

**Aus dem Institut für Physiologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. F. Lang**

**Untersuchungen zur Induktion von Atherosklerose
in Mäusen durch fettreiche Ernährung**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard – Karls – Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

**Diana Ravilevna Fieß, geb. Iantoudina
aus Sibaj**

2007

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Heinle
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. D. Siegel-Axel

Inhalt

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Material	5
2. 1	Chemikalien	5
2. 2	Geräte	6
2. 3	Lösungen	7
3	Methoden	8
3. 1	Experimentelle Gruppen	8
3. 1. 1	Gruppeneinteilung und Tierhaltung.....	8
3. 1. 2	Fütterung	9
3. 1. 3	Versuchsprotokoll zur Organentnahme.....	9
3. 2	Histologische Methoden	10
3. 2. 1	Fixierung	10
3. 2. 2	Überführreihe	11
3. 2. 3	Einbettung.....	11
3. 2. 4	Schneiden	12
3. 2. 5	Färbung	12
3. 2. 6	Eindeckung	13
3. 2. 7	Mikroskopieren.....	13
3. 2. 8	Morphometrie.....	14
3. 3	Funktionelle Methoden zur Charakterisierung der Gefäßmechanik	15
3. 3. 1	Beschreibung der Apparatur und des Versuchsablaufs	15
3. 3. 2	Erfassung von passiven mechanischen Eigenschaften	17
3. 3. 2. 1	Vorgehensweise	18
3. 3. 2. 2	Elastizitätsmessung	18
3. 3. 2. 3	Viskoelastizitätsmessung.....	19

3. 3. 3	Erfassung von Kontraktionseigenschaften und der Endothelfunktion.....	20
3. 3. 3. 1	KCl-induzierte Kontraktilität	20
3. 3. 3. 2	Endothelfunktion	21
3. 3. 3. 3	L-Phenylephrin-induzierte Kontraktilität	22
3. 4	Klinisch chemische Methoden	22
3. 4. 1	Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Serum	22
3. 4. 2	Cholesterinbestimmung im Serum	24
3. 5	Statistik	25
4	Ergebnisse	26
4. 1	Einfluss der fettreichen Ernährung auf Serumparameter	26
4. 1. 1	Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf das Serumcholesterin ...	26
4. 1. 2	Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf antioxidative Kapazität ..	28
4. 2	Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf intimale Läsionen der Aorta	29
4. 3	Einfluss von fettreicher Ernährung auf passive Mechanik von thorakaler Aorta	39
4. 3. 1	Einfluss der Paigen-Diät bzw. High fat Diät auf die elastischen Dehnungseigenschaften	39
4. 3. 1. 1	Einfluss der Paigen-Diät	39
4. 3. 1. 2	Einfluss der High fat Diät bei Wild Typ-Tieren	41
4. 3. 1. 3	Einfluss der High fat Diät bei SGK1-knock-out-Tieren	42
4. 3. 1. 4	Einfluss der High fat Diät im Gruppenvergleich	43
4. 3. 2	Einfluss der Paigen-Diät und High fat Diät auf die Viskoelastizität.....	44
4. 3. 2. 1	Einfluss der Paigen-Diät	44
4. 3. 2. 2	Einfluss der High fat Diät bei Wild Typ-Tieren	45
4. 3. 2. 3	Einfluss der High fat Diät bei SGK1-knock-out-Tieren	46
4. 3. 2. 4	Einfluss der High fat Diät im Gruppenvergleich	47

4. 4	Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf aktive mechanische Eigenschaften von thorakaler Aorta	48
4. 4. 1	Wirkung KCl–angereicherter Lösung und endothelvermittelte Relaxation.....	48
4. 4. 1. 1	Einfluss der Paigen-Diät	48
4. 4. 1. 2	Einfluss der High fat Diät	50
4. 4. 2	Wirkung von L–Phenylephrin auf die thorakale Aorta	51
4. 4. 2. 1	Einfluss der Paigen-Diät	51
4. 4. 2. 2	Einfluss der High fat Diät	53
5	Diskussion.....	54
5. 1	Rolle der Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus in der Atherosklerose.....	54
5. 2	Die Maus als Modell in der Atheroskleroseforschung.....	56
5. 3	Einfluss der fettreichen Ernährung auf Serumparameter ...	57
5. 3. 1	Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf das Serumcholesterin ..	57
5. 3. 2	Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf antioxidative Kapazität .	58
5. 4	Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf intimale Läsionen der Aorta	60
5. 5	Einfluss von fettreicher Ernährung auf passive Mechanik von thorakaler Aorta	62
5. 5. 1	Einfluss der Paigen-Diät und High fat Diät auf die elastischen und viskoelastischen Dehnungseigenschaften	62
5. 6	Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf aktive mechanische Eigenschaften von thorakaler Aorta und endothelvermittelte Relaxation	64
5. 6. 1	Wirkung KCl–angereicherter Lösung und von L–Phenylephrin auf die thorakale Aorta	64
5. 6. 2	Endothelvermittelte Relaxation	66

5.7	Rolle der Serum/ Glukokortikoid-induzierten Protein-Kinase1 in der Atherosklerose	68
6	Zusammenfassung	70
7	Literaturverzeichnis.....	73
8	Anhang	80
8.1	Abkürzungen.....	80
	Danksagung.....	82
	Lebenslauf	83

1 Einleitung und Fragestellung

Auch neuere Erhebungen belegen, dass die kardiovaskulären Erkrankungen in westlichen Industrienationen immer noch die häufigste Todesursache darstellen (49% in Europa und 42% in EU (Petersen et al. 2005)), gefolgt von den bösartigen Neubildungen. Die wichtigsten Risikofaktoren für die Atherogenese sind: Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und Lipidstoffwechselstörungen (erhöhter LDL- und niedriger HDL-Spiegel), Bewegungsmangel, Diabetes mellitus, Rauchen, andauernder Stress, männliches Geschlecht, Adipositas und Lebensalter. Außerdem gehören die in jüngerer Zeit identifizierten Risikofaktoren wie: Erhöhung des Lipoproteins (a), des C-reaktiven Proteins, Entwicklung der Insulinresistenz und Gerinnungsstörungen dazu. Allerdings muss auf Grund der bisher doch relativ geringen vorhersagbaren Erfassung der Risikopatienten davon ausgegangen werden, dass zusätzliche Parameter gefunden werden können.

Oft werden die Begriffe Atherosklerose und Arteriosklerose als Synonyme gebraucht. Doch sind beide von einander zu unterscheiden. Die Atherosklerose ist „eine chronisch progrediente, in erster Linie fokale, aber auch diffuse Veränderung der Arterienwand“ (Kreuzer und Tiefenbacher 2003). Diese Veränderungen haben ihren Ursprung in der Tunica intima des Gefäßes. Arteriosklerose stellt dagegen eine *generelle* Arterienverhärtung dar, die durch Fibrose und Mediaverkalkung gekennzeichnet ist und mit dem zunehmenden Alter auftritt (Grestkötter 1996).

Die Pathogenese der Atherosklerose ist ein komplexer und vielseitiger Prozess. Im Kurzen zusammengefasst, unterscheidet man folgende Stadien (Stary 2005):

- 1 Unabhängig von der Risikofaktorkonstellation, kommt es initial zu einer Endothelläsion (Typ I), was u. a. eine erhöhte Durchlässigkeit für Plasmabestandteile (einschließlich Lipide) nach sich zieht. Die in die Intima eingewanderten Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen, die zusammen mit den Endothelzellen aggressive Sauerstoffradikale

bilden. Diese Radikale beteiligen sich an der Oxidation von LDL (Low Density Lipoprotein). Oxidierte LDL können nicht mehr an die LDL-Rezeptoren binden, werden aber über „Scavenger-Rezeptoren“ von Makrophagen aufgenommen, wodurch mehrere Reaktionen ausgelöst werden können:

- Makrophagen wandeln sich in lipidgefüllte Schaumzellen
 - In Endothelzellen werden vermehrt Adhäsionsmoleküle für die Einwanderung von weiteren Monozyten und Leukozyten exprimiert
 - Durch modifizierte LDL wird NO abgefangen
- 2 Leukozyten setzen Zytokine frei, die die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in der subendothelialen Schicht aktivieren. Die extrazelluläre Matrix nimmt zu, wodurch makroskopisch sichtbare „Fatty Streaks“ entstehen (Typ II).
 - 3 Typ III, Präatherom genannt, enthält einzelne extrazelluläre Lipidablagerungen, Makrophagen.
 - 4 Eine weitere Entwicklung stellt das Atheromstadium dar (Typ IV): Hier ist ein nekrotischer Herd (auch Lipidkern genannt) zu beobachten, der aus Lipiden, Zell- und Fasernresten besteht. Der nekrotische Herd ist von einer faser- und zellreichen Deckplatte umgeben, die den Lipidkern vom Lumen abgrenzt.
 - 5 Entscheidend für die Stabilität einer solchen Plaque sind sowohl die Größe des Lipidkerns als auch die Dicke der Deckplatte. Bei den instabilen Plaques besteht die Gefahr der Ruptur der dünnen Platte. Es kommt dann zu Gerinnung und Thrombusbildung, die zum akuten Gefäßverschluss führen können (Typ V-VI). Im weiteren Verlauf der Atherogenese kann es zur Verkalkung oder Fibrosierung der fortgeschrittenen Läsionen kommen (Typ VII-VIII).

Während die histologische Charakterisierung der Gefäßwandläsionen schon sehr detaillierte Erkenntnisse geliefert hat, besteht noch vielfach Unklarheit über

die molekularen Mechanismen, über die die verschiedenen Risikofaktoren in die Pathogenese eingreifen bzw. diese induzieren.

Die Befunde, dass ca. 60% der Herzinfarktpatienten durchaus keinen erhöhten Cholesterinspiegel aufweisen oder es Raucher gibt, die bis ins hohe Alter keine Kreislaufsymptome zeigen, verlangen nach weiterer Erklärung der zugrunde liegenden Pathomechanismen.

Ein aktueller Ansatz hierzu liegt in der Verwendung von knock-out Mäusen, bei denen spezifische Gene ausgeschaltet, bzw. von transgenen Tieren, bei denen entsprechende Gene überexprimiert werden.

Um prinzipiell die Möglichkeit zu haben, die Bedeutung einzelner Gene für die Atherogenese zu untersuchen, sollte hier in einer Voruntersuchung Fütterungsmodelle zu Erzeugung von Atherosklerose in der Maus erprobt werden.

Das erste Fütterungsmodell stellt die Anwendung der Paigen-Diät dar. Die Beschreibung dieser Diät stammt aus Arbeiten von Paigen et al. (1987). Sie enthält u. a. 15% Fett, 1,25% Cholesterin und 0,5% Natrium Cholat. Ihre atherogene Wirkung zeigte sich in C 57 BL/6 Mäusen, die schon nach sieben Wochen Fütterung einige Plaques im Bereich vom Aortenbogen und der Herzarterien aufwiesen. Bei Weiterführung der Behandlung (bis zur 14 Woche) nahmen die Plaques in ihrer Größe und Zahl noch zu.

Das zweite Fütterungsmodell ist die Anwendung einer fett- und kohlenhydratreichen Diät (High fat Diät), deren Verabreichung zur Entstehung von Metabolischem Syndrom und Diabetes mellitus Typ II führte.

In Rahmen dieser Arbeit sollten einerseits klinisch chemische und morphologische Untersuchungen durchgeführt, andererseits auch funktionelle Gefäßparameter erfasst werden. Unter Verwendung beider Fütterungsmodelle sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Führt die Fütterung mit den fettreichen Diäten zu einer Zunahme des Plasmacholesterins?
2. Ergeben sich Hinweise auf oxidativen Stress während der Fütterungszeit?

3. Lassen sich in den Fütterungsmodellen atherosklerotische Plaques im Aortenbogen detektieren? Nimmt die Plaqueprogression mit längerer Fütterungsdauer zu?
4. Wie verändern sich die passiven Dehnungseigenschaften der Aorta unter den verschiedenen Fütterungen?
5. Wie verändern sich die aktiven Kontraktilitätseigenschaften sowie die endotheliale Funktion der Aorta unter den verschiedenen Fütterungen?

2 Material

2.1. Chemikalien

α -Aktin-Färbung: Monoclonal Anti- α Smooth Muscle Actin, Mouse Ascites Fluid; Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, USA und Vectastain ABC-Peroxidase-Kit, Anti-Mouse IgG Biotin; Vector Laboratories, Burlingame, USA

2,2-Azobis (2-Amidinopropane) hydrochloride (AAPH), Polysciences, Warrington, USA

Benzoessäure-methylester, Roth, Karlsruhe

Calciumchlorid Dihydrat, Roth, Karlsruhe

Cholesterin, Boehringer, Mannheim

Diethylether, Aldrich, Steinheim

Eosin Y, Sigma, USA, St. Louis

Ethanol 99,0%, Universitätsapotheke, Tübingen

Hämatoxylin nach Weigert, Chroma, Köngen

N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes), Roth, Karlsruhe

Glucose Monohydrat, Roth, Karlsruhe

Kaliumchlorid, Roth, Karlsruhe

Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinon), Merck, Darmstadt

Makrophagenfärbung: 1) Monoclonal Antibody to Mouse F4/80 Antigen, Acris Antibodies, Hiddenhausen; 2) Mouse-on-Mouse Kit (Immunperoxidase), Vector Laboratories, Burlingame, USA

Magnesiumsulfat, Roth, Karlsruhe

Methylbenzoat reinst, Merck, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, Roth, Karlsruhe

Natriumchlorid, Merck, Darmstadt

N_w-Nitro-L-Arginine, Sigma-Aldrich, Steinheim

Paraformaldehyd, Merck – Schuhardt, Hohenbrunn bei München

Paraplast Plus, Kendall, Mansfield, USA

L-Phenylephrin, Serva, Heidelberg

Resorcinfuchsin nach Weigert, Chroma, Köngen

Van Gieson-Lösung (Pikro-Fuchsin), Chroma, Köngen

Xylol, Fluka, Steinheim

2. 2 Geräte

Apparatur zur Messung von aktiven und passiven mechanischen
Gefäßeigenschaften (Universität Tübingen)

Bioluminat LB 9500 Berthold, Wildbad

Brutschrank, Heraeus, Stuttgart

Digitalisierungstableau, Summagraphics, München; Laborlux S., Leica,
Bensheim

Digital-pH-Meter, Orion Research, Massachusetts, USA

Farbkamera-3CCD: MC-3255 P, Sony Corp., Japan

Lichtmikroskop, Olympus, Japan

Microfuge E™, Beckman, U.K.

Mikroskop, Laborlux S., Leica, Bensheim

Paraffinspender, Medax, Kiel

Photomikroskop Axiophot, Zeiss, Oberkochen

Rotationsmikrotom, Leica, Nussloch

Software, BIOQUANT INTRO: BQANALYSIS BQ-IAD, Bilany Consultants
GmbH, Düsseldorf

Spektrophotometer, Hitachi, Japan

Wägetechnik, Mettler, Schweiz

2.3 Lösungen

Tyrode-Lösung:

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1,54 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,19 mM
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	2,5 mM
KCl	5 mM
NaCl	118 mM
Hepes	10 mM

KCl-angereicherte Tyrode-Lösung 30 mM/ 60 mM/ 90 mM:

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1,54 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,19 mM
CaCl * 2 H ₂ O	2,5 mM
KCl	30 mM/ 60 mM/ 90 mM
NaCl	93,3 mM/ 63,3 mM/ 33,3 mM
Hepes	10 mM

Sowohl Tyrode-Lösung als auch KCl-angereicherte Tyrode-Lösung wurden mit 10 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

3 Methoden

3.1 Experimentelle Gruppen

3.1.1 Gruppeneinteilung und Tierhaltung

Für die Untersuchung standen Tiere zur Verfügung, die zwei unterschiedlichen Versuchsreihen angehörten.

Versuchsreihe A: C 57 BL/6 Mäuse (weiblich); geliefert von der Firma Charles River, Sulzfeld; (n=21).

Diese Versuchstiere waren in folgende Gruppen eingeteilt:

- 1 Gruppe erhielt die Paigen-Diät 14 Wochen lang; (n=8)
- 2 Gruppe erhielt dieselbe Diät 21 Wochen lang; (n=5)
- 3 Kontrollgruppe erhielt die Standard-Diät; (n=8)

Versuchsreihe B: Es standen 17 Mäuse beiderlei Geschlechter zur Verfügung, die entweder als „ Wild Typ“ (WT) oder als SGK1-Knock-out (KO) Mäuse im Institut für Physiologie gezüchtet wurden:

Diese Versuchstiere waren in folgende Gruppen eingeteilt:

- 1 WT, gefüttert mit High fat Diät (HFD); (n=4)
- 2 KO, gefüttert mit High fat Diät (HFD); (n=4)
- 3 WT, gefüttert mit Standard-Diät (CTRD); (n=5)
- 4 KO, gefüttert mit Standard-Diät (CTRD); (n=4)

Sowohl die C 57 BL/6 Mäuse als auch die Mäuse mit metabolischem Syndrom bekamen ihre Nahrung ad libitum und wurden in Gruppen von jeweils 4-5 Tieren in einem Käfig gehalten.

3. 1. 2 Fütterung

Paigen-Diät: enthielt u. a. 1,25% Cholesterin, 15% Fett, 0,5% Natrium Cholat (Ssniff, Soest)

High fat Diät (HFD): enthielt u. a. 45% Kohlenhydrate, 12% Rohfett, 6% Asche, 4% Rohfasern (Altromin, Lage)

Standard-Diät (CTRD): enthielt u. a. 22,5% Rohprotein, 0,5% Rohfett, 6,5% Asche, 4,5% Rohfasern, 48% N-freie Extraktstoffe (Altromin, Lage)

Bei den Tieren der Versuchsreihe A wurde das Körpergewicht am Versuchsende registriert. Die Mittelwerte betragen: Kontrollgruppe 23 ± 8 g, nach 14 Wochen Behandlung mit der Paigen-Diät 26 ± 9 g und nach 21 Wochen 27 ± 11 g.

Die Tiere mit HFD der Versuchsreihe B bekamen Dexamethasone $10 \mu\text{g/g}$ pro Körpergewicht subkutan 24 Stunden vor der Tötung.

3. 1. 3 Versuchsprotokoll zur Organentnahme

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Der Zugang zum Herz erfolgte schichtweise. Zuerst wurde das Fell aufgeschnitten, danach das Brustbein (mitsamt der Thoraxmuskulatur) von Processus xiphoideus bis zur Incisura jugularis durchgetrennt. Dadurch öffnete sich der Zugang zum Mediastinum bzw. zum Herz. Mit einer feinen Schere wurde das rechte Atrium angeschnitten. Das herausströmende Blut ließ sich mit Hilfe einer Spritze sammeln und nach Einsetzung der Gerinnung zentrifugieren. Der gewonnene Überstand (Serum) diente der Bestimmung der antioxidativen Kapazität und des Cholesteringehaltes. Die Aorta wurde frei präpariert und mit dem Herz zusammen exzidiert. Unter dem Mikroskop erfolgte die Trennung der Aorta vom

restlichen Gewebe. Der Aortenbogen wurde in vierprozentiger Formalinlösung zur Anfertigung der histologischen Präparate fixiert. Der thorakale Anteil wurde in 4mm lange Ringpräparate zur Bestimmung mechanischer Eigenschaften disseziert.

3.2 Histologische Methoden

Es wurden vier histologische Färbungen ausgewählt:

1. Hämatoxylin–Eosin (HE) zur Darstellung der allgemeinen Übersicht
2. Elastika–van Gieson (EvG) zur Darstellung des elastischen Materials in der Aortenwand
3. α -Aktin zur Darstellung der glatten Muskelzellen
4. Makrophagenfärbung (Monoclonal Antibody to Mouse F4/80; Mouse-on-Mouse Kit (Immunperoxidase)) zur Darstellung lipidgefüllter Makrophagen (Schaumzellen)

Alle Färbungen wurden von Mitarbeitern des Institutes für Sozial- und Arbeitsmedizin (Universität Tübingen) durchgeführt.

3.2.1 Fixierung

Um die nach der Entnahme des Gewebes einsetzende Autolyse zu verhindern, wurden die Gewebe sofort in 4% Formaldehyd-Lösung fixiert. Die Dauer der Fixierung betrug mindestens 24 Stunden.

3. 2. 2 Überführreihe

Die Überführreihe diente der Entwässerung des Gewebes und bereitete damit den nächsten Schritt vor, die Einbettung in wasserunlösliches Paraffin. Zusätzlich verlieh sie dem Gewebe eine gewisse Härte, die für das Schneiden mit dem Rotationsmikrotom notwendig war.

Die Aortenbögen wurden zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 99%) für jeweils 1,5-2 Stunden eingelegt. Darauf folgten Methylbenzoat- (mindestens für 24 Stunden) und Rotihistolstufen (für 20 Minuten). Die in die letzte Stufe, Paraplast, überführten Aortenbögen wurden für mindestens 30 Stunden im Brutschrank aufbewahrt, um Paraplast flüssig zu halten. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass sich die Lipide unter Einwirkung von Alkohol aus der Aortenwand lösen und somit nicht mehr nachgewiesen werden können.

3. 2. 3 Einbettung

Die Aortenbögen wurden mit Hilfe eines Skalpell in 2–3 Abschnitte geteilt und nur die aufsteigenden und absteigenden Abschnitte in flüssiges Paraffin eingebettet (dabei war es wichtig darauf zu achten, dass die Präparate mit der Schnittfläche auf dem Boden des Einbettungsschälchens auflagen). Die Schälchen wurden mit einer Plastikkassette bedeckt und auf Eis gelegt. Die abgekühlten Paraffinblöcke ließen sich leicht mit den Kassetten zusammen aus dem Schälchen entfernen.

3. 2. 4 **Schneiden**

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden die in Paraffin eingebetteten Aortenringe in 4µm dicke Querschnittspräparate geschnitten. Anschließend wurden sie auf den Objektträger übertragen.

3. 2. 5 **Färbung**

Die getrockneten Schnitte auf dem Objektträger wurden durch Xylol und die anschließende absteigende Alkoholreihe (99%, 96%, 70%) entparaffiniert. Danach erfolgte die Färbung:

HE-Färbung (Abb. 4.2.5); Chroma, Köngen

Rot gefärbt Kollagen, Zytoplasma

Blau gefärbt Kalk, Zellkerne

Ziel allgemeine Übersicht

EvG-Färbung (Abb. 4.2.7); Chroma, Köngen

Schwarz gefärbt elastische Fasern

Rot gefärbt Bindegewebe

Gelb gefärbt Muskelzellen

Ziel Darstellung von elastischen Fasern

α -Aktin-Färbung (Abb. 4.2.8): 1) Monoclonal Anti- α Smooth Muscle Actin, Mouse Ascites Fluid; Sigma Immuno Chemicals, St. Louis, USA; 2) Vectastain ABC-Peroxidase-Kit, Anti-Mouse IgG Biotin; Vector Laboratories, Burlingame, USA

Rot-braun gefärbt glatte Muskelzellen

Blau-grau gefärbt restliches Gewebe

Ziel	Darstellung der glatten Muskelzellen und deren Abgrenzung vom restlichen Gewebe, z. B. Schaumzellen
Makrophagenfärbung (Abb. 4.2.9):	1) Monoclonal Antibody to Mouse F4/80 Antigen; Acris Antibodies, Hiddenhausen; 2) Mouse-on-Mouse Kit (Immunperoxidase); Vector Laboratories, Burlingame, USA
Rot-braun gefärbt	Schaumzellen
Blau-grau	restliches Gewebe
Ziel	Darstellung der Makrophagen

3. 2. 6 Eindeckung

Die gefärbten und durch die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol überführten Aortenschnitte wurden mit Hilfe von Eukitt (Vitroklud) eingedeckt.

3. 2. 7 Mikroskopieren

Mit 20x-, 40xVergrößerungen wurden die allgemeinen und mit 100-facher die detaillierten Übersichten dargestellt. Die Anwendung von Immersionsöl ermöglichte eine höhere Auflösung.

3. 2. 8 **Morphometrie**

Die Messung der Plaqueflächen erfolgte jeweils an 4 Querschnittspräparaten jeder Aorta (HE-Färbung). Hierfür wurden ein Digitalisierungstableau (Summagraphics, München; Laborlux S., Leica, Bensheim) und die Software (BIOQUANT INTRO: BQANALYSIS BQ-IAD, Bilany Consultants GmbH, Düsseldorf) verwendet. Da die Plaques in den Mausgefäßen sehr klein sind, wurden die Plaqueflächen (in μm^2) direkt, ohne Berücksichtigung der Lumenfläche ausgewertet. Jede Messung wurde 3-mal durchgeführt und der arithmetische Mittelwert ausgerechnet. Beim Vorkommen mehrerer Plaques in einem Präparat wurden die einzelnen Werte addiert.

3.3 Funktionelle Methoden zur Charakterisierung der Gefäßmechanik

3.3.1 Beschreibung der Apparatur und des Versuchsablaufs

Zur Beschreibung der Apparatur für die Untersuchung der passiven und aktiven mechanischen Gefäßseigenschaften dienen **Abb. 3.3.1.1** und **Abb. 3.3.1.2**.

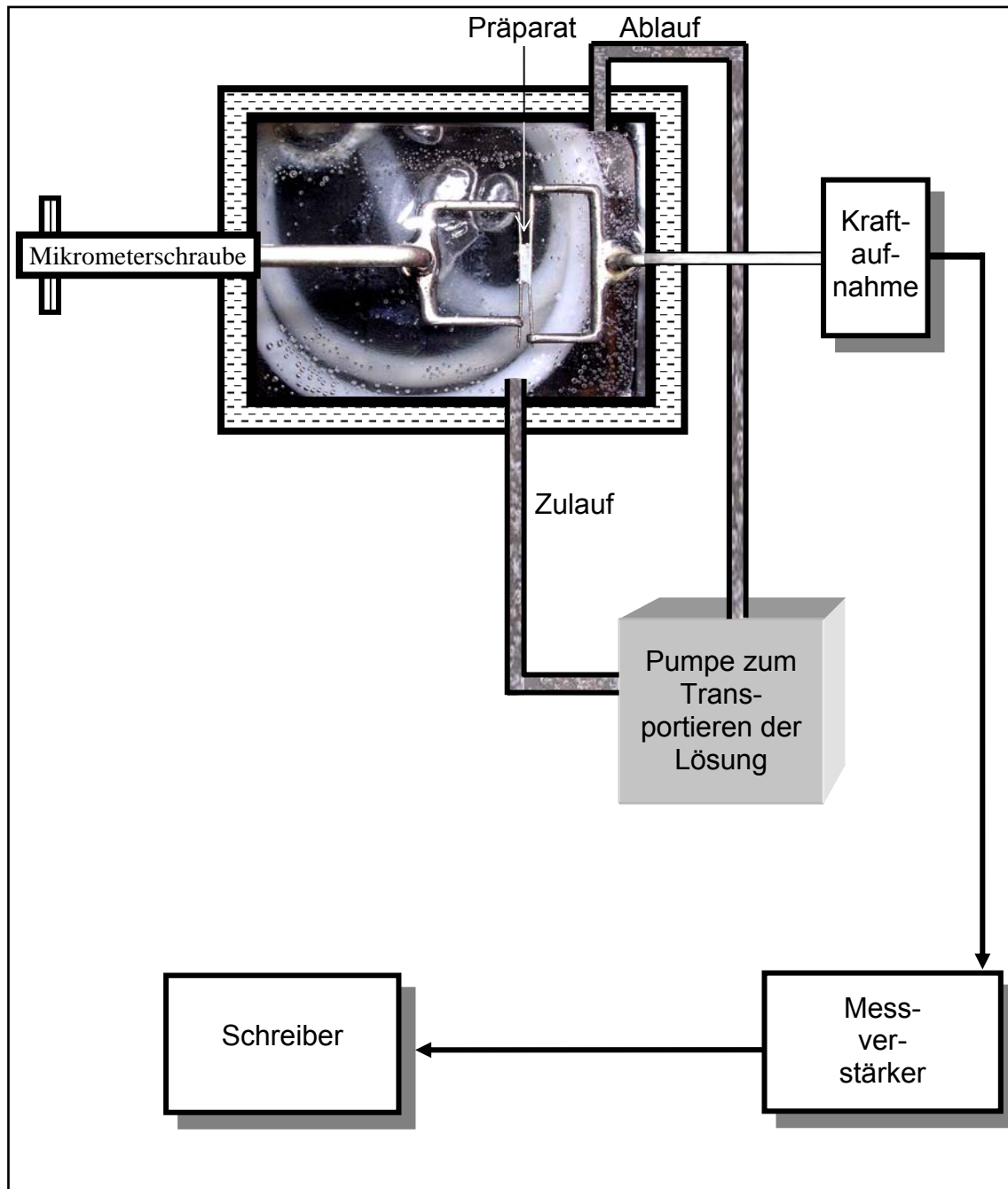


Abb. 3.3.1.1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

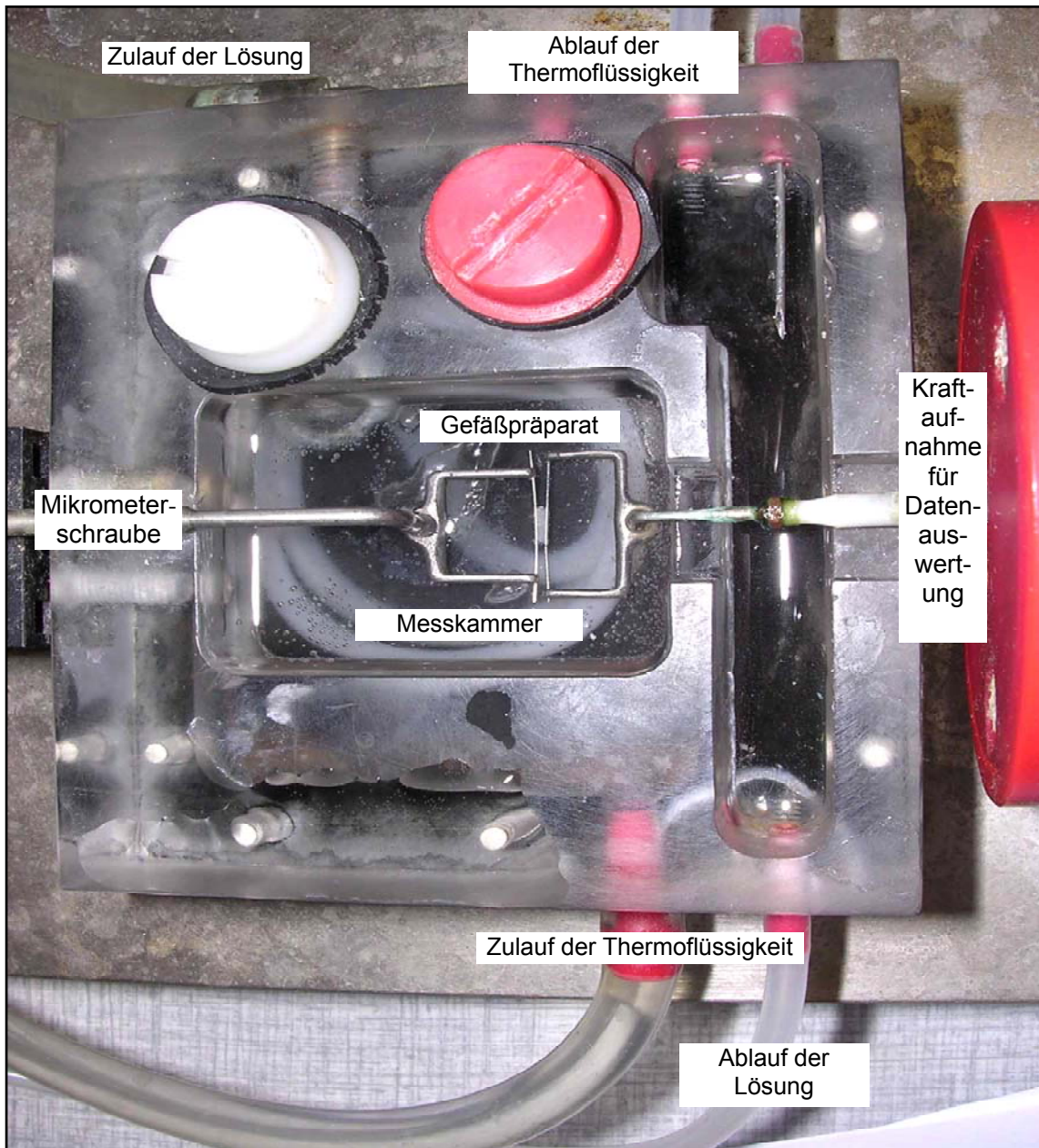


Abb. 3.3.1.2 Fotografie des Versuchsaufbaus.

Die 4mm langen Segmente der thorakalen Aorta wurden auf zwei Metallnadeln in der mit Tyrode-Lösung gefüllten Messkammer geschoben. Eine der beiden Nadeln wurde durch die Mikrometerschraube gehalten. Dadurch konnte der Abstand zwischen den Nadeln reguliert werden. Die zweite Nadel war mit

einem Kraftaufnehmer verbunden, wodurch die im Gefäß entstandene Spannung registriert und durch den Verstärker und den Schreiber dokumentiert werden konnte. Die Perfusion der Kammer mit physiologischer Lösung bzw. mit zusätzlichen Agonisten und verschiedenen Substanzen ermöglichte die Modulation der arteriellen Kontraktion. Die Temperatur der Kammerflüssigkeit wurde bei 37°C konstant gehalten. Ein typischer Versuchsablauf zur Erfassung der passiven Dehnungseigenschaften und der KCl- bzw. L-Phenylephrin-induzierten Kontraktilität ist aus der **Abb. 3.3.1.3** ersichtlich.

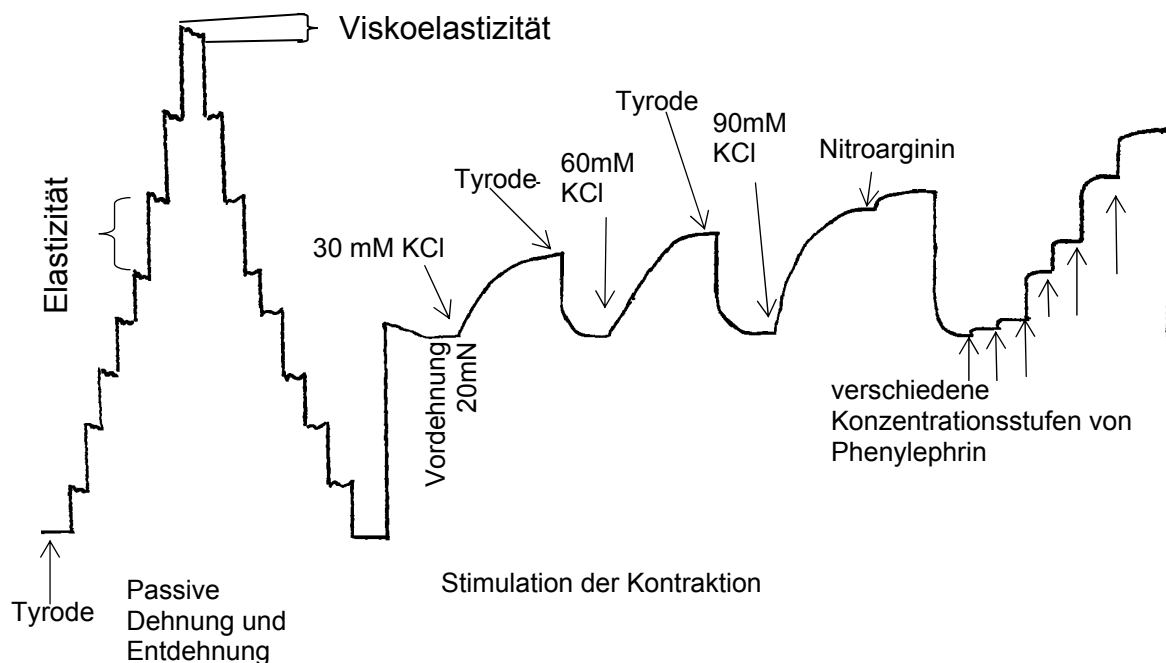


Abb. 3.3.1.3 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

3. 3. 2 Erfassung von passiven mechanischen Gefäßeigenschaften

Zur Erfassung passiver mechanischer Eigenschaften wurden Elastizität und Viskoelastizität der Gefäßringe untersucht.

3.3.2.1 Vorgehensweise

Um zunächst den Ausgangsradius der Aortenringe im ungedehnten Zustand zu bestimmen, wurde mit Hilfe einer Schieblehre die Messung des Außenabstandes zwischen den Metallnadeln bei minimaler Anfangsdehnung (aus dem Radius ließ sich später die Dehnung ermitteln s. **Tab. 3.3**) durchgeführt. Das Gefäß wurde dann in 8 Schritten um jeweils 100µm im Abstand von zwei Minuten gedehnt und anschließend ebenso entdehnt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die ersten 8 Dehnungs- bzw. Entdehnungsschritte dienten der Anpassung des Gewebes. Der zweite Durchlauf mit je 8 Dehnungs- und Entdehnungsschritten wurde für die Auswertung verwendet.

$\varepsilon = r_n - r_o / r_o$ $r_n = (0,4\pi + 2a + \Delta x) / 2\pi$	ε =Dehnung r_n =Radius auf der Dehnungsstufe n r_o =Ursprünglicher Radius a =Außenabstand-0,4(Nadeldurchmesser) Δx =Stufenweiser Dehnungsunterschied
---	--

Tabelle 3.3 Berechnung der Dehnung.

3.3.2.2 Elastizitätsmessung

Elastizität ist die Eigenschaft des Gewebes, einer von außen wirkenden Kraft (in unserem Fall der Dehnung) einen Widerstand entgegenzusetzen und nach Aufhebung der Kraft wieder seine ursprüngliche Form einzunehmen. Dies führt zur Entstehung von Spannung bzw. Entspannung im Gefäß. Die jeweiligen Spannungszunahmen in Abhängigkeit von den Dehnungsstufen wurden

zunächst registriert, dann aufsummiert und in eine Ruhe-Dehnungskurve aufgetragen (**Abb. 3.3.2.2**).

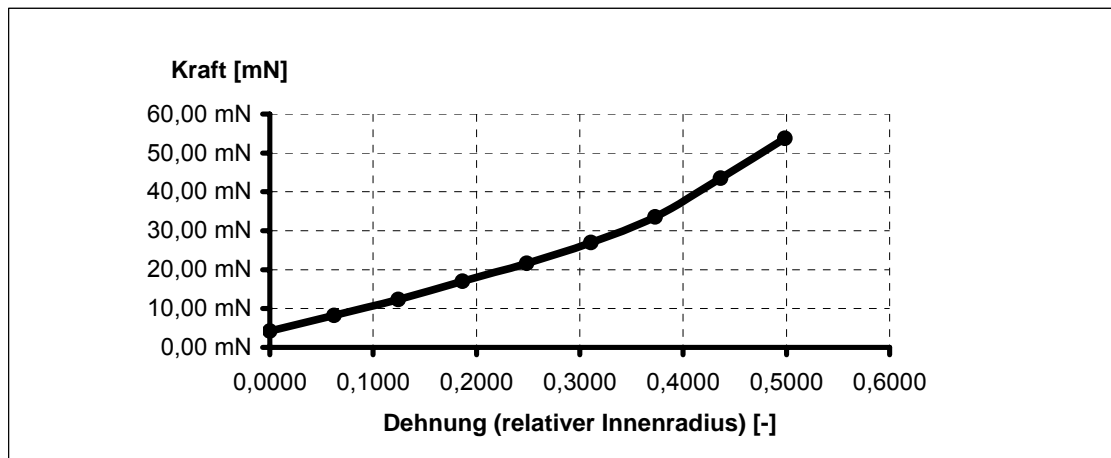


Abb. 3.3.2.2 Darstellung einer typischen Ruhe-Dehnungskurve.

3. 3. 2. 3 Viskoelastizitätsmessung

Tritt nach dem Dehnungsschritt eine zeitabhängige Rückstellung der Gewebespannung auf, liegen viskoelastische Eigenschaften vor. In unserem Fall betrug die vorgegebene Anpassungszeit zwei Minuten. Die einzelnen Schritte der entsprechenden Spannungsabnahmen wurden aufsummiert und in eine Viskoelastizitätskurve in Abhängigkeit von den Dehnungsschritten aufgetragen (**Abb.3.3.2.3**).

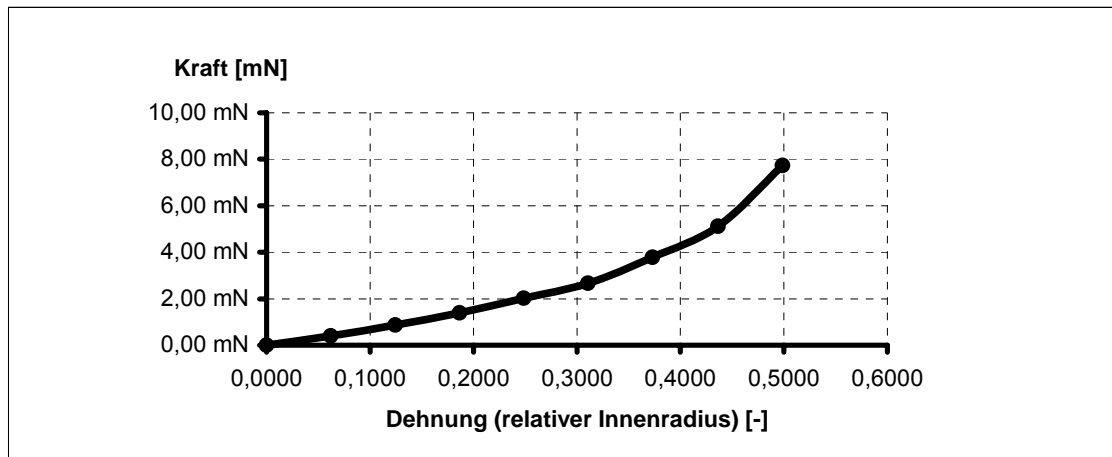


Abb. 3.3.2.3 Darstellung einer typischen Viskoelastizitätskurve.

3. 3. 3 Erfassung von Kontraktionseigenschaften und der Endothelfunktion.

3. 3. 3. 1 KCl-induzierte Kontraktilität

Die Kontraktilität der Aorta wurde zunächst durch die Zugabe von KCl-angereicherter Lösungen in aufsteigenden Konzentrationsstufen (30mM, 60mM, 90mM) überprüft (s. **Abb. 3.3.1.3**). Dabei wurde das von Tyrode umspülte Gefäß zunächst auf 20mN vorgedehnt, wodurch sich die Dehnungsverhältnisse denen in vivo annäherten. Anschließend wurde die Tyrode-Lösung durch 30mM KCl-angereicherter Lösung ersetzt. Diese Lösung führte zu Depolarisation glatter Muskelzellen in der Tunica media und löste dadurch eine Kontraktion der Aortenwand aus. Nach dem Erreichen des Kontraktionsplateaus erfolgte eine erneute Umspülung des Gefäßes für 15 Mi-

nuten mit Tyrode-Lösung bis zur Relaxation. Die gleiche Vorgehensweise wurde mit 60 und 90mM KCl-angereicherter Lösung wiederholt.

3.3.3.2 Endothelfunktion

Zur Untersuchung der Endothelfunktion wurde auf der Stufe 90mM KCl-angereicherter Lösung 50 μ M Nw-Nitro-L-Arginin zugeführt. Diese Substanz ist ein Inhibitor der endothelialen NO (Stickstoff-Monoxid)-Synthase und führt in den Präparaten zu einer weiteren Erhöhung des Tonus der glatten Muskelzellen. Dadurch wird eine zusätzliche Kontraktionssteigerung im Gefäß verursacht (s. **Abb. 3.3.3.2**).

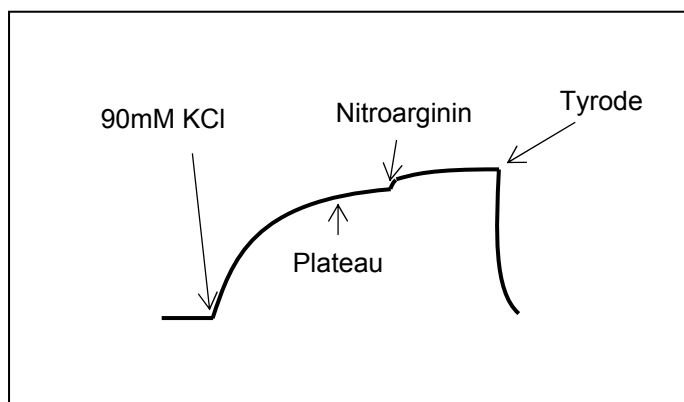


Abb. 3.3.3.2 Wirkung von Nw-Nitro-L-Arginin auf KCl-induzierte Kontraktion von thorakaler Aorta.

3.3.3.3 L-Phenylephrin-induzierte Kontraktilität

Zur weiteren Charakterisierung der Kontraktionseigenschaft der Mousaorta wurde L-Phenylephrin, ein Agonist an α -Rezeptoren, verwendet. Hier wurden die Konzentrationen von 10^{-8} M; 2×10^{-8} M; 10^{-7} M; 2×10^{-7} M; 10^{-6} M; 2×10^{-6} M in einer kumulativen Dosis-Wirkung-Beziehung appliziert (s. **Abb. 3.3.3.3**). Dazu wurde die jeweilige Kontraktionszunahme ausgewertet.

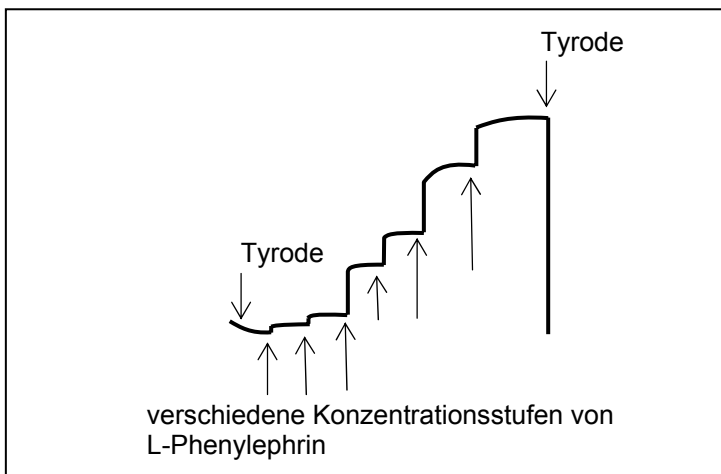


Abb. 3.3.3.3 Wirkung von L-Phenylephrin auf die Kontraktion von thorakaler Aorta.

3.4 Klinisch chemische Methoden

3.4.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Serum

Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität des Blutserums erfolgte durch die AAPH-Reaktion, bei der durch thermischen Zerfall freie Radikale gebildet

werden. Diese können über luminolverstärkte Chemilumineszenz gemessen werden. Antioxidantien fangen die gebildeten Radikale ab. Ihre Wirkung kann durch die Unterdrückungszeit charakterisiert werden (s. **Abb. 3.4.1**). Entsprechend wurde die antioxidative Kapazität des Blutserums ermittelt. Die Unterdrückungszeit ließ sich aus dem Zeitabstand zwischen der Serumzugabe und dem Anstieg der Radikalproduktion (bis das Ausgangsniveau der Chemilumineszenz wieder erreicht war) ausrechnen (in **Abb. 3.4.1** als Pfeil zu sehen).

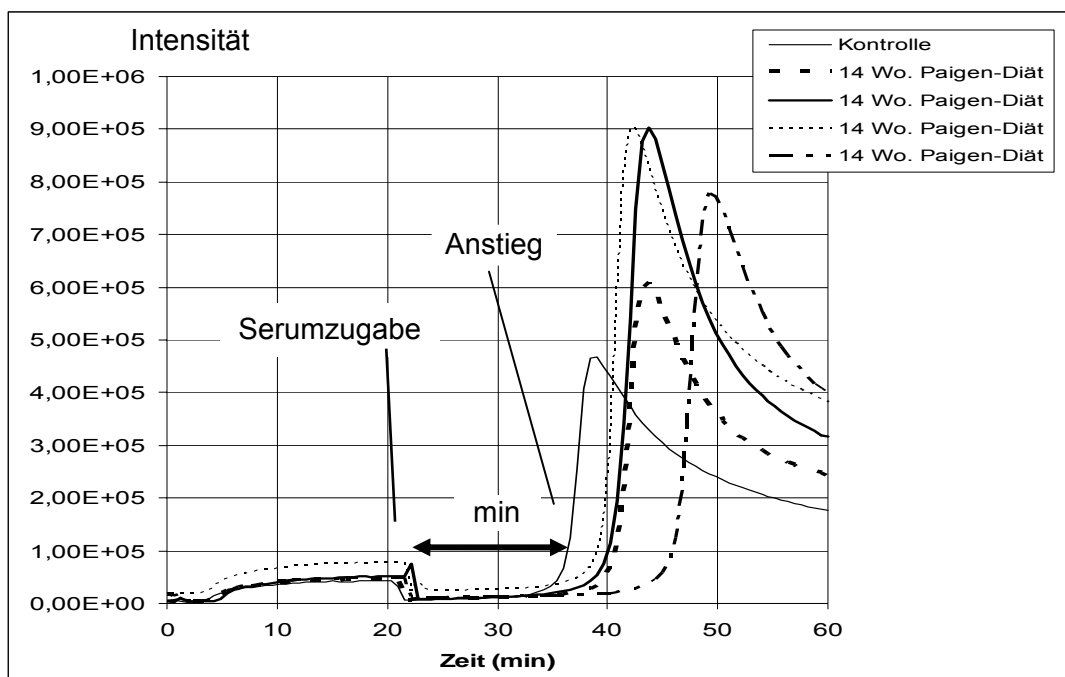


Abb. 3.4.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität des Serums. Als Maß dafür dient die Unterdrückungszeit in min, die mit dem Pfeil gekennzeichnet ist.

Lösung	Stammlösung	Menge	Endkonzentration
PBS-Puffer pH 7,4		475 µl	
Luminol 2mg/ml	11,3 mM	5 µl	113 µM
AAPH	500 µM	10 µl	10 µM
Probe		10 µl	

Tabelle 3.4 Pipettierschema der AAPH-Reaktion (Amraei Davijani 2005).

3. 4. 2 Cholesterinbestimmung im Serum

Cholesterinbestimmung erfolgte mittels CHOD–PAP–Methode (Boehringer, Mannheim). Zunächst wurde freies Cholesterin mit Cholesterinoxidase zu Wasserstoffperoxid und Cholestenon umgesetzt, wobei das Wasserstoffperoxid in der nachfolgenden Indikatorreaktion (mit 4-Aminophenazol und Phenol) einen roten Farbstoff bildete, der photometrisch gemessen und quantifiziert wurde. Die Wellenlänge betrug 546 nm, die Extinktionmessung erfolgte gegen den Leerwert. Pipettierschema wurde nach der Packungsanweisung durchgeführt. Zur Berechnung der Cholesterinkonzentration wurde die vom Hersteller angegebene Formel verwendet:

$$C \text{ (mg/dl)} = 853 \times \text{Extinktion der Probe}$$

3. 5 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm Excel durchgeführt. Der Vergleich zweier unabhängiger Messreihen erfolgte mit dem t-Test für unverbundene Stichproben. Für zwei abhängige Messreihen wurde t-Test für verbundene Stichproben (Paarvergleichstest) angewandt. Signifikanzniveau betrug 0,05.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der fettreichen Ernährung auf Serumparameter

4.1.1 Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf das Serumcholesterin

Abb. 4.1.1 zeigt Serumcholesterinwerte der Tiere nach der Paigen-Diät bzw. High fat Diät jeweils im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Nach 14 Wochen der Anwendung der Paigen-Diät waren die Cholesterinwerte signifikant (281 ± 29 mg/dl) gegenüber den Kontrollen angestiegen, jedoch wurde in der Gruppe nach 21 Wochen gleicher Diät ein niedrigerer Wert beobachtet. Überraschenderweise zeigten schon die Kontrolle erhöhte Werte (170 ± 29 mg/dl). Der Normalwert sollte bei 60-80 mg/dl liegen (Plump 2005).

HFD KO-Tiere erreichten ein Gesamtcholesterin von 268 ± 33 mg/dl und zeigten damit einen signifikanten Unterschied zur CTRD KO-Gruppe. Zwischen knock-out- und Wild Typ-Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

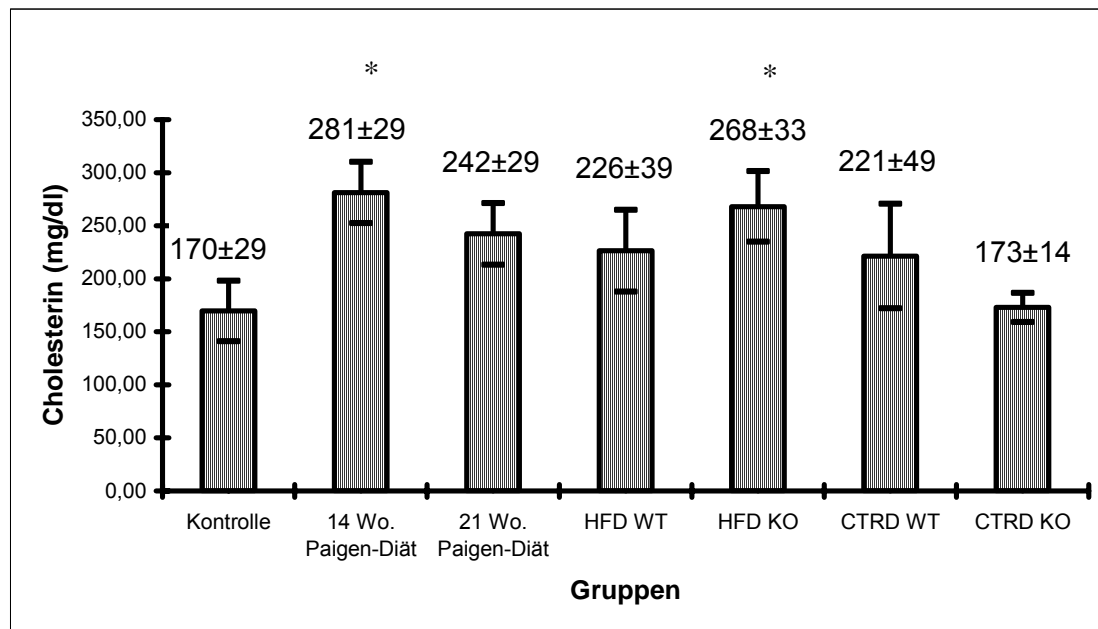


Abb. 4.1.1 Serumcholesterin (mg/dl) der verschiedenen Gruppen; die Säulen repräsentieren Mittelwert±Standartabweichung (*signifikanter Unterschied zu Kontrollen: $p < 0,05$).

4. 1. 2 Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf antioxidative Kapazität

Antioxidative Kapazität des Serums wurde als Auslöschzeit während der AAPH-Reaktion gemessen. Nach Verabreichung der Paigen-Diät 14 und 21 Wochen wurde eine signifikante Senkung der Auslöschzeit ($21,4 \pm 3,5$ min bzw. $23,6 \pm 1,5$ min) im Vergleich zu den Kontrollen ($28 \pm 4,5$ min) beobachtet.

Die HFD WT-Mäuse erreichten den Wert von $9,4 \pm 3,5$ min und CTRD WT von $6,6 \pm 2,8$ min. Die beiden knock-out-Gruppen erwiesen geringere Zeiten; $6,1 \pm 2,0$ min bei den HFD KO- und $3,2 \pm 0,6$ min bei den CTRD KO-Tieren.

Tabelle. 4.1 Auslöschzeit (min) der AAPH-Reaktion als antioxidativer Parameter des Serums einzelner Gruppen; Mittelwert \pm Standardabweichung (*signifikanter Unterschied zu Kontrollen: $p < 0,05$).

Gruppe	Kontrolle	14 Wo. Paigen-Diät	21 Wo. Paigen-Diät	HFD WT	HFD KO	CTRD WT	CTRD KO
Auslöschzeit (Mittelwert; min)	28,0	21,4*	23,6*	9,4	6,1	6,6	3,2
S. D.	4,5	3,5	1,5	3,5	2,0	2,8	0,6
Anzahl der Tiere (n)	8	8	5	4	4	5	4

4.2 Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf intimale Läsionen der Aorta

Die morphologischen Untersuchungen wurden bei allen Mausgruppen durchgeführt.

Die Hämatoxylin–Eosin (HE)–Färbung diente der Darstellung der allgemeinen Übersicht (s. **Abb. 4.2.1**; **Abb. 4.2.6**). Da eine Intima in Aortenpräparaten gesunder Tiere praktisch nicht zu erkennen ist (s. **Abb. 4.2.1A**), lassen sich umso deutlicher deren Veränderungen bei den mit lipidangereicherten Diäten behandelten Tieren darstellen (s. **Abb. 4.2.1B**): die Bildung einer Neointima mit Lumenverengung, Umwandlung der feinfaserigen Intima in die grobfaserige, Verdickung der gesamten Aortenwand mit Zunahme an Zellzahl (erkennbar an den zahlreichen blauen Kernen).

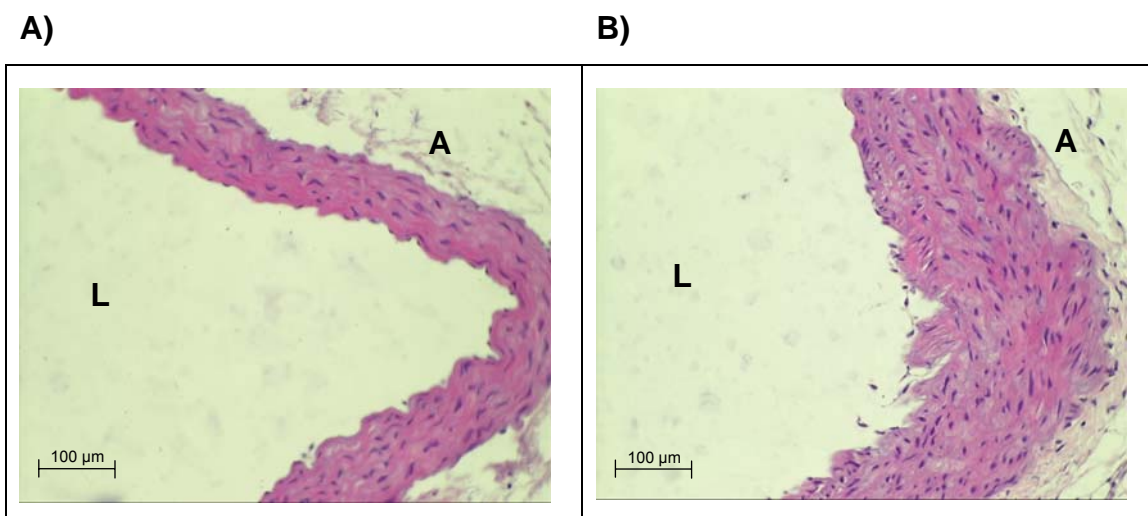


Abb. 4.2.1 HE-Färbung; Aorta; A) Kontrolle; B) nach 14 Wochen Paigen-Diät; L-Lumen, A-Adventitia.

Die Elastica–van–Gieson–Färbung diente der Darstellung der Lamina elastica interna und elastischer Fasern in der Media. Lamina elastica interna grenzt die Intima von der Mediaschicht ab und ist normalerweise ununterbrochen. Bei den hypercholesterinämischen Tieren wurde der Verlust an der Intaktheit der Lamina elastica interna aber auch des restlichen elastischen Materials (subjektive Bewertung bei 100facher Vergrößerung) beobachtet (s. **Abb. 4.2.2 A)** und **B)**).

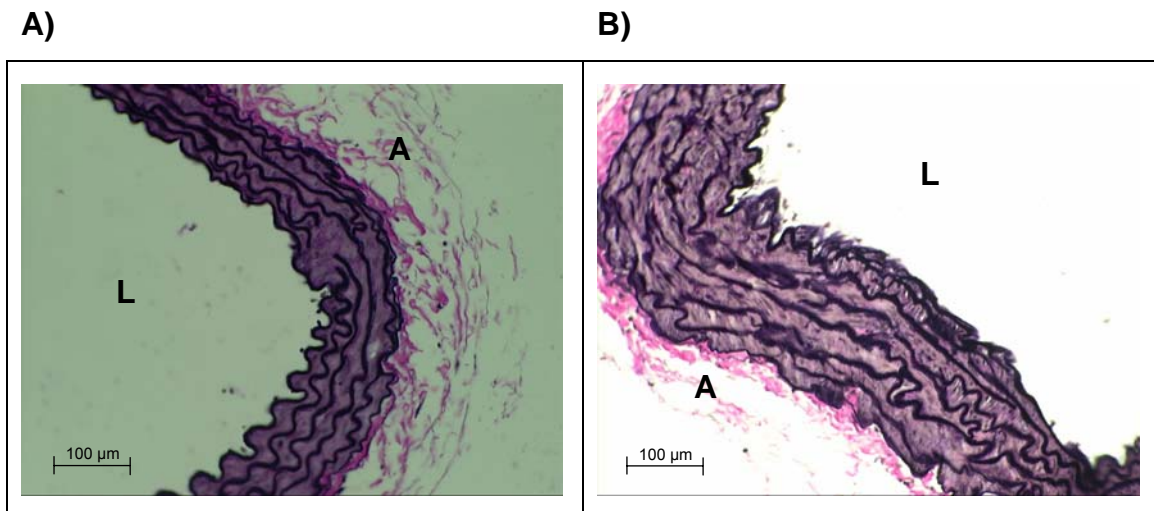


Abb. 4.2.2 EvG-Färbung; Aorta; A) Kontrolle; B) nach 14 Wochen Paigen-Diät; L-Lumen, A-Adventitia.

Die α -Aktin-Färbung diente der spezifischen Darstellung der glatten Muskelzellen und damit zu deren Abgrenzung von anderen Zellen in der Gefäßwand. So konnten bei den mit Paigen- und High fat Diät behandelten Tieren (s. **Abb. 4.2.3B**) auf der Plaqueoberfläche α -Aktin-negative Zellen nachgewiesen werden.

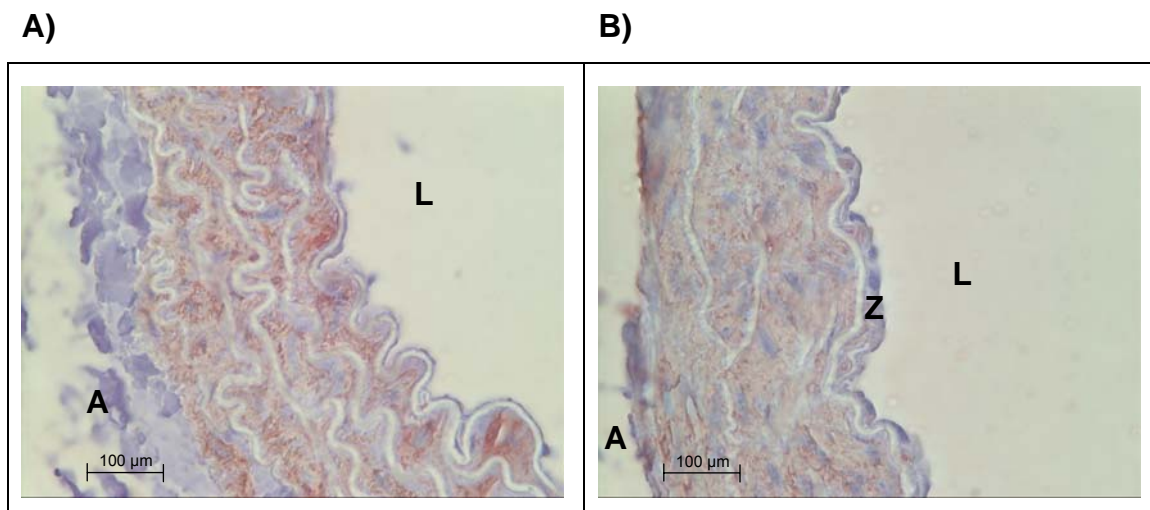


Abb. 4.2.3 α -Aktin-Färbung; Aorta; A) Kontrolle; B) nach 5 Monaten HFD; L- Lumen, A-Adventitia, Z- α -Aktin-negative Zellen.

Die Makrophagenfärbung (Monoclonal Antibody to Mouse F4/80 Antigen; Mouse-on-Mouse Kit (Immunperoxidase)) sollte der Darstellung der erwarteten Schaumzellen (lipidgefüllten Makrophagen) in der Aortenwand dienen. Vor allem sollten die auf der Oberfläche der intimalen Veränderungen der Gefäße α -Aktin-negativen Zellen determiniert werden. Nach Auswertung sämtlicher Aortenpräparaten konnten die erwarteten Schaumzellen jedoch nicht nachgewiesen werden. **Abb. 4.2.4A)** zeigt beispielsweise einen Antigen-positiven Kontrollschnitt (Milz einer Maus) im Vergleich zum befundnegativen Aortenpräparat (**Abb. 4.2.4B)**) eines HFD KO-Tieres.

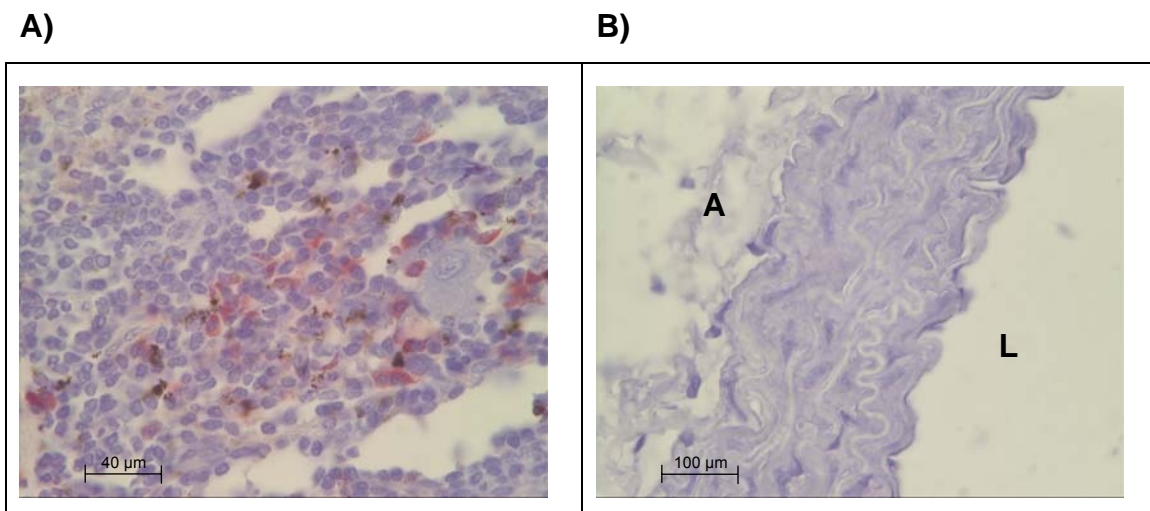


Abb. 4.2.4 Makrophagenfärbung (Monoclonal Antibody to Mouse F4/80 Antigen; Mouse-on-Mouse Kit (Immunperoxidase)); A) Antigen-positive Mausmilz (Kontrollschnitt); B) Antigen-negative Aortenwand (nach 5 Monaten HFD); L-Lumen, A-Adventitia.

Die folgenden Abbildungen sollen die intimalen Veränderungen der Aortenpräparaten im vergrößerten Maßstab darstellen.

In der Abbildung 4.2.5 ist die Aorta einer mit High fat Diät behandelten Maus (Wild Typ) dargestellt. Auf der Oberfläche der Plaque liegen Zellen mit einem großen dunklen Kern. Der morphologischen Erscheinung dieser Zellen entsprechend, könnte es sich hierbei um Makrophagen, evtl. auch um Schaumzellen handeln.

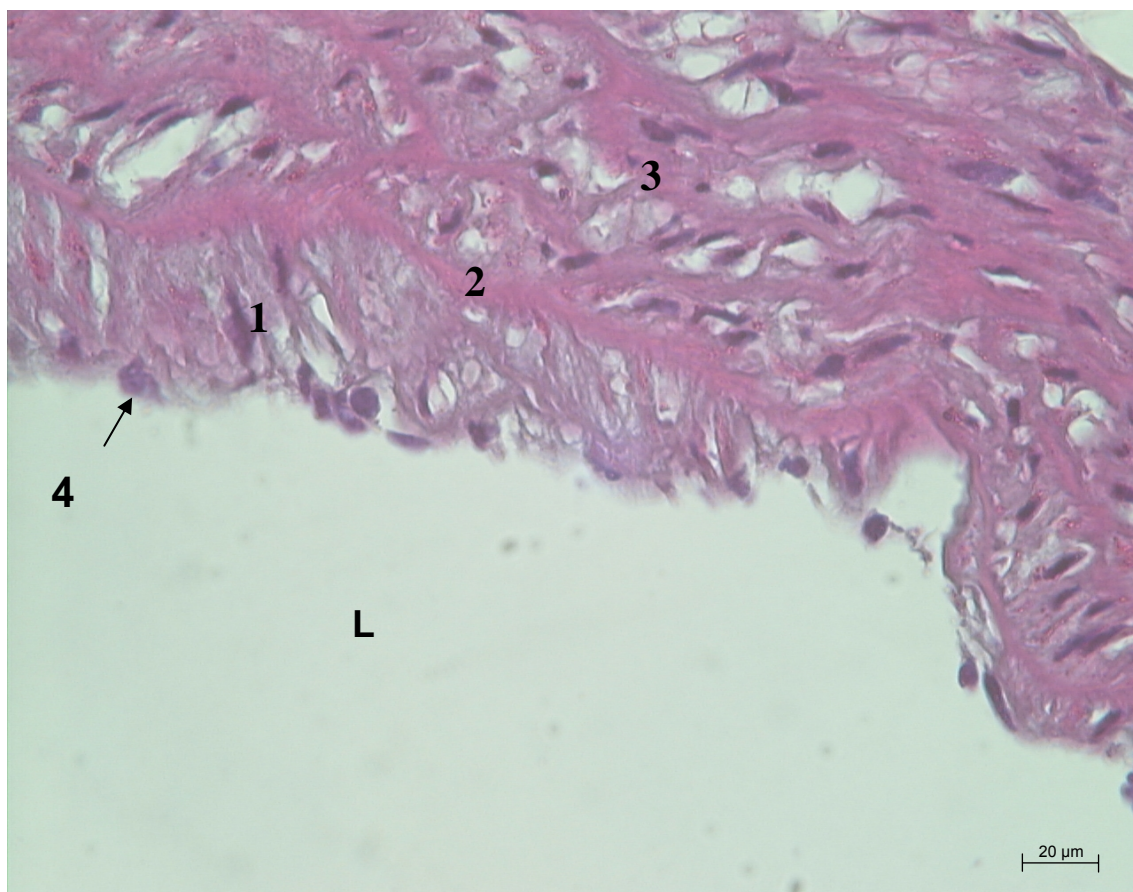


Abb. 4.2.5 HE-Färbung; Aorta; HFD WT; 1) intimale Veränderungen, 2) Lamina elastica interna, 3) Media, 4) potentielle Makrophagen; L-Lumen.

Abbildung 4.2.6 zeigt die intimalen Veränderungen der Aorta eines CTRD WT-Tieres. Plaque ist deutlich von der Media durch die Lamina elastica interna abgegrenzt. Morphologische Kennzeichnungen von einigen Zellen in Plaque sprechen für Makrophage.

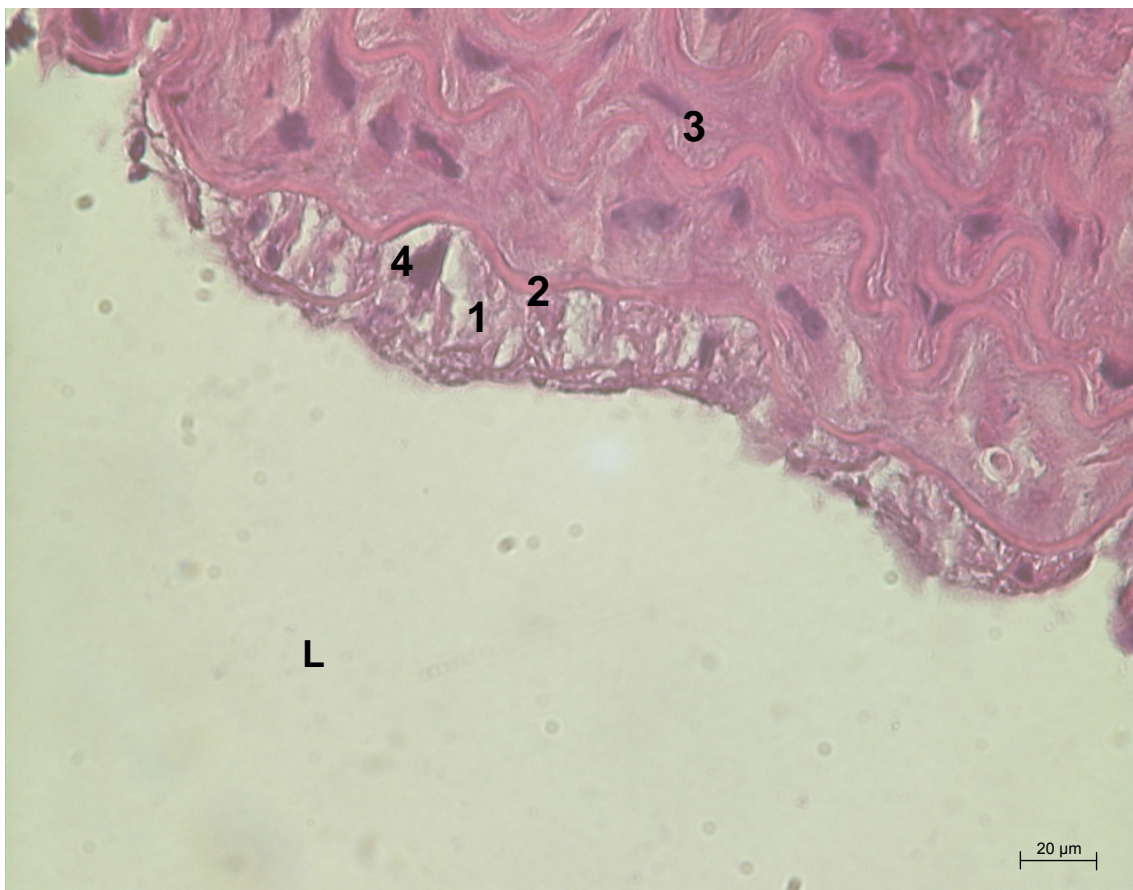


Abb. 4.2.6 HE-Färbung; Aorta; CTRD WT; 1) intimale Veränderungen, 2) Lamina elastica interna, 3) Media, 4) potentielle Makrophagen (evtl. Schaumzellen); L-Lumen.

Abbildung 4.2.7 zeigt die Veränderungen der Intima in EvG-Färbung mit Vergrößerung des subendothelialen Raumes, die auch bei den Kontrolltieren zu finden waren. Die schwarzen Punkte repräsentieren die Zellkerne.



Abb. 4.2.7 EvG-Färbung; Aorta; Kontrolle; 1) intimale Veränderungen, L-Lumen.

Abbildung 4.2.8 zeigt glatte Muskelzellen in der Aortenwand (rot-braun). Auf der Plaquesoberfläche sind die von der α -Aktin-Färbung ausgespart gebliebenen Zellen zu sehen, bei denen es sich möglicherweise um Schaumzellen handelt.

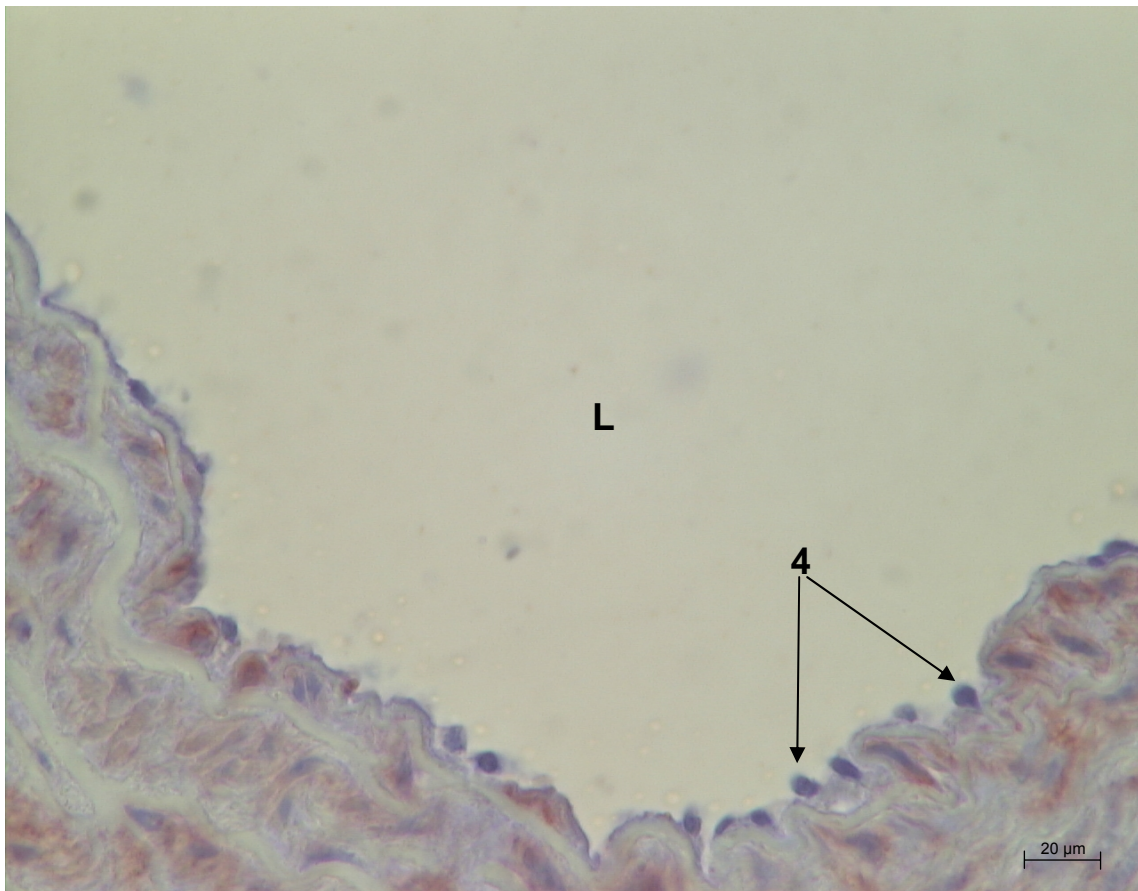


Abb. 4.2.8 α -Aktin-Färbung; Aorta; CTRD KO; L-Lumen, 4- α -Aktin-negative Zellen.

Abbildung 4.2.9 zeigt ein Aortenpräparat einer HFD WT-Maus. Die erwarteten Makrophagen auf der Oberfläche erwiesen sich jedoch als durch Antikörper nicht anfärbbare Zellen.

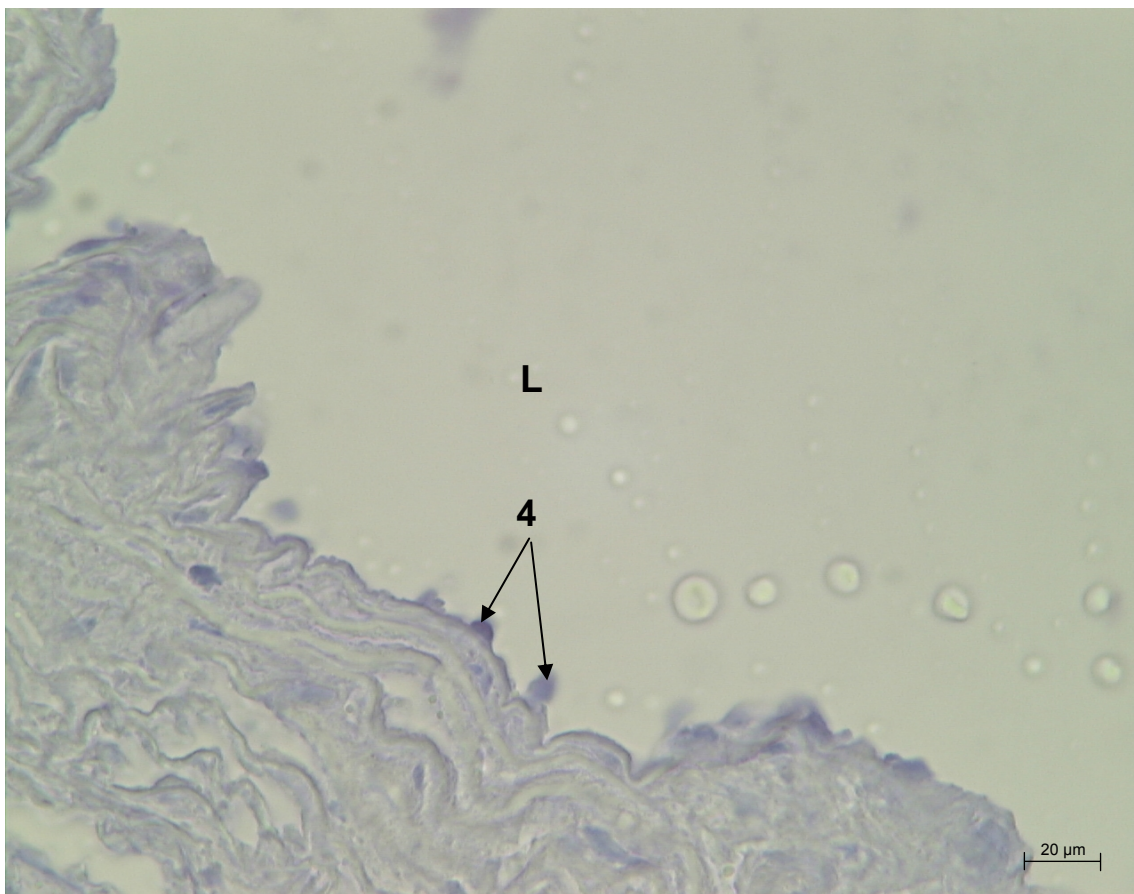


Abb. 4.2.9 Makrophagenfärbung (Monoclonal Antibody to Mouse F4/80; Mouse-on-Mouse Kit (Immunoperoxidase)); Aorta; HFD WT; 4) Makrophagenfärbung-negative Zellen; L-Lumen.

Tabelle 4.2A Anzahl der Tiere mit Plaques in den einzelnen Gruppen.

Gruppe	Kontrolle	14 Wochen Paigen-Diät	21 Wochen Paigen-Diät	HFD WT	HFD KO	CTRD WT	CTRD KO
Anzahl der Tiere mit Plaques	3	3	1	2	2	3	2
Gesamtzahl in der Gruppe (n)	8	8	5	4	4	5	4

Tabelle 4.2B Plaquefläche (in μm^2).

Gruppe	Kontrolle	14 Wochen Paigen-Diät	21 Wochen Paigen-Diät	HFD WT	HFD KO	CTRD WT	CTRD KO
Einzelwerte der Tiere in den verschiedenen Gruppen	1350 3300 2100	1800 3200 3000	6500	3700 11800	7000 1700	1000 4000 6000	14000 1100

4.3 Einfluss von fettreicher Ernährung auf passive Mechanik von thorakaler Aorta

Die Untersuchung zur Charakterisierung der elastischen und viskoelastischen Dehnungseigenschaften der Aorta wurden bei den Tieren nach der Paigen-Diät und High fat Diät jeweils im Vergleich zu den Kontrolltieren durchgeführt. Im Folgenden sind die Mittelwerte einzelner Gruppen im Gruppenvergleich dargestellt.

4.3.1 Einfluss der Paigen-Diät und High fat Diät auf die elastischen Dehnungseigenschaften

4.3.1.1 Einfluss der Paigen-Diät

Bei den 14 Wochen mit der Paigen-Diät behandelten Tieren zeigte sich eine Verringerung der Dehnbarkeit der thorakalen Aorta im Vergleich zu den Kontrollen. Doch war diese Verminderung nur vorübergehend, denn die Ruhe-Dehnungskurve der Tiere nach 21 Wochen Paigen-Diät verläuft sogar noch flacher als die der Kontrollen (s. **Abb. 4.3.1.1**). Die Aorten dieser Gruppe zeigten eine signifikante Zunahme der Dehnbarkeit gegenüber der 14 Wochen-Gruppe.

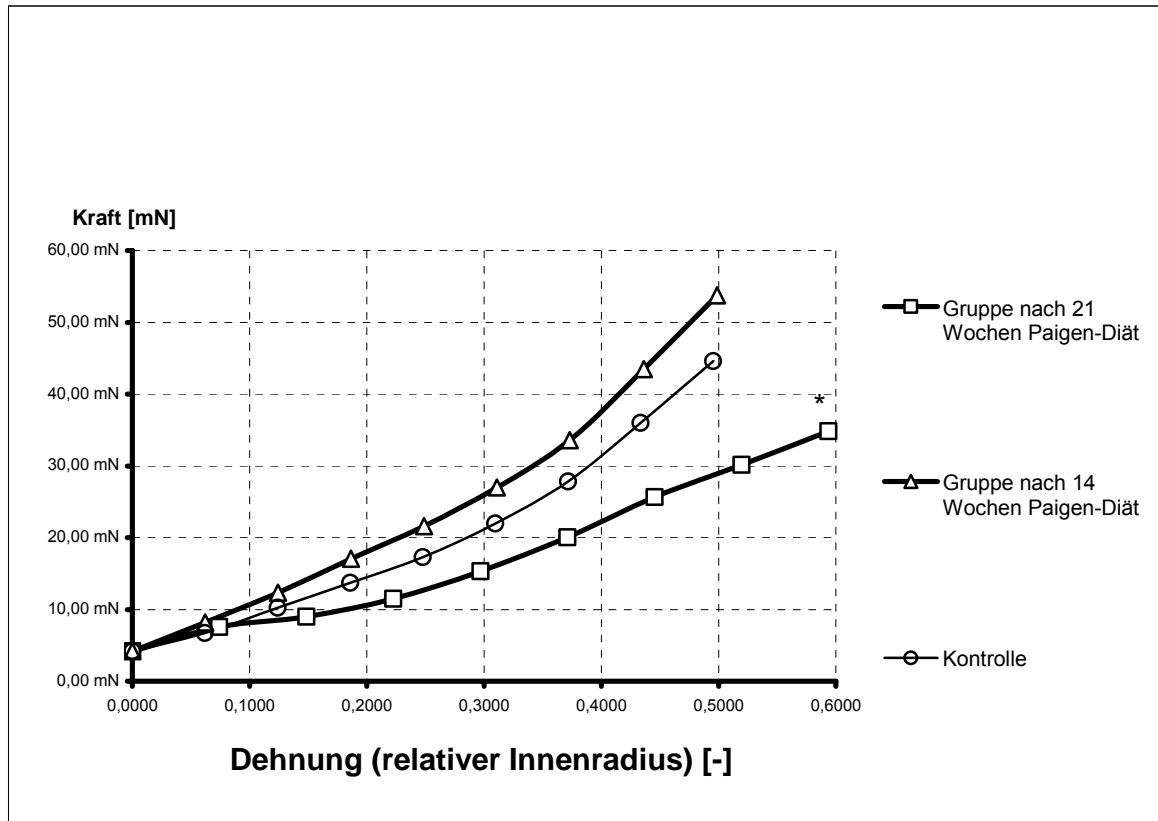


Abb. 4.3.1.1 Ruhe-Dehnungskurven von thorakaler Aorta; Gruppenvergleich (Kontrollen ($n=8$), nach 14 Wochen Paigen-Diät ($n=8$), nach 21 Wochen Paigen-Diät ($n=5$)); Mittelwerte (*signifikanter Unterschied zur 14 Wochen-Gruppe: $p<0,05$, bezogen auf die jeweils letzte Dehnungsstufe).

4.3.1.2 Einfluss der High fat Diät bei Wild Typ-Tieren

Bei dem Vergleich beider Wild Typ-Gruppen wurde eine nicht signifikante Abnahme der Dehnbarkeit der thorakalen Aorta bei den fettreich ernährten Tieren festgestellt (**Abb. 4.3.1.2**).

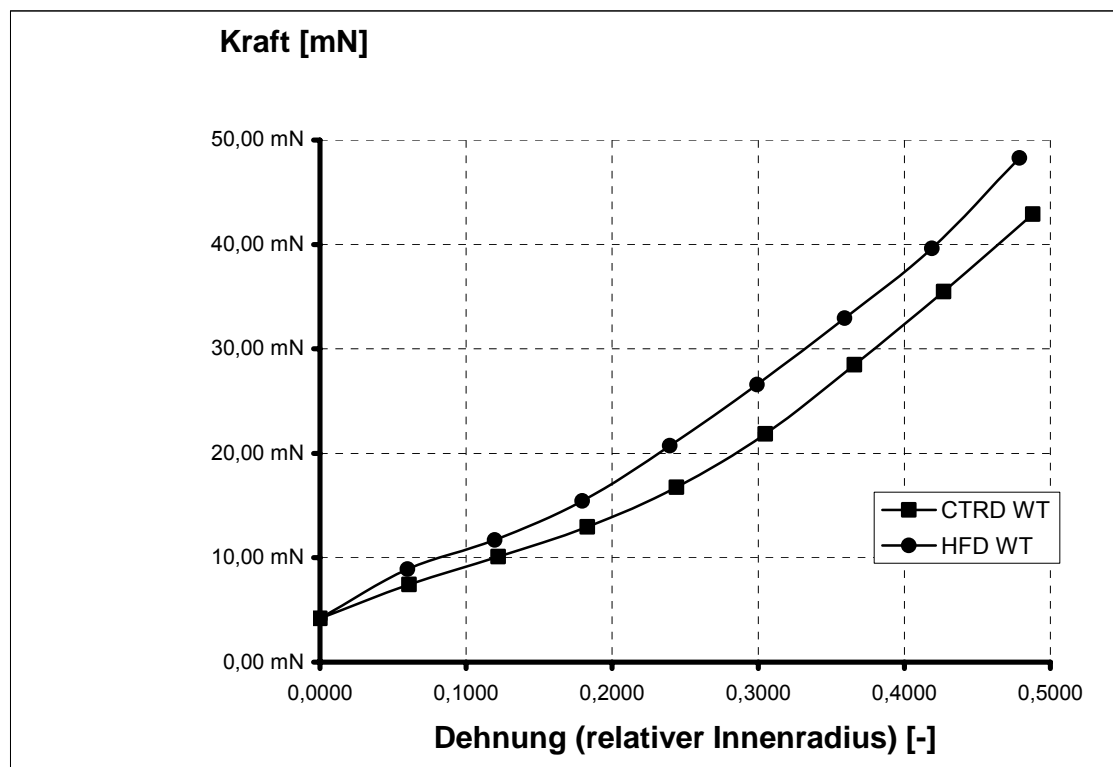


Abb. 4.3.1.2 Ruhe-Dehnungskurven der thorakalen Aorta; Gruppenvergleich (HFD WT (n=4), CTRD WT (n=5)); Mittelwerte.

4.3.1.3 Einfluss der High fat Diät bei SGK1-knock-out-Tieren

Die beiden knock-out-Tiergruppen (HFD KO und CTRD KO) zeigten annähernd den gleichen Anfangsverlauf der Kurve (**Abb. 4.3.1.3**), doch ließ die Aortendehnbarkeit der mit High fat Diät behandelten Tiere in den höheren Stufen gegenüber der Kontrollgruppe nach. Ein signifikanter Unterschied ergab sich jedoch nicht.

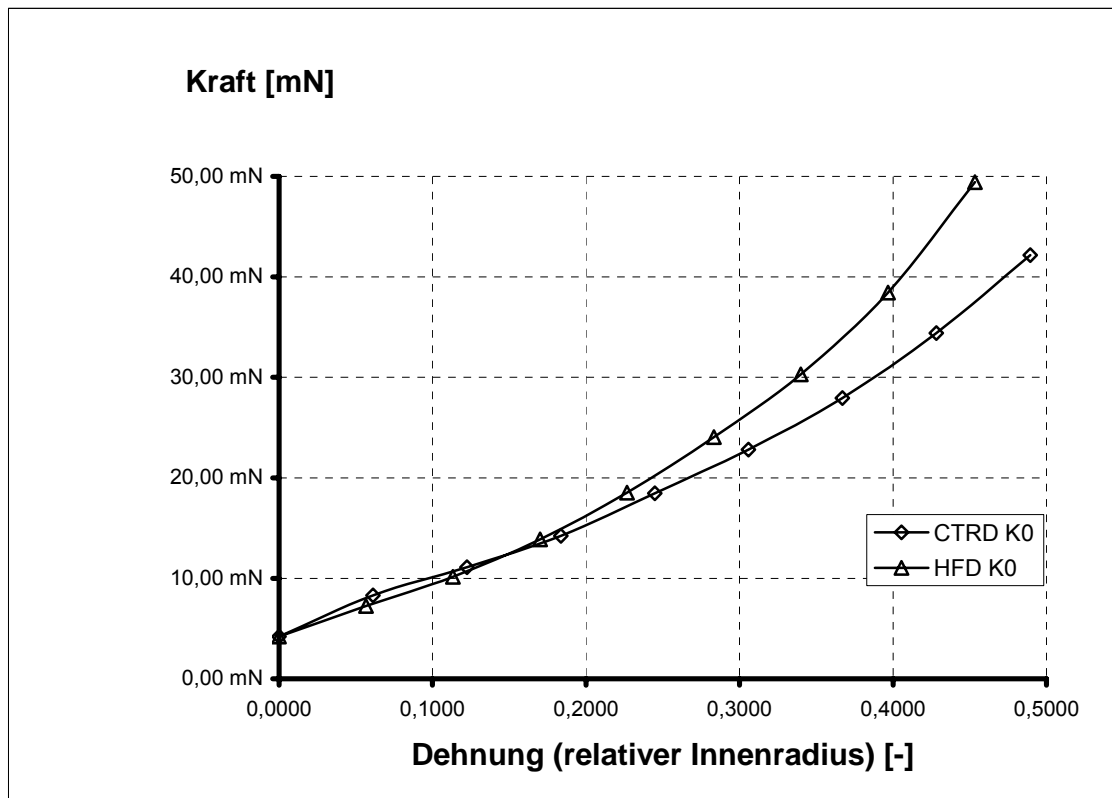


Abb. 4.3.1.3 Ruhe-Dehnungskurven der thorakalen Aorta; Gruppenvergleich (HFD KO (n=5), CTRD KO (n=4)); Mittelwerte.

4.3.1.4 Einfluss der High fat Diät im Gruppenvergleich

Die Aorten beider mit HFD behandelten Tiergruppen (HFD WT und HFD KO) erwiesen eine geringere Dehnbarkeit der thorakalen Aorta im Vergleich zu Kontrollgruppen (CTRD WT und CTRD KO). Ein signifikanter Unterschied ergab sich jedoch nicht (s. **Abb. 4.3.1.4**).

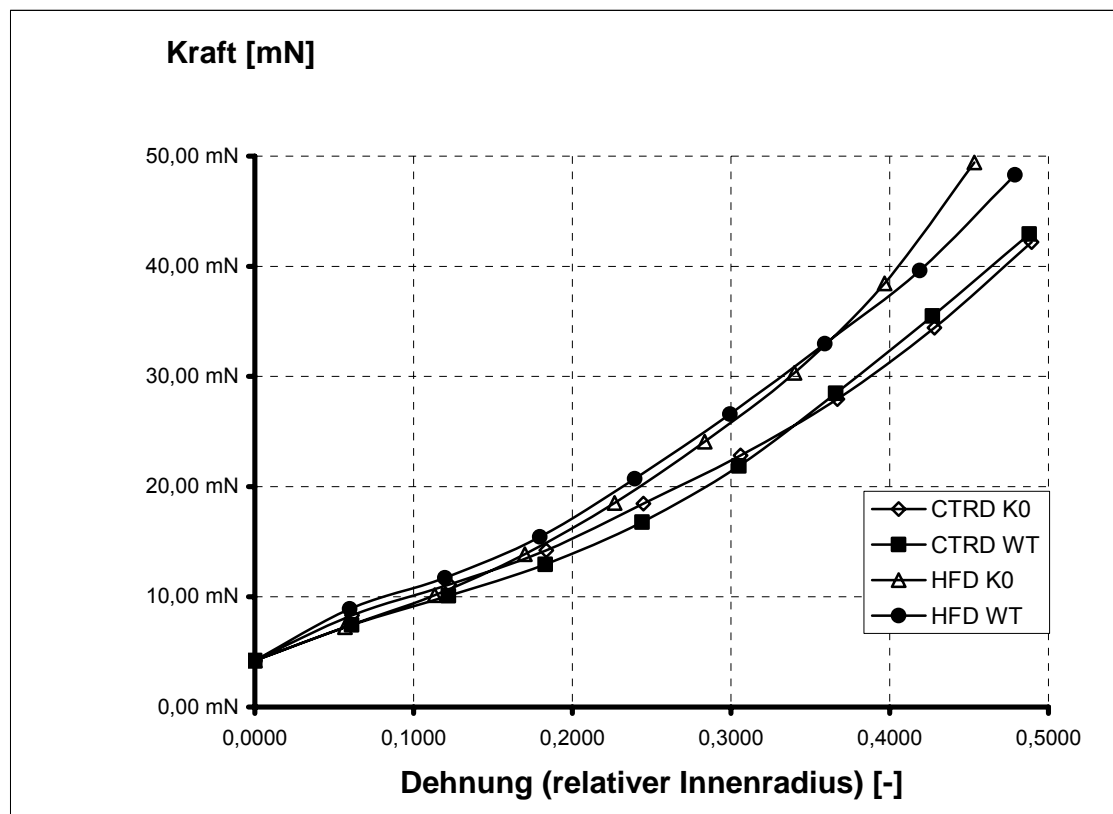


Abb. 4.3.1.4 Ruhe–Dehnungskurven der thorakalen Aorta; Gruppenvergleich (HFD WT (n=4), HFD KO (n=5), CTRD WT (n=5), CTRD KO (n=4)); Mittelwerte.

4.3.2 Einfluss der Paigen-Diät und High fat Diät auf die Viskoelastizität

4.3.2.1 Einfluss der Paigen-Diät

Wie Abbildung 4.3.2.1 zeigt, wiesen die Aorten der Kontrollmäusen und die der 14 Wochen lang mit der Paigen-Diät behandelten Tiere bei der Prüfung der Viskoelastizität einen ähnlichen Kurvenverlauf und damit annähernd gleiche viskoelastische Eigenschaften auf. Dagegen zeigten die Tiere nach 21 Wochen Paigen-Diät eine signifikante Zunahme der viskoelastischen Dehnungseigenschaften der thorakalen Aorta gegenüber den beiden anderen Gruppen.

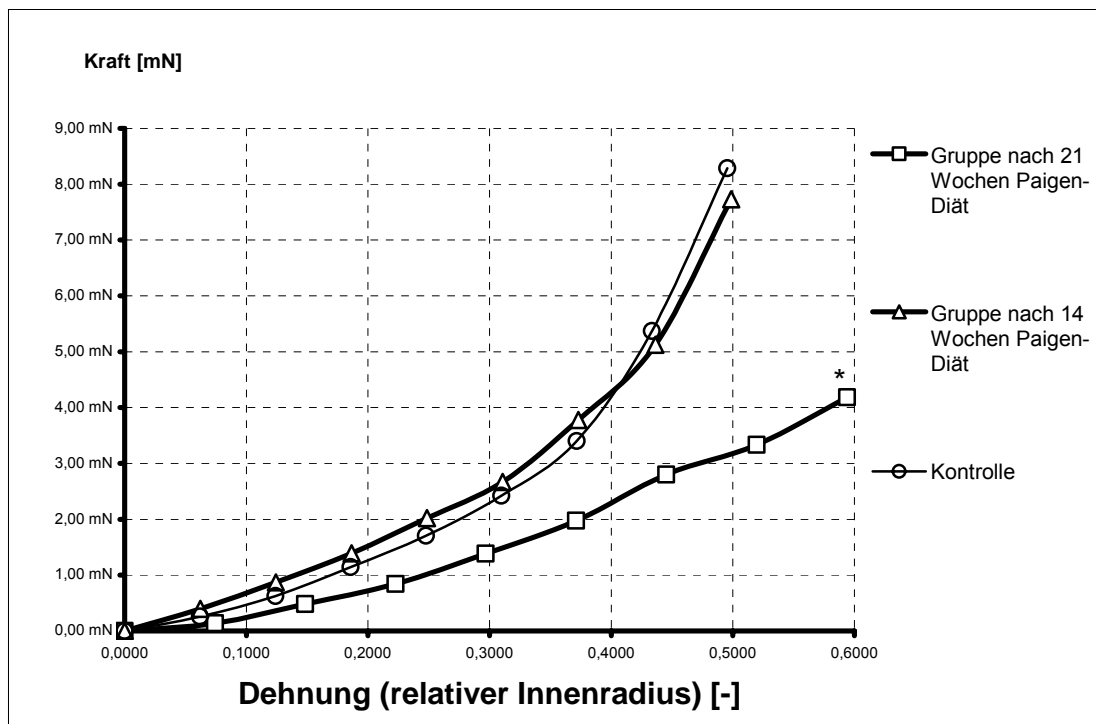


Abb. 4.3.2.1 Viskoelastizitätskurven der thorakalen Aorta; Gruppenvergleich (Kontrolle (n=8), nach 14 Wochen Paigen-Diät (n=8), nach 21 Wochen Paigen-Diät (n=5)); Mittelwerte (*signifikanter Unterschied: $p < 0,05$, bezogen auf die jeweils letzte Entdehnungsstufe).

4.3.2.2 Einfluss der High fat Diät bei Wild Typ-Tieren

Zwischen den beiden Gruppen (HFD WT und CTRD WT) wurde kein signifikanter Unterschied in den viskoelastischen Eigenschaften der Aorta festgestellt (s. **Abb. 4.3.2.2**).

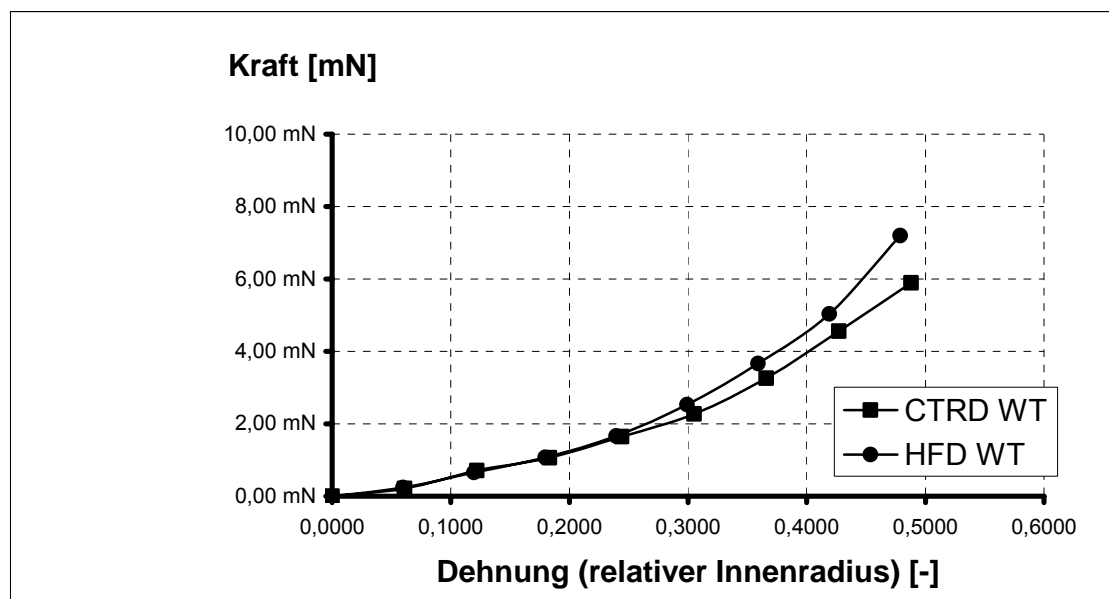


Abb. 4.3.2.2 Viskoelastizitätskurven der thorakalen Aorta; Gruppenvergleich (HFD WT (n=4), CTRD WT (n=5)); Mittelwerte.

4.3.2.3 Einfluss der High fat Diät bei SGK1-knock-out-Tieren

Nach der Anwendung der High fat Diät wurden keine signifikanten Änderungen in viskoelastischen Eigenschaften der HFD KO-Tiere gegenüber der CTRD KO-Gruppe beobachtet (s. **Abb. 4.3.2.3**).

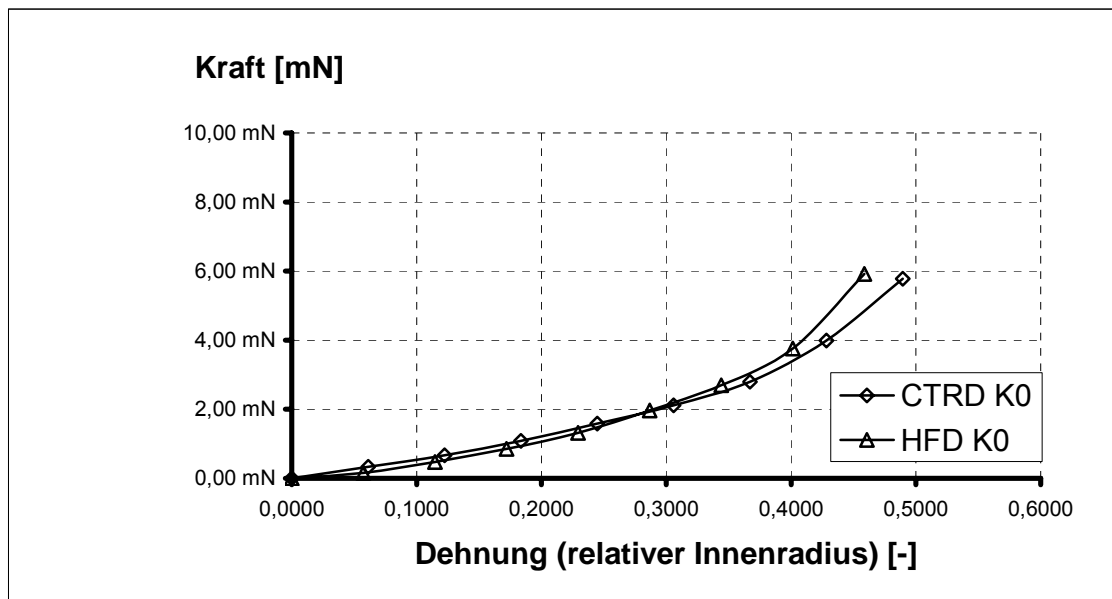


Abb. 4.3.2.3 Viskoelastizitätskurven der thorakalen Aorta; Gruppenvergleich (HFD KO (n=5), CTRD KO (n=4)); Mittelwerte.

4.3.2.4 Einfluss der High fat Diät im Gruppenvergleich

Der Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied in der Viskoelastizität der thorakalen Aorten zwischen den Mäusen nach der High fat Diät und Standard-Diät bzw. zwischen den normalen und knock-out Tieren (s. **Abb. 4.3.2.4**).

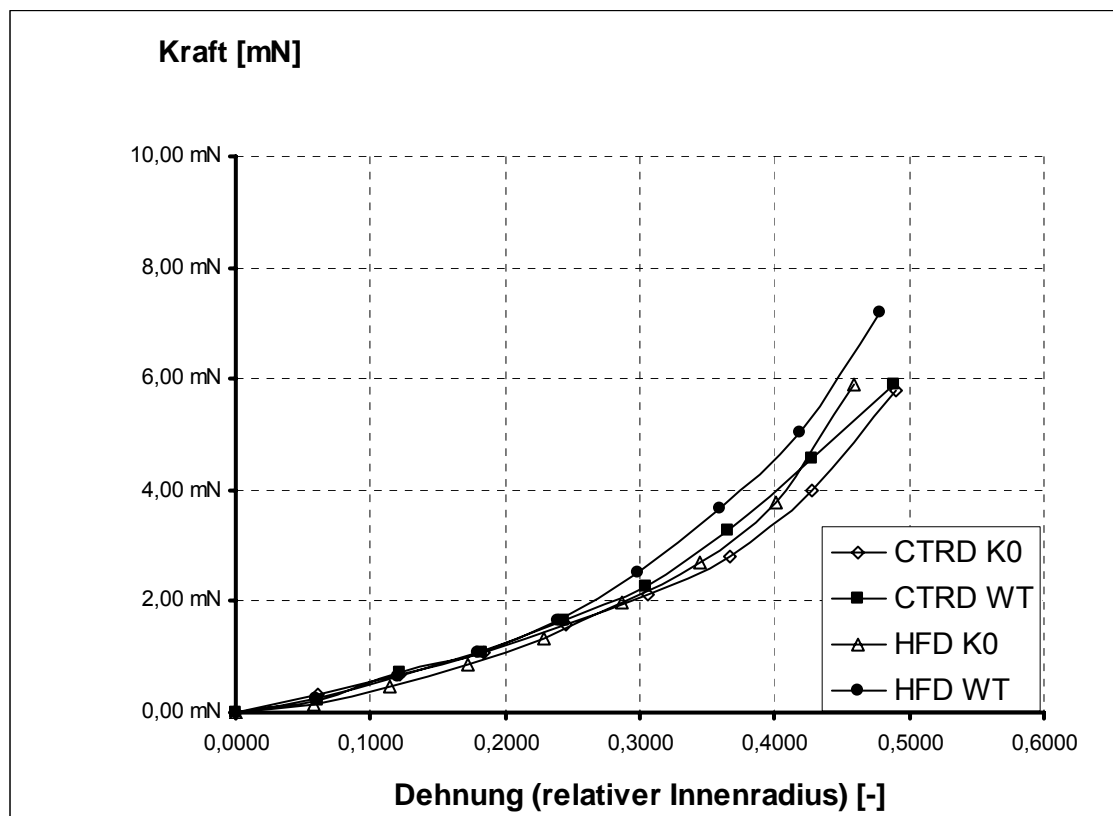


Abb. 4.3.2.4 Viskoelastizitätskurven der thorakalen Aorta; Gruppenvergleich (HFD WT (n=4), HFD KO (n=5), CTRD WT (n=5), CTRD KO (n=4)); Mittelwerte.

4.4 Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf aktive mechanische Eigenschaften von thorakaler Aorta

Kontraktile Eigenschaften und Veränderung der Endothelfunktion wurden bei den Tieren nach 14 bzw. 21 Wochen Paigen-Diät im Vergleich zur Kontrollgruppe und bei den Wild Typ-Tieren nach 5 Monaten High fat Diät (HFD WT) bzw. Standard-Diät (CTRD WT) untersucht. Im Folgenden sind die Mittelwerte einzelner Gruppen im Gruppenvergleich dargestellt.

4.4.1 Wirkung KCl-angereicherter Lösung und endothelvermittelte Relaxation

In den nächsten Abbildungen sind die Wirkungen KCl-angereicherter Lösung in verschiedenen Konzentrationsstufen (30 mM, 60 mM, 90 mM) und von Nw-Nitro-L-Arginin auf der Stufe von 90 mM (90+Nitroarg) auf die thorakale Aorta dargestellt.

4.4.1.1 Einfluss der Paigen-Diät

Abbildung **4.4.1.1** zeigt einen signifikanten Unterschied in der Reaktion auf die Applikation von KCl-angereicherter Lösung zwischen den Kontrollen einerseits und den Tieren nach 14 bzw. 21 Wochen Paigen-Diät andererseits. Schon auf die Konzentrationsstufe von 30 mM KCl-angereicherter Lösung war die Reaktion der Kontrollen annähernd maximal und ließ sich durch Erhöhung der KCl-Konzentration nicht mehr wesentlich steigern. Im Vergleich dazu wurde bei den Tieren nach 14 und 21 Wochen Paigen-Diät eine konzentrationsabhängige Steigerung der Kontraktionskraft beobachtet. Auf allen KCl-Konzentrationsstu-

fen war die Gefäßkontraktion der mit Paigen-Diät behandelten Tiere signifikant stärker im Vergleich zu Kontrollen.

Auch die Einwirkung von Nw-Nitro-L-Arginin auf die Aorta führte bei den Kontrollen nur zu einer unbedeutenden Kontraktionszunahme. Die 14 und 21 Wochen-Gruppen zeigten dagegen durch die Hemmung der endothelialen NO-Synthase eine deutliche Kontraktionssteigerung. Diese Steigung war bei der 14 Wochen-Gruppe signifikant (Paarvergleichstest).

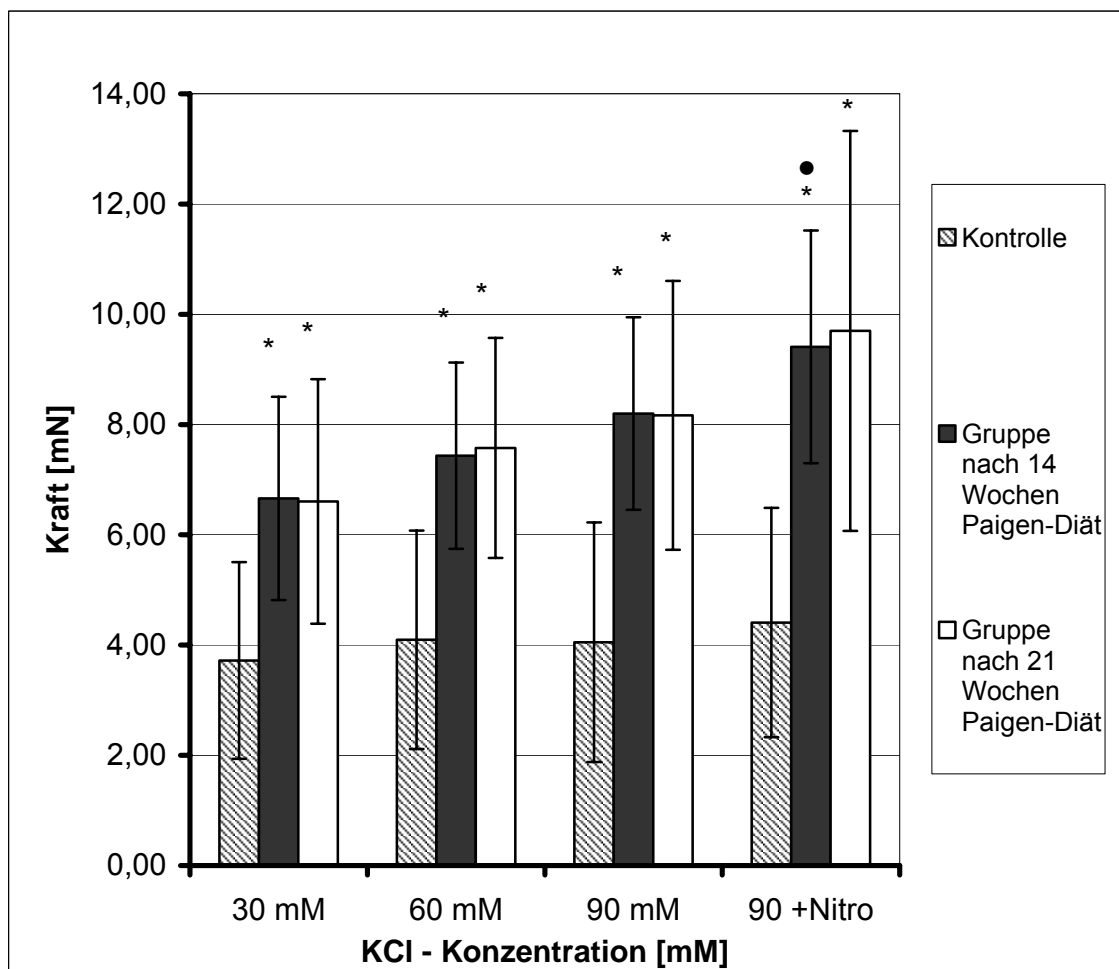


Abb. 4.4.1.1 Wirkung von KCl-angereicherter Lösung in verschiedenen Konzentrationen (30 mM, 60 mM, 90 mM) und Nw-Nitro-L-Arginin auf die thorakale Aorta; Gruppenvergleich (Kontrolle (n=8), Tiere nach 14 (n=6) und 21 (n=5) Wochen Paigen-Diät); die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung (*signifikanter Unterschied zwischen der 14 Wochen-

Gruppe und den Kontrollen bzw. 21 Wochen-Gruppe und den Kontrollen; •signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung von 90 mM KCl-angereicherter Lösung und 90+NLA bei den 14 Wochen-Tieren; $p < 0,05$).

4. 4. 1. 2 Einfluss der High fat Diät

Nach der Verabreichung der High fat Diät wurde gegenüber der CTRD-Gruppe eine nicht signifikant verringerte Reaktion auf KCl-angereicherter Lösung aller Konzentrationen beobachtet. Die Zugabe von Nw-Nitro-L-Arginin führte in beiden Gruppen zu einer Zunahme der Kontraktionskraft (s. **Abb. 4.4.1.2**).

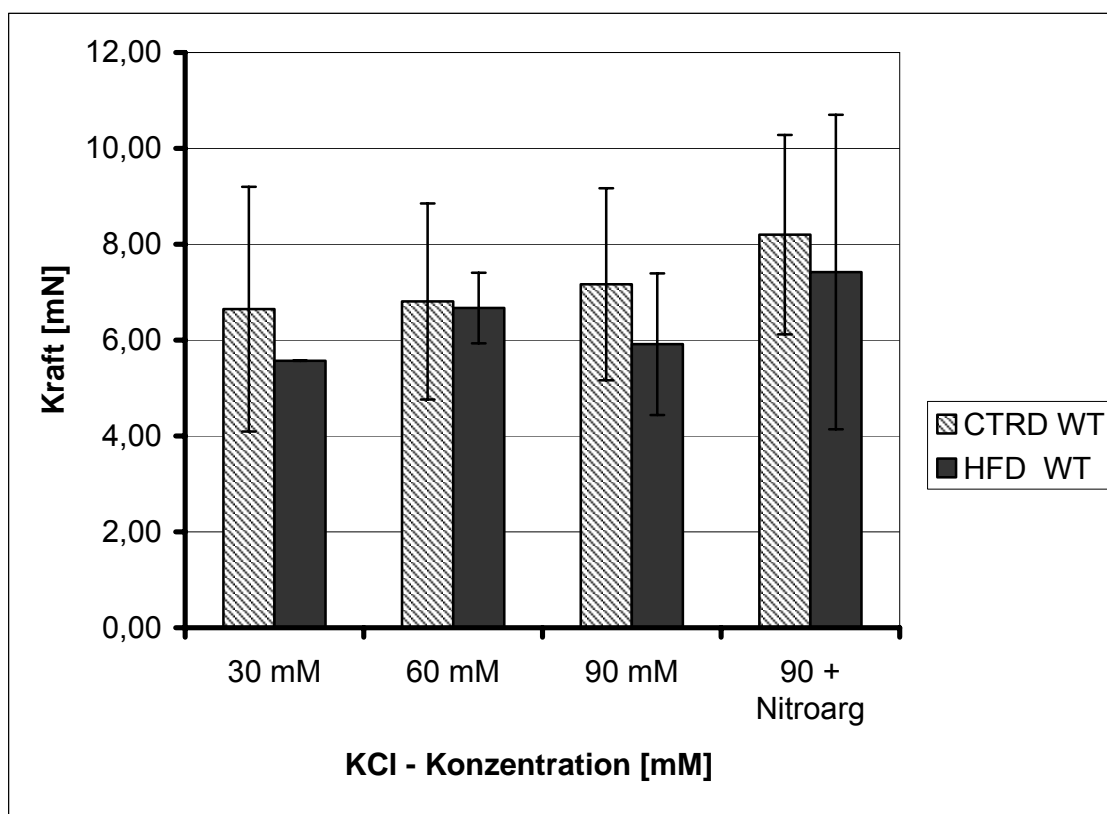


Abb. 4.4.1.2 Wirkung von KCl-angereicherter Lösung in verschiedenen Kon-

zentrationen (30 mM, 60 mM, 90 mM) und Nw–Nitro–L–Arginin auf die thorakale Aorta; Gruppenvergleich (HFD WT (n=2) und CTRD WT (n=3)); die Säulen repräsentieren Mittelwerte±Standartabweichung.

4. 4. 2 Wirkung von L–Phenylephrin auf die thorakale Aorta

In den nächsten Abbildungen ist die Wirkung von L–Phenylephrin in verschiedenen Konzentrationsstufen von 10^{-8} M bis 2×10^{-6} M auf die Kontraktilität der thorakalen Aorta dargestellt.

4. 4. 2. 1 Einfluss der Paigen-Diät

Wie die **Abb. 4.4.2.1** zeigt, führte die Verabreichung der Paigen-Diät zu einer Veränderung der Reaktion auf die Einwirkung von L–Phenylephrin. Die Kontrollgruppe erwies eine signifikant stärkere Reaktion in den niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu den Tieren nach der Paigen-Diät. Dagegen war die L-Phenylephrin-induzierte Kontraktionskraft bei höheren Konzentrationen in den hypercholesterinämischen Tieren signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht.

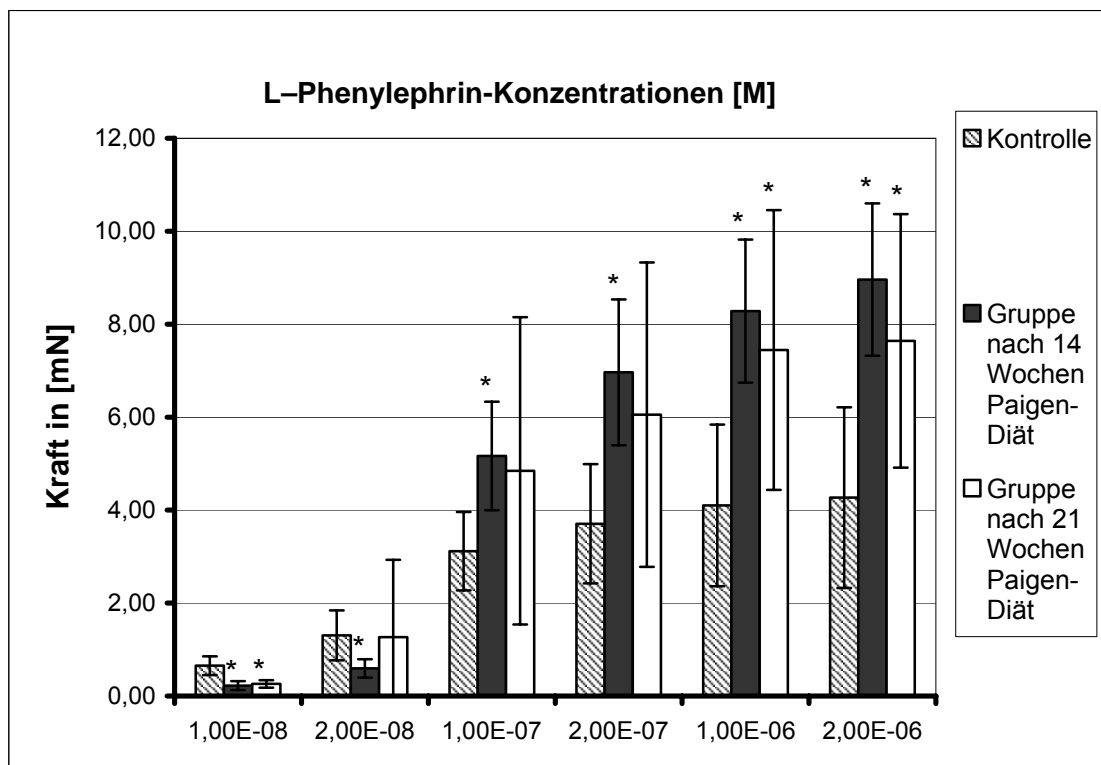


Abb. 4.4.2.1 Wirkung von L-Phenylephrin in verschiedenen Konzentrationen (10^{-8} M; 2×10^{-8} M; 10^{-7} M; 2×10^{-7} M; 10^{-6} M; 2×10^{-6} M) auf die thorakale Aorta; Gruppenvergleich (Kontrolle (n=7), Tiere nach 14 (n=4) bzw. 21 Wochen (n=5) Paigen-Diät); die Säulen repräsentieren Mittelwert+Standartabweichung (*signifikanter Unterschied zu Kontrollen: $p < 0,05$).

4. 4. 2. 2 Einfluss der High fat Diät

Die Wirkung von L-Phenylephrin auf die thorakale Aorta der HFD WT- und CTRD WT-Tiere war mit einander vergleichbar. Es ergab sich konzentrationsabhängige Kontraktionssteigerung (s. **Abb. 4.4.2.2**).

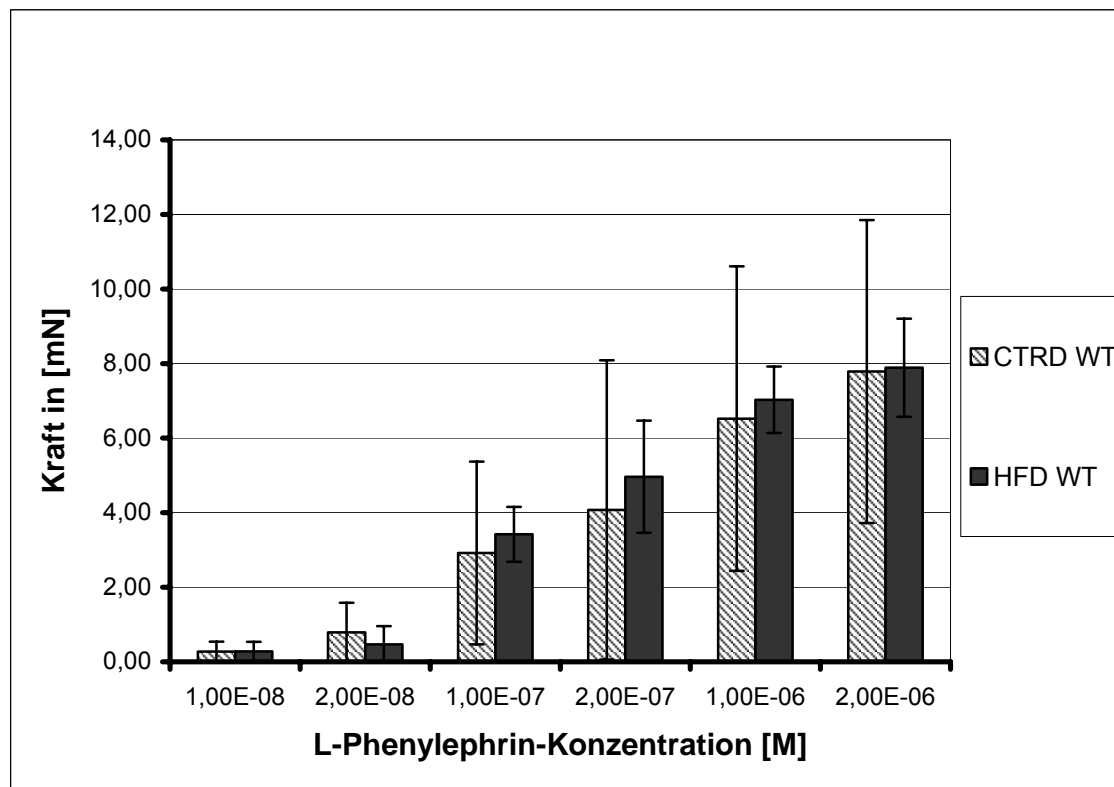


Abb. 4.4.2.2 Wirkung von L-Phenylephrin in verschiedenen Konzentrationen (10^{-8} M; 2×10^{-8} M; 10^{-7} M; 2×10^{-7} M; 10^{-6} M; 2×10^{-6} M) auf die thorakale Aorta; Gruppenvergleich (HFD WT (n=2) und CTRD WT (n=3)); die Säulen repräsentieren Mittelwert+Standartabweichung.

5 Diskussion

5.1 Rolle von Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus in der Atherosklerose

Die Erhöhung des Serum-Cholesterinspiegels steht heute unumstritten in einem engen Zusammenhang mit dem Risiko der Atherosklerose. Schon im Jahr 1908 zeigte der russische Wissenschaftler Ignatovski eine Induktion der Atherosklerose an Kaninchen durch die Anwendung einer milch- und eigelbreichen Diät. Im Jahr 1910 entdeckte der deutsche Chemiker Windaus das Vorhandensein von Cholesterin in den menschlichen atherosklerotischen Plaques (Fey 2005). Im Jahr 1929 zeigte der norwegische Arzt C. Müller an einem kleinen Kollektiv einen Zusammenhang zwischen familiärer Hypercholesterinämie und der Entwicklung von Atherosklerose und Xanthomen (Thiery et al. 1999). In einer Vielzahl von Studien wurde der Einfluss des Cholesterinspiegels auf die Ereignisrate von kardiovaskulären Erkrankungen überprüft. Im Jahr 1979 begann in Münster die PROCAM Studie. An einem großen Kollektiv über 20.000 Probanden wurde die Bedeutung des Gesamtcholesterins und Verhältnis von LDL- und HDL-Fraktionen auf die Entstehung von KHK gezeigt (Assmann et al 1999). In einer zwölfjährigen Untersuchung an 2425 Probanden zeigte die Frahmingham-Studie den Zusammenhang zwischen der Höhe von HDL-Cholesterin und der Entwicklung des Myokardinfarkts (Abbott et al. 1988). Regression der KHK durch Cholesterinreduktion zeigte zum ersten Mal die CLAS-Studie in 1987 (Thiery et al. 1999). Die Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) ergab eine Senkung des Cholesterinspiegels und der KHK-Mortalität unter der Behandlung mit Simvastatin bei Patienten mit Herzinfarkt oder stabiler Angina pectoris (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group 1994). Neue Studien belegen, dass Simvastatin-Behandlung auch zu einer signifikanten Reduktion von transitorischen ischämischen Attacken, Schlaganfällen, vaskulären und korona-

ren Ereignissen bei Patienten mit zerebrovaskulären Erkrankungen oder Diabetes im Vergleich zu Kontrollen führt (Collins et al. 2004).

Die atherogenen Wirkungen der Lipoproteine ergeben sich einerseits durch die Erhöhung des LDL- und andererseits durch die Senkung des HDL-Cholesterins. LDL und HDL sind aber nicht allein entscheidend für die Pathogenese. Vielmehr wird durch das Vorkommen zusätzlicher Risikofaktoren wie Erhöhung des Lp (a), verstärkte LDL-Oxidation, Apo E-Genotyp und Diabetes mellitus die atherogene Wirkung der Lipoproteine deutlich verstärkt. Von besonderer Bedeutung in der Atherogenese sind die oxidierten LDL, da sie in der Gefäßwand inflammatorisch wirken. Sie sind in der Lage, die Einwanderung von Monozyten und Leukozyten einerseits und die Bildung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Schaumzellen andererseits zu induzieren (Ross et al. 1996).

Die Oxidation von LDL wird u. a. auch durch glykierte Proteine beeinflusst. Diese entstehen vermehrt, wenn die Blutzuckerwerte erhöht sind. Diese Proteine werden auch als AGE-Proteine (advanced glykation endproducts) bezeichnet (Bierhaus 1999). AGE-Proteine werden verstärkt in den Gefäßen von Diabetikern abgelagert. Selbst die oxidierten LDL können glykiert werden, was eine vermehrte Aufnahme durch Makrophagen nach sich zieht. Diabetes ist daher eng mit arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen assoziiert (Ceriello et al 2004). Diese treten bei Diabetikern zwei bis vier Mal häufiger als bei Nichtdiabetikern (Haffner et al. 1998 and Beckman et al. 2002). Auch die Vorstufe zum Diabetes mellitus, das metabolische Syndrom, verstärkt die atherogene Wirkung der Risikofaktoren. Die hier zu beobachtenden Bluthochdruck, Insulinresistenz und daraus folgende Adipositas mit Fettstoffwechselstörungen führen zur Veränderung der Funktion des Endothels, sowie auch der glatten Muskelzellen, Aktivierung der Gerinnung, Reduktion der Fibrinolyse und Entstehung der Atherosklerose (zur Übersicht s. bei Rösen 2004). Atherosklerotisch veränderte Gefäße verlieren an Elastizität und können den angemessenen Blutfluss nicht mehr sicherstellen.

5.2 Die Maus als Modell in der Atheroskleroseforschung

Um die Pathogenese der Atherosklerose zu erforschen, ist man auf die Verwendung von Tiermodellen angewiesen. Eine besondere Bedeutung nehmen hier kleine Tierarten ein, die leicht zu halten und einfach zu handhaben sind.

Die Maus als eines der bedeutsamen Tiermodelle hat sich in der Atheroskleroseforschung fest etabliert. Zusätzlich vorteilhaft ist die relativ einfache Manipulation des Genoms (zur Übersicht s. bei Qiao et al. 1994). Bisher wurden vor allem knock-out Mäuse in der Atheroskleroseforschung verwendet. Die Ausschaltung eines Proteins bzw. seine Überexpression führen jedoch zu Auswirkungen im Gesamtorganismus. So werden bei den knock-out Mäusen deutliche Veränderungen in der normalen Physiologie beobachtet (Johnston et al. 2002). Die weitgehende Konkordanz zwischen menschlichem Genom und Genom der Maus wurde für die phänotypischen Merkmale: HDL-Spiegel, Hypertension, Asthma, entzündliche Darmerkrankungen, Osteoporosis und Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen (Paigen 2003).

In dieser Arbeit war es jedoch von Interesse, genetisch unveränderte Tiere als Atherosklerosemodelle zu etablieren. Eine der häufigsten Methoden zur Erzeugung von atherosklerotischen Läsionen ist die Anwendung von lipidangereicherten Diäten. Die ersten Untersuchungen hierzu wurden bei C57BL/6 Mäusen durch die Verabreichung von cholesterinhaltigen Diäten durchgeführt (Paigen et al. 1987 und 1990). Diese Befunde werden in 5.3.1 und 5.4 näher erläutert. Zu den Besonderheiten des Mausmodells gehören eine hohe Resistenz gegen Atherosklerose und aufwendige Blutabnahme.

5.3 Einfluss der fettreichen Ernährung auf Serumparameter

5.3.1 Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf das Serumcholesterin

Hypercholesterinämie repräsentiert durch hohes LDL bzw. niedrigen HDL/LDL Quotient einen bekannten Risikofaktor für Atherosklerose. Die Ursachen der Hypercholesterinämie sind sowohl durch exogene Faktoren (z. B. ungünstige Ernährung, Übergewicht) als auch familiär (z. B. defektes Apolipoprotein B 100) bedingt (Miserez et al. 2004). Ungesunde Ernährungsweise mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren und Nahrungscholesterin führt zur Erhöhung des Plasmacholesterins. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass der hohe Cholesterinspiegel durch eine langfristige Verringerung der Fettzufuhr sinkt. Bei manchen Versuchstieren (Maus, Kaninchen, Ratte) kann unter der Anwendung der lipidangereicherten Diäten die Entstehung von Hypercholesterinämie und atherosklerotischen Plaques induziert werden. Zahlreiche Untersuchungen wurden zu diesem Thema veröffentlicht (zur Übersicht s. bei Heinle et al. 2000, Heinle et al. 2002 und Schneider et al. 1999). Auch in dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Fütterungsmodelle erprobt, die sich bezüglich des Fettgehaltes der Diäten unterschieden. Das erste Fütterungsmodell, die Paigen-Diät, enthielt u. a. 1,25% Cholesterin, 15% Fett, 0,5% Natrium Cholat. Es wurde bei Tieren der Versuchsreihe A 14 und 21 Wochen angewandt. Das zweite Fütterungsmodell, High fat Diät, enthielt u. a. 45% Kohlenhydrate, 12% Rohfett und wurde den Tieren der Versuchsreihe B 5 Monate lang verabreicht. Es soll typischerweise zu Diabetes mellitus Typ II führen.

Die Anwendung beider lipidangereicherter Diäten führte bei den Versuchstieren zur Induktion der Hypercholesterinämie und zur Bildung von atherosklerotischen Plaques. Signifikante Anstiege des Serumcholesterins wurden bei den Tieren nach Verabreichung der Paigen-Diät nach 14 Wochen und bei der HFD KO-Gruppe beobachtet. Jedoch waren die Cholesterinwerte

auch sämtlicher Kontrolltiere erhöht, was sich in der Plaquebildung bei diesen Tieren widerspiegelte.

In der Übersicht von Plump (2005) wurde ebenfalls der Einfluss der Paigen-Diät auf Plasmacholesterin der Versuchstiere beschrieben. Vergleichbar führte sie zur Erhöhung des Cholesterinspiegels auf 200 bis 300 mg/dl mit Erhöhung von nicht-HDL-Lipoproteinen. Bei der Anwendung der Standard-Diät beträgt dieser Wert im Gegensatz dazu 60 bis 80 mg/dl. Auch die Arbeiten anderer Autoren zeigten, dass durch die Anwendung fettreicher Diäten eine Hypercholesterinämie bei Mäusen erzeugt werden konnte (Murphy et al. 2002). Hier wurde wie bei der Paigen-Diät eine cholesterin- und fettreiche Diät zusammen mit Natrium Cholat nicht genetisch veränderten C 57 BL/6 Mäusen 4 Wochen lang verabreicht. Dies führte zur Entstehung der Hypercholesterinämie. Die histologischen Untersuchungen zeigten jedoch keine Entstehung von „Fatty Streaks“-Läsionen.

Offensichtlich ist es also auch in der Maus möglich, durch cholesterin- und fettreiche Diät eine Erhöhung des Plasmacholesterinspiegels und damit eine atherogene Risikokonstellation zu erzielen.

5. 3. 2 Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf antioxidative Kapazität

Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen die freien Radikale. Diese entstehen u. a. im aeroben Stoffwechsel der Zelle selbst, z. B. durch NAD(P)H-Oxidation in Mitochondrien. Pathophysiologisch wichtige Quellen stellen auch die Entzündungsreaktionen oder die LDL-Oxidation dar. Hypercholesterinämie, Insulinresistenz und andere Stoffwechselstörungen führen zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen. Diese aktivieren Gerinnung und inflammatorische Reaktionen mit Ausschüttung von vasoaktiven

Substanzen. Die Folgen sind Schädigung des Endothels und verminderte Bildung von Stickstoffmonoxid. Diese Reaktionskaskade führt zur Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen und strukturellen und funktionellen Veränderungen der gesamten Gefäßwand (Ross et al. 1996). Durch oxidativen Stress entstehen vermehrt chemisch modifizierte LDL, die sich an der Expression der Adhäsionsmoleküle für Makrophagen aber auch an deren Umwandlung in Schaumzellen beteiligen. Antioxidantien bewirken eine Verminderung des oxidativen Stresses. Sie fangen die freien Radikale ab und verhindern dadurch die Oxidation der LDL. Einige Antioxidantien besitzen möglicherweise die Eigenschaft, Gefäßmuskelzell-Proliferation zu verhindern und Endothelfunktion zu verbessern (Traber 2001). Der Einsatz von Antioxidantien zur Primärprävention der Atherosklerose ist jedoch umstritten (zur Übersicht s. bei Kreuzer und Tiefenbacher 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Paigen-Diät und HFD auf die antioxidative Kapazität des Serums untersucht, die aus der Unterdrückungszeit der Radikalbildung in der AAPH-Reaktion ermittelt wurde. In beiden Versuchstierengruppen mit der Paigen-Diät zeigten die Ergebnisse eine Senkung der totalen antioxidativen Kapazität. Ähnliche Ergebnisse ermittelte auch die Arbeit von Heinle et al. 2002. Hier wurde den Kaninchen (Weisse Neuseeländer) eine cholesterinreiche (2%) Diät 6 Wochen lang verabreicht. Anschließend folgte eine Regressionsphase von 68 Wochen. Die Ergebnisse zeigten eine Erhöhung der Parameter des oxidativen Stresses (oxLDL) mit einem Maximum in Woche 14 bei den mit Diät behandelten Tieren gegenüber den Kontrollen.

Dagegen war die antioxidative Kapazität bei den Tieren mit HFD im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Dies steht im Widerspruch zum erwarteten Resultat, da die Diät zu Diabetes mellitus Typ II führt, der über Hyperglykämie und die Bildung von AGE-Proteinen eine zusätzliche Erhöhung des oxidativen Stresses verursacht (zur Übersicht s. bei Aronson et al. 2005 und Sonta et al. 2004). Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit der Applikation von Dexamethason 10 mg/g pro Körpergewicht 24 Stunden vor der Tötung.

Dexamethason besitzt, wie auch die anderen Glukokortikoide, eine antiinflammatorische Wirkung. Diese betrifft vor allem die Leukozyten-Immigration, Freisetzung von Cytokinen und Bildung von Entzündungsmediatoren (Lüllmann et al. 2001). Auch wird eine Veränderung der Aktivität von antioxidativen Enzymen unter Dexamethason-Phosphat beschrieben (Ozmen, 2005). Hinweise dafür, dass Dexamethason die antioxidative Kapazität des Serums erhöhen könnte, wurden in der Literatur nicht gefunden (aktuelle medline Recherche).

Offensichtlich ist es also möglich, auch im Mausmodell durch Hypercholesterinämie oxidativen Stress zu erzeugen, der sich in einer verminderten antioxidativen Kapazität des Serums äußert. Die Erhöhung der antioxidativen Kapazität im Serum bei den Tieren nach der High fat Diät steht jedoch möglicherweise im Zusammenhang mit der Dexamethason-Applikation. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Mechanismen der Wirkung von Dexamethason zu erklären.

5. 4 Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf intimale Läsionen der Aorta

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von zwei verschiedenen lipidangereicherten Diäten auf die Bildung atherosklerotischer Plaques in der Mousaorta im Vergleich zu Kontrollen überprüft. Das leitende Fütterungsmodell der Arbeit, die Paigen-Diät, wurde in der Arbeit von Paigen et al. (1990) an den C 57 BL/6 Mäusen zum ersten Mal für eine Zeit bis zu 14 Wochen angewandt. Aus den Aortenbögen und Herzarterien wurden histologische Präparate angefertigt und auf den Zeitverlauf der Plaquebildung und der Plaquegröße untersucht. Schon nach sieben Wochen Fütterung zeigte sich die atherogene Wirkung der Paigen-Diät. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die C 57 BL/6 Mäuse einige Plaques im Bereich vom Aortenbogen und den Herzarterien auf. Bei der

Weiterführung der Behandlung bis zur 14. Woche nahmen die Plaques in ihrer Größe und Zahl noch zu.

Die histologischen Befunde der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Verabreichung beider lipidangereicherten Diäten (Paigen-Diät und HFD) die Entstehung von mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Aortenwand bewirken konnte. Diese Veränderungen betrafen sowohl die intimale Schicht als auch die allgemeine Gefäßwandstruktur. Es wurden einerseits die Zunahme der Gefäßwanddicke durch die Proliferation glatter Muskelzellen und Verlust an der Regelmäßigkeit aller elastischen Fasern in der Media beobachtet. Andererseits kam es zur Umwandlung feinfaseriger Intima in grobfaserige und deren Wucherungen ins Lumen. Die Frage, ob Schaumzellen auftreten, konnte nicht eindeutig beantwortet werden. Schaumzellen entstehen aus Makrophagen durch die Aufnahme von oxidierten LDL über „Scavenger-Rezeptoren“ und kommen in allen Stadien der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen vor (zur Übersicht s. bei Raines et al. 2005). Obwohl eindeutig Zellen mit den großen Kernen identifiziert worden, die in HE-Färbung wie Makrophagen erscheinen, konnte dieser Zelltypus durch Antikörperreaktion nicht markiert werden. Als Positivkontrolle hierzu diente ein käufliches Präparat der Mausmilz. Letztlich besteht aber Unsicherheit darüber, ob diese Kontrolle tatsächlich volle Gültigkeit besitzt. Die Anwesenheit von Lipiden in der Gefäßwand wurde von Paigen selbst gezeigt, allerdings nur durch die Ölrotfärbung, die eine genaue zelluläre Zuordnung nicht erlaubt (Paigen et al. 1990 a, b). In der vorliegenden Arbeit konnten Fettablagerungen in Zellen mit den großen Kernen nicht nachgewiesen werden, da sich die Lipide unter Einwirkung von Alkohol der Überführreihe bei der Entwässerung des Gewebes aus der Aortenwand lösten. Überraschenderweise wiesen auch die Kontrolltiere atherosklerotische Läsionen der Aortenwand auf. Dies dürfte auf zwei folgende Mechanismen zurückzuführen sein. Auf der einen Seite wurde bei den Kontrolltieren ein erhöhter Serumcholesterinspiegel beobachtet, der für die Plaqueentstehung verantwortlich sein könnte. Auf der anderen Seite zeigte Berg et al. (2002),

dass die Entwicklung einer spontanen Atherosklerose bei nicht transgenen Mäusen auch unter normaler Fütterung als Folge des Alterungsprozesses entstehen könnte.

5. 5 Einfluss von fettreicher Ernährung auf passive Mechanik von thorakaler Aorta

5. 5. 1 Einfluss der Paigen-Diät und High fat Diät auf die elastischen und viskoelastischen Dehnungseigenschaften

Mit Elastizität wird die mechanische Eigenschaft des Gewebes bezeichnet, bei Einwirkung einer Kraft (in unserem Fall der passiven Dehnung) mit einem Widerstand entgegenzuwirken und nach Aufhebung der Kraft seine ursprüngliche Form wieder einzunehmen (Dorn et al. 1980). Viskoelastizität ist ein weiterer Parameter für die Dehnbarkeit eines Blutgefäßes. Hierbei erfolgt jedoch die Rückkehr in die ursprüngliche Form (im Unterschied zu Elastizität) mit geringerer Geschwindigkeit bzw. wird die durch Dehnung aufgebaute Spannung bei gleich bleibender Länge des Präparates abgeschwächt.

Die für die elastischen Eigenschaften verantwortlichen elastischen Lamellen sind konzentrisch in der Mediaschicht der Aortenwand angeordnet. Zwischen den Fasern sind zahlreiche glatte Muskelzellen zu finden, wobei direkte Verbindungen zwischen beiden Komponenten möglich sind (Junqueira et al. 2002). Diese können in verschiedener Weise moduliert werden (Seyama et al. 2004). So führt z. B. die Induktion der Zellproliferation zur Inhibition der Fasernexpression.

Aufgrund des hohen Anteils an elastischen Fasern in der Media wird die Anpassung der Aorta an den systolischen Druckanstieg und die Durchfluss-

menge und dadurch die Ausübung der Windkesselfunktion ermöglicht. Verschiedene krankhafte Prozesse wie Diabetes mellitus und Atherosklerose können zu funktionellen und strukturellen Veränderungen der Gefäßwand und damit zur Einschränkung der Windkesselfunktion führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine tendenzielle Abnahme der Dehnbarkeit, jedoch keine relevante Veränderung der Viskoelastizität nach der Anwendung der Paigen-Diät 14 Wochen lang beobachtet. Bei der Weiterführung der Diät bis zur 21. Woche nahmen jedoch die passiven mechanischen Dehnungseigenschaften von thorakaler Aorta signifikant zu.

Nach Verabreichung der HFD wurde eine Verringerung der Dehnbarkeit der Aorta ermittelt. Dagegen zeigten diese Versuchstiere (HFD WT, HFD KO) annähernd gleiche viskoelastische Eigenschaften wie die Tiere nach der Standard-Diät (CTRD WT, CTRD KO).

Zu diesen Befunden gibt es einige Arbeiten, die verschiedene Erklärungsmöglichkeiten aufzeigen. Auf der einen Seite berichten Qiao et al. (1994) über Kalzifikationsprozesse in der Tunica media der Mousaorta. So wurde bei den C57BL/6J-Tieren nach 15 bis 30 Wochen atherogener Diät (15% Fett, 1,25% Cholesterin, 0,5% Natrium Cholat) eine von Lipidakkumulation unabhängige Kalzifikation der Aorta beobachtet. Dabei führen die Ablagerungen von Kalzium in der Gefäßwand und Störung der Funktion von elastischen Fasern zur Verminderung der Dehnbarkeit im Verlauf der Atherosklerose (Seyama et al. 2004). Auf der anderen Seite wurde in einer Arbeit an hypercholesterinämischen Kaninchen gefunden, dass sich die Dehnbarkeit über die Versuchszeit von 84 Wochen biphasisch veränderte. Einer anfänglichen Zunahme stand eine spätere Abnahme entgegen. Dies wurde durch eine unterschiedliche Rolle von Makrophagen und den von diesen sezernierten Metallproteinasen erklärt (Emmerich 2003). Matrix Metallproteinasen wird eine immer größere Rolle in der Progression der Atherosklerose zugeschrieben. Sie sind offensichtlich in der Lage, Kollagenfasern und elastische Lamellen abzubauen (zur Übersicht s. bei Lijnen 2002). Damit tragen sie zur Abnahme der extrazellulären Matrix der Gefäßwand

bei. Der Verlust von Matrixsubstanz in der Mediaschicht führt zur „Aufweichung“ der Aortenwand und dadurch zur größeren Dehnbarkeit.

In ähnlicher Weise könnten die hier an Mäusen nach der Paigen-Diät erhobenen Befunde, dass zunächst eine Abnahme, anschließend eine Zunahme der Dehnbarkeit von thorakaler Aorta gefunden wurde, begründet werden.

5.6 Einfluss der Paigen-Diät bzw. HFD auf aktive mechanische Eigenschaften von thorakaler Aorta und die endothelvermittelte Relaxation

5.6.1 Wirkung von KCl-angereicherter Lösung und von L-Phenylephrin auf die thorakale Aorta

Kontraktilen Verhalten der Aorta setzt eine regelrechte Funktion der glatten Muskelzellen voraus. Diese befinden sich in der Mediaschicht der Gefäßwand und sind über Gap Junction verbunden. Die Kontraktion dieser Zellen wird durch Ca^{2+} gesteuert, wobei sowohl elektromechanische als auch pharmakokinetische Kopplungsmechanismen vorhanden sind. Die Funktion der glatten Muskelzellen kann durch unterschiedliche krankhafte Prozesse wie Atherosklerose und Diabetes verändert werden. Einerseits kommt es zu einer Migration von glatten Muskelzellen in die atherosklerotischen Läsionen, wo sie verstärkt extrazelluläre Matrix bilden und als sekretorische Zellen verminderte Kontraktilität aufweisen. Andererseits werden aggressive Sauerstoffradikale vermehrt in diesen Zellen generiert (Creager et al. 2003). Die freien Radikale verursachen neben der Schädigung des Endothels zusätzlich funktionelle und strukturelle Veränderungen der glatten Muskelzellen, so dass sie über intrazelluläre Mobilisation von Ca^{2+} erhöhte Kontraktilität erhalten (Lüscher et al.

2005). Die Folge ist Störung der normalen kontraktile Funktion der Gefäße (zur Übersicht s. bei Guo et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden die kontraktile Eigenschaften der Mauseorta durch die Zugabe von KCl-angereicherten Lösungen in verschiedenen Konzentrationsstufen (30 mM, 60 mM, 90 mM) und von L-Phenylephrin überprüft. KCl-angereicherte Lösung führt durch Depolarisation der Membran und Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und löst dadurch eine rezeptorunabhängige Kontraktion aus. L-Phenylephrin wurde in sechs ansteigenden Konzentrationsstufen zur Tyrode-Lösung zugeführt. Diese Substanz bewirkt über die Stimulation von α -Rezeptoren pharmakologisch eine Kontraktion der Gefäßwand.

Nach Verabreichung der Paigen-Diät zeigten die beiden Versuchsgruppen bei der Einwirkung von KCl-angereicherten Lösungen eine signifikante Erhöhung der Kontraktion von thorakaler Aorta auf allen Konzentrationsstufen. Bei der Wirkung von L-Phenylephrin auf die Gefäßwand dieser Tiere wurde eine schwächere Reaktion auf die beiden niedrigen und tendenziell stärkere auf die höheren Konzentrationsstufen beobachtet.

Dagegen führte die Verabreichung der High fat Diät zu einer nicht signifikanten Verminderung der kontraktile Eigenschaften von thorakaler Aorta auf die Wirkung von KCl-angereicherten Lösungen. Die Wirkung von L-Phenylephrin war annähernd vergleichbar der von den Tieren nach der Paigen-Diät. Es wurde eine schwächere Gefäßkontraktion auf die beiden niedrigen und stärkere auf die höheren Konzentrationsstufen der mit HFD behandelten Mäusen ermittelt.

Vergleichbare Ergebnisse werden auch von den anderen Autoren beschrieben. In der Arbeit von Schmitz (2003) wurde kontraktile Verhalten der Gefäßwand von diabetischen Mäusen durch die Zugabe von Kaliumchlorid gegenüber den C 57 BL/6-Kontrollen überprüft. Dabei wurde bei den Tieren mit Diabetes eine signifikant stärkere Vasokontraktion beobachtet. Okon et al. (2003) untersuchte die Wirkung von L-Phenylephrin auf Insulin-resistente ob/ob Mäuse und beo-

bachtete, dass es durch die vaskuläre Dysfunktion der Aorta dieser Tiere zu einer Erhöhung der Reaktion auf L-Phenylephrin gegenüber den 57 CBL/6J-Kontrollmäusen kam.

Im Widerspruch dazu zeigten jedoch in der vorliegenden Arbeit die Tiere mit Diabetes mellitus Typ II (HFD WT-Gruppe) eine verminderte kontraktile Reaktion auf die Wirkung KCl-angereicherter Lösung gegenüber den CTRD WT-Tieren. Auch von Mahmoudian et al. (1996) wird beschrieben, dass Diabetes eine Abnahme des kontraktile Verhaltens der Rattenaorta bei der Einwirkung KCl-angereicherter Lösung induzieren kann. Dies liegt möglicherweise an der Inhibition der elektromechanischen Kopplungsmechanismen durch Insulinmangel (zur Übersicht s. bei Maria et al. 1997). Es sind offensichtlich weitere Untersuchungen erforderlich, um die Mechanismen genauer verstehen zu können.

5. 6. 2 Endothelvermittelte Relaxation

Die intakte Endothelfunktion stellt u. a. durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) die Regulation des Tonus der Gefäßmuskulatur sicher, wodurch die Organe bzw. das umliegende Gewebe ausreichend mit Blut versorgt werden können. Außerdem werden die Einwanderung von Monozyten und glatten Muskelzellen in die Intima sowie die Thrombozytenaggregation verhindert. Inflammation mit erhöhtem oxidativen Stress, Hypertonie und Diabetes können zu einer Dysfunktion des Endothels führen. Dies löst die Gefahr für kardiovaskuläre Erkrankungen aus (Lüscher et al. 2005).

Die Endothelfunktion wurde in dieser Arbeit durch die Zufuhr von Nw-Nitro-L-Arginin (NNLA), einem reversiblen Inhibitor von Stickstoff-Monoxid-Synthase (NOS), zur Kaliumchlorid-Lösung auf der Stufe von 90 mM untersucht. Diese Zugabe führte in allen Fällen zu einer Steigerung des kontraktile Effektes von KCl-angereicherter Lösung.

Die Verabreichung der Paigen-Diät 14 und 21 Wochen führte zu einer stärkeren NNLA-induzierten Kontraktion von thorakaler Aorta und damit einer Verbesserung der endothelvermittelten Relaxation als bei den Kontrollen. Zusätzlich ergab sich eine signifikante Spannungssteigerung zwischen der Einwirkung von 90 mM KCl-angereicherter Lösung und von NNLA bei der 14 Wochen-Gruppe.

Dagegen zeigt die Anwendung der HFD 5 Monaten lang bzw. Diabetes mellitus Typ II eine Reduktion der endothelvermittelten Vasodilatation der Aorta. Dieser Befund wurde auch in anderen Arbeiten beschrieben. Zum Beispiel wurde sowohl bei diabetischen Mäusen nach der Anwendung einer fettreichen Diät als auch bei insulinresistenten ob/ob Mäusen eine Verminderung der endothelvermittelten Vasorelaxation gegenüber den C 57BL/6J-Kontrollmäusen beobachtet (Molnar et al. 2005 und Okon et al. 2003). Endotheliale Dysfunktion in Rahmen von Diabetes mellitus ist u. a. auf zwei Mechanismen zurückzuführen. Einerseits führen die reaktiven Sauerstoffradikale, die vermehrt bei Atherosklerose, Diabetes, Hypercholesterinämia und Hyperglykämia entstehen, zur Inaktivierung von NO (Cai et al. 2000). Andererseits wird Insulin eine Rolle bei der Phosphorylierung der Stickstoff-Monoxid-Synthase zugeschrieben. Die Folge ist eine Reduktion der NO-Bildung bei Diabetes (Creager et al. 2003).

Nach der Anwendung der Paigen-Diät zeigten jedoch die Tiere in der vorliegenden Arbeit eine Verbesserung der endothelvermittelten Relaxation. Damit wurde einerseits weitgehend gezeigt, dass die Funktion des Endothels auch bei der Atherosklerose nicht vollständig unterbrochen wird. Ohne erhaltenes Endothel wäre die Kontraktionssteigerung nicht zu beobachten gewesen. Andererseits wird beschrieben, dass erhöhte Glukosekonzentration eine Vasodilatation und Inhibition des Arterientonus bei den Ratten bewirken kann (Cipolla et al. 1997). Auch bei streptozin-induzierten diabetischen Mäusen nach 4 Wochen wird eine Verbesserung der endothelvermittelten Vasorelaxation bei der Einwirkung von Acetylcholine gegenüber den Kontrollen beschrieben. Die Endothelzellen von diabetischen Tieren in früheren Stadien

sind offensichtlich in der Lage, PGI₂ (Prostaglandin I₂) und EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) vermehrt zu bilden. Dies könnte zu einer Erhöhung der endothelvermittelten Vasodilatation beitragen (Shen et al. 2003). Inwieweit sich die durch die Verabreichung der Paigen-Diät entstandenen Stoffwechselstörungen denen bei Diabetes annähern, ist unbekannt.

5.7 Rolle der Serum/ Glukokortikoid-induzierten Protein-Kinase1 in der Atherosklerose

Serum/ Glukokortikoid-induzierte Protein-Kinase1 (SGK1) ist ein Enzym, das Proteine an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert. Dieses Enzym wurde zum ersten Mal in Brusttumorzellen einer Ratte entdeckt. Die Transkription der SGK1 wird u. a. durch Steroidhormone und Serum stimuliert. Es gibt auch eine menschliche hSGK (human SGK), die dem Enzym der Ratte sehr ähnlich ist. Ihre Aktivierung wird durch die Veränderung des Zellvolumens, durch Glukokortikoide, transforming grow factor (TGF-β), Insulin und IGF beeinflusst (zur Übersicht s. bei Lang et al. 2001 und Wagner et al. 2001). Bis heute ist die Funktion und Wirkung von Serum/ Glukokortikoid-induzierter Protein-Kinase1 nicht ausreichend beschrieben.

In dieser Arbeit wurde der mögliche Einfluss der SGK1 auf die Atherogenese der mit HFD und Standard-Diät behandelten Tiere, bei denen das SGK1-Gen „ausgeknockt“ war, überprüft. Zu untersuchende Parameter waren die histologischen Befunden, passive Mechanik, Gesamtcholesterin und antioxidative Kapazität des Serums. Die Ergebnisse zeigten jedoch keinen relevanten Unterschied in sämtlichen Parameter zwischen den SGK1-knock-out Mäusen (HFD KO, CTRD KO) einerseits und den Wild Typ-Tieren (HFD WT, CTRD WT) andererseits.

Es gibt bis jetzt keine Arbeiten, die sich mit Rolle dieses Enzyms in der Atherogenese befassen. Von den zahlreichen Funktionen der SGK1 werden

hier nur einige davon erwähnt, die möglicherweise über Erhöhung der Risikofaktoren die Entstehung und Fortschreitung der Atherosklerose beeinflussen können. Erstens trägt die SGK1 über die Regulation der Na^+ -Reabsorption in der Niere zur Entstehung des Bluthochdrucks bei. Das Enzym stimuliert die ENaC (epitheliale Na^+ -Kanäle) im Sammelrohr, wobei die ENaC unter Aldosteroneinfluss stehen. Sie bewirken die Na^+ -Rückresorption und verhindern damit einen Salzverlust. Überfunktion von ENaC verursacht daher eine schwere Hypertonie und K^+ -Verlust (Lang et al. 2000 und Lang et al. 2001). Zweitens nimmt die SGK1 an den Fibrosierungsprozessen, speziell bei Diabetes teil. Hohe Expression von SGK1 ist in Makrophagen und Fibroblasten zu finden. Über die Aktivierung dieses Enzyms u. a. über den TGF- β trägt SGK1 zur Produktion extrazellulärer Matrix bei.

Bei Diabetes wird der SGK1 eine besondere Rolle zugeordnet. Hohe extrazelluläre Glukosekonzentrationen führen zur vermehrten Expression von TGF- β . Dies hat eine verstärkte Transkription von SGK1 in Fibroblasten zur Folge (Lang et al. 2000).

Möglicherweise kann die SGK1 über Beeinflussung der Risikofaktoren zu Entstehung und Fortschreitung der Atherogenese beitragen. Die Untersuchungen der SGK1 in der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch keinen relevanten Unterschied zwischen den SGK1-knock-out Mäusen und den Wild Typ-Tieren. Es sind offensichtlich weitere Untersuchungen notwendig, um die Funktionen und Rolle der SGK1 in der Atherogenese zu verstehen.

6 Zusammenfassung

Aufgrund der hohen Prävalenz und der schweren klinischen Komplikationen (KHK, Schlaganfall) gehört Atherosklerose zu den wichtigsten Forschungsgebieten. Die relevanten Risikofaktoren sind u. a. Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus Typ II. Mit Fortschreiten dieser Erkrankung kommt es zur Bildung der atherosklerotischen Plaques in den arteriellen Gefäßen mit Verengung des Lumens und Verlust an Elastizität.

Da die Pathogenese im Menschen nicht direkt untersucht werden kann, werden immer mehr Tiermodelle zur Gewinnung neuerer Erkenntnisse über die Ätiologie und Pathogenese der Atherosklerose etabliert.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von zwei verschiedenen lipidangereicherten Diäten auf die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen an den Mäusen untersucht. Die erste Diät, Paigen-Diät, erhielten die Tiere der Versuchsreihe A 14 und 21 Wochen. Die zweite Diät, High fat Diät, wurde den Tieren der Versuchsreihe B fünf Monaten lang verabreicht und führte zur Entstehung von Diabetes mellitus Typ II. Da in der Versuchsreihe B die Bedeutung und Funktion der Serum/ Glukokortikoid-induzierten Protein-Kinase1 (SGK1) untersucht werden sollte, war die Hälfte dieser Tiere SGK1 - knock – out.

Es wurde der Einfluss beider lipidangereicherten Diäten auf Serumparameter (Cholesterinspiegel, antioxidative Kapazität des Serums) und die mikroskopisch und morphometrisch erfassbaren histologischen Veränderungen der Aortenbögen untersucht. Zur Erfassung der funktionellen Veränderungen der Gefäßwand wurden das aktive Kontraktions- und das passive Dehnungsverhalten überprüft.

Die Anwendung beider lipidangereicherten Diäten führte zur Entstehung von Hypercholesterinämie und mikroskopisch sichtbaren Veränderungen sowohl der Intima als auch der gesamten Gefäßwand. Interessanterweise wiesen auch sämtliche Kontrolltiere erhöhte Cholesterinwerte, die sich in Entwicklung von Läsionen der Aortenwand dieser Tiere widerspiegelten. Obwohl die Schaumzellen normalerweise in jedem Stadium der Atherogenese zu finden

sein sollten, wurden sie bei keinem der behandelten Tiere nachgewiesen. Hierfür könnte eine fehlende Reaktion von Antikörpern der Makrophagenfärbung auf die Schaumzellen vermutet werden.

Der Einfluss beider fettreichen Diäten auf die antioxidative Kapazität des Serums wurde aus der Unterdrückungszeit der Radikalbildung in der AAPH-Reaktion ermittelt. Aus den Befunden ist ersichtlich, dass die durch Paigen-Diät erzeugte Atherosklerose mit einer Erhöhung des oxidativen Stresses einhergeht. Die erhöhte antioxidative Kapazität des Serums bei den Tieren mit Diabetes mellitus Typ II könnte in einem Zusammenhang mit der Applikation von Dexamethasone bei diesen Tieren betrachtet werden. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um die möglicherweise antioxidative Eigenschaften von Dexamethasone in der Pathogenese der Atherosklerose zu überprüfen.

Die Untersuchung der passiven mechanischen Eigenschaften von thorakaler Aorta erbrachte eine Verringerung der Dehnbarkeit und Viskoelastizität nach der Anwendung der Paigen-Diät 14 Wochen lang. Dieser anfänglichen Abnahme stand jedoch eine spätere Zunahme entgegen. Dieser biphasische Verlauf des passiven Dehnungsverhaltens wurde in einem Zusammenhang mit den Matrix Metallproteinasen diskutiert, die durch Abbau von Matrixsubstanz zu einer Aufweichung der Gefäßwand führen könnten.

Die Untersuchung der aktiven mechanischen Eigenschaften von thorakaler Aorta durch die Zugabe von KCl-angereicherter Lösung und von L-Phenylephrin zeigte in den meisten Fällen nach der Anwendung der Paigen-Diät und HFD eine Steigerung des kontraktiven Verhaltens der Gefäßwand. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die atherosklerotischen Gefäßveränderungen mit einer Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber den vasokonstriktischen Substanzen sowohl auf der rezeptorunabhängigen als auch rezeptorabhängigen Ebene einhergehen. Interessant war jedoch, dass die Tiere mit Diabetes mellitus Typ II als einzige Gruppe eine Verminderung des kontraktiven Verhaltens auf die Wirkung von Kaliumchlorid-angereicherter Lösung aufwiesen. Offensichtlich wird durch Insulinmangel bei Diabetes eine

Inhibition der elektromechanischen Kopplungsmechanismen induziert, die eine Reduktion der kontraktiven Eigenschaften der Gefäßwand hervorrufen könnte.

Die endothelvermittelte Relaxation wurde in dieser Arbeit durch die Zufuhr von Nw-Nitro-L-Arginin, ein Inhibitor von Stickstoff-Monoxid-Synthase, zur Kaliumchlorid-Lösung auf der Stufe von 90 mM untersucht. Dabei führte die Anwendung von lipidangereicherten Diäten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einer Verschlechterung nach der Verabreichung der HFD stand eine Verbesserung der endothelvermittelten Vasodilatation nach der Paigen-Diät entgegen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand einerseits zur Verminderung der NO-Bildung führen können. Andererseits wird jedoch daraus ersichtlich, dass die Endothelfunktion auch durch die Atherogenese nicht vollständig unterbrochen wird. Vielmehr könnte erhöhte Glukosekonzentration in frühen Stadien kompensatorisch die Freisetzung der vasorelaxierenden Substanzen verstärken.

Serum/ Glukokortikoid-induzierte Protein-Kinase1 ist ein Enzym, dessen Expression und Aktivierung u. a. durch die Veränderung des Zellvolumens, Glukokortikoide, „transforming grow factor“ (TGF) reguliert werden. Eine mögliche Beteiligung dieses Enzyms an der Entstehung und Fortschreitung der Atherosklerose durch die Verstärkung von Risikofaktoren konnte durch zwei Mechanismen vermutet werden. Serum/ Glukokortikoid-induzierte Protein-Kinase1 trägt zur Erhöhung des Blutdrucks über die epithelialen Na⁺-Kanäle des Sammelrohrs der Nieren einerseits und zu den Fibrosierungsprozessen speziell bei Diabetes (SGK1 wird vermehrt in den Makrophagen und Fibroblasten exprimiert) andererseits bei. Die erhobenen Befunde zeigten jedoch in sämtlichen Parametern zwischen den Wild Typ- und den SGK1-knock-out-Mäusen keinen relevanten Unterschied. Es sind offensichtlich weitere Forschungen an der Funktion der SGK1 in der Atherogenese notwendig.

7 Literaturverzeichnis

Abbott RD, Wilson PW, Kannel WB, Castelli WP, (1988): High density lipoprotein cholesterol, total cholesterol screening, and myocardial infarction. The Framingham study. *Atherosclerosis*; 8: 207-211

Amraei Davijani F, (2005): Untersuchungen zur Bedeutung von oxidativem Stress bei Präeklampsie. Universität Tübingen, Dissertation

Aronson D, Rayfield EJ, (2005): Diabetes, obesity, and the metabolic syndrome. In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG, (ed): *Atherothrombosis and coronary artery disease*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA; 261-295

Asai K, Funaki C, Hayashi T, Yamada K, Naito M, Kuzuya M, Yishida F, Yoshimini N, Kuzuya F, (1993): Dexamethasone-induced suppression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*; 13: 892-899

Assmann G, Cullen P, Schulte H, (1999): Obesity, mortality and cardiovascular disease in the Münster Heart Study (PROCAM). *Atherosclerosis*; 144: 199-209

Baumhoer D, Steinbrück I, Götz W, (2000): *Histologie*. München, Jena: Urban&Fischer; 1: 91 – 94

Beckman JA, Craeger MA, Libby P, (2002): Diabetes and atherosclerosis. Epidemiologie, pathophysiologie, and management. *JAMA*; 287: 2570-2581

Berg K, Svindland A, Smith AJ, Lawn RM, Djurovic S, Alestrom A, Alestrom P, Eliassen K, (2002): Spontaneous atherosclerosis in the proximal aorta of LPA transgenic mice on a normal diet. *Atherosclerosis*; 163: 99-104

Bierhaus A, (1999): Molekulare Mechanismen der Arteriosklerose. In Nawroth P, Lasch HG, (ed): *Vaskuläre Medizin systematisch*. Bremen: Uni-Med; 72-90

Blumenstein A, (2004): Oxidativer Stress und Gefäßfunktion: Untersuchungen zum Einfluss von Hydroperoxiden auf Kontraktion und Endothelfunktion in Arterien. Universität Tübingen, Dissertation

Bonaterrea GA, Hildebrandt W, Bodens A, Sauer R, Dugi KA, Deigner H-P, Droege W, Metz J, Kinscherf R, (2004): Hyperlipidemia increases gene expression of scavenger-rezeptors, oxidative stress and inflammation in human peripheral blood mononuclear cells. *Perfusion*; 9: 370-370

Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt S, Kranzhofer A, Katus HA, Kranzhofer R, (2005): Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via factor-

kappaB and activator protein1 in a redox-sensitive Manner. *J Vasc Res*; 42: 415-423

Busjahn A, Aydin A, Uhlmann R, Krasko C, Bähring S, Szelestei T, Feng Y, Dahm S, Sharma AM, Luft FC, Lang F, (2002): Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. *Hypertension*; 40: 256-260

Cai H, Harrison DG, (2000): Endotheliale dysfunktion in cardiovascular disease: the rolle of oxidant stress. *Circ Rec*; 87: 840-844

Ceriello A, Motz E, (2004): Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 24: 816-823

Cipolla MJ, Porter JM, Osol G, (1997): High glucose concentrations dilate cerebral arteries and diminish myogenic tone through an endothelial mechanism. *Stroke*; 28: 405-411

Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R, (2004), for the Heart Protection Study Collaborative Group. Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high risk conditions. *Lancet*; 363: 757-767

Creager MA, Lüscher TF, Beckman JA, (2003): Diabetes and vascular disease. *Circulation*; 108: 1527-1532

Dalferth P, (2000): Oxidativ modifiziertes LDL: Untersuchungen zu seiner Bildung und seinen zellulären Effekten. Universität Tübingen, Dissertation

Darblade B, Batkai S, Causse E, Gourdy P, Fouque MJ, Rami J, Arnal JF, (2001): Failure of L – nitroarginine to inhibit the activity of aortic inducible nitric oxide synthase. *J Vasc Res*; 38: 266-275

Daugherty A, (2002): Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci*; 323: 3-10

Diehm C, Lawall H, (2006): Diabetes, heart surgery and the peripheral arteries. *Clin Res Cardiol*; 95: 63-69

Dorn F, Bader F, (1980): Physik. Hannover: Schroedel

Emmerich M, (2003): Modulation mechanisch funktioneller Parameter und der Radikalsekretion in arteriellen Gefäßwänden durch atherogene Risikofaktoren. Universität Tübingen, Dissertation

Falk E, Shah PK, (2005): Pathogenesis of atherothrombosis-role of vulnerable, ruptured, and eroded plaques. In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG, (ed): Athero-

thrombosis and coronary artery disease. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA; 451-466

Fetter M, (2006): Diabetes and cerebrovascular disease. Clin Res Cardiol; 95: 59-62

Fey WB, (2005): A historical perspective on atherosclerosis and coronary artery disease. In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG (ed): Atherothrombosis and coronary artery disease. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA; 1-15

Fillon S, Klingel K, Wärntges S, Sauter M, Gabrysch S, Pestel S, Tanneur V, Waldegger S, Zipfel A, Viebahn R, Häussinger D, Bröer S, Kandolf R, Lang F, (2001): Expression of the serine/threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis. Cell Physiol Biochem; 12: 47-54

Frey J-C, (2001): Plaquedynamik im Aortenbogen des Kaninchens über einen Zeitraum von 68 Wochen nach Absetzen eines cholesterinhaltigen Futters. Universität Tübingen, Dissertation

Greskötter K-R, (1996): Pathologie/ Klinische Medizin systematisch. Lorch: Uni-Med; 1: 609 – 614

Guo Z, Su W, Allen S, Pang H, Daugherty A, Smart E, Gong MC, (2005): COX-2 Up-regulation and vascular smooth muscle contractile hyperreactivity in spontaneous diabetic db/db. Cardiovasc Res; 67: 723-735

Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyörälä K, Laakso M, (1998): Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. N Engl J Med; 339: 229-234

Hanefeld M, Koehler C, Schaper F, Fuecker K, Henkel E, Temelkova-Kurktschiev T, (1999): Postprandial plasma glucose is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in non-diabetic individuals. Atherosclerosis; 144: 229-235

Harms V, (1998): Biomathematik, Statistik und Dokumentation. Kiel: Harms

Heinle H, Schulte H, Hanefeld M, (2000): Atherogenese und Metabolisches Syndrom. Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung. Tübingen: Attempto-Service; 34-37: 44-50: 280-284

Heinle H, Brehme U, Friedmann G, Frey J-C, Wolf AT, Kelber O, Weiser D, Schmahl FW, Lang F, Schneider W, (2002): Intimal plaque development and oxidative stress in cholesterol-induced atherosclerosis in New Zealand rabbits. Acta Physiol Scand; 176: 101-107

Johnston TP, Coker JW, Paigen BJ, Tawfik O, (2002): Sex does not seem to influence the formation of aortic lesions in the P-407-induced mouse model of hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol*; 39: 404-411

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO, (2002): *Histologie*. Berlin, Heidelberg, New-York: Springer

Kannel WB, McGee DL, (1979): Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *J Am Med Assoc*; 241: 229-235

Kishi Y, Numano F, (1984): Contractions in normal and atherosclerotic rabbit aortas. *Mech Ageing Dev*; 26: 357-369

Kreuzer J, Tiefenbacher C, (2003): *Atherosklerose*. Stuttgart, New-York: Thieme

Lang F, Klingel K, Wagner CA, Stegen C, Warntges S, Friedrich B, Lanzendorfer M, Melzig J, Moschen I, Steuer S, Waldegger S, Sauter M and 9 other, (2000): Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc Nat Acad Sci*; 97: 8157-8162

Lang F, Cohen P, (2001): Regulation and physiological roles of serum and glukokortikoid – induced Protein kinase. *Sci. STKE*; 108: RE 17

Lange M, (1997): *Zellbiologische Untersuchungen zur Wirkung von Antioxidantien bei der Atherogenese*. Universität Tübingen, Dissertation

La Rosa JC, He J, Vupputuri S, (1999): Effekt of Statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*; 282: 2340-2346

Lijnen R, (2002): Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*; 30: 163-167

Lüllmann H, Mohr K, Wehling M, (2001): *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart, New York: Thieme; 15: 370-376

Lüscher TF, Noll G, Spieker L, Corti R, Pepine CJ, (2005): Coronary spasm and atherothrombosis. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, (ed): *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA; 599-623

Mahmoudian M, Behnaz F, Rezaei E, (1996): Diabetes-induced changes in the contractility of the aorta and pA2 of nifedipine in the rat. *Acta Diabetologica*; 33: 114-117

Maria PN, Collados T, Masso F, Guarner V, (1997): Endothelin mediation of insulin and glucose-induced changes in vascular contractility. *Hypertension*; 30: 825-829

Miserez AR und Redaktionsausschuss der AGLA und der schweiz. Gesellschaft für Kardiologie (Battegay E, Darioli R, Graf C, Miserez AR, Riesen W, Saner B, Schulthess G), (2004): Genetische Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten. *Kardiovaskuläre Medizin*; 7: 10-15

Molnar J, Yu S, Mzhavia N, Pau C, Chereshev I, Dansky HM, (2005): Diabetes induces endothelial dysfunction but does increase neointimal formation in high-fat diet fed C57 BL/6J mice. *Circ Res*; 96: 1178-1184

Murphy N, Grimsditch DC, Parkin S, Vidgeon-Hart M, Overend P, Groot PHE, Graham A, Benson GM, (2002): Hypercholesterolaemia and circulating levels of CXC chemokines in apoE* Leiden mice. *Atherosclerosis*; 163: 69-77
Ng MKC, Celermajer DS, (2004): Glucocorticoid treatment and cardiovascular disease. *Heart*; 90: 829-830

Okon EB, Szado T, Laher I, McManus B, van Bremen C, (2003): Augmented contractile response of vascular smooth muscle in a diabetic mouse model. *J Vasc Res*; 40: 520-530

Ozmen I, (2005): Evaluation of effect of some corticosteroids on glucose-6-phosphate dehydrogenase and comparative study of antioxidant enzyme activities. *J Enzyme Inhib Med Chem*; 20:19-24.

Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA, (1987): Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*; 68: 231-240

Paigen B, Ishida BY, Verstuyft J, Winters RB, Albee D, (1990 a): Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis*; 10: 316-323

Paigen B, Holmes PA, Novak EK, Swank RT, (1990 b): Analysis of atherosclerosis susceptibility in mice with genetic defects in platelet function. *Arteriosclerosis*; 10: 648-652

Paigen K, (2003): One hundred years of mouse genetics: An intellectual history II. The molecular revolution (1981-2002). *Genetics*; 163: 1227-1235

Palmer WK, Emenson EE, Johnston TP, (1997): The poloxamer 407-induced hyperlipidemic atherogenic animal model. *Med Sci Sports Exerc*; 29: 1416-1421

Petersen S, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A, (2005): *European cardiovascular disease statistics*. London

Plump AS, Masucci-Magoulas L, Bruce C, Bisgaier CL, Breslow JL, Tall AR, (1999): Increased atherosclerosis in ApoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19: 1105-1110

Plump AS (2005): Mouse models of lipoprotein disorders and atherosclerosis. In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG, (ed): Atherothrombosis and coronary artery disease. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA; 355-375

Qiao JH, Xie PZ, Fishbein MC, Kreuzer J, Drake TA, Demer LL, Lusis AJ, (1994): Pathology of atheromatous lesions in inbred and genetically engineered mice. Genetic determination of arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 14: 1480-1497

Raines EW, Libby P, Rosenfeld ME, (2005): The role of macrophages. In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG, (ed): Atherothrombosis and coronary artery disease. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA; 505-520

Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Hallak H, Kindt E, Chen J, Rosebury WS, Anderson MK, Kuipers PJ, Ryan MJ, (2000): Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma. *Circ Res*; 86: 101-108

Rösen P, (2004): Oxidative Stress führt zu Schädigungen der großen Blutgefäße. Vortrag: 40 Jahrestagung der DDG

Ross R, Fuster V, (1996): The pathogenesis of atherosclerosis. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, (ed): Atherosclerosis and coronary artery disease. Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, USA; 441-460

Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, (1994): Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*; 344: 1383-1389

Schmitz V, (2003): Untersuchungen zum Einfluss von experimentellem Diabetes auf vasculäre Reaktivität. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn, Dissertation

Schneider W, Dalferth P, Kelber O, Friedemann G, Haasis R, Heinle H, (1999): Oxidizability of low density lipoprotein and total antioxidative capacity of plasma are differently altered during induction and regression of hypercholesterolemia in rabbits. *Atherosclerosis*; 144: 69-72

Seyama Y, Wachi H, (2004): Atherosclerosis and matrix dystrophy. *J Atheroscler Thromb*; 11: 236-245

Shen B, Ye C, Ye K, Liu J, Sun P, Jiang J, (2003): Mechanism underlying enhanced endothelium-dependent vasodilatation in thoracic aorta of early stage streptozotocin-induced diabetic mice. *Acta Pharmacol Sin*; 24: 422-428

Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sekiguchi N, Kobayashi K, Matsumoto S, Utsumi H, Nawata H, (2004): Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radic Biol Med*; 37: 115-123

Stary HC, (2005): Histologic classification of human atherosclerotic lesions. In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG (ed): Atherothrombosis and coronary artery disease. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA; 441-449

Thiery J, Teupser D, (1999): Stoffwechsel der Plasmalipoproteine. In Nawroth P, Lasch HG, (ed): Vaskuläre Medizin systematisch. Bremen: Uni-Med; 91-100

Thomas G, Ramwell PW, (1991): Nw-nitro L-arginine benzyl ester, a potent irreversible inhibitor of endothelium dependent relaxation. Biochem Biophys Res Commun; 179: 1677-1682

Traber MG, (2001): Does vitamin E decrease heart attack risk? Summary and implications with respect to dietary recommendations: J Nutr.; 131: 395-397

Wagner CA, Huber SM, Wärntges S, Zempel G, Kaba NK, Fux R, Orth N, Busch GL, Waldegger S, Lambert I, Nilius B, Heinle H, Lang F, (2000): Effect of urea and osmotic cell shrinkage on Ca^{2+} entry and contraction of vascular smooth muscle cells. Pflügers Arch – Eur J Physiol; 440: 295-301

Wagner CA, Ott M, Klingel K, Beck S, Melzig J, Friedrich B, Wild KN, Broer S, Moschen I, Albers A, Waldegger S, Tummler B, Egan ME, Geibel JP, Kandolf R, Lang F, (2001): Effects of the serine/ threonine kinase SGK1 on the epithelial Na^{+} channel (ENaC) and CFTR: implications for cystic fibrosis. Cell Physiol Biochem; 11: 209 - 218

De Winther MP, Hofker MN, (2002): New mouse models for lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol; 13: 191-197

Wu TC, Leu HB, Lin WT, Lin CP, Lin SJ, Chen JW, (2005): Plasma matrix metalloproteinase-3 level is an independent prognostic factor in stable coronary artery disease. Eur J Clin Invest; 35: 537-545

Wulff P, Vallon V, Huang DY, Völkl H, Yu F, Richter K, Jansen M, Klingel K, Loffing J, Kauselmann G, Bösl MR, Lang F, Kuhl D, (2002): Impaired renal Na^{+} retention in the sgk1 – knockout mouse. J Clin Invest.; 110: 1263 - 1268

Xavier FE, Davel AP, Rossoni LV, Vassallo DV, (2003): Time – dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. Vascul Pharmacol; 40: 67-76

Yamaguchi Y, Yamada K, Kitagawa S, Kunitomo M, (1990): Atherosclerosis mouse model induced by high-cholesterol diet supplemented with beta-aminopropionitrile: effects of various anti-atherosclerotic agents on the biochemical parameters. Jpn J Pharmacol; 54: 187-196

Zhu BH, Guan YY, Min J, He H, (2001): Contractile responses of diabetic rat aorta to phenylephrine at different stages of diabetic duration. Acta Pharmacol Sin; 22: 445-449

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

AAPH - 2,2 – Azobis (2-Amidinopropane) hydrochloride

AGE – advanced glycation endproducts

Apo – E – Apolipoprotein E

CTRD KO – Kontrolltiere; nach 5 Monaten Standard-Diät; knock-out für SGK1

CTRD WT – Kontrolltiere; nach 5 Monaten Standard-Diät; Wild Typ

ENaC - Epitheliale Na⁺ Kanäle

EvG – Elastica – van – Gieson – Färbung

HDL – High Density Lipoprotein

HE – Hämatoxylin – Eosin – Färbung

HFD KO – Mäuse mit metabolischem Syndrom; nach 5 Monaten High fat Diät; knock – out für SGK1

HFD WT – Mäuse mit metabolischem Syndrom; nach 5 Monaten High fat Diät; Wild Typ

IGF - Insulin - like Growth Factor

LDL – Low Density Lipoprotein

Lp (a) – Lipoprotein (a)

NNLA – Nw – Nitro – L – Arginine

PBS – Phosphate Buffered Saline

SGK1 – Serum/ Glukokortikoid – induzierte Protein – Kinase1

hSGK1 – human Serum/Glukokortikoid – induzierte Protein – Kinase1

TGF- β - Transforming Grow Factor- β

Danksagung

- Herrn Prof. Dr. Helmut Heinle für die freundliche Überlassung des Themas, gute Betreuung und Hilfsbereitschaft. Ganz besonders bedanke ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme am 1. Deutschen Atherosklerose Kongress in Leipzig in 2004 und an der DGAF in Blaubeuren in 2005
- Frau Dr. Ute Brehme (Institut für Arbeits- und Sozialmedizin) für die große Hilfe bei der Anfertigung und Mikroskopieren histologischer Präparate und für ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihre nette und freundliche Art
- Frau S. Ulrich und Frau F. Ranta für die freundliche Überlassung von Blutproben und Aorten diabetischer Mäuse
- Frau M. Holz, Frau J. Schatz, Frau G. Kaletta aus dem Institut für Sozial- und Arbeitsmedizin für deren Hilfe und Unterstützung bei der Färbung histologischer Präparate und bei der digitalen Aufnahmen (Herr K. Drysch)
- Uschi Pascht, Ines Germann, Felor Amraei-Davijani, Annette Hartwich, Daniela Hagelauer für die Hilfe bei der Bedienung von Laborgeräten und für eine tolle Arbeitsatmosphäre
- Meinem lieben Mann für die unerschöpfliche Hilfe trotz eigenem anstrengendem Job und dafür, dass er ständig für meine Fragen ein offenes Ohr hatte

Ganz besonders danke ich meiner Familie und der Familie meines Mannes für die liebevolle Unterstützung und Interesse an meiner Arbeit

Lebenslauf

Diana Fieß, geb. Iantoudina

Geburtsdatum	08.08.78
Geburtsort	Sibaj, Republik Baschkortostan (Russische Föderation)
1985-1993	Gesamtschule
1993-1997	Kunsthochschule. Ausbildung zur Orchestermusikerin und Violinlehrerin in Kinder- und Jugendmusikschulen
1994-1997	Abendschule (Zugangsvoraussetzung für Studium)
1998-2000	Studium an der SMUB (staatliche medizinische Universität Baschkiriens); Ufa
2000-2001	Arbeit als Au-Pair und Besuch mehrerer Sprachkurse in Deutschland
ab W/S -2001	Studium an der Eberhard – Karls - Universität Tübingen. Medizinische Fakultät
17.08.02	Eheschließung
06.11.07	Ärztliche Prüfung