

**Immunhistochemische und  
rasterelektronenmikroskopische Evaluierung von  
Endothelschädigungen der Vena saphena magna  
im Zuge von koronaren Bypass - Operationen**

**Diplomarbeit**

eingereicht von

**Kamnig Florian**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie**

unter der Anleitung von

**Mag. Dr. Gerd Leitinger**

**2009**

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

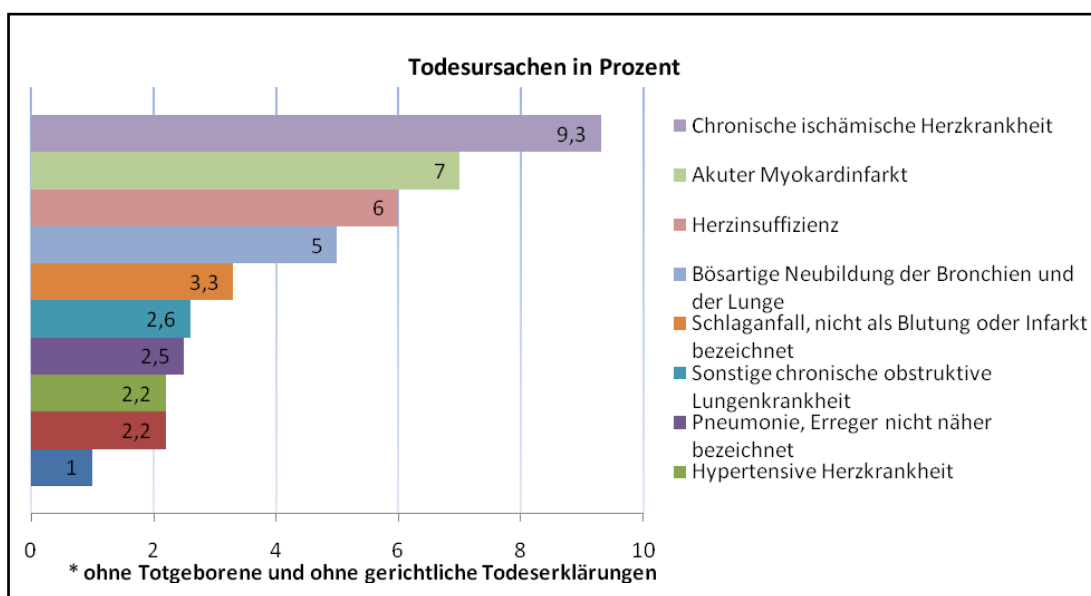
Graz, am 08/07/2009

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Kampf'.

## VORWORT

Neben den Zivilisationskrankheiten wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus Typ II und Adipositas, steht kaum ein zu dieser Kategorie gehörender Krankheitskomplex so im Blickpunkt der Wissenschaft und der Öffentlichkeit wie Herz- und Gefäßerkrankungen.

Die untenstehende Abbildung zeigt eindrucksvoll, dass die Gruppe der koronaren Herzkrankheiten eindeutig an der Spitze der Todesursachen liegen.



**Abbildung 1 Die zehn häufigsten Todesursachen (Deutschland 2007); Daten von (1)**

Herz-Kreislaufkrankungen sollen nach Schätzungen bis zum Jahr 2020 weiter ansteigen und einen Wert von 15% erreichen (2). Dazu zählt im engeren Sinne auch die Atherosklerose, welche in dieser Arbeit eine zentrale Rolle einnimmt.

Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium ist die operative Therapie, im Speziellen die Bypassoperation das Mittel der Wahl. Dieser Eingriff kann aber das Problem nicht an der Wurzel angreifen, sondern versucht nur mehr die bereits bestehende klinische Symptomatik zu verbessern. Dass die Durchgängigkeit der Umgehungsgefäße nach 12 Jahren nur noch 40% (3) beträgt, zeigt, dass man

präventive Maßnahmen weiter forcieren sollte. Gleichzeitig hat es durchaus Relevanz, auf dem Gebiet der Atherosklerose Forschung zu betreiben, um neue Ansatzpunkte für die Behandlung dieser chronischen Systemerkrankung zu finden.

## DANKSAGUNG

Diese Diplomarbeit wurde am Institut für Histologie, Embryologie und Zellbiologie der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Mag. Dr. Gerd Leitinger für sein Engagement und seine Unterstützung im Zuge meiner Tätigkeit danken. Ebenfalls gebührt Frau Bock Elisabeth Dank für ihre Präparationen im Bereich der Rasterelektronenmikroskopie und Frau Jäger Silke für ihre Hilfestellung im immunhistochemischen Bereich. Des Weiteren möchte ich mich bei der Klinischen Abteilung für Herzchirurgie der Universitätsklinik für Chirurgie des LKH-Universitätsklinikums Graz, insbesondere bei Dr. Meszaros Katharina, für die Zusammenarbeit bedanken.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich meinen Eltern aussprechen, die mich stets unterstützt und mich ermutigt haben, meinen Weg zu finden und zu gehen.

Danke,

meiner Frau Claudia und meiner Tochter Helena, die mir immer Kraft gegeben haben und mich in meinem Tun stets vorangebracht haben.

Zu guter Letzt möchte ich auch noch meine Freunde erwähnen, die mir in allen Lebenslagen beigestanden haben.

## ZUSAMMENFASSUNG

Atherosklerose – der Vorreiter der Zivilisationskrankheiten - ist im stetigen Fortschritt begriffen. Entsprechend der „response – to – injury – hypothesis“ steht am Anfang der Erkrankung, die Risikofaktoren außen vorgelassen, eine Verletzung der Gefäßinnenwand. Als Antwort setzt die Intima eine Kaskade von Proteinexpression in Gang, welche als Indikatoren der Schädigung dienen.

Als Untersuchungsmaterial wurde die humane Vena saphena magna herangezogen, die häufig als Graftgefäß in der Herzchirurgie verwendet wird. Dieses Gefäß des Unterschenkels wird unter Mitnahme von umgebenden Bindegewebe (non-touch-technique) freipräpariert und anschließend, nach Abbinden der Kollateralgefäße, auf Dichtheit überprüft. Der hierbei aufgewendete Druck, welcher potentiell das Endothel schädigt und so die Atherogenese in Gang setzt, ist der Ansatzpunkt dieses Projektes.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Untersuchung der Endothelschädigung an Stücken der Vena saphena magna nach der Dichteüberprüfung angewandt. Zum einen wurde mit immunhistochemischen Verfahren versucht eine zeitliche Abhängigkeit der Expression der Marker VCAM, ICAM und p-Selektin in den Endothelzellen zu zeigen. Über die mittlere Intensität der Fluorochrome wurden die Schnitte untereinander verglichen.

Zum anderen wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop eine Oberflächenbeurteilung durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zwei randomisierte Gruppen gebildet, wobei einerseits die Dichtigkeitsprüfung der Venen mittels Druckbegrenzung (103,43 mmHg) und andererseits ohne diese durchgeführt wurde. Die Auswertaufnahmen wurden mit 100facher Vergrößerung durchgeführt, um eine möglichst große Fläche auswerten zu können. Diese erfolgte über eine Auszählung der geschädigten Endothelzellen unter Zuhilfenahme eines Punktgitters. Zur Berechnung wurde die ausgewertete Gesamtfläche der Geschädigten gegenübergestellt und so ein prozentuelles Schädigungsmaß ermittelt.

Die immunhistochemischen Ergebnisse zeigen ein differentes Bild. ICAM weist eine progrediente Expression mit der Zeit auf. Das „vascular cell adhesion molecule“ zeigt von Anfang an ein erhöhtes Expressionslevel und steigert sich am Zeitpunkt t=3, um schließlich wieder auf das Ausgangsniveau zurückzukehren. Das Protein p-Selektin zeigt beginnend mit einer starken Erstexpression zum Zeitpunkt der Druckaufwendung ein rückläufiges Bild. Die rasterelektronische Untersuchung konnten keine signifikanten Ergebnisse zeigen. Vielmehr scheinen die Unterschiede zwischen den Individuen größer zu sein als der Unterschied zwischen den Gruppen.

## ABSTRACT

Atherosclerosis - the most common disease of civilisation – is still advancing. According to the „response – to – injury – hypothesis“, it starts with an injury of the most internal layer of the vein (however, the risk factors are not included in this notion). The endothelium shows an expression of proteins as an answer to the damage. These specific proteins were used as indicators for the damage in this study.

The human saphenous vein was used for examination. This vessel of the lower leg is a common graft for CABG. Saphenous vein grafts are harvested in the open no-touch-technique with a pedicle of surrounding tissue. Afterwards the patency of the vessel is proved by injecting autologous heparinized blood to rule out leakage. The pressure distension caused by this procedure may be one of the most important factors causing endothelial damage in saphenous bypass grafts.

Two different methods were applied here to assess the damage on pieces of human venae saphenae magnaе after the patency check. On the one hand we tried to show a temporal dependence of the expression of the three markers VCAM, ICAM und p-selectin with indirect immunohistochemistry. The results were compared by the relative intensity of the fluorochromes.

On the other hand the endothelial surface was assessed for damage with the help of a scanning electron microscope. For this, the patency check was either performed with a pressure valve to limit the injection pressure to 103.43 mmHg or without pressure valve. For the quantitative assessment images were taken at 100x magnification. A point grid was placed over the images, similar to stereological methods. The number of points counted as damaged, divided by the total number of points counted for each vein gave an estimate of the ratio of endothelial surface that had been damaged.

The immunohistochemical results did not show a uniform time course of expression levels. ICAM was progressively expressed over the time. Whereas VCAM exhibited a nearly stable progress, besides a significant elevation at t=3[h], p-selectin expression decreased in time after an initially high expression. The

assessments of the SEM-results did not reveal significant differences between the two groups. In fact, the differences in endothelial damage between the individuals appeared larger than the differences between the groups.

## INHALTSVERZEICHNIS

KAPITEL I	EINLEITUNG .....	1
KAPITEL II	THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....	3
	Atherosklerose .....	3
	Definition .....	3
	Ätiologie .....	4
	Pathogenese .....	5
	Histologie der humanen Gefäße .....	7
	Anatomie des menschlichen Herzens .....	9
	Einleitung .....	9
	Funktion .....	9
	Gefäßversorgung des Herzens .....	10
	Bypass Operation .....	11
	Definition .....	11
	Verwendete Materialien bzw. Gefäße .....	12
	Indikation .....	13
KAPITEL III	MATERIAL UND METHODEN .....	14
	IMMUNHISTOCHEMIE .....	14
	Einleitung .....	14
	Entstehung von Fluoreszenz .....	14
	Eigenschaften von Fluoreszenzspektren .....	15
	Prinzip der immunhistochemischen Reaktion .....	16
	Nachzuweisende Adhäsionsmoleküle .....	20
	Operationsablauf .....	22
	Kryoschnitte .....	22
	Positivkontrollen .....	25
	Versuchsaufbau .....	26
	Auswertung mit dem LSM .....	28
	Berechnung .....	34
	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE .....	35
	Probenvorbereitung .....	36
	Rasterelektronenmikroskop .....	39
	Studienaufbau .....	40

Auswertung .....	41
Berechnung.....	41
KAPITEL IV ERGEBNISSE .....	42
IMMUNHISTOCHEMIE.....	42
Einleitung .....	42
Auswertung .....	43
RASTERELEKTONENMIKROSKOPIE .....	51
Einleitung .....	51
Auswertung .....	52
KAPITEL V DISKUSSION .....	62
Einleitung .....	62
LSM .....	62
Konklusion.....	65
REM.....	66
KAPITEL VI BIBLIOGRAPHIE.....	68

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Die zehn häufigsten Todesursachen (Deutschland 2007); Daten von (1).....	II
Abbildung 2 Eröffnete Aorta mit atherosklerotischen Veränderungen (7) .....	3
Abbildung 3 Pathogenese der Atherosklerose (2) .....	5
Abbildung 4 Allgemeiner Bauplan von Gefäßen (9).....	8
Abbildung 5 Bypass (11) .....	11
Abbildung 6 Antigen-Antikörper-Komplex (14).....	16
Abbildung 7 Schema einer monoklonalen Antigen-Antikörper-Bindung (16).....	17
Abbildung 8 Schema einer polyklonalen Antigen-Antikörper-Bindung (17) .....	17
Abbildung 9 Schema der direkten (a) und indirekten (b) Methode der Immunfluoreszenz (18) .....	18
Abbildung 10 Darstellung der Objekträger .....	25
Abbildung 11 Darstellung der Objekträger .....	27
Abbildung 12 Aufbau eines LSM (27) .....	29
Abbildung 13 Positivkontrolle (ICAM t4).....	31
Abbildung 14 Nachweis von ICAM .....	32
Abbildung 15 Darstellung der Detektionskanäle von Cy3 und Cy5 .....	32
Abbildung 16 Definierung der ROIs (t4_ICAM_06).....	33
Abbildung 17 Oberfläche eines geschädigte (links) und eines intakten (rechts) Endothel- abschnittes der Vena saphena magna .....	35
Abbildung 18 Phasendiagramm von Wasser .....	37
Abbildung 19 Sputter (30) .....	38
Abbildung 20 Schema eines REM (31) .....	39
Abbildung 21 Punktgitter .....	41
Abbildung 22 Aufnahme t2_ICAM_05.....	44
Abbildung 23 Aufnahme t4_ICAM_04 .....	44
Abbildung 24 Dreidimensionale Darstellung von ICAM (rot) und vWF (blau).....	45
Abbildung 25 Aufnahme t4_VCAM_06 .....	47
Abbildung 26 Aufnahme t0_p_Selektin_03 .....	49
Abbildung 27 Aufnahme t4_p_Selektin_01 .....	49
Abbildung 28 p-Selektin und vWF    Abbildung 29 p-Selektin und vWF .....	50
Abbildung 30 Mechanischer Endothelschaden einer humanen Vena saphena magna .....	51
Abbildung 31 Präparat 298_02; Aufnahme_Ü2 lu.....	54
Abbildung 32 Präparat 299_02.....	55
Abbildung 33 Präparat 301_01; Aufnahme Ü2.1 .....	55
Abbildung 34 Präparat 304_02.....	56
Abbildung 35 Präparat 298_01; Aufnahme Ü2 .....	58
Abbildung 36 Präparat 299_01; Aufnahme Ü3.2 .....	58
Abbildung 37 Präparat 301_02; Aufnahme Ü2.2 .....	59
Abbildung 38 Präparat 304_03; Aufnahme Ü1.1 .....	60

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Risikofaktoren der Atherosklerose; modifiziert nach (2).....	4
Tabelle 2 Gefäßversorgung des Herzens; modifiziert nach (10) .....	10
Tabelle 3 Darstellung der Fluoreszenzspektren.....	15
Tabelle 4 Zeitreihe der Probenentnahme.....	22
Tabelle 5 Darstellung der Verdünnungsreihen.....	23
Tabelle 6 Begutachtung VCAM .....	24
Tabelle 7 Begutachtung p-Selektin .....	24
Tabelle 8 Begutachtung ICAM .....	25
Tabelle 9 Darstellung der verwendeten Konzentrationen .....	26
Tabelle 10 Verwendete Lösungen .....	27
Tabelle 11 Allgemeine Einstellungen des LSM.....	30
Tabelle 12 Spezifische Einstellungen des LSM .....	31
Tabelle 13 Randomisierung der Patienten inklusive aufgewendete Drücke.....	40
Tabelle 14 Ergebnisse ICAM.....	43
Tabelle 15 Ergebnisse VCAM .....	46
Tabelle 16 Ergebnisse p_Selektin.....	48
Tabelle 17 Prozentueller Schädigungsanteil mit Druckbegrenzung .....	53
Tabelle 18 Prozentueller Schädigungsanteil ohne Druckbegrenzung .....	57

## GRAPHENVERZEICHNIS

Graphik 1 Säulendiagramm der mittleren Fluoreszenz / Zeit von ICAM.....	43
Graphik 2 Säulendiagramm der mittleren Fluoreszenz / Zeit von VCAM .....	46
Graphik 3 Säulendiagramm der mittleren Fluoreszenz / Zeit von p-Selektin.....	48
Graphik 4 Punktdiagramm der Ergebnisse der Gruppe 1.....	61
Graphik 5 Punktdiagramm der Ergebnisse der Gruppe 2.....	61

## FORMELVERZEICHNIS

Formel 1 Formel zu Berechnung der mittleren Intensität aller ROIs.....	34
Formel 2 Formel zur Berechnung der prozentuellen Schädigung .....	41

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AOBS	akusto-optische Strahlteiler (engl. Acousto-Optical Beam Splitter)
VCAM	Zelladhäsionsmolekül (engl. vascular cell adhesion molecule)
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
HDL	High Density Lipoprotein
Hg	Quecksilber (lat.: hydrargyrum)
ICAM	Adhäsionsmolekül (engl.: intercellular adhesion molecule)
INF	Interferon
LCA	Arteria coronaria sinistra (engl. left coronary artery)
LCX	Ramus circumflexus (engl. left circumflex)
LDL	Low Density Lipoprotein
LSM	Laserscanningmikroskop
mo-LDL	minimal oxidiertes Low Density Lipoprotein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PTCA	perkutane transluminale coronare Angioplastie
PTFE	Polytetrafluorethylen
RCA	Arteria coronaria dextra (engl. right coronary artery)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIVA	Ramus interventricularis anterior (engl. left anterior descending; LAD)
RIVP	Ramus interventrikularis posterior
ROI	Region des Interesses (engl.: region of interest)
VCAM	Vaskular – Adhesions - Molekül (engl.: vascular cell adhesion molecule)
VLDL	very low density lipoprotein
vWF	von – Willebrand – Faktor
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope

## KAPITEL I EINLEITUNG

Da Atherosklerose eine systemische Erkrankung ist, kann diese natürlich nicht mit einer Bypassoperation, welche eine rein symptomatische Behandlung darstellt, geheilt werden. Daraus geht hervor, dass auch die Graftgefäße gegen pathogene Prozesse hinsichtlich atherosklerotischen Veränderungen nicht gefeit sind. Dies wurde von Fitzgibbon et al. (3) im Jahr 1996 in einer großen Studie gezeigt. Hierbei wurde eine Graftdurchgängigkeit von suboptimalen Graftgefäßen von 88% nach einem Jahr, von 75% nach 5 Jahren und von nur 50% nach 15 Jahren beschrieben. Bei der Verwendung von optimalen Graftgefäßen wurde eine Durchgängigkeit von 40% nach 12,5 Jahren gezeigt.

Die Tatsache, dass mechanischer Stress, Druck und Scherkräfte zu einer Expressionsteigerung von Proteinen am Gefäßendothel führen, wurde in einigen Studien bereits gezeigt. LaMack et al. (4) zeigten in vitro durch Aufwendung von Scherstress an Aorten von Schweinen mittels PCR eine Expression von verschiedenen Markern, welche auf eine Schädigung des Endothels hinweisen. Zhao et al. (5) wiesen mit ihrer Arbeit auf die Vulnerabilität von biologischem Material hin – insbesondere im Hinblick auf die Gewinnung von Bypassgefäßen. Chello et al. (6) zeigten in einem direkten Vergleich von Venae saphenae magnaе, als Untersuchungsobjekte von 20 verschiedenen Patienten, die sich einer Bypassoperation unterzogen, eine signifikante Expression von „Stressproteinen“, hervorgerufen durch Druckaufwendung auf das Gefäßendothel. Diese Proteine bilden die Andockstellen für Makrophagen, welche den Entzündungsprozess in Gang setzten, der entsprechend der „responce – to – injury – hypothesis“ (siehe Kapitel II Theoretische Grundlagen), für die Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen entscheidend ist.

Durch diese bereits gewonnen Erkenntnisse kann man davon ausgehen, dass eine Korrelation zwischen dem intraoperativ aufgewendeten Druck und dem Ausmaß der Beschädigung besteht.

Als Versuchsmaterial wurden humane Venen des Unterschenkels (Vena saphena magna) herangezogen, die als häufigstes Graftmaterial gelten. Die entnommenen Gefäßabschnitte werden mittels Spülung auf deren Dichtigkeit geprüft. Das Ausmaß der Schädigung wurde untersucht und es wurde überprüft, ob man mit einer Drucklimitierung beim Spülvorgang einer iatrogenen Schädigung entgegenwirken kann und so der Genese der Atherosklerose keinen Ansatzpunkt entsprechend der Pathophysiologie der Atherosklerose zu geben.

In diesem Projekt wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet. Einerseits wurde eine rasterelektronische Oberflächenbeurteilung von zwei Gruppen durchgeführt. Die Kontrollgruppe, mit vordefiniertem Spüldruck des Gefäßes, wurde mit der Gruppe von Patientenvenen verglichen, welche ohne Drucklimitierung auf Dichtheit geprüft wurden. Andererseits wurde immunhistochemisch nach einer zeitlichen Abhängigkeit der Expression der „Stressmarker“ ICAM, VCAM und p-Selektin gesucht.

Ziel dieses Projektes war es, durch Voruntersuchungen den weiteren Weg zu definieren und die Ziele einzugrenzen. Das Augenmerk sollte auf dem Benefit für den Patienten gerichtet sein, d.h., ob man durch neue Erkenntnisse die Rekonvaleszenz beschleunigen kann bzw. um pathologischen Prozessen keinen Nährboden auf Grund von medizinischem Wissensmangel zu bieten.

## KAPITEL II THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### Atherosklerose

#### Definition

Unter dem Begriff Arteriosklerose wird eine Reihe von Arterienerkrankungen zusammengefasst, welche allesamt durch eine Verfestigung der Gefäßwand mit einem daraus resultierenden Elastizitätsverlust und auch einer Lumeneinengung charakterisiert sind. Der Oberbegriff Arteriosklerose fasst folgende Gefäßerkrankungen zusammen (2):

- Atherosklerose; gekennzeichnet durch Lipideinlagerungen und Bildung fibröser Plaques in der Intima
- Mönckeberg – Mediaverkalkung; gekennzeichnet durch spangenartige Kalkablagerungen in der Media
- Arteriosklerose; gekennzeichnet durch den Befall von kleinen Arterien und Arteriolen in Assoziation mit Diabetes mellitus und Hypertonus

In dieser Arbeit spielt die Atherosklerose die entscheidende Rolle, welche aus klinischer Sicht auch die größte Relevanz hat. Abbildung 2 zeigt eindrucksvoll das Endstadium von atherosklerotischen Veränderungen anhand der Aorta.



Abbildung 2 Eröffnete Aorta mit atherosklerotischen Veränderungen (7)

Die WHO definiert dies als eine „variable Kombination von Veränderungen in der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia (2).“

## Ätiologie

Risikofaktoren für diese Erkrankung werden nach ihrer Relevanz für die Progression der Atherosklerose in Risikofaktoren erster und zweiter Ordnung unterteilt. Dies können genetische Prädispositionen sein oder auch Umwelteinflüsse.

genetische Prädisposition	Umweltfaktoren
erhöhte LDL/VLDL-Spiegel	fetteiche Ernährung
reduzierte HDL-Spiegel	Nikotinabusus
erhöhte Lipoprotein-A-Spiegel	niedrige Antioxidanzienpiegel
Homozysteinämie	Bewegungsmangel
familiäre Häufung	Infektionen (Chlamydien, ZMV)
Diabetes mellitus und Adipositas	
erhöhte Gerinnungsfaktoren	
Depressionen und Verhaltensstörungen	
Geschlecht	
Systemische Entzündungserkrankungen	
Metabolisches Syndrom	

**Tabelle 1 Risikofaktoren der Atherosklerose; modifiziert nach (2)**

**Pathogenese**

In den letzten Jahren hat sich neben einigen Theorien (Filtrationstheorie, Perfusionstheorie...) gezeigt, dass die „response-to-injury-hypothesis“ die gewonnenen Erkenntnisse am besten zusammenführt und so die beste Erklärung dieses polyätiologischen Prozesses liefert. Im Mittelpunkt des Prozesses der Entstehung der Atherosklerose steht ein inflammatorischer Prozess (8).

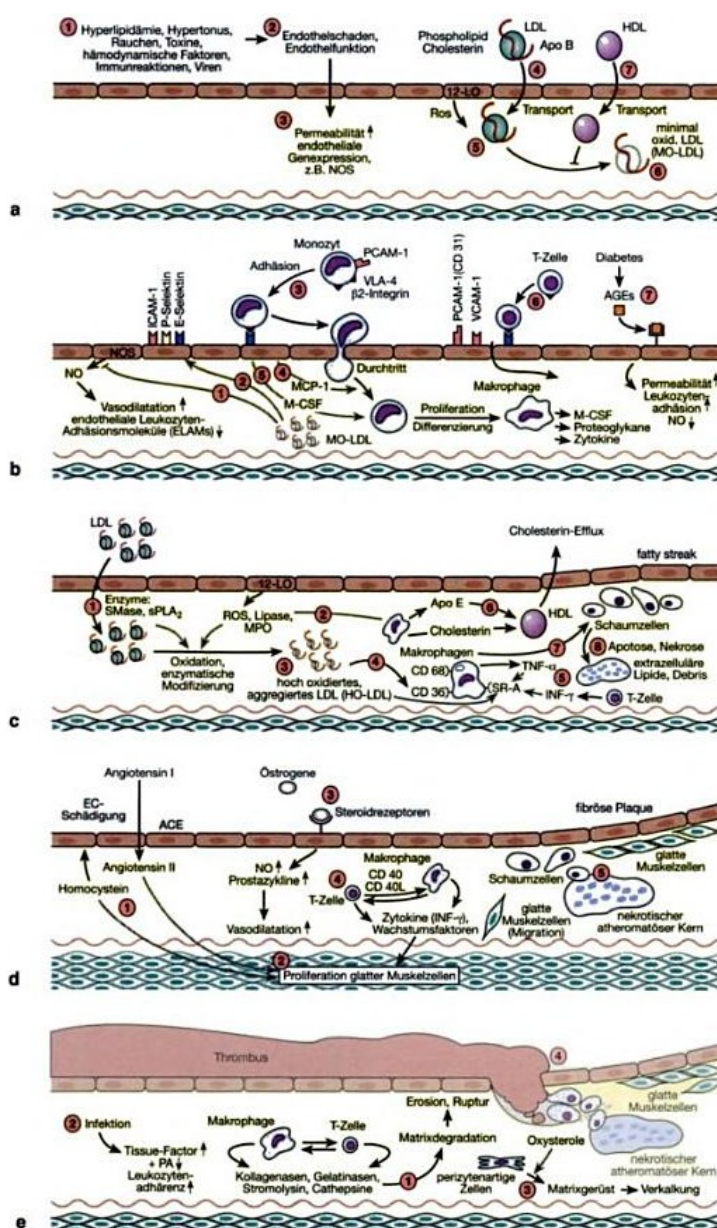


Abbildung 3 Pathogenese der Atherosklerose (2)

### Initiale Phase (a)

Zu Beginn des pathogenen Prozesses steht ein Endothelschaden bzw. eine endotheliale Dysfunktion, welche durch verschiedene Einflüsse (siehe Risikofaktoren) entstehen kann. Diese Störung der Integrität des Endothels führt zu einer Lipoproteinmigration - von vor allem Low-Density-Lipoprotein (LDL) - in die Intima. Ebenso treten auch andere Apoprotein B enthaltene Lipoproteine passiv durch das Endothel, wo das Cholesterin von High – Density – Lipoprotein (HDL ) wieder aufgenommen werden kann, aber teilweise auch zu minimal oxidiertem LDL (mo-LDL) umgebaut wird. HDL kann diesen Vorgang aber nur zu einem Teil verhindern (2).

### Inflammatorische Phase (b)

Durch die steigende Anzahl der mo-LDL kommt es zu einer Akkumulation dieser und zur Produktion von Chemokinen, welche die Adhäsion und Umwandlung von Monozyten aus dem Blut fördern. Die Monozyten wandeln sich in Zuge dieses Vorganges in Makrophagen um. Zusätzlich induzieren die mo-LDL eine Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 und PCAM-1 an den Endothelzellen. Diese Adhäsionsmoleküle erleichtern die Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten in die Intima. Diese Abfolge führt zu einem inflammatorischen Prozess.

### Schaumzellbildung (c)

Damit mo-LDL von den Makrophagen aufgenommen werden, muss es in eine hochoxidierte Form überführt werden. Mit der Andockung an die Scavanger-Rezeptoren und der Aufnahme dieser modifizierten LDLs, wandeln sich die Makrophagen in Schaumzellen um.

### Bildung fibröser Plaques (d)

Durch die Prozesse in der Intima wandern unter dem Einfluss von chemotaktischen Substanzen zahlreiche Lymphozyten ein. Diese Entzündungsreaktion aktiviert Zytokine, welche ein Einwandern glatter Muskelzellen forciert.

### Komplizierte Plaques (e)

Die Entzündungsreaktion bzw. die daraus resultierende Produktion von INF-gamma hemmt die Bildung der extrazellulären Matrix. Diese Matrixinstabilität birgt die Gefahr von Ulzerationen und Thrombosen durch Plaquestabilisierung.

Diese Arbeit setzt in der Initialen Phase an, wobei die Schädigung des Endothels durch eine äußere Krafteinwirkung entsteht (6).

## **Histologie der humanen Gefäße**

Generell kann man allen Gefäßen (mit ein paar speziellen Ausnahmen, z.B. intrakranielle Sinus) einen gemeinsamen Bauplan zuschreiben. Entsprechend den jeweiligen physiologischen Bedingungen der einzelnen Gefäßsegmente kann der Bauplan starke Variationen aufweisen. Beispielsweise ist in Gefäßen, die einem höheren intravasalen Druck entgegenwirken müssen, der muskuläre Anteil stärker ausgeprägt. Dies bezieht sich im Allgemeinen auf Arterien.

### Intima (Tunica intima)

Sie besteht aus dem Endothel und einer subendothelialen Schicht. Das Endothel ist ein einschichtiges Plattenepithel und stellt die entscheidende Barriere zwischen dem Intra- und Extravasalraum dar.

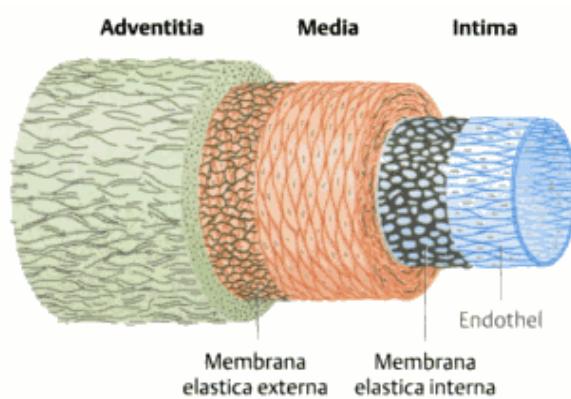
### Media (Tunica media)

Diese Schicht, bestehend aus glatter Muskulatur, ist für die Einstellung der Wandspannung verantwortlich und so respektive auch für die Gefäßweite.

Adventitia (Tunica adventitia oder externa)

Bindegewebe ist hier das vorherrschende Gewebe, und so dient diese Schicht der Einbettung des Gefäßes in die Umgebung.

Zusätzlich kann zwischen der Intima und der Media noch eine elastische Lamelle, die Membrana elastica interna, und zwischen der Media und der Adventitia die Membrana elastica externa vorkommen.



**Abbildung 4 Allgemeiner Bauplan von Gefäßen (9)**

## **Anatomie des menschlichen Herzens**

### **Einleitung**

Das muskuläre Hohlorgan Herz besteht aus vier Kammern – 2 Vorhöfe (Atrien) und 2 Hauptkammern (Ventrikel). Es liegt in der Perikardhöhle im mittleren Mediastinum, wobei jedoch ungefähr zwei Drittel des Organs links der Medianebene liegen (10).

### **Funktion**

Das menschliche Herz hat im Großen und Ganzen zwei wichtige Aufgabengebiete. Zum einen fungiert es als Pumporgan, zum anderen aber auch als endokrines Organ (10).

### **Pumporgan**

Funktionell kann man das Herz in eine rechte und linke Seite unterteilen. Jede Hälfte besteht aus einem Atrium und einem Ventrikel, welche zusammengeschaltet sind. Die beiden Herzhälften stehen über den Lungenkreislauf in Verbindung. Dieser sorgt für eine Anreicherung des venösen Blutes, das aus der Körperperipherie kommt, mit Sauerstoff. Das oxygenierte Blut wird dann über das „linke Herz“ wieder in den Körperkreislauf gepumpt, wo der Sauerstoff von den Körperzellen verbraucht wird und als venöses Blut zum „rechten Herzen“ zurückbefördert wird. Hier schließt sich der Kreis (10).

### **Endokrines Organ**

Durch Dehnungsreize getriggert, welche durch Erhöhung des Blutvolumens zustande kommen, schüttet das Herz - vor allem das rechte Atrium - ein

Polypeptid, das Atriale Natriuretische Peptid (ANP, Atriopeptin), aus. Dieses wirkt direkt auf die Nieren und führt zu einer erhöhten  $\text{Na}^+$  - und Wasserausscheidung. Nerval vermittelte Dehnungsreize des rechten Vorhofes führen zu einer reduzierten Freisetzung von ADH im Hypothalamus (antidiuretisches Hormon), was zu einer vermehrten Diurese führt (10).

### Gefäßversorgung des Herzens

Am Herzen unterscheidet man prinzipiell 2 Koronararterien, die nach ihrem Verlauf im Sulcus coronarius benannt sind:

- Arteria coronaria sinistra (engl. left coronary artery, LCA)
- Arteria coronaria dextra (engl. right coronary artery, RCA)

Die eben genannten Hauptstämme entspringen dem aufgetriebenen Sinus aortae. Die LCA teilt sich nach relativ kurzem Verlauf in den Ramus interventricularis anterior und den Ramus circulflexus (engl. left circulflex, LCX). Die RCA hingegen verläuft im Sulcus coronarius nach dorsal und gibt am Sulcus interventricularis posterior den ebenso genannten Ramus ab (10).

Die Versorgungsgebiete der Koronararterien sind in der untenstehenden Tabelle (Tabelle 2) vereinfacht ersichtlich.

Versorgungsgebiet	Koronararterie
Vorderwand	LCA über RIVA, RCA
rechter Ventrikel	RCA
Septum	ventral: LAD; dorsal: RIVP
linker Ventrikel	RCX, LAD
Sinusknoten	55% RCA; 45% LCA
AV-Knoten	90% RCA; 10% LCA

**Tabelle 2 Gefäßversorgung des Herzens; modifiziert nach (10)**

## Bypass Operation

### Definition

Unter dem Begriff „Bypass“ wird im Allgemeinen eine Umgehung verstanden. Im speziellen Fall der Herzchirurgie versteht man die Umgehung eines stenotisch veränderten Abschnittes einer oder mehrerer Koronararterien. Das Ziel ist es, die poststenotische Durchblutung und damit die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels zu gewährleisten. Die Operation wird routinemäßig mithilfe der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt.

Die Bypässe werden routinemäßig am stillgelegten Herzen an der Aorta ascendens und distal der Engstelle an der Koronararterie anastomosiert. Routinemäßig wird jede Koronararterie mit einer signifikanten Stenose ( $> 70\%$ ) mit einem Bypassgraft revaskularisiert.

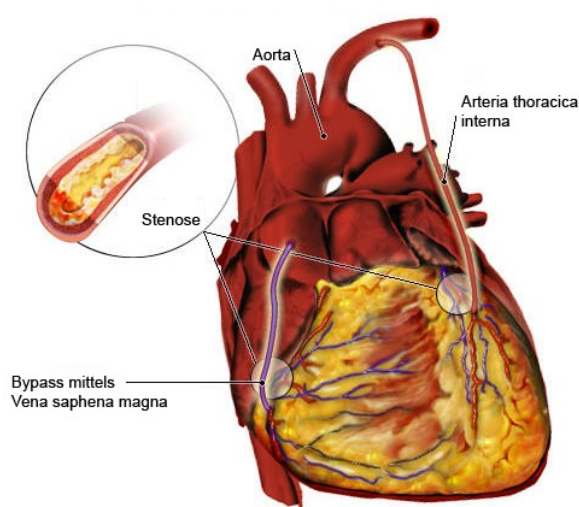


Abbildung 5 Bypass (11)

## Verwendete Materialien bzw. Gefäße

Diese Auflistung wird der Vollständigkeit halber angeführt. Es wird eigentlich ausschließlich patienteneigenes Graftmaterial verwendet. Auf Grund von wissenschaftlichen Vergleichen wurde ganz klar festgestellt, dass patienteneigene Venen den anderen Materialien überlegen sind (12).

Grundsätzlich kann man zwischen alloplastischem, xenogenem und autologem Graftmaterial unterscheiden.

Alloplastische, d.h. künstliche Bypässe, werden meist mit PTFE (Polytetrafluorethylen) oder Dacron® durchgeführt. Bei PTFE handelt es sich um ein flexibles, sehr weiches Thermoplast, welches einen niedrigen Reibungskoeffizienten besitzt. So soll die Wahrscheinlichkeit der Thrombenbildung und ein daraus resultierendes embolisches Ereignis minimiert werden. Weiters ist dieses synthetische Material biologisch inaktiv und durch seine antiallergischen und antiadhäsiven Komponenten seit den siebziger Jahren in der Bypasschirurgie weit verbreitet (12).

Dacron® ist eine gestrickte oder gewebte aus Fasern bestehende Gefäßprothese, deren Grundstoff Polyethylenterephthalat ist. Es ist elastischer als PTFE und wird mit verschiedenen Beschichtungen angeboten (zum Beispiel Gelatine-, Kollagen-, Heparin-, Silber-, Karbon- oder Fluopolymer-beschichtet). Dacron® findet jedoch lediglich bei aortoiliakalen oder femoropoplietalen Bypässen Anwendung (12).

Xenoplastische, d.h. aus einem andersartigen Organismus stammende, Materialien finden in der Bypasschirurgie eigentlich keinen Einzug. Sie werden hier der Vollständigkeit wegen angeführt. Verwendet werden z.B. Herzklappen von Schweinen bei Herzklappentransplantationen.

Als autologe, d.h. aus der selben Person entnommene Donorgefäße, welche unter den Angeführten auch das beste Ergebnis in Follow-Up Untersuchungen gezeigt haben, werden unter Berücksichtigung der unten angeführten Verwendungskriterien die Vena saphena magna, Arteria thoracica interna (sinistra et dextra)

oder in speziellen Fällen – beispielsweise bei Varizen der Vena saphena magna - die Arteria radialis verwendet.

Die Entscheidung über die Verwendung des Graftmaterials hängt schlussendlich vom Chirurgen ab, wobei mehrere Faktoren in die Entscheidungsfindung einfließen. Zum einen muss der physikalische Status, d.h. der Allgemeinzustand des Patienten beachtet werden, zum anderen muss aber auch die Operationszeit möglichst kurz gehalten werden, da ein Eingriff in diesem Ausmaß natürlich eine große Belastung für den Patienten darstellt. Nicht außer Acht zu lassen ist der Zustand des zu verwendenden autologen Bypassmaterials. Da der Hauptgrund für Bypassoperationen eine systemische Erkrankung – nämlich die Atherosklerose – ist, sind natürlich nicht ausschließlich die Koronararterien betroffen, sondern alle Gefäße des Körpers und damit auch die potentiellen Bypassgefäße. Weiters liegt das Problem in der Verpflanzung eines venösen Gefäßes in das Hochdrucksystem.

### **Indikation**

Die Indikationen zur Bypassoperation werden durch die Guidelines des „American College of Cardiology/American Heart Association Task Force“ gesetzt (13):

- Erkrankung der Arteria coronaria sinistra (sog. Hauptstammstenose)
- Erkrankung aller 3 Koronargefäße: Arteria coronaria sinistra, Ramus circumflexus, Arteria coronaria dextra
- diffuse therapieresistente Erkrankung mit perkutaner transluminaler coronarer Angioplastie (PTCA)

## **KAPITEL III MATERIAL UND METHODEN**

### **IMMUNHISTOCHEMIE**

#### **Einleitung**

Die Immunhistochemie wird verwendet, um Proteine am histologischen Schnitt darzustellen und auch zu quantifizieren. Sie beruht auf der Bindung zwischen Antikörpern und Antigenen. Die Antikörper erkennen spezifische Antigene und binden daran, was zur Bildung eines Antigen-Antikörpers-Komplexes führt. Im Fall dieser Arbeit wird mit in Aceton fixiertem menschlichem Gewebe gearbeitet, um drei verschiedenen Proteine über die Immunfluoreszenz zu untersuchen.

Die Immunfluoreszenz ist ein spezielles Teilgebiet der Immunhistochemie. Dieses Verfahren stützt sich auf die Verwendung von Fluorochromen, welche an Antikörper gebunden sind. Fluorochrome sind fluoreszierende Farbstoffe, welche unter bestimmten Bedingungen sichtbar gemacht werden können.

#### **Entstehung von Fluoreszenz**

Fluoreszenz entsteht, wenn Elektronen durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein höheres Energieniveau gehoben werden und nach dortiger kurzer Verweildauer wieder auf das Ausgangsniveau zurückfallen und dabei Emissionslicht aussenden.

## Eigenschaften von Fluoreszenzspektren

Ein Fluoreszenzmolekül kann innerhalb seines Anregungsspektrums mit unterschiedlicher Wellenlänge bestrahlt werden und sendet daraufhin Licht über ein charakteristisches Emissionsspektrum aus. Die Stärke der Anregung ist abhängig von der Wellenlänge, d.h., Licht unterschiedlicher Wellenlänge zeigt unterschiedliche „Anregungseffizienz“ mit einem für jedes Fluorochrom charakteristischen Maximum bei einer bestimmten Wellenlänge. Die Stärke des Emissionlichtes wird deshalb von zwei Faktoren - von der Strahlungsintensität des Anregungslichtes und von seiner Wellenlänge - bestimmt. Im Fall dieser Arbeit wurden folgende Anregungsmaxima verwendet (Tabelle 3).

<b>Fluorochrom</b>	<b>Anregungsmaximum [nm]</b>	<b>Emissionsmaximum [nm]</b>
Cy3	543	586
Cy5	633	670

**Tabelle 3** Darstellung der Fluoreszenzspektren

## Prinzip der immunhistochemischen Reaktion

Hier liegt das Prinzip des Antigen-Antikörper-Komplexes zu Grunde, d.h. die Bindung eines Antikörpers an das Epitop des Antigens entsprechend dem Schlüssel-Schloss-Prinzip.

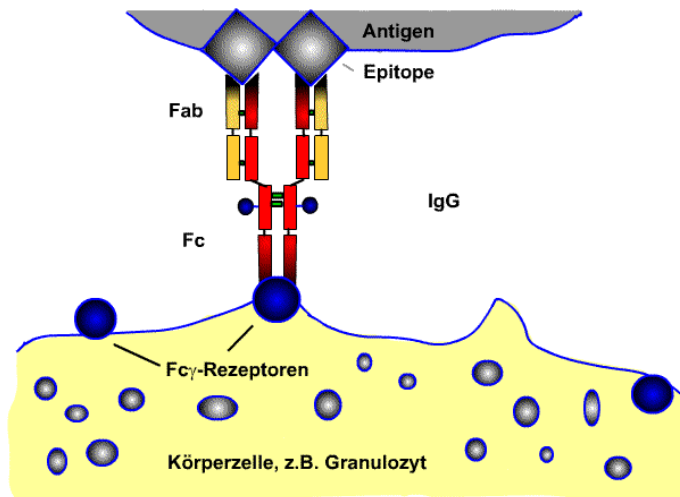


Abbildung 6 Antigen-Antikörper-Komplex (14)

Antikörper werden als Antwort auf den Kontakt mit Antigenen von B-Lymphozyten/Plasmazellen gebildet. Diese Immunglobuline bilden dann Antigen-Antikörper-Komplexe aus und das nicht nur in vivo, sondern auch in-vitro, was sich die immunhistochemische Untersuchung zu Nutzen macht.

Um eindeutig bestimmte Moleküle nachweisen zu können, benötigt man Immunglobuline, welche ausschließlich an das gewünschte Epitop binden. Man unterscheidet monoklonale und polyklonale Antikörper.

## Monoklonale Antikörper

Dieser Antikörpertyp ist gegen ein einziges Epitop gerichtet und entspringt aus einer Zelllinie (Klon). Dieser Umstand macht monoklonale Antikörper sehr spezifisch, jedoch auf Kosten der Sensitivität und Stabilität (15).

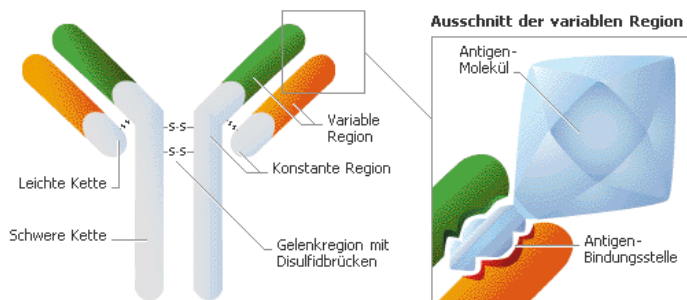


Abbildung 7 Schema einer monoklonalen Antigen-Antikörper-Bindung (16)

## Polyklonale Antikörper

Dies sind heterogene Antikörper verschiedener Plasmazellen und binden so an unterschiedliche Determinanten des Antigens. Beim Nachweis eines spezifischen Epitops durch Verwendung polyklonaler Antikörper kann es somit zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. Der Vorteil liegt wiederum darin dass die Erkennung unterschiedlicher antigenen Determinanten die Empfindlichkeit der Methode erhöht (15).

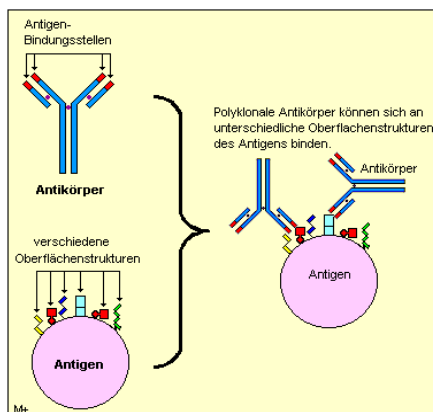


Abbildung 8 Schema einer polyklonalen Antigen-Antikörper-Bindung (17)

Man unterscheidet in der Immunfluoreszenz die direkte und die indirekte Methode.

### Direkte Methode

Bei der direkten Methode ist das Fluorochrom an den Antikörper gebunden, welcher an das Antigen bindet (Abbildung 9a).

### Indirekte Methode

Wie in Abbildung 9b gezeigt, kommen zwei Antikörper zum Einsatz. Der Primärantikörper bindet an das Antigen und bildet den Antigen-Antikörper-Komplex. Der Sekundärantikörper, an den das Fluorochrom gekoppelt ist, ist gegen die konstante Region des Primärantikörpers gerichtet (15).

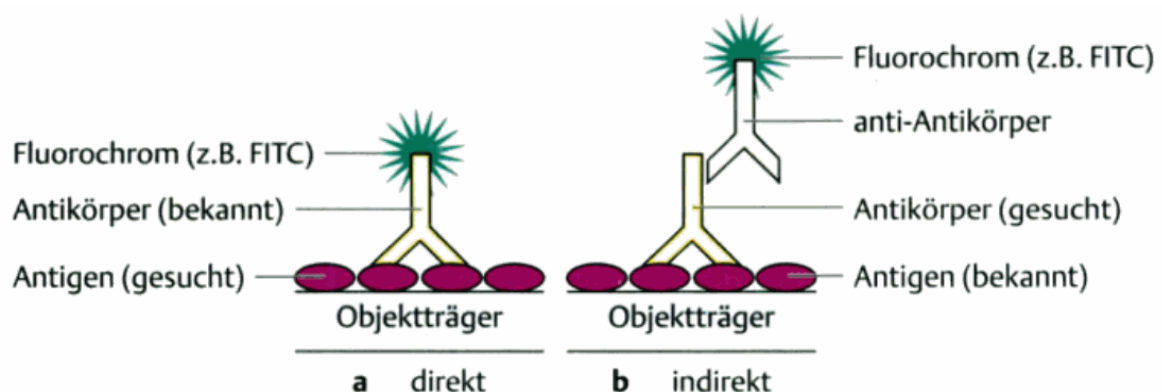


Abbildung 9 Schema der direkten (a) und indirekten (b) Methode der Immunfluoreszenz (18)

### Positivkontrolle

Die Positivkontrolle hat in der vorliegenden Arbeit den Zweck, Strukturen an histologischen Schnitten eindeutig nachzuweisen und soll die Orientierung erleichtern. In diesem speziellen Fall wird der von-Willebrand-Faktor (Faktor VIII), welcher in den Endothelzellen - genauer in den Weibel-Palade-Körperchen - von Gefäßen vorkommt, als Nachweis verwendet (19).

Wenn sich nun der Nachweis der Positivkontrolle mit dem Nachweis des gesuchten Moleküls örtlich deckt, kann man davon ausgehen, dass beide Moleküle in bzw. an der gleichen Zelle vorkommen.

### **Negativkontrolle**

Diese Kontrolle soll ausschließen, dass Sekundärantikörper unspezifisch an Epitope binden und dass es so zu falsch-positiven Ergebnissen kommt. Hier wird zum Nachweis der Primärantikörper nicht auf den Schnitt aufgebracht, sondern ausschließlich der Sekundärantikörper. Bei der Auswertung sollte man im Idealfall keinerlei Nachweis des Fluorochroms erkennen. Kann man dennoch deutliche Fluoreszenz erkennen, kann man entweder davon ausgehen, dass der Sekundärantikörper auch gegen andere Epitope gerichtet ist, oder dass Gewebe von sich aus fluoresziert („Autofluoreszenz“).

### **Isotypenkontrolle**

Zu diesem Zweck wurde je ein Schnitt mit Maus-Serum bzw. mit Kaninchen-Serum inkubiert und anschließend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper behandelt. Für die Kontrolle des vW - Faktors wurde das Kaninchenserum und für die Adhäsionsmoleküle das Mausserum verwendet. Dieses Vorgehen soll ausschließen, dass unspezifische Immunglobuline, welche ebenfalls in den Lösungen der Primärantikörper vorkommen, Bindungen eingehen und so falsch positive Ergebnisse liefern.

## **Nachzuweisende Adhäsionsmoleküle**

Mittels Immunfluoreszenz wurden drei verschiedene Adhäsionsmoleküle nachgewiesen. Dies sind Proteine, welche an den Endotheloberflächen exprimiert werden und so die Adhäsion von anderen Zellen möglich machen. Sie fungieren als Bindeglieder. Alle drei Proteine gehören der Familie der Zelladhäsionsmoleküle (CAM; engl. cell adhesion molecule) an.

### *Interzelluläres – Adhäsion - Molekül (ICAM; CD54)*

Dieses Protein wird in niedriger Konzentration in den Membranen von Leukozyten und Endothelzellen nachgewiesen. Nach Stimulation durch Zytokine, wie Interleukin (IL-1) und Tumornekrosefaktor (TNF $\alpha$ ), wird das Protein von Endothelzellen, Makrophagen und Lymphozyten verstärkt exprimiert. ICAM ist der Ligand des Integrin, eines Rezeptors von Lymphozyten. Nach Aktivierung und Bindung treten die Leukozyten entsprechend der „response-to-injury-hypothesis“ (siehe Kapitel II Theoretische Grundlagen) durch das Endothel hindurch und bilden so einen wesentlichen Bestandteil des inflammatorischen Prozesses (20).

### *Vaskular – Adhäsion - Molekül (VCAM; CD106)*

VCAM gehört zur Gruppe der Immunglobulin – Superfamilie und wird am Endothel durch Einwirken von Zytokinen via Transkription verstärkt exprimiert. Zytokine werden als Antwort auf gewisse Reize, in diesem Fall auf Dehnungsreiz bzw. Schädigung auf Grund von Dehnungsreizen von den betroffenen Zellen ausgeschüttet. Es hat die Aufgabe, das Andocken von Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten am Gefäßendothel zu bewerkstelligen.

*p-Selektin (CD62P)*

Selektine sind Glykoproteine, welche in eukaryontischen Zellen vorkommen. Es sind drei Subtypen bekannt: E-, P- und L-Selektin. Der Unterschied dieser liegt in der Aminosäurestruktur. E-Selektin ist in den Plasmamembranen von Endothelzellen zu finden, P-Selektin wird sowohl von Endothelzellen als auch von Blutplättchen exprimiert und L-Selectin wird von allen Leukozyten gebildet (21). Entsprechend der Studie von Cleator et al. (22) wurde gezeigt, dass p-Selektin über Thrombin, welches bei Verletzungen, in diesem Fall bei druckprovozierten Mikrotraumen des Endothels, freigesetzt wird, aktiviert wird und so seinen Teil zur inflammatorischen Genese bei Atherosklerose beiträgt.

*von – Willebrand – Faktor (vWF)*

Dieses Glykoprotein ist ein Baustein der Blutgerinnung und spielt vor allem eine Rolle in der Bindung von Faktor VIII und so in weiterer Folge in der Adhäsion von Thrombozyten (23). Aufgrund seiner stark positiven Expression in Endothelzellen (19, 23) wurde vWF in dieser Arbeit als Positivkontrolle und in Doppelfärbung mit den oben erwähnten Adhäsionsmolekülen zur Lokalisation der Endothelzellen verwendet.

## Operationsablauf

Nach Entnahme des Graftgefäßes aus dem Bein und mit Abschluss der Dichtheitsprüfung, wurde ein ca. 5cm langes Stück des Gefäßes abgetrennt und in autologem, heparinisierten Vollblut des Patienten gelagert. Die Übergabe des Probenmaterials wurde als Zeitpunkt  $t = 0$  der Zeitreihe definiert. Ein ca. 5mm langes Stück der Vene wurde chirurgisch abgetrennt und sofort in „Phosphate Buffered Saline“ (PBS) überführt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Daraufhin wurde der Rest des Gefäßes bei Raumtemperatur gelagert und in regelmäßigen Abständen wurden wieder 5mm lange Stücke abgetrennt, in PBS überführt und ebenfalls eingefroren (siehe Tabelle 4).

Bezeichnung	Zeit [h]	Bezeichnung
t = 0	0	mit PBS
t = 2	2	mit PBS
t = 3	3	mit PBS
t = 4	4	mit PBS

**Tabelle 4** Zeitreihe der Probenentnahme

## Kryoschnitte

Das Probenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff (77 Kelvin) aufbewahrt. Mit dem Kryostat HM560V wurden Gewebeschnitte mit jeweils einer Dicke von  $6\mu\text{m}$  angefertigt. Das Gewebe wurde auf einem speziellen Präparathalter aufgebracht und in Tissue-Tek® (einem Einbettmedium zur Gefrierschnittherstellung) eingebettet. Das Gewebe wurde so ausgerollt, dass Querschnitte beim Schneiden entstanden. Durch das Einfrieren des Einbettmediums mit dem darin enthaltenen Probenmaterial, erlangt das Gewebe bei einer Arbeitstemperatur von  $-20^\circ\text{C}$  eine solche Festigkeit, dass das Schneiden mit dem Mikrotom ohne größere Schwierigkeiten möglich ist.

Die Schnitte wurden auf einen Objektträger mit Raumtemperatur aufgebracht und bei Raumtemperatur mindestens 2 Stunden getrocknet. Die weitere Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank bei 4°Celsius.

Die Kryoschnitte wurden im weiteren Verlauf für die Immunhistochemie verwendet.

### **Voruntersuchungen zur Bestimmung der geeigneten Antikörperkonzentration**

Die Voruntersuchung bestand darin, die geeignete Antikörperkonzentration zu finden. Zu diesem Zweck wurden drei Konzentrationen (siehe Tabelle 5) in Anlehnung an die Datenblätter der Antikörperhersteller angenommen und mittels einer Verdünnungsreihe hergestellt. Als Verdünnungsmedium wurde Diluting Solution (Dako, Wien) verwendet.

<b>CD62P</b>	<b>CD54</b>	<b>CD106</b>
1:100	1:10	1:10
1:300	1:30	1:30
1:900	1:90	1:90

**Tabelle 5 Darstellung der Verdünnungsreihen**

Der Sekundärantikörper wurde mit einer Konzentration von 1:200 angewendet. Parallel dazu wurde eine Negativkontrolle hergestellt.

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur eine Stunde lang aufgetaut und dann mittels Azeton 5 Minuten fixiert. Mit einem Pap-Pen wurden die drei Schnitte pro Objektträger einzeln umrandet um ein Verrinnen der Antikörperlösung zu vermeiden. Nach dem Trocknen wurden die Gewebeproben mit PBS (pH = 7,4) rehydriert. Der pH-Wert des Puffers spiegelt die physiologischen Verhältnisse des

humanen Blutes wieder. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden Primärantikörper aufgebracht und nach der Inkubation von 30 Minuten in einer Dunkelbox für je 5 Minuten drei mal mit PBS gespült. Darauf folgte die Inkubation mit Sekundärantikörperlösung und ebenfalls drei Spülschritte zu je 5 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger in Aqua destillata überführt. Die Schnitte wurden in Mowiol eingedeckelt und die Ränder der Deckgläser mit Nagellack umrandet um eine ideale Konservierung zu erreichen. Die präparierten Objektträger wurden im Dunklen bei 4°C gelagert.

Die Schnitte wurden mittels Auflichtfluoreszenzmikroskop begutachtet.

#### **Objektträger 1\_VCAM (CD106)**

<b>Verdünnung</b>	<b>Beurteilung</b>	<b>Bemerkung</b>
1:10	Schnitt abgeschwommen	nicht auswertbar
1:30	Fluoreszenz gut ausgeprägt	-
1:90	geringe Fluoreszenz	-

#### **Tabelle 6 Begutachtung VCAM**

Trotz des Abschwimmens des Schnittes mit der Verdünnung 1:10, wurde vermutet, dass man mit dieser Konzentration die beste Färbung erzielen wird.

#### **Objektträger 2\_p - Selektin (CD62P)**

<b>Verdünnung</b>	<b>Beurteilung</b>	<b>Bemerkung</b>
1:100	Fluoreszenz stark ausgeprägt	-
1:300	Fluoreszenz schwach sichtbar	höhere [c] nötig
1:900	Schnitt abgeschwommen	nicht beurteilbar

#### **Tabelle 7 Begutachtung p-Selektin**

Bezugnehmend auf die obige Auswertung wurde entschieden die Verdünnung 1:100 zu verwenden.

**Objektträger 3\_ICAM (CD54)**

Verdünnung	Beurteilung	Bemerkung
1:10	Fluoreszenz sehr stark sichtbar	-
1:30	Fluoreszenz stark sichtbar	[c] reicht aus
1:90	Schnitt zerrissen	schwer beurteilbar

**Tabelle 8 Begutachtung ICAM**

Die Verdünnung von 1:30 wurde für die weiteren Versuche verwendet.

Bei den Negativkontrollen zeigte sich in allen 3 Schnitten eine minimale Fluoreszenz. Für die weiteren Versuche respektive für die Auswertung derer, wird die Sensitivität des Detektors soweit herabgesetzt, dass keine falsch positiven Ergebnisse detektiert werden konnten.

**Positivkontrollen**

Bei dieser Vorversuchsreihe wurde zusätzlich nach der Rehydrierung auf die Gewebeschnitte „Ultravision Block“ aufgebracht - eine spezielle Lösung zur Verminderung unspezifischer Bindung des Primär- und Sekundärantikörpers.

Bei Schnitten, die für den Nachweis von Adhäsionsmolekülen verwendet wurden, wurde jeweils eine Positivkontrolle mittels Darstellung des von-Willebrandt-Faktors (19, 24) durchgeführt.

Die Positivkontrolle ist mit einer Verdünnung von 1:400 durchgeführt worden.

ICAM 1:30	VCAM 1:10	Negativkontrolle	Objektträger
p-Selektin 1:100	Negativkontrolle Cy3_mouse	Negativkontrolle Cy5_rabbit	Objektträger

**Abbildung 10 Darstellung der Objektträger**

Die Isotypenkontrollen wurden mit äquivalenten Konzentrationen durchgeführt.

Bezeichnung	Konzentration
vWF	1:400
Cy3 rabbit	1:200
Cy5mouse	1:200
mouse IG	1:150
rabbit IG	1:2000

**Tabelle 9 Darstellung der verwendeten Konzentrationen**

Diese Vorversuchsreihe diente lediglich der Kontrolle der Konzentrationen und der Ausprägung der Positivkontrolle sowie der Isotypenkontrolle. Ebenso wurde der Schritt der Blockierung mit „Ultravision“ ins Protokoll aufgenommen. Die Färbung beinhaltete ausschließlich Schnitte von einem Entnahmezeitpunkt. Vor allem wurde dieser Vorversuch durchgeführt um Erfahrung zu sammeln und Fehler aufzudecken.

Aus den eben genannten Gründen wurden diese Ergebnisse nicht in die Auswertung eingeschlossen.

### **Versuchsaufbau**

Um systemische Fehler bei der Auswertung zu vermeiden, wurden nach Abschluss der Voruntersuchungen Präparate aller Zeitpunkte der Zeitreihe in einen Versuch einbezogen. So konnte sichergestellt werden, dass die Konzentrationen der Antikörper und die Inkubationszeiten für alle Objektträger respektive für alle Schnitte ident sind.

Die Objektträger wurden eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut bzw. getrocknet und währenddessen die zu verwendenden Lösungen (Tabelle 10) hergestellt.

Lösung	Konzentration
anti-human CD106	1:10
monoclonal antibody to CD62P	1:100
monoclonal antibody to CD54	1:30
Polyclonal Antibody to Human Factor VIII Related Antigen	1:400
Cy3 anti mouse	1:200
Cy5 anti rabbit	1:200
Mouse IG	1:225; 1:150; 1:750
Rabbit IG	1:2000

**Tabelle 10** Verwendete Lösungen

Als Verdünnungsreagenz wurde wieder Diluent Solution (Dako, Wien) verwendet.

Entsprechend dem Laborprotokoll wurden die Schnitte in Aceton für 5 Minuten fixiert und nach dem Verdunsten des Acetons die Schnitte mit einem Pap-Pen eingegrenzt. Die Schnitte wurden in PBS mit einem pH von 7,4 rehydriert und in weiterer Folge mit Ultravision Block behandelt.

Wiederum wurde bei jedem Schnitt, der für die Adhäsionsmolekülfärbung vorgesehen war, die Positivkontrolle (vWF) mitmarkiert.

Die Isotypenkontrolle für die Sekundärantikörper Cy3 und Cy5 wurde mit äquivalenten Konzentrationen durchgeführt.

Übersicht über die Objektträger bzw. die Schnitte:

ICAM 1:30	VCAM 1:10	p-Selektin 1:100	Objektträger
Negativkontrolle ICAM	Negativkontrolle VCAM	Negativkontrolle p-Selektin	Objektträger
Negativkontrolle	Negativkontrolle Cy5_rabbit	Autofluoreszenz	Objektträger

**Abbildung 11** Darstellung der Objektträger

Es wurde für jeden Zeitpunkt der Zeitreihe ein oben ersichtliches Regime angefertigt (Abbildung 11).

Die Inkubationszeit der Antikörper betrug jeweils 30 Minuten, unterbrochen durch Spülung der Proben von drei mal 5 Minuten in PBS. Nach dem abschließenden Spülen wurden die Objektträger in Aqua destillata überführt und wiederum in Mowiol eingedeckelt. Zur Fixierung wurden die Deckgläser mit Nagellack eingerahmt.

## **Auswertung mit dem LSM**

### Einleitung

Zur Auswertung des Probenmaterials wurde das Laser Scanning Mikroskop herangezogen, da es eine quantitative Beurteilung ermöglicht.

### Die konfokale Laserscanningmethode

In der konfokalen Mikroskopie werden Strukturen erkannt, indem das von einer Probe emittierte oder reflektierte Licht mittels Detektoren erfasst wird. Diese Methode wird in der Zellbiologie verwendet und sie basiert auf dem konfokalen Prinzip.

### Das konfokale Prinzip

Hierbei besteht die Möglichkeit, dass das emittierte Licht der angeregten Probe aus einer einzigen Ebene gesammelt werden kann. Bei der konfokalen Laserscanningmethode wird jeder Punkt bzw. jede Zeile sequentiell durch den Laser abgetastet und in weiterer Folge das Fluoreszenzlicht und Reflexionslicht der Probe über das Objektiv zurückgeleitet. Dadurch entstehen hochaufgelöste Abbildungen der Probe. Durch eine Lochblende wird sichergestellt, dass nur Licht aus dieser abzubildenden Ebene vom Detektor erfasst werden kann. Informationen, die nicht in der Fokusebene liegen, werden somit nicht abgebildet. Die Lochblende ist zur Fokusebene konjugiert, d.h. konfokal (25).

Indem man schrittweise die Fokusebene auf der z-Achse verschiebt, lassen sich dreidimensionale Bildstapel herstellen, die unter digitaler Verarbeitung zu dreidimensionalen Bildern werden (26, 27).

Die Arbeit wurde mit dem Leica TSC SP2 durchgeführt. Dieses ermöglicht mittels eines optischen Kristalls, des akusto-optischen Strahlteilers, einzelne Laserlinien zu selektieren. Am Kristall ist ein Ultraschallfeld angelegt, welches durch Modulation den Laser unterschiedlich stark beugt. Dadurch besteht die Möglichkeit ausgewählte Wellenlängen zu verwenden.

Der Kristall lenkt das Anregungslicht auf das Präparat und trennt vom Präparat zurückkommendes Fluoreszenzlicht und reflektiertes Anregungslicht.

Das Leica TSC SP2 arbeitet mit verschiedenen Anregungslasern. Ein Argon – Laser emittiert im blauen Spektrum; ein Neon/Helium – Laser im grünen Spektralbereich und ein weiterer im roten Spektrum.

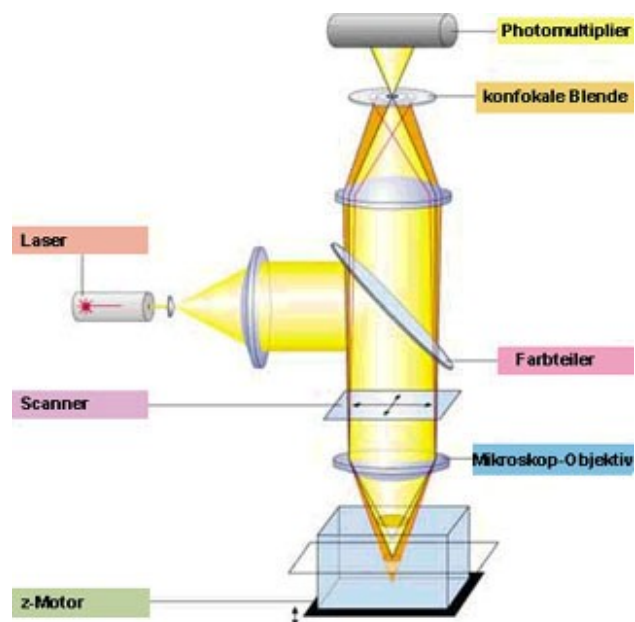


Abbildung 12 Aufbau eines LSM (27)

Einstellungen des LSM

Das Fluorochrom Cy3 wurde mit 543nm Laserlicht angeregt und in einer Bandbreite zwischen 550 und 614nm detektiert, das Fluorochrom Cy5 wurde mit 633nm angeregt und zwischen 650 und 750 nm detektiert. Tabelle 11 und Tabelle 12 fassen die allgemeinen und spezifischen Einstellungen des CLSMs zusammen.

Zuerst wurde die Sensitivität der Detektoren (Offset und HV) mit der Isotypenkontrolle so eingestellt, dass gerade keine Fluoreszenz messbar war. Danach wurde diese Einstellung gespeichert und als maximale Sensitivitätsstufe für die weiteren Untersuchungen angenommen. Die Sensitivität wurde nun nur mehr nach unten verändert, um ein Überstrahlen der Positivkontrolle zu vermeiden und so die Bildqualität zu gewährleisten.

Um Cross-Talk (Detektion der Fluoreszenz eines Fluorochroms im Detektionswellenlängenbereich eines anderen) zu vermeiden, wurden die beiden Fluorochrome hintereinander angeregt („Sequential Mode“).

**Allgemeine Einstellungen**

Resolution in Bit:	12
Logical Size:	1024x1024
Beam Expander	6
Objective	PLAN 50.0x0.75
Pinhole [airy]	1
Size-Width[ $\mu\text{m}$ ]	300.000.000
Size-Height[ $\mu\text{m}$ ]	300.000.000
Zoom	1.000.000
PMT 2 (Offs.)	-17.100.000
PMT 2 (HV)	633.645.955

<b>Detektionseinstellung</b>	CY3.18
SP Mirror 2 (left)	550.000.000
SP Mirror 2 (right)	614.000.000

<b>Detektionseinstellung</b>	CY5.18
SP Mirror 3 (left)	650.000.000
SP Mirror 3 (right)	750.000.000

**Tabelle 11 Allgemeine Einstellungen des LSM**

**Spezifische Einstellungen**

Detektorsensitivität VCAM

PMT 2 (Offs.) -17.100.000

PMT 2 (HV) 641.266.120

Detektorsensitivität ICAM

PMT 2 (Offs.) -17.100.000

PMT 2 (HV) 633.645.955

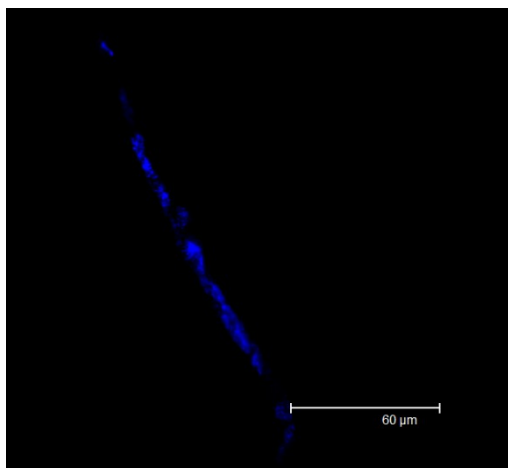
Detektorsensitivität p\_Selektin

PMT 2 (Offs.) -17.100.000

PMT 2 (HV) 700.468.933

**Tabelle 12 Spezifische Einstellungen des LSM**

Von jedem Schnitt wurden drei Aufnahmen aus repräsentativen Ausschnitten angefertigt; in jedem Ausschnitt wurden nacheinander zuerst Cy3 (zur Visualisierung des jeweiligen Adhäsionsmoleküls), dann Cy5 (zur Visualisierung der Positivkontrolle, vWF) aufgenommen.



Die nebenstehende Abbildung zeigt die Verteilung des Fluorochroms Cy5 zur Lokalisation des vWF in einem Venenschnitt. Mittels vWF-Markierung konnte das Venenendothel blau dargestellt werden.

**Abbildung 13 Positivkontrolle (ICAM t4)**

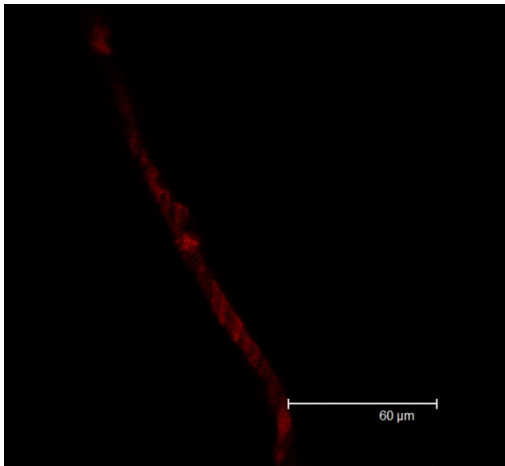


Abbildung 14 zeigt die Verteilung des Fluorochroms Cy3 zur Lokalisation des Adhäsionsmoleküls ICAM im selben Bildausschnitt wie Abbildung 13.

**Abbildung 14 Nachweis von ICAM**

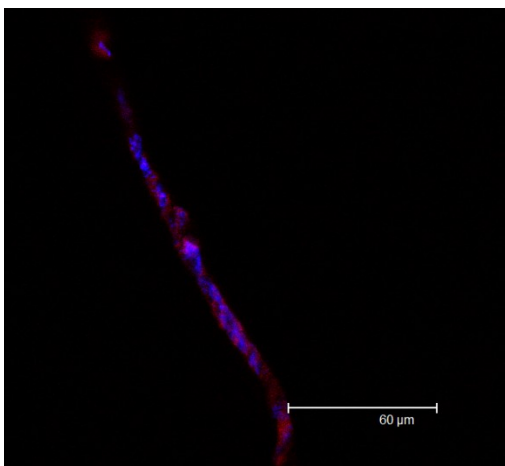


Abbildung 15 zeigt eine Überlagerung der Abbildung 13 und 14 und gibt einen Eindruck über die Expression von ICAM (rot) und ihren Zusammenhang zum durch vWF-Markierung dargestellten Venenendothel (blau).

**Abbildung 15 Darstellung der Detektionskanäle von Cy3 und Cy5**

Mittels der Negativkontrolle wurde die Sensitivität der Detektoren so eingestellt, dass keine Fluoreszenz mehr darstellbar war. Somit wurde sichergestellt, dass bei der Auswertung keine falsch-positiven Ergebnisse auftreten können.

Über die Positivkontrolle wurden unter starker Vergrößerung die „region of interest“ definiert. Dies geschah durch manuelles Nachzeichnen der Konturen der Fluoreszenzareale (Abbildung 16).

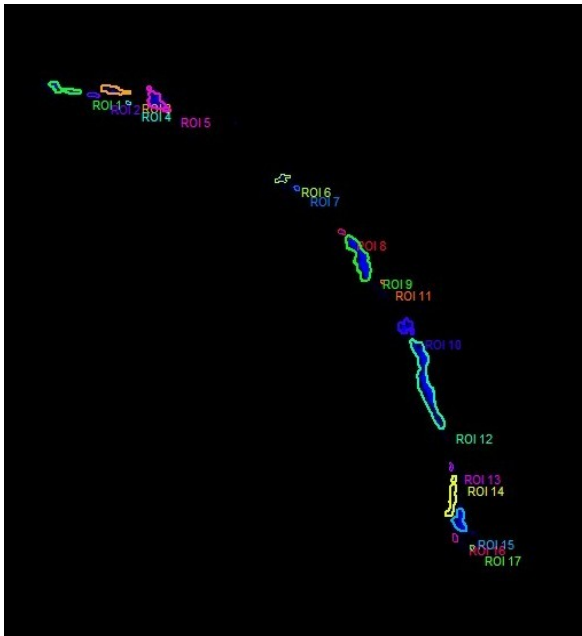


Abbildung 16 Definierung der ROIs (t4\_ICAM\_06)

Bei der Auswertung wurde durch Übereinanderlegen der auszuwertenden Fluoreszenzkanäle und der Positivkontrolle sichergestellt, dass nur die Areale beurteilt wurden, von denen man mit Sicherheit sagen kann, dass es sich um Endothel handelt. Die Zahl der Pixel innerhalb der ROIs und die Summe der Fluoreszenz-Intensitäten dieser Pixel wurden festgehalten.

## Berechnung

Zur Berechnung und respektive zum Vergleich der einzelnen Schnitte wurde die Summe der mittleren Intensität aller ROIs herangezogen.

$$\frac{[\text{Sum}(I)_1 + \text{Sum}(I)_2 + \text{Sum}(I)_n]}{[\text{Pixel}_{\text{Num } 1} + \text{Pixel}_{\text{Num } 2} + \text{Pixel}_{\text{Num } n}]} = \sum \text{ROI}(I)$$

Sum(I)                    quantitative Angabe der Intensitäten eines ROIs

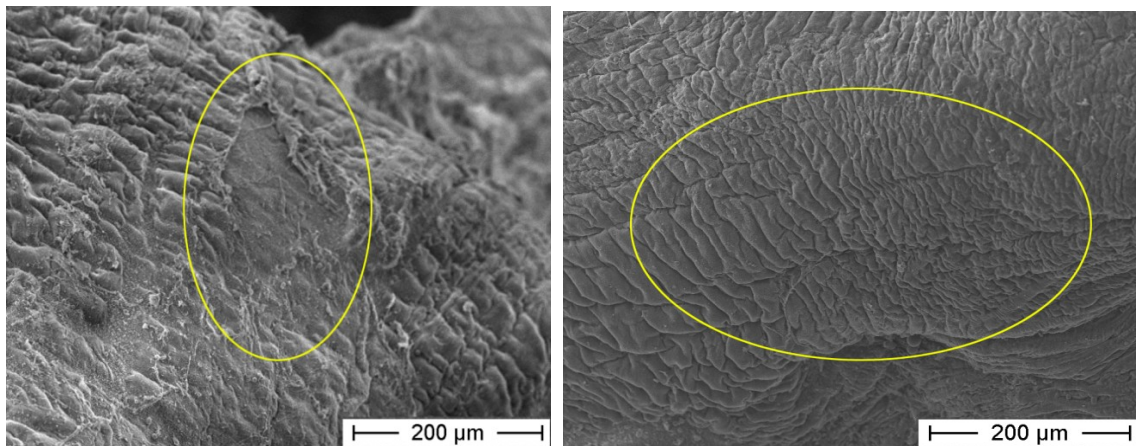
Pixel\_Num                Anzahl der Pixel innerhalb eines ROIs, welche Fluoreszenz aufweisen

### Formel 1 Formel zu Berechnung der mittleren Intensität aller ROIs

Über das Berechnungsergebnis ließ sich dann ein relativer Vergleich der Markerexpression über die Zeit zwischen den einzelnen Proben ziehen.

## RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Das Ziel der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung war es, die Belastungszonen des Gefäßendothels mittels Oberflächenbegutachtung darzustellen und die Beschädigung quantitativ zu evaluieren.



**Abbildung 17** Oberfläche eines geschädigte (links) und eines intakten (rechts) Endothelabschnittes der Vena saphena magna

Mittels des Rasterelektronenmikroskops (REM) ist es möglich, Flächenbeurteilungen des Endothels durchzuführen, weshalb diese Methode in diesem Versuch ausgewählt wurde.

## **Probenvorbereitung**

### Einleitung

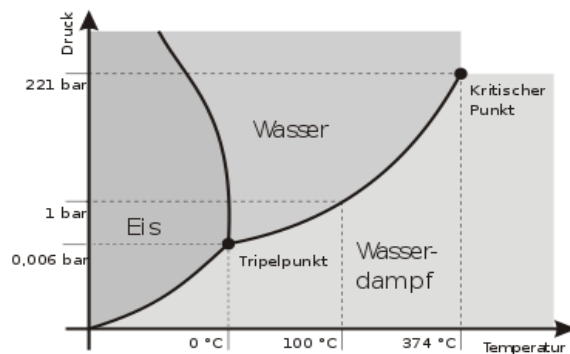
Um Gewebe im Rasterelektronenmikroskop untersuchen zu können, müssen diese vorbehandelt werden. Die zwei wesentlichen Schritte sind die Kritisch-Punkt-Trocknung und die Kathodenzerstäubung. In dieser Reihenfolge müssen die Verfahren auch angewendet werden.

### Fixierung und Dehydration

1. Fixierung des Gewebes mit 2% Paraformaldehyd / 2,5% Glutardialdehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) ( oder 0,1 M Natriumphosphatpuffer) mindestens 2 Stunden bei 20° C.
2. Auswaschen des Fixans mit Cacodylatpuffer oder Natriumphosphatpuffer mindestens 3 Stunden bei 20°C
3. Fixierung mit 2% Osmiumtetroxid in Cacodylatpuffer oder Natriumphosphatpuffer 0,1 M gelöst 2-3 Stunden bei 20° C
4. Auswaschen des Fixans mit Cacodylatpuffer oder Natriumphosphatpuffer mindestens 3 Stunden bei 20°C
5. Gewebepräparate in Probenkorb rasch übertragen; eine Antrocknung des Gewebes vermeiden.
6. Entwässerung mit 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 2 x 100% Ethanol je 30 Min.
7. 100% Aceton für 5 Minuten

### Kritisch-Punkt-Trocknung

Dieses physikalische Verfahren nutzt man zur kontrollierten und präzisen Abtrennung von Flüssigkeiten aus Feststoffen. Zweck dieses speziellen Trocknungsverfahrens ist es, die Gewebsstruktur so gut wie möglich zu erhalten. Bei der Lufttrocknung kommen Oberflächenspannungen zustande und diese deformieren und zerstören somit die Präparate. Um die auftretenden strukturschädigenden Kräfte zu verhindern, muss sichergestellt werden, dass beim Trocknungsprozess die Phasengrenze „flüssig – gasförmig“ nicht überschritten wird.



**Abbildung 18 Phasendiagramm von Wasser**

Die Trocknung findet bei diesem Verfahren über dem Kritischen Punkt des flüssigen Mediums statt. Dabei geht die Flüssigkeit direkt in den gasförmigen Aggregatzustand über. Hierbei entstehen keine Kapillarkräfte, die das biologische Probenmaterial schädigen könnten (28).

### Kathodenzerstäubung

Mit diesem Verfahren wurden die Gefäße mit einer elektrisch leitenden Schicht überzogen, um zu gewährleisten, dass beim Mikroskopievorgang keine bildstörenden elektrischen Aufladungen entstehen. Des Weiteren wird so eine bessere Sekundärelektronen-Emission erzielt. Die Kathodenzerstäubung wird auch „Sputtern“ (engl.: to sputter = zerstäuben) genannt. Sie beschreibt einen physikalischen Vorgang, bei dem Atome aus einem Festkörper, dem sogenannten „Target“, durch Beschuss mit energiereichen Ionen herausgelöst werden und in die Gasphase übergehen.

Dieser Vorgang wird in einer evakuierten Probenkammer durchgeführt. Die Kammer wird unter Einlassen von Argongas auf einen Druck von 0,05 mbar gebracht. Zwischen dem Objektstisch (Anode) und dem Sputter-Target (Kathode) wird eine Hochspannung angelegt und eine Glimmentladung gezündet. Die Argongas-Ionen, welche dabei zur Kathode hin beschleunigt werden, schlagen aus dem Sputter-Target Metallatome heraus, wodurch eine diffuse Metallatom-Wolke entsteht. Als Target werden Gold, Platin oder Gold/Palladium eingesetzt. Diese Wolke setzt sich auf der zerklüfteten Probe ab und überzieht sie mit einer homogenen, elektrisch leitenden Schicht (29).

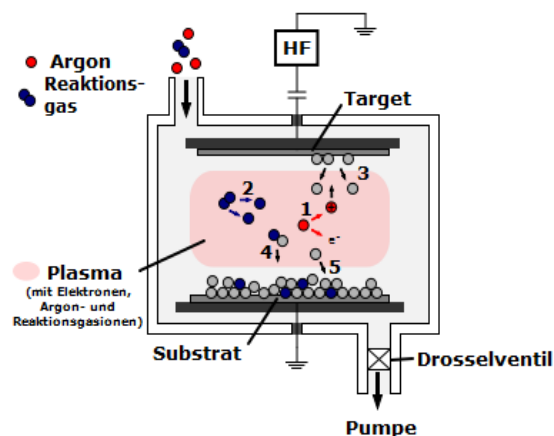


Abbildung 19 Sputter (30)

## Rasterelektronenmikroskop

Das Rasterelektronenmikroskop ermöglicht es, Oberflächen von Proben mittels Elektronen abzubilden. Elektronen werden von einer Elektronenquelle, dem Kathodenkopf (im Fall dieser Arbeit ein Wolframdraht) emittiert. Durch Erhitzen dieser Kathode werden Elektronen freigesetzt, welche über ein elektrisches Feld gegen die Anode beschleunigt werden.

Der Wehneltzylinder ist für das Fokussieren von Elektronenstrahlen zuständig. Er fungiert als Steuerelektrode, um die Helligkeit und die Intensität des Elektronenstrahls über eine angelegte Spannung einzustellen.

Durch Linsen, wobei meistens adaptierbare, magnetische Linsen verwendet werden, ist es möglich, die Brennweite einzustellen.

Der Vorgang der Elektronenbeschleunigung wird in einem Vakuumsystem durchgeführt, das dafür sorgt, dass die Elektronenquelle effizienter arbeiten kann und die Elektronen auf ihrem Weg nicht durch Kollision mit Gasmolekülen oder Schwebeteilchen (Staub) behindert werden.

Die Probenhalterung muss neben der Eigenschaft der stabilen Lage der Proben auch noch Manipulationsmöglichkeiten wie Verschiebung, Drehung, Heizung, Kühlung, Dehnung etc. aufweisen.

Schlussendlich werden noch Detektoren, die die Elektronen selbst oder sekundäre Signale registrieren, benötigt.

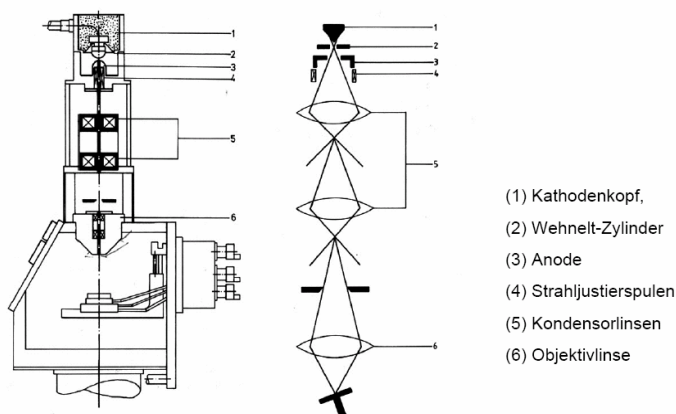


Abbildung 20 Schema eines REM (31)

### Abrastern der Probenoberfläche

Der Primärelektronenstrahl wird zeilenweise über die Oberfläche des Objekts geführt (Rastern), während das vom Detektor registrierte Signal in Grauwertinformationen umgewandelt und synchron auf dem Bildschirm dargestellt wird. Sind alle Zeilen des Bildes abgetastet, fängt das Rastern wieder am oberen Bildrand an und ein neues Bild wird erzeugt.

### **Studienaufbau**

Präoperativ wurden die Patienten randomisiert und in zwei Gruppen unterteilt. Bei Gruppe 1 wurde die Dichtigkeitsprüfung mit einer Druckbegrenzung von 103,43 mmHg durchgeführt, wohingegen bei Gruppe 2 keine Druckbegrenzung stattfand, jedoch eine Druckmessung während des Spülvorganges. Jeder Gruppe wurden vier Patienten zugeteilt.

<b>Gruppe 1</b>		<b>Gruppe 2</b>	
	mm Hg		mm Hg
Patient 1.1	103,43	Patient 2.1	258
Patient 1.2	103,43	Patient 2.2	198
Patient 1.3	103,43	Patient 2.3	225
Patient 1.4	103,43	Patient 2.4	293

**Tabelle 13 Randomisierung der Patienten inklusive aufgewendete Drücke**

Zur Auswertung wurden mit dem REM Aufnahmen in hundertfacher Vergrößerung angefertigt. Diese Vergrößerungsstufe hat sich als ideal erwiesen, da man auftretende Schäden gut erkennen kann und des Weiteren eine große Fläche betrachten und beurteilen kann.

## Auswertung

Ein Punktgitter (32) wurde über die Aufnahmen gelegt, wobei dem Zufall überlassen wurde wo genau es zu liegen kam (Zufallsbedingte Stichprobenentnahme). Danach wurde jeder Punkt dahingehend evaluiert, ob er auf einer geschädigten oder intakten Endothelzelle lag.

```
+++++
+++++
+++++
+++++
+++++
+++++
+++++
```

Abbildung 21 Punktgitter

## Berechnung

$$p = \frac{\sum a}{\sum a + b}$$

- a geschädigte Zellen  $\approx$  geschädigte Fläche
- b intakte Zellen  $\approx$  intakte Fläche

### Formel 2 Formel zur Berechnung der prozentuellen Schädigung

Die Berechnung wurde für jede Probe mit der oben gezeigten Formel durchgeführt und gibt ein Verhältnis der Schädigung der Endotheloberfläche an. Endothelzellen, die nicht eindeutig einem Punkt zugeordnet werden konnten, wurden ebenso wenig in die Beurteilung einbezogen wie Areale, die durch Überlagerungen von Proteinen, Erythrozyten etc. nicht auswertbar waren.

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests.

## **KAPITEL IV    ERGEBNISSE**

### **IMMUNHISTOCHEMIE**

#### **Einleitung**

Zur Auswertung von Endothelschäden wurden humane Proben (Vena saphena magna) von Patienten, welche sich einer Bypassoperation unterzogen ließen, verwendet. Die Proben wurden gemäß einer Zeitreihe entnommen, um eine zeitliche Korrelation der Expression von Schädigungsmarkern zu untersuchen. Entsprechend wurde als Nachweismethode die indirekte Immunfluoreszenzmethode gewählt, um die Proteine, welche Schäden demaskieren, optisch fassbar zu machen. Computergestützt wurde die relative Intensität der Fluoreszenzausprägung innerhalb einer Zeitreihe evaluiert.

Die berechneten Werte, welche die mittlere Intensität widerspiegeln, wurden graphisch in Form von einem Säulendiagramm dargestellt, um einen besseren Eindruck über den Expressionsverlauf zu bekommen.

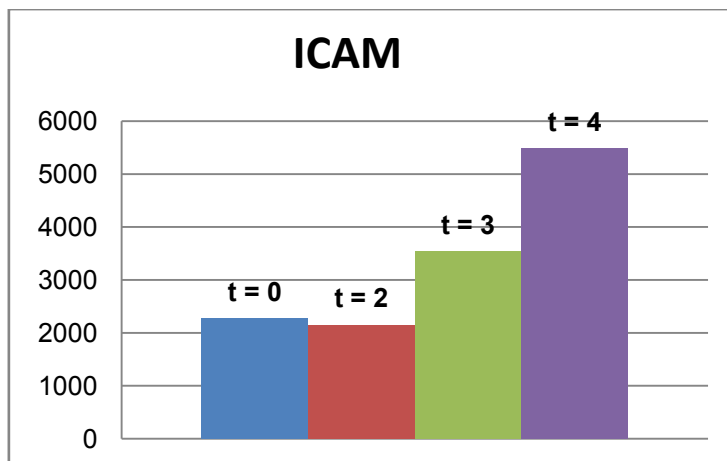
In den Tabellen 14, 15 und 16 sind die zur Berechnung erforderlichen und die Endergebnisse, zugeordnet zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten, entsprechend jedes Markers, ersichtlich.

## Auswertung

### ICAM

Präparat	$\Sigma$ Sum (I)	$\Sigma$ Pixel Num.	$\Sigma$ ROI (I)
t0_ICAM	46799162	1057372	2277,1883
t2_ICAM	5705637	6769	2154,5930
t3_ICAM	9572887	8203	3539,6937
t4_ICAM	18187215	12005	5478,7340

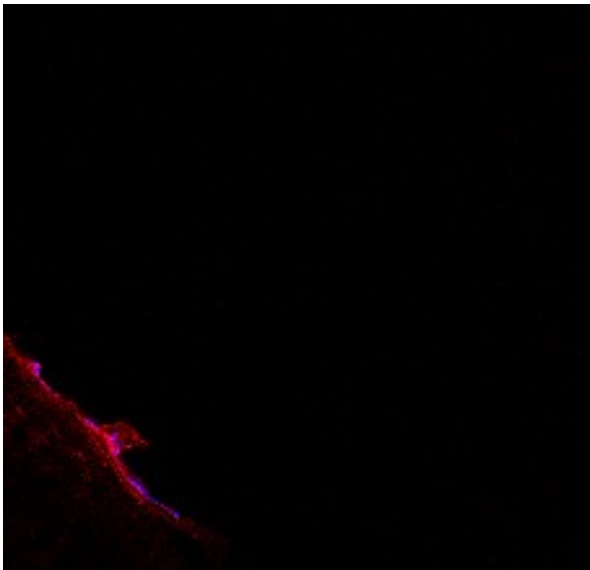
**Tabelle 14 Ergebnisse ICAM**



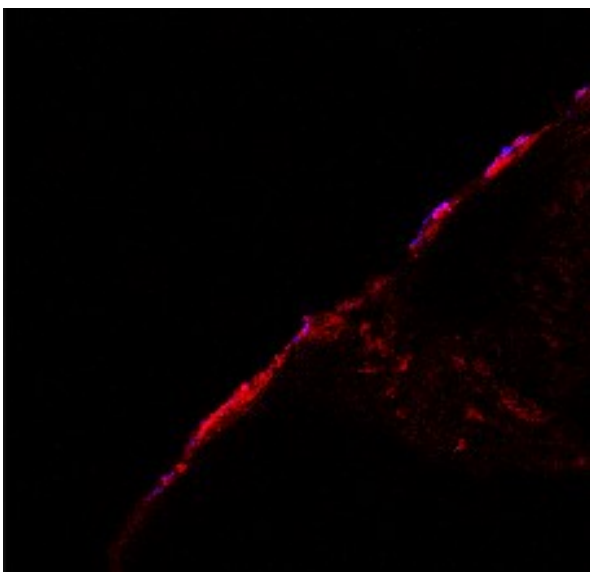
**Graphik 1 Säulendiagramm der mittleren Fluoreszenz / Zeit von ICAM**

Die graphische Darstellung der erworbenen Werte zeigt deutlich eine Zunahme der Fluoreszenz mit der Zeit. Diese ist ab drei Stunden nach der Entnahme (Zeitpunkt t=3) deutlich messbar, scheint aber 2 Stunden nach der Entnahme (Zeitpunkt t=2) noch nicht eingesetzt zu haben. Dies kann man mit einer progredienten Expression von ICAM gleichsetzen, die zwischen 2 und 3 Stunden nach der Entnahme des Gewebestücks sichtbar wird.

Die nachfolgenden Overlay – Abbildungen (Abbildung 22 und Abbildung 23) zeigen die immunhistochemischen Färbungen des Markers ICAM (rot) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Abbildung 22 wurde zum Zeitpunkt t=2 entnommen, wohingegen Abbildung 23 zum Zeitpunkt t=4 entnommen wurde. Als Positivkontrolle (blau) wurde, wie beschrieben, der von-Willebrand-Faktor verwendet.



**Abbildung 22 Aufnahme t2\_ICAM\_05**



**Abbildung 23 Aufnahme t4\_ICAM\_04**

Mit graphischer Aufbereitung ist es möglich, eine dreidimensionale Darstellung (Abbildung 24) der Daten, welche in einem speziellen Scanverfahren gewonnen wurden, darzustellen. Das Präparat wird zu diesem Zweck in einem definierten Bereich in mehreren Ebenen entsprechend der z-Achse gescannt.

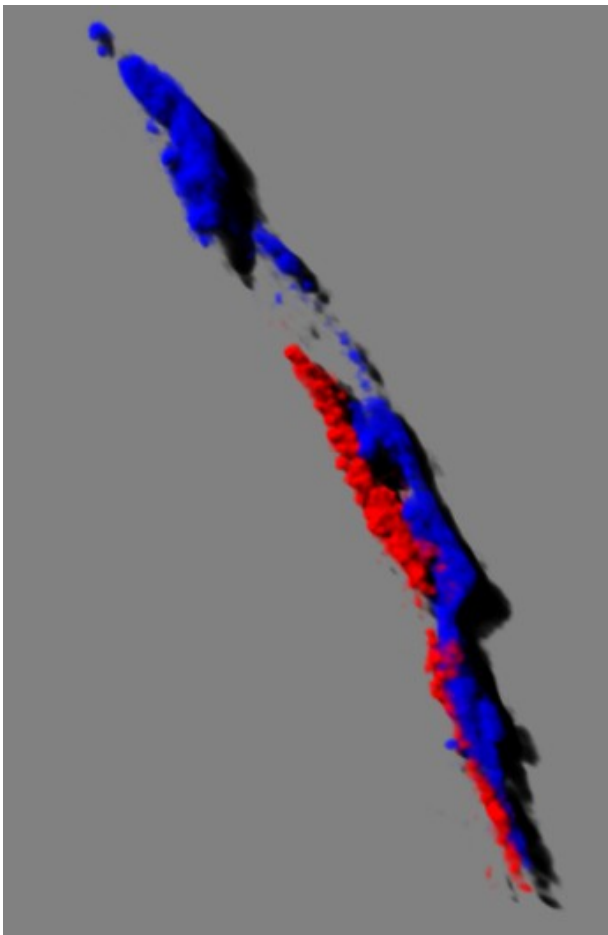
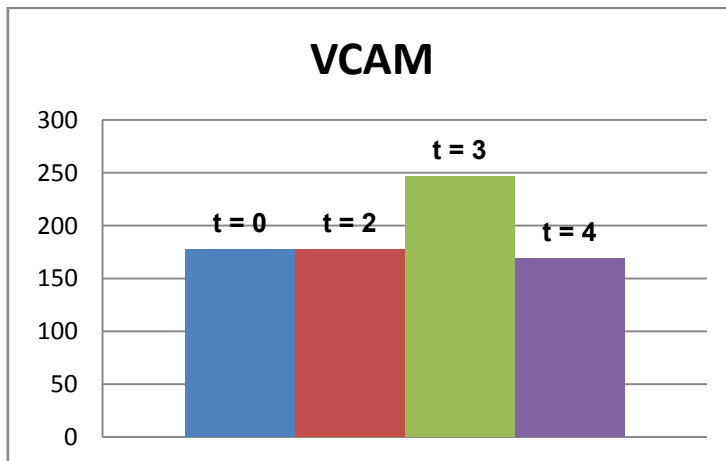


Abbildung 24 Dreidimensionale Darstellung von ICAM (rot) und vWF (blau)

**VCAM**

Präparat	$\Sigma$ Sum (I)	$\Sigma$ Pixel Num.	$\Sigma$ ROI (I)
t0_VCAM	751947	12486	177,75065
t2_VCAM	404512	7458	177,00882
t3_VCAM	1056496	12639	246,78317
t4_VCAM	402509	7653	169,00860

**Tabelle 15 Ergebnisse VCAM****Graphik 2 Säulendiagramm der mittleren Fluoreszenz / Zeit von VCAM**

Die Expression von VCAM bleibt zu den Zeitpunkten t=0, t=2 und t=4 annähernd konstant, wohingegen die Fluoreszenz zum Zeitpunkt t=3 einen deutlich erhöhten Wert zeigt.

Abbildung 25 zeigt eine Overlay – Aufnahme von VCAM zum Zeitpunkt  $t=4$ . Mit freiem Auge ist hier beinahe keine Fluoreszenz von VCAM (rot) wahrzunehmen. Das Endothel wurde durch Cy3 (blau) anhand vom vWF markiert und dargestellt.

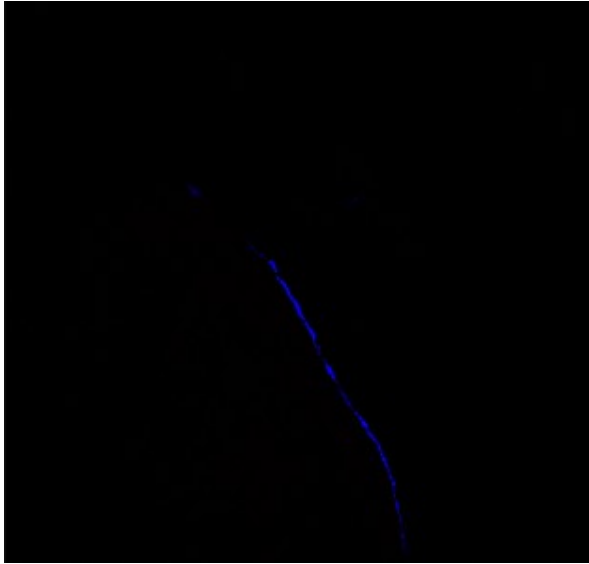
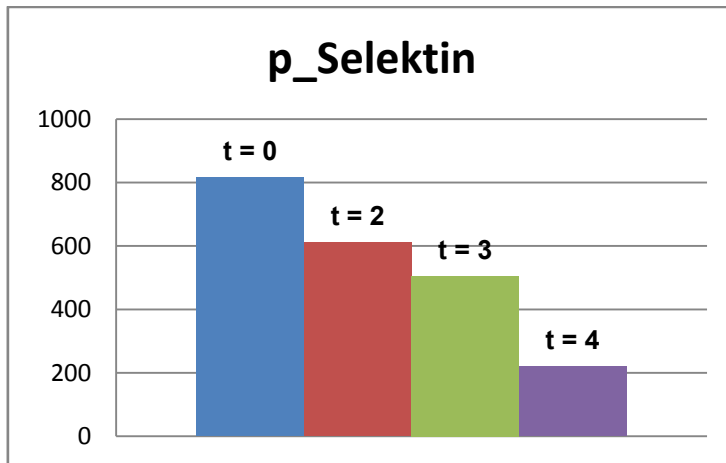


Abbildung 25 Aufnahme t4\_VCAM\_06

**p-Selektin**

Präparat	$\Sigma$ Sum (I)	$\Sigma$ Pixel Num.	$\Sigma$ ROI (I)
t0_p_Selektin	309073	2319	815,7274
t2_p_Selektin	2928175	23205	611,8210
t3_p_Selektin	630113	3496	505,0607
t4_p_Selektin	656119	8620	220,8180

**Tabelle 16 Ergebnisse p\_Selektin****Graphik 3 Säulendiagramm der mittleren Fluoreszenz / Zeit von p-Selektin**

Das Protein p-Selektin zeigt eine fortschreitende Abnahme mit der Zeit. Der Zeitpunkt der Entnahme der Vene stellt den höchsten Wert der Expression dar; die Abnahme der Expression von p-Selektin ist bereits ab dem Zeitpunkt t=2 Stunden deutlich erkennbar und sinkt bis zu Zeitpunkt t=4 Stunden um das 3,7 fache ab.

Abbildung 26 zeigt neben dem vWF (blau), p-Selektin (rot) zum Zeitpunkt  $t=0$ .



Abbildung 26 Aufnahme t0\_p\_Selektin\_03

Abbildung 27 zeigt einen Ausschnitt vom selben Präparat zum Zeitpunkt  $t=4$ .  
Wiederum handelt es sich um eine Overlay – Abbildung, in welcher Cy5 (rot) als  
Markerfarbstoff, und Cy3 (blau) als Positivkontrolle dargestellt wird.

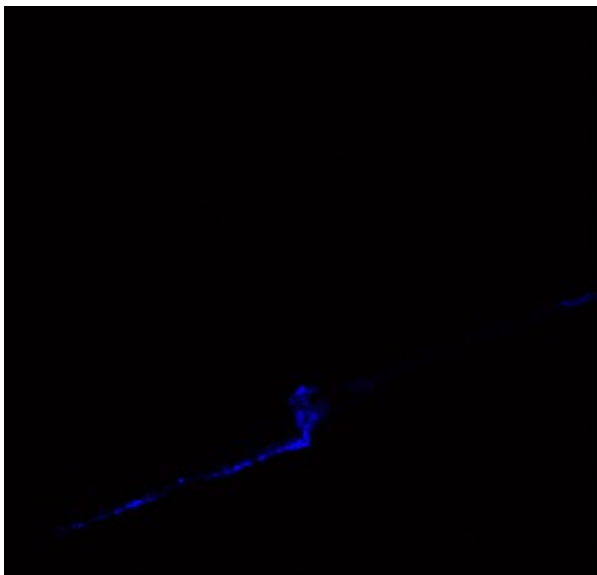


Abbildung 27 Aufnahme t4\_p\_Selektin\_01

Abbildung 28 zeigt p-Selektin (rot) und den von-Willebrand-Faktor (blau) nach computergestützter Auswertung und Darstellung der Serienaufnahme. Die identen Daten wurden verwendet, um eine dreidimensionale Darstellung (Abbildung 29) von derselben Aufnahme zu erstellen.

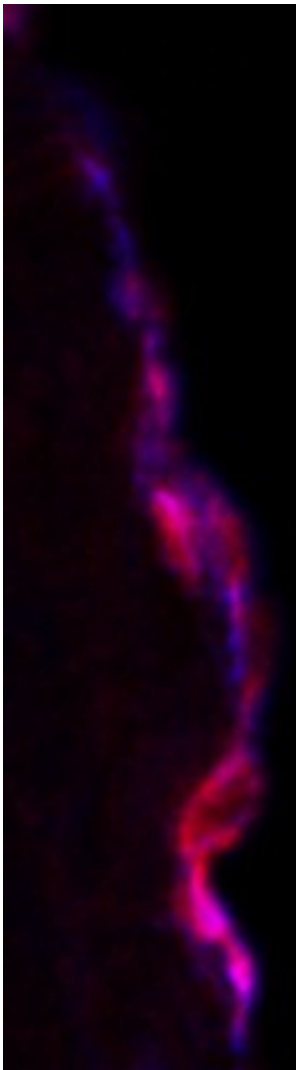


Abbildung 28 p-Selektin und vWF

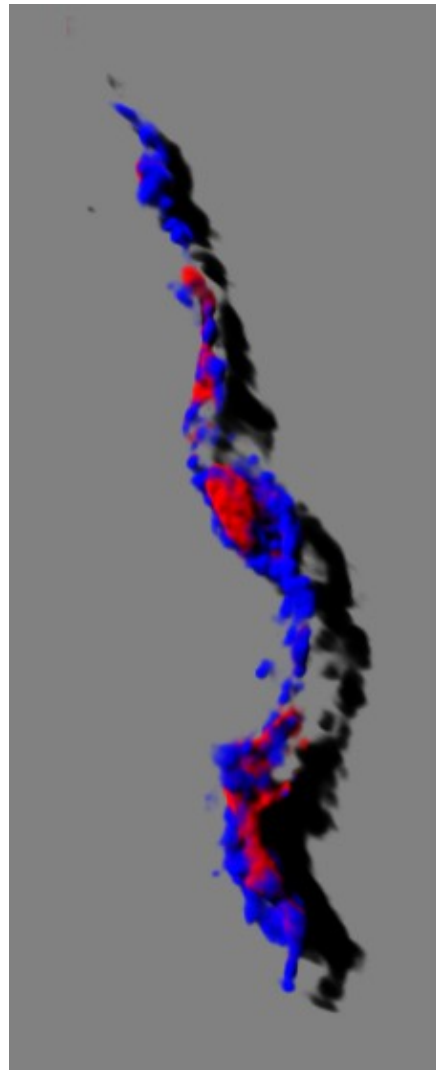


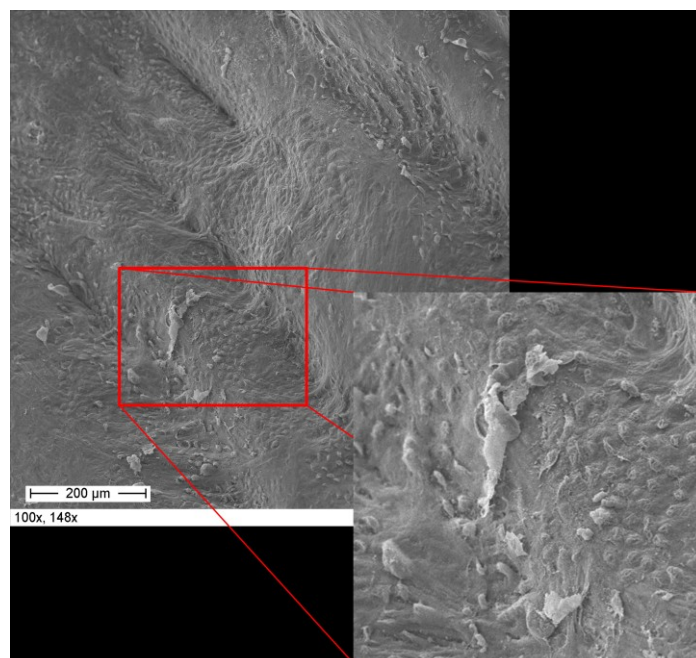
Abbildung 29 p-Selektin und vWF

## RASTERELEKTONENMIKROSKOPIE

### Einleitung

Die Oberflächenbeurteilung des Probenmaterials wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt. Mit dieser Methode war es möglich einen Großteil des Endothels darzustellen und auch auszuwerten.

Die Randomisierung wurde an der Klinischen Abteilung für Herzchirurgie der Universitätsklinik für Chirurgie des LKH-Universitätsklinikums Graz durchgeführt. Nach Übergabe des Probenmaterials wurde jede Probe am Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie mit einer Nummer versehen, um die Auswertung möglichst objektiv durchführen zu können. Die Präparation der Versuchsvenen für die Rasterelektronenmikroskopie wurde ebenfalls am Institut für Zellbiologie, Histologie und Embryologie vollzogen.



**Abbildung 30 Mechanischer Endothelschaden einer humanen Vena saphena magna**

Die Auszählung erfolgte „blind“ von insgesamt acht Präparaten, d.h. von vier Patientenproben pro Gruppe.

## Auswertung

Bei allen 8 Individuen aus beiden Gruppen waren teilweise Schäden an der Endotheloberfläche sichtbar; die geschädigten Areale wechselten sich mit scheinbar intakten Arealen ab.

Intaktes Endothel erscheint als ein geschlossener Zellverband, wobei man die Zellgrenzen gut erkennen kann. Ebenfalls kann man sehen, dass sich manche Ausschnitte auf Grund einer kontrahierten Tunica media zusammengerafft ist und so die einzelnen Zellen gestaucht wirken. Areale, die durch Auflagerungen wie Globuline, Fasern, Fibrinbeläge oder Erythrozyten schwer beurteilbar waren, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Dies gilt im gleichen Maße für Ausschnitte der Proben, welche auf Grund ihrer dreidimensionalen Ausdehnung unscharf abgebildet wurden. Des Weiteren muss man bedenken, dass es beim Präparieren von biologischem Material zur Schrumpfung kommen kann und diese in die Diskussion der Resultate einbeziehen sollte.

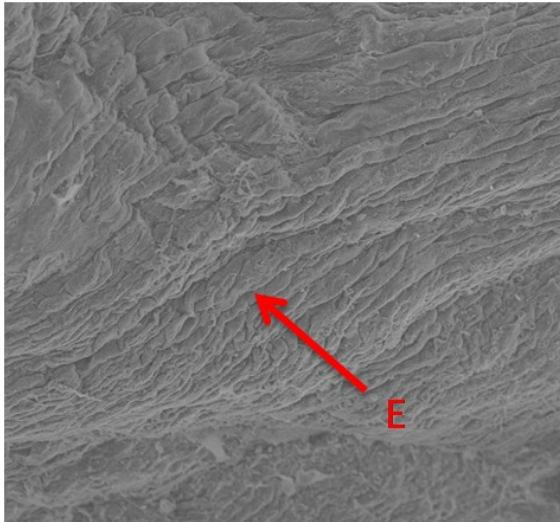
Geschädigtes Endothel zeigt sich in Form von Rissen und Lücken im Zellverband. Die Tunica intima kann regelrecht zerrissen und aufgeklappt sein und so den Blick auf die darunterliegenden Schichten eröffnen.

In Tabelle 17 wurde der prozentuellen Schädigungsanteil der Proben, auf welche ein Druck von 103,43 mmHg aufgewendet wurde, dargestellt.

<b>Auswertung der Präparate mit Druckbegrenzung</b>	
Präparat	Anteil der Schädigung [%]
298_02	17,38
299_02	15,08
301_01	25,65
304_02	21,60
Mittelwert	19,93
Median	19,49
Standardabweichung	4,674
n = 4	

**Tabelle 17 Prozentueller Schädigungsanteil mit Druckbegrenzung**

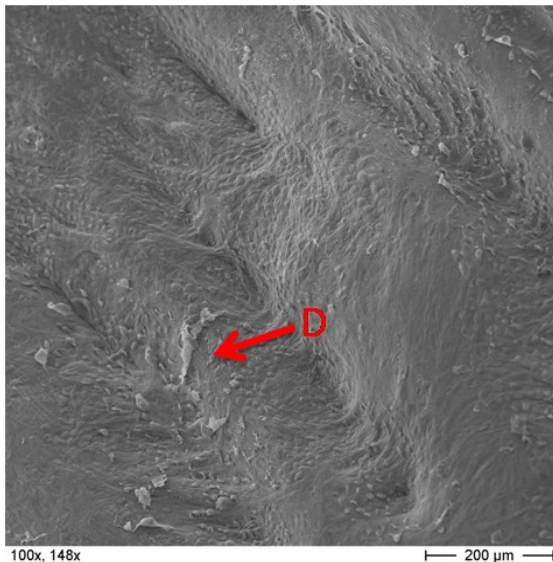
Die nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 31 bis Abbildung 34) zeigen repräsentative Ablichtungen aller Individuen der Gruppe 1 (mit Druckbegrenzung), welche in der REM – Auswertung eingeschlossen wurden.



100x, 148x

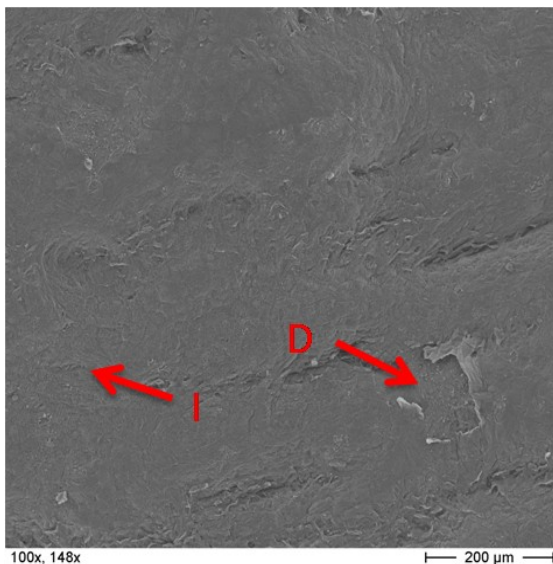
**Abbildung 31 Präparat 298\_02; Aufnahme\_Ü2 lu**

Abbildung 31 zeigt überwiegend eine geschlossene Endothelstruktur (E). Man hat den Eindruck, dass sich die Tunica intima ein wenig kontrahiert hat. Dies kann man durch die wellenartige Struktur sehen



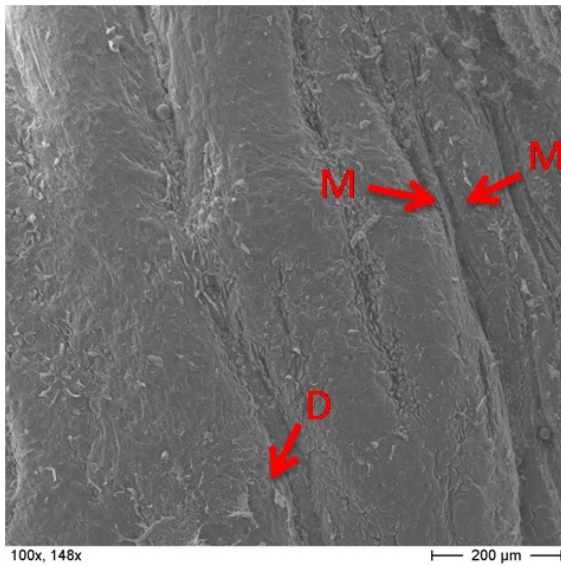
**Abbildung 32 Präparat 299\_02**

In der obigen Aufnahme (Abbildung 32) kann man neben glatten Endothelzellen und Auflagerungen auch einen großen Defekt (D) sehen. Das Endothel wirkt aufgerissen.



**Abbildung 33 Präparat 301\_01; Aufnahme Ü2.1**

Ebenso wie in der vorangegangenen Aufnahme kann man in Abbildung 33, bei größtenteils intakter Oberflächenstruktur (I), im rechten unteren Quadranten einen Defekt (D) des Endothels erkennen.



**Abbildung 34 Präperat 304\_02**

Hier in Abbildung 34 kann man eine durch Muskelzug (M) bedingte gewölbte Gefäßoberfläche erkennen, die wiederum von Auflagerungen gezeichnet ist. Am unteren Bildrand kann man Schäden (D) des Endothels ausmachen.

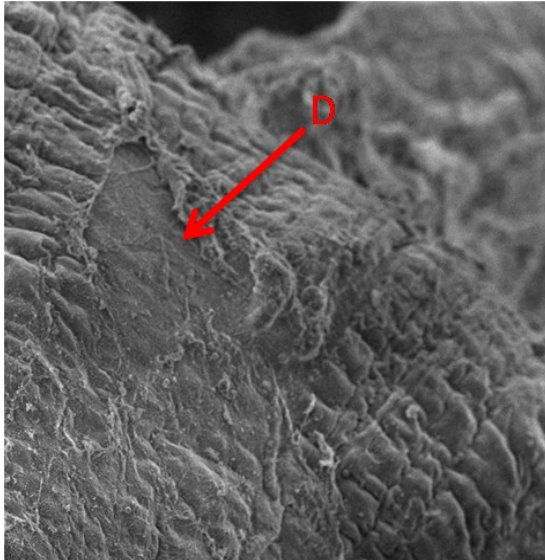
Die Spanne der prozentuellen Schädigung reichte in der Gruppe mit Druckbegrenzung von 15,08% bis 25,65%. Der errechnete Mittelwert beträgt 19,93%.

Die Tabelle 18 zeigt die prozentuellen Vergleichswerte der Venen, welche nicht unter standardisierten Verhältnissen behandelt wurden.

<b>Auswertung der Präparate ohne Druckbegrenzung</b>		
Präparat	Anteil der Schädigung [%]	Maximaldruck [mm Hg]
298_01	22,11	258,0
299_01	18,09	198,0
301_02	13,75	225,0
304_03	14,99	293,0
Mittelwert	17,24	243,5
Median	16,54	241,5
Standardabweichung	3,727	41,12
n = 4		

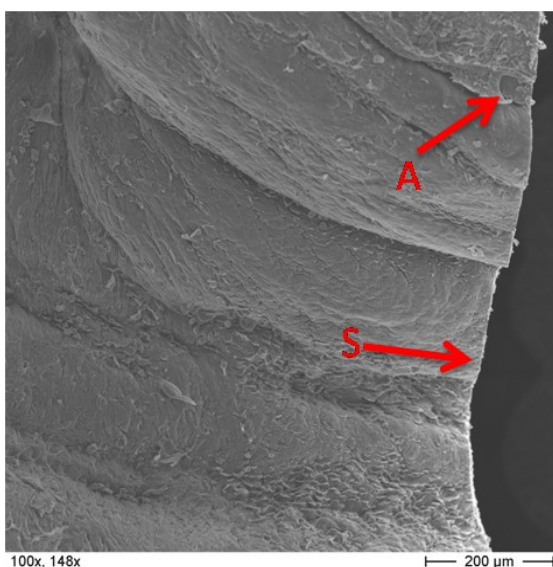
**Tabelle 18 Prozentueller Schädigungsanteil ohne Druckbegrenzung**

Die Abbildungen 35 bis 38 stellen repräsentative Aufnahmen aller Individuen der Gruppe ohne Druckbegrenzung dar.



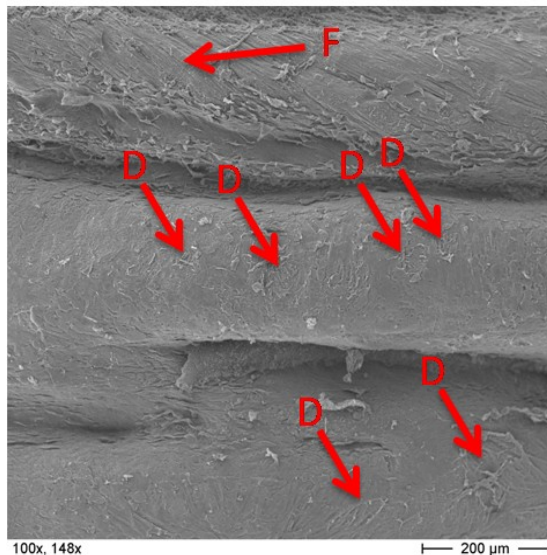
**Abbildung 35 Präparat 298\_01; Aufnahme Ü2**

Die obige Aufnahme (Abbildung 35) zeigt einen großen Defekt (D) des Endothels, wobei man die darunterliegende Schicht deutlich erkennen kann. Ansonsten kann man fadengleiche Überlagerungen der regelrechten Endothelstruktur erkennen.



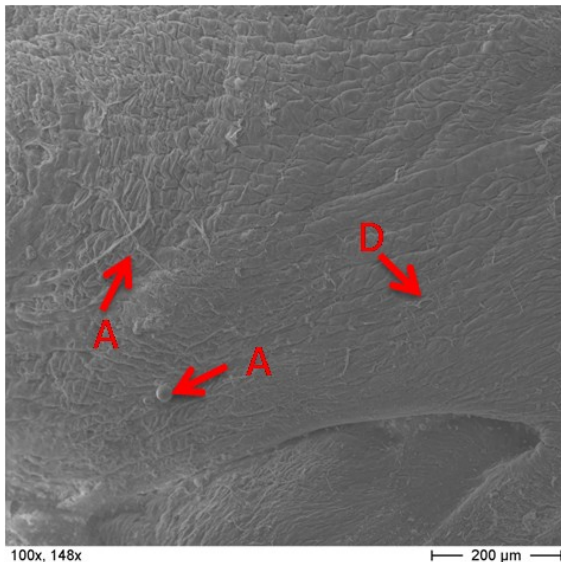
**Abbildung 36 Präparat 299\_01; Aufnahme Ü3.2**

Bei dieser Aufnahme (Abbildung 36) ist der Präparatschnitt (S) zu sehen. Bei der Auswertung muss man darauf achten, dass man Artefakte (A), welche durch den Schnitt entstanden sind, nicht in die Auswertung miteinbezieht.



**Abbildung 37 Präparat 301\_02; Aufnahme Ü2.2**

Im oberen Drittel der Aufnahme (Abbildung 37) erkennt man grob faserige Strukturen (F), die jedoch eher Muskelfasern als Endothelzellen entsprechen. An der Vorwölbung im mittleren Drittel kann man diverse Endothelschäden (D) erkennen. Dies gilt ebenso im unteren Bildrand, wohingegen die Defekte spärlicher gesät sind.



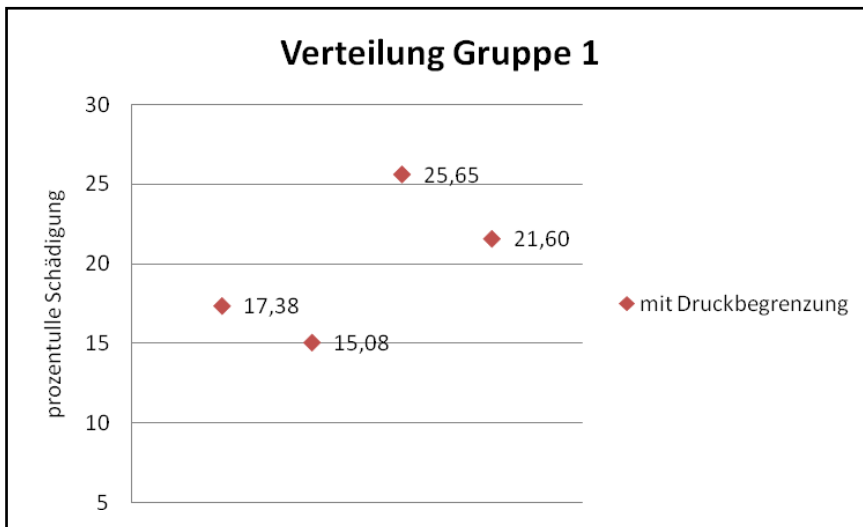
**Abbildung 38 Präparat 304\_03; Aufnahme Ü1.1**

In Abbildung 38 wurden bei der Auswertung diverse kleine Defekte (D) der Endothelintegrität gefunden. Ebenso kann man diverse Auflagerungen (A) erkennen, die am wahrscheinlichsten Fibrinfäden bzw. Globulinen entsprechen.

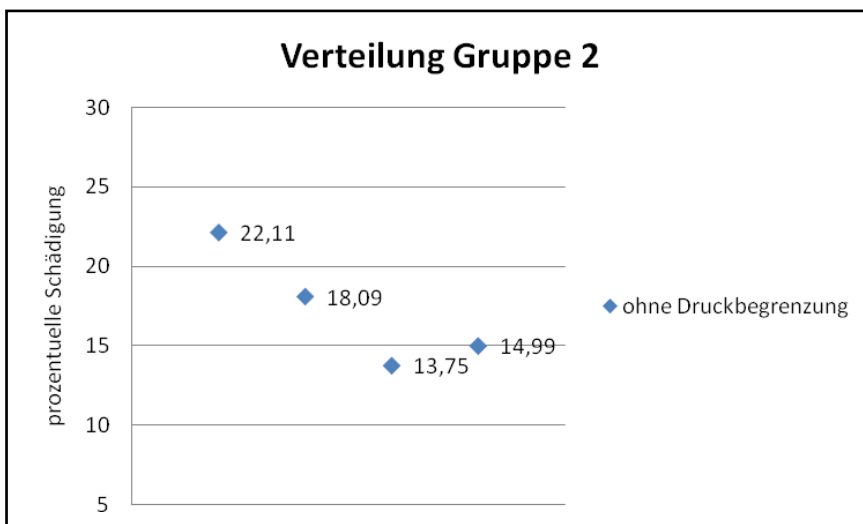
Bei der Gruppe ohne Druckkontrolle bei der Dichtigkeitsprüfung ergab sich eine Spanne der Schädigung von 13,75% bis 22,11%. Der Mittelwert beträgt 17,24%.

Auf die Venen, welche nicht druckkontrolliert behandelt wurden, wurde ein mittlerer Druck von 243,5 mmHg bei der Spülung aufgewendet (Graphik 5). Der angewandte Maximaldruck variierte stark zwischen den einzelnen Dichtigkeitsüberprüfungen (198-258 mm Hg) und war im Mittel (243,5mm Hg) mehr als doppelt so hoch wie der mittels Druckventil erzielte Maximaldruck bei der Gruppe mit Druckbegrenzung (103,43mm Hg).

Wie in Graphik 4 und 5 ersichtlich, erscheinen die Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen in beiden Gruppen recht groß. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Schädigung der Endotheloberfläche festgestellt werden.



Graphik 4 Punktdiagramm der Ergebnisse der Gruppe 1



Graphik 5 Punktdiagramm der Ergebnisse der Gruppe 2

## **KAPITEL V    DISKUSSION**

### **Einleitung**

Die Behandlung von atherosklerotischen Veränderungen im menschlichen Gefäßsystem gestaltet sich als schwierig, da die Pharmakologie nach wie vor nur bis zu einem gewissen Grad in die Pathogenese eingreifen kann. Es besteht zwar die Möglichkeit die Erkrankung in ihrer Progression zu bremsen, aber Heilung an sich ist nicht möglich. Der effektivste Weg der Behandlung besteht in der Prävention, welche vor allem die Aufklärung der Bevölkerung beinhaltet. Nur durch die Schaffung eines Bewusstseins für diese Erkrankung und die daraus resultierende Lebensstiladaptierung ist es möglich, dem pathogenen Fortschritt Einhalt zu gebieten.

Zusätzlich aber ist es die ethische Pflicht der Wissenschaft die Forschung auf dem Gebiet der Atherosklerose voranzutreiben, um neue Wege in der Behandlung zu finden.

### **LSM**

Die Vorstudie mittels der Laserscanningmethode war ein wichtiger Schritt, um diverse Parameter im Vorfeld von weiteren Untersuchungen zu verifizieren. So wurde diese Methode angewandt, um einen Nachweis zu haben, dass die Proteinexpression auch an den angenommenen Stellen, wie in der glatten Muskulatur der Gefäßwand, passiert. Dadurch kann man die Expressionsorte genau festlegen und so auch davon ausgehen, dass man bei der Quantifizierung keinerlei falsche Marker in die Auswertung miteinbezieht. Ebenso konnte auf diesem Weg die Expression der Marker in ihrer zeitlichen Korrelation, ab dem Zeitpunkt der Entnahme des Gefäßes, überprüft werden. Die Auswertung mittels

des LSM ist sicherlich ein gelungener Weg, um einen Eindruck über den Expressionsverlauf zu bekommen.

Jedoch war es mit dem verwendeten Gerät nicht möglich die Schnitte in ihrer Gesamtheit zu beurteilen. Das bedeutet, dass man mit der Übersichtslupe den Schnitt in seiner Gesamtheit untersuchen konnte, aber bei dieser geringen Vergrößerung das Auflösungsvermögen des Mikroskops nicht ausreichte, um die, teils minimal ausgeprägte Fluoreszenz, zu erfassen. Deshalb mussten stärker vergrößerte Ausschnitte aus dem Gewebe zur Beurteilung herangezogen werden. Obwohl versucht wurde, möglichst repräsentative Ausschnitte zu wählen, beschränkte sich die Untersuchung auf einen Bruchteil des ganzen Schnittes.

Eine weitere und elegantere Möglichkeit der Quantifizierung von Proteinen stellt der Western Blot dar. Dazu muss zu Beginn ein Zellaufschluss durchgeführt werden, um die Plasmamembran zu extrahieren, wo die Marker exprimiert werden. Nach Auftragung des zu untersuchenden Materials auf SDS-Gel (Abkürzung für *engl. sodium dodecylsulfate*) werden die Proteine nach ihrer Größe, durch Einwirken eines gerichteten elektrischen Feldes, aufgetrennt. Diese dadurch entstehenden Banden kann man mittels Chemilumineszenz durch Belichtung und Entwicklung in einer Dunkelkammer sichtbar machen. Hierbei werden radioaktiv markierte Sekundärantikörper verwendet. Auf diesem Weg besteht nun auch die Möglichkeit die Proteine zu quantifizieren (33).

Eine weitere Möglichkeit um optimierte Ergebnisse zu bekommen wäre es, eine Kombination aus dem ESEM und dem „immunogold labelling“ zu verwenden (34). Mit dieser Technik konnten Muscariello et al. zeigen, dass es möglich ist Oberflächenproteine darzustellen und einer semiquantitativen Auswertung zuzuführen. Das ESEM (*engl.: Environmental Scanning Electron Microscope*) ist eine Variante des Rasterelektronenmikroskopie, wobei der wesentliche Unterschied darin besteht, dass in der Probenkammer ein höherer Druck (130-1300 Pascal) besteht als bei dem in dieser Arbeit verwendeten REM (35, 36). Mit dieser Methode kann man Fehlerquellen reduzieren, da viele Präparationsschritte entfallen. Dies ermöglicht das Arbeiten mit nativem Gewebe und verringert das Risiko des Auftretens von Präparationsartefakten deutlich.

## ICAM

Dieser Marker zeigt einen deutlichen Expressionsanstieg mit der Zeit und erreicht mit Ende der Messreihe einen 24mal höheren Wert. Das minimale Absinken der Signalstärke am Zeitpunkt  $t=2$  ist vermutlich auf die Messvarianz zurückzuführen. Der markante Anstieg über die Zeit lässt den Schluss zu, dass dieser Marker durch seinen Anstieg auch eine progrediente Schädigung des Endothels signalisiert. Man könnte auch argumentieren, dass sich das Gewebe in einem unphysiologischen Zustand befunden hat und es so zu einem natürlichen biologischen Zerfall der Zellintegrität gekommen ist. Durch die Hypoxie wird eine Atherogenese induziert, die mit einer Expression von Adhäsionsfaktoren einhergeht. In den hypoxischen Arealen kommt es zu einem Anstieg der Wandschubspannung, welcher den mechanischen Stimulus für die Gefäßwand darstellt (37). Dieser Vorgang, kombiniert mit der Expression der Adhäsionsfaktoren, könnte zu einer weiteren Ausbildung von Schädigungsmarkern führen. Nagel et al (38) zeigte in seiner Versuchsreihe ebenfalls einen progredienten Anstieg von ICAM nach der Aufwendung von Scherkräften auf die Gefäßinnenwand.

## VCAM

Die Ergebnisse zeigen eine konstante Ausprägung über die Zeit mit einer deutlich höheren Expression des Markers zum Zeitpunkt  $t=3$ . Man könnte annehmen, dass die Ausprägung, welche an den ersten beiden Messzeitpunkten vorliegen, bereits vor der Entnahme bestanden hat und dass es lediglich zu einer vermehrten Expression zum Zeitpunkt  $t=3$  gekommen ist, wobei das Protein wiederum abgebaut wurde und zum vorherigen Expressionslevel zurückgekehrt ist. Das würde bedeuten, dass entweder ein physiologischer Grundstock von VCAM immer an den Endotheloberflächen sitzt oder aber dass bei einer systemischen Gefäßerkrankung eine konstante Markerexpression im erhöhten Zustand vorhanden ist. Dies korreliert mit dem Wissen, dass ein inflammatorischer Prozess, wie es bei der Atherogenese der Fall ist, eine Expression von VCAM induziert. Des Weiteren kann man vermuten, dass es so bei der Druckaufwendung zu einer temporären Überexpression von VCAM kommt. Um genaueren

Aufschluss über den Expressionsverlauf zu gewinnen, wäre ein weiterer Versuch mit engeren Zeitintervallen von Nutzen.

Nagel et al (38) veröffentlichten in ihrer Arbeit ebenfalls eine stagnierende Expression von VCAM nach der Aufwendung von Druck auf das Endothel.

#### p-Selektin

Der sukzessive Abfall der Proteinkonzentration über die Zeit lässt vermuten, dass p-Selektin nach seiner starken Erstexpression zum Zeitpunkt der Traumatisierung wieder abgebaut wird. Dieses Ergebnis wurde auch bereits von Tedder et al. (39) beschrieben. Dies kann bedeuten, dass die Dichtigkeitsprüfung tatsächlich die Expression dieses Schädigungsmarkers induziert, dies aber nur im vollen Ausmaß direkt nach der Druckaufwendung stattfindet. Diese Expression ist ein möglicher Startschuss für weitere atherogene Veränderungen. Theoretisch kann man auch von einer geringen Halbwertszeit dieses Proteins ausgehen und so die rückläufige Expression erklären.

### **Konklusion**

Die teils widersprüchliche Ausprägung der unterschiedlichen Markern könnte als Hinweis auf die Gewichtung der atherogenen Potenz verstanden werden. Wie Tedder et al. bereits zeigten, scheint p -Selektin nur in der primären Phase einen größeren Einfluss auf die Leukozyten – Endothel – Interaktion zu haben (39). Wobei dies voraussetzt, dass die Dichte der exprimierten Marker direkt mit dem Ausmaß der Schädigung zusammenhängt. Die Ausprägung von VCAM gibt den Anlass, weitere Untersuchungen durchzuführen und einen engmaschigeren Zeitplan zu erstellen, um das Expressionsverhalten über die Zeit genauer zu untersuchen. Zu erwarten wäre eine exponentielle Funktion, welche mit der Halbwertszeit dieses Proteins assoziiert ist. Der Marker ICAM spiegelt interpoliert einen typischen biologischen Verlauf wieder (38).

## REM

Die Ergebnisse aus der rasterelektronischen Untersuchung haben keinen Hinweis auf eine Schädigungsverteilung zu Gunsten einer der beiden Gruppen ergeben. Wobei man nicht außer Acht lassen darf, dass eine gesicherte Relation zwischen den untersuchten Markern und der Atherogenese besteht (40). Vielmehr kann man sagen, dass die Unterschiede innerhalb der Gruppen größer sind als die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Graphik 4). Dies trifft vor allem auf die Gruppe der Patienten zu, deren Venen mittels einer Drucklimitierung überprüft wurden.

Man muss bemerken, dass andere Studien einen signifikanten Anstieg von Stressproteinen gefunden haben. Chello et al. (6) haben jedoch die Gefäße jedes einzelnen Patienten zweimal untersucht. Das bedeutet einmal vor der Druckaufwendung und nach der Druckprovokation ein weiteres Mal. Dies führt zu einem direkteren Vergleich. Des Weiteren hat diese Arbeitsgruppe den aufgewendeten Druck standardisiert. Jedes Gefäß wurde mit einem Druck von 300 mmHg behandelt, während unsere Studie darauf abzielte, Unterschiede im vom Chirurgen tatsächlich verwendeten Druck zu erfassen.

Eine weitere Studie, Dumanski et al. (41), zeigte vergleichbare Ergebnisse wie bei Chello et al. (6). Wobei Dumanski et al. (41) neben der Expression von Stressproteinen auch eine Evaluation der Spüllösung (heparinisertes Vollblut vs. saline Lösung) vornahm. Hier zeigte sich, dass die verwendete Lösung keinen Einfluss auf die Schädigung des Endothels nimmt. Vielmehr steht wieder der aufgewendete Druck im Vordergrund.

Anlehnend an die gewonnenen Daten könnte man annehmen, dass der aufgewendete Druck während der Operation keine signifikante Relevanz im Bezug auf postrekonvaleszente atherogene Entwicklung hat. Jedoch müsste man mehr Patientenmaterial untersuchen, um eine gesicherte Aussage treffen zu können. In weiterer Folge sollte man sich über den Untersuchungsalgorithmus Gedanken machen, die verwendeten Materialien neu bewerten und mit den bereits

veröffentlichten Studien vergleichen. Ebenso sollte die Präparation des biologischen Untersuchungsmaterials hinterfragt werden, da hier ein gewisses Risiko besteht Artefakte zu erzeugen.

Insgesamt sollte man sich im Klaren sein – hier sind vor allem die Patienten angesprochen, dass Atherosklerose eine systemische Erkrankung ist, die man nicht durch eine Operation (3), geschweige denn durch Pharmaka heilen kann. Mit diesen jedoch nicht zu unterschätzenden medizinischen Errungenschaften kann man lediglich die akute Symptomatik bzw. auch gewisse physiologische Parameter (Vorlast, Nachlast, Blutdruck, Herzfrequenz, Inotropie usw.) beeinflussen, jedoch den unaufhaltsamen Fortschritt der Erkrankung nicht stoppen.

## KAPITEL VI BIBLIOGRAPHIE

1. Statistisches\_Bundesamt. Wiesbaden: Statistisches\_Bundesamt; 2009.
2. Böcker;Denk;Heitz. Pathologie. München: Urban&Fischer; 2004.
3. Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol*1996 Sep;28(3):616-26.
4. LaMack JA, Friedman MH. Individual and combined effects of shear stress magnitude and spatial gradient on endothelial cell gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*2007 Nov;293(5):H2853-9.
5. Zhao J, Andreasen JJ, Yang J, Rasmussen BS, Liao D, Gregersen H. Manual pressure distension of the human saphenous vein changes its biomechanical properties-implication for coronary artery bypass grafting. *J Biomech*2007;40(10):2268-76.
6. Chello M, Mastroberto P, Frati G, Patti G, D'Ambrosio A, Di Sciascio G, et al. Pressure distension stimulates the expression of endothelial adhesion molecules in the human saphenous vein graft. *Ann Thorac Surg*2003 Aug;76(2):453-8; discussion 8.
7. Centers\_of\_diseasecontrol\_and\_prevention. 2009; Available from: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>.
8. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*1999 Nov;138(5 Pt 2):S419-20.
9. Lüllmann-Rauch. Taschenlehrbuch Histologie: Thieme Verlag; 2006.
10. Waldeyer. Anatomie des Menschen: de Gruyter; 2003.
11. WorldMedAssist. 2006; Available from: [www.worldmedassist.com](http://www.worldmedassist.com).
12. Eidt;Roll;Kulp;Müller-Nordhorn;Vauth;Greiner;Willich;Graf\_von\_der\_Schulenburg. Bypassmaterialien in der Gefäßchirurgie. Band 31 ed. Köln: Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information; 2006.
13. Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R, Edwards FH, Ewy GA, Gardner TJ, et al. ACC/AHA 2004 guideline update for coronary artery bypass graft surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery). *Circulation*2004 Oct 5;110(14):e340-437.
14. Köchli;Walz;Köchli. 2009; Available from: [www.biorama.ch](http://www.biorama.ch)
15. Romeis. Mikroskopische Technik: Urban & Schwarzenberg; 1989.
16. Online-Enzyklopädie ME. Monoklonale Antikörper. 2008; Available from: <http://de.encyarta.msn.com>.

17. Wehner\_J. 2009; Available from: <http://www.medizinfo.de/>.
18. Kayser;Böttger;Eckert;Zinkernagel;Deplazes. Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie: Thieme Verlag; 2005.
19. Jungeira;Carneiro. Histologie: Springer Verlag; 1996.
20. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*2005 Jul 15;106(2):584-92.
21. Karp\_Gerald. Molekulare Zellbiologie: Springer Verlag; 2005.
22. Cleator JH, Zhu WQ, Vaughan DE, Hamm HE. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood*2006 Apr 1;107(7):2736-44.
23. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*1998;67:395-424.
24. Bucher;Wartenberg. Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen1997.
25. Leica\_Microsystems. Benutzerhandbuch Leica TCS SP2. 21022002 ed2001.
26. Carl\_Zeiss\_GmbH. 2009; Available from: [www.zeiss.com](http://www.zeiss.com).
27. Leica\_Microsystems. 2009; Available from: [www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com).
28. S.Böhler. Kritisch-Punkt-Trochnung biologischer Proben in der Raster-Elektronenmikroskopie. Fachbericht Balzers.
29. Balzers\_Union\_Limited. Betriebsanleitung MED 010. 1987.
30. Cepheiden. Schema einer Sputterkammer. 2007.
31. Albert\_Ludwigs\_Universität\_Freiburg. Available from: [www.uni-freiburg.de/](http://www.uni-freiburg.de/).
32. C.V.Howard;M.G.Reed. Unbiased Stereology - Three dimensional measurement in Microscopy. Oxford: Bios Scientific Publication; 1998.
33. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*1981 Apr;112(2):195-203.
34. Muscariello L, Rosso F, Marino G, Barbarisi M, Cafiero G, Barbarisi A. Cell surface protein detection with immunogold labelling in ESEM: optimisation of the method and semi-quantitative analysis. *J Cell Physiol*2008 Mar;214(3):769-76.
35. Danilatos GD. Introduction to the ESEM instrument. *Microsc Res Tech*1993 Aug;25(5-6):354-61.
36. Danilatos GD, Postle R. The environmental scanning electron microscope and its applications. *Scan Electron Microsc*1982(Pt 1):1-16.
37. Schmidt;Lang. Physiologie des Menschen: Springer Verlag; 2007.
38. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*1994 Aug;94(2):885-91.
39. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*1995 Jul;9(10):866-73.

- 
40. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003 Oct;170(2):191-203.
  41. Dumanski A, Sopel M, Pelczar M, Szlapka M, Kustrzycki W, Zabel M. Influence of pressure on the endothelium of the saphenous vein coronary artery bypass graft. *In Vivo* 2007 Sep-Oct;21(5):785-9.