

**Einfluß von Thalidomid auf die Atherogenese im Tiermodell der  
ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel- Knockout Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Irina Anjuli Gunkel  
geboren in Frankfurt-Höchst

Gießen 2012

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie  
Abteilung für Diagnostische Radiologie  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen  
Leiter: Prof. Dr. med. G. Krombach

Gutachter: Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich

Gutachter: Prof. Dr. rer. physiol. A. Meinhardt

Tag der Disputation: 29.03.2012

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

*Wer im Gedächtnis seiner Lieben lebt,  
der ist nicht tot, der ist nur fern;  
tot ist nur, wer vergessen ist.*

Immanuel Kant

- Meinem Papa -



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 PATHOGENESE DER ATHEROSKLEROSE .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 VASA VASORUM.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 THALIDOMID.....</b>	<b>12</b>
1.3.1 GESCHICHTE DES THALIDOMIDS- DER CONTERGAN SKANDAL .....	12
1.3.2 DIE RENAISSANCE VON THALIDOMID .....	13
1.3.3 NEBENWIRKUNGEN VON THALIDOMID .....	19
1.3.4 PHARMAKOKINETIK VON THALIDOMID .....	20
<b>1.4 TIERMODELL .....</b>	<b>21</b>
<b>1.5 BILDGEBUNG.....</b>	<b>23</b>
1.5.1 GRUNDLAGEN DER COMPUTERTOMOGRAPHIE.....	24
1.5.2 MIKRO- UND NANO- COMPUTERTOMOGRAPHIE .....	26
1.5.2.1 Grundlagen der Mikro- Computertomographie.....	26
1.5.2.2 Grundlagen der Nano- Computertomographie .....	29
1.5.3 ANWENDUNG IN DER GEFÄß- UND WEICHTEILDARSTELLUNG .....	30
<b>1.6 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT .....</b>	<b>32</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 IN -VITRO- ZELLVERSUCHE: PROLIFERATION UND MIGRATION VON ENDOTHELZELLEN UNTER DEM EINFLUSS VON THALIDOMID.....</b>	<b>33</b>
2.1.1 GERÄTE .....	33
2.1.2 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN, MEDIEN .....	34
2.1.3 MEDIKAMENTE.....	34

2.1.4	ZELLKULTUR .....	35
2.1.5	FUNKTIONELLE ASSAYS .....	35
2.1.5.1	Proliferationsassay.....	35
2.1.5.2	Migrationsassay .....	37
<b>2.2</b>	<b>TIERMODELL .....</b>	<b>38</b>
2.2.1	TIERHALTUNG .....	38
2.2.2	TIERFUTTER, ERNÄHRUNG UND THALIDOMIDARREICHUNG .....	39
2.2.3	STUDIENDESIGN UND VERSUCHSDURCHFÜHRUNG .....	39
<b>2.3</b>	<b>PRÄPARATION UND PERFUSION DES VASKULÄREN STROMGEBIETS.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4</b>	<b>SEKTION UND GEFÄßENTNAHME.....</b>	<b>41</b>
<b>2.5</b>	<b>BILDGEBUNG.....</b>	<b>42</b>
2.5.1	NANO- COMPUTERTOMOGRAPHIE .....	42
2.5.2	SYNCHROTRON- BASIERTE MIKRO- COMPUTERTOMOGRAPHIE.....	43
2.5.3	QUANTITATIVE ANALYSE.....	44
2.5.3.1	Auszählung und Planimetrierung der adventitiellen Vasa vasorum.....	44
2.5.3.2	Messung des aortalen Gesamtdurchmessers .....	45
2.5.3.3	Messung des aortalen luminalen Durchmessers.....	45
2.5.3.4	Planimetrierung der aortalen luminalen Oberfläche.....	45
2.5.3.5	Berechnung der Plaqueoberfläche.....	45
2.5.3.6	Berechnung des Gefäßwand/ Lumen Quotienten.....	46
<b>2.6</b>	<b>HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODEN .....</b>	<b>46</b>
2.6.1	ZUSCHNEIDEN DES GEWEBES UND HISTOLOGISCHE EINBETTUNG .....	47
2.6.2	ANFERTIGUNG HISTOLOGISCHER PRÄPARATE.....	47
2.6.3	FÄRBE-METHODEN.....	47
<b>2.7</b>	<b>KORRELATION DER SCHNITTBILDER AUS DER SYNCHROTRON- BASIERTEN MIKRO- UND NANO-COMPUTERTOMOGRAPHIE UND HISTOLOGIE .....</b>	<b>49</b>
<b>2.8</b>	<b>STATISTISCHE ANALYSE .....</b>	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>IN-VITRO- ZELLVERSUCHE: EINFLUSS VON THALIDOMID AUF ENDOTHELZELLEN .....</b>	<b>50</b>
3.1.1	PROLIFERATIONSASSAY.....	50

3.1.2	MIGRATIONSASSAY .....	53
3.2	QUANTIFIZIERUNG ATHEROSKLEROTISCHER LÄSIONEN.....	54
3.3	VASA VASORUM.....	57
4	DISKUSSION .....	60
4.1	THALIDOMID.....	61
4.2	BILDGEBUNG.....	65
4.3	TIERMODELL .....	70
4.4	LIMITATIONEN.....	71
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	73
6	SUMMARY.....	74
7	LITERATURVERZEICHNIS .....	75
8	ANHANG .....	95
8.1	MATERIAL.....	95
8.2	FÄRBEMETHODEN.....	96
8.2.1	<i>HAEMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG</i> .....	96
8.2.2	<i>ELASTIKA- FÄRBUNG NACH WEIGERT</i> .....	97
8.2.3	<i>GOLDNER´S-MASSON-TRICHROME FÄRBUNG</i> .....	98
8.2.4	<i>BERLINER-BLAU-FÄRBUNG</i> .....	99
9	DANKSAGUNG .....	100
10	PUBLIKATIONEN .....	101
10.1	ORIGINALARBEITEN .....	101
10.2	ABSTRACTS .....	101



## Abkürzungsverzeichnis

A	Arterie
Aa.	Arterien
Abb.	Abbildung
AHA	American Heart Association
ApoE	Apolipoprotein E
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BGB	Bundesgesetzbuch
BIT	Binary digit
BM	Basal Medium
BrdU	Bromodesoxyuridin
°C	Grad Celcius
CCD	Charged Coupled Device
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
EC	Endothelzellen
EGM	Endothelzell- Growth- Medium
EBM	Endothelzell- Basal- Medium
ELISA	Enzyme- linked immunosorbent assay

EMEA	European Medicines Evaluation Agency
et al	et alii/ et aliae, lateinisch für „und andere“
eV	Elektronenvolt
FCS	Fätales Kälberserum
Fe <sup>3+</sup>	dreiwertiges Eisen
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
GM	Growth Medium
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin Eosin
HE/HU	Hounsfield- Einheit
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
IU	International Units
IVUS	Intravaskulärer Ultraschall
keV	Kilo- Elektronen- Volt
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
Konz.	Konzentration
kV	Kilovolt
kVp	Kilovolt peak

LDL	Low Density Lipoprotein
mA	Milliampere
max.	maximal
MB	Megabyte
M- CSF	Macrophage colony- stimulating factor
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MONICA	MONItoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease
MRT	Magnetresonanztomographie
μA	Mikroampere
μCT	Mikro-Computertomograph(ie)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NCT	Nano-Computertomograph(ie)
nm	Nanometer
NTK- Zellen	natürliche T- Killerzellen
p	Wahrscheinlichkeit
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline

PDGF	platelet derived growth factor
PET	Positronen- Emissions- Tomographie
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
s.	siehe
SPECT	Single- photon emission computed tomography
SPF	Specific Pathogen Free Facility
Std.	Stunden
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
u.a.	unter anderem
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1wa
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	very low density lipoprotein
vs.	versus
VV	Vasa Vasorum
VVE	Vasa Vasorum Externa
VVI	Vasa Vasorum Interna
VVV	Venöse Vasa Vasorum
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WST	water soluble tetrazolium
z. B.	zum Beispiel



## 1 Einleitung

Die Komplikationen und klinischen Folgeerscheinungen der Atherosklerose sind in den westlichen Industriestaaten nach wie vor die Haupttodesursache und tragen zu mehr als 50% der Gesamtmortalität bei.<sup>1</sup> In einer Langzeitstudie (Multinational Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease, MONICA) zwischen Mitte der 80er und 90er Jahre der Weltgesundheitsorganisation (WHO) konnte gezeigt werden, dass durch moderne Therapiekonzepte die Mortalitätsrate bei einem Myokardinfarkt und einem akuten Koronarsyndrom gesenkt werden konnte.<sup>2</sup>

Die Inzidenz für Atherosklerose steigt jedoch weiterhin weltweit an<sup>3</sup>, so dass es auch in Zukunft als Schwerpunkt der Forschung verstanden werden muss, die detaillierten Pathomechanismen der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen zu analysieren, sowie darauf basierend neue Therapieansätze zu entwickeln.

Dem Statistischen Bundesamt nach waren 2009 in Deutschland die Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems die häufigste Todesursache (41,7%), noch vor den Neubildungen (26,0%) und den Krankheiten des Atmungssystems (7,4%). Dabei gilt der komplette Gefäßverschluss als die häufigste Ursache für den plötzlichen Tod. Diese akuten Gefäßverschlüsse finden ihren Ursprung zu 75% in einer rupturierten atherosklerotischen Gefäßläsion.<sup>4</sup> Ausschlaggebend für das Risiko einer Plaqueruptur sind der Läsionstyp und die jeweilige Plaquezusammensetzung.<sup>5</sup>

Die Entwicklung der Atherosklerose kann schon im zweiten Lebensjahrzehnt beginnen und bleibt meist Jahrzehnte klinisch unauffällig. Oftmals manifestiert sie sich erst in der zweiten Lebenshälfte, wenn die Gefäße einen hochgradigen Verschluss aufweisen.<sup>6</sup> Die Atherosklerose stellt somit die Ursache ischämischer Folgeerkrankungen in verschiedenen Organsystemen dar. So manifestiert sich der Gefäßverschluss im Gehirn als ischämischer zerebraler Insult<sup>7</sup>, im Herz als koronare Herzerkrankung (KHK) oder als Angina Pectoris<sup>8</sup> und in den Extremitäten als die sogenannte periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK).<sup>9</sup>

Heute geht man davon aus, dass in den kommenden 15 Jahren kardiovaskuläre Erkrankungen statistisch die Haupttodesursache weltweit sein werden.<sup>1</sup>

## **1.1 Pathogenese der Atherosklerose**

Nach der Definition der WHO ist die Atherosklerose eine Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien, sowie der elastischen und muskulären Arterien. Die akute und/ oder chronische Entzündungsreaktion der Gefäßwand geht von der Intima, der innersten Wandschicht der Arterien, aus und greift im weiteren Verlauf auf die Media, die mittlere Wandschicht der Arterien, über. Dabei bilden sich herdförmige Lipidansammlungen in der Gefäßwand, mit komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, diffusen Kollagenfaseranhäufungen und Kalkablagerungen. Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, sowie Gefäßendothelzellen und glatte Muskelzellen sind an dieser Entzündungsreaktion beteiligt.<sup>10; 11</sup>

Prädisponiert für die Entstehung der Atherosklerose sind besonders die Aorta, die Karotiden, die Herzkranzgefäße, die Hirnarterien und die mittelgroßen Arterien der Extremitäten.<sup>12</sup> Häufig sind die konvexen Gefäßinnenwände und Gefäßabgänge, wo es zu Verzweigungen kommt und die Strömungsrichtung des Blutes wechselt, betroffen.<sup>13</sup>

Für die Initiation und Progression der Atherosklerose konnte man einige endogene, also nicht beeinflussbare Risikofaktoren ausfindig machen, wie das Alter, die genetische Veranlagung oder das männliche Geschlecht. Zu den exogenen Risikofaktoren zählen die Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, die Hypertonie, die Low Density Lipoprotein (LDL)- Cholesterinfraktion, die Hyperlipidämie, Bewegungsmangel, Gicht, eine fettreiche und hyperkalorische Ernährung, Rauchen, Stress und Adipositas.<sup>14; 15</sup> Bei der Atherosklerose handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen, wobei sich das Risiko der Ausbildung atherosklerotischer Plaques signifikant erhöht, wenn mehrere Risikofaktoren bei einem Patienten gleichzeitig bestehen.<sup>16</sup>

Die verschiedenen Stadien der Atherosklerose wurden nach histomorphologischen Kriterien von der American Heart Association (AHA) klassifiziert:

Stadium	Bezeichnung	Histologische Merkmale
-	Intimale Verdickung	Im histologischen Aufbau ist die Tunica intima erhalten, proportionale Zunahme der Schichtdicken – Prädilektionsstelle für die Initiation atherosklerotischer Läsionen
I	Initiale Läsion	Ansammlung von Lipoproteinen und Makrophagen/ isolierten Schaumzellen in der Tunica intima
II	„Fatty Streak“, Fettstreifen- Läsionen	Typ I + Akkumulation von Makrophagen, T-Lymphozyten, Mastzellen und glatten Muskelzellen, Anreicherung intrazellulärer Lipide, Ausbildung einer Schichtung der Schaumzellen
III	Präatherom	Typ II + isolierte, extrazelluläre Lipidpools
IV	Atherom	Typ III + konfluierender, extrazellulärer Lipidkern (Atheromkern), strukturelle Intimaschäden, Zusammensetzung der Kappe entspricht der Tunica intima Schichtung
V	Fibroatherom	Typ IV + fibröse Kappe und Nekrosen im Kern, Ausbildung einer fibromuskulären Gewebsschicht
VI	Thrombohämorrhagische Läsion	Komplizierte atherosklerotische Plaques, Ulzeration/ Fissur der fibrösen Kappe (VIa), intraplaque Hämorrhagie/ Hämatom (VIb) und /oder thrombotischer Veränderung (VIc)
VII	Kalzifizierte Läsion	Typ V Läsion mit eingelagerten Kalkspangen, ggf. Atheromkern durch kalzifizierte Matrix ersetzt
VIII	Fibrotische Läsion	Typ V Läsion mit wenigen oder keinen Lipidablagerungen im atherosklerotischen Plaque, Bindegewebzunahme

**Tabelle 1.1:** Klassifizierung atherosklerotischer Läsionen nach der überarbeiteten Einteilung der American Heart Association.<sup>17; 18; 16; 19; 20</sup>

Bezüglich der Pathogenese der Atherosklerose gab es in der Vergangenheit mehrere Erklärungsansätze, aus denen schließlich zwei zentrale Hypothesen hervorgingen. Zum einen die „Response to injury hypothesis“ und zum anderen die „Lipoprotein-induced atherosclerosis hypothesis“.

Die von Ross und Glomset (1973) postulierte „Response to injury“ Hypothese sieht in der Verletzung der Intima die primäre Ursache in der Initiierung des atherosklerotischen Geschehens. Dabei führen sie mehrere Ursachen für die



Schädigung der einzelligen Lage von Endothelzellen auf. Es kann sich bei den schädigenden Noxen um mechanische Verletzungen, biochemische Schädigungen, morphologische Schädigungen, Schädigungen durch bakterielle Toxine, aber auch um den Angriff durch Antigen- Antikörper- Komplexe, um Angriffe durch Viren und um biophysikalische Verletzungen auf molekularer Ebene handeln.<sup>21; 12; 22</sup> In Folge der Gefäßwandverletzung kommt es, vermittelt durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, zur Migration und Proliferation glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima und durch Lipidinfiltration zur Formierung von Schaumzellen in beiden Schichten, was schließlich über einen gewissen Zeitraum zu herdförmigen Gewebsveränderungen, den atherosklerotischen Plaques führt.<sup>21</sup>

Die „Lipoprotein- induced atherosclerosis“ Hypothese, berücksichtigt die wichtige Rolle der oxidativen Modifizierung von LDL durch Makrophagen und ihre darauffolgende Umwandlung in Schaumzellen und sieht die Endothelzellläsion nicht als Hauptursache für die Initiierung der Atherosklerose.<sup>23</sup>

Steinberg et al postulierten 1989 bereits die Prozesse der Lipideinlagerung und der Schaumzellbildung als einen essentiellen Vorgang im atherosklerotischen Geschehen.<sup>24</sup> Wenn der Plasmaspiegel von stark cholesterinhaltigen Molekülen VLDL (very low density lipoprotein) und LDL (low density lipoprotein) einen bestimmten Wert überschreitet, lagern sich diese Lipoproteine in der Gefäßwand ab, wo sie nicht mehr genügend abgebaut werden können und schließlich subendothelial in der Intima akkumulieren.<sup>25</sup> Die modifizierten Lipoproteine bewirken eine Aktivierung der Endothelzellen.

Bezüglich des weiteren Verlaufs der Pathogenese sind sich beide Hypothesen einig. Die aktivierten Endothelzellen exprimieren vermehrt Zelladhäsionsmoleküle, was Leukozyten aus dem Blut veranlasst über das Endothel zu rollen und fest zu adhären.<sup>26; 27</sup>

Angelockt von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen wandern Leukozyten, wie Monozyten und T- Zellen, aus dem Intravasalraum durch das intakte Endothel ins Gewebe, was gleichbedeutend mit dem Anfangsstadium der Atherosklerose, der initialen Läsion (Typ I, Tab. 1.1), ist.<sup>11</sup> Eine, durch die Schaumzellbildung verursachte, Entzündungsreaktion führt zu einem Gewebeumbau

innerhalb der Arterie, aus dem eine bindegewebige Kappe mit einem Lipidkern im Inneren resultiert, was man schon als einen atherosklerotischen Plaque bezeichnet.<sup>22</sup>

Die sogenannten Schaumzellen (engl. Foam cells), die aufgrund ihres schaumigen Aussehens, der im Zytoplasma liegenden Lipid- Tröpfchen, ihren Namen erhielten, entstehen aus ausgewanderten Monozyten. Stimuliert durch den Makrophagen Koloniestimulierenden Faktor (M-CSF) differenzieren sich diese zu Makrophagen und schließlich durch die Aufnahme oxidiertes Lipoproteine zu Schaumzellen.

Diese frühen atherosklerotischen Plaques, die an dieser Stelle auch als Typ II Läsionen (Tab. 1.1) bezeichnet werden, bestehen hauptsächlich aus intimalen Ansammlungen von lipidbeladenen Makrophagen in Form von „Schaumzellbeeten“, aber auch aus aktivierten T-Zellen, dendritischen Zellen, Mastzellen und glatten Muskelzellen. In der Fettfärbung werden die Fettstreifen des Endothels sichtbar, die auch als sogenannte „fatty streaks“ bezeichnet werden. Sie verursachen keine Symptome und können sich zu einem Atherom weiterentwickeln oder wieder verschwinden, sie treten besonders bei jungen Menschen auf.<sup>28</sup>

Antigenpräsentierende Zellen aktivieren die ins Gewebe auswandernden T-Zellen. Dabei kommt es überwiegend zu einer TH1- Zellen abhängigen Immunantwort.<sup>29</sup> Die TH1- Zellen produzieren daraufhin den Tumor- Nekrose- Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und proinflammatorische Zytokine, wie Interferon-  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ).<sup>11</sup> Sogenannte Typ III Läsionen, auch Präatherome (Tab. 1.1) genannt, entstehen dann durch den Untergang von Schaumzellen oder Makrophagen und die darauffolgende Entwicklung extrazellulärer, intimaler Lipidansammlungen. Die fortgeschrittenen Läsionen vom Typ IV, Atherome genannt (Tab. 1.1), bestehen aus einer intimalen Hyperplasie, gebildet aus proliferierenden Muskelzellen und eingewanderten Fibroblasten, was zur weiteren Lumeneinengung führt. Atherome bestehen aus einer lipidreichen Kernregion (Lipid Core, Atheromkern), in der sich Entzündungszellen, Cholesterinkristalle und Schaumzellen befinden, die durch Nekrose oder Apoptose zugrunde gegangen sind und das nekrotische Zentrum des Atheroms ausmachen.<sup>30</sup> An die Kernregion schließt sich nach außen eine fibröse Kappe (fibrous cap) an, die aus extrazellulärer Matrix und glatten Muskelzellen besteht und eine Abgrenzung des Atheroms vom Gefäßlumen darstellt, was eine Thrombozytenadhäsion an der lipidreichen Kernregion verhindert.<sup>29</sup>

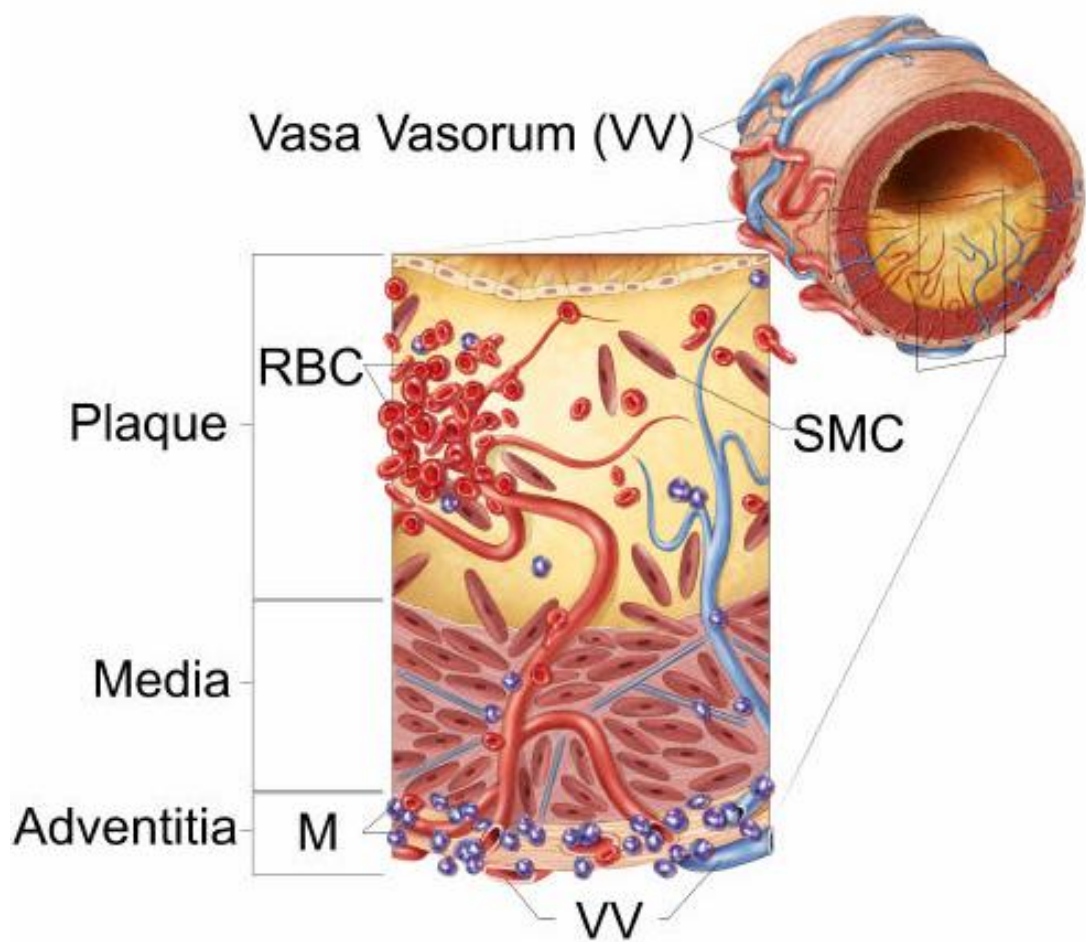
Nach dem das Atherom durch eine fibröse Kapsel abgegrenzt ist, wird dieses Stadium von der AHA als Typ V Läsion (Fibroatherom) bezeichnet (Tab. 1.1). In der Wachstumsregion des atherosklerotischen Plaques, die auch als Schulter bezeichnet wird, und im Bereich zwischen Kernregion und der fibrösen Kappe finden sich enorme Mengen an T- Zellen und Makrophagen.<sup>28; 29</sup> In dieser Region des Plaques befinden sich besonders viele Neutrophile Granulozyten.<sup>31</sup> Zudem besteht das Atherom aus natürlichen T- Killer- Zellen (NTK- Zellen), Mastzellen und wenigen B- Lymphozyten.<sup>32; 33; 29</sup> In diesem Stadium der Atherosklerose können bereits klinische Symptome wie Angina pectoris durch Gefäßeinengungen bestehen. Durch kompensatorische Erweiterungen, die als „vascular remodeling“ bezeichnet (Gefäßwandumbau) werden, können Stenosen bis 40% klinisch unauffällig sein.<sup>34; 35</sup>

In den darauffolgenden Stadien dünnt die fibröse Kapsel immer mehr aus. Nicht die langsame Atheromvergrößerung, vielmehr die Ruptur der fibrösen Kapsel, bedingt durch Fissuren oder Erosionen, löst die meisten kardiovaskulären Ereignisse aus. In Folge der Ruptur kommt das proaggregatorische Lipidmaterial mit dem Blut in Kontakt, worauf es zu einer Freisetzung des Tissue Faktors, einem membrangebundenen Glykoprotein, kommt und die Gerinnungskaskade mit auslöst.<sup>36</sup> Das Glykoprotein stammt wahrscheinlich von, durch Apoptose zugrunde gegangenen, Makrophagen.<sup>37</sup> Zu einer rapiden Läsionsvergrößerung kommt es aufgrund der anschließenden Thrombusbildung, die bis zum kompletten Gefäßverschluss führen kann.<sup>22</sup> Die Menge an Kollagenfasern bestimmt die Dicke und Stabilität der fibrösen Kappe, was wiederum ausschlaggebend für das Risiko einer Plaque- Ruptur ist.<sup>38-40</sup> Faktoren wie TGF-  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), PDGF (platelet derived growth factor) und IL-1 (Interleukin- 1) stimulieren die Kollagenbildung in der Arterienwand über glatte Muskelzellen. Dieser Prozess und die basale Kollagenbildung wird durch das Zytokin IFN  $\gamma$ , gebildet von T- Lymphozyten, gehemmt.<sup>41</sup> Zusätzlich werden von Makrophagen Matrix-degradierende Moleküle, die Matrix- Metalloproteinasen, gebildet, die die Kollagenfasern degradieren.<sup>42; 43</sup> Daher wirkt sich die Makrophagen- und T- Zellen-Anzahl in der Läsion negativ, der Kollagenfasergehalt und der Gehalt an glatten Muskelzellen sich positiv auf die Stabilität eines atherosklerotischen Plaques aus.

Nach der AHA spricht man ab dem Läsionstyp VI (Tab. 1.1) von sogenannten „vulnerablen“ Risikoplaques („plaques prone to rupture“) oder auch von den komplizierten Läsionen, weil jetzt ein erhöhtes Risiko für Plaquerupturen und hämorrhagische Einblutungen (Abb. 1.1) mit Aktivierung der Gerinnungskaskade besteht.<sup>44</sup> Bei den Läsionen vom Typ VIa entstehen Rupturen, wie Risse und Fissuren an der Plaqueeoberfläche. Bei Typ VI b entstehen daraufhin sekundär an der Oberfläche Hämatome und Hämorrhagien. Thromben entwickeln sich dann im Typ VI c Stadium. Alle Läsionen vom Typ VI neigen zu Rissen an der Oberfläche, besonders an Stellen, an denen viele Makrophagen bzw. Schaumzellen zu finden sind. Die Läsion wird also instabil, was ab dem Läsionstyp VI der Fall ist, wenn sie viele Makrophagen enthält und damit einen hohen Anteil an Lipiden im Atheromkern enthält und die Plaqueschulter, also die fibröse Kapsel, dünn ist.<sup>45</sup>

Kalzifizierte Läsionen vom Typ VII (Tab. 1.1) weisen die Kriterien einer V Läsion auf. Charakteristisch für dieses Stadium der Atherosklerose sind jedoch kalzifizierte, Areale, sogenannte Kalkspangen, die sich als mineralisierte Matrix an die Stelle des Atheromkerns setzen können. Klinisch manifestiert sich dieses Stadium zum Beispiel als eine stabile Angina pectoris, da die Plaques zwar zu einer Stenosierung des Gefäßlumens führen, jedoch die Gefahr der Ruptur nicht so ausgeprägt ist wie bei einer frühen Läsion.

Typ VIII Läsionen (Tab. 1.1) stellen einen fibrotischen Umbau der intimalen Hyperplasie dar. Nach einer Plaqueruptur wird dieser aktiv- degenerative Prozess als Umbauvorgang beschrieben. Innerhalb dieser Läsionen findet man kaum Zellen und Ablagerungen von Lipiden, jedoch viel Bindegewebe.<sup>14:20</sup>



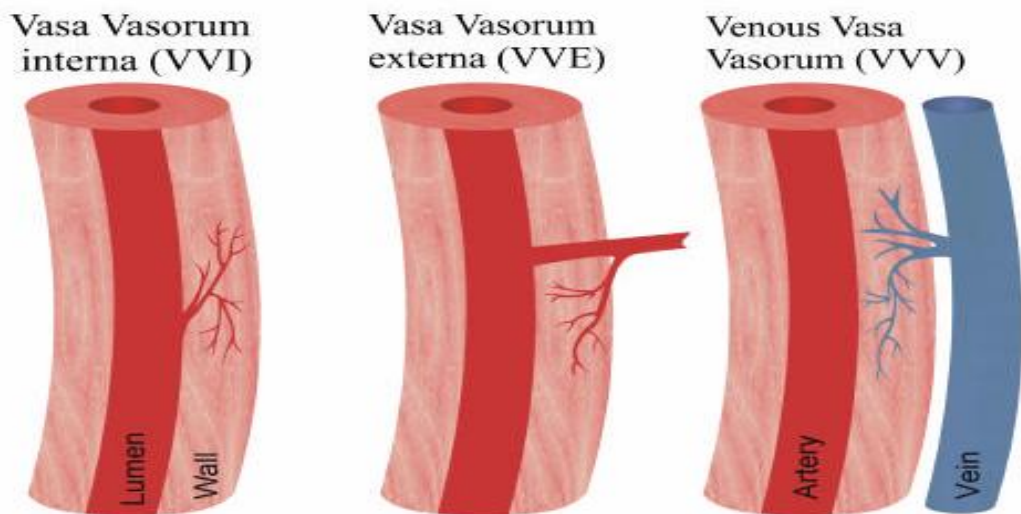
*Abbildung 1.1: Adventitielle VV Neovaskularisierung mit resultierender Intraplaquehämorrhagie durch inkompetente, neugebildete Gefäße im atherosklerotischen Plaque. (Langheinrich AC et al. Thrombosis and Haemostasis. 2007)  
RBC=Red Blood Cells; SMC=Smooth Muscle Cells; M=Monocytic Cells*

## 1.2 Vasa Vasorum

Arterien, die einen Durchmesser von über 2mm aufweisen, besitzen in ihrer Adventitia und äußeren Media ein Netz kleiner Blutgefäße, die sogenannten Vasa vasorum (VV, „Gefäße der Gefäße“). An der Grenze zur Media verdichten sich die VV zu einem Kapillarnetz, welches die äußeren Mediaschichten mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Die innere Schicht der Tunica media wird hingegen vom Arterienlumen aus, durch Diffusion aus dem Blut, durch das Endothel ernährt. In den größeren Arterien vom muskulären Typ (Aa. myotypicae), bei denen die Media über 0,3mm dick ist, dringen Kapillaren in die äußeren Mediaschichten ein. Hier liegen die VV in Gefäßkanälen, die von elastischen Netzen umgeben sind. In Arterien vom elastischen Typ (Aa. elastotypicae) ist die gefäßfreie Mediazone 0,3mm breit (30

Lammelleneinheiten). Über venöse VV ist der venöse Abstrom gewährleistet. Die Entwicklung der VV findet beim Mensch schon in der Embryonalphase statt. Anhand der Studie von Kwon et al über die Visualisierung der dreidimensionalen, räumlichen Struktur der VV mittels Mikro-CT-Technologie wurde eine Klassifikation der VV (Abb. 1.2) erstellt.<sup>46-48</sup>

Man kann die VV in Vasa vasorum interna (VVI), Vasa vasorum externa (VVE) und die venösen Vasa vasorum unterteilen (Abb. 1.2). Die VVE (Abb. 1.2), die ihren Ursprung in kleineren, sekundären Gefäßen haben, teilen sich zirkulär in der Adventitia, umgeben das Hauptlumen und formieren sich zu bogenförmigen Arteriolen bis hin zu Kapillaren (VV 2.Ordnung). Die VVI (Abb. 1.2), die in gleichmäßigen Abständen von Verzweigungsstellen der Hauptgefäße entspringen, verlaufen in Längsrichtung am Gefäß (VV 1. Ordnung). Über die VVV (Abb. 1.2) erfolgt die Drainage des Blutes aus den arteriellen Gefäßwänden in begleitende Venen.<sup>49</sup>



**Abbildung 1.2:** Klassifikation der VV nach Kwon et al J Clin Invest 1998<sup>48</sup>

Besonders die großkalibrigen Gefäße oder auch diejenigen, die eine luminale Diffusionsstörung aufweisen, sind auf eine hohe Nähr- und Sauerstoffversorgung aus den adventitiellen VV angewiesen.<sup>47; 50; 51</sup>

Gerade bei Geweben, die sich im Wachstum befinden, wird die lokale Angiogenese über regulierende Faktoren, wie dem Sauerstoff und der Hypoxie, gesteuert.<sup>52; 53</sup> In

humanpathogenetischen und experimentellen Studien konnte die gesteigerte Anzahl an adventitiellen VV bei atherosklerotisch veränderten Gefäßen, besonders bei denjenigen mit fortgeschrittenen Läsionen festgestellt werden.<sup>54-57</sup> Die atherosklerotische Plaqueauflagerung, die eine Hypoxie verursacht und der damit verbundene Sauerstoff- Versorgungsmangel der Gefäßwand, erfordern den Ausgleich der Sauerstoffschuld. In Folge wird die Diffusion von Sauerstoff vom Gefäßlumen aus entweder erschwert oder ist gar nicht mehr möglich. Als Gegenregulation dient die Ausschüttung angiogenetischer Faktoren, die zu einer erhöhten Bildung von adventitiellen VV führen, die wiederum die Versorgung der Media mit Sauerstoff sicherstellt.<sup>48</sup> Die aussprossenden VV verzweigen sich zunächst in der Adventitia, um dann durch die Media hindurch zur atherosklerotischen Läsion zu gelangen. Hier dienen sie dem Ausgleich des, von der Intimahyperplasie ausgehenden, erhöhten Nährstoff- und Sauerstoffbedarfs.<sup>58</sup> Es konnte gezeigt werden, dass durch die Unterbrechung der Blutversorgung durch VV, beispielsweise provoziert durch eine Kompression der Adventitia, eine Hypoxie in der Gefäßwand ausgelöst werden kann und darüber hinaus atherosklerotische Läsionen entstehen können.<sup>59; 60</sup> Die Neovaskularisation innerhalb atherosklerotischer Läsionen wurde bereits in zahlreichen Studien analysiert und belegt, wie zum Beispiel von Heistad et al. Sie konnten unter Hypercholesterinämie einen erhöhten Blutfluss in Gefäßabschnitten mit atherosklerotischen Läsionen nachweisen.<sup>50</sup> In der Studie von Barger et al konnte in humanen Koronararterien, die atherosklerotische Läsionen aufwiesen, ein ausgeprägtes adventitielles Gefäßnetzwerk von VV festgestellt werden.<sup>55</sup> Das gesteigerte Luminal- und Durchflussvolumen in Koronargefäßen mit atherosklerotischen Läsionen deutet auf Neovaskularisation in Form von VV hin. Diese Tatsache wird auch durch die Studie von Virmani et al, die auf die Verknüpfung zwischen atherosklerotischen Veränderungen, der Neoangiogenese, chronischer Inflammation und Granulationsgewebe eingeht, unterstrichen.<sup>61</sup> Aufgrund der gesteigerten Einwanderung von T-Lymphozyten und Makrophagen kommt es zu chronisch, immunologisch vermittelten Entzündungsvorgängen. Die Arbeitsgruppe von Moulton et al beschreibt, dass die Neoangiogenese der VV weniger von der Größe der Plaqueoberfläche als vielmehr von inflammatorischen Vorgängen beeinflusst wird und dass die neu entstandenen Gefäße zum Transport der Entzündungszellen dienen, die destruirenden Einfluss auf die medialen und

intimalen Gefäßschichten haben.<sup>62</sup> Den Zusammenhang zwischen der chronischen, immunologischen Inflammation innerhalb der Gefäße und der Neovaskularisation beschreiben auch Moreno et al.<sup>63</sup> In Folge der Ansammlung von infiltrierenden, inflammatorischen Zellen, wie Makrophagen, Zellresten und proliferierenden, glatten Muskelzellen kommt es zur Freisetzung zellulärer und humoraler Botenstoffe, die die Neoangiogenese adventitieller VV initiieren. Die Tatsache, dass Entzündungszellen, wie aktivierte T-Lymphozyten und Makrophagen, über die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (z.B. Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) und Zytokinen zu einer Vermehrung von VV führen, wird auch in den Arbeiten von Hansson et al und O' Brien et al belegt.<sup>64; 65</sup>

Mit Hilfe des antiinflammatorischen und antiproliferativen Wirkstoffes 3-Deazaadenosin (c(3)Ado) konnten Langheinrich et al 2009 im Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel- Knockout Maus eine Abnahme der VV Neovaskularisation sowie der atherosklerotischen Plaquefläche, im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der Verumgruppe beobachten. 3-Deazaadenosin weist somit eine antiangiogenetische Wirkung auf.<sup>66</sup> Ein ausschlaggebender Faktor des inflammatorischen Geschehens ist das Zytokin TNF- $\alpha$ . Nach der Verabreichung von 3-Deazaadenosin konnte eine Senkung der TNF- $\alpha$  Konzentration im Blut der Mäuse beobachtet werden. Die Reduzierung der TNF- $\alpha$  Konzentration hatte eine verminderte Expression an interzellulären (Inter- Cellular Adhesion Molecule 1, ICAM1) und vaskulären (Vascular Cell Adhesion Molecule 1, VCAM1) Adhäsionsmolekülen, über welche einwandernde Leukozyten an Endothelzellen binden und zum inflammatorischen Geschehen beitragen, zur Folge.<sup>67</sup> Langheinrich et al erzielten diese Herunterregulation von ICAM1 und VCAM1 ebenfalls mit Hilfe von 3-Deazaadenosin.<sup>68</sup>

Kwon et al führten Studien unter experimenteller Hypercholesterinämie durch.<sup>48</sup> Anhand der Untersuchung adventitieller Gefäßnetzwerke von VV in anfänglichen Stadien der Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass die Volumenzunahme der VVE (VV 2.Ordnung, Abb. 1.2) noch vor der Bildung atherosklerotischer Plaques stattfindet. Man kann also davon ausgehen, dass durch die Reaktion auf die zunehmende Hypoxie der Gefäßwand, die adventitielle Neoangiogenese von VVE noch vor der eigentlichen Bildung von Gefäßläsionen beginnt. Ergänzende Theorien



bezüglich der Ursache der Neoangiogenese von VV kommen von der Arbeitsgruppe um A. Lerman und Erik L. Ritman. Sie geben zum einen als auslösenden Faktor Tonusschwankungen in muskulären Gefäßwandabschnitten und Kompressionskräfte in der Gefäßwand an. Zudem soll es stimuliert durch Zytokine, die sich in der Arterienwand durch Lipidansammlungen, Hypertonie, ausgetretene Blutprodukte (z.B. entzündliche Produkte, rote Blutkörperchen, Makrophagen) und Hypercholesterinämie ansammeln und als Folge von pharmakologischen Stimuli zur Neovaskularisation in der Adventitia kommen.<sup>69</sup> Die Studien von Fleiner et al identifizieren zwei weitere angiogene Faktoren im Zusammenhang mit der Pathogenese der Atherosklerose. Sie fanden heraus, dass die Neovaskularisation die Folge der intimalen Hyperplasie und der damit einhergehenden Nährstoffminderversorgung sei. Trotz weiteren Plaquewachstums ist somit die Versorgung der Gefäßwand weiterhin gewährleistet. Außerdem zeigten sie, dass gerade bei Patienten die an Diabetes mellitus leiden, ein dichtes Gefäßnetzwerk aus adventitiellen VV in frühen atherosklerotischen Läsionen der intimalen Hyperplasie vorausgeht.<sup>54</sup> Studien an Mäusen konnten zeigen, dass atherosklerotisches Plaquewachstum auch reversibel beeinflusst werden kann. Mit Hilfe des Pharmakons Angiostatin hemmte man die Angiogenese der VV, woraufhin das Plaquewachstum stagnierte und sogar vermindert werden konnte.<sup>62</sup>

### **1.3 Thalidomid**

#### *1.3.1 Geschichte des Thalidomids- Der Contergan Skandal*

Thalidomid wurde von der deutschen Pharmafirma Chemie- Grünenthal in Aachen im Jahre 1954 entwickelt.<sup>70</sup> Im Oktober 1957 wurde es unter dem Handelsnamen Contergan<sup>®</sup> als Nicht- Barbituratschlafmittel mit antiemetischen Eigenschaften für den Handel zugelassen und löste wenige Jahre später durch seine teratogene Wirkung einen Pharmaskandal aus.<sup>71; 72</sup> In klinischen Studien mit menschlichen Probanden und auch in Tierversuchen an Nagetieren konnte man keine Nebenwirkungen feststellen, so dass der Wirkstoff als zweifelsfrei sicher eingestuft wurde und zu diesem Zeitpunkt als ein Beruhigungsmittel mit geringer Toxizität gehandelt wurde.<sup>73; 74</sup>

Am 1. Oktober 1957 wurde Thalidomid dann zur rezeptfreien Abgabe für den Handel freigegeben. Ein gesetzliches Medikamenten- Zulassungsverfahren existierte zu dieser Zeit nicht. In den Jahren von 1957 bis 1961 nahmen 5 Millionen Menschen in insgesamt 48 Ländern das Medikament ein.<sup>74; 71</sup> Der deutsche Arzt Widukind Lenz (1962) und der australische Arzt William McBride (1961) stellten unabhängig voneinander den Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Teratogenität und der Verabreichung von Thalidomid fest, so dass der Wirkstoff Ende 1961 vom Arzneimittelmarkt genommen wurde.<sup>71</sup> Es konnte schließlich festgestellt werden, dass es unter der Einnahme von Thalidomid in einem bestimmten Abschnitt der Schwangerschaft zu fetalen Missbildungen der inneren Organe und der Extremitäten, der sogenannten „Phokomelie“, gekommen ist. Man fand heraus, dass schon die Einnahme einer einzigen Tablette im Zeitraum von der 4.-6. Schwangerschaftswoche, also innerhalb des 1. Trimenons, zu Fehlbildungen führte.<sup>74</sup> 40% der betroffenen Neugeborenen verstarben noch während des ersten Lebensjahres.<sup>72; 75</sup> Nach der Rücknahme des Medikaments vom Markt offenbarte sich das ganze Ausmaß der Katastrophe. Dem Schlafmittel Contergan<sup>®</sup> fielen weltweit 8.000-12.000 Kinder zum Opfer, die mit den unterschiedlichsten kongenitalen Fehlbildungen, vor allem aber mit Missbildungen der Gliedmaßen, zur Welt kamen. In Deutschland waren etwa 4.000 Kinder betroffen von denen 2.800 überleben konnten.<sup>74; 76; 77</sup>

### *1.3.2 Die Renaissance von Thalidomid*

Nach dem Contergan- Skandal in den 60er Jahren gilt Thalidomid heute als ein höchst potenter Wirkstoff, der trotz jahrelanger fehlender Zulassung nie vollkommen aus der Medizin verschwand und eine enorme Anwendungsbandbreite generiert. Derzeit ist der Wirkstoff nur bei wenigen Indikationen unter strengsten Auflagen verfügbar.

Schon im Jahre 1964, also nur 3 Jahre nach der Marktrücknahme von Thalidomid, fand der israelische Arzt J. Sheskin heraus, dass der Wirkstoff Heilung beim Erythema nodosum leprosum, eines an Lepra erkrankten Patienten, versprach.<sup>78</sup> In einer klinischen Studie der WHO konnte die Wirksamkeit von Thalidomid bei Leprakranken bestätigt werden, so dass es kurz darauf als wirksames Medikament

gegen die Sekundärkomplikation von Lepra, dem Erythema nodosum leprosum, von der WHO in Entwicklungsländern eingesetzt wurde.<sup>79; 74</sup>

Der antikanzerogene Effekt von Thalidomid wurde bereits in den 60er Jahren von Wissenschaftlern verfolgt, aufgrund des Contergan- Skandals wurden diese Untersuchungen jedoch bald wieder aufgegeben.<sup>80; 81</sup>

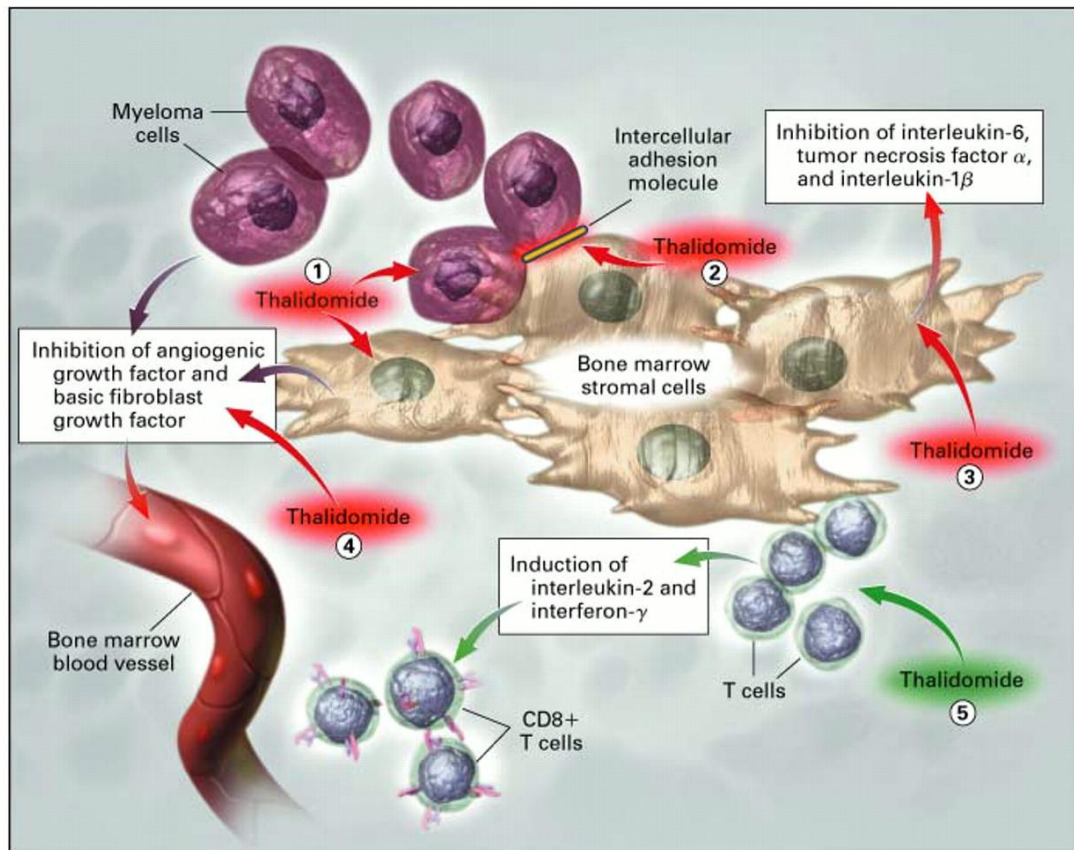
Erst 20 Jahre nach der Zufallsentdeckung des Wirkstoffes konnten die positiven Wirkungsprinzipien, des bis dato so verschrieenen Arzneimittels, entschlüsselt werden. Man fand heraus, dass Thalidomid mit seinen immunsuppressiven und antiangiogenetischen Eigenschaften (Abb. 1.3) zahlreiche Einsatzmöglichkeiten in der Therapie der unterschiedlichsten Erkrankungen ermöglicht.<sup>82</sup> Thalidomid ist ein Immunmodulator und zeigt Wirkung gegen Zytokine, Integrine und die Angiogenese (Abb. 1.3).<sup>83</sup> Der Wirkstoff inhibiert die Chemotaxis von Monozyten und Neutrophilen, indem es die Expression von Adhäsionsmolekülen und Integrinen, welche für die Leukozytenmigration verantwortlich sind, hemmt.<sup>84</sup> Auf T-Lymphozyten wirkt Thalidomid kostimulatorisch, indem es zu einer erhöhten Produktion an IL- 2 und IFN-  $\gamma$  führt.<sup>85</sup> Die Erkenntnisse über diese zwei prognostisch wichtigen Zytokine spielen vor allem in der Onkologie eine große Rolle.<sup>86</sup> In Monozyten blockiert es dosisabhängig, partiell und selektiv die Synthese des inflammatorisch wirkenden Zytokins TNF-  $\alpha$ .

TNF-  $\alpha$  ist für die Immunantwort, die Pathogenese von Infektionen und Autoimmunerkrankungen verantwortlich.<sup>87</sup> Erhöhte Werte von TNF  $\alpha$  wie zum Beispiel beim Endotoxin- induzierten Schock müssen mit der Hemmung der Zytokinproduktion behandelt werden.<sup>88</sup> Thalidomid hat über den inhibierenden Einfluss auf TNF-  $\alpha$  eine regulative Funktion in der Immunmodulation und im Entzündungsgeschehen.

Die Arbeitsgruppe von D'Amato et al zeigte 1994 erstmalig wieso es unter Thalidomideinnahme der schwangeren Mütter zu Missbildungen von Extremitäten bei den Neugeborenen kam. Sie demonstrierten in vivo am Kaninchen die antiangiogenetischen Eigenschaften des Wirkstoffes. Nach oraler Gabe kam es zu einer Hemmung der Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)- induzierten Vaskularisierung im Kornealbereich.<sup>89</sup>

Die Angiogenese spielt eine wichtige Rolle in physiologischen sowie in pathologischen Vorgängen. Sie initiiert das Wachstum des Follikels in der Embryogenese, ist aber auch die Ursache für das Wachstum von Neoplasien, atherosklerotischen Läsionen oder der Erblindung durch eine Retinopathie. Ausgelöst durch eine Gewebsminderperfusion, wie man sie im Fall von Neoplasien und atherosklerotischen Plaques beobachten kann, wird eine Hypoxie induziert, die anschließend zur Ausschüttung von Stimulatoren der Angiogenese führt, wie zum Beispiel dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), dem Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), dem Fibroblast Growth Factor (FGF) oder dem Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Sie induzieren die Neubildung von Gefäßen. Faktoren, die die Gefäßneubildung hingegen hemmen sind zum Beispiel Protease-Inhibitoren, Metalloproteinasen, Plasminogen-Fragment, Angiostatin und Thalidomid.<sup>90</sup> Man geht davon aus, dass Thalidomid die vaskulären Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF<sup>91</sup> inhibieren und Adhäsionsrezeptoren, welche die Angiogenese und die Immunsuppression regulieren, wie Selectine und  $\beta$ -Integrine, modulieren kann.<sup>92: 89: 93</sup> Desweiteren beeinflusst Thalidomid Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen, Leukozyten und Lymphozyten.<sup>92</sup>

Aus diesen Erkenntnissen heraus wurde Thalidomid nun in den darauf folgenden Jahren erfolgreich als antiinflammatorisches, antineoplastisches und antiangiogenetisches Arzneimittel eingesetzt (Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3:** Wirkungsmechanismen des Thalidomids.<sup>94</sup>

1. Antineoplastischer Effekt; 2. Modulierender Einfluss auf Adhäsionsmoleküle;
3. Antiinflammatorischer Effekt; 4. Antiangiogenetische Wirkung; 5. Einsatz als Immunmodulator

Die eigentliche Ursache weshalb es zu den kongenitalen Fehlbildungen kam, nämlich die Hemmung der Angiogenese, wird heute in der Tumorthherapie genutzt.<sup>95</sup> Die Arbeitsgruppe von Hwu et al konnte in ihren Studien experimentelles Melanomwachstum durch Thalidomidgabe hemmen.<sup>96</sup> Auch Bauer et al zeigten in ihren Arbeiten mit Mäusemodellen, dass man über die Hemmung der Angiogenese mittels Thalidomid das Wachstum von Malignomen und ihren Metastasen aufhalten kann.<sup>97</sup> Tumore, die eine gewisse Größe in ihrer Wachstumsphase überschreiten, sind auf die Neovaskularisation angewiesen, um Sauerstoff und Nährstoffe in hohem Maße zu generieren.<sup>98</sup> Thalidomid hemmt die Neubildung der Blutgefäße, weshalb es zur Unterdrückung neoplastischen Wachstums dient und in der Onkologie zur Behandlung von zahlreichen soliden und hämatologischen Krebserkrankungen

eingesetzt wird.<sup>99; 100</sup> Thalidomid ist heute nicht mehr wegzudenken aus der Therapie des multiplen Myeloms, eine besonders aggressive Form des Knochenmarkkrebses. Durch die Hemmung der Angiogenese über die Blockade angiogenetischer Zytokine und durch die direkte oxidativ vermittelte DNA- Schädigung von Knochenmarks- und Tumorstromazellen greift der Wirkstoff hemmend in das Tumorwachstum ein.<sup>89; 101; 102</sup> Darüber hinaus bewirkt Thalidomid die direkte Apoptose von Myelomzellen.<sup>103</sup>

Auch wird der Wirkstoff zur Therapie unterschiedlicher Autoimmunerkrankungen<sup>104</sup>, wie dem systemischen Lupus erythematoses, der rheumatoiden Arthritis, dem Sjögren-Syndrom, bei Multipler- Sklerose, bei Morbus Crohn, dem Behçet- Syndrom sowie zur Therapie von der Graft versus Host- Reaktion, einer chronischen Abstoßungsreaktion, nach allogener Knochenmarkstransplantation, verwendet.<sup>105-109</sup> Desweiteren wird Thalidomid auch bei der Behandlung von Juckreiz, zur Besserung paraneoplastischen Schwitzens und zur Vorbeugung einer Irinotecan- induzierten Diarrhoe eingesetzt.<sup>110; 111</sup>

Der antiangiogenetische Effekt des Wirkstoffes wird ebenfalls in der Behandlung von Diabetes Patienten genutzt, die meist durch krankhaftes Gefäßwachstum im Auge erblinden.<sup>112</sup> Auch in der Therapie des mit HIV assoziierten Kaposi- Sarkoms wird Thalidomid eingesetzt.<sup>113</sup> Zudem kann das Medikament für die Behandlung von Mundschleimhautulzerationen, den sogenannten Aphten, eingesetzt werden.<sup>114</sup> Und auch bei dem im Zusammenhang mit HIV- Infektionen stehenden Wasting- Syndrom wird es eingesetzt.<sup>115</sup>

In den letzten Jahren untersuchten zahlreiche Arbeitsgruppen den Zusammenhang zwischen der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen und der Neoangiogenese von VV innerhalb von Plaques. Gössl et al erforschten im Jahre 2009 diese Abhängigkeit unter dem Einsatz von Thalidomid. Sie konnten belegen, dass die Neovaskularisation innerhalb der atherosklerotischen Pathogenese eine Schlüsselrolle im proinflammatorischen Geschehen spielt und untersuchten die antiangiogenetische Wirkung von Thalidomid an Schweinen, welche unter einer cholesterin- und fettreichen Experimentaldiät, atherosklerotische Läsionen entwickelt hatten. Für drei Monate bekam die Verumgruppe täglich 200mg Thalidomid verabreicht. Anschließend wurden die vaskulären Gewebeproben im Mikro- CT untersucht. Es

stellte sich heraus, dass es unter der Gabe von Thalidomid in frühen atherosklerotischen Läsionen zu einer Abnahme der Plaqueneovaskularisation und damit der Plaquegröße gekommen war.<sup>116</sup>

Die Arbeitsgruppe von Chew et al verursachte die Progression atherosklerotischen Plaquewachstums durch die inflammatorische Komponente zu beeinflussen.

Mit Hilfe des Wirkstoffes Thalidomid hemmten sie die TNF-  $\alpha$  Produktion im Tiermodell der Apolipoprotein E (ApoE) - defizienten Maus, worauf man in Folge die Inhibition atherosklerotischen Plaquewachstums beobachten konnte.<sup>117</sup>

In Ländern wie der Türkei, Israel, Neuseeland oder Australien ist Thalidomid als Arzneimittel zugelassen. Weltweit haben seit dem Wiederaufkommen des Wirkstoffes Thalidomid über 100.000 Patienten das Arzneimittel zu sich genommen. Den Großteil der Konsumenten machen dabei die an einem multiplen Myelom erkrankten Patienten aus.<sup>118</sup> In Deutschland ist zur Zeit kein Fertigarzneimittel, welches Thalidomid enthält, auf dem Markt zugelassen. Nach § 73.3 AMG darf Thalidomid auf Nachfrage nach Deutschland importiert werden.

Die Ärzte, welche in Deutschland mit Thalidomid therapieren, bekommen es von der Firma Pharmion seit 2003 und seit 2009 von der Firma Celegne gestellt. Über die in London bei der European Medicines Evaluation Agency (EMA) beantragte Zulassung von Thalidomid für das Erythema nodosum leprosum und das Multiple Myelom ist noch nicht entschieden, so dass die Anwendung eines Thalidomid-haltigen Arzneimittels in persönlicher Verantwortung des Arztes erfolgt. (Bekanntmachung des Bundesinstituts für Arzneimittel & Medizinprodukte zu Thalidomid-haltigen Arzneimittel, Januar 2004) Eine zukünftige Zulassung wird wahrscheinlich nur unter der Einhaltung bestimmter Risikominimierungsrichtlinien („Pharmion Risk Management Programm“ ) zu realisieren sein, die bereits von Pharmion und EMA festgelegt wurden. Nur unter der Berücksichtigung dieser Richtlinien, wie zum Beispiel die Registrierung des Arztes, des Apothekers und des Patienten in einem Sicherheitsprogramm, die Beratung bezüglich der Empfängnisverhütung, wie dem Einsatz zweier unterschiedlich wirkender kontrazeptiver Mittel bei Frauen im gebärfähigen Alter, darf Thalidomid im jeweiligen Heilversuch eingesetzt werden. (Verschreibungsinformation zu Thalidomid, Pharmion, Compassionate Use, version 2, 6. Juni 2003) Auch das

Deutsche Ärzteblatt betont in einer Veröffentlichung, dass durch die bereits bekannten Risiken von Thalidomid, besonders die Teratogenität, die Abgabe des Wirkstoffes nur unter den höchsten Sicherheitsvorkehrungen erfolgen darf. (Bundesärztekammer, 2004)

### *1.3.3 Nebenwirkungen von Thalidomid*

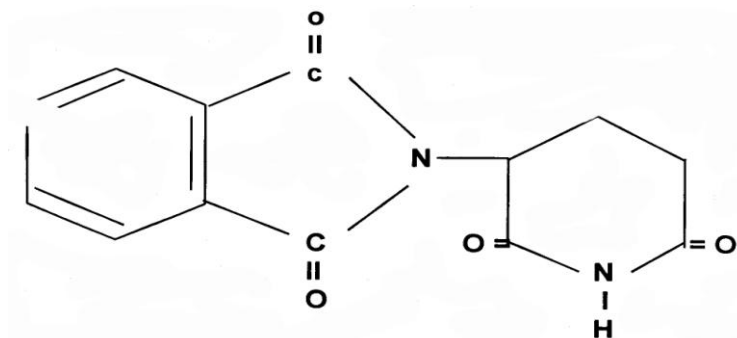
Der Contergan- Skandal Anfang der 60er Jahre deckte die wohl bekannteste und gut erforschte Nebenwirkung, die Teratogenität, auf.<sup>88</sup> Eine weitere gut dokumentierte Nebenwirkung, die am häufigsten zum Therapieabbruch führt, ist das Auftreten von Neuropathien. Es löst an den Axonen sensorischer Nervenfasern, unter Schonung der Myelinscheide, an unteren und oberen Extremitäten eine Degeneration aus. Es kommt dabei zu einer Abnahme der myelinisierten und zu einer Zunahme der unmyelinisierten Fasern.<sup>119</sup> Ab Dosen von 2,8g traten bereits Neuropathien auf. Sie sind in bis zu 30% der Fälle zu beobachten. Die Häufigkeit für das Auftreten von Neuropathien steigt mit zunehmender Dosis an und ist zum Teil irreversibel.<sup>119; 120</sup>

Als Symptome der Neuropathie traten Muskelkrämpfe in den Beinen, Parästhesie, Taubheit und Hyperästhesie für Schmerz und Temperatur an Füßen und Händen, unabhängig vom Alter, auf.<sup>121</sup> Wenn eine symptomatische Neuropathie diagnostiziert wurde, sollte man um eine Chronifizierung zu verhindern, das Medikament umgehend absetzen.<sup>120; 121</sup> 10- 20% der Patienten klinischer Studien setzen Thalidomid aufgrund von Nebenwirkungen wie Benommenheit, peripherer Neuropathie und Exanthemen ab.<sup>122; 123</sup> Bei höherer Dosierung werden Delir, Schwindel, Müdigkeit und Kopfschmerzen beschrieben.<sup>124</sup> Die häufigsten Nebenwirkungen sind dosisabhängiger Schwindel und Somnolenz.<sup>125</sup> Der Schwindel steht mit der hypertensiven Wirkung von Thalidomid im Zusammenhang und kann durch viel Flüssigkeit und ein langsames Aufrichten aus dem Liegen reduziert werden.<sup>86</sup> Desweiteren werden Bradykardie, Obstipation, ein verändertes Temperaturempfinden, Ödeme, gastrointestinale Beschwerden, Infektionsneigung, unregelmäßige Menstruationszyklen,<sup>99; 124</sup> tiefe Beinvenenthrombosen, periphere Neuropathien, Tremor, Stimmungsveränderungen, Exantheme, Xerostomie, Juckreiz, Fieber, Depressionen, Leberfunktionsstörungen und Hypothyreodismus im Zusammenhang mit der Thalidomid- Einnahme beschrieben.<sup>105; 126; 127</sup>



Aufgrund dieser Nebenwirkungen darf Thalidomid nur in reduzierten Dosen verabreicht werden. Zu betonen ist die Tatsache, dass die meisten Patienten die Nebenwirkungen durchaus tolerieren. Meist sind die unerwünschten Wirkungen nur mäßig und sprechen gut auf die Reduktion der Dosis an.<sup>127; 128</sup> In den 60er Jahren diente Thalidomid als Sedativum, was heute eine unerwünschte Wirkung darstellt. Deshalb bekommen die Patienten das Arzneimittel bevorzugt am Abend verabreicht.<sup>126</sup> Gegenüber dem sedativen Effekt von Thalidomid entwickeln die Patienten eine Toleranz.<sup>86</sup> Bei Schwangeren und stillenden Müttern, sowie bei sexuell aktiven Frauen und Männern, die keine Verhütung betreiben und für Patienten mit bereits bekannter Überempfindlichkeit gegenüber Thalidomid besteht eine Kontraindikation für die Verabreichung des Wirkstoffes. (Verschreibungsinformation zu Thalidomid Pharmion, Compassionate Use, Version 2, 6. Juni 2003)

#### 1.3.4 Pharmakokinetik von Thalidomid



**Abbildung 1.4:** Thalidomid- Struktur

Thalidomid (N- α- Phthalimidoglutarimid) gehört zur Gruppe der Piperidindione, eine strukturelle Abwandlung der Barbiturate. Thalidomid ist eine chirale Verbindung und liegt als racemische Mischung aus einem (-)-S- Enantiomer und einem (+)-R-Enantiomer vor.<sup>126; 129</sup>

Eine Zeit lang nahm man an, dass nur das S-Enantiomer teratogen wirkt und dass das R-Enantiomer für die sedierende Wirkung verantwortlich ist.<sup>130</sup> Studien konnten diese Annahme nicht belegen.<sup>76</sup> Nach der jeweiligen Applikation von nur eines der beiden Enantiomere findet im Blutplasma durch die Razemisierung eine rapide

Umwandlung zwischen beiden Enantiomeren statt, sodass beide Formen präsent sind (Razemisierungsgeschwindigkeit  $t_{1/2}=2,25$  Stunden). Es stellt sich schließlich ein Gleichgewicht von ungefähr 1:1,7 ein. Eine beruhigende oder teratogene Wirkung kann man deshalb nicht einem der zwei Enantiomere zu ordnen.<sup>73</sup> Es ist Tatsache, dass die Contergan- Katastrophe durch die Gabe eines reinen R- Enantiomers nicht verhindert hätte werden können. Neue Studien beschäftigen sich nun mit der Herstellung eines konfigurationsstabilen Thalidomid Analogons. Mit ihm soll es möglich sein die zwei Enantiomere getrennt auf ihre Eigenschaften bezüglich Teratogenität und Sedation analysieren zu können.<sup>131</sup>

Im Organismus wird Thalidomid durch eine spontane nicht- enzymatische Hydrolyse zu 12 Hydrolyseprodukten metabolisiert und entweder über den Urin eliminiert oder die nicht absorbierten Bestandteile mit dem Faeces ausgeschieden.<sup>132-135</sup> Der genaue Metabolismus und die Pharmakokinetik von Thalidomid sind jedoch noch nicht hinreichend bekannt und scheinen individuellen Abweichungen zu unterliegen.<sup>77; 126</sup> Es verteilt sich zwar in Organen und Geweben und weist eine hohe Plasmaproteinbindungsrate auf, jedoch ist die gastrointestinale Absorption mit einem Mittelwert von 4 Stunden insgesamt sehr langsam.<sup>77; 129; 136; 137</sup>

Die kaum vorhandene Wasserlöslichkeit (50µg/ml) und die hydrolytische Instabilität macht eine intravenöse Applikation des Wirkstoffes unmöglich, weshalb es in Kapseln und Tabletten klinisch dargeboten wird.<sup>73; 126</sup>

## **1.4 Tiermodell**

Zur Erforschung polygenetischer Krankheitsbilder und ihrer komplexen Mechanismen, wie der Atherosklerose, kommen heute Tiermodelle zum Einsatz. In-vitro- Verfahren reichen hierfür alleine nicht aus. In der Vergangenheit griff man in der Atherosklerose- Forschung auf größere Tiere wie Schweine, Kaninchen oder Primaten zurück. Als Problem stellt sich jedoch die zeit- und kostenintensive Haltung sowie die genetische Varianz heraus, weshalb man heute meist Mausmodelle in der Forschung einsetzt.

Mäuse haben eine reduzierte genetische Variabilität und pflanzen sich schnell fort.<sup>138; 139</sup> Durch gezielte Eingriffe in die Genetik der Mäuse konnte man verschiedene Modelle entwickeln, wie die LDL- Rezeptor- defiziente Maus (LDL<sup>-/-</sup>-

Maus), die ApoE- defiziente Maus (ApoE<sup>-/-</sup>-Maus) oder die Kombination aus beiden, die ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Maus, die bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen dem Mensch sehr ähnlich ist.<sup>140; 141</sup>

Das Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel- Knockout Maus ist ein gut validiertes und international eingesetztes Mausmodell zur Erforschung der Pathogenese der Atherosklerose.<sup>142</sup> ApoE- defizient bedeutet, dass hier eine Blockade der Apolipoprotein E- Synthese vorliegt. Dieses Protein stellt einen höchst affinen Liganden für Lipoproteinartikel dar, beteiligt sich an der Beseitigung von Lipiden aus dem Plasma und weist eine antiatherogene Wirkung auf. Es steuert die Verteilung und den Transport von Lipiden in Organen und ihren Geweben.<sup>140; 143</sup> Bei der LDL<sup>-/-</sup>- Rezeptor defizienten Maus ist der Rezeptor für das Low Density Lipoprotein, welches zum Transport wasserunlöslicher Substanzen, wie Fettsäuren und Cholesterin, sowie zum Transport von fettlöslichen Vitamin in die Zellen dient, blockiert. Die Folge davon ist, dass sich das LDL, auch umgangssprachlich als „böses“ oder „schlechtes“ Cholesterin bezeichnet, im Plasma anreichert und sich im Gewebe ablagert.<sup>144; 145</sup>

Dieses Gen- Knockout bewirkt, dass die Tiere eine Hypercholesterinämie entwickeln und es zu atherosklerotischen Veränderungen in der Gefäßwand kommt.<sup>140; 146</sup> In Abhängigkeit von der jeweiligen Diät verhält sich der Cholesterinspiegel des Plasmas. Durch eine hohe Zufuhr von Lipiden und Cholesterin kann man das Auftreten atherosklerotischer Plaques fördern und bereits nach wenigen Wochen eine Hypercholesterinämie beobachten.<sup>147-150</sup> Dabei durchlaufen die Gefäße der Mäuse ähnliche Stadien und Schweregrade der Atherosklerose wie sie in humanen Gefäßen zu beobachten sind.<sup>147</sup> Zunächst bilden sich auch bei den Mäusen die sogenannten „Fatty Streaks“. In späteren Stadien kann man auch die Entstehung der fibrösen Kappe beobachten.<sup>139-141</sup>

Studien über die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen im Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Maus konnten zeigen, dass fortgeschrittene atherosklerotische Gefäßalterationen besonders in der Aorta und in großen muskulären Arterien beobachtet werden können.<sup>151</sup>

## 1.5 Bildgebung

In der Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen stehen eine Vielzahl bildgebender Verfahren zur Verfügung. Man kann hierbei zwischen nicht- invasiven und invasiven bildgebenden Methoden unterscheiden, die es ermöglichen die klinische Diagnostik zu unterstützen. Als invasive Verfahren gelten die digitale Subtraktionsangiographie,<sup>152; 153</sup> die Angioskopie,<sup>154</sup> der intravaskuläre Ultraschall (IVUS),<sup>155</sup> die Koronarangiographie<sup>156</sup> und die optische Kohärenz-Tomographie(OCT)<sup>157</sup>. Zu den nicht- invasiven Verfahren zählen die nuklearmedizinischen Untersuchungsmethoden (PET, SPECT),<sup>158</sup> die Echokardiographie<sup>156</sup> und neuere Verfahren wie die Mehrzeilen- Computertomographie<sup>159-161</sup> oder die Magnetresonanz- Angiographie<sup>162-164</sup>.

Der intravaskuläre Ultraschall kann mittels eines Miniatur- Ultraschallkopfes, welcher sich an der Katheterspitze befindet, eine zweidimensionale Aufnahme vom atherosklerotischen Plaque liefern und die Wandverhältnisse im Gefäß darstellen. So ist es möglich nicht- stenosierende Plaques aufzufinden, die sich in einer Angiographie nicht abbilden würden. Desweiteren dient es der Einschätzung des Verkalkungs- sowie des Fibrosierungsgrades und des Lipidgehaltes der Läsion. So lässt sich mit Hilfe des IVUS der Plaqueaufbau im Detail quantifizieren und das Stadium der atherosklerotischen Läsion in etwa abschätzen. Zur Zeit wird dieses Verfahren meist für Forschungszwecke eingesetzt, da es hohe Kosten in sich birgt und zeitaufwändig ist.<sup>155</sup>

Obwohl sich mittlerweile viele neue bildgebende Methoden in der Radiologie etabliert haben, stellt die digitale Subtraktionsangiographie heute noch immer den Goldstandard zur Diagnostik atherosklerotischer Gefäßläsionen dar. Die erzeugte luminographische Darstellung des Gefäßes macht es zwar möglich Stenosen zu erkennen, jedoch ist keine Aussage über den mikromorphologischen Aufbau der Gefäßwandveränderung zu treffen.<sup>165-168</sup>

Das Mehrzeilen- CT stellt eine nicht- invasive Methodik dar, mit deren Hilfe man in kurzer Zeit das Gefäßlumen ausmessen und den Schweregrad der Stenosierung durch atherosklerotische Plaques quantifizieren kann. Jedoch sind auch hier wie bei der digitalen Subtraktionsangiographie kaum Rückschlüsse auf die Plaquezusammensetzung zu ziehen.<sup>169</sup>

Die Magnetresonanz- Angiographie, bei der der Patient keiner Belastung durch Röntgenstrahlung ausgesetzt ist, macht es möglich die Größe des Plaques und seine Zusammensetzung abzuschätzen. Bei diesem, bis zu einer halben Stunde andauernden, Untersuchungsverfahren wird nach Gabe eines gadoliniumhaltigen MR- Kontrastmittels der Stenosegrad des Gefäßes und die vorliegenden Wandverhältnisse, welche auf Vulnerabilität untersucht werden können, im Detail abgebildet.<sup>170</sup>

Die histologische Untersuchung gilt als Goldstandard zur Darstellung und Quantifizierung von Strukturen <200µm. Mittels standardisierter Methoden wird das zu untersuchende Gewebe aufgearbeitet und anschließend angefärbt. Die Histomorphometrie, nach welcher die Läsionsklassifizierung nach AHA bzw. Stary vorgenommen wurde, ermöglicht eine Analyse und Quantifizierung der Gefäßparameter (z.B. luminale Gefäßoberfläche, Gefäßwanddicke und Plaquefläche) sowie eine detailreiche Diagnostik der unterschiedlichen atherosklerotischen Läsionstypen. Histologische Untersuchungen und ihre Darstellungsmöglichkeiten der Gefäße und Weichteile bewegen sich im zweidimensionalen Raum. Die Kontinuität des Präparates geht bei diesem Verfahren verloren, da der zu analysierende Gewebsabschnitt dabei aus der Gesamtheit herausgelöst wird. Nach zufälliger Auswahl eines µm großen Segmentes ist eine vollständige Quantifizierung der Probe kaum möglich. Jedoch sei zu betonen, dass diese detailreiche Darstellung von Gefäß- und Plaquestrukturen mittels histologischer Aufarbeitung bisher mit den in der Klinik zum Einsatz kommenden Geräten nicht erzielt werden kann.<sup>171</sup>

Im letzten Jahrzehnt konnte die biomedizinische Forschung große Fortschritte aus zwei neuen Technologien generieren, die eine viel genauere, dreidimensionale Untersuchung des Gewebes ermöglichen. Als potentielle Alternative zur quantitativen Histologie setzten sich in der ex- vivo Grundlagenforschung die Mikro- (µCT)<sup>172</sup> und Nano- Computertomographie (NCT)<sup>173; 174</sup> durch.

### *1.5.1 Grundlagen der Computertomographie*

Die Computertomographie stellt ein radiologisches Untersuchungsverfahren dar, bei dem durch Röntgenstrahlung zweidimensionale Schnittbilder des Körpers erstellt werden. Eine um die Längsachse des Patienten rotierende Röntgenröhre bestrahlt die

jeweilige Körperregion mit einer bestimmten Röntgenstrahldosis. Auf der gegenüberliegenden Seite der Röntgenstrahlquelle befindet sich ein Detektor, der nach Durchstrahlung des Objektes und Abschwächung (Attenuation) der Strahlung, durch Absorption und Streuung der ionisierenden Strahlung, die restliche Strahlendosis, als Differenz zwischen ausgesandter und gemessener Strahlung misst.

Ein Computer berechnet daraus ein anatomisches Bild, welches sich aus verschiedenen Graustufen zusammensetzt. In Abhängigkeit von der Dichte des untersuchten Gewebes stellt sich die Intensität der Graustufen dar. Bestimmte Gewebe schwächen Röntgenstrahlung in einem charakteristischen Maße ab, so dass man pathologische Veränderungen, die sich durch eine veränderte Strahldurchlässigkeit hervorheben, ausmachen kann. Aus der jeweiligen Strahlenschwächung wird der Schwächungskoeffizient (Dichtewert) berechnet. Dieser ist zum einen abhängig von der Gewebeart, der Energie der Strahlung und für eine monochromatische Strahlung genau definiert. Die Dichtemessung der einzelnen Volumenelemente eines Gewebes, die sogenannten Voxel, erfolgt in Hounsfield-Einheiten (HE), welche nach dem Erfinder der Computertomographie, G.N. Hounsfield, benannt ist. Er führte die sogenannte CT- Zahl (angegeben in Hounsfield- Einheiten= HU/ HE) ein. HU- Einheiten errechnen sich danach folgendermaßen:  $HU(\text{Gewebe}) = (\mu(\text{Gewebe}) - \mu(\text{Wasser})) : \mu(\text{Wasser}) \times 1000$ .

Dabei legte man Luft, welche auf einem CT- Bild schwarz erscheint, mit einer Dichte von -1000HE, Wasser mit einer Dichte von 0HE und Knochen mit bis zu +3000HE als Referenzwerte fest. Diese Werte entsprechen somit dem arithmetischen Mittel der Dichtewerte, also der Schwächung der Strahlung der einzelnen Voxel. Die durch die Computertomographie bestimmten Schwächungskoeffizienten werden dann im Verhältnis zu diesen Referenzwerten in HE angegeben. Jedem Voxel wird mittels eines Rechners sein charakteristischer Schwächungswert zugeordnet. Dabei schwächen dichtere Strukturen als Wasser die Röntgenstrahlung mehr und weisen folglich eine positivere HE auf (Vollblut +50HE, Spongiosa bis +300HE). Negative Werte weisen Gewebe auf, die die Strahlung weniger schwächen als Wasser, wie zum Beispiel Fett (Fett -100HE).

Röntgendichtere Strukturen, welche einen hohen HU- Wert besitzen, wie Knochen, werden folglich heller dargestellt als weniger dichte Gewebe, welche zum Beispiel

viel Fett oder Luft enthalten. Die ermittelten Daten werden schließlich von einem Rekonstruktionsrechner digitalisiert und zu einem Volumendatensatz, mit dem man schließlich dreidimensionale Ansichten und Schnittbilder erzeugen kann, umgewandelt. Ein Computertomograph kann bis zu 4.000 Graustufen detektieren. Das menschliche Auge hingegen kann höchstens zwischen 15-20 Graustufen unterscheiden. Die Kontrastauflösung eines CT- Bildes (Speichertiefe) ist umso höher, je größer die Zahl der Grauwertabstufungen pro Pixel bzw. Voxel sind. Um das untersuchte Gewebe in, für das menschliche Auge wahrnehmbare, Graustufen darzustellen, bedient man sich sogenannter Fenstereinstellungen. In diesen Fenstern können spezifische Gewebe durch die Festlegung eines zentralen Graustufenwertes (Fenstermitte) und Werte die darüber oder darunter liegen (Fensterweite) sehr kontrastreich und optimiert dargestellt werden. Dabei wählt man zur Darstellung von Weichgeweben, deren Abschwächungskoeffizienten sehr eng beieinander liegen, eine schmalere Fensterweite, um den Kontrast zu optimieren. Im Bereich knöcherner Strukturen werden hingegen größere Fensterweiten gewählt.<sup>175; 176</sup>

### *1.5.2 Mikro- und Nano- Computertomographie*

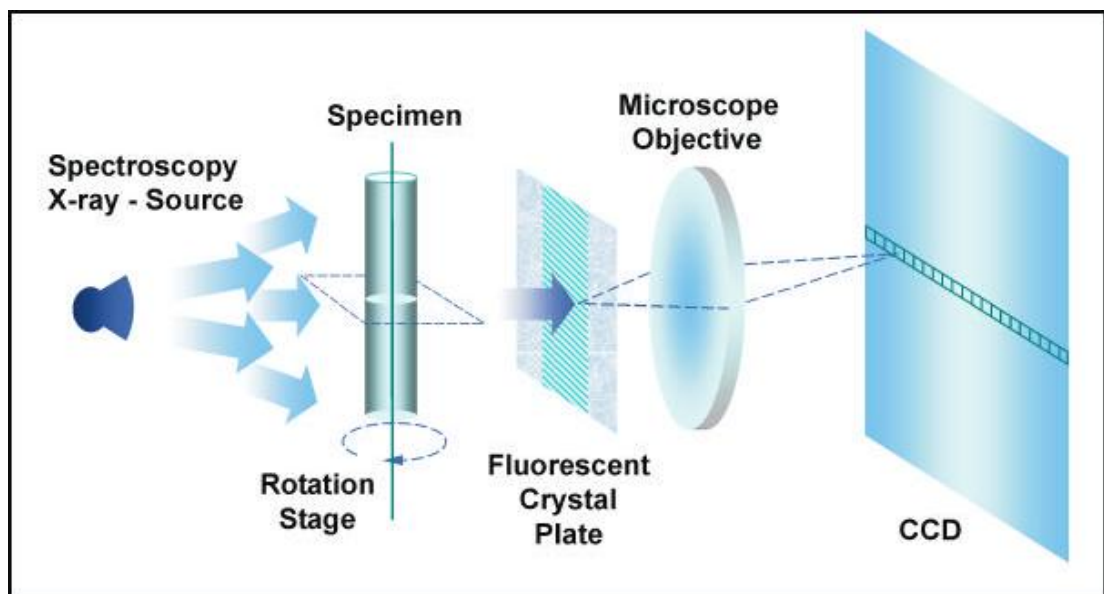
#### **1.5.2.1 Grundlagen der Mikro- Computertomographie**

Anfang der achtziger Jahre setzte es sich die Forschung zum Ziel die bisherigen Möglichkeiten der bildgebenden Verfahren zu steigern, um noch kleinere Objekte detailreich und mit einem hohen Auflösungsvermögen mittels der Mikro- Computertomographen darzustellen. Trotz des gemeinsamen Basisprinzips unterscheiden sich der CT- Scanner und der Mikro- CT- Scanner in ihrem Aufbau und der maximal erreichbaren Auflösung.

Mit Hilfe von Mikro- CT- Scannern, die aus einer Strahlenquelle, einem Probeschlitten und einer CCD- Detektor- Kamera (Charged- Coupled- Device) bestehen und zur Datenverarbeitung an einen Computer angeschlossen sind, konnte die Bildauflösung im Vergleich zu CT- Scannern um bis zu zwei Größenordnungen angehoben werden (von 1-0,5mm auf 5-50 $\mu$ m). Mit den neuesten Geräten gelingt es heutzutage sogar Bilder mit einer isotropen Voxelgröße von 5-10  $\mu$ m zu erzielen.<sup>177;</sup>

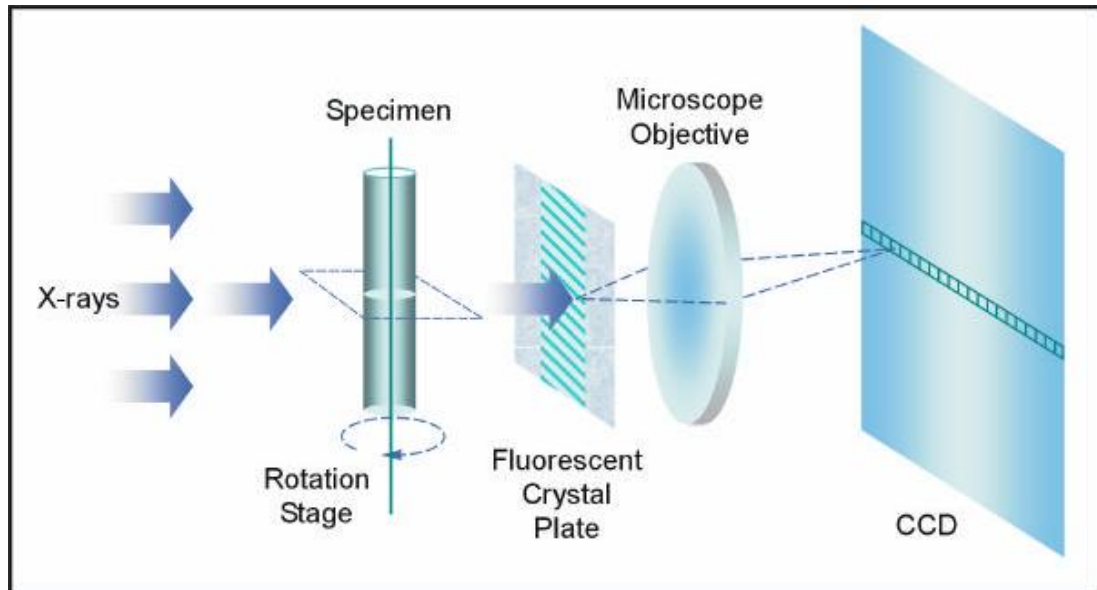
178

Bei der Mikrocomputertomographie rotiert das Objekt, welches sich auf dem Probeschlitten befindet, in definierbaren Winkelschritten, in einem feststehenden Strahlengang und erzeugt dabei auf der Filmschicht der CCD- Kamera Durchlichtschattenbilder. Als Strahlenquelle dient eine Mikrofokus- oder Feinfokusröntgenröhre mit eingebauter Reflektions- oder Transmissionsanode, bei der sich eine Fächerstrahl- oder Kegelstrahlgeometrie ergibt (Abb. 1.5.). Die gewählte Strahlenquelle bestimmt diese Strahlungsgeometrie. Bei Einsatz von Synchrotronstrahlung ergibt sich beispielsweise eine Parallelstrahlgeometrie. Hier bestimmt das Detektoraufklärungsvermögen die maximale Auflösung. Anders bei der Fächerstrahl- oder Kegelstrahlgeometrie. Hier wird die maximal erreichbare Auflösung von der Fokusgröße der Röntgenröhre, die zwischen 5-30  $\mu\text{m}$  liegt<sup>177</sup>, bestimmt (Abb. 1.6).



*Abbildung 1.5: Kegelstrahlgeometrie mit Flächendetektor*





**Abbildung 1.6:** Parallelstrahlgeometrie für Synchrotronstrahlenquellen

Die sich aus diesem Aufbau ergebenden Parameter für eine Mikrofokus- oder Feinfokusröntgenröhre betragen für den Anodenstrom 40- 100 $\mu$ A bei einer angelegten Spannung von 10 bis 150kV. Zur Erfassung der Bildinformationen wird bei den Mikro- Computertomographen mit Kegelstrahlgeometrie ein Flächendetektor, bei den Tomographen mit Fächerstrahlgeometrie hingegen ein Zeilendetektor verwendet.<sup>177</sup> Der Vergrößerungsmaßstab (zwischen 1:1 und 20:1) lässt sich durch die Verschiebung des Objektes auf dem Probeschlitten entlang der horizontalen Achse zwischen dem CCD- Detektor und der Strahlenquelle regulieren. Wobei man den Abstand zwischen Objekt und Detektor unter Überwachung mittels einer kleinen Kamera vergrößert. Die Brennfleckgröße, hier als limitierender Faktor, begrenzt die maximal erzielbare Vergrößerung. Bei dieser elektrisch gesteuerten Verschiebung entlang der Längsachse darf durch eine weitere Annäherung des Objektes an die Strahlenquelle die minimale Fokusgröße von 8 $\mu$ m nicht unterschritten werden. Die in einem bestimmten Zeitraum pro Fläche zur Verfügung stehenden Röntgenquanten bestimmen die Strahlungsintensität. Die Röntgenleistung bestimmt somit die Strahlenintensität. Zur Erzielung der optimalen Bildauflösung bedient man sich deshalb einer hohen Strahlungsintensität und eines kleinen Fokus. Bei Reduzierung der Fokusgröße nimmt die Röhrenleistung allerdings ab und die notwendige Strahlenintensität kann nicht erzielt werden. Zur Lösung dieses Problems

bedient man sich beim Mikro- CT wesentlich längerer Messzeiten und kleinerer Probendurchmesser.<sup>177; 171</sup> Der Bilddetektor setzt sich aus einer elektrisch gekühlten 12-bit CCD- Kamera und einem faseroptischen Sensor (3,7:1), auf dem eine 25µm dicke, hochauflösende Szintillatorschicht aufliegt, zusammen. Die Szintillatorschicht, welche aus Caesiumiodid und Thallium [CsI(Tl)] besteht, generiert ein Lichtsignal und gibt die Bildinformationen an die CCD- Kamera weiter, die wiederum über einen Frame- Grabber mit einem PC zur Bildvisualisierung verbunden ist. Die Kamera, die mit einer maximalen Matrixgröße von 1024x 1024 Pixeln ausgestattet ist, wird gekühlt um den Anstieg des Dunkelstroms nach langen Messungen vorzubeugen und somit ein optimiertes Signal- Rausch- Verhältnis zu erzielen. Nach dem die Absorptionsbilder über Lichtsignale in ein digitales Signal umgewandelt wurden, werden die Rohdaten (WTS- Dateien) mittels Feldkamp- Algorithmus und Rückprojektionstechnik schließlich in axiale Einzelschichtbilder verwandelt.<sup>175</sup> Die Schnittbilder setzen sich aus isotropen Voxeln zusammen und weisen die Größe von etwa 1 MB auf. Nach der Bestimmung der maximalen und minimalen Grauwerte in jedem einzelnen Schnittbild, kann die dreidimensionale Rekonstruktion der Schnittbilder aus dem Datensatz erfolgen. Abschließend erfolgt die Auswertung und Quantifizierung der Probe, indem alle gewonnen Parameter mit einem Bildanalyseprogramm erfasst werden, z.B. ANALYZE<sup>®</sup> 9.0 (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA).

### **1.5.2.2 Grundlagen der Nano- Computertomographie**

Die belgische Firma Sky Scan brachte 2005 den ersten Nano- Computertomographen, der eine noch höhere Ortsauflösung als ein Mikro- Computertomograph ermöglicht, auf den Markt. Der Einsatz ist bis heute auf wenige Forschungsbereiche, wie die Materialwissenschaft<sup>179</sup> und die biomedizinische Forschung<sup>173; 180; 174</sup> limitiert, so dass nur eine begrenzte Anzahl von Herstellern diese neue Technologie anbietet.

Die NCT ermöglicht mit einer Bildauflösung, die sich im Submikrometerbereich bewegt, eine nicht- destruktive, dreidimensionale Visualisierung von Mikrostrukturen, die in diesem Maße bisher nur durch das zeit- und kostenintensive Synchrotronverfahren zu realisieren war. NCT, deren Aufbau generell mit dem eines µ- CT zu vergleichen ist, bedienen sich als Mikrofokusröntgenröhre einer

Strahlenquelle vom sogenannten offenen Typ. Die Röntgenröhre emittiert Strahlen, welche mit einer Fokusgröße von unter 400nm deutlich kleiner ist, als es bisher mit dem  $\mu$ - CT möglich war. Ein hintereinander geschaltetes Blenden- und Linsensystem ermöglicht es den Brennfleck auf eine Größe von wenigen  $\mu\text{m}$  zu reduzieren. Bei einer anliegenden Spannung von 20 bis 80 kV wird der, von der Kathode ausgehende, Elektronenstrahl in Richtung eines Targets, welches aus einer Berylliumglasplatte mit einer  $5\mu\text{m}$  dicken Wolframbeschichtung besteht, beschleunigt. Nachdem die Röntgenstrahlen diese Wolframschicht verlassen, treffen sie schließlich auf das rotierende Objekt, welches sich zwischen der Röntgenröhre und dem Detektor befindet. Wie schon bei den Grundlagen der Mikro-Computertomographie beschrieben, treffen die Röntgenquanten auf eine Szintillatorschicht auf, wo sie in Lichtsignale umgewandelt und über einen Röntgendetektor (CCD- Kamera,  $1280 \times 1024$  Pixel) schließlich zur Datenver- und -bearbeitung an ein Computersystem weitergeleitet werden. Auch hier erfolgt die dreidimensionale Rekonstruktion der Datensätze, sowie deren qualitative und quantitative Auswertung durch ein Bildanalyseprogramm, zum Beispiel ANALYZE<sup>®</sup> 9.0 (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA). Mit Hilfe der NCT lassen sich heute Mikrostrukturen, die in einem Bereich von 200nm liegen, visualisieren.<sup>179</sup>

### *1.5.3 Anwendung in der Gefäß- und Weichteildarstellung*

Den ersten Einsatz fand die  $\mu$ - CT 1989 in der Untersuchung von Knochenstrukturen durch die Arbeitsgruppen von Feldkamp und Layton et al.<sup>181; 182</sup> Ende der neunziger Jahre begann man das Verfahren dann in der Osteoporoseforschung einzusetzen<sup>177</sup>, was bis heute noch neue Erkenntnisse im Bereich der Erforschung knöcherner Strukturen verspricht.<sup>183</sup>

Jorgensen et al waren die ersten, welche 1998 die  $\mu$ - CT im Bereich der vaskulären Grundlagenforschung, wie zum Beispiel zur dreidimensionalen Darstellung der Gefäßarchitektur, einsetzten.<sup>184</sup> Mittels Applikation von röntgenpositiven Kontrastmittel in Koronararterien von Schweinen gelang die Darstellung der Gefäßarchitektur von myo- und epikardialen Gefäßen, ihrer VV sowie die Visualisierung von Nierengefäßstrukturen und denen peripherer Muskeln. Wan et al verbesserten die Auflösung, so dass der Arbeitsgruppe eine vollständige dreidimensionale Quantifizierung von Rattenkoronarien bezüglich des

Verzweigungsmusters, der Dichte und des Volumens der Gefäße gelang.<sup>185</sup> In den darauffolgenden Jahren beschäftigten sich viele Forschungsgruppen mit der Darstellung und Analyse mikrovaskulärer Funktionseinheiten. Ritman und Lerman erforschten an Koronararterien von Ratten, unter der Anwendung von intravasal verbleibendem Kontrastmittelpolymer, die Beziehung zwischen der arteriellen Perfusion der Gefäßwand und der Perfusion von VV, die entweder bereits vorhanden waren oder sich neu entwickelt hatten.<sup>69</sup>

Die NCT ist eine noch sehr junge Technologie, die wie bereits erwähnt, bisher noch auf wenige Forschungsbereiche beschränkt ist. Da die NCT- Geräte Strukturen in einer Größenordnung von 200nm darstellen und eine hohe Ortsauflösung ermöglichen, eignen sie sich auch zur Analyse vaskulärer Strukturen. Nur wenige Arbeitsgruppen bedienen sich dieses bildgebenden Verfahrens in der Gefäßanalytik. Langheinrich et al konnten 2010 den Nutzen der NCT- Technologie für die Forschung im Bereich mikrovaskulärer Strukturen herausarbeiten.<sup>173; 174</sup>

Zur besseren Visualisierung und Abgrenzung der meist kontrastarmen Gefäßnetzwerke in ex- vivo Angiographien, hergestellt durch eine Mikro- oder NCT, bedarf es der Applikation von Kontrastmittel. Hierfür bietet die Industrie diverse Mittel an. Das häufig in der biomedizinischen Forschung verwendete Kontrastmittel Baritop besteht aus einer Gelatine- Bariumsulfat- Suspension. Ein sicherer Garant für einen größeren Anteil perfundierter Gefäße ist allerdings Microfil<sup>®</sup> (Microfil<sup>®</sup> MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA).<sup>184; 171; 186; 187</sup> Studien konnten zeigen, dass sogar die Mikrostruktur kleinster Gefäße, die einen Durchmesser unter 20 µm aufweisen, mittels der, wie Gummi aushärtenden, Masse und anschließendem Einsatz bildgebender Verfahren, dargestellt werden konnte. Auch konnte Microfil<sup>®</sup>, welches aus Silikon und Chromat besteht, nachweislich eine höhere Kontrastverstärkung, als es mit den bariumsulfathaltigen Produkten möglich war, erzielen.<sup>188</sup>

## 1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist den Einfluß von Thalidomid auf die Atherogenese im Tiermodell zu analysieren. Dazu werden die VV-Neovaskularisation sowie die Größe der atherosklerotischen Plaques in fortgeschrittenen stenosierenden Läsionen der aortalen Gefäßwand von ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Mäusen mittels hochauflösender, bildgebender Verfahren, wie der Mikro- und Nano- Computertomographie, quantifiziert. Das Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel- Knockout Maus bietet sich an, da die Tiere nach Gabe einer fett- und cholesterinreichen Diät innerhalb weniger Wochen zunächst frühe und später auch fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen entwickeln. Die VV- Neovaskularisation, welche über die Gesamtfläche und die Anzahl der VV quantifiziert wird, wird dabei ins Verhältnis zur Plaqueoberfläche der atherosklerotischen Läsionen der deszendierenden Aorta von 35 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Mäusen nach Thalidomidgabe gesetzt. Die Versuchsgruppe teilt sich in zwei Subgruppen auf, bestehend aus der Verum- und der Kontrollgruppe. Als begleitender in- vitro- Zellversuch wurde der Einfluss von Thalidomid auf die Proliferation und Migration von Endothelzellen mittels funktioneller Assays untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 In -vitro- Zellversuche: Proliferation und Migration von Endothelzellen unter dem Einfluss von Thalidomid

#### 2.1.1 Geräte

Akku Pipettierhilfe	HIRSCHMANN, Eberstadt
Biofuge Fresco	HERAEUS INSTRUMENTS, Hanau
Combitips	EPPENDORF, Hamburg
Feinwaage	SARTORIUS, Göttingen
Inkubator 1000	HEIDOLPH, Kelkheim
Magnetrührer Ikamag	IKA LABORTECHNIK, Staufen
Mikrotitrierplatte	GREINER, Frickenhausen
Neubauer- Zell- Zählkammer	MARIENFELD, Lauda-Königshofen
Photometer SLT Spectra	SLT LABINSTRUMENTS, Crailsheim
Pipetten	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Polypropylenröhrchen 15ml/50ml	GREINER, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2ml	EPPENDORF, Hamburg
Schüttler Duomax 1030	HEIDOLPH, Kelkheim
Sterile Zellkultur- Arbeitsbank	HEARUS INSTRUMENTS, Hanau

### *2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien*

Antibody- BrdU	ROCHE, Mannheim
Antibody- BrdU dilution solution	ROCHE, Mannheim
Aqua dest.	BRAUN, Melsungen
BrdU- Labeling Reagent	ROCHE, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA, Steinheim
Dulbecco's 1xPBS	PAA LABOR Linz, Österreich
Endothel- Basalmedium	CAMBREX, Verviers, Belgien
Endothel- Growthmedium	CAMBREX, Verviers, Belgien
FCS (Fetales Kälberserum)	GIBCO, Darmstadt
Fix Denat	ROCHE, Mannheim
Washing Buffer	ROCHE, Mannheim
Washing Solution	ROCHE, Mannheim
WST-1	ROCHE, Mannheim

### *2.1.3 Medikamente*

Thalidomid	SIGMA, Hamburg
------------	----------------

#### *2.1.4 Zellkultur*

Die Endothelzellen (HCAEC) aus humanen Koronararterien werden von der Firma Cambrex (Verviers, Belgien) bezogen. Die Kultivierung der Zellen findet in Endothelzell- Growth Medium oder -Basal Medium (EGM-2/ EBM- 2, Cambrex) statt. Es werden ausschließlich Zellen der Passagen 2-4 verwendet. Alle Zellversuche, welche im Labor für molekulare Kardiologie an der Universitätsklinik Gießen, Deutschland, durchgeführt werden, erfolgen an der sterilen Zellkultur-Arbeitsbank sowie mit sterilen Lösungen und Materialien.

#### *2.1.5 Funktionelle Assays*

##### **2.1.5.1 Proliferationsassay**

Die Proliferation der Endothelzellen in Kultur wird mit Hilfe des BrdU ELISA Kits von Roche (Mannheim, Deutschland) bestimmt. Man gibt den Zellen bei diesem Assay Bromodesoxy- Uridin bei, welches ein Pyrimidinanalogon ist. Proliferierende Zellen bauen es anstelle von Thymidin in ihr Genom ein. Auf die Proliferation der Zellen lässt sich durch die Menge an eingebautem BrdU schließen. Je well werden 3000 EC's für die Versuche in 96well Mikrotitrier- Platten ausgesät und entsprechend der 9 Versuchsbedingungen behandelt:

#### **4 Kontrollbedingungen:**

1. Endothelzellen + Basalmedium
2. Endothelzellen + Basalmedium + DMSO
3. Endothelzellen + Growthmedium
4. Endothelzellen + Growthmedium + DMSO



## **5 Thalidomidbedingungen:**

1. Endothelzellen + Growthmedium + Thalidomid (50µg/ml) aufgelöst in DMSO
2. Endothelzellen + Growthmedium + Thalidomid (100µg/ml) aufgelöst in DMSO
3. Endothelzellen + Growthmedium + Thalidomid (150µg/ml) aufgelöst in DMSO
4. Endothelzellen + Growthmedium + Thalidomid (200µg/ml) aufgelöst in DMSO
5. Endothelzellen + Growthmedium + Thalidomid (250µg/ml) aufgelöst in DMSO

Gewechselt wird das Medium nach 24 Std. und die Proliferationsmessung nach 48 Std. gestartet. Zu diesem Zweck werden zu jedem well 100 µl Wachstumsmedium sowie 10 µl BrdU labeling solution gegeben. Im Anschluss an eine zweistündige Inkubation im Brutschrank werden zusätzlich 10 µl WST-1 zu jedem well pipettiert. Ein Maß für die Anzahl an lebenden Zellen stellt der Farbumschlag von rot zu gelb dar, welcher durch die Metabolisierung von WST-1 durch lebende Zellen zustande kommt. Nach erfolgtem Farbumschlag wird die Extinktion im ELISA-Reader gemessen und ausgewertet. Um die eigentliche Proliferationsmessung durchzuführen wird das Medium der 96well Mikrotitrier- Platten nach 6 Std. entfernt und eine DNA Denaturierung mittels Zugabe von 200 µl/well Fixierungslösung durchgeführt.

Dieser Vorgang ist essentiell, damit das inkorporierte BrdU von einem Antikörper erreicht werden kann. Bei Raumtemperatur wird die Fixierungslösung für 30 min auf den Zellen belassen. Es werden im Anschluss an das Ausklopfen der Lösung 100 µl/well anti- BrdU Lösung (enthält BrdU- Antikörper) auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 90 min werden die Zellen dreimal mit 200 µl Waschpuffer gespült. Mittels einer Substratsolution (enthält fluorescein-gekoppeltes IgG) können die gebildeten Immunkomplexe sichtbar gemacht werden.

Nun werden 100 µl dieser Lösung bei Raumtemperatur für 20-30 min auf die Zellen gegeben. Nach einer ausreichenden blauen Farbentwicklung wird diese Reaktion mittels Zugabe von 25 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Ein Farbumschlag zu gelb ist das Resultat. Mit einem ELISA-Reader wird die Extinktion bei 450nm gemessen und die Farbentwicklung so bewertet.

#### **2.1.5.2 Migrationsassay**

Die Fähigkeit der Endothelzellen unter dem Einfluss von Thalidomid zu migrieren, wird mit Hilfe von 24well- Transwell- Platten der Firma Costar ( Cambridge, MA) untersucht. An ihrer Unterseite bestehen die Platten aus einer Polycarbonatmembran mit unregelmäßig angeordneten 8 µm großen Poren, durch die die Zellen migrieren können. Zur Verbesserung der Adhäsion der Zellen an der Unterseite der Membran im Anschluss an die Migration, wird diese zuvor mit Gelantine (1,5%) beschichtet. Die Zellen werden in 10 cm Schalen ausgesät und transfiziert. Nach 24 Std. werden die Zellen für 24 Std. mit serumfreiem Basal- Medium ruhend gesetzt. Anschließend werden die Zellen trypsiniert, in serumfreiem Medium resuspendiert und gezählt. Nach insgesamt 72 Std. erfolgt das Treatment der Endothelzellen:

#### **2 Thalidomidkonzentrationen:**

- in 3 Schalen : Endothelzellen + Thalidomid (500 µg/ml)\*+ Growth Medium
  - in 3 Schalen : Endothelzellen + Thalidomid (250 µg/ml)\* + Growth Medium
- (\*als Lösungsmittel wird hier DMSO verwendet.)

#### **1 Kontrollbedingung:**

- in 3 Schalen : Endothelzellen + Growth Medium

Nach erfolgtem Treatment werden die Endothelzellen für weitere 24 Std. im Brutschrank bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid inkubiert. Nach 96 Std. kommt die 24 well Platte zum Einsatz: Dabei werden in die oberen Kammern der Einsätze jeweils 50.000 Zellen in einem Volumen von 100 µl Medium pipettiert. Mit 600 µl

Medium werden jeweils die unteren Kammern der Transwell- Platten gefüllt und der Migrationsreiz durch die Zugabe von 20% FCS (Kontrollbedingungen werden keinem FCS ausgesetzt) ausgelöst. Nun werden die Platten für weitere 24 Std. im Brutschrank inkubiert. Mit einem Baumwolltupfer werden die nicht migrierten Zellen dann von der Oberseite der Transwelleinsätze abgelöst. In neue wells werden 300 µl Medium mit 30 µl WST- 1 (1:10) vorgelegt und die Transwelleinsätze reingesetzt. Wst-1 wird von Zellen metabolisiert und ist ein Farbstoff, welcher zu einem messbaren Farbumschlag von rot zu gelb führt. Der Grad des gemessenen Farbumschlages steht schließlich in Relation zur migrierten Zellzahl. Die Platte wird nun im Brutschrank inkubiert bis eine deutliche Gelbfärbung des Mediums erkennbar ist. Aus jedem well wird für die Messung 100 µl in eine 96well Mikrotiterplatte überführt. Die Extinktion wird anschließend mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 450nm bestimmt.

## **2.2 Tiermodell**

Die Tierversuche werden im Anschluss an die Genehmigung des Versuchsvorhabens 2007 (AZ GI VI 63- 19 c 20- 15 (1) GI 20710, 76/2007) durch das Regierungspräsidium Gießen nach § 8 Abs. 2 des Tierschutzgesetzes (BGB1.I S.1207, Mai 2006) durchgeführt. Seit vielen Generationen werden die Tiere in der SPF- Anlage (Specific Pathogen-Free Facility) des Zentralen Tierstalls der Universitätsklinik Giessen und Marburg, Standort Giessen, gehalten. Die Wahrung der homozygoten Linie ist hiermit gegeben.

Bezogen werden die atherosklerosesensiblen ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel-Knockout Mäuse über die Charles River GmbH in Sulzfeld, Deutschland. Ein Teil der Tiere wird stellvertretend für alle Tiere in einem spezialisierten mikrobiologischen Laboratorium untersucht (MFD Diagnostics GmbH, Wendelsheim), um alle viralen, bakteriellen und mykotischen Infektionen, laut Empfehlung der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) 2001, der Tierreihe in der SPF- Anlage, auszuschließen.

### *2.2.1 Tierhaltung*

In der SPF-Anlage des Zentralen Tierstalls der Universitätsklinik Giessen werden jeweils maximal fünf Mäuse in einem individuell belüfteten Käfig gehalten. Hier

werden die Umgebungstemperatur und die Luftfeuchtigkeit stets überwacht. Die elektronisch gesteuerte Luftzufuhr wird über selbstschließende Luftventile kontrolliert und garantiert somit die Integrität des geschlossenen Systems. Die Einspeisung der gefilterten Luft mit einer geringen Geschwindigkeit findet in der oberen Etage des Käfigs statt. Die Ausströmung der gefilterten Luft findet ebenfalls durch eine spezielle Öffnung statt. Die Luftdiffusion liegt hier bei maximal 0,15m/s. Die Temperatur im Käfig liegt bei 23 °C und die Umgebungstemperatur bei ca. 22,5 °C. Die Mäuse werden über ein Kunstlicht (400Lux) von 06 bis 18 Uhr belichtet und der Tag-Nacht Rhythmus liegt bei jeweils 12 Stunden.

### *2.2.2 Tierfutter, Ernährung und Thalidomidarreichung*

Nach dem Studiendesign erhalten die Versuchstiere nach Ablauf der Säugeperiode (ca. 6 Wochen) eine atherogene Basisdiät über den Zeitraum von 29 Wochen. Unter regelmäßiger Kontrolle werden Futter und Wasser ad libitum dargereicht. Die Western Type Experimentaldiät (Diättyp TD 88137) enthält hohe Konzentrationen an Cholesterin und Fett und kann als Folge von Adipositas, Atherosklerose induzieren. Die Fütterungsdauer bis die ersten klinischen Symptome auftreten ist von der Mauslinie und von verschiedenen exogenen Faktoren abhängig. Der Rohfettgehalt beträgt 21,2% und der Rohproteingehalt 17,3%, was einer Bruttoenergie von 22,1 MJ/kg entspricht. Die Darreichungsform sind 10mm große, sterile Pellets. Die Pellets werden mit 25kGy bestrahlt, um eine Röntgensterilisation des Futters zu erzielen, so dass es in die SPF-Haltung eingeschleust werden kann. Die Versuchsgruppe (n=10) setzt sich aus zwei Subgruppen, der Verumgruppe (n=5) und der Kontrollgruppe (n=5) zusammen. Die Kontrollgruppe, die kein Thalidomid verabreicht bekommt, erhält diese Diät mit Schokogeschmack. Die Verumgruppe bekommt zusätzlich 1,6g Thalidomid pro Kilogramm Futter untergemischt. Bei einer täglichen Futtermenge von 2,5g pro Maus und einem durchschnittlichen Gewicht von 25g pro Maus ergibt sich eine Tagesdosis von 200mg /kg Körpergewicht pro Tag.

### *2.2.3 Studiendesign und Versuchsdurchführung*

In die Studie zur Ermittlung des Einflusses von Thalidomid auf die Atherogenese im Tiermodell der Apo<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Maus werden insgesamt 10 Tiere (5xweiblich/ 5xmännlich) eingeschlossen.

Um die Anzahl und die Gesamtfläche ( $\text{mm}^2$ ) an Vasa vasorum sowie die Fläche der atherosklerotischen Plaques in Abhängigkeit zur Thalidomidgabe zu betrachten, untersuchen wir jeweils die deszendierende Aorta der 10 Mäuse. Das Studiendesign besteht aus 2 Gruppen:

- Verumgruppe (n=5): erhält über 29 Wochen die atherogene Basisdiät mit Thalidomid
- Kontrollgruppe (n=5): erhält über 29 Wochen die atherogene Basisdiät ohne Thalidomid

Die Mäuse sind bei Abschluss des Versuches 35 Wochen alt und ihr durchschnittliches Gewicht liegt bei 25g. Nachdem die Tiere eine letale Dosis Trichlormethan inhaliert haben, werden sie für die Perfusion mit Kontrastmittel und für die Gefäßentnahme vorbereitet. Im Anschluss an die Entnahme werden die zehn deszendierenden Aorten zunächst für den Scanvorgang im Mikro CT und anschließend für den NCT in einzelne Segmente zerteilt. Prinzipiell handelt es sich bei diesem Versuch um eine Einfach-Blindstudie. Die Person, die die Ergebnisse der Experimente auswertet, weiß nicht, welche der Experimental- oder der Kontrollgruppe angehören. Somit kann man eine subjektive Erwartungshaltung, die sich negativ auf die Auswertung der Ergebnisse niederschlagen würde, eliminieren.

### **2.3 Präparation und Perfusion des vaskulären Stromgebiets**

Die Quantifizierung und Darstellung der Gefäße erfolgt mittels einer direkten, intraarteriellen ex-vivo Applikation von Kontrastmittel.

Durch einen transversalen Unterbauchschnitt erfolgt die Eröffnung des Abdomens und des Thorax. Nun kann der linke Ventrikel mit Hilfe einer Kanüle punktiert werden. Die Nadel wird an der Einstichstelle über Sekundenkleber am Myokard der Kammer befestigt, so dass zum einen der sichere Halt der Nadel am linken Ventrikel gegeben ist, aber auch um einen Rückfluss des über die Kanüle applizierten Volumens vorzubeugen. Der Abfluss der infundierten Flüssigkeit erfolgt über einen Schnitt entlang der Vena cava inferior unterhalb des Zuflusses der V. renalis. Mit heparinisierter Kochsalzlösung (10 ml 0,9%- NaCl mit 1000 IU Heparin) wird anschließend das komplette Gefäßnetzwerk durchspült, bis auch das venöse System blutleer ist. Das nun applizierte röntgendichte Kontrastmittel Microfil<sup>®</sup> (MV-122,

Flow Tech, Carver, MA, USA) besteht aus den drei Komponenten: MV Compound, MV Diluent und MV Curing Agent, welche in einem Verhältnis von 1:1:0,1 miteinander vermischt werden.

Um eine Gebrauchslösung von 2ml in einer Spritze aufzuziehen, werden nach dem Spülen die Komponenten des gelben Kontrastmittels, welches Silikon und Chromat enthält, mit einem Magnetrührer homogenisiert. Über die Kanüle, die in den linken Ventrikel reicht, wird das Kontrastmittel dann infundiert. Wichtig ist dabei die gleichmäßige und vollständige Perfusion, bei einem Druck von 100mmHg, ohne dass sich durch Luftblasen oder Blutreste Füllungsunregelmäßigkeiten bilden. Die Polymerisation von Microfil dauert ungefähr 20 Minuten, dabei geht die flüssige in eine visköse Phase über.

Anhand einer gelblichen Verfärbung von Gewebe und Gefäßen kann geprüft werden, ob die Perfusion erfolgreich war. Das Kontrastmittel härtet innerhalb von 20 Minuten aus und weist zum Schluss eine gummiartige Konsistenz auf, die auch gleichzeitig eine Stabilität und Haftung des Mittels an der Gefäßwand zur Folge hat. So kann eine Fixation der Gefäße in ihrer Form erzielt werden.

## **2.4 Sektion und Gefäßentnahme**

Nach erfolgter Aushärtung des Kontrastmittels kann man die Tiere sezieren und die Entnahme der Organe vornehmen. Die Aorta kann nach Präparation des retroperitonealen Raumes und der A.abdominalis aus dem umgebenden periaortalem Fettgewebe gelöst werden. Das Herz wird aus dem Perikard freipräpariert. Unter dem Mikroskop wird nach Trennung der abgehenden Gefäße des Aortenbogens und der thorakalen Aorta nahe der Aortenwand, das ganze Herz- Lungen- Paket mit Aorta thoracalis und Aorta abdominalis, sowie Milz, Leber, Niere, Darm, Harnblase und Pankreas abgetrennt und entnommen. Die Organe werden umgehend in 4% Formalinlösung fixiert und für anschließende Untersuchungen aufbewahrt. Bei der Entnahme der Organe und ihrer Präparation ist darauf zu achten die Zug- und Scherkräfte, welche dabei entstehen, so gering wie möglich zu halten, damit das infundierte Kontrastmittel nicht von den Gefäßwänden abreißt.

## 2.5 Bildgebung

Um zunächst einen Gesamtüberblick über die vaskulären Strukturen, der zu untersuchenden ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Mäuse zu erhalten und die Gleichmäßigkeit der Kontrastmittelperfusion zu prüfen, wird das Herz und die thorakale Aorta im Ganzen im Mikrocomputertomographen (SkyScan 1072\_80kVp) der Firma SkyScan<sup>®</sup> (Kontich, Belgien) am Universitätsklinikum Gießen, Deutschland, eingescannt. Mit Hilfe der Erzeugung dreidimensionaler Datensätze kann man einen Überblick über vaskuläre und kardiale Strukturen sowie von der Homogenität der Perfusion erhalten.

Für eine noch detailreichere Analyse der Aorta descendens werden die Gefäßproben darüber hinaus in den Nano- Computertomographen (Nano-CT\_2011, Firma SkyScan<sup>®</sup>, Kontich, Belgien) am Universitätsklinikum Gießen, Deutschland, geschickt. Vorbereitend für dieses Verfahren wird die Aorta descendens in einzelne Segmente unterteilt und zum Schutz vor Austrocknung in Parafilm<sup>®</sup>-Folie eingebettet.

### 2.5.1 Nano- Computertomographie

Der Nano- Computertomograph der Firma SkyScan<sup>®</sup> (Kontich, Belgien) setzt sich aus einem Gehäuse zusammen, welches die Strahlenquelle, einen Probeschlitten und eine hochauflösende CCD- Kamera zur Röntgenstrahldetektion enthält. Von außen ist das Gehäuse an eine Vakuumpumpe, einen Druckluftkompressor und einen Computer, welcher der dreidimensionalen Rekonstruktion der gewonnen Daten sowie der Systemkontrolle dient, angeschlossen.

Bei der Strahlenquelle handelt es sich um eine Mikrofokusröntgenröhre, welche mit einer Lanthanum Boride Kathode in ein evakuiertes System eingelassen ist. Der von der Kathode ausgehende Elektronenstrahl wird durch zwei elektromagnetische Linsen auf der Oberfläche der Anode gebündelt. Das Röntgenstrahl- Target, welches mit einer dünnen Wolframschicht an der Oberfläche des Beryllium Fensters überzogen ist, emittiert Röntgenstrahlung, die eine Fokusgröße von unter 400nm erzeugen kann. Die Röntgenstrahlung erreicht in Fächerstrahlgeometrie den Probeschlitten, eine luftgelagerte Rotationsbühne, die sich zwischen der Mikrofokusröntgenröhre und dem Röntgendetektor befindet.

Der Röntgenstrahldetektor besteht aus einer digitalen, wassergekühlten, hochauflösenden (1280x 1024 Pixel), faseroptischen 3.7:1 12-bit CCD Kamera, die mit einem digitalen Framegrabber verbunden ist. Die einzelnen Segmente der Aorta descendens werden in Parafilm<sup>®</sup>-Folie eingelassen, auf einem computergesteuerten Drehtisch positioniert und 180° entlang der vertikalen Achse in Drehschritten von 0,3°, bei einem Röhrenstrom von 180µA und einer Röhrenspannung von 40kV gescannt. Die Belichtungszeit pro Rotationsschritt liegt bei 2.4 Sekunden. Um das Signal- Rauschverhältnis zu optimieren werden vier Einzelbilder erzeugt, bei einer insgesamt Scanzzeit von zwei Stunden, die zu einer daraus resultierenden Aufnahme zusammengesetzt werden. Die gewonnen Daten werden im Feldkamp- Kegelstrahl- Rekonstruktionsmodus in eine zweidimensionale 8-bit Graustufen Darstellung, bestehend aus isotropen kubischen Voxeln mit einer Kantenlänge zwischen 4µm und 400nm, rekonstruiert.

### *2.5.2 Synchrotron- basierte Mikro- Computertomographie*

Um die atherosklerotischen Plaques und die dazugehörigen VV in der Aorta descendens der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel- Knockout Mäuse noch detailreicher quantifizieren zu können, werden die Gewebeproben mit der synchrotronbasierten Mikro- Computertomographie untersucht. Dazu bedienen wir uns der Beamline X2B am Synchrotron der National Synchrotron Light Source (NSLS) an den Brookhaven National Laboratories, Upton, NY, USA. Die Probe wird während des Scanvorgangs dabei um 360° entlang ihrer vertikalen Achse in 0,25 ° Schritten rotiert, woraus 1440 Aufnahmen resultieren. Die Rotationsachse wird dabei zu der Seitenkante des 5mm breiten Bildfeldes ausgerichtet. Bei konstanten Parametern wie einer Bandbreite von 50eV und einer nominalen Photonenenergie von 18 KeV werden dreidimensionale Aufnahmen erzeugt. Im Anschluss an die Datengewinnung können die Aufnahmen zu Schnittbildern, die eine 16- bit Grauwertverteilung aufweisen, zusammengefügt werden. Insgesamt erzielt man hierbei ein isotropes Auflösungsvermögen von 1,9 µm<sup>3</sup> Voxelgröße.



### 2.5.3 Quantitative Analyse

Im Folgenden werden in 1084 Transversalschnitten der Aorta descendens die Anzahl und die Gesamtfläche der adventitiellen Vasa Vasorum bestimmt sowie die vorhandenen atherosklerotischen Plaques vermessen.

Atherosklerotische Läsionen erkennt man anhand einer Einengung des Lumens oder anhand von lokalen Verdickungen der Aortenwand. Verschiedene Dichtewerte und Graustufungen grenzen die verbreiterte Gefäßwand gegenüber dem umgebenden Gewebe und dem mit Kontrastmittel gefüllten Lumen ab. Gemessen und berechnet werden in der Aorta descendens folgende Parameter:

1. Auszählung /Planimetrierung ( $\text{mm}^2$ ) der adventitiellen Vasa vasorum
2. Messung des aortalen Gesamtdurchmessers
3. Messung des aortalen luminalen Durchmessers
4. Planimetrierung der aortalen luminalen Oberfläche ( $\text{mm}^2$ )
5. Berechnung der Plaqueoberfläche ( $\text{mm}^2$ )
6. Berechnung des Gefäßwand/ Lumen Quotienten

Die Messungen werden mit dem Software Programm ANALYZE<sup>®</sup> (ANALYZE 9.0/10.0, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) vorgenommen. Dazu werden die Transversalschnitte von zehn 35 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Mäusen aus der Aorta descendens ausgewertet. Bei den untersuchten atherosklerotischen Läsionen handelt es sich ausschließlich um den fortgeschrittenen fibrotischen Plaquetyp. Die daraus gewonnen Daten sind als Wert je Transversalschnitt zu verstehen.

#### 2.5.3.1 Auszählung und Planimetrierung der adventitiellen Vasa vasorum

Zu den adventitiellen VV gehören venöse und arterielle Gefäße, welche an der äußeren Begrenzung der Media entlang oder auch ein wenig weiter peripher verlaufen, jedoch in den Bezug zum Media- Adventitia- Übergang zu bringen sind.

Eigenständige Gefäße, welche das um die Aorta gelegene Gewebe versorgen sowie im Plaque verlaufende Gefäße werden bei der Zählung nicht berücksichtigt.

In jedem zehnten transversalen Schnitt der Aorta descendens wird mittels Zählung die Anzahl an VV bestimmt. Um die Gesamtfläche der VV pro Transversalschnitt zu ermitteln wird jedes adventitelles Gefäß planimetriert. Die pro Schnitt erhaltenen einzelnen Werte werden zur Gesamtfläche eines jeden Transversalschnittes addiert und in  $\text{mm}^2$  angegeben.

### **2.5.3.2 Messung des aortalen Gesamtdurchmessers**

Als Orientierung für die Messung dient der Übergangsbereich zwischen dem periaortalen Gewebe und der Gefäßwand der Aorta, welcher sich durch eine unterschiedliche Grauwertverteilung abgrenzt. Es werden dabei jeweils zwei Werte (Einheit in mm) in einem Transversalschnitt festgelegt, welche senkrecht aufeinander stehen. Aus diesen beiden Werten wird der arithmetische Mittelwert bestimmt, der dann für die weiteren Messungen den aortalen Gesamtdurchmesser repräsentiert.

### **2.5.3.3 Messung des aortalen luminalen Durchmessers**

Aufgrund der Perfusion der Aorta mit Kontrastmittel ist es möglich das Lumen durch unterschiedliche Grauwerte von der Gefäßwand klar abzugrenzen.

Auch hier wählt man zwei senkrecht aufeinander stehende Werte (Einheit in mm) und ermittelt daraus den arithmetischen Mittelwert. Der aortale luminale Durchmesser wird in 1084 Transversalschnitten bestimmt.

### **2.5.3.4 Planimetrierung der aortalen luminalen Oberfläche**

Die aortale luminale Oberfläche grenzt sich ebenfalls durch eine Grauwertdifferenz von der Gefäßwand ab und wird in 1084 Transversalschnitten planimetriert und in  $\text{mm}^2$  angegeben.

### **2.5.3.5 Berechnung der Plaqueoberfläche**

Um die Plaqueoberfläche zu bestimmen benötigt man die aortale luminale Oberfläche und die aortale Gesamtoberfläche. Die aortale Gesamtoberfläche wird mit Hilfe der Kreisflächenformel „  $A = \pi \cdot (d/2)^2$  ” errechnet. Der Durchmesser d

entspricht dem Mittelwert des aortalen Gesamtdurchmessers (siehe 2.5.3.2). Der Wert für die aortale lumenale Oberfläche wird wie in 2.5.3.4 angegeben ermittelt.

Die Plaqueoberfläche ( $\text{mm}^2$ ) ergibt sich aus der Differenz der aortalen Gesamtoberfläche und der aortalen luminalen Oberfläche.

#### **2.5.3.6 Berechnung des Gefäßwand/ Lumen Quotienten**

Über den aortalen luminalen Durchmesser und die durchschnittliche Gefäßwanddicke kann man den Quotienten Gefäßwand /Lumen pro transversalem Schnitt ermitteln. Zunächst ermittelt man das arithmetische Mittel aus dem aortalen luminalen Durchmesser (2.5.3.3) und dem aortalen Gesamtdurchmesser(2.5.3.2) und bildet dann die Differenz aus beiden Werten. So erhält man die Summe der Dicke der Gefäßwand auf beiden Seiten des aortalen Lumens. Da wir aber nur die durchschnittliche Gefäßwanddicke auf einer Seite des aortalen Lumens ermitteln wollen, halbieren wir den gewonnen Wert. Die Formel lautet:

*Gefäßwanddicke = (arithmetischer Mittelwert des aortalen Gesamtdurchmessers - arithmetischer Mittelwert des aortalen luminalen Durchmessers) · ½*

Außerdem brauchen wir für die Berechnung des Gefäßwand/ Lumen Quotienten den arithmetischen Mittelwert des aortalen luminalen Durchmessers (2.5.3.3).

Schließlich dividiert man die durchschnittliche Gefäßwanddicke durch die Werte des aortalen luminalen Durchmessers und erhält daraus den Gefäßwand/ Lumen-Quotient.

## **2.6 Histologische Untersuchungsmethoden**

Sämtliche im  $\mu$ CT als auch im NCT eingescannten Gewebeproben werden für die sich anschließenden histologischen Untersuchungen präpariert. Um die Ergebnisse der bildgebenden Verfahren mit der Histologie vergleichen zu können, werden die histologischen Präparate am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen hergestellt und befundet. Für die kommenden Untersuchungen werden die angefertigten Präparate mit einem Lichtmikroskop (Axioskop Zeiss, Germany) verbunden an eine JVC Digital Camera (KY- F75U) in digitale Dateien konvertiert.

### *2.6.1 Zuschneiden des Gewebes und histologische Einbettung*

Im Anschluss an das Scannen der Proben im  $\mu$ CT und NCT erfolgt die Einbettung der einzelnen Segmente der deszendierenden Aorta in Paraffinwachs.

Das Paraffinwachs dient der Bewahrung der Integrität der Proben während der histologischen Aufarbeitung.

Eine Platzierung des Gewebes in vorgefertigten, siebartigen Einbettkassetten und eine Lagerung in 4,5% Formalin dient der sich anschließenden Paraffineinbettung. Über Nacht wird den Präparaten in ansteigender Alkoholreihe Wasser entzogen. Anschließend werden sie in Xylol fixiert. Das Einbetten im erhitzten, flüssigen Paraffinwachs soll einer homogenen Konsistenz und der Stabilität dienen, um später dünne und gleichmäßige Schnitte produzieren zu können. Das Paraffin wird fest und stabil, wenn es abkühlt. So dass die Präparate nun bereit zur histologischen Aufbereitung sind.

### *2.6.2 Anfertigung Histologischer Präparate*

Aus Paraffinblöcken werden unter Zuhilfenahme eines kreuzrollengeführten Schlittenmikrotoms die histologischen Präparate, in Form von Stufenschnitt- und Serienschnittpräparaten, mit einer Dicke von  $6\mu\text{m}$ , hergestellt. Bei einer Temperatur von  $36\text{-}38^\circ\text{C}$  im Wasserbad wird der im Paraffin fixierte Schnitt geglättet, gestreckt, auf einen Objektträger aufgezogen und über Nacht in einem Wärmeschrank ( $37^\circ\text{C}$ ) inkubiert, um eine bessere Haftung der Schnitte auf dem Objektträger zu erzielen. Zur Entfettung kommen die Schnitte für 10 Minuten zunächst in Xylol und werden anschließend in abnehmender Alkoholreihe gewässert. Jetzt können die unterschiedlichen Färbemethoden angewandt werden. Schließlich werden die histologischen Präparate luftdicht eingedeckt und verschlossen.

### *2.6.3 Färbemethoden*

Die Haematoxylin- Eosin- Färbung (HE) dient der Visualisierung atherosklerotischer Läsionen in der Aorta descendens. Mit dieser gebräuchlichen Routinefärbung ist es möglich die Ausdehnung sowie die Anzahl der atherosklerotischen Plaques zu bestimmen. Desweiteren wird eine Elastika Färbung nach Weigert und eine Goldner's- Masson- Trichrome- Färbung für die Identifizierung der glatten

Muskelzellen sowie der elastischen und kollagenen Fasern vorgenommen. Durch die Anfärbung dieser Strukturen kann man den Media- Adventitia- Übergang und das perivaskuläre Bindegewebe sichtbar machen. Aortale Gewebeproben, welche Hämorrhagien innerhalb eines atherosklerotischen Plaques aufweisen, können nach Identifizierung durch das NCT, über den Eisennachweis lichtmikroskopisch mit der Berliner- Blau- Färbung und zusätzlich mit einer 3,3`- Diaminobenzidine (DAB)- Intensivierung nachgewiesen und diagnostiziert werden.

Die verwendeten Materialien und die jeweilige Vorgehensweise sind im Anhang beschrieben und aufgelistet.

<b>Färbung</b>	<b>Darstellung</b>	<b>Farbreaktion</b>
Haematoxylin-Eosin-Färbung (HE)	Kern und Zellplasma	Kerne: blau Zytoplasma:rot
Haematoxylin-Eosin-Elastika-Färbung	Elastische Fasernetze	Elastische Fasern: violett /schwarz
Goldner's-Masson-Trichrome-Färbung	Kollagenfasern, Zellkerne und Zytoplasma	Zellkerne: schwarz Zytoplasma:rot Kollagenfasern:grün
Berliner-Blau-Reaktionsfärbung mit DAB- Intensivierung	Zellkerne, Eisen, Hämosiderin	Eisen/ Hämosiderin: blau Zellkerne: rot

**Tabelle 2.1:** Übersicht Färbemethoden

## **2.7 Korrelation der Schnittbilder aus der Synchrotron- basierten Mikro- und Nano-Computertomographie und Histologie**

Um eine Korrelation zwischen den digitalisierten histologischen Präparaten und den Schnittbildern aus dem Mikro- sowie dem Nano- CT zu ermitteln, werden die aus den CT- Datensätzen ermittelten Schnittbilder aufgesucht, welche eine Übereinstimmung mit denen der mikroskopischen Histomorphometrie aufzeigen.

Als Orientierung dienen hierbei die Form der Aorta sowie ihr dazugehöriger Durchmesser, die Ausdehnung atherosklerotischer Läsionen und das Verteilungsmuster begleitender Gefäße im periaortalen Bindegewebe. Dabei ist das Auffinden korrelierender Bilder erschwert, da durch das Zuschneiden der Gewebeproben Distorsionen in den histologischen Präparaten resultieren. Zudem sind die computertomographischen und die histologischen Schnittbilder unterschiedlich dick und es bestehen Unterschiede bezüglich der Pixelgröße der jeweiligen Bilder. Daher ist es nur annäherungsweise möglich Bilder zu finden, die eine Korrelation aufweisen.

## **2.8 Statistische Analyse**

Für die statistische Berechnung verwenden wir das Analyseprogramm JMP 5.1 (SAS, CA, USA) mit der Unterstützung durch die Abteilung für Biostatistik, Mayo Clinic, College of Medicine, Rochester/USA. Als Mittelwertvergleiche  $\pm$  Standardabweichungen werden die Daten der deskriptiven Statistik angegeben (MW  $\pm$  SEM). Der einfaktorielle Varianzanalysetest (One-way ANOVA) und der Tukey-Kramer Gegentest mit Fehlerkorrektur für mehrere Vergleiche dienen der Berechnung der statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen. Der jeweilige Vergleich zwischen den Gruppen wird mit dem unpaaren Student t-Test gemacht. In allen Berechnungen gehen wir für die statistische Wahrscheinlichkeit von einem Wert von  $p < 0,05$  aus.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 In-vitro- Zellversuche: Einfluss von Thalidomid auf Endothelzellen**

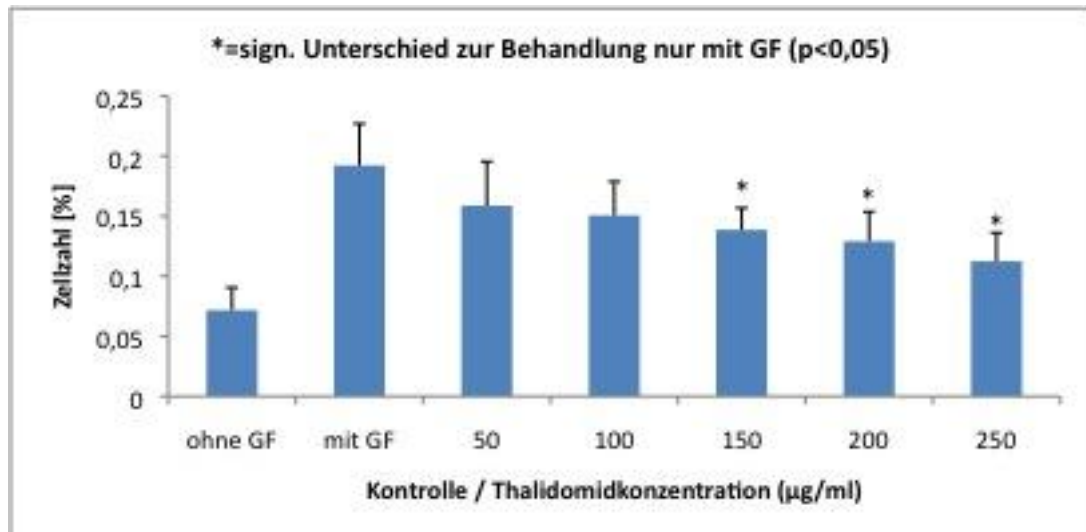
Um die antiangiogenetische Wirkung von Thalidomid zu untersuchen, wurde im Folgenden der Einfluss des Wirkstoffes in steigender Konzentration auf das Proliferations- sowie das Migrationsverhalten von humanen Endothelzellen in vitro untersucht.

Nach Auswertung der entsprechenden Assays konnte eine signifikante, dosisabhängige Inhibition der Proliferation und Migration von humanen Endothelzellen durch Thalidomidgabe bestätigt werden.

#### *3.1.1 Proliferationsassay*

Die dosisabhängige Hemmung der Proliferation humaner Endothelzellen unter dem Einfluss steigender Thalidomidkonzentrationen (50- 250µg/ml) konnte sowohl im WST- Assay als auch nach Anwendung des BrdU ELISA Kits der Firma Roche beobachtet werden.

Da nur lebende Zellen das Reagent Wst-1 metabolisieren und zu einem Farbumschlag von rot zu gelb führen, kann man bereits 20 Stunden nach der Zugabe von Thalidomid zu den Endothelzellen mit dem WST- Assay die abnehmende Anzahl der überlebenden Zellen über die Extinktion mit einem ELISA- Reader messen.

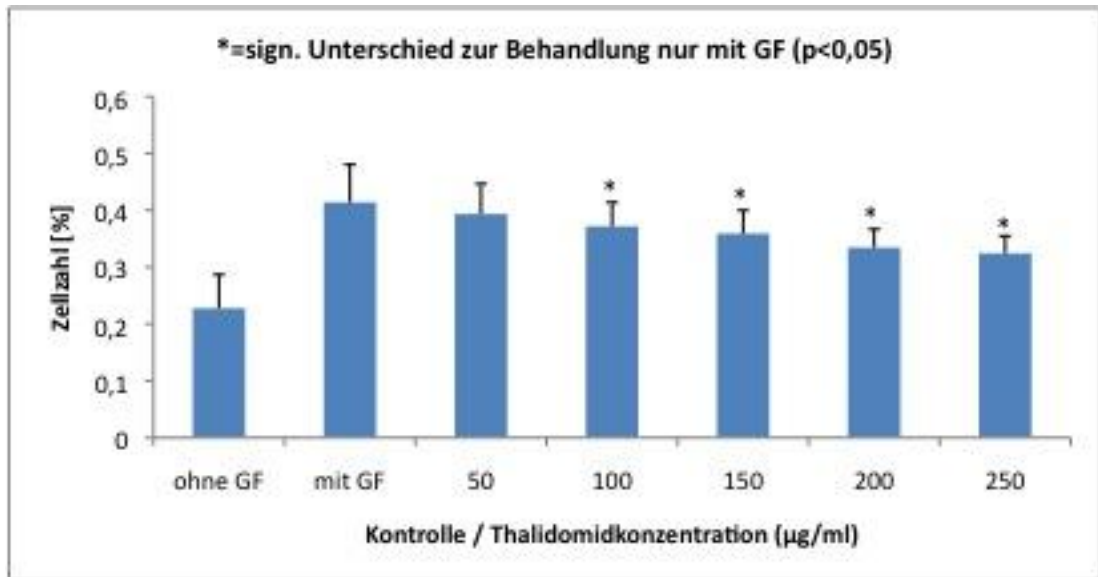


**Abbildung 3.1:** Der Effekt von Thalidomid auf die Proliferation von humanen Endothelzellen (EC). Die Auswertung des WST- Assays mit Endothelzellen nach Behandlung mit steigender Thalidomidkonzentrationen und Kontrollkonditionen ohne Thalidomid (ohne/mit Growth Factor) zeigt eine signifikante, dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität ab einer Thalidomidkonzentrationen von 150µg/ml und höher (20,1%± 3,5% vs. 12,2 ± 2,3%,  $p < 0,05$ ).

Weitere 8 Stunden nach dieser ersten Proliferationsmessung konnte man nach Zugabe des BrdU- Antikörpers eine weitere Farbentwicklung von blau nach gelb über die Extinktion im ELISA- Reader messen.

Die größte Proliferationsrate wiesen die Endothelzellen auf, welche nur mit Growth-Medium ohne Thalidomidzugabe behandelt wurden. Eine dosisabhängige, signifikante Abnahme der Proliferationsrate und damit der überlebenden Zellen ist nach Zugabe steigender Thalidomidkonzentrationen (50, 100, 150, 200, 250µg/ml) zu beobachten.

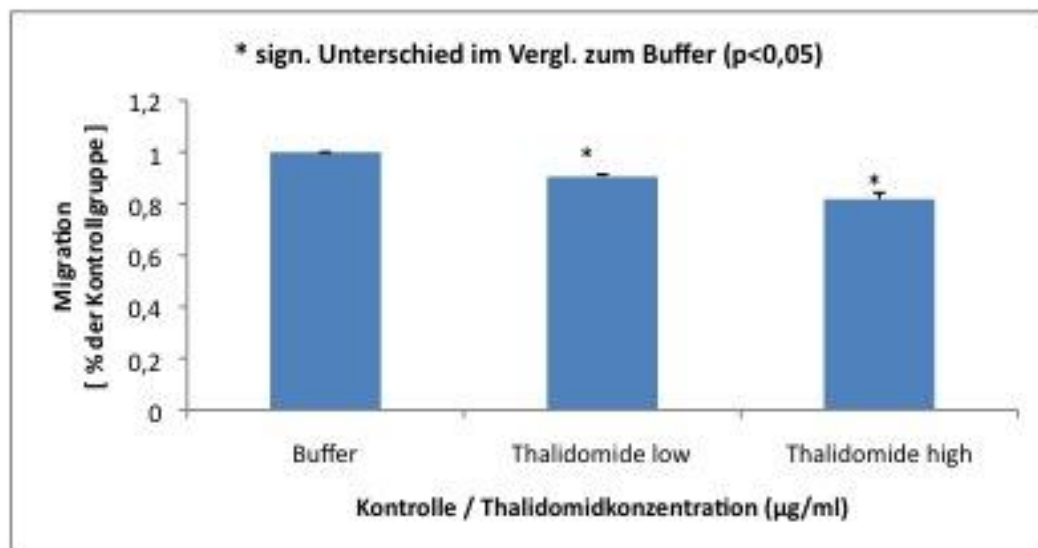




**Abbildung 3.2:** Der Effekt von Thalidomid auf die Proliferation von humanen Endothelzellen (EC). Die Auswertung des BrdU- Assays mit Endothelzellen nach Behandlung mit steigender Thalidomidkonzentrationen und Kontrollkonditionen ohne Thalidomid (ohne/mit Growth Factor) zeigt eine signifikante, dosisabhängige Abnahme der DNA-Replikation ab einer Thalidomidkonzentration von 100 µg/ml (42,4%± 6,6% vs. 33,4%±3%, p<0,05).

### 3.1.2 Migrationsassay

Die Auswertung des Migrationsassays ergab ebenfalls eine signifikante, dosisabhängige Inhibition der Endothelzellen unter dem Einfluss steigender Thalidomidkonzentrationen (250µg/ml, 500µg/ml). Nach Zugabe von Wst-1, ein Farbstoff welcher von lebenden Zellen metabolisiert wird, konnte der Farbumschlag von rot zu gelb gemessen werden. Dieser Farbumschlag spiegelt die Zahl der migrierten Endothelzellen durch die Poren der Polycarbonatmembran der 24well-Transwell-Platten wieder. Wie aus der Abb. 3.3 hervorgeht, wiesen die Endothelzellen der Kontrollgruppe (Buffer), welche nur dem Growth Medium ausgesetzt waren, die höchste Migrationsrate auf. Die Endothelzellen, welche der hohen bzw. niedrigen Konzentration an Thalidomid ausgesetzt waren, zeigen eine signifikante, dosisabhängige Hemmung der Migrationsrate ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3.3:** Der Effekt von Thalidomid auf die Migration von Endothelzellen (EC). Die Migration wird signifikant und dosisabhängig mit steigender Thalidomidkonzentration gehemmt. (linker Balken: FCS, ohne Thalidomide; mittlerer Balken: FCS + Thalidomide 250µg/ml; rechter Balken: FCS + Thalidomide 500µg/ml)

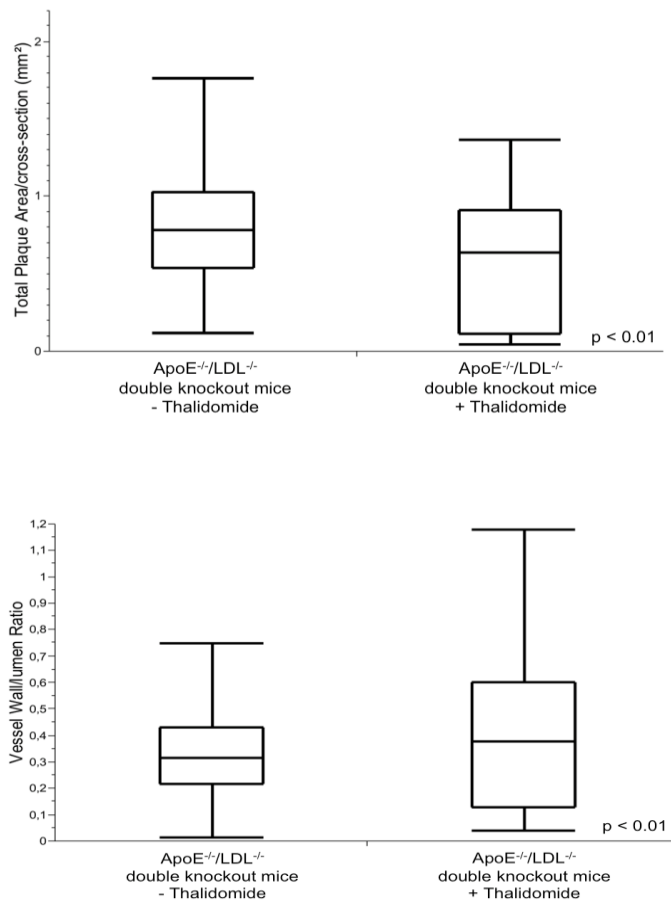
### **3.2 Quantifizierung atherosklerotischer Läsionen**

Mit Hilfe der Mikro- und Nano- Computertomographie war es möglich dreidimensionale Ansichten der Aorta descendens zu erzeugen, welche eine Quantifizierung und Analyse der atherosklerotischen Plaques sowie der adventitiellen VV ermöglichten.

Die Untersuchung der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel- Knockout Mäuse im Alter von 35 Wochen, mit 5 Tieren aus der Verumgruppe und 5 Tieren aus der Kontrollgruppe, zeigte Veränderungen im Bereich der Größe der atherosklerotischen Läsionen und der Fläche des aortalen Lumens (siehe Gefäßwand- Lumen- Quotient).

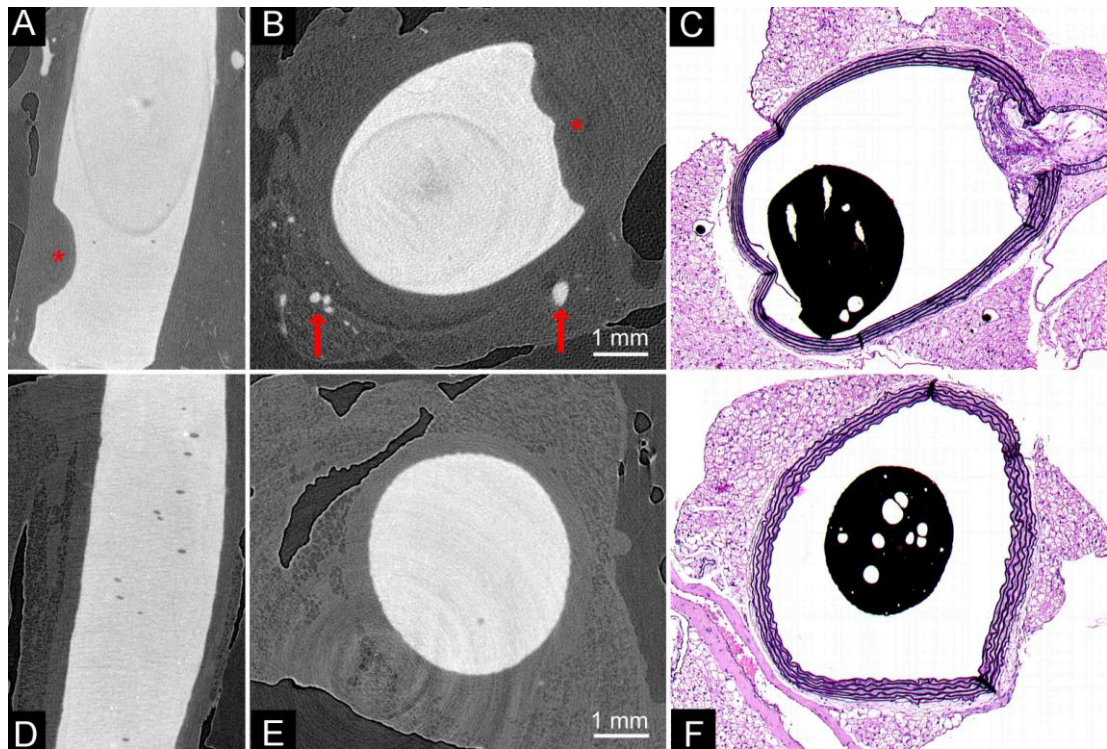
Die Mäuse der Verumgruppe, welche über einen Zeitraum von 29 Wochen eine Tagesdosis an Thalidomid von 200mg/kg verabreicht bekamen, wiesen signifikant kleinere atherosklerotische Plaques (mm<sup>2</sup>) als die Kontrollgruppe, die nur die atherogene Basisdiät alleine erhielt, auf (p<0,01) (Abb. 3.4; 3.5 D- F; 3.7 E- H).

Bezüglich der Plaquecharakteristik, welche mittels Bildgebung im NCT analysiert wurde, ist zu sagen, dass es sich bei allen Läsionen, in beiden Versuchsgruppen, um den fortgeschrittenen, fibrotischen Plaquetyp handelt.



**Abbildung 3.4:** Ergebnisse der statistischen Auswertung zu der Plaquesfläche (mm<sup>2</sup>) und des Gefäßwand- Lumen- Quotienten pro axialem NCT- Schnittbild in der Übersicht.

Auch ergab die vergleichende Untersuchung der 35 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Mäuse, dass der Gefäßwand- Lumen- Quotient nach Thalidomidgabe angehoben war, was sich auf kleinere atherosklerotische Plaques und folglich ein größeres aortales Lumen in dieser Versuchsgruppe zurückführen lässt (p<0,01) (Abb.3.4).



**Abbildung 3.5:** Signifikante Abnahme der Plaquefläche sowie der VV- Neovaskularisation nach Thalidomidgabe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den sagittalen und transversalen Einzelschnittbildern der Aorta descendens aus den Synchrotron- basierten-  $\mu$ CT- Datensätzen ( $1,9 \mu\text{m}$  Voxelgröße) einer 35 Wochen alten  $\text{ApoE}^{-/-}/\text{LDL}^{-/-}$ - Doppel- Knockout Maus nach Thalidomidverabreichung (D, sagittaler Schnitt; E, transversaler Schnitt) und einer gleich alten Maus aus der Kontrollgruppe (A, sagittaler Schnitt; B, transversaler Schnitt) stellt sich die Reduzierung der Plaquefläche (\* im Bild A,B) sowie der adventitiellen VV (Pfeile im Bild B) nach Thalidomidgabe dar.

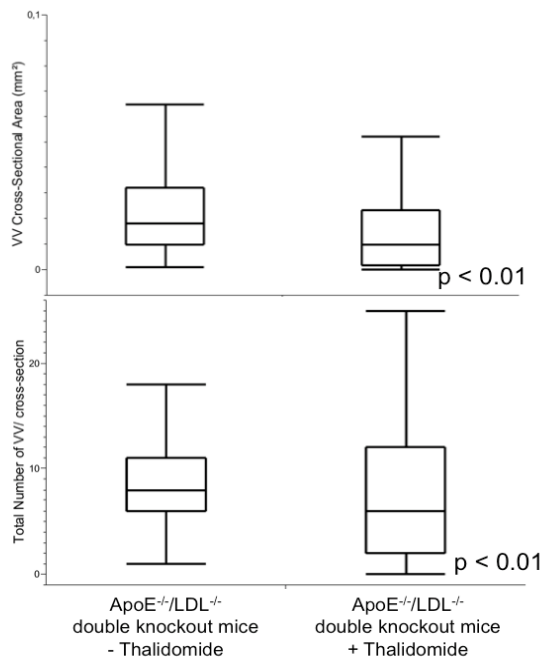
Die Abbildungen C (Kontrollgruppe) und F (Verumgruppe) zeigen die mit den  $\mu$ CT- Bildern korrespondierenden histologischen Schnitte der 35 Wochen alten Tiere (Elastika- und HE-Färbung, Vergrößerung  $\times 10$ ). Eine Verkleinerung des atherosklerotischen Plaques sowie eine Reduktion der VV nach Thalidomidgabe sind deutlich erkennbar.

### 3.3 Vasa Vasorum

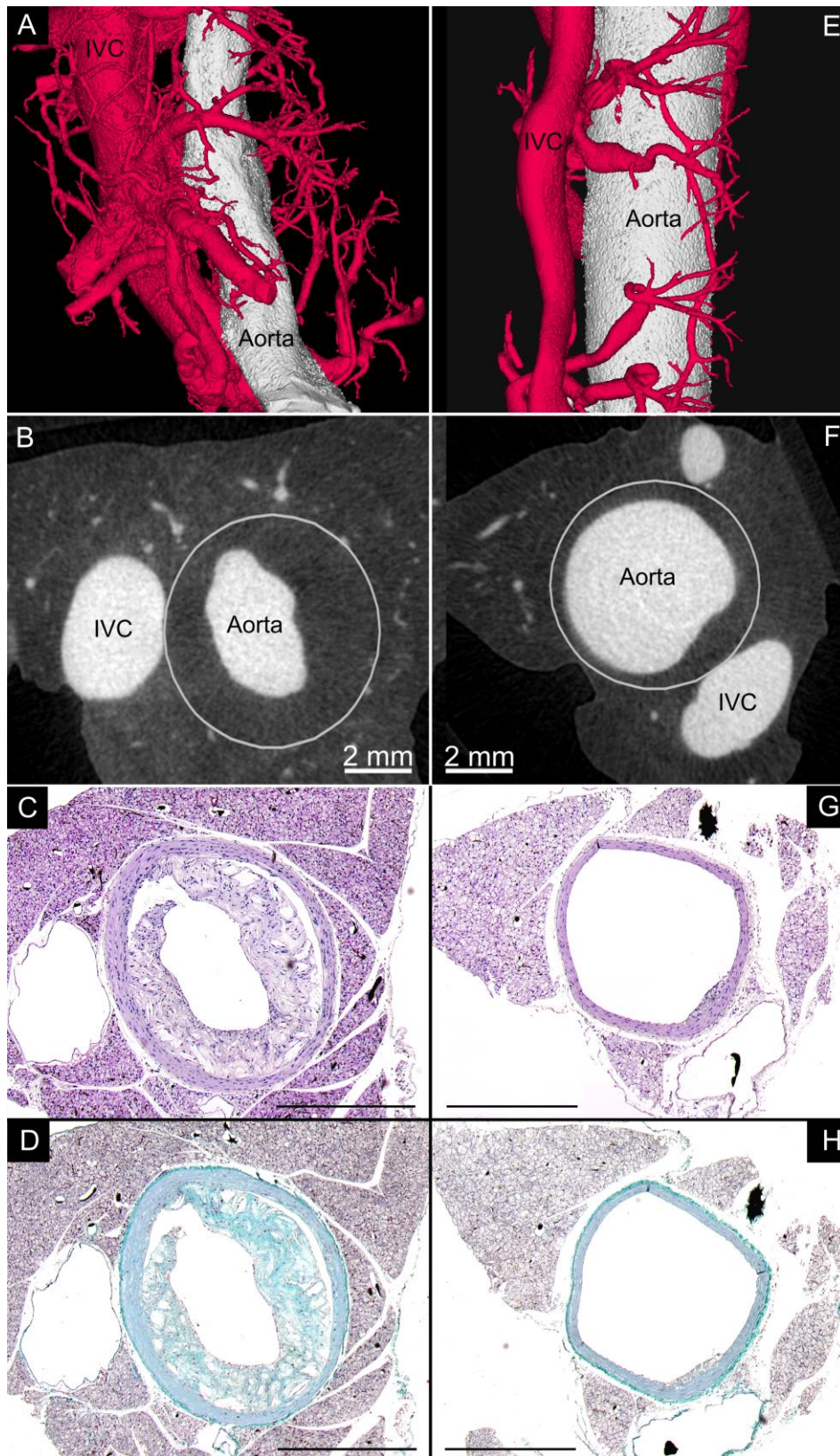
Die Auswertung und Analyse der Messergebnisse zeigte, dass sowohl die Gesamtfläche ( $\text{mm}^2$ ) als auch die Anzahl der VV pro axialem NCT- Schnittbild von 35 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Mäusen in der Verumgruppe und damit die VV-Neovaskularisation, im Vergleich zur Kontrollgruppe, einen signifikanten Rückgang verzeichnet (Abb.3.6; 3.7 E, F, G, H).

Die Tiere der Kontrollgruppe wiesen hingegen mehr VV entlang der deszendierenden Aorta und folglich eine größere Gesamtfläche der VV ( $\text{mm}^2$ ) im NCT- Schnittbild auf. Die statistische Auswertung lieferte vergleichbare Ergebnisse bei der Gesamtfläche ( $\text{mm}^2$ ) und Anzahl der VV pro Einzelschnittbild ( $p < 0,01$ ) (Abb. 3.6).

Thalidomid inhibiert folglich die Neoangiogenese von VV in atherosklerotischen Läsionen.



**Abbildung 3.6:** Ergebnisse der statistischen Auswertung der Gesamtfläche der VV ( $\text{mm}^2$ ) und Anzahl der VV pro axialem NCT- Schnittbild in der Übersicht.



**Abbildung 3.7:** Deszendierende Aorten von  $ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}$  Doppel- Knockout Mäusen im Alter von 35 Wochen nach Thalidomidverabreichung über 29 Wochen (E-H) und

*Kontrollgruppe (A-D). Die dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion aus NCT-Datensätzen (Voxelgröße 1,2µm) der Aorta descendens mit ihren begleitenden Gefäßstrukturen zeigt die signifikante Abnahme der VV in der Verumgruppe (E) im Vergleich zur Kontrollgruppe (A). Die axialen Einzelschnittbilder aus NCT- Datensätzen, bei welchen die Grenze zwischen Tunica Media und Tunica Adventitia mit einem grauen Kreis hervorgehoben ist, verdeutlichen ergänzend die Abnahme der Plaquefläche sowie der Anzahl der VV nach Thalidomidgabe (F), im Vergleich zur Kontrollgruppe (B). Die histologische Aufarbeitung der Aorta descendens Segmente (C, D, G, H) verifiziert die Ergebnisse aus dem NCT (C, G: HE- Färbung; D, H: Masson Trichrome Färbung) und verdeutlicht die Lokalisation sowie die signifikante Abnahme der VV- Anzahl und der Größe der atherosklerotischen Läsionen von der Kontrollgruppe (C,D) zur Verumgruppe (G,H).*

---

Vergleicht man die statistische Auswertung aller Messwerte (Abb.3.4, 3.6) sieht man, dass die Anzahl sowie die Gesamtfläche der VV mit der Plaquefläche (mm<sup>2</sup>) bei den untersuchten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Mäusen korreliert. Die Mäuse, welche über 29 Wochen eine tägliche Dosis von 200mg/kg Thalidomid verabreicht bekamen, wiesen kleinere atherosklerotische Läsionen, als auch eine reduzierte Anzahl und Gesamtfläche an VV, im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe, auf (Abb.3.5,3.7).



## 4 Diskussion

Da die Atherosklerose mit ihren Komplikationen und klinischen Folgeerscheinungen heute die häufigste Ursache für den Tod in den westlichen Industrienationen darstellt,<sup>1</sup> muss die Aufklärung der Pathomechanismen, welche zur Initiation und Progression atherosklerotischer Läsionen führen, sowie die Ermittlung neuer Therapieansätze auch in Zukunft im Fokus der Wissenschaft stehen.

In der Vergangenheit limitierten bildgebende Verfahren durch mangelnde Auflösung die Gefäßdiagnostik. Neue Technologien, wie das  $\mu$ CT und das NCT, ermöglichen es der Wissenschaft, als auch dem Kliniker neue Erkenntnisse im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen zu erlangen und neue Therapieansätze zu generieren.

In den letzten Jahren arbeiteten diverse Arbeitsgruppen, auch unter Nutzung dieser modernen bildgebenden Verfahren, den Zusammenhang zwischen der VV-Neovaskularisation, der Inflammation und atherosklerotischen Plaquewachstums heraus.<sup>116; 117; 189</sup> Wie in zahlreichen Studien bereits gezeigt werden konnte, unterhält die VV-Neoangiogenese atherosklerotisches Plaquewachstum.<sup>189; 116</sup> Es handelt sich dabei um zwei miteinander korrelierende Prozesse, welche in einem dynamischen Zusammenhang zueinander stehen.<sup>51</sup>

Das Arzneimittel Thalidomid, welches auch im Mittelpunkt unserer Studie stand, kristallisierte sich im Hinblick auf die Pathogenese stenosierender Gefäßalterationen dabei als antiinflammatorischer<sup>190; 191</sup> und antiangiogenetischer<sup>116; 192</sup> Wirkstoff heraus, der die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine<sup>190; 191</sup> und angiogenetischer Faktoren<sup>116; 192</sup> modulieren kann.

Bezüglich der Herkunft der angiogenetischen Faktoren, welche für die Neoangiogenese adventitieller VV verantwortlich sind sowie der Funktion der neugebildeten Gefäße werden mehrere Theorien diskutiert.<sup>62; 48; 64</sup> Zur Zeit ist es noch nicht möglich Aussagen zu treffen, in wie weit die VV-Neovaskularisation und die Inflammation sich dabei gegenseitig beeinflussen und welcher Prozess welchem vorausgeht. Desweiteren gilt es die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Tiermodelle auf den Menschen zu analysieren, so dass trotz vieler bereits gewonnener

Erkenntnisse das Krankheitsbild der Atherosklerose also auch zukünftig noch der Zuwendung durch die Grundlagenforschung bedarf.

#### **4.1 Thalidomid**

Thalidomid wurde ursprünglich von der Firma Grünenthal 1957 auf den europäischen Markt, als barbituratfreies Schlaf- und Beruhigungsmittel, unter dem Markennamen Contergan<sup>®</sup>, eingeführt.<sup>70</sup> Bereits vier Jahre später wurde dem Wirkstoff, aufgrund von Missbildungen Neugeborener und einer unbekanntem Zahl von Fehlgeburten, die Zulassung entzogen. Die Einnahme von Thalidomid innerhalb des ersten Trimenons führte zu schwersten teratogenen Fehlbildungen der Gliedmaßen, wie der Dysmelie (radiale Klumphant), dem Fehlen von Röhrenknochen (Phokomelie) oder dem völligen Fehlen von Organen und Gliedmaßen (Aplasie).<sup>71; 72</sup>

Thalidomid führt zu einer Blockade des Wachstumsfaktors VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), weshalb es zu einer Hemmung der Angiogenese in den Extremitäten der Neugeborenen gekommen war. Mit der Folge meist beidseitig fehlender oder verkürzter Beine und Arme.<sup>193</sup> Man fand heraus, dass das Protein Cereblon als teratogenes Target für Thalidomid dient. Cereblon bildet mit anderen Proteinen einen Komplex, der die Bildung von Gliedmaßen steuert und durch die Bindung von Thalidomid in seiner Aktivität gehemmt wird.<sup>193</sup>

Trotz dieser grausamen Erkenntnis bezüglich der Nebenwirkungen von Thalidomid erfuhr der Wirkstoff schon wenige Jahre nach seiner Marktrücknahme eine Renaissance. Mittlerweile wird der Wirkstoff Thalidomid für eine ganze Reihe von Krankheiten, vom Multiplen Myelom bis hin zum Erythema nodosum leprosum, klinisch eingesetzt. Studien belegen, dass es über die Hemmung der TNF- $\alpha$  – und VEGF-Produktion und damit der VV- Neovaskularisation, auch möglich ist mit Thalidomid frühe atherosklerotische Läsionen in ihrem Wachstum zu hemmen.<sup>116</sup>

Man weiß heute, dass Thalidomid ein antiinflammatorisches, immunmodulatorisches und antiangiogenetisches Arzneimittel ist, welches, wie bereits erwähnt, in die komplexen Prozesse der Inflammation und Angiogenese einzugreifen vermag.<sup>194; 195</sup>

Diverse Arbeitsgruppen erbrachten bereits den Beweis, dass der Wirkstoff die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine<sup>190; 191</sup>, sowie angiogenetischer Faktoren<sup>116; 192</sup> beeinflussen kann. Die Ausbildung neuer Gefäßstrukturen, wie man

sie in pathologischen Prozessen, wie in Neoplasien und atherosklerotischen Läsionen beobachten kann, ist zum einen von angiogenetischen Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF sowie von der Proliferation und Migration von Endothelzellen in das Gewebe abhängig.<sup>196; 197</sup>

Im Fokus unserer Studie stand die Inhibition der adventitiellen VV-Neovaskularisation innerhalb atherosklerotischer Plaques. Deshalb sollten zunächst humane Endothelzellen in- vitro als kleinste Versuchseinheit, repräsentativ für den komplexen Prozess der Angiogenese, auf ihr Verhalten nach Thalidomidgabe untersucht werden.

Mit Hilfe zweier etablierter Assays konnte der inhibierende und dosisabhängige Einfluss von Thalidomid auf das Proliferations- und Migrationsverhalten von humanen Endothelzellen in- vitro gezeigt werden. Damit sind unsere Ergebnisse mit zahlreichen uns vorausgehenden Studien zu vergleichen.<sup>100; 89; 116</sup>

Da die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen eng mit der Neovaskularisation von VV<sup>189</sup> und der adventitiellen Inflammation<sup>198</sup> verbunden ist, war es Ziel der Studie über die Hemmung der VV- Neovaskularisation, mit Hilfe des potentiell antiangiogenetischen und antiinflammatorischen Wirkstoffes Thalidomid, atherosklerotisches Plaquewachstum zu inhibieren. Anhand der Quantifizierung atherosklerotischer Gefäßläsionen entlang der deszendierenden Aorta von fünf 35 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> Doppel- Knockout Mäusen nach Thalidomidverabreichung und von fünf gleich alten Mäusen aus der Kontrollgruppe im NCT, gelang der Nachweis des antiangiogenetischen und des Plaquewachstum reduzierenden Effektes des Wirkstoffes. Mäuse, welche über 29 Wochen eine atherogene Diät mit Thalidomidzusatz (200mg/kg pro Tag) verabreicht bekamen, wiesen signifikant, kleinere Läsionen und weniger VV auf, als die Kontrollgruppe. Die Größe der atherosklerotischen Läsionen korreliert dabei mit der VV-Neovaskularisation. Eine reduzierte Anzahl an adventitiellen VV ging mit einer reduzierten Plaquegröße einher, so dass sich auch hier der bereits entdeckte Zusammenhang zwischen Plaquewachstum und der Neoangiogenese adventitieller VV bestätigt.<sup>189</sup> Auch wird diese Annahme durch die Ergebnisse aus den begleitenden in vitro Zellversuchen mit humanen Endothelzellen gestützt.

Unsere Arbeit schließt sich hiermit einer Reihe von Studien an, die ebenfalls den Wirkstoff Thalidomid im Hinblick auf die Therapie stenosierender Gefäßalterationen untersuchten.<sup>117; 116</sup>

Der „anti- atherosklerotische“ Wirkungsmechanismus von Thalidomid ist dabei vermutlich auf einen synergistischen Effekt zwischen seiner antiinflammatorischen und antiangiogenetischen Wirkung zurückzuführen.

Chew et al machten die inflammatorische Komponente der Atherosklerose, indem sie sich gezielt mit der antiinflammatorischen Wirkung von Thalidomid beschäftigten, zum Mittelpunkt ihrer Studie. Mit Hilfe des Wirkstoffes konnte sie in ihrer Arbeit zeigen, dass man über die Inhibition der Ausschüttung von TNF $\alpha$  frühe atherosklerotische Läsionen in ihrem Wachstum beeinflussen kann.<sup>117</sup>

Die Arbeitsgruppe von Gössl et al untersuchte 2009 an Schweinen den Einfluss von Thalidomid auf die zusammenhängenden Prozesse der VV- Neovaskularisation, adventiteller Inflammation und Plaquewachstum. Die Tiere der Verumgruppe entwickelten durch eine cholesterinreiche Experimentaldiät frühe atherosklerotische Läsionen und bekamen für drei Monate 200mg Thalidomid pro Tag verabreicht. Im  $\mu$ -CT konnte die Abnahme der VV- Gesamtfläche in Koronararterien festgestellt werden. Über diverse labortechnische Untersuchungen des koronaren Gewebes, wie z.B. dem Western Blot, konnte man die Abnahme des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  und des angiogenetischen Faktors VEGF im Gewebe Thalidomid behandelter Tiere nachweisen.<sup>116</sup> Auch dieses Ergebnis unterstreicht den synergistischen Effekt des Wirkstoffes.

Die Arbeitsgruppe von Moulton et al bediente sich hingegen des antiangiogenetischen Wirkstoffes Angiostatin in ihren Studien rund um atherosklerotisch bedingte Gefäßveränderungen. Sie konzentrierten sich 2003 gezielt auf das inflammatorische Geschehen als potentiell auslösenden Faktor für die Formation neuer Gefäße innerhalb atherosklerotischer Plaques. Sie stellten die These auf, dass Entzündungszellen selbst über die Ausschüttung angiogenetischer Faktoren die Gefäßneubildung initiieren, um sie dann als Eintrittspforten in das bereits chronisch, entzündliche Geschehen innerhalb des bestehenden Plaques zu nutzen. Sie beobachteten dabei eine Korrelation zwischen der Dichte der VV und der Anzahl der anwesenden Entzündungszellen. Über die Hemmung der VV- Neovaskularisation mit

Angiostatin gelang es auch ihnen atherosklerotisches Plaquewachstum zu inhibieren. Darüberhinaus stellten sie ergänzend die These auf, dass man über die Inhibition der Gefäßneubildung innerhalb der Läsion und die Reduktion der Makrophagenanzahl den atherosklerotischen Plaque, im Hinblick auf Rupturen und Hämorrhagien, stabilisieren kann.<sup>62</sup>.

Unsere Studie ergänzt die bisher gewonnen Erkenntnisse bezüglich des Effektes von Thalidomid auf atherosklerotisches Plaquewachstum in soweit, dass man bisher den Wirkstoff nur im Zusammenhang mit frühen Läsionen beschrieben hat. Die Tiere unserer Studie entwickelten jedoch fortgeschrittene, fibrotische Plaques und auch in diesem Plaquestadium konnte Thalidomid seine antiangiogenetische Wirkung entfalten konnte.

Was als ein besonderer Erfolg zu werten ist, aufgrund der Tatsache, dass, wie in 1.2 bereits erwähnt, in dem Stadium fortgeschrittener Läsionen eine besonders hohe Anzahl an VV aufzufinden ist.<sup>54; 55</sup>

In sich uns anschließenden Studien wird es darauf ankommen, im Detail zu untersuchen in wie weit man über die Beeinflussung der pathologischen Vorgänge der VV-Neovaskularisation und der Inflammation, Plaquewachstum aufhalten kann. Es muss geklärt werden, welcher dieser pathologischen Prozesse sich als erster in einer atherosklerotischen Läsion manifestiert, auch wenn bewiesenermaßen Thalidomid beide Vorgänge hemmt.

Bezüglich der Neoangiogenese während der Atherosklerose gibt es zur Zeit mehrere Theorien, welche es zukünftig verlangen genau untersucht und konkretisiert zu werden.

Sind es die chronisch vermittelten Entzündungsvorgänge mit destruirendem Einfluss auf die medialen und intimalen Gefäßschichten, die über die Ausschüttung angiogenetischer Faktoren zur Neubildung von VV führen<sup>62; 199; 63</sup> oder sind hingegen die neu entstandenen adventitiellen Gefäße, die sich in Folge der ausgelösten Hypoxie durch Plaqueauflagerungen formieren<sup>48</sup>, erst die Voraussetzung für das Einwandern von Entzündungszellen.

Desweiteren wird zu klären sein, welcher der von Thalidomid beeinflusste molekulare Mechanismus, ob die VV- Neoangiogenese oder die Inflammation, im

Verlauf der Pathogenese der Atherosklerose letztlich der ausschlaggebende Faktor für die Reduktion des Plaquewachstums darstellt.

Auch muss analysiert werden in wie weit sich die in Tiermodellen simulierten atherosklerotischen Läsionen auf den Menschen übertragen lassen.

Ob sich Thalidomid tatsächlich zur Behandlung früher als auch fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen in Zukunft durchsetzen wird, ist zur Zeit noch ungewiss. Die in 1.3.3 erwähnten Nebenwirkungen werden sicherlich nicht den klinischen Einsatz im Bereich der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen verhindern, da sie gut auf die Reduktion der Dosis ansprechen und hierüber zu kontrollieren sind. Zudem werden sie meist von den Patienten toleriert.

## **4.2 Bildgebung**

In der Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen etablierten sich neue nicht-invasive sowie invasive Methoden, wie die digitale Subtraktionsangiographie,<sup>152; 153</sup> die Mehrzeilen- Computertomographie,<sup>159-161</sup> der intravaskuläre Ultraschall<sup>155</sup> und die MR- Angiographie.<sup>162-164</sup>

Mit Hilfe dieser modernen bildgebenden Verfahren konnte zum einen die klinische Diagnostik verbessert, als auch im Bereich der Grundlagenforschung wichtige Fortschritte gemacht werden. Limitierender Faktor dieser Untersuchungsverfahren ist jedoch eine Ortsauflösung von maximal 400µm. Durch den Einsatz von folienlosen Materialprüffilmen oder einer Feinfokusröntgenröhre ist es zwar möglich eine höhere Auflösung zu erzeugen, jedoch kann man anhand der erzielten Projektionsradiographien keine dreidimensionale Quantifizierung vornehmen.<sup>200</sup> Die Visualisierung von prä- und postkapillären Blutgefäßen, also Strukturen welche unter 400µm liegen oder die Charakterisierung der verschiedenen Plaquestadien ist hiermit limitiert.

Die histologische Untersuchungsmethode dient als Goldstandard zur Darstellung und Quantifizierung von Strukturen in einer Größenordnung von <200µm. Das zu untersuchende Gewebe wird aufgearbeitet und anschließend angefärbt, so dass sich verschiedene Gefäßwandparameter analysieren lassen. Die Auswertung der Serienschnittpräparate kann bei der mikroskopischen Histomorphometrie, jedoch nur semi- quantitativ erfolgen. Eine Zerstörung des zu untersuchenden Gewebes ist dabei

unumgänglich und macht die weitere Untersuchung mit Hilfe anderer bildgebender Verfahren unmöglich. Die Kontinuität des Präparates kann bei diesem Analyseverfahren nicht gewahrt werden, da das zu untersuchende Gewebe aus der Gesamtheit des Präparates gelöst wird. Auch kann nach einer unspezifischen, willkürlichen Wahl eines  $\mu\text{m}$  großen Segmentes, die Probe nicht ihrer Gesamtheit quantifiziert werden. Atherosklerotische Läsionen, welche im Gefäßbaum heterogen verteilt sind, können in ihrer Verteilung nicht ausreichend erfasst werden. Die Darstellungsmöglichkeiten der Weichteile und Gefäße bewegen sich im zweidimensionalen Raum, so dass volumetrische Messungen nur sehr begrenzt vorgenommen werden können. Die Histomorphometrie ermöglicht trotzdem eine äußerst detailreiche Visualisierung von Strukturen, wie sie bisher mit den in der Klinik zum Einsatz kommenden bildgebenden Verfahren nicht zu erzeugen ist.<sup>171</sup> Über stereologische Methoden, die allerdings auch zu den destruktiven Methoden gehören, kann man unter Nutzung mathematischer und statistischer Berechnungen aus zweidimensionalen Bildern mikroskopisch kleiner Strukturen Dreidimensionalität erzeugen.<sup>201</sup>

Im letzten Jahrzehnt sind im Bereich der biomedizinischen Forschung zwei neue Technologien auf den Markt gekommen, die eine dreidimensionale Untersuchung des Gewebes ermöglichen und als potentielle Alternative zur quantitativen Histologie gelten. In der ex- vivo Grundlagenforschung etablierten sich zunächst die Mikro- ( $\mu\text{CT}$ )<sup>172; 184; 185; 202</sup> und im Folgenden die Nano- Computertomographie (NCT)<sup>173; 174</sup> zur Quantifizierung von Gewebeproben. Die gewonnen dreidimensionalen Datensätze, welche sich aus isotropen Voxeln zusammensetzen, erzielen CT- Bilder mit einer Ortsauflösung von 5- 10 $\mu\text{m}$  im  $\mu\text{CT}$  und bis zu 150nm im NCT.<sup>177; 179</sup>

Kurz nach der Einführung in den achtziger Jahren wurde das  $\mu\text{CT}$  anfänglich nur im Bereich der Knochenforschung eingesetzt.<sup>181; 182</sup> Durch die unterschiedlichen Dichtewerte der Knochenmarkräume und der Matrix ist es möglich dreidimensionale Bilder von hoher Qualität zu erzeugen, so dass das  $\mu\text{CT}$  bis heute noch eine gefragte Methode in der Analyse knöcherner Strukturen, wie in der Osteoporoseforschung, darstellt.<sup>177; 183</sup>

Die Arbeitsgruppe um Jorgensen et al bediente sich als erstes dieses bildgebenden Verfahrens zur Analyse vaskulärer Strukturen.<sup>184</sup> Durch die intravaskuläre

Kontrastmittelapplikation gelang es Gefäßstrukturen an isolierten Organen, wie Vasa vasorum von Koronargefäßen oder Koronarien von Ratten<sup>185</sup>, dreidimensional darzustellen. Die Strukturanalyse und Quantifizierung pathologischer Gefäßveränderungen sowie die Aufklärung vaskulärer Verzweigungs- und Verteilungsmuster wurde möglich.<sup>203-205</sup>

Segmentation und Extraktionsalgorithmen helfen Gefäßverzweigungsmuster als auch die vaskuläre Dichte und das vaskuläre Volumen detailliert zu analysieren. 1998 konnte mit Hilfe der  $\mu$ CT- Technologie schon ein Bezug zwischen der VV- Neovaskularisation und atherosklerotisch bedingten Gefäßalterationen in Koronarien hergestellt werden.<sup>48</sup>

Das  $\mu$ CT wurden bereits von vielen Arbeitsgruppen für Studien genutzt, um beispielsweise Pulmonalarterien, Corpora cavernosa und den arteriellen und portalvenösen Lebergefäßbaum zu untersuchen.<sup>206; 203; 207; 204</sup>

Heute ist eine detaillgetreue, dreidimensionale Darstellung von Gefäßnetzwerken und ihrer volumetrischen Analyse durch die Technologie der Mikro- Computertomographie, welche immer häufiger für die Aufklärung mikrovaskulärer Struktur- Funktionsbeziehungen zum Einsatz kommt, realisierbar.<sup>208; 209</sup>

Die Perfusion von Organen mit Kontrastmittel (z.B. Microfil<sup>®</sup>) und der anschließende Scan- Vorgang im Mikro- CT birgt im Bereich der Gefäßanalytik nie dagewesene Einblicke. Diverse Kontrastmittel mit den unterschiedlichsten Inhaltsstoffen kommen für die ex- vivo Angiographie in Frage. In der biomedizinischen Forschung kommen beispielsweise Suspensionen aus Bariumsulfat und Gelantine (z.B. Baritop) zum Einsatz. Verstärkt wird jedoch das silikon- und chromathaltige Kontrastpolymer Microfil<sup>®</sup> verwendet.<sup>171; 184</sup> Bewiesenermaßen perfundiert Microfil, welches in gummiartiger Konsistenz aushärtet, mehr Gefäße als Kontrastmittel, die Bariumsulfat enthalten.<sup>187</sup> Dabei können Gefäße mit einem Durchmesser unter 20 $\mu$ m kontrastreich mit Hilfe bildgebender Verfahren dargestellt werden.<sup>188</sup>

Das 2005 von der belgischen Firma SkyScan vorgestellte NCT ist ein weiteres nicht- destruktives Verfahren zur Darstellung von Strukturen im Submikrometerbereich, welches völlig neue Möglichkeiten im Bereich bildgestützter Grundlagenforschung offeriert. Die Mikrostrukturanalyse wird durch eine Ortsauflösung, welche Strukturen im Bereich von 200nm abbilden kann, ermöglicht, was einen enormen Fortschritt im



Bereich der Wissenschaft darstellt. Die Anwendung des NCT's ist bisher auf eine mindere Zahl von Einsatzgebieten, wie in der Materialwissenschaft<sup>179</sup> und in der biomedizinischen Forschung<sup>173; 180</sup>, beschränkt.

Die emittierten Röntgenstrahlen, welche eine Fokusgröße von <400nm aufweisen, erlauben die Analyse kleinster vaskulärer Binnenstrukturen und Weichteildetails.<sup>173;</sup>

174

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Thalidomid auf die Atherogenese im Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Maus unter der Nutzung der Technologie der Mikro- und Nano- Computertomographie untersucht.

Im Kleintiermodell der Knockout Maus gelang es uns den Zusammenhang zwischen der Inhibition der Neovaskularisation von VV und der damit einhergehenden Abnahme des Plaquewachstums mit Hilfe der bildgebenden Verfahren zu demonstrieren.

Die Verumgruppe wies kleinere atherosklerotische Plaques (mm<sup>2</sup>) und bezogen auf die Anzahl sowie die Fläche (mm<sup>2</sup>) weniger VV als die Kontrollgruppe auf. Diese zwei Beobachtungen können in einen deutlichen Zusammenhang gebracht werden. Die Anzahl der VV und die jeweilige Plaquetypgröße sind also voneinander abhängig und korrelieren miteinander. In unserer Studie identifizierten wir mittels der genannten bildgebenden Verfahren, wie bereits erwähnt, die sich bei den ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel- Knockout Mäusen entwickelten atherosklerotischen Läsionen, als den „fortgeschrittenen fibrotischen Plaquetyp“. Die Neoangiogenese von VV innerhalb eines atherosklerotischen Geschehens ist als ein dynamischer Prozess zu verstehen von dem die Plaquetypgröße abhängt.<sup>210</sup>

Unsere Ergebnisse sind vergleichbar mit Studien, die eine Abnahme des Plaquevolumens nach Thalidomidgabe in frühen Plaquestadien beschreiben.<sup>117</sup>

Mit unserer Arbeit reihen wir uns durch die Nutzung der Mikro- Computertomographie, als bildgebendes Verfahren, in den derzeitigen Stand der Grundlagenforschung ein. Zusätzlich bedienen wir uns als erste Arbeitsgruppe, im Hinblick auf die Thalidomidstudie von Gössl et al im Jahre 2009, der modernen Technologie der NCT zur Quantifizierung der stenosierenden Gefäßläsionen und ihrer adventitiellen VV nach Thalidomidgabe.

Sämtliche über die Computertomographie akquirierten Daten wurden den Werten aus der mikroskopischen Histomorphometrie gegenübergestellt. Die Mikro- und Nano-CT bewährten sich beim Vergleich der Messergebnisse, welcher eine hohe Korrelation ergab, als verlässliche bildgebende Verfahren in der Quantifizierung atherosklerotischer Läsionen und ihrer VV im Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout Maus.

Die Rolle der VV- Neovaskularisation innerhalb atherosklerotischen Plaquewachstums machten sich schon viele Arbeitsgruppen zum Fokus ihrer Forschung<sup>55</sup> und wird schon seit langem diskutiert. Doch erst mit Hilfe neuer Technologien wie der Mikro- und Nano- Computertomographie können stenosierende Gefäßläsionen bezüglich ihres Aufbaus, ihrer Größe sowie das Verteilungsmuster der dazugehörigen VV analysiert werden.<sup>189</sup> Prozesse wie die VV- Neoangiogenese und die adventitielle Inflammation stehen in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen in einem engen Zusammenhang und charakterisieren die unterschiedlichen Stadien der atherosklerotischen Plauepathogenese. Jedoch spielen sich diese Prozesse im Submikrometerbereich ab, weshalb die Identifizierung der Plauezusammensetzung und des jeweiligen Stadiums bislang nur durch das zeit- und kostenintensive Synchrotronverfahren zu realisieren war.

Bezüglich der Anwendung der Mikro- und Nano- Computertomographie in der non-invasiven bildgestützten Grundlagenforschung ergeben sich jedoch nicht nur Vorteile. So müssen die Gewebeproben vor dem Scanvorgang mit Kontrastmittel perfundiert werden, um einen ausreichenden Kontrast in der anschließenden dreidimensionalen Darstellung, der die Gewebedifferenzierung ermöglicht, zu erzielen. Das Volumen der zu untersuchenden Gewebeproben darf aufgrund des eingeschränkten Messfeldes nur wenige mm<sup>3</sup> bzw. cm<sup>3</sup> betragen, so dass der erfassbare Probenumfang stark reduziert ist.

Der Nachteil der ausschließlichen ex- vivo Angiographie mittels der Mikro- und Nano- CT konnte beseitigt werden. Durch die Einführung neuer in- vivo Mikro- CT-Scanner ist es heute möglich Kleintiere unter Sedierung zu untersuchen und physiologische sowie pathologische Prozesse in Longitudinalstudien zu analysieren.<sup>211</sup>

Neben den erwähnten Nachteilen eröffnet die Mikro- und Nano- CT im Bereich der Grundlagenforschung jedoch völlig neue Dimensionen und Möglichkeiten. Besonders im Bereich der bildgebenden Gefäßanalytik birgt sie mit der dreidimensionalen Erfassung von Strukturen im Submikrometerbereich enorme Vorteile, so dass in zukünftigen Studien durch diese Technologie neue Erkenntnisse bezüglich pathologischer Gefäßalterationen generiert werden können.

### **4.3 Tiermodell**

Das Kleintiermodell der Knockoutmaus ermöglicht es eine Vielzahl von Krankheiten, so auch die Pathogenese der Atherosklerose, über ein genetisch präzise definiertes Tiermodell zu simulieren, welches zudem noch den Vorteil bietet, dass es in großer Anzahl, schnell zur Verfügung steht und eine hohe Reproduzierbarkeit generiert.

Mit Hilfe der Knockoutmäuse kann die Wissenschaft in- vivo untersuchen, in wie weit exogene (Umweltfaktoren) oder endogene Einflüsse (Gene) auf die Initiation und Progression atherosklerotischer Geschehen Einfluss nehmen. An ihnen können pharmakologische Konzepte getestet und aufgestellte Thesen verifiziert werden. In Zukunft wird es so eventuell möglich sein, eine Antwort darauf zu finden, weshalb trotz ähnlicher Plasma- Cholesterolspiegel, das Auftreten atherosklerotischer Läsionen von Mensch zu Mensch stark abweichen kann.

Mit Hilfe von Vektoren, die auf künstlichem Wege in die Zelle eingebracht werden, kann eine gezielte Inaktivierung der Gene in Säugerzellen über die homologe Geninaktivierung erreicht werden. Die Inaktivierung findet nur in einem der beiden Allele statt, so dass die Zellen heterozygot für den Gendefekt sind. Wenn man die Tiere nun miteinander kreuzt, erhält man homozygot- defiziente Tiere, die sogenannten Knockout- Mäuse.<sup>212</sup>

Bei der oftmals simulierten familiären Hypercholesterinämie finden Mutationen im Gen des Rezeptors für LDL (low density lipoprotein) statt. Es kommt dadurch zu einer minderen Aufnahme des Lipoproteins, welches daraufhin im Plasma akkumuliert und sich beispielsweise in Gefäßwänden von Koronarien abgelagert.<sup>148</sup>

Mit Hilfe der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Mäuse, welche zum einen Apolipoprotein E defizient sind und über eine weitere Genmanipulation einen ebenfalls mutierten Rezeptor für LDL (LDL<sup>-/-</sup>) aufweisen,<sup>148</sup> ist es möglich binnen

kürzester Zeit unter einer atherogenen Diät über frühe Gefäßveränderungen, im Folgenden fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen zu erzeugen.<sup>140; 147</sup>

Die atherosklerotischen Läsionen, welche die Mäuse bereits in den ersten Lebenswochen entwickeln, ähneln dabei in ihrem Aufbau bezüglich der Plaquemorphologie sehr stark denen humaner Atherosklerose und durchlaufen ähnliche Stadien und Schweregrade der Atherosklerose, wie sie auch in humanen Gefäßen zu beobachten sind.<sup>147; 139; 213</sup>

Das Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel- Knockout Maus, welches international zur Erforschung der Pathogenese der Atherosklerose eingesetzt wird,<sup>142</sup> entwickelt schon früh eine ausgeprägte VV- Neovaskularisation, so dass es sich besonders zur Analyse, durch Atherosklerose bedingter Modifikationen im aortalen Stromgebiet, anbietet.

Trotz der bewiesenen Vergleichbarkeit der Pathogenese der Atherosklerose zwischen der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>-Doppel- Knockout Maus und dem Mensch, lassen sich die Ergebnisse unserer Studie nicht eins zu eins mit humanen atherosklerotischen Läsionen vergleichen und erheben einen Anspruch auf die Interpretation der Übertragbarkeit.

#### **4.4 Limitationen**

Die in unserer Studie ermittelten Ergebnisse ermöglichen es uns zwar Aussagen bezüglich der Korrelation zwischen der VV-Neovaskularisation und der Atherogenese zu machen, jedoch erhebt die Studie keinen Anspruch auf Kausalität. Veränderungen, welche im Stromgebiet der deszendierenden Aorta, bedingt durch das Auftreten atherosklerotischer Läsionen, entstanden sind, können anhand unserer Arbeit quantifiziert werden. Die ermittelten Messwerte erlauben die Durchführung von Vergleichsanalysen.

Die vorliegende Arbeit kann zeigen, dass die Thalidomidgabe bei den ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Mäusen zu einer Reduktion der VV- Neovaskularisation und der Plaquegröße geführt hat, jedoch ist es nicht möglich zu sagen, ob dies auf die antiangiogenetische, auf die antiinflammatorische oder auf die synergistische Wirkung beider Effekte Thalidomids zurückzuführen ist.

In wie weit sich die Prozesse der Neoangiogenese und der Inflammation beeinflussen, chronologisch in die Pathogenese der Atherosklerose einzuordnen sind und zum Wachstum des atherosklerotischen Plaques beitragen, wird im Fokus weiterführender Studien stehen. Die Messungen für die Studie wurden postmortal an ex-vivo Angiographien durchgeführt.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Synchrotron- basierter  $\mu$ CT und NCT der Einfluß von Thalidomid auf die Atherogenese im Tiermodell von 35 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Mäusen untersucht. Die Technologie der NCT ermöglicht eine nicht- destruktive Darstellung von Strukturen im Submikrometerbereich. Nach intravasaler Kontrastmittelperfusion können Gefäßnetzwerke dreidimensional erfasst und volumetrische Analysen vorgenommen werden. Die hohe Ortsauflösung ermöglicht die Quantifizierung stenosierender Gefäßläsionen und ihrer adventitiellen VV anhand eines dreidimensionalen Datensatzes.

Die Tiere der Verumgruppe, welche über 29 Wochen Thalidomid verabreicht bekamen, wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant kleinere atherosklerotische Läsionen (mm<sup>2</sup>), weniger adventitielle VV und insgesamt eine reduzierte Gesamtfläche an VV (mm<sup>2</sup>) entlang der deszendierenden Aorta auf. Die Mäuse der Kontrollgruppe, welche über 29 Wochen eine atherogene Basisdiät ohne Thalidomidzugabe erhielten, entwickelten hingegen eine ausgeprägte adventitielle VV- Neovaskularisation und eine erhöhte Plauefläche. Bei allen in der Aorta descendens beobachteten atherosklerotischen Läsionen handelte es sich um den fortgeschrittenen fibrotischen Plaquetyp. Die histologische Aufarbeitung (Elastika-, HE-, Masson Trichrome- Färbung) der Segmente verifizierte die Ergebnisse aus dem  $\mu$ - und NCT. Die antiangiogenetische Wirkung von Thalidomid wurde begleitend mit Hilfe eines Proliferations- und eines Migrationsassays in- vitro an humanen Endothelzellen untersucht. Die Auswertung der Assays ergab eine dosisabhängige, signifikante Inhibition der Proliferation und Migration der Endothelzellen durch Thalidomid. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig unter dem Einsatz der  $\mu$ - und NCT gezeigt werden, dass Thalidomid das Wachstum atherosklerotischer Plaques über die Hemmung der VV- Neovaskularisation im Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>- Doppel- Knockout Maus inhibieren kann. Ob die anti-atherosklerotischen Eigenschaften von Thalidomid auf seine antiinflammatorische, auf seine antiangiogenetische Wirkung oder auf beide zurückzuführen ist, kann man zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht sagen.

## 6 Summary

Using synchrotron- based micro- and nano- CT we analysed the effect of thalidomide on the atherogenesis in apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice at the age of 35 weeks.

The high resolution of the nano- CT images enables a non- destructive and three- dimensional visualization of structures in a submicrometer- size.

Images based on nano- CT allow analysis of VV neovascularization and plaque characteristics. At the age of 35 weeks, thalidomide treated apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice demonstrated a significant decrease of atherosclerotic plaque area and VV neovascularization confirmed by histology.

Compared to controls, the adventitial VV lumen cross sectional area of the thalidomide- challenged mice was significantly lower. We identified the observed atherosclerotic lesions in the descending aortas of the apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout at the age of 35 weeks as advanced fibrotic plaques.

Moreover, we analysed the effect of the anti- angiogenic drug on human artery endothelial cells in vitro by using a BrdU and a migration assay. The results indicate that thalidomide significantly prevented EC proliferation and migration in a dose- dependent manner.

In this study we demonstrate that thalidomide, a potent anti-angiogenic drug, inhibits growth of atherosclerotic plaque in the descending aorta of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice by using synchrotron- based micro- and nano-CT. VV neovascularization and inflammation are strongly associated with plaque growth. Because of its anti-inflammatory and anti-angiogenic effect Thalidomide leads to a suppression of both, but the anti- atherosclerotic properties of that drug remains to be determined.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349(9063):1436–42.
2. Tunstall-Pedoe H, Vanuzzo D, Hobbs M, Mähönen M, Cepaitis Z, Kuulasmaa K, Keil U. Estimation of contribution of changes in coronary care to improving survival, event rates, and coronary heart disease mortality across the WHO MONICA Project populations. *Lancet*. 2000;355(9205):688–700.
3. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349(9064):1498–504.
4. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92(3):657–71.
5. Kristensen SD, Andersen HR, Falk E. What an interventional cardiologist should know about the pathophysiology of acute myocardial infarction. *Semin Interv Cardiol*. 1999;4(1):11–6.
6. Stary HC. Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic Res. Cardiol*. 1994;89 Suppl 1:17–32.
7. Lehmann ED, Hopkins KD, Gosling RG. Atherosclerosis in the ascending aorta and risk of ischaemic stroke. *Lancet*. 1995;346(8975):589–90.
8. Ardissino D, Merlini PA, Ariëns R, Coppola R, Bramucci E, Mannucci PM. Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. *Lancet*. 1997;349(9054):769–71.
9. Simpson JD, Doux JD, Lee PY, Yun AJ. Peripheral arterial disease: a manifestation of evolutionary dislocation and feed-forward dysfunction. *Med. Hypotheses*. 2006;67(4):947–50.
10. Classification of atherosclerotic lesions; report of a study group. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1958;57(143):1–20.
11. Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, Yan Z. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. Res*. 2002;91(4):281–91.



12. Munro JM, Cotran RS. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab. Invest.* 1988;58(3):249–61.
13. Ross R. Growth regulatory mechanisms and formation of the lesions of atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995;748:1-4; discussion 4-6.
14. Bräsen JH, Niendorf A. Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance. *Pathologe.* 1997;18(3):218–27.
15. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 1999;340(2):115–26.
16. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92(5):1355–74.
17. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1992;85(1):391–405.
18. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1994;89(5):2462–78.
19. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20(5):1177–8.
20. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20(5):1262–75.
21. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science.* 1973;180(4093):1332–9.
22. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006;83(2):456-460.

23. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1983;52:223–61.
24. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 1989;320(14):915–24.
25. Skålen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002;417(6890):750–4.
26. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1992;90(3):1138–44.
27. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J. Exp. Med.* 2001;194(2):205–18.
28. Hansson GK, Robertson AL, Söderberg-Nauclér C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:297–329.
29. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis.* 1986;6(2):131–8.
30. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868–74
31. van Leeuwen M, Gijbels MJJ, Duijvestijn A, Smook M, van de Gaar MJ, Heeringa P, Winther MPJ de, Tervaert JWC. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR-/- mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008;28(1):84–9.
32. Bobryshev YV, Lord RS. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. *Cardiovasc. Res.* 1995;29(5):689–96.
33. Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation.* 1995;92(5):1084–8.
34. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 1987;316(22):1371–5.

35. Schoenhagen P, Ziada KM, Vince DG, Nissen SE, Tuzcu EM. Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of "dilated" versus "obstructive" coronary atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001;38(2):297–306.
36. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989;86(8):2839–43.
37. Brand K, Banka CL, Mackman N, Terkeltaub RA, Fan ST, Curtiss LK. Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes. *Arterioscler. Thromb.* 1994;14(5):790–7.
38. Richardson PD, Davies MJ, Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet.* 1989;2(8669):941–4.
39. Loree HM, Kamm RD, Stringfellow RG, Lee RT. Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ. Res.* 1992;71(4):850–8.
40. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 1995;91(11):2844–50.
41. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.* 1991;11(5):1223–30.
42. Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation.* 1999;99(19):2503–9.
43. Horton DB, Libby P, Schönbeck U. Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;947:329–36.
44. Little WC. Angiographic assessment of the culprit coronary artery lesion before acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 1990;66(16):44G–47G.
45. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N. Engl. J. Med.* 1992;326(4):242–50.

46. Benninghoff A, Drenckhahn D. Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut, Band 2: Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut: Elsevier, München Urban & Fischer; 2004. ISBN: 3437423517.
47. Werber AH, Heistad DD. Diffusional support of arteries. *Am. J. Physiol.* 1985;248(6 Pt 2):H901-6.
48. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, McKenna C, Holmes DR, Schwartz RS, Lerman A. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* 1998;101(8):1551-6.
49. Gössl M, Rosol M, Malyar NM, Fitzpatrick LA, Beighley PE, Zamir M, Ritman EL. Functional anatomy and hemodynamic characteristics of vasa vasorum in the walls of porcine coronary arteries. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003;272(2):526-37.
50. Heistad DD, Armstrong ML. Blood flow through vasa vasorum of coronary arteries in atherosclerotic monkeys. *Arteriosclerosis.* 1986;6(3):326-31.
51. Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T, Bohle RM. Vasa vasorum and atherosclerosis - Quid novi? *Thromb. Haemost.* 2007;97(6):873-9.
52. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 1995;146(5):1029-39.
53. Williams JK, Heistad DD. The vasa vasorum of the arteries. *J Mal Vasc.* 1996;21 Suppl C:266-9.
54. Fleiner M, Kummer M, Mirlacher M, Sauter G, Cathomas G, Krapf R, Biedermann BC. Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic atherosclerosis. *Circulation.* 2004;110(18):2843-50.
55. Barger AC, Beeuwkes R, Lainey LL, Silverman KJ. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1984;310(3):175-7.
56. Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum. Pathol.* 1995;26(4):450-6.

57. Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ. Res.* 1988;62(3):515–23.
58. Heistad DD. Unstable coronary-artery plaques. *N. Engl. J. Med.* 2003;349(24):2285–7.
59. Barker SG, Talbert A, Cottam S, Baskerville PA, Martin JF. Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig. *Arterioscler. Thromb.* 1993;13(1):70–7.
60. Booth RF, Martin JF, Honey AC, Hassall DG, Beesley JE, Moncada S. Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation. *Atherosclerosis.* 1989;76(2-3):257–68.
61. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25(10):2054–61.
62. Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvan E, Lo K, Gillies S, Javaherian K, Folkman J. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003;100(8):4736–41.
63. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation.* 2004;110(14):2032–8.
64. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21(12):1876–90.
65. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation.* 1996;93(4):672–82.
66. Langheinrich AC, Sedding DG, Kampschulte M, Moritz R, Wilhelm J, Haberbosch WG, Ritman EL, Bohle RM. 3-Deazaadenosine inhibits vasa vasorum neovascularization in aortas of ApoE(-)/LDL(-) double knockout mice. *Atherosclerosis.* 2009;202(1):103–10.

67. Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M. Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2005;180(1):11–7.
68. Langheinrich AC, Braun-Dullaeus RC, Walker G, Jeide I, Schilling R, Tammoscheit K, Dreyer T, Fink L, Bohle RM, Haberbosch W. Effects of 3-deazaadenosine on homocysteine and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2003;171(2):181–92.
69. Ritman EL, Lerman A. The dynamic vasa vasorum. *Cardiovasc. Res*. 2007;75(4):649–58.
70. Keller H, Kunz W, Muckter H. N-phthalyl-glutamic acid imide; experimental studies on a new synthetic product with sedative properties. *Arzneimittelforschung*. 1956;6(8):426–30.
71. Kirk B. Der Contergan-Fall, eine unvermeidbare Arzneimittelkatastrophe?, Zur Geschichte des Arzneistoffs Thalidomid: Wissenschaftliche Verlagsges.; 1999. ISBN: 3804716814.
72. Lenz W. A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology* 1988;38(3):203–15.
73. Eriksson T, Björkman S, Höglund P. Clinical pharmacology of thalidomide. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 2001;57(5):365–76.
74. Rajkumar SV. Thalidomide: tragic past and promising future. *Mayo Clin. Proc*. 2004;79(7):899–903.
75. Lenz W. A personal perspective on the thalidomide tragedy. *Teratology*. 1992;46(5):417–8.
76. Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer*. 2004;4(4):314–22.
77. Cool RM, Herrington JD. Thalidomide for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Pharmacotherapy*. 2002;22(8):1019–28.
78. Sheskin J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin. Pharmacol. Ther*. 1965;6:303–6.
79. Iyer CG, Languillon J, Ramanujam K, Tarabini-Castellani G, las Aguas JT de, Bechelli LM, Uemura K, Martinez Dominguez V, Sundaresan T. WHO co-ordinated short-term double-blind trial with thalidomide in the

treatment of acute lepra reactions in male lepromatous patients. Bull. World Health Organ. 1971;45(6):719–32.

80. Grabstald H, Golbey R. Clinical experiences with thalidomide in patients with cancer. Clin. Pharmacol. Ther. 1965;6:298–302.
81. Olson KB, Hall TC, Horton J, Khung CL, Hosley HF. Thalidomide (N-phtaloylglutaminide) in the treatment of advanced cancer. Clin. Pharmacol. Ther. 1965;6:292–7.
82. Peuckmann V, Fisch M, Bruera E. Potential novel uses of thalidomide: focus on palliative care. Drugs. 2000;60(2):273–92.
83. Davis MP, Dickerson ED. Thalidomide: dual benefits in palliative medicine and oncology. Am J Hosp Palliat Care. 2001;18(5):347–51.
84. Nogueira AC, Neubert R, Felies A, Jacob-Müller U, Frankus E, Neubert D. Thalidomide derivatives and the immune system. 6. Effects of two derivatives with no obvious teratogenic potency on the pattern of integrins and other surface receptors on blood cells of marmosets. Life Sci. 1996;58(4):337–48.
85. Corral LG, Kaplan G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. Ann. Rheum. Dis. 1999;58 Suppl 1:I107-13.
86. Hussein MA. Research on thalidomide in solid tumors, hematologic malignancies, and supportive care. Oncology (Williston Park, N.Y.). 2000;14(11 Suppl 12):9–15.
87. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. J. Exp. Med. 1991;173(3):699–703.
88. Bousvaros A, Mueller B. Thalidomide in gastrointestinal disorders. Drugs. 2001;61(6):777–87.
89. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994;91(9):4082–5.
90. Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. J. Mol. Med. 1995;73(7):333–46.
91. Rajkumar SV, Kyle RA. Angiogenesis in multiple myeloma. Semin. Oncol. 2001;28(6):560–4.

92. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science*. 1995;270(5241):1500–2.
93. McCarty MF. Thalidomide may impede cell migration in primates by down-regulating integrin beta-chains: potential therapeutic utility in solid malignancies, proliferative retinopathy, inflammatory disorders, neointimal hyperplasia, and osteoporosis. *Med. Hypotheses*. 1997;49(2):123–31.
94. Raje N, Anderson K. Thalidomide--a revival story. *N. Engl. J. Med*. 1999;341(21):1606–9.
95. Salech F, Valderrama S, Nervi B, Rodriguez JC, Oksenberg D, Koch A, Smok G, Duarte I, Pérez-Ayuso RM, Jarufe N, Martínez J, Soza A, Arrese M, Riquelme A. Thalidomide for the treatment of metastatic hepatic epithelioid hemangioendothelioma: a case report with a long term follow-up. *Ann Hepatol*. 2011;10(1):99–102.
96. Hwu WJ. New approaches in the treatment of metastatic melanoma: thalidomide and temozolomide. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 2000;14(12 Suppl 13):25–8.
97. Bauer JA, Morrison BH, Grane RW, Jacobs BS, Borden EC, Lindner DJ. IFN-alpha2b and thalidomide synergistically inhibit tumor-induced angiogenesis. *J. Interferon Cytokine Res*. 2003;23(1):3–10.
98. Zündorf I, Dingermann T. True to the motto: cut off the supply! Angiogenesis inhibitors in the future. *Pharm Unserer Zeit*. 2007;36(6):452–61.
99. Adlard JW. Thalidomide in the treatment of cancer. *Anticancer Drugs*. 2000;11(10):787–91.
100. Eisen TG. Thalidomide in solid tumors: the London experience. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 2000;14(12 Suppl 13):17–20.
101. Neben K, Moehler T, Kraemer A, Benner A, Egerer G, Ho AD, Goldschmidt H. Response to thalidomide in progressive multiple myeloma is not mediated by inhibition of angiogenic cytokine secretion. *Br. J. Haematol*. 2001;115(3):605–8.
102. Parman T, Wiley MJ, Wells PG. Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat. Med*. 1999;5(5):582–5.



103. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, Raje N, Davies FE, Tai YT, Treon SP, Lin B, Schlossman RL, Richardson P, Muller G, Stirling DI, Anderson KC. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood*. 2000;96(9):2943–50.
104. Yasui K, Kobayashi N, Yamazaki T, Agematsu K. Thalidomide as an immunotherapeutic agent: the effects on neutrophil-mediated inflammation. *Curr. Pharm. Des.* 2005;11(3):395–401.
105. Gutiérrez-Rodríguez O. Thalidomide. A promising new treatment for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1984;27(10):1118–21.
106. Atra E, Sato EI. Treatment of the cutaneous lesions of systemic lupus erythematosus with thalidomide. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1993;11(5):487–93.
107. Mascaro JM, Lecha M, Torras H. Thalidomide in the treatment of recurrent, necrotic, and giant mucocutaneous aphthae and aphthosis. *Arch Dermatol.* 1979;115(5):636–7.
108. Lim SH, McWhannell A, Vora AJ, Boughton BJ. Successful treatment with thalidomide of acute graft-versus-host disease after bone-marrow transplantation. *Lancet.* 1988;1(8577):117.
109. Saurat JH, Camenzind M, Helg C, Chapuis B. Thalidomide for graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Lancet.* 1988;1(8581):359.
110. Govindarajan R, Heaton KM, Broadwater R, Zeitlin A, Lang NP, Hauer-Jensen M. Effect of thalidomide on gastrointestinal toxic effects of irinotecan. *Lancet.* 2000;356(9229):566–7.
111. Deaner P. Thalidomide for distressing night sweats in advanced malignant disease. *Palliat Med.* 1998;12(3):208–9.
112. Bosco AA, Lerario AC, Santos RF, Wajchenberg BL. Effect of thalidomide and rosiglitazone on the prevention of diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* . 2003;46(12):1669–75.
113. Rubegni P, Sbrano P, Aloe G de, Flori ML, Fimiani M. Thalidomide in the treatment of Kaposi's sarcoma. *Dermatology.* 2007;215(3):240–4.
114. Youle M, Clarbourn J, Farthing C, Connolly M, Hawkins D, Staughton R, Gazzard B. Treatment of resistant aphthous ulceration with thalidomide in patients positive for HIV antibody. *BMJ.* 1989;298(6671):432.

115. Reyes-Terán G, Sierra-Madero JG, Martínez del Cerro V, Arroyo-Figueroa H, Pasquetti A, Calva JJ, Ruiz-Palacios GM. Effects of thalidomide on HIV-associated wasting syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *AIDS*. 1996;10(13):1501–7.
116. Gössl M, Herrmann J, Tang H, Versari D, Galili O, Mannheim D, Rajkumar SV, Lerman LO, Lerman A. Prevention of vasa vasorum neovascularization attenuates early neointima formation in experimental hypercholesterolemia. *Basic Res. Cardiol*. 2009;104(6):695–706
117. Chew M, Zhou J, Daugherty A, Eriksson T, Ellermann-Eriksen S, Hansen PR, Falk E. Thalidomide inhibits early atherogenesis in apoE-deficient mice. *APMIS Suppl*. 2003;(109):113–6.
118. Habeck M. Australia approves thalidomide. *Lancet Oncol*. 2003;4(12):713.
119. Fullerton PM, O'Sullivan DJ. Thalidomide neuropathy: a clinical electrophysiological, and histological follow-up study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*. 1968;31(6):543–51.
120. Gardner-Medwin JM, Smith NJ, Powell RJ. Clinical experience with thalidomide in the management of severe oral and genital ulceration in conditions such as Behçet's disease: use of neurophysiological studies to detect thalidomide neuropathy. *Ann. Rheum. Dis*. 1994;53(12):828–32.
121. Ochonisky S, Verroust J, Bastuji-Garin S, Gherardi R, Revuz J. Thalidomide neuropathy incidence and clinico-electrophysiologic findings in 42 patients. *Arch Dermatol*. 1994;130(1):66–9.
122. Vogelsang GB, Farmer ER, Hess AD, Altamonte V, Beschoner WE, Jabs DA, Corio RL, Levin LS, Colvin OM, Wingard JR. Thalidomide for the treatment of chronic graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med*. 1992;326(16):1055–8.
123. Hamuryudan V, Mat C, Saip S, Ozyazgan Y, Siva A, Yurdakul S, Zwingenberger K, Yazici H. Thalidomide in the treatment of the mucocutaneous lesions of the Behçet syndrome. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med*. 1998;128(6):443–50.
124. Thomas DA, Kantarjian HM. Current role of thalidomide in cancer treatment. *Curr Opin Oncol*. 2000;12(6):564–73.
125. Tseng S, Pak G, Washenik K, Pomeranz MK, Shupack JL. Rediscovering thalidomide: a review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. *J. Am. Acad. Dermatol*. 1996;35(6):969–79.

126. Dimopoulos MA, Anagnostopoulos A, Weber D. Treatment of plasma cell dyscrasias with thalidomide and its derivatives. *J. Clin. Oncol.* 2003;21(23):4444–54.
127. Cavenagh JD, Oakervee H. Thalidomide in multiple myeloma: current status and future prospects. *Br. J. Haematol.* 2003;120(1):18–26.
128. Ghobrial IM, Rajkumar SV. Management of thalidomide toxicity. *J Support Oncol.* 2003;1(3):194–205.
129. Teo SK, Colburn WA, Tracewell WG, Kook KA, Stirling DI, Jaworsky MS, Scheffler MA, Thomas SD, Laskin OL. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(5):311–27.
130. Höglund P, Eriksson T, Björkman S. A double-blind study of the sedative effects of the thalidomide enantiomers in humans. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1998;26(4):363–83.
131. Shoji A, Kuwahara M, Ozaki H, Sawai H. Modified DNA aptamer that binds the (R)-isomer of a thalidomide derivative with high enantioselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 2007;129(5):1456–64.
132. Eriksson T, Björkman S, Fyge A, Ekberg H. Determination of thalidomide in plasma and blood by high-performance liquid chromatography: avoiding hydrolytic degradation. *J. Chromatogr.* 1992;582(1-2):211–6.
133. Huupponen R, Pyykkö K. Stability of thalidomide in human plasma. *Clin. Chem.* 1995;41(8 Pt 1):1199.
134. Schumacher H, Smith RL, Williams RT. The metabolism of thalidomide: the spontaneous hydrolysis of thalidomide in solution. *Br J Pharmacol Chemother.* 1965;25(2):324–37.
135. Richardson P, Hideshima T, Anderson K. Thalidomide: emerging role in cancer medicine. *Annu. Rev. Med.* 2002;53:629–57.
136. Eriksson T, Björkman S, Roth B, Höglund P. Intravenous formulations of the enantiomers of thalidomide: pharmacokinetic and initial pharmacodynamic characterization in man. *J. Pharm. Pharmacol.* 2000;52(7):807–17.
137. Figg WD, Raje S, Bauer KS, Tompkins A, Venzon D, Bergan R, Chen A, Hamilton M, Pluda J, Reed E. Pharmacokinetics of thalidomide in an elderly prostate cancer population. *J Pharm Sci* 1999;88(1):121–5.

138. Becker KD, Gottshall KR, Chien KR. Strategies for studying cardiovascular phenotypes in genetically manipulated mice. *Hypertension*. 1996;27(3 Pt 2):495–501.
139. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. Thromb*. 1994;14(1):133–40.
140. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258(5081):468–71.
141. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler. Thromb*. 1994;14(1):141–7.
142. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science*. 1996;272(5262):685–8.
143. Mahley RW, Rall SC. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:507–37.
144. Tomkin GH. Atherosclerosis, diabetes and lipoproteins. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2010;8(7):1015–29.
145. Mori N, Horie Y, Gerritsen ME, Granger DN. Ischemia-reperfusion induced microvascular responses in LDL-receptor  $-/-$  mice. *Am. J. Physiol*. 1999;276(5 Pt 2):H1647-54.
146. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71(2):343–53.
147. Plump AS, Breslow JL. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu. Rev. Nutr*. 1995;15:495–518.
148. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(10):4431–5.
149. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985;57(1):65–73.

150. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17(11):2333–40.
151. Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J. Lipid Res.* 1995;36(11):2320–8.
152. Pomposelli F. Arterial imaging in patients with lower-extremity ischemia and diabetes mellitus. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2010;100(5):412–23.
153. Tang GL, Chin J, Kibbe MR. Advances in diagnostic imaging for peripheral arterial disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2010;8(10):1447–55.
154. Nishio M, Ueda Y, Matsuo K, Asai M, Nemoto T, Hirata A, Kashiwase K, Kodama K. Detection of disrupted plaques by coronary CT: comparison with angiography. *Heart.* 2011;97(17):1397–402.
155. Nissen SE, Yock P. Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation.* 2001;103(4):604–16.
156. Knez A, Becker C, Becker A, Leber A, Haberl R, Reiser M, Steinbeck G. Diagnostic imaging in cardiac diagnosis. *Radiologe.* 2000;40(2):103–10.
157. Bourantas CV, Papafaklis MI, Naka KK, Tsakanikas VD, Lysitsas DN, Alamgir FM, Fotiadis DI, Michalis LK. Fusion of optical coherence tomography and coronary angiography - In vivo assessment of shear stress in plaque rupture. *Int. J. Cardiol.* 2012;155(2):e24-6.
158. Kiraç S. The role of advanced cardiac imaging methods in coronary artery disease. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2008;8 Suppl 1:1–4.
159. Achenbach S. Clinical Use of Multi-Slice CT Coronary Angiography. *Herz.* 2003;28(2):119–25.
160. Ropers D, Baum U, Pohle K, Anders K, Ulzheimer S, Ohnesorge B, Schlundt C, Bautz W, Daniel WG, Achenbach S. Detection of coronary artery stenoses with thin-slice multi-detector row spiral computed tomography and multiplanar reconstruction. *Circulation.* 2003;107(5):664–6.

161. Achenbach S, Hoffmann U, Ferencik M, Wicky S, Brady TJ. Tomographic coronary angiography by EBCT and MDCT. *Prog Cardiovasc Dis.* 2003;46(2):185–95.
162. Kato S, Kitagawa K, Ishida N, Ishida M, Nagata M, Ichikawa Y, Katahira K, Matsumoto Y, Seo K, Ochiai R, Kobayashi Y, Sakuma H. Assessment of coronary artery disease using magnetic resonance coronary angiography: a national multicenter trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010;56(12):983–91.
163. Fink C, Eichhorn J, Kiessling F, Bock M, Delorme S. Time-resolved multiphasic 3D MR angiography in the diagnosis of the pulmonary vascular system in children. *Rofo.* 2003;175(7):929–35.
164. Vogt FM, Goyen M, Debatin JF. MR angiography of the chest. *Radiol. Clin. North Am.* 2003;41(1):29–41.
165. Butz B, Dorenbeck U, Borisch I, Zorger N, Lenhart M, Feuerbach S, Link J. High-resolution contrast-enhanced magnetic resonance angiography of the carotid arteries using fluoroscopic monitoring of contrast arrival: diagnostic accuracy and interobserver variability. *Acta Radiol.* 2004;45(2):164–70.
166. Fayad ZA, Fuster V. Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circ. Res.* 2001;89(4):305–16.
167. Schroeder S, Kopp AF, Baumbach A, Kuettner A, Herdeg C, Rosenberger A, Selbmann HK, Claussen CD, Oberhoff M, Karsch KR. Noninvasive detection of coronary lesions by multislice computed tomography: results of the New Age pilot trial. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2001;53(3):352–8.
168. Lansky AJ, Desai K, Leon MB. Quantitative coronary angiography in regression trials: a review of methodologic considerations, endpoint selection, and limitations. *Am. J. Cardiol.* 2002;89(4A):4B-9B.
169. Kim EJ, Yong HS, Seo HS, Lim SY, Kim SW, Kim M, Kim YK, Poddar KL, Ramasamy S, Na JO, Choi CU, Lim HE, Kim JW, Kim SH, Lee EM, Rha S, Park CG, Oh DJ. Association between aortic calcification and stable obstructive coronary artery disease. *Int. J. Cardiol.* 2011;53(2):192-5.
170. Wasserman BA. Advanced contrast-enhanced MRI for looking beyond the lumen to predict stroke: building a risk profile for carotid plaque. *Stroke.* 2010;41(10 Suppl):S12-6.

171. Langheinrich AC, Leithauser B, Rau WS, Bohle RM. Cardio-pulmonary vascular system. Three-dimensional quantitative evaluation by microcomputed tomography. *Pathologe*. 2004;25(2):135–40.
172. Bonse U, Busch F. X-ray computed microtomography (microCT) using synchrotron radiation (SR). *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1996;65(1-2):133–69.
173. Langheinrich AC, Kampschulte M, Scheiter F, Dierkes C, Stieger P, Bohle RM, Weidner W. Atherosclerosis, inflammation and lipoprotein glomerulopathy in kidneys of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *BMC Nephrol.* 2010;11:18.
174. Langheinrich AC, Yeniguen M, Ostendorf A, Marhoffer S, Dierkes C, Gerlach S v., Nedelmann M, Kampschulte M, Bachmann G, Stolz E, Gerriets T. In vitro evaluation of the sinus sagittalis superior thrombosis model in the rat using 3D micro- and nanocomputed tomography. *Neuroradiology*. 2010;52(9):815–21.
175. Feldkamp LA, Davis LC, Webb S. Comments, with reply, on 'Tomographic reconstruction from experimentally obtained cone-beam projections' by S. Webb, et al. *IEEE Trans Med Imaging*. 1988;7(1):73–4.
176. Barnes JE. Characteristics and control of contrast in CT. *Radiographics*. 1992;12(4):825–37.
177. Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W. Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Radiologe*. 1999;39(3):203–12.
178. Ritman EL. Micro-computed tomography-current status and developments. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004;6:185–208.
179. Cnudde V, Dewanckele J, Boone M, Kock T de, Boone M, Brabant L, Duser M, Ceukelaire M de, Clercq H de, Hayen R, Jacobs P. High-resolution X-ray CT for 3D petrography of ferruginous sandstone for an investigation of building stone decay. *Microscopy research and technique*. 2011;74(11): 1006-17.
180. Stolz E, Yeniguen M, Kreisel M, Kampschulte M, Doenges S, Sedding D, Ritman EL, Gerriets T, Langheinrich AC. Angioarchitectural changes in subacute cerebral venous thrombosis. A synchrotron-based micro- and nano-CT study. *Neuroimage*. 2011;54(3):1881–6.

181. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* 1989;4(1):3–11.
182. Layton MW, Goldstein SA, Goulet RW, Feldkamp LA, Kubinski DJ, Bole GG. Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computed axial tomography. *Arthritis Rheum.* 1988;31(11):1400–5.
183. Tamminen IS, Isaksson H, Aula AS, Honkanen E, Jurvelin JS, Kröger H. Reproducibility and agreement of micro-CT and histomorphometry in human trabecular bone with different metabolic status. *J. Bone Miner. Metab.* 2011;29(4):442–8.
184. Jorgensen SM, Demirkaya O, Ritman EL. Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT. *Am. J. Physiol.* 1998;275(3 Pt 2):H1103-14.
185. Wan S, Ritman EL, Higgins WE. Multi-generational analysis and visualization of the vascular tree in 3D micro-CT images. *Comput. Biol. Med.* 2002;32(2):55–71.
186. Langheinrich AC, Wienhard J, Vormann S, Hau B, Bohle RM, Zygmunt M. Analysis of the fetal placental vascular tree by X-ray micro-computed tomography. *Placenta.* 2004;25(1):95–100.
187. Langheinrich AC, Vormann S, Seidenstücker J, Kampschulte M, Bohle RM, Wienhard J, Zygmunt M. Quantitative 3D micro-CT imaging of the human fetoplacental vasculature in intrauterine growth restriction. *Placenta* 2008;29(11):937–41.
188. Marxen M, Thornton MM, Chiarot CB, Klement G, Koprivnikar J, Sled JG, Henkelman RM. MicroCT scanner performance and considerations for vascular specimen imaging. *Med Phys.* 2004;31(2):305–13.
189. Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, Walker G, Beighley PE, Rau WS, Bohle RM, Ritman EL. Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E(-/-)/low-density lipoprotein(-/-) double knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(2):347–52.
190. Moreira AL, Wang J, Sarno EN, Kaplan G. Thalidomide protects mice against LPS-induced shock. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1997;30(10):1199–207.
191. Ishikawa M, Kanno S, Takayanagi M, Takayanagi Y, Sasaki K. Thalidomide promotes the release of tumor necrosis factor-alpha (TNF-



- alpha) and lethality by lipopolysaccharide in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 1998;21(6):638–40.
192. Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B, Lentzsch S, Davies FE, Chauhan D, Schlossman RL, Richardson P, Ralph P, Wu L, Payvandi F, Muller G, Stirling DI, Anderson KC. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia.* 2001;15(12):1950–61.
193. Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science.* 2010;327(5971):1345–50.
194. Ito T, Ando H, Handa H. Teratogenic effects of thalidomide: molecular mechanisms. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011;68(9):1569–79.
195. Hendler SS, McCarty MF. Thalidomide for autoimmune disease. *Med. Hypotheses.* 1983;10(4):437–43.
196. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* 1977;14(1):53–65.
197. Celletti FL, Hilfiker PR, Ghafouri P, Dake MD. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001;37(8):2126–30.
198. Stratford N, Britten K, Gallagher P. Inflammatory infiltrates in human coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1986;59(3):271–6.
199. Harper L, Savage CO. Pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. *J. Pathol.* 2000;190(3):349–59.
200. Langheinrich AC, Bohle RM, Breithecker A, Lommel D, Rau WS. Micro-computed tomography of the vasculature in parenchymal organs and lung alveoli. *Rofo.* 2004;176(9):1219–25.
201. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988;96(5):379–94.
202. Lerman A, Ritman EL. Evaluation of microvascular anatomy by micro-CT. *Herz.* 1999;24(7):531–3.

203. Simopoulos DN, Gibbons SJ, Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G, Ritman EL, Moreland RB, Nehra A. Corporeal structural and vascular micro architecture with X-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: histopathological correlation. *J. Urol.* 2001;165(5):1776–82.
204. Rodriguez-Porcel M, Lerman A, Ritman EL, Wilson SH, Best PJ, Lerman LO. Altered myocardial microvascular 3D architecture in experimental hypercholesterolemia. *Circulation.* 2000;102(17):2028–30.
205. Maehara N. Experimental microcomputed tomography study of the 3D microangiarchitecture of tumors. *Eur Radiol.* 2003;13(7):1559–65.
206. Wan SY, Kiraly AP, Ritman EL, Higgins WE. Extraction of the hepatic vasculature in rats using 3-D micro-CT images. *IEEE Trans Med Imaging.* 2000;19(9):964–71.
207. Karau KL, Molthen RC, Dhyani A, Haworth ST, Hanger CC, Roerig DL, Johnson RH, Dawson CA. Pulmonary arterial morphometry from microfocal X-ray computed tomography. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001;281(6):H2747-56.
208. Kantor, Ritman, Holmes Jr DR, Schwartz. Imaging Angiogenesis with Three-Dimensional Microscopic Computed Tomography. *Curr Interv Cardiol Rep.* 2000;2(3):204–12.
209. Kantor B, Jorgensen SM, Lund PE, Chmelik MS, Reyes DA, Ritman EL. Cryostatic micro-computed tomography imaging of arterial wall perfusion. *Scanning.* 2002;24(4):186–90.
210. Kampschulte M, Brinkmann A, Stieger P, Sedding DG, Dierkes C, Bohle RM, Krombach G, Ritman EL, Langheinrich AC. Quantitative CT imaging of the spatio-temporal distribution patterns of vasa vasorum in aortas of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Atherosclerosis.* 2010;212(2):444–50.
211. Yang X, Meng Y, Luo Q, Gong H. High resolution in vivo micro-CT with flat panel detector based on amorphous silicon. *J Xray Sci Technol* 2010;18(4):381–92.
212. Mortensen RM. Double knockouts. Production of mutant cell lines in cardiovascular research. *Hypertension.* 1993;22(4):646–51.
213. Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, Rosenfeld ME. Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential roles of lipid deposition, medial

atrophy, and adventitial inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17(12):3593–601.

## **8 Anhang**

### **8.1 Material**

#### **Für die in- vitro- Zellversuche:**

Siehe Auflistung in 2.1.1 bis 2.1.3.

#### **Für die Ex- vivo Angiographie:**

**Bildanalyseprogramm:** Analyze<sup>®</sup> 9.0/ 10.0, Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

**Formalin:** Formaldehyd- Lösung 3,5-3,7%, neutral gepuffert, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland

**Kontrastmittel:** Microfil<sup>®</sup> MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA

**Mikroskop:** JVC Digital Camera KY-F75U, Axioskop Zeiss, Deutschland

**Mikroskopie-Computersoftware:** Diskus 4.50 FireWire, Carl H. Hilgers, Technisches Büro, Königswinter, Deutschland

**µCT-Computersystem:** Intel<sup>®</sup>Xeon<sup>™</sup> Prozessor (2x 1800 MHz, 1024 MB RAM)

**µCT-Scanner:** SkyScan\_1072 X-Ray Microscope - Microtomograph, Aartselaar, Belgien

**NCT-Computersystem:** Dell Precision T 5400, Intel<sup>®</sup>Xeon<sup>™</sup> Prozessor

**NCT-Scanner:** SkyScan\_2011 X-Ray Nanotomograph, Aartselaar, Belgien

**Parafilm:** Parafilm<sup>®</sup> Laboratory Film, Menasha, WI, USA

## 8.2 Färbemethoden

### 8.2.1 *Haematoxylin-Eosin Färbung*

Darstellung von Zellen und Zellstrukturen. Zellkerne und Kalk färben sich blau, Zytoplasma und Muskelzellen rot, Erythrozyten orange.

#### Lösungen und Reagenzien:

- Xylol
- 100%, 96% und 70% Isopropanol
- Aqua destilata, Leitungswasser
- Saures Haemalaun nach Mayer, (Gebrauchslösung)
- Eosingebrauchslösung: Eosin 0,5% wässrig, Merck Darmstadt, 70% Alkohol in Mischung 1: 1,5 Tropfen Eisessig (Gebrauchslösung).

#### Arbeitsschritte:

Die Schnitte werden zunächst getrocknet und dann 10 Minuten in Xylol entparaffinisiert. Nach Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe (100%-96%-70% Isopropanol) werden die Schnitte nach Überführung in ein wässriges Milieu mit Aqua destilata gespült. In der Hämalun- Lösung werden die Schnitte nun gefärbt, gespült, im Leitungswasser gebläut und für 20 Sekunden mit einer Eosingebrauchslösung gefärbt. Danach wird wieder mit Aqua destilata gespült und die Schnitte wieder in der aufsteigenden Alkoholreihe gelagert. Nun werden die Objektträger in Xylol gelagert und darauf mit dem Pertex<sup>®</sup>- Einschlussmedium eingedeckt.

### *8.2.2 Elastika- Färbung nach Weigert*

Darstellung elastischer Fasern. Elastische Fasern färben sich hierbei violett/ schwarz.

#### Lösungen und Reagenzien:

- Xylol
- 98%, 96%, 90%, 80% und 70% Isopropanol
- Aqua destilata, Leitungswasser
- 1% HCl-Alkohol
- Resorcin-Fuchsin nach Weigert
- Kernechtrot-Lösung: 0,1 g Kernechtrot in 100 ml 5% wässriger Aluminiumsulfatlösung

#### Durchführung:

Zunächst werden die Schnitte getrocknet und für 3x10 Minuten in Xylol entparaffinisiert. In einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten mit Isopropanol (98%- 96%- 90%- 80%- 70%) behandelt und mit Aqua destilata gespült. Die Schnitte werden nun für 10 Minuten im Brutschrank mit Resorcin- Fuchsin bei 45°C inkubiert, um sie dann für 3x3 Minuten unter fließendem Leitungswasser auszuwaschen. Anschließend erfolgt die Differenzierung in 1% HCl- Alkohol.

Nun erfolgt ein erneutes 10 minütiges Auswaschen unter fließendem Leitungswasser. Die anschließende Kontrolle unter dem Mikroskop soll klären, ob alle elastischen Fasern gefärbt sind. Es schließt sich eine 5 minütige Färbung mit Kernechtrot und eine 2 minütige Spülung mit Aqua destilata an. Für 2 Minuten werden die Schnitte in 96% Isopropanol differenziert, um sie für 2x3 Minuten mit 100% Isopropanol zu behandeln. Nach Lagerung der Objektträger in Xylol für 3 Minuten werden die Präparate mit Pertex<sup>®</sup>- Einschlussmedium eingedeckt.

### *8.2.3 Goldner´s-Masson-Trichrome Färbung*

Darstellung von Zellkernen, Kollagenfasern, Zytoplasma und glatten Muskelzellen. Zellkerne färben sich schwarz, Kollagenfasern färben sich grün und Zytoplasma rot.

#### Lösungen und Reagenzien:

- Eisenhämatoxylin nach Weigert
- Ponceau-Säurefuchsin
- Phosphorwolframsäure- Orange Gebrauchsgemisch
- Lichtgrün
- 1% Essigsäure
- Leitungswasser
- Aqua destilata
- Xylol
- 98%, 96%, 90%, 80%, 70% Isopropanol

#### Durchführung:

Die getrockneten Schnitte werden für 3x10 Minuten in Xylol entparaffinisiert. Dann werden die Schnitte in absteigender Alkoholreihe jeweils 5 Minuten in (98%- 96%- 90%- 80%- 70% ) Isopropanol behandelt, mit Aqua destilata gespült und 2 Minuten in Eisenhämatoxylin gegeben. Anschließend werden sie für 15 Minuten in Leitungswasser geblät, für 3 Minuten wieder mit Aqua destilata gespült und für 5 Minuten mit Ponceau- Säurefuchsin behandelt. In einer 1%igen Essigsäure werden die Schnitte dann 3x5 Minuten ausgewaschen, 10 Minuten in einem Phosphorwolframsäure- Orange Gebrauchsgemisch inkubiert und wiederum 3x5 Minuten in der Essigsäure ausgewaschen. Nun folgt eine Behandlung für 5 Minuten mit Lichtgrün mit einem anschließenden Auswaschen in 1% Essigsäure. Für 3x3 Minuten werden die Schnitte in 100% Isopropanol gegeben, um sie nach 3 minütigem Einlegen in Xylol mit Pertex<sup>®</sup>-Einschlussmedium einzudecken.

#### 8.2.4 Berliner-Blau-Färbung

Das dreiwertige Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) wird im Körper als Hämosiderin gespeichert. Mit Hilfe der Berliner-Blau-Färbung kann man durch Salzsäure dreiwertiges Eisen aus Hämosiderin herauslösen, welches dann mit Kaliumhexacyanoferrat einen Komplex bildet, der blau leuchtet:  $\text{FeCl}_3 + \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 = \text{KFeFe}(\text{CN})_6^- + 3\text{KCl}$

Eisen der Zelle färbt sich blau, das Zytoplasma rosa und Zellkerne ziegelrot.

##### Lösungen und Reagenzien:

- Xylol
- 100%, 96% und 70% Isopropanol
- Aqua destilata
- Kaliumhexacyanoferrat-Lösung 2%
- HCl-Lösung 2%
- Kernechtrot

##### Durchführung:

Nachdem die Schnitte getrocknet wurden werden sie in Xylol entparaffiniert. Danach erfolgt die Behandlung der Präparate in absteigender Alkoholreihe (100%-96%-70%) Isopropanol und die Spülung mit Aqua destilata. Anschließend werden die Präparate mit 2% Kaliumhexacyanoferrat- und 2% HCl-Lösung im Verhältnis 1:1 behandelt und wiederum mit Aqua destilata gespült. Nach der Behandlung in aufsteigender Alkoholreihe wird der Objektträger in Xylol gelagert und das Präparat schließlich mit dem Pertex<sup>®</sup>-Einschlussmedium eingedeckt.



## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die an der Fertigstellung der Arbeit beteiligt waren,

- Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A.C. Langheinrich für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die Unterstützung und gute Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit in der Abteilung für diagnostische Radiologie am Universitätsklinikum Giessen.
- Herrn Prof. Dr. med. Daniel Sedding und seinem gesamten Team für die Betreuung im Labor für Molekulare Kardiologie an der Medizinischen Klinik II am Universitätsklinikum Giessen.
- Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. M. Kampschulte für die tatkräftige Hilfe, Betreuung und zuverlässige Unterstützung.
- Sowie bei Herrn Prof. Dr. med. E.L. Ritman für die Untersuchungen am Synchrotron-basiertem Mikro-CT.
- Bei Frau G. Martels möchte ich mich für die Anfertigung der Mikro- und Nano- CT- Datensätze und die Einführung in das Bildanalyseprogramm ANALYZE<sup>®</sup> bedanken.
- Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Gießen für die Erstellung der histologischen Präparate und die Unterstützung bei der mikroskopischen Begutachtung sowie Quantifizierung der Proben bedanken.
- Einen weiteren Dank richte ich an alle Mitarbeiter und Pfleger des Zentralen Tierstalls der Universitätsklinik Gießen, die für die Betreuung der Mäuse sorgten.
- Meiner Familie, meinem Freund Gero und seinen Eltern danke ich für die Höhen und Tiefen, welche sie während meines Studiums und meiner Promotionszeit mit mir durchgestanden haben.

## **10 Publikationen**

### **10.1 Originalarbeiten**

Kampschulte M, **Gunkel I**, Stieger P, Sedding DG, von Gerlach S, Brinkmann A, Ritman EL, Langheinrich AC. Thalidomide Inhibits Vasa Vasorum Neovascularization in Aortas of ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>Double Knockout Mice. Atherosclerosis, submitted.

### **10.2 Abstracts**

Kampschulte M, **Gunkel I**, Stieger P, Sedding DG, von Gerlach S, Brinkmann A, Ritman EL, Langheinrich AC. Thalidomide Inhibits Vasa Vasorum Neovascularization in Aortas of ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup>Double Knockout Mice. Deutscher Röntgenkongress 2011 Hamburg.