

Aus dem

Universitären Herzzentrum Hamburg
Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Angiologie
Direktor Prof. Dr. med. Thomas Meinertz

IMMUNOLOGIE DER ATHEROSKLEROSE

Untersuchung von Fragmenten der A. mammaria interna vor der
Verwendung für koronare Bypass Operationen in Bezug auf eine
mögliche Korrelation der Expression von Hitzeschockprotein 60 mit
der späteren Neigung zur Restenose

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nicole Buhr

aus Düsseldorf

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: **12.10.2009**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: **Prof. Dr. Th. Meinertz**

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: **PD Dr. M. Merkel**

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: **Prof. Dr. J. Kähler**



Innsbruck, Aquarell 50x35cm, 1999

Franziska Königsrainer

Inhaltsverzeichnis

Liste der Abkürzungen	VII
------------------------------------	------------

Arbeitshypothese und Fragestellung	9
---	----------

1. Existenz eines VALT in der Intima der A. mammaria interna?.....	9
2. Expression von HSP60 in der Intima der A. mammaria interna	9
3. Nachweis von dendritischen Zellen in der Intima der A. mammaria interna als frühes Zeichen der Atherogenese	10
4. Besonderheiten der A. mammaria interna	10

Einleitung	11
-------------------------	-----------

1. Histologie des Gefäßsystems	11
1.1. Wandaufbau größerer Gefäße	11
1.2. Windkesselgefäße (Arterien vom elastischen Typ).....	12
1.3. Widerstandsgefäße (Arterien vom muskulären Typ).....	13
1.4. Austauschgefäße	13
1.5. Kapazitätsgefäße	13
1.6. Shunt- Gefäße	14
2. Physiologie und Pathophysiologie des Kreislaufsystems	14
3. Pathogenese arterieller Verschlüsse	15
4. Atherosklerose.....	16
4.1. Stadieneinteilung der Atherosklerose.....	16
4.1.1. Adaptive Intimaverdickung.....	16
4.1.2. Typ I	17
4.1.3. Typ II oder fatty streaks	17
4.1.4. Übergangszone.....	17
4.1.5. Typ III.....	18
4.1.6. Typ IV	18
4.1.7. Typ V	18
4.1.8. Typ VI	19
4.1.9. Typ VII	19
4.1.10. Typ VIII	19

Inhaltsverzeichnis

4.2. Epidemiologie der Atherosklerose	21
4.2.1. Prävention und Framingham- Studie	21
4.2.2. Risikofaktoren	22
5. Theorien zur Pathogenese der Atherosklerose	23
5.1. „Response to injury“- Theorie	24
5.2. „Altered LDL“- Hypothese	24
5.3. „Athero- ELAM“- Hypothese	25
5.4. Immunologische Hypothese.....	26
6. Grundlagen zur immunologischen Hypothese	27
6.1. Die Familie der „Heat shock“ Proteine (HSP).....	27
6.2. Klassifikation der HSP	28
6.3. Autoimmunität, Infektion und HSP	29
6.4. Atherosklerose und HSP.....	31
6.5. Zelluläre Komponenten in der Atherosklerose.....	32
6.5.1. Makrophagen	32
6.5.2. Glatte Muskelzellen	32
6.5.3. T-Lymphozyten.....	32
6.5.4. Mastzellen.....	33
6.5.5. Dendritische Zellen.....	34
6.6. Adhäsionsmoleküle und Atherosklerose.....	34
6.6.1. Die Selektine.....	35
6.6.2. Integrine.....	38
6.6.3. Immunglobulin- Superfamilie	39
6.6.4. Cadherine.....	40
6.6.5. Die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle in der Atherogenese	40
7. Das vascular associated lymphoid tissue (VALT)	42
8. Die A. mammaria interna (IMA).....	43
8.1. Indikationen der Bypasschirurgie und Ergebnisse	45
8.2. Langzeitergebnisse nach koronarer Bypasschirurgie	45
Material und Methoden	48
1. Patienten und Gewebe.....	48

Inhaltsverzeichnis

1.1. Patienten.....	48
1.2. Gewebe- Präparation.....	48
2. Reagenzien	49
2.1. Primärantikörper	49
2.2. Konjugate und Brückenantikörper.....	50
2.3. Bezugsquellen:	50
2.4. Kommerziell erhältliche Reagenzien.....	51
3. Puffer und Reaktionslösungen	52
3.1. Zubereitung der Stammlösungen	52
3.2. Zubereitung von Tris buffered saline (TBS).....	52
3.3. Zubereitung von Phosphate buffered saline (PBS)	53
3.4. Reagenz zum Blockieren der endogenen Peroxidase	53
4. Immunhistochemische Methoden.....	53
4.1. Fixierung und Einbetten des Gewebes.....	53
4.2. Beschichten der Objektträger	54
4.3. Anfertigen der Paraffinschnitte	54
4.4. Kontrollen.....	54
4.5. Vorbehandlung Demaskierung	55
4.6. Methoden	56
4.6.1. direkte Methode/ indirekte Methode	56
4.7. Testablauf.....	58
4.7.1. Alkalische Phosphatase- Färbung	58
4.7.2. Peroxidase- Färbung	59
5. Auswertung und Dokumentation.....	59
Ergebnisse	60
1. Oberflächenantigene.....	61
1.1. von Willebrand Faktor (vWF).....	61
1.2. Mononukleäre Zellen	62
2. Adhäsionsmoleküle	63
2.1. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)	63
2.2. P-Selektin	64

Inhaltsverzeichnis

2.3. <i>Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)</i>	65
3. <i>HSP6066</i>	
Diskussion	67
1. <i>Kein Nachweis eines VALT in der Intima der A. mammaria interna</i>	67
2. <i>Bypassuntersuchungen am Mausmodell</i>	68
3. <i>Auswirkung von verschiedensten Stressfaktoren</i>	69
4. <i>Rolle der Adhäsionsmoleküle</i>	74
Zusammenfassung	76
Literaturverzeichnis	78
Danksagung	90

Liste der Abkürzungen

A.	Arterie
a.d.	Aqua destillata
Ak	Antikörper
AGE	Advanced glycolation and products
AP	Activator protein
ApoB	Apolipoprotein B
APC	Antigen präsentierende Zelle
BALT	Bronchus associated lymphoid tissue
BiP	Bacterial intravenous Protein
C	Komplement
CCS	Canadian cardiovascular society
CD	Cluster of differentiation
CMV	Cytomegalievirus
DC	Dendritische Zelle
Dnak	Escherichia coli heat shock protein
ECM	Extrazelluläre Matrix
ELAM	Endothelial leukocyte adhesion molecule
EC	Endothelzelle
EGF	Epidermal growth factor
eNOS	endotheliale NO- Synthetase
Fab	Antigenbindungsfragmente
FGF	Fibroblast growth factor
FIA	Inkomplettes Freundsches Adjuvans
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GlyCAM	Glycosylation dependent cell adhesion molecule
GM-CSF	Granulozyten/ Makrophagen- Kolonie stimulierender Faktor
GroEL	Chaperonin 60
Grp	Glucose regulated protein
HDL	High density lipoprotein
HEV	High endothelial venules
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
hsc	Heat Shock Cognate
HSP	Heat shock protein
HUVEC	Human umbilical venous endothelial cell
iC3b	Komplementkomponente
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMA	Arteria mammaria interna
kD	Kilodalton
KFA	Komplettes Freundsches Adjuvans

Liste der Abkürzungen

KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Left anterior descending
LDL	Low density lipoprotein
LFA	Lymphocyte function associated antigen
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPS	Lipoproteinlipase
Mac	granulozytärer Komplementrezeptor
MAdCAM	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MC	Mastzelle
MCP-1	Monocyte chemotactic protein
MDV	Marek disease virus
MHC	Major histocompatibility complex
NALT	Nasopharyngeal associated lymphoid tissue
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NFKB	Nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B
NHS	Normales humanes Serum
NK	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
OxLDL	Oxidiertes LDL
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PECAM	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PP	Peyer'sche Plaques
SMC	Glatte Muskelzelle
SSRE	Shear stress responsive element
SV	Vena saphena magna
TBS	Tris buffered saline
TCR	T-Zellrezeptor
TTGF	Tumor growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V.	Vene
V.v.	Vasa vasorum
VALT	Vascular associated lymphoid tissue
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	Very late antigen
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Arbeitshypothese und Fragestellung

1. Existenz eines VALT in der Intima der A. mammaria interna?

In unserer Arbeitsgruppe wurde in den letzten Jahren die „autoimmunologische“ Hypothese für die Entstehung der Atherosklerose entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass sich im frühen Stadium der Atherogenese entzündlich-immunologische Reaktionen in der Intima an jenen Bezirken abspielen, die einem vermehrten hämodynamischen Stress ausgesetzt sind. In diesen Bezirken wurden Ansammlungen von mononukleären Zellen nachgewiesen. In der Annahme einer möglichen lokalen Immunfunktion wurden diese als VALT (Vascular associated lymphoid tissue) bezeichnet. In Vorgängerdissertationen (G. Millonig 1999; C. Schwentner 2000) wurden in erster Linie die zelluläre Zusammensetzung des VALT und das Vorhandensein von Adhäsionsmolekülen untersucht. Hier konnte anhand des Tiermodells gezeigt werden, dass sich in Bezirken von Bypass- Restenosen vermehrt mononukleäre Zellen befinden. Erstaunlicherweise konnten diese Daten auch auf „gesunden“ kindlichen Gefäßen bestätigt werden. In der vorliegenden Dissertation soll nun überprüft werden, ob auch in der *IMA*, dem Gefäß, das bevorzugt für Koronarbypässe verwendet wird, Zellen nachgewiesen werden können, die sonst in frühen atherosklerotischen Läsionen zu finden sind und ob sie eine Rolle bei der Atherogenese spielen.

2. Expression von HSP60 in der Intima der A. mammaria interna

Des Weiteren konnten wir beobachten, dass klinisch gesunde Probanden mit sonographisch nachweisbaren atherosklerotischen Läsionen in der *A. carotis* signifikant höhere Antikörpertiter gegen HSP60 aufweisen als Kontrollpersonen ohne solche Läsionen. Diese Antikörper reagieren kreuz mit humanem HSP60. Auch diese Daten konnten im Tierexperiment bestätigt werden (Xu 2003). Im Rahmen von Bypass- Restenosen wurde HSP60 exprimiert.

Ziel ist es nun, Parameter zu entwickeln, die es erlauben, das Risiko einer Restenose bei der Verwendung der *A. mammaria interna* für koronare Bypassoperationen abzuschätzen.

3. Nachweis von dendritischen Zellen in der Intima der *A. mammaria interna* als frühes Zeichen der Atherogenese

Außerdem soll untersucht werden, ob in der Intima der *A. mammaria interna* schon *in situ* dendritische Zellen vorhanden sind, die dann eventuell später, d.h. unter anderen Strömungsbedingungen zur initialen Sensibilisierung von eingewanderten T-Zellen und somit dem Beginn einer entzündlich-autoimmunologischen Reaktion beitragen könnten.

4. Besonderheiten der *A. mammaria interna*

Die *A. mammaria interna*, als bevorzugtes Gefäß für aortokoronare Bypässe verwendet, zeichnet sich anderen Bypassgefäßen gegenüber durch eine lange Offenheitsrate aus. Wie lässt sich dieses Phänomen erklären? Welche Stressfaktoren wirken auf die Gefäße ein? Führen die veränderten Strömungsverhältnisse zu spezifischen Veränderungen im Endothel?

Einleitung

1. Histologie des Gefäßsystems

1.1. Wandaufbau größerer Gefäße

Das Kreislaufsystem wird in ein Hochdrucksystem mit vorwiegend hohen Drücken um 100 mmHg und in ein Niederdrucksystem mit niedrigen Drücken von 5-25 mmHg unterteilt.

Entsprechend ihrer funktionellen Bedeutung kann man die einzelnen Abschnitte in 6 Gefäßklassen unterteilen (Windkessel-, Widerstands-, Sphinkter-, Austausch-, Kapazitäts- und Shunt- Gefäße).

Der Wandaufbau ist bei allen Blutgefäßen, sofern ihr Lumen einen bestimmten Durchmesser überschreitet, prinzipiell gleichartig:

- **Tunica intima:** Die innerste Schicht, welche die Gefäße auskleidet, besteht aus einem einschichtigen *Endothel* und einem *Stratum subendotheliale*, das über ein feines Netz lockeren Bindegewebes mit vereinzelt glatten Muskelzellen verfügt.

Die Grenze zur Media bildet die *Membrana elastica interna*.

- **Tunica media:** Diese Schicht wird von ringförmig angeordneten glatten Muskelzellen gebildet, zwischen denen Elastin, Kollagen Typ I, Typ III und Typ IV, sowie Proteoglykane eingebettet sind.

Da sowohl die Intima, als auch der größte Teil der Media gefäßlos sind, erhalten sie ihre Nährstoffe vom Lumen her.

Die Abgrenzung zur nächsten Schicht stellt die eher dünnere *Membrana elastica externa* dar.

- **Tunica externa:** Oder auch Adventitia genannt besteht aus lockerem Bindegewebe mit elastischen Fasern und verschiedenen Typen von Kollagen. Die Adventitia wird über *Vasa vasorum* mit Nährstoffen versorgt.

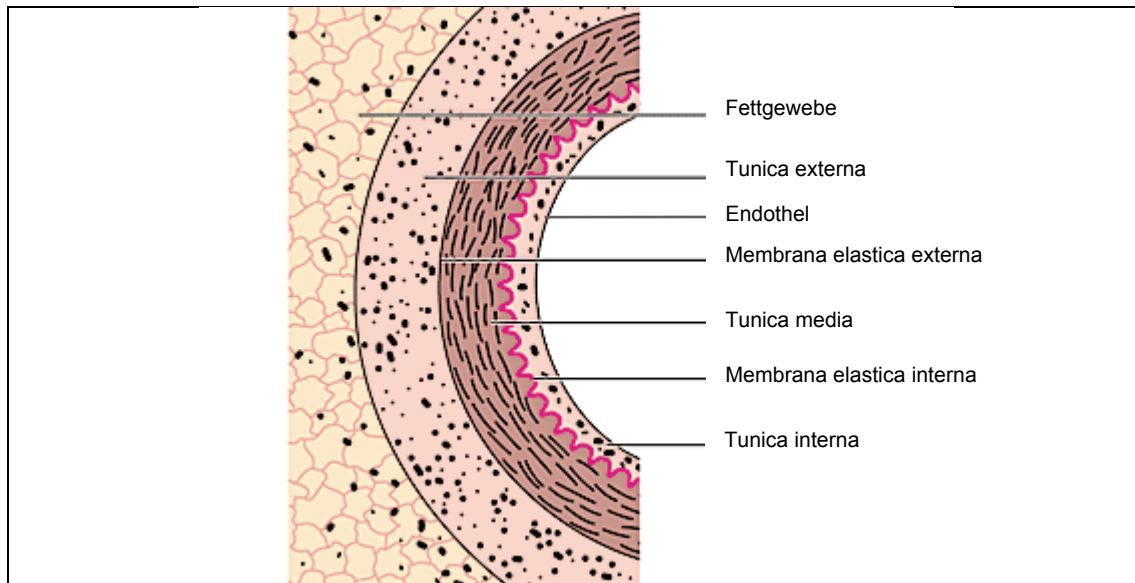


Abbildung 1 : Wandaufbau einer Arterie

1.2. Windkesselgefäße (Arterien vom elastischen Typ)

Dazu gehören die Aorta und ihre Hauptäste.

Die **Intima** imponiert durch ein breit ausgeprägtes *Stratum subendotheliale* mit längsverlaufenden Bindegewebsfasern.

Die *Membrana elastica interna* ist häufig mit der **Media** verschmolzen. Diese besteht aus konzentrisch angeordneten gefensterten elastischen Membranen mit dazwischenliegenden glatten Muskelzellen.

Eine *Membrana elastica externa* fehlt und die *Adventitia* ist eher schwächlich ausgeprägt.

Die *Windkesselfunktion der Aorta* kommt dadurch zustande, dass der vom Herzen in der Systole geförderte diskontinuierliche Blutstrom in einen kontinuierlich fließenden Strom während der Diastole umgewandelt wird. Dies wird durch Speicherung der kinetischen Energie während der Austreibungsphase in der dehnbaren Aortenwand als potentielle Energie erreicht. Diese wird bei abfallendem Druck wieder zurückverwandelt und in die Zirkulation abgegeben.

1.3. Widerstandsgefäße (Arterien vom muskulären Typ)

Dieser Gruppe gehören die terminalen Arterienäste und die Arteriolen an.

Sie haben den üblichen Wandaufbau mit charakteristischer, bis zu 40 Lagen glatter Muskulatur umfassender **Media**, wobei der **Tunica intima** eine *subendotheliale* Schicht, sowie eine *Membrana elastica interna* fehlen.

Diese muskelstarken Gefäße sind den Kapillaren vorgeschaltet, um den arteriellen Druck von ca. 120 mmHg auf Werte um 35 mmHg zu reduzieren. Zu dieser Gruppe zählen auch die **Sphinktergefäße**, die sich im präkapillären Bereich der Arteriolen befinden und die Größe der kapillären Austauschfläche reduzieren.

1.4. Austauschgefäße

Diese Gefäßgruppe entspricht den Kapillaren, die nur aus einer Lage von *Endothelzellen* und evtl. einer *Basalmembran* bestehen.

Hier vollzieht sich der Gas- und Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe durch Diffusion und Filtration.

1.5. Kapazitätsgefäße

Hierunter fallen funktionell die postkapillären Venolen mit einem Durchmesser von ca. 50 µm, die einen Wandaufbau wie die Kapillaren aufweisen, sowie die kleinen und mittelgroßen Venen, die über eine **Intima** mit einer dünnen *subendothelialen Schicht* verfügen. Die **Media** besteht aus schmalen Bündeln glatter Muskelzellen. Die **Adventitia** ist gut entwickelt.

Im Gegensatz dazu haben die großen Venen eine relativ dicke **Intima** und eine eher spärliche **Media** mit viel Bindegewebe. Dafür ist die **Adventitia** mit Bündeln glatter Muskulatur besonders ausgeprägt.

Bei den Venen ist die Wand meist dünner und die Schichtung weniger ausgeprägt, als bei den Arterien.

Das venöse System ist in der Lage, 64% des Blutes aufzunehmen und bei Bedarf, durch Kontraktion der glatten Venenmuskulatur zur Verfügung zu stellen.

1.6. Shunt- Gefäße

Hierunter ist ein Kurzschluss zwischen arteriellen und venösen System zu verstehen. Histologisch sind sie durch zusätzlich längsverlaufende Muskelfasern in der **Media**, bei Fehlen einer *Membrana elastica interna*, gekennzeichnet.

2. Physiologie und Pathophysiologie des Kreislaufsystems

Die Regulation der Kreislauffunktion geschieht zum einen auf zentraler Ebene durch neurale und humorale Mechanismen und zum anderen durch lokale Einflüsse im Rahmen einer Autoregulation. Dazu gehören Stoffwechselprodukte, thermische Faktoren, sowie Veränderungen des Sauerstoffgehaltes.

Daneben spielen die Beschaffenheit der Gefäßwand und biophysikalische Gesetze zur Aufrechterhaltung der Kreislauffunktion eine wichtige Rolle.

Für die Höhe des arteriellen Druckes sind die Windkesselerlastizität der Aorta, der periphere Strömungswiderstand, sowie die Herztätigkeit maßgebend.

Sinkt nun mit zunehmendem Alter die Dehnbarkeit in der Aorta, besonders wenn atherosklerotische Veränderungen hinzukommen, muss das Herz eine größere Beschleunigungsarbeit leisten, was durch die Steifheit der Gefäße zu einem erhöhten Druckpuls und in den Koronararterien zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf führt. Entscheidend dabei ist die Wandspannung des Ventrikels, d.h. die Kraft, die das Myokard pro Wandquerschnittsfläche zur Überwindung des erhöhten Aortendrucks aufbringen muss.

Nach dem *Laplace- Gesetz* berechnet sich die Wandspannung eines kugeligen Hohlorgans aus $(transmurale\ Druck \times Radius) / (2 \times Wanddicke)$. Was nun also bedeutet, wenn bei unveränderter Wanddicke der Ventrikeldruck durch Aortenstenose oder Hypertonie steigt, so erhöht sich die für die Aufrechterhaltung des normalen Herzzeitvolumens notwendige Wandspannung und damit der Sauerstoffbedarf des Myokards.

Für atherosklerotisch verengte Koronargefäße bedeutet dies, wenn das Lumen großer Koronargefäße um mehr als 60-70% verringert ist und sich damit die Querschnittsfläche auf 10-15% verkleinert, kommt es schon bei geringer körperlicher Belastung zu ischämischen Zuständen.

Der Zusammenhang von Strömungsgeschwindigkeit (V), Gefäßwiderstand (R) und dessen Bedeutung im Hinblick auf atherosklerotische Wandveränderungen spiegelt sich im *Hagen- Poiseuille`schen Gesetz* wider:

$$v = (\pi \cdot r^4) / (8 \cdot \eta \cdot l) \cdot (p_1 - p_2) \cdot t.$$

Es wird deutlich, dass sich der Gefäßwiderstand umgekehrt proportional zur 4. Potenz des Radius verhält. Das bedeutet: eine Verringerung des Radius um den Faktor 2, wie sie bei atherosklerotischen Wandverengungen eintritt, führt zu einer Zunahme des Gefäßwiderstandes um den Faktor $2^4 = 16$. Dieser erhöhte Widerstand muss nun durch noch höheren Druck und damit durch noch stärkere Herzarbeit kompensiert werden. Allerdings trifft diese Gesetzmäßigkeit für Bereiche mit laminarer Strömung zu. In herznahen Gefäßen, sowie an Bifurkationen und Gefäßstenosen findet sich ein turbulentes Strömungsprofil. Der Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung kann durch die dimensionslose Reynold Zahl geschätzt werden, die sich aus *Strömungsgeschwindigkeit x Gefäßradius x Massendichte des Blutes / Viskosität* berechnet und dessen Bedeutung darin liegt, dass in diesen Bereichen Wirbel entstehen, womit der Reibungswiderstand erheblich zunimmt und es zu Endothelzellschäden kommt (Fry 1968).

Blutgefäße unterliegen fortschreitenden Veränderungen und jede Arterie zeigt ihr eigenes Alterungsmuster. Erste Veränderungen treten schon um das 20. Lebensjahr an den Koronarien auf, während an anderen Arterien Veränderungen ab dem 40. Lebensjahr klinische Relevanz erfahren.

3. Pathogenese arterieller Verschlüsse

Arterielle Verschlusskrankheiten lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen: In entzündliche und degenerative Gefäßkrankheiten, wie z.B. die Thrombendangiitis obliterans und Vaskulitiden, die durch immunologische Prozesse ausgelöst werden. Desweiteren in mechanische Verschlüsse, die durch Druck äußerer Strukturen bedingt sind und dadurch neurologische Kompressionssyndrome verursachen können. Außerdem in Störungen in der Gefäßregulation, wie z.B. das Raynaud-Syndrom.

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der mittleren und größeren muskulären sowie der elastischen Arterien. Die Begriffe Arteriosklerose und Atherosklerose

werden häufig synonym gebraucht, wobei ersterer in dieser Arbeit nur in Zusammenhang mit Läsionen ohne wesentliche Lipidbeteiligung verwendet wird.

Laut WHO ist die Atherosklerose eine „...*variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlehydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumeinlagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.*“

Die Entwicklung kann jahrzehntelang asymptomatisch verlaufen, manifestiert sich allerdings in schwerwiegenden klinischen Folgeerkrankungen wie z.B. der koronaren Herzkrankheit und der chronisch arteriellen Verschlusskrankheit der Extremitäten, der Hirnarterien oder viszeraler Arterien. Es kommt zur Bildung von Thromben, die das Restlumen vollkommen verschließen und periphere Embolien auslösen können. Einblutungen in die Plaques und die Gefäßwand führen zur Aneurysmabildung, dessen Ruptur lebensgefährlich sein kann.

4. Atherosklerose

4.1. Stadieneinteilung der Atherosklerose

Entsprechend dem *Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis* werden atherosklerotische Läsionen nach ihrem histologischen Typ klassifiziert und in acht Stadien eingeteilt (Stary 1993).

4.1.1. Adaptive Intimaverdickung

Der Zustand der Intimaverdickung zeigt sich bei jedem Menschen von Geburt an in unterschiedlichem Ausmaß. Im weiteren Verlauf kommt es zur Anpassung des Gefäßes an die verschiedenen Strömungsverhältnisse und die unterschiedliche Wandspannung (Stary 1992; Zarins 1983).

Adaptiv verdickte Intimaregionen sind immer exzentrisch und fokal und enthalten im Vergleich zu anderen Intimaabschnitten vermehrt Plasmalipoproteine. Bleibt in weiterer Folge ein erhöhter Spiegel von plasmatischen Lipoproteinen (z.B. LDL) im Serum bestehen, kommt es in

diesen Bereichen zu vermehrter Einlagerung von Lipiden und es entstehen dort bevorzugt atherosklerotische Läsionen.

Es kann somit eine Voraussage über die Lokalisation späterer Läsionsentstehung getroffen werden. Stary klassifiziert diese Bereiche noch weiter in Regionen, die zu Lipidakkumulation neigen („lesion prone“), in Bereiche, die weitere Veränderungen begünstigen („progression prone“) und in solche, die sich atherosklerotischen Veränderungen gegenüber resistent zeigen („lesion resistant areas“).

Die adaptive Intimaverdickung ist somit eine Prädilektionsstelle für die Atheroskleroseentstehung und keine atherosklerotische Veränderung als solche.

4.1.2. Typ I

Das initiale Ereignis in der Atheroskleroseentstehung stellt, wie bereits erwähnt, die Akkumulation von T-Zellen und die Einwanderung von Makrophagen mit oder ohne Lipidbeteiligung in die Intima dar.

4.1.3. Typ II oder fatty streaks

Im Verlauf des Stadiums II werden die in den Makrophagen gespeicherten Lipide nun makroskopisch sichtbar und imponieren als gelbe Streifen (*fatty streaks*). Diese sind meistens intrazellulär gelegen, selten extrazellulär.

Außerdem beginnen auch die glatten Muskelzellen zu proliferieren und Lipide einzulagern.

4.1.4. Übergangszone

Dieser Begriff stellt den Übergang von normaler Intima zu den *fatty streaks* dar und ist geprägt von einer massiven Akkumulation von T-Zellen, die Werte bis zu 40% der gesamten Zellpopulation erreichen. Diese T-Zellen sind überwiegend CD-4 positiv und liegen in aktiviertem Zustand vor. Daneben finden sich MHC-II exprimierende Endothelzellen und glatte Muskelzellen dort wo bereits HLA DR⁺, γ -Interferon produzierende T-Zellen nachzuweisen sind.

Der Begriff der Transitionszone ist in der offiziellen Klassifizierung von Stary nicht aufgeführt, sondern wird von unserer Arbeitsgruppe ergänzt und soll das Stadium zwischen den noch komplett reversiblen Prozessen der Typen I und II und den nachfolgenden verdeutlichen (Xu et al. 1990).

4.1.5. Typ III

Bei einigen Erwachsenen finden sich in den *lesion prone areas* zusätzlich zu den Veränderungen wie in Typ I und Typ II beschrieben, vermehrte Lipidablagerungen und vor allem extrazelluläre Lipidakkumulationen, die an Stelle von glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix treten und damit die Läsionsarchitektur verändern.

Morphologisch gesehen tritt dieses Stadium zwischen die als durchaus noch reversibel eingestuften Typen I und II und den folgenden fortgeschrittenen Läsionen und wird daher als *Prä-Atherom* bezeichnet.

4.1.6. Typ IV

Dieser Typ ist durch die Entstehung von einzelnen extrazellulären Lipidpools, die als Lipidcore bezeichnet werden, gekennzeichnet. Als erste wird die Typ IV Veränderung als fortgeschritten und damit als *Atherom* bezeichnet, obwohl sie sich noch nicht als angiographisch signifikant darstellen lässt.

4.1.7. Typ V

An Stellen, an denen die extrazellulären Lipidcores das normale Gewebe und Zellen verdrängen, kommt es zur Proliferation von Kollagen und glatten Muskelzellen und damit zur Ausbildung einer fibroatheromatösen Plaque. Es kommt zur Einsprossung von Kapillaren und damit zur Einwanderung von Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen in die Umgebung der neugebildeten Plaque.

4.1.8. Typ VI

Kennzeichnend für dieses Stadium sind Einblutungen, Hämatome und thrombotische Ereignisse.

Durch Ruptur neugebildeter wandschwacher Gefäße kommt es zur Einblutung im Inneren der Läsionen (Beeuwkes et al. 1990).

Fissuren auf der Oberfläche von Atheromen und Fibroatheromen führen, begünstigt durch Verletzungen und Erosionen des Endothels, zu Hämatomen und Ablagerung thrombotischen Materials (Constantinides 1990; Richardson et al. 1989; Falk 2006; Davies u. Wolfe 1993).

4.1.9. Typ VII

Werden diese fortgeschrittenen Läsionen kalzifiziert, vorwiegend bei älteren Menschen und entsprechen diese Kalkablagerungen dem überwiegenden Plaqueanteil, werden sie als Typ VII bezeichnet. Tote Zellbestandteile, extrazelluläres Lipid, sowie auch Lipidcores werden dabei mineralisiert und ersetzt.

4.1.10. Typ VIII

Bei einigen Läsionen, vorwiegend im Bereich der unteren Extremität, fehlen Lipidablagerungen fast oder ganz und die normale Intima wird hauptsächlich durch Kollagen ersetzt und als *fibrotische Läsion* bezeichnet. Hervorgerufen wird dies durch viele Prozesse, wie z.B. der vorher erwähnte Organisationsprozeß von Thromben oder die Resorption von Lipidcores.

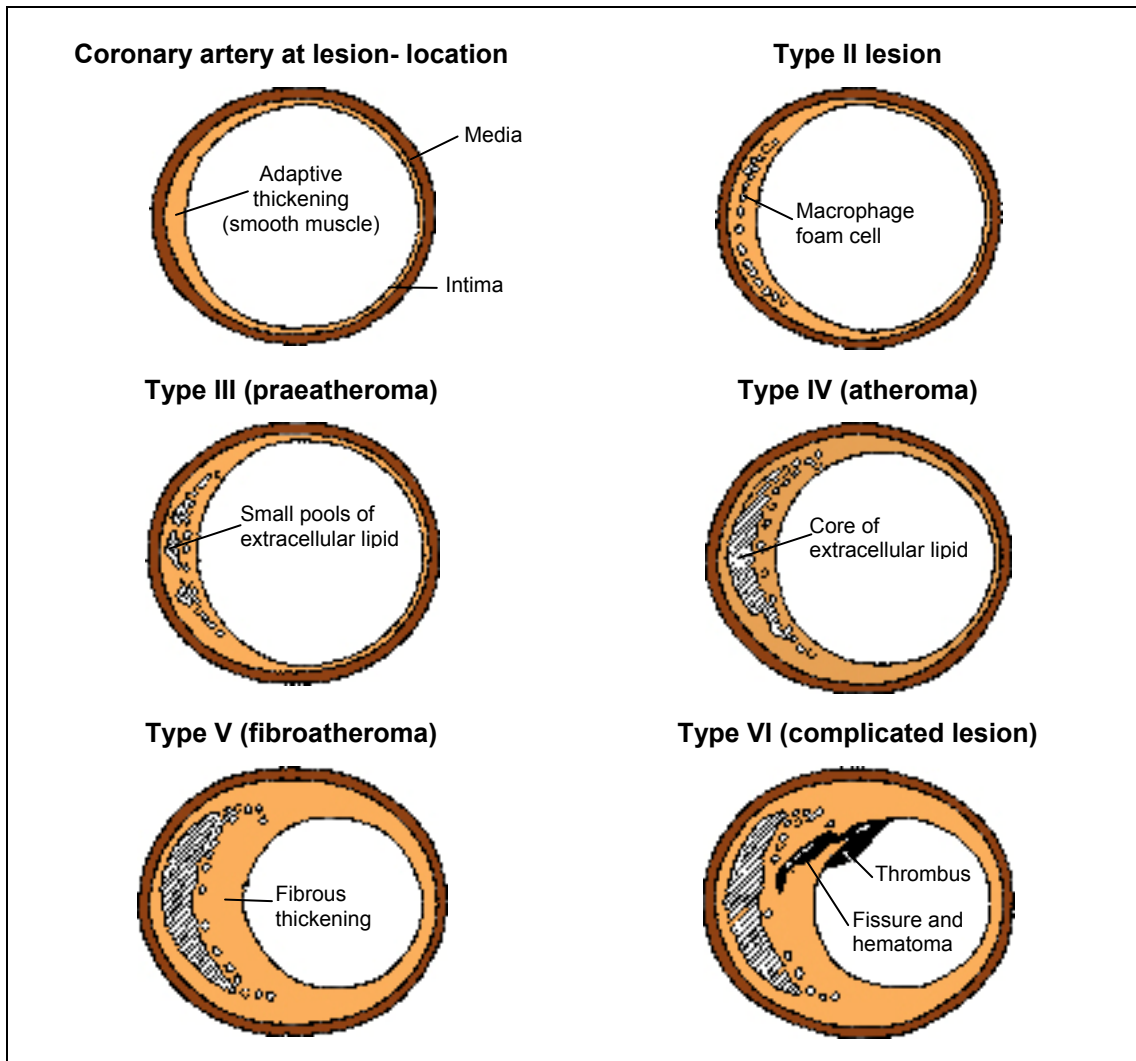


Abbildung 2: Stadien der Atheromentstehung. Stary 1993.

4.2. Epidemiologie der Atherosklerose

Untersuchungen der *National Health Examination Survey* zeigen, dass ungefähr 5 Mio. Amerikaner an einer KHK leiden. Sie ist die führende Todesursache bei Männern über 35 Jahre und bei allen über 47-jährigen Menschen, gefolgt von den Krebskrankheiten.

Zwischen 1940 und 1960 sind in den USA die Todesraten für die verschiedenen Formen kardiovaskulärer Erkrankungen um 40% gestiegen, die maximale Mortalität fand sich im Jahr 1963, danach ist ein Abwärtstrend zu verzeichnen. Seit 1970 zeigt sich eine Reduktion um 3% pro Jahr (*National Heart, Lung and Blood Institute, USA, 1990*), dennoch stellen sie nach wie vor die größte Bedrohung für Leben und Gesundheit in der Bevölkerung dar.

Bemerkenswerterweise ist in den hochindustrialisierten westlichen Nationen die Todesrate um ein Vielfaches höher als in Ostasien. In Japan erreicht sie nur ein Sechstel derjenigen in den Vereinigten Staaten. Bei japanischen Einwanderern in die USA, welche die entsprechenden Ess- und Lebensgewohnheiten angenommen haben, ist allerdings ein Anstieg auf amerikanisches Niveau zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass Lebens- und Ernährungsgewohnheiten für die Progression der Atherosklerose entscheidend zu sein scheinen.

4.2.1. Prävention und Framingham- Studie

Bis zur ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts sah man das Alter als alleinigen Hauptrisikofaktor für die Entstehung der Atherosklerose an. In den dreißiger und vierziger Jahren machte man erste Beobachtungen an KHK Patienten, die zusätzlich hohe Serumcholesterinspiegel aufwiesen (Steiner u. Domanski 1943) und vermutete einen Zusammenhang mit dem männlichen Geschlecht und Hypertonie (Master et al. 1939).

Es wurde daraufhin vom Public Health Service der USA eine longitudinale Studie in Auftrag gegeben, die die Einwohner von Framingham, Massachusetts umfasste.

Diese Framingham Studie untersuchte 5000 Einwohner im Alter von 30-59 Jahren, die zu diesem Zeitpunkt das erste Mal untersucht und als gesund, d.h. ohne Anzeichen für Atherosklerose, eingestuft wurden.

Die Daten dieser und nachfolgender Studien führten zur Definition der heute bekannten Risikofaktoren.

Da weder die Ätiologie noch die Pathogenese dieser Erkrankung hinreichend erforscht sind, kommt der Prävention dieser Risikofaktoren eine besondere Bedeutung zu.

4.2.2. Risikofaktoren

Entsprechend der Bedeutung für die Progression der Atherosklerose unterscheidet man Risikofaktoren erster und zweiter Ordnung. Zu den Risikofaktoren erster Ordnung zählen:

- Hyperlipidämie

Die Unterscheidung zwischen HDL (high density lipoprotein) und LDL (low density lipoprotein) wurde erstmalig in den 70er Jahren durch neu entwickelte Methoden erreicht (Burstein et al. 1970). Seitdem wird dem LDL eine positive und dem HDL eine negative Korrelation in Bezug auf das Krankheitsrisiko zugeschrieben (Miller u. Miller 1975).

Neuere Erkenntnisse gehen zusätzlich von einer immunologischen Variante des LDLs, dem Lp(a) aus (Dahlen et al. 1976), sowie dem chemisch modifizierten oxLDL (Steinberg et al. 1989) und der möglichen Auswirkung auf die Krankheitsentwicklung.

- Hypertonie

Die Bedeutung erhöhter systolischer Blutdruckwerte für die Entwicklung der Atherosklerose ist eines der wesentlichen Ergebnisse der Framingham Studie (Lusis 1988).

- Nikotinabusus

Epidemiologischen Studien zufolge konnte gezeigt werden, dass der Nikotinkonsum ein atherogener Faktor ist. Die kausal pathogenetischen Zusammenhänge sind allerdings noch Gegenstand der Forschung. Mögliche Gründe dafür könnten sein, dass Nikotin den Sympathikus stimuliert, O₂ am Hämoglobin durch CO verdrängt und damit eine Hypoxie verursacht. Außerdem vermehrt es die Zahl freier Radikale und führt damit zur Oxidation von LDL.

Ferner konnte gezeigt werden, dass Rauchen zu einer up- Regulation von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen führt (Lehr et al. 1993).

- **Diabetes mellitus**

Die erhöhte Blutglucosekonzentration führt zur nicht-enzymatischen Glykosylierung von Proteinen, darunter auch der Apolipoproteine. Diese sogenannten „advanced glycolation and products“ (AGE) lagern sich in der Arterienwand ab und binden vermehrt LDL. Diese glykosilierten LDL sind der Oxidation einfacher zugänglich als native LDL und liefern Cholesterin leichter an die Endothelzellen.

Die erhöhte Glucosekonzentration stimuliert auch die Proliferation von glatten Muskelzellen.

Neben diesen genannten Risikofaktoren erster Ordnung existieren Risikofaktoren zweiter Ordnung, wozu allgemeine Adipositas, Hyperurikämie, Stress, sowie hormonelle Einflüsse und Bewegungsmangel zählen.

Ferner können das Geschlecht und die familiäre Vorbelastung eine Rolle spielen.

5. Theorien zur Pathogenese der Atherosklerose

Erklärungsversuche für die Ätiologie und Pathogenese der Atherosklerose reichen bis in das Jahr 1815 zurück, als der Londoner Chirurg Joseph Hodgson erstmalig atheromatöses Material in der Intima identifizierte und als Ursache eine Entzündung deutete. Im Folgenden von Rayer und 30 Jahre später von Rudolf Virchow und von Carl von Rokitansky wieder aufgenommen, wurden diese Modelle weiter entwickelt. Selbst heute sind Entzündungsvorgänge als Auslöser für atherosklerotische Veränderungen von zentraler Bedeutung und sollen im Folgenden erläutert werden.

5.1. „Response to injury“- Theorie

1973 erstmalig von Russel Ross formuliert und in den folgenden Jahren weiter ergänzt, wird die Hypothese postuliert, dass eine Veränderung des Endothels durch mechanischen Stress, Toxine, freie Radikale, etc. das erste Ereignis in der Atheroskleroseentstehung darstellt. Die Folge davon ist eine endotheliale Dysfunktion, was zur vermehrten Durchlässigkeit für Lipoproteine, zur Produktion von Wachstumsfaktoren, besonders des PDGF (platelet derived growth factor) und zur Expression von Adhäsionsmolekülen führt.

Dies kann eine Folge von Ereignissen auslösen, wie die Monozyten- und Thrombozytenadhärenz, die Migration von Monozyten in die Intima und deren Entwicklung zu Makrophagen, die über ihren Scavenger- Rezeptor chemisch modifizierte LDL- Partikel aufnehmen können und dann als Schaumzellen oder sog. „*fatty- streaks*“ imponieren.

Stimuliert von den Wachstumsfaktoren wandern glatte Muskelzellen in die Intima ein und proliferieren. Diese glatten Muskelzellen nehmen ebenso über ihren Scavenger- Rezeptor Lipoproteine auf und werden zu Schaumzellen. Durch eine Hyperlipidämie wird dieser Prozess besonders stimuliert.

Dieser Verletzung des Endothels („*injury*“) folgt die Antwort („*response*“) in Form von entzündlichen Reaktionen, die zu fibrotischen Bindegewebsproliferationen führt. Gefolgt von Verletzungen und Rupturen dieser Bereiche, was wiederum eine Thrombozytenaggregation nach sich zieht und schlussendlich das Gefäßlumen einengt, sodass das umliegende Gewebe minderperfundiert wird.

5.2. „Altered LDL“- Hypothese

Diese Hypothese basiert auf den klassischen Konzepten von Goldstein und Brown aus den Jahren 1977-1979, die als erste die Aufnahme von chemisch modifiziertem LDL anstatt nativem LDL durch Makrophagen beschrieben. Die Makrophagen wandeln sich anschließend in Schaumzellen um. Diese Modifikation geschieht durch Acetylierung, Oxidation und Konjugation mit Malondialdehyd. Das chemisch veränderte LDL wird nun wesentlich schneller vom Monozyten- Makrophagensystem aufgenommen als natives LDL. Der entsprechende Rezeptor wird als „Acetyl LDL Rezeptor“ oder auch als „*Scavenger Rezeptor*“ bezeichnet. Er unterscheidet sich vom nativen LDL

Rezeptor dahingehend, dass er zum einen nicht absättigbar ist, da er über keine feed- back Hemmung reguliert wird (Henriksen et al. 1983) und zum anderen natives LDL nicht erkennt.

Es wird ferner beschrieben, dass neben Monozyten und Makrophagen auch glatte Muskelzellen in der Lage sind, LDL in Anwesenheit von Metallionen zu oxidieren (Steinberg et al. 1989). Diese Modifikation kann bei Anwesenheit von Antioxidantien, wie z.B. Vitamin A (Morel et al. 1984), Vitamin E und Vitamin C gehemmt werden (Morel et al. 1994). Antioxidantien zeigen außerdem antiinflammatorische Wirkung, indem sie die Expression von Adhäsionsmolekülen hinaufregulieren (Fruebis et al. 1997).

Rauchen führt zu einem Verbrauch anti- oxidativer Substanzen und damit zu vermehrter Oxidation von LDL- Partikeln, während beim Diabetes mellitus die erhöhte Blutglucosekonzentration zur nichtenzymatischen Glykosylierung der LDL führt.

Die „*altered LDL*“ Hypothese wird durch die „*retention of modified LDL*“- Theorie in der Annahme ergänzt, dass natives LDL und nicht bereits oxidierte Partikel im Blut zirkulieren. Das native LDL wird in die Intima transportiert, im Endothel oxidiert, wo es chemotaktisch auf andere Monozyten und glatte Muskelzellen wirkt, um sie dann in Schaumzellen zu verwandeln (Witzum et al. 1991).

5.3. „Athero- ELAM“- Hypothese

Als frühestes Ereignis in der Atheroskleroseentstehung kommt es zur Infiltration der Intima durch Monozyten. Sie adhärieren am Endothel und wandern dann in den subendothelialen Raum ein, wo sie anschließend akkumulieren, Lipide aufnehmen und zu Schaumzellen werden. In diesem Stadium fördern sie die Progression der Läsionsentstehung durch Sekretion von Cytokinen, wie IL-1, TNF und von Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF, FGF, HB-EGF (Ross 1993). Erst in fortgeschrittenen Läsionen sind laut dieser Hypothese, aber im Gegensatz zu unseren Beobachtungen, Lymphozyten zu finden, die durch die Sekretion von IF- γ und IL-4 zur Aktivierung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen beitragen (Libby u. Hansson 1991). Dieser leukozytenähnliche Prozess der Anlockung von Monozyten legt die Vermutung nahe, dass es sich um Endothel- abhängige Adhäsionsvorgänge wie bei akuten und chronischen

Entzündungen handeln könnte (Springer 1990). Demzufolge müsste es spezifische Vorgänge in der Endothel- Leukozyten Interaktion, wie die Expression von *endothelial leukocyte adhesion molecules* (ELAM) in atherosklerotischen Läsionen (ATHERO- ELAM), geben.

In vivo Untersuchungen an Kaninchen bestätigen diese Hypothese dahingehend, dass eine ELAM- Expression in schaumzellreichen-, sowie auch an Stellen mit geringer mononukleärer Infiltration gefunden werden konnte, nicht jedoch in blanden Regionen.

Molekularbiologische Untersuchungen konnten nun eine Sequenzhomologie zwischen Athero- ELAM-Molekülen von Kaninchen und humanen Leukozyten Adhäsionsmolekülen, die als VCAM-1 (*Vascular adhesion molecule*) identifiziert wurden, feststellen (Osborn et al. 1989). Es konnte am Tiermodell außerdem gezeigt werden, dass, wenn man eine Kaninchenaorta möglichst ohne große Manipulation untersucht, es vor der mononukleären Infiltration zur Expression von VCAM-1 kommt (Li et al. 1998) und dass erhöhte LDL- Spiegel zu einer Veränderung des Adhäsionsmolekülmusters, sowie zur up- Regulation von VCAM-1 (Kume et al. 1992) führen.

5.4. Immunologische Hypothese

Das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte immunologische Konzept stellt einen Zusammenhang zwischen entzündlichen Prozessen und der Entstehung der Atherosklerose her. Immunhistologische Untersuchungen an arteriellen Gefäßsegmenten von Patienten, die nicht an atherosklerotisch bedingten Gefäßerkrankungen gestorben sind, konnten zeigen, dass die ersten, die Intima infiltrierenden Zellen T-Zellen sind und nicht wie bisher angenommen Monozyten und Makrophagen (Emeson et al. 1996). Die Mehrheit dieser T-Zellen waren CD-4 positiv, HLA-DR positiv und als Zeichen ihrer Aktivierung (Xu et al. 1990) Interleukin-2-Rezeptor (IL-2) positiv. Im Zusammenhang damit wurde als pathogenetische Hauptkomponente ein Stressprotein identifiziert, das Heat shock protein 60 (HSP60). HSP60 wird von Endothelzellen exprimiert, die verschiedensten Formen von Stress ausgesetzt sind. Insbesondere jenen, die allgemein als Risikofaktoren bezeichnet werden (Wick et al. 2004).

6. Grundlagen zur immunologischen Hypothese

Die Haupttheorien zur Entstehung der Atherosklerose wie z.B. die „Response- to- injury“ oder die „Altered lipoprotein“ Hypothese konnten durch das Konzept ergänzt werden, dass entzündlich immunologische Prozesse in den unterschiedlichen Stadien der Atherogenese eine Rolle spielen. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass in atherosklerotischen Läsionen neben mononukleären Zellen und T-Zellen auch das Heat shock protein 60 (HSP60), ein Mitglied der Familie der Stressproteine nachgewiesen werden kann.

6.1. Die Familie der „Heat shock“ Proteine (HSP)

HSP`s werden von prokaryontischen und eukaryontischen Zellen konstitutiv oder nach Stressexposition exprimiert. Sie erfüllen physiologische Funktionen in der Faltung von Proteinen und ihrem intrazellulären Transport (Young et al. 1993). Einige HSP`s entwickeln unter Stressbedingungen, wie z.B. Hitze, Infektion, mechanischer Stress (Udelsmann et al.1991) etc. eine Art „Chaperon“- Funktion, indem sie entstehende Peptide während der Translation in Konformation halten und falten, sowie bestehende Proteine vor Denaturierung schützen.

Die Familie der HSP`s hat eine essentielle Bedeutung in der Evolution, was ihre hohe phylogenetische Konservierung erklärt. Es finden sich sehr große Sequenzhomologien zwischen den HSP`s unterschiedlicher Spezies. Z.B. gleichen sich unterschiedliche bakterielle HSP`s in bis zu 95% und humanes und bakterielles HSP zeigen in 50% eine Homologie auf Protein- und DNA-Ebene.

6.2. Klassifikation der HSP

Die HSP's werden ihrem relativen Molekulargewicht entsprechend in mehrere Subfamilien eingeteilt: HSP90, HSP70, HSP60 und niedrigmolekulares HSP:

Familie	Hauptvertreter	Physiologische Funktionen	Mögliche Bedeutung in der Immunantwort
HSP90	HSP90, HSP83	Verhindert Bindung des Steroidrezeptors an die DNA, Phosphorylierung der Tyrosinkinase	Tumoresistenz; Autoimmunität
HSP70	HSP70, BiP, hsc70, grp78, Dnak	Proteinfaltung und –entfaltung (Chaperon), Translokation von Proteinen, Zusammenbau multimerer Komplexe	Bildung der Immunglobuline, Klasse II Antigenprozessierung, Antigen vieler Pathogene, Autoimmunität
HSP60	HSP65, groEL	Proteinfaltung und –entfaltung (Chaperon), unterstützt Bildung der Polypeptide	Antigen vieler Pathogene, Autoimmunität
Ubiquitin	Ubiquitin	Abbau von Proteinen	Klasse I Antigenprozessierung, lymphocyte homing Autoimmunität

Tabelle 1: HSP und Subfamilien

- Die HSP90- Subfamilie:

HSP90 α und HSP90 β spielen eine wichtige Rolle im Steroidhormonrezeptorstoffwechsel (Lai et al.1984). Gemeinsam mit HSP56 und HSP70 stehen sie mit dem Aporezeptorkomplex in Verbindung. Außerdem spielt HSP90 eine wichtige Rolle in der Gefäßregulation, wobei es eng mit der endothelialen NO- Synthetase (eNOS) assoziiert ist (Garcia-Cardena et al.1998).

- Die HSP70- Subfamilie:

Es werden zwei verschiedene Typen von HSP70 unterschieden: Eine Form erfährt eine kontinuierliche Expression, die andere wird nur unter Stressbedingungen exprimiert.

HSP70 arbeitet dabei als „Chaperon“ und bindet an neu entstehende Peptide noch bevor sie die ribosomale Einheit verlassen haben. Es steht jedoch mit dem Endprodukt, dem fertig synthetisierten Protein nicht mehr in Verbindung (Hightower et al. 1994).

- **Die HSP60- Subfamilie:**

Die Gruppe der HSP60- Subfamilie wird von humanem HSP60, mykobakteriellem HSP65 und GroEL, dem Homolog von E. coli, sowie bakteriellm HSP10 und anderen bakteriellen Homologen gebildet. Auch diese Gruppe hat den Schutz von Proteinen während der Faltungsprozedur zur Aufgabe. HSP60 interagiert dabei u.a. mit HSP70 (Agard 1993).

- **Die Subfamilie der niedrigmolekularen HSP's:**

Die beiden Hauptvertreter dieser Gruppe sind HSP27 und HSP32. Sie sind in der Lage, hochpolymerisierte Partikel, die sogenannten *Heat Shock Granula*, auszubilden. HSP32 wird von einer Vielzahl von Stressfaktoren induziert und findet sich in hoher Dichte in myokardialen Myozyten. Verglichen mit anderen Subfamilien zeigen die niedermolekularen HSP's weniger interspecies Homologie, jedoch mehr intraspecies Homologie untereinander.

- **Ubiquitin:**

Ubiquitin oder auch HSP8 genannt, gilt als wichtiger Cofaktor im nicht-lysosomalen Abbau von Proteinen (Hershko 1988). Insbesondere in der Aminosäuresequenz veränderte Proteine werden auf diesem Weg beseitigt.

6.3. Autoimmunität, Infektion und HSP

In klinischen und experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Atherosklerose als entzündlich immunologisches Geschehen beginnt und auf eine autoimmunologische Reaktion gegen HSP60 zurückzuführen ist. HSP bildet die entscheidenden antigenen Determinanten für Mikroorganismen und ist folglich wichtig für die Entstehung einer protektiven humoralen und zellulären Immunantwort. Wenn man nun die große Sequenzhomologie betrachtet, mykobakterielles HSP65 z.B. zeigt mehr als 50% Übereinstimmung mit humanem HSP60, besteht darin das Risiko der Kreuzreaktivität und damit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Kiessling et al. 1991).

Obwohl die Ätiopathogenese der meisten Autoimmunkrankheiten noch immer nicht endgültig geklärt ist, wird vermutet, dass bestimmte HLA- Haplotypenkonstellationen, veränderte Autoantigene (z.B. physikalisch, chemisch oder viral) und Kreuzreaktionen zwischen humanen und bakteriellen Antigenen von Bedeutung sind. Letztgenanntes Kriterium wird von den HSP`s aufgrund ihres hohen evolutionären Konservierungsgrades besonders gut erfüllt. Folglich entsteht aus einer hochspezifizierten Erregerabwehr eine potentiell kreuzreaktive Immunantwort, die den Untergang körpereigenen Gewebes zur Folge hat. Dies ist nachvollziehbar wenn man in Betracht zieht, dass HSP- Epitope in Form von MHC- Peptidkomplexen und HSP- Molekülen selbst an der Oberfläche zu finden sind (Kaufmann 1991). Immunisierungsversuche an Ratten mit komplettem Freundschens Adjuvans, welches reichlich mykobakterielles HSP65 enthält, zeigen die Entstehung einer, der rheumatoiden Arthritis entsprechenden Erkrankung (Adjuvans- Arthritis). Die infiltrierenden T-Zellen reagieren mit einem bestimmten Epitop des mykobakteriellen HSP65. Dieses Epitop entspricht zu 45% der Aminosäuresequenz eines Bindungsproteins für Rattenknorpelproteoglykane (Van Bilsen 2002; Van Eden 1988 und 1989).

Ähnliche mögliche Kreuzreaktionen gegen humanes HSP60 konnten bei der Colitis ulcerosa, dem Mb.Crohn, dem juvenilen insulinpflichtigen Diabetes mellitus (Jones et al. 1993), der systemischen Sklerose (Sklerodermie) und anderen Erkrankungen nachgewiesen werden.

Hinweise für die Beteiligung einer Immunreaktion gegen HSP60 in den Anfangsstadien der Atheroskleroseentstehung wurden ebenfalls aus Studien am Tiermodell erhoben. Bei Kaninchen ist es möglich, durch Immunisierung mit kompletten Freundschens Adjuvans atherosklerotische Läsionen zu erzeugen. Diese befinden sich an typischen Prädilektionsstellen, die einem vermehrten turbulenten hämodynamischen Stress ausgesetzt sind, wie z.B. Hauptaufzweigungsstellen von Arterien. In diesen atherosklerotischen Läsionen konnten aktivierte T-Zellen, Makrophagen, glatte Muskelzellen und extrazelluläre Matrixproteine nachgewiesen werden, jedoch zunächst keine Schaumzellen. Diese traten erst auf, nachdem zusätzlich eine cholesterinreiche Diät verabreicht wurde, und zwar dann in stärkerer Ausprägung als bei alleiniger cholesterinreicher Fütterung (Xu et al. 1990 und 1992).

Die alleinige Immunantwort führt also lediglich zur Arteriosklerose (einfache mononukleäre entzündliche Infiltration und Verhärtung der arteriellen Wand), die zusätzliche cholesterinreiche Ernährung jedoch zur Atherosklerose (Entzündung mit Auftreten von Schaumzellen in der Arterienwand). Die HSP65- induzierten Läsionen gleichen denen, die auch beim Menschen vorhanden sind.

Zudem gibt es zahlreiche Hinweise, dass Infektionen in den Prozess der Atherogenese involviert sind. So konnte z.B. das Marek disease virus (MDV), ein *Herpesvirus*, für die Entstehung von T-Zell- Lymphomen bei Hühnern identifiziert werden (Hajjar 1991). Ferner wird die Beteiligung von *Cytomegalieviren (CMV)* (Adam et al. 1987), *Herpesviren* (Yamashiroya et al. 1988) und *Chlamydia pneumoniae* (Saikku et al. 1988) an der Entstehung der Atherosklerose beim Menschen diskutiert.

6.4. Atherosklerose und HSP

Immunhistochemische Untersuchungen an atherosklerotischen Läsionen von Arterien zeigten eine HSP60- Expression in der Intima. Während mikroskopisch die Intima gesunder Gefäße keine HSP60- Expression zeigt, beginnen Endothelzellen und Makrophagen HSP60 in Übergangszonen von normaler Intima zu fatty streaks und Plaques zu exprimieren (Kleindienst et al. 1993). Diese Beobachtung wurde bei glatten Muskelzellen und T-Zellen erst in fortgeschrittenen Läsionen gemacht. In den Läsionen zeigten sich vor allem im Bereich des Kerns große Mengen von HSP60, aber auch von HSP70, welches einen protektiven Effekt auf das Überleben von glatten Muskelzellen hat (Johnson et al. 1995). Die infiltrierenden T-Zellen stehen in engen Kontakt mit HSP- exprimierenden Zellen, was möglicherweise auf eine zelluläre Immunantwort zurückzuführen ist.

Durch eine *in vitro* Inkubation einer Gewebekultur von Ratten- Aorten mit LPS kann eine HSP- und Adhäsionsmolekülexpression des Endothels induziert werden und zwar an solchen Stellen, die dem größten hämodynamischen Stress ausgesetzt sind. Diese Bereiche entsprechen zugleich jenen, die später Atherosklerose entwickeln (Seitz et al. 1996).

6.5. Zelluläre Komponenten in der Atherosklerose

6.5.1. Makrophagen

Makrophagen sind in allen Stadien der Atherosklerose präsent. Sie sind als antigenpräsentierende Zellen aktiv, wie auch als Auffänger für sämtliche korpuskuläre Noxen aus dem Kreislauf, wie z.B. oxLDL. Außerdem sezernieren sie Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Metalloproteinasen und andere proteolytische Enzyme (Ross et al. 1993). Monozyten und Makrophagen selbst werden über Makrophagen- stimulierenden Faktor, Granulozyten- stimulierenden Faktor, Monozyten- stimulierenden Faktor und IL-2 angelockt und zur Proliferation angeregt.

6.5.2. Glatte Muskelzellen

Glatte Muskelzellen kommen physiologischerweise in der Gefäßwand einer gesunden Arterie nur in der Media, vereinzelt in der Intima, vor. Durch Sekretion von Makrophagen- Mitogenen (PDGF- ähnlich) werden die glatten Muskelzellen vom kontraktilen Typ durch Aufhebung der G₀- Phase in sekretorische glatte Muskelzellen transformiert.

Im Laufe der Atherogenese wandern glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima ein, durchlaufen diesen Phänotypwechsel und proliferieren. Dort bilden sie Kollagene, Proteoglykane und elastische Fasern. Auf diese Weise kommt es zu einer Fibrosierung der Plaques. Zu den Stimulatoren der Proliferation gehören u.a. Thromboxan A₂ (Lindblad et al. 1988), Angiotensin II, Katecholamine (Blaes u. Boissel 1983) und Serotonin (Nemecek et al. 1986).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten jedoch zeigen, dass glatte Muskelzellen bereits in der Intima von Kleinkindern präsent sind (Dissertation Falkensammer 1998).

6.5.3. T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind in allen Stadien des atherosklerotischen Prozesses präsent. Ihre Infiltration in die Intima gehört zu den ersten morphologisch fassbaren Veränderungen (Millonig et al. 2002). T-Zellen werden aktiviert, wenn ihnen Antigene von antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen

Zellen, präsentiert werden. Sie produzieren daraufhin Zytokine einschließlich Interferon γ und Tumornekrosefaktor α und $-\beta$, welche die Immunantwort verstärken (Hansson et al. 1989).

Der T-Zell- Anteil ist jedoch nicht in allen Phasen gleich und auch der Aktivierungsgrad unterliegt Veränderungen. So sind bereits initial in der verdickten Intima einzelne T-Zellen nachzuweisen. Zur Übergangszone hin erhöht sich der Anteil auf 40% aller zellulären Elemente. Auch der Aktivierungsgrad ist mit 70% sehr hoch. Dieser lässt sich über die Expression von HLA-DR als Aktivierungsmarker verfolgen (Xu et al. 1990). Diese Tatsache lässt die Vermutung aufkommen, dass die T-Zellen nicht zufällig dort zu finden sind, sondern vielmehr die Folge einer gerichteten immunologischen Reaktion darstellen. Mit zunehmender Progression der Atherosklerose hin zu komplexen Läsionen nimmt der T-Zell- Anteil wieder ab und die Makrophagen überwiegen. Dies spiegelt eine Abnahme der Aktivität der Entzündung wider.

6.5.4. Mastzellen

Mastzellen sind praktisch in all jenen Geweben präsent, die eine Barriere zur Außenwelt bilden, wie z.B. Haut, Darmwand und Bronchien. Da Mastzellen jedoch auch in der arteriellen Intima gefunden werden, könnte auch dieser Region eine gewisse Barrierefunktion zukommen (siehe später beim VALT). Mastzellen greifen auch in den Lipidmetabolismus der arteriellen Wand ein, indem sie sowohl den LDL- als auch den HDL- Mechanismus beeinflussen. Sie begünstigen die Schaumzellentwicklung, indem sie die Endozytoserate für LDL in Makrophagen steigern. Aber auch freies LDL kann von ihnen, wenn auch unspezifisch, auf der Zelloberfläche gebunden und abgebaut werden (Kokkonen u. Kovanen 1993). Außerdem spielen Mastzellen eine Rolle in der Oxidation von LDL zu oxLDL- Partikeln (Lindstedt et al. 1993). Darüber hinaus sezernieren sie Heparin, Tryptase, Chymase und Zytokine, wie z.B. Fibroblast growth factor, PAF und TGF- β und beeinflussen damit die Entstehung der Atherosklerose. Zytokine erfüllen dabei verschiedene Aufgaben: Sie führen zur Infiltration von T-Zellen und Monozyten/ Makrophagen (Ross 1993). Auch die Immigration und Proliferation von glatten Muskelzellen wird stimuliert (Inoue et al. 1996).

6.5.5. Dendritische Zellen

Die dendritischen Zellen gehören wie auch die Makrophagen und B-Zellen zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen, stellen jedoch die wichtigste „professionelle“ Zellgruppe dar. Gereifte dendritische Zellen besitzen eine typische verzweigte Morphologie und kommen ausschließlich in den T-Zellbereichen der lymphatischen Gewebe vor. Ihre Vorläuferzellen halten in der Peripherie Antigene fest und wandern dann zu den lymphatischen Geweben, wo sie die Antigene den T-Zellen präsentieren (Immunologie Janeway u. Travers 1997). Dendritische Zellen sind insofern speziell, als dass sie naive T-Zellen stimulieren können, während Makrophagen nur solche Zellen aktivieren können, die vorher einen Priming- Prozess durchlaufen haben. Sie exprimieren neben MHC-I auch MHC-II konstitutiv auf ihrer Oberfläche, sodass sie mit CD4 und CD8 interagieren können.

In der T-Zellreifung im Thymus präsentieren dendritische Zellen Autoantigene und eliminieren so autoreaktive T-Zellen im Rahmen der negativen Selektion (Kurts et al. 1997).

Außerdem finden sich dendritische Zellen in atherosklerotischen Läsionen, bei denen auf Schaumzellen das CD1a Antigen nachgewiesen werden konnte (Bobryshev u. Lord 1995; Bobryshev et al. 1995 und 1996). Sogar in der Intima von gesunden Kleinkindern wurden dendritische Zellen entdeckt (Waltner-Romen et al. 1998). Auch in der Intima von Erwachsenen- Gefäßen konnte ein Netzwerk dendritischer Zellen (vascular associated dendritic cells- VADC) nachgewiesen werden, welches besonders an hämodynamisch belasteten Regionen ausgeprägt ist und dem Netzwerk von Langerhans- Zellen in der Haut ähnelt (Millonig et al. 2001).

6.6. Adhäsionsmoleküle und Atherosklerose

Adhäsionsmoleküle sind chemisch betrachtet Proteine. Sie bilden die Grundlage für alle gerichteten Migrationen der immunologischen Effektorzellen. Sie werden auf der Basis struktureller Homologien verschiedenen Molekülfamilien zugeordnet. Die an der Leukozytenmigration (s. Abb. 4) beteiligten Moleküle gehören den Selektinen, den Integrinen, den Cadherinen oder der Immunglobulin-Superfamilie an.

Die Expression von Adhäsionsmolekülen ist gewebsspezifisch, was ein *Homing* von Zellen jeglicher Art ermöglicht. Durch Änderung des spezifischen Mikroenvironments, wie die wechselnde Ausprägung des Zytokinmusters, kommt es auch zur Änderung des Adhäsionsmolekülprofils. Die Folge davon kann eine verminderte oder vermehrte Infiltration von mononukleären Zellen sein. So wird auch verständlich, dass Adhäsionsmoleküle in allen Stadien der Atherosklerose präsent sind.

6.6.1. Die Selektine

Ihre Hauptaufgabe besteht in erster Linie darin, das *Homing* von Leukozyten an ihren Bestimmungsort in spezifischen Geweben zu vermitteln. Sie werden entweder auf Leukozyten (L-Selektin = CD62L) oder auf vaskulärem Endothel (P-Selektin = CD62P und E-Selektin = CD62E) nicht konstitutiv exprimiert. Selektine sind Zelloberflächenmoleküle ähnlicher Grundstruktur. Die einzelnen Moleküle unterscheiden sich durch eine lektinähnliche Seitenkette in ihrem extrazellulären Bereich (s. Abb. 3). Jedes Selektin bindet an ein Kohlenhydratmolekül an der Zelloberfläche.

	Name	Gewebeverteilung	Ligand
Selektine Binden Kohlenhydrate lösen Leukozyten- Endothel- Wechselwirkungen aus	L-Selektin	Naive und einige Gedächtnis- T-Lymphozyten, Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, Eosinophile	Sulfatiertes Sialyl- Lewis, GlyCAM-1, CD34, MAdCAM-1
	P-Selektin	Aktiviertes Endothel und Thrombozyten	Sialyl- Lewis ^x
	E-Selektin	Aktiviertes Endothel	Sialyl- Lewis ^x

Tabelle 2: Selektine und ihre Liganden

Einleitung

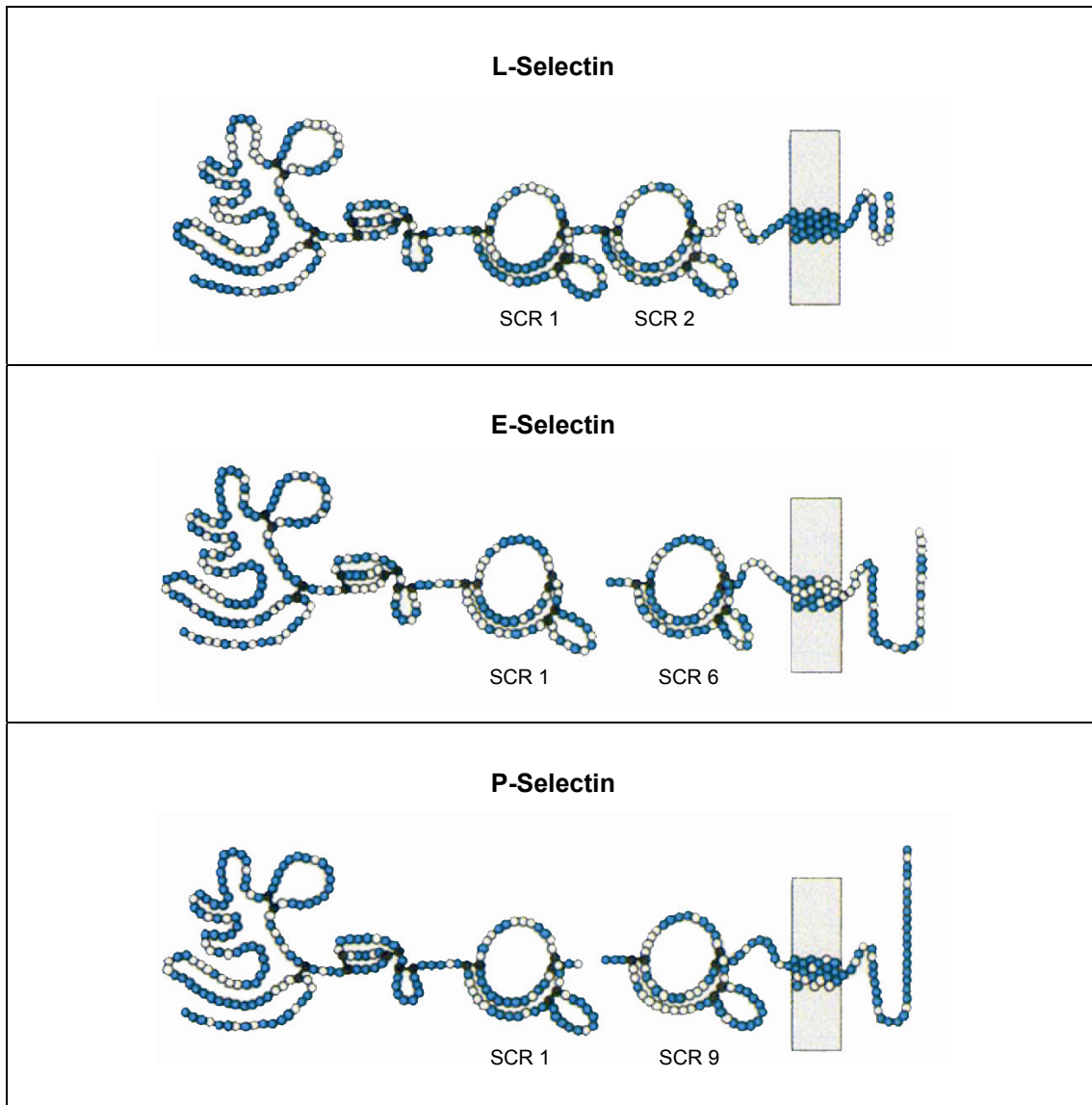


Abbildung 3: Kettenaufbau der Selectine. Tedder et al. 1995.

Die selektinvermittelte Adhäsion ist so schwach, dass die Leukozyten am Gefäßendothel entlangrollen können

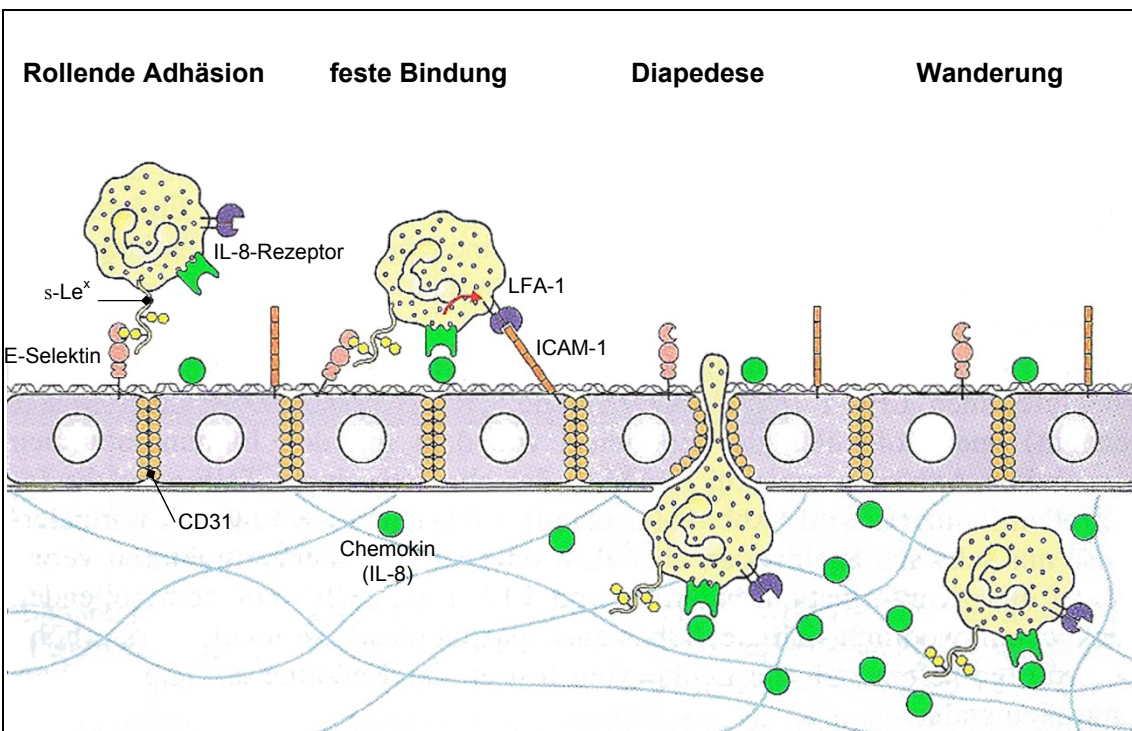
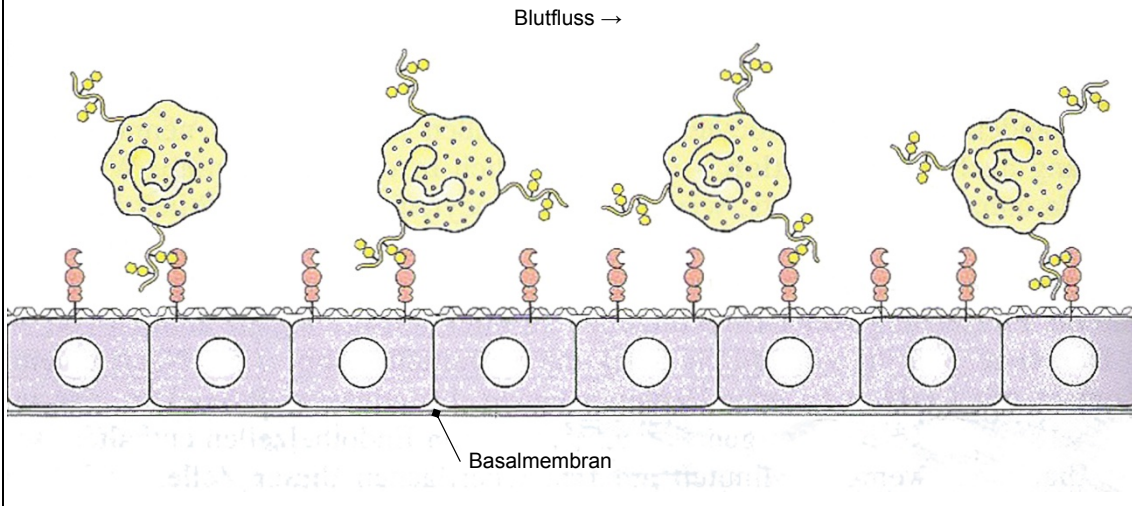


Abbildung 4: Sequenz der Leukozytenadhäsion „homing“. Janeway und Travers 1997

6.6.2. Integrine

Die Integrine umfassen eine große Familie von Zelloberflächenproteinen, die die Adhäsion zwischen Zellen, sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix bei der Immunantwort und der inflammatorischen Antwort ermöglichen. Außerdem sind sie am Aufbau von Geweben und bei der Zellwanderung während der Entwicklung beteiligt. Integrine bestehen aus einer großen α - Kette, die nicht- kovalent mit einer kleineren β - Kette zusammengelagert ist. Es gibt verschiedene Unterfamilien der Integrine, die durch gleiche β - Ketten charakterisiert sind. Die Unterfamilien mit ihren entsprechenden Liganden sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

	Name	Gewebeverteilung	Ligand
Integrine Binden an Zelladhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrix	$\alpha_L\beta_2$	T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen	ICAM-1, ICAM-2
	$\alpha_M\beta_2$	Monozyten, Makrophagen, Neutrophile	ICAM-1, ICAM-2, iC3b, Fibrinogen
	$\alpha_X\beta_2$	Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen	iC3b
	$\alpha_4\beta_1$	Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen	VCAM-1
	$\alpha_5\beta_1$	Monozyten, Makrophagen	Fibronectin
	$\alpha_4\beta_7$	Lymphozyten	MAdCAM-1
	$\alpha_E\beta_7$	Lymphozyten im Epithel	E-Cadherin

Tabelle 3: Integrine und ihre Liganden

6.6.3. Immunglobulin- Superfamilie

Diese Familie wird so genannt, weil die einzelnen Mitglieder strukturelle Ähnlichkeiten zu den konstanten Regionen von Immunglobulinen aufweisen. Zu dieser Familie gehören die Adhäsionsmoleküle CD2, CD31 (PECAM-1), LFA3, ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, MAdCAM-1, NCAM-1, als auch Non-Adhäsionsmoleküle Ig, TCR, CD3, CD4, CD8, MHC. Alle enthalten die Immunglobulin-Domäne in unterschiedlicher Häufigkeit. Endothelzellen exprimieren ICAM-1 bereits konstitutiv, die Expression wird aber vermutlich durch IL-1, TNF- α , INF- γ und LPS noch weiter erhöht, während ICAM-2 nur konstitutiv exprimiert wird. LFA-1 auf Leukozyten ist der entsprechende Ligand für ICAM-1 und ICAM-2.

VCAM-1 interagiert bevorzugt mit aktivierten T-Memoryzellen, jedoch auch mit VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$ - Integrin), welches auf Leukozyten, Tumorzellen und unreifen Erythrozyten zu finden ist. Die Expression auf dem Endothel ist nicht konstitutiv und muss erst induziert werden.

	Name	Gewebeverteilung	Ligand
Die Immunglobulin-Superfamilie verschiedene Funktionen bei der Zelladhäsion Ziel von Integrinen	CD2 (LFA-2)	T-Zellen	LFA-3
	ICAM-1	aktivierte Endothelzellen, Lymphozyten, dendritische Zellen	LFA-1, Mac1
	ICAM-2	ruhende Endothelzellen, dendritische Zellen	LFA-1
	ICAM-3	Lymphozyten	LFA-1
	LFA-3	Monozyten, Makrophagen	Fibronektin
	LFA-2	Lymphozyten, antigenpräsentierende Zellen	CD2
	VCAM-1	aktiviertes Endothel	VLA-4

Tabelle 4: Immunglobulin- Superfamilie

6.6.4. Cadherine

Cadherine sind Transmembranglykoproteine. Man unterteilt diese Gruppe in klassische und desmosomale Cadherine, in Protocadherine und cadherinverwandte Peptide (Suzuki 1996). Klassische Cadherine weisen in ihrer Klasse mit 43%-58% Sequenzhomologie auf Proteinebene eine hohe evolutive Konservierung auf (Kemler et al. 1989). Sie vermitteln extrazellulär den calciumabhängigen direkten Zell- Zell- Kontakt zu Cadherinen der Nachbarzelle (Ozawa et al. 1998).

6.6.5. Die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle in der Atherogenese

Die Adhäsion von Leukozyten an das arterielle Endothel stellt einen sehr frühen Prozess in der Entstehung der Atherosklerose dar (Ross et al. 1993). Einer solchen Adhäsion muss die Expression von Adhäsionsmolekülen vorausgehen. Es wurden spezifische Adhäsionsmoleküle sowohl in frühen als auch in späten atherosklerotischen Läsionen beschrieben. Diese Beobachtungen werden noch durch die bekannten Risikofaktoren ergänzt, welche die Expression der Adhäsionsmoleküle in unterschiedlicher Weise induzieren. Die arterielle Hypertonie bewirkt eine Zunahme von E-Selektin und P-Selektin auf Endothelzellen, sowie eine Zunahme der Serumspiegel von löslichem P-Selektin (Verhaar et al. 1998). Rauchen verstärkt die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin (Shen et al. 1997). Auch oxLDL alteriert die natürlichen Expressionsmuster, indem es eine Zunahme von ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin, *in vitro* unter Kulturbedingungen bewirkt (Kume et al. 1992; Mehta et al. 1995). Interessanterweise trifft dies nur auf arterielle Gefäße, nicht jedoch auf venöse Endothelzellen zu. Dies könnte eine Erklärung für das Fehlen von Venosklerose sein. Ein Erklärungsversuch für dieses Phänomen besteht darin, dass arterielle Endothelzellen in ihren früheren Lebensphasen einem höheren hämodynamischen Stress unterliegen. Dieser Vor- Stress könnte bereits Veränderungen im Rahmen des HSP- Metabolismus nach sich gezogen haben, die zu einem unterschiedlichen Verhalten von arteriellen und venösen Endothelzellen unter den gleichen Kulturbedingungen führen (Amberger et al. 1997). Stressoren führen außerdem zu einer synchronen Expression von Adhäsionsmolekülen und HSP60 (Seitz et al. 1996). Nach

diesem Vor- Stress kommt es zu einer Erniedrigung der Schwelle für andere Stressfaktoren, wie z.B. oxLDL. Dieses oxLDL könnte daher einen Stimulus für die leukozytäre Infiltration zu Beginn der Atheroskleroseentstehung darstellen. Nach Infiltration in das subendotheliale Bindegewebe bilden die Leukozyten wiederum eine Vielzahl von Zytokinen, IL-1, TNF- α u.a., die ihrerseits die Adhäsionsmolekülexpression forcieren und damit neue Leukozyten zum Einwandern bewegen.

Doch auch biomechanischer Stress bewirkt eine sehr differenzierte Veränderung im Profil der Expression von Adhäsionsmolekülen, indem es zu einer starken Induktion von ICAM-1 kommt. Besonders Scheerstress ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen (Chiu et al. 2004). Diese Besonderheit könnte für das Verteilungsmuster atherosklerotischer Veränderungen verantwortlich sein. Dies geschieht hauptsächlich an Stellen, die vermehrtem hämodynamischen Stress unterliegen.

Dieses Konzept lässt sich auch auf die protektiven Faktoren, wie Östrogen und HDL anwenden. Diese anti- atherogenen Einflüsse führen zu einer Verringerung der Expression von Adhäsionsmolekülen und erschweren dadurch die Infiltration von Entzündungszellen in die Intima (Miller et al. 2004). Auch der atheroprotektive Effekt von Acetylsalicylsäure (ASS) gehört in diesen Bereich. Wie auch Östrogen und HDL verringert ASS die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen. Dies verhindert die Interaktion von Leukozyten mit HSP60, obwohl es selbst durch ASS induziert wird. Ohne die Co- Expression dieser beiden Moleküle ist die Immunantwort von T-Zellen gegen HSP60 nicht möglich, da sie wegen der schnellen Blutströmung nicht anhaften können (Amberger et al. 1999).

Adhäsionsmoleküle können in ihrer löslichen Form auch als serologischer Marker für die präklinische Diagnose der Atherosklerose verwendet werden. Zusammen mit einer erhöhten Monozytenzahl zeigt ein erhöhtes lösliches ICAM-1 im Serum eine bestehende Koronaratherosklerose an (Ikata et al. 2000). In diesem Zusammenhang ist auch VCAM-1 zu nennen, der als spezifischster Serummarker in seiner Höhe mit der Ausdehnung korreliert (Peter et al. 1999).

7. Das vascular associated lymphoid tissue (VALT)

Bei Untersuchungen zum Nachweis einer entzündlich- immunologischen Beteiligung an der Entstehung der Atherosklerose wurden normale vermeintlich gesunde Arterien von Kindern im Alter von 8 Wochen bis 8 Jahren, die entweder Unfällen zum Opfer gefallen sind oder am plötzlichen Kindstod verstarben, als Negativkontrolle verwendet. Als Kontrollgefäß wurde die *Arteria carotis communis* einschließlich ihrer Bifurkation zur *Arteria carotis externa* und *interna* verwendet. Wider Erwarten fanden sich in der Intima dieser kindlichen Arterien mononukleäre Zellen (T-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen und einige Mastzellen) aber fast keine B-Zellen und NK-Zellen. Und zwar bevorzugt an solchen Stellen (Bifurkation), von denen bekannt ist, dass sie für die Atheroskleroseentstehung im späteren Lebensalter prädisponiert sind, da sie einem erhöhten hämodynamischen Stress unterliegen. Analog einer lokalen Immunabwehr an Strukturen, die bereits für z.B. den Darm und den Respirationstrakt als MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*) beschrieben wurden, wurde diese Ansammlung mononukleärer Zellinfiltrate VALT (*vascular associated lymphoid tissue*) bezeichnet. Wir gehen davon aus, dass sie ähnlich dem MALT eine lokale immunologische Überwachung des Blutstroms ausführt (Wick et al. 1995 und 1997; Millionig et al. 2002).

Jedoch gibt es auch wesentliche Unterschiede zwischen VALT und MALT. Ersterem fehlen wichtige Komponenten, wie Lymphfollikel, bzw. Keimzentren und B-Zellen. Gemeinsam haben sie den hohen Anteil an γ/δ -T-Zellen. Im VALT finden sich mit 10-15% γ/δ -T-Zellen deutlich weniger als im MALT, aber immerhin noch deutlich mehr als im peripheren Blut (1-2%). Die meisten T-Zellen exprimieren den α/β -TCR. Jene, die den γ/δ -TCR exprimieren, finden sich hingegen in frühen atherosklerotischen Läsionen (Kleindienst et al. 1993). γ/δ -T-Zellen erkennen spezielle Stress- induzierte MHC- assoziierte Epitope (Hampl et al. 1999). Durch eine Epithelläsion werden γ/δ -T-Zellen aktiviert und sezernieren Zytokine, die zur Anlockung von Entzündungszellen führen (Wu et al. 2002). Diese Beobachtungen wurden für das MALT beschrieben, scheinen aber auch auf das Konzept des VALT anwendbar. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass γ/δ - T-Zellen im MALT hauptsächlich mit Hitzeschockproteinen reagieren (Zugel et al. 1999), was deren Rolle als

wichtige Komponente der lokalen Immunität und die Hypothese zur Existenz eines lokalen vaskulären Abwehrsystems unterstützt.

8. Die A. mammaria interna (IMA)

Erste Schritte in der koronaren Bypasschirurgie wurden von Vineberg und Miller im Jahr 1951 gemacht. Unter Verwendung der *A. mammaria interna*, die direkt in das ischämische Ventrikelmyocard gezogen wurde, erhoffte man sich eine verbesserte Myocardperfusion. Ein nächster revolutionärer Schritt wurde von Kolesov 1964 in Leningrad unternommen. Ihm gelang die Anastomose der *A. mammaria interna* direkt auf den stenosierten *Ramus interventricularis anterior* (s. Abb. 5a). Seit Ende der sechziger Jahre findet auch der aortokoronare Venenbypass klinische Anwendung, erstmalig 1967 von Favoloro und Effler in Cleveland verwendet (s. Abb. 5b).

Das Prinzip der Koronarrevaskularisation mittels Bypasschirurgie hat sich neben der medikamentösen und interventionellen Kardiologie in der Therapie der koronaren Herzkrankheit etabliert. Neben der Verwendung von Venen, hauptsächlich der *Vena saphena magna*, wird die *A. mammaria interna* aufgrund ihrer Tomographie routinemäßig zur Versorgung des stenosierten *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) eingesetzt.

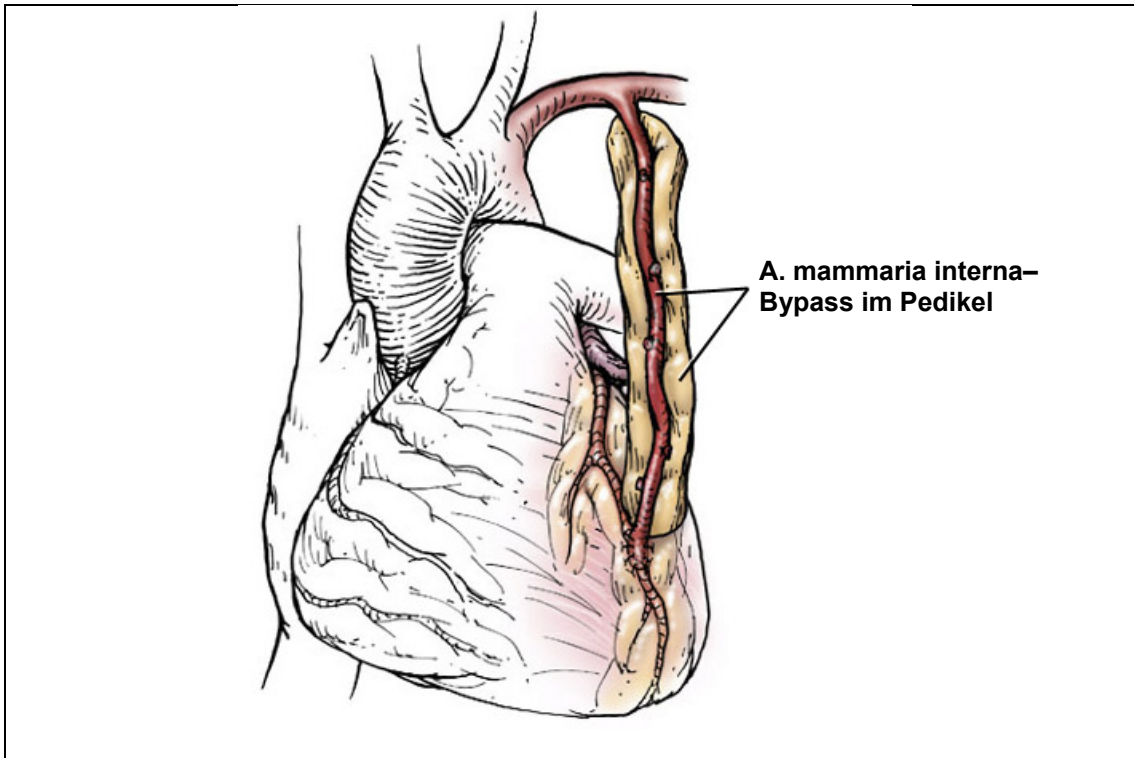


Abbildung 5a: Situs eines A.mammaria interna- (= thoracica interna) Bypasses

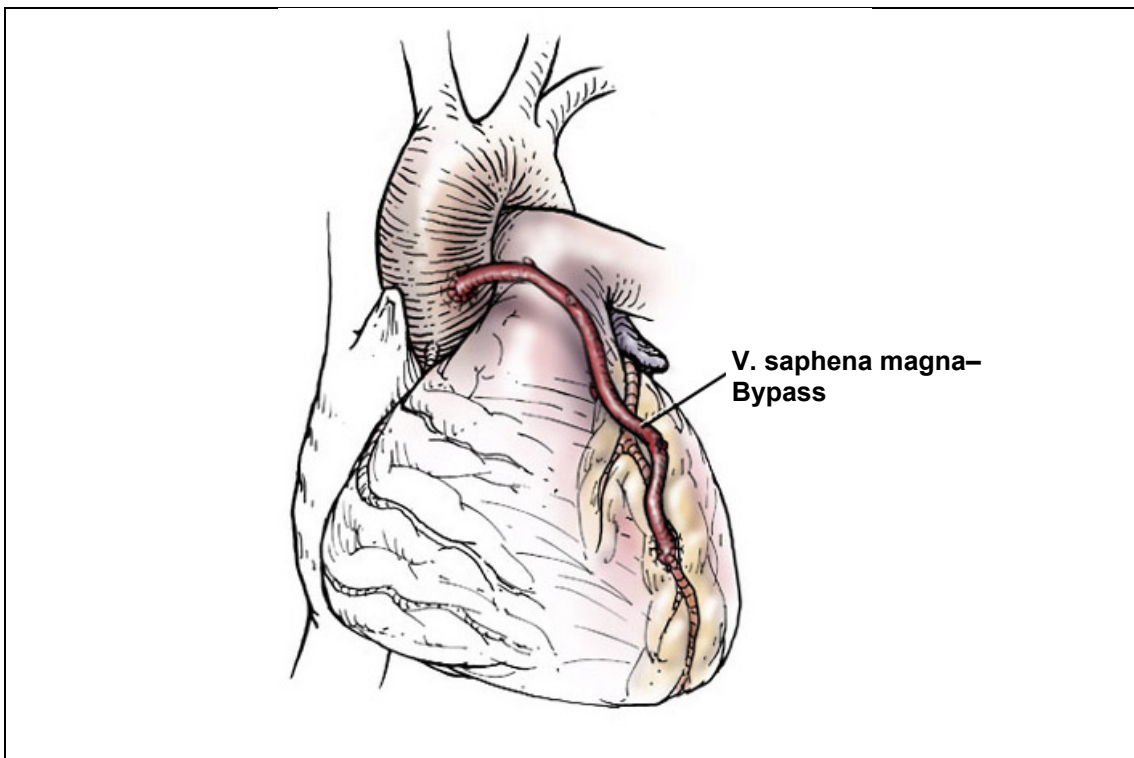


Abbildung 5b: Situs eines Vena saphena Bypasses

8.1. Indikationen der Bypasschirurgie und Ergebnisse

Die Basis zur adäquaten Indikationsstellung in der Koronarchirurgie stellen zum einen die Beurteilung der Koronarpathologie mittels Herzkatheteruntersuchung dar, zum anderen der Ischämienachweis, z.B. durch Ruhe- und Belastungsmyokardszintigraphie, Stressechokardiographie oder Positronen-emissionstomographie (PET). Zudem kann die Beurteilung der linksventrikulären Pumpfunktion echokardiographisch oder durch Radionuklidventrikulographie erfolgen. Für die Indikationsstellung wichtig ist auch die Erfassung der klinischen Anamnese zur Einteilung der Angina-pectoris- Symptomatik mittels der CCS- Klassifikation. Die weite Verbreitung der koronaren Bypasschirurgie ergab sich durch drei prospektive klinische Vergleichsstudien, die eine verbesserte Überlebensrate und Lebensqualität nach Bypasschirurgie im Vergleich zur medikamentösen Therapie, insbesondere bei Patienten mit koronarer Mehrgefäßerkrankung aufzeigten (European Coronary Surgery Study Group 1982).

Medikamentös refraktäre Angina pectoris mit nachweisbarer Koronarstenose
Instabile Angina pectoris
Linke Hauptstammstenose > 50%
Schwere koronare Drei-Gefäß-Erkrankung
Ein- oder Zwei-Gefäß-Erkrankung mit Ischämienachweis und unzulänglicher PTCA
Postinfarkt-Angina-pectoris
Akuter Myokardinfarkt mit kardiogenem Schock PTCA-Komplikationen (Dissektion, Perforation, Ischämie)
Kongenitale Missbildungen (zum Beispiel Aneurysma) und Fehlabgänge der Koronarien
Aortendissektion mit Beteiligung der Koronarien

Tabelle 5: Aktuelle Indikationen zur koronaren Bypasschirurgie.

8.2. Langzeitergebnisse nach koronarer Bypasschirurgie

Der Erfolg der koronaren Bypasschirurgie ist primär an die Offenheitsrate der Bypässe gebunden. Aufgrund der klinischen Erfahrung sollen die Ergebnisse von Venenbypässen und arteriellen Conduits separat diskutiert werden.

Für Venenbypässe gilt die Grundregel, dass nach fünf Jahren ungefähr 30%- und nach zehn Jahren die Hälfte der Bypässe verschlossen sind (Dougenis et

al. 1998). Faktoren, welche die Offenheitsrate beeinflussen, sind das angeschlossene Koronargefäß (häufigste Verschlüsse treten bei Bypässen zur RCA auf), die Größe des Koronargefäßes, die chirurgische Technik bei der Venenentnahme und Anastomosennaht. Außerdem spielen das Geschlecht sowie der möglichst frühe Beginn der Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern (z.B. Aspirin, Ticlopidin oder Clopidogrel) eine entscheidende Rolle. Die langfristige Offenheitsrate wird entscheidend von der Ausprägung von Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Nikotinabusus beeinflusst (Campeau et al. 2005).

Die Anwendung der *A. mammaria interna* in der Bypasschirurgie als arterieller Graft zum RIVA hat die klinischen Ergebnisse deutlich verbessert. Dies erklärt sich durch die ausgezeichneten Langzeitergebnisse mit Offenheitsraten von über 90% nach fünf und zehn Jahren (Dougenis et al. 1998). Die guten klinischen Ergebnisse führten zu einer Ausbreitung der arteriellen Revaskularisation unter Verwendung weiterer Conduits bis hin zur kompletten Bypassversorgung mittels arterieller Grafts. Dies umfasst den bilateralen Gebrauch der *A. mammaria interna*, wobei die Offenheitsrate für die rechte *Arteria mammaria* nach fünf Jahren von 89,5% mit der der linken *Arteria mammaria* vergleichbar ist (Jegaden et al. 1995). Als weitere arterielle Conduits kommen die *Arteria radialis*, die *Arteria gastroepiploica* und die *Arteria epigastrica inferior* zur Anwendung.

Das zentrale Problem der koronaren Bypasschirurgie ist der vorzeitige Bypassverschluss. Nach zehn Jahren ist etwa die Hälfte der Venenbypassbrücken verschlossen und die restlichen Überbrückungen atherosklerotisch verändert. Der Verschlussprozess lässt sich in drei verschiedene Zeitphasen einteilen: Der Frühverschluss ist primär durch thrombotisches Material, schlechtes Abflussverhalten der Bypässe und schlechte Technik bedingt. In einer Zwischenphase führen Intimaverdickungen an den Bypassendigungen zu intermittierenden Ischämien, in der Spätphase tritt das Bypassversagen durch eine progressive Atherosklerose auf (Solymoss et al. 1991).

- **Venen- Bypässe:**

Eine Intimaverdickung ist bereits nach einem Monat zu sehen, verstärkt sich dann jedoch nicht mehr. Nach einem Jahr nähert sich der Durchmesser der

Venen dem viel kleineren Durchmesser der Koronargefäße an. 10% der Bypässe verschließen sich nach einigen Wochen, wenn kein Aspirin verabreicht wird. Die meisten Bypässe zeigen atherosklerotische Veränderungen nach 10 Jahren, die Offenheitsrate beträgt dann noch 50-60%.

- **Mammaria- Bypässe:**

Auch hier entwickeln sich Intimaverdickungen, jedoch sind diese Bypässe sehr resistent gegen Atherosklerose. 5-10% entwickeln eine späte Verengung, aber die meisten dieser Verengungen schreiten nicht bis zu einem Verschluss weiter. Nach 10 Jahren sind noch 90% der Mammaria- Bypässe offen.

Revisionseingriffe nach Bypass- Operationen sind in 25% der Fälle Ballondilatationen (PTCA), 75% der restlichen Eingriffe sind chirurgisch. Bei 90% der Patienten ist über einen Zeitraum von 10 Jahren keine erneute Intervention erforderlich.

Die häufigste Ursache für einen Neueingriff ist eine Verengung der Venen-Bypässe. Ein *IMA*- Bypass verringert das Risiko für eine neue Operation und zögert die Zeit bis zu einer Neuoperation hinaus.

Material und Methoden

1. Patienten und Gewebe

1.1. Patienten

Die Untersuchungen erfolgen an Präparaten, die aus einer kooperativen prospektiven Studie von Herrn Prof. G. Fraedrich von der Universitätsklinik in Innsbruck und Herrn Dr. B. Ihling von der Universitätsklinik Freiburg stammen. Es handelt sich dabei um Fragmente der *A. mammaria interna*, die während Bypassoperationen gewonnen wurden.

Das Alter der insgesamt 32 Patienten liegt zwischen 42 und 71 Jahren mit einem Durchschnitt von 59,5 Jahren. 29 Patienten gehören dem männlichen und 3 Patienten dem weiblichen Geschlecht an.

1.2. Gewebe-Präparation

Die Arterie wird im Rahmen der Bypassoperation mit ihrem Bindegewebskörper (Pedikel) von der inneren Thoraxwand nahe dem Sternum bis hin zum Zwerchfell abpräpariert, wobei das distale Segment als Untersuchungsmaterial dient. Dies wird für die weitere Bearbeitung mit Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet.

2. Reagenzien

2.1. Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper stammen von den in Tabelle 6 angegebenen Firmen.

Antikörper gegen	Immunglobulin -Isotyp (*)	Code	Identifizierte Antigene	Bezugsquelle
CD3	Polyklonal rabbit	RB-360	Endothelzellen	neomarkers
CD4	IgG 1	MS-392	TH-4-Zellen	neomarkers
CD8	IgG 1	NCL-CD8-295	TH-8-Zellen	serotec
CD25	IgG 2b	NCL-CD25-305	Aktivierte T- u.B-Zellen, Monozyten	serotec
CD68	IgG 1	MS-397	Makrophagen, Monozyten, neutrophile u.basophile Leukozyten, Lymphozyten	neomarkers
CD54 (ICAM-1)	IgG 1	MS-1094	Endothelzellen, AG-präsentierende Zellen	neomarkers
CD106 (VCAM-1)	IgG 1	MS-1101	Endothelzellen, AG-präsentierende Zellen	neomarkers
p-Selektin	IgG 2a	M 7199	Endothelzellen, aktivierte Thrombozyten, Megakaryozyten	DAKO
S 100	IgG 2a	MS-296	dendritische Zellen	neomarkers
HLA-DR	IgG 2b	MS-133	dendritische Zellen, B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Monozyten, Makrophagen	neomarkers
vWF	polyklonal rabbit	A 0082	Endothelzellen, Megakaryozyten	DAKO
HSP60/65	IgG 1	ML-30	Heat-shock-protein 60/65	J.Ivanyi

Tabelle 6: Primärantikörper,

(*) wenn nicht separat erwähnt, handelt es sich um monoklonale Antikörper der Maus

2.2. Konjugate und Brückenantikörper

Konjugate und Brückenantikörper	Immunglobulinklasse	Bezugsquelle
goat-a-rabbit Immunoglobulins	Gesamt IgG	DAKO
rabbit-a-mouse Immunoglobulins	IgM	DAKO
Alkaline Phosphatase-Conjugated goat-a-rabbit Immunoglobulins	Gesamt IgG	DAKO
Alkaline Phosphatase-Conjugated goat-a-mouse Immunoglobulins	Gesamt IgG	DAKO
Peroxidase-Conjugated goat-a-mouse Immunoglobulins	Gesamt IgG	DAKO
Peroxidase-Conjugated goat-a-rabbit Immunoglobulins	Gesamt IgG	DAKO
APAAP-mouse monoklonal	IgG 1	DAKO
EnVision Labelled Polymer,Alkaline Phosphatase	Gesamt IgG	DAKO
EnVision Labelled Polymer,Peroxidase	Gesamt IgG	DAKO

Tabelle 7: Konjugate und Brückenantikörper

2.3. Bezugsquellen:

DAKO	Glostrup – Denmark
neomarkers	Fremont – USA
J.Ivanyi	MRC Tuberculosis and Related Infections Unit, Hammersmith Hospital London – United Kingdom
serotec	Düsseldorf, Germany

2.4. Kommerziell erhältliche Reagenzien

Reagenzien	Bezugsquelle
Aceton	Merck (Darmstadt, BRD)
3-Aminopropyltriethoxysilane	Sigma (München, BRD)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt, BRD)
Citronensäure-Monohydrat	Merck (Darmstadt, BRD)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, BRD)
Ethanol	Merck (Darmstadt, BRD)
Formalin	
HCL	Merck (Darmstadt, BRD)
Hämatoxylin	Merck (Darmstadt, BRD)
Kaliumcitrat	Merck (Darmstadt, BRD)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, BRD)
Kayser`s Glyceringelatine	Merck (Darmstadt, BRD)
Methanol	Merck (Darmstadt, BRD)
Meyer`s Hämalun	Merck (Darmstadt, BRD)
Natriumbicarbonat	Merck (Darmstadt, BRD)
Natriumacid	Merck (Darmstadt, BRD)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, BRD)
Poly-L-Lysin	Sigma (München, BRD)
Perhydrol	Merck (Darmstadt, BRD)
Protease XXIV	Sigma (München, BRD)
Sigma Fast DAB Metal Enhancer	Sigma (München, BRD)
Sigma Fast Red TR/Naphtol	Sigma (München, BRD)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck (Darmstadt, BRD)
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt, BRD)
Titriplex	Merck (Darmstadt, BRD)
Xylol	Merck (Darmstadt, BRD)

Tabelle 8: Kommerziell erhältliche Reagenzien

3. Puffer und Reaktionslösungen

3.1. Zubereitung der Stammlösungen

NaCl 10x (9%ig):

NaCl 90 g
in einem Liter Aqua bidestillata lösen

1M Tris – Stammpuffer:

Tris 121,1 g
in einem Liter Aqua bidestillata lösen

Titrieren auf pH 7,4

0,1M Citrat Buffer Antigen Retrieval Solution (pH 6,0):

Stammlösung A: 0,1M Citronensäure-Monohydrat 21,04 g/l
Stammlösung B: 0,1M tri-Natriumcitrat-Dihydrat 29,41 g/l

Lösung A 29 ml
Lösung B 123 ml

auf 1,5 Liter Aqua bidestillata auffüllen

Titrieren auf pH 6,0

3.2. Zubereitung von Tris buffered saline (TBS)

Tris 1M 25 ml
NaCl 10x 100 ml
Aqua bidestillata 875 ml

TBS 1000 ml

Titrieren auf pH 7,4

3.3. Zubereitung von Phosphate buffered saline (PBS)

NaCl	667,75 g
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	14,19 g
KH ₂ PO ₄	4,08 g

in Aqua bidestillata lösen und auf 10 Liter auffüllen

Titrieren auf pH 7,4

3.4. Reagenz zum Blockieren der endogenen Peroxidase

NaN ₃	260 mg
PBS	40 ml
H ₂ O ₂	50 µl

Natriumacid wird in PBS gelöst und unmittelbar vor Gebrauch wird Perhydrol hinzugegeben. Die Blockierungsprozedur wird in einer Küvette bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Mengenangaben verstehen sich für eine Küvette.

4. Immunhistochemische Methoden

4.1. Fixierung und Einbetten des Gewebes

Nach der Präparation wird das Gewebe rasch ins Formalin (4% Formol in PBS) gegeben um die Autolyse zu verhindern. Nach ca. 3 Tagen ist der Fixierungsvorgang abgeschlossen und es folgt das Einbetten in Paraffin im Gewebeeinbettautomat (Citadel 1000, Shandon).

Zu diesem Zweck werden die Kapseln mit flüssigem Paraffin ausgegossen.

4.2. Beschichten der Objektträger

Während der vielen Waschschriffe kam es häufig zu einem Abschwimmen der Paraffinschnitte. Daher war es notwendig, die Objektträger vor der Verwendung zu beschichten.

Wie aus früheren Untersuchungen bereits bekannt ist, eignet sich dafür am besten eine Silanbeschichtung.

Dafür werden die Objektträger zunächst für 5 Minuten in ein 2%iges Silan-Acetongemisch gegeben und anschließend dreimal für 5 Minuten in Aceton gewaschen.

Dieses Verfahren verbessert deutlich die Adhärenz der Schnitte an die Objektträger und verhindert damit ein Abschwimmen.

4.3. Anfertigen der Paraffinschnitte

Vor dem Schneiden werden die ausgegossenen Paraffinblöckchen auf einer Kühlplatte gekühlt, um sie besser schneidbar zu machen.

Das Anfertigen der Paraffinschnitte mit einer Dicke von 3µm erfolgt an einem Rotationsmikrotom (Biocut 2035, Leica). Anschließend werden die Schnitte in einem Wasserbad bei 37°C ausgebreitet, geglättet und auf Objektträger aufgezogen.

Die Schnitte werden dann bei 37°C im Brutschrank über Nacht getrocknet und bei Raumtemperatur zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.4. Kontrollen

Bei allen Tests werden unterschiedliche Gewebsschnitte als Positiv- und Negativkontrollen verwendet. Zumeist dient humanes Lymphknotengewebe als Kontrolle mit Ausnahme des HSP60 (nur glomeruläre Podozyten werden angefärbt; Ebrahim et al. 1999). Hierfür wird humanes Nierengewebe als Positivkontrolle verwendet. Außerdem kann in allen Präparaten die Media, als auch die Adventitia als interne positive Kontrolle angesehen werden.

Die Gebrauchsverdünnung aller Primär- und Sekundärantikörper wird vor Gebrauch mit Hilfe einer Schachbretttitration bestimmt.

Eine Negativkontrolle, die einer Konjugatkontrolle entspricht, wird entweder durch Ersetzen des Primärantikörpers durch TBS oder durch das Verwenden einer dem Primärantikörper entsprechenden Isotypenkontrolle erzielt.

4.5. Vorbehandlung Demaskierung

Die meisten Gewebeproben werden, wie auch in diesem Fall, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Dieser Vorgang löst allerdings eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur der Proteine aus, sodass sie für einige Antikörper nicht mehr erkennbar sind. Es gibt nun Antikörper, die gegen Epitope gerichtet sind, die nicht durch die Fixierung verändert werden und solche, deren korrespondierende Epitope ihre immunologische Reaktivität verlieren.

Diese Antigene müssen einer speziellen Vorbehandlungsprozedur unterzogen werden.

Im Rahmen von Vorversuchen werden alle Antikörper mit allen Vorbehandlungsmethoden getestet, wobei sich dann drei als geeignet erwiesen:

- a. **Proteinase XIV** (1mg/ml PBS)- in feuchter Kammer **5 min**
- in a.d. spülen

Für: CD62p, vWF, CD68, HLA-D

- b. **Citratpuffer** (0,01M, pH 6,0) - Mikrowelle 730W, in der Glasküvette
- leere Plätze mit Objektträgern
auffüllen **2x 5 min**
- dazwischen a.d. auffüllen
- in Citratpuffer abkühlen **10 min**

Für: ML-30, ICAM-1, S-100

- zusätzlich 1,5%ig H₂O₂ in Methanol **10 min**
- a.d. spülen **2x 5 min**
- TBS spülen **2x 5 min**

Für: CD3, CD8, CD25

- c. **EDTA** (0,01M, pH 8,0)
- Mikrowelle 730W, in der Glasküvette
 - leere Plätze mit Objektträgern
auffüllen **2x 5 min**
 - dazwischen a.d. auffüllen
 - in EDTA abkühlen **10 min**
 - zusätzlich 1,5%ig H₂O₂ in Methanol **10 min**
 - a.d. spülen **2x 5 min**
 - TBS spülen **2x 5 min**

Für: CD4, VCAM-1

Ungeeignet erweisen sich die Vorbehandlungen mit Trypsin pH 7,8 (0,1% in 0,05M Tris-Puffer + 0,15M NaCl+0,1% CaCl₂), sowie die Dampfkochtopfmethode mit 0,01M Citratpuffer oder 0,01M EDTA.

4.6. Methoden

4.6.1. direkte Methode/ indirekte Methode

Der einfachste Weg, ein bestimmtes Antigen zu lokalisieren besteht darin, einen spezifischen Antikörper zu verwenden. Bei der direkten Methode ist dieser spezifische Antikörper chemisch an ein Enzym (Peroxidase oder alkalische Phosphatase) gekoppelt. Das konjugierte Reagenz wird dem Präparat zugegeben und reagiert mit dem Antigen. Ein nachfolgend zugefügtes Substrat ruft ein gefärbtes Endprodukt hervor, das an dieser Stelle präzipitiert und das dort gelegene Antigen markiert.

Der Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass für jedes Antigen ein separater konjugierter Antikörper notwendig ist. Daher wird häufiger der indirekte immunhistochemische Nachweis gewählt (s. Abb. 6 und Abb. 7).

Hierbei kommt es zu einer Bindung eines unkonjugierten Antikörpers an das Antigen im Präparat. Um diese Anlagerung zu lokalisieren, wird ein enzymmarkierter Sekundärantikörper verwendet, der an den ersten bindet. Anschließend wird die Reaktion mit Hilfe eines Substrates sichtbar gemacht.

Um eine höhere Sensitivität zu erreichen, kann man den enzymmarkierten Sekundärantikörper durch eine enzymmarkierte Polymerstruktur ersetzen. Diese Polymerkette bindet mehrere Zweitantikörper und Enzymmoleküle,

wodurch eine Verstärkung des Signals erreicht wird. Dies ist bei besonders schwer zugänglichen Epitopen von Vorteil.

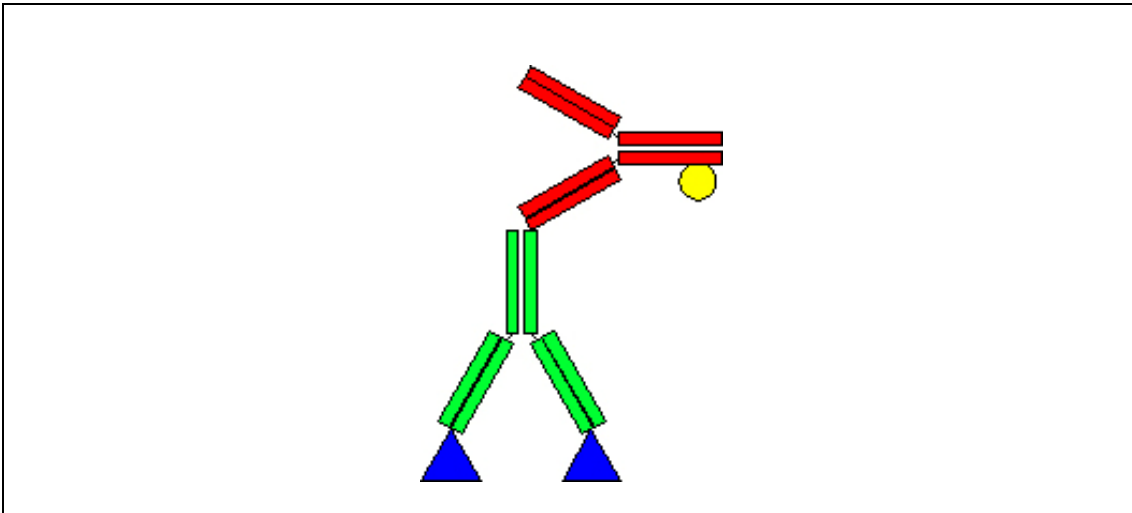


Abbildung 6: indirekte Methode

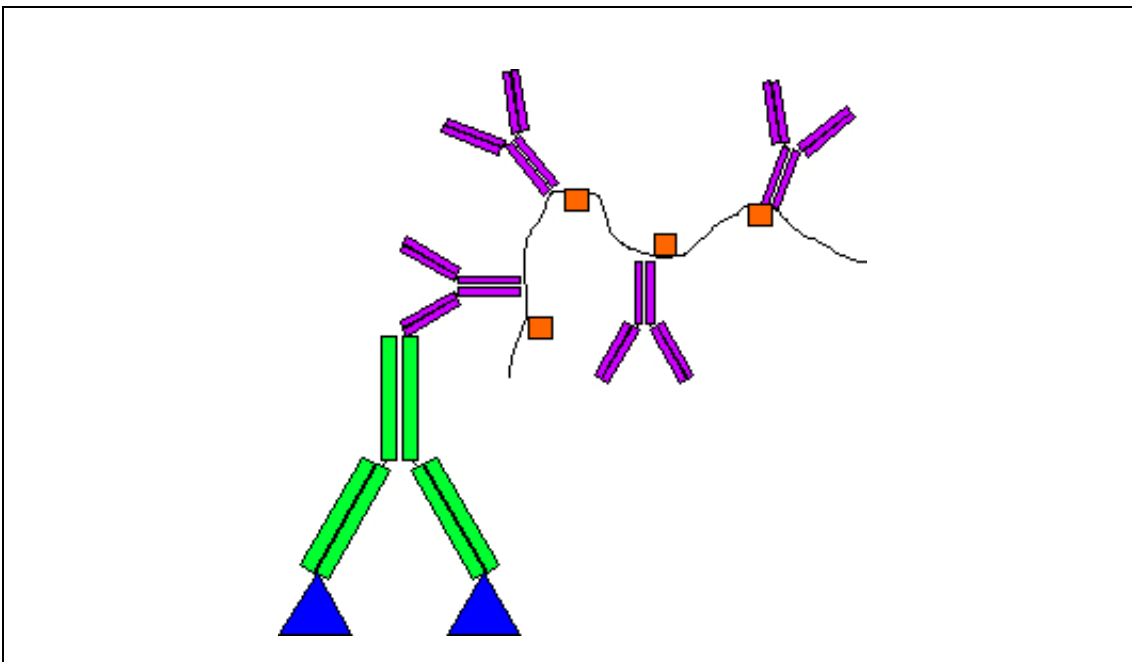
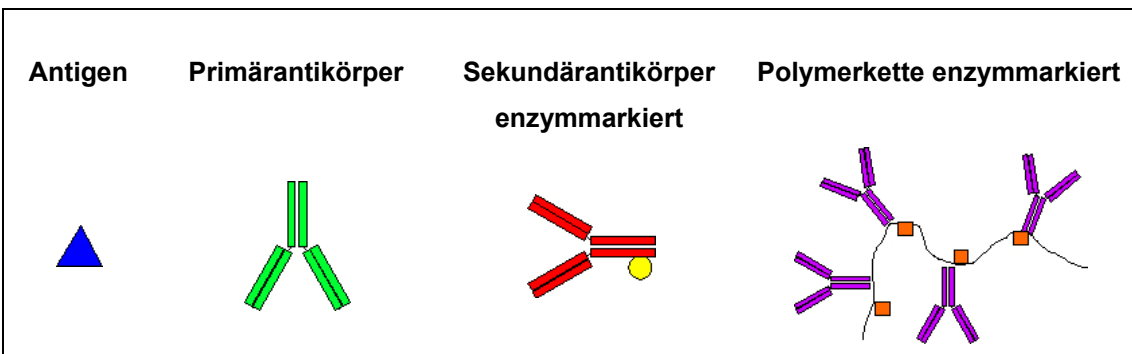


Abbildung 7: indirekte Methode+ Polymerkette (Envision)



Legende

4.7. Testablauf

Der gesamte Test wird bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Schnitte werden zunächst in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert:

- Xylol	3x 10 min
- 100% Alkohol absolut	5 min
- 100% Alkohol vergällt	5 min
- 96% Alkohol	2x 5 min
- 70% Alkohol	2x 5 min
- TBS	

Die Vorbehandlungsmethode variiert wie vorher beschrieben.

4.7.1. Alkalische Phosphatase- Färbung

- Schnitte mit PAP- Pen (=Fettstift zur Begrenzung des Schnittareals) auf dem Objektträger umranden	
- in feuchter Kammer Schnitte mit 1,5% NHS in Blocking-Reagenz inkubieren (verhindert unspezifische Antikörperbindung)	15 min
- Schnitte nicht spülen, nur abklopfen	
- Primärantikörperinkubation	120 min
- 3x waschen in TBS auf Schüttler	je 5 min
- Sekundärantikörperinkubation bzw. Envision- fluid	30 min
- 3x waschen in TBS auf Schüttler	je 5 min
- Substratentwicklung mit Fast- Red unter Sichtkontrolle unter dem Mikroskop	
- Reaktion stoppen in Leitungswasser	
- Gegenfärbung (Kerne) mit Hämatoxylin (filtriert) 1:40 in a.d.	2 min
- Abstoppen in Leitungswasser und Bläuen	10 min
- Eindecken in Kayser`s Glycerin-Gelatine	

4.7.2. Peroxidase- Färbung

- Schnitte mit PAP- Pen umranden
- Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität mit 260mg NaN_3 in 40ml PBS+ 50ml H_2O_2 kurz vor Beginn dazugeben **30 min**
- in feuchter Kammer Schnitte mit 1,5% NHS in Blocking-Reagenz inkubieren (verhindert unspezifische Antikörperbindung) **15 min**
- Schnitte nicht spülen, nur abklopfen
- Primärantikörperinkubation **120 min**
- 3x waschen in TBS auf Schüttler **je 5 min**
- Sekundärantikörperinkubation bzw. Envision- fluid **30 min**
- 3x waschen in TBS auf Schüttler **je 5 min**
- Substratentwicklung mit DAB Metal- Enhancer unter Sichtkontrolle unter dem Mikroskop
- Reaktion stoppen in Leitungswasser
- Gegenfärbung (Kerne) mit Hämatoxylin filtriert 1:40 in a.d. **2 min**
- Abstoppen in Leitungswasser und Bläuen **10 min**
- Eindecken in Kayser`s Glycerin-Gelatine

5. Auswertung und Dokumentation

Alle Präparate wurden mit dem Lichtmikroskop (Optiphon 2, Nikon) bei unterschiedlichen Vergrößerungen semiquantitativ beurteilt:

- 0: keine positiven Zellen im Präparat vorhanden
- +: in einem Gesichtsfeld finden sich vereinzelt positive Zellen
- ++: in einem Gesichtsfeld finden sich fast ausschließlich positive Zellen
- +++: alle Zellen sind positiv angefärbt

Die Dokumentation erfolgt an der am gleichen Mikroskop installierten Mikrophotografieeinrichtung UFX- DX. Verwendet wurden ausschließlich Tageslichtfilme der Marke Fuji (Fujichrome Velvia 50).

Ergebnisse

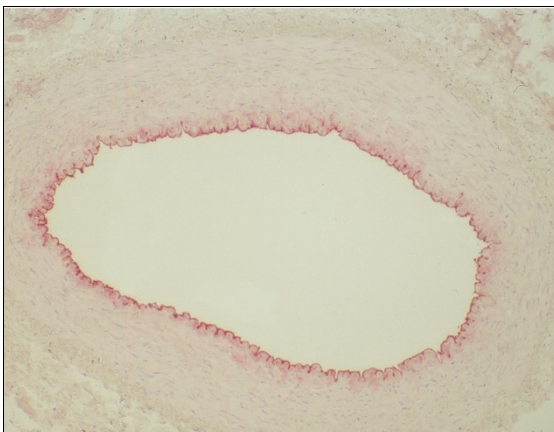
Die Auswertung wird unter dem Mikroskop mit der 200- fachen Vergrößerung vorgenommen. Beurteilt wird die Intima der Gefäßpräparate hinsichtlich des Vorkommens bestimmter Zellpopulationen bzw. der Expression verschiedenster Oberflächenmarker und deren Farbintensität gemäß dem in Punkt 5. *Auswertung und Dokumentation (Material und Methoden)* genannten Schema. Bei allen Untersuchungen wird eine Negativkontrolle mitgeführt, die aus einem Lymphknotenschnitt besteht, bei dem anstelle des Primärantikörpers lediglich Puffer aufgetragen wird. Alle anderen Schritte werden gleich durchgeführt.

Aus technischen Gründen konnten lediglich Einzelfärbungen vorgenommen werden.

1. Oberflächenantigene

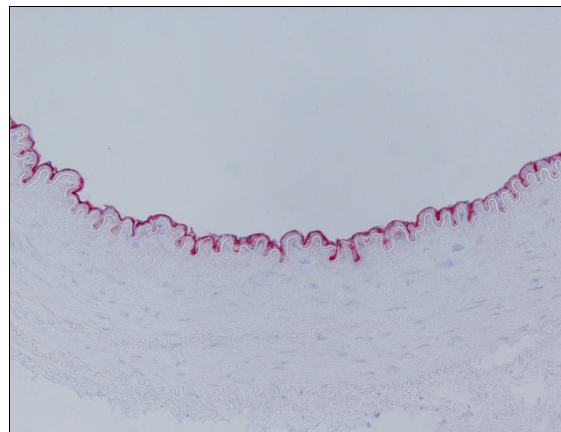
1.1. von Willebrand Faktor (vWF)

Der Endothelzellmarker vWF wird als Positivkontrolle mitgeführt und um die Beschaffenheit des Endothels zu beurteilen. Von den insgesamt 32 Gefäßen weisen 14 eine sehr gute Endothelzellerfärbung mit +++ auf, 15 Gefäße sind mit ++ zu beurteilen und lediglich 3 Gefäße zeigen eine weniger gute Färbung mit +.



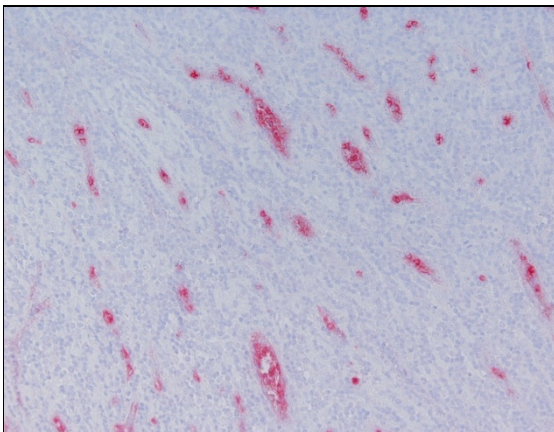
(100 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 9211221: vWF positive
Endothelzellen eines 53-jährigen, männlichen
Bypasspatienten.



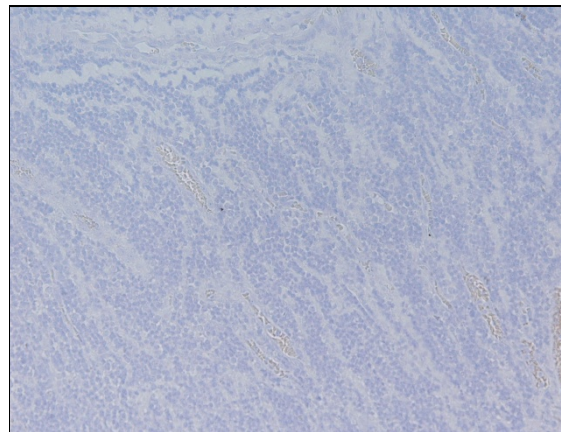
(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 9211221: Der gleiche Patient.
Vergrößerung des Endothels.



(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Positivkontrolle: vWF positive Endothelzellen
in der Kontrolle eines
Lymphknotenpräparates.

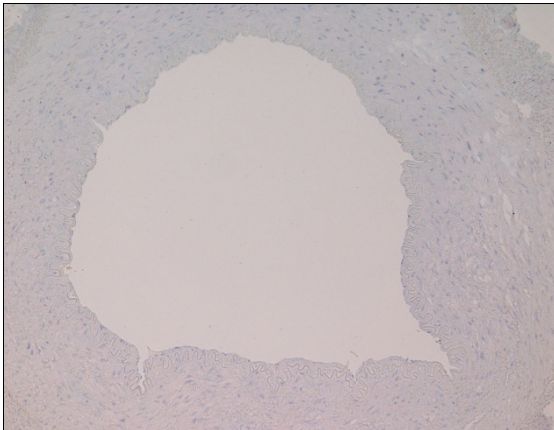


(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Negativkontrolle: Negativkontrolle eines
Lymphknotenpräparates.

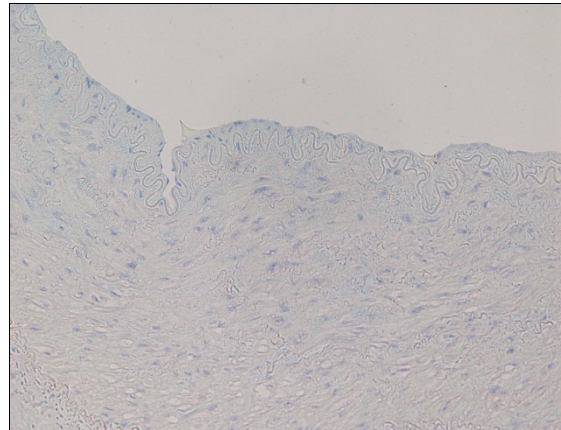
1.2. Mononukleäre Zellen

Es können keine mononukleären Zellinfiltrate in der Intima nachgewiesen werden. Alle 32 Patienten sind hinsichtlich der Ausprägung der Oberflächenantigene CD3, CD4, CD8, CD25, CD68 und S-100 als negativ zu beurteilen.



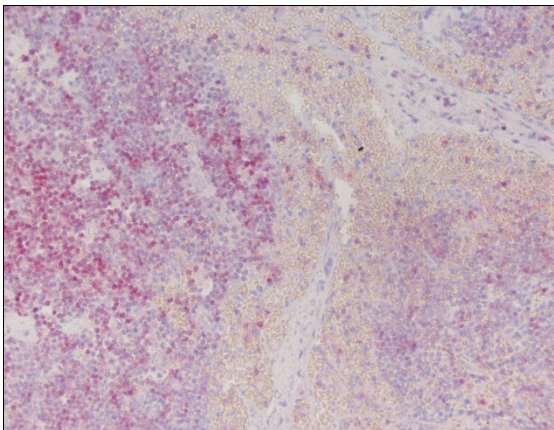
(100 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 9211102: Keine CD3 positiven Zellen am Endothel nachweisbar.
66-jähriger, männlicher Bypasspatient.



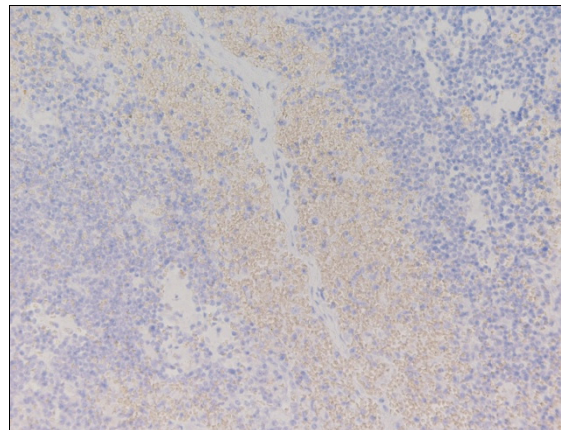
(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 9211102: Der gleiche männliche Bypasspatient. Vergrößerung des Endothels.



(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Positivkontrolle: CD3 positive Zellen in der Kontrolle eines Lymphknotenpräparates.



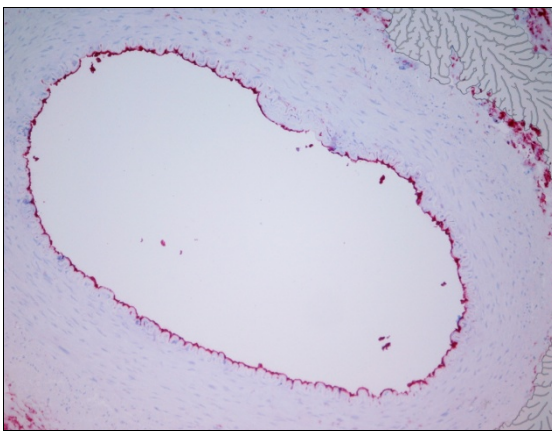
(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Negativkontrolle: Negativkontrolle eines Lymphknotenpräparates.

2. Adhäsionsmoleküle

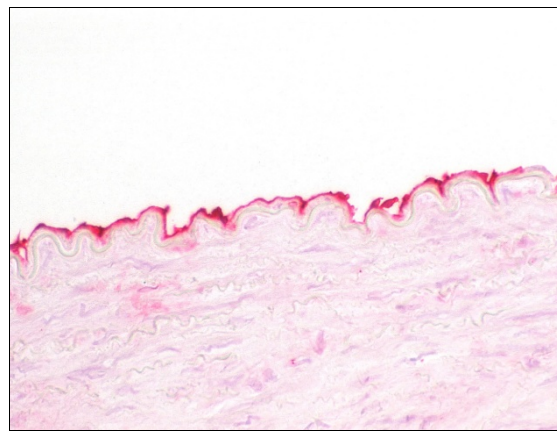
2.1. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)

Alle 32 Patienten zeigen ein positives Ergebnis in der Expression von VCAM-1. Davon sind 10 Gefäße mit +++, 16 Gefäße mit ++ und 5 mit + zu bewerten. Von den 5 Gefäßen, die mit + beurteilt wurden, waren 4 in Bezug auf ihre Endothelbeschaffenheit (vWF) mit +++ bewertet worden, nur 1 Gefäß mit ++. Was zeigt, dass die fehlende Expression von VCAM-1 bei den 5 Patienten nicht auf verletztes Endothel zurückzuführen ist.



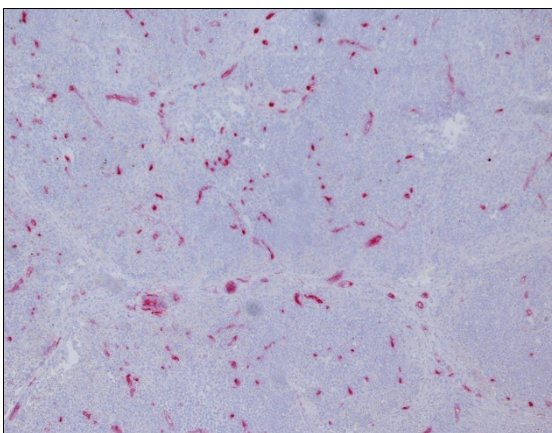
(100 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 9211011: VCAM-1 positive Endothelzellen eines 48-jährigen, männlichen Bypasspatienten mit arterieller Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus.



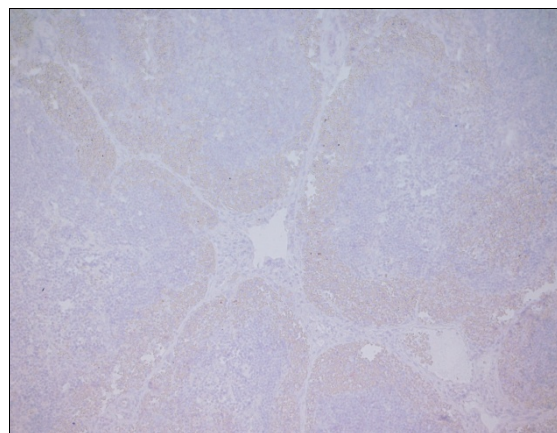
(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 9211011: Der gleiche männliche Bypasspatient. Vergrößerung des Endothels.



(100 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Positivkontrolle: VCAM-1 positive Zellen in der Kontrolle eines Lymphknotenpräparates.

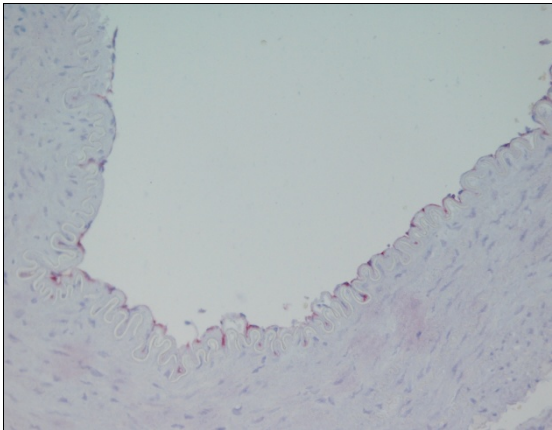


(100 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Negativkontrolle: Negativkontrolle eines Lymphknotenpräparates.

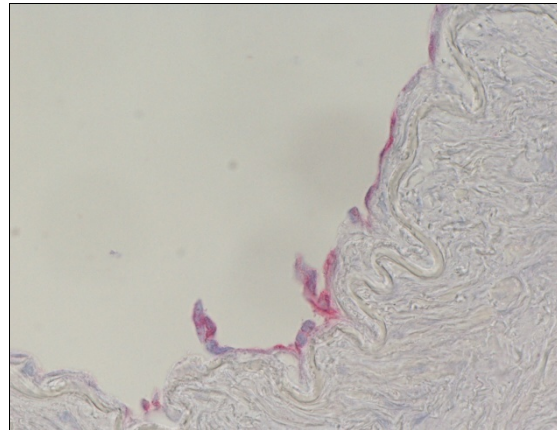
2.2. P-Selektin

In 27 von 32 Gefäßpräparaten kann P-Selektin nachgewiesen werden. Jedoch in geringerer Ausprägungsstärke als VCAM-1. 2 Gefäße werden mit +++ beurteilt, 5 Patienten exprimieren P-Selektin mit ++ und 20 Gefäße werden mit + beurteilt.



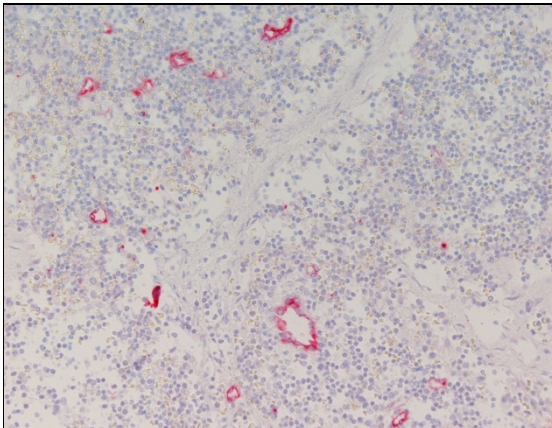
(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 929020: *P-Selectin positive Endothelzellen eines 62-jährigen, männlichen Bypasspatienten mit arterieller Hypertonie und Hypercholesterinämie.*



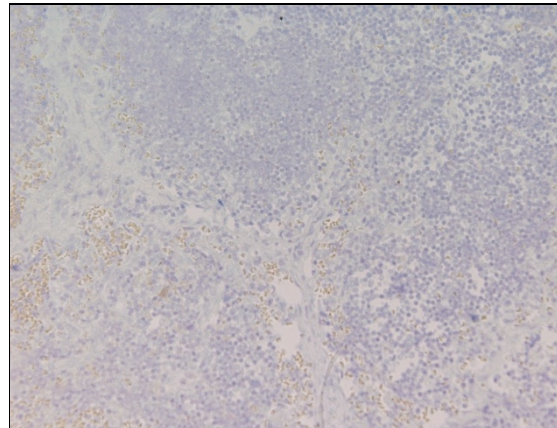
(600 fache Vergrößerung mit Ölimmersion, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 921550: *P-Selectin positive Endothelzellen eines 57-jährigen, männlichen Bypasspatienten mit arterieller Hypertonie und Hypercholesterinämie.*



(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Positivkontrolle: *P-Selektin positive Zellen in der Kontrolle eines Lymphknotenpräparates.*

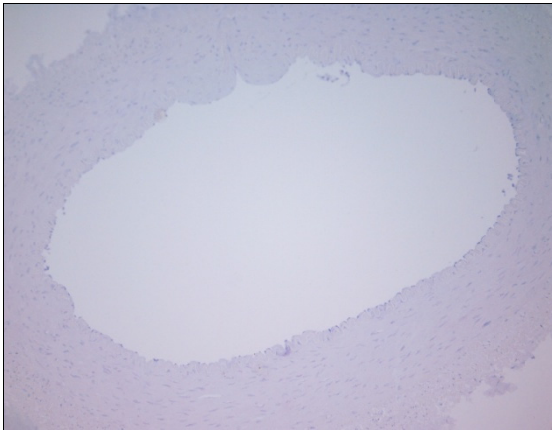


(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Negativkontrolle: *Negativkontrolle eines Lymphknotenpräparates.*

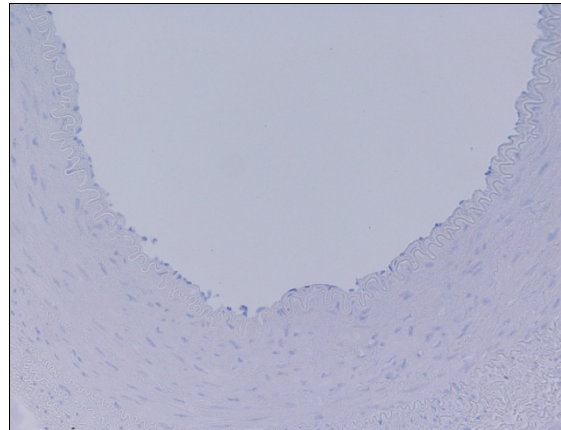
2.3. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)

Bei keinem der 32 Gefäßpräparate kann eine ICAM-1 Expression nachgewiesen werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass ICAM-1 bei dem Prozess der Transmigration der Entzündungszellen durch das Endothel für die Fixierung verantwortlich ist. Obwohl die Expression der Adhäsionsmoleküle ein frühes Ereignis in der Atherogenese ist, erfolgt dieser Schritt nach dem 4- Stufen Leukozytenadhäsionsmodell erst relativ spät (s. Abb. 4 - *Einleitung*).



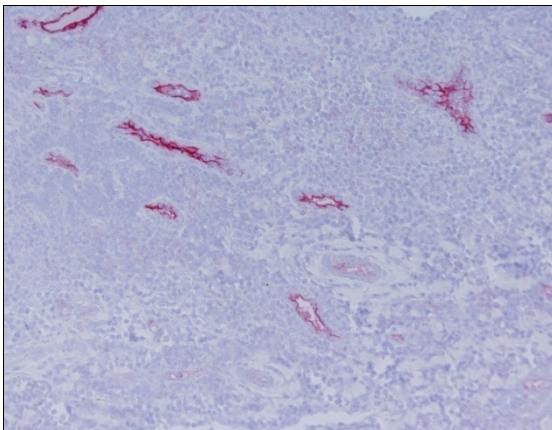
(100 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 9211011: Keine ICAM-1 positiven Zellen am Endothel nachweisbar.
48-jähriger, männlicher Bypasspatient.



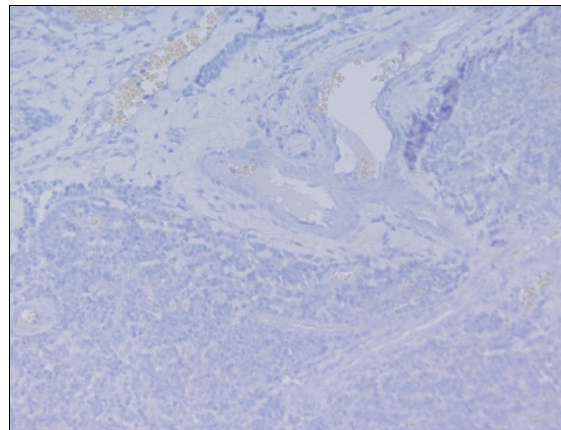
(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 9211011: Der gleiche männliche Bypasspatient, Vergrößerung des Endothels.



(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Positivkontrolle: ICAM-1 positive Zellen in der Kontrolle eines Lymphknotenpräparates.



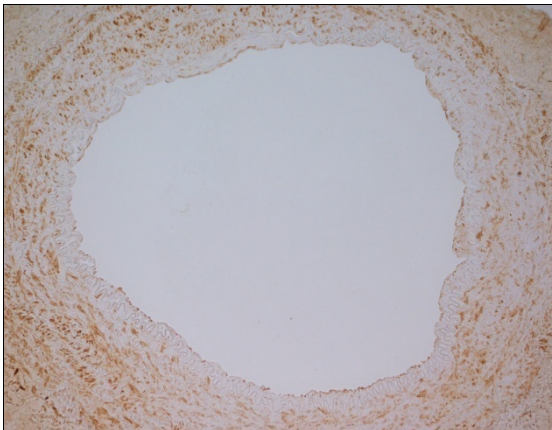
(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Negativkontrolle: Negativkontrolle eines Lymphknotenpräparates.

3. HSP60

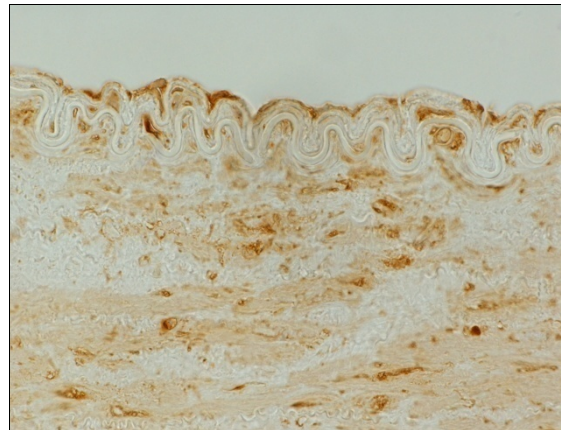
Die Bildung von HSP60 wurde mit dem Antikörper ML-30 untersucht. Dieser Antikörper ist gegen mykobakterielles HSP65 gerichtet und zeigt eine Kreuzreaktion mit humanem HSP60.

In 26 der 32 Gefäße lässt sich HSP60 im Endothel nachweisen. 4 Patienten exprimieren HSP60 mit +++, 8 Patienten zeigen ein positives Ergebnis mit ++ und in 14 Fällen ist die Anfärbung mit + zu bewerten.



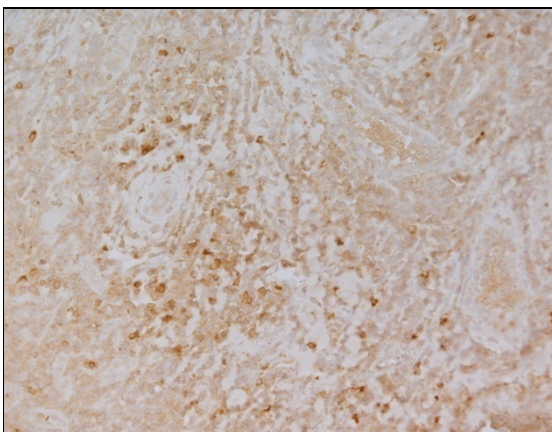
(100 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 921168: *ML-30- positive Endothelzellen eines 62-jährigen, männlichen Bypasspatienten mit Nikotinabusus und Hypercholesterinämie. Zusätzlich ML-30- positive SMC in der Media.*



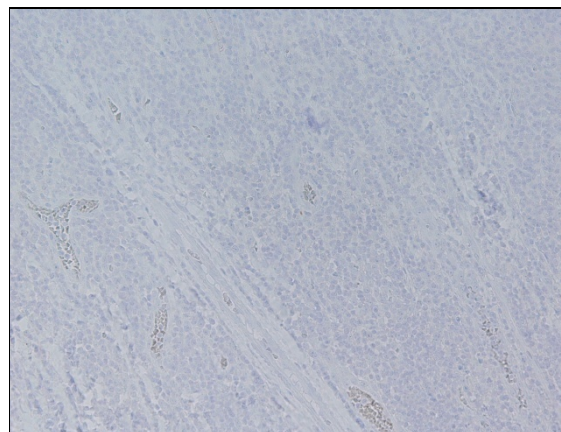
(600 fache Vergrößerung mit Ölimmersion, Paraffinschnitt)

Patient Nr. 921110: *ML-30- positive Endothelzellen eines 66-jährigen, männlichen Bypasspatienten ohne Risikofaktoren. Auch hier zeigen sich ML-30- positive SMC in der Media.*



(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Positivkontrolle: *ML-30- positive Zellen in der Kontrolle eines Lymphknotenpräparates.*



(200 fache Vergrößerung, Paraffinschnitt)

Negativkontrolle: *Negativkontrolle eines Lymphknotenpräparates.*

Diskussion

1. Kein Nachweis eines VALT in der Intima der *A. mammaria interna*

Aufbauend auf experimentellen und klinischen Ergebnissen haben wir in den letzten Jahren die „autoimmunologische“ Hypothese für die Entstehung der Atherosklerose entwickelt. Zentrale zelluläre Bestandteile sind T-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen und Mastzellen, welche die Grundlage für das VALT bilden (Kleindienst et al.1993; Waltner- Roman et al.1998; Wick et al. 1995, 1997 und 2004; Dissertation G. Millonig 1999; Dissertation C. Schwentner 2000).

In Zusammenarbeit mit der Gefäßchirurgischen Abteilung der Universität Innsbruck von Herrn Prof. G. Fraedrich sollte dieses Konzept auf die *A. mammaria interna* angewendet werden. Dieses für koronare Bypassoperationen bevorzugte Gefäß gilt aufgrund seiner langen Offenheitsrate als nahezu atheroskleroseresistent.

In Vergleichsstudien von venösen und arteriellen Bypässen entwickeln Venen unter den veränderten Strömungsbedingungen Venosklerose und zeigen eine Restenose von 50% nach zehn Jahren. Demgegenüber zeichnet sich die *A. mammaria interna* durch eine Resistenz gegenüber Atherosklerose aus. Diese Beobachtungen konnten bestätigt werden. Bei keinem der *A. mammaria interna* Präparate konnte eine Infiltration von mononukleären Zellen festgestellt werden. In früheren Untersuchungen konnten bereits an kindlichen Gefäßen *post mortem* im Bereich hämodynamisch belasteter Regionen Ansammlungen von mononukleären Zellen gefunden werden (Dissertation C. Schwentner 2000). Diese Regionen decken sich mit den Bereichen, die als Prädilektionsstellen für spätere atherosklerotische Läsionen gelten. Diese Akkumulationen weisen Ähnlichkeiten mit anderen Systemen lokaler Immunität (MALT, BALT, etc.) auf. In der Vorstellung einer ähnlichen Funktion dieser Bereiche, d.h. lokales Monitoring von potentiell gefährlichen exogenen und autologen Antigenen, wurden diese Akkumulationen in Analogie

zu den anderen Systemen lokaler Immunität als *Vascular associated lymphoid tissue* (VALT) (Wick et al. 1995 und 1997) bezeichnet.

2. Bypassuntersuchungen am Mausmodell

Während am Menschen frühe Bypassuntersuchungen, d.h. Untersuchungen über die Qualität des Bypasses kurz nach der Transplantation wenig verfügbar sind, existieren Tiermodelle, anhand derer das Problem der Restenosierung genauer untersucht wurde. So wurden für solche Untersuchungen autologe oder isologe Transplantationen der *Vena jugularis externa* oder der *Vena cava* in die Arteria carotis als End-zu-End Anastomose am Mausmodell durchgeführt. Hierbei konnte nach 1 Woche ein Zellverlust und eine Gefäßwanddegeneration neben einer Einwanderung von mononukleären Zellen in die Adventitia des venösen Bypasses diagnostiziert werden (Zou et al. 1998). Nach 2 Wochen bereits wurde eine Infiltration von mononukleären Zellen in die Gefäßwand auch von luminal her festgestellt. Das Lumen des transplantierten Gefäßes wurde durch eine Intimahyperplasie zunehmend verengt. Untersuchungen der Gefäße zeigten nach 2 und 4 Wochen eine starke Proliferation von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand, die nach 4 und 8 Wochen eine signifikante Stenosierung zur Folge hatte. Diese erreichte ihr Maximum von 20% nach 16 Wochen (Zou et al. 1998). Diese Beobachtungen entsprechen denen am Menschen, wobei nach 1-10 Tagen postoperativ ein Endothelzellverlust und eine Abnahme von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand eines *Vena saphena magna* Bypasses festgestellt wurde (Kockx et al. 1996). Es muss jedoch auch festgehalten werden, dass hinsichtlich pathogenetischer Prozesse zwischen transplantationsbedingter Venosklerose und Atherosklerose ein Unterschied besteht. Zunächst entwickelt sich die Venosklerose viel schneller als die Atherosklerose. Für frühe Veränderungen in der Gefäßwand werden in erster Linie der operative Stress und ischämiebedingte Schädigungen verantwortlich gemacht, während ein Merkmal für spätere Läsionen die Proliferation von glatten Muskelzellen gilt. Dies wird auf die veränderten Bedingungen, denen die venösen Bypässe ausgesetzt sind, zurückgeführt. Dazu zählt die mechanische Beanspruchung in Form des erhöhten Blutdrucks, der die venöse Gefäßwand plötzlich ausgesetzt ist. Der arterielle Blutdruck in dem transplantierten Gefäß

ist um das Zehnfache höher, als im venösen System. Dies gilt als starker Stimulus für die glatten Muskelzellen.

Durch Schädigung der Endothelzelloberfläche kommt es zu einer neointimalen Reaktion, welche die Genexpression für Wachstumsfaktoren, Cytokine und Matrixproteine erhöht (Resnick et al. 1995). Dabei werden vermehrt ICAM-1, VCAM-1 und monocyte chemoattractant protein-1 über eine Aktivierung der nukleären Transkriptionsfaktoren *factor kappa B (NFkB)* und *activator protein-1 (AP-1)* exprimiert. Diese Moleküle sind für die Leukozyten-Endothelzellinteraktion und die anschließende Diapedese wichtig.

3. Auswirkung von verschiedensten Stressfaktoren

Während keines der untersuchten Gefäße eine Einwanderung von mononukleären Zellen zeigt und somit von zellulärer Seite kein Anhaltspunkt für das spätere Schicksal des Bypasses gegeben ist, weisen 24 von 32 Patienten eine Expression von HSP60 auf.

HSP60 ist ein Molekül, welches phylogenetisch hoch konserviert ist und von vielen verschiedenen Zellen als Antwort auf verschiedenste Arten von Stress gebildet wird. Wie bereits einleitend erwähnt, spielt es in der Entstehung der Atherosklerose eine bedeutende Rolle, sobald es zur Kreuzreaktion mit zirkulierenden Antikörpern und T-Zellen gegen bakterielles HSP60 kommt. Gibt es nun vielleicht doch Hinweise dafür, dass bestimmte Vorgänge in der *A. mammaria interna* Reaktionen auslösen, die für das weitere Schicksal des Bypasses bestimmend sind?

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe wurde die Einwirkung von Endotoxin auf Endothelzellen der Aorta im Tiermodell (Ratte) und *in vitro* untersucht. Endotoxine wurden in Form von LPS verabreicht. LPS sind Lipopolysaccharide (Endotoxine), welche Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien sind. LPS sind verantwortlich für lokale Entzündungsreaktionen und die systemischen toxischen Auswirkungen während einer Infektion (Cybulsky u. Gimbrone 1991). Es konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen zwischen 6 und 48 Stunden nach LPS- Injektion eine erhöhte HSP60 Expression zeigten. Ferner wurde nach 3 Stunden eine synchrone Expression von ICAM-1 beobachtet, die bis zu 72 Stunden persistierte. Die Anzahl ins Endothel

eingewanderter Leukozyten erreichte nach 6 Stunden ihren Höhepunkt, wobei es sich in erster Linie um Monozyten (80%) und in 20% um T-Zellen handelte (Seitz et al. 1996).

Ist das Endothel also toxischem Stress ausgesetzt kommt es direkt oder indirekt zur Zellschädigung, ausgelöst durch freie Radikale und Cytokine, die von den eingewanderten Monozyten freigesetzt werden.

Jeder Mensch gerät Zeit seines Lebens in Kontakt mit Mikroorganismen, der entweder eine Infektion im Körper auslösen oder auch klinisch stumm verlaufen kann. Es konnte sogar bei klinisch gesunden Probanden in allen untersuchten Fällen ein Antikörpertiter gegen HSP60 nachgewiesen werden (Xu et al. 1999). So ist anzunehmen, dass nicht nur Risikofaktoren, die bekanntermaßen für die Entstehung der Atherosklerose verantwortlich sind, sondern die Summe an mikrobiellen Schädigungen („*infectious load*“) darüber entscheidet, ob es zu einer Manifestation der Erkrankung kommt. Davon bleibt auch die *A. mammaria interna* nicht verschont. Dieses Gefäß gilt durch seine entwicklungsgeschichtlich begründete bedeutsame Rolle als besonders geschützt in Bezug auf Stenosierungen. Es kann jedoch mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass bereits vor der Verwendung als aorto- koronarer Bypass prä- inflammatorische Reaktionen im Endothel der *A. mammaria interna* ablaufen, welche die Voraussetzung für die spätere Einwanderung von Entzündungszellen bilden und somit eine spätere Restenose begünstigen könnten.

Neben der Einwirkung von Toxinen sind eine Reihe anderer Stressfaktoren untersucht worden, die Schädigungen des Endothels hervorrufen. So konnte z.B. auch eine erhöhte mechanische Belastung in Form von Scherstress in kausalem Zusammenhang mit der Expression von HSP60 gebracht werden. Setzt man im Tiermodell die *Arteria carotis communis* einer Seite erhöhter mechanischer Belastung aus, indem die *Arteria carotis communis* der Gegenseite ligiert wird, findet man nach 3 und 6 Stunden postoperativ eine HSP60 Expression des Endothels und der Media, die über 12 und 24 Stunden stetig zunimmt. Das Endothel der ligierten Gegenseite mit der niedrigeren Beanspruchung zeigt stattdessen nur vereinzelt HSP60 positive Zellen (Hochleitner et al. 2000). Blutdruckschwankungen wirken vermutlich schädigend auf das Endothel und es kommt zur up- Regulation des HSP60.

Diese Zellen sind dadurch angreifbar für HSP60 Antikörper, die wiederum in der Lage sind, gestresste Endothelzellen zu lysieren. Nicht gestresste Endothelzellen werden nicht angegriffen (Schett et al. 1995).

Ist die Erklärung für eine HSP- Expression in der Reaktion auf das intraoperative „handling“ zu suchen?

Die *A. mammaria interna* wird in ihrem Bindegewebskörper (Pedikel) (s. Abb. 5a - *Einleitung*) von der inneren Thoraxwand abpräpariert. Dies sollte mit geringer Hyperthermie möglichst schonend geschehen, um das Gefäß nicht unnötiger Hitzebelastung auszusetzen. Es sollte auch ein häufiges Angreifen (= mechanischer Stress) vermieden werden. Die Anastomosierung mit den Koronargefäßen erfolgt dann rasch.

Perioperative Schädigungen der Gefäße sind trotzdem nicht ganz auszuschließen.

Frühere Untersuchungen an *A. mammaria interna* (*IMA*) und *V. saphena magna* (*SV*) Präparaten zeigten unter Hitzebelastung und Sauerstoffentzug eine Reaktion des Endothels in Form von HSP- Expression. Die Gefäße wurden zunächst 30 Minuten und anschließend 6 Stunden lang einer erhöhten Temperatur von 42°C ausgesetzt. Nach 30 Minuten ergaben sich keine Unterschiede im Vergleich mit den Kontrollpräparaten, jedoch war nach 6 Stunden eine erhöhte Expression von HSP72 und HSP73 in den *IMA*- und *SV*- Präparaten festzustellen. Es konnte allerdings keine gesteigerte HSP60 Bildung nachgewiesen werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch unter Sauerstoffentzug von 6 Stunden gemacht. Es zeigte sich nur eine sehr schwache Anfärbung für HSP60, aber wiederum eine gesteigerte Expression von HSP72 und HSP73 sowohl in der *SV* als auch in der *IMA*. Jedoch war das Ausprägungsmuster der HSP60 Expression im Vergleich in den *SV*- Präparaten stärker, als in den *IMA*- Vergleichsschnitten (Hammerer- Lercher et al. 2001).

Diese Ergebnisse decken sich insofern mit denen der vorliegenden Arbeit, da auch bei uns die meisten Patienten HSP60 schwächer ausprägten, aber durch gewisse Einflüsse eine HSP60- Expression induziert wird. Dies könnte dem intraoperativen „handling“ des Chirurgen zugeschrieben werden. Denn obwohl die Präparation im Pedikel erfolgt, wird durch die Freipräparation mittels Elektrocauter eine hohe Hitzeeinwirkung erzeugt, welche für die Veränderungen

des Endothels verantwortlich sein könnte. Es wäre sicherlich interessant, diesen Sachverhalt noch weiter zu untersuchen. Man könnte z.B. die HSP60-Expression von Gefäßen vergleichen, welche mittels Elektrocauter präpariert werden und solchen ohne Elektrokoagulation. In nativen *IMA* Präparaten, welche im Rahmen anderer Untersuchungen als negative Kontrolle für die HSP60-Expression verwendet wurden, konnten weder mononukleäre Zellen noch HSP positive Endothelzellen nachgewiesen werden (Kleindienst et al. 1993).

Ist das Gefäß mit dem umgebenden Bindegewebskörper freipräpariert, muss das distale Ende noch reseziert werden, denn es ist bekannt, dass das distale Segment eine vermehrte Kontraktilität aufweist und somit zu einem Frühverschluss führt. Und zwar ist dies unabhängig davon, ob es besonders „schonend“ behandelt wurde. Dabei ist der Durchmesser des Gefäßes entscheidend. Je kleiner der Durchmesser, desto grösser ist die Neigung zum Vasospasmus (He et al. 2002).

In diesem Zusammenhang wurde an den von uns untersuchten Gefäßpräparaten bereits im Rahmen einer Vorgängerdissertation (Göbel et al. 1998) die Expression von Endothelin-1 durch Endothelzellen immunhistochemisch untersucht. Endothelin ist ein hochwirksamer Vasokonstriktor. Seine gefäßverengende und damit blutdrucksteigernde Wirkung ist einhundertmal höher als beim Noradrenalin. In der Studie konnte gezeigt werden, dass die *IMA* kein passives conduit ist, sondern vasokonstriktiven Reaktionen ausgesetzt ist. Dies ist insbesondere bei Vorliegen von Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie gesteigert.

Außerdem gibt es Unterschiede hinsichtlich der Operationstechnik. So wird in einigen Kliniken das Verfahren des „Skelettierens“ der *IMA* bei der Freipräparation verwendet, anstatt der Präparation im Pedikel. Dabei wird die linke *IMA* in den meisten Fällen gestielt zur Versorgung der Vorderwand verwendet. Das zweite freie Bypassgefäß, die rechte *IMA* oder Radialarterie, wird an die Aorta anastomosiert. Bei nicht ausreichender Länge des zweiten Bypassgefäßes, was z.B. bei Versorgung der Endäste der rechten Koronararterie die Regel ist, erfolgt die Verbindung über eine 90 Grad Anastomose in die linke *IMA*, in der sog. "T-Graft"-Technik. Dabei ist es nicht

verwunderlich, dass durch Manipulationen eine Schädigung des Endothels hervorgerufen werden kann. In einigen Kliniken gibt es zudem die Vorgehensweise, die *IMA* vor der Anastomose mit einem Vasodilatator, wie z.B. Papaverin durchzuspülen, was in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit Papaverin zur Zerstörung der Endothelzellen in der Zellkultur führt (Mayranpaa et al. 2004; He 1998).

Die HSP60 Expression ist in größeren Gefäßen stärker ausgeprägt als in den Kleinen, wie der *A. mammaria interna*, deren Durchmesser jenen der Koronararterien ähnlich ist (Kleindienst et al. 1993).

Außerdem unterscheidet sich die *A. mammaria interna* hinsichtlich ihres Gefäßwandaufbaus von der *V. saphena magna*. Sie besteht aus mehreren Schichten elastischer Fasern und weniger Muskelzellen. Dieser erhöhte Gehalt an Elastin macht die *IMA* widerstandsfähiger gegenüber äußeren Einflüssen, denn elastische Fasern sind relativ inert und stoffwechsellinaktiv (Dzimiri et al. 1996).

Gefäße unterschiedlicher Größe und aus verschiedenen anatomischen Kompartimenten zeigen eine Vielfalt an phänotypischen Merkmalen auf ihrem Endothel. Ähnlich wie antigenpräsentierende Zellen sind sie dazu befähigt, z.B. in Krankheitssituationen adäquat zu reagieren. So wurde z.B. auf Koronarendothelien von Patienten mit KHK nach Herztransplantation eine MHC-II Expression nachgewiesen, selten hingegen in Koronargefäßen mit atherosklerotischen Plaques und nie in größeren gesunden Gefäßen. Diese Erkenntnisse werden in engen Zusammenhang mit der Pathogenese der Erkrankung gebracht (Page et al. 1992).

Die Besonderheit der *IMA* ist in ihrer anatomischen Lage und Funktion begründet, was das Fehlen von mononukleären Zellinfiltraten zeigt. Genauso wie Endothelzellen in Leber, Lunge und Niere unterschiedliche Oberflächenantigene exprimieren, um ihre spezifischen Funktionen zu erfüllen, ist die *A. mammaria interna* vor Atherosklerose geschützt.

4. Rolle der Adhäsionsmoleküle

Es stellt sich nun die Frage, welche Rolle spielen die nachgewiesenen Adhäsionsmoleküle in der Intima der *A. mammaria interna*?

Adhäsionsmoleküle sind an dem Vorgang des „Homing“ von Leukozyten (s. Abb. 4 - *Einleitung*) an ihren Bestimmungsort und für die Transmigration von aktivierten T-Zellen durch das Endothel von Bedeutung. VCAM-1 interagiert spezifisch mit VLA-4 ($\alpha 4 / \beta 1$ - Integrin), das auf Lymphozyten präsent ist. Es wird nicht- konstitutiv von den Endothelzellen exprimiert, d.h. seine Bildung muss erst induziert werden. Außerdem ist VCAM-1 in seiner löslichen Form im Serum ein Marker für die Atherosklerose, wobei sein Spiegel mit der Ausdehnung korreliert (Peter et al. 1999). VCAM-1 wird als spezifischer Marker auch bei KHK- Patienten verwendet, um Endothelverletzungen zu erkennen (Semaan et al. 2000).

P-Selektin wird in präformierter Form in den Weibel- Palade Körperchen im Endothel gespeichert und wird durch Induktion von z.B. oxLDL, Histamin und Thrombin freigesetzt. P-Selektin ist in der Lage, spezifisch CD4-TH1-Zellen zu erkennen, die pro- inflammatorische Aktivität zeigen und daher Autoimmunprozesse begünstigen können. Demgegenüber sind CD4-TH2-Zellen für die Erzeugung einer humoralen Immunantwort, z.B. im Rahmen von Allergien, bedeutsam. P-Selektin kann somit die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats steuern.

In früheren Untersuchungen konnte sogar eine Co- Expression von ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 und HSP60 auf humanen arteriellen und venösen Endothelzellen als Antwort auf Stressfaktoren in Form von Cytokinen und oxLDL festgestellt werden (Amberger et al. 1997). Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass Adhäsionsmoleküle eine bedeutende Rolle in der T-Zelladhäsion spielen. HSP60 stellt das Autoantigen für spezifische T-Zellen dar, indem die infiltrierenden T-Zellen mit einem bestimmten Epitop des HSP60 reagieren. Die Affinität des T-Zellrezeptors zu seinem Antigen ist allerdings zu schwach, wohingegen Adhäsionsmoleküle die wesentlich höhere Affinität aufweisen (Seitz et al. 1996). Damit die Immunreaktion ablaufen kann bedarf es zunächst der Bindung an Adhäsionsmoleküle.

Auch wenn in der *Arteria mammaria interna* keine mononukleären Zellinfiltrate nachgewiesen wurden, zeigt die Expression von Adhäsionsmolekülen, dass bereits proinflammatorische Reaktionen im Endothel ablaufen, die für das spätere *outcome* des Gefäßes als Bypass entscheidend sein könnten.

Eine Rolle spielt auch die Komorbidität von Risikofaktoren wie z.B. der Diabetes mellitus. Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Diabetes mellitus eine vermehrte Expression von VCAM-1 und ICAM-1 im Endothel der Aorta und der *IMA* stattfand. Verbunden mit einer Intimahyperplasie in den untersuchten Gefäßabschnitten kann man von einem erhöhten Restenosierungsrisiko der *IMA*- Bypässe bei Diabetikern ausgehen (Ribau et al. 1999).

Leider war es im Rahmen dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht möglich, Doppelfärbungen durchzuführen, jedoch konnte bei den untersuchten Gefäßpräparaten HSP60, P-Selektin und VCAM-1 im Endothel an gleichen Lokalisationen in Einzelfärbungen nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Diese Dissertation schließt an eine Reihe vorheriger Dissertationen (M. Mayr 1998; G. Millonig 1999; C. Schwentner 2000) an, die sich mit dem immunologischen Konzept zur Entstehung der Atherosklerose beschäftigt haben. Dieses Konzept, welches in unserer Arbeitsgruppe erarbeitet wurde (Wick et al. 2004), basiert auf der Beobachtung, dass auf der Oberfläche von Endothelzellen eine Expression von Hitzeschockprotein 60 (HSP60) stattfindet. Eine autoimmunologische Reaktion gegen dieses Protein kann als initialer Mechanismus für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen angesehen werden.

Arterielle Endothelzellen reagieren auf die lebenslange Einwirkung von arteriellem Blutdruck, was zu einer Art „Vorstressung“ führt. Dies macht die Endothelzellen empfindlich für die Einwirkung von zusätzlichen Stressfaktoren, wie z.B. das Rauchen. Daraus resultiert eine erniedrigte „Schwelle“ für die Expression von Adhäsionsmolekülen und HSP60. Die mechanisch vorgestressten arteriellen Endothelzellen, welche HSP60 exprimieren, dienen dann als Zielzellen für eine präexistente, gegen HSP60 gerichtete zelluläre und humorale Immunantwort. Dies wird durch Infektion oder echte anti- HSP60 Autoimmunität durch biochemisch verändertes autologes HSP60 induziert.

Der Prozess wurde bereits bei der Entstehung von Bypassrestenosen beobachtet.

In dieser Arbeit sollte versucht werden, immunhistologische Parameter zu entwickeln, die es erlauben, das Risiko einer Bypassrestenose der *A. mammaria interna* auf Basis endothelialer Expression von HSP60 abzuschätzen.

In einer Vorgängerdissertation (Göbel et al. 1998) am Pathologischen Institut der Universität Freiburg wurden die gleichen Gefäßpräparate bereits auf die Expression von Endothelin-1 in Korrelation mit perioperativen vasospastischen Reaktionen untersucht.

Mit unseren Untersuchungsergebnissen kann die Besonderheit der *A. mammaria interna* bestätigt werden. Während in der Intima aller anderen arteriellen Gefäße bereits im Kindesalter Ansammlungen von mononukleären

Zellen gefunden werden konnten, gibt es in der Intima der *A. mammaria interna* keinen Hinweis auf derartige Zellinfiltrate, auch wenn die Patienten gefäßkrank sind und unter den als Risikofaktoren geltenden Nebenerkrankungen leiden. In den intraoperativ entnommenen Gefäßpräparaten konnten jedoch Adhäsionsmoleküle und HSP60 nachgewiesen werden. Dies gilt als Zeichen einer Stresseinwirkung, was an dem intraoperativen „handling“ des Chirurgen oder auch an ischämiebedingten Schädigungen liegen könnte.

Als Nachfolgeprojekt wäre es sicherlich interessant etwas über das *outcome* der Bypässe zu erfahren, da die Operationen mittlerweile 14 Jahre zurückliegen und diese Frage im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden konnte.

Literaturverzeichnis

Adam E, Probstfield JL, Burek J, McCollum CH, Melnick JL, Petrie BL, Bailey KR, Debakey ME
High levels of cytomegalievirus antibody in patients requiring vascular surgery for atherosclerosis.
Lancet 1987; 8: 291-293

Agard DA
To fold or not to fold....
Science 1993 Jun 25; 260 (5116): 1903-4

Amberger A, Macek C, Jürgens G, Michaelis D, Schett G, Trieb K, Eberl T, Jindal S, Xu G and Wick G
Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and HSP60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxLDL.
Cell stress and Chaperones 1997; 294-103

Amberger A, Hala M, Sauerwein-Teissl M, Metzler B, Grubeck-Löbenstein B, Xu Q, Wick G
Suppressive effects of anti-inflammatory agents on human endothelial cell activation and induction of heat shock proteins.
Mol Med 1999; 5: 117-28

Beeuwkes R
Cinematographic studies of the vasa vasorum of human coronary arteries, in pathobiology of the human atherosclerotic plaque, ed. S. Glagov et al.
New York, Springer Verlag, 1990: 425-432

Blaes N, Boissel JP
Growth stimulating effects of catecholamins on rat aortic smooth muscle cells in culture.
J Cell Physiol 1983; 116: 167-172

Bobryshev YV, Lord RSA
Ultrastructural recognition of cells with dendritic morphology in human aortic intima. Contacting interactions of vascular dendritic cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta.
Aren Histol Cytol 1995; 58: 307-322

Bobryshev YV, Lord RSA
S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions.
Cardiovasc Res 1995; 29: 689-696

Bobryshev YV, Lord RSA
Heterogeneity and contact interactions of vascular dendritic cells in human arterial intima and atherosclerotic lesions.
NZ J Surg 1996; 66: 247

Bobryshev YV, Lord RSA, Rainer S, Jamal OS, Munro VF
Vascular dendritic cells and atherosclerosis.
Pathol Res Pract 1996; 192: 462-467

Bobryshev YV, Watanabe T
Subset of vascular dendritic cells transforming into foam cells in human
atherosclerotic lesions.
Cardiovasc Pathol 1997; 6: 321-331

Burstein M, Scholnick HR, Morfin R
Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by
precipitation with polyanions.
LipidRes 1970; 11: 583-595

Campeau L, Lesperance J, Bilodeau L, Fortier A, Guertin MC, Knatterud GL
Effect of cholesterol lowering and cardiovascular risk factors on the progression
of aortoiliac arteriosclerosis: a quantitative cineangiography study.
Angiology 2005 Mar-Apr; 56 (2): 191-9

Chiu JJ, Lee PL, Chen CN, Lee CI, Chang SF, Chen LJ, Lien SC, Ko YC,
Usami S, Chien S
Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin
expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in endothelial cells.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004 Jan; 24 (1): 73-9

Constantinides P
Plaque hemorrhage, their genesis and their role in supra- plaque thrombosis
and atherogenesis. In: Pathobiology of the atherosclerotic plaque; Ed. S.
Glagov et al. New York, Springer Verlag; 1990, pp 393-411

Cybulsky MI, Gimbrone MA jr.
Endothelial expression of mononuclear leukocyte adhesion molecule during
atherogenesis.
Science 1991; 251: 788- 791

Dahlen G, Berg K, Frick MH
Lp (a) lipoprotein/ pre-beta1-Lipoprotein in patients with coronary heart disease.
Clin Genetics 1976; 9: 558-66

Davies MJ, Woolf N
Atherosclerosis what is it and when does it occur?
Br Heart J 1993; 69 (suppl) 3-11

Dougenis D, Brown AH
Long-term results of reoperations for recurrent angina with internal mammary
artery versus saphenous vein grafts.
Heart 1998 Jul; 80 (1): 9-13

Dzimiri N, Chester AH, Allen SP
Vascular reactivity of arterial coronary artery bypass grafts- implications for their performance.
Clin Cardiol 1996; 19: 165-171

Ebrahim H, Evans DJ
Antibody induced injury to podocytes with proteinuria and foot process swelling in a transgenic (T16) mouse.
Int J Exp Pathol 1999 Apr;80(2):77-86.

Emeson EE, Shen ML, Bell CG, Qureshi A
Inhibition of atherosclerosis in CD4 T-cell-ablated and nude (nu/nu) C57BL/6 hyperlipidemic mice.
Am J Pathol. 1996 Aug;149(2):675-85

European Coronary Surgery Study Group
Long-term results of prospective randomized study of coronary artery bypass surgery in stable angina pectoris.
Lancet 1982; 2: 1173-9

Falk E
Pathogenesis of atherosclerosis
J Am Coll Cardiol. 2006 Apr 18;47(8 Suppl):C7-12.

Falkensammer G
Immunologie der Atherosklerose
Dissertation Universität Innsbruck 1998

Fruebis J, Gonzales V, Silvestre M, Palinski W
Effect of probucol treatment on gene expression of VCAM-1, MCP-1 and M-CSF in the aortic wall of LDL receptor- deficient rabbits during early atherogenesis.
Thromb Vasc Biol 1997; 17: 1289-1302

Fry DL
Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients.
Circ Res 1968; 22: 165

Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentiono R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa W
Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by HSP90
Nature 1998; 392: 821-824

Göbel H, Ihling C, Dentz J, Schaefer HE, Zeiher AM, Fraedrich G
Increased tissue endothelin-1-like immunoreactivity in the internal mammary artery of patients with diabetes or hypercholesterolemia modulates the graft flow in the peri-operative period.
Eur J Cardiothorac Surg 1998 Oct; 14 (4): 367-72

Hajjar DP

Warner-Lambert/Parke-Davis Award Lecture. Viral pathogenesis of atherosclerosis. Impact of molecular mimicry and viral genes.

Am J Pathol 1991 Dec; 139 (6): 1195-211

Hammerer- Lercher A, Mair J, Bonatti J, Watzka S, Puschendorf B, Dirnhofer S
Hypoxia induces heat shock protein expression in human coronary artery bypass grafts.

Cardiovascular Research 50 (2001) 115- 124

HAMPL J, Schild H, LITZENBERGER C, BARON M, CROWLEY MP, CHIEN YH

The specificity of a weak gamma delta TCR interaction can be modulated by the glycosylation of the ligand.

J Immunol 1999 Jul 1; 163 (1): 288-94

Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S

Immune mechanisms in atherosclerosis.

Atherosclerosis 1989; 9; 567- 78

He GW

Verapamil plus nitroglycerin solution maximally preserves endothelial function of the radial artery: comparison with papaverine solution.

J Thorac Cardiovasc Surg 1998 Jun ;115 (6): 1321-7

He GW, Yang Q, Yang CQ

Smooth muscle and endothelial function of arterial grafts or coronary artery bypass surgery.

Clin Exp Pharmacol Physiol 2002 Aug; 29 (8): 717-20

Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D

Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein.

Arteriosclerosis 1983; Mar- Apr; 3(2): 149-59

Hershko A

Ubiquitin mediated protein degradation.

J Biol Chem 1988; 263: 15237-40

Hightower LE, Sadis SE, Takenaka IM

Interactions of vertebrate hsc 70 and HSP70 with unfolded proteins and peptides. In: Morimoto RI, Tissieres A and Georgopoulos C editors;

The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.

Cold Spring Harbor Press 1994; Cold Spring Harbor NY

Hochleitner BW, Hochleitner EO, Obrist P, Eberl T, Amberger A, Xu Q, Margreiter R, Wick G

Fluid shear stress induces heat shock protein 60 expression in vitro and in vivo.

Arterioscler Thromb Vase Biol 2000; 20: 617-623

- Ikata J, Wakatsuki T, Oishi Y, Oki T, Ito S
Leukocyte counts and concentrations of soluble adhesion molecules as predictors of coronary atherosclerosis.
Coron Artery Dis 2000; 11: 445-449
- Inoue Y, King TE jr., Tinkle SS, Dockstader K, Newman LS
Human mast cell basic fibroblast growth factor in pulmonary fibrotic disorders.
Am J Pathol 1996; 149: 2037-2054
- Janeway CA, Travers P
Immunologie 2. Auflage.
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford 1997
- Jegaden O, Eker A, Montagna P
Risk and results of bypass grafting using bilateral internal mammary and right gastroepiploic arteries.
Ann Thorac Surg 1995; 59: 955-60
- Johnson AD, Berberian PA, Tytell M, Bond MG
Differential distribution of 70-kD heat shock protein in atherosclerosis. Its potential role in arterial SMC survival.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995 Jan;15(1):27-36
- Jones DB, Coulson AFW, Duff GW
Sequence homology between HSP60 and Autoantigens.
Immunol Today 1993; 14: 115-118
- Kaufmann SH, Schoel B, van Embden JD, Koga T, Wand-Wurtttenberger A, Munk ME, Steinhoff U
Heat-shock protein 60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infections.
Immunol Rev 1991 Jun; 121: 67-90
- Kemler R, Ozawa M, Ringwald M
Calcium-dependent cell adhesion molecules.
Curr Op Cell Biol 1989 1: 892-897
- Kiessling R, Grönberg A, Ivanyi J, Söderstrom K, Ferm M, Kleinau S, Nielsson E, Klareskog L
Role of HSP60 during autoimmune and bacterial inflammation.
Immunol Rev 1991; 12: 91-111
- Kleindienst R, Xu Q, Willeit J, Waldenberger F, Weimann S, Wick G
Immunology of atherosclerosis. Demonstration of heat shock protein 60 expression and T-lymphocytes bearing the α/β or γ/δ -receptor in human atherosclerotic lesions.
Am J Pathol 1993; 142: 1927-1937

Kockx MM, De Meyer GR, Bortier HE, De Meyere N, Muhring J, Bakker A, Jacob W, van Vaeck L, Herman A
Luminal foam cell accumulation is associated with smooth muscle cell death in the intimal thickening of human saphenous vein grafts.
Circulation 1996 Sep 15; 94 (6): 1255-62

Kokkonen JO, Lindstedt KA, Kovanen PT
Metabolism of LDL in mast cells recovering from degranulation. Description of a novel intracellular pathway leading to proteolytic modification of the lipoprotein.
Arterioscler Thromb 1993 Feb; 13 (2): 276-85

Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA
Lysophosphatidyl-choline, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured arterial endothelial cells.
J Clin Invest 1992; 90: 1138-1144

Kurts C, Carbone FR, Barnden M, Blanas E, Allison J, Heath WR, Miller JF
CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity.
J Exp Med 1997 Dec 15; 186 (12): 2057-62

Lai B, Chin N, Stanek A, Keh W, Lanks K
Quantitation and intracellular localization of the 85 kD heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies.
Mol Cell Biol 1984; 4: 2802-2810

Lehr HA, Kroger M, Hübner C, Messmer K
Stimulation of leukocyte/endothelium interaction by oxLDL in hairless mice. Involvement of CD11b/CD18 adhesion receptor complex.
Lab Invest 1993; 68: 388-395

Li YQ, Kobayashi M, Yuan L, Wang J, Matsushita K, Hamada JI, Kimura K, Yagita H, Okumura K, Hosokawa M
Protein kinase C mediates the signal for interferon-gamma mRNA expression in cytotoxic T cells after their adhesion to laminin.
Immunology 1998 Apr; 93 (4): 455-61

Libby P, Hansson GK
Biology of disease: Involvement of the immune System in human atherogenesis: Current knowledge and unanswered questions.
Lab Invest 1991; 64: 5-10

Lindblad B, Burkel WE, Graham LM, Darvishian D, Harell K, Seil R, Stanley JC
Effect of anti-coagulant and anti-platelet drugs on in vitro smooth muscle cell proliferation.
Artery 1988; 15: 225-233

Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT

Inhibition of copper-mediated oxidation of LDL by rat serosal mast cells. A novel cellular protective mechanism involving proteolysis of the substrate under oxidative stress.

Arterioscler Thromb 1993 Jan; 13 (1): 23-32

Lusis AJ

Genetic effectors affecting blood lipoproteins: the candidate gene approach.

JLipidRes 1988: 397-429

Master AM, Duck S, Jaffe HL

Age, sex and hypertension in myocardial infarction due to coronary occlusion.

Arch Int med 1939; 64: 767-86

Mayr M

Immunologie der Atherosklerose. Immunreaktion gegen HSP als mögliche Verbindung zwischen Infektion und Atherosklerose. Serumantikörper gegen HSP von E.coli und C.pneumoniae mediieren endotheliale Zytotoxizität.

Dissertation Universität Innsbruck 1998

Mayranpaa M, Simpanen J, Hess MW, Werkkala K, Kovanen PT

Arterial endothelial denudation by intraluminal use of papaverine-NaCl solution in coronary bypass surgery.

Eur J Cardiothorac Surg 2004 Apr; 25 (4): 560-6

Mehta A, Yang B, Khan S, Hendricks JB, Stephen C, Mehta JL

Oxidized low density lipoproteins facilitate leukocyte adhesion to aortic intima without affecting endothelium dependent relaxation: The Role of P-selectin.

Arterioscler Thromb Vase Biol 1995; 15: 2076-2083

Miller AP, Feng W, Xing D, Weathington NM, Blalock JE, Chen YF, Oparil S

Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries.

Circulation 2004 Sep 21; 110 (12): 1664-9

Miller GH, Miller NE

Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischemic heart Disease.

Lancet 1975; 1: 16-19

Millonig G

Immunology of atherosclerosis. Immunohistochemical characterisation of the vascular associated lymphoid tissue (VALT) with special regard to PDAY-specimens (pathobiological determinants of atherosclerosis in youth)

Dissertation Universität Innsbruck 1999

Millonig G, Niederegger H, Rabl W, Hochleitner BW, Hoefer D, Romani N, Wick G

Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001 Apr; 21 (4): 503-8

Millonig G, Malcom GT, Wick G

Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study.

Atherosclerosis 2002 Feb; 160 (2): 441-8

Morel DW, Di Corletto PE, Chisolm GM

Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation.

Arteriosclerosis 1984; 4: 357-364

Morel DW, de la Llera- Moya M, Friday KE

Treatment of cholesterol- fed rabbits with dietary vitamins E and C inhibits lipoprotein oxidation but not development of atherosclerosis.

J Nutr 1994 Nov; 124 (11): 2123-30

National Heart, Lung and Blood Institute

USA 1990

Nemecek GM, Coughlin SR, Handley DA, Moshkowitz MA

Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin.

Proc Natl Acad Sei USA 1986; 83: 674-678

Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R
Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes.

Cell 1989 Dec 22; 59 (6): 1203-11

Ozawa M, Kemler R

The membrane- proximal region of the E- cadherin cytoplasmatic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity.

J Cell Biol. 1998 Sep 21; 142 (6): 1605-13

Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R

Antigenic heterogeneity of vascular endothelium.

Am J Pathol 1992, 141 (3): 673-683

Peter K, Weirich U, Nordt TK, Ruef J, Bode C

Soluble vascular cell adhesion molecule-1 as a Potential marker of atherosclerosis.

Thromb Haemost 1999; 82 (suppl) 38-43

Resnick N, Gimbrone MA jr.

Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression.

FASEB J 1995; 9: 874- 882

Ribau JC, Hadcock SJ, Teoh K, DeReske M, Richardson M
Endothelial adhesion molecule expression is enhanced in the aorta and internal
mammary artery of diabetic patients.
J Surg Res 1999 Aug; 85 (2): 225-33

Richardson PD, Davies MJ, Born GV
Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary
atherosclerotic plaques.
Lancet 1989 Oct 21; 2 (8669): 941-4

Ross R
The pathogenesis of atherosclerosis. A perspective for the 1990s.
Nature 1993; 362: 801-809

Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Makela PH,
Huttunen JK, Valtonene V
Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with
chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction.
Lancet 1988; 2: 983-986

Schett G, Xu Q, Amberger A, van der Zee R, Recheis H, Willeit J, Wick G
Autoantibodies against heat-shock protein 60 mediate endothelial cytotoxicity.
J Clin Invest 1995; 96: 2569-2577

Schwendtner C
Immunologie der Atherosklerose. Immunhistologische Charakterisierung der
extrazellulären Matrixproteine im humanen Gefäß-assoziierten lymphatischen
Gewebe (vaskular associated lymphoid tissue, VALT).
Dissertation Universität Innsbruck 2000

Seitz C, Kleindienst R, Xu Q, Wick G
Coexpression of heat-shock protein 60 and intercellular adhesion molecule-1 is
related to increased adhesion of monocytes and T cells to aortic endothelium of
rats in response to endotoxin.
Lab Invest 1996; 74: 241- 252

Semaan HB, Gurbel PA, Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist JF, Hörne BD,
Serebruany VL
Soluble VCAM-1 and E-Selectin, but not ICAM-1 discriminate endothelial injury
in patients with documented coronary artery disease.
Cardiology 2000; 93: 7-10

Shen Z, Reznikoff G, Dranoff G, Rock KL
Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I
and II molecules.
J Immunol 1997; Mar 15; 158 (6): 2723-30

- Solymoss BC, Leung TK, Pelletier LC
Pathologic change in coronary artery saphenus grafts and related etiologic factors.
Cardiovasc Clin 1991; 21: 45-65
- Springer TA
Nature 1990; 346: 425-434
- Sтары HC
A definition of the intima of human arteries and of its atherosklerotic prone region.
Circ 1992; 85: 391-405
- Sтары HC
Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries.
Basic Res Cardiol 1993; 89 (Suppl.1), 17-32.
- Sтары HC
The evolution of human atherosclerotic lesions.
Merck&Co Inc 1993
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL
Beyond cholesterol modifications of low density lipoproteins that increase its atherogenicity.
N Engl J Med 1989; 320: 915-22
- Steiner A, Domanski B
Serum cholesterol levels in coronary atherosclerosis.
Arch Int Med 1943; 71: 397-402
- Suzuki ST
Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway?
J Cell Bioch 1996 61: 531-542
- Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P
The selectins: vascular adhesion molecules.
FASEB J 1995 Jul; 9 (10): 866-73
- Udelsman R, Blake MJ, Holbrook NJ
Molecular response to surgical stress: Specific and simultaneous heat- shock protein induction in the adrenal cortex, aorta and vena cava.
Surgery 1991; 6: 1125-1131
- Van Bilsen JH, Wagenaar-Hilbers JP, Boot EP, van Eden W, Wauben MH
Searching for the cartilage-associated mimicry epitope in adjuvant arthritis.
Autoimmunity 2002 May; 35 (3): 201-10

Van Eden W, Thole JER, van der Zee R, Noordzij A, van Embden JDA, Hensen EJ, Cohen IR
Cloning of mycobacterial epitope recognized by T-lymphocytes in adjuvant arthritis.
Nature 1988; 33: 171-173

Van Eden W, de Vries RR
The immunopathogenesis and immunogenetics of rheumatoid arthritis.
Br J Rheumatol 1989; 28: 21-53

Verhaar MC, Beutler JJ, Gaillard CA, Koomans HA, Fijnheer R, Rabelink TJ
Progressive vascular damage in hypertension is associated with increased levels of circulating P-selectin.
J Hypertens 1998 Jan; 16 (1): 45-50

Waltner- Romen M, Falkensammer G, Rabl W, Wick G
A previously unrecognized site of local accumulation of mononuclear cells. The vascular associated lymphoid tissue.
J Histochem Cytochem 1998; 46: 1347-50

Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q
Is atherosclerosis an autoimmune mediated disease?
Immunol Today 1995; 16: 27-33

Wick G, Romen M, Amberger A, Metzler B, Falkensammer G, Xu Q
Atherosclerosis, immunology and vascular associated lymphoid tissue.
FASEBJ 1997; 11: 1199-1207

Wick G, Knoflach M, Xu Q
Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis.
Annu Rev Immunol 2004; 22: 361-403

Witzum JL, Steinberg D
Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis.
J Clin Invest 1991; 88: 1785-1792

Wu J, Groh V, Spies T
T- cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells.
J Immunol 2002 Aug 1;169 (3): 1236-40

Xu Q
Infections, heat shock proteins and atherosclerosis.
Curr Opin Cardiol 2003 Jul; 18 (4): 245-52

Xu Q, Oberhuber G, Gruschwitz M, Wick G
Immunology of atherosclerosis: Cellular composition and major histocompatibility complex class II antigen expression in aortic intima, fatty streaks and atherosclerotic plaques in young and aged human specimens.
Clin Immunol immunopathol 1990; 56: 344-359

Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ, Gown AM, Schoel B, Mikuz G, Kaufmann Sh, Wick G
Induction of atherosclerosis in normocholesterinemic rabbits by immunisation with HSP65.

Arterioscl Thromb 1992; 12: 789-99

Xu Q, Kiechl S, Mayr M, Metzler B, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J, Wick G
Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis.

Circulation 1999; 100: 1169-1174

Yamashiroya HM, Ghosh L, Yang R, Robertson AL jr.

Herpesviridae in the coronary arteries and aorta of young trauma victims.

Am J Pathol 1988; 133: 71-79

Young P, Roman E, Moreno C, O`Brian R, Born W

Molecular chaperon and immune response.

Biol Sci 1993; Mar 29: 339 (1289): 363-7 u 363-8

Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S

Carotid bifurcation atherosclerosis : Quantitative correlation of plaque localisation with flow velocity profiles and wall shear stress.

Circ Res 1983; 53: 502-505

Zou Y, Dietrich H, Hu Y, Metzler B, Wick G, Xu Q

Mouse Model of Venous Bypass Graft Arteriosclerosis.

American Journal of Pathologie Vo. 153, No 3, October 1998

Zugel U, Kaufmann SH

Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases.

Clin Microbiol Rev 1999 Jan;12(1):19-39

Danksagung



Mein besonderer Dank gilt **Herrn Prof. Dr. med. G. Wick**, emeritierter Vorstand des Instituts für Pathophysiologie der Universität Innsbruck für die Überlassung des Dissertationsthemas, die fachliche Betreuung und Beratung sowie für die Unterstützung bei der Literaturrecherche und der Diskussion meiner Ergebnisse.



In gleichem Masse möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. med. G. Fraedrich**, Vorstand der Abteilung für Gefäßchirurgie der Universität Innsbruck für die finanzielle Unterstützung, das zur Verfügungstellen der Gefäßpräparate und die Geduld bis zum Fertigstellen dieser Arbeit bedanken.

Für Ihre Hilfestellung bei der Einführung in die Laborarbeit, bei der Vorbereitung der Experimente und der moralischen Unterstützung bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Freundin **Frau Christina Mayrl**.

Es sei auch **Frau Pia Müller** gedankt, die mich freundlich in ihr Labor aufgenommen hat und für labortechnische Fragen immer ein offenes Ohr hatte. Ausserdem **Frau Ruth Pfeilschifter-Resch** für die Anfertigung der Paraffinschnitte.

Herrn Prof. Dr. med. T. Meinertz möchte ich danken, daß er sich als Gutachter an der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt hat.

Meinem Lebenspartner **Alex Wielander** danke ich ganz besonders für sein Verständnis und die stetige moralische Unterstützung und Motivation.

Für die Überlassung des Titelbildes möchte ich mich bei **Frau Franziska Königsrainer** bedanken.

Allen Institutsangehörigen, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und nicht namentlich erwähnt wurden, sei mein herzlicher Dank ausgesprochen.

Danksagung

Die Finanzierung der Arbeit erfolgte durch den Österreichischen Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (FWF Projekt -Nr.: P 14741).