

Aus dem der Klinik für Medizin mit Schwerpunkt Kardiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Auswirkungen einer Rosuvastatintherapie  
auf Arteriogenese und Atherosklerose  
bei ApoE-knock-out-Mäusen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felix Hedwig

aus Marburg/Lahn

Gutachter/in:     1. Priv.-Doz. Dr. med. I. Buschmann  
                          2. Prof. Dr. med. R. Büchsel  
                          3. Prof. Dr. med. K.-L. Schulte

Datum der Promotion: 30.11.2012

**Meinen Eltern**

**Elka und Armin Hedwig**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Arteriogenese .....	2
1.2	Atherosklerose .....	5
1.3	Lipidstoffwechsel.....	7
1.4	Statine .....	9
1.5	ApoE -/- Mäuse.....	12
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>14</b>
3.1.1	Geräte .....	14
3.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	14
3.1.3	Reagenzien .....	15
3.1.4	Antikörper .....	16
3.1.5	Software .....	17
3.1.6	Tiere .....	17
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>17</b>
3.2.1	Operation.....	18
3.2.2	Behandlung .....	19
3.2.3	Perfusion .....	19
3.2.4	Berechnung der hämodynamischen Parameter .....	20
3.2.5	Gewebeasservierung .....	21
3.2.6	FACS .....	21
3.2.7	Sudanfärbung.....	22
3.2.8	Histologie .....	22
3.2.9	Quantifizierung.....	24
3.2.10	Statistik .....	25
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss auf die Arteriogenese</b> .....	<b>26</b>
4.1.1	Perfusionsmessung .....	26
4.1.2	Perivaskuläre Monozyteninfiltration .....	27
<b>4.2</b>	<b>Einfluss auf die Atherogenese</b> .....	<b>28</b>
4.2.1	Plaqueeoberfläche .....	28
4.2.2	Plaquezusammensetzung .....	29
<b>4.3</b>	<b>Einfluss auf Endotheliale Vorläuferzellen</b> .....	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>32</b>

<b>5.1</b>	<b>Atherosklerose .....</b>	<b>32</b>
5.1.1	Einfluss durch Statine .....	33
5.1.2	Endothel .....	34
<b>5.2</b>	<b>Arteriogenese .....</b>	<b>35</b>
5.2.1	Einfluss durch Statine .....	35
5.2.2	Endothel .....	36
5.2.3	Glatte Muskelzellen .....	37
5.2.4	Matrix .....	37
5.2.5	Monozyten/Makrophagen .....	38
<b>6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>49</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>51</b>
<b>11</b>	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>52</b>

# 1 Einleitung

Die Behandlung von arteriellen Verschlusskrankheiten (pAVK, KHK) und ihren Folgen ist ein zentrales Thema der modernen Medizin<sup>1</sup>.

Trotz der bedeutenden Erfolge, die in den letzten Jahrzehnten bei der Bekämpfung dieser Krankheiten erzielt werden konnten, steigt deren Prävalenz weltweit an<sup>2</sup>. Die Senkung der Mortalität und vor allem der Morbidität mit Hinblick auf eine Lebensqualitätsverbesserung muss somit auch weiterhin Fokus der aktuellen medizinischen Forschung bleiben.

Für die Pathogenese von arteriellen Verschlusskrankheiten und deren fatale Folgen, wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder akute Extremitätenischämie, spielt die Entstehung von Atherosklerose eine zentrale Rolle. Neben einer Umstellung der Lebensweise ist die Beeinflussung des Risikoprofils durch medikamentöse Therapie ein wichtiger Aspekt zur primären und sekundären Prävention. Neben Acetylsalicylsäure zur Verhinderung thrombotischer Gefäßverschlüsse, sowie der Gruppe der Antihypertensiva, sind die seit den späten 1980er Jahren verfügbaren Statine zur Behandlung der Dyslipoproteinämie die wirkungsvollste Medikamentengruppe bezüglich der Senkung von Mortalität und Morbidität<sup>3</sup>.

Wie bei vielen anderen Krankheiten besitzt der Körper auch bei Gefäßverschlüssen eine Vielzahl von eigenen Reparaturmechanismen. Eine zentrale Rolle zur Aufrechterhaltung der Perfusion und somit der Versorgung des distal des Verschlusses liegenden Gewebes spielt dabei die Ausbildung von Kollateralkreisläufen<sup>4</sup>.

Diesen als Arteriogenese bekannten Mechanismus, in Abgrenzung zur Angiogenese und Vaskulogenese, zu fördern und zu beschleunigen ist das Interesse neuester Forschungsarbeit.

Die hierbei zugrunde liegenden Vorgänge, die eine präexistierende Kollaterale von der Größe einer Arteriole zu einer funktionellen Arterie umwandeln, werden zurzeit intensiv untersucht.

Bei Arbeiten zur Stimulation der Arteriogenese zeigte sich allerdings, dass dies auch die Entwicklung von Atherosklerose fördern kann, da beide Prozesse sich in einigen wichtigen grundlegenden Mechanismen, insbesondere hinsichtlich der bedeutenden Rolle inflammatorischer Mediatoren, überschneiden<sup>5</sup>.

Das Wissen um diese wichtige Nebenwirkung einer proarteriogenen Therapie auf die Atherogenese ließ die Frage aufkommen, welche Auswirkungen eine antiatherogene Therapie auf den Vorgang der Arteriogenese hat. Hier ist zum einen eine hemmende Wirkung über die Mechanismen der Inflammation denkbar. Gleichzeitig ist aber auch eine positive Beeinflussung auf die Perfusionsverhältnisse durch die Therapie der Hypercholesterinämie zu erwarten.

Die Auswirkung eines Statins, einem in der Praxis inzwischen zum Routinemedikament avancierten Pharmakon, auf die Arteriogenese, ist Ziel dieser Arbeit.

## 1.1 Arteriogenese

Den Umbau präexistenter Kollateralarteriolen zu gewebeversorgenden Kapazitätsgefäßen bezeichnet man als Arteriogenese.

Obwohl es sich bei der Arteriogenese per Definition nicht im wörtlichen Sinne um eine de-novo Genese von Arterien handelt, führt sie doch zur Entstehung von arteriellen Konduktanzgefäßen aus kleinen anastomosierenden Gefäßen. Die Arteriogenese unterscheidet sich in einigen wichtigen funktionellen Aspekten von Angiogenese und Vaskulogenese, teilt sich mit ihnen jedoch auch viele basale Mechanismen, wie die adaptive Zellproliferation<sup>6</sup>.

Arteriogenese ist der wichtigste körpereigene Mechanismus, um die durch einen arteriellen Verschluss bedrohten Gewebeareale vor kritischer Ischämie zu bewahren und den Zellen die zum Überleben notwendigen Nährstoffe und Sauerstoff zukommen zu lassen.

Von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität der Kollateralarterien ist die Radiuszunahme des Lumens. Gemäß dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz geht dieser mit der vierfachen Potenz in die Leitfähigkeit ein. Eine geringe Größenzunahme resultiert somit in einer erheblichen Verbesserung der Konduktanz. Nur so können die durch einen Verschluss ausgefallenen Kapazitätsgefäße ersetzt werden. Schon rein rechnerisch ist die Ausbildung eines kapillaren Netzwerkes durch Angiogenese kaum in der Lage, die benötigten Blutmengen zu transportieren<sup>7</sup>.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Angiogenese und Arteriogenese ist die Bedeutung der Hypoxie. Der hierbei verringerte Sauerstoffpartialdruck im Gewebe ist ein starker Stimulus für die Angiogenese. Die Rolle der Hypoxie während der Arteriogenese ist hingegen nicht eindeutig geklärt. Hypoxie und/oder Ischämie sind jedoch sicher nicht zwingend notwendig für eine effektive Arteriogenese<sup>8</sup>. Wichtigster Stimulus für die Arteriogenese ist ein anderer Prozess: distal eines Verschlusses kommt es zu einer Perfusionsdruckminderung und somit zu einer Zunahme des Druckgradienten über der Stenose. Als Folge des dadurch erhöhten Blutflusses in den präexistierenden Kollateralgefäßen kommt es zu einer Zunahme der Scherkraftbelastung der Gefäßendothelzellen. Dies bewirkt zum einen über eine NO-vermittelte Vasodilatation die Ausschöpfung der kurzfristig verfügbaren Perfusionsreserve. Des Weiteren wird durch extrazelluläre Integrine<sup>9</sup> über F-actin eine Signaltransduktion vermittelt<sup>10</sup>, die eine Reihe von Transkriptionsfaktoren beeinflusst<sup>11</sup> und es der Endothelzelle so ermöglicht, spezifisch auf den Scherstress zu reagieren.

Eine Schlüsselrolle im weiteren Verlauf spielen zirkulierende Monozyten. Diese werden von der Endothelzelle durch MCP-1 Sekretion chemotaktisch angelockt<sup>12</sup>. Über den Rezeptor CCR-2<sup>13</sup> bewirkt dieses Chemokin bei den Monozyten eine vermehrte Präsentation von Integrinen. Die so verbesserte Zell-Zell-Interaktion führt zunächst zum sogenannten „Rolling“. Durch vermehrte Präsentation von Selektinen und eine gesteigerte ICAM und VCAM Expression<sup>14</sup> der Endothelzellen wird dann über Mac-1<sup>15</sup> und LFA-1 eine enge Adhäsion aufgebaut<sup>16</sup>. Geleitet durch die Integrine und durch Sekretion proteolytischer Faktoren kommt es schließlich zur Migration in den perivaskulären Raum<sup>17</sup>. Hier beginnen sie, weitere Zellen zu rekrutieren. Durch Sekretion von Chemokinen wie MCP-1 und TNF-alpha kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion<sup>18</sup>. Über GM-CSF wird die Lebensspanne der migrierten Makrophagen verlängert<sup>19</sup>. Dieses Milieu bildet eine wichtige Grundlage zum Umbau der Arteriole in eine Arterie. Die von Makrophagen freigesetzten Matrixmetalloproteasen<sup>20</sup> sorgen durch Degradierung der kollagenen Matrix des Gefäßbettes und des umgebenden Gewebes für den für die Proliferation benötigten Platz. Außerdem regen Makrophagen die Zellen der Gefäßwand zur Proliferation an. Das Zytokin TGF-beta ist hier ein wichtiger Faktor für die Teilung von vaskulären Myozyten<sup>21</sup>.

Mit der Vergrößerung des Durchmessers nimmt die Konduktanz des Gefäßes zu. Der Druckgradient fällt und somit auch die auf das Endothel wirkende Scherkraft. Der Vorgang terminiert sich somit selbst, wenn das kollaterale Gefäß eine gewisse Größe erreicht hat<sup>22</sup>.

Dabei kommt es allerdings nicht zu einer vollständigen Wiederherstellung der Konduktanz im Vergleich zur normalen Situation. Der Wiederherstellungsgrad ist bei unterschiedlichen Spezies sehr verschieden.<sup>23;24</sup>

Zusätzlich ist nicht nur die maximale, sondern auch die schnellstmögliche Wiederherstellung der Durchblutung nötig, um das Gewebe vor Nekrose zu schützen. Für einen therapeutischen Nutzen sollte eine Beeinflussung der Arteriogenese folglich diesen Parameter beinhalten.

1997 gelang es Ito et al. in einem Tiermodell der artifiziellen Gefäßokklusion den Spontanverlauf zu stimulieren<sup>25</sup>. Durch die Ligatur der Femoralarterie im Kaninchenhinterlauf simulierte man den spontanen Gefäßverschluss. Eine lokale Infusion von MCP-1 führte zu einer signifikanten Verbesserung der Perfusionswiederherstellung.

Neben MCP-1 konnte auch für die Applikation von TGF-beta ein pro-arteriogener Effekt nachgewiesen werden<sup>26</sup>. Ähnlich wie bei dem sehr monozytenspezifischen MCP-1, kommt es zu einer starken Zunahme der monozytären Adhäsion an Endothelzellen. Ebenso zeigt sich eine Zunahme der in den perivaskulären Raum transmigrierten Monozyten. Den bisher größten Effekt zeigte eine Kombinationstherapie aus MCP-1 und GM-CSF<sup>27</sup>. Letzteres amplifiziert die durch MCP-1 vermehrte Makrophagenanhäufung über eine verlängerte Lebensdauer dieser Zellen.

Van Royen et al. zeigten aber, dass durch die Beeinflussung von Makrophagen mittels MCP-1 der Prozess der Atherosklerose beschleunigt wird<sup>28</sup>. Ein klinischer Einsatz dieses ansonsten stärksten arteriogenen Faktors ist somit obsolet.

Die pro-arteriogene Wirkung des Makrophagen stimulierenden Faktors GM-CSF wurde dagegen bereits in einer Pilotstudie an pAVK-Patienten untersucht<sup>29</sup>. Im Patientenkollektiv mit mittlerer bis schwerer Ausbildung der Krankheit konnte bei subkutaner Applikation dieses pro-arteriogenen Faktors allerdings keine signifikante Verbesserung der Gehstrecke beobachtet werden. Ergebnisse von Seiler et al. zeigen aber bei Koronarpatienten einen positiven Effekt für GM-CSF<sup>30</sup>.

## 1.2 Atherosklerose

Die Begriffe Atherosklerose und die oft synonym verwandte Arteriosklerose beschreiben einen Umbauvorgang in arteriellen Gefäßen, der zur Einengung oder Verschluss des Gefäßlumens führt. Im Menschen führt dies je nach Endorgan zu Ereignissen wie Angina Pectoris, Myokardinfarkt, Schlaganfall oder pAVK.

Die Entstehung der atherosklerotischen Veränderungen und die Voraussetzungen sowie ihre prädisponierenden Risikofaktoren sind Gegenstand jahrelanger Forschungsarbeit und unterliegen ständigem Zuwachs an neuen Erkenntnissen aber auch Revisionen von aufgestellten Hypothesen.

Der derzeitige Stand der Forschung beschreibt die Atherosklerose als eine entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäße<sup>31</sup>.

Wichtige Reize sind dabei z.B. veränderte Scherkräfte durch Turbulenzen im Gefäß bei bogenförmigem Verlauf oder Aufzweigungen. Des Weiteren spielen Noxe wie Nikotin oder die Erhöhung von Blutplasmabestandteilen wie Homocystein und Harnsäure und vor allem eine Störung der Lipoproteinhomeostase eine große Rolle.

Nach der *Response-to-injury* Hypothese kommt es in den Endothelzellen durch die oben genannten Reize zu einer Schädigung, die den inflammatorischen Prozess in Gang setzt<sup>32</sup>.

Durch eine vermehrte Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und P-Selektin<sup>33</sup> sowie eine gesteigerte Gefäßpermeabilität durch Endothelin und PDGF<sup>34</sup> kommt es zur Adhäsion und schließlich zur Migration von zirkulierenden Monozyten und anderer inflammatorischer Zellen. Hier im subintimalen Raum werden die Makrophagen durch das Phagozytieren von LDL und ox-LDL<sup>35</sup> aktiviert und sezernieren ihrerseits Zytokine (MCP-1, TGF-beta) die weitere Makrophagen zur Migration anregen<sup>36;37</sup>.

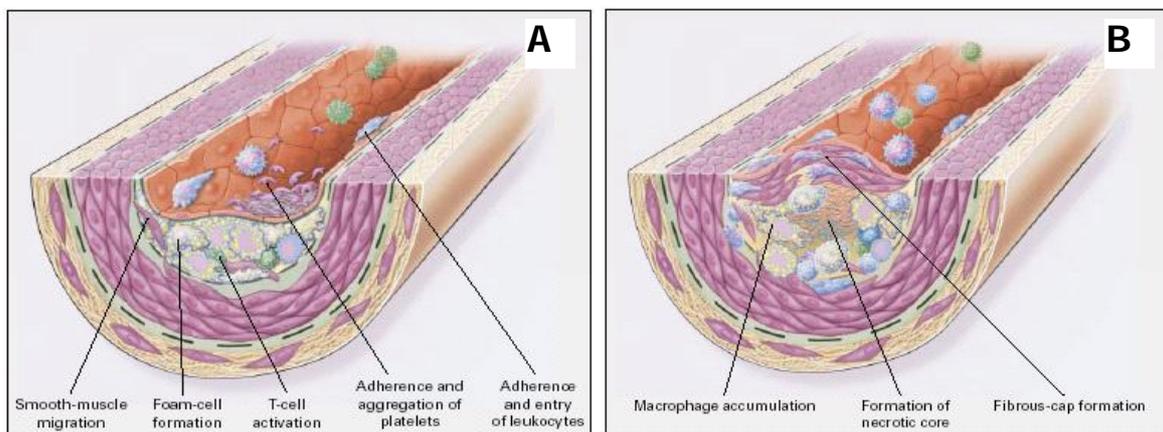
Die fehlende Möglichkeit zum Abbau vor allem des ox-LDL führt zu einer Akkumulation der Lipide und Ausbildung eines schaumzelligen Makrophagenphänotyps mit dem pathomorphologischen Korrelat sogenannter *fatty streaks*<sup>38</sup>.

Durch weitere Akkumulation von Makrophagen, T-Zellen und die Aktivierung von myoepithelialen Zellen kommt es zur Ausbildung einer fortgeschrittenen Läsion. Diese ist

charakterisiert durch eine aus Kollagenfasern und Myozyten gebildete Kapsel und einem aus degenerierten Schaumzellen, Lipiden und inflammatorischen Zellen bestehendem Kern<sup>39</sup>.

Je nach Anteil dieser zwei Komponenten kann sich die atherosklerotische Plaque durch den fibrösen Mantel stabilisieren, oder aber bei Akzeleration der entzündlichen Komponente durch Degradierung mittels Matrixmetalloproteinasen<sup>40</sup> und Abnahme der glatten Muskelzellen<sup>41</sup> in der Plaquekapsel instabil werden und schließlich rupturieren<sup>39</sup>.

Hierdurch kommt es zur Präsentation von pro-thrombotischem Material, Adhäsion von Thrombozyten, Aktivierung des Gerinnungssystems und im schlimmsten Fall zu einem akuten Verschluss des Gefäßes.



**Abbildung 1**

A: *Fatty streaks*-Bildung durch Invasion lipidbeladener Monozyten/Makrophagen (*foam cells*) mit beginnender Migration glatter Muskulatur (*smooth-muscle migration*). B: Fortgeschrittene Läsion mit Makrophagenakkumulation (*macrophage accumulation*) unter Bildung eines nekrotischen Kerns (*necrotic core*) mit fibröser Kappe (*fibrous-cap*). Modifiziert nach Ross (1999)<sup>31</sup> unter Belassung der englischsprachigen Beschriftung.

Diese Balance zu verschieben und den atherosklerotischen Prozess zu verlangsamen oder gar aufzuhalten, ist heute eines der wichtigsten Ziele der modernen Medizin. Als von herausragender Bedeutung für die Einschränkung der Progression von atherosklerotischen Plaques hat sich die Minimierung oder Ausschaltung der Risikofaktoren erwiesen. Neben dem antithrombotisch/anti-inflammatorischen Ansatz der Acetylsalicylsäure hat sich die Senkung des Cholesterinspiegels, insbesondere des LDL-Anteils und die Balancierung einer Dyslipoproteinämie als äußerst wirkungsvoll erwiesen<sup>42</sup>.

Ein anderer Ansatz ist es, die stabilisierenden Faktoren zu unterstützen. Neue und intakte Endothelzellen können atherosklerotische Plaques stabilisieren und den entzündlichen Prozess verlangsamen oder gar aufhalten. Aus Stammzellen hervorgegangene endotheliale Vorläuferzellen (EPC) könnten somit einen anti-atherogenen Effekt ausüben. Die Wirkung von Pharmakotherapien auf den EPC-Spiegel könnte ein Surogatmarker für atherogene oder antiatherogene Eigenschaften eines Medikamentes sein<sup>43</sup>.

### 1.3 Lipidstoffwechsel

Exogene und endogene Lipide werden im Blut in Form von Lipoproteinen transportiert. Sie bestehen aus freien Fettsäuren, Triglyzeriden, Phospholipiden, freiem und verestertem Cholesterin sowie amphiphilen Apolipoproteinen. Diese Partikel werden ihrer Dichte entsprechend unterteilt. Partikel mit sehr geringer Dichte werden als VLDL bezeichnet (*Very-Low-Density Lipoprotein*), solche mit hoher Dichte HDL (*High-Density Lipoprotein*). Des Weiteren werden sie in solche mit mittlerer Dichte (*Intermediate-Density Lipoprotein*, IDL) und geringer Dichte (*Low-Density Lipoprotein*, LDL) unterteilt.

Über den Darm aufgenommene Fette werden über Chylomikronen durch den *ductus thoracicus* in den Blutkreislauf transportiert und dort von Endothel-, Fett- oder Muskelzellen aufgenommen. Die verbleibenden *Remnants* haben eine kurze Halbwertszeit und werden schnell abgebaut.

Lipoprotein	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Größe (nm)	100-1000	30-70	-	15-25	5-12
Dichte (g/ml)	0,93	0,93- 1,006	-	1,019- 1,063	1,063- 1,21
Lipid/Protein- Verhältnis	99/1	90/10	-	78/22	50/50
Cholesterin %	5	19	-	50	19
Triacylglycerine %	86	55	-	6	4
Apoproteine	E, B48, CII	B100, CII,E	CII, E	B100,E	AI

**Tabelle 1**

Lipoproteine, ihre Größe, Dichte, ihr Lipid/ProteinVerhältnis, Cholesteringehalt, Triacylglycerine und die wichtigsten Apoproteine im Vergleich.

Die Gruppe der VLDL wird in der Leber aus Triglyzeriden und Cholesterin, die aus der Blutbahn aufgenommen werden, synthetisiert. Periphere Zellen hydrolysieren mittels der Lipoproteinlipase aus den VLDL die Fettsäuren und nehmen sie auf. Es verbleiben IDL, die zum einen wieder von der Leber aufgenommen werden oder durch weitere Verstoffwechslung zu LDL-Partikeln umgebaut werden. Diese haben nun einen hohen Anteil an Cholesterinestern und besitzen dazu eine längere Halbwertszeit, so dass sie etwa zwei Drittel des Plasmacholesteringehaltes ausmachen.

Hohe LDL-Konzentrationen verhindern eine proteolytische Spaltung des *Sterol Responsive Element Binding Protein* (SREBP). Dies führt zu einer ungehinderten Caveolin-1 Transkription. Dieses Protein hat einen inhibierenden Effekt auf die endotheliale NO-Synthetase. NO als potenter Vasodilatator hat jedoch selbst einen anti-atherogenen Effekt<sup>44</sup>. Die erniedrigte Konzentration an NO führt somit zu einer Akzeleration des atherogenen Prozesses.

Freie Radikale oxidieren bei erhöhter LDL-Konzentration mehr dieser Lipoproteine. OxLDL aktiviert Makrophagen über den *Scavenger-Receptor*. Der entzündliche Prozess wird initiiert<sup>76;77</sup>.

HDL ist ein Lipoprotein, welches mit Hilfe des Lecitin-Cholesterin-Transferproteins in der Lage ist, freies Cholesterin zu verestern und im Kern zu binden. Ein so vermittelter

Abtransport aus der Gefäßwand scheint ein entscheidender Mechanismus für den anti-atherosklerotischen Effekt von HDL zu sein.

Das Metabolische Syndrom, welches mit einem sehr hohen Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert ist, zeigt sich unter anderem in einer Hyperlipoproteinämie. Wichtig dabei scheint aber vor allem zu sein, dass es zu einer Verschiebung der Partikelverhältnisse kommt: Hohe LDL-Konzentrationen kombiniert mit einem niedrigen HDL-Spiegel.

Neben dieser multifaktoriellen Variante gibt es einzelne genetische Defekte, die zu einer Hyperlipoproteinämie führen. Erkrankte können mitunter keine LDL-Rezeptoren ausbilden oder die Bindungsfähigkeit entscheidender Liganden, wie das ApoB oder ApoE, ist eingeschränkt.

## 1.4 Statine

Die Senkung des Serumcholesterinspiegels reduziert die Mortalität und Morbidität für kardiovaskuläre Erkrankungen. Der angestrebte Wert wurde im Laufe der Zeit immer weiter nach unten korrigiert und liegt heute, insbesondere für Hochrisikopatienten, zum Teil unter der 95%-Perzentile des Plasmaspiegels in der Durchschnittsbevölkerung<sup>45</sup>, so dass man hier heutzutage, ähnlich wie bei der arteriellen Hypertonie, oftmals den niedrigstmöglichen Plasmaspiegel anstrebt<sup>46</sup>.

Neben diätetischen Maßnahmen haben sich die medikamentöse Intervention mit Nikotinsäure oder gallensäurebindenden Substanzen und vor allem die direkte Hemmung der Cholesterinsynthese durch Statine als sehr effektiv erwiesen<sup>47</sup>.

Seit der Erstbeschreibung des aus einem *Penicillium*-Stamm isolierten Mevastatins (1976), wurden strukturelle Analoga, chemisch modifizierte Derivate, sowie synthetische Moleküle entdeckt bzw. entwickelt. Zu dem seit 1989 zugelassen Lovastatin sind heute z.B. Simvastatin, Pravastatin, Fluvastatin, Atorvastatin und Rosuvastatin als Medikamente zugelassen und im klinischen Alltag z.T. weit verbreitet. Sie vermögen aber nicht nur eine signifikante Senkung des Gesamtcholesterins, gelegentlich bewirken sie auch einen Anstieg des HDL-Spiegels.

Statine sind HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren. Aufgrund ihrer um drei Größenordnungen geringeren Dissoziationskonstante verdrängen sie das Substrat reversibel vom Enzym. Der so blockierte Schritt vom HMG-CoA zur Mevalonsäure ist der entscheidende und geschwindigkeitsbestimmende Schritt zur Synthese von Cholesterin (Schlüsselenzym). Konsekutiv kommt es zu einer Leerung spezieller intrazellulärer Steroidspeicher und zu einer gesteigerten LDL-Rezeptor-Expression vor allem in der Leber. LDL wird über die gesteigerte Rezeptorzahl vermehrt in die Zellen aufgenommen. Dies ist neben der geringeren Gesamtproduktion von Cholesterin der wichtigste Mechanismus zur Senkung des LDL-Spiegels im Blut.

Zusätzlich zu diesen anerkannten Effekten werden zunehmend zusätzliche Eigenschaften von Statinen diskutiert. Diese sogenannten pleiotropen Effekte werden zum einen zusätzlich für die anti-atherogenen Eigenschaften verantwortlich gemacht, zum anderen scheinen sie weitere Einsatzmöglichkeiten, wie z.B. in der Alzheimertherapie, aufzuzeigen<sup>48</sup>.

Dabei spielen die aus Mevalonsäure synthetisierten Proteine Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat eine entscheidende Rolle. Diese sind wichtig für die Synthese einer Proteinfamilie die Einfluss auf posttranslationale Modifikationen nimmt. Es handelt sich dabei um heterodimere G-Proteine; Heme-a; nucleare Lamine; und das kleine GTP-bindende Protein Ras sowie um Ras-ähnliche Proteine wie Roh, Rab und Rac. Dies führt zu Veränderungen in der Zelle bezüglich Form, Motilität, Sekretion und Proliferation.

So wurden für Statine sowohl immunmodulatorische Fähigkeiten als auch eine Einflussnahme auf Endothel- und glatte Muskelzellen sowie auf die Thrombozytenfunktion nachgewiesen.

Es hat sich gezeigt, dass Rosuvastatin den bisher auf dem Markt befindlichen HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren in seiner Fähigkeit zur LDL-Reduktion überlegen ist<sup>49</sup>. Außerdem zeigt es bei einer Dosierung von 5-40 mg/Tag ein großes Potential in der HDL-Erhöhung und Triglyzerid-Senkung. Doch auch wenn Rosuvastatin bis jetzt in der Nebenwirkungsrate gegenüber den anderen Statinen gut abschneidet, stehen Langzeitstudien für die Beurteilung der primären und sekundären Prävention von kardiovaskulären Ereignissen noch aus.

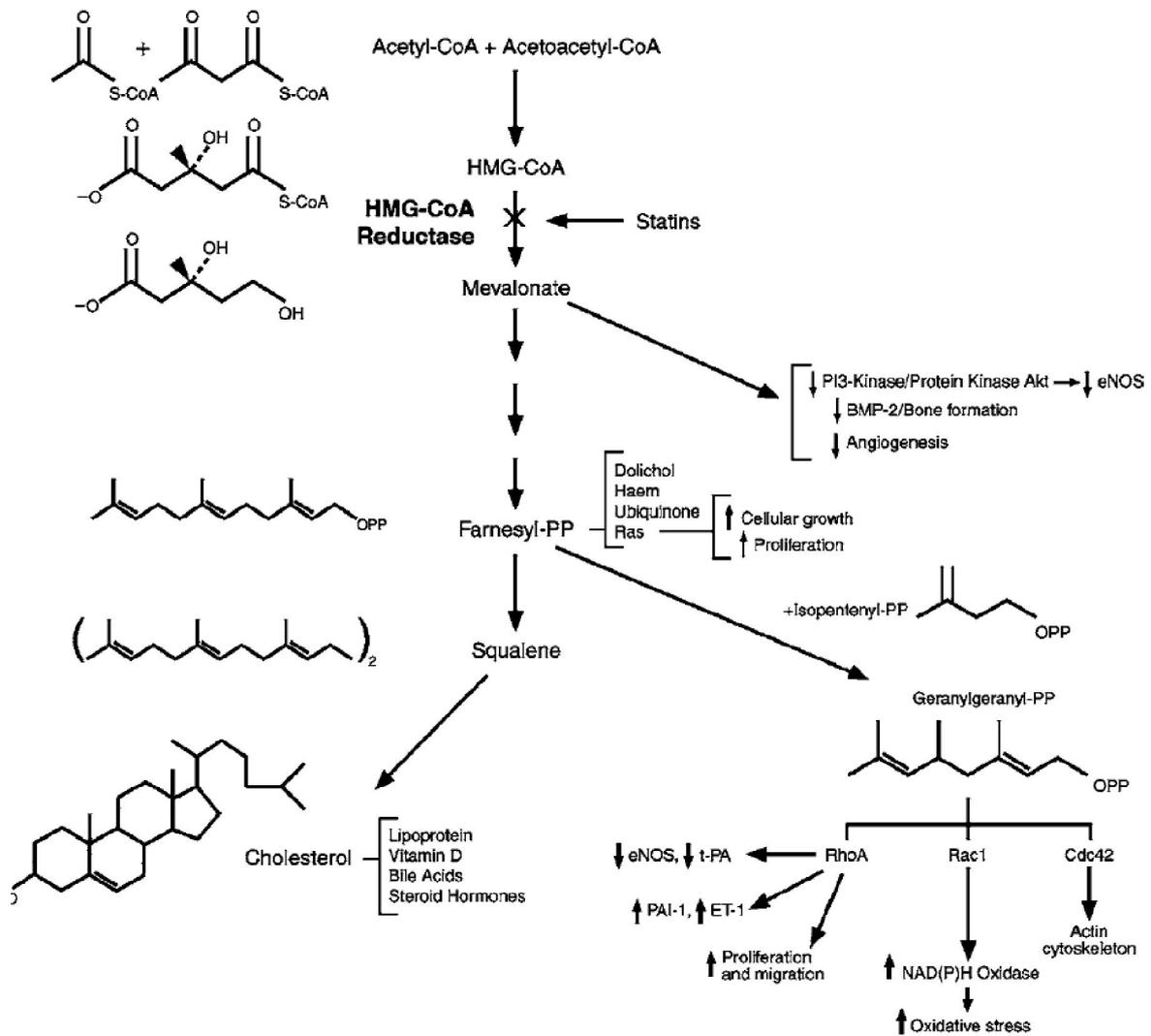


Abbildung 2

Biologische Funktionen von Isoprenoiden. Diagramm der Cholesterinsynthese mit Auswirkungen einer HMG-CoA-Reduktase Inhibition durch Statine. Eine herabgesetzte Isoprenylierung von Ras, Roh, und Rac führt zu Veränderungen in verschiedenen Signalwegen. Aus Liao et Laufs (2005) unter Beibehaltung der englischen Beschriftung.

## 1.5 ApoE <sup>-/-</sup> Mäuse

Zur Erforschung der Pathogenese sowie der Erprobung neuer Therapieansätze gab es lange Zeit kein adäquates Tiermodell. Größere Tiere wie Affen oder Schweine haben zwar gewisse Ähnlichkeiten mit Menschen hinsichtlich der Atherogenese, sind aber für die Forschung vor allem unpraktikabel und teuer. Kaninchen unter Fütterung einer atherogenen Diät spielten lange Zeit eine dominante Rolle in der Atheroskleroseforschung, haben aber den Nachteil, dass die Pathologie nur bedingt mit der des Menschen zu vergleichen ist.

Apolipoprotein E als Strukturprotein von LDL fungiert hauptsächlich als Ligand für den ApoB und ApoE(LDL) Rezeptor und vermittelt so die Aufnahme der Partikel in die Leber.

Im Menschen ist die häufigste Isoform das ApoE-3. Eine weitere Form ist das ApoE-2. Liegt diese homozygot vor, kommt es zu einer starken Einschränkung der Bindungsaffinität und es entwickelt sich eine Typ III Hyperlipoproteinämie (familiäre Dysbetalipoproteinämie) mit stark beschleunigter Atheroskleroseentstehung.

1992 gelang erstmals die Züchtung einer ApoE-defizienten Maus<sup>50</sup>. Wildtypen weisen eine hohe Resistenz gegenüber Atherosklerose auf und auch unter entsprechender Fütterung lässt sich keine adäquate Plaqueentwicklung provozieren.

Die Ausschaltung des Genes für das Apolipoprotein E bewirkt in der Maus eine Umverteilung der Plasmalipide. Die im Gegensatz zum Menschen hohe Fraktion an HDL wird hauptsächlich durch eine hohe Konzentration an VLDL ersetzt. Zusätzlich steigt das Gesamtcholesterin und die Triglyzeridkonzentration<sup>51</sup>. ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse weisen praktisch alle Stadien der Atherosklerose auf, wie sie auch beim Menschen beobachtet werden können. Eine Plaqueruptur wird allerdings so gut wie nie beobachtet, was man vornehmlich auf die kleinen Gefäßdurchmesser von maximal 1mm in der Aorta und die daraus resultierende geringe Druckbelastung der Gefäßwand zurückführt.

Diese Tiere bieten somit heute eines der best verfügbaren Modelle, um aktuelle Pharmakotherapien im Bereich der Atherosklerose auf ihre Auswirkungen *in vivo* zu untersuchen. Insbesondere Statine sind in ihrer Auswirkung auf die Arteriogenese bisher kaum untersucht worden.

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen einer lipidsenkenden Pharmakotherapie mittels eines HMG-CoA-Reduktaseinhibitors auf die Arteriogenese zu untersuchen.

Es hat sich gezeigt, dass pro-arteriogene Faktoren pro-atherogene Eigenschaften aufweisen können. Im Umkehrschluss gilt es nun, die Auswirkung einer anti-atherogenen Therapie auf den Prozess der Arteriogenese zu untersuchen. Hoefler et al. zeigten für die Therapie mittels Acetylsalicylsäure einen anti-arteriogenen Effekt und führten dies auf die anti-inflammatorische Komponente zurück. So konnten sie auch zeigen, dass Clopidogrel keine Nachteile bezüglich der Arteriogenese aufzeigt<sup>52</sup>.

Die LDL-senkende Komponente von Statinen scheint im Gegensatz zur Arteriogenese in der Atherogenese eine herausragende Rolle zu spielen. Sie führt über eine geringere oxLDL Konzentration zu einer Reduktion der Schaumzellen und darüber zu einer Entzündungshemmung.

Die Untersuchung der Auswirkungen einer Statintherapie in einem Atherosklerosemodell mittels ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen und der Stimulation der Arteriogenese nach Gefäßverschluss mittels Okklusion der *A. femoralis* ist Ziel dieser Arbeit.

Untersucht wird die Beeinflussung der Perfusion der ligierten Extremität und Infiltration der Kollateralen durch Makrophagen. Außerdem erfolgt eine Kontrolle der Statinbehandlung mittels Plaqueoberflächenbestimmung und Plaquezusammensetzung. Zusätzlich wird die Einflussnahme auf endotheliale Vorläuferzellen untersucht, die eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Mikrochirurgischer Bestecksatz	Aesculap, Tuttlingen, D
Mikropumpen: Alzet, 1007D	Alza Corporation, Palo Alto, USA
Mikroskop: Leica MZ6	Leica, Wetzlar, D
Mikroskop: DM RXE	Leica, Wetzlar, D
Durchflusszytometer Epics XL-MCL	Coulter, Miami, USA
Cryotom: Leica CM 1900-Kryostat	Leica, Wetzlar, D
Digitalkamera: DC 300F	Leica, Wetzlar, D
Digitalkamera: Coolpix 900	Nikon, Tokyo, Japan
MS2-Minishaker:	IKA, Staufen, D
Messzylinder, Messbecher	Roth, Karlsruhe, D

#### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Desinfektionsspray: SoftaseptN	Braun, Melsungen, D
Spritzen: Injekt 1 und 10ml	Braun, Melsungen, D
Katheter:	
(innen Ø 0,86mm – außen Ø 1,27mm)	
(innen Ø 0,28mm - außen Ø 0,61mm)	SIMS Portex, Keene, USA
Eppendorf-Gefäße, 1,5ml	Roth, Karlsruhe, D

Kork	Zitt Thoma, Freiburg, D
Objekträger: Superfrost plus	MJResearch, Waltham, USA
Deckgläser	Merck, Darmstadt, D
Pipettenspitzen: 10-200µl; 100-1000µl	Roth, Karlsruhe, D
Rührspatel	Hellma, Müllheim, D
Faden: Perma Hand Seide 4/0	Ethicon, Brüssel, Belgien

### 3.1.3 Reagenzien

Rompun 2%	Bayer, Leverkusen, D
Ketamin 10%	Essex Pharma, München, D
Rosuvastatin	Astra Zeneca, UK
Heparin Liquemin 25000	Roche, Basel, Schweiz
Adenosinmonophosphat	Sigma, ST. Louis, USA
Fluospheres Color Kit No.2,	
Polystyrene Microspheres	Molecular Probes, Eugene, USA
Aceton 100%	Merck, Darmstadt, D
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt, D
Formalin 4%	Merck, Darmstadt, D
Polyoxyethylenesorbitan (Tween 20)	Sigma, St.Louis, USA
Xylol	Fluka, Seelze, D
Tissue Tek	Sakura, Zoeterwoude, NL
2-Methylbutan	Roth, Karlsruhe, D
Eosin	Thermo Skandan, Pittsburgh, USA

Hämatoxilin	Sigma, St.Louis, Missouri, USA
Hoechst 33342	Molecular Probes, Oregon, USA
Sudan IV	Sigma, St.Louis, Missouri, USA
Propanol-2	Roth, Karlsruhe, D
Fluoromount-GTM	South. Biotech., Birmingh., USA
Entellan	Merck, Darmstadt, D
PBS:	80g NaCl; 2g KCl; 11,5g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O; 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> gelöst in 1l Aqua dest.
PBSA:	1g Milchpulver gelöst in 100ml PBS

### 3.1.4 Antikörper

FITC konjugierter anti-human (Kreuzreaktivität bei Mausgewebe)	Sigma, St.Louis, Missouri, USA Sigma, St.Louis, Missouri, USA
Anti- $\alpha$ -smooth muscle-Marker	Sigma, St.Louis, Missouri, USA
Rat anti Murine Monocytes/Macrophages	Sigma, St.Louis, Missouri, USA
MOMA-2-Antikörper	BMA Biomedicals, Augst, CH
Goat-anti-rat IgG, Cy3-konjugiert	DPC Biermann, Bad Nauheim, D
Rat anti mouse, Ki 67	Dako, Glostrup, Dänemark

### 3.1.5 Software

Qfluoro software	Leica, Wetzlar, D
ImageJ software	<a href="http://rsb.info.nih.gov/ij">http://rsb.info.nih.gov/ij</a>
Varionag compact:	Komet, Besigheim, D

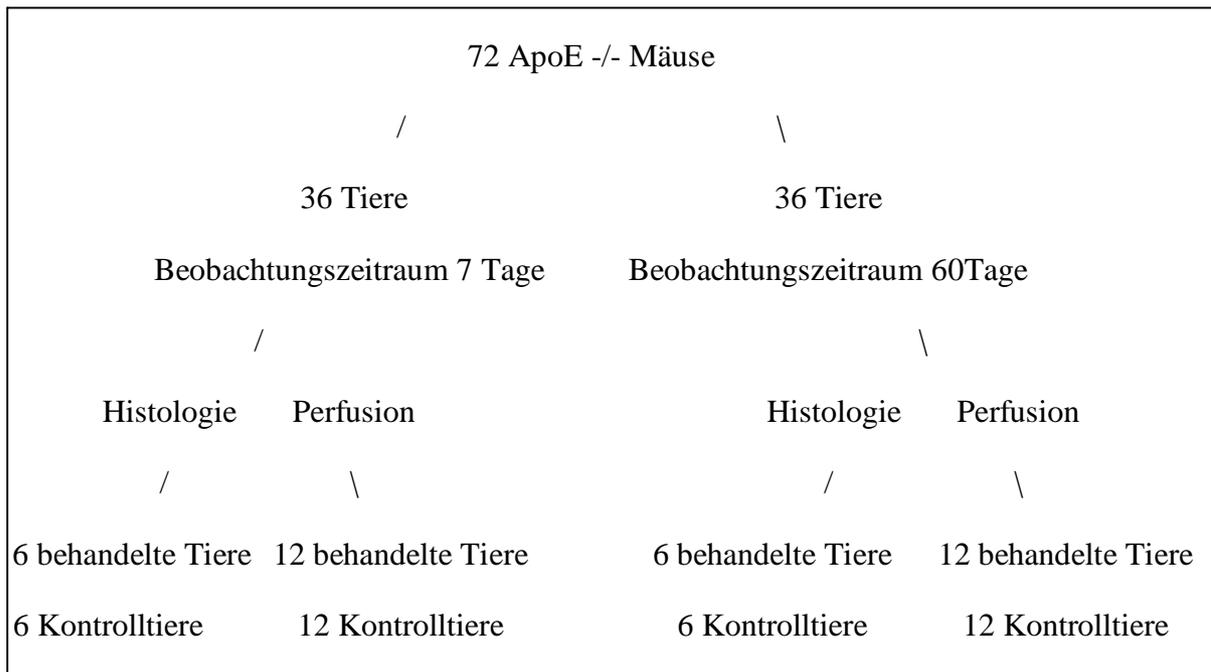
### 3.1.6 Tiere

Für das Experiment wurden 72 ApoE defiziente Mäuse (N10, Rückkreuzung C57/BL6J, Taconic A/S, Lille Skensved, Denmark) untersucht.

## 3.2 Methoden

Diese Studie wurde konform des *guide for the care and use of laboratory animals* (veröffentlicht von US National Institutes of Health, Publication No.85-23, 1996) durchgeführt.

Alle Tiere wurden randomisiert und in acht Gruppen aufgeteilt. Jeweils die Hälfte wurde den verschiedenen Beobachtungszeiträumen von sieben Tagen und zwei Monaten zugeordnet. Dabei wurden jedem Untersuchungszeitpunkt gleichviel Tiere aus dem Behandlungsarm sowie aus dem Kontrollarm zugewiesen. Außerdem wurden jeweils zwölf Tiere der Perfusionsmessung unterzogen, jeweils sechs Tiere wurden histologisch untersucht.

**Abbildung 3**

Aufteilung der ApoE -/- Mäuse auf die jeweiligen Studienarme

### 3.2.1 Operation

Im Alter von 6 Monaten wurde eine Ligatur der rechten *Arteria femoralis* durchgeführt. Hierbei wurden die Mäuse mit einem Ketamin (0,1ml) / Xylazin (0,1ml) Gemisch aufgezo- gen auf 1ml NaCl - nach Körpergewicht dosiert - anästhesiert. Unter dem Mikroskop wurde die rechte *Arteria femoralis* freipräpariert und eine doppelte Ligatur distal des Abganges der *Arteria femoris profunda* vorgenommen. Anschließend wurde die Wunde mit einer primären Hautnaht verschlossen.

### 3.2.2 Behandlung

36 Tiere wurden im Folgenden mit Rosuvastatin behandelt. 18 davon für 7 Tage, die anderen 18 über einen Zeitraum von 60 Tagen. Die Tiere bekamen eine tägliche Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin gelöst in 0,1ml 0,9%iger NaCl-Lösung subkutan appliziert.

Die restlichen 36 Tiere wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten, erhielten als Kontrollgruppe jedoch nur NaCl-Lösung injiziert.

### 3.2.3 Perfusion

Nach 7 Tagen bzw. 2 Monaten wurden je 12 behandelte Tiere und 12 Kontrolltiere mit Ketamin und Xylazin i.p. anästhesiert und im Folgenden mit 500 I.E. Heparin i.p. vollheparinisiert. Unter einem Mikroskop wurde die *Aorta abdominalis* freipräpariert, und über eine Querinzision ein Katheter eingeführt.

Über den Katheter wurden nun bei verschiedenen Druckstufen unterschiedlich markierte fluoreszierende Mikrosphären von 15 µm Durchmesser appliziert.

Die Mikrosphären wurden dabei durch kontinuierliches Rühren in Suspension gehalten. Als Lösungsflüssigkeit diente 0,9%ige NaCl-Lösung mit Tween 20 als Suspensator. Des Weiteren wurde die Lösung mit Adenosin versetzt, so dass die Messungen in vollständiger Vasodilatation durchgeführt wurden.

Über ein regulierbares Druckluftsystem wurden nun die einzelnen Mikrosphären wie folgt appliziert:

Red bei	60 mmHg	Yellow-green bei	90 mmHg
Blue-green bei	70 mmHg	Crimson bei	100 mmHg
Orange bei	80 mmHg	Scarlet bei	110 mmHg

Vor der ersten und darauf nach jeder weiteren Phase der Mikrosphärenapplikation erfolgte eine Spülung des gesamten Systems mit der gleichen Trägerflüssigkeit, in der die Mikrosphären suspendiert wurden.

Im Anschluss wurde die Muskulatur der unteren Extremität entnommen. Die nach der Perfusion gewonnen Proben wurden mechanisch homogenisiert und über 5 Tage mit einem Lysepuffer auf Proteinase K Basis aufgelöst. Zusätzlich zu den Perfusionsmikrosphären wurde eine Referenzmikrosphäre der Farbe *blue* hinzugegeben. Dann wurde die Lösung zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die verbleibenden Mikrosphären in FACS-Lösung resuspendiert und im Durchflußzytometer analysiert. Außerdem wurden Herz und Aorta entnommen und wie unten beschrieben eingefroren.

### 3.2.4 Berechnung der hämodynamischen Parameter

Die Berechnung des Blutflusses durch das arterielle Kollateralsystem in die Muskelproben berechnete sich nach folgender Formel aus der Anzahl der Mikrosphären in der Probe ( $Mp$ ) sowie einer Referenzprobe ( $Mref$ ), der Anzahl der blauen Kontrollmikrosphären in der Gewebeprobe ( $ISp$ ) und der Referenzprobe ( $ISref$ ) als internem Standard, dem Gewicht der Referenzprobe ( $Gp$ ) und der Infusionszeit ( $t$ ).

$$Perfusion = \frac{Mp * ISref * Gp}{Isp * Mref * t}$$

Für jedes Tier wurde ein prozentualer Wert der Blutflussänderung des okkludierten zum nicht okkludierten Hinterlauf errechnet. Die Werte der behandelten Gruppe wurden dann mit denen der unbehandelten Gruppe verglichen.

### 3.2.5 Gewebeasservierung

Die übrigen Tiere dienten der Gewinnung von Gewebeproben. Sie wurde nach 7 Tagen (6 behandelte Tiere, 6 Kontrolltiere) bzw. 60 Tagen (6 behandelte Tiere, 6 Kontrolltiere) ebenso anästhesiert, laparotomiert und Blut aus der linken Herzkammer aspiriert. Darauf folgend mittels Thorakotomie das Herz samt Aorta entnommen. Des Weiteren wurden die Extremitäten vom Fell befreit und der *musculus quadriceps femoris*, die Adduktorengruppe und der *musculus peroneus* abpräpariert.

Das Herz wurde kurz oberhalb der Wurzel von der Aorta abgetrennt und wie auch die Muskeln zur weiteren histologischen Untersuchung eingefroren. Dazu wurde Methylbutan in einem Bad aus flüssigem Stickstoff auf  $-150\text{ °C}$  gekühlt, die Gewebeproben auf ein 2x2 cm großes Stück Kork mit Tissue Tek eingefasst und in Methylbutan zum Einfrieren gebracht. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei  $-80\text{ °C}$  gelagert.

### 3.2.6 FACS

Der Einfluss der Statinbehandlung auf endotheliale Vorläuferzellen wurde mittels Färbung von CD34/CD45 und Durchflusszytometrie detektiert.

Protokoll:

1. 100  $\mu\text{l}$  Vollblut, 190  $\mu\text{l}$  PBS, 5  $\mu\text{l}$  CD34-Antikörper, 5  $\mu\text{l}$  CD45-Antikörper mischen und 45 min inkubieren
2. zum Waschen 3 ml PBS hinzufügen, bei 400 g 3 min zentrifugieren und Überstand absaugen
3. mit 500  $\mu\text{l}$  Lysepuffer mischen, 10 min inkubieren, mit 3 ml PBS waschen, zentrifugieren und Überstand absaugen
4. 1 ml PBS zufügen und Analyse mittels FACS

### 3.2.7 Sudanfärbung

Bei den Mäusen aus dem 60-tägigen Beobachtungszeitraum wurde planimetrisch die Plaqueoberfläche bestimmt. Dazu wurden die Aorten unter dem Mikroskop vom adventitiellen Fettgewebe freipräpariert und in einprozentiger Formalinlösung für eine Stunde fixiert. Es folgte die komplette Längsinzision der Aorta auf der Innenseite des Bogens sowie eine Inzision auf der konkaven Seite des Bogens. Mit Akkupunkturadeln wurde das Präparat nun auf Kork aufgespannt und in einer Sudanlösung über 24 Stunden angefärbt.

Sudanstammlösung:

1. 3,5 g Sudan-IV-Pulver in 350 ml Propanol-2 auflösen
2. kontinuierliches Mischen über mindestens 24 Stunden
3. Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C.

Sudanfärbelösung:

1. 20 ml Stammlösung auf 1000 ml Aqua dest.
2. 600 ml Propanol-2 hinzufügen
3. mischen über mindestens 12 Stunden
4. filtrieren

Nach Ablauf der Färbezeit wurden die Aorten mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült, auf einem weißen Papier aufgespannt und unter dem Mikroskop abfotografiert.

### 3.2.8 Histologie

Die Auswirkung der Rosuvastatinbehandlung auf Monozyten im Rahmen der Arteriogenese wurde mittels immunhistochemischer Färbung der Muskelgewebeprobe untersucht.

Dazu wurden am Cryotom von den Quadrizepsproben der zwei 7 Tage Gruppen Schnittserien von 5 µm dicken Schichten angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und auf Monozyten/Makrophagen gefärbt. Zur Darstellung der Kollateralen wurden außerdem glatte Muskelzellen angefärbt.

Um die Zusammensetzung der Plaques zu beurteilen, wurden bei den Tieren aus dem 60-tägigen Beobachtungszeitraum Schnittserien von 5 µm Dicke der Herzbasis angefertigt. Zur morphologischen Analyse wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen vorgenommen. Bei Schnitten, die auf Höhe der Aortenklappe Plaques aufwiesen, wurden die darauffolgenden Schnitte auf Makrophagen und glatte Muskelzellen angefärbt.

### **3.2.8.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen**

1. Schnitte 3 min in Hämatoxylin inkubieren
2. 5 min unter fließendem Wasser waschen
3. 3 min in Eosin-Lösung inkubieren
4. 2 mal 3 min in Leitungswasser waschen
5. je 3 min in aufsteigender Alkohollösung zu 70%, 80%, 100% entfuchten
6. 3 min in Xylol fixieren
7. in Entellan mit Deckglas einbetten

### **3.2.8.2 Immunfluoreszenz Färbung**

1. 5 µm dicke Schnitte auf eine Objektträger aufziehen und 30 min trocknen
2. 5 min in -4 °C kaltem Aceton fixieren  
nach kurzem Trocknen für 3 min in PBS waschen

3. Ersten Antikörper (rat-anti-mouse MOMA-2) in PBSA 1:200 verdünnen und die Probe mit 40µl benetzen
4. 24h bei 4 °C inkubieren
5. 3 mal je 3 min in PBS waschen
6. Zweiten Antikörper (goat-anti-Rat, CY3 konjugiert) in PBSA 1:100 verdünnen und die Probe mit 40µl benetzen
7. 1h bei 37 °C inkubieren
8. 3 mal je 3 min in PBS waschen
9. dritten. Antikörper (anti-human alpha-smooth muscle cells, FITC konjugiert) in PBSA 1:500 verdünnen und die Probe mit 40 µl benetzen
10. 1 Stunde bei 37 °C inkubieren
11. 3 mal je 3 min in PBS waschen
12. 1 min mit Kernfärbung (Höchst 33342, 1:1000 in PBS verdünnt) inkubieren
13. 3 mal je 3 min in PBS waschen
14. in Fluoromount-GTM einbetten und mit Deckglas belegen.

### **3.2.9 Quantifizierung**

Die Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop inspiziert und die wichtigen Bereiche zur Dokumentation und Quantifizierung abfotografiert.

In den Muskelpräparaten wurden dazu die Kollateralarterien aufgesucht, zentriert und mit umgebendem interstitiellem Gewebe des Gesichtsfeldes ausgewertet.

In den Präparaten der Aortenwurzel wurden die atherosklerotischen Plaques aufgesucht und abfotografiert.

### **3.2.9.1 Atherosklerotische Plaqueoberfläche**

Die digitalen Fotos der Aortenteilabschnitte wurden kodiert und mit ImageJ Software zuerst die Gesamtfläche der Aorta ausgemessen, danach die Fläche der einzelnen Plaques, die durch die Sudanbehandlung rot zur Darstellung kamen. Die Plaqueflächen wurden addiert und in Bezug zur Fläche der gesamten Aorta gestellt.

### **3.2.9.2 Makrophagen um Kollateralen**

Die Fotos wurden kodiert und die CY3 positiv gefärbten Zellen, deren Zellkern in der Schnittebene angefärbt war, ausgezählt und die Daten der Kontrolltiere mit denen der behandelten Tiere verglichen.

### **3.2.9.3 SMC's und Makrophagen in Plaques**

Die Fotos wurden kodiert und die CY3 bzw. FITC positiven Zellen, deren Zellkern in der Schnittebene angefärbt war, ausgezählt und die Daten der Kontrolltiere mit denen der behandelten Tiere verglichen.

## **3.2.10 Statistik**

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student-t-Tests für unabhängige Stichproben bei Betrachtung eines Merkmales unter Normalverteilung. Als signifikant wurde ein  $p < 0,05$  angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss auf die Arteriogenese

#### 4.1.1 Perfusionsmessung

Durch den Vergleich des Mikrosphärengehaltes der rechten, okkludierten hinteren Extremität und der unversehrten linken Extremität ließ sich das Verhältnis, ausgedrückt in Prozent, bezogen auf die normale Perfusion, errechnen. Diesbezüglich wird die Kontrollgruppe mit der behandelten Gruppe verglichen.

Nach sieben Tagen ergab sich in der Kontrollgruppe im rechten Hinterlauf eine Perfusionsreduktion auf 26,6 % +/- 5,2% bezogen auf die des linken Hinterlaufes.

Die Statin behandelte Gruppe zeigte eine Reduktion auf 35,2% +/- 3,6%. Dies ist eine signifikante Steigerung mit einem  $p < 0,05$ .

Nach 60 Tagen erholte sich der Blutfluss auf 49,0% +/- 6,0% in der Kontrollgruppe sowie 56,0% +/- 5,6% in der mit dem HMG-CoA-Reduktaseinhibitor behandelten Gruppe. Auch hier ergab sich eine eindeutige statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ).

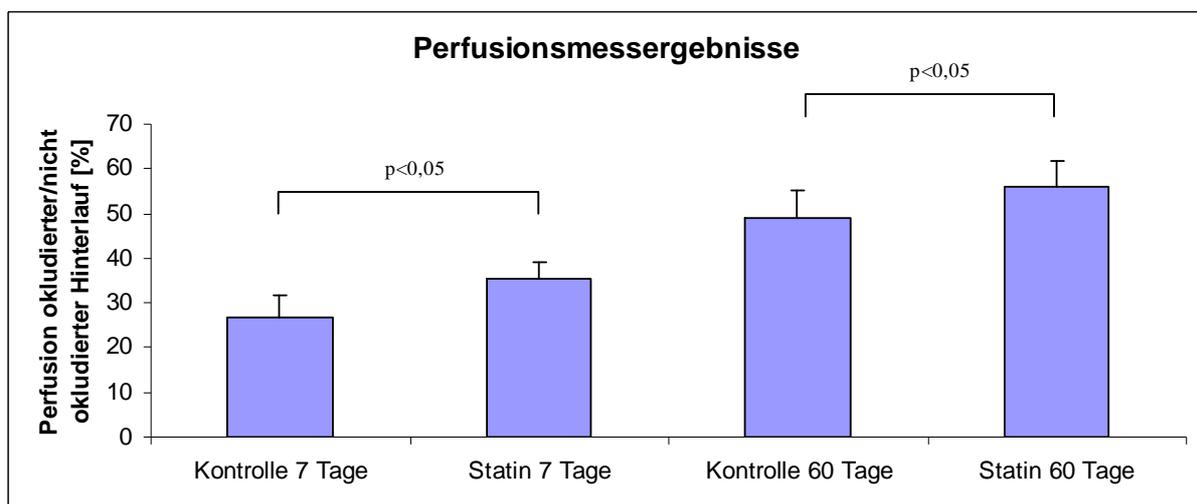
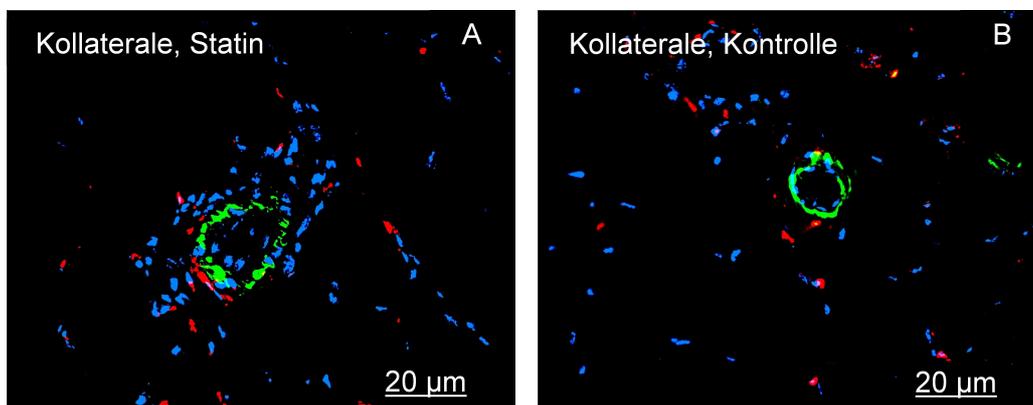


Diagramm 1

Perfusionsmessergebnisse dargestellt als Verhältnis in Prozent des okkludierten zum nicht okkludierten Hinterlauf.

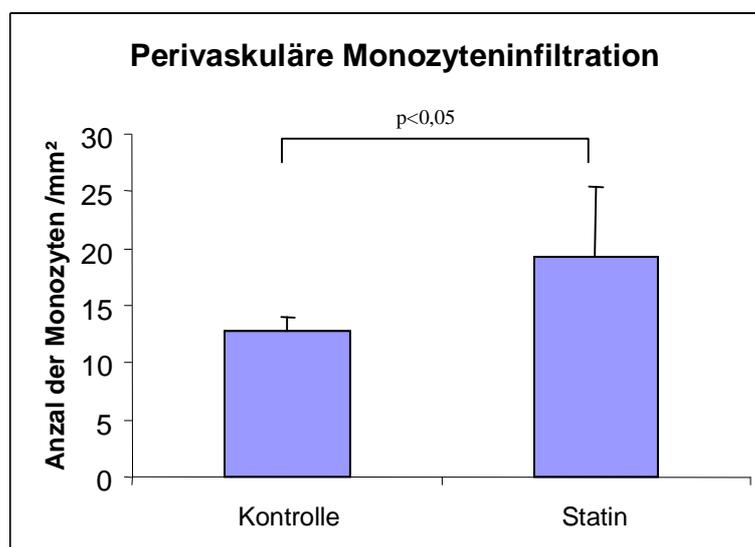
### 4.1.2 Perivaskuläre Monozyteninfiltration

Bei der Auszählung von perivaskulären Monozyten, die durch den Prozess der Arteriogenese aus dem Lumen des Gefäßes einwanderten, zeigte sich in der Kontrollgruppe nach sieben Tagen eine durchschnittliche Zellzahl von  $13 \text{ Zellen/mm}^2 \pm 2 \text{ Zellen/mm}^2$ . In der Rosuvastatin behandelten Gruppe waren es  $18 \text{ Zellen/mm}^2 \pm 5 \text{ Zellen/mm}^2$ . Diese Zunahme der perivaskulären Infiltration ist statistisch signifikant mit einem  $p < 0,05$ .



**Abbildung 3**

Immunfluoreszenz Färbung einer Kollaterale. Zellkerne sind mit Höchst 33342 blau dargestellt, glatte Muskelzellen wurden grün, infiltrierende Monozyten rot angefärbt. A: Bild einer Kollateralarterie einer mit Statin behandelten Maus. B: Bild einer Kollateralarterie einer Kontrollmaus.



**Diagramm 2**

Perivaskuläre Monozyteninfiltration in Anzahl der Monozyten pro mm<sup>2</sup>

## 4.2 Einfluss auf die Atherogenese

### 4.2.1 Plaqueoberfläche

Durch die Statinbehandlung sank die Gesamtoberfläche der atherosklerotischen Plaques in der Aorta signifikant. Nach 60 Tagen betrug die Plaqueoberfläche im Vergleich zur gemessenen Gesamtoberfläche der Aorta 12,2 %  $\pm$  3,2 %. Die Statingruppe zeigte nur einen Oberflächenbefall von 4,8 %  $\pm$  1,2 %. Mit  $p < 0,05$  ist diese Reduktion statistisch signifikant.



Abbildung 4

Aorta fixiert in Formalin. Die atherosklerotischen Plaques wurden mit Sudan-IV Lösung über 24 h angefärbt.

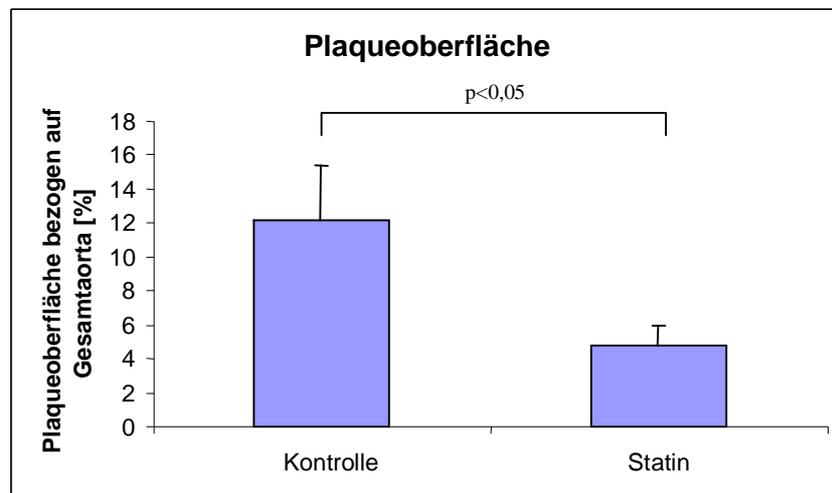


Diagramm 3

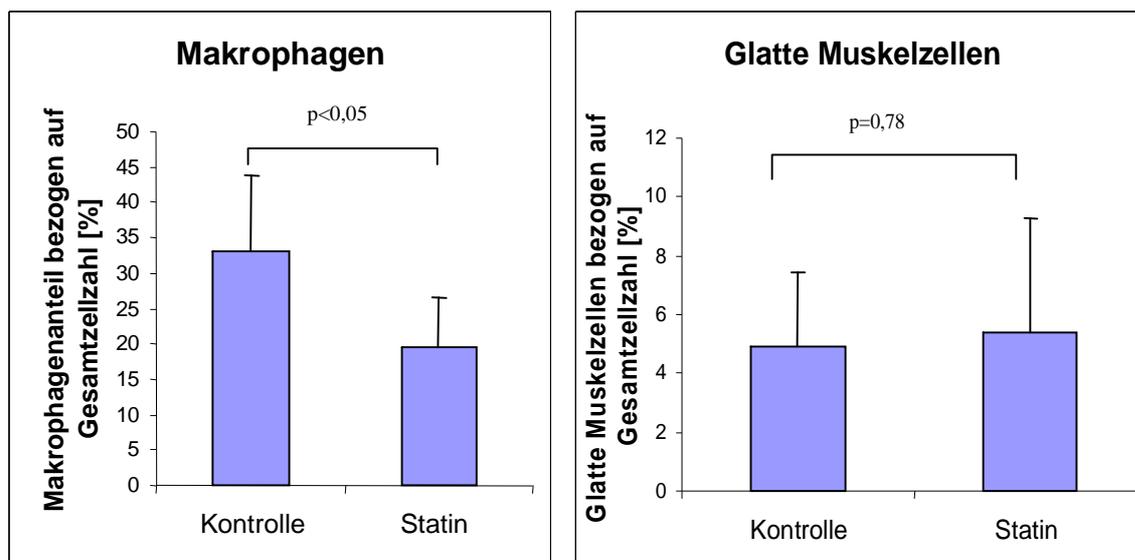
Plaqueoberfläche der Aorten bezogen auf die Gesamtoberfläche angegeben in Prozent

## 4.2.2 Plaquezusammensetzung

Die histologische Auswertung der Plaquekomposition erfolgte in der 60-Tage-Gruppe.

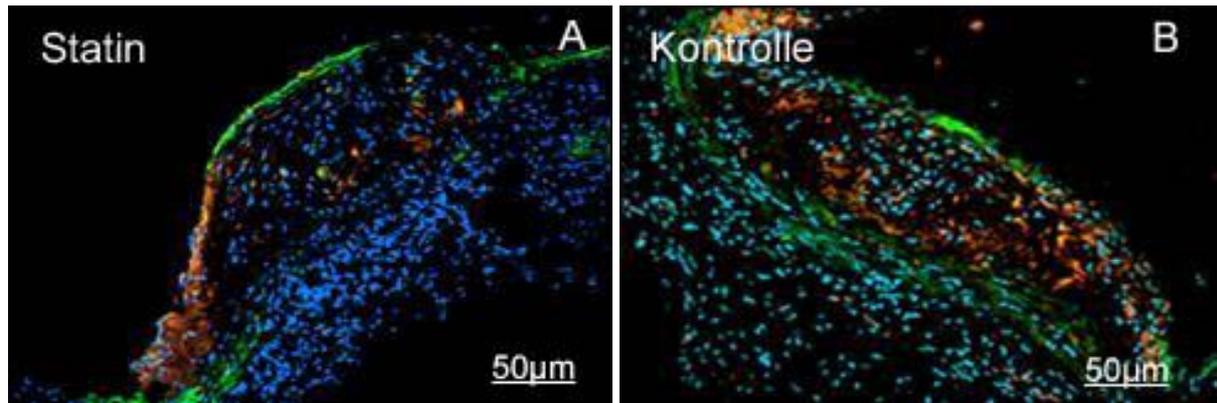
In der unbehandelten Gruppe zeigten die atherosklerotischen Plaques einen Anteil glatter Muskelzellen von 4,9% +/- 2,5%. In der behandelten Gruppe war der Anteil größer: 5,4% +/- 3,9%. Mit  $p=0,78$  ist dieser Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant.

Bei der Auszählung der für Makrophagen gefärbten Präparate zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen. Der Gehalt an Makrophagen betrug 33,1% +/- 10,6% in der Kontrollgruppe, und 19,4% +/- 7,6% in der Statingruppe. Dies ist eine signifikante ( $p<0,05$ ) Reduktion.



**Diagramm 4 und 5**

Anteil der Makrophagen und glatten Muskelzellen am Gesamtgehalt der Zellen im Plaque dargestellt als Verhältnis in Prozent.

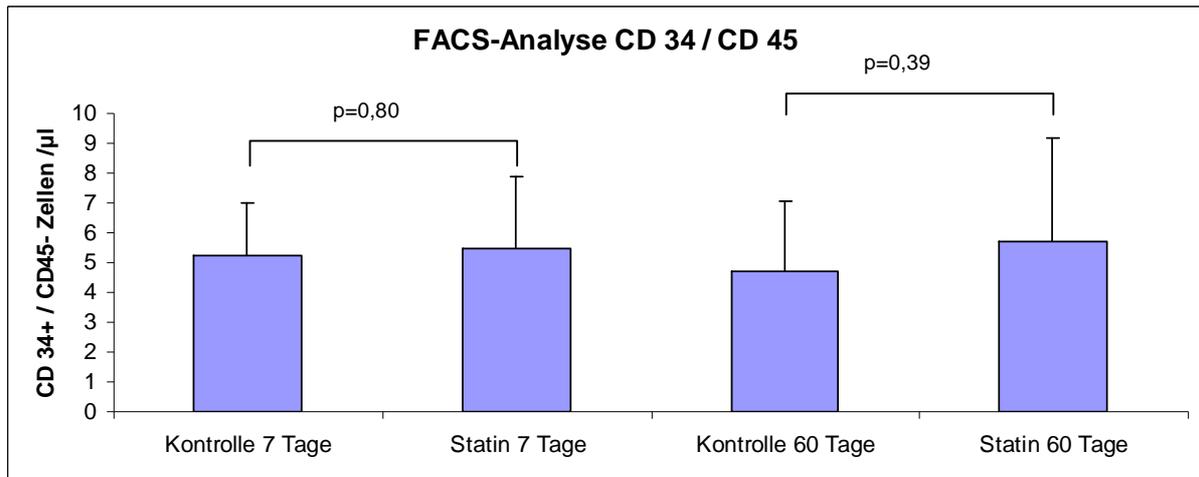


**Abbildung 5**

Schnittbilder atherosklerotischer Plaques auf Höhe der Aortawurzel. Zellkerne sind mit Höchst 33322 blau angefärbt. Glatte Muskelzellen wurden über FITC-markierten Antikörper grün, Monozyten durch Cy3-Markierung rot dargestellt. A: Bild einer Plaque einer über 60 Tage mit Statin behandelten Maus. B.: Bild einer Plaque einer Kontrollmaus

### **4.3 Einfluss auf Endotheliale Vorläuferzellen**

Die FACS-Analyse auf CD34 positive/CD45 negative Zellen im zirkulierenden Blut ergab in der Gruppe der 7 Tage behandelten Mäuse 5,2 Zellen/ $\mu$ l +/- 0,6 Zellen/ $\mu$ l für die Kontrolle und 5,5 Zellen/ $\mu$ l +/- 0,8 Zellen/ $\mu$ l für die behandelten Tiere. Nach 60 Tagen zeigten sich 5,7 Zellen/ $\mu$ l +/- 0,6 Zellen/ $\mu$ l in der mit Rosuvastatin behandelten Gruppe und 4,7 Zellen/ $\mu$ l +/- 0,5 Zellen/ $\mu$ l in der unbehandelten Gruppe. Trotz leichter Tendenz in der Gruppe mit dem langen Beobachtungszeitraum zeigte sich zu beiden Zeitpunkten keine statistische Signifikanz.



**Diagramm 6**

FACS-Analyse der CD 34 und CD 45 gefärbte Zellen. Nur CD 34 positive und CD 45 negative Zellen wurden als endotheliale Vorläuferzellen gewertet.

## 5 Diskussion

### 5.1 Atherosklerose

In der vorliegenden Arbeit wurde die Einflussnahme von Statinen auf die Arteriogenese untersucht. Hierzu wurde ein pAVK Modell in atherosklerotischen ApoE defizienten Mäusen ausgewählt, um der klinischen Situation beim Patienten näher zu kommen. Dass Arteriogenese auch im hyperlipidämischen Mausmodell zu beobachten und zu quantifizieren ist, zeigten 2003 van Royen et al<sup>5</sup>.

Zur Kontrolle der Wirksamkeit der Rosuvastatintherapie wurde die totale Plaqueoberfläche der Aorta bezogen auf die Gesamtoberfläche der Aorta sowie die Plaquezusammensetzung quantifiziert. Hier zeigte sich in der Kontrollgruppe ein hohes Ausmaß an atherosklerotischen Veränderungen in der Aorta. Diese Lumeneinengung ist auch die Basis für einen Gefäßverschluss, der wiederum durch die Proliferation von Kollateralen kompensiert werden kann. Dies sind Bedingungen wie sie bei einer akuten Ischämie vorzufinden sind. Eine Hyperlipidämie wird mittels eines Statins behandelt, trotzdem kommt es zur Gefäßokklusion. Dies geschieht im Experiment durch den reproduzierbaren Femoralarterienverschluss. Damit wird eine Ausgangsbasis für die folgenden Untersuchungen geschaffen. Nun kann eruiert werden, wie sich die Pharmakotherapie auf den Kompensationsmechanismus eines entstehenden Kollateralkreislaufs auswirkt, insbesondere ob sie im Rahmen einer arteriogenesefördernden Therapie einsetzbar ist.

Des Weiteren wurde in der Kontrollgruppe als Ausgangswert das Verhältnis von Makrophagen und glatten Muskelzellen in der Plaque analysiert. Hier ergaben sich 33,1% +/- 10,6% Makrophagen und 4,9% +/- 2,5% glatter Muskelzellen. Dies ist eine deutliche Verschiebung zuungunsten der glatten Muskelzellen. Eine weitere Verschiebung mit Zunahme des inflammatorischen Anteils bzw. eine Abnahme der stabilisierenden glatten Muskelzellen kann zu einer Progression der Atherosklerose und Destabilisierung der Plaques führen.

### 5.1.1 Einfluss durch Statine

In der Statingruppe ergab sich für die Auswertung der Plaqueoberfläche ein Anteil von 4,8% gegenüber 12,2% in der Kontrollgruppe, bezogen auf die Gesamtaorta. Dies ist eine hochsignifikante Reduktion. Als wichtigste Grundlage für diesen Effekt ist sicherlich die Abnahme der Cholesterinablagerung im Plaque anzusehen<sup>53</sup>. Kleemann et al. zeigten aber bereits, dass der anti-atherosklerotische Effekt von Rosuvastatin darüber hinausgeht<sup>54</sup>. Man kann somit davon ausgehen, dass auch die pleiotropen Eigenschaften des Statins zu dieser Plaquereduktion beigetragen haben. Der Versuchsaufbau dieser Studie lässt allerdings keine Rückschlüsse darauf zu, wie stark diese daran beteiligt waren.

Auch für die Analyse der Plaquekomposition ergab sich ein positives Ergebnis. Leider konnte durch den hohen interindividuellen Unterschied bei dieser Gruppengröße nur für die Abnahme an Makrophagen, nicht aber die Zunahme an glatten Muskelzellen in der Kapsel eine statistische Signifikanz gezeigt werden. Ein Trend zur Zunahme ist aber deutlich zu erkennen. Außerdem zeigten Furmann et al., dass über eine verringerte Proteinase Sekretion der Makrophagen neben der reinen Zellzahl auch andere Faktoren für die Stabilität wichtig sind<sup>55</sup>. Hier kann also von einem stabileren Plaquephänotyp durch die Statintherapie ausgegangen werden.

Der geringere Anteil an Makrophagen ist sicherlich zum größten Teil auf die Reduktion der Cholesterinsynthese zurückzuführen. Dies führt wahrscheinlich indirekt zu einer geringeren Fettablagerung in den *fatty streaks*. Das Unvermögen dies zu phagozytieren und abzubauen führt sonst zu einer weiteren Rekrutierung von Makrophagen, so dass diese schließlich akkumulieren.

Doch auch pleiotrophe Effekte sind sicherlich an der Reduktion der Makrophagen beteiligt. Über ihre anti-inflammatorischen und makrophagenmodulatorischen Eigenschaften tragen sie dazu bei, den atherosklerotischen Prozess zu verlangsamen.

Der Trend zu mehr glatten Muskelzellen in der Plaqueoberfläche könnte auf die veränderte Makrophagenkonzentration zurückzuführen sein. Die geringere Cholesterin Konzentration kann zu einer geringeren Aktivierung und somit zu einer veränderten sekretorischen Aktivität der Makrophagen führen. Eine geringere NO-Produktion durch die induzierbare NOS (iNOS) führt zu einer Herabregulierung von Oberflächen-Fas<sup>56</sup>. Diese leitet normalerweise einen

programmierten Zelltod ein, so dass hier eher von einem antiapoptotischen als von einem proliferationsfördernden Effekt auf die glatten Muskelzellen in der Plaqueoberfläche ausgegangen werden sollte. Die direkte Wirkung von Statinen hemmt eher die Teilung glatter Muskelzellen in der Gefäßwand. Diese Eigenschaft wird für eine geringere Neointimabildung verantwortlich gemacht<sup>57</sup>.

Hier zeigt sich, dass glatte Muskelzellen in Neointima und diejenigen auf der Plaqueoberfläche einen unterschiedlichen Phänotyp aufweisen. Sie können somit auch von Medikamenten unterschiedlich beeinflusst werden<sup>58</sup>.

### 5.1.2 Endothel

Die Angiogenese galt lange Zeit als der wichtigste Prozess im Rahmen der Blutflusswiederherstellung. Endotheliale Vorläuferzellen sind für die Angiogenese von großer Bedeutung. Es ist erwiesen, dass sie in viele Prozesse involviert sind.

Auch die Plaqueentstehung ist von einsprossenden Gefäßen begleitet. Endotheliale Vorläuferzellen könnten somit eine Progression der Plaque begünstigen.

Allerdings könnten diese Zellen auch in der Arteriogenese eine Rolle spielen. Zwar haben im Gegensatz zu Kapillaren, die nur aus Endothelzellen aufgebaut sind, funktionelle Kollateralen eine Media. Zur Vergrößerung des Lumens muss aber auch die Endothelzellzahl zunehmen. Neben der lokalen Proliferation kann ein Ausbau der Intima z. B. durch Vorläuferzellen aus dem zirkulierenden Blut das Lumen vergrößern. Eine direkte Beteiligung am nativen menschlichen Gefäßsystem ist aber umstritten<sup>59</sup>.

Werner et al.<sup>60</sup> zeigten 2002 einen positiven Einfluss von Rosuvastatin auf die zirkulierenden Zellen. Dieser war allerdings nur am Tag 10 der Behandlung statistisch signifikant. Der Trend relativierte sich zudem im Laufe der Zeit.

In dieser Arbeit konnte kein Unterschied der endothelialen Vorläuferzellenkonzentration unter Statinbehandlung gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Mit 5,2 Zellen/ $\mu$ l in der Kontrollgruppe und 5,5 Zellen/ $\mu$ l in der behandelten 7 Tage-Gruppe, sowie 5,7 Zellen/ $\mu$ l

gegenüber 4,7 Zellen/ $\mu$  in der Langzeitgruppe ergab sich keine signifikante Veränderung. Auch wenn es sich bei den Messungen jeweils nur um eine Momentaufnahme handelt, scheint ein Einfluss der endothelialen Vorläuferzellen unwahrscheinlich, insbesondere wenn man bei der Arteriogenese nur von dem von Ziegelhoeffer<sup>59</sup> postulierten unterstützenden Effekt ausgeht.

## 5.2 Arteriogenese

Zentrales Thema dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen der Behandlung auf die Arteriogenese zu untersuchen. Dazu wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Zum einen die funktionelle Messung der Blutflusswiederherstellung mittels Perfusionsanalyse, sowie die histopathologische Untersuchung und Quantifizierung der perivaskulären Makrophageninvasion.

Für die hämodynamische Untersuchung auf das Kollateralarterienwachstum wurde eine Methode gewählt, die einen möglichst genauen Rückschluss auf die Gegebenheiten während der physiologischen Perfusion in der Extremität zulässt<sup>61</sup>. Dabei wurden fluoreszierende Mikrosphären verwandt, diese sind radioaktiv markierten Mikrosphären in Genauigkeit und Handhabung inzwischen überlegen<sup>62</sup>.

### 5.2.1 Einfluss durch Statine

In der mit Statin behandelten Gruppen zeigte sich eine eindeutige Verbesserung der Perfusion gegenüber den Kontrollgruppen ( $p < 0,05$ ). In der 7 Tage Gruppe war die Beeinflussung der Arteriogenese am deutlichsten. Aber auch nach 60 Tagen konnte noch ein Unterschied detektiert werden. Hierbei kommt es allerdings zu einer Annäherung der zu vergleichenden Gruppen. Diese Annäherung ist aber ein bekanntes Phänomen, das auch unter MCP-1 Therapie beobachtet wurde<sup>63</sup>. Wichtig ist dabei, dass die möglichst rasche Wiederherstellung der benötigten Perfusion dazu beiträgt, dass das betroffene Gewebe nicht einer chronischen

Ischämie exponiert ist und schließlich nekrotisiert<sup>64</sup>. Bei einer niedrigen Ischämietoleranz wie z. B. im Gehirn ist der Zeitfaktor von besonderer Bedeutung<sup>65</sup>.

In der Untersuchung auf perivaskuläre Makrophagen bestätigten sich diese Ergebnisse. Hier kam es zu einer Zunahme der Monozytenmigration. Dies ist wichtige Voraussetzung für den Umbau der Arteriole zur funktionellen Arterie und unterstützt somit die Perfusionsdaten.

Rosuvastatin weist somit pro-arteriogene Effekte auf. Dies steht scheinbar im Gegensatz zu den bisher bekannten pleiotropen Eigenschaften der Statine. Zu erwarten wäre, dass die anti-inflammatorische Komponente einen negativen Effekt auf die entzündliche Komponente der Arteriogenese bewirkt und das Kollateralwachstum somit hemmt.

Andere Mechanismen müssen daran beteiligt sein, dies auszugleichen und sogar zu übersteigen.

Im Folgenden soll der Einfluss auf verschiedene, an der Arteriogenese beteiligten, Zellpopulationen diskutiert werden. Dabei wird dargestellt, wie sich eine Statintherapie auf diese Zellen auswirken kann.

### **5.2.2 Endothel**

Endothelzellen spielen in der Arteriogenese eine entscheidende Rolle. Die durch den erhöhten Scherstress veränderte Genexpression ist der initiale Stimulus für eine nun folgende Zellrekrutierung.

Auch im weiteren Verlauf interagieren Endothelzellen mit Monozyten, Makrophagen und glatten Muskelzellen<sup>66</sup>. Die hier beteiligten Zytokine unterliegen einem prekären Gleichgewicht und sind vielen äußeren Einflüssen ausgesetzt. Dies könnte ein Angriffspunkt für die Statine sein. Aus der Atheroskleroseforschung weiß man, dass Statine über eine gesteigerte mRNA Expression<sup>67</sup> und Stabilisierung<sup>68</sup> in Endothelzellen eine erhöhte eNOS-Expression vermitteln. Dies hat einen anti-atherosklerotischen Effekt und ist ein wichtiger pleiotroper Effekt von Statinen<sup>69</sup>. In der Arteriogenese spielt eNOS ebenfalls eine wichtige Rolle. Cai et al. zeigten einen 6,2-fachen Anstieg der eNOS Expression in wachsenden Kollateralen<sup>70</sup>. ENOS -/- Mäuse weisen eine extrem verringerte arteriogene Potenz auf<sup>71</sup>.

Außerdem zeigen Mäuse mit adenoviral induzierter eNOS Überexpression ein verstärktes Wachstum von Kollateralarterien<sup>72</sup>. Eine statinbedingte Steigerung der eNOS-Expression könnte somit den pro-arteriogenen Effekt erklären.

Trotz dieser Gemeinsamkeit scheinen sich hier die Wege zu trennen. Bei der Plaquentstehung bewirkt eine vermehrte eNOS-Expression eine Herabregulation von MCP-1<sup>68</sup>, die zu einer verminderten Leukozytenadhäsion führt. Die Proliferation der glatten Muskelzellen kann durch NO auch verringert werden<sup>56</sup>. Dies sind Vorgänge, die in der Arteriogenese einen negativen Effekt zeigen würden. Cai et al. hypothetisieren hier, dass eNOS vor allem in der zweiten Phase des Kollateralwachstums aktiv ist<sup>70</sup>.

### 5.2.3 Glatte Muskelzellen

Der Einfluss von HMG-CoA-Reduktasehemmern auf glatte Muskelzellen ist sehr komplex und zuweilen divergent. Im entstehenden Plaque verhindern sie die Proliferation<sup>73</sup>, im fortgeschrittenen Stadium wirken sie Apoptose hemmend und damit plaquestabilisierend<sup>57</sup>.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin dass HMG-CoA-Reduktasehemmer in der Arteriogenese zur Vermehrung der glatten Muskelzellen beitragen und somit das Wachstum der Kollaterale fördern können. Ob dabei eine anti-apoptotische Komponente oder vielleicht z.B. eine verbesserte Wirkung von TGF-beta dazu beiträgt, müssen weitere Studien zeigen.

Es lässt sich allerdings nur schwer differenzieren, ob diese Beeinflussung direkt oder indirekt zustande kommt. Abccante et al. zeigten, dass eine Statinbehandlung von Makrophagen zu einer gesteigerten TGF-beta-Expression führen kann. Für eine exogene TGF-beta Applikation konnte bereits ein pro-arteriogener Effekt gezeigt werden<sup>74</sup>.

### 5.2.4 Matrix

Die Adventitia, also das Bindegewebe, das die Gefäße umgibt, ist eine Matrix aus Kollagen. Sie verschafft dem Gefäß die nötige flexible Aufhängung im Gewebe. Diese Gefäßschicht ist

aber auch gleichzeitig eine Begrenzung für das Wachstum durch Zellproliferation. Die beteiligten Zellen der Arteriogenese müssen hier über den Abbau der Matrix Freiraum für die größer werdenden Arterien schaffen. Dies erfolgt hauptsächlich über die Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Wie schon erwähnt, zeigt die bisherige Forschung der Statintherapie eine Herabregulation der MMP-Sezernierung durch Makrophagen. In der Plaque führt dies zu einer Stabilisierung und hat somit wünschenswerte Eigenschaften. Zum Wachstum von Kollateralen muss im Prozess der Arteriogenese allerdings Platz geschaffen werden. Über eine vermehrte Expression von MMPs wird die perivaskuläre Matrix abgebaut. Die bisherigen Forschungsergebnisse würden hier eher für einen anti-arteriogenen Effekt sprechen.

Ob diese Enzyme in wachsenden Kollateralen unter Statintherapie wirklich herunterreguliert werden, ist eine Frage, die in weiteren Experimenten zu klären ist. Denn auch hier ist wahrscheinlich davon auszugehen, dass dieser Effekt *in vivo* zu gering ist, um die Enzymsekretion der Makrophagen stark zu beeinflussen.

### **5.2.5 Monozyten/Makrophagen**

Monozyten und Gewebsmakrophagen sind essentiell für die Arteriogenese. Durch ihre Migration in den perivaskulären Raum und ihre dortige Aktivierung, schaffen sie ein Milieu, welches weitere Leukozyten anlockt. Sie sind die wichtigste Quelle für wachstumsfördernde Faktoren, die zur Ausbildung von Kollateralarterien führen.

Der Einfluss von Statinen auf Makrophagen in der Entstehung der Atherosklerose ist schon intensiv erforscht worden. Hier kommt es über die Mevalonatsynthesehemmung zu einer Expressionshemmung vieler inflammatorischer Zytokine. Mitani et al. zeigten, dass TNF-alpha, G-CSF, Matrixmetalloproteinase und auch MCP-1 verringert sind<sup>75</sup>. Dies ließ sich in dieser Studie durch die Auswirkungen auf die Artherogenese gut nachvollziehen. Schwieriger scheint es, einen anti-inflammatorischen Effekt mit Arteriogeneseförderung in Einklang zu bringen. Zytokine wie MCP-1 oder G-CSF sind Faktoren, die wichtig für das Kollateralwachstum sind. Eine Verringerung durch Statine spricht somit eher nicht für einen

pro-arteriogenen Effekt. Interessant wäre hier die in vivo Auswirkung der Statintherapie auf Wachstumsfaktoren, die Makrophagen stimulieren, weiter zu untersuchen.

Einfluss hat sicher auch die NO Produktion. Zwar führt sie - wie oben beschrieben - eventuell zu einer anfänglich herabgesetzten Migration der Monozyten. Im weiteren Verlauf scheint sie sich aber positiv auf die Funktion bezüglich des Gefäßwachstums auszuwirken<sup>70</sup>.

TGF-beta könnte ein weiterer Schlüsselmechanismus für die Überwindung der anti-inflammatorischen Komponenten sein. Dieses Cytokin könnte über das Wachstum von Endothel und Muskularis zur Zunahme des Lumens und somit zur Verbesserung der Kollateralkonduktanz führen.

In der Arteriogenese ist der Scherstress die wichtigste Komponente für die Induktion des Arterienwachstums, was durch die Statintherapie zunächst unbeeinflusst bleibt. Durch die endothelmodulatorischen Eigenschaften der Statine sind hier aber Einflüsse auf die weitere Signaltransduktion denkbar. Der Effekt des Scherstresses könnte somit unterstützt werden. Hier gilt es die bekannten Signalwege der Arteriogenese diesbezüglich weiter zu erforschen. Gleichzeitig gilt es das Potential zu sehen, um über die Forschung der Statinwirkung neue Einflüsse auf die Mechanismen der Arteriogenese zu entdecken.

Insbesondere die Monozytenfunktion bezüglich pro-arteriogener Wachstumsfaktoren könnte weitere Information erbringen. So ist diese Funktion in Patienten mit Hypercholesterinämie und koronarer Herzerkrankung signifikant reduziert<sup>78</sup>. Von Interesse sind somit neben der Einflussnahme auf die Zellzahl durch eine Statintherapie vor allem Veränderungen hinsichtlich der Interaktion von Cytokinen und Monozyten. Die Funktion dieser Zellpopulation ist eine wichtige Voraussetzung für das Wachstum von Kollateralen<sup>79</sup>.

Hier verdichten sich aber die Vermutungen, dass Statine über die cholesterinsenkende Wirkung hinaus so genannte pleiotrophe Effekte haben. Diese sind aber sicherlich nicht nur aus anti-inflammatorischen Effekten abzuleiten.

Die positive Wirkung auf die Arteriogenese ist ein neuer Erklärungsansatz für die signifikante Morbiditäts- und Mortalitätsreduktion die in klinischen Studien nachgewiesen werden konnten.

Diese Daten bieten Grundlagen für eine Erweiterung der Indikation von Statinen.

## 6 Ausblick

Die Arteriogeneseforschung hat über die Grundlagen der Mechanismen um das Wachstum von Kollateralen hinaus bereits viele Substanzen und Faktoren verifizieren können, die diesen Prozess fördern oder aber auch nachteilig beeinflussen. Dabei handelt es sich zum einen um Rezeptoren, Chemokine und Zytokine, also körpereigene Faktoren. Zum anderen liegt heute ein Augenmerk auf Pharmaka und deren Einflüsse auf die Arteriogenese.

So zeigten Grundmann et al.<sup>18</sup> einen hemmenden Einfluss auf die Arteriogenese für die Therapie mit dem TNF-alpha-Antagonisten Infliximab.

Gerade Medikamente, die bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zum Einsatz kommen, sind hier von großer Bedeutung. Für Acetylsalicylsäure wurden bereits antiarteriogene Eigenschaften beschrieben<sup>52</sup>. Dass in dieser Arbeit für Statine ein pro-arteriogener Effekt gezeigt werden konnte, ist aufgrund des pleiotropen anti-inflammatorischen Charakters dieser Medikamentengruppe zunächst nicht zu erwarten gewesen.

Die im vorhergehenden Abschnitt diskutierten beteiligten Systeme können hier einen guten Erklärungsansatz liefern. Es gilt nun diese genauer zu untersuchen, zu verifizieren und diese Ansätze weiter zu verfolgen.

Die Einflussnahme über eNOS könnte hier ein erster Ansatzpunkt sein. Zu klären gilt es, ob ein Einfluss von Statinen in eNOS -/- Mäusen noch zu detektieren ist, z.B. ob eNOS unter Statintherapie in der Arterienwand von Kollateralen verstärkt exprimiert wird.

Des Weiteren ist die Rolle von TGF-beta zu klären. Wird dieses Zytokin wirklich durch die Statinbehandlung beeinflusst? Die Rolle in der Arteriogenese ist hier weiter zu untersuchen und ebenfalls die Frage, welchen Effekt eine lokale Therapie mit dieser Substanz auf die Atherogenese hat?

Inwieweit die beschriebenen Effekte dosisabhängig sind, ist ein weiteres Thema von zentraler Bedeutung. In der Angiogenese wurden z.T. sehr divergente dosisabhängige Ergebnisse erzielt<sup>74</sup>. Weiterhin gilt es, auch die anderen auf dem Markt befindlichen Statine auf ihren Einfluss auf die Arteriogenese zu untersuchen. Durch den Einsatz von lipophilen oder hydrophilen Statinen könnten durchaus unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden.

Eine weitere Frage, die es zu klären gilt, ist, ob die positive Einflussnahme von Rosuvastatin als weitere pleiotrophe Eigenschaft eingestuft werden kann. Damit würde es sich hier um eine Komponente dieses Medikamentes handeln, die unabhängig von den lipidsenkenden Effekten zu Tage tritt.

Schon heute spielen Statine eine zentrale Rolle bei der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen. Über die Reduktion von LDL tragen diese Medikamente dazu bei, die Mortalitäts- und Morbiditätsrate zu senken. Doch auch die davon unabhängigen pleiotropen Effekte scheinen ihren Teil zu diesen Ergebnissen beizutragen.

Über die Förderung des Kollateralarterienwachstums ist nun ein weiterer Erklärungsansatz für diese positiven Eigenschaften hinzugekommen.

## 7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen einer Rosuvastatintherapie auf das Wachstum kollateraler Blutgefäße im Tiermodell zu untersuchen. Hierbei wurde ein Atherosklerosemodell mit hyperlipidämischen ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen verwandt, um möglichst realitätsnahe Bedingungen zu schaffen.

Untersucht wurden die Einflussnahme auf die Atherogenese mithilfe einer Plaqueoberflächenbestimmung sowie die Plaquezusammensetzung mittels immunhistochemischer Verfahren. Aufschluss über die arteriogenen Eigenschaften brachte eine Mikrosphären basierte Perfusionsmessung und eine histologische Quantifizierung perivaskulärer Makrophagen. Zusätzlich wurde mittels Durchflusszytometrie die Konzentration zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen analysiert.

Für die Atherosklerose ergab sich unter Statintherapie eine eindeutige Plaqueoberflächenreduktion ( $p < 0,05$ ) sowie eine Tendenz zur Stabilisierung der Plaquezusammensetzung. Die Perfusionsmessungen zeigten eine signifikante Verbesserung in der mit Statin behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Dies war sowohl sieben Tage ( $26,6\% \pm 5,2\%$  und  $35,2\% \pm 3,6\%$ ) als auch zwei Monate nach Ligatur der Fall ( $49,0\% \pm 6,0\%$  bzw.  $56,0\% \pm 5,6\%$ ). Es kommt somit maximal zu einer fast 35%igen relativen Verbesserung der Perfusion. Bestätigt wird dies durch die signifikante Zunahme der Monozyteninfiltration.

Über welchen Mechanismus Rosuvastatin diese pro-arteriogenen Eigenschaften vermittelt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Ein erfolgversprechender Ansatz ist die Aktivierung der eNOS-Expression, die zu einem starken arteriogenen Effekt führt. Auch die Einflussnahme auf TGF-beta, sowie die genaue Rolle dieses Zytokins, ist ein interessanter Ansatzpunkt für weitergehende Forschungsarbeiten.

Zusammenfassend kann durch diese Arbeit erstmals ein deutlicher arteriogenesfördernder Effekt für Rosuvastatin gezeigt werden.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Klever-Deichert G, Hinzpeter B, Hunsche E et al. [Costs of coronary heart diseases over the remaining life time in coronary heart disease cases--an analysis of the current status of coronary heart disease cases in Germany from the social perspective]. *Z Kardiol.* 1999;88:991-1000.
2. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med.* 1997;337:1360-1369.
3. Hackam DG. Cardiovascular risk prevention in peripheral artery disease. *J Vasc Surg.* 2005;41:1070-1073.
4. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation.* 2003;10:83-97.
5. van Royen N, Hoefler I, Buschmann I et al. Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits. *Cardiovasc Res.* 2003;57:178-185.
6. Buschmann I, Katzer E, Bode C. Arteriogenesis - is this terminology necessary? *Basic Res Cardiol.* 2003;98:1-5.
7. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol.* 2000;190:338-342.
8. Ito WD, Arras M, Scholz D et al. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol.* 1997;273:H1255-H1265.
9. Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A et al. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003;81:177-199.
10. Ingber DE. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci.* 2003;116:1397-1408.
11. Ingber DE. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res.* 2002;91:877-887.
12. Ito WD, Arras M, Winkler B et al. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res.* 1997;80:829-837.
13. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S et al. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res.* 2004;94:671-677.

14. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84:2068-2101.
15. Hofer IE, van Royen N, Rectenwald JE et al. Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1- mediated mechanisms. *Circ Res*. 2004;94:1179-1185.
16. Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand*. 2001;173:35-43.
17. Schaper J, Konig R, Franz D et al. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1976;370:193-205.
18. Grundmann S, Hofer IE, Ulusans S et al. Anti-Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Therapies Attenuate Adaptive Arteriogenesis in the Rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005.
19. Buschmann IR, Hofer IE, van Royen N et al. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*. 2001;159:343-356.
20. Khan KM, Falcone DJ. Role of laminin in matrix induction of macrophage urokinase-type plasminogen activator and 92-kDa metalloproteinase expression. *J Biol Chem*. 1997;272:8270-8275.
21. Kusch A, Tkachuk S, Lutter S et al. Monocyte-expressed urokinase regulates human vascular smooth muscle cell migration in a coculture model. *Biol Chem*. 2002;383:217-221.
22. Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res*. 2004;95:449-458.
23. Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res*. 2004;95:449-458.
24. Ito WD, Arras M, Scholz D et al. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol*. 1997;273:H1255-H1265.
25. Ito WD, Arras M, Winkler B et al. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res*. 1997;80:829-837.
26. van Royen N, Hofer I, Buschmann I et al. Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *FASEB J*. 2002;16:432-434.
27. Buschmann IR, Hofer IE, van Royen N et al. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*. 2001;159:343-356.
28. van Royen N, Hofer I, Bottinger M et al. Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but

- induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ Res.* 2003;92:218-225.
29. van Royen N, Schirmer SH, Atasever B et al. START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation.* 2005;112:1040-1046.
  30. Seiler C, Pohl T, Wustmann K et al. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation.* 2001;104:2012-2017.
  31. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
  32. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973;180:1332-1339.
  33. Walpola PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI et al. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:2-10.
  34. Mondy JS, Lindner V, Miyashiro JK et al. Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo. *Circ Res.* 1997;81:320-327.
  35. Stemme S, Faber B, Holm J et al. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:3893-3897.
  36. Folcik VA, Aamir R, Cathcart MK. Cytokine modulation of LDL oxidation by activated human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1954-1961.
  37. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY et al. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation.* 1997;96:396-399.
  38. Boullier A, Bird DA, Chang MK et al. Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:214-222.
  39. Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP et al. Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. *Heart.* 2004;90:1385-1391.
  40. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94:2493-2503.
  41. Mercurius KO, Morla AO. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circ Res.* 1998;82:548-556.

42. Kolodgie FD, Virmani R, Burke AP et al. Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. *Heart*. 2004;90:1385-1391.
43. Schmidt-Lucke C, Rössig L et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005;111(22):2981-7.
44. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(6):998-1005.
45. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383-1389.
46. Davidson MH. A look to the future: new treatment guidelines and a perspective on statins. *The American Journal of Medicine*. 2002;112:34-41.
47. Fodor JG, Frohlich JJ, Genest JG, Jr. et al. Recommendations for the management and treatment of dyslipidemia: Report of the Working Group on Hypercholesterolemia and Other Dyslipidemias. *CMAJ*. 2000;162:1441-1447.
48. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118.
49. Cheng JW. Rosuvastatin in the management of hyperlipidemia. *Clin Ther*. 2004;26:1368-1387.
50. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258:468-471.
51. Moghadasian MH, McManus BM, Nguyen LB et al. Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *FASEB J*. 2001;15:2623-2630.
52. Hofer IE, Grundmann S, Schirmer S et al. Aspirin, but not clopidogrel, reduces collateral conductance in a rabbit model of femoral artery occlusion. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:994-1001.
53. Shiomi M, Ito T, Hirouchi Y et al. Stability of atheromatous plaque affected by lesional composition: study of WHHL rabbits treated with statins. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;947:419-423.
54. Kleemann R, Princen HM, Emeis JJ et al. Rosuvastatin reduces atherosclerosis development beyond and independent of its plasma cholesterol-lowering effect in APOE\*3-Leiden transgenic mice: evidence for antiinflammatory effects of rosuvastatin. *Circulation*. 2003;108:1368-1374.
55. Furman C, Copin C, Kandoussi M et al. Rosuvastatin reduces MMP-7 secretion by human monocyte-derived macrophages: potential relevance to atherosclerotic plaque stability. *Atherosclerosis*. 2004;174:93-98.

56. Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR. Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1624-1630.
57. Corpataux JM, Naik J, Porter KE et al. The Effect of Six Different Statins on the Proliferation, Migration, and Invasion of Human Smooth Muscle Cells. *J Surg Res.* 2005.
58. Erl W. Statin-induced vascular smooth muscle cell apoptosis: a possible role in the prevention of restenosis? *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2005;5:135-144.
59. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res.* 2004;94:230-238.
60. Werner N, Priller J, Laufs U et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1567-1572.
61. He FC, Wei LP, Lanzetta M et al. Assessment of tissue blood flow following small artery welding with an intraluminal dissolvable stent. *Microsurgery.* 1999;19:148-152.
62. Van Oosterhout MF, Prinzen FW, Sakurada S et al. Fluorescent microspheres are superior to radioactive microspheres in chronic blood flow measurements. *Am J Physiol.* 1998;275:H110-H115.
63. van Royen N, Hoefler I, Bottinger M et al. Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ Res.* 2003;92:218-225.
64. Hoefler IE, van Royen N, Buschmann IR et al. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res.* 2001;49:609-617.
65. Fulgham JR, Ingall TJ, Stead LG et al. Management of acute ischemic stroke. *Mayo Clin Proc.* 2004;79:1459-1469.
66. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation.* 2003;10:83-97.
67. Landsberger M, Jantzen F, Konemann S et al. Blockade of geranylgeranylation by rosuvastatin upregulates eNOS expression in human venous endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336:1005-1009.
68. Weber M, Hagedorn CH, Harrison DG et al. Laminar shear stress and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. *Circ Res.* 2005;96:1161-1168.

69. Alfon J, Guasch JF, Berrozpe M et al. Nitric oxide synthase II (NOS II) gene expression correlates with atherosclerotic intimal thickening. Preventive effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis*. 1999;145:325-331.
70. Cai WJ, Kocsis E, Luo X et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall during arteriogenesis. *Mol Cell Biochem*. 2004;264:193-200.
71. Yu J, Demuinck ED, Zhuang Z et al. Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:10999-11004.
72. Brevetti LS, Chang DS, Tang GL et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase increases skeletal muscle blood flow and oxygenation in severe rat hind limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2003;38:820-826.
73. Erl W, Hristov M, Neureuter M et al. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2003;169:251-258.
74. Van Royen N, Hoefler I, Buschmann I et al. Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *FASEB J*. 2002;16:432-434.
75. Mitani H, Egashira K, Kimura M. HMG-CoA reductase inhibitor, fluvastatin, has cholesterol-lowering independent "direct" effects on atherosclerotic vessels in high cholesterol diet-fed rabbits. *Pharmacol Res*. 2003;48:417-427
76. Steinberg D, Lewis A. Conner memorial lecture: oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*. 1997; 95: 1062–1071
77. Nishi K, Itabe H, Uno M, et al. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 1649–1654
78. Czepluch FS, Bergler A, Waltenberger J. Hypercholesterolaemia impairs monocyte function in CAD patients. *J Intern Med* 2007;261:201–4
79. Monocyte function rather than number is a prerequisite for the stimulation of collateral growth. *Atherosclerosis, Volume 196, Issue 1, January 2008, Pages 485-486*

## 9 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Arterie
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
bzw.	beziehungsweise
d.h.	das heißt
EPC	<i>Endothelial Progenitor Cells</i>
et al.	<i>et alii</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
g	Gramm
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i>
HE	Hämotoxylin-Eosin
HMG-CoA	Hydroxamethylglutaryl-Coenzym A
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IDL	<i>Inermediate Density Lipoprotein</i>
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter

MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
SREBP	<i>Sterol Responsive Element Binding Protein</i>
SSRE	<i>Shear Stress Response Element</i>
TGFβ-1	<i>Transforming Growth Factor-beta 1</i>
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein
V.	Vene
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 10 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Priv.-Doz. Dr. Ivo Buschmann für die Anregung und Möglichkeit zur Forschung an diesem Thema und für die Einführung und Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten.

Besonders danke ich auch Herrn Dr. Imo Höfer für die intensive und freundschaftliche Einarbeitung in das Themenfeld, für die vielen anregenden Diskussionen und für die zuverlässige Begleitung meiner Arbeit.

Dr. Niels van Royen, Susanne Hartmann und Stephanie Fischer danke ich für die Einarbeitung in den Mikrokosmos der Histologie.

Außerdem danke ich meinen Forscherkolleginnen und -kollegen Jan-Philipp Andert, Dr. Caroline Bergmann, Dr. Markus Böttinger, Dr. Eva Buschmann, Dr. Sebastian Grundmann, Dr. Jing Hua, Dr. Benjamin Meder, Dr. Elena Ninci, Dr. Stephan Schirmer und Dr. Susann Ulusans, für die sehr gute Zusammenarbeit und die gelungene Kooperation.

Meiner Verlobten Enken Gundlach danke ich für die emotionale Unterstützung während meiner gesamten Forschungsarbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern Elka und Armin Hedwig danken. Sie ermöglichten mir Unabhängigkeit bei gleichzeitig unermüdlicher Motivation.

## 11 Erklärung

„Ich, Felix Hedwig, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Auswirkungen einer Rosuvastatintherapie auf Arteriogenese und Atherosklerose bei ApoE-knock-out-Mäusen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift