterhin unbekannt. Ziel dieses Projektes war es, im Tiermodell den Effekt des anti-oxidativen therapeutischen Wirkstoffes Baicalein auf das AAA und die Inflammation zu untersuchen sowie den Einfluss einzelner inflammatorischer Signalwege bei der Entstehung des AAAs besser zu verstehen.

Als Modell diente das etablierte AAA-Mausmodell, bei dem ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen durch eine subkutan implantierte osmotische Pumpe (ALZET Modell 2004) über 4 Wochen Angiotensin II (1500 ng/kg/min) appliziert wird. Von den vier verwendeten Tiergruppen erhielten die Gruppen NaCl BAI- und NaCl BAI+ (n=10) physiologische Kochsalzlösung während die Tiergruppen Ang II BAI- und Ang II BAI+ (n= 30) Angiotensin II appliziert bekamen. Die Gruppen NaCl BAI+ und Ang II BAI+ bekamen zusätzlich täglich Baicalein (i.p. 1,5 mg/kg/Tag). Der Aorten-Diameter, die mittlere Fließgeschwindigkeit und der durchschnittliche systolische Spitzenfluss wurden wöchentlich duplexsonographisch gemessen. Nach dem Ende der Experimente wurde die Aorta entnommen, um anhand histologischer Färbungen die Mediadegeneration zu quantifizieren (Grad 0-III). Mittels histologischer und immunhistochemischer Färbungen erfolgte der Nachweis von Immunzellen sowie der Präsenz weiterer inflammatorischer Proteine in der Aortenwand. Zusätzlich wurde der Nachweis von apoptotischen Zellen im Aneurysma der Versuchstiere erbracht.

Die Baicalein-Therapie hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtmortalität, die Aneurysma-spezifische Mortalität, die Diameterentwicklung und die bei 30 Prozent liegende Inzidenz von Aneurysmen in der Verumgruppe. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass bei einer Dosis von 1,5 mg/kg/Tag Baicalein keine signifikanten Effekte auf die Präsenz von inflammatorischen Proteinen im Aneurysma erkennbar sind. Trotzdem ist eine tendenzielle Abnahme bei der Inzidenz und der Aneurysma-spezifischen Mortalität ersichtlich. Zusätzlich deutet sich eine Wirkung von BAI auf die Degeneration der Media an.

In Verbindung mit der Abnahme der AAA-Inzidenz und der Verringerung des AAA-Diameters in anderen Arbeiten weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Wirkung von Baicalein auf die AAA-Entwicklung hin.

## 7. Summary

### **The effect of Baicalein on inflammatory cells and mediators in aortic aneurysm of mice**

An abdominal aortic aneurysm (AAA) is defined as a pathological focal dilation of the abdominal aorta. Over 70 per cent of human patients die after a rupture of abdominal aortic aneurysm. This fact shows how important it is to explore the inflammatory development of aortic aneurysms. Nevertheless, the exact pathophysiological mechanisms are not revealed. The aim of this project was to investigate the effect of the anti-oxidative substance Baicalein on aortic aneurysm formation and the inflammation in a mouse model. Also the better understanding of the inflammatory pathway on development of aortic aneurysms should be explored.

The established Angiotensin II induced ApoE<sup>-/-</sup> -Mouse Model was used. During 4 weeks, 1500 ng/kg/min Angiotensin II was infused via an implanted osmotic pump (ALZET Modell 2004). Animals were classified in 4 groups. Group NaCl BAI<sup>-</sup> and NaCl BAI<sup>+</sup> (n=10) had a saline infusion, Group Ang II BAI<sup>-</sup> and Ang II BAI<sup>+</sup> (n= 30) were perfused with angiotensin II. The Groups NaCl BAI<sup>+</sup> and Ang II BAI<sup>+</sup> additionally received 1,5 mg/kg/day Baicalein via intraperitoneal injection. The aortic diameter, the peak systolic velocity and the mean velocity were measured weekly through the use of a duplex sonographer. After 4 weeks, the mice were sacrificed and the aortas were dissected. The aortas were stained with histological and immunohistochemical methods to locate the spread of immunological cells, apoptotic cells and the presence of inflammasome components in the aortic wall. Also the degeneration of the media (Grading 0-III) was staged via histological review.

There was no significant effect on mortality, diameter development and the incidence of aortic aneurysms with 30 percent in the verum-group in response to the injection of 1,5 mg/kg/day Baicalein. In addition, Baicalein treatment seems to be associated with the decrease of mortality and incidence of AAAs. Moreover, this dose did not change the presence and distribution patterns of inflammasoms in the aortic wall. Analyses of the medial degeneration seem to show a reduction through Baicalein.

The findings of this study in addition with the inhibition of AAA incidence and the decrease of AAA diameters of other investigations indicate that Baicalein might have an effect on the development of AAA.

## 8. Literaturverzeichnis

- Deutsche Gesellschaft für Gefäßchirurgie (D.G.G.), D. G. f. G. (2010). *Bauchaortenaneurysma und Beckenarterienaneurysma (S2)*. Berlin, Heidelberg, Springer.
- Acosta, S., M. Ogren, H. Bengtsson, D. Bergqvist, B. Lindblad and Z. Zdanowski (2006). "Increasing incidence of ruptured abdominal aortic aneurysm: a population-based study." *J Vasc Surg* **44**: 237-243.
- Altenburg, J., C. S. de Graaff, T. S. van Der Werf and W. G. Boersma (2010a). "Immunomodulatory Effects of Macrolide Antibiotics – Part 1: Biological Mechanisms." *Respiration* **81**: 67-74.
- Altenburg, J., C. S. de Graaff, T. S. van Der Werf and W. G. Boersma (2010b). "Immunomodulatory Effects of Macrolide Antibiotics – Part 2: Advantages and Disadvantages of Long-Term, Low-Dose Macrolide Therapy." *Respiration* **81**: 75-87.
- Alvarez, A., L. Piqueras, R. Bello, A. Canet, L. Moreno, P. Kubes and M. J. Sanz (2001). "Angiotensin II is involved in nitric oxide synthase and cyclo - oxygenase inhibition - induced leukocyte - endothelialcell interactions in vivo." *Br J Pharmacol* **132**: 677-684.
- Bergqvist, D. (2011). "Pharmacological Interventions to Attenuate the Expansion of Abdominal Aortic Aneurysm (AAA) – A Systematic Review." *Eur J Vasc Endovasc Surg* **41**: 663-667.
- Bobryshev, Y. V. and R. S. Lord (2001). "Vascular-associated lymphoid tissue (VALT) involvement in aortic aneurysm." *Atherosclerosis* **154**: 15-21.
- Braun, R. and E. Willnow (1996). "Die „Knockout“-Maus als Krankheitsmodell: Prinzipien und klinische Relevanz." *Dtsch Arztebl International* **93**: 1765-1769.
- Brophy, C. M., J. M. Reilly, G. J. Smith and M. D. Tilson (1991). "The role of inflammation in nonspecific abdominal aortic aneurysm disease." *Ann Vasc Surg* **5**: 229-233.
- Bruemmer, D., A. Daugherty, H. Lu and D. L. Rateri (2011). "Relevance of angiotensin II-induced aortic pathologies in mice to human aortic aneurysms." *Ann N Y Acad Sci* **1245**: 7-10.
- Busuttil, R. W., A. M. Abou-Zamzam and H. I. Machleder (1980). "Collagenase activity of the human aorta. A comparison of patients with and without abdominal aortic aneurysms." *Arch Surg* **115**: 1373-1378.
- Cao, R. Y., T. Amand, M. D. Ford, U. Piomelli and C. D. Funk (2010). "The Murine Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Model: Rupture Risk and Inflammatory Progression Patterns." *Front Pharmacol* **1**: 9.

- Carrell, T. W., A. Smith and K. G. Burnand (1999). "Experimental techniques and models in the study of the development and treatment of abdominal aortic aneurysm." *Br J Surg* **86**: 305-312.
- Chaikof, E. L., D. C. Brewster, R. L. Dalman, M. S. Makaroun, K. A. Illig, G. A. Sicard, C. H. Timaran, G. R. Upchurch, Jr., F. J. Veith and S. Society for Vascular (2009). "The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: the Society for Vascular Surgery practice guidelines." *J Vasc Surg* **50**: S2-49.
- Chaikof, E. L., R. L. Dalman, M. K. Eskandari, B. M. Jackson, W. A. Lee, M. A. Mansour, T. M. Mastracci, M. Mell, M. H. Murad, L. L. Nguyen, G. S. Oderich, M. S. Patel, M. L. Schermerhorn and B. W. Starnes (2018). "The Society for Vascular Surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm." *J Vasc Surg* **67**: 2-77 e72.
- Chevallier, A. (2001). *Das grosse Lexikon der Heilpflanzen München [i.e.] Starnberg : Dorling Kindersley*
- Cookson, B. T. and M. A. Brennan (2001). "Pro-inflammatory programmed cell death." *Trends Microbiol* **9**: 113-114.
- Daugherty, A. and L. Cassis (2004a). "Angiotensin II-mediated development of vascular diseases." *Trends Cardiovasc Med* **14**: 117-120.
- Daugherty, A. and L. A. Cassis (2004b). "Mouse models of abdominal aortic aneurysms." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 429-434.
- Daugherty, A., L. A. Cassis and H. Lu (2011). "Complex pathologies of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms." *J Zhejiang Univ Sci B* **12**: 624-628.
- Daugherty, A., M. W. Manning and L. A. Cassis (2000). "Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice." *J Clin Invest* **105**: 1605-1612.
- DeYoung, K. L., M. E. Ray, Y. A. Su, S. L. Anzick, R. W. Johnstone, J. A. Trapani, P. S. Meltzer and J. M. Trent (1997). "Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma." *Oncogene* **15**: 453-457.
- Dihlmann, S., P. Erhart, A. Mehrabi, A. Nickkholgh, F. Lasitschka, D. Bockler and M. Hakimi (2014). "Increased expression and activation of absent in melanoma 2 inflammasome components in lymphocytic infiltrates of abdominal aortic aneurysms." *Mol Med* **20**: 230-237.
- Dinarello, C. (1998). "Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme." *Ann N Y Acad Sci* **856**: 1-11.
- Eliason, L. J. and R. G. Upchurch (2008). "Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair." *Circulation* **117**: 1738-1744.

Fernandes-Alnemri, T., J.-W. Yu, P. Datta, J. Wu and E. S. Alnemri (2009). "AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA." *Nature* **458**: 509.

Franchi, L., N. Warner, K. Viani and G. Nuñez (2009). *Function of Nod - like receptors in microbial recognition and host defense*. Oxford, UK. **227**: 106-128.

Freestone, T., R. J. Turner, D. J. Higman, M. J. Lever and J. T. Powell (1997). "Influence of hypercholesterolemia and adventitial inflammation on the development of aortic aneurysm in rabbits." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 10.

Gandhi, N. M. (2013). "Baicalein protects mice against radiation-induced DNA damages and genotoxicity." *Mol Cell Biochem* **379**: 277-281.

Gao, Z., K. Huang, X. Yang and H. Xu (1999). "Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi." *Biochim Biophys Acta* **1472**: 643-650.

Gavrila, D., W. G. Li, M. L. McCormick, M. Thomas, A. Daugherty, L. A. Cassis, F. J. Miller, Jr., L. W. Oberley, K. C. Dellsperger and N. L. Weintraub (2005). "Vitamin E inhibits abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-infused apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**: 1671-1677.

Golledge, J., P. S. Tsao, R. L. Dalman and P. E. Norman (2008). "Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression." *Circulation* **118**: 2382-2392.

Hakimi, M., A. Peters, A. Becker, D. Bockler and S. Dihlmann (2014). "Inflammation-related induction of absent in melanoma 2 (AIM2) in vascular cells and atherosclerotic lesions suggests a role in vascular pathogenesis." *J Vasc Surg* **59**: 794-803.

Hamada, H., M. Hiramatsu, R. Edamatsu and A. Mori (1993). "Free radical scavenging action of baicalein." *Arch Biochem Biophys* **306**: 261-266.

Henriques, T. A., J. Huang, S. S. D'souza, A. Daugherty and L. A. Cassis (2004). "Orchiectomy, But Not Ovariectomy, Regulates Angiotensin II-Induced Vascular Diseases in Apolipoprotein E-Deficient Mice." *Endocrinology* **145**: 3866-3872.

Hornung, V., A. Ablasser, M. Charrel-Dennis, F. Bauernfeind, G. Horvath, D. R. Caffrey, E. Latz and K. A. Fitzgerald (2009). "AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC." *Nature* **458**: 514-518.

Huang, Y., S. Y. Tsang, X. Yao and Z. Y. Chen (2005). "Biological properties of baicalein in cardiovascular system." *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **5**: 177-184.

Janeway, C. A. and R. Medzhitov (2002) "Innate immune recognition." *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216 DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359

Johnston, K. W., R. B. Rutherford, M. D. Tilson, D. M. Shah, L. Hollier and J. C. Stanley (1991). "Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery." *J Vasc Surg* **13**: 452-458.

Karlsson, L., J. Gnarpe, D. Bergqvist, J. Lindbäck and H. Pärsson (2009). "The effect of azithromycin and Chlamydia pneumonia infection on expansion of small abdominal aortic aneurysms - A prospective randomized double-blind trial." *J Vasc Surg* **50**: 23-29.

Kent, K. C. (2014). "Clinical practice. Abdominal aortic aneurysms." *N Engl J Med* **371**: 2101-2108.

Kimura, Y., Z. Okuda H Fau - Ogita and Z. Ogita (1997). "Effects of flavonoids isolated from scutellariae radix on fibrinolytic system induced by trypsin in human umbilical vein endothelial cells." *J Nat Prod* **60(6)**: 598-601.

Klopfleisch, R. (2013). "Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology--a systematic review." *BMC Vet Res* **9**: 123.

Kobe, B. and J. Deisenhofer (1994) "The leucine-rich repeat: A versatile binding motif." *Trends Biochem Sci* **19**, 415-421 DOI: 10.1016/0968-0004(94)90090-6.

Kollerup Madsen, B., M. Hilscher, D. Zetner and J. Rosenberg (2018) "Adverse reactions of dimethyl sulfoxide in humans: a systematic review." *F1000Res* **7**, 1746 DOI: 10.12688/f1000research.16642.2.

Laine, M. T., S. J. Laukontaus, I. Kantonen and M. Venermo (2016). "Population-based study of ruptured abdominal aortic aneurysm." *Br J Surg* **103**: 1634-1639.

Lamkanfi, M. and V. M. Dixit (2012). "Inflammasomes and their roles in health and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 137-161.

Latz, E., T. S. Xiao and A. Stutz (2013). "Activation and regulation of the inflammasomes." *Nat Rev Immunol* **13**: 397-411.

Li, C., G. Lin and Z. Zuo (2011). "Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of Radix Scutellariae and its bioactive flavones." *Biopharm Drug Dispos* **32**: 427-445.

Li, Y., J. Wang, X. Song, H. Bai, T. Ma, Z. Zhang, X. Li, R. Jiang, G. Wang, X. Fan, X. Liu and L. Gao (2017). "Effects of baicalein on IL-1beta-induced inflammation and apoptosis in rat articular chondrocytes." *Oncotarget* **8**: 90781-90795.

Li-Weber, M. (2009). "New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin." *Cancer Treat Rev* **35**: 57-68.

Lin, T.-Y., T.-Y. W. Wei, S. Li, S.-C. Wang, M. He, M. Martin, J. Zhang, T.-P. Shentu, H. Xiao, J. Kang, K.-C. Wang, Z. Chen, S. Chien, M.-D. Tsai and J. Y. J. Shyy (2016). "TIFA as a crucial mediator for NLRP3 inflammasome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 15078-15083.

Lizarbe, T. R., C. Tarín, M. Gómez, B. Lavin, E. Aracil, L. M. Orte and C. Zaragoza (2009). "Nitric Oxide Induces the Progression of Abdominal Aortic Aneurysms through the Matrix Metalloproteinase Inducer EMMPRIN." *Am J Pathol* **175**: 1421-1430.

Lopez-Candales, A., D. R. Holmes, S. Liao, M. J. Scott, S. A. Wickline and R. W. Thompson (1997). "Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms." *Am J Pathol* **150**: 993-1007.

Lu, A., V. G. Magupalli, J. Ruan, Q. Yin, M. K. Atianand, M. R. Vos, G. F. Schroder, K. A. Fitzgerald, H. Wu and E. H. Egelman (2014). "Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes." *Cell* **156**: 1193-1206.

Mahley, R. W. (1988). "Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology." *Science (New York, N.Y.)* **240**: 622-630.

Maiellaro, K. and W. R. Taylor (2007). "The role of the adventitia in vascular inflammation." *Cardiovasc Res* **75**: 640-648.

Mariathasan, S., K. Newton, D. Monack and D. Vucic (2004). "Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf." *Nature* **430**: 213-218.

Martinon, F., K. Burns and J. Tschopp (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." *Mol Cell* **10**: 417-426.

Martinon, F., V. Pétrilli, A. Mayor, A. Tardivel and J. Tschopp (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." *Nature* **440**: 237-241.

Masumoto, J., S. Taniguchi, K. Ayukawa, H. Sarvotham, T. Kishino, N. Niikawa, E. Hidaka, T. Katsuyama, T. Higuchi and J. Sagara (1999). "ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells." *J Biol Chem* **274**: 33835-33838.

Michel, J.-B., J.-L. Martin-Ventura, J. Egido, N. Sakalihasan, V. Treska, J. Lindholt, E. Allaire, U. Thorsteinsdottir, G. Cockerill and J. Swedenborg (2011). "Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans." *Cardiovasc Res* **90**: 18-27.

Moll, F. L., J. T. Powell, G. Fraedrich, F. Verzini, S. Haulon, M. Waltham, J. A. van Herwaarden, P. J. E. Holt, J. W. van Keulen, B. Rantner, F. J. V. Schlösser, F. Setacci and J. B. Ricco (2011). "Management of Abdominal Aortic Aneurysms Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery." *Eur J Vasc Endovasc Surg* **41**: S1-S58.

Ocana, E., J. C. Bohorquez, J. Perez-Requena, J. A. Brieva and C. Rodriguez (2003). "Characterisation of T and B lymphocytes infiltrating abdominal aortic aneurysms." *Atherosclerosis* **170**: 39-48.

Peshkova, I. O., G. Schaefer and E. K. Koltsova (2016). "Atherosclerosis and aortic aneurysm - is inflammation a common denominator?" *FEBS J* **283**: 1636-1652.

Piedrahita, J. A., S. H. Zhang, J. R. Hagaman, P. M. Oliver and N. Maeda (1992). "Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4471.

Plump, A. S., J. D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J. G. Verstyuyft, E. M. Rubin and J. L. Breslow (1992). "Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells." *Cell* **71**: 343-353.

Powell, J. (1991). "Models of arterial aneurysm: for the investigation of pathogenesis and pharmacotherapy —a review." *Atherosclerosis* **87**: 93-102.

PubChem. (2020). "Baicalein | C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> - PubChem." Retrieved 18 Apr. 2020, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281605>.

Pyo, R., J. K. Lee, J. M. Shipley, J. A. Curci, D. Mao, S. J. Ziporin, T. L. Ennis, S. D. Shapiro, R. M. Senior and R. W. Thompson (2000). "Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms." *J Clin Invest* **105**: 1641.

Rateri, D. L., D. A. Howatt, J. J. Moorleggen, R. Charnigo, L. A. Cassis and A. Daugherty (2011). "Prolonged Infusion of Angiotensin II in apoE <sup>-/-</sup> Mice Promotes Macrophage Recruitment with Continued Expansion of Abdominal Aortic Aneurysm." *Am J Pathol* **179**: 1542-1548.

Rathinam, V. and K. Fitzgerald (2010). "Inflammasomes and Anti-Viral Immunity." *J Clin Immunol* **30**: 632-637.

Rijbroek, A., F. L. Moll, H. A. von Dijk, R. Meijer and J. W. Jansen (1994). "Inflammation of the abdominal aortic aneurysm wall." *Eur J Vasc Surg* **8**: 41-46.

Sagara, K., Y. Ito, T. Oshima, T. Misaki, H. Murayama and H. Itokawa (1985). "Simultaneous determination of baicalein, wogonin, oroxylin-A and their glucuronides in scutellariae radix by ion-pair high-performance liquid chromatography." *J Chromatogr A* **328**: 289-297.

- Saiga, H., S. Kitada, Y. Shimada, N. Kamiyama, M. Okuyama, M. Makino, M. Yamamoto and K. Takeda (2012). "Critical role of AIM2 in Mycobacterium tuberculosis infection." *Int Immunol* **24**: 637-644.
- Saraff, K., F. Babamusta, L. A. Cassis and A. Daugherty (2003). "Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**: 1621-1626.
- Sauer, J.-D., C. E. Witte, J. Zemansky, B. Hanson, P. Lauer and D. A. Portnoy (2010). "Listeria monocytogenes triggers AIM2-mediated pyroptosis upon infrequent bacteriolysis in the macrophage cytosol." *Cell Host Microbe* **7**: 412.
- Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The Inflammasomes." *Cell* **140**: 821-832.
- SciStatCalc. (2013). "Fisher's Exact Test Calculator (2 × 2 Contingency Table)." Retrieved 20.08.2020, 2020, from <https://scistatcalc.blogspot.com/2013/11/fishers-exact-test-calculator.html>.
- Shimizu, K., R. N. Mitchell and P. Libby (2006). "Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**: 987.
- Social\_Science\_Statistics. (2020). "Mann-Whitney U Test Calculator." Retrieved 08.08.2020, 2020, from <https://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/default2.aspx>.
- Strowig, T., J. Henao-Mejia, E. Elinav and R. Flavell (2012). "Inflammasomes in health and disease." *Nature* **481**: 278-286.
- Teresa, F.-A., Y. Je-Wook, J. Christine, S. Leobaldo, K. Seokwon, W. Jianghong, D. Pinaki, M. Margaret, H. Lan, M. Erin, E. Laurence, P. L. Carlisle and S. A. Emad (2010). "The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis." *Nat Immunol* **11**: 385.
- Theeuwes, F. and S. Yum (1976). "Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations." *Ann Biomed Eng* **4**: 343-353.
- Thomas, P. G., P. Dash, J. R. Aldridge, A. H. Ellebedy, C. Reynolds, A. J. Funk, W. J. Martin, M. Lamkanfi, R. J. Webby, K. L. Boyd, P. C. Doherty and T.-D. Kanneganti (2009). "The Intracellular Sensor NLRP3 Mediates Key Innate and Healing Responses to Influenza A Virus via the Regulation of Caspase-1." *Immunity* **30**: 566-575.
- Thompson, S., A. R. Clarke, A. M. Pow, M. L. Hooper and D. W. Melton (1989). "Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells." *Cell* **56**: 313-321.
- Trachet, B., R. A. Fraga-Silva, P. A. Jacquet, N. Stergiopoulos and P. Segers (2015). "Incidence, severity, mortality, and confounding factors for dissecting AAA detection in angiotensin II-infused mice: a meta-analysis." *Cardiovasc Res* **108**: 159-170.

Trachet, B., A. Piersigilli, R. A. Fraga-Silva, L. Aslanidou, J. Sordet-Dessimoz, A. Astolfo, M. F. Stampanoni, P. Segers and N. Stergiopoulos (2016). "Ascending Aortic Aneurysm in Angiotensin II-Infused Mice: Formation, Progression, and the Role of Focal Dissections." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **36**: 673-681.

Twine, C. P. and I. M. Williams (2011). "Systematic review and meta-analysis of the effects of statin therapy on abdominal aortic aneurysms." *Br J Surg* **98**: 346-353.

Usui, F., K. Shirasuna, H. Kimura, K. Tatsumi, A. Kawashima, T. Karasawa, K. Yoshimura, H. Aoki, H. Tsutsui, T. Noda, J. Sagara, S. Taniguchi and M. Takahashi (2015). "Inflammasome activation by mitochondrial oxidative stress in macrophages leads to the development of angiotensin II-induced aortic aneurysm." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**: 127-136.

Wang, A. W., L. Song, J. Miao, H. X. Wang, C. Tian, X. Jiang, Q. Y. Han, L. Yu, Y. Liu, J. Du, Y. L. Xia and H. H. Li (2015). "Baicalein attenuates angiotensin II-induced cardiac remodeling via inhibition of AKT/mTOR, ERK1/2, NF-kappaB, and calcineurin signaling pathways in mice." *Am J Hypertens* **28**: 518-526.

Wang, F., H. Chen, Y. Yan, Y. Liu, S. Zhang and D. Liu (2016). "Baicalein protects against the development of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms by blocking JNK and p38 MAPK signaling." *Sci China Life Sci* **59**: 940-949.

Wang, R., Y. Wang, N. Mu, X. Lou, W. Li, Y. Chen, D. Fan and H. Tan (2017). "Activation of NLRP3 inflammasomes contributes to hyperhomocysteinemia-aggravated inflammation and atherosclerosis in apoE-deficient mice." *Lab Invest* **97**: 922-934.

Wang, Z. L., S. Wang, Y. Kuang, Z. M. Hu, X. Qiao and M. Ye (2018). "A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*." *Pharm Biol* **56**: 465-484.

Wanhainen, A., F. Verzini, I. Van Herzelee, E. Allaire, M. Bown, T. Cohnert, F. Dick, J. van Herwaarden, C. Karkos, M. Koelemay, T. Kolbel, I. Loftus, K. Mani, G. Melissano, J. Powell, Z. Szeberin, E. G. Committee, G. J. de Borst, N. Chakfe, S. Debus, R. Hinchliffe, S. Kakkos, I. Koncar, P. Kolh, J. S. Lindholt, M. de Vega, F. Vermassen, DocumentReviewers, M. Bjorck, S. Cheng, R. Dalman, L. Davidovic, K. Donas, J. Earnshaw, H. H. Eckstein, J. Golledge, S. Haulon, T. Mastracci, R. Naylor, J. B. Ricco and H. Verhagen (2019). "Editor's Choice - European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2019 Clinical Practice Guidelines on the Management of Abdominal Aorto-iliac Artery Aneurysms." *Eur J Vasc Endovasc Surg* **57**: 8-93.

Weiss, D., J. J. Kools and W. R. Taylor (2001). "Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice." *Circulation* **103**: 448-454.

Weyrauch, K. D. (2009). *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*. 2., überarb. Aufl., Stuttgart, Enke.

Zaragoza, C., C. Gomez-Guerrero, J. L. Martin-Ventura, L. Blanco-Colio, B. Lavin, B. Mallavia, C. Tarin, S. Mas, A. Ortiz and J. Egido (2011). "Animal models of cardiovascular diseases." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 497841.

Zhao, Q., X. Y. Chen and C. Martin (2016). "Scutellaria baicalensis, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants." *Sci Bull (Beijing)* **61**: 1391-1398.

## Anhang

Tabelle 15: Mortalität aller Versuchsgruppen (Gesamter Versuchszeitraum)

<b>Mortalität Gesamt</b>			
Versuchsgruppe	Verstorben	Verstorben (%)	Anzahl der Versuchstiere
NaCl BAI-	0	0	10
NaCl BAI+	0	0	10
Ang II BAI-	7	23.33	30
Ang II BAI+	8	26.67	30

Tabelle 16: Aneurysma-spezifische Mortalität

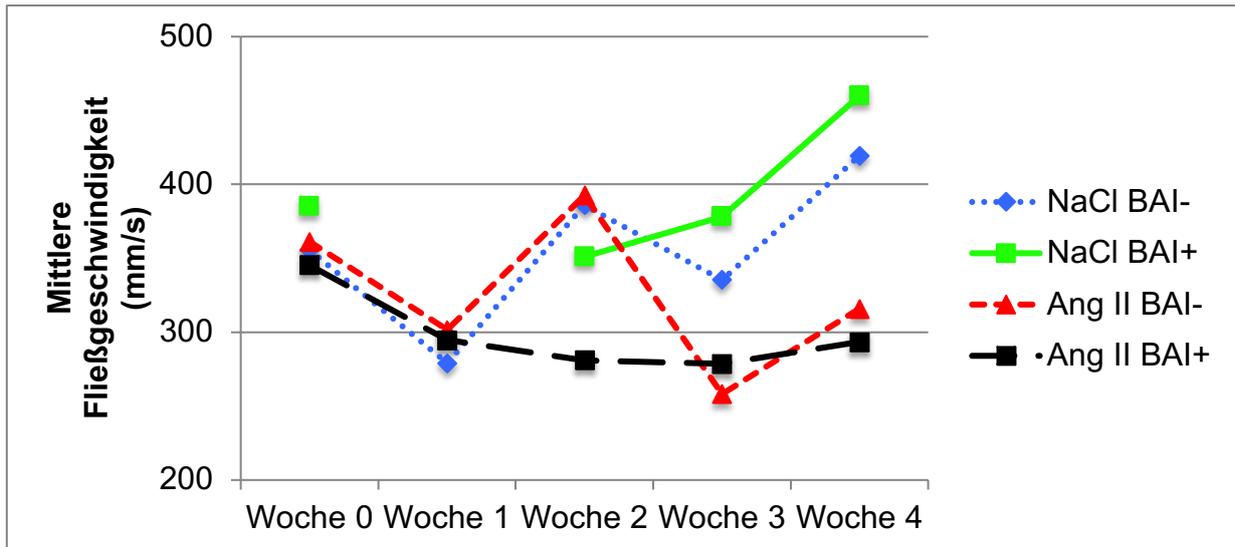
<b>Aneurysma-spezifische Mortalität</b>			
Versuchsgruppe	Verstorben	Verstorben (%)	Anzahl der Versuchstiere
NaCl BAI-	0	0	10
NaCl BAI+	0	0	10
Ang II BAI-	5	16,67	30
Ang II BAI+	3	10	30

Tabelle 17: Inzidenz der Aneurysmen

<b>Inzidenz der Aneurysmen</b>			
Versuchsgruppe	Aneurysmen	Aneurysmen (%)	Anzahl der Versuchstiere
NaCl BAI-	0	0	10
NaCl BAI+	0	0	10
Ang II BAI-	12	40	30
Ang II BAI+	9	30	30

Tabelle 18: Mittlere Fließgeschwindigkeit

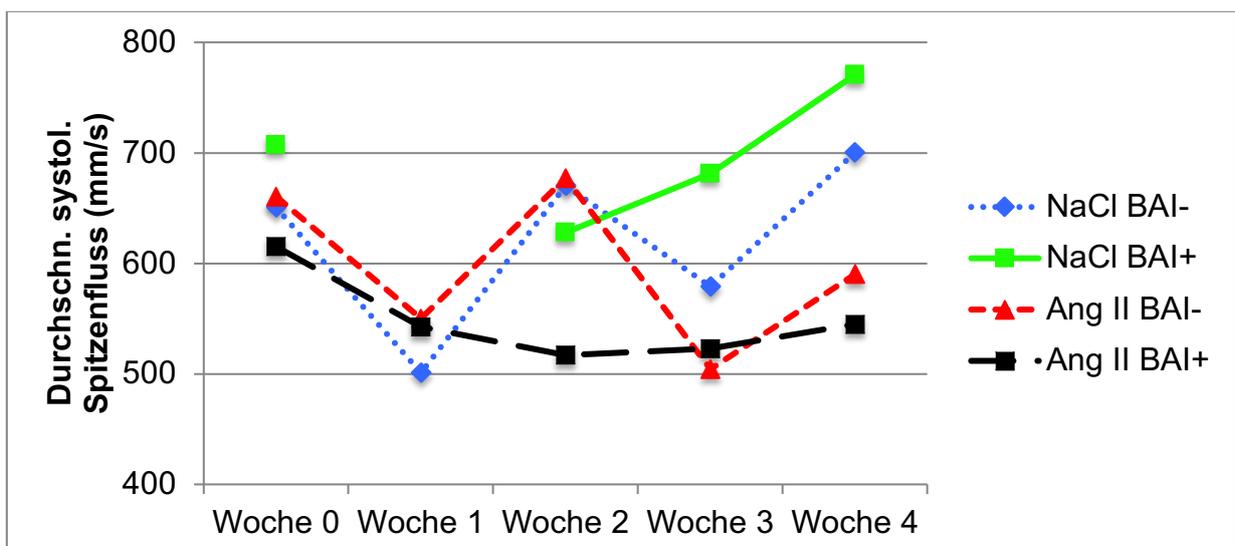
<b>Mittlere Fließgeschwindigkeit (mm/s)</b>					
Versuchsgruppe	Woche 0	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4
NaCl BAI-	355.86 ± 81.78	279.12 ± 24.70	386.13 ± 134.18	335.56 ± 70.84	419.35 ± 99.55
NaCl BAI+	385.34 ± 106.75		351.09 ± 57.53	378.33 ± 117.41	459.83 ± 51.69
Ang II BAI-	361.22 ± 104.42	301.59 ± 106.74	392.50 ± 109.09	258.19 ± 72.10	315.88 ± 115.99
Ang II BAI+	345.32 ± 87.58	294.68 ± 93.50	280.99 ± 100.63	278.65 ± 98.20	293.44 ± 77.52



**Abbildung 47:** Wochenübersicht der mittleren Fließgeschwindigkeit (in mm/s) der drei Kontrollgruppen (NaCl BAI-, NaCl BAI+ und Ang II BAI-) und der Verumgruppe (Ang II BAI+)

**Tabelle 19:** Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss  $\pm$  Standardabweichung

Durchschnittlicher systolischer Spitzenfluss (mm/s)					
Versuchsgruppe	Woche 0	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4
NaCl BAI-	650.69 $\pm$ 148.05	500.97 $\pm$ 49.66	670.41 $\pm$ 217.26	579.09 $\pm$ 111.39	700.16 $\pm$ 175.63
NaCl BAI+	706.81 $\pm$ 185.79		627.79 $\pm$ 98.09	681.08 $\pm$ 199.38	770.55 $\pm$ 92.55
Ang II BAI-	660.37 $\pm$ 183.33	549.87 $\pm$ 193.53	677.16 $\pm$ 212.30	504.31 $\pm$ 114.76	590.15 $\pm$ 214.59
Ang II BAI+	615.15 $\pm$ 153.29	542.51 $\pm$ 171.94	516.91 $\pm$ 181.52	522.94 $\pm$ 166.00	544.70 $\pm$ 134.05



**Abbildung 48:** Wochenübersicht des durchschnittlichen systolischen Spitzenflusses (PSV in mm/s) der drei Kontrollgruppen (NaCl BAI-, NaCl BAI+ und Ang II BAI-) und der Verumgruppe (Ang II BAI+)

**Tabelle 20:** P-Wert CD45-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse

<b>P-Wert CD45-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse</b>				
Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
CD 45 (P-Wert)	0.32997	0.35942	0.33724	0.22965

**Tabelle 21:** P-Wert ASC-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse

<b>P-Wert ASC-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse</b>				
T-Test	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
ASC (P-Wert)	0.3313	0.3928	0.6734	0.5466

**Tabelle 22:** P-Wert AIM2-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse

<b>P-Wert AIM2-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse</b>				
Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
AIM2 (P-Wert)	0.31918	0.0778	0.02068	0.08692

**Tabelle 23:** P-Wert NLRP3-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive während des Experiments verstorbenen Mäuse

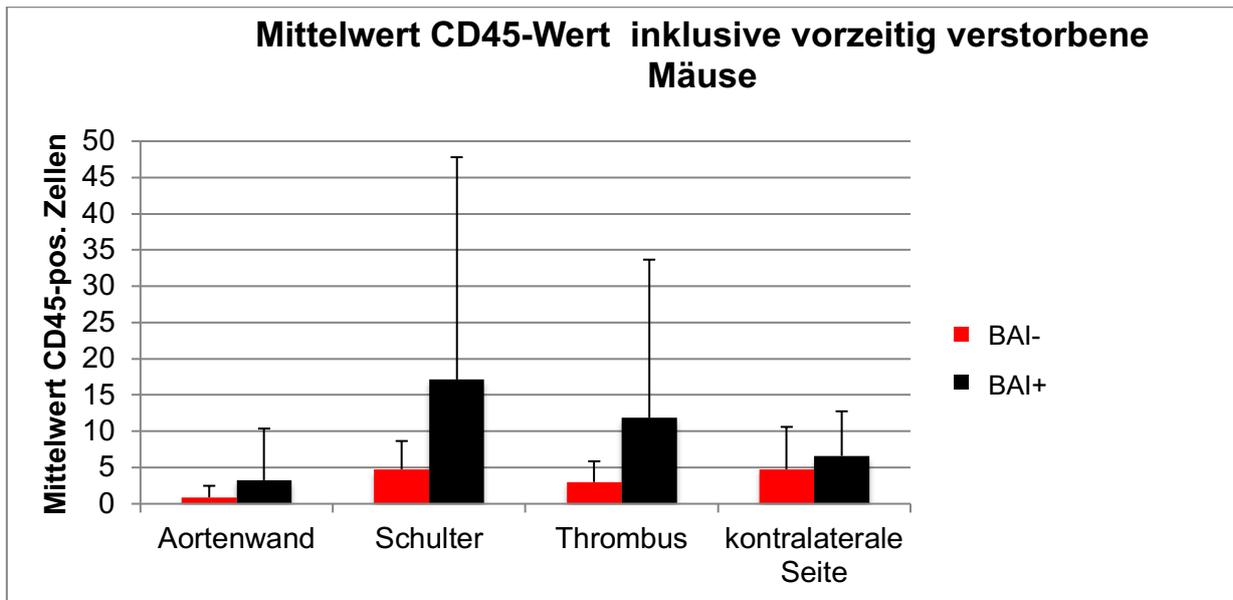
<b>P-Wert NLRP3-positiver Zellen in der Aorta aller Mäuse inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse</b>				
T-Test	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
NLRP3 (P-Wert)	0.3313	0.2632	0	0.6941

**Tabelle 24:** P-Wert apoptotischer Zellen in der Aorta aller Mäuse ohne vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse

<b>P-Wert apoptotischer Zellen in der Aorta aller Mäuse exklusive vorzeitig verstorbene Mäuse</b>				
T-Test	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
TUNEL (P-Wert)	0.78759	0.02881	0.69349	0.15518

**Tabelle 25:** Mittelwert der Auszählung der Leukozyteninfiltration (CD45-positiven Zellen)

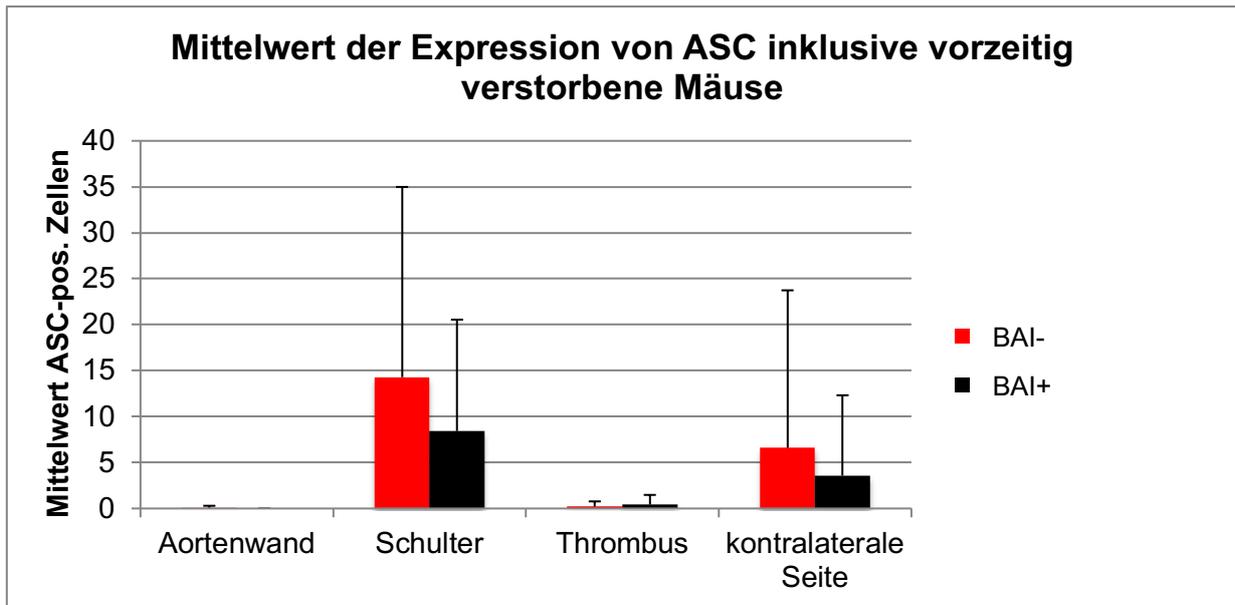
Mittelwert der Auszählung der Leukozyteninfiltration (CD45-positive Zellen)				
Gruppen	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
Ang II BAI-	0.88	4.77	3.00	4.77
Ang II BAI+	3.25	17.14	11.83	6.60



**Abbildung 49:** Mittelwerte der Anzahl CD45-positiver Zellen inklusive der vorzeitig während des Experimentes verstorbenen Mäuse ( $\pm$  Standardabweichung)

**Tabelle 26:** Mittelwert der Expression von ASC inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse

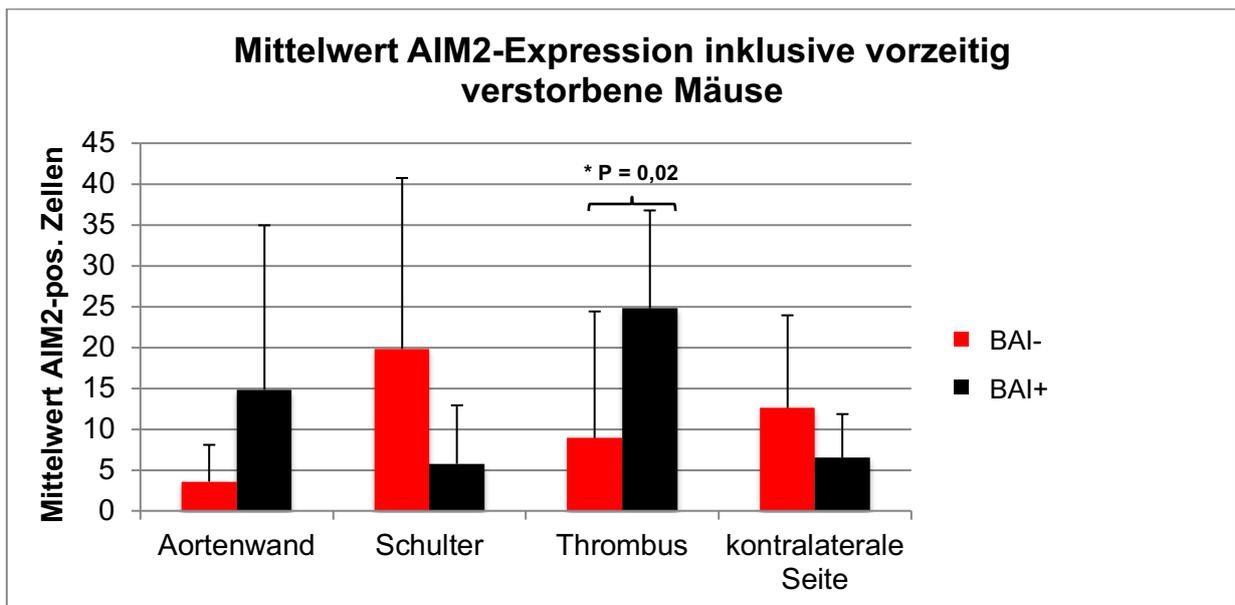
Mittelwert der Expression von ASC (ASC-positive Zellen)				
Gruppen	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
Ang II BAI-	0.06	14.29	0.21	6.60
Ang II BAI+	0.00	8.43	0.43	3.57



**Abbildung 50:** Mittelwerte der Anzahl ASC-positiver Zellen inklusive vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse ( $\pm$  Standardabweichung)

**Tabelle 27:** Mittelwert der Expression von AIM2 inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse

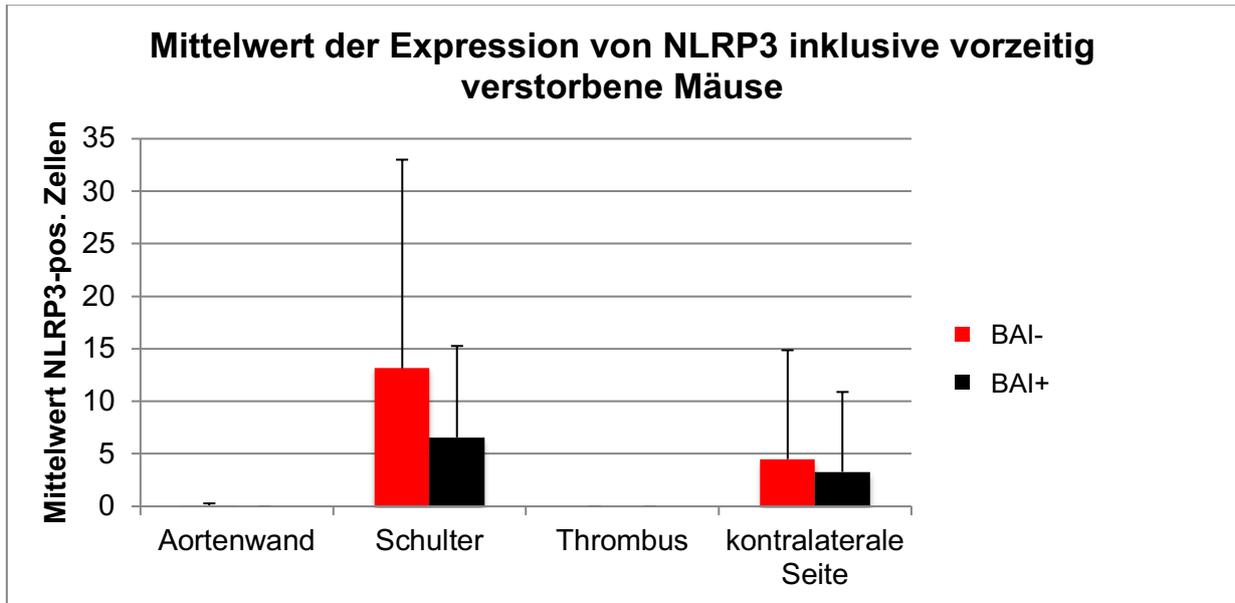
Mittelwert der Expression von AIM2 (AIM2-positive Zellen)				
Gruppen	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
Ang II BAI-	3.58	19.83	8.91	12.58
Ang II BAI+	14.83	5.75	24.80	5.40



**Abbildung 51:** Mittelwerte der Anzahl AIM2-positiver Zellen inklusive vorzeitig während des Experiments verstorbenen Mäuse ( $\pm$  Standardabweichung)

**Tabelle 28:** Mittelwert der Expression von NLRP3 inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse

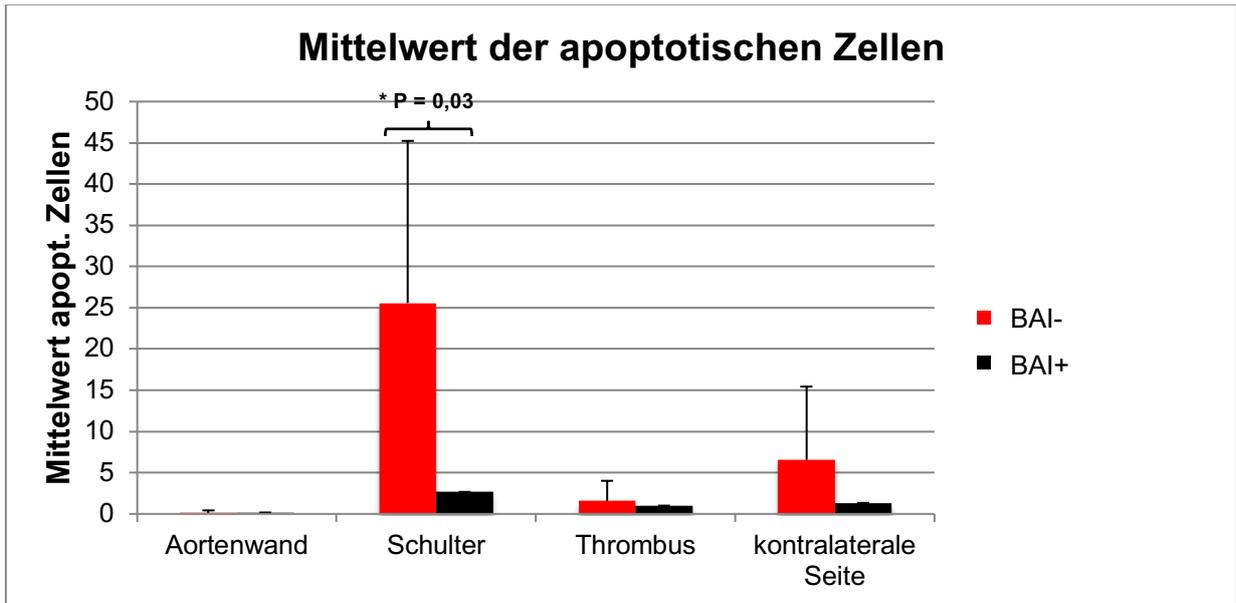
Mittelwert der Expression von NLRP3 (NLRP3-positive Zellen)				
Gruppen	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
Ang II BAI-	0.06	13.14	0.00	4.50
Ang II BAI+	0.00	6.57	0.00	3.29



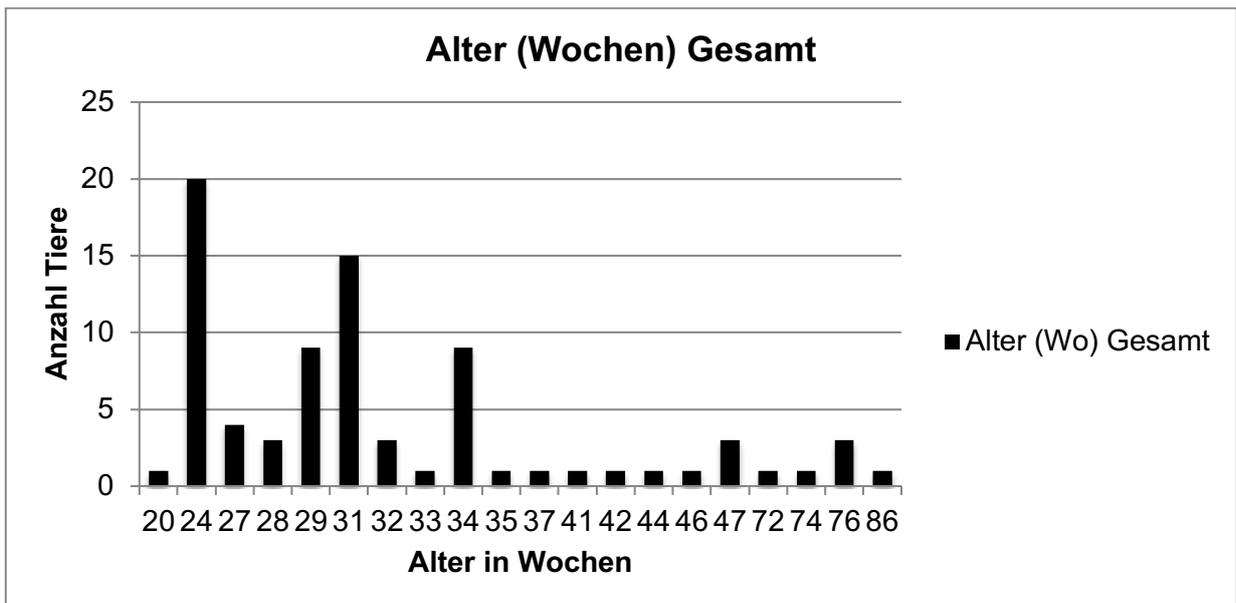
**Abbildung 52:** Mittelwerte der Anzahl NLRP3-positiver Zellen inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse ( $\pm$  Standardabweichung)

**Tabelle 29:** Mittelwert der apoptotischen Zellen inklusive vorzeitig verstorbene Mäuse

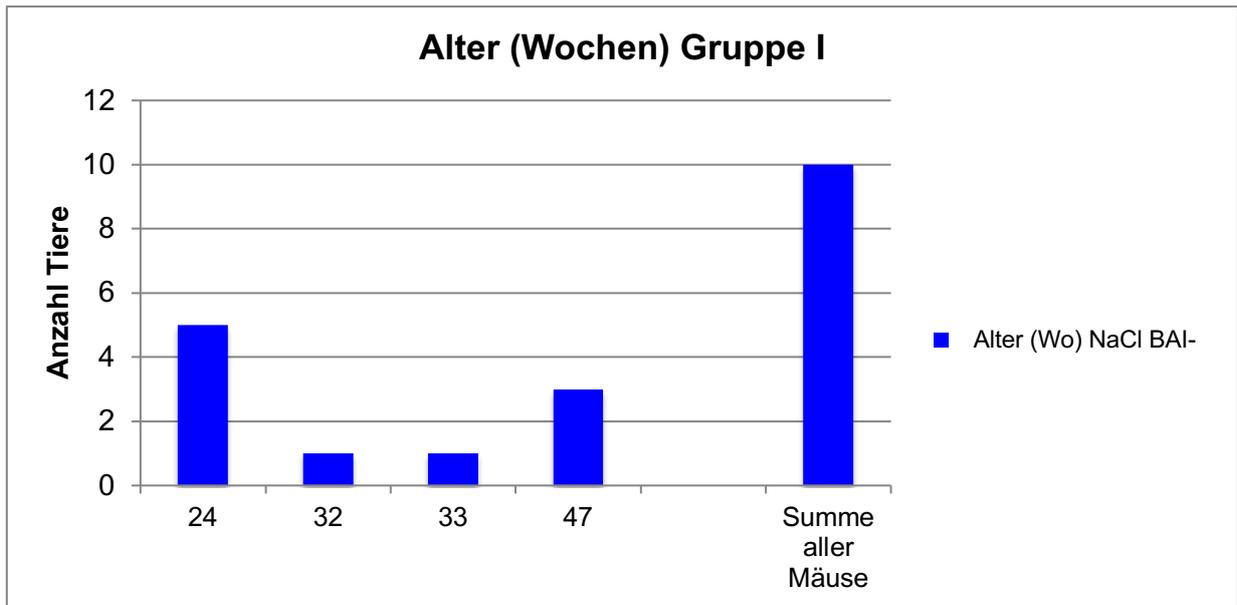
Mittelwert der apoptotischen Zellen				
Gruppen	Aortenwand	Schulter	Thrombus	kontralaterale Seite
Ang II BAI-	0.11	25.57	1.57	6.56
Ang II BAI+	0.17	2.67	1.00	1.33



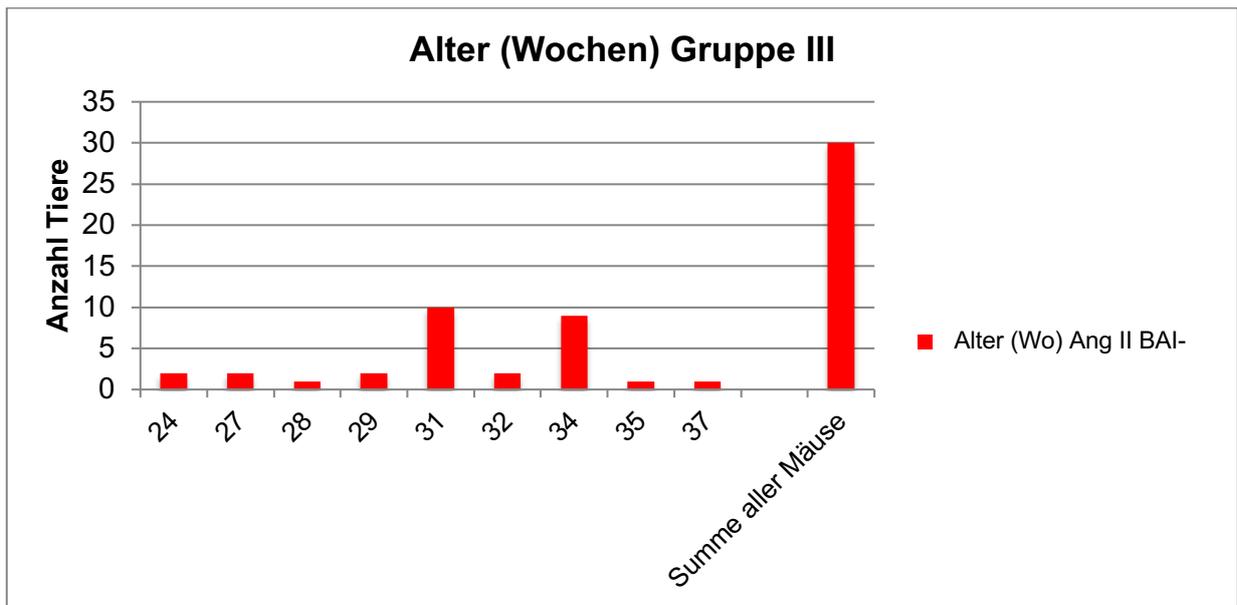
**Abbildung 53:** Mittelwert der Anzahl TUNEL-positiver (apoptotischer) Zellen ( $\pm$  Standardabweichung)



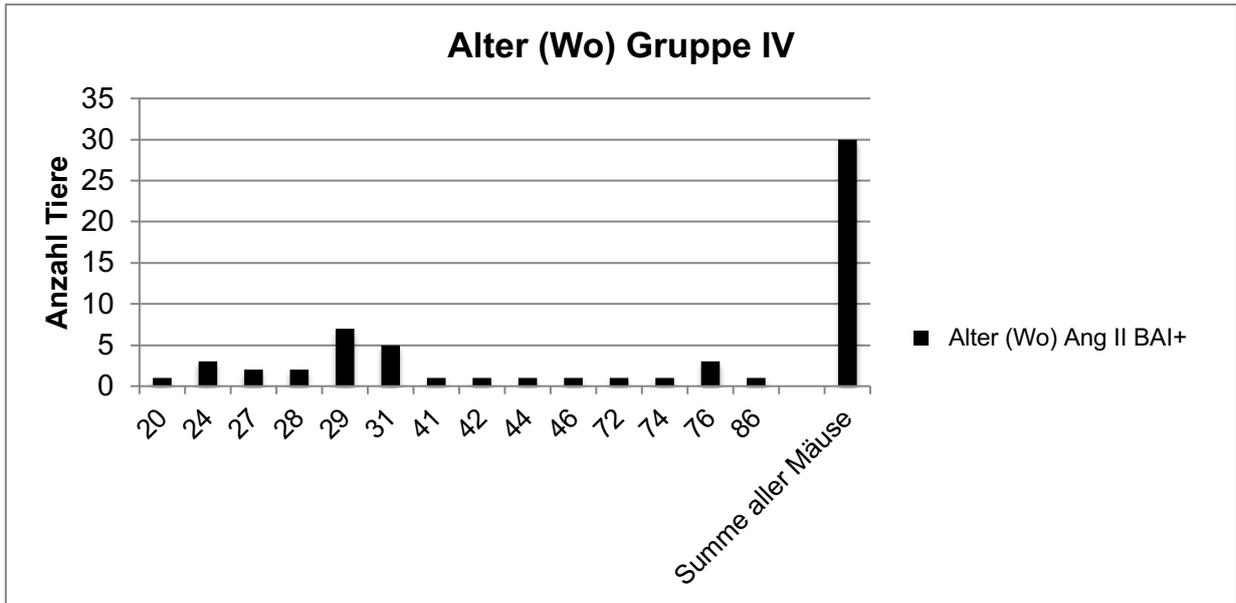
**Abbildung 54:** Altersverteilung in Wochen Gesamt



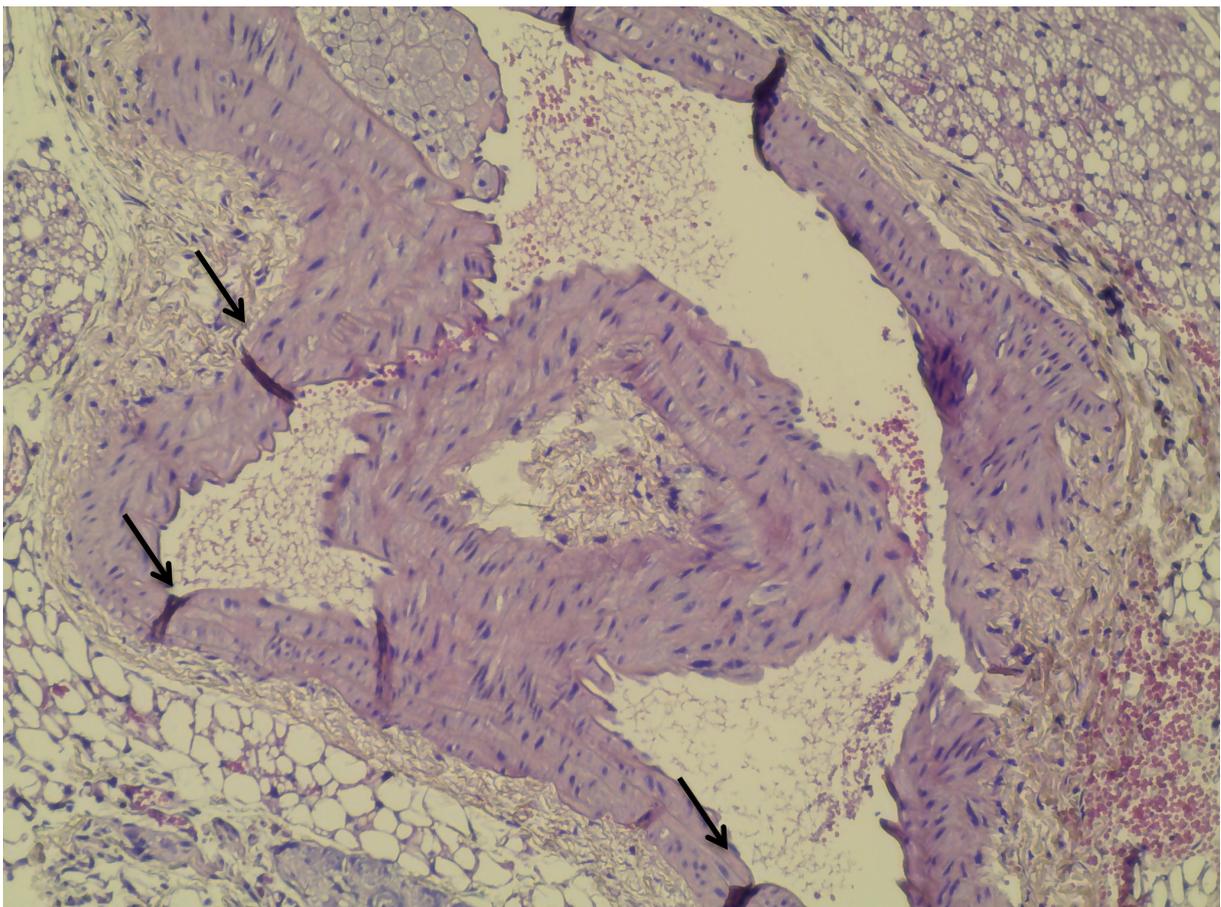
**Abbildung 55** Altersverteilung in Wochen der Gruppe NaCl BAI- und Gesamtanzahl Gruppe NaCl BAI-



**Abbildung 56:** Altersverteilung in Wochen der Gruppe Ang II BAI- und Gesamtanzahl Gruppe Ang II BAI-

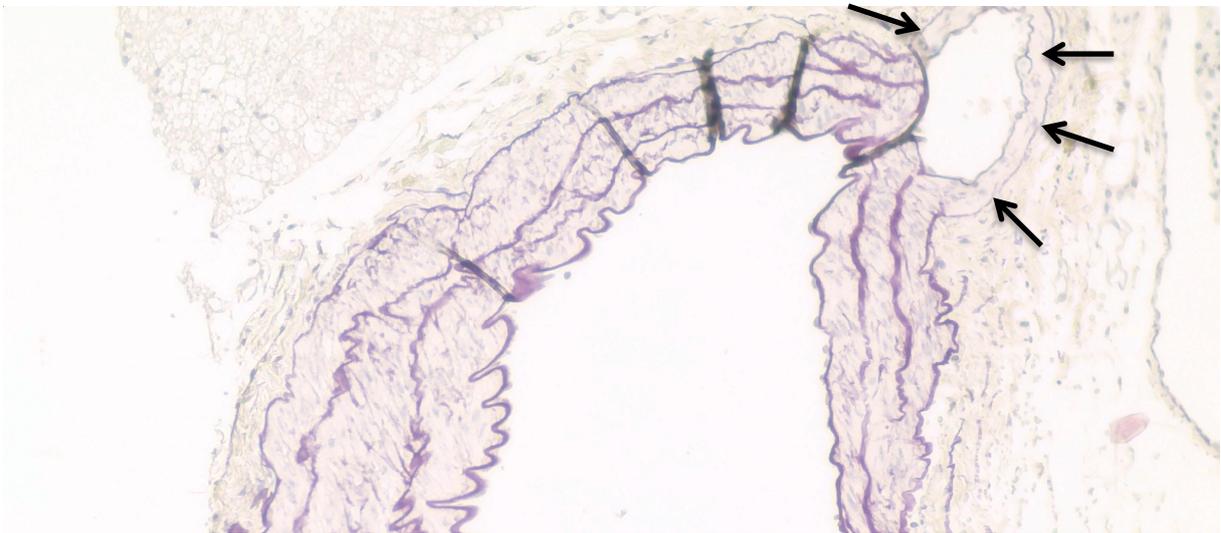


**Abbildung 57:** Altersverteilung in Wochen der Gruppe Ang II BAI+ und Gesamtanzahl Gruppe Ang II BAI+



**Abbildung 58:** Artefakte (Pfeile) in einem HE gefärbten Schnitt

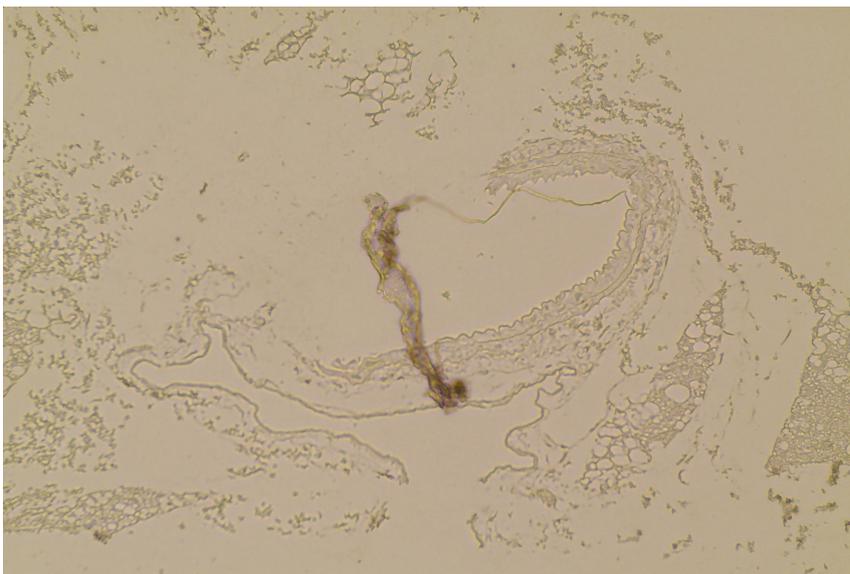
Bei den in Abbildung 58 dargestellten Artefakten handelt es sich um Knicke, die durch das Aufziehen des wenige  $\mu\text{m}$  dicken Präparatschnittes auf einen Objektträger entstehen. Diese Artefakte sind leider nicht zu vermeiden.



**Abbildung 59:** Artefakt (Pfeile) in einem HE gefärbten Schnitt.

Bei dem in Abbildung 59 dargestellten Artefakt handelt es sich um einen Gefäßabgang, der eine Beurteilung der Media und deren Verlauf erschwert.

Bei Schnitten, die unvollständig waren, machte der fehlende Anteil die Beurteilung des Schnittes unmöglich (Abbildung 60).



**Abbildung 60:** Unvollständiges Gefäß in einem ungefärbten Präparat

## Publikationen

Eine Vorveröffentlichung von Daten aus dieser Dissertation fand im Rahmen verschiedener Vorstellungen des Themas statt.

- Poster Präsentation auf dem Heidelberger Promotionskongress der Medizinischen Fakultät Heidelberg am 29.04.2017.  
Titel: **Inflammatorische Zellen und Mediatoren bei der Entstehung des Aortenaneurysmas der Maus**  
Autoren: Adrian Abele, Markus Wortmann, Maani Hakimi, Susanne Dihlmann  
Veröffentlicht wurden Daten, Methoden und Ergebnisse aus dieser Doktorarbeit.
- Präsentation auf dem DGG Jahreskongress in Frankfurt am Main am 29.09.2017 durch Dr. M. Wortmann.  
Titel: „**Der Einfluss der 12/15 Lipoxigenase auf die Entstehung des Aortenaneurysmas im Mausmodell**“  
Autoren: M. Wortmann, M. Hakimi, A. Abele, D. Böckler, S. Dihlmann  
Hierbei wurden Daten, Methoden und P-Werte der Ergebnisse aus dieser Doktorarbeit verwendet.
- Präsentation auf den 22. Chirurgischen Forschungstagen 2018 in Erlangen am 06.09.2018 durch Dr. M. Wortmann.  
Titel: „**Der Einfluss der 12/15 Lipoxigenase auf die Entstehung des Aortenaneurysmas im Mausmodell**“  
Autoren: M. Wortmann, M. Hakimi, A. Abele, D. Böckler, S. Dihlmann  
Hierbei wurden Daten, Methoden und P-Werte der Ergebnisse aus dieser Doktorarbeit verwendet.

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben:

Mein besonderer Dank gilt der Laborleiterin des Forschungslabors der Klinik für Gefäßchirurgie und Endovaskuläre Chirurgie Heidelberg Frau Prof. Dr. rer. nat. Susanne Dihlmann für die Unterstützung bei Fragen und dem Gedankenaustausch bei komplizierten Sachverhalten, sowie für die hilfreichen und konstruktiven Vorschläge und Korrekturen bei der Verfassung dieser Arbeit und das immer offene Ohr.

Mein Dank gilt auch meinem Erstgutachter Herrn PD Dr. rer. nat. Christoph Gabler für seine genauen und ausführlichen konstruktiven Vorschläge und Korrekturen bei der Verfassung dieser Arbeit und die Möglichkeit zum ausführlichen Gedankenaustausch.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Dr. med. Markus Wortmann und Frau Anja Spieler für die ausführliche Einarbeitung im Labor und die zuvorkommende Hilfe bei allen Fragen und Problemen bedanken, sowie bei Herrn Dr. med. Markus Wortmann für die Bereitschaft als Second Observer zu dienen.

Beim Ärztlicher Direktor der Klinik für Gefäßchirurgie und Endovaskuläre Chirurgie Heidelberg, Prof. Dr. med. Dittmar Böckler und bei Prof. Dr. med. Maani Hakimi bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Ebenso möchte ich den Mitarbeitern der Klinik für Gefäßchirurgie und Endovaskuläre Chirurgie Heidelberg für die gute Aufnahme sowie die anregende und angenehme Atmosphäre danken.

Dem klinisch experimentellen Bereich (KEB) der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung Heidelberg danke ich für die Versorgung der Tiere und die gute Zusammenarbeit und Kommunikation.

Dankzusagen gilt es auch der Belegschaft des Landratsamtes Hildburghausen im Besonderen meinen Mitarbeitern im Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt für das Durchhalten in Zeiten meiner Abwesenheit.

Vor allem aber danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Dr. Raimund und Tatjana Abele, meinem Bruder Fabian und meiner Großmutter Klothilde Abele, dass Sie diesen Schritt stets mitgetragen hat. Ihr wart mir stets Inspiration, Ausgleich und Unterstützung.

Zuletzt möchte ich meinem Großvater Rolf Zimmermann gedenken, der immer an mich und die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt hat.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 16.08.2021

Adrian A. Abele











9 783967 291322

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-132-2