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

Quantitative Analyse der Lymphangiogenese und Expression lymphangiogenetischer Wachstumsfaktoren im perivaskulären Fettgewebe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit

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

Vorgelegt von

Maria Del Pilar Ortega Carrillo
aus San Marcos, Sucre. Kolumbien

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med.

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med.

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med

Tag der Promotion:7. Dezember 2021

Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden im Juli 2019 im *Journal of Clinical Medicine* publiziert:

Ioannis Drosos, Maria Pavlaki, **Maria Del Pilar Ortega Carrillo**, Adriani Kourkouli, Katja Buschmann, Fotios Konstantinou, Rajinikanth Gogiraju, Magdalena L. Bochenek, Georgios Chalikias, Christos Tortopidis, Christian F. Vahl, Dimitrios Mikroulis, Dimitrios Tziakas, Thomas Münzel, Stavros Konstantinides and Katrin Schäfer. *Increased Lymphangiogenesis and Lymphangiogenic Growth Factor Expression in Perivascular Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease.* Journal of Clinical Medicine, 2019, 8, no. 7: 1000. https://doi.org/10.3390/jcm8071000

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis III

Tabellenverzeichnis IV

1. Einleitung 1

2. Literaturdiskussion 4

2.1 Die koronare Herzkrankheit 4

2.1.1 Die Pathogenese der Atherosklerose 4

2.1.2 Beeinflussbare kardiovaskuläre Risikofaktoren und ihre Wirkung bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit 7

2.2 Perivaskuläres Fettgewebe (PVAT) 9

2.2.1 Phänotyp 9

2.2.2 Funktion des perivaskulären Fettgewebes 10

2.2.3 Dysfunktion des perivaskulären Fettgewebes 10

2.3 Das lymphatische System 14

2.3.1 Lymphangiogenese, die Entstehung des lymphatischen Systems 14

2.3.2 Rolle des lymphatischen Gefäßsystems in der Pathogenese von Atherosklerose und Hinweise auf seine Anwesenheit im perivaskulären Fettgewebe 15

3. Materialen 17

3.1 Reagenzien und Kits 17

3.2 Antikörper, Seren, Enzyme und Nukleotide 19

3.3 Primer 20

F: forward primer; R: reverse primer 20

3.4 Geräte 20

3.5 Puffer und im Labor hergestellte Lösungen 21

3.6 Weitere Hilfsmittel 22

3.7 Software 24

3.8 Studie und Patientenkollektiv 24

4. Methoden 26

4.1 Probensammlung 26
4.2 Probenvorbereitung 26
4.3 Histologische Färbung und Immunhistochemie 27
4.3.1 Paraffinschnitte: 27
4.3.2.Histologische Färbung 27
4.3.3. Immunhistochemie 28
4.4 Isolation von *Messenger Ribonucleic Acid* 33
4.5 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der mRNA 35
4.6 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR): 36
4.7 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) 37
4.8 Analyse 39
4.8.1 Histologie und Immunhistochemie 39
4.8.2 Polymerase-Kettenreaktion 40
4.8.3 Statistische Auswertung 40
5. Ergebnisse 41
5.1 Patientenkollektiv 41
5.1.2 Häufigkeit und Vorkommen beeinflussbarer Risikofaktoren innerhalb der Stichprobe 41
5.2 Strukturelle histologische und immunhistochemische Analyse 42
5.2.1 Angiogenese/Neovaskularisation 42
5.2.2 Lymphangiogenese 42
5.2.3 Inflammation 43
5.2.1 Fibrose 45
5.3 mRNA Expression angiogenetischer und fibrotischer Wachstumsfaktoren in IMA-PVAT und C-PVAT 47
5.3.1 Angiogenese/Neovaskularisation 47
5.3.2. Lymphangiogenese 47
5.3.2.1 An Lymphangiogenese beteiligte endotheliale Wachstumsfaktoren 47
5.3.2.2 Lymphangiogenese-Rezeptor 48

5.3.3. Fibrose 48
6. Diskussion 50
6.1 IMA-PVAT als Kontrolle 50
6.2 Angiogenese 51
6.3 Lymphgefäße im perivaskulären Fettgewebe 52
6.4 Zusammenhang zwischen Lymphangiogenese und Inflammation im C-PVAT 55
6.5 C-PVAT, Merkmale dysfunktionalen perivaskulären Fettgewebes 56
6.5.1. Inflammation und Fibrose in C-PVAT 57
6.6 Limitationen 60
6.7 Fazit und Ausblick 61
7. Zusammenfassung 63
8. Literaturverzeichnis 65
9. Anhang 97
10. Danksagung 105
11. Lebenslauf 107

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
Apo B	Apolipoprotein B
CRP	C-reaktives Protein
dH_2O	Destilliertes Wasser
DM	Diabetes mellitus
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HTG	Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie
IL	Interleukin
IDL	*Intermediate Density Lipoprotein* (Lipoproteine mittlerer Dichte)
IMA	*Internal mammary artery* (Arteria thoracica interna)
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	*Low Density Lipoprotein* (Lipoproteine niedriger Dichte)
Mn	Minimol
M	Mol
MMP	Matrixmetalloproteasen
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	*Messenger Ribonucleid Acid*
NF-κb	*Nuclear Factor Kappa B*
NADPH	Nicotinamid Adenosin Dinucleotid Phosphat
Ox-LDL	*Oxidized Low Density Lipoprotein*
PVAT	*Perivascular Adipose Tissue* (Perivaskuläres Fettgewebe)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
rcf	*Relative Centrifuge Force*

RCT	Reverser Cholesterintransport
rpm	*Rotation speed, Rotations per minute*
TGFβ	*Transforming Growth Factor beta*
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
VDL	*Very Low-Density Lipoproteins* (Lipoprotein geringer Dichte)
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
VEGFR3	*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3*
VES-MTC	Verhoeff's Elastica-Masson-Trichrom-Färbung
VSMC	*Vascular Smooth Muscle Cell* (vaskuläre glatte Muskelzelle)
WHO	*World Health Organization*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des perivaskulären Fettgewebes 9

Abbildung 2: Schematische Darstellung von dysfunktionalem perivaskulärem Fettgewebe 11

Abbildung 3: Beladungsschema der 96-Well-Platte 37

Abbildung 4: Gegenüberstellung der immunhistochemischen Färbungen.....44

Abbildung 5: Fibrose. Histologische VES-MTC-Färbung 45

Abbildung 6: Quantitative Analyse der Median- und Mittelwerte für die unterschiedlichen histologischen und immunhistochemischen Färbungen.....46

Abbildung 7: Quantitative Analyse der m-RNA-Expression von an Angiogenese, Lymphangiogenese und Fibrose beteiligten Genen 49

Abbildung 8: Repräsentative Bilder der Auswirkungen von ANGPT2 und VEGF-C auf die Lymphangiogenese.....54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien und Kits 17

Tabelle 2: Verwendete Antikörper, Seren, Primer, Enzyme und Nukleotide 19

Tabelle 3 Verwendete Primer mit jeweiligen Sequenzenpaaren.....20

Tabelle 4: Verwendete Geräte 20

Tabelle 5: Verwendete Puffer und im Labor hergestellte Lösungen 21

Tabelle 6: Weitere verwendete Hilfsmittel 22

Tabelle 7: Verwendete Software 24

Tabelle 7: Spezifische Schritte der CD31-immunhistochemischen Färbung.....31

Tabelle 8: Spezifische Schritte der immunhistochemischen Färbung von Podoplanin 32

Tabelle 9: Spezifische Schritte der immunhistochemischen Färbung mit Lyve-1 32

Tabelle 10: Spezifische Schritte der immunhistochemischen Färbung mit CD68 33

Tabelle 11: Aufstellung der beeinflussbaren Risikofaktoren der KHK.....41

1. Einleitung

Atherosklerose ist die pathophysiologische Grundlage von zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen in den Industrienationen. Die Atherosklerose der Herzkranzgefäße, die koronare Herzkrankheit (KHK), war im Jahr 2019 weltweit die Ursache für etwa 49,2 % der Todesfälle im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen (1). Unter den möglichen Konsequenzen dieses Leidens befinden sich nicht nur kardiovaskuläre Ereignisse, wie ein Myokardinfarkt, sondern auch der Tod oder die Verminderung der Lebensqualität durch die eingeschränkte Teilhabe an Alltagsaktivitäten (2–5).

Nach aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen werden die pathophysiologischen Vorgänge der Atherosklerose nicht mehr nur auf die arterielle Gefäßwand begrenzt. Die chronische Inflammation der Gefäßwand steht in kontinuierlicher Wechselwirkung mit dem, im Jahr 1991 von Soltis & Cassis zuerst beschriebenen (6), perivaskulären Fettgewebe (*Perivascular adipose tissue,* (PVAT)) (7). Im gesunden Zustand übt dies durch die Ausschüttung von parakrinen Botenstoffen überwiegend vasoregulatorische und protektive Fähigkeiten auf die arterielle Gefäßwand aus. Beim Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren diese die protektiven Eigenschaften des PVAT jedoch verloren, was die destruktiven Eigenschaften der Atherosklerose verstärkt und zur Pathogenese dieser Erkrankung beiträgt. Daraufhin kommt es zur Inflammation sowie zur phänotypischen und biochemischen Veränderung des PVAT. Diese Umwandlung vom PVAT wird von manchen Autoren in der Literatur als „PVAT-Dysfunktion“ bezeichnet (8–10).

Der menschliche Körper verfügt über die *A. thoracica interna* (IMA), die kaum Atherosklerose aufweist (11). Die genauen Ursachen hierfür sind in ihrer Vollständigkeit noch nicht geklärt. Unter den möglichen Hypothesen befindet sich ein für die IMA ausgedehntes begleitendes Lymphgefäßnetz als Voraussetzung für den Schutz gegen Atherosklerose (12). Die Präsenz von Lymphgefäßen in der Umgebung von atherosklerotischen Plaques wurde bereits beschrieben. Drozdz et al. (2008) stellten in humanen Proben der *A. carotis interna* eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad der atherosklerotischen Plaques und der Anzahl an Lymphgefäßen in der äußersten Gefäßwandschicht, der Adventitia, fest (13).

Unter physiologischen Bedingungen dient das Lymphgefäßsystem dem Gleichgewicht der Gewebeflüssigkeit und der Aufrechterhaltung des hydrostatischen und onkotischen Druckes (14). Es funktioniert als Transportmedium für aktive Biolipide (15) und unterstützt über den reversen Cholesterintransport (RCT) den Abtransport von überschüssigem extrazellulären Cholesterin (16) und die Aufrechterhaltung des Fettstoffwechsels. Zudem bildet es durch sein

flächig verteiltes Netzwerk ein Transportmedium für Abwehrzellen, die an der Bekämpfung von inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Auch dient es durch die Förderung der immunologischen Interaktion von Abwehrzellen und körperfremden Antigenen der Modulation des Immunsystems (17).

Es sind diese beschriebenen Funktionen, die es dem Lymphgefäßsystem erlauben, mit atherosklerotischen Plaques in Wechselwirkung zu treten. Infolge einer Inflammation der innersten Schicht der Arterien, der Intima, nach einer Kathetermaßnahme ergab sich eine reaktive Angio- und Lymphangiogenese sowie eine infolgedessen verursachte Makrophagenanreicherung in der Adventitia (18). Lim et al. (2013) stellten fest, dass in einem dyslipidämischen Mausmodell die Anwesenheit von funktionstüchtigen Lymphgefäßen zur Erhaltung der Funktionalität des RCT erforderlich ist (19). Martel et al. (2013) zeigten durch ein genetisch verändertes Mausmodell mit gestörtem lymphatischen System einen abgeschwächten RCT mit resultierender Akkumulation von Cholesterin in der Aorta (20).

Die Ergebnisse histologischer Analysen von Eliska et al. (2006) und Martel et al. (2013) ergaben weitere Erkenntnisse zur anatomischen Lokalisation von Lymphgefäßen in der Nähe atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen (20, 21). Eliska et al. (2006) zeigten in menschlichen Proben die Anwesenheit von Lymphgefäßen eher im periadventitiellen Bereich als in der Adventitia selbst (21). Auch in dem oben beschriebenen Experiment von Martel et al. (2013) fand sich ein ausgedehntes Lymphgefäßnetz im Bereich des perivaskulären Fettgewebes in räumlicher Nähe von atherosklerotischen Plaques (20).

Bereits vor zwei Jahrzehnten wurde die Funktion der Lymphgefäße im periadventitiellen Bereich bekannt. Sie dienen dem Abfluss von interstitieller Flüssigkeit aus der arteriellen Gefäßwand (22). Bei einer Störung dieser Funktion zeigt sich eine ausgeprägte Anfälligkeit für Atherosklerose, die auf der, durch den verhinderten Lymphabfluss bedingten Schwellung der Intimaschicht beruht (23, 24). Zudem konnte eine Abflussstörung der Lymphflüssigkeit im atherosklerotischen Mausmodell festgestellt werden, die auf eine erhöhte Permeabilität der Lymphgefäße zurückzuführen ist (25).

Bei der Suche nach möglichen Antworten für die bisher unaufgeklärten Ursachen der Fähigkeit des PVAT um die IMA, Letztere gegen Atherosklerose zu schützen, besteht die Vorstellung, dass das Lymphgefäßsystem eine vertretbare Beteiligung an dieser Widerstandsfähigkeit haben kann. Dass sich die Lymphgefäße im PVAT unterhalb von atherosklerotischen Gefäßen befinden, konnte bereits festgestellt werden. Über die Funktionalität dieser Lymphgefäße wurde bisher wenig geschrieben. Damit stellt sich die Frage, ob das PVAT um die IMA über ein ausgedehntes und überproportional funktionstüchtiges Lymphgefäßnetzwerk verfügt, das eine unkontrollierte Ansammlung von Cholesterinmolekülen in der Intima verhindert und

sogleich eine außerordentliche Anzahl an Abwehrzellen von dem chronischen inflammatorischen atherosklerotischen Prozess aussondert. Demgegenüber stellt sich die Frage, ob die Lymphgefäße in dem dysfunktionalen PVAT unterhalb von atherosklerotischen Plaques ihren Aufgaben, dem Cholesterin-Abtransport, der Linderung von Inflammation und dem Abfluss von interstitieller Flüssigkeit aus der Gefäßwand, aufgrund einer eingeschränkten Funktion nicht nachkommen.

Bisher existieren nur wenige Studien über den Einfluss des perivaskulären Fettgewebes auf das Lymphgefäßsystem im Rahmen einer KHK. Das Ziel dieser Dissertation ist es, mögliche Unterschiede zwischen dem regulären und dem pathologisch veränderten dysfunktionalen PVAT in Bezug auf Angiogenese, insbesondere die Lymphangiogenese sowie mögliche Folgen wie Inflammation und Fibrose zu beschreiben. Das PVAT um die IMA wurde als physiologisch, das um die Aorta als pathologisch betrachtet. Die Fettgewebsproben wurden im Rahmen einer Studie, während aortocoronarer Venenbypass-Operationen erworben. Durch histologische, immunhistochemische und mRNA-Expressions-Untersuchungen wurden charakteristische Merkmalszüge dieser Fettgewebe festgestellt. Ziel dieser Arbeit ist die Festlegung der Ausdehnung des Lymphgefäßnetzes im PVAT. Zudem wird nach Hinweisen gesucht, die auf eine gestörte oder verstärkte Funktion dieses Abflusssystems hindeuten.

Entsprechend sollen folgende Forschungsfragen beantwortet werden: Zeigt das PVAT um die Koronargefäße eine erhebliche Expression an lymphangiogenetischen Genen und immunhistochemischen Markern im Vergleich zum PVAT um die IMA? Entsteht durch den bidirektionalen Signalweg zwischen dem PVAT und den atherosklerotischen Plaques ein gestörtes Lymphsystem im PVAT, dass die Ausbildung und/oder Weiterentwicklung von Atherosklerose begünstigt?

2. Literaturdiskussion

Der theoretische Kontext dieser Dissertation schließt die Pathophysiologie der Atherosklerose, die Eigenschaften vom PVAT und das Lymphgefäßsystem ein. Im folgenden Kapitel werden wesentliche Angaben über diese Bereiche ausgeführt. Zunächst wird die Pathophysiologie der koronaren Herzkrankheit ausführlich erläutert. Anschließend erfolgt ein kurzer Einblick in die beeinflussbaren kardiovaskulären Risikofaktoren, die einen wesentlichen Einwirkung auf die Erkrankungsentwicklung haben. Um das PVAT einzuführen, werden seine phänotypischen Merkmale und Funktionen in Bezug auf die arteriellen Gefäße aufgezeigt. Die Entwicklung seines dysfunktionalen Zustands, unter dem Einfluss der oben genannten kardiovaskulären Risikofaktoren und die Erläuterung seiner wichtigsten parakrinen Botenstoffe geben Hinweise über seine Beteiligung in der atherosklerotischen Erkrankung. Zum besseren Verständnis der Funktion von Lymphgefäßen innerhalb des PVAT, das in der Entwicklung der atherosklerotischen Erkrankung beteiligt ist, werden die Entstehung und Funktion dieses Gefäßsystem ausführlich beschrieben. Zudem werden publizierte Ergebnisse über der nachgewiesenen Beteiligung und Anwesenheit des Lymphgefäßsystem in Nähe von atherosklerotischen Plaques dargestellt.

2.1 Die koronare Herzkrankheit

Die KHK findet ihre Grundlage in der Ausbildung von atherosklerotischen Plaques in der Wand von Koronargefäßen. Die Koronargefäße dienen der Versorgung des Herzmuskels mit Nährstoffen und Sauerstoff. Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization,* WHO) führt die KHK unter der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen. Trotz Bemühungen der WHO zur Reduktion der diese Erkrankung verursachenden Risikofaktoren und somit zur Senkung der Mortalitätsraten sind diese Pathologien bis zur Gegenwart immer noch für etwa die Hälfte der Todesursachen in Europa verantwortlich (26) und stehen deshalb im Mittelpunkt der präventiven Medizin und wissenschaftlichen Forschung.

2.1.1 Die Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine komplexe chronische Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems und ist durch ihren multifaktoriellen und dynamischen Bildungsmechanismus aus Endothelschädigung, gestörtem Cholesterintransport, Zellinfiltration, Inflammation und Risikofaktoren gekennzeichnet (27, 28). Der Ursprung dieser chronischen Wandprozesse ist auf eine Endothelschädigung zurückzuführen. Diese wird vorzugsweise an empfänglichen

Stellen des arteriellen Gefäßsystems gebildet, beispielsweise an Gefäßabgängen, Bifurkationen, Kurvaturen oder Orten turbulenter Blutströmung (29), wo sich relevante Scherspannungen auf das Endothel auswirken (30) (31).

Eine kontinuierliche Exposition von turbulenten Strömungen führt im Endothel zur Aktivierung der inflammatorischen Signalkaskade des *Nuclear Factor Kappa B* (NF-κb) (32–35). Zum einen ändert das Endothel sein physiologisches protektives Expressionsprofil und exprimiert vermehrt NF-κb-abhängige Gene für Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren (36–39). Zum anderen erhöht sich die Permeabilität des Endothels durch Lockerung der seitlichen Endotheladhäsionsmoleküle, der *Tight Junctions*, wie in einer In-vitro-Studie gezeigt werden konnte (40). Laut Nielsen et al. (1996) resultiert daraus eine Mehraufnahme von Lipoproteinen-niedriger-Dichte(LDL)-Cholesterinmolekülen in der subendothelialen Schicht der Gefäßwand und ein vereinfachter Eintritt von Entzündungszellen in die Intima (41).

Die Akkumulation von LDL-Molekülen in der subendothelialen Schicht wird durch ihre physikalische Verankerung an extrazelluläre Matrixpartikel, die Proteoglykane, gefördert (42). Die Weiterentwicklung vom atherogenen Läsionen oder *Fatty Streaks* zu atherosklerotischen Plaques wird durch erhöhten oxidativen Stress bei Vorliegen von Risikofaktoren wie Dyslipidämien, arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus (DM) und Rauchen akzeleriert (43). Unter solchen Bedingungen werden LDL-Moleküle durch freie Radikale oxidiert. Letztere werden von oxidatorischen Enzymen an der Gefäßwand, wie den Myeloperoxidasen (44), Gefäßperoxidase (VPO-1) (45), Xanthinoxidasen und Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat(NADPH)-Oxidasen (46) generiert.

Mit der Bildung von *oxidized LDL* (ox-LDL) werden weitere inflammatorische Signalwege aktiviert und die Endotheldysfunktion verstärkt (47). Chemotaktische Faktoren, wie Monocyte-chemoattract protein-1 (MCP-1), und Adhäsionsmoleküle für Entzündungszellen werden nach einer signifikanten Exposition mit ox-LDL vermehrt exprimiert, wie die In-vitro-Studie von Zhang et al. (2013) zeigte (48). Monozyten wandern in die subendotheliale Schicht ein und schütten dort inflammatorische Zytokine aus. Die Cholesterinaufnahme in Makrophagen wird durch eine gesteigerte Expression von Cholesterinrezeptoren erhöht. Durch die Herunterregulierung der Expression von Cholesterin-Abtransport-Kanälen an den Makrophagen kommt es zu einem gestörten Cholesterin-Efflux. Resultat dieser Veränderungen ist die Bildung von Schaumzellen (49).

Die Weiterentwicklung von Schaumzellen zu atherosklerotischen Plaques wird durch vom ox-LDL veränderte vaskuläre glatte Muskelzellen (*Vascular Smooth Muscle Cell*, VSMC) beeinflusst. Die phänotypischen Veränderungen, Proliferation und molekularen Umstrukturierungen von VSMC treiben eine auf Schaumzellen gerichtete Migration an. Dort

verstärken die VSMC durch Ausschüttung von inflammatorischen Signalproteinen die Aufrechterhaltung der Plaquebildung (50). Durch die vermehrte Ausschüttung der lymphatischen Zytokine CXCL3 und CCL21 initiieren die veränderten VSMC die Ausbildung eines tertiären lymphatischen Organs in der Adventitia (51). Dies beinhaltet eine verstärkte Proliferation von B- und T-Lymphozyten sowie eine gesteigerte Neoangiogenese und Lymphangiogenese in der äußersten Schicht der Gefäßwand (52). Außerdem exprimieren die veränderten VSMC, die die Bildung des tertiären lymphatischen Organs steuern, weitere inflammatorische Zytokine. Hiernach werden weitere Entzündungszellen, wie Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, in der Adventitia gelockert (53).

Des Weiteren fördert die Umstrukturierung der Adventitia den Entwicklungsgang von atherosklerotischen Plaques. Dies ergibt sich zum einen aus der Erweiterung ihres Vasa-vasorum-Netzwerks. Es findet im Rahmen des inflammatorischen Umbauprozesses der Gefäßwand während der Fortentwicklung der Plaquebildung statt (54). Zum anderen ist dies auf die aus der erhöhten Neoangiogenese resultierenden verstärkten Inflammation der Adventitia und Intima durch Rekrutierung von Entzündungszellen in der Umgebung von fortgeschrittenen Plaques zurückzuführen (55, 56). Diese Erkenntnisse wurden von Sedding et al. (2018) in einem ausgedehnten Review ausführlich dargelegt (57).

Anhand neuerer Studienerkenntnisse ist der Grad der lipidreichen atherosklerotischen Läsionen in Koronargefäßen mit einer ausgeprägten Inflammation in der Adventitia und einer erhöhten Anzahl an Vasa vasorum sowie inflammatorischen Markern in dem angrenzenden epikardialen Fettgewebe assoziiert. Diese Beobachtungen weisen auf einen möglichen Einfluss der lokalen Fettgewebeinflammation auf die Weiterentwicklung von atherosklerotischen Plaques über die Vasa vasorum der Adventitia hin (58). Laut Libby et al. (2019) fördern inflammatorische Zytokine aus dem viszeralen oder perivaskulären Fettgewebe die Bildung von atherosklerotischen Läsionen sowie die lokale Inflammation und Zytokinproduktion in der arteriellen Gefäßwand (59).

In späteren Stadien der Atherosklerose kommt es unter der Makrophagenmigration und der exazerbierten Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und Matrixmetalloproteasen (MMP) zu einer Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (60). Durch die verschiedenen exprimierten MMPs in Makrophagen (61) und VSMC (62) wird die extrazelluläre Matrix durch Erschöpfung von Kollagenfasern (63) mechanisch instabil. Daraufhin kann die fibrotische Kappe des Plaques rupturieren (64), durch Kontakt des Blutes mit Bestandteilen der Gefäßwand kommt es zur Thrombose bis zur vollständigen Okklusion des Gefäßlumens (65) – mit der möglichen nachfolgenden Auslösung einer Ischämie bzw. eines Herzinfarktes im Falle der Koronararterien.

2.1.2 Beeinflussbare kardiovaskuläre Risikofaktoren und ihre Wirkung bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit

Hypertonie

Von Hypertonie oder pathologischem Blutdruck wird gesprochen, wenn bei an zwei unterschiedlichen Tagen durchgeführten Messungen der systolische Blutdruck über 140 mmHg und/oder der diastolische Blutdruck über 80 mmHg liegt (66). Hypertonie erhöht das Risiko für Gefäßwandalterungen (67). Das Vorliegen dieses Risikofaktors ist stark auf das Auftreten von akuten ischämischen Ereignissen des Myokards bezogen (68). Patienten mit Hypertonie zeigen höhergradige Koronarstenosen als Patienten ohne (69).

Nikotinabusus

Nikotin erhöht die Wahrscheinlichkeit des Atherosklerosеleidens durch eine Beeinträchtigung der Vasodilatation (70–73). Zudem fördert er die Ausbildung eines inflammatorischen Milieus der arteriellen Gefäßwand (74, 75). Das Ausmaß an oxidativem Stress steigt unter Nikotinabusus. Daraufhin verändern sich die Lipidserumprofile. Folglich wird die Formation von atherosklerotischen Vorstufen, Schaumzellen und Fatty Streaks, erleichtert (76, 77). Des Weiteren fördert Nikotin die Progression von bereits bestehenden atherosklerotischen Plaques (78–80).

Dyslipidämie

Die Fettmoleküle Cholesterin, Triglyzeride und Phospholipide werden in Proteinkomplexen mit dem Blutstrom in der Peripherie zwecks Energieausnutzung, Hormonbildung und Gallenflüssigkeitsbildung transportiert (81). Bei einem Ungleichgewicht in der Zusammensetzung dieser Komplexe wird von einer Dyslipidämie gesprochen (82, 83). Das kardiovaskuläre Risiko von Dyslipidämien beruht auf den kleinen Apolipoprotein-B-haltigen Lipoproteinen (*Low-Density-Lipoprotein* (LDL), *Intermediate Density Lipoprotein* (IDL), *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL), die den Anfang der Atherosklerose begünstigen (84–86). Das Risiko, an einem akuten kardiovaskulären Geschehen zu leiden, steigt mit Zunahme der zeitlichen Exposition mit hohen Lipoproteinen (87).

Diabetes mellitus

Diabetiker haben ein etwa doppelt so hohes Risiko, an kardiovaskulären Erkrankungen zu leiden wie Nichtdiabetiker (88). Das Risiko von DM für kardiovaskuläre Krankheiten besteht in der vaskulären Schädigung aufgrund von hyperglykämischen Zuständen. Die bei Patienten mit DM verstärkt ausgeprägte endotheliale Dysfunktion (89, 90) verstärkt die Bildung und den Beginn atherosklerotischer Plaques. Die Erhöhung von Oxidationsprodukten (91) und vermehrte Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen (92) tragen im Rahmen dieser metabolischen Störung zu weiteren Gefäßwandschädigungen bei.

Adipositas/Übergewicht

Adipositas erhöht die Wahrscheinlichkeit, kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln und ein akutes ischämische Geschehen zu erleiden (93, 94). Adipositas ist mit einen dauerhaften niedrigschwellig-inflammatorischem assoziiert Zustand (95–97). In der Summe begünstigt Adipositas durch die chronische Exposition der Gefäße mit Inflammation (98, 99) und oxidativem Stress (100) sowie durch die Entstehung von Endotheldysfunktionen (100–102) und eines hyperkoagulabilen Zustands (103–105) (106, 107) das Auftreten eines kardiovaskulären Ereignisses.

2.2 Perivaskuläres Fettgewebe (PVAT)

Das PVAT (Abbildung 1) kommt, außer bei den zerebralen Gefäßen, um die arteriellen Gefäße zirkulär anliegend vor (108, 109) und weist je nach Lokalisation im Blutkreislauf verschiedene Phänotypen auf.

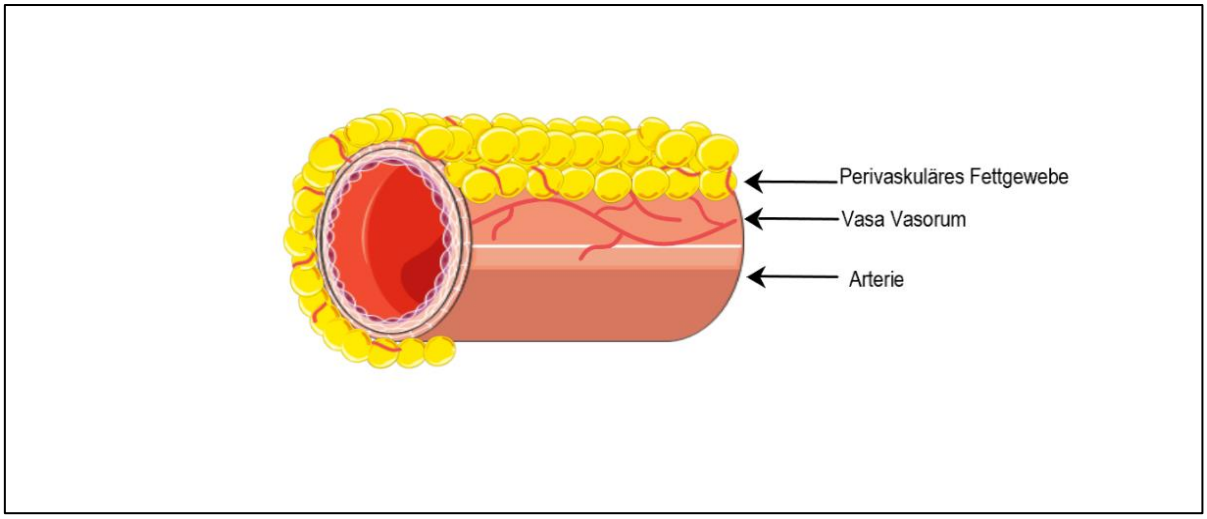

***Abbildung 1**: Schematische Darstellung des perivaskulären Fettgewebes (Eigene Darstellung mithilfe der Image-Bank von Servier Medical Art erstellt)*

2.2.1 Phänotyp

Das Fettgewebe zeigt, je nach Lokalisation im menschlichen Organismus und Lebensalter, unterschiedliche phänotypische Ausprägungen. Das weiße Fettgewebe befindet sich in der Bauchhöhle und subkutan (110), das braune Fettgewebe hauptsächlich in der perirenalen (111), supraklavikularen und der zervikalen Region (112).

In Tierstudien stellte sich das abdominelle PVAT mit einem weißen, fettgewebsähnlichen Aussehen und das thorakale PVAT mit einem vorwiegend braunen Fettgewebsphänotyp dar (113, 114). Das koronare PVAT ist vom epikardialen Fettgewebe physisch nicht getrennt und zeigt, trotz Expression einiger brauner Fettgewebsgene, einen weißen fettgewebeähnlichen Phänotyp (115). Die Adipozyten des PVAT sind weniger differenziert als die der klassischen Fettgewebstypen und neigen, unter entsprechenden Bedingungen, zur Ausschüttung von inflammatorischen Faktoren sowie Wachstumsfaktoren (116). Neben Adipozyten sind andere Zellen im (perivaskulären) Fettgewebe anzutreffen, die dessen Zusammensetzung und Funktion beeinflussen, darunter Endothelzellen, mesenchymale Stammzellen, Präadipozyten und Makrophagen (117–120).

2.2.2 Funktion des perivaskulären Fettgewebes

Früher galt das PVAT als ein rein strukturelles „Organ“, dem eine Haltefunktion der Gefäße zugeschrieben wurde (121). Heute wird dem PVAT eine relevante Funktion in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase zuerkannt. Aufgrund der anatomischen Nähe zur Gefäßwand und deren Vasa vasorum kann es durch Ausschüttung von unterschiedlichen bioaktiven Botenstoffen eine parakrine Fähigkeit ausüben (121).

Unter physiologischen Bedingungen des vaskulären Gewebebetts herrschen im PVAT protektive, anti-inflammatorische und vasoregulatorische Eigenschaften (116, 122, 123). Tierstudien zeigen, dass eine Deletion antikontraktiler Gene im PVAT zur Beeinträchtigung der Vasodilatation in arteriellen Gefäßen beiträgt (124) (125). Eine ausgeprägte Intimahyperplasie wurde infolge der Entfernung von gesundem PVAT in einer anderen Studie bestätigt (9).

Des Weiteren wurde in einer Studie bei Menschen ohne kardiovaskuläre Erkrankungen ein konstitutionsbedingt überwiegend pro-inflammatorisches, angiogenetisches und vaskulär modulatorisches Genexpressionsprofil des koronaren PVAT im Vergleich zu den subkutanen Fettgewebe festgestellt (116). Diese Eigenschaften erlauben es dem PVAT auf, durch metabolische und kardiovaskuläre Risikofaktoren bedingte, Gefäßwandveränderungen zu reagieren. Demnach resultiert ein in beide Richtungen funktionierender Signalweg und eine wechselseitige Beeinflusseung zwischen dem PVAT und der Gefäßwand (126, 127).

2.2.3 Dysfunktion des perivaskulären Fettgewebes

Adipositas (128), Hypercholesterinämie (115), Hypertonie (129), Diabetes (130), erhöhter oxidativer Stress (131) und das metabolische Syndrom (132) führen zu einer Änderung des Phänotyps und der Genexpression im PVAT. Dabei verändert sich die Produktion ihrer parakrinen Botenstoffe zugunsten inflammatorischer Signalwege (133) (115), weshalb sie von einigen Autoren als PVAT-Dysfunktion bezeichnet werden (118, 134, 135). Bei der Entwicklung der PVAT-Dysfunktion nehmen die pathophysiologischen Vorgänge Inflammation und Neovaskularisation eine relevante Stellung ein. Abbildung 2 beschreibt schematisch einen Auszug dieses Prozesses.

Die Folgen der PVAT-Dysfunktion sind bei Diabetes die Störung der insulinabhängigen Vasoregulation aufgrund der Expressionsabnahme von Adiponectin (136). Bei Adipositas führen die vom PVAT ausgehenden relevant hohen Produktionsniveaus an TNF-α zu erhöhten oxidativen Stressniveaus (137). Letzteres wird zum Teil auch für die verminderte

antikontraktile Fähigkeit von PVAT und für die endothelbedingte vaskuläre Dysfunktion verantwortlich gemacht (137, 138).

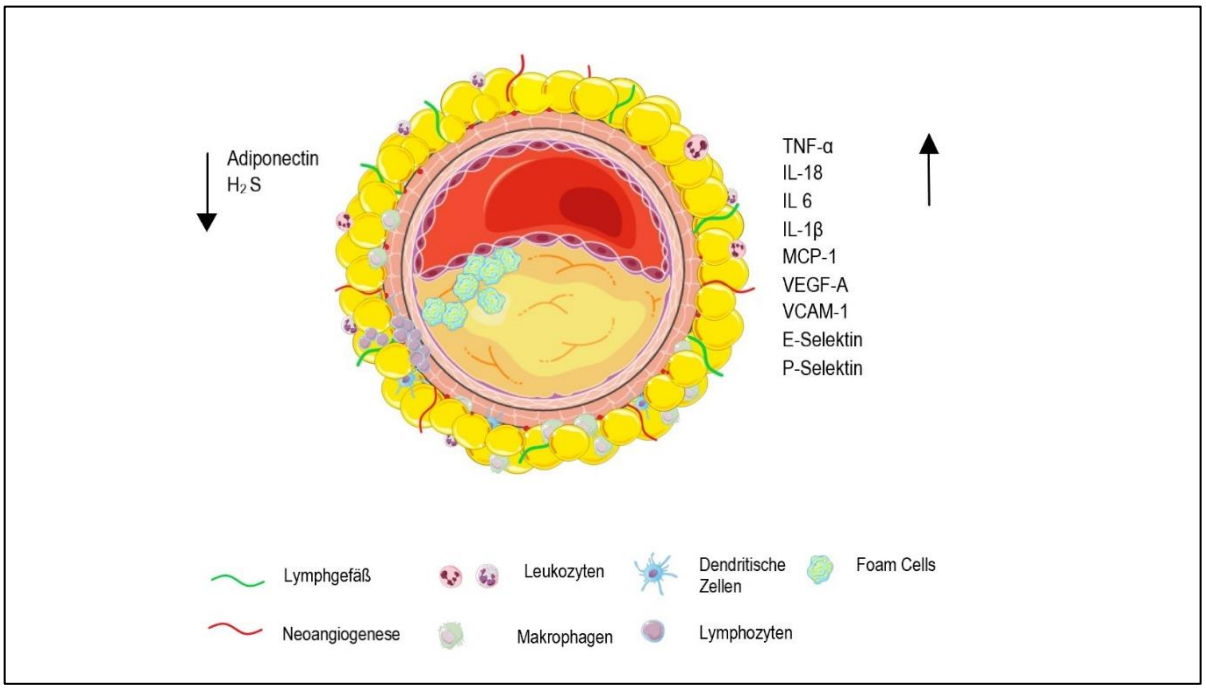

Abbildung 2: *Schematische Darstellung von dysfunktionalem perivaskulärem Fettgewebe (Eigene Darstellung mithilfe der Image-Bank von Servier Medical Art erstellt)*

Im Zusammenhang mit Atherosklerose ist die Inflammation des PVAT ein entscheidender Faktor für die Ausbildung seiner Dysfunktion (118). Die Inflammation von PVAT wurde in einer Post-Mortem-Studie mit humanem PVAT von Koronargefäßen als die lokale Akkumulation von Makrophagen sowohl im PVAT als auch in der Adventitia beschrieben (139). In weiteren Atherosklerose-Tiermodellstudien wurden auch in der Adventitia eine Erhöhung von aktivierten Makrophagen und Entzündungszellen im Allgemeinen (140) sowie ein damit korrelierendes Fortschreiten der Plaquebildung (141) nachgewiesen.

Unter den an der Inflammation beteiligten Abwehrzellen befinden sich auch B- und T-Lymphozyten. Sie finden durch L-Selectin-Rezeptoren in der Wand der Vasa vasorum ihren Weg zur arteriellen Gefäßwand und somit zu atherosklerotischen Plaques (140). Okamoto et al. (2001) zeigten eine inflammatorische Reaktion von PVAT auf Gefäßwandschädigung nach Ballondilatation. Hierbei konnten eine reaktive Erhöhung von P-Selectin, E-Selectin und VCAM-1 in den Vasa vasorum sowie eine Akkumulation von Leukozyten im PVAT ermittelt werden (142).

In einer Tiermodellstudie von Atherosklerose wurde nach einer proatherogenen Diät das Fortschreiten des entzündeten Zustands von PVAT-Adipozyten über die Zeit nachgewiesen.

Hiernach stiegen die Expression der proatherogenen Marker, Interleukin (IL)-1 und IL-6, sowie die Migration von Entzündungszellen, wie die der CD68+-Makrophagen, an. Im Gegensatz dazu ergab sich eine Abnahme des antiinflammatorischen Markers Adiponectin (143). Nach Überprüfung von Galkina E, Ley K (2009) und Aghamohammadzadeh R et al. (2012) zeigte sich im dysfunktionalen PVAT im Rahmen einer atherosklerotischen Erkrankung eine hohe Entzündungszellrate, eine hohe Zytokinproduktion und eine Adipozytenhypertrophie (144, 145). Die Arbeitsgruppe um Zhu bewies im dysfunktionalen PVAT nicht nur die Anreichung von inflammatorischen Makrophagen, sondern auch die Expression von inflammatorischen Zytokinen, wie TNF-α, IL-18, IL-6 und IL-1β. Zudem unterstützt das PVAT die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten in der Adventitia nach vaskulären endothelialen Schäden (146).

Des Weiteren stellt die Neovaskularisation einen wesentlichen Bestandteil der atherosklerotischen Plaquebildung dar. Sie wird von ihrer eigenen Natur aus chronischer Inflammation und der hypoxischen Umwelt beeinflusst (147). Die Assoziation zwischen inflammatorischen Zellen, der Expression der Hypoxie-abhängigen neoangiogenetischen HIF-1-Gene und dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sowie der Neovaskularisation in atherosklerotischen Plaques wurde bereits beschrieben (148). Bezüglich die Rolle der Neovaskularisation in der Entstehung einer PVAT-Dysfunktion gaben Inoue et al. (1998) mit ihrer Hypothese einen Hinweis auf die Beziehung zwischen dem Vorliegen von Inflammation und erhöhter Neovaskularisation der Adventitia im Rahmen atherosklerotischer Gefäßerkrankungen (149). In einer späteren Studie konnte gezeigt werden, dass als Teil der Reaktion von PVAT auf die atherosklerotischen Plaques eine vermehrte Neovaskularisation der Adventitia resultiert. Der Transport von den inflammatorischen Markern TNF-α und die Plaqueweiterentwicklung wurden dadurch begünstigt (150). In einer anderen Studie von Tanaka K et al. (2011) konnte eine Ausbreitung der Plaques erst nach der vermehrten Neovaskularisation der Adventitia gezeigt werden (151) .

Drosos et al. (2016) stellten histologisch eine positive Korrelation zwischen der Akkumulation von Entzündungszellen und dem Auftreten von Neoangiogenese und Hypoxie im humanen PVAT aus der Aortenwurzel und der rechten Koronararterie fest (152). Eine weitere Studie zeigte eine Korrelation zwischen der hypoxischen Adventitia und einer erhöhten Expression des hypoxisch induzierten angiogenetischen VEGF mit einer erhöhten Neoangiogenese im atherosklerotischen Mausmodell (153). Aufgrund neuerer Erkenntnisse hat sich der Terminus *VEGF-A* als angiogenetischer Wachstumsfaktor gegenüber dem Prototyp VEGF durchgesetzt (154, 155). Die Interaktion von VEGF-A mit seinem Rezeptor VEGFR-2 (154) ist für die Bildung von neuen Gefäßen sowohl in der embryonalen Entwicklung (156–158) als auch unter pathologischen Zuständen (159–161) wesentlich.

2.2.4 Adipokine des perivaskulären Fettgewebes

Adiponektin ist ein vom PVAT produzierter parakriner Botenstoff, der in Tierstudien einen antiatherosklerotischen Schutzeffekt zeigte (162). Unter physiologischen Bedingungen treten die antiinflammatorischen Eigenschaften von Adiponektin hervor. Die Komponenten inflammatorischer Kaskaden, wie Entzündungsrezeptoren oder Entzündungsmediatoren, werden durch Adiponektin in ihrer Funktion beeinflusst. Dadurch werden inflammatorische Reaktionen reduziert (163–167). Adiponektin antwortet auf die Erhöhung von Sauerstoffradikalen und zielt auf die Senkung von Oxidationsprodukten der Gefäßwand ab, indem es die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) erhöht. Dies dient auch als Schutzmechanismus gegenüber einer Endotheldysfunktion (126) (168) (169).

Leptin ist ein hauptsächlich vom weißen Fettgewebe produziertes Hormon mit zentralen und peripheren Wirkungen. Im menschlichen Körper dient es der Regulation der Energiespeicherung (170) und des Appetits (109). Durch Bindung seines Rezeptors nimmt es an der Modulation des Signalwegs zwischen Hypothalamus und Gonaden sowie des Insulins (171, 172) teil. Außerdem beeinflusst es das Immunsystem (173–177). Die Produktion von Leptin hat eine positive Korrelation mit der Fettgewebsmasse (178). Als Hormon wird seine Wirkung vom metabolischen Stoffwechsel beeinflusst, was sämtliche Pathologien beschleunigen kann. Die schädlichen Effekte von Leptin im kardiovaskulären System sind auf dessen Produktionsinkrement im Fettgewebe, im Rahmen von Adipositas oder eines metabolischen Syndroms, zurückzuführen (179–181). Zu den Leptineffekten, die zur Verschlechterung von Atherosklerose führen, zählt die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen (182) in den Endothelzellen, die zusammen mit einer ausgeprägten Neointimabildung (183) zu einer Endotheldysfunktion (184, 185) führen kann. Dadurch wird die Vasodilation geschädigt. Zusätzlich wird eine Thrombose (186) begünstigt und das Einströmen von Entzündungszellen erleichtert (187).

Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α) ist ein pro-inflammatorisches Zytokin (188). Es wird im Zusammenhang mit Gewebeschädigung und chronischen inflammatorischen Prozessen vor allem durch Monozyten produziert (189). Das PVAT exprimiert TNF-α in der Nachbarschaft von atherosklerotischen Plaques erst, nachdem es ein dysfunktionales Stadium erreicht hat. Dysfunktionales PVAT weist erhöhte TNF-α-Expressionsniveaus (190) auf. Es führt zu erhöhten oxidativen Stressniveaus und fördert inflammatorische Signalwege wie NK-κB sowie die Expression weiterer inflammatorischer Zytokine wie IL-1β, IL-6, INF-γ (132) und MCP-1 (191). Des Weiteren resultiert es in der Expression von pro-angiogenetischen Faktoren wie VEGF, HGF und IGF-1 in Adipozyten-Vorläuferzellen (192) sowie von MCP-1 (193).

Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)**,** das auch als CC-Chemokinlingand-2 bezeichnet wird, ist ein inflammatorisches Zytokin. Zudem verfügt es über pro-angiogenetische Fähigkeiten (194). Manka et al. stellten in einer Mausmodellstudie durch die Transplantation von thorakalem PVAT an atherosklerotischen Mäusen fest, dass MCP-1 als angiogenetischer Faktor vom PVAT hergestellt wird. Sein angiogenetisches Potenzial ist auf die Hochregulation des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF zurückzuführen (195).

Der VEGF fördert die Angiogenese in vaskulären Pathologien durch die Aktivierung von VEGFR-2. Dies resultiert in der Proliferation des Endothels (196). Dabei kommt es zur Proliferation und Migration von VSMC (197). Während inflammatorischer Prozesse steigt die Expression von VEGF durch die Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen wie NF-κb. Schlichs Arbeitsgruppe belegte, dass perivaskuläre Adipozytenvorläuferzellen eine deutlich höhere Expression des VEGF-Gens unter diabetischen Bedingungen produzieren als das viszerale und subkutane Fettgewebe. Folglich zeigte sich eine erhöhte Proliferation von VSCM (198).

2.3 Das lymphatische System

Das lymphatische System dient der Homöostase der peripheren Gewebeflüssigkeit als Conduit für die interstitielle Flüssigkeit (199) (200), den Transport von Immunzellen und Antigenen (201), die Resolution von Inflammation und den Transport von Lipiden (202) sowie den reversen Cholesterol-Transport (20). Aufgrund der großen Hürden bei seiner anatomischen Darstellung und Erforschung dauerte es viele Jahrzehnte, bis die ersten Hypothesen über seinen möglichen Einfluss auf kardiovaskuläre Pathologien erschienen (203).

Die Neuentstehung von Lymphgefäßen, die Lymphangiogenese, wird im reifen Organismus durch entzündliche Prozesse, Gewebereparaturmechanismen und Wachstum von Tumoren getriggert (204–207). Da die molekularen Abläufe der adulten Lymphangiogenese die Ereignisse der embryonalen Lymphangiogenese ähneln, werden in dem folgenden Unterkapitel 2.3.1. die wichtigsten Auszüge und teilnehmenden Moleküle der embryonalen Lymphangiogenese erläutert.

2.3.1 Lymphangiogenese, die Entstehung des lymphatischen Systems

Über den genauen Beginn der Entstehung des lymphatischen Gefäßsystems während der frühen embryonalen Entwicklung wird in der Literatur noch umfangreich diskutiert (208–213). Allerdings werden auch bei diskreten unterschiedlichen Hypothesen die gleichen

Entwicklungsfaktoren, wie SRY box 18 (Sox 18), Homeobox 1 Transkriptionsfaktor 1 (Prox-1), *Vascular Endothelial Growth Factor C* (VEGF-C), *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3* (VEGFR3), Lyve-1 und Podoplanin, dargestellt.

Nach den ersten Schritten der Vaskulogenese während der frühen Entwicklungswochen werden aus bereits angelegten embryonalen Venen bestimmte LYVE-1-positive Endothelzellen mit erhöhter Expression des PROX-1-Transkriptionsfaktors zu lymphatischen Vorläuferendothelzellen (214). Die erhöhte Expression und Aktivierung von PROX-1 wird durch die Bindung des Transkriptionsfaktors Sox-1 gesteuert (215). Der Rezeptor VEGFR3 wird zum Bindungsziel vom Prox-1. Dieser bindet wiederum Prox-1 in Form einer Rückkopplungsschleife und erhält die Anwesenheit vom Prox-1 in den lymphatischen Endothelvorläuferzellen aufrecht (216).

Nach Aufrechterhaltung der lymphatischen Vorläuferzellen fangen diese von den embryonalen venösen Strukturen an zu sprießen. Das Aufkeimen und die Migration der lymphatischen Vorläuferendothelzellen zu lymphatischen Endothelzellen sowie die Ausbildung der ersten Lymphsäcke wird durch den VEGFC-/VEGFR3-Signalweg gefördert (217, 218). Kurz vor der Aufkeimung erhöht sich die Expression von Podoplanin in den lymphatischen Vorläuferendothelzellen, was durch Thrombozytenaktivierung für die venös-lymphatische Gefäßtrennung wesentlich ist. Bei den aktiven, migrierenden lymphatischen Endothelzellen bleibt auch die Podoplanin-Expression erhöht (213, 219, 220). Im Gegensatz dazu ist die LYVE-1-Expression, kurz nach dem Aussprossen, etwas niedriger verglichen mit der in den lymphatischen Vorläuferendothelzellen (214, 219).

Ein weiterer Ligand von VEGFR3, das VEGF-C-Homolog VEGF-D (221, 222), ist auch nach seiner proteolytischen Aktivierung für die Interaktion mit dem Rezeptor und die Steuerung der Lymphangiogenese bekannt (223). Einige Studien weisen auf seine wesentliche Funktion im reifen Organismus während pathologischer Prozesse, z. B. im Rahmen von inflammatorischen Prozessen (224) oder Tumormetastasen (225), hin.

2.3.2 Rolle des lymphatischen Gefäßsystems in der Pathogenese von Atherosklerose und Hinweise auf seine Anwesenheit im perivaskulären Fettgewebe

Die Beteiligung des Lymphgefäßsystems in der Pathogenese von Atherosklerose begann erst in den letzten zwei Jahrzenten, an Interesse zu gewinnen. In Menschen zeigte eine Post-Mortem-Studie anhand einer Analyse der Gefäßwandschichten von atherosklerotischen Koronargefäßen die Präsenz von Lymphgefäßen in netzwerkartigen Formationen in der Adventitia (226). In Bezug auf atherosklerotische Veränderungen gibt es Hinweise auf die

Beteiligung von Lymphgefäßen an zwei wesentlichen Bestandteilen der Atherosklerose, dem RCT und der peri-adventitiellen Inflammation.

Eine atherosklerotische Mausmodellstudie mit lymphatischer Dysfunktion deutet aufgrund der größeren und fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen in der Intima und Media im Vergleich zur Kontrollspezies auf eine nachweisbare Teilhabe des Lymphsystems in der Entwicklung von Atherosklerose hin (227). Martel et al. (2013) belegten in einem dyslipidämischen Mausmodell mit zusätzlichen dysfunktionalen Lymphgefäßen einen infolgedessen gestörten RCT und eine Akkumulation von Cholesterol in der Aorta (20). Andere stellten in einem für Atherosklerose anfälligen dyslipidämischen Mausmodell fest, dass eine Dysfunktion der Lymphgefäße bereits vor der Entstehung von atherosklerotischen Plaques besteht (228).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass während der Inflammation der arteriellen Gefäßwand (229) in Rahmen der Atherosklerose eine Zunahme von Lymphgefäßen in der Adventitia auftritt (230, 231). Nach einer iatrogenen Endothelschädigung durch einen Ballonkatheter ergab sich eine reaktive Angio- und Lymphangiogenese in der Adventitia. Zudem zeigte sich dabei eine Anreicherung an Entzündungsmakrophagen und eine erhöhte Expression an Lymphangiogenese-Wachstumsfaktoren (18). Grzegorek et al. bestätigten auch eine erhöhte Expression der Lymphangiogenese-Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D in der Adventitia atherosklerotischer Arterien. Zudem konnte ein ausgeprägter Verkehr an Entzündungszellen durch die gesamte Gefäßwand festgestellt werden (232). Rademakers T et al. (2017) konnten eine Anreicherung von inflammatorischen T-Lymphozyten in der Adventitia und atherosklerotische Plaquegebilde nach der Dissektion der drainierenden Lymphgefäße ermitteln (233).

Aufgrund der anatomischen Nähe und parakrinen Beziehung zwischen dem PVAT und Arterien ist es denkbar, dass das PVAT über die Lymphangiogenese auch einen Einfluss auf das Fortschreiten der Plaques bei Atherosklerose ausübt. Einer Forschungsgruppe gelang mittels Genüberexpression von entzündungsgetriebenen lymphangiogenetischen Wachstumsfaktoren in weißem Fettgewebe das überschießende Wachstum und die Neubildung von Lymphgefäßen. Eine nachfolgende Einwanderung von Makrophagen hat sich dabei bestätigt (234).

In der oben beschriebenen Studie vom Martel werden Hinweise für die mögliche Teilnahme von Lymphgefäßen innerhalb des PVAT im Rahmen der Atherosklerose angedeutet. Demnach wurden Lymphgefäße nicht nur in der Adventitia unterhalb von atherosklerotischen Plaques, sondern auch in dem anliegenden PVAT in- und auswebend gefunden. Eine einheitliche Grenze konnte nicht demonstriert werden (20).

3. Materialen

3.1 Reagenzien und Kits

Tabelle 1: *Verwendete Reagenzien und Kits (eigene Darstellung)*

Name	Bestellnummer	Firma
AEC-Kit	SK-4200	VECTOR LABORATORIES INC, Burlingame, USA
5X Buffer	M891A	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA
Chloroform	7331.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Cyber green	172-5274	Bio-rad Laboratories, Inc., Hercules, California
DAB Kit	SK-4100	VECTOR LABORATORIES INC, Burlingame, USA
DEPC Wasser	T1431	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Entellan	1.07961.0100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
100 % EtOH	A36778	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
96 % EtOH	A2551	PanReac AppliChem, ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland
70 % EtOH	T913.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany
Gill’s Hämatoxylin	GHS332	Sigma-Aldrich (Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland

3 % H_2O_2	9681.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ImmEd Pen	H-4000	VECTOR LABORATORIES INC., Burlingame, USA
ImmuMount	9990412	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
0,9 % NaCl	REF 3570160	B Braun Melsungen, Hessen, Deutschland
2 M NaOH	182158.1211	PanReac AppliChem, ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland
Nuklease-freies Wasser		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
$MgCl_2$	A351H	Promega Corporation, Madison, WI, USA
PBS-Lösung	10010056	Gibco (ThermoFisher Scientific), Waltham, USA
RNA-Isolation Nucleospin RNA-Kit	-	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland
RNAse Away	Catalog Nr.7002	Molecular Bioproducts, San Diego California
Roti-liquid Barrier	AN92.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
0,05 % Triton X100	3051.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRI-Reagent® Solution	AM9738	Ambion (ThermoFischerScientific), Waltham, USA
VectaStain ABC-Kit-Elite	PK-6100	VECTOR LABORATORIES INC., Burlingame, USA

Xylol	9713.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.2 Antikörper, Seren, Enzyme und Nukleotide

Tabelle 2: *Verwendete Antikörper, Seren, Primer, Enzyme und Nukleotide (eigene Darstellung)*

Name	Bestellnummer	Firma
Biotin-XX-goat-anti-mouse IgG	B2763	Life Technologies (ThermoFischer Scientific), Waltham, USA
Biotin-XX-goat anti-rabbit IgG	B2770	Molecular Probes (ThermoFischer Scientific), Waltham, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human CD68-Antibody	M 0876	Dako (Agilent Technologies, NC.), Santa Clara, United States
Monoclonal Mouse Anti-Human CD31-Antibody	M082301-2	Dako (Agilent Technologies, INC.), Santa Clara, United States
Rabbit Monoclonal Anti-Mouse/Human CD3-Antibody	Ab 6669	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit Polyclonal Anti-Human LYVE-1 Antibody	NPB2-38500	Novus Biologicals, Colorado, USA
Rabbit Polyclonal Anti-Human, Mouse Podoplanin-Antibody	NBP1-90211	Novus Biologicals, Colorado, USA
dNTP	C1145	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Random Hexamer Primer	C1181	Promega Corporation, Madison, WI, USA

RNAse Inhibitor	N2515	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Reverse Transkriptase	M1701	Promega Corporation, Madison, WI, USA
DNA Ladder Marker 100 bp	N3231L	New England Biolabs Inc. Ipswich, USA

3.3 Primer

Tabelle 3 *Verwendete Primer mit jeweiligen Sequenzenpaaren*

Primer	Gen	Sequenz (5´-3´ Richtung)	Firma
VEGF-A	VEGFA	F: CTACCTCCACCATGCCAAGT R: GCAGTAGCTGCGCTGATAGA	Eurofins Genomics, Louisville, KY, USA
VEGF-C	VEGFC	F: CACGAGCTACCTCAGCAAGA R: GCTGCCTGACACTGTGGTA	Eurofins Genomics, Louisville, KY, USA
VEGF-D	VEGFD	F: CCTGAAGAAGATCGCTGTTC R: GAGAGCTGGTTCCTGGAGAT	Eurofins Genomics, Louisville, KY, USA
VEGFR3	FLT4	F: GCACTGCCACAAGAAGTACCT R: GCTGCACAGATAGCGTCCC	Eurofins Genomics, Louisville, KY, USA
LRP-10	LRP10	F: GGATGGAGGCTGAGATTGTGCA R: CTGTAGCAGAGAACGCAGGTTG	Eurofins Genomics, Louisville, KY, USA
TGFB	TGFB1	F: TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC R: GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA	Eurofins Genomics, Louisville, KY, USA

F: forward primer; R: reverse primer

3.4 Geräte

Tabelle 4: *Verwendete Geräte (eigene Darstellung)*

Name	Modelnummer	Firma

Einbettautomat	EG1150	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Homogenizator	MICCRA D1	MICCRA GmbH, Heitersheim, Deutschland
Mastercycler Themocylcer	Nexus gradient 6331 CN 205309	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	BX51	Olympus optical CO, Ltd Hamburg Deutschland
Mikroskop	-	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle	-	Sharp K.K; Osaka Japan
Ofen Heratherm	-	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Bio-Photometer	613121221	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer	-	VWR International GmbH; Darmstadt, Deutschland
Vortex 2 Genie	6560E	Scientific Industries; New York, USA
Zentrifuge	5424 R	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.5 Puffer und im Labor hergestellte Lösungen

Tabelle 5: *Verwendete Puffer und im Labor hergestellte Lösungen (eigene Darstellung)*

Name	Herstellung	Bestellnummer und Firma
0,01 M Citrat-Puffer	100 ml 0,1 M Citratpuffer Ph 6,0 in 900 ml d H_2O	Citric Acid Monohydrat C1909 Sigma-Aldrich,

		(Merck KGaA), Darmstadt, Deutschland
10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 9,0	12,1 g Tris + 3,72 EDTA in 800 ml d H_2O	Tris 0188.3, EDTA-Dinatriumsalz A3553, PanReac AppliChem, ITW Reagents, Darmstadt, Deutschland
50 % EtOH	714 ml 70 % Ethanol in 1000 ml d H_2O	70 % EtOH T913.3, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
3 % H_2O_2 in Methanol	450 ml Methanol in 50 ml 30 % H_2O_2	Methanol CP43.2, 30 % H_2O_2 9861.4, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

3.6 Weitere Hilfsmittel

Tabelle 6: *Weitere verwendete Hilfsmittel (eigene Darstellung)*

Name	Bestellnummer	Firma
Becherglas 600 ml	10047543	Schott Duran, Mainz, Deutschland
Deckgläser 24 x 600 mm Menzel-Gläser		Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
EDTA-K Monovette 2,7 ml	04.1951.001	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Eis		Klinikintern

Eppendorf Safe Block Tubes 1,5 ml	0030120.086	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe Block Tubes 2,0 ml	0030.120.094	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe BlockTubes mit Drehverschluss 2,0 ml	1003-8760	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falconröhrchen 50 ml Cellstar Tubes	227261	ThermoFischer Scientific Waltham, USA
Falconröhrchen 15 ml Cellstar Tubes	188 271	ThermoFischer Scientific Waltham, USA
Flüssiger Stickstoff	-	Klinikintern
Glasküvetten	631-9328	VWR International GmbH; Darmstadt
Objektträger 76 x 26 mm	011101	Diagonal GmbH & Co.KG, Münster Deutschland
Pasteurpipetten nicht steril 5.8 ml 14.7 cm	612-4492	VWR International GmbH; Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten nicht steril 5.8 ml 15.5 cm	612-4494	VWR International GmbH; Darmstadt, Deutschland
PCR-Platten 96 Well	Catalog Nr MLL9601	Bio-rad Laboratories Inc., Hercules, California
Pipettenspitzen 1250 µl	VT0270	SurPhob, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 100 µl	VT0230	SurPhob, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	VT0200	SurPhob, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Präparierbesteck	-	Klinikintern

Roti-Liquid Barrier	AN92.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Safety-Multifly-Kanüle 21 G	85.1638.235	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serum-Gel Monovetten 7,5 ml	02.1388	Sarstedt AG & Co.KG Nümbrecht, Deutschland
Sterile Pipetten 25 ml	760107	Cellstar, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhauen, Deutschland
Sterile Pipetten 10 ml	607107	Cellstar, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhauen, Deutschland
Tesa	-	Schreibwarenladen
Wasserfester Stift	-	Schreibwarenladen

3.7 Software

Tabelle 7: *Verwendete Software (eigene Darstellung)*

Name
GraphPadPrism 8.0
Excel 2010
Image-Pro® Plus Version 7.0 for Windows
PCR-Software
Word 2010

3.8 Studie und Patientenkollektiv

Die Datenerhebung dieser Doktorarbeit erfolgte im Rahmen einer klinisch-experimentellen Beobachtungsstudie. Diese wurde als Kooperationsstudie zwischen dem Zentrum für

Kardiologie, Kardiologie I der Universitätsmedizin Mainz und der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Die Studie entspricht der Erklärung von Helsinki und wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz genehmigt (Bearbeitungs-Nr. 837.048.15 (9816; Schreiben vom 13.04.2015).

Patienten, die sich einer elektiven koronaren Bypassoperation in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie (HTG) der Universitätsmedizin Mainz unterzogen, sind bei der Aufnahme nach erfülltem Einschlusskriterium (Zwei- oder Dreigefäß-KHK) und bei Einwilligungsfähigkeit zur Studienteilnahme aufgenommen worden. Demente Patienten und aus anderen Gründen nicht einwilligungsfähige Patienten wurden von der Studie ausgeschlossen. Alle an der Studie teilnehmenden Patienten haben nach ausführlicher Aufklärung des Studienablaufs freiwillig eine Einverständniserklärung unterschrieben. Die Studienteilnehmer konnten die Studie jederzeit abbrechen. Sie erhielten Pseudonyme in Form vom CAD-Nummern, unter denen die Blutproben, Gewebesammlungen und Erhebungen von klinischen Daten anonymisiert stattfanden.

Im Zeitraum von August 2016 bis Mai 2017 fand die Sammlungsphase statt. Das Patientenkollektiv lag insgesamt bei 25 Teilnehmern. Im Anhang befinden sich exemplarisch der Aufklärungsbogen zur Studienteilnahme, sowie der Fragebogen der Studie.

4. Methoden

4.1 Probensammlung

Bei der stationären Aufnahme erhielten die Studienteilnehmer am Vortag der Operation eine venöse Blutentnahme. Hierbei wurden in einer Serum-Gel-Monovette 5 ml und in zwei EDTA-Monovetten jeweils 1,5 ml Blut abgenommen. Die Blutproben wurden bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Aufbewahrung von jeweils 6 x 300 µl Serum bzw. Plasma in beschrifteten 1,5-ml-Eppengrf-Gefäßen erfolgte bei −80 °C. Am Vortag der Operation wurden zudem die für den Patienten zuständigen Operateure über die Einwilligung zur Studienteilnahme informiert.

Am Operationstag konnten nach der erfolgreichen Präparation und nach Anschluss des IMA-Bypasses das Restsegment des bereits präparierten IMA-Gefäßes mit dem umgebenden IMA-PVAT und das C-PVAT mit der Aortenwand-Stanze während der extrakorporalen Zirkulation und nach dem Öffnen der die Aorta schließenden Klemmen in der Zentral-OP der HTG der Universitätsklinik Mainz gesammelt werden. Die frischen Gewebeproben wurden in ein mit 50 ml sterilem NaCl gefüllten Falconröhrchen überführt und anschließend auf Eis gekühlt unverzüglich zur Weiterverarbeitung ins Labor transportiert.

4.2 Probenvorbereitung

Auf einer sauberen Arbeitsoberfläche (Glasplatte) erfolgte mittels Skalpells und Pinzette die Präparation. Geschädigte Gewebeteile und Markierungsclips wurden entfernt. Um eine versehentliche Materialübertragung zu vermeiden, wurden die Gewebeproben in den Gruppen IMA- und C-PVAT hintereinander vorbereitet. Letztlich sollten die Proben in zwei gleichmäßige Mengen geteilt werden, die jeweils für Paraffinschnitte und RNA-Extraktion verwendet werden konnten. Aufgrund der oft geringen erhaltenen Gewebemenge war es jedoch nicht möglich, Proben für alle Untersuchungen zu erhalten. Die Ausführung der Probenaufteilung in Histologie und RNA-Extraktion erfolgte anhand einer Excel-Tabelle.

Histologie:

Zur Vorbereitung des Fixierungsprozesses wurden die Gewebeproben in mit 3 % Zinkformalin gefüllte Glasbehälter überführt und die mit CAD-Codes beschrifteten Proben über Nacht in einem 4° C kalten Kühlschrank aufbewahrt.

RNA-Extraktion:

Die Gewebeproben wurden je nach Größe in unterschiedliche TRIzol®-Volumina in 2,5-ml-Eppendorfgefäßen bei −80 °C aufbewahrt.

4.3 Histologische Färbung und Immunhistochemie

4.3.1 Paraffinschnitte:

Die in 3 % Zinkformalin nachfixierten Gewebeproben wurden nach 24 Stunden in 70%iges Ethanol (EtOH) übertragen. Anschließend erfolgte ein Auswaschungsschritt mit Leitungswasser zur Entfernung von Formalin- und EtOH-Resten. In den folgenden 24 Stunden fand der Einbettungsprozess der Proben in den Einbettautomaten TP1020 der Firma Leica statt. Nach abgeschlossener Einbettung wurden von der technischen Assistentin mit der Paraffin-Einbett-Station Leica EG1150C Paraffinblocks aus den Proben angefertigt. Die Objektträger der jeweiligen Gewebeproben wurden mit dem Mikrotom LEICA RM2245 vorbereitet. Zur histologischen Färbung und immunhistochemischen Behandlung wurden von 10 Patienten jeweils 20 Objektträger pro IMA-PVAT und C-PVAT angefertigt.

4.3.2.Histologische Färbung

Verhoeff’s Elastica-Masson-Trichrom-Färbung (VES-MTC)

Unter der Annahme, dass PVAT in der Anwesenheit von atherosklerotischen Plaques eine phänotypische Umstrukturierung erleidet, wurde nach histopathologischen Unterschieden zwischen den Fettgeweben gesucht. Eine chronische Entzündung führt in den meisten Körpergeweben zu Umbauprozessen, unter anderem zur Fibrosierung. Um eine bessere Übersicht über die Fettegewebezusammensetzung zur schaffen und Hinweise über die Fibrosierung innerhalb des PVAT aufgrund der chronischen Inflammation im Rahmen der Atherosklerose zu erhalten, wurde eine VES-MTC-Färbung angewendet (235). Die Blaufärbung von Kollagenfasern weist auf eine Fibrosierung im Fettgewebe hin (236). Die Fibrosierung wird in Korrelation zur chronischen atherosklerotischen Entzündung gestellt.

Gestartet wurde die Färbung der Objektträger mit der Entparaffinisierung. Diese besteht aus der dreimaligen Einführung der Gewebeschnitte für jeweils 5 Minuten in mit Xylol gefüllte Glasküvetten. Es folgte der Hydrierungsprozess der Objektträger: Diese wurden zweimal für jeweils 2 Minuten in 100 % EtOH überführt, dann zweimal in 96 %, 70 % und 50 % EtOH und letztlich für 5 Minuten in destilliertes Wasser (dH_2O) eingetaucht. Mit dem Ziel der Umfixierung

und Freilegung der nachzuweisenden Proteine wurden die Objektträger über Nacht in Bouin-Fixativ bei Raumtemperatur behandelt. Für die Entfernung der Bouin-Fixativ-Reste wurden die Gewebeschnitte in fließendem Leitungswasser bis zur Klärung ausgewaschen.

Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Proben für 15 Minuten mit Verhoeff's Elastica eingefärbt. In der Folge fand ein Auswaschungsprozess unter fließendem Leitungswasser für 20 Minuten mit anschließendem kurzem Eintauchen in dH_2O statt.

Um eine Differenzierung zu erzielen, wurden die Schnitte für 2 Minuten mit 2%igem Eisenchlorid und für 5 Minuten mit 5 %igem Eisenthiosulfalt behandelt. Das Sichtbarmachen des Zellzytoplasmas wurde durch Einführung in Biebrich-Scarlet–Acid-Fuchsin für 2 Minuten möglich. Folgend wurde die rote Farbe durch dH_2O ausgewaschen und somit geklärt. Eine Entfärbung der Kollagenfaser und die Aufhellung des Zytoplasmas wurden mit der Überführung der Schnitte in 1.25%ige Phosphomolybdic-Phosphotungstic Lösung für ca. 12 bis 15 Minuten ermöglicht. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung der Bindegewebsfasern mit 2,5%iger Anilinblaulösung für ca. 8 bis 10 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle. Der auf dem Gewebeschnitt übrige Farbstoff wurde mit dH_2O ausgewaschen. Schließlich fand ein letzter Differenzierungsschritt mit Essigsäure statt. Die Objektträger wurden für jeweils 2 Minuten entlang einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung (2x 96 %; 2x 100 % EtOH) behandelt. Das zweimalige Eintauchen für jeweils 5 Minuten in Roticlear erfolgte, um Farbstoffreste zu entfernen. Abschließend wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

4.3.3. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach etablierten Protokollen der AG Schäfer, die sich in ihrer Abfolge ähnelten. Deshalb werden im Rahmen dieser Dissertation die gemeinsamen Schritte der Immunhistochemie in einem allgemeinen Protokoll erläutert. Dazu werden die Bedeutung und die speziellen Färbungsschritte der jeweiligen Antikörper beschrieben. Die speziellen Protokolle aller immunhistochemischen Marker sind dem Appendix zu entnehmen.

4.3.3.1 Allgemeine Schritte der immunhistochemischen Färbung

Die Objektträger wurden zuerst entlang einer Entparaffinisierungsreihe behandelt. Anfangs wurden die Gewebeschnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in Xylol eingetaucht, dann zweimal in 100%iges EtOH für jeweils 2 Minuten. Im Anschluss wurde die endogene Peroxidase, die in blut- und erythrozythaltigem Gewebe vorkommt, durch Behandlung mit 3%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) für 10 Minuten blockiert. Da das Enzym in einem Avidin-Biotin-Komplex für die Farbreaktion der Antikörper zur

Anwendung kommt, ist dieser Schritt unumgänglich, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Zur Rehydrierung der Zell- und Membranzwischenräume der Gewebeschnitte wurden diese entlang einer absteigenden Alkoholreihe behandelt: je 2 Minuten in 96 %igem, 70 %igem und 50 %igem EtOH und für 5 Minuten in Wasser.

Der Entparaffinisierungsreihe folgte der Schritt der Antigendemaskierung, um dem Antikörper Zugänglichkeit zu den Zwischenräumen und somit auf die Epitope zu ermöglichen. Bei bestimmten Färbungen wurde ein Permeabilisierungsschritt notwendig, in dem der Aufbruch von Vernetzungen und Membranen innerhalb des Gewebes erfolgte, sodass die Epitope aufgedeckt werden konnten. Zur Permeabilisierung wurden die Gewebeschnitte nach der Re-Hydrierung in einem auf 37 °C vorgeheizten Ofen in eine Küvette mit 0,05%igen Triton X-100 für 10 Minuten überführt. Die Antigendemaskierung der Gewebeschnitte erfolgte mittels Wärmebehandlung. Hierbei sind die Objektträger für ca. 10 bis 11 Minuten in einem mit Puffer gefüllten Behälter bei 800 W in der Mikrowelle aufgewärmt worden. Der 10-Mm-Tris-1-Mm-EDTA- Puffer (pH 9,0) und der 0,01-M-Citrat-Puffer (pH 6,0) wurden im Labor hergestellt. Nach ca. 20 Minuten Abkühlung wurden die einzelnen Gewebeschnitte mit dem ImmEdge-Pen eingezirkelt, um ein Verlaufen des ersten und zweiten Antikörpers auf dem Objektträger und eine Mitfärbung der Negativkontrolle zu verhindern.

Mit dem Ziel, unspezifische Wechselwirkungen mit beliebigen Epitopen zu verhindern, wurden die Objektträger für 30 Minuten mit Normalserum in 1x PBS bei Raumtemperatur beschichtet. Die im Normalserum enthaltenen natürlichen Antikörper haben größtenteils die unspezifischen Antigene gebunden. Anschließend wurden die Schnitte vorsichtig auf Papiertücher geklopft. Die ersten Antikörper wurden in einer bestimmten Verdünnung in 1x PBS gelöst (Tabelle 7-10) und mit einer 50-µl-Pipette verteilt. Die in einer feuchten Kammer liegenden Objektträger wurden zur Inkubation in einen Kühlschrank (4 °C) gestellt.

Zur Entfernung der nicht gebundenen ersten Antikörper wurden die Objektträger nach 16 bis 18 Stunden Inkubationszeit vorsichtig auf Papier abgeklopft und dreimal für 5 Minuten in 1x PBS gewaschen. Um die gebundenen ersten Antikörper nachzuweisen, erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper. Die zweiten, biotinylierten und in 1x PBS verdünnten, Antikörper wurden für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger erneut dreimal für 5 Minuten in 1x PBS gewaschen. Um die Epitope im Mikroskop darstellen zu können, wurde die Methode des Avidin-Biotin-Enzymkomplexes benutzt. Aufgrund der hohen Affinität von Avidin zu Biotin gelangt das komplexgebundene Enzym an den biotinylierten zweiten Antikörper.

Dies vermittelt später eine spezifische Chromogenreaktion, die das gesuchte erste Antigen im Gewebe sichtbar macht.

Bei allen immunhistochemischen Färburgen wurde das VectaStain ABC-Kit angewendet. Das in diesem Kit enthaltene Enzym (Reagenz B), eine Meerrettichperoxidase, wurde zusammen mit Biotin (Reagenz A) und 5 ml 1x PBS angemischt. Die Reaktion wurde auf die Gewebeschnitte der Objektträger pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Entfernung des nicht am zweiten Antiköper gebundenen Avidin-Biotin-Enzymkomplexes wurden die Objektträger dreimal für 5 Minuten in 1x PBS gewaschen.

Für die Chromogenreaktion wurde, je nach Antigen, das AEC-Kit oder das DAB-Kit verwendet. Die Chromogene AEC und DAB werden durch die enzymatische Reaktion der oben genannten Peroxidase oxidiert und in sichtbare farbige (rote bzw. braune) Signale umgewandelt. Das Chromogen-Kit wurde kurz vor der Anwendung frisch angesetzt und auf den Gewebeschnitten der Objektträger verteilt. Die Objektträger wurden beim AEC-Kit zwischen 15 und 25 Minuten, bei DAB zwischen 5 und 8 Minuten unter dem Mikroskop beobachtet. Nach Sichtbarwerden des Chromogens wurde die Reaktion mit dH_2O gestoppt. Zur Auswaschung des Chromogens wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten in dH_2O überführt. Um eine Gegenfärbung der anderen nicht markierten Strukturen zu erhalten, wurden die Gewebeschnitte zweimal kurz in Gill‘s Hämatoxylin (Sigma; GHS332) eingetaucht. Anschließend erfolgte die Klärung der Gewebeschnitte durch Auswaschung mit Leitungswasser.

Dann wurden die Objektträger für 5 Minuten erneut in dH_2O eingetaucht. Anschließend waren sie für den Eindeckungsprozess bereit. Bei Benutzung des AEC-Kits erfolgte die Eindeckung mit dem wässrigen Eindeckmedium ImmuMount, bei der Anwendung des DAB-Kits mit Entellan. Letzteres erforderte zuerst eine Dehydrierungsreihe: jeweils zweimaliges Einführen in 96%iges und in 100%iges EtOH für 2 Minuten sowie zuletzt in RotiClear für 5 Minuten.

4.3.3.2 Immunhistochemie des Gefäßendothelmarkers CD31

Zur objektiven Beurteilung der möglichen Unterschiede der Angiogenese von Blutgefäßen innerhalb der verschiedenen Fettgewebe wurde ein monoklonaler Antikörper gegen humanes Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) (CD31) verwendet. Bei PECAM-1 handelt es sich um ein transmembranes Glykoprotein, das von Endothelzellen exprimiert wird *(237)*. Zudem befindet es sich an der Oberfläche von Thrombozyten und Leukozyten *(238–240)*. Es spielt eine relevante Rolle in der Leukozytendiapedesis *(241)* und in der Angiogenese

von Blutgefäßen *(242)*. Trotz seines heterogenen Vorkommens *(243)* erhielt es aufgrund der Forschung in der Tumorangiogenese *(244, 245)* einen Platz als Marker des Blutgefäßendothels *(246, 247)*.

***Tabelle 8**: Spezifische Schritte der CD31-immunhistochemischen Färbung (eigene Darstellung)*

Spezifische Schritte der CD31-immunhistochemischen Färbung	
Permeabilisierung	0,05 % Triton X100 für 10 Minuten bei 37 °C
Antigendemaskierung	10 mmol Tris,1 mmol EDTA pH 9,0 11 Minuten bei 800 Watt
Konzentration des 1. Antikörpers: ***Monoclonal Mouse Anti-Human CD31-Antibody***	1:50 in 1x PBS
Konzentration des 2 Antikörpers: ***Biotin-XX goat-anti-mouse IgG***	1:1000 in 1x PBS
Chromogenreaktion	AEC-Kit

4.3.3.3 Immunhistochemie des lymphangiogenetischen Markers Podoplanin

Als Marker für die Lymphangiogenese wurde das membranständige O- und N-Glykoprotein gewählt, das eine relevante Funktion in der Entwicklung der Lymphgefäße ausübt. Es wird auf der Kardinalvene und auf Prox1-positiven lymphatischen Vorläuferendothelzellen während der embryonalen Entwicklung exprimiert. Nach der Geburt wird Podoplanin nahezu exklusiv von lymphatischen Endothelzellen gebildet (248). Es fördert die Aktivierung von Blutplättchen und blockiert somit den Eintritt von Blut in die sich aktiv entwickelnden lymphatischen Gefäße (249, 250).

***Tabelle 9:** Spezifische Schritte der immunhistochemischen Färbung von Podoplanin (eigene Darstellung*

Spezifische Schritte der immunhistochemischen Färbung von Podoplan in	
Antigendemaskierung	0,01 M Citrat Puffer pH 6,0 11 Minuten bei 800 Watt
Konzentration des 1. Antikörpers: ***Rabbit Polyclonal Anti-Human/Mouse Podoplanin***	1:400 in 1x PBS

Konzentration des 2. Antikörpers: ***Biotin-xx goat anti-rabbit IgG***	1:1000 in 1x PBS
Chromogenreaktion	DAB-Kit

4.3.3.4 Immunhistochemie des Lyve-1-Lymphangiogenese-Markers

Als zweiter Marker des lymphatischen Endothels wurde der LYVE-1-Antikörper verwendet, der auf den endothelialen Hyaluronsäure-Rezeptor-1 der kleinen Lymphgefäße abzielt (251). Der Lyve-1-Hyaluronsäure-Rezeptor ist bei der Einströmung und dem Transport von Leukozyten und Makrophagen durch das Lymphgefäßsystem involviert (252, 253).

Tabelle 10: *Spezifische Schritte der immunhistochemischen Färbung mit Lyve-1 (eigene Darstellung)*

Spezifische Schritte der immunhistochemischen Färbung mit Lyve-1	
Permeabilisierung	1 % Normalgoat Serum in 0,4 % Triton x-100 in 1x PBS
Antigendemaskierung	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0 11 Minuten bei 800 Watt
Konzentration des 1 Antikörpers: ***Rabbit Polyclonal Anti-Human LYVE-1 Antibody***	1:400 in 1x PBS
Konzentration des 2. Antikörpers: ***Biotin-xx goat anti-rabbit IgG***	1:1000 in 1 % NGS in 1x PBS
Chromogenreaktion	DAB-Kit

4.3.3.5 Immunhistochemie des CD68-Makrophagenmarkers

Für die immunhistochemische Färbung von Makrophagen wurde der monoklonale Maus-Anti-Human-CD68-Antikörper (Clone PG-M1) verwendet. Bei CD68 handelt es sich um ein glykosyliertes Membranprotein, das zur Lysosom-/Endosom-assoziierten Membranproteinfamilie (LAMP) gehört und sich in der Membran von Endosomen und Lysosomen phagozytierender Zellen befindet (254, 255). Es wirkt außerdem als Scavanger-Rezeptor für die Aufnahme von oxidierten LDL-Partikeln in Makrophagen (256, 257). Trotz in der Literatur unterschiedlicher Angaben über die Spezifität des Antikörpers zeigt sich die Hintergrundfärbung dieses Klons im Vergleich zu den anderen gering (258).

Tabelle 11: *Spezifische Schritte der immunhistochemischen Färbung mit CD68*

Spezifische Schritte der immunhistochemischen Färbung mit CD68	
Antigendemaskierung	10 mmol Tris und 1 mmol EDTA (pH 9,0) 11 Minuten bei 800 Watt
Konzentration des 1. Antikörpers: ***Monoclonal Mouse Anti-Human CD68 Antibody***	1:75 in 1xPBS
Konzentration des 2. Antikörpers: ***Biotin-xx goat-anti-mouse IgG***	1:1000 in 1x PBS
Chromogenreaktion	DAB-Kit

4.4 Isolation von *Messenger Ribonucleic Acid*

Zur Überprüfung von molekularen Unterschieden in der Angiogenese, Fibrose, und Lymphangiogenese in den PVAT erfolgte zunächst die Isolation von *Messenger Ribonucleic Acid* (mRNA), um dann die Genexpression von den verschiedenen Fettgeweben zu vergleichen. Ansätze zur Isolation von mRNA erfordern, aufgrund der ubiquitären Anwesenheit von RNAsen, gründliche und saubere Vorgehensweisen. Bei RNAsen handelt es sich um RNA-Molekül-abbauende Enzyme. Sie besitzen eine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit, die ihnen Stabilität verleiht. Zudem werden sie von Menschen produziert. Demzufolge war das Tragen eines Laborkittels und von Handschuhen während des Experiments durchgehend erforderlich. Auf diese Weise wurden Verunreinigungen durch RNAsen in den Ansätzen vermieden. Vor Experimentbeginn wurden alle Arbeitsflächen mit RNase AWAY® besprüht. Mögliche RNAsen oder RNA-Bestände wurden somit entfernt. Die Homogenisierung, der erste Schritt der mRNA-Isolation, erfordert die Anwendung von TRIzol®. Letzteres enthält Phenol, Ammonium-Rhodanide und Guanidinthiocyanat. Aus Sicherheitsgründen wurde dieser Isolationsschritt unter dem Abzug ausgeführt.

Die Homogenisierung des Gewebes wurde unter Zuhilfenahme des elektrischen Homogenisators und des DS-5/PE-Dispergierers für RNA umgesetzt. Vor jedem Gebrauch erfolgte eine Geräteeinigung zur Vermeidung einer Materialverschleppung und der Entfernung von Geweberückständen. Zuerst wurde der Homogenisator in einem Falconröhrchen mit ca. 50 ml NaOH und anschließend dreimal hintereinander in 50 ml dH_2O gestartet. Nach der vollständigen Reinigung wurden verbliebene Wassertropfen mit Papiertüchern vorsichtig abgefangen. Somit wurden Verdünnungen der RNA-Konzentration der Proben verhindert.

Die im TRIzol® aufbewahrten Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Zum Wärmeschutz während der Homogenisierung wurden aufgetaute Proben in ein mit Eis gefülltes Becherglas eingetaucht. Unter zirkulären Bewegungen erfolgte der Homogenisierungsprozess auf der niedrigsten Stufe des Homogenisators in den mit TRIzol® gefüllten Eppendorfgefäßen. TRIzol® ermöglichte gleichzeitig die Zelllyse und die Inaktivierung der RNAsen. Es wurden kurze Homogenisierungszeiten eingehalten, um Probenschädigungen durch Überwärmung unter der ständigen Drehung des Dispergierers zu vermeiden. Nach optischer Kontrolle (gegen das Licht) auf eine vollständige und homogene Lyse wurden die Gewebeproben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Homogenisierung mehrerer Proben wurden diese nach Ablauf der 5 Minuten senkrecht in Eis aufbewahrt.

Folgend wurde die Trennungsphase von festen Zellresten durchgeführt. Hierzu wurden alle Proben in der Zentrifuge 5424 R austariert und für 10 Minuten auf 4 °C bei 12 000 rcf zentrifugiert. Dadurch senkten sich Zellreste und Proteine auf den Boden des Eppendorfgefäßes. Im Fall von zentrifugiertem Fettgewebe schwimmt das Fett nach diesem Schritt auf der Oberfläche. Um einen hohen Reinheitsfaktor der mRNA zu erhalten, wurde zuerst die oberste Fettphase, soweit wie möglich, vorsichtig abpipettiert. Dann wurde zügig hindurchpipettiert, ohne die restliche Fettphase und den darunterliegenden flüssigen Überstand aufzumischen. Der flüssige Überstand wurde in ein frisches 1,5-ml-Eppendorfgefäß übertragen.

Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion. Für den Ansatz wurde ein RNA-Isolations-Kit angewendet. Eine weitere Phasentrennung war demnach erforderlich. Zum o. g. flüssigen Überstand wurde Chloroform in einem Verhältnis von 1:5 zum Ausgangsvolumen an TRIzol® hinzugefügt. Daraufhin wurden die Proben zehnmal vorsichtig gemischt. Es schloss sich die Inkubation der Proben bei Raumtemperatur für 12 Minuten an. Dann erfolgte die Zentrifugierung bei 4 °C auf 12 000 rcf für 12 Minuten. Während des o. g. Zentrifugierungsprozesses wurden 90 µl Reaktionspuffer für die rDNAse in markierte, sterile 1,5-ml-Eppendorfgefäße pipettiert und diese wurden zur Seite gestellt. Nach abgeschlossener Zentrifugierung zeigten sich drei unterschiedliche Phasen: eine wässrige Phase, in der die mRNA enthalten war; eine weiße Interphase, in der sich DNA befand, und eine organische Phase, die weitere Zellbestände enthielt. Die wässrige Phase wurde, ohne sie mit der Interphase (enthält DNA und Protein) aufzumischen, in ein frisches 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt. Im Verhältnis 1:1 zum TRIzol® wurde 70%iges EtOH hinzugefügt und vorsichtig auf- und abpipettiert. In der Folge wurden die in EtOH vorbereiteten mRNA-Proben in die Säulen des NucleoSpin®-RNA-Isolation Kits überführt. Die Säulen bestanden aus einer Tube mit Filter am unteren Ende und einem Sammelgefäß.

Bis zur vollständigen Beladung aller Proben wurden die noch nicht behandelten Proben im Eis aufbewahrt. Alle Proben wurden in der Zentrifuge austariert und anschließend bei 11 000 rcf für eine Minute bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurden alle Säulen in ein neues Sammelgefäß gestellt, ohne den Rand des Sammelgefäßes zu berühren. Es wurden 350 µl MDB (Membrane-Desalting-Buffer) auf jede Säule hinzuaddiert und bei 11 000 rcf für eine Minute bei 4 °C zentrifugiert. Der hierbei entstandene Durchfluss wurde verworfen und die Tube wieder in das gleiche Sammelgefäß überführt.

Zu den oben beschriebenen, mit jeweils 90 µl Reaktionspuffer für rDNAse gefüllten Eppendorfgefäßen wurden 10 µl der DNAse hinzuaddiert. Durch Auf- und Abpipettieren wurde die DNAse-Reaktion gestartet. Hiervon wurden 95 µl direkt ins Zentrum der Membran jeder Säule gegeben. Die Einwirkzeit der Reaktion zur DNA-Verdauung betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Unterbrechung der Reaktion forderte einen mehrschrittigen Waschvorgang. Zunächst wurden 200 µl Buffer RAW2 hinzugegeben und die Säulen bei 11 000 rcf für eine Minute bei 4 °C zentrifugiert. Jede Säule wurde sorgsam in ein frisches Sammelgefäß gestellt und, nachdem 600 µl Buffer RA3 zugegeben wurde, wurden die Proben wieder bei 11 000 rcf für eine Minute bei 4 °C zentrifugiert. Der im Sammelgefäß empfangene Durchfluss wurde verworfen und die Säule wieder auf das Sammelgefäß platziert. Anschließend wurden wieder 250 µl Buffer RA3 zugegeben und es wurde bei 11 000 rcf für 2 Minuten bei 4 °C zentrifugiert.

Die RNA-Isolation wurde durch die Überführung der Säulen in ein frisches, steriles 1,5-ml-Eppendorfgefäß und die Zugabe von 20 µl RNAse-freiem Wasser ins Zentrum der Membran möglich. Daraufhin erfolgte ein abschließender Zentrifugierungsschritt bei 11 000 rcf für eine Minute bei 4 °C. Hierbei kam es zur Durchflussbildung, in dem mRNA enthalten war.

4.5 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der mRNA

Die mRNA-Konzentration der frisch isolierten Proben wurde unverzüglich anhand eines Bio-Photometers von Eppendorf ermittelt. Mit einem speziellen Papier ist die Glasküvette vor jeder Messung gereinigt worden. Zuerst sollte das Photometer auf die Hintergrundlösung geeicht werden. Hierfür wurden 2 µl – für den Isolationsschritt notwendig – RNAse-freies Wasser luftblasenfrei auf den schwarzen Markierungskreis der Küvetten pipettiert. Nach Einführung der Küvette in die Kammer wurde die Blank-Taste gedrückt. Tropfendes Wasser wurde abgewischt. Anschließend wurden die Proben mit sterilen Pipettenspitzen auf die gleiche Weise pipettiert und die Taste ‚Sample' wurde gedrückt.

Die Konzentration und der Reinheitsfaktor 240/260 wurden dem Bildschirm entnommen. Die Zahlen wurden in eine Excel-Datei eingegeben. Abschließend wurden die RNA enthaltenden

Eppendorfgefäße mit entsprechenden Konzentrationsetiketten bei −80 °C für die weiteren Experimente gelagert.

4.6 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR):

Zielsetzung der mRNA-Isolation war die spätere Durchführung einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) zum Genexpressionsvergleich der aus unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen stammenden Fettgewebe. Aufgrund der für die qRT-PCR-Reaktion erforderlichen DNA-abhängigen Enzyme wurde die einzelsträngige mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre doppelsträngige cDNA umgewandelt (259). Zuerst wurden die Arbeitsflächen und Ständer für die Eppendorfgefäße mit EtOH und RNase AWAY® gründlich gereinigt. Aufgrund der im Experiment hitzeempfindlichen Substanzen wurde vor Protokollbeginn Eis zur Verfügung gestellt. Entscheidend für den Erfolg des Experiments war die Umrechnung der RNA-Konzentration der jeweiligen Proben in Volumeneinheiten. Beispielrechnung:

RNA-Konzentration	250 µg/ml = 0,25 µg/µl
Gewünschte Menge	1 µg RNA

$$\frac{1\ \mu g}{0{,}25\ \mu g/\mu l} = 4\ \mu l$$

War die RNA-Konzentrationen von einer Probe sehr niedrig, wurde diese ohne Wasserzusatz eingesetzt. Das Gesamtvolumen (20 µl) der Reaktion pro Probe setzte sich aus 12 µl Mastermix und 8 µl in Nuklease-freiem Wasser gelöster RNA zusammen. Die 8 µl in nuklease-freiem Wasser gelöste RNA wurden in einem sterilen 0,2-ml-Eppendorfgefäß hergestellt. Zunächst wurde das für die jeweilige Probe berechnete Volumen in µl für 1 g RNA hinzupipettiert. Dazu wurde das Restvolumen für 8 µl aus Nuklease-freiem Wasser hinzuaddiert. Die vorbereiteten Proben wurden auf Eis gestellt.

Die für den Mastermix notwendigen Substanzen wurden aus dem Gefrierfach geholt und unter ständiger Kontrolle aufgetaut. In einem 0,2-ml-Eppendorfgefäß wurden pro zu analysierender Probe die folgenden Reagenzien eingesetzt: 4 µl des M-MVL RT 5X Buffers (Promega), 4 µl $MgCl_2$ 25 mmol (Promega), 2 µl dNTp 10 mmol (Promega), Random hexamer Primer 0,2 µl, RNAse Inhibitor (20–40 U/µl). Auf einem gekühlten Eppendorfgefäßhalter wurden 0,8 µl des Enzyms M-MLV RT (200 U/µl) pro Probe auf den Mastermix hinzuaddiert.

Bereitgestellten 0,5-ml-Eppendorf-PCR-Tubes wurden 12 µl des Mastermixes zugesetzt. In einer im Voraus festgelegten Reihenfolge wurden die 8-µl-RNA-Proben in die PCR-Tubes

pipettiert. Anschließend wurden, nach Sicherstellung der Geschlossenheit und Beschriftung der PCR-Tubes, diese kurz zentrifugiert und im Mastercycler unter dem Programm cDNA umgewandelt. Die fertigen cDNA-Proben wurden im Gefrierfach bei −20 °C aufbewahrt.

4.7 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die quantitativen Messungen der Genexpression der PVAT-Proben wurden mittels qRT-PCR durchgeführt. Die in Kapitel 3.2.1 erwähnten bedeutenden Gene der Lymphangiogenese wurden untersucht. Die Durchführung der SYBER-GREEN-Methode erforderte die zusätzliche Anwendung eines Referenzgens, des House-Keeping-Gens LRP10. Das Referenzgen LRP10 dient der kontrollierten Auswertung der ermittelten Signalwerte. Für die qRT-PCR wurden 96 Wells der Firma Biorad benutzt. Das Beladungsschema (Abbildung 3) wurde nach der x- und y-Achse bestimmt. Auf der y-Achse (Wells 1–12) erfolgte die zweimalige Verteilung der Gene wie folgt: VEGF-C → VEGF-D → VEGF-A → TGFß → VEGFR3 → LRP-10. Auf der x-Achse (Wells A–H) wurden drei Gruppen von Proben (IMA-PVAT und C-PVAT eines selben Patienten) zugeteilt.

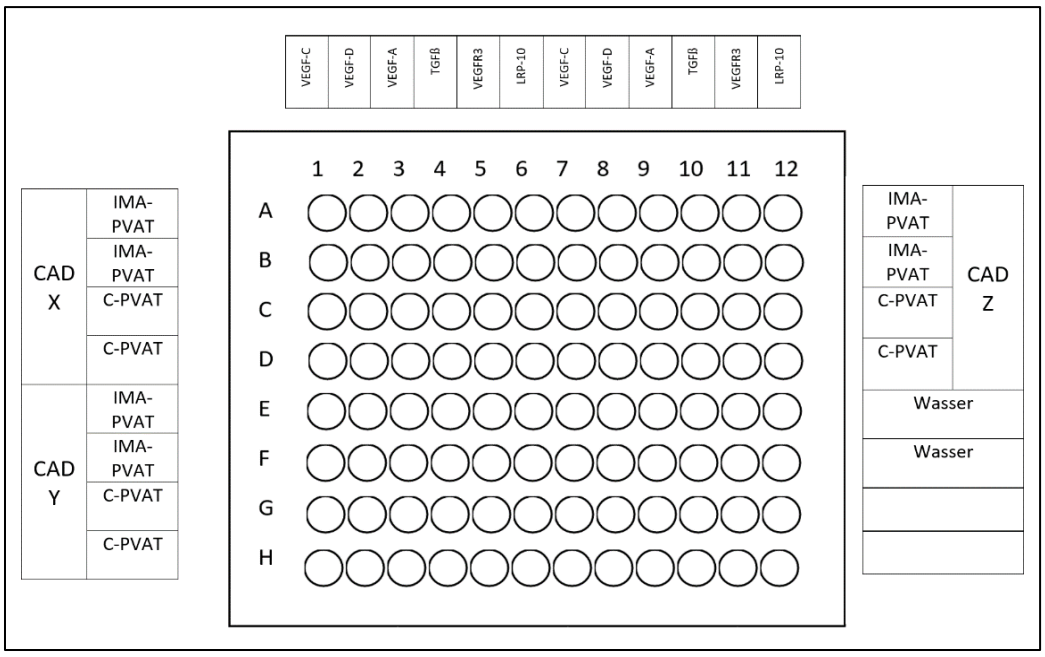

Abbildung 3: *Beladungsschema der 96-Well-Platte (Eigene Darstellung)*

Das gesamte Reaktionsvolumen pro Well umfasste 20 µl. Die Zusammensetzung ergab sich aus 17,5 µl Mastermix und 2,5 µl der zuvor hergestellten cDNA. Die Mastermixe wurden aus den unterschiedlichen Primermixen erstellt.

Zur Bildung eines Primermixes wurden 1 µl Forward-Primer und 1 µl Reverse Primer aus den 100-µM-Stockkonzentrationen der Primer in 2 µl DEPC-H_2O verdünnt. Daraus ergab sich eine 5-µM-Endkonzentration. Daraufhin wurden die Primer in 8 Wells entlang der x-Achse der Wells-Platte eingesetzt. Jede PVAT-Probe wurde zweimal getestet. Das Endvolumen des Primermixes pro Primer ergab sich aus der Hochrechnung

8 (+1) Proben x 4 µl Primermix = 36 µl

Aus jedem Primermix wurde ein Mastermix für jeweils eine Reaktion hergestellt. Pro Reaktion bzw. Well wurden 10 µl SYBR-Green, 1 µl Primermix (0,5 µl Primer Fwd und 0,5 µl Primer rev) sowie 6,5 µl DEPC-H_2O eingesetzt. Da jede Probe zweimal eingesetzt wurde, errechnete sich das Gesamtvolumen pro Mastermix aus der Anzahl der Reaktionen mit dem Volumen eines einzelnen Mastermixes.

16 Reaktionen x 17,5 µl Mastermix = 280 µl

Anschließend wurde der 17,5-µl-Mastermix mittels Filterpipettenspitzen in die zugehörigen Wells für diesen Primer entlang der x-Achse pipettiert. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde 1 µg cDNA im Verhältnis 1:3/1:5 in DEPC-H_2O verdünnt (z. B. 20 µl cDNA + 40 µl DEPC-H_2O). Der Verdünnungsfaktor war von der Ausgangskonzentration abhängig. Die Konzentration ergab dann ca. 333 ng/200 ng. Aus der neuen Verdünnung wurden 2,5 µl cDNA, die ca. 41 ng cDNA entsprachen, in die Reaktion eingesetzt. Um eine sichere Pipettierung der unterschiedlichen cDNA-Proben zu ermöglichen, wurde eine frische Box von 10-µl-Filterpipettenspitzen verwendet. Jede Probe wurde auf die unterschiedlichen Mastermixe so verteilt, dass eine Pipettenspitze einem Well in der PCR-Platte entsprochen hat.

Zur Vermeidung der Probenevaporation während der Hochheizung in den PCR-Zyklen wurden die Platten mit einer durchsichtigen Folie der Firma Biorad verschlossen, sodass die Ränder der einzelnen Wells gut durch die Folie abgedichtet waren. Anschließend wurde die Platte mit dem Short-Spin-Programm der Eppendorf-Zentrifuge 5310 R kurz runterzentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich die zuletzt abpipettierte cDNA tatsächlich im Mastermix verteilt (gesenkt) hatte.

Die Platte wurde lichtgeschützt in Alufolie verpackt in das Labor der AG Professor Ruf gebracht. Dort wurde das BioRad-CFX-Manager-(Version 3.1.1517.0823)-Programm (siehe unten) in dem CFX-Connect-Real-Time-PCR-System-Gerät laufen gelassen.

Programm:

95 °C 03:00 min

95 °C 00:15 min

60 °C 01:00 min

} 40 Zyklen

95 °C 00:15 min

65 °C 00:05 min

95 °C 00:15 min

Nach dem abgeschlossenen Programm wurden die Daten exportiert und in einer Excel-Datei gespeichert. Die CT-Werte von den jeweiligen Genen konnten hiernach abgelesen und zur Auswertung verwendet werden.

4.8 Analyse

4.8.1 Histologie und Immunhistochemie

Zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung wurden von den Gewebeschnitten repräsentative Bilder mit dem Mikroskop Olympus BX51 aufgenommen. Ein Bild stellte ein Mikroskop-Feld dar. Die Quantifizierung der repräsentativen Aufnahmen erfolgte mithilfe des Programms Image Pro Plus®. Zur Analyse wurden Verhältnisse zwischen immunopositiven gefäßähnlichen Strukturen oder Zellen auf die Gesamtgewebefläche berechnet. Die Gesamtgewebefläche war nicht mit einem Mikroskop-Feld gleichzusetzen, da aufgrund der unregelmäßigen Kontur der Fettgewebsschnitte in einem Mikroskop-Feld leere Spalten des Objektträgers enthalten waren. Die Berechnung der Gesamtgewebefläche gelang mit Hilfe des Programms Image Pro Plus®. Nach auswählen des Modus „Fläche-Ermitteln“ wurde die Fläche in mm² durch manuelles Einkreisen der Fettgewebeanteile innerhalb eines Mikroskop-Felds automatisch berechnet. Die Ergebnisse wurden als Anzahl immunpositiver gefäßähnlicher Strukturen oder Zellen pro mm² angegeben.

Die Beurteilung des Ausmaßes an Gewebefibrose in den mit Vorhoeff’s Elastica Massons Trichromfärbung gefärbten Gewebeproben erfolgte anhand der Quantifizierung der blau gefärbten Kollagenflächen im Verhältnis zur Gesamtgewebefläche in mm² pro 100-x-Mikroskop-Feld. Die Anzahl an Gefäßen und lymphatischen Sammelgefäßen wurde manuell

von PECAM-1- und PDPN-immunopositiven gefäßähnlichen Strukturen pro Gesamtgewebefläche in mm² auf einem 200-×-Mikroskop-Feld ermittelt. Bei der Quantifizierung von PDPN-immunpositiven gefäßähnlichen Strukturen wurden alle Gefäße mit intraluminalen Erythrozyten als falsch-positiv gewertet und in den Zählungsprozess nicht aufgenommen. Die Anzahl der Lymphkapillaren ergab sich durch die manuelle Zählung von LYVE-1-immunopositiven gefäßähnliche Strukturen pro Gesamtgewebefläche in mm² auf einen 200-×Mikroskop-Feld und die Zahl der Gewebemakrophagen wurde durch manuelles Zählen von CD68-immunopositiven Zellen pro Gewebefläche in mm² auf einem 400-×-Mikroskop-Feld bestimmt. Als CD68-positiven Makrophagen wurden nur immunopositive zellähliche Strukturen bewertet, die einen Kern enthalten haben.

Der arithmetische Mittelwert der Anzahl an immunpositiven gefäßähnlichen Strukturen oder Zellen von drei, nach dem Zufallsprinzip ausgewählten, Mikroskop-Feldern einer einzelnen Gewebeprobe wurde ermittelt.

4.8.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Auswertung der PCR-Analyse richtete sich nach der SYBR-Green Fluoreszenz-Methode. Die Anwendung erforderte die Bewertung der CT-Werts des Zielgens. Der CT-Wert des Zielgens gibt den Replikationszyklus an, ab dem die hergestellte Fluoreszenz durch SYBER-Green signifikant im Vergleich zu der Hintergrundfluoreszenz angestiegen ist. Hiernach wird der CT-Wert des Zielgens mit dem CT-Wert des Referenzgens normalisiert. Die normalisierten CT-Werte werden als ΔCT angegeben.

4.8.3 Statistische Auswertung

Die erfassten Mittelwerte wurden mittels D´Angostino-Pearson-Normalitätstest auf Normalverteilung untersucht. Normalverteilte Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Nicht normalverteilte Daten werden als Median und Interquartile angegeben.

Die PVAT-Proben eines gleichen Patienten wurden jeweils untereinander (verpaart) verglichen. Normalverteilte Daten wurden mit dem gepaarten t-Test bewertet. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test getestet. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0, 05 festgelegt.

5. Ergebnisse

5.1 Patientenkollektiv

Das dieser Studie zugrundeliegende Patientenkollektiv umfasste 25 Patienten, davon 84 % Männer und 16 % Frauen. Das mittlere Alter der teilnehmenden Personen betrug 69,96 Jahre. Die Altersspanne der Teilnehmer lag zwischen 55 und 88 Jahren.

5.1.2 Häufigkeit und Vorkommen beeinflussbarer Risikofaktoren innerhalb der Stichprobe

Alle für die KHK relevanten beeinflussbaren Risikofaktoren sind im Patientenkollektiv (n = 25) repräsentiert. Der Risikofaktor arterielle Hypertonie wurde mit einer Häufigkeit von 100 % in der gesamten Stichprobe nachgewiesen. Als weitere Risikofaktoren zeigen Dyslipidämie und Übergewicht bzw. Adipositas mit 96 % bzw. 80 % eine relevante Ausprägung im Kollektiv. Mit 40 % und 48 % werden Nikotinabusus und DM in einem deutlich geringeren Ausmaß innerhalb der Stichprobe als andere Risikofaktoren dargestellt.

Tabelle 12: *Aufstellung der beeinflussbaren Risikofaktoren der KHK*

Patientenkollektiv (n = 25)		
Beeinflussbarer Risikofaktor (Kriterien)	Häufigkeit	Prozent
Arterielle Hypertonie **(sys RR > 140 mmHg und/oder diast RR > 90 mmHg** **bzw. Einnahme von anti-hypertensiver Medikation)**	25	100 %
Nikotinabusus	10	40 %
Dyslipidämie **(LDL > 115 mg/dl, HDL < 40 mg/dl und/oder Triglyzeride > 190 mg/dl bzw. Einnahme lipidsenkender Medikamente)**	24	96 %
Diabetes mellitus **(Nüchtern-Glukose > 126 mg/dl; HbA1c > 6.5 % bzw. Einnahme von Anti-Diabetika/Insulin)**	12	48 %
Übergewicht und Adipositas **(Übergewicht BMI: 25–29,9 bzw. Adipositas BMI > 30)**	20	80 %

5.2 Strukturelle histologische und immunhistochemische Analyse

Durch Auflösung der Ausprägung der angiogenetischen und lymphangiogentischen Marker wurde im Rahmen dieser Dissertation die Charakterisierung der IMA- und C-PVAT erzielt. Die Ermittlung der Besiedlung von CD68-positiven Makrophagen in den beiden unterschiedlichen Fettgeweben diente der Einschätzung des inflammatorischen Zustands der IMA- und C-PVAT im Rahmen einer KHK. Außerdem wurde mit der Verhoeff's Elastica Masson Trichrom Färbung ein Hinweis über die Folgeveränderung dieser inflammatorischen Veränderungen erzielt. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der gepaarten statistischen Analyse von IMA- und C-PVAT Gewebeproben von 10 Probanden aufgezeigt.

5.2.1 Angiogenese/Neovaskularisation

Die Beurteilung der Gefäßneubildung wurde mithilfe der CD31/Pecam1-immunhistochemischen Färbung ermittelt (Fig. A, Abbildung 4). Beim Vergleich der Mittelwerte der Fettgewebe zeigte sich ein relevanter Unterschied zwischen C-PVAT und IMA-PVAT mit einem p-Wert von 0,004. Dies wird in Abbildung 5 illustriert (Graphik PECAM1-positive Gefäße). Die dargestellte Gefäßanzahl im C-PVAT war mit 25,4 ± 2,75 pro mm² größer als beim IMA-PVAT mit 12,9 ± 1,79 pro mm².

5.2.2 Lymphangiogenese

Zur Beurteilung der Unterschiede in Bezug auf das Lymphgefäßnetzwerk innerhalb von PVAT wurden Podoplanin und Lyve-1-Färbungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Immunhistochemie werden im Folgenden erläutert.

Podoplanin

Der Podoplaninantikörper bindet, wie in Kapitel 5.3.3 beschrieben, vorwiegend lymphatische Sammelgefäße. Mithilfe vom DAB (braun) ließ sich die Antikörper-Antigenbindung am besten hervorheben (Fig. B, Abbildung 4). Der Mittelwert an lymphatischen Sammelgefäßen im C-PVAT zeigte sich mit 5.45 ± 1.54 pro mm² wesentlich größer als im IMA-PVAT mit 0,74 ± 0,34 pro mm² (Grafik *PDNP-positive Gefäße* in Abbildung 5). Bei normalverteilten Daten ergab sich nach dem gepaarten t-Test ein p-Wert von 0,023. Ein signifikanter Unterschied konnte in der Dichte der lymphatischen Sammelgefäße innerhalb der beiden Fettgewebe festgestellt werden.

Lyve-1

Der Lyve-1-Antikörper (Fig. C, Abbildung 4) zielt auf lymphatische Kapillaren ab. Auch hier konnte mithilfe des Chromogens DAB die Bindungsreaktion identifiziert werden. Der Median (nicht-normalverteilte Daten) vom C-PVAT von 24,7 (0,61–32,3) zeigte sich größer als der des IMA-PVAT von 2,97 (0–6,58) pro mm² (in Abbildung 5 Grafik *LYVE1-postive Gefäße*). Bei nicht normalverteilten Stichproben ergab der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit einem p-Wert von 0,027 eine signifikante Differenz in der Ausprägung der verteilten lymphatischen Kapillaren in den Fettgeweben.

5.2.3 Inflammation

Hinsichtlich der Frage von Inflammation im gesunden und dysfunktionalen PVAT erfolgte die Darstellung von Unterschieden mit der immunhistochemischen Färbung von CD68, einem Marker für Makrophagen (siehe Fig. D, Abbildung 4). Die Grafik *C68-positiven Zellen* der Abbildung 5 stellt eine größere Infiltration des C-PVAT mit CD68-positiven Zellen (207 ± 35,78 pro mm²) im Vergleich zum IMA-PVAT (52,85 ± 7,32 pro mm²) dar. Der gepaarte t-Test zeigte bei normalverteilten Stichproben mit einem p-Wert von 0,001 eine statistische Signifikanz auf.

Die Abbildung 5 stellt eine Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse dar. Aufgezeigt werden repräsentative Bilderpaare in der jeweiligen, zur quantitativen Analyse gewählten, Mikroskop-Feld-Vergrößerung. Jedes horizontal angeordnete Bilderpaar entstammt einem Probanden.

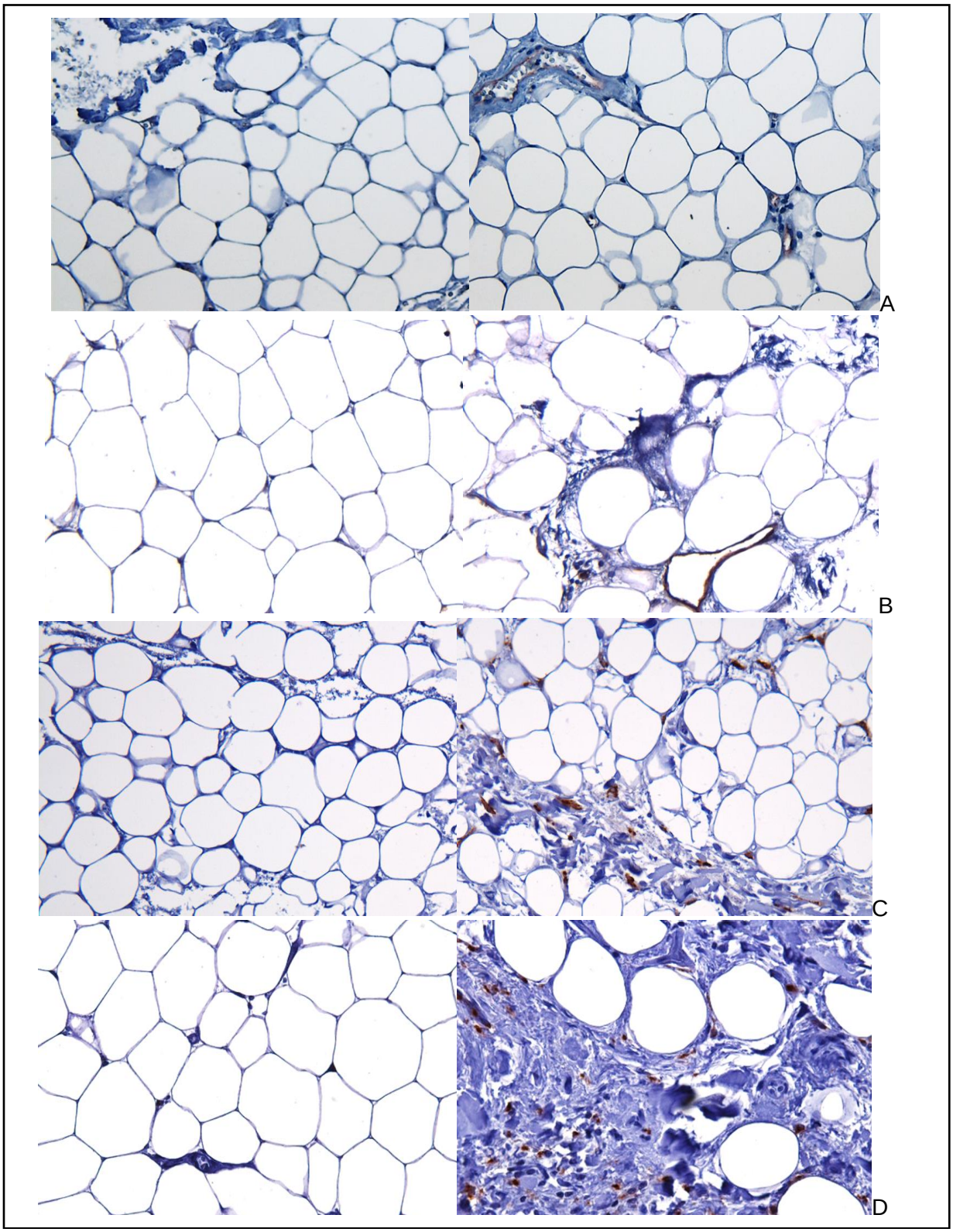

Abbildung 4: *Gegenüberstellung der immunhistochemischen Färbungen: IMA-PVAT (links) vs. C-PVAT (rechts). Von oben nach unten: A = PECAM-CD31 in 20-x-Mikroskop-Feld, B = Podoplanin in 40-x- Mikroskop-Feld, C = LYVE-1 D in 20-x-Mikroskop-Feld und D = CD68 in 40-x- Mikroskop-Feld. n=10. (Eigene Darstellung aus Bildern, die mit Hilfe von dem Mikroskop Olympus BX51 aufgenommen wurden).*

5.2.1 Fibrose

Das Ausmaß der Unterschiede von Fibrose im PVAT der Aorta und der IMA konnte mittels VES-MTC-Färbung dargestellt werden. Anhand der Blaufärbung von Kollagenfasern wurde der prozentuale Anteil an fibrotischen Arealen in Bezug auf die Gesamtfläche des beobachteten Gebiets in den unterschiedlichen Fettgewebe ermittelt. Beim C-PVAT trat mit einem Median von 0,83 % mehr Fibrose (0,02–4,63 %) auf als beim IMA-PVAT mit einem Median von 0,02 % (0,01–0,11 %). Nach dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test konnte mit einem p-Wert von 0,027 ein signifikanter Unterschied zwischen der prozentualen Ausdehnung von Fibrose innerhalb der beiden Fettgewebe demonstriert werden.

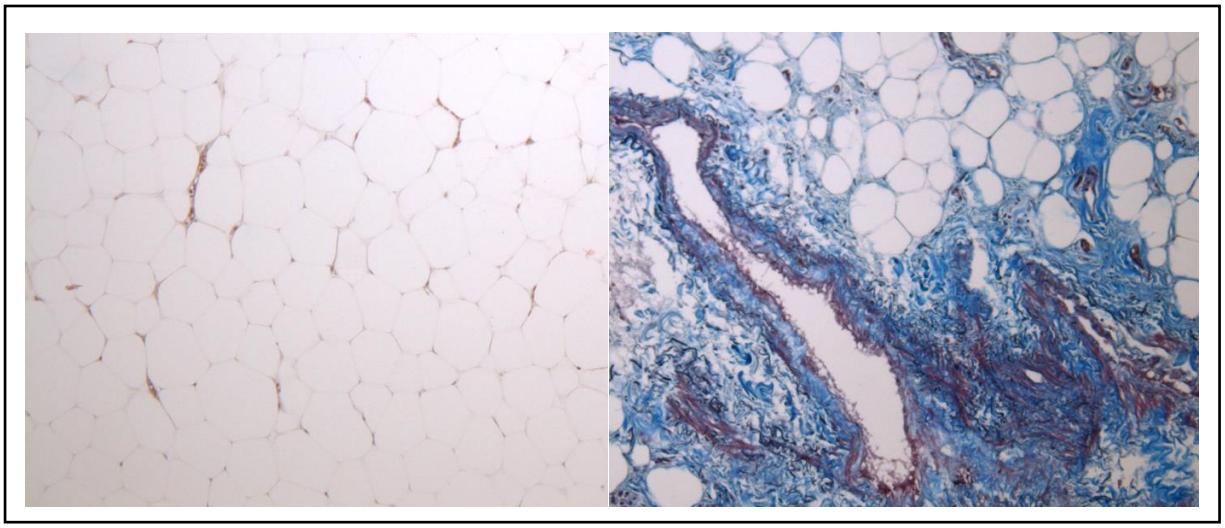

***Abbildung 5**: Fibrose. Histologische VES-MTC-Färbung vom IMA-PVAT (links) und C-PVAT (rechts) in 10-x-Mikroskop-Feld. n=10 (Eigene Darstellung aus Bildern, welche mit Hilfe des Mikroskops Olympus BX51 aufgenommen wurden)*

Die folgende Abbildung 7 illustriert die graphische Darstellung des direkten Vergleiches von arithmetischen Mittelwerten und Median aus der Anzahl von gefäßähnlichen Strukturen oder immunopositiven Zellen in IMA- und C-PVAT Probandenpaaren.

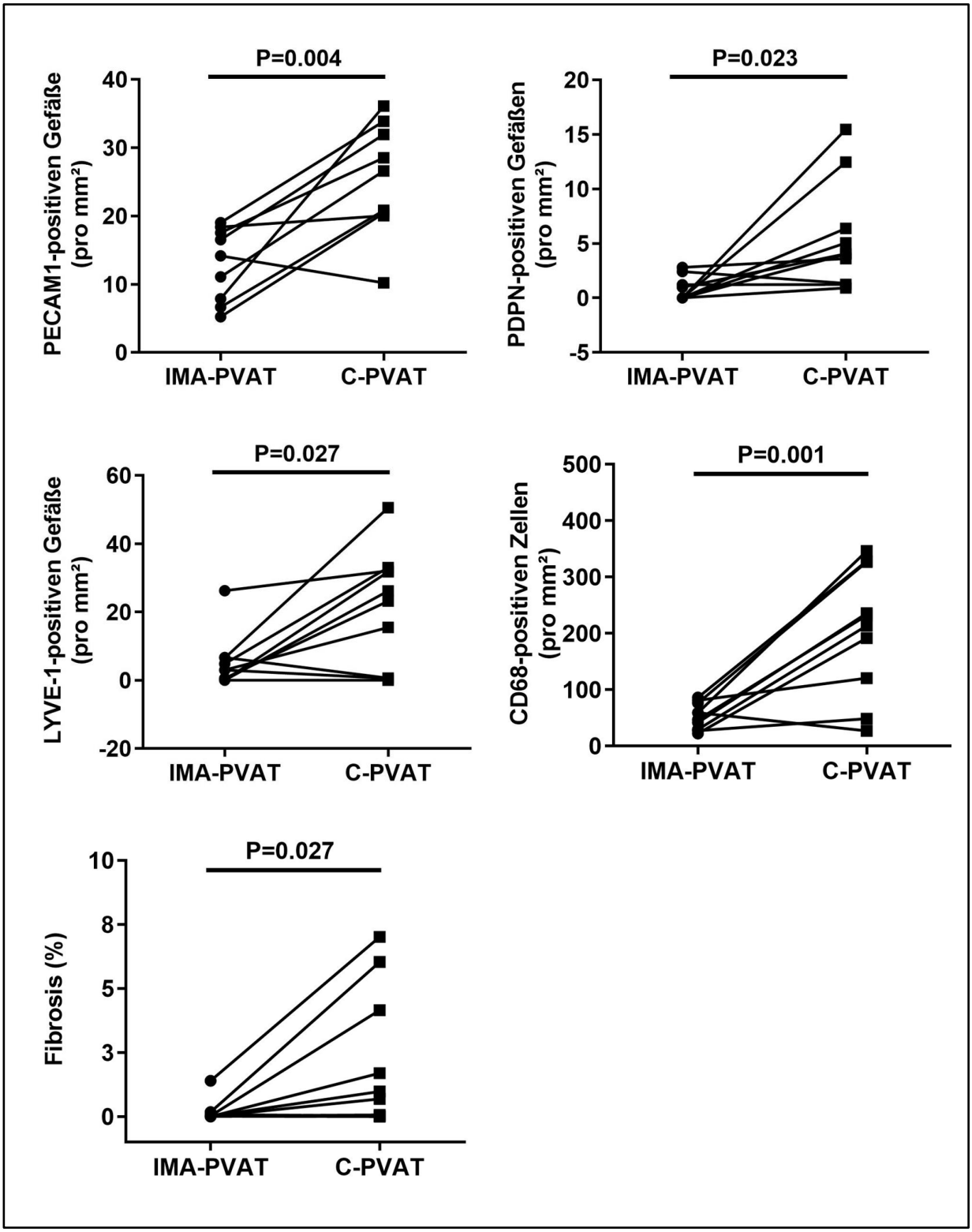

Abbildung 6: *Quantitative Analyse der Median- und Mittelwerte für die unterschiedlichen histologischen und immunhistochemischen Färbungen der IMA- und C-PVAT Probandenpaare. n=10 (Eigene Darstellung mit Hilfe des Programms GraphPad8.0)*

5.3 mRNA Expression angiogenetischer und fibrotischer Wachstumsfaktoren in IMA-PVAT und C-PVAT

Die Frage, ob die immunhistochemisch nachgewiesene vermehrte Angio- und Lymphangiogenese sowie die ausgeprägte Gewebefibrose im C-PVAT im Vergleich zum IMA-PVAT auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte, wurde mittels qRT-PCR nachgegangen.

5.3.1 Angiogenese/Neovaskularisation

Wie in Unterkapitel 2.3.3 dargelegt, wird die Umwandlung vom regulären zum dysfunktionalen PVAT zum Teil durch die vermehrte Neovaskularisation bedingt. Durch Erhebung der VEGF-A-Expression in den unterschiedlichen Fettgeweben gelang die Erfassung der Angiogenese. Bei nicht normalverteilten Stichproben zeigte sich auf Ebene der mRNA-Expression nach dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test keine statistische Signifikanz (p-Wert: 0,421 zwischen den erhobenen Median-Werten von IMA- und C-PVAT (0,72 [0,41–1,02] vs. 0,85 [0,68–1,21]).

5.3.2. Lymphangiogenese

Die wesentlichen Wachstumsfaktoren der Lymphangiogenese wurden im Unterkapitel 2.3.1 detailliert beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus auf die Wachstumsfaktoren VEGF-D und VEGF-C, sowie der Wachstumsfaktorrezeptor VEGFR3.

5.3.2.1 An Lymphangiogenese beteiligte endotheliale Wachstumsfaktoren

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression der an der Lymphangiogenese beteiligten endothelialen Wachstumsfaktor-Gene VEGF-C und VEGF-D wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Expressionsraten vom IMA und C-PVAT festgestellt. Bei nicht normalverteilten Stichproben ergab sich nach dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bei VEGF-C ein p-Wert von 0,022. Der Median des IMA-PVAT von 0,36 (0,22–0,72) zeigte sich kleiner im Vergleich zum Median des C-PVAT von 0,83 (0,55–1,25). Der p-Wert des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests lag für VEGF-D bei 0,007 – bei deutlichen Unterschieden im Median von IMA-PVAT mit 0,25 (0,21–0,31) und C-PVAT mit 0,58 (0,42–0,87).

5.3.2.2 Lymphangiogenese-Rezeptor

Die mRNA-Expression des relevantesten an der Lymphangiogenese beteiligten Rezeptors VEGFR3 wurde zur Abschätzung der Signalwegaktivierung und Ansteuerung der Lymphangiogenese untersucht. Hierbei war der Median bei nicht normalverteilten Stichproben des VEGFR3 im IMA-PVAT mit 0.07 (0.05–0.12) geringer als beim C-PVAT mit 0.13 (0.09–0.25). Der p-Wert von 0.022 zeigte einen signifikanten Unterschied in der VEGFR3-Rezeptor Expression zwischen den beiden Fettgewebe auf.

5.3.3. Fibrose

Die Ergebnisse von Antoniades et al. 2019 lassen vermuten, dass die chronische Entzündung im Rahmen der Atherosklerose zu den Veränderungen des Phänotyps des PVAT beiträgt (260). Daraufhin werden eine vermehrte Zelleinwanderung, Zytokinausschüttung und strukturelle Veränderungen gefördert. Diese Umwandlungsprozesse können unter anderem in einer Gewebefibrose resultieren. Einer der Wege, der zu den genannten Veränderungen führen kann, ist die Aktivierung des TGFβ-Signalweges in den perivaskulären Fettgewebszellen (143).

Durch Erhebung des Expressionsausmaßes von *TGFB*-mRNA wurde die Nachprüfung des bereits in Unterkapitel 6.2.1 erwähnten Unterschieds in Form eines molekularen Korrelats angestrebt. Dabei zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen dem Median vom IMA-PVAT 0,47 (0,34–0,67) und dem von C-PVAT 0,49 (0,45–0,70). Ein p-Wert von 0,1514 deutet darauf hin, dass zwischen den beiden Stichproben kein Unterschied in der Expression vom TGFβ besteht und lässt somit die Schlussfolgerung zu, dass eine vermehrte TGFβ Expression nicht die Ursache der beobachteten vermehrten Fibrose darstellt.

Die Abbildung 8 zeigt eine graphische Darstellung des Vergleiches der mRNA-Expression der angiogenetischen und fibrotischen Wachstumsfaktoren in den unterschiedlichen IMA- und C-PVAT Probandenpaaren.

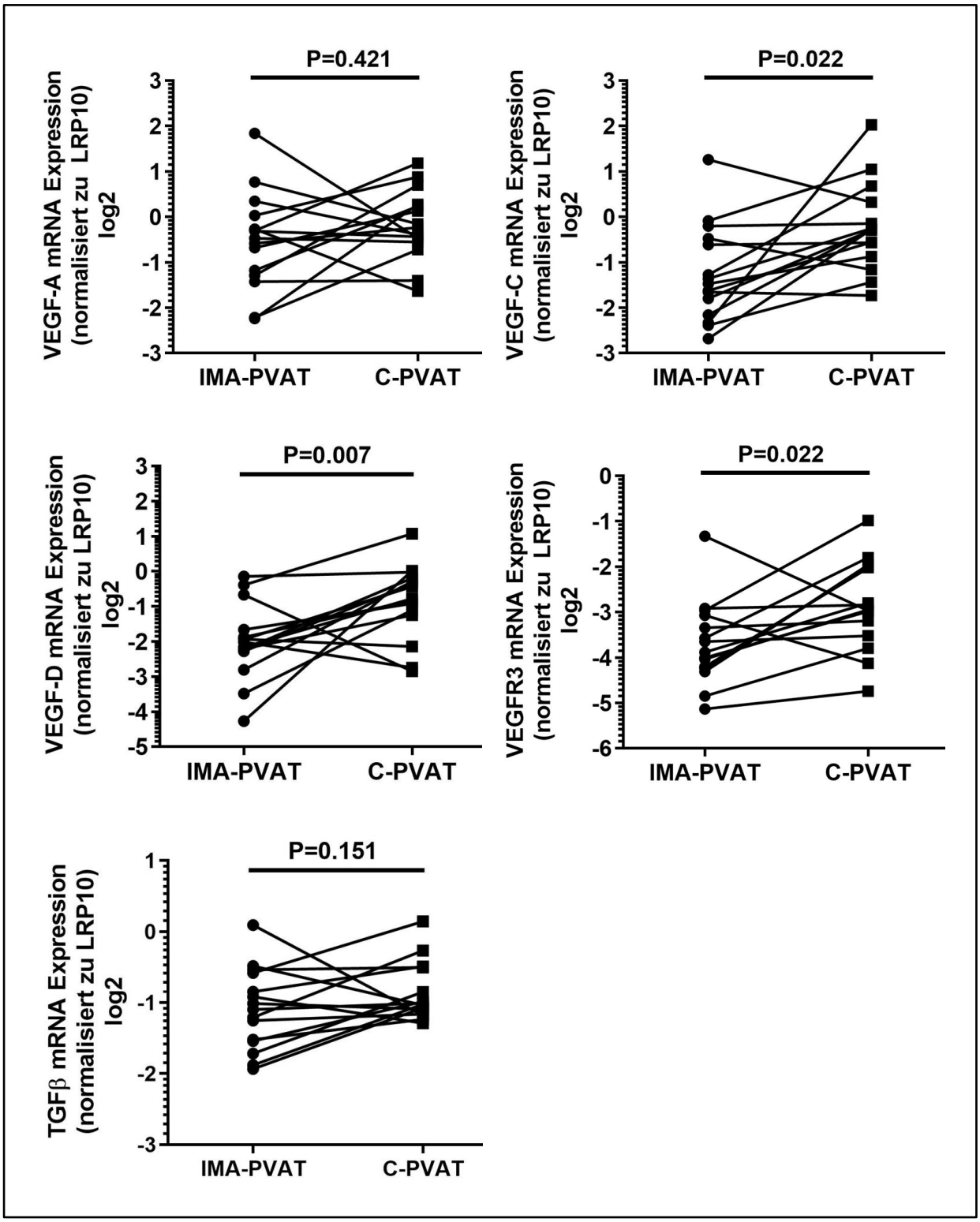

Abbildung 7: *Quantitative Analyse der m-RNA-Expression von an Angiogenese, Lymphangiogenese und Fibrose beteiligten Genen in IMA- und C-PVAT (VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-R3, TGFβ) mittels RT-PCR. n=15. (Eigene Darstellung mit Hilfe des Programms GraphPad Prism, Version 8.0)*

6. Diskussion

Atherosklerotische Gefäßwandveränderungen und ihre Folgeerkrankungen, wie die KHK, stellen weiterhin eine Erkrankung von größter medizinischer und gesellschaftlicher Relevanz dar. Trotz unterschiedlicher Ansätze können bisher die bereits ausgebildeten atherosklerotischen Plaques in der Wand von Koronargefäßen auf pathophysiologischer Ebene nur in ihrem Frühstadium rückgängig gemacht werden. Daraufhin bleibt die Zielsetzung präventiver und medikamentöser Behandlungsstrategien, die volle Ausprägung der Erkrankung zu verlangsamen und ihre thrombotischen Komplikationen zu verhindern.

Im Rahmen klinischer und experimenteller Forschungsarbeiten zur Pathophysiologie der KHK mit der Absicht, bedarfsgerechte Behandlungsmöglichkeiten anzubieten, stellte sich heraus, dass das umliegende Fettgewebe der Gefäße, das PVAT, vermutlich eine signifikante Rolle in der Pathophysiologie der Erkrankung einnimmt. Nach der Erkenntnis von Solis, Cassis (1991) besitzt PVAT nicht nur eine strukturelle Funktion (6). Ergebnisse von Studien an Menschen und im Tiermodell zeigen, dass PVAT aufgrund seiner parakrinen Fähigkeiten und endokrinen Produktion biochemisch aktiver Botenstoffe einen Einfluss auf chronische atherosklerotische Gefäßwandprozesse ausüben kann (261, 262). Im Gegensatz dazu ist bisher über die Rolle der Angiogenese, der Lymphgefäße und der Lymphangiogenese innerhalb des perikoronaren PVAT und über deren Funktion im Rahmen der pathophysiologischen Entwicklung der Erkrankung wenig bekannt. Mit dem Ziel, einen Beitrag über den möglichen Wert der Angiogenese und des lymphatischen Gefäßsystems sowie der Lymphangiogenese innerhalb des PVAT bezüglich der Begünstigung von atherosklerotischen Plaques bzw. deren Auflösung zu leisten, wurde im Rahmen dieser Dissertation das PVAT von KHK-Patienten auf das Ausmaß der perivaskulären Lymphangiogenese und der Expression lymphangiogenetischer Wachstumsfaktoren erstmals systematisch untersucht. Ferner wurde im Rahmen dieser Arbeit die Überprüfung der Folgezustände, Inflammation und Fibrose, innerhalb des dysfunktionalen PVAT durch eine quantitative Analyse erzielt.

6.1 IMA-PVAT als Kontrolle

Um zu klären, inwiefern das angiogenetischen Potential und die Lymphangiogenese im morphologisch und pathophysiologisch veränderten C-PVAT auf die Ausbildung von Atherosklerose einwirken kann, bedarf es eines Vergleichsgewebes. In mehreren Langzeitstudien mit Patienten nach aortokoronarer Venenbypass-Operation wurde berichtet, dass der IMA-Bypass in einer Zehnjahresperspektive nur selten thrombosiert und kaum

atherosklerotische Plaques aufweist (11, 263, 264). Da entsprechende Gewebeproben von gefäßgesunden Personen nicht zur Verfügung standen, wurden IMA-PVAT und C-PVAT desselben Patienten miteinander verglichen. Dies hatte zudem den Vorteil, dass systemische Einflussfaktoren (die auf beide Gewebe gleichermaßen einwirken) in ihrer Bedeutung zurücktreten und somit mehr Gewicht auf lokale Veränderungen gelegt werden konnte.

Die folgenden Kapitel zeigen eine Gegenüberstellung des direkten Vergleiches zwischen IMA-PVAT und C-PVAT bezüglich des Ausmaßes an Angiogenese, Lymphangiogenese und lymphangiogenetischen Wachstumsfaktoren, sowie der langzeitfolgen, Inflammation und Fibrose, im Rahmen dieser Dissertation.

6.2 Angiogenese

Bislang konnte das angiogenetische Potential von PVAT weitgehend überprüft werden. PVAT-Adipozyten sind in der Lage, pro-angiogenetische Adipokine, wie VEGF und MCP-1, abzusondern (265). Das PVAT kann aufgrund seines parakrinen Fähigkeiten nach einer Gefäßwandschädigung die Neovaskularisation der Adventitia induzieren (266). Dennoch gibt es wenige Ergebnisse aus quantitativen Analysen über die Angiogenese und die Ausdehnung des Gefäßnetzwerks innerhalb des PVAT. Durch die immunhistologische Untersuchung mit dem Antikörper PECAM-CD31 im Rahmen dieser Arbeit ließ sich ein dichteres Gefäßnetz im C-PVAT als innerhalb des korrespondierenden IMA-PVAT nachweisen.

Es ist bekannt, dass der VEGF-A ein stark pro-angiogenetischer Faktor ist. Gharakhanian et al. (2019) konnten die Relevanz seiner Teilnahme in der Angiogenese innerhalb des PVAT belegen. Transgene Mäuse mit einer Deletion des VEGF-A-Gens konnten nur ein begrenztes Gefäßsystem innerhalb von PVAT entwickeln (267). Demgegenüber zeigte diese Arbeit unterschiedliche Ergebnisse. Die Expression des VEGF-A-Gens im C-PVAT wurde im Vergleich zum IMA-PVAT nicht als signifikant größer erfasst. Dies könnte darauf hindeuten, dass an der Sprossung neuer Gefäße im PVAT, außer VEGF-A, noch andere biologische Mediatoren und Signalwege involviert sind oder dass durch die einseitigen Analysen in der Vergangenheit vorhandene Unterschiede nicht erfasst wurden.

Die Resultate einer Studie an Mäusen waren ähnlich wie in dieser Dissertation. Der Hypoxie-induzierte Faktor HIF-1 alpha führte in einem adipösen Milieu nicht zu einer Steigerung des angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF-A. Die Autoren mutmaßten, dass die Expansion der Gefäße auf Aktivierungen von Wachstumsfaktoren in Adipozyten-Vorläuferzellen, Prä-Adipozyten und Endothelzellen zurückzuführen sind (268). Chen et al. (2016) fanden, dass das inflammatorische Protein, CRP, nach Aktivierung einer HIF-1-alpha-Überexpression die Expression von VEGF in Stammzellen aus PVAT induzieren

kann. Konditioniertes Medium aus diesen Stammzellen sorgte für eine vermehrte Angiogenese aus Endothelzellen (269). Die Ergebnisse einer weiteren Studie mit transgenen Mäusen offenbarten, dass der pluripotente Faktor OCT4 in perivaskulären Vorläuferzellen auf die Exposition von Stressreizen, beispielsweise Hypoxie, mit der Migration und Proliferation von VSMC reagiert. Die Aktivierung dieses Faktors war für die Ausbildung funktionsfähiger Gefäße erforderlich (270).

Des Weiteren konnte bereits die Rolle des pro-angiogenetischen Faktors *Angiopoietin-like-Protein 2* (ANGPT2) in der Angiogenese im Fettgewebe ausführlich überprüft werden (271). Allerdings ist die bisherige Evidenz über die durch ANGPT2 geförderte Angiogenese innerhalb von PVAT gering. Tian et al. (2013) konnten die Expression von ANGPT2 innerhalb PVAT belegen. Hierin zeigte ANGPT2 jedoch eine eher entzündungsfördernde Funktion (272). Die Überexpression von ANGPT2 in Adipozyten aus dem subkutanen Fettegewebe in transgenen Mäusen führte zu einer Proliferation der Blutgefäße. Auch die Expression weiterer pro-angiogenetischer Gene, wie VEGF-A, des *Tyrosine-protein kinase receptor* (Tie-2) und das Endothezellmarker CD31 zeigten sich ebenfalls erhöht (273). Weiterführende Ergebnisse der Forschungsgruppe von Frau Professor Schäfer im Rahmen dieser Studie zeigten zum ersten Mal die Rolle des angiogenetischen Wachstumsfaktors ANGPT2 bei der erhöhten Vaskularisation innerhalb vom C-PVAT sowohl histologisch als auch auf Protein- und RT-q-PRC-Ebene (274).

Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen entnommen werden, dass die Funktion des VEGF-A trotz dessen starken angiogenetischen Potenzials bei der Neovaskularisation von PVAT eher begrenzt ist. Die Angiogenese innerhalb von PVAT scheint ein multifaktorieller Prozess zu sein, der nicht nur den Wachstumsfaktor VEGF-A, sondern auch perivaskuläre Vorläuferzellen, VSMC und inflammatorische Zytokine (MCP-1, IL-6) involviert.

6.3 Lymphgefäße im perivaskulären Fettgewebe

Bisher lag der Schwerpunkt der Untersuchungen von PVAT auf den Effekten der Neovaskularisation der Adventitia, dem parakrinen Austausch von Adipokinen zwischen PVAT und den atherosklerotischen Plaques sowie der Gefäßwand. Durch die Untersuchung der Lymphgefäße innerhalb des PVAT sollte eine neue Perspektive zum besseren Verständnis der atherosklerotischen Erkrankung geschaffen werden. Die Resultate dieser Dissertation erlauben erste Einblicke in das Lymphgefäßsystem von humanem PVAT in der Nähe von atherosklerotischen Plaques.

Die ersten Hinweise auf die Existenz von Lymphgefäßen und ihre Assoziation mit der Plaqueprogression erbrachte die Untersuchung der Gefäßwandschichten von

atherosklerotischen Gefäßen (275). Die Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen zeigten ein florides lymphatisches Gefäßnetz in der Adventitia, in der Nähe atherosklerotischer Plaques, sowohl in Mausmodellen als auch in humanen Koronargefäßen. Parallel zeigte sich durch die Unterbrechung des VEGF-C-/-D/VEGFR3-Signalweges eine Akkumulation von Entzündungszellen, insbesondere von CD3 T-Lymphozyten, in der Adventitia. Basierend auf diesen Befunden ließ sich mutmaßen, dass der eben genannte Signalweg eine relevante Rolle beim Abströmen von Entzündungszellen aus den atherosklerotischen Plaques besitzt (233). Andere Autoren fanden ebenfalls, dass die Blockade der Lymphangiogenese in der Adventitia für die Aggravation bereits bestehender atherosklerotischer Plaques sorgte. Umgekehrt konnte das Ausmaß der Atherosklerose durch die Überexpression des VEGF-C-Gens attenuiert werden (276). Durch die anatomische Nähe der Adventitia zum PVAT und die parakrinen Eigenschaften des PVAT, bei dem es mit den inflammatorischen Prozessen von atherosklerotischen Plaques kommuniziert, ist die Annahme vertretbar, dass auch das lymphatische Gefäßnetz vom PVAT durch den Austausch von Botenstoffen beeinflusst werden könnte (174).

Im Rahmen dieser Dissertation konnte durch die Antikörpermarkierung mit LYVE-1 und Podoplanin innerhalb von C-PVAT ein größeres lymphatisches Gefäßnetzwerk belegt werden. Passend dazu konnte ein erhöhtes mRNA-Expressionsniveau der lymphangiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D in den C-PVAT-Proben festgestellt werden. Auch konnte durch eine qRT-PCR eine höhere Expression des lymphangiogenetischen Rezeptors VEGR-3 in C-PVAT-Proben gezeigt werden. Andere Gruppen fanden, dass die Inaktivierung von VEGF-C, verursacht durch die erhöhte Expression des VEGFR-2-Rezeptors aus den Endothelzellen der Wand von atherosklerotischen Arterien, mit einer Regression von lymphatischen Gefäßen in der Adventitia einherging (277).

Interessanterweise zeigten die Ergebnisse der Forschungsgruppe von Frau Professor Schäfer einen synergistischen Effekt von VEGF-C und ANGPT2 in Bezug auf die Lymphangiogenese. Abbildung 8 illustriert lymphatische Endothelzellen aus der Haut von Menschen in konditioniertem Medium aus PVAT. Nach simultaner Behandlung mit VEGF-C und ANGPT-2 ist die Sprossung von Lymphgefäßähnlichen Strukturen erheblicher als nach der Behandlung mit den einzelnen Faktoren (274). Die Bedeutung des ANGPT2 und ihres Rezeptors Tie2 in der Begünstigung der Lymphangiogenese wurde bereits überprüft (278). Zheng et al. (2014) konnten ANGPT-2 als einen lymphangiogenetischen Wachstumsfaktor nachweisen. Es ist für die Sprossung und Proliferation von Lymphgefäßen sowie für den Erhalt ihrer morphologischen Integrität verantwortlich (279). Eine Deletion des ANGPT-2-Gens geht mit einer erheblichen Dysfunktion der Lymphgefäße einher, was ihre Rolle in der Entwicklung von Lymphgefäßen bestätigt (280).

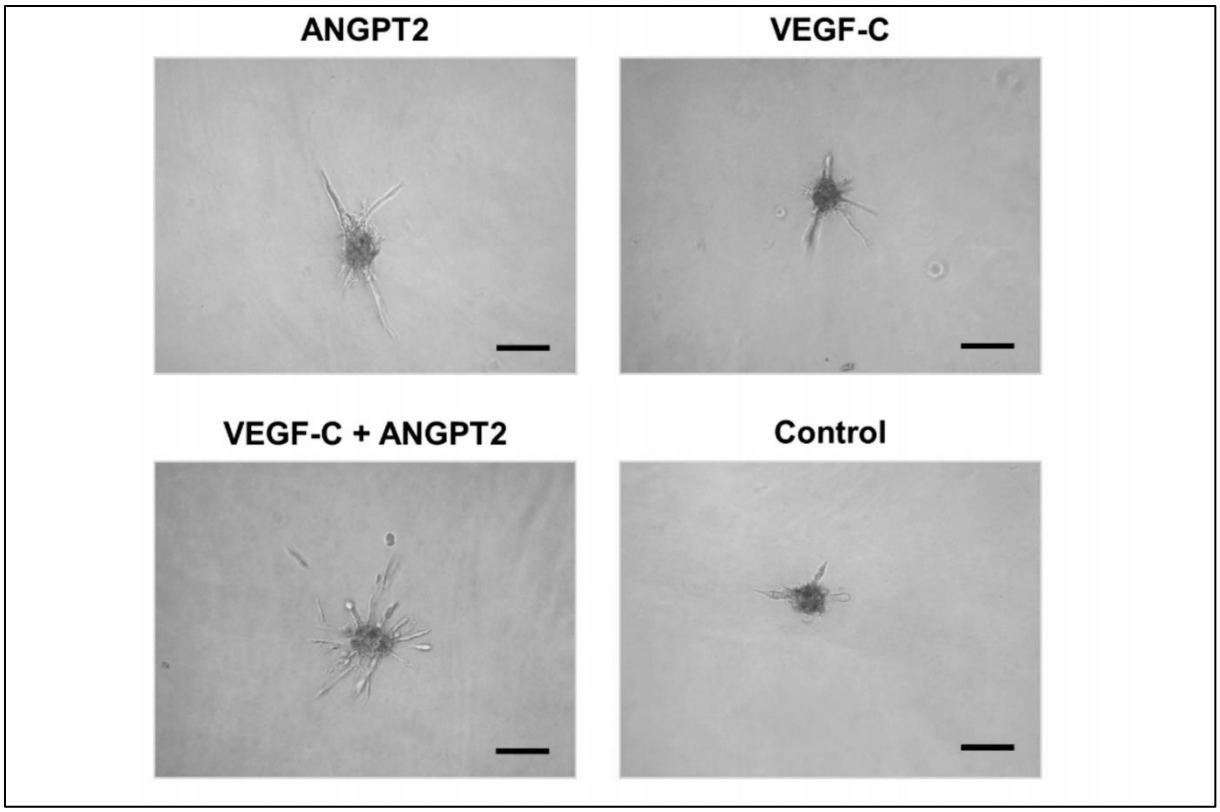

Abbildung 8: *Repräsentative Bilder der Auswirkungen von ANGPT2 und VEGF-C auf die Lymphangiogenese beim Menschen. Bilder von humanen dermalen lymphatischen Endothelzellen (HDLEC) Sphäroiden. Modifiziert aus Drosos et al. (2019) (274).*

Unter inflammatorischen Bedingungen kann ANGPT2 auch die Proliferation von lymphatischen Endothelzellen stimulieren. Beispielsweise induziert die simultane Behandlung humaner lymphatischer Endothelzellen mit TNF-α und ANGTP-2 ihre Proliferation (281). Außerdem kann ANGPT2 zur Lockerung inflammatorischer Makrophagen im Gewebe und nachfolgender Erhöhung inflammatorischer Zytokine, wie TNF-α, IL-6 und CCL2, führen (282). TNF-α ist in der Lage, den inflammatorischen NF-κb-Signalweg zu aktivieren. Die Aktivierung von NF-κb kann zu einer vermehrten Expression von VEGFR3 in lymphatischen Endothelzellen und zur Sensibilisierung derselben auf die lymphatischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und -D führen (283). Da, wie im Unterkapitel 6.5.1 beschrieben, das C-PVAT Zeichen einer dauerhaften Inflammation aufweist, könnte dies vermutlich eine Erklärung für die erhöhte Expression von ANGPT-2 innerhalb C-PVAT und das ausgebaute Lymphgefäßsystem sein.

Diese Ergebnisse belegen nicht nur, dass die Lymphangiogenese von PVAT in der Umgebung von atherosklerotischen Plaques vermehrt aktiviert wird, sondern auch, dass der Signalweg VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 als ein relevanter Mechanismus bei der Aktivierung der Lymphangiogenese im PVAT involviert ist. Einen möglichen Einfluss auf die Lymphangiogenese könnte auch ANGPT2 haben. Wahrscheinlich spielt es eine wesentliche

Rolle in der inflammatorisch bedingten Lymphangiogenese. Dies bedarf jedoch noch ausführlicheren Untersuchungen innerhalb von PVAT.

6.4 Zusammenhang zwischen Lymphangiogenese und Inflammation im C-PVAT

Lymphgefäße stellen eine wesentliche Grundlage in der Entwicklung von inflammatorischen Prozessen dar. Sie bieten einen Pfad für Entzündungszellen zu inflammatorischen Prozessen hin und von ihnen weg. So können Abwehrzellen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen Antigene in den Lymphknoten präsentieren und das Immunsystem modulieren (206). Die Relation zwischen Atherosklerose, Inflammation und Lymphgefäßen wurde bereits überprüft (230).

Über die Funktion der Lymphgefäße im PVAT finden sich bisher nur wenige Informationen in der Literatur. In dieser Dissertation wurden C-PVAT-Proben mit inflammatorischen Zeichen dargestellt. Gleichzeitig offenbarten die C-PVAT-Proben sowohl immunhistochemisch als auch auf mRNA Expressionsebene mehr Anzeichen für ein stärker ausgebautes Lymphgefäßnetz im Vergleich zum IMA-PVAT. Diese Resultate lassen vermuten, dass eine Beziehung zwischen der Inflammation des PVAT, der Infiltration von Entzündungszellen und dem Ausmaß der Lymphangiogenese besteht.

Zunehmende Forschungsergebnisse ergeben den Hinweis, dass Entzündungszellen und proinflammatorische Zytokine eine Quelle lymphangiogenetischer Wachstumsfaktoren in zahlreichen Erkrankungen sein können. Eine erhöhte Infiltration von Makrophagen ist mit einer verstärkten Expression von VEGF-C in Lipödema verbunden (284). TGFβ1 kann im Rahmen von Fibrose die Expression von VEGF-C erhöhen (285, 286). Ferner können IL-1β und TNFα die Expression von VEGF-C aus Makrophagen in Tumoren induzieren (287).

Durch die Ergebnisse dieser Dissertation kann keine Kausalitätsbeziehung zwischen der Präsenz inflammatorischer Zytokine innerhalb von PVAT und einer Überexpression der lymphangiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D hergestellt werden. In weiteren Studien konnte in dysfunktionalen C-PVAT-Proben von KHK-Patienten eine erhebliche Expression der inflammatorischen Zytokine TGFβ1, IL-1β und TNFα nachgewiesen werden (288, 289). Interessanterweise resultierte die Blockade der VEGF-C- und VEGF-D-Faktoren mittels eines löslichen Antikörpers mit einer verringerten Chemotaxis von Makrophagen in inflammatorisch verändertem Fettgewebe. Ebenfalls zeigte sich die Expression der inflammatorischen Zytokine TNFα und IL-6 reduziert (290). Ob

inflammatorische Zytokine in dysfunktionalen PVAT die Expression von VEGF-D und -C verstärken, bedarf dennoch weiterführenden Untersuchungen.

Chakraborty et al. (2019) haben den Zusammenhang zwischen einer Entzündung des Fettgewebes infolge von Adipositas und Lymphgefäßen im Fettgewebe untersucht. Eine erhöhte Expression von VEGF-D und -C wurde innerhalb inflammatorisch veränderten Fettgewebes festgestellt (291). Ergänzende Ergebnisse der gleichen Forschungsgruppe zeigen, dass unter adipösen Bedingungen bereits ein Lymphgefäßnetz im Fettgewebe ausgebildet ist. Bei Überexpression von VEGF-D in transgenen Mäusen wird die Expansion der lymphatischen Gefäße gefördert. Im weiteren Verlauf ließ sich eine Reduktion inflammatorischer Makrophagen feststellen (292). Diese Ergebnisse weisen zwar auf die Rolle der Lymphgefäße in der Auslösung von Inflammation im veränderten Fettgewebe hin, erlauben jedoch keine Aussagen über diese Prozesse im PVAT.

Die alleinige Anwesenheit von Lymphgefäßen in der Adventitia und im PVAT kann allerdings den Umfang ihrer Mitwirkung in der Erkrankung nicht vollständig erklären. Telinius N, Hjortdal VE et al. (2019) vertreten die Meinung, dass sich Lymphgefäße nach der Bekämpfung eines inflammatorischen Prozesses zurückbilden (293). Eine andere Forschungsgruppe fand heraus, dass ein Teil der neu gebildeten Lymphgefäße im Rahmen chronischer Erkrankungen keine Degeneration erreicht. Hingegen zeigen sie einen pro-inflammatorischen Phänotyp, der die Anreicherung von Entzündungszellen und Inflammation fördern kann (294). Demgegenüber halten andere die Dysfunktionalität der Lymphgefäße für die Ursache der Zuspitzung der atherosklerotischen Plaques. Milasan et al. (2019) belegten, dass die Verbesserung der lymphatischen Funktion im hypercholesterolämischen Mausmodell mit einer zurückhaltenden Plaquebildung und verminderten Anreicherung an Makrophagen verbunden war (295). Ob diese Hypothesen auch für Lymphgefäße innerhalb des PVAT gelten, bleibt jedoch unklar.

6.5 C-PVAT, Merkmale dysfunktionalen perivaskulären Fettgewebes

Durch die parakrinen Eigenschaften des PVAT und seiner Fähigkeit, mit seiner Umwelt zu interagieren, besteht ein bidirektionaler Kommunikationsweg zwischen dem Fettgewebe und der arteriellen Wand sowie ihren inflammatorischen Prozessen (296, 297). Obwohl der Terminus *dysfunktionales perivaskuläres Fettgewebe* etabliert ist, gibt es bisher nur wenige Studien bezüglich Veränderungen des humanen PVAT, in denen biologische und genetische Grundlagen dieser Konstellation beschrieben werden (298). Es ist bereits bekannt, dass zwei wesentliche Mechanismen zur Dysfunktionalität des PVAT führen: Neovaskularisation und Inflammation. In der vorliegenden Dissertation konnte belegt werden, dass das C-PVAT um

atherosklerotische Gefäße in menschlichen Proben irreversible Merkmalszüge von dysfunktionalem PVAT, Inflammation und Fibrose aufweist. Dies unterstützt die Hypothese, dass das PVAT mit der Gefäßwand durch parakrine und endokrine Signalwege interagiert. Dennoch konnte durch die Ergebnisse dieser Dissertation nicht die Verschlechterung der atherosklerotischen Plaques über die Zeit, unter dem Einfluss von dysfunktionalem PVAT, nachgewiesen werden.

Erwähnenswert ist auch die Tatsache, dass kontroverse Ergebnisse aus klinischen Studien über den Einfluss von PVAT auf die Progression atherosklerotischer Plaques publiziert wurden. Das PVAT-Volumen von Koronargefäße wurde in ein direkt proportionales Verhältnis zur Kalzifikation atherosklerotischer Plaques gestellt (299). In einer weiteren Studie wurde eine positive Korrelation zwischen dem perikoronaren PVAT-Volumen und der Anwesenheit darunterliegender Plaques gefunden, unabhängig vom gesamten epikardialen Fettgewebe (300). Hingegen wurde in einer MRT-Studie kein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und dem zirkulären Volumen von PVAT gezeigt (301). In einer weiteren Studie mittels CT-Diagnostik wurde einem solchen Verhältnis ebenfalls widersprochen (302). Diese Untersuchungen geben Hinweise, dass die Grundlage der Beziehung zwischen PVAT und atherosklerotischen Plaques nicht in den physikalischen Eigenschaften von PVAT, sondern in ihren biologischen und parakrinen Fähigkeiten liegt.

Zahlreiche Studien lassen vermuten, dass das PVAT bzw. eine PVAT-Dysfunktion bei unterschiedlichen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems eine Rolle spielen könnte. Ergebnisse einer Studie mit Mausmodellen legen nahe, dass eine gesteigerte Inflammation im PVAT zur Verschlechterung atherosklerotischer Plaques beitragen könnte (303). Ohyama et al. (2018) zeigen in einer Studie über vasospastische Angina bei Menschen, dass die Inflammation von PVAT einen starken Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung hatte (304). In einer weiteren Studie wurde vorgezeigt, wie die PVAT-Dysfunktion Reparaturprozesse nach Verletzung der Gefäßwand beeinflussen könnte (146). Ebenso führte die Transplantation veränderten PVATs aus adipösen Mausmodellen in nicht adipöse Mausmodelle zu einer erhöhten Ausprägung an Atherosklerose in der thorakalen Aorta (305).

Das folgende Unterkapitel beschäftigt sich mit den Folgen des Dysfunktionalen PVAT, Inflammation und Fibrose. Dabei werden die wichtigsten Faktoren, die diese Folgezustände auslösen, aufgezeigt. Des Weiteren werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen vergleichen.

6.5.1. Inflammation und Fibrose in C-PVAT

Die Inflammation von PVAT ist eine Folgeveränderung, die auf den bidirektionalen Austausch von Adipokinen mit der entzündeten arteriellen Gefäßwand im Rahmen einer KHK

zurückzuführen, ist. Durch nichtinvasive Diagnostik, mittels Computertomographie- und ^{18}F-Fluordesoxyglukose-Positronsemisiontomographie-Untersuchungen, konnte die Inflammation von PVAT um humane Koronargefäße bereits belegt werden (10, 127, 306). In einer von Suzuki et al. (2020) durchgeführten Studie mit PVAT um Koronargefäße aus KHK-Patienten konnten hohe Expressionsniveaus der inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1β im Vergleich zu Patienten ohne KHK nachgewiesen werden (307). Dazu passend zeigten Mazzotta et al. (2021) bei Patienten, die sich einer koronaren Bypassoperation unterzogen haben, eine deutliche Ausprägung an inflammatorische Mediatoren innerhalb C-PVAT im Vergleich zu IMA-PVAT. Das PVAT um die Koronargefäße weist eine m-RNA Überexpression pro-inflammatorischer Adipokine, unter anderem des IL-6 und MCP-1. Auch dessen korrespondierende Proteinexpressionsniveaus zeigten sich erhöht (308).

Der Zusammenhang zwischen der Expression inflammatorischer Zytokine und der Akkumulation von Entzündungszellen im PVAT im Rahmen einer KHK wurde bereits ausführlich beschrieben (309, 310). In einer von Konaniah et al. (2017) durchgeführten Studie mit dysfunktionalem PVAT aus atherosklerotischen Mäusen wird nicht nur die Anreicherung von CD68-postiven Makrophagen belegt, sondern auch die Überexpression der inflammatorischen Zytokine wie MCP-1 und TNF-α (311). Ergebnisse dieser Arbeit konnten durch die immunhistochemische Untersuchung mithilfe von CD68-Antikörpern in den C-PVAT-Proben eine dichtere Häufung von Makrophagen als im gesunden IMA-PVAT gezeigt werden. Ähnliche Feststellungen erfassten Farias-Itao et al. (2019). Im PVAT, direkt angrenzend an Koronargefäße mit instabilen atherosklerotischen Plaques, konnte eine erhebliche Akkumulation von B-Lymphozyten und CD68-positiven Makrophagen nachgewiesen werden (312). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Inflammation von dysfunktionalem C-PVAT durch die Anreicherung an Entzündungszellen und Zytokinen zur Aufrechterhaltung der chronischen Inflammation beitragen kann. Ein Progress atherosklerotischer Plaques ist unter den genannten schädlichen Bedingungen vorstellbar.

Ferner gelang mit Hilfe von CT-Angiographien bei KHK-Patienten der Nachweis von Fibrose in PVAT als Folge der chronischen Inflammation (313). In diesem Zusammenhang soll vermerkt werden, dass in der histologischen Untersuchung von Fibrose durch die Vorhoeff's-Elastica-Masson-Trichrom-Färbung in der vorliegenden Arbeit eine bemerkenswerte Differenz des fibrotischen Anteils zwischen den Fettgeweben belegt wurde. Das C-PVAT weist, im Verhältnis zur gemessenen Gesamtgewebefläche, signifikant mehr Fibrose auf. Passend dazu zeigte sich in den C-PVAT-Proben, wie im oberen Abschnitt beschrieben, eine hohe Akkumulation von CD68-postiven Makrophagen.

Die Entwicklung von Fibrose innerhalb eines Gewebes beinhaltet komplexe Mechanismen. Unter den Genen, die eine Gewebefibrose fördern, nimmt das TGFβ-Gen eine zentrale

Stellung ein. Frangogiannis et al. (2020) und Verrecchia, F. und Mauviel, A. (2002) konnten bestätigen, dass das TGFβ-Gen die Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten sowie die Stabilisierung der extrazellulären Matrix unterstützt (314, 315). Innerhalb von PVAT und in vaskulären Pathologien existieren allerdings auch andere pro-fibrotische Faktoren, die entweder über die direkte Aktivierung des TGFß-Gens oder durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine die Expression des TGFß-Gens aktivieren. Erwähnenswert sind hierbei Angiotensin II (316), IL-1β (146) und TNF-α (317). Auch Makrophagen stellten eine relevante Quelle des TGFβ-Gens dar (318). In der vorliegenden Arbeit wurden PVAT-Proben nach der Expression des TGFβ-Gens untersucht. Allerdings korreliert die m-RNA-Expression des TGFβ-Gens innerhalb des C-PVAT nicht mit dem histologisch festgestellten Anteil an Fibrose.

Numaguchi et al. (2019) zeigen in ihrer Studie ähnliche Ergebnisse bezüglich der Inflammation und Fibrose in C-PVAT-Proben. Eine erhöhte Akkumulation an CD68-positiven Makrophagen und einem erhöhten Anteil an histologisch festgestellter Fibrose wurde im C-PVAT-Proben dargelegt. Ferner zeigten sich im Gegensatz zu unseren Ergebnissen hohe Expressionsniveaus der profibrotischen Gene TGFβ. Auch andere profibrotischen Gene zeigten eine erhebliche Expression, wie das *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP-1), das Makrophage inducible C-Type Leptin (Mincle) und der Platelet-derived growth factor subunit B* (288). Mikami et. al (2021) konnten in einer Studie analoge Ergebnisse in PVAT-Proben vorweisen. Die Masson-Trichrom-Färbung stellte einen erheblichen Anteil an Fibrose in C-PVAT im Vergleich zu IMA-PVAT und Aortale-PVAT dar. Eine Ansammlung von CD68-positiven Makrophagen konnte parallel zu einer ausgeprägten Expression der proinflammatorischen Gene TNF-α, IL-6, IL-1β und MCP-1 im C-PVAT nachgewiesen werden. Zudem zeigten sich die profibrotischen Gene TGFβ, TIMP-1und Mincle im C-PVAT höher exprimiert als im IMA-PVAT (289).

Infolge der chronischen Entzündung innerhalb von PVAT ändert sich auch das Sekretionsprofil von Adipokinen aus PVAT-Adipozyten mit der weiteren Progression atherosklerotischer Plaques. Leptin und Adiponektin sind zwei native Adipokine, deren Einsatz in Atherosklerose bereits ausführlich untersucht wurde. Viele bisherige publizierte Studien zeigen allerdings meistens Ergebnisse aus dem epikardialen oder viszeralen Fettgewebe. Gruzdeva et al. (2021) konnten innerhalb von inflammatorisch verändertem C-PVAT in der Nähe von Atherosklerose eine erniedrigte Expression des anti-inflammatorischen Adipokins, Adiponektin, nachweisen. Ebenfalls konnte eine Zunahme der Expression von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 festgestellt werden. Die Veränderungen der Expression von Adipokinen verschärfen sich mit Laufe der Erkrankungsprogression (319). Außerdem wurde in C-PVAT-Proben aus KHK-Patienten mit hochgradigen Koronargefäßstenosen eine

höhere Expression des pro-inflammatorischen Adipokins, Leptin, als bei KHK-Patienten ohne Stenosen nachgewiesen. Im Gegensatz zu Adiponektin zeigt sich die Expression von TNF-α im C-PVAT ebenfalls erhöht (320). Interessanterweise konnten bei Mäusen ohne Zeichen von Atherosklerose erst nach Verletzung der Gefäßwand mittels perkutaner transluminaler Angioplastie der Arteria Iliaca eine Erhöhung von MCP-1, TNF-α und IL-6 sowie Abnahme von Adiponektin in der angrenzenden PVAT nachgewiesen werden(119).

Durch diese Ergebnisse wird belegt das C-PVAT Merkmale dysfunktionalen Fettgewebes im Rahmen einer KHK aufweist. Es handelt sich dabei um ein komplexes Geschehen, das über eine lokale Verletzung der Gefäßwand in einer reaktiven Inflammation und später in einer phänotypischen und sekretorischen Umstellung vom PVAT aufgrund der verbleibenden entzündlichen vaskulären Umgebung führt.

6.6 Limitationen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde nach Hinweisen für die möglichen Ursachen der erhöhten Widerstandsfähigkeit der IMA gegenüber der Entwicklung einer Atherosklerose gesucht und dabei insbesondere auf die strukturelle Zusammensetzung des IMA-PVAT im Vergleich zu PVAT um eine atherosklerotische Läsion geachtet. Hierfür wurden Unterschiede im Vergleich zum dysfunktional veränderten C-PVAT erkundet. Die chirurgische Entnahme entsprechender Gewebeproben gesunder Probanden ist infolge der hohen Risiken und Komplikationen des ansonsten unnötigen Eingriffes ethisch nicht vertretbar. Deshalb wurde das IMA-PVAT im Rahmen dieser Dissertation als gesundes Gewebe betrachtet und IMA- und C-PVAT-Proben eines gleichen Probanden miteinander verglichen. Die Möglichkeit, Informationen über die Merkmalszüge gesunden PVATs um die Aorta oder um Koronargefäße zu erwerben, war somit nicht gegeben.

Des Weiteren basiert die KHK auf einer chronischen pathophysiologischen Entwicklung. Die Lymphangiogenese geschieht parallel zur Fortentwicklung der Erkrankung. Die Teilnehmer der Studie befanden sich in einem fortgeschrittenen Stadium der KHK. Durch die Untersuchung der Histologie, Immunhistochemie und mRNA-Expression der Fettgewebsproben ergaben sich Resultate, die nur eine Momentaufnahme der Erkrankung darstellen. Somit war es nicht möglich, die vollständige Entwicklung der Lymphangiogenese während der KHK zu beobachten.

Erwähnenswert ist auch, dass die Untersuchung von Fettgewebe aufgrund seiner Zusammensetzung große Gewebemengen erfordert. Hinsichtlich der begrenzten Gewebemengen konnten die Proben teilweise nur für eine Untersuchung verwendet und die Ergebnisse der Histologie und mRNA-Expression nicht direkt miteinander vergleichen werden.

Außerdem ist zu beachten, dass die C-PVAT-Proben standardisiert aus der Nähe der Aortenwurzel entnommen wurden. Obwohl laut Literatur keine räumliche Abgrenzung des PVAT um die Koronargefäße, die Aorta und das epikardiale Fettgewebe besteht, befanden sich die hier analysierten C-PVAT-Proben nicht in der direkten Umgebung der atherosklerotischen Plaques der Koronargefäße.

6.7 Fazit und Ausblick

Durch die Untersuchung der Expression von lymphangiogenetischen Genen und immunhistochemischen Markern wurde im Rahmen dieser Dissertation der Vergleich zwischen der Lymphangiogenese von IMA- und C-PVAT angestrebt. Basierend auf diesem Vergleich war das Ziel in der vorliegenden Dissertation, zu prüfen, ob durch den bidirektionalen Signalweg zwischen dem PVAT und den atherosklerotischen Plaques ein gestörtes Lymphgefäßsystem im PVAT entsteht, dass die Ausbildung und/oder Weiterentwicklung von Atherosklerose begünstigt (oder umgekehrt).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das C-PVAT von KHK-Patienten eine höhere Lymphangiogenese und Expression lymphangiogenetischer Wachstumsfaktoren aufweist als das des ‚gesunden' IMA-PVAT. Im C-PVAT gelang der immunhistochemische Nachweis mit dem LYVE-1 und den Podoplanin-Antikörpern eines umfangreicheren lymphatischen Gefäßnetzwerkes. Zudem konnte gezeigt werden, dass die lymphangiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF-C, -D und -R3 deutlich mehr vom C-PVAT exprimiert werden. Aus diesen Endpunkten kann darauf geschlossen werden, dass das Lymphgefäßsystem im C-PVAT umfangreicher aufgebaut ist als im IMA-PVAT. Allerdings lässt sich daraus wenig über die Ursachen für diesen Unterschied herleiten. Dass im C-PVAT auch einer höheren Anzahl an Makrophagen und sogleich ein fortgeschrittener fibrotischer Zustand festgestellt wurde, lässt die Vermutung zu, dass Inflammation und Fibrose im C-PVAT als Triggerfaktoren für die Ansteuerung der Lymphangiogenese eine Rolle gespielt haben könnten.

Des Weiteren konnten im Rahmen dieser Arbeit Ergebnisse erhoben werden, die das Vorliegen eines parakrinen Signalweges zwischen arterieller Gefäßwand und PVAT bestätigen. Die C-PVAT-Proben wiesen zahlreiche Merkmalszüge dysfunktionalen Fettgewebes auf. Die ausgeprägte Neovaskularisation und die fortgeschrittene Inflammation des C-PVAT aufgrund der Infiltration von Makrophagen sowie der nachgewiesenen Fibrosierung des Gewebes lassen ableiten, dass die morphologischen Veränderungen von C-PVAT im Zusammenhang mit der Entwicklung atherosklerotischer Plaques stehen. Das Vorkommen unterschiedlicher PVAT-Formen in demselben Patienten lässt den Schluss zu, dass diese Veränderungen unabhängig von systemischen Faktoren sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Unterscheid im Lymphgefäßsystem zwischen dysfunktionalem C-PVAT um die Koronargefäße und ‚gesundem' IMA-PVAT belegt werden. Das fibrotisch und inflammatorisch veränderte C-PVAT verfügte über ein stärker ausgeprägtes Lymphgefäßsystemnetzwerk. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass Veränderungen des Lymphgefäßsystems im dysfunktionalen PVAT an der Pathogenese der KHK beteiligt sein könnten. Jedoch bleibt die genaue Erklärung über die Mitwirkung dieses Systems unklar. Die Frage, ob durch den bidirektionalen Signalweg zwischen dem PVAT und den atherosklerotischen Plaques ein gestörtes Lymphgefäßsystem im PVAT entsteht, das die Ausbildung und/oder Weiterentwicklung von Atherosklerose begünstigt, oder ob die gefundenen Änderungen sekundärer Natur sind, konnte durch die Resultate dieser klinisch-experimentellen Studie nicht beantwortet werden.

Inwiefern ein ununterbrochener Zufluss von Entzündungsmediatoren und -zellen durch ein pro-inflammatorisches Lymphgefäßsystem die Fortbildung von Atherosklerose fördert oder ein dysfunktionales Lymphgefäßsystem die Auflösung der Inflammation und den Abtransport von Immunzellen aus den atherosklerotischen Plaques behindert, bedarf weiterer Analysen. Der Fokus zukünftiger Untersuchungen sollte daher auf der In-vivo-Analyse der Funktionalität von Lymphgefäßen und der Nachverfolgung des Verkehrs von Entzündungszellen zwischen atherosklerotischen Plaques, der arteriellen Gefäßwand und dem PVAT liegen.

7. Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der KHK beruht auf pathophysiologischen Veränderungen der Gefäßwand von Koronargefäßen auf dem Boden atherosklerotischer Plaques. Nach aktuellem Stand der Wissenschaft wird davon ausgegangen, dass die Gefäßwand in kontinuierlicher Wechselwirkung mit dem sie umgebenden perivaskulären Fettgewebe (PVAT) steht. Dies führt einerseits dazu, dass das PVAT seine normalerweise vasoregulatorischen und vasoprotektiven Eigenschaften verliert. Andererseits kann dysfunktionales PVAT aufgrund eines bidirektionalen Signalwegs mit der arteriellen Gefäßwand selbst morphologische und molekulare Umstrukturierungen induzieren. Wesentliche strukturelle Merkmale der dysfunktionalen Transformation von PVAT sind Gefäßneubildung, Inflammation und Fibrosierung.

Neben dem arteriellen und venösen Blutgefäßsystem nimmt das Lymphgefäßsystem eine relevante Stellung in der Pathophysiologie chronisch-inflammatorischer Prozesse ein. Es dient als Transportmedium von Abwehrzellen zu einem Entzündungsherd hin. Außerdem trägt es zum Kommunikationsweg zwischen Entzündungsherden sowie Lymphknoten der sekundären Immunität bei und fördert die Gewebeflüssigkeitshomöostase und das Gleichgewicht des Fettstoffwechsels. Es existieren bereits wissenschaftliche Erkenntnisse, die einen Zusammenhang zwischen Atherosklerose, Inflammation und Lymphgefäßen beschreiben. Jedoch wurden die Anwesenheit von Lymphgefäßen im PVAT und ihre Funktionalität im dysfunktionalen PVAT sowie deren Zusammenhang mit der Pathogenese von Atherosklerose bisher kaum untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob Unterschiede im Ausmaß der Lymphangiogenese zwischen gesundem und dysfunktionalem PVAT existieren und ob diese auf einer veränderten Expression lymphangiogenetischer Wachstumsfaktoren beruhen. Durch den Vergleich von PVAT um atherosklerotisch veränderte und ‚gesunde' Gefäßwandsegmente sollten erste Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zur Pathogenese der Atherosklerose gewonnen werden.

Im Rahmen einer Studie vom Patienten mit einer 2- oder 3-GKHK, die sich einer elektiven koronaren Bypassoperation in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie (HTG) der Universitätsmedizin Mainz unterzogen, erfolgte die Sammlung von Gewebeproben. Hierbei wurde PVAT um die IMA gesammelt, die als Bypassgraft verwendet wurden. Gleichzeitig wurde PVAT um die Aorta/Koronargefäße entnommen. Das IMA-PVAT wurde als ‚gesundes' PVAT und das paraaortale PVAT als dysfunktional betrachtet. Durch die quantitative Analyse von C-PVAT und IMA-PVAT gelang der Nachweis des Lymphgefäßsystems innerhalb von

PVAT. Die immunhistochemische Untersuchung des LYVE-1 und Podoplanin-Antikörpers zeigte ein aufgebautes Lymphgefäßnetzwerk im C-PVAT. Die mRNA-Untersuchungen stellten eine bedeutsame Expression der lymphangiogenetischen Gene VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3 im C-PVAT fest. Durch die CD31-immunhistochemische Färbung konnten Anzeichen einer erheblichen Vaskularität im C-PVAT im Vergleich zu IMA-PVAT dargestellt werden. Dahingegen wurde kein relevanter Unterschied im angiogenetischen Wachstumsfaktor VEGF-A festgestellt. Mit der CD68-Färbung wurden signifikant mehr Makrophagen innerhalb des C-PVAT nachgewiesen. Der histologische Nachweis an Fibrose nach der VES-MTC-Färbung war im C-PVAT größer als in das IMA-PVAT, jedoch zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Expression des pro-fibrotischen Gens TGFβ.

Durch die Ergebnisse dieser Dissertation werden die vermehrte Anwesenheit von Lymphgefäßen und die Expression lymphangiogenetischer Wachstumsfaktoren im PVAT im Rahmen einer atherosklerotisch veränderten Gefäßwand belegt. Darüber hinaus zeigte das C-PVAT ein höheres Ausmaß an Merkmalen eines inflammatorischen Zustands. Hinweise dafür wurden in der größeren Besiedelung an Makrophagen und des größeren Anteils an Fibrose des Gewebes pro berechneter Fläche des C-PVAT festgestellt. Zwar konnte beim dysfunktional veränderten C-PVAT ein ausgedehntes und aufgebautes Lymphgefäßsystem im Vergleich zum gesunden PVAT nachgewiesen werden, jedoch ließen sich daraus keine Hinweise über die Funktionsfähigkeit der Lymphgefäße entnehmen.

Die Endpunkte dieser klinisch-experimentellen Studie erlauben die Annahme, dass das Lymphgefäßsystem im PVAT unter dem Einfluss des bidirektionalen Signalweges zwischen PVAT und der Gefäßwand der Koronararterien steht. Sie erlauben allerdings keine Aussage über die genaue Funktion des Lymphgefäßsystem innerhalb von PVAT in der Pathogenese der Atherosklerose in den Koronargefäßen.

8. Literaturverzeichnis

Literatur

1. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. J Am Coll Cardiol 2020; 76(25):2982–3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.
2. Zaninotto P, Sacker A, Breeze E, McMunn A, Steptoe A. Gender-specific changes in well-being in older people with coronary heart disease: evidence from the English Longitudinal Study of Ageing. Aging Ment Health 2016; 20(4):432–40. doi: 10.1080/13607863.2015.1020410.
3. Khan MA, Hashim MJ, Mustafa H, Baniyas MY, Al Suwaidi SKBM, AlKatheeri R et al. Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. Cureus 2020; 12(7):e9349. doi: 10.7759/cureus.9349.
4. 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. doi: 10.1093/eurheartj/ehw334.
5. Lima EG, Charytan DM, Hueb W, Azevedo DFC de, Garzillo CL, Favarato D et al. Long-term outcomes of patients with stable coronary disease and chronic kidney dysfunction: 10-year follow-up of the Medicine, Angioplasty, or Surgery Study II Trial. Nephrol Dial Transplant 2020; 35(8):1369–76. doi: 10.1093/ndt/gfy379.
6. Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. Clin Exp Hypertens A 1991; 13(2):277–96. doi: 10.3109/10641969109042063.
7. Kim HW, Shi H, Winkler MA, Lee R, Weintraub NL. Perivascular Adipose Tissue and Vascular Perturbation/Atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2020; 40(11):2569–76. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.312470.
8. Ahmadieh S, Kim HW, Weintraub NL. Potential role of perivascular adipose tissue in modulating atherosclerosis. Clin Sci (Lond) 2020; 134(1):3–13. doi: 10.1042/CS20190577.
9. Tanaka K, Sata M. Roles of Perivascular Adipose Tissue in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Front Physiol 2018; 9:3. doi: 10.3389/fphys.2018.00003.
10. Lin A, Dey D, Wong DTL, Nerlekar N. Perivascular Adipose Tissue and Coronary Atherosclerosis: from Biology to Imaging Phenotyping. Curr Atheroscler Rep 2019; 21(12):47. doi: 10.1007/s11883-019-0817-3.

11. Otsuka F, Yahagi K, Sakakura K, Virmani R. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? Ann Cardiothorac Surg 2013; 2(4):519–26. doi: 10.3978/j.issn.2225-319X.2013.07.06.

12. Sims FH. Discontinuities in the internal elastic lamina: a comparison of coronary and internal mammary arteries. Artery 1985; 13(3):127–43.

13. Drozdz K, Janczak D, Dziegiel P, Podhorska M, Patrzałek D, Ziółkowski P et al. Adventitial lymphatics of internal carotid artery in healthy and atherosclerotic vessels. Folia Histochem Cytobiol 2008; 46(4):433–6. doi: 10.2478/v10042-008-0083-7.

14. Levick JR, Michel CC. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. Cardiovasc Res 2010; 87(2):198–210. doi: 10.1093/cvr/cvq062.

15. Breslin JW, Yang Y, Scallan JP, Sweat RS, Adderley SP, Murfee WL. Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology. Compr Physiol 2018; 9(1):207–99. doi: 10.1002/cphy.c180015.

16. Huang L-H, Elvington A, Randolph GJ. The role of the lymphatic system in cholesterol transport. Front Pharmacol 2015; 6:182. doi: 10.3389/fphar.2015.00182.

17. Randolph GJ, Ivanov S, Zinselmeyer BH, Scallan JP. The Lymphatic System: Integral Roles in Immunity. Annu Rev Immunol 2017; 35:31–52. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055354.

18. Xu X, Lu H, Lin H, Li X, Ni M, Sun H et al. Aortic adventitial angiogenesis and lymphangiogenesis promote intimal inflammation and hyperplasia. Cardiovasc Pathol 2009; 18(5):269–78. doi: 10.1016/j.carpath.2008.07.004.

19. Lim HY, Thiam CH, Yeo KP, Bisoendial R, Hii CS, McGrath KCY et al. Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues by SR-BI-mediated transport of HDL. Cell Metab 2013; 17(5):671–84. doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.002.

20. Martel C, Li W, Fulp B, Platt AM, Gautier EL, Westerterp M et al. Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice. J Clin Invest 2013; 123(4):1571–9. doi: 10.1172/JCI63685.

21. Eliska O, Eliskova M, Miller AJ. The absence of lymphatics in normal and atherosclerotic coronary arteries in man: a morphologic study. Lymphology 2006; 39(2):76–83.

22. Jellinek H, Detre Z. Role of the altered transmural permeability in the pathomechanism of arteriosclerosis. In 2 parts. Part I. Pathology - Research and Practice 1986; 181(6):693–712. doi: 10.1016/S0344-0338(86)80045-0.

23. Johnson RA. Lymphatics of blood vessels. Lymphology 1969; 2(2):44–56.

24. Nakata Y, Shionoya S. Structure of lymphatics in the aorta and the periaortic tissues, and vascular lesions caused by disturbance of the lymphatics. Lymphology 1979; 12(1):18–9.

25. Milasan A, Jean G, Dallaire F, Tardif J-C, Merhi Y, Sorci-Thomas M et al. Apolipoprotein A-I Modulates Atherosclerosis Through Lymphatic Vessel-Dependent Mechanisms in Mice. J Am Heart Assoc 2017; 6(9). doi: 10.1161/JAHA.117.006892.

26. WHO Europe. Cardiovascular Disease: Data and Statistic: World Health Organisation Regional Office for Europe.

27. Wang T, Butany J. Pathogenesis of atherosclerosis. Diagnostic Histopathology 2017; 23(11):473–8. doi: 10.1016/j.mpdhp.2017.11.009.

28. Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, Hernández-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R et al. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. Arch Med Res 2015; 46(5):328–38. doi: 10.1016/j.arcmed.2015.06.006.

29. Peter Libby. Harrison's principles of internal medicine: The Pathogenesis of Atherosclerosis. New York (N.Y.): McGraw-Hill, medical Publishing division; 2001.

30. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. J Am Coll Cardiol 2009; 54(23):2129–38. doi: 10.1016/j.jacc.2009.09.009.

31. Tabas I, García-Cardeña G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. J Cell Biol 2015; 209(1):13–22. doi: 10.1083/jcb.201412052.

32. Leena Hajra, Andrew I. Evans, Mian Chen, Sharon J. Hyduk, Tucker Collins, and Myron I. Cybulsky. The NFk B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formatio. PNAS 2000; (97):9052–7. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.9052.

33. Gareus R, Kotsaki E, Xanthoulea S, van der Made I, Gijbels MJJ, Kardakaris R et al. Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. Cell Metab 2008; 8(5):372–83. doi: 10.1016/j.cmet.2008.08.016.

34. S. Mohan, N. Mohan, and E. A. Sprague. Differential activation of NF-kappa B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments. American Journal of Physiology- Cell Physiology 1997; (273):C572-C578. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.273.2.C572.

35. Zmysłowski A, Szterk A. Current knowledge on the mechanism of atherosclerosis and pro-atherosclerotic properties of oxysterols. Lipids Health Dis 2017; 16(1):188. doi: 10.1186/s12944-017-0579-2.

36. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. Nature 2005; 437(7057):426–31. doi: 10.1038/nature03952.

37. Pérez L, Muñoz-Durango N, Riedel CA, Echeverría C, Kalergis AM, Cabello-Verrugio C et al. Endothelial-to-mesenchymal transition: Cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions. Cytokine Growth Factor Rev 2017; 33:41–54. doi: 10.1016/j.cytogfr.2016.09.002.

38. Fang Y, Shi C, Manduchi E, Civelek M, Davies PF. MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(30):13450–5. doi: 10.1073/pnas.1002120107.

39. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. J Clin Invest 1996; 97(7):1715–22. doi: 10.1172/JCI118598.

40. Ting LH, Jahn JR, Jung JI, Shuman BR, Feghhi S, Han SJ et al. Flow mechanotransduction regulates traction forces, intercellular forces, and adherens junctions. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2012; 302(11):H2220-9. doi: 10.1152/ajpheart.00975.2011.

41. Nielsen LB. Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. Atherosclerosis 1996; 123(1-2):1–15. doi: 10.1016/0021-9150(96)05802-9.

42. Fogelstrand P, Borén J. Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2012; 22(1):1–7. doi: 10.1016/j.numecd.2011.09.007.

43. Guzik TJ, Sadowski J, Guzik B, Jopek A, Kapelak B, Przybylowski P et al. Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26(2):333–9. doi: 10.1161/01.ATV.0000196651.64776.51.

44. Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. J Clin Invest 1997; 99(9):2075–81.

45. Yang Y, Shi R, Cao Z, Zhang G, Cheng G. VPO1 mediates oxidation of LDL and formation of foam cells. Oncotarget 2016; 7(24):35500–11. doi: 10.18632/oncotarget.9193.

46. Hurtubise J, McLellan K, Durr K, Onasanya O, Nwabuko D, Ndisang JF. The Different Facets of Dyslipidemia and Hypertension in Atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep 2016; 18(12):82. doi: 10.1007/s11883-016-0632-z.

47. Abdo AI, Rayner BS, van Reyk DM, Hawkins CL. Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase oxidants induces endothelial dysfunction. Redox Biol 2017; 13:623–32. doi: 10.1016/j.redox.2017.08.004.

48. Zhang F, Wang C, Wang H, Lu M, Li Y, Feng H et al. Ox-LDL promotes migration and adhesion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via regulation of MCP-1 expression. Mediators Inflamm 2013; 2013:691023. doi: 10.1155/2013/691023.

49. Bekkering S, Quintin J, Joosten LAB, van der Meer JWM, Netea MG, Riksen NP. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; 34(8):1731–8. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303887.

50. Kiyan Y, Tkachuk S, Hilfiker-Kleiner D, Haller H, Fuhrman B, Dumler I. oxLDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4. J Mol Cell Cardiol 2014; 66:72–82. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.11.005.

51. Guedj K, Khallou-Laschet J, Clement M, Morvan M, Delbosc S, Gaston A-T et al. Inflammatory micro-environmental cues of human atherothrombotic arteries confer to vascular smooth muscle cells the capacity to trigger lymphoid neogenesis. PLoS ONE 2014:e116295. doi: 10.1371/journal.pone.0116295.

52. Gräbner R, Lötzer K, Döpping S, Hildner M, Radke D, Beer M et al. Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE-/- mice. J Exp Med 2009:233–48. doi: 10.1084/jem.20080752.

53. Lötzer K, Döpping S, Connert S, Gräbner R, Spanbroek R, Lemser B et al. Mouse aorta smooth muscle cells differentiate into lymphoid tissue organizer-like cells on combined tumor necrosis factor receptor-1/lymphotoxin beta-receptor NF-kappaB signaling. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010:395–402. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.191395.

54. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005:2054–61. doi: 10.1161/01.ATV.0000178991.71605.18.

55. Langheinrich AC, Kampschulte M, Scheiter F, Dierkes C, Stieger P, Bohle RM et al. Atherosclerosis, inflammation and lipoprotein glomerulopathy in kidneys of apoE-/-/LDL-/- double knockout mice. BMC Nephrol 2010:18. doi: 10.1186/1471-2369-11-18.

56. Fleiner M, Kummer M, Mirlacher M, Sauter G, Cathomas G, Krapf R et al. Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic atherosclerosis. Circulation 2004; 110(18):2843–50. doi: 10.1161/01.CIR.0000146787.16297.E8.

57. Sedding DG, Boyle EC, Demandt JAF, Sluimer JC, Dutzmann J, Haverich A et al. Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease. Front Immunol 2018; 9:706. doi: 10.3389/fimmu.2018.00706.

58. Ito H, Wakatsuki T, Yamaguchi K, Fukuda D, Kawabata Y, Matsuura T et al. Atherosclerotic Coronary Plaque Is Associated With Adventitial Vasa Vasorum and Local Inflammation in Adjacent Epicardial Adipose Tissue in Fresh Cadavers. Circ J 2020:769–75. doi: 10.1253/circj.CJ-19-0914.

59. Libby P, Hansson GK. From Focal Lipid Storage to Systemic Inflammation: JACC Review Topic of the Week. J Am Coll Cardiol 2019; 74(12):1594–607. doi: 10.1016/j.jacc.2019.07.061.

60. Macarie RD, Vadana M, Ciortan L, Tucureanu MM, Ciobanu A, Vinereanu D et al. The expression of MMP-1 and MMP-9 is up-regulated by smooth muscle cells after their cross-talk with macrophages in high glucose conditions. J Cell Mol Med 2018:4366–76. doi: 10.1111/jcmm.13728.

61. Müller A, Krämer SD, Meletta R, Beck K, Selivanova SV, Rancic Z et al. Gene expression levels of matrix metalloproteinases in human atherosclerotic plaques and evaluation of radiolabeled inhibitors as imaging agents for plaque vulnerability. Nucl Med Biol 2014:562–9. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2014.04.085.

62. Jager NA, Wallis de Vries BM, Hillebrands J-L, Harlaar NJ, Tio RA, Slart RHJA et al. Distribution of Matrix Metalloproteinases in Human Atherosclerotic Carotid Plaques and Their Production by Smooth Muscle Cells and Macrophage Subsets. Mol Imaging Biol 2016; 18(2):283–91. doi: 10.1007/s11307-015-0882-0.

63. Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. Circulation 1997; 96(2):396–9. doi: 10.1161/01.CIR.96.2.396.

64. Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billinghurst RC et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. Circulation 1999; 99(19):2503–9. doi: 10.1161/01.cir.99.19.2503.

65. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. N Engl J Med 2013; 368(21):2004–13. doi: 10.1056/NEJMra1216063.

66. WHO. Hypertension: WHO; 2019. Verfügbar unter: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension.

67. Terentes-Printzios D, Vlachopoulos C, Xaplanteris P, Ioakeimidis N, Aznaouridis K, Baou K et al. Cardiovascular Risk Factors Accelerate Progression of Vascular Aging in the General Population: Results From the CRAVE Study (Cardiovascular Risk Factors Affecting Vascular Age). Hypertension 2017; 70(5):1057–64. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09633.

68. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. The Lancet 2004; 364(9438):937–52. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17018-9.

69. Nakanishi R, Baskaran L, Gransar H, Budoff MJ, Achenbach S, Al-Mallah M et al. Relationship of Hypertension to Coronary Atherosclerosis and Cardiac Events in Patients With Coronary Computed Tomographic Angiography. Hypertension 2017; 70(2):293–9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09402.

70. Zeiher AM, Schächinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. Circulation 1995; 92(5):1094–100. doi: 10.1161/01.CIR.92.5.1094.

71. Lanza GA, Spera FR, Villano A, Russo G, Di Franco A, Lamendola P et al. Effect of smoking on endothelium-independent vasodilatation. Atherosclerosis 2015; 240(2):330–2. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.041.

72. Cui M, Cui R, Liu K, Dong J-Y, Imano H, Hayama-Terada M et al. Associations of Tobacco Smoking with Impaired Endothelial Function: The Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). J Atheroscler Thromb 2018; 25(9):836–45. doi: 10.5551/jat.42150.

73. Chalon S, Moreno H, Benowitz NL, Hoffman BB, Blaschke TF. Nicotine impairs endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. Clin Pharmacol Ther 2000; 67(4):391–7. doi: 10.1067/mcp.2000.105153.

74. McEvoy JW, Nasir K, DeFilippis AP, Lima JAC, Bluemke DA, Hundley WG et al. Relationship of cigarette smoking with inflammation and subclinical vascular disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2015; 35(4):1002–10. doi: 10.1161/ ATVBAHA.114.304960.

75. Giunzioni I, Bonomo A, Bishop E, Castiglioni S, Corsini A, Bellosta S. Cigarette smoke condensate affects monocyte interaction with endothelium. Atherosclerosis 2014; 234(2):383–90. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.029.

76. Heitzer T, Ylä-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Münzel T, Just H et al. Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL. Circulation 1996; 93(7):1346–53. doi: 10.1161/01.CIR.93.7.1346.

77. Oliveira OMMF, Brunetti IL, Khalil NM. Nicotine-enhanced oxidation of low-density lipoprotein and its components by myeloperoxidase/H_2O_2/Cl- system. An Acad Bras Cienc 2015; 87(1):183–92. doi: 10.1590/0001-3765201520140156.

78. Lowery CL, Elliott C, Cooper A, Hadden C, Sonon RN, Azadi P et al. Cigarette Smoking-Associated Alterations in Serotonin/Adrenalin Signaling Pathways of Platelets. J Am Heart Assoc 2017; 6(5). doi: 10.1161/JAHA.116.005465.

79. Hung J, Lam JY, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. Circulation 1995; 92(9):2432–6. doi: 10.1161/01.CIR.92.9.2432.

80. Fusegawa Y, Handa S. Platelet aggregation induced by ADP or epinephrine is enhanced in habitual smokers. Thromb Res 2000; 97(5):287–95. doi: 10.1016/s0049-3848(99)00137-1.

81. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. Eur Heart J 2019. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455.

82. Pascual Fuster V. Pharmacological management of dyslipidemia in high and very high cardiovascular risk patients. Rev Esp Sanid Penit 2016; 18(3):95–108. doi: 10.4321/S1575-06202016000300004.

83. Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S et al. Diagnostic criteria for dyslipidemia. J Atheroscler Thromb 2013; 20(8):655–60. doi: 10.5551/jat.17152.

84. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. J Lipid Res 2002; 43(9):1363–79. doi: 10.1194/jlr.R200004-JLR200.

85. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. Circulation 2007; 116(16):1832–44. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890.

86. Proctor SD, Vine DF, Mamo JCL. Arterial permeability and efflux of apolipoprotein B-containing lipoproteins assessed by in situ perfusion and three-dimensional quantitative confocal microscopy. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004; 24(11):2162–7. doi: 10.1161/01.ATV.0000143859.75035.5a.

87. Ference BA, Graham I, Tokgozoglu L, Catapano AL. Reprint of: Impact of Lipids on Cardiovascular Health: JACC Health Promotion Series. J Am Coll Cardiol 2018; 72(23 Pt B):2980–95. doi: 10.1016/j.jacc.2018.10.021.

88. Sarwar N, Gao P, Seshasai SRK, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. Lancet 2010; 375(9733):2215–22. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60484-9.

89. van Sloten TT, Henry RMA, Dekker JM, Nijpels G, Unger T, Schram MT et al. Endothelial dysfunction plays a key role in increasing cardiovascular risk in type 2 diabetes: the Hoorn study. Hypertension 2014; 64(6):1299–305. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04221.

90. Idris-Khodja N, Ouerd S, Mian MOR, Gornitsky J, Barhoumi T, Paradis P et al. Endothelin-1 Overexpression Exaggerates Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction by Altering Oxidative Stress. Am J Hypertens 2016; 29(11):1245–51. doi: 10.1093/ajh/hpw078.

91. Headley CA, DiSilvestro D, Bryant KE, Hemann C, Chen C-A, Das A et al. Nitrones reverse hyperglycemia-induced endothelial dysfunction in bovine aortic endothelial cells. Biochem Pharmacol 2016; 104:108–17. doi: 10.1016/j.bcp.2016.01.005.

92. Pahwa R, Nallasamy P, Jialal I. Toll-like receptors 2 and 4 mediate hyperglycemia induced macrovascular aortic endothelial cell inflammation and perturbation of the endothelial glycocalyx. J Diabetes Complicat 2016; 30(4):563–72. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.01.014.

93. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. Circulation 1983; 67(5):968–77. doi: 10.1161/01.cir.67.5.968.

94. Britton KA, Massaro JM, Murabito JM, Kreger BE, Hoffmann U, Fox CS. Body fat distribution, incident cardiovascular disease, cancer, and all-cause mortality. J Am Coll Cardiol 2013; 62(10):921–5. doi: 10.1016/j.jacc.2013.06.027.

95. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. JAMA 1999; 282(22):2131–5. doi: 10.1001/jama.282.22.2131.

96. Mendall MA, Patel P, Ballam L, Strachan D, Northfield TC. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study. BMJ 1996; 312(7038):1061–5. doi: 10.1136/bmj.312.7038.1061.

97. Weyer C, Yudkin JS, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG, Pratley RE, Tataranni PA. Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians. Atherosclerosis 2002; 161(1):233–42. doi: 10.1016/s0021-9150(01)00626-8.

98. Valerio A, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Pisconti A et al. TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. J Clin Invest 2006; 116(10):2791–8. doi: 10.1172/JCI28570.

99. Virdis A. Endothelial Dysfunction in Obesity: Role of Inflammation. High Blood Press Cardiovasc Prev 2016; 23(2):83–5. doi: 10.1007/s40292-016-0133-8.

100. Gamez-Mendez AM, Vargas-Robles H, Ríos A, Escalante B. Oxidative Stress-Dependent Coronary Endothelial Dysfunction in Obese Mice. PLoS ONE 2015; 10(9):e0138609. doi: 10.1371/journal.pone.0138609.

101. Brook RD, Bard RL, Rubenfire M, Ridker PM, Rajagopalan S. Usefulness of visceral obesity (waist/hip ratio) in predicting vascular endothelial function in healthy overweight adults. Am J Cardiol 2001; 88(11):1264–9. doi: 10.1016/s0002-9149(01)02088-4.

102. Virdis A, Masi S, Colucci R, Chiriacò M, Uliana M, Puxeddu I et al. Microvascular Endothelial Dysfunction in Patients with Obesity. Curr Hypertens Rep 2019; 21(4):32. doi: 10.1007/s11906-019-0930-2.

103. Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. J Clin Invest 1996; 97(1):37–46. doi: 10.1172/JCI118404.

104. Lallukka S, Luukkonen PK, Zhou Y, Isokuortti E, Leivonen M, Juuti A et al. Obesity/insulin resistance rather than liver fat increases coagulation factor activities and expression in humans. Thromb Haemost 2017; 117(2):286–94. doi: 10.1160/TH16-09-0716.

105. Samad F, Pandey M, Loskutoff DJ. Tissue factor gene expression in the adipose tissues of obese mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(13):7591–6. doi: 10.1073/pnas.95.13.7591.

106. Barrachina MN, Sueiro AM, Izquierdo I, Hermida-Nogueira L, Guitián E, Casanueva FF et al. GPVI surface expression and signalling pathway activation are increased in platelets from obese patients: Elucidating potential anti-atherothrombotic targets in obesity. Atherosclerosis 2019; 281:62–70. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.023.

107. Davì G, Guagnano MT, Ciabattoni G, Basili S, Falco A, Marinopiccoli M et al. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. JAMA 2002; 288(16):2008–14. doi: 10.1001/jama.288.16.2008.

108. Siegel-Axel DI, Häring HU. Perivascular adipose tissue: An unique fat compartment relevant for the cardiometabolic syndrome. Rev Endocr Metab Disord 2016; 17(1):51–60. doi: 10.1007/s11154-016-9346-3.

109. Szasz T, Bomfim GF, Webb RC. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. Vasc Health Risk Manag 2013; 9:105–16. doi: 10.2147/VHRM.S33760.

110. Gil A, Olza J, Gil-Campos M, Gomez-Llorente C, Aguilera CM. Is adipose tissue metabolically different at different sites? Int J Pediatr Obes 2011; 6 Suppl 1:13–20. doi: 10.3109/17477166.2011.604326.

111. Nagano G, Ohno H, Oki K, Kobuke K, Shiwa T, Yoneda M et al. Activation of classical brown adipocytes in the adult human perirenal depot is highly correlated with PRDM16-EHMT1 complex expression. PLoS ONE 2015; 10(3):e0122584. doi: 10.1371/journal.pone.0122584.

112. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007; 293(2):E444-52. doi: 10.1152/ajpendo.00691.2006.

113. Fitzgibbons TP, Kogan S, Aouadi M, Hendricks GM, Straubhaar J, Czech MP. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011; 301(4):H1425-37. doi: 10.1152/ajpheart.00376.2011.

114. Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2013; 304(7):R543-52. doi: 10.1152/ajpregu.00567.2012.

115. Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. Circ Res 2009; 104(4):541–9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.182998.

116. Chatterjee TK, Aronow BJ, Tong WS, Manka D, Tang Y, Bogdanov VY et al. Human coronary artery perivascular adipocytes overexpress genes responsible for regulating vascular morphology, inflammation, and hemostasis. Physiol Genomics 2013; 45(16):697–709. doi: 10.1152/physiolgenomics.00042.2013.

117. Pan X-X, Ruan C-C, Liu X-Y, Kong L-R, Ma Y, Wu Q-H et al. Perivascular adipose tissue-derived stromal cells contribute to vascular remodeling during aging. Aging Cell 2019; 18(4):e12969. doi: 10.1111/acel.12969.

118. Nosalski R, Guzik TJ. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. Br J Pharmacol 2017; 174(20):3496–513. doi: 10.1111/bph.13705.

119. Takaoka M, Suzuki H, Shioda S, Sekikawa K, Saito Y, Nagai R et al. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010; 30(8):1576–82. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207175.

120. Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. Clin Sci (Lond) 2012; 122(1):1–12. doi: 10.1042/CS20110151.

121. Hildebrand S, Stümer J, Pfeifer A. PVAT and Its Relation to Brown, Beige, and White Adipose Tissue in Development and Function. Front Physiol 2018; 9:70. doi: 10.3389/fphys.2018.00070.

122. Mancio J, Oikonomou EK, Antoniades C. Perivascular adipose tissue and coronary atherosclerosis. Heart 2018; 104(20):1654–62. doi: 10.1136/heartjnl-2017-312324.

123. Fitzgibbons TP, Czech MP. Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations. J Am Heart Assoc 2014; 3(2):e000582. doi: 10.1161/JAHA.113.000582.

124. Almabrouk TAM, Ugusman AB, Katwan OJ, Salt IP, Kennedy S. Deletion of AMPKα1 attenuates the anticontractile effect of perivascular adipose tissue (PVAT) and reduces adiponectin release. Br J Pharmacol 2017; 174(20):3398–410. doi: 10.1111/bph.13633.

125. Löhn M, Dubrovska G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. FASEB J 2002; 16(9):1057–63. doi: 10.1096/fj.02-0024com.

126. Margaritis M, Antonopoulos AS, Digby J, Lee R, Reilly S, Coutinho P et al. Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin

in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. Circulation 2013; 127(22):2209–21. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001133.

127. Antonopoulos AS, Sanna F, Sabharwal N, Thomas S, Oikonomou EK, Herdman L et al. Detecting human coronary inflammation by imaging perivascular fat. Sci Transl Med 2017; 9(398). doi: 10.1126/scitranslmed.aal2658.

128. Costa RM, Neves KB, Tostes RC, Lobato NS. Perivascular Adipose Tissue as a Relevant Fat Depot for Cardiovascular Risk in Obesity. Front Physiol 2018; 9:253. doi: 10.3389/fphys.2018.00253.

129. Ruan C-C, Ma Y, Ge Q, Li Y, Zhu L-M, Zhang Y et al. Complement-mediated inhibition of adiponectin regulates perivascular inflammation and vascular injury in hypertension. FASEB J 2017; 31(3):1120–9. doi: 10.1096/fj.201600780R.

130. Azul L, Leandro A, Boroumand P, Klip A, Seiça R, Sena CM. Increased inflammation, oxidative stress and a reduction in antioxidant defense enzymes in perivascular adipose tissue contribute to vascular dysfunction in type 2 diabetes. Free Radic Biol Med 2020; 146:264–74. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.002.

131. Antonopoulos AS, Margaritis M, Coutinho P, Shirodaria C, Psarros C, Herdman L et al. Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NADPH oxidase activity in the human arterial wall: the regulatory role of perivascular adipose tissue. Diabetes 2015; 64(6):2207–19. doi: 10.2337/db14-1011.

132. DeVallance E, Branyan KW, Lemaster K, Olfert IM, Smith DM, Pistilli EE et al. Aortic dysfunction in metabolic syndrome mediated by perivascular adipose tissue TNFα- and NOX2-dependent pathway. Exp Physiol 2018; 103(4):590–603. doi: 10.1113/EP086818.

133. Mikolajczyk TP, Nosalski R, Szczepaniak P, Budzyn K, Osmenda G, Skiba D et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. FASEB J 2016; 30(5):1987–99. doi: 10.1096/fj.201500088R.

134. Guzik TJ, Marvar PJ, Czesnikiewicz-Guzik M, Korbut R. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. J Physiol Pharmacol 2007; 58(4):591–610.

135. Fernández-Alfonso MS, Gil-Ortega M, García-Prieto CF, Aranguez I, Ruiz-Gayo M, Somoza B. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. Int J Endocrinol 2013; 2013:402053. doi: 10.1155/2013/402053.

136. Meijer RI, Bakker W, Alta C-LAF, Sipkema P, Yudkin JS, Viollet B et al. Perivascular adipose tissue control of insulin-induced vasoreactivity in muscle is impaired in db/db mice. Diabetes 2013; 62(2):590–8. doi: 10.2337/db11-1603.

137. da Costa RM, Fais RS, Dechandt CRP, Louzada-Junior P, Alberici LC, Lobato NS et al. Increased mitochondrial ROS generation mediates the loss of the anti-contractile effects of perivascular adipose tissue in high-fat diet obese mice. Br J Pharmacol 2017; 174(20):3527–41. doi: 10.1111/bph.13687.

138. Cybularz M, Langbein H, Zatschler B, Brunssen C, Deussen A, Matschke K et al. Endothelial function and gene expression in perivascular adipose tissue from internal mammary arteries of obese patients with coronary artery disease. Atheroscler Suppl 2017; 30:149–58. doi: 10.1016/j.atherosclerosissup.2017.05.042.

139. Verhagen SN, Vink A, van der Graaf Y, Visseren FLJ. Coronary perivascular adipose tissue characteristics are related to atherosclerotic plaque size and composition. A post-mortem study. Atherosclerosis 2012; 225(1):99–104. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.031.

140. Galkina E, Kadl A, Sanders J, Varughese D, Sarembock IJ, Ley K. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. J Exp Med 2006; 203(5):1273–82. doi: 10.1084/jem.20052205.

141. Skiba DS, Nosalski R, Mikolajczyk TP, Siedlinski M, Rios FJ, Montezano AC et al. Anti-atherosclerotic effect of the angiotensin 1-7 mimetic AVE0991 is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis. Br J Pharmacol 2017; 174(22):4055–69. doi: 10.1111/bph.13685.

142. Okamoto E, Couse T, Leon H de, Vinten-Johansen J, Goodman RB, Scott NA et al. Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries. Circulation 2001; 104(18):2228–35. doi: 10.1161/hc4301.097195.

143. Kim S, Lee E-S, Lee S-W, Kim Y-H, Lee C-H, Jo D-G et al. Site-specific impairment of perivascular adipose tissue on advanced atherosclerotic plaques using multimodal nonlinear optical imaging. Proc Natl Acad Sci U S A 2019; 116(36):17765–74. doi: 10.1073/pnas.1902007116.

144. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). Annu Rev Immunol 2009; 27:165–97. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132620.

145. Aghamohammadzadeh R, Withers S, Lynch F, Greenstein A, Malik R, Heagerty A. Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence

of a new pharmacotherapeutic target. Br J Pharmacol 2012; 165(3):670–82. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01479.x.

146. Zhu X, Zhang H-W, Chen H-N, Deng X-J, Tu Y-X, Jackson AO et al. Perivascular adipose tissue dysfunction aggravates adventitial remodeling in obese mini pigs via NLRP3 inflammasome/IL-1 signaling pathway. Acta Pharmacol Sin 2019; 40(1):46–54. doi: 10.1038/s41401-018-0068-9.

147. van Hinsbergh VWM, Eringa EC, Daemen MJAP. Neovascularization of the atherosclerotic plaque: interplay between atherosclerotic lesion, adventitia-derived microvessels and perivascular fat. Curr Opin Lipidol 2015; 26(5):405–11. doi: 10.1097/MOL.0000000000000210.

148. Sluimer JC, Gasc J-M, 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. doi: 10.1016/j.jacc.2007.12.025.

149. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. Circulation 1998; 98(20):2108–16. doi: 10.1161/01.cir.98.20.2108.

150. Gössl M, Herrmann J, Tang H, Versari D, Galili O, Mannheim D et al. Prevention of vasa vasorum neovascularization attenuates early neointima formation in experimental hypercholesterolemia. Basic Res Cardiol 2009; 104(6):695–706. doi: 10.1007/s00395-009-0036-0.

151. Tanaka K, Nagata D, Hirata Y, Tabata Y, Nagai R, Sata M. Augmented angiogenesis in adventitia promotes growth of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-deficient mice. Atherosclerosis 2011; 215(2):366–73. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.016.

152. Drosos I, Chalikias G, Pavlaki M, Kareli D, Epitropou G, Bougioukas G et al. Differences between perivascular adipose tissue surrounding the heart and the internal mammary artery: possible role for the leptin-inflammation-fibrosis-hypoxia axis. Clin Res Cardiol 2016; 105(11):887–900. doi: 10.1007/s00392-016-0996-7.

153. Heriansyah T, Nafisatuzzamrudah N, Aini FN, Ridwan M, Primardhika RF, Wijayanti M et al. Reduction in Vasa Vasorum Angiogenesis by Lp-PLA2 Selective Inhibitor Through The HIF-1α and VEGF Expression Under Dyslipidemic Conditions in Atherosclerosis Pathogenesis. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem 2018; 16(2):114–9. doi: 10.2174/1871525716666181105151429.

154. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2016; 17(10):611–25. doi: 10.1038/nrm.2016.87.

155. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Exp Cell Res 2006; 312(5):549–60. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012.

156. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature 1996; 380(6573):435–9. doi: 10.1038/380435a0.

157. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature 1996; 380(6573):439–42. doi: 10.1038/380439a0.

158. Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(4):1076–81. doi: 10.1073/pnas.0404984102.

159. Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P et al. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. EMBO J 2005; 24(13):2342–53. doi: 10.1038/sj.emboj.7600709.

160. Karaman S, Leppänen V-M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. Development 2018; 145(14). doi: 10.1242/dev.151019.

161. Zhang Q, Lu S, Li T, Yu L, Zhang Y, Zeng H et al. ACE2 inhibits breast cancer angiogenesis via suppressing the VEGFa/VEGFR2/ERK pathway. J Exp Clin Cancer Res 2019; 38(1):173. doi: 10.1186/s13046-019-1156-5.

162. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K et al. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. J Biol Chem 2003; 278(4):2461–8. doi: 10.1074/jbc.M209033200.

163. Chen Y, Zheng Y, Liu L, Lin C, Liao C, Xin L et al. Adiponectin Inhibits TNF-α-Activated PAI-1 Expression Via the cAMP-PKA-AMPK-NF-κB Axis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Cell Physiol Biochem 2017; 42(6):2342–52. doi: 10.1159/000480006.

164. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. Circulation 1999; 100(25):2473–6. doi: 10.1161/01.cir.100.25.2473.

165. Wang Y, Wang X, Lau WB, Yuan Y, Booth D, Li J-J et al. Adiponectin inhibits tumor necrosis factor-α-induced vascular inflammatory response via caveolin-mediated ceramidase recruitment and activation. Circ Res 2014; 114(5):792–805. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302439.

166. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. Biochem Biophys Res Commun 2004; 323(2):630–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.145.

167. Yamaguchi N, Argueta JGM, Masuhiro Y, Kagishita M, Nonaka K, Saito T et al. Adiponectin inhibits Toll-like receptor family-induced signaling. FEBS Lett 2005; 579(30):6821–6. doi: 10.1016/j.febslet.2005.11.019.

168. Baltieri N, Guizoni DM, Victorio JA, Davel AP. Protective Role of Perivascular Adipose Tissue in Endothelial Dysfunction and Insulin-Induced Vasodilatation of Hypercholesterolemic LDL Receptor-Deficient Mice. Front Physiol 2018; 9:229. doi: 10.3389/fphys.2018.00229.

169. Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, Sonoyama K, Clancy O, Jeziorska M et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. Circulation 2009; 119(12):1661–70. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821181.

170. Akoumianakis I, Antoniades C. The interplay between adipose tissue and the cardiovascular system: is fat always bad? Cardiovasc Res 2017; 113(9):999–1008. doi: 10.1093/cvr/cvx111.

171. Kleinridders A, Lauritzen HPMM, Ussar S, Christensen JH, Mori MA, Bross P et al. Leptin regulation of Hsp60 impacts hypothalamic insulin signaling. J Clin Invest 2013; 123(11):4667–80. doi: 10.1172/JCI67615.

172. Pérez C, Fernández-Galaz C, Fernández-Agulló T, Arribas C, Andrés A, Ros M et al. Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. Diabetes 2004; 53(2):347–53. doi: 10.2337/diabetes.53.2.347.

173. Arnalich F, López J, Codoceo R, Jim nez M, Madero R, Montiel C. Relationship of plasma leptin to plasma cytokines and human survivalin sepsis and septic shock. J Infect Dis 1999; 180(3):908–11. doi: 10.1086/314963.

174. Landman RE, Puder JJ, Xiao E, Freda PU, Ferin M, Wardlaw SL. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(3):1285–91. doi: 10.1210/jc.2002-021393.

175. Rafail S, Ritis K, Schaefer K, Kourtzelis I, Speletas M, Doumas M et al. Leptin induces the expression of functional tissue factor in human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells through JAK2-dependent mechanisms and TNFalpha involvement. Thromb Res 2008; 122(3):366–75. doi: 10.1016/j.thromres.2007.12.018.

176. Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ et al. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. J Exp Med 1997; 185(1):171–5. doi: 10.1084/jem.185.1.171.

177. Sun C, Wang Z, Tian J-W, Wang Y-H. Leptin-induced inflammation by activating IL-6 expression contributes to the fibrosis and hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis. Biosci Rep 2018; 38(2). doi: 10.1042/BSR20171214.

178. Srikanthan K, Feyh A, Visweshwar H, Shapiro JI, Sodhi K. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. Int J Med Sci 2016; 13(1):25–38. doi: 10.7150/ijms.13800.

179. Ekmen N, Helvaci A, Gunaldi M, Sasani H, Yildirmak ST. Leptin as an important link between obesity and cardiovascular risk factors in men with acute myocardial infarction. Indian Heart J 2016; 68(2):132–7. doi: 10.1016/j.ihj.2015.07.032.

180. Jamar G, Caranti DA, Cassia Cesar H de, Masquio DCL, Bandoni DH, Pisani LP. Leptin as a cardiovascular risk marker in metabolically healthy obese: Hyperleptinemia in metabolically healthy obese. Appetite 2017; 108:477–82. doi: 10.1016/j.appet.2016.11.013.

181. Gormez S, Demirkan A, Atalar F, Caynak B, Erdim R, Sozer V et al. Adipose tissue gene expression of adiponectin, tumor necrosis factor-α and leptin in metabolic syndrome patients with coronary artery disease. Intern Med 2011; 50(8):805–10. doi: 10.2169/internalmedicine.50.4753.

182. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. FASEB J 1999; 13(10):1231–8.

183. Hubert A, Bochenek ML, Schütz E, Gogiraju R, Münzel T, Schäfer K. Selective Deletion of Leptin Signaling in Endothelial Cells Enhances Neointima Formation and Phenocopies the Vascular Effects of Diet-Induced Obesity in Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2017; 37(9):1683–97. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309798.

184. Korda M, Kubant R, Patton S, Malinski T. Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2008; 295(4):H1514-21. doi: 10.1152/ajpheart.00479.2008.

185. Knudson JD, Dincer UD, Zhang C, Swafford AN, Koshida R, Picchi A et al. Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 289(1):H48-56. doi: 10.1152/ajpheart.01159.2004.

186. Konstantinides S, Schäfer K, Koschnick S, Loskutoff DJ. Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity. J Clin Invest 2001; 108(10):1533–40. doi: 10.1172/JCI13143.

187. Suzukawa M, Koketsu R, Baba S, Igarashi S, Nagase H, Yamaguchi M et al. Leptin enhances ICAM-1 expression, induces migration and cytokine synthesis, and prolongs survival of human airway epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2015; 309(8):L801-11. doi: 10.1152/ajplung.00365.2014.

188. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. Nat Rev Immunol 2015; 15(6):362–74. doi: 10.1038/nri3834.

189. Gane JM, Stockley RA, Sapey E. TNF-α Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF-α Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade In Vivo. J Immunol Res 2016; 2016:1079851. doi: 10.1155/2016/1079851.

190. Ma Y, Li L, Shao Y, Bai X, Bai T, Huang X. Methotrexate improves perivascular adipose tissue/endothelial dysfunction via activation of AMPK/eNOS pathway. Mol Med Rep 2017; 15(4):2353–9. doi: 10.3892/mmr.2017.6225.

191. Chen Y, Xu X, Zhang Y, Liu K, Huang F, Liu B et al. Diosgenin regulates adipokine expression in perivascular adipose tissue and ameliorates endothelial dysfunction via regulation of AMPK. J Steroid Biochem Mol Biol 2016; 155(Pt A):155–65. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.07.005.

192. Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2006; 291(4):R880-4. doi: 10.1152/ajpregu.00280.2006.

193. Aubin K, Safoine M, Proulx M, Audet-Casgrain M-A, Côté J-F, Têtu F-A et al. Characterization of In Vitro Engineered Human Adipose Tissues: Relevant Adipokine Secretion and Impact of TNF-α. PLoS ONE 2015; 10(9):e0137612. doi: 10.1371/journal.pone.0137612.

194. Hayashi Y, Murakami M, Kawamura R, Ishizaka R, Fukuta O, Nakashima M. CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis

leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. Stem Cell Res Ther 2015; 6:111. doi: 10.1186/s13287-015-0088-z.

195. Manka D, Chatterjee TK, Stoll LL, Basford JE, Konaniah ES, Srinivasan R et al. Transplanted perivascular adipose tissue accelerates injury-induced neointimal hyperplasia: role of monocyte chemoattractant protein-1. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; 34(8):1723–30. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303983.

196. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. J Biochem Mol Biol 2006; 39(5):469–78. doi: 10.5483/bmbrep.2006.39.5.469.

197. Lamers D, Schlich R, Greulich S, Sasson S, Sell H, Eckel J. Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells. J Cell Mol Med 2011; 15(5):1177–88. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01099.x.

198. Schlich R, Willems M, Greulich S, Ruppe F, Knoefel WT, Ouwens DM et al. VEGF in the crosstalk between human adipocytes and smooth muscle cells: depot-specific release from visceral and perivascular adipose tissue. Mediators Inflamm 2013; 2013:982458. doi: 10.1155/2013/982458.

199. Wiig H, Swartz MA. Interstitial fluid and lymph formation and transport: physiological regulation and roles in inflammation and cancer. Physiol Rev 2012; 92(3):1005–60. doi: 10.1152/physrev.00037.2011.

200. Dongaonkar RM, Laine GA, Stewart RH, Quick CM. Balance point characterization of interstitial fluid volume regulation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2009; 297(1):R6-16. doi: 10.1152/ajpregu.00097.2009.

201. Liao S, Weid PY von der. Lymphatic system: an active pathway for immune protection. Semin Cell Dev Biol 2015; 38:83–9. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.11.012.

202. Kataru RP, Jung K, Jang C, Yang H, Schwendener RA, Baik JE et al. Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. Blood 2009; 113(22):5650–9. doi: 10.1182/blood-2008-09-176776.

203. Natale G, Bocci G, Ribatti D. Scholars and scientists in the history of the lymphatic system. J Anat 2017; 231(3):417–29. doi: 10.1111/joa.12644.

204. Beerens M, Aranguren XL, Hendrickx B, Dheedene W, Dresselaers T, Himmelreich U et al. Multipotent Adult Progenitor Cells Support Lymphatic Regeneration at Multiple

Anatomical Levels during Wound Healing and Lymphedema. Sci Rep 2018; 8(1):3852. doi: 10.1038/s41598-018-21610-8.

205. Lee S-J, Park C, Lee JY, Kim S, Kwon PJ, Kim W et al. Generation of pure lymphatic endothelial cells from human pluripotent stem cells and their therapeutic effects on wound repair. Sci Rep 2015; 5:11019. doi: 10.1038/srep11019.

206. Kim H, Kataru RP, Koh GY. Inflammation-associated lymphangiogenesis: a double-edged sword? J Clin Invest 2014; 124(3):936–42. doi: 10.1172/JCI71607.

207. Garnier L, Gkountidi A-O, Hugues S. Tumor-Associated Lymphatic Vessel Features and Immunomodulatory Functions. Front Immunol 2019; 10:720. doi: 10.3389/fimmu.2019.00720.

208. Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV, Lin F-J, Tsai S, Tsai M-J et al. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. Genes Dev 2007; 21(19):2422–32. doi: 10.1101/gad.1588407.

209. Sabin FR. On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. Am. J. Anat. 1902; 1(3):367–89. doi: 10.1002/aja.1000010310.

210. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dubé KN et al. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. Nature 2015; 522(7554):62–7. doi: 10.1038/nature14483.

211. Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Stanczuk L, Tatin F, Kizhatil K, John SWM et al. Nonvenous origin of dermal lymphatic vasculature. Circ Res 2015; 116(10):1649–54. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306170.

212. Stanczuk L, Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Zhang Y, Laviña B, Fruttiger M et al. cKit Lineage Hemogenic Endothelium-Derived Cells Contribute to Mesenteric Lymphatic Vessels. Cell Rep 2015; 10(10):1708–21. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.026.

213. Yang Y, García-Verdugo JM, Soriano-Navarro M, Srinivasan RS, Scallan JP, Singh MK et al. Lymphatic endothelial progenitors bud from the cardinal vein and intersomitic vessels in mammalian embryos. Blood 2012; 120(11):2340–8. doi: 10.1182/blood-2012-05-428607.

214. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. EMBO J 2002; 21(7):1505–13. doi: 10.1093/emboj/21.7.1505.

215. François M, Caprini A, Hosking B, Orsenigo F, Wilhelm D, Browne C et al. Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. Nature 2008; 456(7222):643–7. doi: 10.1038/nature07391.

216. Srinivasan RS, Escobedo N, Yang Y, Interiano A, Dillard ME, Finkelstein D et al. The Prox1-Vegfr3 feedback loop maintains the identity and the number of lymphatic endothelial cell progenitors. Genes Dev 2014; 28(19):2175–87. doi: 10.1101/gad.216226.113.

217. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. Nat Immunol 2004; 5(1):74–80. doi: 10.1038/ni1013.

218. Le Guen L, Karpanen T, Schulte D, Harris NC, Koltowska K, Roukens G et al. Ccbe1 regulates Vegfc-mediated induction of Vegfr3 signaling during embryonic lymphangiogenesis. Development 2014; 141(6):1239–49. doi: 10.1242/dev.100495.

219. Hägerling R, Pollmann C, Andreas M, Schmidt C, Nurmi H, Adams RH et al. A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy. EMBO J 2013; 32(5):629–44. doi: 10.1038/emboj.2012.340.

220. Uhrin P, Zaujec J, Breuss JM, Olcaydu D, Chrenek P, Stockinger H et al. Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. Blood 2010; 115(19):3997–4005. doi: 10.1182/blood-2009-04-216069.

221. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(2):548–53. doi: 10.1073/pnas.95.2.548.

222. Stacker SA, Stenvers K, Caesar C, Vitali A, Domagala T, Nice E et al. Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. J Biol Chem 1999; 274(45):32127–36. doi: 10.1074/jbc.274.45.32127.

223. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV et al. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. EMBO J 2001; 20(6):1223–31. doi: 10.1093/emboj/20.6.1223.

224. Bui HM, Enis D, Robciuc MR, Nurmi HJ, Cohen J, Chen M et al. Proteolytic activation defines distinct lymphangiogenic mechanisms for VEGFC and VEGFD. J Clin Invest 2016; 126(6):2167–80. doi: 10.1172/JCI83967.

225. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. Nat Med 2001; 7(2):186–91. doi: 10.1038/84635.

226. Kholová I, Dragneva G, Cermáková P, Laidinen S, Kaskenpää N, Hazes T et al. Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. Eur J Clin Invest 2011; 41(5):487–97. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02431.x.

227. Vuorio T, Nurmi H, Moulton K, Kurkipuro J, Robciuc MR, Ohman M et al. Lymphatic vessel insufficiency in hypercholesterolemic mice alters lipoprotein levels and promotes atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; 34(6):1162–70. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.302528.

228. Milasan A, Dallaire F, Mayer G, Martel C. Effects of LDL Receptor Modulation on Lymphatic Function. Sci Rep 2016; 6:27862. doi: 10.1038/srep27862.

229. Pant S, Deshmukh A, Gurumurthy GS, Pothineni NV, Watts TE, Romeo F et al. Inflammation and atherosclerosis--revisited. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2014; 19(2):170–8. doi: 10.1177/1074248413504994.

230. Zheng Z, Ren K, Peng X, Zhu X, Yi G. Lymphatic Vessels: A Potential Approach to the Treatment of Atherosclerosis? Lymphat Res Biol 2018; 16(6):498–506. doi: 10.1089/lrb.2018.0015.

231. Drozdz K, Janczak D, Dziegiel P, Podhorska M, Piotrowska A, Patrzalek D et al. Adventitial lymphatics and atherosclerosis. Lymphology 2012; 45(1):26–33.

232. Grzegorek I, Drozdz K, Chmielewska M, Gomulkiewicz A, Jablonska K, Piotrowska A et al. Arterial wall lymphangiogenesis is increased in the human iliac atherosclerotic arteries: involvement of CCR7 receptor. Lymphat Res Biol 2014; 12(4):222–31. doi: 10.1089/lrb.2013.0048.

233. Rademakers T, van der Vorst EPC, Daissormont ITMN, Otten JJT, Theodorou K, Theelen TL et al. Adventitial lymphatic capillary expansion impacts on plaque T cell accumulation in atherosclerosis. Sci Rep 2017; 7:45263. doi: 10.1038/srep45263.

234. Lammoglia GM, van Zandt CE, Galvan DX, Orozco JL, Dellinger MT, Rutkowski JM. Hyperplasia, de novo lymphangiogenesis, and lymphatic regression in mice with tissue-specific, inducible overexpression of murine VEGF-D. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2016; 311(2):H384-94. doi: 10.1152/ajpheart.00208.2016.

235. O'Connor WN, Valle S. A combination Verhoeff's elastic and Masson's trichrome stain for routine histology. Stain Technol 1982; 57(4):207–10. doi: 10.3109/10520298209066710.

236. Schipke J, Brandenberger C, Rajces A, Manninger M, Alogna A, Post H et al. Assessment of cardiac fibrosis: a morphometric method comparison for collagen quantification. J Appl Physiol 2017; 122(4):1019–30. doi: 10.1152/japplphysiol.00987.2016.

237. Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrerk W et al. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. J Immunol 1990; 145(11):3889–97.

238. Lyons AB, Cooper SJ, Cole SR, Ashman LK. Human myeloid differentiation antigens identified by monoclonal antibodies to the myelomonocytic leukemia cell line RC-2A. Pathology 1988; 20(2):137–46. doi: 10.3109/00313028809066624.

239. Ohto H, Maeda H, Shibata Y, Chen RF, Ozaki Y, Higashihara M et al. A novel leukocyte differentiation antigen: two monoclonal antibodies TM2 and TM3 define a 120-kd molecule present on neutrophils, monocytes, platelets, and activated lymphoblasts. Blood 1985; 66(4):873–81.

240. Cabañas C, Sanchez-Madrid F, Bellon T, Figdor CG, Te Velde AA, Fernandez JM et al. Characterization of a novel myeloid antigen regulated during differentiation of monocytic cells. Eur J Immunol 1989; 19(8):1373–8. doi: 10.1002/eji.1830190804.

241. Dangerfield J, Larbi KY, Huang M-T, Dewar A, Nourshargh S. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. J Exp Med 2002; 196(9):1201–11. doi: 10.1084/jem.20020324.

242. Park S, DiMaio TA, Scheef EA, Sorenson CM, Sheibani N. PECAM-1 regulates proangiogenic properties of endothelial cells through modulation of cell-cell and cell-matrix interactions. Am J Physiol Cell Physiol 2010; 299(6):C1468-84. doi: 10.1152/ajpcell.00246.2010.

243. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. J Histochem Cytochem 2006; 54(4):385–95. doi: 10.1369/jhc.4A6514.2005].

244. Zhuo J, Fu W, Liu S. Correlation of contrast-enhanced ultrasound with two distinct types of blood vessels for the assessment of angiogenesis in lewis lung carcinoma. Ultraschall Med 2014; 35(5):468–72. doi: 10.1055/s-0033-1356194.

245. Poblet E, Gonzalez-Palacios F, Jimenez FJ. Different immunoreactivity of endothelial markers in well and poorly differentiated areas of angiosarcomas. Virchows Arch 1996; 428(4-5):217–21. doi: 10.1007/BF00196693.

246. Martin SG, Hewett PW. Angiogenesis Protocols. New York, NY: Springer New York; 2016. (Bd. 1430).

247. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. J Clin Pathol 1990; 43(9):752–7. doi: 10.1136/jcp.43.9.752.

248. Schacht V, Ramirez MI, Hong Y-K, Hirakawa S, Feng D, Harvey N et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. EMBO J 2003; 22(14):3546–56. doi: 10.1093/emboj/cdg342.

249. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. Am J Pathol 1999; 154(2):385–94. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65285-6.

250. Bertozzi CC, Schmaier AA, Mericko P, Hess PR, Zou Z, Chen M et al. Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. Blood 2010; 116(4):661–70. doi: 10.1182/blood-2010-02-270876.

251. Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. J Cell Biol 1999; 144(4):789–801. doi: 10.1083/jcb.144.4.789.

252. Johnson LA, Banerji S, Lawrance W, Gileadi U, Prota G, Holder KA et al. Dendritic cells enter lymph vessels by hyaluronan-mediated docking to the endothelial receptor LYVE-1. Nat Immunol 2017; 18(7):762–70. doi: 10.1038/ni.3750.

253. Lawrance W, Banerji S, Day AJ, Bhattacharjee S, Jackson DG. Binding of Hyaluronan to the Native Lymphatic Vessel Endothelial Receptor LYVE-1 Is Critically Dependent on Receptor Clustering and Hyaluronan Organization. J Biol Chem 2016; 291(15):8014–30. doi: 10.1074/jbc.M115.708305.

254. Bobryshev YV. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. Micron 2006; 37(3):208–22. doi: 10.1016/j.micron.2005.10.007.

255. Holness CL, Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. Blood 1993; 81(6):1607–13.

256. van der Kooij MA, Mark EM von der, Kruijt JK, van Velzen A, van Berkel TJ, Morand OH. Human monocyte-derived macrophages express an approximately 120-kD Ox-LDL binding protein with strong identity to CD68. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17(11):3107–16. doi: 10.1161/01.ATV.17.11.3107.

257. Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O, Steinberg D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(25):14833–8. doi: 10.1073/pnas.93.25.14833.

258. Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. Ann Rheum Dis 2004; 63(7):774–84. doi: 10.1136/ard.2003.013029.

259. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc 2006; 1(3):1559–82. doi: 10.1038/nprot.2006.236.

260. Antoniades C, Kotanidis CP, Berman DS. State-of-the-art review article. Atherosclerosis affecting fat: What can we learn by imaging perivascular adipose tissue? J Cardiovasc Comput Tomogr 2019; 13(5):288–96. doi: 10.1016/j.jcct.2019.03.006.

261. Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, Pache J-C, Velebit V, Dayer J-M et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis? Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25(12):2594–9. doi: 10.1161/01.ATV.0000188508.40052.35.

262. Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H et al. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. Circulation 2003; 108(20):2460–6. doi: 10.1161/01.CIR.0000099542.57313.C5.

263. Tinica G, Chistol RO, Enache M, Leon Constantin MM, Ciocoiu M, Furnica C. Long-term graft patency after coronary artery bypass grafting: Effects of morphological and pathophysiological factors. Anatol J Cardiol 2018; 20(5):275–82. doi: 10.14744/AnatolJCardiol.2018.51447.

264. Fleissner F, Engelke H, Rojas-Hernandez S, Ismail I, Stiefel P, Cebotari S et al. Long-term follow-up of total arterial revascularization with left internal thoracic artery and radial artery T-grafts: survival, cardiac morbidity and quality of life. Eur J Cardiothorac Surg 2016; 49(4):1195–200. doi: 10.1093/ejcts/ezv289.

265. Rittig K, Dolderer JH, Balletshofer B, Machann J, Schick F, Meile T et al. The secretion pattern of perivascular fat cells is different from that of subcutaneous and visceral fat cells. Diabetologia 2012; 55(5):1514–25. doi: 10.1007/s00125-012-2481-9.

266. Ying R, Li S-W, Chen J-Y, Zhang H-F, Yang Y, Gu Z-J et al. Endoplasmic reticulum stress in perivascular adipose tissue promotes destabilization of atherosclerotic plaque by regulating GM-CSF paracrine. J Transl Med 2018; 16(1):105. doi: 10.1186/s12967-018-1481-z.

267. Gharakhanian R, Su S, Aprahamian T. Vascular Endothelial Growth Factor-A Deficiency in Perivascular Adipose Tissue Impairs Macrovascular Function. Front Physiol 2019; 10:687. doi: 10.3389/fphys.2019.00687.

268. Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S et al. HIF-1α in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. Diabetes 2016; 65(12):3649–59. doi: 10.2337/db16-0012.

269. Chen J, Gu Z, Wu M, Yang Y, Zhang J, Ou J et al. C-reactive protein can upregulate VEGF expression to promote ADSC-induced angiogenesis by activating HIF-1α via CD64/PI3k/Akt and MAPK/ERK signaling pathways. Stem Cell Res Ther 2016; 7(1):114. doi: 10.1186/s13287-016-0377-1.

270. Hess DL, Kelly-Goss MR, Cherepanova OA, Nguyen AT, Baylis RA, Tkachenko S et al. Perivascular cell-specific knockout of the stem cell pluripotency gene Oct4 inhibits angiogenesis. Nat Commun 2019; 10(1):967. doi: 10.1038/s41467-019-08811-z.

271. Carbone C, Piro G, Merz V, Simionato F, Santoro R, Zecchetto C et al. Angiopoietin-Like Proteins in Angiogenesis, Inflammation and Cancer. Int J Mol Sci 2018; 19(2). doi: 10.3390/ijms19020431.

272. Tian Z, Miyata K, Tazume H, Sakaguchi H, Kadomatsu T, Horio E et al. Perivascular adipose tissue-secreted angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) accelerates neointimal hyperplasia after endovascular injury. J Mol Cell Cardiol 2013; 57:1–12. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.004.

273. An YA, Sun K, Joffin N, Zhang F, Deng Y, Donzé O et al. Angiopoietin-2 in white adipose tissue improves metabolic homeostasis through enhanced angiogenesis. Elife 2017; 6. doi: 10.7554/eLife.24071.

274. Drosos I, Pavlaki M, Ortega Carrillo MDP, Kourkouli A, Buschmann K, Konstantinou F et al. Increased Lymphangiogenesis and Lymphangiogenic Growth Factor Expression in Perivascular Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease. J Clin Med 2019; 8(7). doi: 10.3390/jcm8071000.

275. Nakano T, Nakashima Y, Yonemitsu Y, Sumiyoshi S, Chen Y-X, Akishima Y et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis and expression of lymphangiogenic factors in the atherosclerotic intima of human coronary arteries. Hum Pathol 2005; 36(4):330–40. doi: 10.1016/j.humpath.2005.01.001.

276. Singla B, Lin H-P, Chen A, Ahn W, Ghoshal P, Cherian-Shaw M et al. Role of R-spondin 2 in arterial lymphangiogenesis and atherosclerosis. Cardiovasc Res 2020. doi: 10.1093/cvr/cvaa244.

277. Taher M, Nakao S, Zandi S, Melhorn MI, Hayes KC, Hafezi-Moghadam A. Phenotypic transformation of intimal and adventitial lymphatics in atherosclerosis: a regulatory role for soluble VEGF receptor 2. FASEB J 2016; 30(7):2490–9. doi: 10.1096/fj.201500112.

278. Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. Cells 2019; 8(5). doi: 10.3390/cells8050471.

279. Zheng W, Nurmi H, Appak S, Sabine A, Bovay E, Korhonen EA et al. Angiopoietin 2 regulates the transformation and integrity of lymphatic endothelial cell junctions. Genes Dev 2014; 28(14):1592–603. doi: 10.1101/gad.237677.114.

280. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J et al. Angiopoietin-2 Is Required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1. Developmental Cell 2002; 3(3):411–23. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00217-4.

281. Yan Z-X, Jiang Z-H, Liu N-F. Angiopoietin-2 promotes inflammatory lymphangiogenesis and its effect can be blocked by the specific inhibitor L1-10. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2012; 302(1):H215-23. doi: 10.1152/ajpheart.00895.2011.

282. Sasaki Y, Ohta M, Desai D, Figueiredo J-L, Whelan MC, Sugano T et al. Angiopoietin Like Protein 2 (ANGPTL2) Promotes Adipose Tissue Macrophage and T lymphocyte Accumulation and Leads to Insulin Resistance. PLoS ONE 2015; 10(7):e0131176. doi: 10.1371/journal.pone.0131176.

283. Flister MJ, Wilber A, Hall KL, Iwata C, Miyazono K, Nisato RE et al. Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF-kappaB and Prox1. Blood 2010; 115(2):418–29. doi: 10.1182/blood-2008-12-196840.

284. Felmerer G, Stylianaki A, Hollmén M, Ströbel P, Stepniewski A, Wang A et al. Increased levels of VEGF-C and macrophage infiltration in lipedema patients without changes in lymphatic vascular morphology. Sci Rep 2020; 10(1):10947. doi: 10.1038/s41598-020-67987-3.

285. Kinashi H, Toda N, Sun T, Nguyen TQ, Suzuki Y, Katsuno T et al. Connective tissue growth factor is correlated with peritoneal lymphangiogenesis. Sci Rep 2019; 9(1):12175. doi: 10.1038/s41598-019-48699-9.

286. Kinashi H, Ito Y, Sun T, Katsuno T, Takei Y. Roles of the TGF-β⁻VEGF-C Pathway in Fibrosis-Related Lymphangiogenesis. Int J Mol Sci 2018; 19(9). doi: 10.3390/ijms19092487.

287. Peppicelli S, Bianchini F, Calorini L. Inflammatory cytokines induce vascular endothelial growth factor-C expression in melanoma-associated macrophages and stimulate melanoma lymph node metastasis. Oncol Lett 2014; 8(3):1133–8. doi: 10.3892/ol.2014.2297.

288. Numaguchi R, Furuhashi M, Matsumoto M, Sato H, Yanase Y, Kuroda Y et al. Differential Phenotypes in Perivascular Adipose Tissue Surrounding the Internal Thoracic Artery and Diseased Coronary Artery. J Am Heart Assoc 2019; 8(2):e011147. doi: 10.1161/JAHA.118.011147.

289. Mikami T, Furuhashi M, Sakai A, Numaguchi R, Harada R, Naraoka S et al. Antiatherosclerotic Phenotype of Perivascular Adipose Tissue Surrounding the Saphenous Vein in Coronary Artery Bypass Grafting. J Am Heart Assoc 2021; 10(7):e018905. doi: 10.1161/JAHA.120.018905.

290. Karaman S, Hollmén M, Robciuc MR, Alitalo A, Nurmi H, Morf B et al. Blockade of VEGF-C and VEGF-D modulates adipose tissue inflammation and improves metabolic parameters under high-fat diet. Mol Metab 2015; 4(2):93–105. doi: 10.1016/j.molmet.2014.11.006.

291. Chakraborty A, Barajas S, Lammoglia GM, Reyna AJ, Morley TS, Johnson JA et al. Vascular Endothelial Growth Factor-D (VEGF-D) Overexpression and Lymphatic Expansion in Murine Adipose Tissue Improves Metabolism in Obesity. Am J Pathol 2019; 189(4):924–39. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.12.008.

292. Chakraborty A, Scogin CK, Rizwan K, Morley TS, Rutkowski JM. Characterizing Lymphangiogenesis and Concurrent Inflammation in Adipose Tissue in Response to VEGF-D. Front Physiol 2020; 11:363. doi: 10.3389/fphys.2020.00363.

293. Telinius N, Hjortdal VE. Role of the lymphatic vasculature in cardiovascular medicine. Heart 2019; 105(23):1777–84. doi: 10.1136/heartjnl-2018-314461.

294. Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ et al. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. J Clin Invest 2005; 115(2):247–57. doi: 10.1172/JCI22037.

295. Milasan A, Smaani A, Martel C. Early rescue of lymphatic function limits atherosclerosis progression in Ldlr-/- mice. Atherosclerosis 2019; 283:106–19. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.01.031.

296. Chang L, Garcia-Barrio MT, Chen YE. Perivascular Adipose Tissue Regulates Vascular Function by Targeting Vascular Smooth Muscle Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2020; 40(5):1094–109. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.312464.

297. Quesada I, Cejas J, García R, Cannizzo B, Redondo A, Castro C. Vascular dysfunction elicited by a cross talk between periaortic adipose tissue and the vascular wall is reversed by pioglitazone. Cardiovasc Ther 2018; 36(3):e12322. doi: 10.1111/1755-5922.12322.

298. Cheng CK, Bakar HA, Gollasch M, Huang Y. Perivascular Adipose Tissue: the Sixth Man of the Cardiovascular System. Cardiovasc Drugs Ther 2018; 32(5):481–502. doi: 10.1007/s10557-018-6820-z.

299. Torkian P, Langroudi TF, Negarestani AM, Shabestari AA, Naderian M, Tabary M et al. A new approach to cardiac fat volume assessment and the correlation with coronary artery calcification. Rom J Intern Med 2020; 58(2):81–91. doi: 10.2478/rjim-2020-0002.

300. Mahabadi AA, Reinsch N, Lehmann N, Altenbernd J, Kälsch H, Seibel RM et al. Association of pericoronary fat volume with atherosclerotic plaque burden in the underlying coronary artery: a segment analysis. Atherosclerosis 2010; 211(1):195–9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.02.013.

301. Alkhalil M, Edmond E, Edgar L, Digby JE, Omar O, Robson MD et al. The relationship of perivascular adipose tissue and atherosclerosis in the aorta and carotid arteries, determined by magnetic resonance imaging. Diab Vasc Dis Res 2018; 15(4):286–93. doi: 10.1177/1479164118757923.

302. Gorter PM, Vos AM de, van der Graaf Y, Stella PR, Doevendans PA, Meijs MFL et al. Relation of epicardial and pericoronary fat to coronary atherosclerosis and coronary artery calcium in patients undergoing coronary angiography. Am J Cardiol 2008; 102(4):380–5. doi: 10.1016/j.amjcard.2008.04.002.

303. Xiong W, Zhao X, Villacorta L, Rom O, Garcia-Barrio MT, Guo Y et al. Brown Adipocyte-Specific PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) Deletion Impairs Perivascular Adipose Tissue Development and Enhances Atherosclerosis in Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2018; 38(8):1738–47. doi: 10.1161/atvbaha.118.311367.

304. Ohyama K, Matsumoto Y, Takanami K, Ota H, Nishimiya K, Sugisawa J et al. Coronary Adventitial and Perivascular Adipose Tissue Inflammation in Patients With Vasospastic Angina. J Am Coll Cardiol 2018; 71(4):414–25. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.046.

305. Horimatsu T, Patel AS, Prasad R, Reid LE, Benson TW, Zarzour A et al. Remote Effects of Transplanted Perivascular Adipose Tissue on Endothelial Function and Atherosclerosis. Cardiovasc Drugs Ther 2018; 32(5):503–10. doi: 10.1007/s10557-018-6821-y.

306. Mazurek T, Kobylecka M, Zielenkiewicz M, Kurek A, Kochman J, Filipiak KJ et al. PET/CT evaluation of 18F-FDG uptake in pericoronary adipose tissue in patients with stable coronary artery disease: Independent predictor of atherosclerotic lesions' formation? J Nucl Cardiol 2017; 24(3):1075–84. doi: 10.1007/s12350-015-0370-6.

307. Suzuki T, Ogita H, Sato A, Minamidate N, Hachiro K. Differences Between Patients with and without Atherosclerosis in Expression Levels of Inflammatory Mediators in the Adipose Tissue Around the Coronary Artery. Int Heart J 2021; 62(2):390–5. doi: 10.1536/ihj.20-585.

308. Mazzotta C, Basu S, Gower AC, Karki S, Farb MG, Sroczynski E et al. Perivascular Adipose Tissue Inflammation in Ischemic Heart Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2021; 41(3):1239–50. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315865.

309. Liu Y, Sun Y, Hu C, Liu J, Gao A, Han H et al. Perivascular Adipose Tissue as an Indication, Contributor to, and Therapeutic Target for Atherosclerosis. Front Physiol 2020; 11:615503. doi: 10.3389/fphys.2020.615503.

310. Qi X-Y, Qu S-L, Xiong W-H, Rom O, Chang L, Jiang Z-S. Perivascular adipose tissue (PVAT) in atherosclerosis: a double-edged sword. Cardiovasc Diabetol 2018; 17(1):134. doi: 10.1186/s12933-018-0777-x.

311. Konaniah ES, Kuhel DG, Basford JE, Weintraub NL, Hui DY. Deficiency of LRP1 in Mature Adipocytes Promotes Diet-Induced Inflammation and Atherosclerosis-Brief Report. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2017; 37(6):1046–9. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309414.

312. Farias-Itao DS, Pasqualucci CA, Nishizawa A, da Silva LFF, Campos FM, Bittencourt MS et al. B Lymphocytes and Macrophages in the Perivascular Adipose Tissue Are Associated With Coronary Atherosclerosis: An Autopsy Study. J Am Heart Assoc 2019; 8(24):e013793. doi: 10.1161/JAHA.119.013793.

313. Oikonomou EK, Williams MC, Kotanidis CP, Desai MY, Marwan M, Antonopoulos AS et al. A novel machine learning-derived radiotranscriptomic signature of perivascular fat improves cardiac risk prediction using coronary CT angiography. Eur Heart J 2019; 40(43):3529–43. doi: 10.1093/eurheartj/ehz592.

314. Frangogiannis N. Transforming growth factor-β in tissue fibrosis. J Exp Med 2020; 217(3):e20190103. doi: 10.1084/jem.20190103.

315. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. J Invest Dermatol 2002; 118(2):211–5. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01641.x.

316. Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Esteban V, Rupérez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. Circulation 2005; 111(19):2509–17. doi: 10.1161/01.CIR.0000165133.84978.E2.

317. Moe KT, Naylynn TM, Yin NO, Khairunnisa K, Allen JC, Wong MC et al. Tumor necrosis factor-α induces aortic intima-media thickening via perivascular adipose tissue inflammation. J Vasc Res 2013; 50(3):228–37. doi: 10.1159/000350542.

318. Juban G, Saclier M, Yacoub-Youssef H, Kernou A, Arnold L, Boisson C et al. AMPK Activation Regulates LTBP4-Dependent TGF-β1 Secretion by Pro-inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. Cell Rep 2018; 25(8):2163-2176.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.077.

319. Gruzdeva OV, Belik EV, Dyleva YA, Borodkina DA, Sinitsky MY, Naumov DY et al. Expression of adipocytokines in heart fat depots depending on the degree of coronary artery atherosclerosis in patients with coronary artery disease. PLoS ONE 2021; 16(3):e0248716. doi: 10.1371/journal.pone.0248716.

320. Zhou Y, Wei Y, Wang L, Wang X, Du X, Sun Z et al. Decreased adiponectin and increased inflammation expression in epicardial adipose tissue in coronary artery disease. Cardiovasc Diabetol 2011; 10:2. doi: 10.1186/1475-2840-10-2.

9. Anhang

Patienteninformation
zur Teilnahme an der Beobachtungsstudie

„Bedeutung des perivaskulären Fettgewebes für die koronare Herzkrankheit“
(Untersuchung darüber, ob das die Herzkranzgefässe umgebende Fettgewebe Veränderungen der Gefäßwand beeinflusst)

Patient

Name, Vorname	*Patienten-Nummer*	*Geburtsdatum*

Studien-Nr.:	PVAT-KHK MZ-00x
Studienleiter:	Dr. Katja Buschmann, Univ.-Prof. Dr. med. Katrin Schäfer
Sponsor der Studie:	Universitätsmedizin Mainz
Durchführende Einrichtung:	Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie sowie 2. Medizinische Klinik und Poliklinik UNIVERSITÄTSMEDIZIN der Johannes Gutenberg-Universität Mainz Langenbeckstraße 1 55131 Mainz

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie sind wegen einer koronaren Herzerkrankung oder einer Aortenklappenverengung an der Universitätsmedizin Mainz in Behandlung.

Wir führen eine klinisch-experimentelle Studie durch, in der wir den Zusammenhang zwischen bestimmten Faktoren in dem die Blutgefässe umgebenden, so genannten perivaskulären Fettgewebe und der Grösse und Zusammensetzung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen untersuchen.

Wir möchten Sie einladen, an dieser wissenschaftlichen Studie teilzunehmen, welche von der Abteilung Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, in Zusammenarbeit mit der 2. Medizinischen Klinik und Poliklinik und dem Centrum für Thrombose und Hämostase der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt wird. Die Teilnahme ist freiwillig. Bei einer Nicht-Teilnahme entstehen Ihnen keinerlei Nachteile. Sie können Ihre Teilnahme auch später jederzeit mündlich oder schriftlich und ohne Angabe von Gründen beenden oder widerrufen. Studienteilnehmer werden auf jeden Fall genauso wie Nicht-Teilnehmer entsprechend der nationalen und internationalen Leitlinien für die koronare Herzkrankheit behandelt.

Sie haben das Recht, Ihre Teilnahme an der Studie jederzeit und ohne Angabe von Gründen zu widerrufen. Dies hat keine Auswirkungen auf Ihre jetzige und zukünftige Behandlung an der Universitätsmedizin Mainz. Bei Widerruf der Studienteilnahme können Sie verlangen, dass die Blutproben vernichtet und Ihre Daten gelöscht werden.

Der Umgang mit den im Rahmen der Studie erhobenen persönlichen Daten und Studienergebnissen entspricht den Vorgaben der geltenden Datenschutzgesetze. Die erfassten Daten werden *pseudonymisiert*, also ohne Ihre persönlichen Daten (Name, Initialen, Anschrift und Geburtsdatum), und nur mit einer verschlüsselten Codenummer versehen in einer Studiendatenbank gespeichert, bearbeitet und ausgewertet. Die Zuordnung der Daten oder Proben zu einer Person ist nur möglich, wenn hierfür der Schlüssel verwendet wird, mit dem die Daten pseudonymisiert wurden. Die personenbezogenen Daten/Proben werden unter besonderen Schutzvorkehrungen getrennt von den pseudonymisierten Daten aufbewahrt. Die Entschlüsselung ist nur durch die verantwortlichen Studienärzte möglich.

Alle Datenbanken der Studie haben einen gesicherten Zugriff, der eine Anmeldung mit einem Passwort erfordert. Datenzugriff zu den personenbezogenen Daten hat nur die Studienleitung und deren unmittelbare und befugte wissenschaftliche Mitarbeiter sowie Monitore, die im Auftrag der zentralen Studienkoordination im Prüfzentrum die ordnungsgemäße Durchführung der Studie überwachen. Sonstige Mitarbeiter der Studie erhalten nur Zugriff auf die für ihre speziellen Aufgaben erforderlichen pseudonymisierten Daten.

Die personenbezogenen Daten werden noch 10 Jahre nach Beendigung der klinischen Studie gespeichert, soweit gesetzliche Vorgaben nicht längere Fristen vorsehen, bevor sie unwiderruflich gelöscht und danach nur noch die anonymisierten klinischen Daten verwendet werden.

Das Studienprotokoll wurde vor Beginn der Studie von der unabhängigen Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz begutachtet und zustimmend bewertet. Es werden die ethischen Prinzipien der Deklaration von Helsinki, sowie die Leitlinien für "Gute klinische Praxis" (GCP) und "Gute epidemiologische Praxis" (GEP) eingehalten. Alle Mitarbeiter der Studie unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und/oder der Verpflichtung zur Geheimhaltung nach Artikel 42 EGStB (Verpflichtungsgesetz) und sind schriftlich zur Einhaltung des Datengeheimnisses verpflichtet worden.

Die Speicherung der pseudonymisierten Daten erfolgt auf unbestimmte Zeit. Dritte Personen erhalten keinen Einblick in Originalunterlagen. Ausserdem haben Sie die Möglichkeit, die Löschung Ihrer Daten zu verlangen.

Diagnose und Behandlung werden durch die Teilnahme an dieser Studie **nicht** beeinflusst. Für die an der Studie teilnehmenden Probanden besteht kein Risiko und auch kein unmittelbarer Nutzen.

Mit herzlichem Dank für Ihre Unterstützung,

Univ.-Prof. Dr. Katrin Schäfer
Projektleiterin/Prüfärztin

Dr. Katja Buschmann
Projektleiterin/Prüfärztin

WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND UND STUDIENZIELE

Die koronare Herzkrankheit ist eine entzündliche Veränderung der das Herz versorgenden Blutgefässe, die mit einer Verengung des Gefäßdurchmessers einhergeht und eine Minderdurchblutung des Herzens zur Folge hat. Ursachen dafür beinhalten die Erhöhung des Blutdrucks, des Blutzuckers oder der Blutfette, oder ein vermehrtes Körpergewicht. Zusätzlich zu diesen den gesamten Körper betreffenden Veränderungen vermutet man, dass auch lokale Veränderungen eine Rolle spielen. Dazu zählen schädliche Veränderungen in dem das die Gefäßwand direkt umgebenden so genannten perivaskulären Fettgewebe.

Ziel der Studie ist es, den pathophysiologischen Zusammenhang zwischen Veränderungen im perivaskulären Fettgewebe und der Arteriosklerose in der benachbarten Gefäßwand zu untersuchen. Die Untersuchungen erfolgen ergänzend zu experimentellen Analysen im Tiermodell (Maus) und im Zellkultursystem und dienen der Überprüfung der dort gewonnenen Erkenntnisse.

Ein besseres Verständnis der Ursachen der koronaren Herzkrankheit ermöglicht eine gezieltere Behandlung, um eventuelle Folgeerkrankungen, wie einen akuten Herzinfarkt oder eine chronische Herzinsuffizienz, zu verhindern.

NUTZEN UND RISIKEN IHRER STUDIENTEILNAHME

Ihr Gesundheitsnutzen
In dieser Beobachtungsstudie unterscheidet sich die Behandlung von Studienteilnehmern nicht von der Behandlung von Patienten, die nicht daran teilnehmen. Alle Teilnehmer werden, ebenso wie die Nicht-Teilnehmer, nach den Therapieleitlinien für die koronare Herzerkrankung oder Aortenklappenverengung an der Universitätsmedizin Mainz behandelt.

Für Sie entsteht damit kein gegenwärtiger Nutzen aus Ihrer Teilnahme. Die Informationen aus der Analyse der Beobachtungsstudie leisten aber einen wichtigen Beitrag zu neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen, um verbesserte Strategien zur Prävention und Behandlung zu entwickeln sowie eine bestmögliche Lebensqualität für Patienten mit koronarer Herzkrankheit zu erreichen.

Ihr Risiko
Durch die Teilnahme an dieser Studie entstehen keine weiteren Risiken, da die Untersuchungen und Behandlungen sich nicht zwischen Teilnehmern und Nicht-Teilnehmern der Studie unterscheiden.

ABLAUF DER STUDIE

Untersuchungsumfang:

Die Durchführung der Studie ist für Sie mit minimalem zusätzlichem Aufwand verbunden:

Während des bei Ihnen geplanten kardiochirurgischen Eingriffes wird Gewebe (und zwar das die grosse Schlagader (Aorta), die rechte Koronararterie und die A. mammaria interna umgebende Fettgewebe), welches aus operationstechnischen Gründen in jedem Fall entnommen und danach verworfen wird, stattdessen für histologische und molekularbiologische Untersuchungen aufgehoben und haltbar gemacht. Es ist kein zusätzlicher Gewebeschnitt oder Eingriff notwendig. Auf die Durchführung der Operation hat dieses Vorgehen keinerlei Einfluss.

Darüber hinaus werden Ihnen im Rahmen der regulären präoperativen Blutentnahme zusätzlich einmalig 20 ml Blut aus der Armvene abgenommen und daraus Serum sowie Plasma gewonnen. Bei der Blutentnahme kann es sein, dass Sie sich schwach fühlen oder dass leichte Schmerzen, ein Bluterguss, eine Reizung oder Rötung an der Entnahmestelle auftreten. In seltenen Fällen kann es zu einer Infektion kommen, oder Nerven können geschädigt werden. Die Blutprobe wird in der Universitätsmedizin bei -80℃ in für Dritte unzugänglichen Gefrierschränken gelagert (für einen Zeitraum von maximal 10 Jahren). Die Proben werden nicht an Dritte weitergegeben. Ein zusätzliches Risiko ist dadurch nicht zu erwarten.

Die Untersuchungen an der Universitätsmedizin Mainz zur Abklärung der Diagnose und Behandlung der koronaren Herzkrankheit werden für die Studie ausgewertet. Klinische Routinedaten, die grundsätzlich dokumentiert werden (z.B. Symptome, Untersuchungsergebnisse, die durchgeführte Therapie und gegebenenfalls mit der Behandlung einhergegangene Komplikationen), werden wissenschaftlich ausgewertet.

Außerdem werden mittels eines Fragebogens Informationen über Ihr Alter, Gewicht, Körpergröße, kardiovaskuläre Vorerkrankungen, Risikofaktoren und Medikamente eingeholt.

Es sind keine zusätzlichen Untersuchungstermine vorgesehen.

Fragebogen

Pseudonymierungscode: _____(wird vom Arzt ausgefüllt)

Bitte ankreuzen

Welcher ist der Grund für Ihren stationären Aufenthalt:

❑ Bei mir wird eine Koronare Bypass-Operation durchgeführt.

❑ Bei mir wird ein operativer Klappenersatz durchgeführt.

❑ andere Gründe: .....

Geschlecht: männlich ❑ weiblich ❑

Alter (Jahre): .....

Größe (m): .....

Gewicht (kg): .....

Welche Medikamente nehmen Sie momentan ein?

.....

.....

.....

Rauchen Sie aktuell?	Ja ❑	Nein ❑
Haben Sie hohen Blutdruck oder werden deshalb behandelt?	Ja ❑	Nein ❑
Leiden Sie an der Blutzuckerkrankheit (Diabetes mellitus)?	Ja ❑	Nein ❑
Hatten Sie schon einmal einen Herzinfarkt/Schlaganfall?	Ja ❑	Nein ❑
Hatte ein Familienmitglied bereits einen Herzinfarkt/Schlaganfall?	Ja ❑	Nein ❑

EINHOLUNG VON INFORMATIONEN VON IHREN BEHANDELNDEN ÄRZTEN

Um eine bestmögliche Bewertung des Krankheitsverlaufes zu gewährleisten, bitten wir Sie, Ihren Hausarzt bzw. die Sie behandelnden Ärzte von der Schweigepflicht über studienrelevante Vorbehandlungen und Diagnosen zu entbinden.

UMGANG MIT STUDIENDATEN

Die Studiendaten werden am Klinikum der Universitätsmedizin Mainz ausgewertet. Jedem Studienteilnehmer wird im Rahmen dieser Beobachtungsstudie eine Studienidentifikationsnummer zugeordnet. Unter der Studienidentifikationsnummer werden die im Rahmen der Studie erhobenen Daten getrennt von den persönlichen Daten gespeichert. Die Zuordnung der Studiennummer zum jeweiligen Studienteilnehmer ist nur der Studienleitung sowie von ihr bestimmten, eigens für die Betreuung der Studienteilnehmer eingesetzten Studienmitarbeitern bekannt.

EINVERSTÄNDNIS ZUR TEILNAHME AN DER STUDIE

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Aufgenommen in die Studie werden nur Personen, die eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben haben. Das Einverständnis zur Studienteilnahme beinhaltet die Entbindung des Hausarztes bzw. der behandelnden Ärzte von der Schweigepflicht hinsichtlich studienrelevanter Erkrankungen sowie, sollten wir den Kontakt zu Ihnen verlieren, die Abfrage Ihres Vitalstatus und der aktuellen Anschrift beim Einwohnermelderegister.

Die Details zum Einverständnis zu den einzelnen Studienbestandteilen finden Sie in der Einverständniserklärung. Wenn Sie sich zur Teilnahme an der Studie entschließen, bitten wir Sie, Ihre Einwilligung durch Ihre Unterschrift zu erklären. Die Einverständniserklärung muss von Ihnen persönlich datiert und unterschrieben werden. Von der Einverständniserklärung wird Ihnen eine Kopie ausgehändigt, das Original verbleibt im Studienzentrum.

WIDERRUF DER STUDIENTEILNAHME

Sie können Ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Studie jederzeit und ohne Angabe von Gründen schriftlich und/oder mündlich zurückziehen, ohne dass Ihnen daraus Nachteile entstehen.
Für den Fall, dass Sie von Ihrem Recht Gebrauch machen, Ihre Einwilligung an der Studienteilnahme zurückzuziehen, beziehungsweise die Studie vorzeitig zu beenden, wird in der Personendatenbank ein Eintrag vorgenommen, der die Rücknahme des Einverständnisses und das vorzeitige Studienende kenntlich macht.

Die personenbezogenen Daten werden während der Datenerhebungsphase zunächst nicht gelöscht, um zu vermeiden, dass Sie nachfolgend erneut zwecks Studienteilnahme kontaktiert werden.
Mit Abschluss der Datenerhebungsphase werden Ihre personenbezogenen Daten schließlich vollständig aus der Datenbank gelöscht. Ihre bis dahin erhobenen und anonymisierten Analysedaten verbleiben in der Studiendatenbank und können weiterhin verwendet werden.

HINWEIS

Eine Aufwandsentschädigung oder Fahrtkostenerstattung ist nicht vorgesehen.

Für weitere Fragen zu der Studie stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Fragen Sie das Studienpersonal – auch telefonisch unter:
Telefon 06131 17-4221 oder 06131 17-6875
Adresse Langenbeckstraße 1 in 55131 Mainz

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen herzlich bedanken, ohne die, die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. med besonders bedanken für die Möglichkeit die Grundlageforschung kennenlernen zu dürfen und für die erworbenen Erfahrungen, sowie Fähigkeiten in Ihrer Arbeitsgruppe für Translationale Vaskuläre Biologie. Zudem möchte ich ihr meinen größten Dank für die Vergabe dieses Dissertationsthemas aussprechen und für die konstruktive Betreuung und freundliche Zusammenarbeit über die Jahre, sowie für ihre wissenschaftliche Leitung und Unterstützung in der Verfassung dieser Dissertationschrift.

Univ. Prof. Dr. med. danke ich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung, im Zentrum für Kardiologie/Kardiologie I der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, promovieren zu dürfen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. med für die Möglichkeit der Mitarbeit an dieser klinischen-experimentellen Studie sowie für ihre Betreuung in der Sammlungsphase der Studie und die hervorragende Kooperation bei der Probensammlung bedanken.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med , den Mitarbeiter*Innen seiner Abteilung der Herz-Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz sowie insbesondere dem OP-Personal danke ich für die große Unterstützung bei der Probensammlung.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. für die Betreuung und Hilfsbereitschaft, sowie für den fachlichen Austausch aufgrund seiner Vorerfahrungen in dem Thema des PVAT bedanken. Zudem bedanke ich mich bei ihm für die Einleitung in die quantitative Analyse im Rahmen dieser Dissertation und den produktiven Gesprächen, sowie hilfreiche Anregungen.

Nicht zuletzt möchte ich allen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe für Translationale Vaskuläre Biologie für die Zusammenarbeit im Labor und die Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen danken. Bei dieser Gelegenheit möchte ich Frau und Frau für die Einführung und Anleitung in den experimentellen Teil der Studie sowie für alle die Ratschläge und fachlichen Austausch bei der Umsetzung der Experimente bedanken.

Meine Familie und Freunde, die mich während des Studiums begleitet haben, danke ich für die liebevolle Worte und Unterstützung. Ebenfalls möchte ich mich bei für die unersetzbare Ermutigung und seinen Beistand in dieser Promotionszeit bedanken.

11. Lebenslauf

Maria Del Pilar Ortega Carrillo

Geburtsdatum	21.08.1993
Geburtsort	San Marcos, Sucre. Kolumbien

Beruflichen Werdegang

Seit August 2021	**Ärztin in der Weiterbildung zur Fachärztin für Gefäßchirurgie** *Klinik und Poliklinik für Vaskuläre und Endovaskuläre Chirurgie* *Technische Universität München* *Klinikum rechts der Isar*
Februar 2020-Juli2021	**Assistenzärztin in der Weiterbildung zur Fachärztin für Gefäßchirurgie** *St. Josefs-Hospital Wiesbaden GmbH*

Hochschulausbildung

Oktober 2012-Juni 2019	**Studium in der Humanmedizin** *Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*
März 2015	Erstes Staatsexamen
April 2018	Zweites Staatsexamen
Juni 2019	Drittes Staatsexamen
Mai 2018-April 2019	**Praktisches Jahr** *Diakonie Krankenhaus Bad-Kreuznach*

Oktober 2011- 2012	**Festellungsprüfung mit vorbereitendem M-Kurs** *Internationales Studienkolleg Mainz*

Schulische Bildung

Februar 1998-Juni 2010	**Kolumbianisches Abitur** *Deutsche Schule Barranquilla, Kolumbien*
August 2008-Juni 2010	**International Baccalaureate (IB)** *Deutsche Schule Barranquilla, Kolumbien*

Studiums begleitende Nebenjobs

Juni 2016- April 2018	**Studentische Hilfskraft im Programm „Learn and Earn“ auf der Gefäß und Thorax Chirurgie** *St. Josefs-Hospital Wiesbaden GmbH*
April 2013-Mai 2016	**Pflegeassistentin in der Orthopädie** *Helios Aukamm Klinik Wiesbaden GmbH*

Promotion

August 2016-2021	**Wissenschaftliche Hilfskraft und Doktorandin** Arbeitsgruppe für Translationale Vaskuläre Biologie, AG Schäfer Zentrum für *Kardiologie/Kardiologie I, Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz*
April 2017	Teilnahme in der 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie im Mannheim 2017 mit dem Vortrag „*Differences in perivascular lymphangiogenesis and the*

expression of regulatory factors may contribute to human coronary atherosclerosis“

Publikation

Ioannis Drosos, Maria Pavlaki, Maria Del Pilar Ortega Carrillo, Adriani Kourkouli, Katja Buschmann, Fotios Konstantinou, Rajinikanth Gogiraju, Magdalena L. Bochenek, Georgios Chalikias, Christos Tortopidis, Christian F. Vahl, Dimitrios Mikroulis, Dimitrios Tziakas, Thomas Münzel, Stavros Konstantinides and Katrin Schäfer. ***Increased Lymphangiogenesis and Lymphangiogenic Growth Factor Expression in Perivascular Adipose Tissue of Patients with Coronary Artery Disease.*** Journal of Clinical Medicine, 2019, 8, no. 7: 1000. https://doi.org/10.3390/jcm807