

Aus dem Zentrum für Kardiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Bedeutung von Erythrozyten für die Atherosklerose und vaskuläre Kalzifizierung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Elsa Wilma Böhm

aus Köln

Mainz, 2022

Tag der Promotion: 12. Juli 2022

Diese Arbeit wurde publiziert in:

“Lysed Erythrocyte Membranes Promote Vascular Calcification: Possible Role of Erythrocyte-Derived Nitric Oxide.”

Tziakas DN, Chalikias G, Pavlaki M, Kareli D, Gogiraju R, Hubert A, Böhm E, Stamoulis P, Drosos I, Kikas P, Mikroulis D, Giatromanolaki A, Georgiadis GS, Konstantinou F, Argyriou C, Münzel T, Konstantinides SV, Schäfer K.

Circulation 2019 Apr 23; 139(17): 2032-2048. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037166.

“Colocalization of Erythrocytes and Vascular Calcification in Human Atherosclerosis: A Systematic Histomorphometric Analysis.”

Böhm EW, Pavlaki M, Chalikias G, Mikroulis D, Georgiadis GS, Tziakas DN, Konstantinides S, Schäfer K.

TH Open 2021 Apr 14; 5(2): e113-e124. doi: 10.1055/s-0041-1725042.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Physiologie der Gefäßwand	2
2.2 Klinische Relevanz der Atherosklerose	3
2.3 Risikofaktoren und molekulare Mechanismen der Atherosklerose	4
2.3.1 Kardiovaskuläre Risikofaktoren und deren Wirkung	4
2.3.2 An der Atherogenese beteiligte Zelltypen	6
2.3.2.1 Endothelzellen	6
2.3.2.2 Makrophagen	7
2.3.2.3 Glatte Muskelzellen	8
2.3.2.4 Erythrozyten	9
2.4 Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen und deren Komplikationen	11
2.5 Vaskuläre Verkalkung	11
2.5.1 Lokalisation	12
2.5.2 Beteiligte Zelltypen	12
2.5.3 Signaltransduktionswege vaskulärer Kalzifizierung	14
2.5.3.1 BMP-Signalweg	14
2.5.3.2 Wnt-Signalweg	16
2.5.3.3 Notch-Signalweg	16
2.5.3.4 Phosphat-vermittelte Signalwege	17
2.5.3.5 Matrixvesikel und Exosome	17
2.5.3.6 Inhibitorische Faktoren	18
2.6 Offene Fragen und Ziele der Arbeit	18
3 Methoden	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Chemikalien	20
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
3.1.3 Geräte	25
3.1.4 Software	25
3.2 Methoden	26

3.2.1	Herkunft der humanen Gewebeprobe	26
3.2.2	Gewebepräparation	26
3.2.3	Histologische Färbungen	27
3.2.3.1	Alizarin S	28
3.2.3.2	Masson-Goldner-Trichrom	28
3.2.3.3	Berliner-Blau	29
3.2.4	Patientenauswahl	29
3.2.5	Immunhistochemische Färbungen	31
3.2.5.1	ABC-Methode	31
3.2.5.2	Spezifität und Qualitätssicherung	32
3.2.6	Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen	35
3.2.6.1	Auswertung der histologischen Färbungen	36
3.2.6.2	Auswertung der Kolo-kalisation verschiedener Komponenten auf Serienschnitten	36
3.2.7	Statistische Auswertung	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Histologische Übersichtsfärbungen und Auswahl der Gewebeprobe	38
4.1.1	Anfärbung von Kalzifizierung mittels Alizarin S	39
4.1.2	Übersichtsfärbung nach Masson-Goldner-Trichrom	42
4.1.3	Nachweis von Eisen und Hämosiderin mittels Berliner-Blau Färbung	46
4.2	Bedeutung von Erythrozyten für vaskuläre Kalzifizierung	47
4.2.1	Vorkommen von Erythrozyten in humanen atherosklerotischen Läsionen	47
4.2.1.1	Extravasation von Erythrozyten	47
4.2.1.2	Hämolyse extravasaler Erythrozyten	49
4.2.2	Vaskuläre Kalzifizierung in humanen atherosklerotischen Läsionen	51
4.2.2.1	Marker für vaskuläre Kalzifizierung	51
4.2.2.2	Differenzierung von Myofibroblasten zu Osteoblasten	53
4.2.3	Kolo-kalisation von Erythrozyten mit vaskulärer Kalzifizierung	55
4.2.4	Unterschiede zwischen lysierten und intakten Erythrozyten in Bezug auf vaskuläre Kalzifizierung	58
4.2.5	Bedeutung von Erythrozytenmembranen	62
4.2.6	Bedeutung von Hämoglobin	64
4.2.6.1	Fehlende Kalzifizierung in Abwesenheit von Erythrozytenmembranen	64
4.2.6.2	Hämoglobin als NO-Scavenger	66
4.2.6.2.1	Inaktivierung von Hämoglobin durch Oxidation zu Methämoglobin	66
4.2.6.2.2	Inaktivierung durch Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor	69
4.3	Bedeutung von eNOS	75
4.3.1	Expression von eNOS	75

4.3.2	eNOS und vaskuläre Kalzifizierung	79
4.3.3	Effekte gesteigerter NO-Produktion	81
4.4	Bedeutung von Arginase 1	83
4.4.1	Expression von Arginase 1	83
5	Diskussion.....	86
5.1	Osteoblastogenese	86
5.1.1	Veränderungen in vaskulären glatten Muskelzellen bei Kalzifizierung	86
5.1.2	Verwendete immunhistochemische Marker für osteoblastenähnliche Zellen.....	87
5.2	Erythrozyten-vermittelte vaskuläre Kalzifizierung	89
5.2.1	Extravasation und Lyse von Erythrozyten im atherosklerotischen Plaque.....	89
5.2.2	Bedeutung von Erythrozytenmembranen für vaskuläre Kalzifizierung	90
5.2.3	Bedeutung von Hämoglobin für vaskuläre Kalzifizierung	92
5.2.4	Bedeutung von Arginase 1 für vaskuläre Kalzifizierung.....	95
5.3	NO als osteoinduktiver Mediator	95
5.3.1	Mögliche Signalwege	95
5.3.2	Bedeutung von eNOS für die vaskuläre Kalzifizierung.....	97
5.3.3	Konsequenzen einer eNOS-Defizienz	97
5.3.4	Konsequenzen einer eNOS-Überexpression.....	99
5.3.5	Bedeutung der erythrozytären eNOS für vaskuläre Kalzifizierung	100
6	Zusammenfassung	101
7	Literaturverzeichnis	103
8	Anhang	VII
8.1	Zusammensetzung der Lösungen für die histologischen Färbungen.....	VII
8.1.1	Alizarin S	VII
8.1.2	Masson-Goldner-Trichrom	VII
8.1.3	Berliner-Blau	VIII
8.2	Positiv- und Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbungen	IX
8.3	Publikationen.....	X
8.3.1	“Lysed Erythrocyte Membranes Promote Vascular Calcification: Possible Role of Erythrocyte-Derived Nitric Oxide.”	X
8.3.2	“Colocalization of Erythrocytes and Vascular Calcification in Human Atherosclerosis: A Systematic Histomorphometric Analysis.”	X
9	Danksagung	XI
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	XII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.1-1 Auswahl der in der Arbeit verwendeten Gewebeprobe	39
Abbildung 4.1-2 Klassifizierung der Alizarin S Färbung	41
Abbildung 4.1-3 Auswertung der Alizarin S Färbung	42
Abbildung 4.1-4 Färbepbeispiele nach Masson-Goldner-Trichrom Färbung	43
Abbildung 4.1-5 Klassifizierung der Masson-Goldner-Trichrom Färbung	43
Abbildung 4.1-6 Auswertung der Masson-Goldner-Trichrom Färbung	45
Abbildung 4.1-7 Färbepbeispiele nach Berliner-Blau Färbung	46
Abbildung 4.1-8 Auswertung der Berliner-Blau Färbung	47
Abbildung 4.2-1 Extravasation von Erythrozyten in Gefäßläsionen	48
Abbildung 4.2-2 Nachweis von Hämolyse extravasaler Erythrozyten	50
Abbildung 4.2-3 Kolokalisation von Markern für vaskuläre Kalzifizierung	52
Abbildung 4.2-4 Kolokalisation von Myofibroblasten und Osteoblasten	54
Abbildung 4.2-5 Kolokalisation von Kalzifizierung, lysierten Erythrozyten und eNOS	57
Abbildung 4.2-6 Analyse und Auswertung der histologischen Kolokalisationen	60
Abbildung 4.2-7 Assoziation lysierter und intakter Erythrozyten mit vaskulärer Kalzifizierung	61
Abbildung 4.2-8 Bedeutung von Erythrozytenmembranen für vaskuläre Kalzifizierung	63
Abbildung 4.2-9 Fehlende Kalzifizierung in Abwesenheit von Erythrozytenmembranen	65
Abbildung 4.2-10 Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin	67

Abbildung 4.2-11 Bedeutung der Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin für die vaskuläre Kalzifizierung	68
Abbildung 4.2-12 Mögliche Eliminierung von Hämoglobin durch CD163-positive Makrophagen	71
Abbildung 4.2-13 Bedeutung der Eliminierung von Hämoglobin durch CD163-positive Makrophagen für vaskuläre Kalzifizierung	72
Abbildung 4.2-14 Mögliche Inaktivierung von Hämoglobin als NO-Scavenger	73
Abbildung 4.2-15 Konstellationen der Inaktivierung von Hämoglobin als NO-Scavenger	74
Abbildung 4.3-1 Expression von eNOS auf histologischen Gewebeschnitten	76
Abbildung 4.3-2 Expression von eNOS durch unterschiedliche Zelltypen.....	78
Abbildung 4.3-3 Histologische Kolokalisation von kalzifizierten Stellen mit Erythrozyten (Masson-Goldner), Erythrozytenmembranen (CD235a) und eNOS.....	80
Abbildung 4.3-4 Auswirkungen gesteigerter NO-Produktion durch eNOS.....	82
Abbildung 4.4-1 Expression von Arginase 1 auf histologischen Gewebeschnitten.....	84
Abbildung 4.4-2 Zelluläre Expression von Arginase 1	85
Abbildung 8.2-1 Positiv- und Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbungen.....	IX

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1-1 Übersicht Chemikalien	22
Tabelle 3.1-2 Übersicht Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3.1-3 Übersicht Geräte	25
Tabelle 3.1-4 Übersicht Softwares	26
Tabelle 3.2-1 Klinische Daten der ausgewählten Patientenproben	31
Tabelle 3.2-2 Primärantikörper der immunhistochemischen Färbungen	35
Tabelle 4.2-1 Extravasation von Erythrozyten in Gefäßläsionen	48
Tabelle 4.2-2 Nachweis von Hämolyse extravasaler Erythrozyten	51
Tabelle 4.2-3 Kolokalisation von Markern für vaskuläre Kalzifizierung	53
Tabelle 4.2-4 Kolokalisation von Myofibroblasten und Osteoblasten	55
Tabelle 4.2-5 Kolokalisation von Kalzifizierung und lysierten Erythrozyten	58
Tabelle 4.2-6 Bedeutung von Erythrozytenmembranen für vaskuläre Kalzifizierung	64
Tabelle 4.2-7 Fehlende Kalzifizierung in Abwesenheit von Erythrozytenmembranen	66
Tabelle 4.2-8 Bedeutung der Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin für die vaskuläre Kalzifizierung	69
Tabelle 4.2-9 Bedeutung der Eliminierung von Hämoglobin durch CD163-positive Makrophagen	72
Tabelle 4.2-10 Konstellationen der Inaktivierung von Hämoglobin als NO-Scavenger	74
Tabelle 4.3-1 Expression von eNOS auf histologischen Gewebeschnitten	77
Tabelle 4.3-2 Bedeutung von eNOS für vaskuläre Kalzifizierung	80
Tabelle 4.3-3 Auswirkungen gesteigerter NO-Produktion durch eNOS	82

Tabelle 4.4-1 Expression von Arginase 1 auf histologischen Gewebeschnitten

..... 84

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
ABCG2	<i>ATP-binding cassette transporter G2</i>
Acta2	<i>smooth muscle α-actin</i>
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
AEC	Aminoethylcarbazol
AGE	<i>advanced glycosylation end products</i>
AIT	<i>adaptive intimal thickening</i>
ARG1	Arginase 1
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	<i>body-mass-index</i>
BMP-2	<i>bone morphogenic protein-2</i>
Cbfa-1	<i>Core binding factor alpha-1</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CKD	<i>chronic kidney disease</i>
CPPs	<i>fetuin-A calciprotein particles</i>
dH₂O	destilliertes Wasser
EDCF	<i>endothelial-derived contracting factors</i>
EDHF	<i>Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>
EDRF	<i>endothelial-derived relaxing factors</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ENPP1	<i>ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HBG2	Methämoglobin

HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HIER	<i>heat induced epitop retrieval</i>
HIF	<i>hypoxia-inducible transcription factor</i>
ICAM	interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
IP3	Inositoltrisphosphat
IPH	Intraplaquehämmorrhagie
KHK	Koronare Herzerkrankung
KLF-4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MGP	<i>matrix Gla protein</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MSX-2	<i>Msh homeobox 2</i>
Myh11	<i>muscle myosin heavy chain</i>
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PIT	<i>pathological intimal thickening</i>
PKC	Proteinkinase C
RAGE	Rezeptor für <i>advanced glycosylation end products</i>
RANKL	<i>nuclear factor kappaB ligand</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SIBLING	<i>small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein</i>
SM	<i>smooth muscle</i>
SR-A	Scavenger-Rezeptor A
TCFA	<i>thin-cap-fibroatheroma</i>

TGF-β	<i>transforming growth factor-β</i>
TNAP	<i>tissue-nonspecific alkaline phosphatase</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

1 Einleitung

Vaskuläre Kalzifizierungen sind ein typischer Bestandteil fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen, die insbesondere in der Aorta, Aortenklappe und den Koronararterien vorkommen (1). Die Relevanz vaskulärer Verkalkungen für die Plaquestabilität und das Auftreten thrombotischer Ereignisse in Folge einer Plaqueruptur ist umstritten. Dabei wird zwischen Mikro- und Makroverkalkung unterschieden. Mikroverkalkungen, insbesondere innerhalb der fibrösen Kappe, gelten als destabilisierend (2, 3), wohingegen Makroverkalkungen eher vor einer Ruptur schützen (4). Die Ablagerung von Hydroxylapatitkristallen innerhalb atherosklerotischer Läsionen ist ein über verschiedene molekulare Mechanismen regulierter Prozess, der mit der Osteogenese in Knochen vergleichbar ist, sodass verschiedene Marker für osteoblastische Zellen auch in atherosklerotischen Läsionen nachweisbar sind (5, 6). Ein weiteres Phänomen fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen ist die Neovaskularisation, die verantwortlich für Einblutungen in Plaques, sogenannte Intraplaquehämorrhagien, ist (7, 8). In Übereinstimmung hiermit finden sich häufig extravasal gelegene Erythrozytenbestandteile in atherosklerotischen Läsionen (9). Klinische und experimentelle Untersuchungen von Koronararterien (9), Carotisplaques (10) und degenerativ veränderten Aortenklappen (11) konnten zeigen, dass Intraplaquehämorrhagien mit der Progression atherosklerotischer Läsionen assoziiert sind.

Diese Beobachtungen liegen der Leitfrage dieser Arbeit zugrunde, nämlich ob und durch welche molekularen Mechanismen Erythrozyten zum Fortschreiten der Atherosklerose und möglicherweise auch zur Entstehung vaskulärer Verkalkungen beitragen. Die experimentelle Grundlage zur Erforschung dieses Zusammenhangs im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die histologische Analyse von humanen kalzifizierten stenosierenden Aortenklappen, abdominellen Aortenaneurysmata und atherosklerotischen Carotisplaques. Hierbei wurden verschiedene histologische und immunhistochemische Färbungen auf Serienschnitten dieser Läsionen zur Analyse der Kollokationen von Erythrozytenbestandteilen und Anzeichen bzw. Biomarkern vaskulärer Verkalkung durchgeführt. Durch die Demonstration histologisch darstellbarer Kollokationen von Erythrozyten und Verkalkung in der Gefäßwand sollten Hinweise auf mögliche molekulare Zusammenhänge gefunden werden, welche dann von anderen MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe in der Zellkultur oder im Tierexperiment weiterführend untersucht wurden. Da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

an kultivierten Gefäßmuskelzellen bereits gezeigt wurde, dass nur lysierte, nicht aber intakte Erythrozyten eine Kalzifizierung bewirken, lag ein Schwerpunkt der histologischen Analysen auf der Bedeutung lysierter Erythrozytenmembranen für die Umdifferenzierung vaskulärer glatter Muskelzellen zu osteoblastischen, kalzifizierenden Zelltypen in humanen Gefäßläsionen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Physiologie der Gefäßwand

Die zentrale Rolle der Blutgefäße besteht im Transport von Nährstoffen, Bio- und Signalmolekülen und von Gasen durch den gesamten Körper. Außerdem ist das kardiovaskuläre System Träger des Immun- und Gerinnungssystems (12). Histologisch besteht die gesunde Gefäßwand aus drei Schichten. Die innerste Schicht ist die **Intima**, welche aus dem Endothel und dem bindegewebigen *Stratum subendotheliale* besteht (13). Das Endothel ist eine einfache Zellschicht, welche das Gefäßinnere auskleidet. Endothelzellen sind nicht nur physikalische Barriere zwischen Blut und Gefäßwand, sondern auch eine Quelle zahlreicher humoraler Faktoren, die das Verhalten der Zellen in der Gefäßwand und im fließenden Blut und Prozesse wie Blutdruck, Inflammation, Hämostase und Thrombose regulieren (12, 14, 15). Als Antwort auf Dehnung und Scherstress bei erhöhten Blutfluss produzieren Endothelzellen humorale Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin, „*endothelium-derived hyperpolarizing factor*“ (EDHF) oder Endothelin-1, welche durch Hyperpolarisation eine Relaxation der umliegenden vaskulären glatten Muskelzellen verursachen und so den Gefäßtonus regulieren (12, 14). Für diese Arbeit von besonderer Bedeutung ist die von Endothelzellen exprimierte endotheliale NO-Synthase (eNOS), die durch Oxidation aus ihrem Substrat L-Arginin L-Citrullin und NO synthetisiert. Als essentieller Kofaktor wird dabei 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin (BH4) benötigt (16). Das freigesetzte NO sorgt durch Stimulation der Guanylatzyklaseaktivität und nachfolgender Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in glatten Muskelzellen für eine Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation (17, 18). Das in das Gefäßlumen freigesetzte NO inhibiert außerdem die Plättchenaggregation -und adhäsion (16). Die bedeutende Funktion von eNOS wird auch durch Studien in eNOS-Knockoutmäusen deutlich. Diese zeigen einen hypertensiven Phänotyp, an dem eine paradoxe Acetylcholin-induzierte Vasokonstriktion beteiligt ist (19). Außerdem kommt es in diesen Tieren zu einer erhöhten Leukozyten- und Endothelzellinteraktion, vermehrter Plättchenaggregation und Thrombose (20-22).

Weiter außen, jenseits der Intima, liegt die **Media**, welche vor Allem glatte Muskelzellen enthält. Diese regulieren durch das Zusammenwirken zytoskelettaler kontraktiler Proteine die Kontraktion und Relaxation der Gefäßwand den Vasotonus und somit den Blufuss (13).

Die äußerste histologische Schicht stellt die **Adventitia** dar. Sie besteht aus Bindegewebe, welches Kollagenfasern, elastische Fasern, Immunzellen, Lymphgefäße, Progenitorzellen, Nerven und Fibroblasten enthält. Auch die sog. *Vasa vasorum* sind hier zu finden. Dies sind kleine Blutgefäße, welche für die Eigenversorgung des Gefäßes mit Sauerstoff und Nährstoffen zuständig sind (13, 23).

2.2 Klinische Relevanz der Atherosklerose

Pathologische Gefäßveränderungen durch Atherosklerose sind ursächlich für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen, die unter anderem zu dem klinischen Bild eines Myokardinfarktes oder Schlaganfalls führen können. So werden 45% der jährlichen Todesfälle kardiovaskulären Erkrankungen zugeschrieben, wovon 20% durch eine koronare Herzerkrankung, 11% durch zerebrovaskuläre Erkrankungen und 14% durch andere kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht werden (24). Daher ist die Atherosklerose die grundlegende Pathologie der häufigsten Todesursachen der westlichen Welt und mittlerweile auch von Schwellenländern. Aus diesem Grund besitzt sie eine hohe klinische Relevanz und ist von wissenschaftlichem Interesse.

Klinisch und wissenschaftlich von großer Bedeutung sind dabei unter anderem die für die Experimente dieser Arbeit verwendeten Patientenproben aus atherosklerotischen Carotisplaques, kalzifizierten atherosklerotischen Aortenklappen und abdominellen Aortenaneurysmata. Die häufigste Ursache eines Schlaganfalls stellen stenosierende atherosklerotische Plaques in den **Carotisarterien** dar (25), und das Vorkommen morphologischer Bestandteile von Atherosklerose in den Carotiden erhöht deutlich das Risiko, einen Schlaganfall oder eine transitorisch-ischämische Attacke (TIA) zu erleiden (26). Ätiologisch und morphologisch vergleichbare Prozesse mit der Atherosklerose innerhalb der Gefäßwand findet man bei kalzifizierten stenosierenden **Aortenklappen** (27, 28). Diese Pathologie ist klinisch von großer Bedeutung, da sie die häufigste Ursache einer Aortenstenose darstellt und so der häufigste Grund für einen chirurgischen Klappenersatz in westlichen Ländern ist (29). Eine weitere Form kardiovaskulärer Erkrankungen ist neben der Atherosklerose das **abdominelle**

Aortenaneurysma mit einer Prävalenz von ca. 1,5% (30-32). Diese Erkrankung betrifft hauptsächlich Männer im Alter von über 65 Jahren (31) und führt im Falle einer Ruptur bei über 80% der Betroffenen zum Tod, weshalb Screeningprogramme mittels Ultraschallsonographie etabliert wurden (33). Abdominelle Aortenaneurysmata teilen viele Parallelen mit atherosklerotisch veränderten Gefäßen wie beispielsweise gemeinsame prädisponierende Risikofaktoren und eine ähnliche Pathogenese, sodass man abdominelle Aortenaneurysmata als eine Sonderform der Atherosklerose bezeichnen kann (30). Dabei ist allerdings umstritten, ob beide Pathologien Parallelitäten in ihrer Entwicklung aufweisen (34, 35) oder ob eine Atherosklerose der Aorta durch Veränderungen des Scherstress eine ursächliche Rolle bei der Entstehung abdomineller Aortenaneurysmata spielt (35, 36).

2.3 Risikofaktoren und molekulare Mechanismen der Atherosklerose

Atherosklerose entsteht unter Einwirkung kardiovaskulärer Risikofaktoren, die zu endothelialer Dysfunktion und nachfolgender subendothelialer Lipoproteinretention führen. Durch die Akkumulation von Lipoproteinen in der Gefäßintima wird eine inflammatorische Reaktion ausgelöst mit nachfolgender Aktivierung des Endothels und der glatten Muskelzellen. Außerdem werden zunehmend Makrophagen rekrutiert, die durch Phagozytose von Lipidbestandteilen zu sog. Schaumzellen werden. Dadurch kommt es im Verlauf zu einer Akkumulation von inflammatorischen Zellen und extrazellulärer Matrix sowie von Lipidbestandteilen in der Intima (37). Als Barriere zwischen dem Plättchen-enthaltendem zirkulierendem Blut und der prothrombotischen Matrix (sog. Lipidkern) des atherosklerotischen Plaques bildet sich eine fibrotische Kappe. Wenn diese rupturiert, kann es zu arteriellen Thrombosen mit Gefäßverschlüssen und folglich zu Endorganischämien kommen (38). Beeinflusst wird die Aktivierung dieser Zelltypen von verschiedenen (lokalen) Risikofaktoren.

2.3.1 Kardiovaskuläre Risikofaktoren und deren Wirkung

Patienten mit **Diabetes mellitus** Typ 1 (primärer Insulinmangel) oder Typ 2 (Insulinresistenz mit sekundärem Insulinmangel) haben ein erhöhtes Risiko für Schlaganfälle und kardiovaskuläre Erkrankungen (39). Dies hängt damit zusammen, dass durch eine Hyperglykämie vermehrt Proteine und Phospholipide, wie beispielsweise das Kollagen der Gefäßwand, glykosyliert werden. Zunächst entstehen dabei reversible Glykosylierungsprodukte, welche im Verlauf durch weitere chemische Umstrukturierungen zu stabilen, irreversibel veränderten, sog. „*advanced glycosylation end products*“ (AGEs) werden. Dabei entstehen vermehrt reaktive

Sauerstoffspezies, welche oxidative Schäden an der Gefäßwand verursachen können (40). Monozyten und Makrophagen besitzen einen Oberflächenrezeptor für AGEs, sodass es bei Akkumulation dieser Glykosylierungsprodukte in der Gefäßwand zu einer inflammatorischen Antwort und folglich zu erhöhter vaskulärer Permeabilität kommt (41). Neben diesem Mechanismus führt auch eine gesteigerte Aktivität von NADPH-Oxidase zu vermehrtem oxidativen Stress, wie in Gefäßen von Patienten mit Diabetes gezeigt werden konnte (42). Gleichzeitig wird durch Hyperglykämie die Proteinkinase C aktiviert, wodurch die Aktivität von eNOS gehemmt wird und vasokonstriktorisches Faktoren wie Endothelin-1 dominieren (39, 43). Außerdem werden durch Aktivierung der Proteinkinase C vermehrt Adhäsionsmoleküle wie ICAM exprimiert, was eine Aktivierung des Endothels zur Folge hat (39, 44). Eine Insulinresistenz ist häufig mit **Adipositas** im Sinne eines **Metabolischen Syndroms** assoziiert, welches zusätzlich durch eine Dyslipidämie (erhöhte Plasmaspiegel von Triacylglyceriden und „*low density lipoprotein*“ [LDL] Cholesterin, verminderte Plasmakonzentrationen an „*high density lipoprotein*“ [HDL] Cholesterin) und arterielle Hypertonie definiert wird (39, 45).

Eine **Hyper- oder Dyslipidämie** ist selbst ein etablierter Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose (39). Auch hier entsteht vermehrt oxidativer Stress durch eine gesteigerte Expression der NADPH-Oxidase (39). Daneben werden durch eine Hypercholesterinämie die Plasmakonzentrationen von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) erhöht (46, 47). Dieser Faktor konkurriert mit L-Arginin um die Substratbindungsstelle von eNOS und wirkt so als endogener eNOS-Inhibitor, was zu einer eNOS-Entkopplung, einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit und vermehrter Superoxidproduktion führt (41). Ein weiterer bedeutender Mechanismus in der Entstehung von Atherosklerose ist die Oxidation von LDL durch Superoxidradikale mit nachfolgender Aktivierung des Endothels (48). Dabei wird in Endothelzellen die Synthese von Endothelin-1 gesteigert (49), die Inflammation durch Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen gefördert und die Migration und Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen stimuliert (39). Oxidiertes LDL wird von Makrophagen unter Bildung sogenannter Schaumzellen internalisiert, was den Beginn der Plaqueentstehung bedeutet (39).

Auch bei Patienten mit **arterieller Hypertonie** liegt eine gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies vor, und es dominieren vasokonstriktive Faktoren wie Endothelin-1 bei einer reduzierten Bioverfügbarkeit von NO (43, 50). Dies zeigt sich

auch dadurch, dass in hypertensiven Patienten die durch Scherstress provozierte NO-induzierte Vasodilatation reduziert ist (51). Diese sog. endotheliale Dysfunktion ist ein prominenter Pathomechanismus des Krankheitsbildes Bluthochdruck (52).

Das Problem der endothelialen Dysfunktion besteht auch bei **Rauchern**, bei denen die Bioverfügbarkeit von NO und damit die Fluss-vermittelte Vasodilatation vermindert ist (53). Außerdem steigert Tabakkonsum die Bildung von oxidiertem LDL (53). Ursächlich dafür sind freie Radikale im Tabakrauch, welche durch Aktivierung inflammatorischer Zellen die endogene Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies fördern (54, 55). So entsteht vermehrt oxidativer Stress, eNOS wird entkoppelt und es kommt zu endothelialer Dysfunktion, was letztendlich die Atherogenese begünstigt (39).

Auch **Alter** ist häufig mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert (56). Mit steigendem Alter nimmt die Expression von eNOS, sowie die der nachgeschalteten Guanylatzyklase ab, und es entstehen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Gleichzeitig werden vasodilatatorisch wirkende „*endothelial-derived relaxing factors*“ (EDRF) herunter- und vasokonstriktiv wirksame „*endothelial-derived contracting factors*“ (EDCF) heraufreguliert (39, 56). Außerdem kann es altersbedingt zu einer gesteigerten Expression von Arginase-1 kommen, welche mit eNOS um das Substrat L-Arginin konkurriert, wodurch auch so die Bioverfügbarkeit von NO abnimmt (57). All dies verursacht oxidativen Stress und fördert die Entstehung von Atherosklerose (39).

2.3.2 An der Atherogenese beteiligte Zelltypen

2.3.2.1 Endothelzellen

Bei Patienten mit Atherosklerose, die einen oder mehrere der oben genannten Risikofaktoren aufweisen, kommt es zu einem Funktionsverlust des Endothels und unter anderem zu einer Fehlfunktion der eNOS. Diese sog. endotheliale Dysfunktion spielt bei der Atheroskleroseprogression eine entscheidende Rolle. Ursächlich für die Schädigung der Endothelzellen ist insbesondere oxidativer Stress, der durch die typischen Risikofaktoren der Atherosklerose verursacht werden kann (39). Bei oxidativem Stress kommt es zu einer Hochregulation der ROS-bildenden Enzyme, wie zum Beispiel der NADPH-Oxidase (39). Dies initiiert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, Endothelzellapoptose und erhöht auch die Expression von Metalloproteinasen, die an allen Stadien der Atherogenese beteiligt sind (53). Neben der gesteigerten oxidativen Last kommt es gleichzeitig zu einer verminderten antioxidativen Aktivität, welche beispielsweise durch die Superoxiddismutase

vermittelt wird (58). Folglich steigt der Gehalt an Sauerstoffradikalen, welche mit einer hohen Affinität NO binden und inaktivieren (39). Dabei entsteht vermehrt Peroxynitrit (59), welches weitere Schäden am Endothel, unter anderem an eNOS, verursachen kann (60). Außerdem reagiert der Kofaktor Tetrahydrobiopterin, der für die Synthese von NO durch eNOS notwendig ist, sensitiv auf eine Oxidation durch Peroxynitrit (16). Dies verstärkt die sog. Entkopplung von eNOS, sodass es zu weiterer Superoxidproduktion und einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit kommt (39). Gleichzeitig führen diese Schäden am Gefäßendothel auch zu einer gestörten Barrierefunktion der Zellen, was proinflammatorische und prothrombotische Konsequenzen hat. Dies hängt eng mit deren Prädisposition zur Retention oxidativ modifizierter Lipoproteine zusammen. Die Kombination aus endothelialer Dysfunktion und Lipoproteinakkumulation stimuliert das Eindringen von Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen. Diese enthalten Cholesterin von Lipoproteinen und bilden sog. Schaumzellen (37). Auch Zytokine, Glykosylierungsendprodukte, bakterielle und virale Pathogene sind an der proatherogenen Aktivierung des Endothels beteiligt (37).

2.3.2.2 Makrophagen

Durch die Veränderung der Endothelzellen und die daraus begleitende Lipoproteinretention und endotheliale Aktivierung kommt es zu einer Zytokin-induzierten Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand (37). Im atherosklerotischen Plaque differenzieren diese weiter zu Makrophagen. Die läsionale Akkumulation von Makrophagen ist jedoch nicht nur durch den Influx von Monozyten bedingt, sondern auch durch eine lokale Proliferation unter Beteiligung des Scavenger-Rezeptor A (SR-A) (61).

In atherosklerotischen Läsionen sind zwei verschiedene Phänotypen von Makrophagen zu finden: proinflammatorische, sog. M1-Makrophagen und antiinflammatorische, sog. M2-Makrophagen (62). M1-Makrophagen werden durch Toll-like-Rezeptor-Liganden und Zytokine wie Interferon- γ stimuliert und exprimieren selber proinflammatorische Zytokine. Dadurch unterhalten sie die lokale Inflammation im Plaque, was zu einer weiteren Aktivierung des Endothels und Rekrutierung von Monozyten führt (62). Außerdem sind sie am Abbau extrazellulärer Matrixproteine beteiligt, wodurch der Plaque instabiler wird, was erklärt, warum man diese Makrophagen insbesondere in Ruptur-gefährdeten Schulterregionen von atherosklerotischen Läsionen findet (63). Im Gegensatz dazu sezernieren M2-

Makrophagen antiinflammatorische Zytokine und Kollagen. Sie spielen eine Rolle bei Wundheilungsprozessen und Gewebereparaturen, was ihre vermehrte Präsenz in regredienten Läsionen in Mausmodellen erklärt (62). Anders als M1-Makrophagen sind sie in atherosklerotischen Läsionen eher in der Adventitia und in stabilen, zellreichen Bereichen lokalisiert (63).

Nach Eintritt der Makrophagen in den atherosklerotischen Plaque kommt es dort zu einer Internalisierung subendothelial akkumulierter Lipoproteine. Dies geschieht durch Phagozytose aggregierter Lipoproteine, eine Scavenger-Rezeptor-vermittelte Aufnahme modifizierter Lipoproteine und auch durch Pinozytose nativer Lipoproteine. Hierdurch sind Makrophagen im Verlauf der Atheroskleroseprogression auch an der Entstehung eines vulnerablen Plaques beteiligt. Durch vermehrte Akkumulation oxidierter Phospholipide und einer zunehmenden Ansammlung von Cholesterin im endoplasmatischen Retikulum (ER) von Makrophagen entsteht sog. ER-Stress, und die Makrophagen können apoptotisch zugrunde gehen (37, 64). Durch oxidativen Stress und eine zytoplasmatische Überladung anderer Makrophagen mit unverdaulichen Materialien liegt in atherosklerotischen Läsionen gleichzeitig eine gestörte Efferozytose vor, also ein gestörter Abbau der apoptotischen Zellüberbleibsel (65). Auch der nekrotische Untergang von Makrophagen wirkt durch weitere Steigerung der Inflammation proatherogen (66). Zusätzlich exprimieren Makrophagen Matrix-Metalloproteinasen, welche eine weitere Ausdünnung der fibrotischen Kappe verursachen und so das Risiko einer Plaqueruptur weiter steigern (67). Eine *post mortem* Studie von Koronarplaques zeigte, dass die Ausdünnung der fibrotischen Kappe mit einem Voranschreiten der Lumenstenose vor einem akuten thrombotischen Ereignis einhergeht (68).

2.3.2.3 Glatte Muskelzellen

Die oben beschriebene Akkumulation von Lipoproteinen, Aktivierung des Endothels und Inflammation führen ebenfalls zu einer Aktivierung und Änderung des Phänotyps von vaskulären glatten Muskelzellen (37). Diese äußert sich durch eine Herabregulation typischer Marker dieses Zelltyps, wie zum Beispiel „*smooth muscle α -actin*“ (Acta2) oder „*smooth muscle myosin heavy chain*“ (Myh11) (37). Folglich kommt es zu einer gesteigerten Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen von der Media in die Intima und gesteigerter Produktion von Extrazellulärmatrix, was zu einer Größenzunahme, aber auch Stabilisierung des Plaques führt (69, 70). So findet man in vulnerablen Plaques einen reduzierten Anteil an glatten Muskelzellen im Verhältnis

zu inflammatorischen Lipid-beladenen Zellen, insbesondere in der Nähe der fibrotischen Kappe (37). Außerdem kommt es in atherosklerotischen Läsionen zu einem sogenannten „*phenotype-switching*“ von glatten Muskelzellen, bei welchem sich ihr kontraktiler Phänotyp in einen synthetischen und Makrophagen-ähnlichen Phänotyp umwandelt (70). Dieses Phänomen wird durch die Lipidakkumulation im Plaque reguliert, sodass es durch Cholesterinbeladung von kultivierten glatten Muskelzellen zu einer verminderten Expression Muskelzell-typischer Marker und Induktion von Makrophagenmarkern wie CD68 und Mac2 kommt (71). Es lässt sich somit vermuten, dass nicht alle Schaumzellen makrophagozytären Ursprungs sind (71). Jedoch ist die Unterscheidung des Ursprungs glatter Muskelzellen und Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen nur begrenzt möglich, da umgekehrt auch Makrophagen und andere Zellen hämatopoetischen Ursprungs Frühmarker glatter Muskelzellen exprimieren können (72, 73). Auch die Tatsache, dass Cholesterin-beladene glatte Muskelzellen makrophagozytäre Funktionen wie Phagozytose und Efferozytose aufweisen, zeigt deren Beitrag zur Atheroskleroseprogression (74).

2.3.2.4 Erythrozyten

Einen potentiell bedeutenden Mechanismus bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen stellt die Neovaskularisierung dar (7). Innerhalb fortgeschrittener atherosklerotischer Plaques entsteht ein hypoxisches Milieu, wodurch der Transkriptionsfaktor „*hypoxia-inducible transcription factor*“ (HIF) vermindert abgebaut und damit stabilisiert wird. Folglich werden auch nachgeschaltete Gene wie der „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF) hochreguliert, was eine gesteigerte Angiogenese zur Folge hat (8). Auch Inflammation und reaktive Sauerstoffspezies können VEGF-abhängig über HIF-1 α , genauso wie oxidierte Lipide, allerdings VEGF-unabhängig, die Bildung kleiner Mikrogefäße innerhalb des Plaques stimulieren (75). Allerdings sind diese Gefäße eher unreif und rupturieren leicht, was zur Extravasation von Erythrozyten innerhalb der Läsion führt, sog. Intraplaquehämorrhagien (IPH), welche in 40% der Hochrisikoplaques feststellbar sind (7). IPH werden mit der Progression atherosklerotischer Läsionen assoziiert, wodurch beispielsweise in fortgeschrittenen Läsionen von Koronargefäßen vermehrt Glykophorin A-positive Erythrozytenmembranen zu finden sind (9). Auch bei der Analyse von Carotisplaques (10) und degenerativ veränderten Aortenklappen (11) konnte ein Zusammenhang zwischen IPH und dem Progress von Atherosklerose gezeigt werden. Ursächlich dafür ist unter anderem das aus Erythrozytenmembranen freigesetzte Cholesterin, welches

neben LDL eine weitere Quelle zur Bildung von Cholesterinkristallen bei der Expansion des Lipidkerns atherosklerotischer Läsionen darstellt (9, 76). Aus diesem Grund führte auch eine direkte Injektion von roten Blutzellen in atherosklerotische Läsionen von Kaninchen zu einer Vergrößerung des nekrotischen Kerns und vermehrter Formation freier Cholesterinkristalle mit exzessiver Makrophageninfiltration (9). Die Erythrozyten betreiben jedoch selber keine Lipidsynthese, sondern stehen im Austausch mit dem Blutplasma, sodass Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie auch einen erhöhten Cholesteringehalt in den Membranen der Erythrozyten aufweisen (77). Dieser Cholesteringehalt zirkulierender Erythrozyten ist mit der klinischen Präsentation einer koronaren Herzerkrankung assoziiert, wobei Patienten mit akutem Koronarsyndrom einen signifikant höheren Gehalt zeigen (78, 79). Bei Kaninchen konnte unter einer Therapie mit Statinen ein reduzierter Cholesteringehalt der Erythrozytenmembranen erreicht werden, was in den atherosklerotischen Läsionen mit signifikant kleineren Lipidkernen, weniger Makrophagen und weniger Mikrogefäßen einherging (80). Auch die Induktion einer Anämie mit Hilfe von Phenylhydrazin konnte die Läsionsprogression in Apolipoprotein-E-Knockoutmäusen reduzieren (81). Zusätzlich wird im Rahmen der IPH Interleukin-8 freigesetzt, welches zuvor je nach Stadium des Schweregrades der Atherosklerose an die Erythrozyten gebunden wird und letztendlich ebenfalls an der inflammatorischen Kaskade und der Plaqueinstabilität beteiligt ist (82).

Innerhalb atherosklerotischer Läsionen herrscht unter anderem durch reaktive Lipidbestandteile ein oxidatives Milieu, welches zu einer Lyse der extravasierten Erythrozyten führt (7). Folglich sind auch die sonst von der Membran geschützten Erythrozytenbestandteile, insbesondere Hämoglobin, diesem Milieu ausgesetzt und werden oxidiert, sodass Hämoglobin in seiner oxidierten Form Methämoglobin oder der zweifach oxidierten Form Ferryl-Hämoglobin vorliegt (83). Vor allem Ferryl-Hämoglobin triggert durch einen intramolekularen Elektronentransfer die Bildung von Globinradikalen, wodurch prooxidative und -inflammatorische Prozesse weiter verstärkt werden (7). Außerdem werden durch oxidierte Formen von Hämoglobin proinflammatorische Zell-Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1 oder E-Cadherin stimuliert und es kommt zu einer vermehrten Rekrutierung polymorphkerniger Immunzellen (84). Genauso löst auch die prosthetische Gruppe Häm des Hämoglobins einen massiven Influx von Granulozyten und eine Hochregulation verschiedener Adhäsionsmoleküle aus (85). Gleichzeitig ist Häm in der Lage LDL zu oxidieren (86) und Endothelzellen oxidativ zu schädigen (87).

2.4 Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen und deren Komplikationen

Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen werden durch einen nekrotischen Kern, den sogenannten „*necrotic core*“ charakterisiert. Dieser entsteht durch das Eindringen von Makrophagen in die sogenannten „*lipid pools*“, und ist von fibrösem Gewebe umgeben (88). Diese „*lipid pools*“ stellen eine extrazelluläre Ansammlung von Lipiden dar, welche im Bereich der Media zu finden ist und keine glatten Muskelzellen enthält (89). Bei der Bildung dieser nekrotischer Areale stehen die Apoptose von Makrophagen und die mangelhafte Entfernung dieser apoptotischen Zellkörper im Vordergrund (90). In diesem Stadium treten auch vermehrt Verkalkungen und Gefäßneubildungen auf, die Grundlage für Intraplaquehämorrhagien und gesteigerte Inflammation (9, 91). Die fibrotische Kappe, welche einen Schutz zwischen nekrotischem Kern und Blutstrom darstellt, ist ausgedünnt (38). Aus diesem Grund gilt dieses atherosklerotische Stadium auch als Vorläuferläsion für eine Plaqueruptur, welcher ein thrombotisches Ereignis folgt. Sie wird daher auch „vulnerabler Plaque“ bezeichnet (92). Die Frage, in wie fern die für diese Arbeit relevanten Kalzifizierungen innerhalb der Läsionen zu der Plaqueruptur beitragen, bleibt umstritten. Mikrokalzifizierungen, die insbesondere in der fibrotischen Kappe lokalisiert sind, haben durch eine Erhöhung des lokalen Gewebestresses eine destabilisierende Wirkung auf den atherosklerotischen Plaque und fördern die Plaqueruptur (2, 3). Dabei gelten Mikroverkalkungen mit einem Durchmesser $<5 \mu\text{m}$ als harmlos und solche mit einem Durchmesser $>5 \mu\text{m}$ als gefährdend für die Stabilität der fibrotischen Kappe (93). Außerdem haben Mikrokalzifizierungen eine proinflammatorische Wirkung und wirken auch über diesen Mechanismus destabilisierend. Im Gegensatz dazu sind Makrokalzifizierungen mit einem Shift proinflammatorisch wirkender M1-Makrophagen zu antiinflammatorisch wirkenden M2-Makrophagen assoziiert, sodass makroskopisch sichtbare Verkalkung durch eine zurückgehende Inflammation eine stabilisierende Wirkung auf die Läsionen zu haben scheint. Daneben fördern M2-Makrophagen die Produktion extrazellulärer Matrix und die osteoblastische Differenzierung von glatten Muskelzellen, was ebenfalls den Plaque stabilisiert (4). Auch eine weitere Studie konnte zeigen, dass es bei ansteigendem Kalziumgehalt innerhalb der Läsion zu einer Abnahme des Volumens des Lipidkerns kommt und der Plaque dadurch stabilisiert wird (94).

2.5 Vaskuläre Verkalkung

Eine bedeutende Komplikation innerhalb atherosklerotischer Läsionen stellt die vaskuläre Verkalkung dar, bei der die osteochondrogene Differenzierung

verschiedener Zelltypen der Gefäßwand zur Ablagerung von Hydroxylapatitkristallen führt.

2.5.1 Lokalisation

Bei vaskulärer Verkalkung kann man zwei verschiedene Arten der Kalzifizierung unterscheiden. Einerseits kann es durch Osteoblasten-ähnliche Zellen zur Bildung von unstrukturiertem, ektopischen Knochen kommen, andererseits können mineralisierte Areale auch ohne den Einfluss Osteoblasten- oder Osteoklasten-ähnlicher Zellen entstehen (95). Welche Art der Verkalkung vorliegt, hängt von den Eigenschaften des Gefäßes, der ursächlichen Pathologie und auch davon ab, welche Schicht der Gefäßwand betroffen ist (95). Bei atherosklerotisch veränderten Arterien ist durch einen gestörten Blutfluss oder an Gefäßabzweigungen die arterielle Intima pathologisch verändert (96). Verkalkte Areale dieser Plaques sind meist an der Basis der Läsion in Nähe zur Gefäßmedia in Form von Knötchen zu finden und tragen Merkmale von umgebautem Knochen, Knorpelmetaplasie, Fettgewebe und Knochenmarkelementen (95, 97). Eine spezielle Form der Gefäßwandverkalkung, der sog. Mediasklerose oder Mönckebergsklerose, ist mit Diabetes mellitus, hohem Alter und chronischem Nierenleiden („*chronic kidney disease*“, CKD) und der damit verbundenen Hyperphosphatämie assoziiert (98, 99). Hier ist die arterielle Media oder auch die *Membrana elastica interna* betroffen, innerhalb welcher sich Verkalkungen entlang der elastischen Lamellen bildet (95, 100).

Klinisch von großer Bedeutung ist die Verkalkung von Herzklappen, insbesondere der Aortenklappe, die mit der Entwicklung einer Aortenklappenstenose assoziiert ist (101). Die Regulation des kalzifizierenden Effekts weist trotz einiger einzigartiger Eigenschaften deutliche Ähnlichkeiten mit der Entwicklung von Verkalkung innerhalb der Gefäßwand auf (95, 101). Auch hier entsteht die Verkalkung durch eine osteoblastische Transition valvulärer interstitieller Zellen (102). Nach einer Verdickung der Klappensegel bilden sich Kalziumkerne, die aus Knochenmatrix bestehen können. Bei weiterer Vergrößerung der kalzifizierten Areale werden die einzelnen Klappensegel in ihrer Bewegung beeinträchtigt, und die Öffnung der Aortenklappe und damit auch der linksventrikuläre Auswurf sind reduziert (101). In diesem Fall ist ein Klappenersatz die Therapie der Wahl (102).

2.5.2 Beteiligte Zelltypen

Eine osteochondrogene Differenzierung, die zu vaskulärer Verkalkung führt, können verschiedene Zelltypen der Gefäßwand durchlaufen (95). Meistens geht diese im

ersten Schritt allerdings von Zellen der Gefäßmedia aus, den **glatten Muskelzellen** (103). In ihrem Phänotyp veränderte, dedifferenzierte glatte Muskelzellen sind zunächst während der Atherogenese an der Bildung einer Neointima beteiligt und in der Lage, auf osteogene Signale, welche in atherosklerotischen Läsionen durch Diabetes, Hyperphosphatämie oder Inflammation zu finden sind, zu antworten (95). Bei der Differenzierung zu einem osteoblastärem Phänotyp kann zwischen einer indirekten Differenzierung mit vorheriger Dedifferenzierung zu weniger reifen Zellen, gefolgt von einer osteochondrogenen Redifferenzierung und einer direkten Differenzierung zu einem osteochondrogenen Phänotyp unterschieden werden (104). Auslösend für diese Differenzierungsschritte sind unter anderem Zytokine von Makrophagen, die eine Mineralisierung glatter Muskelzellen verursachen können (105, 106). Im Verlauf der Plaqueprogression kommt es außerdem vermehrt zu Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER-Stress), was durch Hochregulation von Faktoren, die essentiell für die Osteoblastogenese sind, wie zum Beispiel Osteocalcin, zu einer osteoblastären Differenzierung glatter Muskelzellen führt (4, 107). Außerdem haben glatte Muskelzellen den gleichen mesenchymalen Ursprung wie Osteoblasten und reagieren mit einem vergleichbaren Expressionsmuster auf osteogene Stimulation (6, 103). Die anschließende Mineralisierung glatter Muskelzellen geschieht entweder durch Sekretion von Matrixvesikeln (108) oder durch Apoptose (109). Dieses mineralisierende Potential wird durch einen Anstieg von Phosphor und Kalzium verstärkt (108, 110), was erklärt, warum vaskuläre Verkalkungen vermehrt bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung auftreten (111). Diese verkalkenden Prozesse werden im Knochen und auch in Arterien durch Inhibitoren wie „*matrix Gla protein*“ (MGP), Pyrophosphate, Osteopontin oder zirkulierendes Fetuin-A gegenreguliert (112).

In der Adventitia der Gefäßwand vorliegende **Myofibroblasten** können auch in eine osteogene Differenzierung involviert sein, was sich in diabetischen Tiermodellen mit Hyperlipidämie zeigte (113). Diese Zellen sind mobil und können daher zu inflammatorischen Gebieten migrieren (95).

Auch **Perizyten** können an vaskulärer Verkalkung beteiligt sein (114) und in osteoblastische Linien differenzieren (115). Andererseits sind sie jedoch auch in der Lage die osteogene Differenzierung glatter Muskelzellen zu inhibieren (116).

Eine osteochondrogene Differenzierung ist durch mesenchymale Transition auch in **Endothelzellen** möglich (117, 118). Das bedeutet, dass die Zellen zunächst in

mesenchymale Zellen mit Stammzellcharakter dedifferenzieren, bevor sie eine osteochondrogene Differenzierung durchlaufen. So sinkt auch das Ausmaß an Verkalkung bei Verminderung der endothelialen-mesenchymalen Transition (118). Zusätzlich steigt durch Inflammation und Beschädigung von Endothelzellen die Expression von „*bone morphogenic protein-2*“ (BMP-2), was zu einer Produktion endothelialer Mikropartikel führt, die vor allem Kalzium und BMP-2 enthalten und vaskuläre glatte Muskelzellen zur Differenzierung und Verkalkung stimulieren (119).

Bedeutend für vaskuläre Verkalkung sind ebenfalls **Progenitorzellen**, welche stationär in der Gefäßwand zu finden sein können oder im Kreislauf zirkulieren und in vaskuläres Gewebe migrieren können (120). Besonders reich an Progenitorzellen, die lokale Zellen der Gefäßwand unterstützen und regulieren, sind außerdem Nischen innerhalb der Adventitia (121). Stationäre Gli1-positive mesenchymale Stammzellen sind beispielsweise Progenitorzellen vaskulärer glatter Muskelzellen, die in der Adventitia lokalisiert sind (122). Sie tragen durch Migration zur Media zur Neointimabildung bei und stellen eine weitere Quelle osteoblastischer Zellen dar (122). Genauso tragen auch zirkulierende Stammzellen des Knochenmarks zur Präsenz osteoblastischer sowie auch osteoklastischer Zellen in der Gefäßwand bei (123). Daher findet man in kalzifizierten Arealen nicht nur mineralisierende Zellen vom osteoblastischen Typ, sondern auch osteoklastische Zellen. Diese sitzen in der Zellwand und besitzen die Fähigkeit, mineralisierte Areale zu degradieren und Osteoblasten-ähnliche Zellen zu regulieren (95). Ihre Abstammung ist auf zirkulierende Monozyten zurückzuführen, welche durch das kalzifizierte Milieu der erkrankten Gefäßwand eine osteoklastische Differenzierung durchlaufen (124).

In verkalkenden stenosierenden Aortenklappen sind es die **valvulären interstitiellen Zellen**, die osteogene Faktoren exprimieren und so zu einer Mineralisierung von Aortenklappen führen (102, 125). Die fibrotisch-kalzifizierenden Prozesse laufen hier hauptsächlich in der Fibrosa, also der Aorta-zugewandten Seite der Klappe, ab, was sich durch vermehrt wirkende Scherkräfte auf dieser Seite der Aortenklappe erklären lassen könnte (102). Auf dieser Seite exprimieren die Endothelzellen außerdem weniger inhibitorische Moleküle für vaskuläre Verkalkung (126).

2.5.3 Signaltransduktionswege vaskulärer Kalzifizierung

2.5.3.1 BMP-Signalweg

Die „*bone morphogenic proteins*“ (BMPs) sind Wachstumsfaktoren, die zu der Gruppe der „*transforming growth factor β* “ (TGF- β)-Familie gehören (127). Als wichtige

Aktivatoren der osteoblastischen Differenzierung sind sie auch in verkalkten Gefäßwänden zu finden (128). Ihre Aktivierung ist dabei mit typischen Bedingungen vaskulärer Verkalkung wie Atherosklerose (129), hohen Phosphatkonzentrationen (130) und Diabetes mellitus (131) assoziiert. Dabei unterscheidet man verschiedene Subtypen der BMPs mit unterschiedlicher Bedeutung für die vaskuläre Kalzifizierung. BMP-2 und -4 fördern durch Modulation der Genexpression osteogener Faktoren die vaskuläre Verkalkung (132). Sie interagieren dabei mit ihrem Rezeptor, was eine Phosphorylierung regulatorischer „*Smads*“ zur Folge hat. Dies sind intrazelluläre Proteine, die extrazelluläre Signale an den Nukleus weiterleiten und so die genetische Transkription der entsprechenden Zelle beeinflussen (133). So wird durch BMPs der Transkriptionsfaktor „*Core binding factor alpha-1*“ (Cbfa-1) bzw. „*Runt-related transcription factor 2*“ (Runx2) vermehrt exprimiert, was zu einer Transition der Zelle in einen osteoblastischen Phänotyp führt (130). Dadurch stellt Cbfa-1 als Schlüsselement der osteoblastischen Differenzierung durch seine Expression in der Gefäßwand einen frühen Schritt vaskulärer Verkalkung dar (134). Außerdem werden durch Cbfa-1 auch weitere Faktoren, die die osteoblastische Differenzierung beeinflussen, wie beispielsweise Osteocalcin, Osteopontin oder Kollagen Typ I, reguliert (135, 136). Es kommt zu einem veränderten Expressionsmuster der differenzierten Zellen mit Hochregulation der Alkalischen Phosphatase, „*bone sialoprotein*“, Osteocalcin und Kollagen Typ II und einer verminderten Expression von MGP, Osteonectin, Osteoprotegerin und Aggrecan (6).

Im Gegensatz zu BMP-2 und -4 vermindert BMP-7 eine osteoblastische Differenzierung durch Förderung der Expression spezifischer Marker von glatten Muskelzellen und durch Hemmung derer Proliferation (137).

Vaskuläre Verkalkung ist eine Komplikation von Atherosklerose, einer chronisch-inflammatorischen Erkrankung der Gefäßwand. Neben oxidativem Stress spielen auch inflammatorische Prozesse eine Rolle bei der Entstehung vaskulärer Verkalkung (95). So sind in atherosklerotischen Läsionen vermehrt Zytokine, wie zum Beispiel TNF- α , zu finden (138). Durch Stimulation der Expression von BMP-2 kann TNF- α vaskuläre glatte Muskelzellen stimulieren, Kalziumablagerungen zu bilden (106, 139). Gleichzeitig liegen inhibitorische Faktoren wie MGP in reduzierter Menge vor (140). Aus diesem Grund kann eine Inhibition des Inflammasoms die Verkalkung von kultivierten vaskulären glatten Muskelzellen vermindern (141). In atherosklerotischen Plaques treten außerdem vermehrt Apoptose und Nekrose auf, wodurch Zytokine, wie

Interleukin-1 α , induziert werden, die auch Verkalkung initiieren (140). Auch Kalziumphosphatkristalle selbst stimulieren umliegende Makrophagen, die in der Folge Zytokine wie TNF- α oder Interleukin-1 β sezernieren und so die vaskuläre Verkalkung durch diesen positiven Rückkopplungsmechanismus weiter verstärken (142). Neben diesen direkten Effekten auf die Verkalkung von Gefäßen steigern Inflammation und Zytokine auch die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies und somit die Entstehung von oxidativem Stress (143). Durch die hohen Spiegel an freien Radikalen werden auch weitere Marker für vaskuläre Verkalkung, wie die Aktivität der alkalischen Phosphatase oder BMP-2, induziert (132). BMP-2 steigert nicht nur die Mineralisierung glatter Muskelzellen, sondern fördert auch die Aktivität der Cyclooxygenase-2. Folglich werden neben der Prostaglandinsynthese auch Oxidasen, die weitere reaktive Sauerstoffspezies synthetisieren, stimuliert (132). Dadurch entsteht ein Teufelskreis, in dem sich inflammatorische und kalzifizierende Prozesse gegenseitig bedingen.

2.5.3.2 Wnt-Signalweg

Wnt-Moleküle sind sekretorische Glykoproteine, die eine wichtige Bedeutung für die Entwicklung und Differenzierung von Zellen und so auch für die Homöostase des Gewebes besitzen (144). In atherosklerotischen Läsionen kommt es durch oxidativen Stress zu einer gesteigerten Expression von BMP-2 und TNF- α , welche unter anderem die Expression des osteochondrogenen Transkriptionsfaktors MSX-2 induzieren. Durch Hochregulation dieses Faktors werden vermehrt Wnt-Moleküle, wie Wnt3a und Wnt7a, exprimiert (145). Diese Wnt-Moleküle binden Proteinkomplexe, die den Abbau von β -Catenin im Proteasom verhindern. Dadurch akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma und wird anschließend in den Nukleus translokalisiert, wo dann bedeutende Gene für eine osteoblastische Differenzierung induziert werden (146). Neben vaskulären Verkalkungen (145) führt eine Aktivierung dieses Signalweges auch zu einer gesteigerten Monozytenadhäsion an Endothelzellen (147) und einer vermehrten Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen (148).

2.5.3.3 Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist ein juxtakriner Signalmechanismus, bei dem es zu einer Interaktion von Notch-Liganden mit deren transmembranären Notch-Rezeptoren kommt, was eine veränderte Transkription der Notch-nachgeschalteten Gene zur Folge hat (149). So können Liganden von Notch-1 wie zum Beispiel Jag1 oder DLL1 die BMP-2-vermittelte osteogene Differenzierung steigern (150). Auch eine gesteigerte

Aktivität der intrazellulären Domäne von Notch-1 stimuliert eine durch BMP-2 induzierte Expression des Transkriptionsfaktors MSX-2 und führt somit zu einer Mineralisierung glatter Muskelzellen (151). Gegenregulatorisch wird durch BMP-2 gleichzeitig der Notch-Ligand Hey1 vermehrt exprimiert, welcher durch eine Inhibition von Runx2 die Mineralisierung glatter Muskelzellen negativ reguliert (152). Durch dieses Phänomen entsteht bei inaktivierenden Mutationen von Notch-1 eine deutliche Progression der Runx2-vermittelten vaskulären Verkalkung (149). Außerdem wird Notch-1 durch erhöhten Scherstress aktiviert und induziert nachfolgend MGP, was zu einer verminderten Aktivität osteoblastischer Gene führt (153). Inhibitorische Liganden der Notch-Rezeptoren wie DIK1, die in proliferierenden Stammzellen exprimiert werden, können deren volle Differenzierung zu Osteoblasten inhibieren (154). Die Aktivität der verschiedenen Notch-Signalwege wird auch durch Hypoxie (149), inflammatorische Zytokine (155, 156) und chemische Modifikationen durch NO oder reaktive Sauerstoffspezies (149) beeinflusst.

2.5.3.4 Phosphat-vermittelte Signalwege

Eine Konsequenz von progressivem Nierenversagen und die beeinträchtigte Fähigkeit der Niere, Phosphat und Kalzium zu sezernieren, ist die Entstehung einer Hyperphosphatämie. Dieses Phänomen ist ein weiterer Stimulator vaskulärer Verkalkung, insbesondere der Gefäßmedia (98). Anorganisches Phosphat lagert sich dabei weniger an Kollagenfibrillen, sondern eher am Elastin der elastischen Fibrillen der Media ab (157). Dieser Prozess wird durch Degradierung des Elastins durch Elastasen und andere Proteasen verstärkt (158). Durch den Natrium-abhängigen Phosphat-Kotransporter Pit-1 gelangt Phosphat in die vaskulären glatten Muskelzellen, wo es durch die Erhöhung der Expression von Osterix, einem osteoblastischen Transkriptionsfaktor, die Mineralisierung der Matrix stimuliert (159).

Im Gegensatz zu anorganischem Phosphat ist Pyrophosphat durch Blockade der Bildung von Hydroxylapatitkristallen ein Inhibitor vaskulärer Verkalkung (132, 160).

2.5.3.5 Matrixvesikel und Exosome

Matrixvesikel sind zellmembranumschlossene Strukturen, deren Inhalt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung des Skeletts spielt. Ähnliche Strukturen wurden auch im Zusammenhang mit vaskulärer Verkalkung entdeckt (161). Matrixvesikel und Exosome enthalten Mineralien, Proteine und RNA, sodass sie den Verkalkungsprozess über diesen Weg beeinflussen können (162).

2.5.3.6 Inhibitorische Faktoren

Vaskuläre Verkalkung wird durch verschiedene Faktoren auch inhibitorisch reguliert. Das oben bereits erwähnte „*matrix Gla protein*“ (MGP) moduliert vaskuläre Verkalkung durch Inhibition der Interaktion der BMPs mit ihren Rezeptoren (163). Für diese inhibitorische Funktion ist eine Vitamin-K-abhängige γ -Carboxylierung des Proteins notwendig, sodass an verkalkten Arealen vermehrt nicht ausreichend carboxyliertes MGP zu finden war (164).

Auch das Osteoprotegerin (OPG)/„*receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand*“ (RANKL)/„*TNF-related apoptosis-inducing ligand*“ (TRAIL)-Signalsystem nimmt Einfluss auf den Prozess der vaskulären Verkalkung (95). Dabei steigert RANKL durch Induktion osteoblastischer Aktivität vaskuläre Verkalkung (165). Jedoch ist OPG in der Lage als „Köderrezeptor“ zu wirken, indem es RANKL bindet und so von dessen Rezeptor abfängt. Die kalzifizierende Wirkung wird dadurch aufgehoben (166). Einen weiteren Liganden für OPG stellt TRAIL dar, dessen genaue Bedeutung für Gefäße allerdings umstritten ist (166).

Ein weiterer potenter Inhibitor vaskulärer Verkalkung ist das Glykoprotein Fetuin-A, das von der Leber produziert wird und zu den negativen Akute-Phase-Proteinen gehört. Fetuin-A ist in der Lage frühe Kalziumphosphat-Kristalle zu binden und so deren Wachstum und Ablagerung zu verhindern (167). Diese Hydroxylapatitkristalle werden normalerweise durch Zellen des retikuloendothelialen Systems verdaut. Durch Bildung dieser sogenannten „*fetuin-A calciprotein particles*“ (CPPs) kann diese Eliminierung vereinfacht ablaufen (167). Außerdem fällt die Induktion der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen durch CPPs niedriger aus als jene durch Hydroxylapatitkristalle alleine (168). Diese Tatsachen sind eine mögliche Erklärung dafür, dass in Patienten mit vaskulärer Verkalkung niedrigere Konzentrationen an Fetuin-A zu finden sind (169).

2.6 Offene Fragen und Ziele der Arbeit

In fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen kommt es mit zunehmender Größe häufig zu Neovaskularisationen, welche durch Leckagen in den kleinen, unreifen Gefäßen zu lokalen Blutungen, sog. IPH führen können (7). Die Präsenz von Erythrozyten innerhalb der Läsionen legt die wesentliche Frage dieser Arbeit offen, ob diese eine Folge fortgeschrittener Atherosklerose sind oder ob ihnen außerdem eine

ursächliche proatherogene Funktion zugeschrieben werden kann. Die oben beschriebenen Studien, bei denen ein steigender Effekt von intraläsionalen Erythrozyten auf die Atheroskleroseprogression beschrieben wird, bestärken diese Annahme (9). Ein weiterer Bestandteil fortgeschrittener atherosklerotischer Plaques sind Kalzifizierungen, welche hauptsächlich durch die osteoblastische Differenzierung glatter Muskelzellen entstehen (95). Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war es herauszufinden, ob sich in atherosklerotischen Läsionen des Menschen histologische Hinweise finden lassen, dass Erythrozyten bei der Transdifferenzierung von glatten Muskelzellen in Osteoblasten und somit für die vaskuläre Kalzifizierung eine Rolle spielen könnten. In diesem Zusammenhang war ein weiteres Ziel der Arbeit, im Falle eines Zusammenhangs den entsprechenden Mechanismus zu analysieren. Hierzu wurde, angelehnt an Zellkulturexperimente und Tierversuche der eigenen Arbeitsgruppe, eine systematische histologische und morphometrische Analyse von humanen kalzifizierten stenosierenden Aortenklappen, abdominalen Aortenaneurysmata und atherosklerotischen Carotisplaques durchgeführt. Mit Hilfe von Kolo-kalisationen verschiedener Erythrozytenbestandteile (Zellmembran, Hämoglobin, Eisen), potentiellen Mediatoren (eNOS, Arginase-1, oxidativer Stress) mit zellulären Markern für Osteoblasten (Osteopontin, Periostin) und anderen potentiell relevanten Zelltypen (CD163-positive Makrophagen, SM alpha-Aktin-positive Myofibroblasten) wurde an Serienschnitten versucht, mögliche Zusammenhänge und Mechanismen der osteoinduktiven Aktivität von Erythrozyten in vivo zu analysieren.

3 Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Name	Firma	Bestellnummer
10X Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Gibco® by Life Technologies™, Carlsberg, CA, USA	70011-051
AB Diluent with Background Reducing Activities	Dako North America, Inc., Carpinteria, USA	S302283-2
Aceton	Applichem GmbH, Darmstadt, DE	A1582, 2500
Acid Fuchsin	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE	F8129
AEC Peroxidase Substrate Kit	VectorLabs, Burlingame, CA, USA	SK-4200
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	2834
Alizarinrot-S	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	O348.2
Ammoniak 10%	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	6756.1
Avidin/Biotin Kit	VectorLabs, Burlingame, CS, USA	SP-2001
Azophloxine	Waldeck GmbH & Co., Münster, DE	1B-103
Biotin-xx-goat anti-mouse IgG	Molecular Probes® by Life Technologies™, Eugene, OR, US	B2763
Biotin-xx-goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes® by Life Technologies™, Eugene, OR, US	B2770
Citric Acid Monohydrate	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE	C1909

EDTA-Dinatriumsalz	Applichem GmbH, Darmstadt, DE	A3553
Essigsäure 100%	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	3738.4
Ethanol 100%	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	K9285
Ethanol 70%	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	T913.3
Ethanol 96%	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	T171.4
Eukitt	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE	3989
Formaldehydlösung 37%	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	4979.1
Gill's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE	GHS332
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	X906.1
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	X907.1
Immersionsöl für Mikroskopie	Applichem GmbH, Darmstadt, DE	A0699,0250
ImmuMount	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, DE	9990402
Kernechrot- Aluminiumsulfat- Lösung	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	N069-1
Lichtgrün SF	Waldeck GmbH & Co., Münster, DE	1B-211R
Methanol (>99,5%)	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	CP.43.2
Normal Goat Serum	Abcam®, Cambridge, UK	ab156046
NovaRed (Peroxidase Substrat Kit)	VectorLabs, Burlingame, CS, USA	SK-4800

Orange G	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	0318.2
ParaPlast Plus	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	X881.2
Phosphomolybdänsäure	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	4440.3
Pikrinsäure, gesättigt	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE	P-6744-1GA
Ponceau Xylidin	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE	P2395
Potassium hexacyanoferrate (II)	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE	P3289-100G
Roti-Clear	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	A538.5
Rotihistol	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	6640.4
Roti-Liquid Barrier Marker, rot	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	AN92.1
Salzsäure 20%	Applichem GmbH, Darmstadt, DE	A3397,1000
TRIS, blotting grade	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	0188.3
Triton-X100	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	3051.3
Vecta Stain ABC Kit Elite (Standard)	VectorLabs, Burlingame, CS, USA	PK 6100
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	9681.4
Xylol (>98%, rein, für Histologie)	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	9713.5
Zinkformalin	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE	Z2902-3,75L

Tabelle 3.1-1 Übersicht Chemikalien

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma	Bestellnummer
Baumwollstäbchen	VWR International, Radnor, PA, US	149-0331
Deckgläser 24x60 mm (Menzel)	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, DE	BB022060A1
Deckglaspinzette gebogen 115 mm	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	K718.1
Drahtbügel für Färbegestell	VWR International, Radnor, PA, US	631-9329
Einbettkassetten	Engelbrecht GmbH, Edermünde, DE	17995
Einmal-Wägeschalen 14x14 mm	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	2159.2
Eppendorf-Cups 1,5 ml SafeLook	Eppendorf AG, Hamburg, DE	
Eppendorf-Cups 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE	1003-8760
Falcon 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE	188271
Falcon 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE	227261
Färbegestelle	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	H552.1
Glasküvetten mit Deckel	VWR International, Radnor, PA, US	631-9328
Laborflaschen 1000 ml	VWR International, Radnor, PA, US	215-1537
Laborflaschen 500 ml	VWR International, Radnor, PA, US	215-1536

Magnetrührstäbchen 30 mm	VWR International, Radnor, PA, US	422-4525
Messzylinder Kartell 100 ml	VWR International, Radnor, PA, US	612-4065
Messzylinder Kartell 1000 ml	VWR International, Radnor, PA, US	612-4066
Messzylinder Kartell 500 ml	VWR International, Radnor, PA, US	612-4063
Objektträger Superfrost ultra	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, DE	J3800AMNZ
Objektträgermappe	VWR International, Radnor, PA, US	631-0689
Pasteurpipetten kurz	VWR International, Radnor, PA, US	612-1701
pH-Elektrode	VWR International, Radnor, PA, US	662-1161
Pinzette (10 cm, gerade)	Fine Science Tools® GmbH, Heidelberg, DE	11150-10
Pipette Eppendorf Research plus 0,5-10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE	3123-000.020
Pipette Eppendorf Research plus 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE	3123-000.047
Pipette Eppendorf Research plus 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE	3123-000.063
Pipettenspitzen 0,1-10 µl	Starlab International GmbH, Hamburg, DE	S1110-3000
Pipettenspitzen 100 µl	Starlab International GmbH, Hamburg, DE	S1111-0006
Pipettenspitzen 1000 µl	Starlab International GmbH, Hamburg, DE	S1111-6001
Serologische Pipetten 10 ml steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE	607107

Trichter (100 mmx155 mm)	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	YA49.1
Zellstoff ungebleicht	Apotheke	

Tabelle 3.1-2 Übersicht Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Geräte

Name	Firma
Gewebeinfiltrationsautomat TP1020	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, DE
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US
Kühlschränke	Liebherr-International AG, Bulle, CH
Magnetrührer VS-C4	VWR International, Radnor, PA, US
MicroPublisher 5.0 RTV	QImaging, Surrey, BC, CA
Mikroskop BX51	Olympus, Hamburg, DE
Mikrotom RM2245	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, DE
Mikrowelle	Sharp K. K., Oskaka, JP
Paraffinausgießstation EG 1150 H	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, DE
pH-Meter	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage, Laboratory LC 2200 P	Sartorius AG, Göttingen, DE

Tabelle 3.1-3 Übersicht Geräte

3.1.4 Software

Name	Firma
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, US
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, US
Microsoft Powerpoint 2016	Microsoft Corporation, Redmond, WA, US

QCapture Pro 6.0	QImaging Corporation, Surrey, CA
Graph Pad Prism 7.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, US
Image-Pro Plus 7.0	Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, US

Tabelle 3.1-4 Übersicht Softwares

3.2 Methoden

3.2.1 Herkunft der humanen Gewebeproben

Untersucht wurden operativ entnommene kalzifizierte stenosierende Aortenklappen, abdominelle Aortenaneurysmata und atherosklerotische Carotisplaques symptomatischer Patienten. Die chirurgischen Eingriffe wurden am „*University General Hospital of Alexandroupolis*“, Griechenland, „*Department of Cardiothoracic Surgery and Vascular Surgery*“ durchgeführt (Ethikvotum der lokalen Behörden liegt beim Kooperationspartner vor) und uns für histologische Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Patienten mit Karzinomen, systemisch inflammatorischen oder Autoimmunkrankheiten wurden von der Studie ausgeschlossen. Das Studienprotokoll entsprach den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki. Alle Patienten wurden aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zum Einschluss in die Studie.

3.2.2 Gewebepreparation

Die Gewebeproben wurden in der Abteilung Pathologie der Universitätsklinik Alexandroupolis zunächst in Formaldehyd (8%) gelagert, für 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert und anschließend in eine Einbettkapsel gegeben. Danach wurde das Gewebe für 3 Stunden unter fließendem Leitungswasser gewässert, bevor es 15 Minuten in dH₂O gespült wurde und in 70% Ethanol überführt wurde. So wurden die Gewebeproben dann bei 4°C bis zur Einbettung in einem Gewebeinfiltrationsautomaten (TP 1020, Leica) gelagert. Dort wurde das Gewebe zunächst entwässert und nach Inkubation in dem Zwischenmedium Rotihistol mit dem Einbettmedium Paraffin infiltriert. Dies geschah nach folgendem Protokoll:

- 5 Minuten in dH₂O
- 30 Minuten in dH₂O

- Aufsteigende Alkoholreihe: 2 Stunden in 70% Ethanol, 2 Stunden in 80% Ethanol, 2 mal 2 Stunden in 96% Ethanol, 2 mal 2 Stunden in 100% Ethanol
- 2 mal 2 Stunden in Rotihistol (Xylol-Ersatz) als Zwischenmedium
- 2 Stunden in Paraffin
- 4 Stunden in Paraffin

Am darauffolgenden Tag wurden die mit Paraffin infiltrierten Proben in Einbettkassetten an einer Paraffinausgießstation (EG 1150 H, Leica) ausgeblockt. Nach Übermittlung der Gewebeblöcke an die Universitätsmedizin in Mainz wurden von den paraffineingebetteten Proben an einem Mikrotom (RM 2245, Leica) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Dabei wurden von jedem Patienten zehn Objektträger mit Serienschnitten mit jeweils zwei bis drei Gewebeschnitten pro Objektträger erstellt. Danach wurden die Schnitte zum Trocknen bei 60°C in einen Inkubator gestellt.

3.2.3 Histologische Färbungen

Zum allgemeinen Überblick über die verfügbaren Patientenproben und zur Eingrenzung der Auswahl der für die Arbeit geeigneten Proben wurden zunächst eine Alizarin S Färbung und eine Masson-Goldner-Trichrom Färbung als Übersichtsfärbungen durchgeführt. Nach dem ersten Ausschluss von Proben, die auf Grund von beschädigtem Gewebe, nicht vorhandener oder zu geringer Verkalkung bzw. Einblutungen für die Untersuchung der Fragestellung ungeeignet waren, wurde zur endgültigen Auswahl der Proben noch eine Berliner-Blau Färbung durchgeführt. Die ausführliche Zusammensetzung der verwendeten Färbelösungen wird im Anhang erläutert.

Im Folgenden werden zunächst die Schritte beschrieben, die zur Entparaffinisierung und Rehydrierung zu Beginn bei allen drei Färbungen identisch durchgeführt wurden. Die Gewebeschnitte wurden dazu in ein Färbegestell mit einem Drahtbügel gestellt und wie im folgenden Protokoll dargestellt für bestimmte Zeiträume in die jeweiligen Küvetten eingebracht.

- 3 mal 5 Minuten in Xylol zur Entparaffinisierung
- Absteigende Alkoholreihe: 2 mal 2 Minuten in 100% Ethanol, 2 mal 2 Minuten 96% Ethanol, 2 Minuten 70% Ethanol, 2 Minuten 50% Ethanol zur Rehydrierung
- 5 Minuten in dH₂O

3.2.3.1 Alizarin S

Die Alizarin S Färbung dient der Darstellung mineralisierter Bereiche im Knochengewebe, sodass sich Hydroxylapatit auf den Gewebeschnitten in leuchtendem Rot anfärbt. Das nicht kalzifizierte Gewebe ist dabei in einem hellen rosa zu sehen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Färbung verwendet, um vaskuläre Kalzifizierung in Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques darzustellen.

Die Durchführung der Färbung erfolgte im Anschluss an die Entparaffinierung nach folgendem Protokoll:

- 2,5 Minuten in 0,5% Alizarinrot S
- 4 mal kurz in Aceton spülen
- 4 mal kurz in einem Aceton-Xylol Gemisch mit dem Mischverhältnis 1:1 spülen
- 2 mal 5 Minuten in Xylol
- Eindecken mit Eukit

3.2.3.2 Masson-Goldner-Trichrom

Die Masson-Goldner-Trichrom Färbung wurde nach dem modifizierten Färbeprotokoll durchgeführt und erlaubt die Darstellung von kollagenreichem Bindegewebe und verschiedenen Zelltypen. Dabei lassen sich Zellkerne in braun-schwarz, Muskelzellen in dunkelrot-schwarz, Erythrozyten in rot-pink, Kollagen und mineralisierter Knochen in grün und Osteoid in rot-orange identifizieren.

In dieser Arbeit war diese Färbung notwendig, um eine allgemeine Übersicht über das Gewebe der Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques zu gewinnen, sowie um Osteoid, glatte Muskelzellen und Erythrozyten zu visualisieren.

Zur Verbesserung des Färbeergebnisses durch Erhöhung der Gewebeempfindlichkeit wurden die Schnitte zunächst über Nacht bei Raumtemperatur in Bouins' Fixativ nachfixiert.

Anschließend wurde die Färbung nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- in Leitungswasser spülen bis die Gewebeschnitte klar aussehen
- 10 Minuten in Weigert's Iron Working Solution (zu gleichen Anteilen aus Lösung A und B frisch angesetzt) färben
- 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen
- 3 Minuten in Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin färben
- 15 Sekunden in 1% Essigsäure spülen

- 2,5 Minuten in Molybdätophosphorsäure-Orange differenzieren (mikroskopisch kontrollieren)
- 15 Sekunden in 1% Essigsäure spülen
- 7 Minuten in 0,15% Lichtgrün SF gegenfärben (mikroskopisch kontrollieren)
- 15 Sekunden in 1% Essigsäure spülen
- Aufsteigende Alkoholreihe: 2 mal 3 Minuten in 100% Ethanol zum Dehydrieren
- 2 mal 5 Minuten in Roticlear klären
- Eindecken mit Eukit

3.2.3.3 Berliner-Blau

Die Berliner-Blau Färbung erlaubt, im histologischen Präparat dreiwertige Eisenionen, Hämosiderin und Ferritin blau anzufärben. Das restliche Gewebe zeigt sich in hellrosa.

Diese Färbung wurde verwendet, um ältere Einblutungen auf den Gewebeschnitten von Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques auffindig zu machen.

Bei der Durchführung wurden alle Glasgefäße vor Benutzung mit 20% Salzsäure ausgespült und der Metallbügel des Färbegestells während der Färbung in der Potassium-Ferrocyanid Lösung abgenommen. Es wurde nach folgendem Protokoll gefärbt:

- 30 Minuten in Potassium-Ferrocyanid Lösung färben
- 15 Sekunden in dH₂O spülen
- 5 Minuten in Kernechrot-Aluminiumsulfat Lösung gegenfärben
- 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser differenzieren
- Aufsteigende Alkoholreihe: 2 mal 2 Minuten in 96% Ethanol, 2 mal 2 Minuten in 100% Ethanol dehydrieren
- 2 mal 5 Minuten in Histoclear klären
- Eindecken mit Eukit

3.2.4 Patientenauswahl

Zu Beginn standen für die Übersichtsfärbungen mittels Alizarin S und Masson-Goldner-Trichrom Gewebeproben aus 14 Aortenaneurysmata, 46 Aortenklappen und 9 Carotisplaques zur Verfügung. Nach Durchführung der beiden Färbungen wurden die histologischen Präparate mit dem Mikroskop *BX51* der Firma Olympus ausgewertet. Da mit Serienschnitten gearbeitet wurde, war es möglich, mit den beiden

Übersichtsfärbungen gezielt die Kolo-kalisation von kalzifizierten Arealen mit Erythrozyten, Osteoid und glatten Muskelzellen zu bestimmen. Die Digitalisierung der Stellen im histologischen Präparat wurde durch das Kamerasystem *MikroPublisher 5.0 RTV* von QImaging, Kanada, und der ImagePro 7.0 Software der Firma Media Cybernetics, USA, gewährleistet. So war es möglich, verschiedene Stellen (insbesondere die mit Verkalkung in der Alizarin S Färbung oder die mit Einblutung in der Masson-Goldner-Trichrom Färbung) in verschiedenen Vergrößerungen aufzunehmen und die entsprechende Stelle in der anderen Färbung auffindig zu machen. Anschließend erfolgte die erste Auswahl und Eingrenzung der Patientenproben, in der vor allem Patienten ausgewählt wurden, bei denen Einblutungen in der Nähe von kalzifizierten Arealen festzustellen waren. Einige Präparate mussten wegen schlechter Qualität und Brüchigkeit des Gewebes (aufgrund zu starker Verkalkung) ausscheiden, da eine Kolo-kalisation im Präparat so nicht nachzuweisen ist. Nach der ersten Auswahl von 6 Aortenaneurysmata, 16 Aortenklappen und 5 Carotisplaques wurde zur weiteren Eingrenzung noch eine Berliner-Blau Färbung durchgeführt, da die Präsenz des hier in blau dargestellten Hämosiderins ein weiterer Indikator für Einblutungen ist. So war es möglich eine endgültige Auswahl von insgesamt 17 geeignete Gewebeproben zu finden.

Dabei wurden 5 Gewebeproben aus Aortenaneurysmata ausgewählt (männlich n=4, weiblich n=0, unbekannt n=1). Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Entnahme betrug 77,5 Jahre, der durchschnittliche BMI lag bei 27,0 kg/m². Von den Gewebeproben aus Aortenklappen wurden 8 ausgewählt (männlich n=2, weiblich n=6). Hier lag das Durchschnittsalter bei 73 Jahren und der durchschnittliche BMI bei 30,9 kg/m². Zuletzt wurden 4 Proben aus Carotisplaques in die Arbeit eingeschlossen (männlich n=3, weiblich n=1). Es ergab sich ein durchschnittliches Alter von 72,3 Jahren. Bei dieser Patientengruppe wurde leider kein BMI erhoben. Die klinischen Daten der Patientenproben sind in *Tabelle 3.2-1* zusammengefasst.

	Aortenaneurysmata	Aortenklappen	Carotisplaques
Anzahl weiblich	0	6	1
Anzahl männlich	4	2	3
Geschlecht unbekannt	1	0	0
TOTAL	5	8	4
Durchschnittliches Alter (Jahre)	77,5	73,0	72,3
Durchschnittlicher BMI (kg/m²)	27,0	30,9	unbekannt

Tabelle 3.2-1 Klinische Daten der ausgewählten Patientenproben

3.2.5 Immunhistochemische Färbungen

Zur histologischen Darstellung von bestimmten im Gewebe erhaltenen Epitope dient die Immunhistochemie. Diese Methode beruht auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung und macht so eine Anfärbung bestimmter Merkmale in histologischen Präparaten möglich. In dieser Arbeit wurden die immunhistochemischen Färbungen dazu verwendet, um die Bedeutung von Erythrozyten für vaskuläre Kalzifizierung histologisch zu untersuchen. Die Kollokalisierung verschiedener Komponenten wurde auf Serienschnitten analysiert.

Dabei waren folgende Komponenten (Antigene) von Bedeutung: Erythrozytenmembranen (CD235a/Glykophorin A), Hämoglobin als Hauptproteinbestandteil von Erythrozyten, Methämoglobin (HBG2), Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger Rezeptor (CD163), Endothelzellen (CD31), Osteoblastenmarker (Osteopontin und Periostin), Myofibroblasten (SM alpha-Aktin), endotheliale NO-Synthase (eNOS), oxidativer Stress (Nitrotyrosin) und Arginase 1 (ARG1).

3.2.5.1 ABC-Methode

Bei der ABC-Methode bindet zunächst ein Primärantikörper an das immunhistochemisch anzufärbende Epitop. Danach werden die Schnitte mit einem Sekundärantikörper, auch Brückenantikörper genannt, inkubiert. Dieser ist biotinyliert und richtet sich gegen das Immunglobulin G (IgG) der Spezies, aus der der Primärantikörper stammt, sodass der Sekundärantikörper an dessen F_c Region („*fragment crystallisable*“ Region) bindet. Anschließend macht man sich die hohe Affinität des Hühnereiweißproteins Avidin zu Biotin zu Nutze (Dissoziationskonstante 10⁻¹⁵ mol/l). Dazu wird der sogenannte Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Komplex)

angelagert. Dieser besteht aus Avidin, welches vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, und einem Markerenzym, in diesem Fall der Meerrettichperoxidase. Avidin bindet mit hoher Affinität mit drei seiner vier Bindungsstellen an die Biotinmoleküle des Sekundärantikörpers und fungiert so als Brücke zwischen dem biotinylierten Sekundärantikörper und der Peroxidase. Im letzten Schritt setzt die Peroxidase dann ein zugegebenes Chromogen, wie zum Beispiel Aminoethylcarbazol (AEC) um, sodass im Präparat ein rot gefärbtes positives Signal am durch den Antikörper detektierten Epitop sichtbar wird.

3.2.5.2 Spezifität und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Spezifität und zum Erlangen eines guten Signal-Hintergrund-Verhältnisses wurden die verschiedenen Antikörper und ihre optimale Verdünnung vorher auf Kontrollgewebe mit bekannter Expression des Epitops getestet. Außerdem wurde bei jeder Färbung Kontrollgewebe mit bekannter Expression des Epitops als Positivkontrolle mitgeführt. Zugleich wurde auch eine negative Kontrolle mitgefärbt, bei der an Stelle des Primärantikörpers nur das Verdünnungsmittel auf das Gewebe aufgetragen wurde (siehe *Abbildung 8.2-1* im Anhang). Um eine unspezifische Umsetzung des Chromogens durch endogene Peroxidaseaktivität zu vermeiden, wurden die Gewebeschnitte in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung (in Methanol) inkubiert, um auf diese Weise die gewebeeigene Peroxidase zu verbrauchen und zu inaktivieren. Außerdem wurde eine Avidin-Biotin-Blockade durchgeführt, da auch endogenes Biotin zu unspezifischen Bindungen und Hintergrundreaktionen führen kann. Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurden die Gewebeschnitte mit sog. Normalserum, das aus der gleichen Spezies wie der Sekundärantikörper stammte, behandelt. **Standardprotokoll:**

Bei allen immunhistochemischen Färbungen wurde die Entparaffinisierung und Blockade der endogenen Peroxidase nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 3 mal 5 Minuten in Xylol entparaffinisieren
- 2 mal 2 Minuten in 100% Ethanol entparaffinisieren
- 10 Minuten in 3% H₂O₂ zur Blockade der endogenen Peroxidase
- 2 mal 2 Minuten in 96% Ethanol, 2 Minuten in 70% Ethanol, 2 Minuten in 50% Ethanol wässern
- 5 Minuten in dH₂O spülen

Anschließend wurden die Gewebeschnitte in 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0) oder in 0,01 mM Tris/EDTA-Puffer (pH 9,0) für 11 Minuten bei 800 Watt in einer Mikrowelle gekocht. Dieser Schritt wird als „*heat induced epitop retrieval*“ (HIER) bezeichnet und dient einer hitzeinduzierten Antigendemaskierung, sodass die Antikörper auch Epitope, die zuvor zum Beispiel durch Aldehydvernetzungen maskiert waren, erkennen können. Danach wurden die Gewebeschnitte für weitere 20 Minuten zum Abkühlen im Puffer stehen gelassen. Da sich auf jedem Objektträger mehrere Schnitte des Gewebes befanden und daher zwei unterschiedliche immunhistochemische Färbungen zugleich auf einem Objektträger durchgeführt wurden, wurden die einzelnen Schnitte mit einer hydrophoben Barriere umkreist, sodass es zu keiner Vermischung, insbesondere der Antikörper kommen konnte. Dazu wurde der Roti-Liquid Barrier der Firma Roth verwendet. Bei manchen Primärantikörpern war eine Permeabilisierung des Gewebes durch 0,05% Triton-X100 für 10 Minuten bei 37°C nötig (siehe *Tabelle 3.2-2*). Zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen des Sekundärantikörpers wurden die Gewebeschnitte nun 30 Minuten mit Normalserum der Ziege behandelt, da aus dieser Spezies auch die verwendeten Sekundärantikörper gewonnen wurden. Zum Abschluss des ersten Tages der Färbung wurde nun der Primärantikörper in seiner entsprechenden Verdünnung (siehe *Tabelle 3.2-2*) auf die Schnitte gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Der Ablauf des zweiten Teils der immunhistochemischen Färbung wurde durch folgendes Protokoll festgelegt:

- 3 mal 5 Minuten mit 1X PBS waschen
- 60 Minuten Inkubation des entsprechenden Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur
- 3 mal 5 Minuten mit 1X PBS waschen
- 30 Minuten Inkubation mit VectaStain ABC-Kit Elite
- 3 mal 5 Minuten mit 1X PBS waschen
- Chromogen (AEC-Kit oder Nova Red, siehe Tabelle) auf die Schnitte geben und Farbentwicklung des Signals, insbesondere der Positivkontrolle, unter dem Mikroskop kontrollieren (5-20 Minuten)
- 5 Minuten in dH₂O waschen zum Abstoppen der Peroxidasereaktion
- Gegenfärben mit Gills Hämatoxylin
- 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
- 5 Minuten in dH₂O waschen

- Eindecken mit ImmuMount

Name	Marker	Firma, Bestellnummer	Herkunft	Verdünnung	Reaktivität
Arginase 1	Arginase 1	Santa Cruz Biotechnologie, sc-166920	Mouse, monoklonal	1:100	Anti-human
CD31 (Pentacam-1)	Endothelzellen	Dako, M 082301-2	Mouse, monoklonal	1:50	Anti-human
CD163	Makrophagen mit NO- Scavenger- Rezeptor	Abcam, ab111250	Mouse, monoklonal	1:25	Anti- human/rabbit
CD235a/Glykophorin A	Glykophorin A in Erythrozytenmembranen	DAKO, M 0819	Mouse, monoklonal	1:200	Anti-human
eNOS	eNOS	Novusbio., NB 300-500	Rabbit, polyklonal	1:50	Anti- mouse/human
Hämoglobin	Hämoglobin	Abcam 191183	Rabbit, monoklonal	1:250	Anti-human
Methämoglobin	Oxidiertes Hämoglobin (Inaktivierung als NO- Scavenger)	Biozol, LS- C472429/120955	Rat, monoklonal (biotinyliert)	1:20	Anti-human
Nitrotyrosin	Oxidativer Stress	Millipore #06-284	Rabbit, polyklonal	1:250	Anti- mouse/human
Osteopontin	Osteoblasten	Abcam 8448	Rabbit, polyklonal	1:500	Anti- mouse/human
Periostin	Extrazelluläres Matrixprotein (von Osteoblasten sezerniert)	PA5-34641	Rabbit, polyklonal	1:50	Anti- mouse/human
SM alpha-Aktin (clone1A4)	Glatte Muskelzellen	Sigma, A 2547	Mouse, monoklonal	1:500	Anti- mouse/human

Name	Sekundärantikörper	Positivkontrolle	Objekt-träger	Puffer	0,05% Triton-X100	Chromogen
<i>Arginase 1</i>	Biotin- goat- anti- mouse	Humane Leber	OT10	0,01 M Citrat- Puffer (pH 6,0)	-	Nova Red
<i>CD31 (Pentacam-1)</i>	Biotin- goat- anti- mouse	Humane Niere	OT7	10mM Tris, 1nM EDTA (pH 9,0)	ja	AEC-Kit
<i>CD163</i>	Biotin- goat- anti- mouse	Humane Leber	OT9	0,01 M Citrat- Puffer (pH 6,0)	-	AEC-Kit
<i>CD235a/Glykophorin A</i>	Biotin- goat- anti- mouse	Humane Lunge, Niere	OT3	0,01 M Citrat- Puffer (pH 6,0)	-	AEC-Kit
<i>eNOS</i>	Biotin- goat- anti- rabbit	Multiblock 2 (Leber, Milz, Thymus, Darm, Niere, Lunge)	OT4	0,01 M Citrat- Puffer (pH 6,0)	-	Nova Red
<i>Hämoglobin</i>	Biotin- goat- anti- rabbit	Humane Niere	OT3	0,01 M Citrat- Puffer (pH 6,0)	-	AEC-Kit
<i>Methämoglobin</i>	-	Humane Lunge	OT7	10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 9,0)	-	AEC-Kit
<i>Nitrotyrosin</i>	Biotin- goat- anti- rabbit	Multiblock 1 (Leber, Darm, Niere, Blase,	OT9	0,01 M Citrat- Puffer (pH 6,0)	-	AEC-Kit
<i>Osteopontin</i>	Biotin- goat- anti- rabbit	Muriner Knochen, unentkalkt	OT6	0,01 M Citrat- Puffer (pH 6,0)	-	AEC-Kit
<i>Periostin</i>	Biotin- goat- anti- rabbit	Muriner Knochen, unentkalkt	OT6	0,01 M Citrat- Puffer (pH 6,0)	ja	Nova Red
<i>SM alpha-Aktin (clone1A4)</i>	Biotin- goat- anti- mouse	Humane Arterie (Media)	OT10	0,01 M Citrat- Puffer (pH 6,0)	-	AEC-Kit

Tabelle 3.2-2 Primärantikörper der immunhistochemischen Färbungen

3.2.6 Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen

Zur Darstellung der histologischen Präparate wurde das Mikroskop BX51 der Firma Olympus verwendet. Dabei wurden Bilder mit der Digitalkamera MicroPublisher 5.0 RTV der Firma QImaging, Kanada, und mit Hilfe der Software Image Pro Plus 7.0 der Firma Media Cybernetics Inc. aufgenommen. Zur statistischen Analyse und

graphischen Darstellung der Auswertung wurde das Programm Graph Pad Prism 7.0 verwendet.

3.2.6.1 Auswertung der histologischen Färbungen

Zu einer quantitativen Bewertung der Übersichtsfärbungen Alizarin S, Masson-Goldner-Trichrom und Berliner-Blau wurden die einzelnen histologischen Präparate unter dem Mikroskop komplett durchmustert und wie folgt analysiert. Dabei wurde das Ausmaß der Präsenz von zuvor definierten Strukturen bewertet, d.h. wie häufig sie im histologischen Präparat angefärbt waren. Insbesondere wurde das Ausmaß der Kalzifizierungen in der Alizarin S Färbung, die Häufigkeit von Erythrozyten, Myofibroblasten und Osteoid in der Masson-Goldner-Trichrom Färbung und die Häufigkeit von blau angefärbten eisenhaltigen Strukturen in der Berliner-Blau Färbung in die Kategorien negativ (nicht aufzufinden), schwach (+), mittelmäßig (++) und stark (+++) eingeteilt. Die prozentuale Verteilung dieser Kategorien wurde graphisch mit Hilfe von Graph Pad Prism 7.0 dargestellt. Zur Nachvollziehbarkeit dieser Einteilung wurden außerdem repräsentative Bilder gemacht. Für die Alizarin S Färbung wurden repräsentative Schnitte der einzelnen Kategorien zusätzlich mit einer Spiegelreflexkamera (Firma; privat) aufgenommen, sodass neben dem mikroskopischen auch ein makroskopischer Eindruck über die Kalzifizierung in Bezug auf die Gesamtfläche gewonnen werden konnte. Außerdem wurde der prozentuale Anteil kalzifizierter Areale von der Gesamtfläche der Gewebeschnitte ebenfalls mit Hilfe des Programms Image Pro Plus 7.0 ausgemessen und berechnet.

3.2.6.2 Auswertung der Kolo-kalisation verschiedener Komponenten auf Serienschnitten

Zur Bestimmung der Kolo-kalisation der verschiedenen Komponenten auf Serienschnitten, die für den Nachweis des Zusammenhangs zwischen Erythrozyten und vaskulärer Kalzifizierung von Bedeutung sind, wurde folgendermaßen vorgegangen:

Um keine relevanten Informationen und Zusammenhänge zu übersehen, wurden zunächst alle Stellen fotografiert, an denen entweder Erythrozytenbestandteile, wie zum Beispiel Erythrozytenmembranen oder Hämoglobin, oder Marker für vaskuläre Kalzifizierung, wie zum Beispiel Alizarin S, Osteopontin oder Periostin, angefärbt waren. Anschließend wurde zu diesen Bildern die entsprechende Stelle in den anderen Färbungen gesucht und ebenfalls fotografiert. Danach wurden für interessante Stellen verschiedener Konstellationen weitere Aufnahmen anderer Färbungen

gemacht. Die quantitative Analyse unterschiedlicher Konstellationen erfolgte durch Auszählen der analysierten Stellen und wurde graphisch mit Hilfe von Graph Pad Prism 7.0 dargestellt.

3.2.7 Statistische Auswertung

Um den Zusammenhang zwischen zwei verschiedenen Variablen statistisch zu prüfen, wurde der Chi-Quadrat Test verwendet. Dieses Testverfahren dient dazu, zwei nominalskalierte Merkmale auf ihre stochastische Unabhängigkeit zu prüfen. Dabei sollten die Häufigkeiten jeder Kategorie >5 sein. War dies nicht der Fall wurde der Exakte Test nach Fisher verwendet. Das Signifikanzniveau lag dabei bei 5% ($p \leq 0,05$).

4 Ergebnisse

4.1 Histologische Übersichtsfärbungen und Auswahl der Gewebeproben

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die drei Übersichtsfärbungen Alizarin S, Masson-Goldner-Trichrom und Berliner-Blau durchgeführt, um die unterschiedlichen Gewebeproben auf ihre Qualität und Eignung für diese Arbeit zu prüfen. Im ersten Schritt wurden die Schnitte in jeder der drei Färbungen komplett mikroskopisch durchmustert und anschließend klassifiziert. Technisch oder qualitativ ungeeignete Proben wurden von der weiteren Analyse und Auswertung ausgeschlossen. Darunter fielen durch eine starke Verkalkung sehr brüchige Schnitte, auf denen die Analyse von Kolo-kalisationen kaum möglich war. Außerdem wurden Schnitte ohne Einblutungen als für die Beantwortung der speziellen Fragestellung dieser Arbeit als ungeeignet aussortiert. Auch sehr zellarme Schnitte wurden ausgeschlossen, da es hier in der weiteren Analyse nur schwer möglich gewesen wäre, zelluläre Mechanismen im frühen Stadium vaskulärer Kalzifizierung immunhistochemisch sichtbar zu machen. Letztendlich wurden 5 Aortenaneurysmata, 8 Aortenklappen und 4 Carotisplaques für den weiteren Verlauf dieser Arbeit ausgewählt. Eine graphische Darstellung über den Ablauf der Auswahl dieser Patientenproben ist in *Abbildung 4.1-1* gezeigt.

Übersichtsfärbungen Alizarin S und Masson-Goldner-Trichrom:

- 14 Aortenaneurysmata
- 46 Aortenklappen
- 9 Carotisplaques

Insgesamt: 69 Gewebeproben



1. Auswahl und Eingrenzung

-42 Gewebeproben

Begründung: schlechte Qualität der Schnitte, Zellarmut, Brüchigkeit, Abwesenheit von Intraplaquehämorrhagien und/oder Verkalkung

Berliner Blau Färbung zur Darstellung von Hämosiderin als

Indikator für Intraplaquehämorrhagien

- 6 Aortenaneurysmata
- 16 Aortenklappen
- 5 Carotisplaques

Insgesamt: 27 Gewebeproben



2. Auswahl und Eingrenzung

-10 Gewebeproben

Begründung: mangelnde Anfärbung von Hämosiderin als Indikator für Intraplaquehämorrhagien

Endgültige Auswahl:

- 5 Aortenaneurysmata
- 8 Aortenklappen
- 4 Carotisplaques

Insgesamt: 17 Gewebeproben

Abbildung 4.1-1 Auswahl der in der Arbeit verwendeten Gewebeproben

Schematische Darstellung der Schritte zur Auswahl der für die Arbeit geeigneten Gewebeproben aus Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques.

4.1.1 Anfärbung von Kalzifizierung mittels Alizarin S

Die Gewebeschnitte aus 14 Aortenaneurysmata, 46 Aortenklappen und 9 Carotisplaques wurden zunächst in der Alizarin S Färbung komplett durchmustert. Dabei wurde das Ausmaß der rot angefärbten verkalkten Areale klassifiziert. Gewebeschnitte, auf denen kein Hydroxylapatit in rot angefärbt war, wurden als Alizarin S negativ bezeichnet. Verkalkung, die nur mikroskopisch, jedoch nicht makroskopisch zu sehen war, wurde als schwach (+) bewertet. Mit einem mittelmäßigen (++) Grad an Verkalkung wurden Schnitte bewertet, an denen auch kleine Hydroxylapatit-reiche Areale makroskopisch sichtbar waren. Großflächige makroskopisch sichtbare Verkalkung wurde als stark (+++) klassifiziert. Beispielhafte Bilder mit der entsprechenden prozentualen Berechnung des Alizarin S-positiven Flächenanteils sind in *Abbildung 4.1-2* gezeigt.

In der detaillierten Verteilung zeigte sich, dass unter den 14 Aortenaneurysmata 4 Patientenproben Alizarin S negativ (28,6%), 2 schwach (+) (14,3%), 6 mittelmäßig (++) (42,9%) und 2 stark (+++) (14,3%) verkalkt waren. Von den 46 durchmusterten Proben aus Aortenklappen stellten sich 16 als Alizarin S negativ (34,8%), 9 als schwach (+) (19,6%), 12 als mittelmäßig (++) (26,1%) und 9 als stark (+++) (19,6%) kalzifiziert dar. Am meisten Hydroxylapatit-reiche Areale zeigten die Carotisplaques. Hier gab es keinen Schnitt, der Alizarin S negativ war. Die Verkalkung wurde auf 2 der 9 gefärbten Schnitte (22,2%) als schwach (+), auf 3 Schnitten (33,3%) als mittelmäßig (++) und auf 4 Schnitten (44,4%) als stark (+++) klassifiziert. Die prozentuale Verteilung des Grades an Kalzifizierung unter den drei Gefäßerkrankungen und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) wird in *Abbildung 4.1-3* graphisch dargestellt.

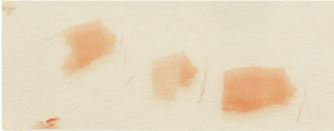

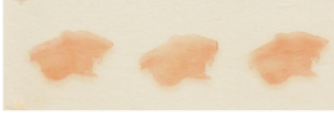

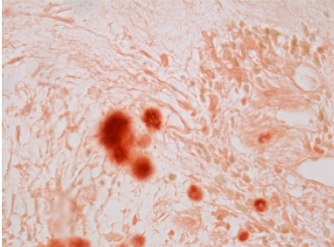


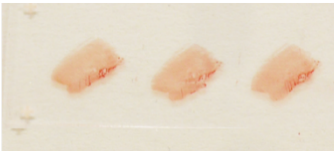
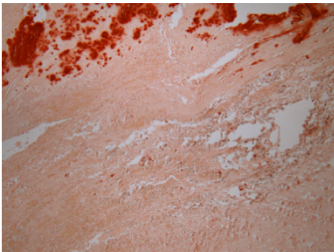
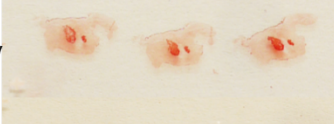
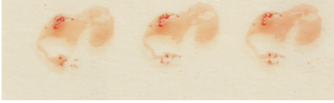
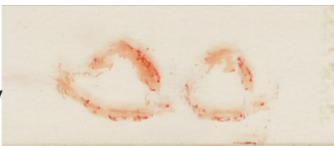
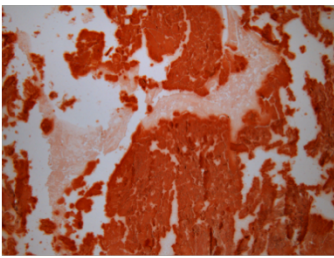
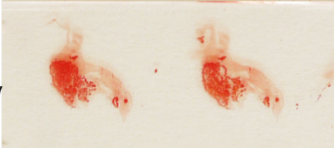
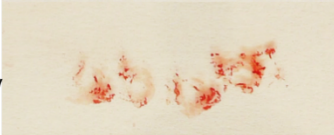
	Makroskopisch	Mikroskopisch
negativ		
Aortenaneurysma 0,00% Alizarin positiv		
Aortenklappe 0,00% Alizarin positiv		
+		100fache Vergrößerung
Aortenaneurysma 0,41% Alizarin positiv		
Aortenklappe 0,78% Alizarin positiv		
Carotisplaque 2,90% Alizarin positiv		1000fache Vergrößerung
++		
Aortenaneurysma 4,54% Alizarin positiv		
Aortenklappe 10,71% Alizarin positiv		100fache Vergrößerung
Carotisplaque 9,45% Alizarin positiv		
+++		
Aortenaneurysma 24,64% Alizarin positiv		
Aortenklappe 34,71% Alizarin positiv		100fache Vergrößerung
Carotisplaque 33,94% Alizarin positiv		

Abbildung 4.1-2 Klassifizierung der Alizarin S Färbung

Repräsentative Beispiele der makro- und mikroskopischen Bewertung des Grades der Kalzifizierung in negativ, schwach (+), mittelmäßig (++) und stark (+++); Anfärbung kalzifizierter Arealen in rot; Analyse des prozentualen Anteils der kalzifizierten Arealen von der Gesamtfläche des Gewebes (in %) mit Hilfe von ImageProPlus 7.

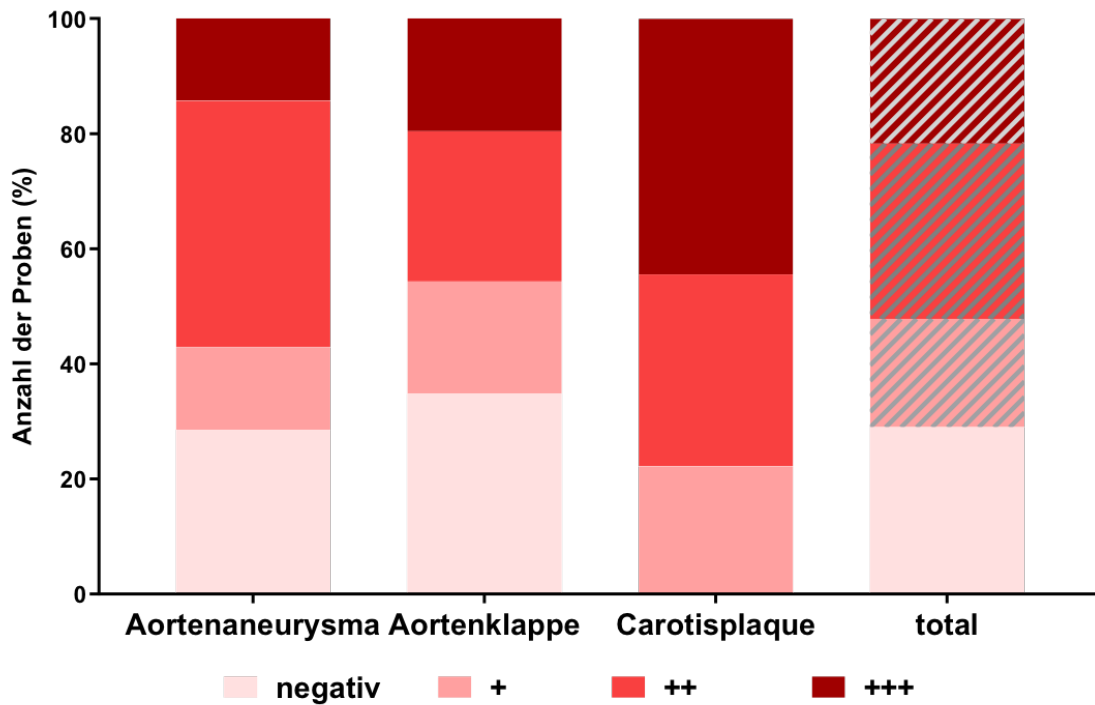


Abbildung 4.1-3 Auswertung der Alizarin S Färbung

Anteil der nicht kalzifizierten (negativ), schwach + (Kalzifizierung makroskopisch: nicht beurteilbar, mikroskopisch: kalzifizierte Areale), mittelmäßig ++ (Kalzifizierung makroskopisch: kleinere kalzifizierte Areale) und stark +++ (Kalzifizierung makroskopisch: großflächige kalzifizierte Areale) kalzifizierten Proben von der Gesamtheit der gefärbten Proben (in %). Unterscheidung zwischen Aortenaneurysmata (n=14), Aortenklappen (n=46), Carotisplaques (n=9) und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) (n=69).

4.1.2 Übersichtsfärbung nach Masson-Goldner-Trichrom

Die Masson-Goldner-Trichrom Färbung erlaubt bei der Durchmusterung der histologischen Präparate die simultane Quantifizierung des Gehaltes an Erythrozyten (rot-pink), Myofibroblasten (rot-schwarz) und Osteoid (rot-orange). Färbebeispiele hierzu sind in *Abbildung 4.1-4* zu sehen. Auch bei dieser Färbung wurde zwischen negativ, schwach (+), mittelmäßig (++) und stark (+++) positiv unterschieden. Beispielhafte Bilder zur Nachvollziehbarkeit dieser Klassifizierung sind in *Abbildung 4.1-5* gezeigt.

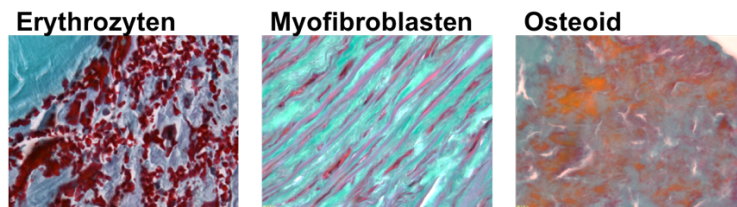


Abbildung 4.1-4 Färbebeispiele nach Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Repräsentative Beispiele der Darstellung von Erythrozyten, Myofibroblasten und Osteoid in der Masson-Goldner-Trichrom Färbung, 1000fache Vergrößerung.

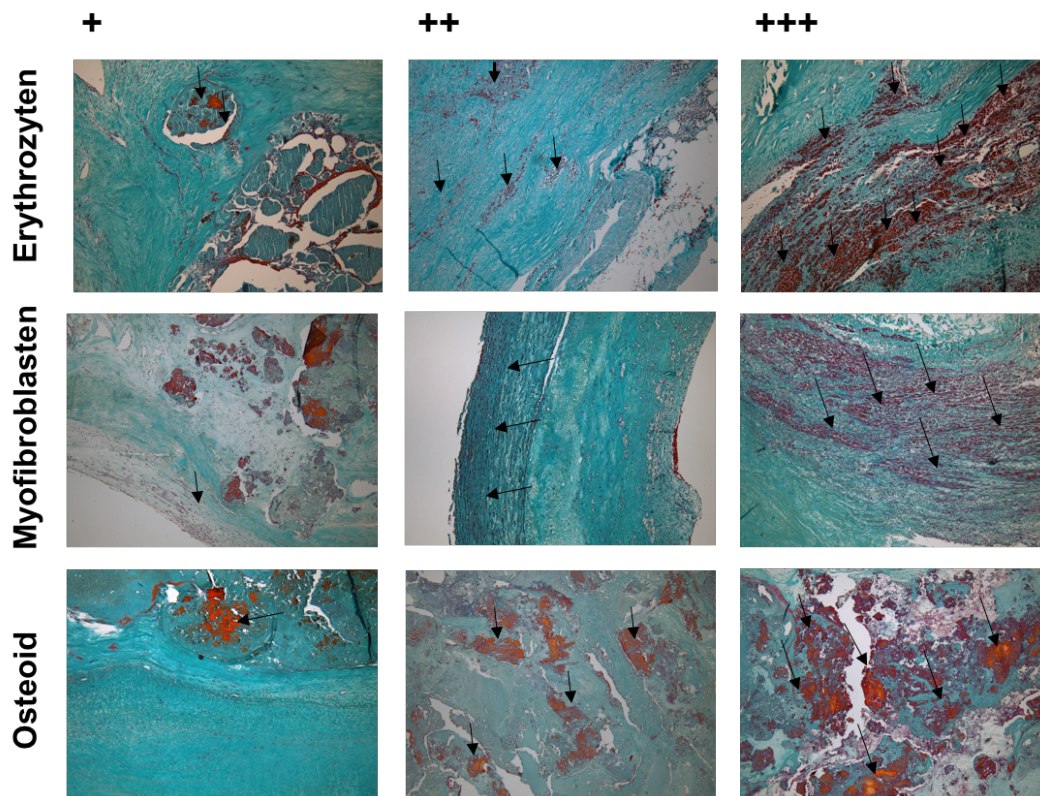


Abbildung 4.1-5 Klassifizierung der Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Repräsentative Beispiele der Bewertung des Grades der Darstellung von Erythrozyten, Myofibroblasten und Osteoid in schwach (+), mittelmäßig (++) und stark (+++); Darstellung von Erythrozyten in rot/pink, von Myofibroblasten in rot/schwarz/gewellt) und von Osteoid in rot/orange, 200fache Vergrößerung.

Im Detail zeigte sich: In den 14 analysierten Aortenaneurysmata waren auf 2 Schnitten (14,3%) keine Einblutung, auf 4 (28,6%) schwache (+), auf 6 (42,9%) mittelmäßige (++) und auf 2 (14,3%) starke (+++) Einblutungen zu sehen. Weniger häufig waren Erythrozyten bei Durchmusterung von Aortenklappen zu sehen. Hier waren auf 12 von 46 gefärbten Schnitten (26,1%) keine Erythrozyten zu erkennen und auf 26 Schnitten

(56,5%) schwache (+), auf 8 Schnitten (17,4%) mittelmäßige (++) und auf keinem der Schnitte starke (+++) Einblutungen sichtbar. Unter den 9 durchmusterten Schnitten aus Carotisplaques wurde der Erythrozytengehalt auf einem Schnitt (11,1%) als negativ, auf 3 Schnitten (33,3%) als schwach (+), auf 5 (55,6%) als mittelmäßig (++) und auf keinem als stark (+++) klassifiziert.

Als nächstes wurde der durch diese Färbung identifizierte Gehalt an glatten Muskelzellen klassifiziert. Bei den Aortenaneurysmata wurde dieser auf 7 Schnitten (50,0%) als negativ, auf 6 Schnitten (42,9%) als schwach (+), auf einem Schnitt (7,1%) als mittelmäßig (++) und auf keinem der Schnitte als stark (+++) eingeteilt. In Aortenklappen war die Präsenz von glatten Muskelzellen auf 24 von 46 Schnitten (52,2%) negativ, auf 19 (41,3%) schwach (+), auf 2 (4,4%) mittelmäßig (++) und auf einem (2,2%) stark. Bei Durchmusterung der Carotisplaques wurden 5 der 9 Schnitte (55,6%) als negativ klassifiziert, ein Schnitt (11,1%) als schwach (+), 3 Schnitte (33,3%) als mittelmäßig (++) und keiner der Schnitte als stark (+++). Bei dieser Analyse zeigte sich, dass es bezüglich der glatten Muskelzellen keine größeren Unterschiede zwischen den drei Gefäßerkrankungen gab.

Zuletzt wurde auch der Osteoidgehalt quantifiziert. Dieser zeigte sich unter den 14 gefärbten Schnitten aus Aortenaneurysmata auf 7 Schnitten (50,0%) als negativ, auf 4 Schnitten (28,6%) als schwach (+), auf 2 Schnitten (14,3%) als mittelmäßig (++) und auf einem Schnitt (7,1%) als stark (+++). Am stärksten war die Präsenz von Osteoid unter den 46 Aortenklappen. Hier waren nur 3 Schnitte (6,5%) negativ, 12 Schnitte (26,1%) wurden als schwach (+), 28 Schnitte (66,7%) als mittelmäßig (++) und 3 Schnitte (7,1%) als stark (+++) an Osteoid beurteilt. Zusätzlich zeigten sich die Aortenklappen in Bereichen des Osteoids mit einer großflächigen zellarmen roten Matrix. Die prozentuale Verteilung dieser Klassifizierung aller drei Spezies und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) wird in *Abbildung 4.1-6* graphisch gezeigt.

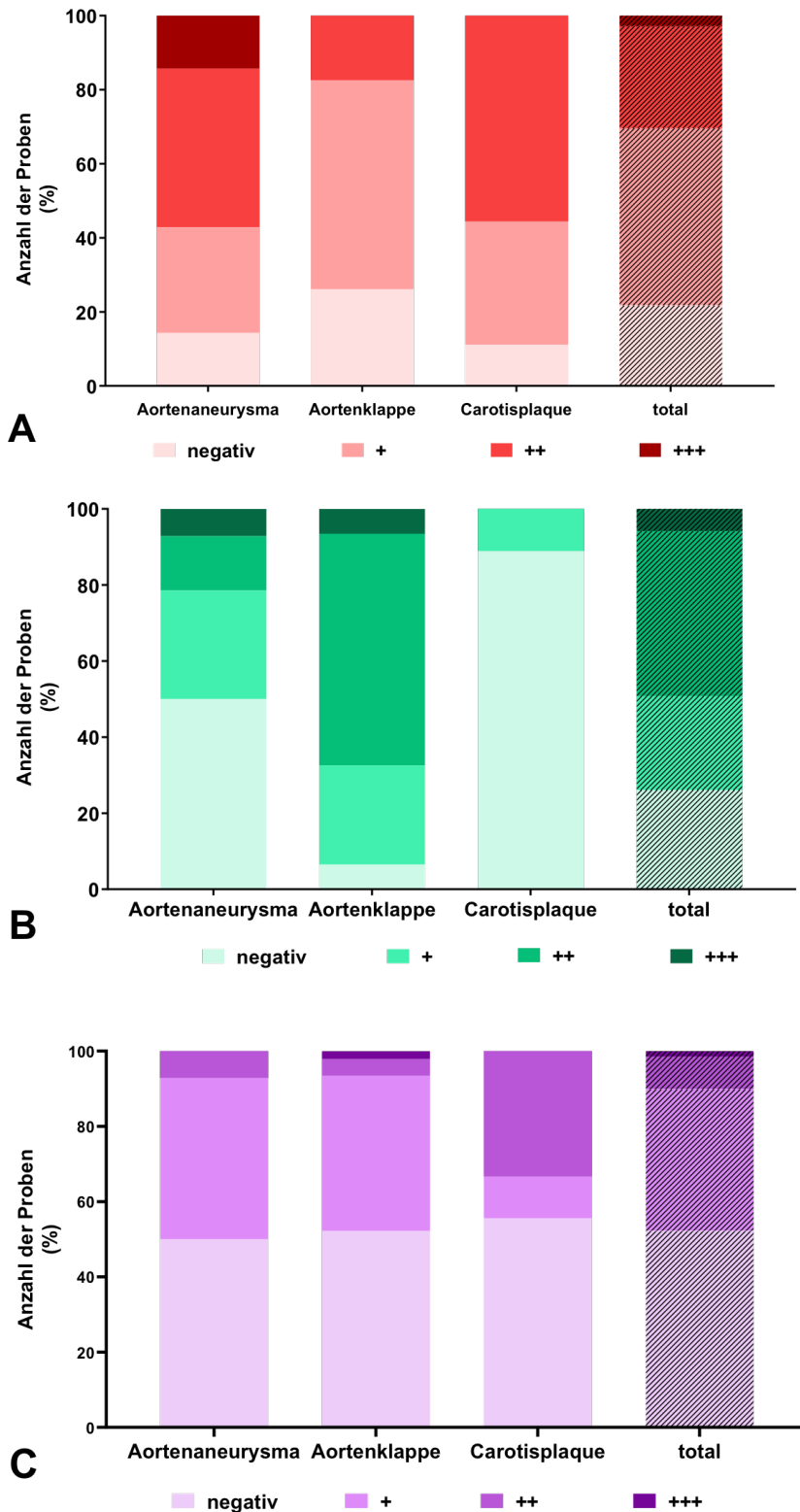


Abbildung 4.1-6 Auswertung der Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Anteil der Proben mit fehlender (negativ, hellster Farbton), schwacher (+, heller Farbton), mittelmäßiger (++, mittlerer Farbton) und starker (+++, dunkler Farbton) Darstellung von **Erythrozyten (A)**, **Osteoid (B)** und **Myofibroblasten (C)** im Gewebe von der Gesamtheit der gefärbten Proben (in %).

Unterscheidung zwischen Aortenaneurysmata (n=14), Aortenklappen (n=46), Carotisplaques (n=9) und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) (n=69).

4.1.3 Nachweis von Eisen und Hämosiderin mittels Berliner-Blau Färbung

Die in die engere Auswahl genommenen Gewebeproben wurden anschließend noch einer Berliner-Blau Färbung unterzogen. Diese Färbung sollte dabei helfen, auf den Gewebeschnitten Einblutungen sichtbar zu machen, da sie freies Eisen und Hämosiderin anfärbt, das im Rahmen einer Hämolyse frei wird. Bei der Auswertung wurden die Schnitte erneut durchmustert und als negativ, schwach (+), mittelmäßig (++) und stark (+++) klassifiziert. Beispielhafte Bilder zu dieser Einteilung sind in *Abbildung 4.1-7* gezeigt.

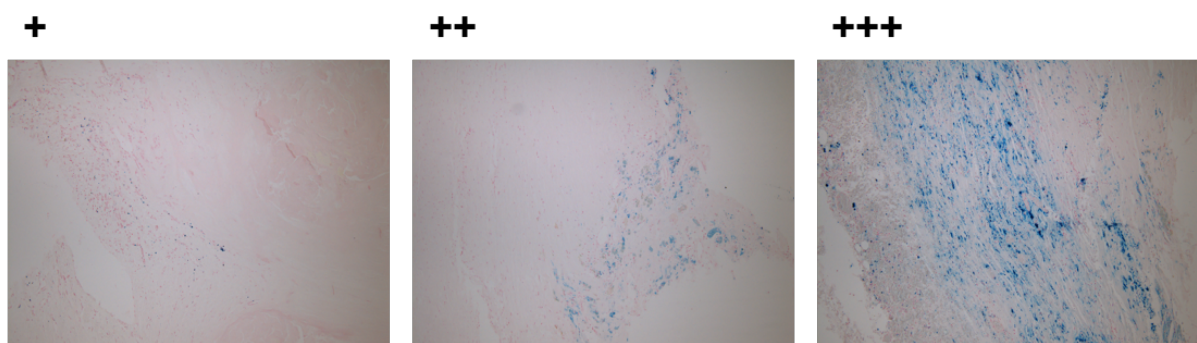


Abbildung 4.1-7 Färbebeispiele nach Berliner-Blau Färbung

Repräsentative Beispiele der Bewertung des Grades der Darstellung von Siderophagen in schwach (+), mittelmäßig (++) und stark (+++); Darstellung von Hämosiderin/Eisen in blau, 200fache Vergrößerung.

Allgemein war das Vorkommen von positiven blauen Signalen eher selten. In den Aortenaneurysmata, wo auch die Präsenz von Erythrozyten in der Masson-Goldner-Trichrom Färbung am größten war, wurde am meisten Hämosiderin/Eisen angefärbt. Von den 6 gefärbten Aortenaneurysmata war nur ein Schnitt (16,7%) Berliner-Blau negativ. 2 der 6 Schnitte (33,3%) zeigten einen schwachen (+), 2 (33,3%) einen mittelmäßigen (++) und ein Schnitt (16,7%) einen starken (+++) Gehalt an angefärbtem Eisen. Unter den 16 gefärbten Aortenklappen befanden sich 12 Schnitte (75,0%) ohne positives Eisensignal, wohingegen 3 Schnitte (18,8%) in die Kategorie schwach (+), einer (6,3%) in die Kategorie mittelmäßig (++) und keiner in die Kategorie stark (+++) eingeteilt wurden. Von den 5 Gewebeschnitten aus Carotisplaques war nur auf einem (20,0%) ein mittelmäßiger (++) Gehalt an angefärbtem Eisen zu sehen. Der Rest (80,0%) zeigte sich negativ. Eine graphische Darstellung der prozentualen Verteilung unter den verschiedenen Spezies und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) ist in *Abbildung 4.1-8* zu sehen.

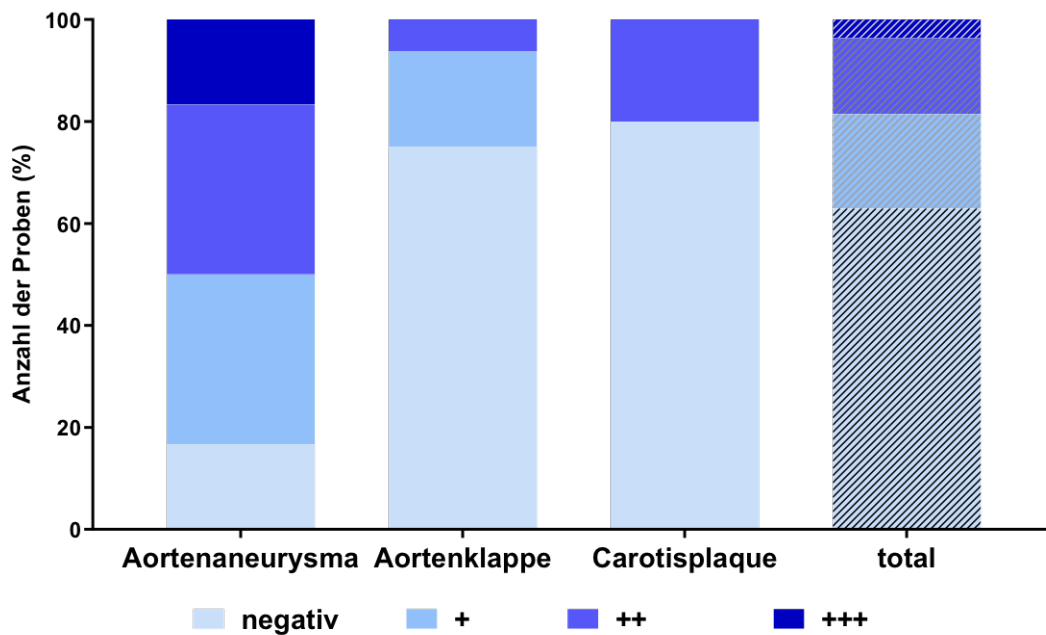


Abbildung 4.1-8 Auswertung der Berliner-Blau Färbung

Anteil der Proben mit fehlender (negativ), schwacher (+), mittelmäßiger (++) und starker (+++) Anfärbung von Siderophagen (Eisen eliminierende Makrophagen, Indikator für Einblutungen) von der Gesamtheit der gefärbten Proben.

Unterscheidung zwischen Aortenaneurysmata (n=6), Aortenklappen (n=16), Carotisplaques (n=5) und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) (n=27).

4.2 Bedeutung von Erythrozyten für vaskuläre Kalzifizierung

4.2.1 Vorkommen von Erythrozyten in humanen atherosklerotischen Läsionen

4.2.1.1 Extravasation von Erythrozyten

In humanen atherosklerotischen Läsionen wurden Erythrozyten zunächst mit Hilfe der Masson-Goldner-Trichrom Färbung, welche Erythrozyten in rot-pink anfärbt, und immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Glykophorin A (CD235a), ein Membranprotein von Erythrozyten, markiert. Kleinere Gefäße innerhalb des Plaques konnten durch die immunhistochemische Anfärbung von Endothelzellen (CD31) dargestellt werden. Daher war es möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob sich die im Plaque befindlichen Erythrozyten innerhalb oder außerhalb von Blutgefäßen befanden. Dabei waren in den Aortenaneurysmata an 16 von 19 analysierten Stellen (84,2%), in den Aortenklappen an 10 von 12 analysierten Stellen (83,3%) und in den Carotisplaques an 10 von 11 analysierten Stellen (90,9%) Erythrozyten auch extravasal, d.h. außerhalb von Blutgefäßen, zu finden. Beispielhafte Bilder für dieses Phänomen sind in *Abbildung 4.2.1* und die Verteilung in *Tabelle 4.2.1* gezeigt.

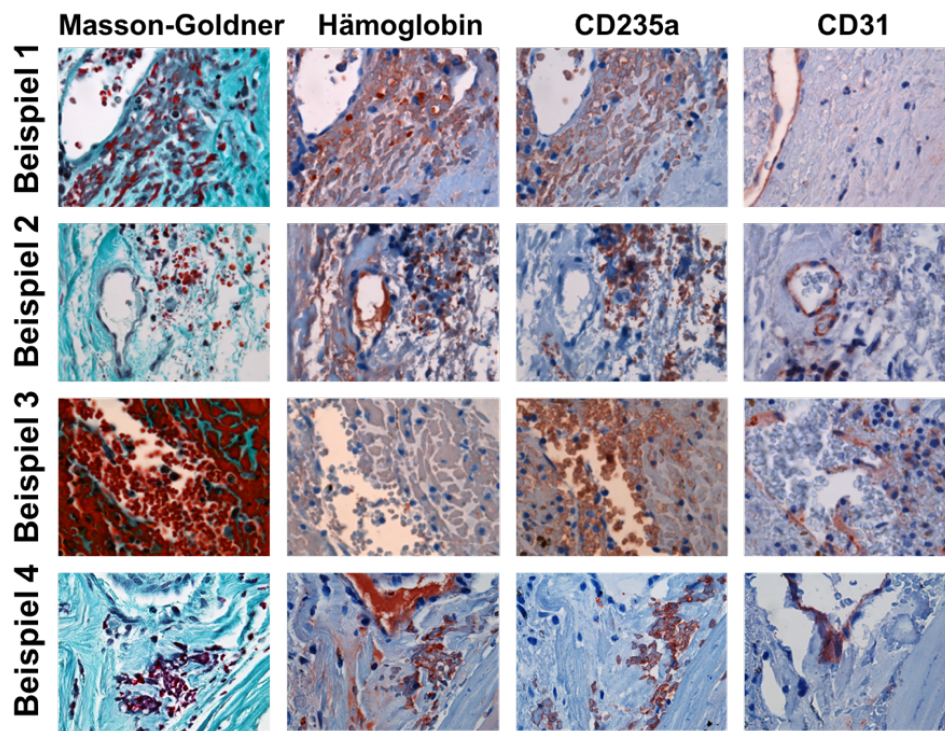


Abbildung 4.2-1 Extravasation von Erythrozyten in Gefäßläsionen

Nachweis des Austritts von Erythrozyten aus Gefäßen in Gefäßläsionen (repräsentative Beispiele aus Aortenaneurysmata) anhand der Kolo-kalisation verschiedener Komponenten auf Serienschnitten. 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte Färbungen:

Masson-Goldner-Trichrom Färbung zur Darstellung von Erythrozyten in rot/pink, Immunhistochemie von Hämoglobin zur Darstellung des Hauptproteinanteils von Erythrozyten (Signal in rot), Immunhistochemie von CD235a zur Darstellung von Erythrozytenmembranen (Signal in rot) und Immunhistochemie von CD31 zur Darstellung des Endothels von Gefäßen (Signal in rot).

	Stellen mit extravasal gelegenen Erythrozyten	Gesamtheit der Stellen mit Erythrozyten	%
Aortenaneurysmata	16	19	84,2
Aortenklappen	10	12	83,3
Carotisplaques	10	11	90,9
TOTAL	36	42	85,7%

Tabelle 4.2-1 Extravasation von Erythrozyten in Gefäßläsionen

4.2.1.2 Hämolyse extravasaler Erythrozyten

Daraufhin wurde histologisch analysiert, in welcher Form extravasal lokalisierte Erythrozyten vorliegen. Hierbei wurde zwischen Hämolyse und intakten Erythrozyten unterschieden. Erythrozyten wurden als lysiert interpretiert, wenn sich das Hämoglobin, welches den Hauptproteinbestandteil von roten Blutzellen darstellt, außerhalb der Erythrozytenmembranen befand, d.h. wenn beide Erythrozytenbestandteile getrennt voneinander angefärbt waren. Hierzu wurden auch die Stellen gezählt, an denen freies Hämoglobin allein zu finden war, da auch dies ein Anzeichen dafür ist, dass an dieser Stelle Erythrozyten geplatzt sein müssen. Im Fall von intakten Erythrozyten, deckte sich das angefärbte Hämoglobin mit den angefärbten Membranen. Als weiterer Indikator für die Hämolyse wurde die Berliner-Blau Färbung hinzugezogen, die bei der Hämolyse frei gewordenen Eisen bzw. Hämosiderin blau darstellt. In den Aortenaneurysmata waren die Erythrozyten an 27 von 30 analysierten Stellen (90,0%) als lysiert zu erkennen. Allerdings war aber nur an 14 dieser 27 Stellen (51,9%) auch Hämosiderin nachweisbar. Bei der Analyse der Aortenklappen waren extravasale Erythrozyten an 18 von 19 analysierten Stellen (94,7%) lysiert, wovon nur an drei Stellen (16,7%) auch ein positives Signal in der Berliner-Blau Färbung zu finden war. An 8 von 10 analysierten Stellen in Carotisplaques (80,0%) war eine Hämolyse nachweisbar. Eine Kolokalisation mit Hämosiderin war nur an einer Stelle (12,5%) zutreffend. Dadurch ließ sich histologisch zeigen, dass die meisten Erythrozyten (89,8%) nach Extravasation aus den Gefäßen innerhalb des Plaques hämolysiert werden, was sich als Austritt von Hämoglobin aus dem Erythrozyten definieren lässt. Die Berliner-Blau Färbung erwies sich bei dieser Analyse als ein unzuverlässiger Indikator, da er nur in 34,0% der analysierten Stellen mit der Darstellung der Hämolyse durch Hämoglobin und Erythrozytenmembranen übereinstimmte.

Repräsentative Bilder und eine tabellarische Darstellung zur Hämolyse extravasaler Erythrozyten sind in *Abbildung 4.2-2* und *Tabelle 4.2-2* gezeigt.

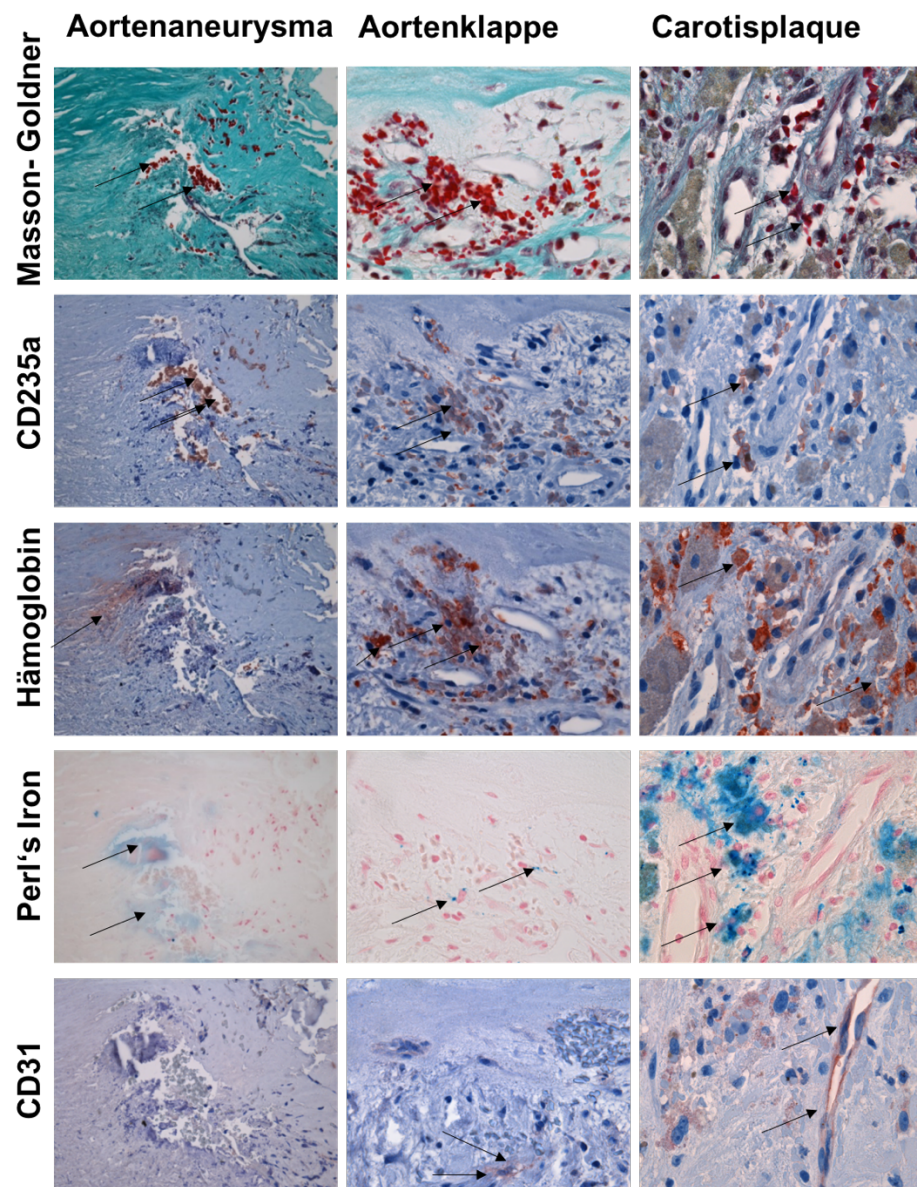


Abbildung 4.2-2 Nachweis von Hämolyse extravasaler Erythrozyten

Nachweis der Hämolyse von extravasalen Erythrozyten, d.h. des Austritts von Hämoglobin aus den Erythrozyten, anhand der Kolokalisation verschiedener Komponenten auf Serienschritten. Gezeigt sind repräsentative Beispiele aus einem Aortenaneurysma, einer Aortenklappe und einem Carotisplaque. 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte Färbungen:

Masson-Goldner-Trichrom Färbung zur Darstellung von Erythrozyten in rot/pink, Immunhistochemie von CD235a zur Darstellung von Erythrozytenmembranen (Signal in rot), Immunhistochemie von Hämoglobin zur Darstellung des Hauptproteinbestandteils von Erythrozyten (Signal in rot), Berliner-Blau Färbung zur Darstellung von Eisen eliminierenden Siderophagen als Indikator einer Einblutung in blau und Immunhistochemie von CD31 zur Darstellung des Endothels von Gefäßen (Signal in rot).

	Stellen mit lysierten Erythrozyten	Gesamtheit der Stellen mit Erythrozyten	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	27	30	90,0
<i>Aortenklappen</i>	18	19	94,7
<i>Carotisplaques</i>	8	10	80,0
<i>TOTAL</i>	53	59	89,8

	Hämosiderin-positive Stellen	Gesamtheit der Stellen mit lysierten Erythrozyten	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	14	27	51,9
<i>Aortenklappen</i>	3	18	16,7
<i>Carotisplaques</i>	1	8	12,5
<i>TOTAL</i>	18	53	34,0

Tabelle 4.2-2 Nachweis von Hämolyse extravasaler Erythrozyten

4.2.2 Vaskuläre Kalzifizierung in humanen atherosklerotischen Läsionen

4.2.2.1 Marker für vaskuläre Kalzifizierung

Um vaskuläre Kalzifizierung histologisch darzustellen, wurden zusätzlich zur Alizarin S Färbung eine immunhistochemische Färbung von Periostin und Osteopontin durchgeführt. Um die Parallelität zu Knochengewebe zu zeigen, wurde bei allen drei Färbungen muriner Knochen als Positivkontrolle mitgeführt.

Alizarin S färbt dabei schon mineralisierte Areale an, also Bereiche, die aus Hydroxylapatit bestehen. Periostin und Osteopontin werden als Marker für osteoblastenähnliche Zellen verwendet. Periostin ist ein extrazelluläres Matrixprotein und Osteopontin, ein Protein, das an der Regulation von Knochensubstanzbildung beteiligt ist und von Osteoblasten exprimert wird.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte auf Kolo-kalisation von Alizarin S-positiven Arealen mit Periostin und Osteopontin geprüft. Dabei waren insgesamt 14 von 27 Alizarin S-positiven Stellen (51,9%) auch Osteopontin-positiv und 26 von 27 Stellen (96,3%) zugleich Periostin-positiv. Außerdem war an 33 von 57 Periostin-positiven

Stellen (57,9%) auch der Marker Osteopontin zu finden. Zusätzlich zeigte sich Osteopontin bei Durchmusterung der histologischen Präparate als ein eher unspezifischer Marker für vaskuläre Kalzifizierung (definiert durch Alizarin S). Im Gegensatz dazu stellte sich Periostin als präziser und spezifischer Marker heraus, da dieser konstant an kalzifizierten Stellen zu finden war. Stellen, an denen Periostin angefärbt war, sich die Alizarin S Färbung jedoch negativ darstellte (30 von 57 Periostin-positiven Stellen, 52,6%), wurden daher in der weiteren Analyse dieser Arbeit als ein früheres Stadium vaskulärer Kalzifizierung interpretiert.

Repräsentative Bilder und eine tabellarische Darstellung der Analyse zur Etablierung der Marker für vaskuläre Kalzifizierung werden in *Abbildung 4.2-3* und *Tabelle 4.2-3* gezeigt.

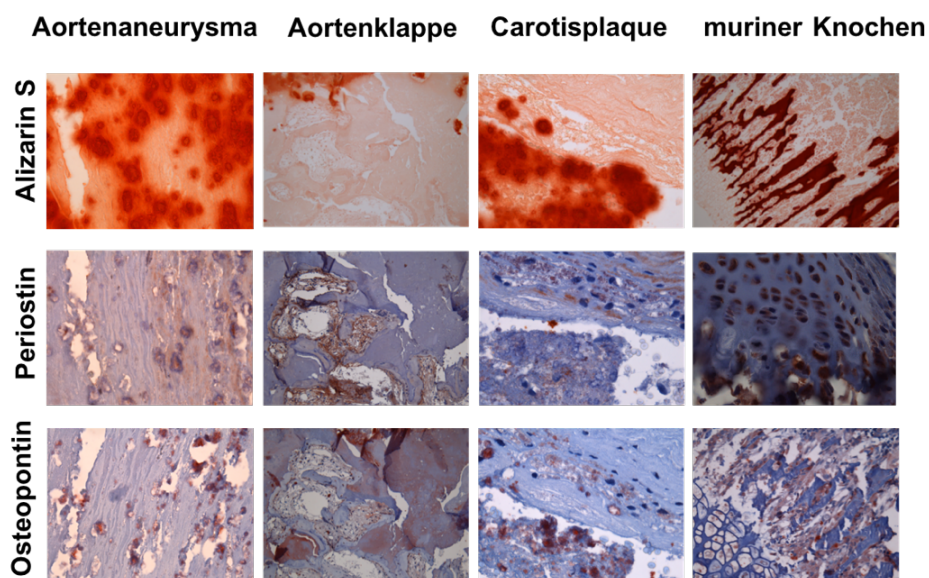


Abbildung 4.2-3 Kolokalisation von Markern für vaskuläre Kalzifizierung

Nachweis der Kolokalisation von Markern für vaskuläre Kalzifizierung und Osteoblastenaktivität auf Serienschritten. Gezeigt werden repräsentative Beispiele aus einem Aortenaneurysma, einer Aortenklappe und einem Carotisplaque sowie murinem Knochen als Positivkontrolle. 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte Färbungen:

Alizarin S zur Darstellung von Hydroxylapatit in rot, Immunhistochemie von Periostin zur Darstellung von Osteoblastenaktivität (Signal in rot) und Immunhistochemie von Osteopontin zur Darstellung von Osteoblasten (Signal in rot).

Gesamtheit der Alizarin S-positiven Stellen	Kolokalisation mit Osteopontin-positiven Stellen	%
27	14	51,9

Gesamtheit der Alizarin S-positiven Stellen	Kolokalisation mit Periostin-positiven Stellen	%
27	26	96,3

Tabelle 4.2-3 Kolokalisation von Markern für vaskuläre Kalzifizierung

4.2.2.2 Differenzierung von Myofibroblasten zu Osteoblasten

Zur Darstellung der Bedeutung von glatten Muskelzellen für vaskuläre Kalzifizierung wurden die Gewebeschnitte auf Kolokalisation von kalzifizierten Arealen (Alizarin S-positiv bzw. Periostin-positiv) mit Myofibroblasten (SM alpha-Aktin-positiv) untersucht, um so zu zeigen, dass Myofibroblasten zu osteoblastenähnlichen Zellen differenzieren können. Als Marker für Myofibroblasten wurde SM alpha-Aktin verwendet, das von diesen Zellen gebildet/produziert wird und Bestandteil des kontraktiven Apparats von glatten Muskelzellen ist. Bei der Analyse wurde zwischen den drei Spezies Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques unterschieden, da die Präsenz von glatten Muskelzellen im histologischen Präparat variierte und bei den Aortenklappen im Gegensatz zu den Aortenaneurysmata und Carotisplaques weniger vorhanden war.

Dabei waren in den analysierten Aortenaneurysmata 9 von 12 Alizarin S-positiven Stellen (75,0%) ebenfalls SM alpha-Aktin-positiv, in Aortenklappen 2 von 3 Stellen (66,7%) und in Carotisplaques ebenfalls 2 von 3 Stellen (66,7%). Des Weiteren wurden Periostin-positiv Stellen untersucht, da dieser Marker als Indiz für ein früheres Stadium vaskulärer Kalzifizierung etabliert wurde. Bei dieser Analyse waren in Aortenaneurysmata an 14 von 17 Periostin-positiven Stellen (82,4%) auch glatte Muskulatur angefärbt, in Aortenklappen an 7 von 14 Stellen (50,0%) und in Carotisplaques an 6 von 12 Stellen (50,0%).

Beispielhafte Bilder, die die Kolokalisation von Myofibroblasten mit vaskulärer Kalzifizierung und damit die Differenzierung von glatten Muskelzellen zu

osteoblastenähnlichen Zellen veranschaulichen und eine tabellarische Darstellung der Ergebnisse, werden in *Abbildung 4.2-4* und *Tabelle 4.2-4* gezeigt.

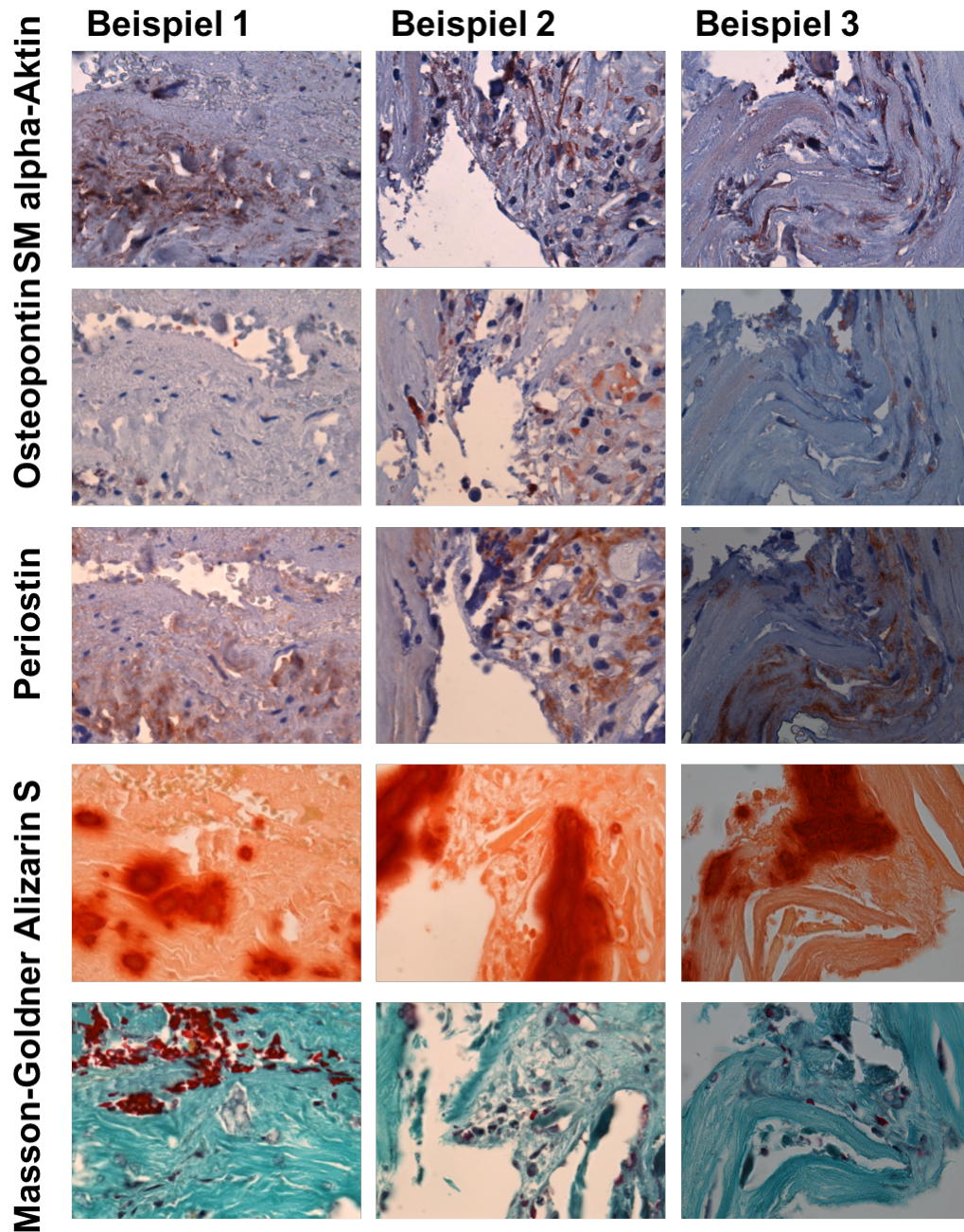


Abbildung 4.2-4 Kolokalisation von Myofibroblasten und Osteoblasten

Nachweis der Differenzierung von Myofibroblasten zu Osteoblasten anhand der Kolokalisation verschiedener Komponenten auf Serienschnitten. Gezeigt werden repräsentative Bilder aus Aortenaneurysmata. 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte Färbungen:

Immunhistochemie von SM alpha-Aktin zur Darstellung von Myofibroblasten (Signal in rot), Immunhistochemie von Osteopontin zur Darstellung von Osteoblasten (Signal in rot), Immunhistochemie von Periostin zur Darstellung von Osteoblastenaktivität (Signal in rot), Alizarin S Färbung zur Darstellung von Hydroxylapatit in rot und Masson-Goldner-Trichrom-Färbung zur Darstellung von Erythrozyten in rot/pink und Kollagen in grün.

	Gesamtheit der Alizarin S-positiven Stellen	Kolokalisation mit SMA-positiven Stellen	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	12	9	75,0
<i>Aortenklappen</i>	3	2	66,7
<i>Carotisplaques</i>	3	2	66,7
<i>TOTAL</i>	18	13	72,2

	Gesamtheit der Periostin-positiven Stellen	Kolokalisation mit SMA-positiven Stellen	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	17	14	82,4
<i>Aortenklappen</i>	14	4	50,0
<i>Carotisplaques</i>	12	6	50,0
<i>TOTAL</i>	43	24	55,8

Tabelle 4.2-4 Kolokalisation von Myofibroblasten und Osteoblasten

4.2.3 Kolokalisation von Erythrozyten mit vaskulärer Kalzifizierung

Ziel dieser Arbeit ist es, Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Erythrozyten und vaskulärer Kalzifizierung in menschlichen atherosklerotischen Läsionen aufzufinden.

In die Analyse wurden zu Beginn alle Stellen einbezogen, an denen entweder Marker für vaskuläre Kalzifizierung (Alizarin S und/oder Periostin) oder Erythrozyten (Masson-Goldner-Trichrom und/oder CD235a) zu sehen waren. Zu diesen Stellen wurden jeweils die entsprechenden Stellen in den anderen Färbungen aufgesucht. Dabei wurde zunächst untersucht, ob an Stellen mit angefärbten Erythrozyten nach Masson-Goldner-Trichrom Färbung oder Immunhistochemie von CD235a auch vaskuläre Kalzifizierungen zu sehen waren. In Aortenaneurysmata war dies an 27 von 32 Stellen (84,4%), in Aortenklappen an 23 von 25 Stellen (92,0%) und in Carotisplaques an 26 von 30 Stellen (86,7%) der Fall. Umgekehrt wurde auch die Präsenz von Erythrozyten an kalzifizierten Stellen überprüft. Hier waren in Aortenaneurysmata an 32 von 43 Stellen (74,4%), in Aortenklappen an 24 von 42 Stellen (57,1%) und in Carotisplaques an 25 von 30 Stellen (83,3%) Erythrozyten im Bereich vaskulärer Kalzifikationen auffindig zu machen. Durch diese Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass es

einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Komponenten geben könnte. Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Formen atherosklerotischer Läsionen lassen sich dadurch erklären, dass atherosklerotische Läsionen an der Aortenklappe histologisch im Allgemeinen zellärmer waren und weniger Einblutungen aufwiesen als atherosklerotische Carotidplaques und Aortenaneurysmata. Auf der Basis von Befunden der Arbeitsgruppe, die an kultivierten Glattmuskelzellen erhoben wurden und auf eine Bedeutung der in Erythrozyten exprimierten eNOS hinwies, wurde auch die Expression von eNOS in menschlichen Gewebeproben untersucht. Bilder aus den drei Spezies, die Kollokationen von Verkalkung, Erythrozyten und dem osteoinduktiven Mediator eNOS zeigen, sind in *Abbildung 4.2-5* gezeigt. Außerdem ist eine tabellarische Darstellung der Analyse durch *Tabelle 4.2-5* gegeben.

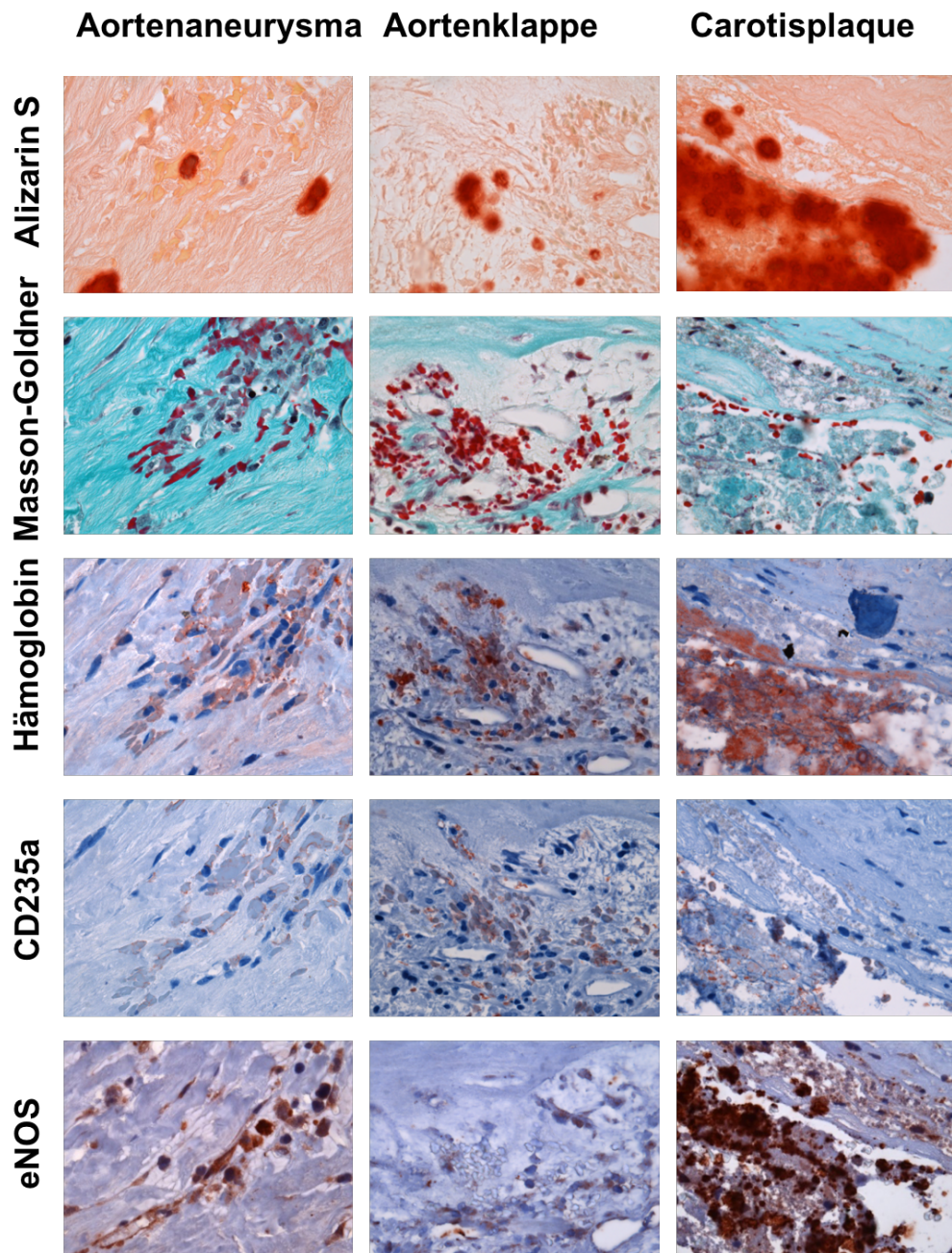


Abbildung 4.2-5 Kolokalisation von Kalzifizierung, lysierten Erythrozyten und eNOS

Nachweis der Kolokalisation von Erythrozytenbestandteilen, eNOS als osteoinduktiven Mediator aus Erythrozytenmembranen und vaskulärer Kalzifizierung auf Serienschritten. Gezeigt sind repräsentative Beispiele aus einem Aortenaneurysma, einer Aortenklappe und einem Carotisplaque. 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte Färbungen:

Alizarin S Färbung zur Darstellung von Hydroxylapatit in rot; Masson-Goldner-Trichrom Färbung zur Darstellung von Erythrozyten in rot/pink und Kollagen in grün; Immunhistochemie von Hämoglobin zur Darstellung des Austritts von Hämoglobin aus den Erythrozyten, d.h. der Lyse von Erythrozyten (Signal in rot); Immunhistochemie von CD235a zur Darstellung von Erythrozytenmembranen (Signal in rot) und Immunhistochemie von eNOS zur Darstellung der NO Produktion (Signal in rot).

	Gesamtheit der Stellen mit Erythrozyten	Kolokalisation mit kalzifizierten Stellen	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	32	27	84,4
<i>Aortenklappen</i>	25	23	92,0
<i>Carotisplaques</i>	30	26	86,7
TOTAL	87	76	87,4

	Gesamtheit der kalzifizierten Stellen	Kolokalisation mit Stellen mit Erythrozyten	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	43	32	74,4
<i>Aortenklappen</i>	42	24	57,1
<i>Carotisplaques</i>	30	25	83,3
TOTAL	115	81	70,4

Tabelle 4.2-5 Kolokalisation von Kalzifizierung und lysierten Erythrozyten

4.2.4 Unterschiede zwischen lysierten und intakten Erythrozyten in Bezug auf vaskuläre Kalzifizierung

Basierend auf Ergebnissen aus Zellkulturexperimenten der Arbeitsgruppe, bei denen ein kalzifizierender Effekt auf kultivierte glatte Muskelzellen nur durch lysierte und nicht durch intakte Erythrozyten feststellbar war, wurde der Zusammenhang der Bedeutung von intakten bzw. lysierten Erythrozyten für die vaskuläre Kalzifizierung auch histologisch detaillierter untersucht. Dabei ließ sich ebenfalls eine unterschiedliche Assoziation von lysierten und intakten Erythrozyten mit Verkalkung im atherosklerotischen Plaque feststellen. Histologisch wurde vaskuläre Kalzifizierung durch Alizarin- und/oder Periostin-positive Areale dargestellt. Bei lysierten Erythrozyten war Hämoglobin außerhalb der mit einem gegen CD235a gerichteten Antikörper angefärbten Erythrozytenmembranen zu finden, wohingegen es bei intakten roten Blutzellen innerhalb der Membranen bzw. der Zelle zu sehen war.

Wie oben bereits beschrieben waren in den analysierten Läsionen an 89,83% der fotografierten Stellen die Erythrozyten in einem lysierten Zustand aufzufinden. Von diesen Stellen war an 81,1% auch vaskuläre Verkalkung zu sehen. Um der Rolle der Erythrozytenbestandteile für Kalzifizierung nachzugehen, wurden diese Stellen auf die

Präsenz von Erythrozytenmembranen und Hämoglobin untersucht. Dabei waren dort an 86,1% auch Membranen und an 72,1% auch Hämoglobin angefärbt. Beide Strukturen zugleich war an 55,8% der Stellen zu sehen. An den nicht kalzifizierten Stellen waren nur an 10,0% Erythrozytenmembranen zu sehen, jedoch an allen (100,0%) Hämoglobin. Dies zeigt, dass Hämoglobin alleine an der Mehrheit der Stellen keine Kalzifizierung auslösen konnte. Zu diesem Ergebnis kamen auch Zellkulturexperimente in der Arbeitsgruppe. Im Vergleich dazu waren von den 10,7% intakten roten Blutzellen nur bei 33,3% auch kalzifizierte Areale zu finden, woraus man schlussfolgern kann, dass der Effekt bei intakten Erythrozyten ebenfalls geringer ist. Eine schematische Übersicht über den Unterschied zwischen lysierten und intakten Erythrozyten in Bezug auf vaskuläre Verkalkung ist in *Abbildung 4.2-6* veranschaulicht. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine Hämolyse von Erythrozyten für deren kalzifizierenden Effekt notwendig ist und dass an verkalkten Stellen vornehmlich Erythrozytenmembranen eine Bedeutung zu haben scheinen. Beispielhafte histologische Bilder sind in *Abbildung 4.2-7* gezeigt. Als osteoinduktiver Mediator aus Erythrozytenmembranen wurde an diesen Stellen auch die Präsenz von eNOS dargestellt.

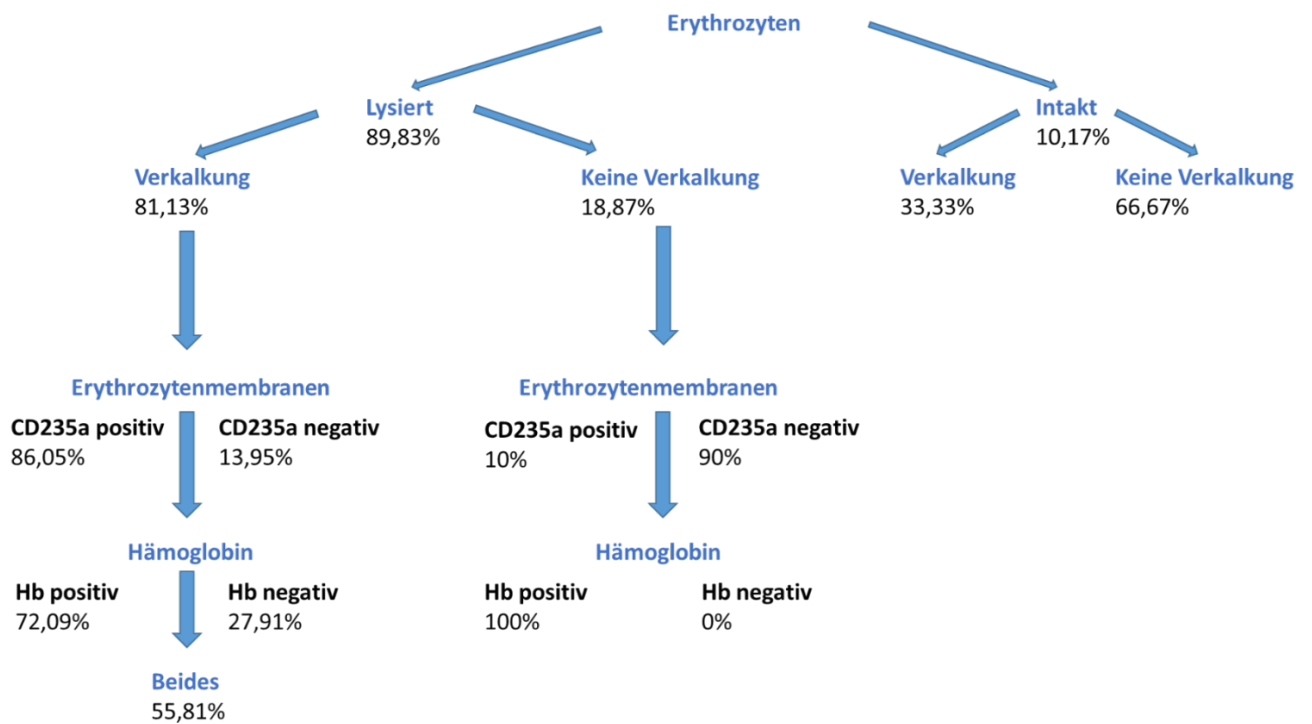


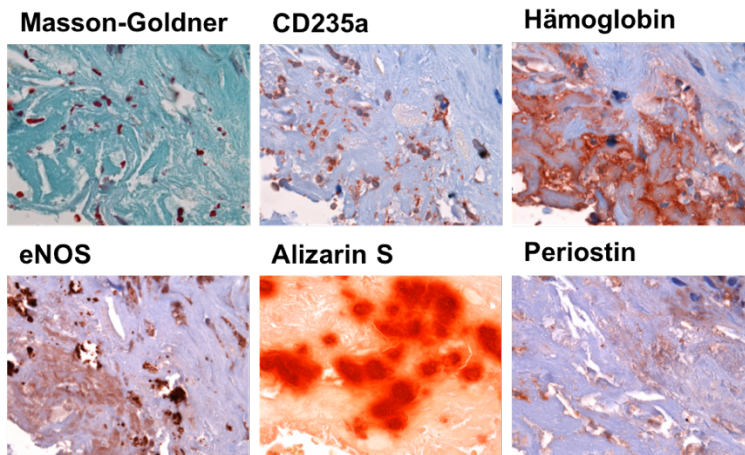
Abbildung 4.2-6 Analyse und Auswertung der histologischen Kolo-kalisationen

n=59 (Anzahl der analysierten Stellen von Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques); Darstellung der Unterschiede zwischen lysierten und intakten Erythrozyten in Bezug auf vaskuläre Kalzifizierung; Darstellung der Rolle von Erythrozytenmembranen und Hämoglobin in Bezug auf Kalzifizierung.

Histologische Bewertung:

Lysierte Erythrozyten: Hämoglobin außerhalb der Erythrozytenmembranen (CD235a), Intakte Erythrozyten: Hämoglobin innerhalb der Erythrozytenmembranen (CD235a) und Verkalkung: Alizarin S und/oder Periostin positiv.

Lysierte Erythrozyten



Intakte Erythrozyten

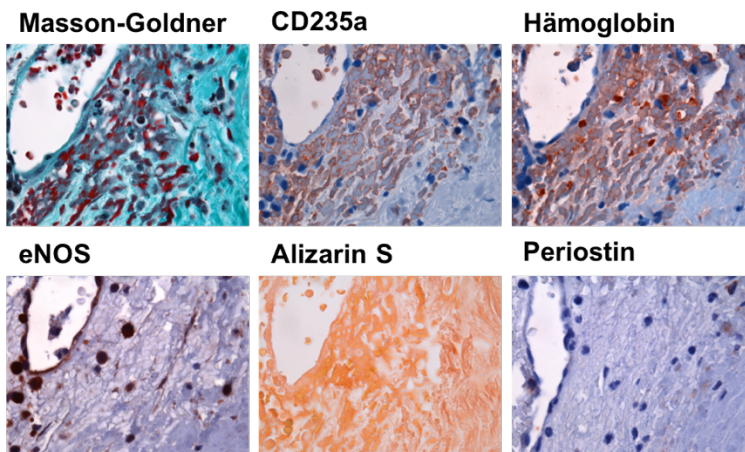


Abbildung 4.2-7 Assoziation lysierter und intakter Erythrozyten mit vaskulärer Kalzifizierung

Repräsentative Bilder zur Darstellung der Unterschiede zwischen lysierten und intakten Erythrozyten in Bezug auf vaskuläre Kalzifizierung anhand der Kolo-kalisation verschiedener Komponenten auf Serienschnitten. 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte Färbungen:

Masson-Goldner-Trichrom Färbung zur Darstellung von Erythrozyten in rot/pink, Immunhistochemie von CD235a zur Darstellung von Erythrozytenmembranen (Signal in rot), Immunhistochemie von Hämoglobin zur Darstellung des Hauptproteinbestandteils von Erythrozyten (Signal in rot), Immunhistochemie von eNOS zur Darstellung der NO Produktion (Signal in rot), Alizarin S Färbung zur Darstellung von Hydroxylapatit in rot und Immunhistochemie von Periostin zur Darstellung von Osteoblastenaktivität (Signal in rot).

Vergleich von **lysierten Erythrozyten** (Darstellung von Hämoglobin außerhalb der Erythrozytenmembranen, kalzifizierender Effekt) und **intakten Erythrozyten** (Darstellung von Hämoglobin innerhalb der Erythrozytenmembranen, kein kalzifizierender Effekt).

4.2.5 Bedeutung von Erythrozytenmembranen

Da sich in der vorangegangenen Analyse ein auffälliger Zusammenhang zwischen der Präsenz von Erythrozytenmembranen und Stellen mit vaskulärer Kalzifizierung ergab, wurde die Bedeutung dieser im Folgenden weiter analysiert. Dazu wurden alle analysierten Stellen in die Auswertung mit einbezogen und auf Anwesenheit von Erythrozytenmembranen (CD235a) untersucht. Anschließend wurde innerhalb der Gruppen CD235a-positiv und -negativ der jeweilige Anteil nicht kalzifizierter und kalzifizierter Stellen berechnet. Es wurde erneut zwischen Aortenaneurysmata, Aortenklappen, Carotisplaques unterschieden und auch die Gesamtheit aller analysierten Stellen (total) bewertet. In Aortenaneurysmata waren von den 27 CD235a-positiven Stellen 22 (81,5%) zugleich verkalkt. An CD235a-negativen Arealen war nur an 3 von 9 Stellen (33,3%) eine Verkalkung zu finden. Bei den Aortenklappen waren 15 von 16 CD235a-positiven Stellen (93,8%) und 3 von 12 CD235a-negativen Stellen (25,0%) kalzifiziert. Bei der Analyse der Stellen aus Carotisplaques war an allen von 17 CD235a-positiven Stellen (100%) auch eine Verkalkung zu sehen, wohingegen nur 2 der 6 CD235a-negativen Stellen (33,3%) eine Verkalkung zeigten. Insgesamt waren von den 87 analysierten Stellen 60 CD235a-positiv (69,0%) und 27 Stellen CD235a-negativ (31,0%). Von den CD235a-positiven Stellen war an 54 (90,0%) zugleich eine Kalzifizierung zu finden. An den CD235a-negativen Stellen war dies nur an 8 Stellen (29,6%) der Fall. Die prozentuale Verteilung der verschiedenen Konstellationen bezogen auf alle analysierten Stellen wird in *Abbildung 4.2-8* graphisch dargestellt. Der Zusammenhang zwischen Erythrozytenmembranen und vaskulärer Kalzifizierung wurde für die Gesamtheit der analysierten Stellen (total) statistisch ausgewertet. Dabei lag der p-Wert bei $<0,00001$, wodurch sich die Abhängigkeit vaskulärer Kalzifizierung von der Anwesenheit von Erythrozytenmembranen als signifikant erwies. Eine tabellarische Darstellung dieser Ergebnisse ist in *Tabelle 4.2-6* zu finden.

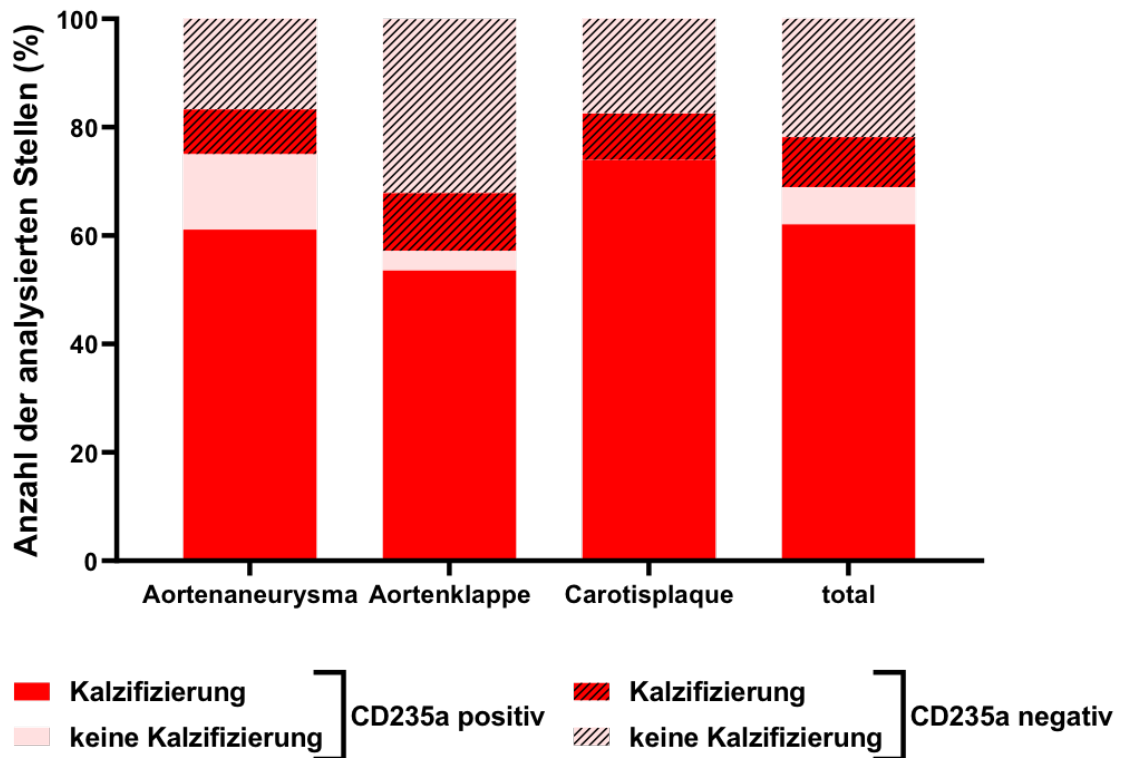


Abbildung 4.2-8 Bedeutung von Erythrozytenmembranen für vaskuläre Kalzifizierung

Anteil der Stellen mit CD235a-positivem oder -negativem Immunsignal (Marker für Erythrozytenmembranen) von der Gesamtheit der analysierten Stellen (in %), Anteil der Stellen mit Darstellung von Kalzifizierung (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) oder keiner Kalzifizierung innerhalb der beiden Gruppen CD235a-positiv oder -negativ (in %); Unterscheidung zwischen Aortenaneurysmata (n=36), Aortenklappen (n=28), Carotisplaques (n=23) und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) (n=87).

	Gesamtheit der CD235a-positiven Stellen	Kolokalisation mit kalzifizierten Stellen	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	27	22	81,5
<i>Aortenklappen</i>	16	15	93,8
<i>Carotisplaques</i>	17	17	100,0
<i>TOTAL</i>	60	54	90,0

	Gesamtheit der CD235a-negativen Stellen	Kolokalisation mit kalzifizierten Stellen	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	9	3	33,3
<i>Aortenklappen</i>	12	3	25,0
<i>Carotisplaques</i>	6	2	33,3
<i>TOTAL</i>	27	8	29,6

	Kalzifizierung	Keine Kalzifizierung
CD235a-positiv	54	6
CD235a-negativ	8	19

Tabelle 4.2-6 Bedeutung von Erythrozytenmembranen für vaskuläre Kalzifizierung

4.2.6 Bedeutung von Hämoglobin

4.2.6.1 Fehlende Kalzifizierung in Abwesenheit von Erythrozytenmembranen

In der vorangegangenen Analyse wurde an nicht-kalzifizierten Stellen festgestellt, dass dort meistens Hämoglobin jedoch weniger Erythrozytenmembranen zu finden waren. Diese Beobachtung legte den Verdacht nahe, dass Hämoglobin allein keine Kalzifizierung verursachen kann und somit Kalzifizierung in Abwesenheit von Erythrozytenmembranen seltener ist. Daher wurden die Stellen, an denen nur Hämoglobin und keine Erythrozytenmembranen zu sehen waren, auf Verkalkung (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) untersucht. Dabei war in Aortenaneurysmata, an 5 von 8 dieser Stellen (62,5%), in Aortenklappen an 9 von 10 (90,0%) und in Carotisplaques an 2 von 3 Stellen (66,7%) keine Verkalkung zu sehen. Insgesamt waren also von 21 Stellen mit Hämoglobin allein nur 5 verkalkt (23,8%) und 16 frei von

Verkalkung (76,2%). Diese Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass der kalzifizierende Effekt von Erythrozyten nicht in ihrem Hauptproteinbestandteil, dem Hämoglobin, liegt, sondern eher in den Erythrozytenmembranen. Repräsentative Bilder und eine tabellarische Darstellung dieses Phänomens sind in *Abbildung 4.2-9* und *Tabelle 4.2-7* gezeigt.

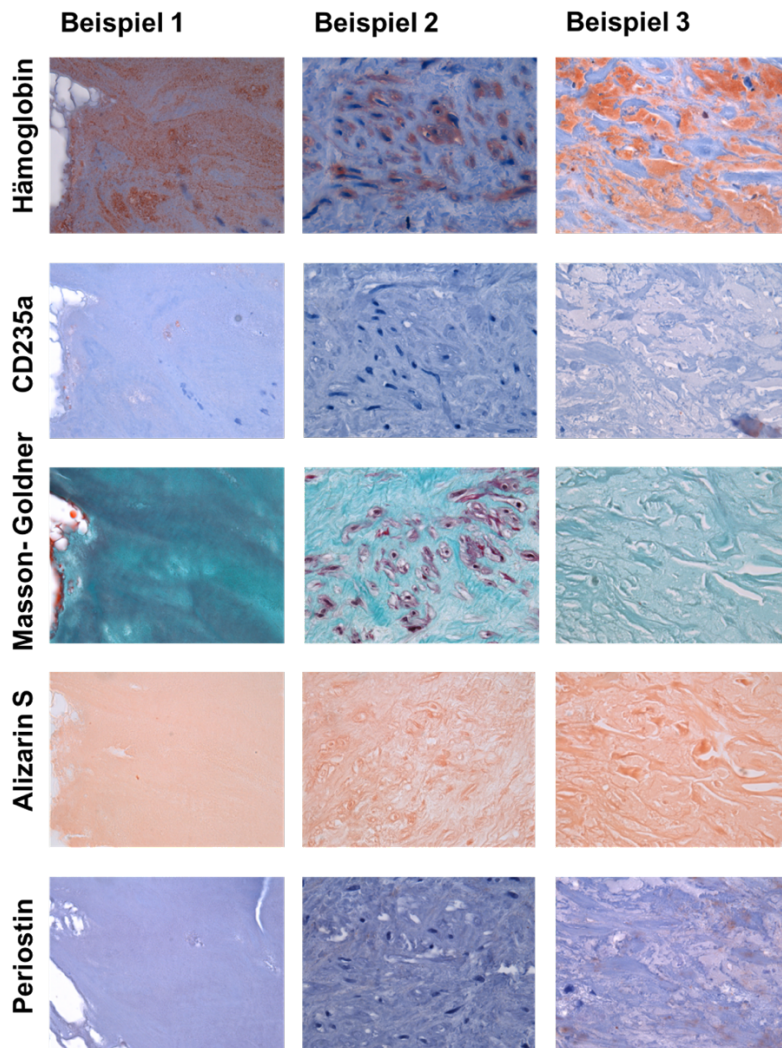


Abbildung 4.2-9 Fehlende Kalzifizierung in Abwesenheit von Erythrozytenmembranen

Repräsentative Beispiele zum Nachweis der fehlenden Kalzifizierung in Anwesenheit von Hämoglobin und Abwesenheit von Erythrozytenmembranen anhand der Kolo-kalisation verschiedener Komponenten auf Serienschnitten. 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte Färbungen:

Immunhistochemie von Hämoglobin zur Darstellung des Hauptproteinbestandteils von Erythrozyten (Signal in rot), Alizarin S Färbung zur Darstellung von Hydroxylapatit in rot, Immunhistochemie von CD235a zur Darstellung von Erythrozytenmembranen (Signal in rot), Masson-Goldner-Trichrom Färbung zur Darstellung von Erythrozyten in rot/pink und Kollagen in grün, Alizarin S Färbung zur Darstellung von Hydroxylapatit in rot und Immunhistochemie von Periostin zur Darstellung von Osteoblastenaktivität (Signal in rot).

	Gesamtheit der Hämoglobin-positiven und CD235a-negativen Stellen	Kolokalisation mit Stellen ohne Kalzifizierung	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	8	5	62,5
<i>Aortenklappen</i>	10	9	90,0
<i>Carotisplaques</i>	3	2	66,7
<i>TOTAL</i>	21	16	76,2

Tabelle 4.2-7 Fehlende Kalzifizierung in Abwesenheit von Erythrozytenmembranen

4.2.6.2 Hämoglobin als NO-Scavenger

In den histologischen Präparaten war jedoch auch an kalzifizierten Stellen Hämoglobin nachweisbar. In Zellkulturexperimenten der Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe genetisch-veränderter Mäuse, pharmakologischer eNOS-Inhibitoren und NO-Donoren gezeigt, dass die Erythrozytenmembran-induzierte Verkalkung durch NO ausgelöst wird (170). In Abschnitt 4.3 ist eine detaillierte Analyse der histologischen Ergebnisse bezüglich der Bedeutung der erythrozytären eNOS für vaskuläre Kalzifizierung zu finden. Das bei der Hämolyse freigesetzte Hämoglobin ist allerdings als NO-Scavenger bekannt (171) und würde so durch Bindung von NO und Bildung von Nitrat eine NO-vermittelte vaskuläre Kalzifizierung verhindern. Als Möglichkeiten der Inaktivierung dieses Mechanismus wurden die Gewebeschnitte immunhistochemisch auf das oxidierte Methämoglobin, das nicht mehr in der Lage ist NO irreversibel zu binden, und auf CD163, einen Marker für Makrophagen mit einem Hämoglobin-Scavenger Rezeptor, untersucht (172).

4.2.6.2.1 Inaktivierung von Hämoglobin durch Oxidation zu Methämoglobin

Als erste Möglichkeit der Inaktivierung des potenten NO-Scavenger Hämoglobin wurde dessen Oxidation von zweiwertigem zu dreiwertigem Eisen enthaltendem Methämoglobin im histologischen Präparat analysiert. Dazu wurden alle Hämoglobin-positiven Stellen auf Kolokalisation mit Methämoglobin (HBG2) und außerdem auch

auf Kalzifizierung (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) untersucht. Dabei zeigte sich, dass an 92,6% der Hämoglobin-positiven Stellen das Hämoglobin in seiner oxidierten Form, dem Methämoglobin, vorlag. Beispielhafte Bilder für die Kolo-kalisation von Hämoglobin und Methämoglobin sind in *Abbildung 4.2-10* gezeigt. Anschließend wurden die kalzifizierten Anteile innerhalb der beiden Gruppen Methämoglobin-positiv und -negativ berechnet. Wie bisher, wurde dabei zwischen Aortenaneurysmata, Aortenklappen, Carotisplaques und der Gesamtheit aller analysierten Patientenproben unterschieden. Hier zeigte sich, dass von den zugleich Hämoglobin- und Methämoglobin-positiven Stellen bei den Aortenaneurysmata 16 von 23 Stellen (69,6%), bei den Aortenklappen 13 von 17 Stellen (76,5%) und bei den Carotisplaques alle Stellen (100,0%) kalzifiziert waren. Unter den wenigen (insgesamt vier) Stellen, an denen Hämoglobin nicht oxidiert, also noch in seiner Funktion als NO-Scavenger fungieren kann, war nur an einer von 4 Stellen (25,0%) Verkalkung zu finden. Die Notwendigkeit der Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin für vaskuläre Kalzifizierung wurde auch statistisch geprüft. Dabei erwies sich der Zusammenhang mit einem p-Wert von 0,0492 als signifikant. Die prozentualen Anteile der einzelnen Konstellationen sind in *Abbildung 4.2-11* und *Tabelle 4.2-8* dargestellt.

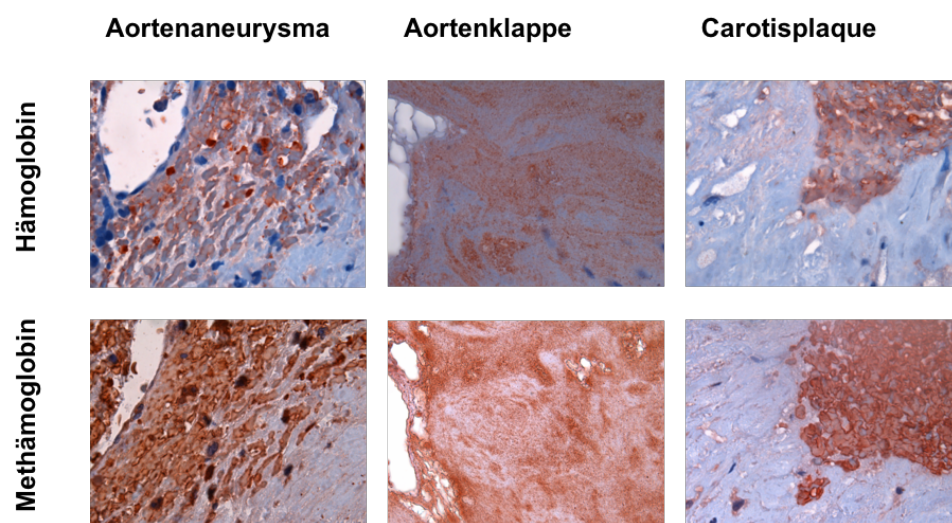


Abbildung 4.2-10 Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin

Nachweis der Kolo-kalisation von Hämoglobin und Methämoglobin auf Serienschnitten. Gezeigt werden repräsentative Beispiele aus einem Aortenaneurysma, einer Aortenklappe und einem Carotisplaque. 1000fache Vergrößerung.

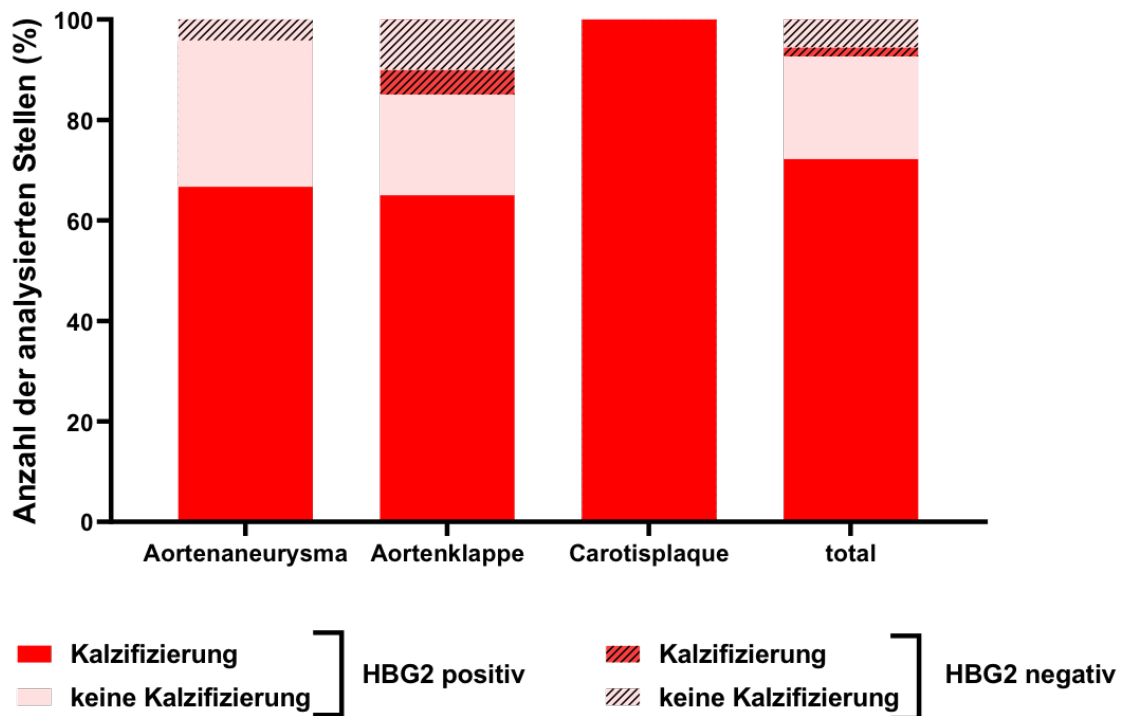


Abbildung 4.2-11 Bedeutung der Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin für die vaskuläre Kalzifizierung

Anteil der Stellen mit Methämoglobin (HBG2)-positivem oder -negativem Immunsignal von der Gesamtheit der Hämoglobin-positiven Stellen (in %),
 Anteil der Stellen mit Darstellung von Kalzifizierung (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) oder keiner Kalzifizierung innerhalb der beiden Gruppen Methämoglobin-positiv oder -negativ (in %);
 Unterscheidung zwischen Aortenaneurysmata (n=24), Aortenklappen (n=20), Carotisplaques (n=10) und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) (n=54).

	Gesamtheit der Hämoglobin- und Methämoglobin-positiven Stellen	Kolokalisation mit kalzifizierten Stellen	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	23	16	69,6
<i>Aortenklappen</i>	17	13	76,5
<i>Carotisplaques</i>	10	10	100,0
<i>TOTAL</i>	50	39	78,0

	Kalzifizierung	Keine Kalzifizierung
HBG2-positiv	39	11
HBG2-negativ	1	3

	Gesamtheit der Hämoglobin-positiven und Methämoglobin-negativen Stellen	Kolokalisation mit kalzifizierten Stellen	%
<i>Aortenaneurysmata</i>	1	0	0,0
<i>Aortenklappen</i>	3	1	33,3
<i>Carotisplaques</i>	0	0	0,0
<i>TOTAL</i>	4	1	25,0

Table 4.2-8 Bedeutung der Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin für die vaskuläre Kalzifizierung

4.2.6.2.2 Inaktivierung durch Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor

Als weiterer limitierender Faktor für die Funktion von Hämoglobin als NO-Scavenger wurde die Präsenz von CD163-positiven Makrophagen an Hämoglobin-positiven Stellen geprüft. Diese Makrophagen exprimieren einen Hämoglobin-Scavenger Rezeptor und können somit Hämoglobin eliminieren, wodurch dieses nicht mehr in der Lage ist zu NO binden und so vaskuläre Kalzifizierung zu verhindern. Bei dieser Analyse wurden alle Hämoglobin-positiven Stellen der drei unterschiedlichen Spezies auf Kolokalisation mit positiven Signalen einer immunhistochemischen Färbung von

CD163 untersucht. Insgesamt traf dieses Phänomen an 35 von 56 Stellen (62,5%) zu. Beispielhafte Bilder dazu sind in *Abbildung 4.2-12* zu finden. Im Anschluss wurden die beiden Gruppen CD163-positiv und -negativ auf vaskuläre Kalzifizierung (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) analysiert. Dabei war unter den Aortenaneurysmata an 12 zugleich Hämoglobin- und CD163-positive Stellen von 18 Hämoglobin-positiven Stellen (66,7%), unter den Aortenklappen an 8 von 9 Stellen (88,9%) und unter den Carotisplaques an 7 von 8 Stellen (87,5%) Verkalkung zu finden. Allerdings waren auch insgesamt 14 der 21 CD163-negativen Stellen (66,7%) kalzifiziert. Um die Beziehung zwischen CD163-positiven Makrophagen und vaskulärer Kalzifizierung auch statistisch zu prüfen, wurde auch hier der Chi-Quadrat Test durchgeführt. Dabei erwies sich der Zusammenhang bei einem p-Wert von 0,39 als nicht signifikant. Eine detaillierte prozentuale Verteilung ist in *Abbildung 4.2-13* und *Tabelle 4.2-9* dargestellt.

Da sich die Inaktivierung durch CD163-positive Makrophagen als nicht so konstant wie jene durch Oxidation zu Methämoglobin erwies, war es notwendig kalzifizierte Stellen auf die verschiedenen Kombinationen der Inaktivierung von anwesendem Hämoglobin zu überprüfen. Dazu wurden alle Stellen mit vaskulärer Kalzifizierung zunächst auf Kolo-kalisation mit Hämoglobin untersucht und anschließend auf verschiedene Konstellationen einer Inaktivierung aufgeteilt. Folgende Kombinationen ergaben sich bei dieser Analyse: keine Form einer Inaktivierung (HBG2- und CD163-negativ), Inaktivierung durch Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin (HBG2- und CD163-positiv) oder alleinige Inaktivierung durch Oxidation (HBG2-positiv und CD163-negativ). Eine Inaktivierung nur durch Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger Rezeptor war an keiner Stelle zu finden. Bei der Gesamtheit der analysierten Stellen waren von den 41 zugleich kalzifizierten und Hämoglobin-positiven Stellen 40 (97,6%) Methämoglobin (HBG2)-positiv, 24 (58,5%) Methämoglobin- und CD163-positiv und nur an einer Stelle (2,4%) war keine Form der Inaktivierung anzutreffen. Die genaue prozentuale Verteilung der verschiedenen Konstellationen in den drei Arten atherosklerotischer Läsionen und der Gesamtheit der analysierten Stellen (total) ist in *Abbildung 4.2-15* und *Tabelle 4.2-10* dargestellt. So konnte festgestellt werden, dass ein „Ausschalten“ von Hämoglobin als NO-Scavenger durch Oxidation zu Methämoglobin für die durch eNOS vermittelte vaskuläre Kalzifizierung notwendig ist.

Repräsentative Bilder, die zeigen, dass an Stellen mit oxidiertem, inaktivem Hämoglobin und CD163-positiven Makrophagen Erythrozytenmembranen eine Kalzifizierung auslösen können, sind in *Abbildung 4.2-14* gezeigt.

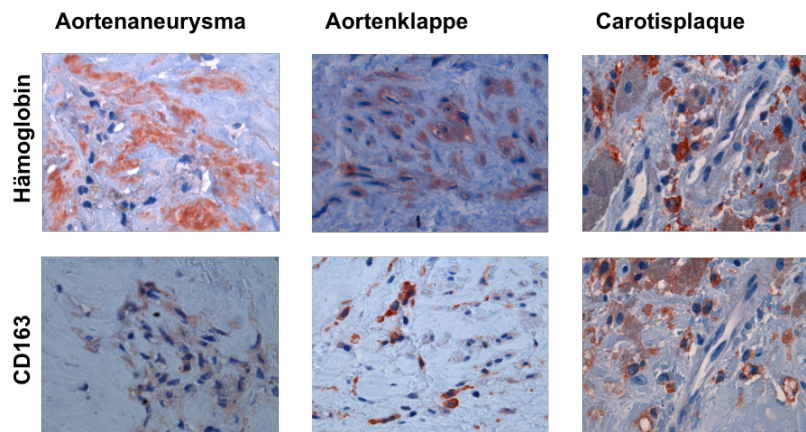


Abbildung 4.2-12 Mögliche Eliminierung von Hämoglobin durch CD163-positive Makrophagen

Nachweis der Kolo-kalisation von Hämoglobin und CD163-positiven Makrophagen auf Serienschnitten. Gezeigt werden repräsentative Beispiele aus einem Aortenaneurysma, einer Aortenklappe und einem Carotisplaque. 1000fache Vergrößerung.

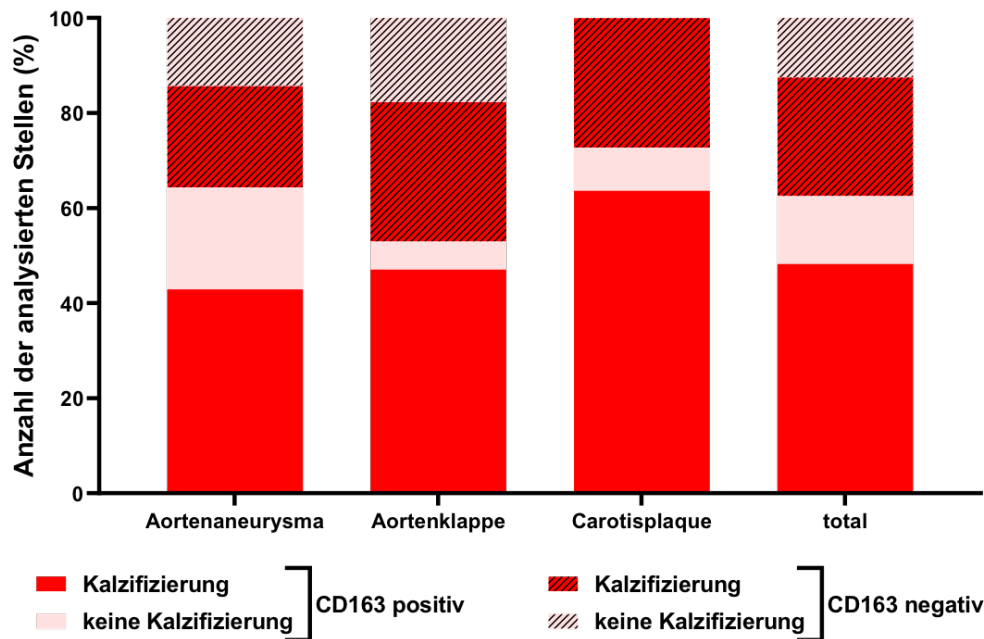


Abbildung 4.2-13 Bedeutung der Eliminierung von Hämoglobin durch CD163-positive Makrophagen für vaskuläre Kalkifizierung

Anteil der Stellen mit CD163-positivem oder -negativem Immunignal (Marker für Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger Rezeptor) von der Gesamtheit der Hämoglobin-positiven Stellen (in %),

Anteil der Stellen mit Darstellung von Kalkifizierung (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) oder keiner Kalkifizierung innerhalb der beiden Gruppen CD163-positiv oder -negativ (in %); Unterscheidung zwischen Aortenaneurysmata (n=28), Aortenklappen (n=17), Carotisplaques (n=11) und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) (n=56).

	Gesamtheit der Hämoglobin- und CD163-positiven Stellen	Kolokalisation mit kalkifizierten Stellen	%
Aortenaneurysmata	18	12	66,7
Aortenklappen	9	8	88,9
Carotisplaques	8	7	87,5
TOTAL	35	27	77,1

	Kalkifizierung	Keine Kalkifizierung
CD163-positiv	27	8
CD163-negativ	14	7

Tabelle 4.2-9 Bedeutung der Eliminierung von Hämoglobin durch CD163-positive Makrophagen

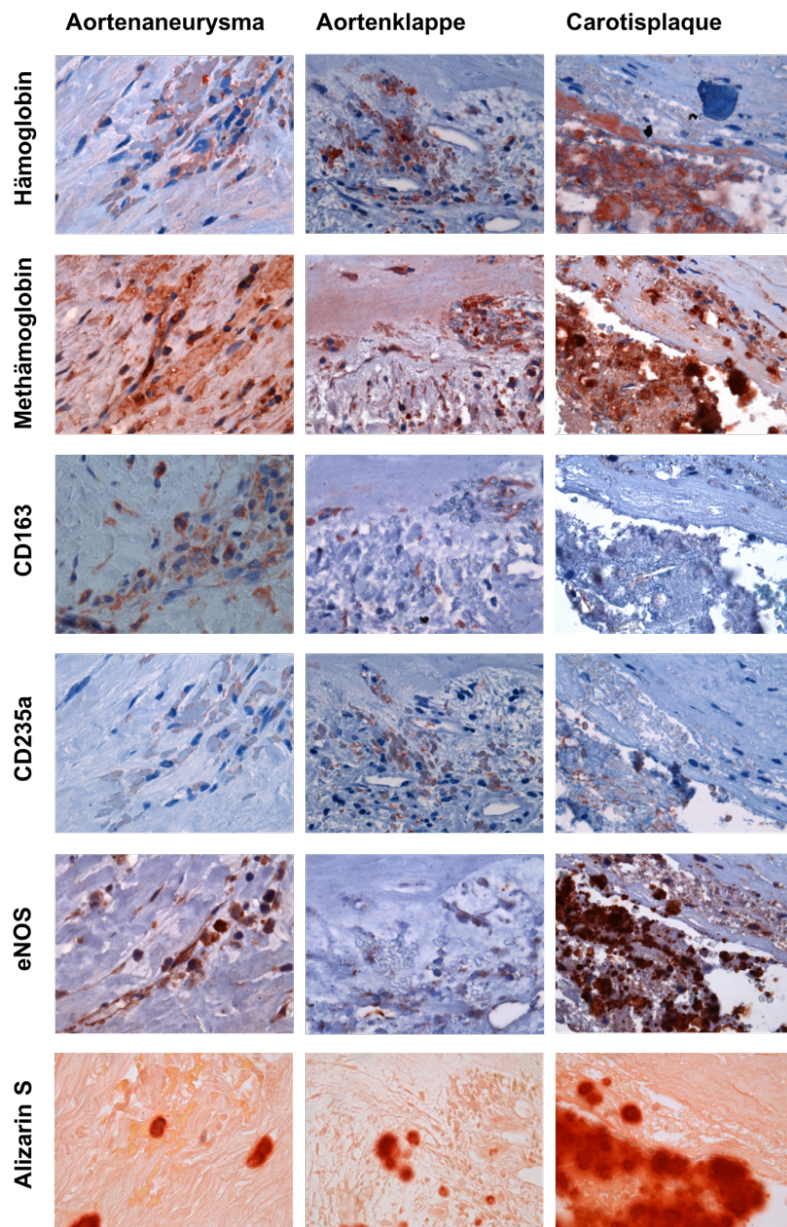


Abbildung 4.2-14 Mögliche Inaktivierung von Hämoglobin als NO-Scavenger

Nachweis der Inaktivierung von Hämoglobin als NO-Scavenger durch Oxidation zu Methämoglobin und durch CD163-positive Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger Rezeptor, anhand der Kolo-kalisation verschiedener Komponenten auf Serienschnitten. Repräsentative Beispiele aus einem Aortenaneurysma, einer Aortenklappe und einem Carotisplaque. 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte Färbungen:

Immunhistochemie von Hämoglobin zur Darstellung des Hauptproteinbestandteils von Erythrozyten und des NO-Scavengers (Signal in rot), Immunhistochemie von Methämoglobin zur Darstellung des Oxidationsproduktes von Hämoglobin (Signal in rot), Immunhistochemie von CD163 zur Darstellung von Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger Rezeptor (Signal in rot), Immunhistochemie von CD235a zur Darstellung von Erythrozytenmembranen (Signal in rot), Immunhistochemie von eNOs zur Darstellung von NO-Produktion (Signal in rot) und Alizarin S Färbung zur Darstellung von Hydroxylapatit in rot.

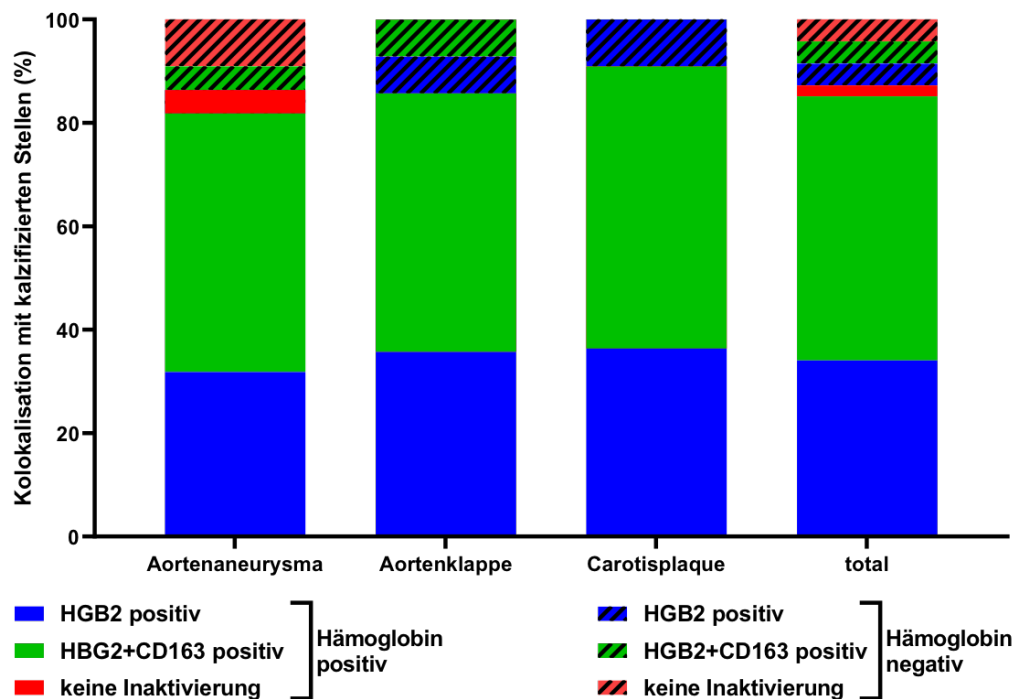


Abbildung 4.2-15 Konstellationen der Inaktivierung von Hämoglobin als NO-Scavenger

Anteil der Stellen mit Hämoglobin-positivem oder -negativem Signal von der Gesamtheit der kalifizierten Stellen (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) (in %), Anteil der Stellen mit Inaktivierung durch Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin (HGB2-positiv), Inaktivierung durch Oxidation zu Methämoglobin und CD163-positive Makrophagen (HGB2+CD163-positiv) oder keine Form der Inaktivierung innerhalb der beiden Gruppen Hämoglobin-positiv oder -negativ (in %); Unterscheidung zwischen Aortenaneurysmata (n=22), Aortenklappen (n=14), Carotisplaques (n=11) und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) (n=47).

	Gesamtheit der kalifizierten und Hämoglobin-positiven Stellen	%
Methämoglobin-positiv	40/41	97,6
CD163-positiv	24/41	58,5
Methämoglobin- und CD163-positiv	24/41	58,5
Methämoglobin- und CD163-negativ	1/41	2,4

Tabelle 4.2-10 Konstellationen der Inaktivierung von Hämoglobin als NO-Scavenger

4.3 Bedeutung von eNOS

Die endotheliale NO-Synthase wird konstitutiv von Endothelzellen exprimiert und spielt durch Bildung des Signalmoleküls NO eine wichtige Rolle bei der Regulation des Vasotonus. Darüber hinaus reguliert NO auch die Aktivität und Funktion von Blutzellen, wie Thrombozyten oder Leukozyten. Bei der Bildung von NO setzt eNOS L-Arginin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff zu L-Citrullin um (173). In Zellkulturexperimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eNOS durch Produktion von NO bei der vaskulären Kalzifizierung als osteoinduktiver Mediator eine Rolle spielt. Daher wurde in dieser Arbeit die Expression von eNOS und der Zusammenhang mit Kalzifizierung auch histologisch untersucht.

4.3.1 Expression von eNOS

Bekannt ist, dass eNOS von gesunden, CD31-positiven Endothelzellen in Gefäßen exprimiert wird. Im histologischen Präparat zeigte sich jedoch ebenfalls eine Expression durch andere Zelltypen, wie Makrophagen, Myofibroblasten und für diese Arbeit von besonderer Bedeutung durch Erythrozyten. Um diese Beobachtungen genauer zu quantifizieren, wurden alle CD31-positiven Stellen zur Darstellung von Endothelzellen, alle CD163-positiven Stellen zur Darstellung von Makrophagen, alle Stellen mit SM alpha-Aktin-positivem Signal zur Darstellung von glatten Muskelzellen / Myofibroblasten und alle CD235a-positiven Stellen zur Darstellung von Erythrozytenmembranen auf ihre Kolokalisation mit eNOS-positiven Signalen untersucht. Dabei war an 15 von 18 CD31-positiven Stellen (83,3%), an 30 von 32 CD163-positiven Stellen (93,8%), an 28 von 31 SM alpha-Aktin-positiven Stellen (90,3%) und an 41 von 48 CD235a-positiven Stellen (85,4%) auch eNOS zu finden. Diese Ergebnisse sind graphisch in *Abbildung 4.3-1* und tabellarisch in *Tabelle 4.3-1* dargestellt. Repräsentative immunhistochemische Bilder zu dieser Analyse sind in *Abbildung 4.3-2* gezeigt.

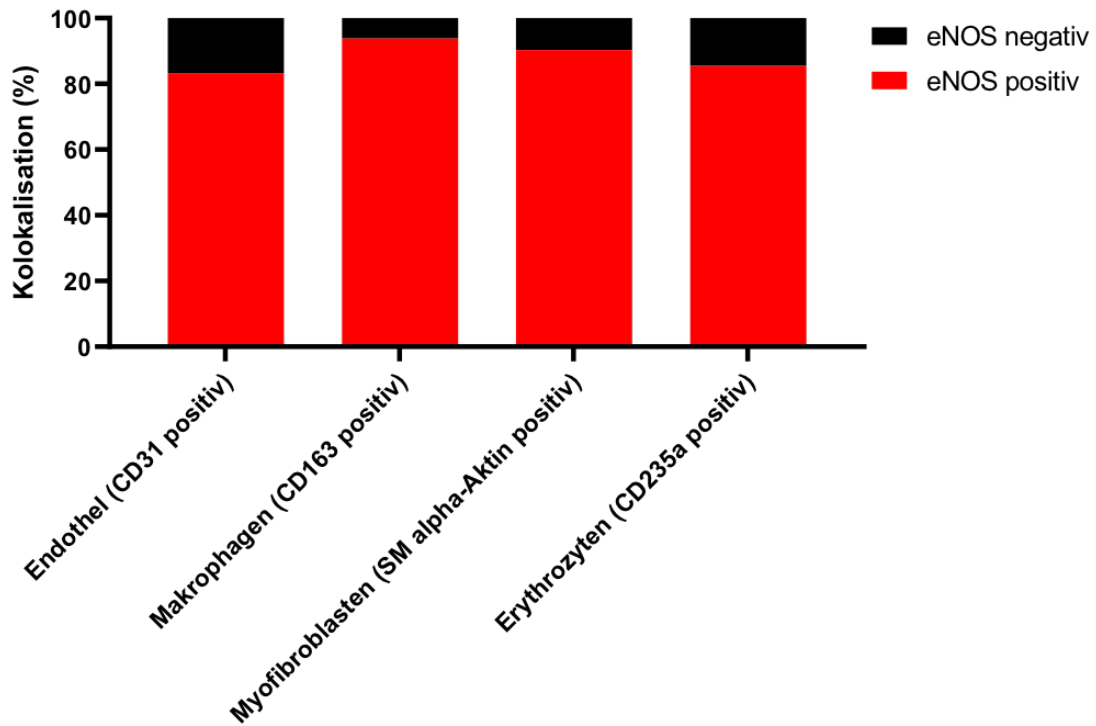


Abbildung 4.3-1 Expression von eNOS auf histologischen Gewebeschnitten

Anteil der Kokalisation von eNOS-positiven Signalen der Immunhistochemie mit Gesamtheit der CD31-positiven Stellen zur Darstellung von Endothelzellen (in %), n=18; Gesamtheit der CD163-positiven Stellen zur Darstellung von Makrophagen (in %), n=32; Gesamtheit der SM alpha-Aktin-positiven Stellen zur Darstellung von Myofibroblasten (in %), n=31 und Gesamtheit der CD235a-positiven Stellen zur Darstellung von Erythrozytenmembranen (in %), n=48.

	Kolokalisation mit eNOS-positiven Stellen	%
<i>Gesamtheit der CD31-positiven Stellen</i>	15/18	83,3
<i>Gesamtheit der CD163-positiven Stellen</i>	30/32	93,8
<i>Gesamtheit der SMA-positiven Stellen</i>	28/31	90,3
<i>Gesamtheit der CD235a-positiven Stellen</i>	41/48	85,4

Tabelle 4.3-1 Expression von eNOS auf histologischen Gewebeschnitten

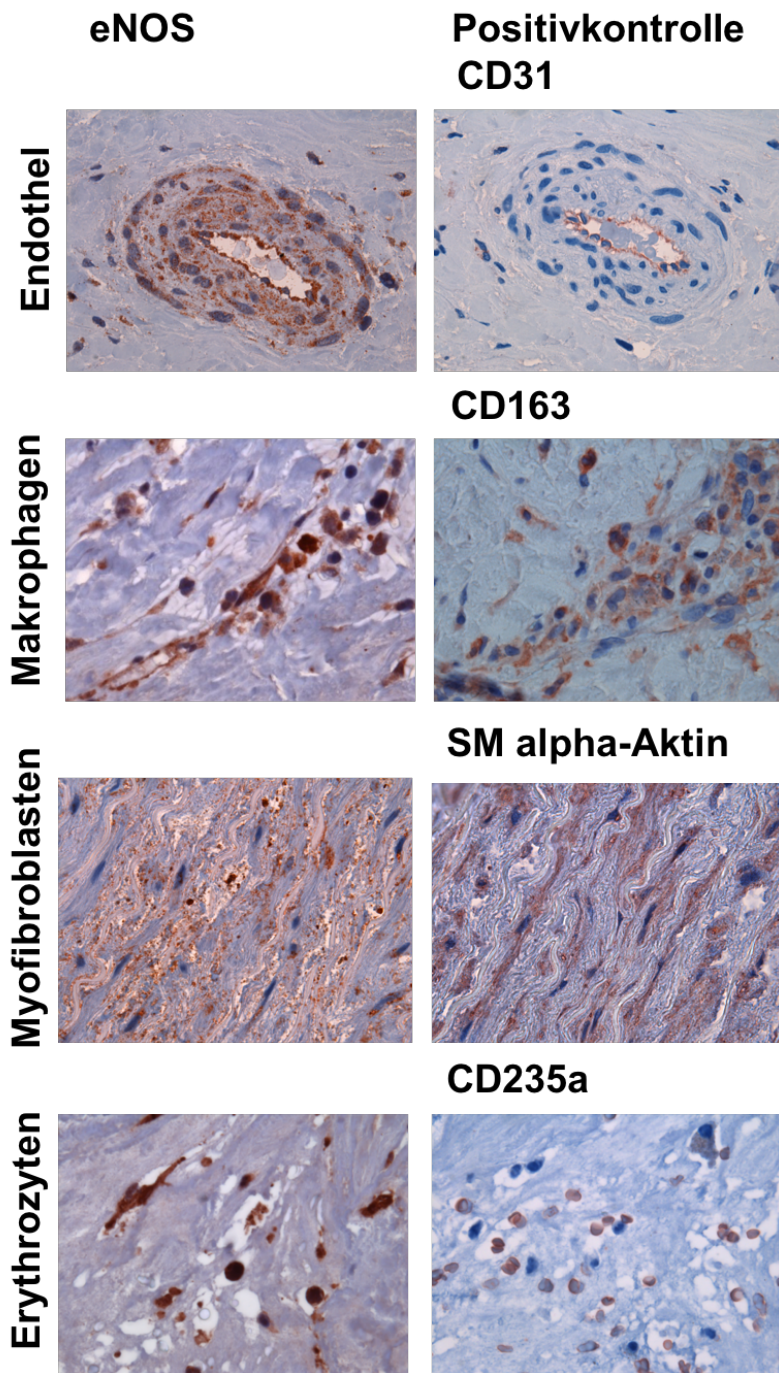


Abbildung 4.3-2 Expression von eNOS durch unterschiedliche Zelltypen

Nachweis der Expression von eNOS und Kolo-kalisation von eNOS-positiven Signalen mit zellspezifischen Markern für verschiedene Zelltypen in immunhistochemischen Färbungen auf Serienschnitten (Signal in rot). 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte immunhistochemische Färbungen:

CD31 zur Darstellung von Endothelzellen, CD163 zur Darstellung von Makrophagen, SM alpha-Aktin zur Darstellung von Myofibroblasten und CD235a zur Darstellung von Erythrozytenmembranen.

4.3.2 eNOS und vaskuläre Kalzifizierung

Zellkulturexperimente der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eNOS aus lysierten Erythrozytenmembranen durch Produktion von NO über den cGMP Signalweg eine Differenzierung von glatten Muskelzellen zu osteoblastenähnlichen Zellen und vaskuläre Kalzifizierung auslösen kann (170). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde dieser Zusammenhang auch histologisch analysiert. Dabei wurden Stellen, die eine Kalzifizierung (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) zeigten, auf Kollokalisation mit Erythrozyten mit Hilfe der Masson-Goldner-Trichrom Färbung bzw. Immunhistochemie von CD235a oder eNOS untersucht. Dabei wurde zwischen Aortenaneurysmata, Aortenklappen, Carotisplaques und der Gesamtheit der analysierten Stellen unterschieden. Hierbei ergab sich insgesamt an 38 von 55 kalzifizierten Stellen (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) eine Kollokalisation mit Erythrozyten in der Masson-Goldner-Trichrom Färbung und an 40 von 55 Stellen (72,7%) waren ebenso CD235a-positive Signale zu sehen. eNOS war an 51 von 55 verkalkten Stellen (92,7%) zu finden, sodass sich auch histologisch ein enger Zusammenhang zwischen vaskulärer Kalzifizierung und dem von eNOS synthetisiertem NO ergibt. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Spezies wird in *Abbildung 4.3-3* graphisch dargestellt. Im Umkehrschluss wurden auch alle eNOS-positiven Stellen auf Kollokalisation mit Markern für Kalzifizierung (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) untersucht. Dabei war in Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques von 66 eNOS-positiven Stellen an 57 (86,4%) zugleich Verkalkung zu finden. Von den eNOS-negativen Stellen war nur eine von 4 (25,0%) kalzifiziert. Der Zusammenhang zwischen eNOS und vaskulärer Kalzifizierung erwies sich mit einem p-Wert von 0.0145 als signifikant. Eine tabellarische Darstellung dieser Ergebnisse ist in *Tabelle 4.3-2* gezeigt.

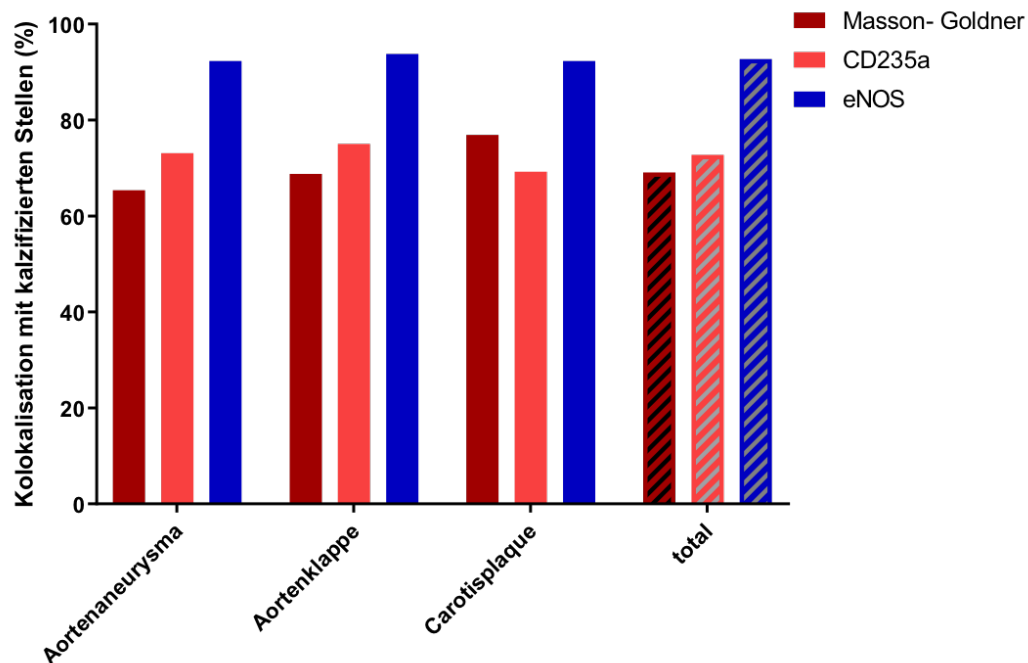


Abbildung 4.3-3 Histologische Kolokalisation von kalzifizierten Stellen mit Erythrozyten (Masson-Goldner), Erythrozytenmembranen (CD235a) und eNOS

Anteil der Kolokalisation von Erythrozyten (Darstellung durch eine Masson-Goldner-Trichrom Färbung in rot/pink), Erythrozytenmembranen (Darstellung durch eine Immunhistochemie von CD235a) und eNOS (Darstellung durch eine Immunhistochemie von eNOS) mit der Gesamtheit der kalzifizierten Stellen (Alizarin S und/oder Periostin positiv) (in %); Unterscheidung zwischen Aortenaneurysmata (n=26), Aortenklappen (n=16), Carotisplaques (n=13) und der Gesamtheit der analysierten Patientenproben (total) (n=55).

	Gesamtheit der kalzifizierten Stellen	Kolokalisation mit eNOS-positiven Stellen	%
Aortenaneurysmata	26	24	92,3
Aortenklappen	16	15	93,8
Carotisplaques	13	12	92,3
TOTAL	55	51	92,7

	Kalzifizierung	Keine Kalzifizierung
eNOS-positiv	57	9
eNOS-negativ	1	3

Tabelle 4.3-2 Bedeutung von eNOS für vaskuläre Kalzifizierung

4.3.3 Effekte gesteigerter NO-Produktion

Auf den histologischen Präparaten zeigte sich eine starke Präsenz von eNOS, was auf eine gesteigerte NO-Synthese und möglicherweise vermehrten oxidativen Stress hindeuten könnte. Dies hat verschiedene Konsequenzen, die sich auch histologisch darstellen ließen. Einer dieser Effekte ist die Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin, welches dann nicht mehr in der Lage ist, NO zu binden. Des Weiteren kommt es zur Nitrosylierung der Tyrosinreste von Proteinen, was ein Indiz für oxidativen Stress ist. Außerdem konnte, wie oben bereits beschrieben, auch histologisch ein Zusammenhang zwischen eNOS und vaskulärer Kalzifizierung aufgedeckt werden. Dazu wurden Methämoglobin- und Nitrotyrosin-positive Stellen auf Kollokalisation mit eNOS untersucht. Gelegentlich waren Stellen in der entsprechenden Färbung im histologischen Präparat weggebrochen und somit nicht zu identifizieren, sodass diese nicht in die Auswertung aufgenommen wurden. Methämoglobin war an allen 52 eNOS-positiven Stellen (100%) angefärbt. An 46 von 52 eNOS-positiven Stellen (92,0%) war auch Nitrotyrosin zu sehen. Kalzifizierung (Alizarin S- und/oder Periostin-positiv) war, wie oben bereits erwähnt, auf 57 von 66 eNOS-positiven Stellen (86,4%) vorhanden. Repräsentative Bilder und eine tabellarische Darstellung dieser Analyse, sind in *Abbildung 4.3-4* und *Tabelle 4.3-3* zu sehen.

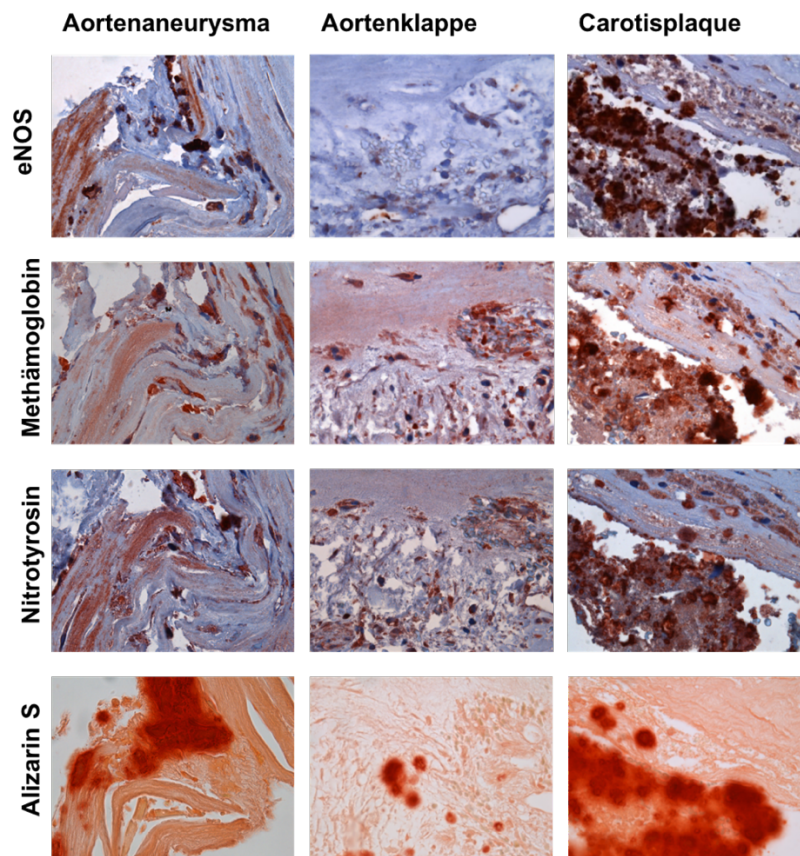


Abbildung 4.3-4 Auswirkungen gesteigerter NO-Produktion durch eNOS

Nachweis der Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin, Entstehung von oxidativem Stress und vaskulärer Kalzifizierung als Konsequenz gesteigerter NO-Produktion durch eNOS, anhand der Kolo-kalisation verschiedener Komponenten auf Serienschnitten. Repräsentative Beispiele aus einem Aortenaneurysma, einer Aortenklappe und einem Carotisplaque. 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte Färbungen:

Immunhistochemie von eNOS zur Darstellung der NO-Produktion (Signal in rot), Immunhistochemie von Methämoglobin zur Darstellung des Oxidationsprodukts von Hämoglobin (Signal in rot), Immunhistochemie von Nitrotyrosin zur Darstellung von oxidativem Stress (Signal in rot) und Alizarin S Färbung zur Darstellung von Hydroxylapatit in rot.

	Gesamtheit der eNOS-positiven Stellen	%
Nitrotyrosin-positiv	46/52	92,0
Kalzifizierungs-positiv	75/66	86,4
Methämoglobin-positiv	52/52	100,0

Tabelle 4.3-3 Auswirkungen gesteigerter NO-Produktion durch eNOS

4.4 Bedeutung von Arginase 1

4.4.1 Expression von Arginase 1

Die Bioverfügbarkeit von NO kann unter anderem auch durch die Expression von Arginase 1 beeinflusst werden, da dieses Enzym mit der NO-Synthase um das Substrat Arginin konkurriert. Daher wurde im Folgenden die Expression von Arginase 1 durch verschiedene Zelltypen auf den histologischen Präparaten analysiert. Dazu wurden alle CD235a-positiven Stellen zur Darstellung von Erythrozytenmembranen, alle SM alpha-Aktin-positiven Stellen zur Darstellung von Myofibroblasten und alle CD163-positiven Stellen zur Darstellung von Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger Rezeptor auf Kolokalisation mit positiven Signalen der immunhistochemischen Färbung von Arginase 1 untersucht. Dabei waren nur 3 von 33 CD235a-positiven Stellen (9,1%) auch Arginase 1-positiv. Eine Kolokalisation mit Arginase 1 war an 20 von 27 SM alpha-Aktin-positiven Stellen (74,1%) und an 16 von 30 CD163-positiven Stellen (53,3%) zu sehen. Diese Daten sind graphisch in *Abbildung 4.4-1* und in *Tabelle 4.4-1* dargestellt. Repräsentative Bilder hierzu werden in *Abbildung 4.4-2* gezeigt.

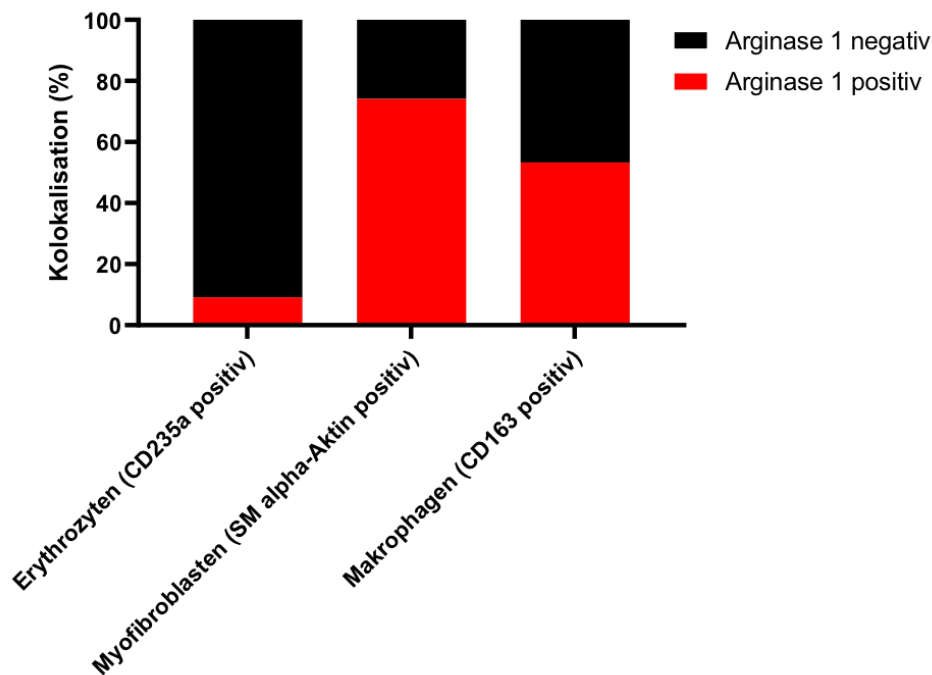


Abbildung 4.4-1 Expression von Arginase 1 auf histologischen Gewebeschnitten

Anteil der Kokalisation von Arginase 1-positiven Signalen der Immunhistochemie mit Gesamtheit der CD235a-positiven Stellen zur Darstellung von Erythrozytenmembranen, n=33; Gesamtheit der SMA-positiven Stellen zur Darstellung von Myofibroblasten, n=27 und Gesamtheit der CD163-positiven Stellen zur Darstellung von Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger Rezeptor, n=30.

	Kokolisationsion mit Arginase 1-positiven Stellen	%
Gesamtheit der CD235a-positiven Stellen	3/33	9,1
Gesamtheit der SMA-positiven Stellen	20/27	74,1
Gesamtheit der CD163-positiven Stellen	16/30	53,3

Tabelle 4.4-1 Expression von Arginase 1 auf histologischen Gewebeschnitten

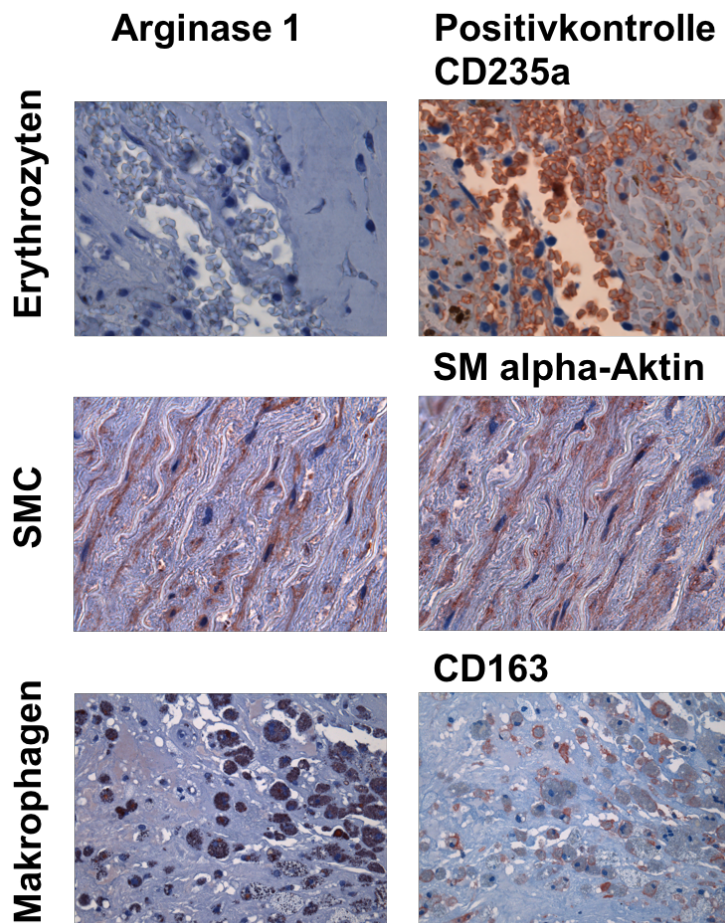


Abbildung 4.4-2 Zelluläre Expression von Arginase 1

Nachweis der Expression von Arginase 1 anhand der Kolo-kalisation von Arginase 1-positiven Signalen mit zellspezifischen positiven Signalen verschiedener Zelltypen in immunhistochemischen Färbungen auf Serienschnitten (Signal in rot). 1000fache Vergrößerung.

Durchgeführte immunhistochemische Färbungen:
 CD235a zur Darstellung von Erythrozytenmembranen, SM alpha-Aktin zur Darstellung von Myofibroblasten und CD163 zur Darstellung von Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger Rezeptor.

5 Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten histologischen Analysen von atherosklerotischen Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques hatten, angelehnt an Zellkulturexperimente der Arbeitsgruppe, zum Ziel, einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen vaskulärer Kalzifizierung und Intraplaquehämorrhagien beim Menschen zu untersuchen. Mit Hilfe verschiedener histochemischer Färbemethoden konnte histologisch dargestellt werden, dass Erythrozyten auf den analysierten Gewebeschnitten extravasal (außerhalb der durch CD31 angefärbten Gefäße) und lysiert vorliegen (174). Zur Darstellung vaskulärer Kalzifizierung wurden osteoblastogene Marker und die Anfärbung von Hydroxylapatit durch eine Alizarin S Färbung etabliert. In kalzifizierenden atherosklerotischen Läsionen waren glatte Muskelzellen zu finden, die osteoblastogene Marker exprimieren. Diese Zellen waren in räumlicher Nähe von Erythrozyten und deren Membranen anzutreffen (174). In der Nähe von Kalzifizierungen lokalisiertes Hämoglobin lag überwiegend als Methämoglobin vor (174). Außerdem wurden zahlreiche, den Hämoglobinrezeptor CD163-exprimierende Makrophagen in den Läsionen angetroffen (174). Zellkulturexperimente der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die in Erythrozytenmembranen exprimierte eNOS durch Produktion von NO eine osteoinduktive Wirkung auf die glatten Muskelzellen hat (170). Daher wurde ein Zusammenhang mit eNOS auch histologisch untersucht. Diese Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

5.1 Osteoblastogenese

5.1.1 Veränderungen in vaskulären glatten Muskelzellen bei Kalzifizierung

Die in dieser Arbeit analysierte vaskuläre Kalzifizierung in Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques ist ein aktiv regulierter Prozess, der Parallelen mit der embryologischen Knochenentwicklung aufweist. Dabei werden in vaskulären glatten Muskelzellen Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Differenzierung der glatten Muskelzellen in einen osteoblastenähnlichen Phänotyp verursachen. Dieser Prozess führt zur Akkumulation von Hydroxylapatitkristallen, welche in dieser Arbeit im histologischen Präparat mit Hilfe einer Alizarin S Färbung dargestellt wurden (131).

Das Vorkommen von Osteoblastogenese in der Gefäßwand konnten bereits frühere Arbeiten anhand eines veränderten Expressionsmusters von Osteoblastenspezifischen Markern zeigen. RT-PCR Analysen in Aortenklappen ergaben eine gesteigerte RNA-Expression von Osteocalcin, Cbfa-1, Osteopontin, „bone

sialoprotein“ und GAPDH in kalzifizierten im Vergleich zu nicht-kalzifizierten Aortenklappen (5). Auch die molekulare Analyse von verkalkten und nicht-verkalkten Arterien zeigte deutliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen: Einerseits kam es in kalzifizierten Arterien zu einer verminderten Expression von „*matrix Gla protein*“ (MGP), Osteonectin, Osteoprotegerin und Aggrecan. Andererseits wurden Proteine wie Alkalische Phosphatase, „*bone sialoprotein*“, Osteocalcin und Kollagen II, reguliert durch die Transkriptionsfaktoren Cbfa 1, MSX-2 und Sox9, vermehrt exprimiert (6). Auch die parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Experimente in glatten Gefäßmuskelzellen zeigten bei Zunahme der Alizarin S-positiv gefärbten Zellen eine gleichzeitig gesteigerte mRNA Expression von Runx2, Osterix und Osteopontin (170). Durch die Untersuchung der Kolo-kalisation von kalzifizierten Arealen mit glatten Muskelzellen, dargestellt durch eine Alizarin S Färbung und den Marker SM alpha-Aktin, konnte auch im histologischen Präparat eine Rolle von glatten Muskelzellen bei der Verkalkung von Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques gezeigt werden.

5.1.2 Verwendete immunhistochemische Marker für osteoblastenähnliche Zellen

Als Marker für Zellen mit einem osteoblastenähnlichem Phänotyp wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Osteopontin und Periostin durchgeführt.

Osteopontin ist ein phosphoryliertes Glykoprotein mit einem sauren Charakter, das multifunktionell agiert. Es spielt unter anderem eine Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen, Karzinomen, Diabetes und Inflammation, indem es die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie Interleukinen reguliert. Auch für Wundheilung, die Lebensfähigkeit von Zellen und die Biomineralisierung ist es von Bedeutung (175). Für diese Arbeit stand die Funktion von Osteopontin bei der Mineralisierung von glatten Muskelzellen im Vordergrund, welche im engen Bezug zu der Rolle von Osteopontin bei der Regulation der Knochenmineralisierung steht. Osteoblasten, Osteozyten und auch Osteoklasten sind in der Lage Osteopontin zu exprimieren. Dabei hat es eine inhibitorische Funktion bei der Bildung von Hydroxylapatit. Jedoch kann diese Wirkung durch eine Dephosphorylierung des Proteins durch die Alkalische Phosphatase begrenzt werden. Auf der anderen Seite kann ein Überschuss an anorganischem Pyrophosphat die Expression und Sekretion von Osteopontin durch Osteoblasten steigern. Begrenzt ist diese Regulierung wiederum durch die Alkalische Phosphatase,

da diese Pyrophosphat spaltet (176). Als zur Familie der SIBLING („*small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein*“) gehörendes Protein kann Osteopontin chemotaktisch auf Osteoklastenvorläuferzellen wirken und diese über Integrin-vermittelte Signalwege aktivieren (177). Über diesen Regelkreislauf kann Osteopontin also das Zusammenwirken von Osteoblasten und Osteoklasten regulieren und dadurch Einfluss auf die Bildung von Hydroxylapatit nehmen. Jedoch wird seine Expression auch durch andere Faktoren wie zum Beispiel Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren oder mechanischen Stress beeinflusst (177). Die Expression von Osteopontin durch andere Zelltypen als osteoblastenähnliche Zellen wie zum Beispiel Skelettmuskelzellen (178), verschiedene Tumorzellen (179) oder Makrophagen (180), aber auch seine Bedeutung als multifunktionelles Zytokin (175) erklären, dass sich Osteopontin im histologischen Präparat eher als unspezifischer Marker erwies, um vaskuläre Kalzifizierung darzustellen. Ein weiterer erschwerender Aspekt beim Nachweis der Differenzierung von glatten Muskelzellen zu osteoblastenähnlichen Zellen durch Kolokalisation mit Osteopontin im histologischen Präparat ist die Tatsache, dass eine erhöhte Expression von Osteopontin in glatten Muskelzellen zu einer Abnahme der Expression von SM alpha-Aktin führt (181). Dadurch ist immunhistochemisch eine Kolokalisation von SM alpha-Aktin und Osteopontin nur begrenzt möglich.

Als weiterer Marker für Osteoblasten wurde Periostin verwendet. Periostin ist ein sekretorisches Protein, das insbesondere in Kollagen-reichem Gewebe zu finden ist, wo es durch proteolytische Aktivierung der Lysyl-Oxidase für eine Cross-link-Bindung zwischen Kollagenmolekülen sorgt. Es wird insbesondere im Knochen, Herz und vaskulären glatten Muskelzellen exprimiert, ist jedoch auch mit Lungenfibrose und dem Knochen-metastasierenden Potential von Lungen- und Brustkrebs assoziiert (182). In vitro Studien zeigten, dass auch Osteoblasten eine Isoform des Proteins sezernieren und eine Überexpression dieses „*Periostin-like-factors*“ zu einer erhöhten Aktivität der Alkalischen Phosphatase und zu vermehrten Kalziumablagerungen führt (183). Außerdem spielt Periostin eine wichtige Rolle bei pathophysiologischen Remodeling-Prozessen, indem es eine Differenzierung von muskulären Zelllinien zu einem fibroblastischen Zelltyp initiiert. Dabei bindet es an extrazelluläre Matrixproteine oder Integrine und aktiviert so intrazelluläre Signalkaskaden, wie zum Beispiel die Rho-Kinase Signaltransduktion, die zu einer Blockade der Muskeldifferenzierung führt und als Regulator von fibroblastischen Vorläuferzellen wirkt (184). Bei der Analyse der histologischen Präparate dieser Arbeit zeigte sich dieser Marker spezifischer als

Osteopontin und kolokalisierte häufiger mit Alizarin S-positiven, also verkalkten, Arealen, und SM alpha-Aktin-positiven glatten Muskelzellen. Daher wurde Periostin als spezifischer Marker für Osteoblasten und vaskuläre Kalzifizierung für diese Arbeit etabliert.

5.2 Erythrozyten-vermittelte vaskuläre Kalzifizierung

5.2.1 Extravasation und Lyse von Erythrozyten im atherosklerotischen Plaque

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von Erythrozyten in atherosklerotischen Plaques und ihre Assoziation mit anderen Prozessen in der Gefäßwand genauer zu analysieren. Dabei zeigte sich in parallel zur histologischen Analyse dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimenten der Arbeitsgruppe, dass Erythrozyten die Kalzifizierung von vaskulären glatten Muskelzellen fördern und für diese Wirkung extravasal und in lysiertem Zustand vorliegen müssen, da die gleiche Proteinmenge an intakten Erythrozyten im Vergleich zu lysierten Erythrozyten zu keinem Alizarin S-positivem Signal führte (170). Histologisch war zu sehen, dass die Mehrheit der im Plaque aufzufindenden Erythrozyten bzw. Erythrozytenbestandteile sich außerhalb der durch eine Immunhistochemie von CD31 dargestellten Blutgefäße des Plaques befand (174). Slumier et al. zeigten bei der Analyse von Plaques aus Koronargefäßen, dass mit der Progression von Atherosklerose auch die Dichte kleiner Gefäße zunimmt, die endotheliale Auskleidung der Gefäßwände bei intakter Basalmembran aber geringer ist und auch, dass interendotheliale Kontakte teilweise unvollständig sind (91). Dadurch erklärt sich die Extravasation von Erythrozyten, die auch deutlich auf den histologischen Präparaten zu sehen war, ohne das offensichtliche Vorliegen einer Gefäßruptur. In der hoch oxidativen Umgebung von atherosklerotischen Läsionen werden diese Erythrozyten dann lysiert, was bedeutet, dass sie in ihre Bestandteile, also Erythrozytenmembranen, Hämoglobin, Eisen und auch Cholesterin und andere, zerfallen. Durch immunhistochemische Anfärbung der einzelnen Bestandteile auf Serienschnitten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass extravasal gelegene Erythrozyten selten intakt bleiben, sondern lysiert werden, sodass ihre Bestandteile im histologischen Präparat immunhistochemisch getrennt angefärbt waren (174).

Verschiedene, in der Literaturdiskussion bereits erwähnte Studien, konnten zeigen, dass IPH die Atheroskleroseprogression fördern (9-11). Hierbei könnte die Akkumulation von freiem Cholesterin aus Erythrozytenmembranen und die folgende Expansion des Lipidkerns ursächlich für die Destabilisation atherosklerotischer Plaques sein (76). Hierdurch sind IPH ein kritischer Faktor für klinische Komplikationen

atherosklerotischer Läsionen, indem sie deren Vulnerabilität erhöhen (185). Lokale Mikrohämorrhagien führten hierbei zu einer gesteigerten Phagozytose von Blutplättchen und Erythrozyten, Eisenablagerung, konsekutiver Aktivierung von Makrophagen und letztendlich zur Schaumzellbildung. Neovaskularisationen können außerdem, neben der Versorgung des Plaques mit Lipoproteinen und Leukozyten, die lokale Plaqueexpansion steigern, wenn Mikrogefäße thrombotisch verschließen oder rupturieren (186). In einer intravaskulären Ultraschallstudie an autopsierten Herzen zeigte sich ebenfalls, dass Koronararteriensegmente mit Einblutungen ausgedehntere atherosklerotische Plaques im Vergleich zu Segmenten ohne Einblutungen präsentieren (187). Vergleichbar mit den Beobachtungen dieser Arbeit konnte in humanen und murinen Aortenaneurysmata ebenfalls ein hohes Maß an IPH und Eisenablagerungen festgestellt werden (188, 189). Bei der für dieses Krankheitsbild typischen Ausdünnung der Gefäßwand, Remodelling und Vergrößerung des Aortendurchmessers (190) ist die typische Komplikation die Ruptur der Gefäßwand mit einer ausgeprägten Einblutung. Trotzdem könnte es durch Stase und Blutgerinnungsbildung bereits in früheren, klinisch stummen Stadien der Erkrankung bereits zu lokaler Akkumulation und Lyse von Erythrozyten kommen. An Stellen, an denen eine Hämolyse von Erythrozyten zu sehen war, konnten in dieser Arbeit durch eine Berliner Blau Färbung ebenfalls Eisen- bzw. Hämosiderinablagerungen dargestellt werden (174). Auch Eisen kann durch eine Verstärkung der Lipidperoxidation, Aktivierung des Endothels und Steigerung der Inflammation die Atheroskleroseprogression fördern (191). Eine Studie an ApoE-Knockoutmäusen konnte zeigen, dass eine Mutation des Eisenexporters Ferroportins, welche in erhöhten Eisenkonzentrationen im Blut resultiert, zu verstärkter vaskulärer Kalzifizierung führt (192). Umgekehrt konnte eine andere Studie demonstrieren, dass eine alimentäre Eisenrestriktion bei Mäusen die Atheroskleroseprogression reduzieren kann (193). Durch die toxischen Effekte des Eisens kann es zur Apoptose glatter Muskelzellen kommen, was die Rupturgefahr atherosklerotischer Läsionen fördert (194, 195). Die Akkumulation von Eisen in atherosklerotischen Aortenaneurysmata kann durch Makrophagenaktivierung und –rekrutierung die Inflammation der Aortenwand potentieren (196). Eine hierdurch bedingte erhöhte Aktivität der Matrix-Metalloproteasen könnte folglich ebenfalls Hämorrhagien fördern (197).

5.2.2 Bedeutung von Erythrozytenmembranen für vaskuläre Kalzifizierung

Um zu untersuchen, welcher Bestandteil von Erythrozyten an der vaskulären Kalzifizierung beteiligt ist, wurden neben der histologischen Analyse

Zellkulturexperimente durchgeführt. Dabei wurden humane arterielle glatte Muskelzellen in osteogenetischem Medium mit Vollblut, lysierten und intakten Erythrozyten und isolierten Erythrozytenmembranen inkubiert. Der stärkste Effekt der Verkalkung in der Alizarin S und van Kossa Färbung zeigte sich nach Inkubation mit den Erythrozytenmembranen und dieser Effekt trat Dosis-abhängig auf. Auch ex vivo Experimente, bei denen murine Aortenringe mit unterschiedlichen Konzentrationen von Erythrozytenmembranen inkubiert wurden, konnten zeigen, dass der osteoinduktive Mediator von Erythrozyten in deren Membran lokalisiert sein muss (170).

Ein kalzifizierender Effekt der Lipidbestandteile, insbesondere von Cholesterin in der Erythrozytenmembran, konnte jedoch durch Zellkulturexperimente ausgeschlossen werden (170). In Erythrozytenmembranen sind neben Cholesterin und Phospholipiden (79, 80) auch verschiedene Proteine lokalisiert. Diese sind meist Integral- oder Transmembranproteine, die als Transporter oder Kanäle dienen (198). Dabei funktionieren sie unter anderem als Bindungsmoleküle, Proteine mit katalytischer Aktivität oder als Signaltransduktoren. Außerdem sorgen sie durch ihre strukturelle Aktivität auch für Elastizität und Plastizität, was für die Anpassung von Erythrozyten an ihre Umgebung besonders wichtig ist (199). In Erythrozytenmembranen wird jedoch auch die endotheliale Isoform der NO-Synthase (eNOS) exprimiert (173). Dieses Enzym, das vor allem im Gefäßendothel exprimiert wird, ist in der Lage L-Arginin unter Verwendung von molekularem Sauerstoff zu L-Citrullin und NO umzuwandeln. In Erythrozyten ist es an der zytoplasmatischen Seite der membranösen Doppelschicht zu finden und wird durch sein Substrat L-Arginin, Kalzium und Phosphorylierung durch die IP3-Kinase reguliert (173). Die Funktion des erythrozytär produzierten NO ist allerdings umstritten. Es gibt Studien, die zeigen konnten, dass NO die Deformabilität der Erythrozyten reguliert und die Aggregation von Plättchen inhibiert (173, 200). Diederich et al. hingegen konnten demonstrieren, dass NO die Verformbarkeit der Erythrozyten nicht verändert, aber unter oxidativem Stress erhält (201). Eine weitere Studie zeigte, dass die Expression von eNOS in Erythrozyten von Patienten mit Koronarer Herzerkrankung niedriger ist und mit dem Grad an endothelialer Dysfunktion korreliert (202). Diese Daten lassen vermuten, dass das von Erythrozyten produzierte NO auch eine Rolle bei der Regulation des Vasotonus spielt. Im Gegensatz zu diesen Studien steht die Hypothese, dass Erythrozyten als potente NO-Scavenger agieren und so beispielsweise die inhibitorische Wirkung von NO auf Plättchen aufheben können (171). In der vorliegenden Arbeit wurde eNOS in Erythrozytenmembranen auf

seine Wirkung als osteoinduktiver Mediator und somit in seiner Bedeutung für vaskuläre Kalzifizierung untersucht.

5.2.3 Bedeutung von Hämoglobin für vaskuläre Kalzifizierung

Der Hauptproteinbestandteil von Erythrozyten setzt sich zu über 95% aus Hämoglobin zusammen, welches Sauerstoff in der Lunge zum Transport reversibel bindet und im Gewebe wieder abgibt. Eine Studie, die die Interaktion zwischen roten Blutzellen und Plättchen über den Guanylatzyklase-Signalweg untersuchte, konnte zeigen, dass dieser NO-vermittelte Signalweg bei intakten Erythrozyten nicht möglich ist. Das könnte daran liegen, dass das von Erythrozyten produzierte NO durch den potenten NO-Scavenger Hämoglobin gebunden und somit inaktiviert wird (171). Dieses Phänomen erklärt auch, warum der kalzifizierende Effekt in den oben erwähnten in vitro Experimenten nur bei lysierten und nicht bei intakten Erythrozyten zu sehen war. Die Beobachtung, dass bei der Rückgabe des vorher isolierten Hämoglobins zu den Erythrozytenmembranen in die Zellkultur der kalzifizierende Effekt in den glatten Muskelzellen ausblieb, verdeutlicht die Wirkung von Hämoglobin als potentiellen NO-Scavenger, der in der Lage ist die Wirkung von NO zu unterbinden (170). Auch die histologischen Analysen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass an Stellen, an denen intakte Erythrozyten vorlagen, meist keine Verkalkung zu sehen war. Im Gegensatz dazu waren Stellen mit lysierten Erythrozytenbestandteilen deutlich mit Verkalkung assoziiert (174). An diesen Stellen war jedoch auch der potentielle NO-Scavenger Hämoglobin nachweisbar, der durch Inaktivierung des von eNOS in Erythrozytenmembranen produzierten NOs die kalzifizierende Wirkung auf glatte Muskelzellen verhindern könnte. Aus diesem Grund wurden diese Stellen auf mögliche Mechanismen der Inaktivierung von Hämoglobin als NO-Scavenger untersucht, die es erlauben, dass das von den ebenfalls angefärbten Erythrozytenmembranen freigesetzte NO zu den glatten Muskelzellen diffundieren und vaskuläre Kalzifizierung verursachen kann.

Dazu wurden insbesondere zwei Mechanismen untersucht: Zum einen die Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin, das so nicht mehr in der Lage ist, NO zu binden, und zum anderen die Eliminierung von Hämoglobin durch Makrophagen, die den Hämoglobin-Scavenger Rezeptor CD163 exprimieren.

Die Bindungseigenschaften von Hämoglobin für Sauerstoff sind abhängig von verschiedenen Faktoren. Zur Bindung von Sauerstoff muss das zentrale Eisenion von Hämoglobin in seiner reduzierten Form, also in einer zweiwertigen Oxidationsstufe

vorliegen. Außerdem wird die Affinität zu Sauerstoff allosterisch durch diesen selber beeinflusst, sodass die Bindung von Sauerstoff eine Konformationsänderung von dem niedrig affinen „*T(tense)-state*“ zu dem hoch affinen „*R(relaxed)-state*“ verursacht. Dieses Phänomen nennt man kooperativer Effekt. Auch die Bindungsaffinität von NO zu Hämoglobin hängt von dessen biochemischem Zustand ab. So bindet NO an reduziertes, also zweiwertiges, Hämoglobin mit einer viel höheren Affinität als an oxidiertes, dreiwertiges Hämoglobin. Auch der Oxygenierungsgrad von Hämoglobin geht mit einem veränderten Verhalten bei der Bindung von NO einher. Oxygeniertes Hämoglobin reagiert mit NO zu Methämoglobin und Nitrat, wodurch das Signalmolekül NO irreversibel inaktiviert wird. Bei desoxygeniertem Hämoglobin im „*T-state*“ liegt eine größere Dissoziationsrate von NO vor als im oxygenierten „*R-state*“, sodass in diesem Zustand NO nur reversibel gebunden und sehr langsam freigesetzt wird. So bleibt die Wirkung von NO teilweise erhalten. Dies würde auch erklären, warum der NO-vermittelte Signalweg für vaskuläre Kalzifizierung im atherosklerotischen Plaque möglich ist. Im Gewebe bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck kommt es physiologisch zur Desoxygenierung von Hämoglobin, sodass auch extravasal im atherosklerotischen Plaque Hämoglobin im desoxygenierten Zustand zu finden sein müsste und das NO-Scavenging dadurch reversibel ist. Ein kooperativer Effekt ist bei der Bindung von NO im Vergleich zur Sauerstoffbindung jedoch nicht gegeben. Außerdem herrscht im atherosklerotischen Plaque ein hoch oxidatives Milieu vor, sodass es höchst wahrscheinlich zu einer Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin kommt. Auch auf den histologischen Präparaten dieser Arbeit zeigte sich, dass Hämoglobin an über 92,6 % der analysierten Stellen als Methämoglobin vorlag (174). Die Oxidation von Hämoglobin ist als Möglichkeit der Erhaltung der NO-Bioaktivität bekannt, sodass der kalzifizierende Effekt von NO an Stellen mit lysierten Erythrozyten nicht behindert wird. Zwar besitzt auch Methämoglobin die Fähigkeit NO zu binden, hat jedoch gleichzeitig eine sehr schnelle Dissoziationsrate. Dadurch verhindert Methämoglobin im Vergleich zu Hämoglobin nicht die Wirkung von NO auf glatte Muskelzellen (172). Eine weitere Studie untersuchte dieses Phänomen auch in vivo: Dabei wurde der vasokonstriktorisches Effekt von NO als Indikator für dessen Bioverfügbarkeit verwendet. Hier konnten neben freiem Hämoglobin auch 50-100 nm große Mikropartikel, die sich durch Fragmentierung bei Lagerung von roten Blutzellen bilden, bei Infusion in Ratten als potente Vasokonstriktoren wirken. Im Gegensatz dazu war der Effekt bei der Infusion von Methämoglobin und Cyanomethämoglobin reduziert, was zeigt, dass oxidiertes Hämoglobin kein potenter NO-Scavenger ist (203).

Erythrozyten sind außerdem in der Lage bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck und auch niedrigem Gehalt an Nährstoffen wie Leucin und Glukose Nitrit durch desoxygeniertes Hämoglobin zu NO zu reduzieren (204). Dabei entstehen instabile Metaboliten, wie an desoxygeniertes Hämoglobin gebundenes Nitrit, und ein Hybrid aus reduziertem und oxidiertem Hämoglobin mit reduziertem Nitrit. Diese Intermediate haben eine sehr hohe Affinität zu Erythrozytenmembranen, was bei Bindung zu einer Konformationsänderung und somit zu einer vereinfachten Freisetzung von NO führt (205). Dieser Effekt könnte zusätzlich zu der NO-Produktion durch eNOS in Erythrozytenmembranen den NO-Gehalt im Plaque steigern und zu der Differenzierung von glatten Muskelzellen zu osteoblastenähnlichen Zellen beitragen.

Zur Klärung eines weiteren Mechanismus der Inaktivierung der NO-Scavenger Funktion von Hämoglobin wurde die Eliminierung durch Makrophagen mit Hämoglobin-Scavenger Rezeptor untersucht. CD163-positive Makrophagen exprimieren diesen Hämoglobin-Scavenger Rezeptor und sind so in der Lage lysierte Erythrozytenkomponenten zu phagozytieren und dadurch eisenhaltiges Hämoglobin zu entfernen (206). Sie werden durch die Aufnahme von Hämoglobin den antiinflammatorischen und plaqueprotektiven M2-Makrophagen zugeordnet (62, 207-210). Bei der Hämolyse wird Hämoglobin aus dem Erythrozyten freigesetzt, welches mit Haptoglobin Komplexe bildet und so abgefangen wird. Der CD163 Rezeptor bindet diese Komplexe hoch affin, sodass die Makrophagen sie nach Endozytose abbauen können (207). Die Expression dieses Rezeptors wird dabei durch Hämoglobin selber gesteigert, was auch erklärt, dass CD163-positive Makrophagen, wie auch in unserer Studie, im atherosklerotischen Plaque insbesondere perivaskulär an Stellen mit Neovaskularisationen und Einblutungen zu finden waren (174, 211). In einer anderen Studie wurde dabei entdeckt, dass diese Makrophagen keine Schaumzellmarker exprimieren und einen geringeren Cholesteringehalt haben. Durch die gesteigerte Eliminierung von Hämoglobin wird auch der intrazelluläre Eisengehalt gesteigert, weshalb der Eisen-Exporter Ferroportin vermehrt exprimiert wird und so der Eisengehalt in den Makrophagen sinkt. Durch den Abfall der Eisenkonzentration werden ABC-Transporter hochreguliert, die für den Efflux von Cholestein sorgen (212). Auch eine Analyse von Aortenaneurysmata zeigte die Nähe von CD163-positiven Makrophagen zu Stellen mit Neovaskularisation und Hämosiderin. Hier konnte gezeigt werden, dass freies Hämoglobin chemotaktisch auf CD163-positive Makrophagen wirkt und deren Differenzierung aus Monozyten fördert (213). Gegensätzlich zu diesen Studien sind Beobachtungen, die CD163 positive Makrophagen in Zusammenhang mit

Plaquetprogression, gesteigerter Angiogenese und Inflammation bringen (214). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass eine erhöhte Anzahl an CD163 exprimierenden Zellen, genauso wie weitere Marker für M2-Makrophagen, in humanen Aortenklappen mit pathologischer Kalzifizierung und weniger in nicht-kalzifizierten Aortenklappen zu finden waren (215). Auf den histologischen Präparaten der vorliegenden Arbeit erwies sich die Präsenz dieser Makrophagen an Hämoglobin-reichen Stellen als nicht sehr konstant, sodass an kalzifizierten Stellen eine alleinige Inaktivierung des Hämoglobins durch CD163-positive Makrophagen nicht nachweisbar war. Möglicherweise waren die Läsionen schon zu stark fortgeschritten und dieses Entwicklungsstadium bereits passiert.

5.2.4 Bedeutung von Arginase 1 für vaskuläre Kalzifizierung

Bei der Lyse von Erythrozyten wird neben Hämoglobin und Erythrozytenmembranen außerdem Arginase 1 frei. Arginase 1 ist ein weiterer limitierender Faktor der NO-Bioverfügbarkeit, da dieses Enzym mit eNOS um das Substrat L-Arginin konkurriert, indem es dieses zu Harnstoff und L-Ornithin abbaut (203). In Zellkulturexperimenten zu dieser Arbeit zeigte sich daher, dass durch Zugabe des Arginase-1-Inhibitors L-Norvalin der kalzifizierende Effekt von Erythrozytenmembranen signifikant gesteigert werden konnte (170). Auch Waleed Barakat et al. konnten in Ratten zeigen, dass eine Inhibition von Arginase unter anderem wegen erhöhter Produktion von NO effektiv gegen experimentell induzierte Schlaganfälle wirkt (216). Auf den histologischen Schnitten dieser Arbeit war an Stellen mit Einblutung und Verkalkung jedoch kaum Arginase 1 angefärbt, was darauf hinweisen könnte, dass hier genug NO produziert werden konnte, um auf die glatten Muskelzellen zu wirken.

5.3 NO als osteoinduktiver Mediator

5.3.1 Mögliche Signalwege

Das von eNOS aus Erythrozytenmembranen synthetisierte NO erwies sich in dieser Arbeit als osteoinduktiver Mediator, der vaskuläre und valvuläre Verkalkung auslöst. Histologisch wurde dies durch Kolo-kalisation von Erythrozyten und eNOS mit Markern für Hydroxylapatit und Osteoblasten analysiert. Durch NO kommt es zu einer Differenzierung von glatten Muskelzellen zu Zellen mit osteoblastärem Phänotyp. Auch ex vivo Experimente unserer Arbeitsgruppe veranschaulichen diese Aussage: Die Inkubation von murinen Aortenringen mit dem NO-Donor DETA-NO führte zu einer signifikanten Erhöhung des Alizarin S-positiven Signals. Ebenso hatte in parallelen

Zellkulturanalysen DETA-NO eine kalzifizierende Wirkung auf humane arterielle glatte Muskelzellen (170), sodass sich NO auch hier als Signalmolekül erwies. Veränderungen der NO-Bioverfügbarkeit bestätigen diese Beobachtung. So konnte das Alizarin S-positive Signal sowie die mRNA Expression von Osteoblastenmarkern durch Koinkubation von Erythrozytenmembranen mit dem NO-Scavenger PTIO und den NOS-Inhibitor L-NNA signifikant gesenkt und durch L-Norvalin, einen Inhibitor von Arginase 1, gesteigert werden (170). Auch weitere Studien befassten sich mit der Bedeutung von NO für die Differenzierung von Osteoblasten. Deren Befunde zeigen, dass es zu einer Aktivierung der sGC (lösliche Guanylatzyklase), der Produktion von cGMP und letztendlich zu einer Aktivierung der Proteinkinase G, die dann den Transkriptionsfaktor Runx2 phosphoryliert, kommt (217, 218). Diese Wirkung von NO über den Guanylatzyklase-Signalweg konnte auch durch unsere Zellkulturexperimente gezeigt werden, in denen die Verkalkung und Expression von Osteoblastenmarkern bei gleichzeitiger Inkubation von humanen glatten Muskelzellen mit humanen Erythrozytenmembranen und dem Inhibitor der Guanylatzyklase ODQ im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Erythrozytenmembranen signifikant abnahm (170). Diese Rolle von NO bei vaskulärer Kalzifizierung lässt sich durch eine parallele Bedeutung in der Knochenmineralisierung unterstreichen, da auch knochenbildende Zellen eNOS exprimieren und das produzierte NO die Proliferation und Differenzierung dieser osteoblastischen Zelllinien steigert (219, 220). Auch Experimente mit exogenen NO-Donatoren ergaben eine gesteigerte Mineralisierung und Knochenbildung durch erhöhte Produktion von intrazellulärem cGMP und erhöhten mRNA-Leveln von Osteocalcin (221, 222). Bestätigt wird diese Funktion von eNOS durch eine reduzierte osteoblastische Differenzierung und folglich auch Mineralisierung durch Zugabe von eNOS-Inhibitoren (222, 223). Studien in eNOS-Knockoutmäusen, bei denen man durch reduzierte Osteoblastenaktivität Defekte in der Knochenentwicklung beobachtete, zeigen ebenfalls die Wichtigkeit von eNOS und NO für die Funktion von Osteoblasten (224).

Ein weiterer möglicher, sGC-unabhängiger Signalweg ist eine direkte Interaktion zwischen NO und β -Catenin (225). So kommt es durch erhöhte Expression von β -Catenin zu gesteigerter Osteoblastogenese (226). Dieser wurde jedoch nicht näher untersucht.

5.3.2 Bedeutung von eNOS für die vaskuläre Kalzifizierung

In dieser Arbeit konnte eine Kolo-kalisation und damit ein Zusammenhang zwischen eNOS und Verkalkung in Aortenaneurysmata, Aortenklappen und Carotisplaques gezeigt werden. Physiologisch ist eNOS an der Regulation des Blutdrucks durch eine NO vermittelte Vasodilatation beteiligt. Dies geschieht in größeren Gefäßen ebenfalls durch eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC), sodass es cGMP-vermittelt zu einer Aktivierung der Proteinkinase G und letztendlich zu einer Relaxation von vaskulären glatten Muskelzellen kommt. In kleineren Widerstandsgefäßen ist diese Relaxation Superoxid-vermittelt (227). Daher werden Patienten mit Angina pectoris, für die meistens eine endotheliale Dysfunktion ursächlich ist, auch mit Nitraten behandelt, um Ischämien im Herzmuskel zu vermeiden (228). Diese exogene Zufuhr von Nitraten ist jedoch auch kritisch zu betrachten, da es durch Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies zu weiteren vaskulären Schäden kommen kann (229, 230). Durch die modifizierbaren Risikofaktoren Diabetes mellitus, Rauchen, Hypercholesterinämie oder Bluthochdruck entsteht der frühe vaskuläre Organschaden der endothelialen Dysfunktion. Dieser ist prädiktiv für die Entstehung von Atherosklerose (230). Leider konnte der Einfluss dieser Faktoren auf die Pathogenese und das Stadium der vaskulären Kalzifizierung in den Patientenproben dieser Arbeit nicht untersucht werden, da hierzu klinische Angaben fehlten. Da es sich um humane Proben handelt, die im Rahmen einer Operation von Patienten entnommen wurden, ist nicht auszuschließen, dass neben den Erythrozyten noch weitere Faktoren zur Gefäßverkalkung beigetragen haben. Die Indikation einer Operation lässt jedoch vermuten, dass sich die Patienten bereits in einem fortgeschrittenem Stadium des vaskulären Schadens befanden, sodass von einer endothelialen Dysfunktion ausgegangen werden kann.

5.3.3 Konsequenzen einer eNOS-Defizienz

In scheinbarem Widerspruch zu den Beobachtungen dieser Arbeit, dass die NO-Synthese durch eNOS in Erythrozytenmembranen ursächlich für vaskuläre Kalzifizierung ist, stehen vorangehende Studien in systemischen eNOS-Knockoutmäusen. Diese Mäuse entwickeln im Vergleich zu Wildtypmäusen Bluthochdruck (19), der ein bekannter Risikofaktor für Atherosklerose ist und für sich alleine eine Erklärung für eine verstärkte Atherosklerose darstellt. Untersuchungen an Mäusen mit einem gleichzeitigen eNOS- und Apolipoprotein E (ApoE)-Knockout im Vergleich zu Mäusen mit alleiniger Deletion von ApoE ergaben signifikant größere atherosklerotische Läsionen in den Doppelknockoutmäusen. Dabei entwickelten die

Doppelknockoutmäuse periphere koronare Atherosklerose mit perivaskulärer und myokardialer Fibrose, was bei den ApoE-Knockoutmäusen nicht der Fall war. Außerdem kam es in den Mäusen mit eNOS-Defizienz neben Bluthochdruck auch zu erhöhter linksventrikulärer Wanddicke. Männliche Tiere entwickelten zusätzlich atherosklerotische Aortenaneurysmata mit folgender Aortendissektion (22). Durch die in Abschnitt 5.3.2 beschriebene physiologische Bedeutung von eNOS für vaskuläre Funktionen und die Blutdruckregulation ist die gesteigerte Atheroskleroseprogression in diesem Doppelknockoutmodell am ehesten eine indirekte Folge der endothelialen Dysfunktion und des systemischen Bluthochdrucks. Andererseits gibt es Studien, die der alleinigen Ursache des erhöhten Blutdrucks für die gesteigerte Atherosklerose widersprechen. Chen et al verglichen die Läsionsgröße in ApoE/eNOS-Knockoutmäusen bei Therapie der Hypertonie mit Hydrazalin mit der von hypertensiven Doppelknockoutmäusen. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Läsionsgröße und die Mäuse entwickelten trotzdem abdominale Aortenaneurysmata (231). Eine weitere Studie an Aortenklappen zeigte, dass eNOS in der Lage ist, die profibrotische Aktivität von valvulären interstitiellen Zellen zu hemmen. eNOS-Knockoutmäuse weisen eine erhöhte Prävalenz an bikuspiden, statt trikuspiden, Aortenklappen auf. Diese zeigten, unabhängig von der eNOS-Defizienz, nach 18 Monaten einen signifikanten Anstieg von Kalzifizierung und Apoptose, was bei trikuspiden Klappen nicht gegeben war (232). Die bikuspidale Klappenanatomie geht mit gesteigertem hämodynamischen Stress einher (233) und gleichzeitig beinhalten bikuspidale Aortenklappen mehr Gefäße und Immunzellen (234). Das könnten mögliche Ursachen für die gesteigerte Atheroskleroseprogression und Verkalkung in diesen Klappen sein. Neben diesen Auswirkungen einer globalen eNOS-Defizienz wurde außerdem ein Anstieg der Plasmainsulinkonzentrationen, der zu einer Dysbalance in Insulin-abhängigen Signalwegen führt und vasokonstriktive Effekte mit Folgen auf die vaskuläre Funktion der Koronargefäße hat, entdeckt (235). Auch die Niere erleidet Schäden beim Fehlen von eNOS, da es neben Hypertonie und gesteigerter Atherosklerose zu einem Anstieg der Kreatininkonzentration, glomerulären Lipidablagerungen und Kalzifizierung kommt (236). Paradoxe Weise bleiben die Lipoproteinkonzentrationen im Plasma unverändert. Es kommt durch eine eNOS-Defizienz sogar zu einer geringeren Oxidation von LDL und somit zu einer reduzierten „fatty streak“ Bildung (237). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich allerdings mit der spezifischen Wirkung der erythrozytären eNOS im Rahmen von IPH, bei denen die Erythrozyten meist lysiert außerhalb von Gefäßen vorliegen und so andere

Wirkungsmechanismen zeigen können, als wenn sie intakt sind und sich innerhalb von Blutgefäßen befinden. Die eNOS, welche global und an anderer Stelle protektiv gegen Atherosklerose wirkt, hat in dieser Situation durch Steigerung der vaskulären Kalzifizierung eine proatherogene Wirkung.

5.3.4 Konsequenzen einer eNOS-Überexpression

Passend dazu fanden auch andere Gruppen, dass auch eine Überexpression von eNOS nicht vor Atheroskleroseprogression schützt, sondern diese eher fördert. Bei erhöhter Expression von eNOS steigt gleichzeitig auch die Produktion von Superoxidradikalen, welche weiter zu Peroxynitrit reagieren (238). Als Konsequenz waren in Mäusen, die eNOS überexprimieren, signifikant größere atherosklerotische Läsionen zu finden (239). Durch die gesteigerte NO-Synthese kommt es zu einem Mangel an dem obligatorischen Cofaktor Tetrahydrobiopterin und somit zu endothelialer Dysfunktion, die sich durch eine gesteigerte Synthese von Superoxiden äußert. So konnte die Läsionsgröße durch Substitution von Tetrahydrobiopterin reduziert werden (239). Ebenso konnte durch eine zusätzliche Überexpression des geschwindigkeitslimitierenden Enzyms der Tetrahydrobiopterinsynthese die Produktion von Superoxiden und somit auch die Läsionsgröße reduziert werden (240). Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass Superoxide zur Entstehung von oxidativem Stress führen. Dadurch kommt es zu einer Modifikation von Lipoproteinen und Phospholipiden, was zu pathologischen Remodelingprozessen und zu einer Förderung der Atherogenese führt (241). Auch in den Patientenproben dieser Arbeit lässt sich der Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Kalzifizierung histologisch nicht ausschließen. Als Indikator für oxidativen Stress wurde eine Immunhistochemie von Nitrotyrosin durchgeführt, welche eine Nitrosylierung von Proteinresten bei gesteigerter NO-Produktion darstellt. Stellen mit vaskulärer Kalzifizierung und eNOS-positiven Signalen kolokalisierten oft auch mit Nitrotyrosin-positiven Signalen. Jedoch konnte in parallel zur Histologie durchgeführten Zellkulturexperimenten nachgewiesen werden, dass der kalzifizierende Effekt der NO-produzierenden Erythrozytenmembranen nicht in der Entstehung von oxidativem Stress liegt. Hierzu wurden humane arterielle glatte Muskelzellen zusätzlich zu Erythrozytenmembranen mit Antioxidantien wie Superoxiddismutase und/oder Katalase in osteogenetischem Medium inkubiert. Dabei ließ sich der Effekt der Erythrozytenmembranen nicht aufheben, sodass man keine Unterschiede im Alizarin S-positivem Signal im Vergleich zu Erythrozytenmembranen allein sah (170). Allerdings sind Untersuchungen in vitro an einem singulären Zelltyp

auch nicht vollständig auf die in vivo Situation übertragbar, so dass dieser Punkt offen bleiben muss.

5.3.5 Bedeutung der erythrozytären eNOS für vaskuläre Kalzifizierung

In Hinblick auf die unterschiedlichen Ergebnisse in Studien an eNOS-defizienten oder -überexprimierenden Mäusen ist vor allem die Tatsache problematisch, dass eNOS, wie in dieser Arbeit histologisch gezeigt werden konnte, von verschiedenen Zelltypen exprimiert wird. Um die alleinige Wirkung von eNOS in Erythrozytenmembranen zu demonstrieren, ohne den Einfluss weiterer Faktoren wie endothelialer Dysfunktion, Hypertonie oder fibrotischem Remodelling, wäre ein zellspezifischer Knockout von eNOS in Erythrozyten notwendig. Da dieses Modell nicht zur Verfügung stand, wurden ex vivo und in vivo Experimente etabliert, um Unterschiede in der Wirkung von Erythrozyten mit eNOS und ohne eNOS (aus ubiquitären eNOS-Knockoutmäusen) auf die Verkalkung von vaskulären glatten Muskelzellen zu untersuchen. Ex vivo wurden Aortenringe von Wildtypmäusen und eNOS-Knockoutmäusen jeweils mit lysierten roten Blutzellen von Wildtypmäusen und eNOS-Knockoutmäusen in osteogenetischem Medium inkubiert. Anschließend wurde das Alizarin S-positive Signal quantifiziert, sowie die mRNA Expression von Runx2 und Osterix. Hierbei konnten die aus Wildtypmäusen, eNOS-exprimierenden, isolierten Erythrozyten in beiden Typen von Aortenringen signifikant die Marker für Verkalkung steigern, wohingegen der Effekt bei Erythrozyten der Knockoutmäuse nicht gegeben war (170). Auch in vivo Experimente konnten deutlich machen, dass Erythrozyten einen kalzifizierenden Effekt haben, der abhängig von deren eNOS Expression ist. Dazu wurde bei ApoE-Knockoutmäusen nach vierwöchiger cholesterinhaltiger Diät durch eine vaskuläre Verletzung der Arteria carotis communis die Ausbildung einer Neointima induziert (242). Drei Wochen später wurden isolierte Erythrozytenmembranen von Wildtypmäusen und eNOS-defizienten Mäusen direkt in die Neointima injiziert. Nach Entnahme sechs Wochen später konnte man in Färbungen zur Darstellung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase sowie nach Alizarin S und van Kossa Färbung sehen, dass vor allem die Injektion von Wildtyperythrozyten, also eNOS-exprimierenden roten Blutzellen, eine vaskuläre Kalzifizierung verursachen konnte, während dieses Phänomen nach Injektion von Erythrozyten aus eNOS-defizienten Mäusen weniger häufig auftrat (170).

Diese Experimente legen die zellspezifische Wirkung von eNOS exprimierenden Erythrozyten auf glatte Muskelzellen nahe, was durch die histologische Untersuchung

humane Schnitte leider nicht möglich ist, da diese möglichen anderer Einflussfaktoren ausgesetzt waren bzw. ein Endstadium der Erkrankung darstellen. Histologisch wurden Patientenproben untersucht, in denen bereits IPH und Kalzifizierung stattgefunden haben, was zeigt, dass es sich bereits um fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen handelt. Aus diesem Grund stehen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht in Widerspruch mit einer protektiven Funktion von eNOS bei einem gesunden Endothelium. In der Situation von IPH und Hämolyse wirkt eNOS aus Erythrozytenmembranen proatherogen, indem glatte Muskelzellen NO-getriggert zu osteoblastischen Zellen differenzieren, was in dieser Arbeit histologisch veranschaulicht werden konnte.

6 Zusammenfassung

Vaskuläre Kalzifizierungen und Intraplaquehämorrhagien sind bedeutende Komplikationen fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob und über welche molekularen Mechanismen Erythrozyten im Rahmen von IPH zu dem Prozess vaskulärer Kalzifizierungen beitragen. Hierzu wurde eine histologische Analyse humaner kalzifizierter stenotischer Aortenklappen, abdomineller Aortenaneurysmata und atherosklerotischer Carotisplaques durchgeführt. Durch Kolo-kalisation des Markers SM α -Actin mit Hydroxylapatitkristallen, dargestellt durch eine Alizarin S Färbung, konnte auch histologisch gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen an der Entstehung vaskulärer Verkalkungen beteiligt sind und dass eine Differenzierung in einen osteoblastischen Phänotyp dabei eine Rolle spielt. Als spezifischer Marker für frühe Stadien der vaskulären Kalzifizierungen und Osteogenese dieser Zellen wurde Periostin verwendet. Der zusätzlich untersuchte Marker Osteopontin zeigte sich im Gegensatz dazu als weniger spezifisch. Bei Analyse des Phänomens von IPH zeigte sich histologisch, dass die Mehrheit der Erythrozyten extravasal, also außerhalb des von CD31-positiven Endothelzellen ausgekleideten Gefäßlumens zu finden war. Durch das oxidative Medium innerhalb atherosklerotischer Läsionen werden die extravasierten Erythrozyten lysiert, was sich histologisch durch eine getrennte Anfärbung von Erythrozytenmembranen, Hämoglobin und Eisen äußerte. Die osteoinduktive Wirkung von Erythrozyten war in vitro vorwiegend bei lysierten und nicht bei intakten roten Blutzellen gegeben, histologisch war eine signifikante Abhängigkeit vaskulärer Verkalkung von der Präsenz von Erythrozytenmembranen feststellbar. Als osteoinduktiver Mediator bei diesem Prozess erwies sich die in

Erythrozytenmembranen exprimiert eNOS durch Synthese von NO. Bei der Hämolyse wird neben den Erythrozytenmembranen jedoch auch Hämoglobin frei, welches ein bekannter Scavenger von NO ist. Da an Stellen vaskulärer Verkalkung allerdings oft Erythrozytenmembranen und Hämoglobin zugleich angefärbt waren, wurden histologisch Möglichkeiten der Inaktivierung von Hämoglobin als NO-Scavenger untersucht. Zunächst stellt eine Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin eine Möglichkeit dar, die Bioverfügbarkeit von NO zu erhalten. Durch das oxidative Medium innerhalb der Läsion lag auf den histologischen Präparaten über 92% des Hämoglobins in der oxidierten Form vor. Hierbei stellte sich eine signifikante Abhängigkeit der Kalzifizierungen von der Oxidation des Hämoglobins zu Methämoglobin heraus. Als weiterer Mechanismus wurde die Präsenz von CD163-positiven Makrophagen analysiert, die durch freies Hämoglobin chemotaktisch angezogen werden, um dieses phagozytisch zu eliminieren. Diese Möglichkeit der Inaktivierung von Hämoglobin erwies sich histologisch jedoch als weniger konstant. Durch diese Mechanismen der Inaktivierung der NO-reduzierenden Funktion von Hämoglobin kann das durch eNOS der Erythrozytenmembranen produzierte NO ungehindert zu den vaskulären glatten Muskelzellen diffundieren. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen eNOS und vaskulären Kalzifizierungen war auch histologisch zu finden, sodass bei der Hämolyse freigesetzte Erythrozytenmembranen über diesen Mechanismus zu vaskulärer Verkalkung beitragen.

7 Literaturverzeichnis

1. Allison MA, Criqui MH, Wright CM. Patterns and risk factors for systemic calcified atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(2):331-6.
2. Maldonado N, Kelly-Arnold A, Vengrenyuk Y, Laudier D, Fallon JT, Virmani R, et al. A mechanistic analysis of the role of microcalcifications in atherosclerotic plaque stability: potential implications for plaque rupture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303(5):H619-28.
3. Vengrenyuk Y, Cardoso L, Weinbaum S. Micro-CT based analysis of a new paradigm for vulnerable plaque rupture: cellular microcalcifications in fibrous caps. *Mol Cell Biomech.* 2008;5(1):37-47.
4. Shioi A, Ikari Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(4):294-303.
5. Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation.* 2003;107(17):2181-4.
6. Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(3):489-94.
7. Jeney V, Balla G, Balla J. Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis. *Front Physiol.* 2014;5:379.
8. Sluimer JC, Gasc JM, van Wanroij JL, Kisters N, Groeneweg M, Sollewijn Gelpke MD, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(13):1258-65.
9. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med.* 2003;349(24):2316-25.
10. Takaya N, Yuan C, Chu B, Saam T, Polissar NL, Jarvik GP, et al. Presence of intraplaque hemorrhage stimulates progression of carotid atherosclerotic plaques: a high-resolution magnetic resonance imaging study. *Circulation.* 2005;111(21):2768-75.
11. Akahori H, Tsujino T, Naito Y, Matsumoto M, Lee-Kawabata M, Ohyanagi M, et al. Intraleaflet haemorrhage is associated with rapid progression of degenerative aortic valve stenosis. *Eur Heart J.* 2011;32(7):888-96.
12. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2017;174(12):1591-619.
13. Mazurek R, Dave JM, Chandran RR, Misra A, Sheikh AQ, Greif DM. Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease. *Adv Pharmacol.* 2017;78:323-50.
14. Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(1):53-62.
15. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit.* 2005;11(6):Ra194-205.
16. Förstermann U, Münzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113(13):1708-14.
17. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-6.
18. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res.* 1983;52(3):352-7.
19. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature.* 1995;377(6546):239-42.
20. Kuhlencordt PJ, Rosel E, Gerszten RE, Morales-Ruiz M, Dombkowski D, Atkinson WJ, et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial activation: insights from eNOS knockout endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286(5):C1195-202.
21. Huang PL. Lessons learned from nitric oxide synthase knockout animals. *Semin Perinatol.* 2000;24(1):87-90.

22. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation*. 2001;104(4):448-54.
23. Majesky MW, Dong XR, Hognlund V, Daum G, Mahoney WM, Jr. The adventitia: a progenitor cell niche for the vessel wall. *Cells Tissues Organs*. 2012;195(1-2):73-81.
24. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. 2016;37(42):3232-45.
25. Kolodgie FD, Yahagi K, Mori H, Romero ME, Trout HHR, Finn AV, et al. High-risk carotid plaque: lessons learned from histopathology. *Semin Vasc Surg*. 2017;30(1):31-43.
26. Gupta A, Baradaran H, Schweitzer AD, Kamel H, Pandya A, Delgado D, et al. Carotid plaque MRI and stroke risk: a systematic review and meta-analysis. *Stroke*. 2013;44(11):3071-7.
27. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*. 1994;90(2):844-53.
28. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29(3):630-4.
29. Sathyamurthy I, Alex S. Calcific aortic valve disease: is it another face of atherosclerosis? *Indian Heart J*. 2015;67(5):503-6.
30. Peshkova IO, Schaefer G, Koltsova EK. Atherosclerosis and aortic aneurysm - is inflammation a common denominator? *Febs j*. 2016;283(9):1636-52.
31. Carino D, Sarac TP, Ziganshin BA, Elefteriades JA. Abdominal Aortic Aneurysm: Evolving Controversies and Uncertainties. *Int J Angiol*. 2018;27(2):58-80.
32. Wanhainen A, Hultgren R, Linne A, Holst J, Gottsater A, Langenskiold M, et al. Outcome of the Swedish Nationwide Abdominal Aortic Aneurysm Screening Program. *Circulation*. 2016;134(16):1141-8.
33. Iwakoshi S, Hirai T, Kichikawa K. Updates on Ultrasonography Imaging in Abdominal Aortic Aneurysm. *Ann Vasc Dis*. 2019;12(3):319-22.
34. Johnsen SH, Forsdahl SH, Singh K, Jacobsen BK. Atherosclerosis in abdominal aortic aneurysms: a causal event or a process running in parallel? The Tromso study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(6):1263-8.
35. Golledge J, Norman PE. Atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm: cause, response, or common risk factors? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(6):1075-7.
36. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2000;102(10):1186-91.
37. Tabas I, Garcia-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol*. 2015;209(1):13-22.
38. Otsuka F, Joner M, Prati F, Virmani R, Narula J. Clinical classification of plaque morphology in coronary disease. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(7):379-89.
39. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr*. 2012;23(4):222-31.
40. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:4.
41. Soldatos G, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Advanced-glycation end products in insulin-resistant states. *Curr Hypertens Rep*. 2005;7(2):96-102.
42. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105(14):1656-62.
43. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol*. 2009;157(4):527-36.
44. Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini G. Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;82 Suppl 2:S94-s101.
45. Hsueh WA, Lyon CJ, Quinones MJ. Insulin resistance and the endothelium. *Am J Med*. 2004;117(2):109-17.

46. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;98(18):1842-7.
47. Boger RH, Vallance P, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(4):1-3.
48. Zeibig S, Li Z, Wagner S, Holthoff HP, Ungerer M, Bultmann A, et al. Effect of the oxLDL binding protein Fc-CD68 on plaque extension and vulnerability in atherosclerosis. *Circ Res*. 2011;108(6):695-703.
49. Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res*. 1992;70(6):1191-7.
50. Tang EH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflugers Arch*. 2010;459(6):995-1004.
51. Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 2001;103(13):1752-8.
52. Bhatt SR, Lokhandwala MF, Banday AA. Resveratrol prevents endothelial nitric oxide synthase uncoupling and attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;667(1-3):258-64.
53. Puranik R, Celermajer DS. Smoking and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis*. 2003;45(6):443-58.
54. Burke A, Fitzgerald GA. Oxidative stress and smoking-induced vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis*. 2003;46(1):79-90.
55. Antoniadis C, Tousoulis D, Stefanadis C. Smoking in Asians: it doesn't stop at vascular endothelium. *Int J Cardiol*. 2008;128(2):151-3.
56. Herrera MD, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev*. 2010;9(2):142-52.
57. Katusic ZS. Mechanisms of endothelial dysfunction induced by aging: role of arginase I. *Circ Res*. 2007;101(7):640-1.
58. Pennathur S, Heinecke JW. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *Curr Diab Rep*. 2007;7(4):257-64.
59. Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(2):110-5.
60. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2003;278(25):22546-54.
61. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19(9):1166-72.
62. Peled M, Fisher EA. Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression. *Front Immunol*. 2014;5:579.
63. Stoger JL, Gijbels MJ, van der Velden S, Manca M, van der Loos CM, Biessen EA, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):461-8.
64. Linton MF, Babaev VR, Huang J, Linton EF, Tao H, Yancey PG. Macrophage Apoptosis and Efferocytosis in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ J*. 2016;80(11):2259-68.
65. Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(6):1256-61.
66. Lin J, Li H, Yang M, Ren J, Huang Z, Han F, et al. A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development. *Cell Rep*. 2013;3(1):200-10.
67. Libby P. Collagenases and cracks in the plaque. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3201-3.
68. Narula J, Nakano M, Virmani R, Kolodgie FD, Petersen R, Newcomb R, et al. Histopathologic characteristics of atherosclerotic coronary disease and implications of the findings for the invasive and noninvasive detection of vulnerable plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(10):1041-51.

69. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:13-40.
70. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):692-702.
71. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(23):13531-6.
72. Stewart HJ, Guildford AL, Lawrence-Watt DJ, Santin M. Substrate-induced phenotypical change of monocytes/macrophages into myofibroblast-like cells: a new insight into the mechanism of in-stent restenosis. *J Biomed Mater Res A.* 2009;90(2):465-71.
73. Martin K, Weiss S, Metharom P, Schmeckpeper J, Hynes B, O'Sullivan J, et al. Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin. *Circ Res.* 2009;105(3):214-8.
74. Vengrenyuk Y, Nishi H, Long X, Ouimet M, Savji N, Martinez FO, et al. Cholesterol loading reprograms the microRNA-143/145-myocardin axis to convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(3):535-46.
75. Kim YW, Byzova TV. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood.* 2014;123(5):625-31.
76. Kolodgie FD, Burke AP, Nakazawa G, Cheng Q, Xu X, Virmani R. Free cholesterol in atherosclerotic plaques: where does it come from? *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(5):500-7.
77. Koter M, Broncel M, Chojnowska-Jezierska J, Klikczynska K, Franiak I. The effect of atorvastatin on erythrocyte membranes and serum lipids in patients with type-2 hypercholesterolemia. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002;58(8):501-6.
78. Tziakas DN, Kaski JC, Chalikias GK, Romero C, Fredericks S, Tentes IK, et al. Total cholesterol content of erythrocyte membranes is increased in patients with acute coronary syndrome: a new marker of clinical instability? *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(21):2081-9.
79. Tziakas DN, Chalikias GK, Stakos D, Tentes IK, Chatzikiyiakou SV, Mitrousi K, et al. Cholesterol composition of erythrocyte membranes and its association with clinical presentation of coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2008;19(8):583-90.
80. Tziakas D, Chalikias G, Kapelouzou A, Tentes I, Schäfer K, Karayannakos P, et al. Erythrocyte membrane cholesterol and lipid core growth in a rabbit model of atherosclerosis: modulatory effects of rosuvastatin. *Int J Cardiol.* 2013;170(2):173-81.
81. Paul A, Calleja L, Vilella E, Martinez R, Osada J, Joven J. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with phenylhydrazine-induced anemia. *Atherosclerosis.* 1999;147(1):61-8.
82. Tziakas DN, Chalikias GK, Tentes IK, Stakos D, Chatzikiyiakou SV, Mitrousi K, et al. Interleukin-8 is increased in the membrane of circulating erythrocytes in patients with acute coronary syndrome. *Eur Heart J.* 2008;29(22):2713-22.
83. Jeney V, Eaton JW, Balla G, Balla J. Natural history of the bruise: formation, elimination, and biological effects of oxidized hemoglobin. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:703571.
84. Silva G, Jeney V, Chora A, Larsen R, Balla J, Soares MP. Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2009;284(43):29582-95.
85. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood.* 2001;98(6):1802-11.
86. Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. *Arterioscler Thromb.* 1991;11(6):1700-11.
87. Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest.* 1991;64(5):648-55.
88. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014;114(12):1852-66.

89. Otsuka F, Kramer MC, Woudstra P, Yahagi K, Ladich E, Finn AV, et al. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):772-82.
90. Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res*. 2007;73(3):470-80.
91. Sluimer JC, Kolodgie FD, Bijnens AP, Maxfield K, Pacheco E, Kutys B, et al. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(17):1517-27.
92. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*. 1985;53(4):363-73.
93. Kelly-Arnold A, Maldonado N, Laudier D, Aikawa E, Cardoso L, Weinbaum S. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(26):10741-6.
94. Wong KK, Thavornpattanapong P, Cheung SC, Sun Z, Tu J. Effect of calcification on the mechanical stability of plaque based on a three-dimensional carotid bifurcation model. *BMC Cardiovasc Disord*. 2012;12:7.
95. Bostrom KI. Where do we stand on vascular calcification? *Vascul Pharmacol*. 2016;84:8-14.
96. Tarbell JM, Shi ZD, Dunn J, Jo H. Fluid Mechanics, Arterial Disease, and Gene Expression. *Annu Rev Fluid Mech*. 2014;46:591-614.
97. Sage AP, Tintut Y, Demer LL. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(9):528-36.
98. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, Thiriet M, Janzen J, Zeller T, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J*. 2014;35(23):1515-25.
99. Latif F, Khalid MM, Khan F, Omar Z, Ali FA. Role of hyperphosphatemia-mediated vascular calcification in cardiovascular outcomes and its management: a review. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2013;14(6):410-5.
100. Micheletti RG, Fishbein GA, Currier JS, Fishbein MC. Monckeberg sclerosis revisited: a clarification of the histologic definition of Monckeberg sclerosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(1):43-7.
101. Rajamannan NM, Evans FJ, Aikawa E, Grande-Allen KJ, Demer LL, Heistad DD, et al. Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation*. 2011;124(16):1783-91.
102. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Lung B, Lancellotti P, Otto CM, et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16006.
103. Chen NX, Moe SM. Vascular calcification: pathophysiology and risk factors. *Curr Hypertens Rep*. 2012;14(3):228-37.
104. Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, et al. Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res*. 2009;104(6):733-41.
105. Kakutani Y, Shioi A, Shoji T, Okazaki H, Koyama H, Emoto M, et al. Oncostatin M Promotes Osteoblastic Differentiation of Human Vascular Smooth Muscle Cells Through JAK3-STAT3 Pathway. *J Cell Biochem*. 2015;116(7):1325-33.
106. Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, et al. Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ Res*. 2002;91(1):9-16.
107. Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T, Cavener DR, et al. Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(alpha)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *J Biol Chem*. 2011;286(6):4809-18.
108. Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Moe SM. Annexin-mediated matrix vesicle calcification in vascular smooth muscle cells. *J Bone Miner Res*. 2008;23(11):1798-805.

109. Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, et al. Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation*. 2008;118(17):1748-57.
110. Chen NX, Kircelli F, O'Neill KD, Chen X, Moe SM. Verapamil inhibits calcification and matrix vesicle activity of bovine vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*. 2010;77(5):436-42.
111. Barreto DV, Barreto Fde C, Carvalho AB, Cuppari L, Draibe SA, Dalboni MA, et al. Association of changes in bone remodeling and coronary calcification in hemodialysis patients: a prospective study. *Am J Kidney Dis*. 2008;52(6):1139-50.
112. Ketteler M, Biggar PH. Review article: Getting the balance right: assessing causes and extent of vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2009;14(4):389-94.
113. Cheng SL, Behrmann A, Shao JS, Ramachandran B, Krchma K, Bello Arredondo Y, et al. Targeted reduction of vascular Msx1 and Msx2 mitigates arteriosclerotic calcification and aortic stiffness in LDLR-deficient mice fed diabetogenic diets. *Diabetes*. 2014;63(12):4326-37.
114. Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res*. 2005;96(9):930-8.
115. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res*. 1998;13(5):828-38.
116. Davaine JM, Quillard T, Chatelais M, Guilbaud F, Brion R, Guyomarch B, et al. Bone Like Arterial Calcification in Femoral Atherosclerotic Lesions: Prevalence and Role of Osteoprotegerin and Pericytes. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2016;51(2):259-67.
117. Wirrig EE, Yutzey KE. Conserved transcriptional regulatory mechanisms in aortic valve development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(4):737-41.
118. Yao J, Guihard PJ, Blazquez-Medela AM, Guo Y, Moon JH, Jumabay M, et al. Serine Protease Activation Essential for Endothelial-Mesenchymal Transition in Vascular Calcification. *Circ Res*. 2015;117(9):758-69.
119. Buendia P, Montes de Oca A, Madueno JA, Merino A, Martin-Malo A, Aljama P, et al. Endothelial microparticles mediate inflammation-induced vascular calcification. *Faseb j*. 2015;29(1):173-81.
120. Vasuri F, Fittipaldi S, Pasquinelli G. Arterial calcification: Finger-pointing at resident and circulating stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):540-51.
121. Psaltis PJ, Simari RD. Vascular wall progenitor cells in health and disease. *Circ Res*. 2015;116(8):1392-412.
122. Kramann R, Goettsch C, Wongboonsin J, Iwata H, Schneider RK, Kuppe C, et al. Adventitial MSC-like Cells Are Progenitors of Vascular Smooth Muscle Cells and Drive Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):628-42.
123. Cho HJ, Cho HJ, Lee HJ, Song MK, Seo JY, Bae YH, et al. Vascular calcifying progenitor cells possess bidirectional differentiation potentials. *PLoS Biol*. 2013;11(4):e1001534.
124. Tseng W, Graham LS, Geng Y, Reddy A, Lu J, Effros RB, et al. PKA-induced receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) expression in vascular cells mediates osteoclastogenesis but not matrix calcification. *J Biol Chem*. 2010;285(39):29925-31.
125. Bosse Y, Miqdad A, Fournier D, Pepin A, Pibarot P, Mathieu P. Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(5):489-98.
126. Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF. Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res*. 2005;96(7):792-9.
127. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):343-55.
128. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1800-9.
129. Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res*. 2010;107(4):485-94.

130. Li X, Yang HY, Giachelli CM. BMP-2 promotes phosphate uptake, phenotypic modulation, and calcification of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2008;199(2):271-7.
131. Bostrom KI, Rajamannan NM, Towler DA. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ Res*. 2011;109(5):564-77.
132. Perez-Hernandez N, Aptilon-Duque G, Blachman-Braun R, Vargas-Alarcon G, Rodriguez-Cortes AA, Azrad-Daniel S, et al. Vascular Calcification: Current Genetics Underlying This Complex Phenomenon. *Chin Med J (Engl)*. 2017;130(9):1113-21.
133. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo j*. 2000;19(8):1745-54.
134. Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res*. 2006;99(10):1044-59.
135. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997;89(5):747-54.
136. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997;89(5):755-64.
137. Dorai H, Vukicevic S, Sampath TK. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cell Physiol*. 2000;184(1):37-45.
138. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*. 2008;79(3):360-76.
139. Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation*. 2000;102(21):2636-42.
140. Bessueille L, Magne D. Inflammation: a culprit for vascular calcification in atherosclerosis and diabetes. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(13):2475-89.
141. Wen C, Yang X, Yan Z, Zhao M, Yue X, Cheng X, et al. *Nalp3* inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *Int J Cardiol*. 2013;168(3):2242-7.
142. Nadra I, Mason JC, Philippidis P, Florey O, Smythe CD, McCarthy GM, et al. Proinflammatory activation of macrophages by basic calcium phosphate crystals via protein kinase C and MAP kinase pathways: a vicious cycle of inflammation and arterial calcification? *Circ Res*. 2005;96(12):1248-56.
143. Deshpande SS, Angkeow P, Huang J, Ozaki M, Irani K. *Rac1* inhibits TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. *Faseb j*. 2000;14(12):1705-14.
144. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene*. 1999;18(55):7860-72.
145. Marinou K, Christodoulides C, Antoniadou C, Koutsilieris M. Wnt signaling in cardiovascular physiology. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(12):628-36.
146. Lerner UH, Ohlsson C. The WNT system: background and its role in bone. *J Intern Med*. 2015;277(6):630-49.
147. Lee DK, Nathan Grantham R, Trachte AL, Mannion JD, Wilson CL. Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway enhances monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;347(1):109-16.
148. Tsaousi A, Williams H, Lyon CA, Taylor V, Swain A, Johnson JL, et al. Wnt4/beta-catenin signaling induces VSMC proliferation and is associated with intimal thickening. *Circ Res*. 2011;108(4):427-36.
149. Rusanescu G, Weissleder R, Aikawa E. Notch signaling in cardiovascular disease and calcification. *Curr Cardiol Rev*. 2008;4(3):148-56.
150. Nobta M, Tsukazaki T, Shibata Y, Xin C, Moriishi T, Sakano S, et al. Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by *Delta1/Jagged1*-activated Notch1 signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(16):15842-8.
151. Shimizu T, Tanaka T, Iso T, Matsui H, Ooyama Y, Kawai-Kowase K, et al. Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of *Mx2* gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2011;286(21):19138-48.

152. Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D, Susa M. Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenetic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene Hey1 inhibits mineralization and Runx2 transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2004;279(36):37704-15.
153. White MP, Theodoris CV, Liu L, Collins WJ, Blue KW, Lee JH, et al. NOTCH1 regulates matrix gla protein and calcification gene networks in human valve endothelium. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;84:13-23.
154. Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G, Leslie RG, Jensen TG, Kassem M. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1. *J Bone Miner Res.* 2004;19(5):841-52.
155. Bash J, Zong WX, Banga S, Rivera A, Ballard DW, Ron Y, et al. Rel/NF-kappaB can trigger the Notch signaling pathway by inducing the expression of Jagged1, a ligand for Notch receptors. *Embo j.* 1999;18(10):2803-11.
156. Oswald F, Liptay S, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. *Mol Cell Biol.* 1998;18(4):2077-88.
157. Aikawa E, Aikawa M, Libby P, Figueiredo JL, Rusanescu G, Iwamoto Y, et al. Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. *Circulation.* 2009;119(13):1785-94.
158. Hosaka N, Mizobuchi M, Ogata H, Kumata C, Kondo F, Koiwa F, et al. Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Calcif Tissue Int.* 2009;85(6):523-9.
159. Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R. Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008;74(2):148-57.
160. Villa-Bellostá R, O'Neill WC. Pyrophosphate deficiency in vascular calcification. *Kidney Int.* 2018;93(6):1293-7.
161. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res.* 2011;109(1):e1-12.
162. Zhang C, Zhang K, Huang F, Feng W, Chen J, Zhang H, et al. Exosomes, the message transporters in vascular calcification. *J Cell Mol Med.* 2018;22(9):4024-33.
163. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem.* 2002;277(6):4388-94.
164. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH, Kwaijtaal M, van Diest R, Appels A, et al. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(8):1629-33.
165. Panizo S, Cardus A, Encinas M, Parisi E, Valcheva P, Lopez-Ongil S, et al. RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ Res.* 2009;104(9):1041-8.
166. Harper E, Forde H, Davenport C, Rochfort KD, Smith D, Cummins PM. Vascular calcification in type-2 diabetes and cardiovascular disease: Integrative roles for OPG, RANKL and TRAIL. *Vascul Pharmacol.* 2016;82:30-40.
167. Evrard S, Delanaye P, Kamel S, Cristol JP, Cavalier E. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin Chim Acta.* 2015;438:401-14.
168. Smith ER, Hanssen E, McMahon LP, Holt SG. Fetuin-A-containing calciprotein particles reduce mineral stress in the macrophage. *PLoS One.* 2013;8(4):e60904.
169. Lee CT, Chua S, Hsu CY, Tsai YC, Ng HY, Kuo CC, et al. Biomarkers associated with vascular and valvular calcification in chronic hemodialysis patients. *Dis Markers.* 2013;34(4):229-35.
170. Tziakas DN, Chalikias G, Pavlaki M, Kareli D, Gogiraju R, Hubert A, et al. Lysed Erythrocyte Membranes Promote Vascular Calcification: Possible Role of Erythrocyte-Derived Nitric Oxide. *Circulation.* 2019.
171. Gambaryan S, Subramanian H, Kehrer L, Mindukshev I, Sudnitsyna J, Reiss C, et al. Erythrocytes do not activate purified and platelet soluble guanylate cyclases even in conditions favourable for NO synthesis. *Cell Commun Signal.* 2016;14(1):16.

172. Helms C, Kim-Shapiro DB. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. *Free Radic Biol Med.* 2013;61:464-72.
173. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood.* 2006;107(7):2943-51.
174. Böhm EW, Pavlaki M, Chalikias G, Mikroulis D, Georgiadis GS, Tziakas DN, et al. Colocalization of Erythrocytes and Vascular Calcification in Human Atherosclerosis: A Systematic Histomorphometric Analysis. *TH Open.* 2021;5(2):e113-e24.
175. Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem.* 2018;59:17-24.
176. Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *J Endocrinol.* 2012;214(3):241-55.
177. Singh A, Gill G, Kaur H, Amhmed M, Jakhu H. Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review. *Prog Orthod.* 2018;19(1):18.
178. Uaesoontrachoon K, Wasgewatte Wijesinghe DK, Mackie EJ, Pagel CN. Osteopontin deficiency delays inflammatory infiltration and the onset of muscle regeneration in a mouse model of muscle injury. *Dis Model Mech.* 2013;6(1):197-205.
179. Shevde LA, Samant RS. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol.* 2014;37:131-41.
180. Shimodaira T, Matsuda K, Uchibori T, Sugano M, Uehara T, Honda T. Upregulation of osteopontin expression via the interaction of macrophages and fibroblasts under IL-1b stimulation. *Cytokine.* 2018;110:63-9.
181. Gao H, Steffen MC, Ramos KS. Osteopontin regulates alpha-smooth muscle actin and calponin in vascular smooth muscle cells. *Cell Biol Int.* 2012;36(2):155-61.
182. Chapurlat RD, Confavreux CB. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology (Oxford).* 2016;55(10):1714-25.
183. Zhu S, Barbe MF, Liu C, Hadjiargyrou M, Popoff SN, Rani S, et al. Periostin-like-factor in osteogenesis. *J Cell Physiol.* 2009;218(3):584-92.
184. Markwald RR, Norris RA, Moreno-Rodriguez R, Levine RA. Developmental basis of adult cardiovascular diseases: valvular heart diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1188:177-83.
185. Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J.* 2011;32(16):1977-85, 85a, 85b, 85c.
186. Kockx MM, Cromheeke KM, Knaapen MW, Bosmans JM, De Meyer GR, Herman AG, et al. Phagocytosis and macrophage activation associated with hemorrhagic microvessels in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(3):440-6.
187. Matsumura M, Mintz GS, Kang SJ, Sum ST, Madden SP, Burke AP, et al. Intravascular ultrasound and near-infrared spectroscopic features of coronary lesions with intraplaque haemorrhage. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2017;18(11):1222-8.
188. Sawada H, Hao H, Naito Y, Oboshi M, Hirotsu S, Mitsuno M, et al. Aortic iron overload with oxidative stress and inflammation in human and murine abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(6):1507-14.
189. Martinez-Pinna R, Lindholt JS, Madrigal-Matute J, Blanco-Colio LM, Esteban-Salan M, Torres-Fonseca MM, et al. From tissue iron retention to low systemic haemoglobin levels, new pathophysiological biomarkers of human abdominal aortic aneurysm. *Thromb Haemost.* 2014;112(1):87-95.
190. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8(2):92-102.
191. Guo L, Harari E, Virmani R, Finn AV. Linking Hemorrhage, Angiogenesis, Macrophages, and Iron Metabolism in Atherosclerotic Vascular Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(4):e33-e9.
192. Vinchi F, Porto G, Simmelbauer A, Altamura S, Passos ST, Garbowski M, et al. Atherosclerosis is aggravated by iron overload and ameliorated by dietary and pharmacological iron restriction. *Eur Heart J.* 2020;41(28):2681-95.
193. Lee TS, Shiao MS, Pan CC, Chau LY. Iron-deficient diet reduces atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Circulation.* 1999;99(9):1222-9.

194. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, et al. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ.* 2016;23(3):369-79.
195. Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol.* 2000;130(5):947-62.
196. Cornelissen A, Guo L, Sakamoto A, Virmani R, Finn AV. New insights into the role of iron in inflammation and atherosclerosis. *EBioMedicine.* 2019;47:598-606.
197. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, et al. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 2002;161(5):1701-10.
198. Kakhniashvili DG, Bulla LA, Jr., Goodman SR. The human erythrocyte proteome: analysis by ion trap mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3(5):501-9.
199. Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, Mann M. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood.* 2006;108(3):791-801.
200. Horn P, Cortese-Krott MM, Keymel S, Kumara I, Burghoff S, Schrader J, et al. Nitric oxide influences red blood cell velocity independently of changes in the vascular tone. *Free Radic Res.* 2011;45(6):653-61.
201. Diederich L, Suvorava T, Sansone R, Keller TCSt, Barbarino F, Sutton TR, et al. On the Effects of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide on Red Blood Cell Deformability. *Front Physiol.* 2018;9:332.
202. Cortese-Krott MM, Kelm M. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol.* 2014;2:251-8.
203. Donadee C, Raat NJ, Kanias T, Tejero J, Lee JS, Kelley EE, et al. Nitric oxide scavenging by red blood cell microparticles and cell-free hemoglobin as a mechanism for the red cell storage lesion. *Circulation.* 2011;124(4):465-76.
204. Wajih N, Liu X, Shetty P, Basu S, Wu H, Hogg N, et al. The role of red blood cell S-nitrosation in nitrite bioactivation and its modulation by leucine and glucose. *Redox Biol.* 2016;8:415-21.
205. Salgado MT, Cao Z, Nagababu E, Mohanty JG, Rifkind JM. Red blood cell membrane-facilitated release of nitrite-derived nitric oxide bioactivity. *Biochemistry.* 2015;54(44):6712-23.
206. Schaer CA, Schoedon G, Imhof A, Kurrer MO, Schaer DJ. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ Res.* 2006;99(9):943-50.
207. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman H-J, Law SKA, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature.* 2001;409:198.
208. Yuan XM, Ward LJ, Forssell C, Siraj N, Li W. Carotid Atheroma From Men Has Significantly Higher Levels of Inflammation and Iron Metabolism Enabled by Macrophages. *Stroke.* 2018;49(2):419-25.
209. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res.* 2004;94(1):119-26.
210. Boyle JJ, Harrington HA, Piper E, Elderfield K, Stark J, Landis RC, et al. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol.* 2009;174(3):1097-108.
211. Yunoki K, Naruko T, Komatsu R, Ehara S, Shirai N, Sugioka K, et al. Enhanced expression of haemoglobin scavenger receptor in accumulated macrophages of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2009;30(15):1844-52.
212. Finn AV, Nakano M, Polavarapu R, Karmali V, Saeed O, Zhao X, et al. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(2):166-77.
213. Rubio-Navarro A, Amaro Villalobos JM, Lindholt JS, Buendia I, Egido J, Blanco-Colio LM, et al. Hemoglobin induces monocyte recruitment and CD163-macrophage polarization in abdominal aortic aneurysm. *Int J Cardiol.* 2015;201:66-78.
214. Guo L, Akahori H, Harari E, Smith SL, Polavarapu R, Karmali V, et al. CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2018;128(3):1106-24.

215. Oba E, Aung NY, Ohe R, Sadahiro M, Yamakawa M. The distribution of macrophage subtypes and their relationship to bone morphogenetic protein 2 in calcified aortic valve stenosis. *Am J Transl Res.* 2020;12(5):1728-40.
216. Barakat W, Fahmy A, Askar M, El-Kannishy S. Effectiveness of arginase inhibitors against experimentally induced stroke. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018;391(6):603-12.
217. Marathe N, Rangaswami H, Zhuang S, Boss GR, Pilz RB. Pro-survival effects of 17beta-estradiol on osteocytes are mediated by nitric oxide/cGMP via differential actions of cGMP-dependent protein kinases I and II. *J Biol Chem.* 2012;287(2):978-88.
218. Pan W, Quarles LD, Song LH, Yu YH, Jiao C, Tang HB, et al. Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *J Cell Biochem.* 2005;94(2):307-16.
219. Kalyanaraman H, Schall N, Pilz RB. Nitric oxide and cyclic GMP functions in bone. *Nitric Oxide.* 2018;76:62-70.
220. Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H, Ralston SH. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res.* 1997;12(7):1108-15.
221. Otsuka E, Hirano K, Matsushita S, Inoue A, Hirose S, Yamaguchi A, et al. Effects of nitric oxide from exogenous nitric oxide donors on osteoblastic metabolism. *Eur J Pharmacol.* 1998;349(2-3):345-50.
222. Ehnes DD, Geransar RM, Rancourt DE, Zur Nieden NI. Exogenous nitric oxide enhances calcification in embryonic stem cell-derived osteogenic cultures. *Differentiation.* 2015;89(3-4):97-103.
223. Xiao ZS, Quarles LD, Chen QQ, Yu YH, Qu XP, Jiang CH, et al. Effect of asymmetric dimethylarginine on osteoblastic differentiation. *Kidney Int.* 2001;60(5):1699-704.
224. van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology.* 2001;103(3):255-61.
225. Warboys CM, Chen N, Zhang Q, Shaifita Y, Vanderslott G, Passacuale G, et al. Bidirectional cross-regulation between the endothelial nitric oxide synthase and beta-catenin signalling pathways. *Cardiovasc Res.* 2014;104(1):116-26.
226. Ding H, Keller KC, Martinez IK, Geransar RM, zur Nieden KO, Nishikawa SG, et al. NO-beta-catenin crosstalk modulates primitive streak formation prior to embryonic stem cell osteogenic differentiation. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 22):5564-77.
227. Shimokawa H, Godo S. Diverse Functions of Endothelial NO Synthases System: NO and EDH. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2016;67(5):361-6.
228. Ferrari R, Pavasini R, Camici PG, Crea F, Danchin N, Pinto F, et al. Anti-anginal drugs-beliefs and evidence: systematic review covering 50 years of medical treatment. *Eur Heart J.* 2018.
229. Münzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, et al. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res.* 2000;86(1):E7-e12.
230. Godo S, Shimokawa H. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2017;109:4-10.
231. Chen J, Kuhlencordt PJ, Astern J, Gyurko R, Huang PL. Hypertension does not account for the accelerated atherosclerosis and development of aneurysms in male apolipoprotein e/endothelial nitric oxide synthase double knockout mice. *Circulation.* 2001;104(20):2391-4.
232. El Accaoui RN, Gould ST, Hajj GP, Chu Y, Davis MK, Kraft DC, et al. Aortic valve sclerosis in mice deficient in endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;306(9):H1302-13.
233. Saikrishnan N, Mirabella L, Yoganathan AP. Bicuspid aortic valves are associated with increased wall and turbulence shear stress levels compared to trileaflet aortic valves. *Biomech Model Mechanobiol.* 2015;14(3):577-88.
234. Moreno PR, Astudillo L, Elmariah S, Purushothaman KR, Purushothaman M, Lento PA, et al. Increased macrophage infiltration and neovascularization in congenital bicuspid aortic valve stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;142(4):895-901.
235. Vecoli C, Novelli M, Pippa A, Giacomelli D, Befly P, Masiello P, et al. Partial deletion of eNOS gene causes hyperinsulinemic state, unbalance of cardiac insulin signaling pathways and coronary dysfunction independently of high fat diet. *PLoS One.* 2014;9(8):e104156.
236. Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O, Maeda N. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest.* 2000;105(4):451-8.

237. Shi W, Wang X, Shih DM, Laubach VE, Navab M, Lusis AJ. Paradoxical reduction of fatty streak formation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;105(17):2078-82.
238. Bouloumie A, Bauersachs J, Linz W, Scholkens BA, Wiemer G, Fleming I, et al. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*. 1997;30(4):934-41.
239. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Namiki M, Inoue N, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2002;110(3):331-40.
240. Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, et al. A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(7):1632-7.
241. Li H, Horke S, Forstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;237(1):208-19.
242. Konstantinides S, Schäfer K, Thinnies T, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation*. 2001;103(4):576-83.

8 Anhang

8.1 Zusammensetzung der Lösungen für die histologischen Färbungen

8.1.1 Alizarin S

0,5% Alizarinrot (pH 4,1-4,3)

- 0,5 g Alizarinrot
- 100 ml dH₂O
- pH-Wert mit 10% NH₃ einstellen

8.1.2 Masson-Goldner-Trichrom

Bouins' Fixative

- 750 ml gesättigte Pikrinsäure
- 250 ml 37% Formaldehyd
- 50 ml 100% Essigsäure

Weigert's Iron Working Solution (frisch ansetzen, gleiche Teile von Lösung A und B)

Lösung A

- 1 g Hämatoxylin
- 100 ml 95% Ethanol

Lösung B

- 4 ml 29% Eisenchloridlösung
- 95 ml dH₂O
- 1 ml konzentrierte Salzsäure, 37%

1% Essigsäure

- 10 ml 100% Essigsäure
- 990 ml dH₂O

Ponceau-Fuchsin Lösung

- 1 g Säurefuchsin
- 1 g Ponceau 2R
- 200 ml 1% Essigsäure

Azophloxin Lösung

- 0,5 g Azophloxin
- 0,2 ml 100% Essigsäure
- 100 ml dH₂O

Ponceau-Säurefuchsin-Azophloxin Lösung (frisch ansetzen)

- 88 ml 0,2% Essigsäure
- 7 ml Ponceau-Fuchsin Lösung
- 2 ml Azophloxin Lösung

Molybdato-phosphorsäure-Orange

- 3 g Molybdato-phosphorsäure
- 2 g Orange-G
- 100 ml dH₂O

Lichtgrün

- 0,15 g Lichtgrün SF
- 200 µl 100% Essigsäure
- 100 ml dH₂O

8.1.3 Berliner-Blau

10% Potassium-Ferrocyanid-Stock Lösung

- 10 g Potassium Hexacyanoferrate (II)
- 100 ml dH₂O

Potassium-Ferrocyanide Working Solution

- 100 ml 10% Potassium-Ferrocyanid-Stock Lösung
- 100 ml 20% Salzsäure

8.2 Positiv- und Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbungen

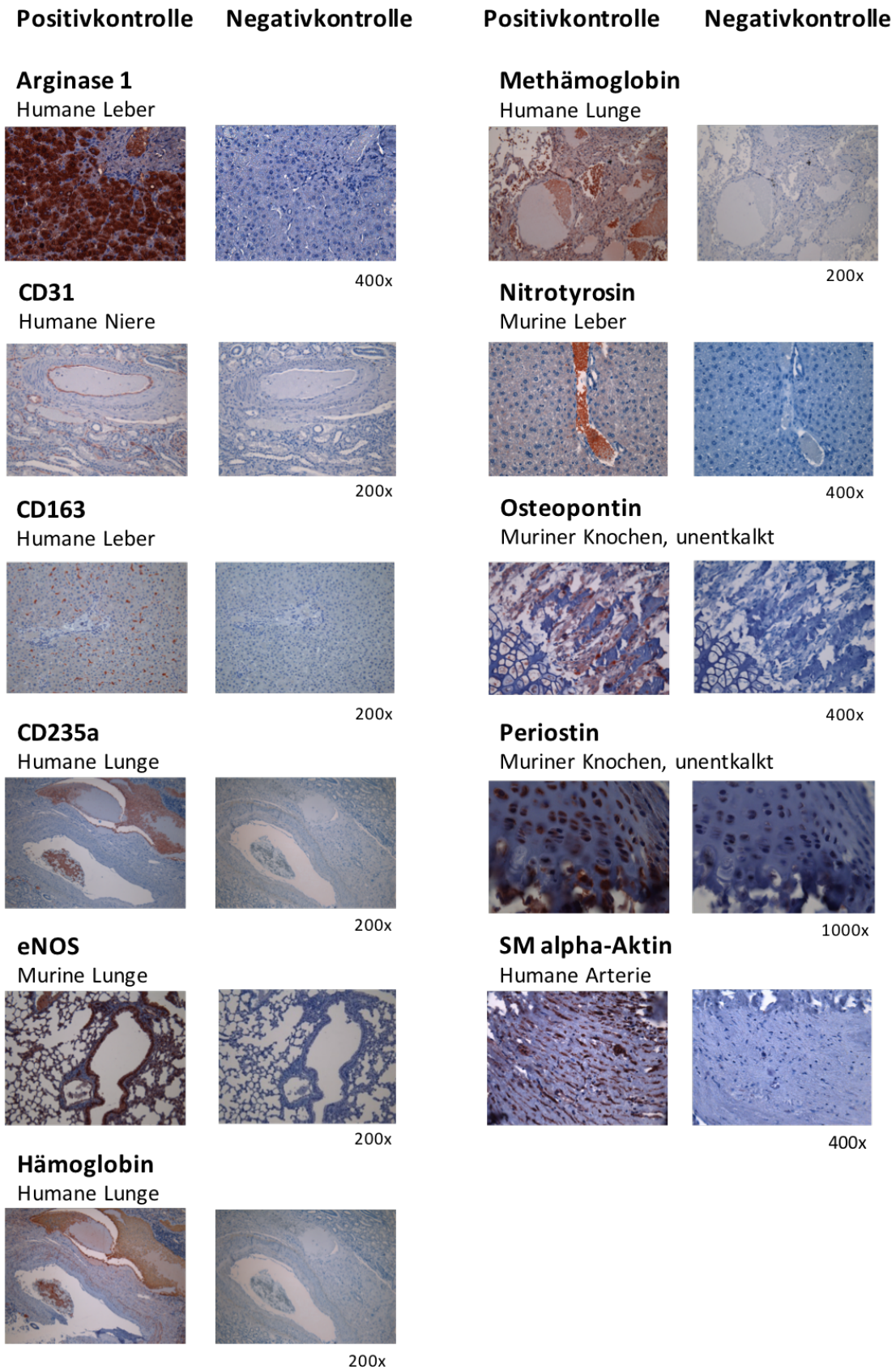


Abbildung 8.2-1 Positiv- und Negativkontrollen der immunhistochemischen Färbungen

8.3 Publikationen

8.3.1 “Lysed Erythrocyte Membranes Promote Vascular Calcification: Possible Role of Erythrocyte-Derived Nitric Oxide.”

Tziakas DN, Chalikias G, Pavlaki M, Kareli D, Gogiraju R, Hubert A, Böhm E, Stamoulis P, Drosos I, Kikas P, Mikroulis D, Giatromanolaki A, Georgiadis GS, Konstantinou F, Argyriou C, Münzel T, Konstantinides SV, Schäfer K.

Circulation 2019 Apr 23; 139(17): 2032-2048. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037166.

8.3.2 “Colocalization of Erythrocytes and Vascular Calcification in Human Atherosclerosis: A Systematic Histomorphometric Analysis.”

Böhm EW, Pavlaki M, Chalikias G, Mikroulis D, Georgiadis GS, Tziakas DN, Konstantinides S, Schäfer K.

TH Open 2021 Apr 14; 5(2): e113-e124. doi: 10.1055/s-0041-1725042.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei den Versuchen und dem Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben, und ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle gilt mein Dank insbesondere Frau ... für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit. Ich danke ihr sehr herzlich für das Erkennen und die stetige Förderung meines wissenschaftlichen Interesses. Es hat mir große Freude bereitet mit ihrer Unterstützung die Möglichkeit zu haben wissenschaftliche Methoden der Grundlagenforschung zu erlernen und viele Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten und Schreiben zu erlangen.

Desweiteren möchte ich der gesamten Forschungsgruppe „Translationale vaskuläre Biologie“ von ... für ihre stetige Unterstützung bei meinen Versuchen und dem Schreiben dieser Arbeit danken. Das gute Arbeitsklima und die Offenheit, sowie Hilfsbereitschaft, jedes Einzelnen haben mir oft weitergeholfen und zu meiner Freude am Anfertigen dieser Arbeit beigetragen. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei ... bedanken, die mich durch ihre technische Assistenz beim Anfertigen und Färben der histologischen Schnitte dieser Arbeit angeleitet und immer unterstützt hat.

Mein Dank gilt ebenfalls den Kollegen der „*University General Hospital of Alexandroupolis*“, „*Department of Cardiothoracic Surgery and Vascular Surgery*“ aus Griechenland, welche uns großzügig das chirurgisch gewonnene Material aus Aortenaneurymata, Aortenklappen und Carotisplaques für die histologischen Schnitte zur Verfügung gestellt haben.

Zuletzt möchte ich ebenfalls meiner Familie und meinen Freunden für ihre herzliche Unterstützung und ihren stetigen Rückhalt bedanken.

10 Tabellarischer Lebenslauf

Elsa Wilma Böhm

Geboren am 18.11.1995 in Köln

Schulbildung:

- **2002-2006** Grundschule Limbach/Saarland
- **2006-2014** Gymnasium Johanneum, Homburg/Saar
 - **06/2014** Allgemeine Hochschulreife (Abitur), Note 1.0
 - **06/2014** Baccalauréat, Note TRÈS BIEN (19.7)

Studium:

- **04/2015-03/2017 Vorklinischer Studienabschnitt**, Johannes Gutenberg Universität, Mainz
 - **03/2017** Abschluss des Ersten Abschnitts Der Ärztlichen Prüfung, Note -sehr gut-
- **04/2017-10/2020 Klinischer Studienabschnitt**, Johannes Gutenberg Universität, Mainz
 - **Wahlpflichtfächer:**
 - Wie entsteht Wissen-Evidenzbasierte Medizin
 - Vaskuläre Biologie und Pharmakologie - theoretische und praktische Grundlagen (Angebot in Kooperation mit MAInz-DOC)
 - Fit für die medizinische Doktorarbeit (in Kooperation mit MAInz-DOC)
 - Immunologische Forschung: Immunzellen und deren Funktion in Krankheit und Gesundheit (in Kooperation mit MAInz-DOC)
 - **10/2020** Abschluss des Zweiten Abschnitts Der Ärztlichen Prüfung, Note -gut-
- **11/2020-10/2021 Praktisches Jahr**
 - **1. Tertial:** Augenheilkunde, Universitätsmedizin Mainz
 - **2. Tertial:** Innere Medizin, Universitätsmedizin Mainz
 - **3. Tertial:** Chirurgie, Universitätsmedizin Mainz
- **11/2021** Abschluss des Dritten Abschnitts Der Ärztlichen Prüfung, Note -sehr gut-

Praktika und Famulaturen:

- **09/2014-10/2014** Krankenpflegepraktikum, Klinik für Innere Medizin II (Gastroenterologie, Endokrinologie, Hepatologie), Universitätsklinikum des Saarlandes Homburg/Saar
- **10/2014-12/2014** Auslandsaufenthalt in den USA (New Jersey), Aupair
- **01/2015-03/2015** Krankenpflegepraktikum, Klinik für Thorax- und Herz-Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes Homburg/Saar

- **08/2017** Famulatur, Abteilung für Innere Medizin 1, Nardini-Klinikum Zweibrücken
- **03/2019** Famulatur, Praxis für Allgemeinmedizin, Farzaneh Ardestani, Homburg/Erbach
- **09/2019** Famulatur, Augenklinik Sulzbach, Knappschaftsklinikum Saar
- **03/2020** Famulatur, Klinik für Pädiatrische Kardiologie, Universitätsklinikum des Saarlandes Homburg/Saar

Promotion und Publikationen:

- **10/2017-jetzt** Experimentelle Promotionsarbeit, „Bedeutung von Erythrozyten für Atherosklerose und vaskuläre Kalzifizierung“, AG Translationale Vaskuläre Biologie, Zentrum für Kardiologie, Kardiologie I, Universitätsmedizin Mainz, Univ.-Prof. Katrin Schäfer
- **“Lysed Erythrocyte Membranes Promote Vascular Calcification: Possible Role of Erythrocyte-Derived Nitric Oxide.”**
Tziakas DN, Chalikias G, Pavlaki M, Kareli D, Gogiraju R, Hubert A, Böhm E, Stamoulis P, Drosos I, Kikas P, Mikroulis D, Giatromanolaki A, Georgiadis GS, Konstantinou F, Argyriou C, Münzel T, Konstantinides SV, Schäfer K.

Circulation 2019 Apr 23; 139(17): 2032-2048. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037166.
- **“Colocalization of Erythrocytes and Vascular Calcification in Human Atherosclerosis: A Systematic Histomorphometric Analysis”**
Elsa Böhm, Maria Pavlaki, Georgios Chalikias, Dimitrios Mikroulis, George S. Georgiadis, Dimitrios N. Tziakas, Stavros Konstantinides and Katrin Schäfer

TH Open 2021 Apr 14; 5(2): e113-e124. doi: 10.1055/s-0041-1725042.

Auszeichnungen und Stipendien:

- **2014** Preis der Deutschen Mathematiker- Vereinigung für das beste Abitur in Mathematik
- **2014** Mathematikpreis 2014 der Naturwissenschaftlich- Technischen Fakultät I der Universität des Saarlandes
- **2014** Preis des Johanneums für die beste Leistung im bilingualen Französischzweig („AbiBac- Zweig“)
- **2018** Promotionsstipendium des Deutschen Zentrums für Herz-Kreislauf-Forschung e.V. (DZHK)

Ehrenamtliche Aktivitäten:

- **2006- jetzt** Mitgliedschaft der Deutschen Pfadfinderschaft St. Georg (DPSG)
- **2011-2014** Ernennung zur Jugendgruppenleiterin

- **2013-2014** Vorstandstätigkeit bei der DPSG Johanneum, Homburg/Saar

Nebentätigkeiten:

- **2015-2019** Sitzwachtätigkeit am Universitätsklinikum des Saarlandes Homburg/Saar, Intermediate Care- Station (CH-03), Klinik für Thorax- und Herz- Gefäßchirurgie

Fremdsprachen:

- Französisch (sehr gut)
- Englisch (sehr gut)
- Spanisch (gut)

Hobbies:

- Reiten
- Klarinette
- Malen/Zeichnen