

Wirkung von Erythropoetin auf Arteriosklerose, arterielles
Remodeling und arterielle Thrombose in einem Mausmodell mit
Überexpression von humanem Erythropoetin

von Anna-Lena Steinsiek

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Wirkung von Erythropoetin auf Arteriosklerose, arterielles
Remodeling und arterielle Thrombose in einem Mausmodell mit
Überexpression von humanem Erythropoetin

von Anna-Lena Steinsiek

aus München

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt am Deutschen Herzzentrum München, Klinik an der Technischen
Universität München

Mentorin: Prof. Dr. med. Ilka Ott

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

Tag der Promotion: 29. Juli 2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Erythropoetin.....	2
1.1.	Eigenschaften	2
1.2.	Biologische Funktion	3
1.3.	EPO-Rezeptoren	5
1.3.1.	Hämatopoetischer EPO-Rezeptor	5
1.3.2.	Nicht-hämatopoetischer EPO-Rezeptor	6
1.4.	Nicht-hämatopoetische EPO-Wirkungen	8
1.5.	Therapeutische Applikation von EPO	12
1.5.1.	Indikationen.....	12
1.5.2.	Hämatopoetische EPO-Präparate	13
1.5.3.	Nicht-hämatopoetische EPO-Präparate.....	14
1.5.4.	Nebenwirkungen von EPO.....	15
2.	Überexpression von humanem EPO in der Maus.....	16
2.1.	Beschreibung des Tg(Epo)-Mausmodells	16
3.	Wandbau von Arterien	19
4.	Arteriosklerose.....	21
4.1.	Definition	21
4.2.	Pathogenese der Arteriosklerose	22
4.3.	Tiermodelle der Arteriosklerose	23
4.4.	Die ApoE ^{-/-} -Maus	24
4.5.	Weitere Mausmodelle.....	24
5.	Arteriellles Remodeling	25
5.1.	Bedeutung	25
5.2.	Mausmodelle.....	26
5.2.1.	Drahtverletzung.....	26
5.2.2.	Ligatur.....	27

6.	Arterielle Thrombose	28
6.1.	Pathogenese	28
6.2.	Hämostase	28
6.3.	Mausmodelle	29
6.3.1.	Induktion der arteriellen Thrombose durch Eisen-3-Chlorid	29
6.3.2.	Arterielle Thrombose mit Ligatur und Manschette	30
6.3.3.	Thromboseinduktion mittels Laser	30
III.	ZIELSETZUNG.....	32
IV.	MATERIAL UND METHODEN	34
1.	Haltungsbedingungen.....	34
2.	Mäuse und Zucht.....	35
3.	Blutanalysen	36
3.1.	Entnahmetechnik	36
3.1.1.	V. facialis-Punktion	36
3.1.2.	Finale Herzpunktion	37
3.2.	Hämatologische Untersuchungen	38
3.2.1.	Gruppengröße und –zusammensetzung.....	38
4.	Narkose	39
5.	Splenektomie.....	41
5.1.	Operationstechnik.....	41
5.2.	Postoperative Überwachung und Analgesie	43
6.	Cholesterinfütterung.....	43
6.1.	Versuchsaufbau und –ablauf.....	43
6.2.	Ölrot-en face-Aortenfärbung	44
6.2.1.	Gruppengröße und –zusammensetzung.....	44
6.2.2.	Entnahme und Aufarbeitung des Gewebes	44
6.2.3.	Protokoll	45
6.2.4.	Ausmessung und Auswertung.....	46
6.3.	Ölrot-Färbung des Aortenursprungs	46
6.3.1.	Gruppengröße und –zusammensetzung.....	46

6.3.2.	Entnahme und Aufarbeitung des Gewebes	46
6.3.3.	Protokoll	47
6.3.4.	Ausmessung und Auswertung	47
7.	Drahtverletzung der A. femoralis communis	48
7.1.	Versuchsaufbau	48
7.2.	Gruppengröße und –zusammensetzung	48
7.3.	Operationstechnik	48
7.4.	Postoperative Überwachung und Analgesie	49
7.5.	Gefäßentnahme und Vorbereitung der Histologie	50
7.6.	Elastica mit van Gieson-Pikrofuchsin-Färbung	51
7.7.	Ausmessung und Auswertung	51
8.	Arterielle Thrombose	53
8.1.	Durchflusszytometrische Bestimmung der Thrombozytenaktivierbarkeit	53
8.1.1.	Prinzip der Messung	53
8.1.2.	Gruppengröße und -zusammensetzung	55
8.1.3.	Probenentnahme und –aufarbeitung	55
8.1.4.	Analyse der Thrombozytenaktivierbarkeit	56
8.2.	Eisen-3-Chlorid-Verletzung	57
8.2.1.	Versuchsaufbau	57
8.2.2.	Gruppengröße und –zusammensetzung	57
8.2.3.	Operationstechnik	57
8.2.4.	Auswertung	60
9.	Dokumentation	60
10.	Statistische Auswertung	61
V.	ERGEBNISSE	62
1.	Hämatologische Parameter vor und nach Splenektomie	62
2.	Der Einfluss von EPO auf Arteriosklerose	65
3.	Der Einfluss von EPO auf arterielles Remodeling	72
4.	Der Einfluss von EPO auf die Thrombozytenaktivierbarkeit	76
5.	Der Einfluss von EPO auf arterielle Thrombose	80

VI.	DISKUSSION	82
1.	Wahl von Mausmodell und Methoden.....	82
2.	Der Einfluss von EPO auf hämatologische Parameter	83
3.	Der Einfluss von EPO auf Arteriosklerose	87
4.	Einfluss von EPO auf arterielles Remodeling	91
5.	Der Einfluss von EPO auf die arterielle Thrombose.....	93
VII.	ZUSAMMENFASSUNG.....	97
VIII.	SUMMARY	98
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	99
X.	TABELLENVERZEICHNIS.....	128
XI.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	129
XII.	ANHANG	131
1.	Protokolle	131
1.1.	Genotypisierung der ApoE-Mäuse	131
1.2.	Genotypisierung der Tg(Epo)-Mäuse	132
2.	Diätzusammensetzung	134
3.	Danksagung	137

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria	EPO-R	Erythropoetin-Rezeptor
Abb.	Abbildung	ESA	Erythropoese stimulierende Agenzien
ApoB	Apolipoprotein B	EZM	Extrazelluläre Matrix
ApoE	Apolipoprotein E	FeCl ₃	Eisen-3-Chlorid
AUC	Area under the curve	g	Gramm
BFU-E	Burst-forming-unit-Erythrozyten	GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor
BFU-Meg	Burst-forming-unit-Megakaryozyten	GP	Glykoprotein
cDNA	Komplementäre DNS	GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstierkunde
CD	Cluster of differentiation	h	Stunde
cEPO	Carbamyliertes EPO	HBS	Hepes buffered saline
CFU-E	Colony-forming-unit-Erythrozyten	HDL	High density lipoprotein
CFU-GM	Colony-forming-unit-Granulozyten/Monozyten	HEPA	High efficiency particulate air filter
CFU-Meg	Colony-forming-unit-Megakaryozyten	HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
CRP	Kollagenähnliches Peptid	HRE	Hormone responsive element
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	IL	Interleukin
EPHB4	Ephrin-B4	iNOS	Induzierbare NO-Synthase
EPO	Erythropoetin	i.p.	Intraperitoneal

IU	International unit	PEG	Polyethylenglykol
IVC	Individually ventilated cage	RDW	Red blood cell distribution width
kb	Kilobase	rHuEPO	Rekombinantes humanes EPO
kD	Kilodalton	RNA	Ribonukleinsäure
kg	Kilogramm	SPF	Spezifiziert pathogenfrei
LDL	Low density lipoprotein	STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
MCSF	Monocyte colony stimulating factor	Tab.	Tabelle
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen	Tg	Transgen
mg	Milligramm	V.	Vena
µg	Mikrogramm	VEGF	Vascular endothelial growth factor
ml	Milliliter	VLDL	Very low density lipoprotein
µl	Mikroliter	vWF	Von-Willebrand-Faktor
mm	Millimeter	WHO	World health organization
µm	Mikromiter	WT	Wildtyp
MMP	Matrix-Metalloproteinase		
mRNA	Messenger RNA		
mW	Milliwatt		
N.	Nervus		
NO	Stickstoffmonoxid		
PAR4	Protease-aktivierter Rezeptor 4		
PBS	Phosphat buffered saline		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		

I. EINLEITUNG

Erythropoetin (EPO), welches hauptsächlich von der adulten Niere gebildet wird, ist das wichtigste Hormon zur Stimulation der Erythropoese. Man nutzt diesen Effekt bei der Behandlung von Anämien verschiedener Ätiologien. Die WHO definiert Anämien als eine Hämoglobinkonzentration von unter 13 g/dl bei Männern und unter 12 g/dl bei Frauen.

In den meisten Fällen sind es Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Krebspatienten unter Chemotherapie, die EPO therapeutisch erhalten. Der Einsatz von EPO ist hierbei verbunden mit einer verbesserten Lebensqualität der Patienten, er ermöglicht die Vermeidung wiederholter Bluttransfusionen und erhöht durch gesteigerte intratumorale Sauerstoffversorgung die Ansprechbarkeit auf Chemo- und Bestrahlungstherapien (Pisoni et al., 2004, Voormolen et al., 2010, Kharagjitsingh et al., 2005, Corwin et al., 2007).

Neben dem Erythropoese-stimulierenden Effekt wurden in verschiedenen Studien diverse gewebsschützende nicht-hämatopoetische Wirkungen des Erythropoetins untersucht. So konnten unter anderem neuroprotektive, kardioprotektive und immun-medierte antikanzerogene Effekte nachgewiesen werden.

Es bestehen jedoch etliche Sicherheitsbedenken bezüglich einer EPO-Therapie. Die USA erließen am 8. November 2007 eine Black-Box-Warnung für Krebspatienten, die vor beschleunigtem Tumorwachstum warnt. Für unterschiedliche Tumoren wurde im Rahmen verschiedener Studien eine verminderte progressionsfreie Überlebensrate belegt (Henke et al., 2003, Leyland-Jones, 2003). Außerdem wird für den Einsatz von EPO ein Zusammenhang mit einer erhöhten Anzahl kardiovaskulärer und thrombotischer Zwischenfälle (Singh et al., 2006, Solomon et al., 2010, Druke et al., 2006) sowie mit einem gesteigerten Herzinfarktrisiko vermutet (Jungers et al., 1997, Iseki and Fukiyama, 2000).

Mit Hilfe einer Mausmutante, die humanes EPO überexprimiert, sollen im Rahmen dieses Projektes daher vaskuläre Effekte von EPO untersucht werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Erythropoetin

1.1. Eigenschaften

Erythropoetin (EPO; altgriechisch; erythros: rot, poiein: machen) ist ein Glykoprotein-Hormon mit einer Molekülmasse von 30,4 kDa, das hauptsächlich in der fetalen Leber und sauerstoffabhängig in der adulten Niere produziert wird.

Phylogenetisch gehört es zur Familie der Zytokine, der unter anderem auch Somatotropin, Prolaktin, die Interleukine-2 bis -7 und die Colony Stimulating Factors angehören.

Die Tertiärstruktur von EPO besteht aus 4 antiparallelen α -Helices. 3 der Helices sind hydrophob und an der Bindung zum EPO-Rezeptor (EPO-R) beteiligt, die vierte Helix ist hydrophil und in die Vermittlung des gewebsschutzlichen Effekts involviert (Brines, 2010). EPO hat 2 nicht identische Bindungsstellen für den EPO-R (Philo et al., 1996). Dies ist einerseits die hochaffine nanomolekulare Bindungsstelle G151 und andererseits die weniger affine mikromolekulare R103 Bindungsstelle.

Das humane EPO-Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert und nimmt eine 5,4 kb Region genomischer DNA ein (Sasaki et al., 2000, Maiese et al., 2005). Es kodiert eine 193 Aminosäuren lange Polypeptidkette. Die reife zirkulierende Form des Proteins besteht lediglich aus 165 Aminosäuren, was auf einer Abspaltung von 27 N-terminalen Aminosäureresten und dem Verlust des C-terminalen Argininrestes während der posttranslationalen Modifikation beruht (Lappin, 2003). Das EPO-Molekül beinhaltet 2 Disulfidbrücken, welche zwischen Aminosäure 7 und 161 sowie zwischen Aminosäure 29 und 33 lokalisiert sind und eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Molekülstruktur innehaben. Der Wegfall beider Brücken bedeutet einen kompletten Verlust der Bioaktivität des Hormons. Funktionell von größerer Bedeutung ist die erstgenannte Brücke, da diese als Haltegurt der Molekülstruktur fungiert und eine Bindung an den EPO-R sicherstellt. 39% der Molekülmasse bestehen aus Kohlenhydratanteilen, 3 davon sind N-glykosidisch gekoppelt an Position 24, 38 und 53, einer ist O-glykosidisch gebunden an Position 126 (Sasaki et al.,

2000). Deglykosylierte Formen sind auch biologisch aktiv, haben aber eine kürzere Halbwertszeit (Dordal et al., 1985).

1.2. Biologische Funktion

Eine Abnahme des Sauerstoffgehalts in der Umgebung erfordert sowohl akute als auch längerfristige physiologische Anpassungen. Akute Adaptationen umfassen den Anstieg von Atem- und Herzfrequenz und eine Vasokonstriktion. Eine gesteigerte Erythropoese ermöglicht eine langfristige Anpassung.

Ein niedriger Sauerstoff-Partialdruck im Gewebe induziert die Expression von EPO. Dies ist einerseits auf eine Aktivierung der Transkription, andererseits auf die Stabilisierung von mRNA zurückzuführen (Ebert and Bunn, 1999).

Hypoxie führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) und bedingt so eine gesteigerte Gentranskription und Produktion von EPO und EPO-R in der Niere (Fandrey, 2004, Hewitson et al., 2004). Alle HIF-Familienmitglieder (HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-3 α) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von EPO und der EPO-R-Expression. Hypoxie führt zur Heterodimerisierung von HIF-1 α mit HIF-1 β zum HIF-1-Komplex (Camenisch et al., 2001, Jewell et al., 2001). Dieser bindet wiederum an das hypoxische Response-Element (HRE), welches in allen HIF-Zielgenen vorkommt und deren Transkription vorantreibt. Neben EPO zählen Regulatoren der Angiogenese, des Blutgefäßtonus und des Eisenstoffwechsels zu den HIF-Zielgenen.

In der Niere wird EPO von spezialisierten interstitiellen Zellen produziert, welche zwischen proximalen Tubuluszellen und peritubulären Kapillaren lokalisiert sind (Engelhardt, 2005). Auch Hepatozyten sind in der Lage, EPO zu synthetisieren (Koury et al., 1991). Niere und Leber stellen die Hauptbildungsorte von EPO dar, niedrige Level an EPO-mRNA findet man aber auch in Lunge, Hoden und Milz von Tieren, die einer Hypoxie ausgesetzt waren (Fandrey and Bunn, 1993, Tan et al., 1991). Im Gehirn kann EPO von Astrozyten gebildet werden, dementsprechend konnten auch EPO-R im Gehirn von Mäusen gefunden werden.

EPO wird in die Zirkulation abgegeben und gelangt auf diesem Weg ins Knochenmark, wo es sich an EPO-R von Vorläuferzellen bindet. Es fördert die Proliferation und Differenzierung von erythroiden Vorläuferzellen, schützt diese außerdem vor Apoptose und ist damit der Hauptregulator der Erythropoese. Die Hauptaufgabe von reifen roten Blutkörperchen ist der Gastransport, welcher den Sauerstofftransport aus der Lunge in die Körpergewebe und den Kohlendioxidtransport aus der Peripherie in die Lunge umfasst.

Die Bildung von roten Blutzellen unterliegt einem streng kontrollierten Differenzierungs- und Proliferationssignalweg. Frühe hämatopoetische Vorläuferzellen differenzieren sich EPO-unabhängig zu Burst-forming-unit-Erythrozyten (BFU-E), auf welchen dann zum ersten Mal EPO-R exprimiert wird (Wu et al., 1995). Burst-forming-unit-Erythrozyten differenzieren sich zu Colony-forming-unit-Erythrozyten (CFU-E). Das Überleben der CFU-E ist von EPO abhängig. Daher findet man auf der Oberfläche dieser Zellen eine vermehrte Anzahl an EPO-R (Broudy et al., 1991, Sawada et al., 1987, Jelkmann, 2004). Bei den CFU-E-Zellen handelt es sich um unipotente Vorläuferzellen, deren Differenzierungsrichtung vorgegeben ist (Engelhardt, 2005). EPO wirkt also vor allem auf späte Stadien der erythroiden Vorläuferzellen. Kontinuierliche Stimulation mit EPO regt diese zur Differenzierung in Erythroblasten an, welche daraufhin ihren Kern verlieren und zu Retikulozyten werden (Sawada et al., 1987). Ein paar Tage später führt der Verlust von Retikulin zur Entstehung von Erythrozyten. Retikulozyten und Erythrozyten exprimieren keinen EPO-R und sind somit nicht mehr durch EPO stimulierbar.

In der Regel ist die EPO-Konzentration niedrig und kann daher nur einen kleinen Teil der Vorläuferzellen zur Proliferation und zum Überleben befähigen, während die verbleibenden Vorläuferzellen apoptotisch zu Grunde gehen.

Der Konzentrationsanstieg an roten Blutzellen wird allerdings nicht primär durch die Höhe der EPO-Konzentration bestimmt, sondern vielmehr durch die Länge der Periode, in welcher gesteigerte EPO-Konzentrationen aufrechterhalten werden. Eine erhöhte EPO-Synthese hat durch das unausgeglichene Verhältnis von EPO-Halbwertszeit, welche etwa 5 Stunden beträgt, und der speziesspezifischen Lebensdauer von roten Blutzellen, welche zwischen 60 und 160 Tagen liegt (Engelhardt, 2005), einen andauernden Effekt.

1.3. EPO-Rezeptoren

1.3.1. Hämatopoetischer EPO-Rezeptor

Der EPO-Rezeptor, auch bekannt als p66, gehört zur Zytokinklasse 1-Rezeptorfamilie. Bekannte andere Rezeptoren dieser Familie sind die Rezeptoren vom Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierenden-Faktor, Thrombopoetin, Leukämie-Inhibierenden-Faktor, Growth Hormone, Prolaktin, Oncostatin M, ziliären neurotrophen Faktor sowie von Interleukin-2 bis -7.

Der EPO-R besteht aus einer extra-, trans- und intrazellulären Domäne (Lappin, 2003, Mulcahy, 2001, Lacombe and Mayeux, 1998). Die extrazelluläre Domäne beinhaltet ein „WSXWS“-Motiv, welches bei der Bindung von Liganden und der Signaltransduktion eine Rolle spielt (Bazan, 1990, Ihle and Kerr, 1995, Bazan, 1989, Ihle et al., 1998). Das „WSXWS“-Motiv besteht aus einer nicht bekannten Aminosäure, welche beidseits von je einem Tryptophan-Serin-Komplex umgeben ist. Das EPO-R-Gen ist etwa 6 kb groß und umfasst 8 Exons (Maouche et al., 1991, Noguchi et al., 1991, Penny and Forget, 1991). Die Exons 1 bis 5 kodieren für die extrazelluläre Domäne, Exon 6 für den transmembranösen Abschnitt und Exon 7 und 8 für den zytoplasmatischen Anteil.

Die Aktivierung vom hämatopoetischen EPO-R beinhaltet eine Dimerisierung, also eine Vernetzung von 2 EPO-R, über einen EPO-Liganden (Syed et al., 1998, Philo et al., 1996, Elliott et al., 1996, Elliott et al., 1997). Der EPO-R besitzt keine endogene Tyrosinkinase, die bei vielen anderen Rezeptoren üblich ist. Die intrazelluläre Signalkaskade wird stattdessen durch die Konformationsänderung des Rezeptors initiiert (Constantinescu et al., 2001, Kubatzky et al., 2005, Seubert et al., 2003). Es erfolgt eine Transphosphorylierung von Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen, sogenannten JAK2-Molekülen. Deren phosphorylierte Tyrosinreste dienen als Andockstelle für verschiedene intrazelluläre Proteine, welche wiederum verschiedene Signalwege aktivieren. Es folgen die Phosphorylierung oder Aktivierung von Signalmolekülen.

Die Phosphorylierung vom Signal Transducers und Activators of Transcription 5 (STAT5)-Transkriptionsfaktor führt zu einer Dimerisierung der STAT-Monomere. Die Dimere werden in den Zellkern transportiert, wo sie in der Promotorregion eine spezifische Basensequenz

ihrer Zielgene erkennen und somit die Transkription von antiapoptotischen Molekülen auslösen.

Phosphorylierte Phosphatidylinositol 3-Kinase phosphoryliert wiederum die Protein Kinase B. Die Protein Kinase B wirkt durch Phosphorylierung unterschiedlicher Moleküle auf verschiedenen Wegen. Zum einen phosphoryliert Protein Kinase B proapoptotische Moleküle (Bad, Caspase 9, Glykogen Synthase Kinase-3b), was diese wiederum inaktiviert. Des Weiteren phosphoryliert sie FOXO TF, welches dadurch nicht zum Zellkern transportiert werden kann. Dies führt dazu, dass dessen proapoptotische Zielgene (Fas Ligand, Bim) nicht transkribiert werden können. Außerdem phosphoryliert sie I κ B, welches daraufhin den Transkriptionsfaktor Nuclear Factor- κ B entlässt. Nach dem Transport in den Zellkern fördert er dort die Transkription von antiapoptotischen Molekülen (XIAP, c-IAP2).

Durch Bindung von EPO an EPO-R wird außerdem HSP70 aktiviert. Stimuliertes HSP70 bindet an proapoptotische Moleküle (Apoptosis Protease-Activating Factor 1, Apoptosis-Inducing Factor), womit es diese inaktiviert. Insgesamt werden durch die Signalkaskade des hämatopoetischen EPO-R also antiapoptotische Vorgänge gefördert beziehungsweise proapoptotische Faktoren gehemmt.

1.3.2. Nicht-hämatopoetischer EPO-Rezeptor

Es ist bekannt, dass die nicht-hämatopoetischen Wirkungen von EPO durch einen anderen Rezeptortyp vermittelt werden als die hämatopoetischen Effekte. In jenen Geweben konnten neben dem EPO-R-Monomer der β common-Rezeptor (β cR) (Brines et al., 2004) und der Ephrin B4-Rezeptor (EPHB4) (Jackson DB, 2012) als Teil eines Rezeptorkomplexes detektiert werden. Es bindet dabei wahrscheinlich die hochaffine EPO-Bindungsstelle an den EPO-R, während die niedrig affine Bindungsstelle oder eine alternative Stelle an den anderen Rezeptorpartner bindet.

Die β cR-Untereinheit wird auch als CD131 bezeichnet. Sie ist auch in das Signaling von Interleukin-3 und -5 (IL-3 und IL-5) und dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierenden-Faktor (GM-CSF) involviert (Brines et al., 2004). Der nicht-hämatopoetische Rezeptor liegt, wie in Abb. 1 ersichtlich, entweder als EPO-R Heterodimer, bestehend aus

einer EPO-R-Einheit und einer β cR-Einheit, oder als β cR-EPO-R- β cR-Heterotrimer vor.

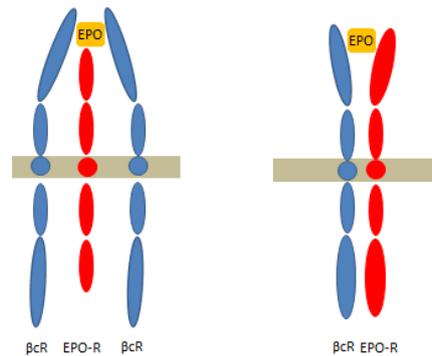


Abb. 1 Nicht-hämatopoetischer EPO-R mit Beteiligung der β cR-Untereinheit,
in Anlehnung an Debeljak et al. 2014;
links: β cR-EPO-R- β cR-Heterotrimer; rechts: β cR-EPO-R-Heterodimer

Der Ephrin-B4 (EPHB4)-Rezeptor gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Die Bezeichnung Ephrin ist abgeleitet von einer EPO-produzierenden hepatozellulären Karzinom-Zelllinie, aus der die cDNA des EPHB4 isoliert werden konnte. Ephrinrezeptoren und ihre Liganden, die Ephrine, spielen eine wichtige Rolle in diversen Entwicklungsprozessen. So vermittelt der Ligand Ephrin-B2 zum Beispiel die Entwicklung von Gefäßen. Außerdem scheint EPHB4-Rezeptor-Signaling als Überlebensfaktor verschiedenen Tumorarten eine Rolle zu spielen (Kumar et al., 2006, Noren and Pasquale, 2007). Ähnlich wie die β cR-Untereinheit ist auch der EPHB4-Rezeptor in nicht-hämatopoetisches EPO-Signaling involviert. Der als NEPOR bezeichnete Komplex besteht aus dem EPO-R-EPHB4-Rezeptor Heterodimer und den Homorezeptoren EPO-R-EPO-R und EPHB4-Rezeptor-EPHB4-Rezeptor (Jackson DB, 2012, Debeljak et al., 2014). Der NEPOR-Komplex ist in Abb. 2 dargestellt.

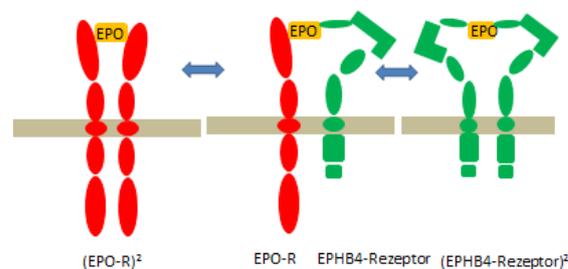


Abb. 2 NEPOR-Komplex, in Anlehnung an Debeljak et al. 2014;
links: EPO-R-EPO-R-Homodimer;
Mitte: EPO-R-EPHB4-Rezeptor-Heterodimer;
rechts: EPHB4-Rezeptor-EPHB4-Rezeptor Homodimer

1.4. Nicht-hämatopoetische EPO-Wirkungen

EPO und der EPO-R wurden bereits in vielen nicht-hämatopoetischen Zellen und Geweben, wie zum Beispiel dem zentralen Nervensystem, dem kardiovaskulären System, der Niere, dem Gastrointestinaltrakt, der Retina und dem weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt, nachgewiesen. Des Weiteren konnte ein Einfluss von EPO während der embryonalen Entwicklung und in der Wundheilung bewiesen werden. Der nicht-hämatopoetische EPO-Effekt wird als eine gewebsschutzende, antiapoptotische, mitogene Wirkung beschrieben.

Was das *zentrale Nervensystem* betrifft, so konnte nachgewiesen werden, dass Neuronen EPO-R exprimieren (Morishita et al., 1997, Masuda et al., 1993) und dass Astrozyten EPO produzieren können (Masuda et al., 1994, Marti et al., 1996). In verschiedenen Tiermodellen mit Gehirn- und Rückenmarksverletzungen konnte ein neuroprotektiver nicht-hämatopoetischer EPO-Effekt nachgewiesen werden. Bereits Präkonditionierung durch parakrin von Astrozyten ausgeschüttetes EPO hat eine Neuroprotektion zur Folge (Ruscher et al., 2002). In verschiedenen Schlaganfall-Tiermodellen führte eine systemische EPO-Applikation bis 6h nach Ischämie zu einem reduzierten Infarkt-Volumen und verminderter neuronaler Apoptose (Brines et al., 2000, Siren et al., 2001, Matsushita et al., 2003, Villa et al., 2003). Der neuroprotektive Effekt von EPO beruht neben der antiapoptotischen Wirkung auf einem proangiogenetischem Effekt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* übt EPO eine proangiogenetische Wirkung auf Endothelzellen aus, welche vor akuter ischämischer Schädigung schützt (Marti et al., 2000, Wang et al., 2004). Angiogenese ist die Bildung von neuen Gefäßen durch Verlängerung bestehender Gefäße in nicht-vaskularisierte Regionen. Sie umfasst die proteolytische Degradation der Basalmembran, die Proliferation und Migration von Endothelzellen und die röhrenförmige Ausrichtung der migrierenden Zellen. Physiologische Angiogenese findet man unter anderem in der Embryonalentwicklung und im Uterus. Unter einigen pathologischen Bedingungen, wie bei Arthritis, diabetischer Retinopathie, Wundheilung und im Tumorwachstum, findet man sie auch im adulten Organismus. Zusätzlich zur antiapoptotischen und proangiogenetischen Wirkung stimuliert EPO durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear Factor- κ B die neuronale Stammzellproduktion (Shingo et al., 2001) und fördert das Überleben von Stammzellen (Jing et al., 2009).

Im *kardiovaskulären System* findet man EPO und EPO-R in Endothelzellen (Anagnostou et al., 1994, Beleslin-Cokic et al., 2004) und in glatten Muskelzellen (Heidenreich et al., 1991, Ammarguellat et al., 1996, Morakkabati et al., 1996). Auch in Kardiomyozyten wurden EPO-R nachgewiesen (Cai et al., 2003, Tramontano et al., 2003). In vivo konnte eine durch EPO stimulierte physiologische Angiogenese in Mäuse- und Hühnerembryonen (Ribatti et al., 1999, Kertesz et al., 2004) und während der Wundheilung (Buemi et al., 2002, Haroon et al., 2003, Buemi et al., 2004, Galeano et al., 2004, Galeano et al., 2006) gezeigt werden. Unter einigen pathologischen Bedingungen, wie zum Beispiel diabetischer Retinopathie oder Tumorwachstum, kann durch unregulierte Angiogenese jedoch das Fortschreiten der Erkrankung vorangetrieben werden. Die Hochregulation von EPO im Glaskörper bei Patienten mit Diabetes geht einher mit proliferativer diabetischer Retinopathie (Watanabe et al., 2005). Auch die frühzeitige EPO-Behandlung der Anämie von Frühgeborenen steht in Verbindung mit einem signifikant erhöhten Risiko für Retinopathie (Ohlsson and Aher, 2006). Ein möglicher Mechanismus EPO-medierter Stimulation von Gewebsneovaskularisierung ist die Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in die Zirkulation (Heeschen et al., 2003, Bahlmann et al., 2004, George et al., 2005).

Der kardioprotektive Effekt von EPO beim Herzinfarkt im Hund und in der Ratte ist verbunden mit einer gesteigerten myokardialen Neovaskularisierung (Hirata et al., 2006, Prunier et al., 2007). Mäuse, die EPO-R nur in Zellen mit hämatopoetischer Abstammung exprimieren, denen das nicht-hämatopoetische EPO-Signaling also fehlt, haben nach Ligatur und Reperfusion der Koronararterie größere Infarkte und eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Kardiomyozyten (Tada et al., 2006). Auch bei chronischen Herzerkrankungen konnte ein kardioprotektiver Effekt von EPO festgestellt werden. In einem chronischen post-Infarkt Mausmodell mit folgender EPO-Behandlung zeigte sich eine verbesserte Herzfunktion, welche sich in verstärkter Angiogenese, nahezu einer Normalisierung der Level an inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und TGF- β 1, und einer verminderten Fibrose äußerte (Li et al., 2006).

Kardiovaskulär zeigt EPO neben der antiapoptotischen Wirkung auch ein proangiogenetisches und antiinflammatorisches Potenzial.

Auch in der *Niere* sind diverse protektive EPO-Wirkungen beschrieben worden. Bei der Ischämie-Reperfusionsschädigung im Tiermodell führt die Gabe von EPO zu einer

verminderten Zahl apoptotischer Zellen in der Niere (Yang et al., 2003, Gong et al., 2004, Patel et al., 2004, Sharples et al., 2004, Sharples and Yaqoob, 2006, Spandou et al., 2006). Bei chronischer Cyclosporin-induzierter Nephropathie mildert es die interstitielle Entzündung und Fibrose ab (Lee et al., 2005). Die Verabreichung von EPO bei strahlungsinduzierter renaler Dysfunktion führte jedoch zu einer Verschlechterung der renalen Funktion (Andratschke et al., 2006). Die renoprotektiven Effekte beruhen demnach auf einer antiapoptotischen und/oder einer antiinflammatorischen Wirkung.

Was den *Verdauungstrakt* betrifft, konnte eine EPO-R-Expression in der Magenschleimhaut (Sereno et al., 2006) sowie im fetalen und neonatalen Dünndarm der Ratte (Juul et al., 2001, McPherson and Juul, 2007) nachgewiesen werden. In der Ratte bewirkt EPO einen Schutz vor Ischämie-Reperfusionsschädigung im Gastrointestinaltrakt, was sich in einer Reduktion des oxidativen Stresses, der Apoptose und der Leukozyteninfiltration manifestiert (Guneli et al., 2007, Sayan et al., 2009). Im Verdauungstrakt übt EPO also eine antiapoptotische und antiinflammatorische Funktion aus.

Auch in der *Retina* werden EPO und EPO-R exprimiert. Der Anstieg der endogenen Epo-Konzentration durch hypoxische Präkonditionierung oder die Gabe von rekombinantem humanem EPO führte im Mausmodell zum Schutz der Retina vor Licht-induzierter Photozellrezeptor-Apoptose (Grimm et al., 2002). In der Retina zeigt sich also das antiapoptotische Potenzial von EPO.

Im weiblichen *Reproduktionstrakt* findet man EPO in der Zervix, im Endometrium, im Ovar (Yasuda et al., 2001) und im Eileiter (Masuda et al., 2000). EPO-R befinden sich im Endothel, in glatten Muskelzellen, in Dezidualzellen, in Drüsenepithelzellen und in Ovarfollikeln (Yasuda et al., 2001). Während die EPO-Produktion in Leber, Niere und Gehirn lediglich hypoxieinduziert erfolgt, geschieht dies in Eileiter und Endometrium auch in Abhängigkeit von Östradiol (Yasuda et al., 1998, Masuda et al., 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass EPO eine wichtige Rolle bei der zyklischen Angiogenese im Uterus spielt. Auch im Ductus epididymidis (Nebenhodengang) konnte eine Produktion von EPO nachgewiesen werden

(Kobayashi et al., 2002). Über die Funktion von EPO im Nebenhoden liegen keine weiteren Erkenntnisse vor.

Die Rolle von EPO bei der *Entwicklung des Organismus* wurde vielfach untersucht. Bisher konnte eine embryonale EPO-R-Expression in Herz (Wu et al., 1999) und Gehirn (Liu et al., 1997, Tsai et al., 2006) von Mäusen nachgewiesen werden.

Die gezielte Störung von EPO oder EPO-R in Mäusen führt zum embryonalen Tod zwischen Tag 11,5-13,5. Ursache ist das Fehlen von fetaler hepatischer Erythropoese und eine daraus resultierende schwerwiegende Anämie (Wu et al., 1995, Kieran et al., 1996, Lin et al., 1996). Während hämatopoetisches EPO-Signaling lebensnotwendig für die Entwicklung des Organismus zu sein scheint, ist es das nicht-hämatopoetische Signaling nicht. Dies wird darin deutlich, dass Mäuse mit fehlendem EPO-R in nicht-hämatopoetischen Geweben nicht embryonal letal sind (Suzuki et al., 2002). Im embryonalen Hühnerherz wurde gezeigt, dass EPO die Proliferation von Kardiomyozyten fördert (Stuckmann et al., 2003). Des Weiteren konnte in EPO-R-KO Mäusen eine verstärkte Apoptose in Myokard und Herz festgestellt werden (Yu et al., 2001, Yu et al., 2002). Die Entwicklung des Nervensystems betreffend, führt ein Fehlen des EPO-R-Signalings entweder durch Fehlen des EPO-R oder von EPO zu einem unvollständigen Schluss der Neuralröhre am Tag 10,5 (Tsai et al., 2006). In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass EPO die Differenzierung von neuronalen Progenitorzellen reguliert (Studer et al., 2000, Shingo et al., 2001). EPO- und EPO-R-KO Mäuse haben außerdem eine beeinträchtigte Angiogenese beginnend ab Tag 10,5 (Wu et al., 1999, Kertesz et al., 2004).

In der Entwicklung des Organismus hat EPO also nachgewiesenermaßen eine wichtige Funktion bei Blutbildung, Angiogenese und der Entwicklung von Herz und Gehirn.

Eine weitere bekannte nicht-hämatopoetische Wirkung des Erythropoetins ist die Förderung der Wundheilung. In unterschiedlichen Verletzungsmodellen wurde EPO eine wundheilungsfördernde Potenz attestiert. In einem Wundheilungsmodell bei Ratten führte die Verabreichung von EPO zu einer verstärkten Ausbildung von Granulationsgewebe. Dies ging einher mit vermehrter Angiogenese und einer Hochregulation der iNOS (induzierbare

NO-Synthase)-Expression (Haroon et al., 2003). Andere Untersuchungen ergaben neben der durch EPO vermehrten Angiogenese einen erhöhten Wundgehalt an Kollagen und VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Buemi et al., 2002, Buemi et al., 2004). Die Behandlung von Brandwunden mit EPO im Tiermodell führte zu einer Beschleunigung von Reepithelialisierung und Wundschluss (Galeano et al., 2006). Auch die Heilung der Femurfraktur in der Maus konnte durch die Gabe von EPO gefördert werden (Holstein et al., 2007).

1.5. Therapeutische Applikation von EPO

1.5.1. Indikationen

Indikationen für den Einsatz von Erythropoese stimulierenden Agenzien (ESA) sind:

- Chronische Nierenerkrankungen
- Chemotherapie-bedingte Anämien bei Krebspatienten
- Zidovudin-assoziierte Anämien in HIV-Patienten
- Begleittherapie von autologen Bluttransfusionen
- Perioperativ (zum Beispiel vor einer Phlebotomie zur Eigenblutspende oder postoperativ zum Ausgleich von Blutverlusten)
- Anämie bei Frühgeborenen

(Jelkmann, 2013).

Gegenüber Transfusionen von allogenen Blutbestandteilen bieten ESAs den Vorteil, ein Infektionsrisiko und immunologische Reaktionen zu umgehen (Jelkmann and Jelkmann, 2013). Zu beachten ist jedoch ein verzögerter Wirkungseintritt, weshalb ein Anstieg der Retikulozytenzahlen erst nach 3 bis 4 Tagen beobachtet werden kann. Außerdem sind viele der Patienten bedingt durch inflammatorische Mediatoren, welche die Proliferation von Erythrozyten und die Eisenverfügbarkeit beeinträchtigen können, resistent gegenüber EPO. Die verabreichten Dosierungen bei Intensivpatienten sind also häufig sehr hoch.

1.5.2. Hämatopoetische EPO-Präparate

Im Jahr 1983 wurde das humane EPO-Gen erstmals geklont. (Lin et al., 1985) Dies legte den Grundstein für die biotechnologische Entwicklung von rekombinatem humanem EPO (rHuEPO), welches die Therapie von Anämien revolutionierte. Endogenes EPO und seine rekombinanten Formen haben dieselbe Aminosäuresequenz, weisen jedoch geringfügige Unterschiede im Zuckerprofil auf. Die WHO hat 1989 für rekombinante EPO-Varianten eine INN (International Nonproprietary Names)-Nomenklatur eingeführt (WHO, 1997). Alle Substanzen mit dem gleichen Wirkmechanismus wie Erythropoetin werden mit dem Wortstamm „-poetin“ versehen. Zur Unterscheidung der rekombinanten Varianten erhalten diese als Suffix einen griechischen Buchstaben.

Epoetin- α und - β werden in einem genetisch modifizierten Subklon einer Ovarialzelllinie vom Chinesischen Streifenhamster, der sogenannten CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zelllinie, produziert (Lasne and de Ceaurriz, 2000). Epoetin- ω hingegen wird in einer genetisch subklonierten Zelllinie aus Nierenzellen von Jungtieren des Syrischen Goldhamsters, welche als BHK (Baby hamster kidney)-Zelllinie bezeichnet wird, hergestellt. Epoetin- δ wird von einer humanen Fibrosarkomzelllinie, der HT1080-Zelllinie, synthetisiert (Martin, 2007).

Epoetin- α war das erste rHuEPO, welches pharmazeutisch zugelassen wurde. Im Verlauf sind weitere ESAs entstanden, welche jedoch im Vergleich zu Epoetin- α verlängerte Halbwertszeiten, verbesserte Rezeptorbindungseigenschaften und erhöhte biologische Wirksamkeiten aufweisen. Somit konnte eine Verlängerung der Dosierungsintervalle gewährleistet werden, was den Einsatz im klinischen Alltag praktikabler macht.

Darbepoetin- α ist ein sogenanntes hyperglykosyliertes EPO-Analogon, welches als Resultat von 5 Aminosäuresubstitutionen 2 zusätzliche N-gebundene Kohlenhydratketten an Position 30 und 88 aufweist (Elliott et al., 2003). Die hinzugefügten Kohlenhydrate interferieren nicht mit der Rezeptorbindung und beeinträchtigen weder Stabilität noch Struktur des Moleküls. Verglichen mit Epoetin- α ist die Serumhalbwertszeit dreifach erhöht, die Rezeptorbindungsaffinität verringert und die Bioaktivität in verschiedenen Spezies verstärkt (Elliott et al., 2003, Elliott et al., 2004, Sasu et al., 2005, Egrie et al., 2003). Die erhöhte Bioaktivität bei verminderter Rezeptorbindungsaffinität ist auf die in der Sialsäure

enthaltenen Kohlenhydrate zurückzuführen, welche die Clearance herabsetzen (Egrie et al., 2003, Elliott et al., 2004). Die verlängerte Exposition kompensiert die verminderte Rezeptorbindungsaffinität, sie resultiert letztlich in einer vergrößerten Bioaktivität.

Durch Kopplung mit Polyethylenglykol (PEG) werden Moleküle von einer Wasserhülle umgeben (Long et al., 2006, Macdougall, 2005, Jarsch et al., 2008). Dies bedingt eine gesteigerte hydrodynamische Größe der Substanz, was mit einer verringerten Aufnahme aus dem Blut ins extravasale Gewebe und in einer verminderten Clearance verbunden ist. Ein Problem der Polyethylenglykolysierung ist die Schwierigkeit des Anvisierens spezifischer Aminogruppen. Dies hat einen Einfluss auf Aktivität und Proteinfaltung. PEGysierung kann die Bindungsaktivität und somit die Bioaktivität vermindern, indem es entweder für die EPO-R-Bindung essentielle Aminosäuren verändert oder die Bindung an den EPO-R sterisch behindert. Die gezielte Addition von PEG und die damit verlängerte Halbwertszeit kann auf 2 verschiedene Arten erzielt werden. Zum einen kann eine vorherige gezielte Substitution von Cystein in nicht-funktionellen Regionen eine Konjugation von PEG bei Erhaltung der Bioaktivität ermöglichen (Long et al., 2006, Goodson and Katre, 1990, He et al., 1999). Zum anderen besteht die Möglichkeit, eine PEG-gekoppelte Aminosäure gezielt zu addieren. Dadurch kann einem potentiellen Verlust der Bioaktivität vorgebeugt werden (Chen et al., 2000, Chen et al., 2005). PEG-konjugierte EPO-Analoga sind zum Beispiel PEG-Darbepoetin- α , PEG-Hematide und Methoxy-PEG-Epoetin- β (Agoram et al., 2009, Fan et al., 2006).

1.5.3. Nicht-hämatopoetische EPO-Präparate

Carbamyliertes EPO (cEPO), welches durch Carbamylierung der 8 Lysinreste und des N-terminalen Alanins des EPO-Moleküls generiert wurde, hat eine neuroprotektive Wirkung, während der stimulierende Einfluss auf die Erythropoese fehlt (Chamorro et al., 2013). Auch bei langfristiger hoher Plasmakonzentration wurde in verschiedenen Tiermodellen keine Stimulation der Erythropoese beobachtet. CEPO vermittelt seine Wirkung durch Bindung an den β cR-Rezeptoranteil, das klassische EPO-R Monomer ist dabei nicht beteiligt.

AsialoEPO entsteht durch enzymatische Desialylierung von EPO. Die Sialsäure am Ende der

Oligosaccharidketten stabilisiert das EPO-Molekül in vivo. AsialoEPO hat daher eine verkürzte Halbwertszeit. Die verkürzte Zeit in der Zirkulation reicht nicht aus, um die Hämatopoese signifikant zu stimulieren, jedoch schon um gewebsschutzliche Effekte zu vermitteln (Sonoda et al., 2014, Takeyama et al., 2012, Nakazawa et al., 2010). Verglichen mit EPO hat asialoEPO dieselbe Rezeptoraffinität zum Epo-R-Homodimer. Auch nach hoch dosierter und langzeitiger Anwendung in Maus und Ratte wurde kein hämatopoetischer Effekt beobachtet.

1.5.4. Nebenwirkungen von EPO

Bekannte potentielle Nebenwirkungen der EPO-Therapie sind unter anderem Bluthochdruck, Retinopathie, Neurotoxizität, Thrombosen und die Aplasie von Erythrozyten.

Bluthochdruck ist eine beschriebene Nebenwirkung der EPO-Therapie bei Patienten mit Nierenerkrankungen. 20 bis 30% dieser Patienten entwickeln eine Hypertension. Die Hypertension kann jedoch in den meisten Fällen medikamentös kontrolliert werden (Maschio, 1995, Bohlius et al., 2006).

Die Retinopathie als Folge der Stimulation von retinaler Neovaskularisierung (Morita et al., 2003) ist eine bekannte Komplikation nach dem Einsatz von EPO zur Behandlung der Anämie von Frühreifen (Ohlsson and Aher, 2006).

Hohe EPO-Dosierungen in Kombination mit Hypoxie sind assoziiert mit einem paradoxen neurotoxischen Effekt (Weber et al., 2005, Buhrer et al., 2007, Kellert et al., 2007).

Verschiedene Studien weisen auf einen prothrombotischen Effekt von EPO hin. Die Verwendung von EPO bei chronisch nierenkranken Patienten birgt ein erhöhtes Risiko für arterielle und venöse Thrombosen (Besarab et al., 1998, Druke et al., 2006, Singh et al., 2006, Phrommintikul et al., 2007). Auch der Einsatz von EPO bei Traumapatienten deutet auf prothrombotische Effekte des Erythropoetins hin (Corwin, 2007). Der Einsatz bei traumatischen Hirnverletzungen war mit vermehrtem Auftreten von venösen Thrombembolien assoziiert (Skrifvars et al., 2016). Ebenso konnte im Rahmen der

Behandlung von Anämien verschiedener Krebserkrankungen eine prothrombotische Wirkung des Erythropoetins nachgewiesen werden. Diese zeigte sich unter anderem bei Tumor-assoziierten Anämien von Zervixkarzinomen und vulvovaginalen Karzinomen (Lin et al., 2004) sowie bei metastasierendem Brustkrebs (Chavez-Macgregor et al., 2009). In einem arterio-venösen Shuntmodell im Hund zeigte EPO thrombogene Eigenschaften (Wolf et al., 1997). Der Hämatokrit blieb unter der EPO-Therapie weitestgehend unverändert. Nach Wegfall der EPO-Therapie fiel auch die thrombogene Wirkung weg.

Bei Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen konnte gezeigt werden, dass sich die EPO-Therapie beim Überschreiten von Hämoglobinwerten von 120 g/l negativ auf das Überleben auswirkt (Henke et al., 2003, Leyland-Jones, 2003, Leyland-Jones et al., 2005, Wright et al., 2007).

Eine weitere bekannte unerwünschte Nebenwirkung der Therapie mit ESAs ist die Aplasie der roten Blutzellen bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen (Bennett et al., 2004).

2. Überexpression von humanem EPO in der Maus

2.1. Beschreibung des Tg(Epo)-Mausmodells

Die Mauslinie, welche humanes EPO in sauerstoffunabhängiger Weise überexprimiert, wurde von Ruschitzka et al. generiert und beschrieben (Ruschitzka et al., 2000). Zunächst wurde dafür der SR α -Promotor des pTREPO-Plasmids, welches die Expression von humaner EPOcDNA ermöglicht, ersetzt durch den Human platelet derived growth factor B chain (PDGFB)-Promotor aus dem psisCAT6a-Plasmid. So konnte das pPDGFepo-Plasmid generiert werden, welches anschließend mittels Mikroinjektion in den Vorkern befruchteter Eizellen von superovulierten (C57BL/6 x C3H)-F1 Hybrid-Mäusen eingebracht wurde. Die Embryonen wurden dann in den Eileiter pseudoträchtiger, zyklussynchronisierter Empfängertiere transplantiert. Aus Schwanzbiopsieproben wurde DNA isoliert, anhand welcher mittels Southern Blot-Technologie das Vorliegen des PDGFB-Promotors nachgewiesen werden

konnte. Die erfolgreiche Integration des Genkonstruktes in das Erbgut der Nachkommen konnte so bewiesen werden. Ergebnis der Vorkerninjektion ist die transgene Mauslinie TgN(PDGFBEPO)321Zbz, welche im Folgenden als Tg(Epo)-Maus bezeichnet wird.

Der veränderte Genotyp spiegelt sich auch im Phänotyp der Mäuse wider. Mittels Radioimmunoassay konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur WT(Epo)-Maus die Erythropoetinkonzentration im Blut der Tg(Epo)-Maus 12fach erhöht ist (Frietsch et al., 2007b). Außerdem konnten 26fach erhöhte EPO-Konzentrationen im Gehirn und 2,5fach erhöhte Konzentrationen in der Lunge festgestellt werden (Heinicke et al., 2006). Keine erhöhte Expression zeigte sich in Herz, Leber und Niere. Es ist unwahrscheinlich, dass das im Gehirn exprimierte EPO die Blut-Hirn-Schranke passiert. Die erhöhten Plasmawerte sind demnach vermutlich auf die Expression in der Lunge zurückzuführen.

Die Tg(Epo)-Maus erreicht innerhalb der ersten 8 bis 9 Lebenswochen Hämatokritwerte bis zu 0,89 l/l (Ruschitzka et al., 2000, Wagner et al., 2001). Die Blutviskosität der Tg(Epo)-Maus ist vierfach erhöht (Frietsch et al., 2007a). In der Milz der Tg(Epo)-Maus findet extramedulläre Erythropoese statt, was sich in einer Splenomegalie äußert (Vogel et al., 2003). Das Milzgewicht ist im Vergleich zu WT(Epo)-Tieren fünffach erhöht. Die lienale erythropoetische Aktivität konnte histologisch mit dem Erythropoese-assoziierten Antikörper ER-HR3 dargestellt werden. Histologisch zeigten sich zudem ein vergrößerter Anteil an roter Pulpa und eine zergliederte Struktur der weißen Pulpa.

Erhöhte Retikulozytenzahlen deuten auf eine jüngere Erythrozytenpopulation hin, was mit besser verformbaren Zellen assoziiert ist (Foller et al., 2007). Das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) der Tg(Epo)-Maus ist größer als das der WT(Epo)-Maus, was auf größere Erythrozytenvolumina zurückzuführen ist. Die etwa dreifach erhöhte Erythrozyten-Verteilungsbreite (RDW), ein die Zellgröße betreffender Variationskoeffizient, legt eine Anisozytose in der Tg(Epo)-Maus nahe. Als adaptiver Mechanismus zur Herunterregulation der Erythrozytenmasse sind vermutlich physiologische Abbauege von Erythrozyten verstärkt (Bogdanova et al., 2007). Das beinhaltet zum einen eine hocheffiziente Erythrophagozytose durch Lebermakrophagen, zum anderen eine beschleunigte Alterung der Erythrozyten. Während WT(Epo)-Erythrozyten eine Lebensdauer von 60 Tagen aufweisen, werden Erythrozyten in Tg(Epo)-Mäusen etwa 20 Tage alt. Andere nachgewiesene Anpassungsmechanismen an den erhöhten Hämatokrit sind eine gesteigerte

Expression von endothelialer NO-Synthase und die damit geförderte NO-medierte Vasodilatation und eine erhöhte Flexibilität der roten Blutzellen (Camici et al., 2007). Außerdem passen sich Tg(Epo)-Mäuse mittels Unterdrückung der Hpcidinsynthese und einer gesteigerten duodenalen Eisenabsorption an den dauerhaft erhöhten Eisenbedarf an (Diaz et al., 2013).

Während das Plasmavolumen der Tiere unverändert ist, ist das Blutvolumen verglichen mit WT(Epo)-Tieren verdoppelt (Heinicke et al., 2006). Die Tg(Epo)-Mäuse haben eine Thrombozytopenie (Camici et al., 2007). Da Thrombozytenzahlen anteilig zum Gesamtblutvolumen betrachtet wurden, ist davon auszugehen, dass bezogen auf den Anteil von Thrombozyten im Plasma kein Unterschied zwischen Tg(Epo)- und WT(Epo)-Mäusen besteht.

Die Mäuse haben keine vermehrten kardiovaskulären Erkrankungen und neigen nicht verstärkt zu thrombembolischen Ereignissen (Heinicke et al., 2006). Es gibt keinen Unterschied im arteriellen Blutdruck und in der Herzfrequenz zwischen Tg(Epo)- und WT(Epo)-Tieren, der zentrale Venendruck in Tg(Epo)-Mäusen ist jedoch erhöht (Vogel et al., 2003). Dies lässt vermuten, dass eine erhöhte Vorlast der Herzen vorliegt. Nach Splenektomie ist der zentrale Venendruck und damit die Vorlast des Herzens deutlich verringert.

Die Tiere haben eine verminderte Lebenserwartung von etwa 7,4 Monaten (Wagner et al., 2001). Dies wird auf eine licht- und elektronenmikroskopisch nachgewiesene Degeneration von Leber und Niere zurückgeführt. Eine auffällige phänotypische Besonderheit sind unilaterale Spasmen der Hintergliedmaße in 7 bis 8 Monate alten Tieren. Histopathologisch äußert sich dies in einer Muskelfaserdegeneration des M. extensor digitorum longus und einer Reduktion der Zahl neuromuskulärer Synapsen (Heinicke et al., 2006). Eine weitere histomorphologische Besonderheit sind luminale Protrusionen, verdickte Basalmembranen und eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien und Transportvesikeln in vaskulären Endothelzellen des Gehirns (Ogunshola et al., 2006). Zusammen mit dem Nachweis verschiedener Marker für Endothelzellaktivierung und -schädigung spricht dies für das Vorliegen von Entzündungsprozessen.

Was die Ausdauerleistung der Tg(Epo)-Mäuse bei einem zweiminütigen Schwimmtest betrifft, so kann bereits nach 60 Sekunden eine vorzeitige Erschöpfung bei den transgenen

Tieren festgestellt werden (Heinicke et al., 2006). Rheologische Veränderungen einerseits, neuromuskuläre Dysfunktionen andererseits könnten die Ursache dafür sein.

Weibliche Tg(Epo)-Mäuse zeigen eine Subfertilität (Gassmann et al., 2008). In der Regel abortieren Tg(Epo)-Weibchen zwischen Tag 9 und 10 der Trächtigkeit. Ursächlich dafür ist eine gestörte uterine Arteriogenese, ausgelöst durch eine niedrige Scherspannung. Somit kann der in der Trächtigkeit benötigte Anstieg des Blutflusses nicht gewährleistet werden. Nach Splenektomie senkt sich der Hämatokrit innerhalb von 2 bis 3 Wochen auf Werte zwischen 0,6 und 0,75 l/l. Durch die Erhöhung der Blutflussgeschwindigkeit und die Verminderung des Durchmessers der uterinen Arterien steigt die Scherspannung. So kann ein normales Wachstum der uterinen Arterien gewährleistet und die Fertilität gesteigert werden.

3. Wandbau von Arterien

Mit Ausnahme der Gefäße in terminalen Strombahnen haben die Gefäße des Körpers einen gemeinsamen, aus 3 Schichten bestehenden Grundbauplan (Liebich, 2004). Von innen nach außen lassen sich Gefäße in eine Tunica interna (Intima), eine Tunica media (Media) und eine Tunica externa (Adventitia) gliedern. Der allgemeine Aufbau einer Arterie ist in Abb. 3 dargestellt.

Die *Intima* gliedert sich in eine einschichtige Lamina endothelialis (Endothel), das Stratum subendotheliale und die Membrana elastica interna. Das Endothel wird von einer geschlossenen Basalmembran umgeben. Das Endothel dient dem transvasalen Stofftransport, welcher die Ernährung der Intima und des inneren Anteils der Media sicherstellt. Außerdem hat das Endothel eine wichtige Funktion beim Verschluss von Gefäßwanddefekten. Es enthält Weibel-Palade-Körper, die von-Willebrand-Faktor (vWF) speichern. Bei Verletzung wird vWF freigesetzt und setzt die Thrombozytenaggregation in Gang.

Die *Media* besteht aus mehreren zirkulären Schichten glatter Muskelzellen mit eingelagerten

elastischen und kollagenen Fasern. Je nach Lokalisation im Gefäßsystem bestehen morphologische Unterschiede im Aufbau der Media. Herznahe Arterien des elastischen Typs enthalten hauptsächlich ein Netzwerk aus elastischen Fasern und nur zu einem geringen Anteil glatte Muskelzellen. Dies kommt der Windkesselfunktion der Gefäße zugute. Das in der Systole vom Herz ausgeworfene Blut wird durch Dehnung der elastischen Fasern zunächst im Gefäß gespeichert, in der Diastole ziehen sich die elastischen Fasern zusammen und treiben das Blut weiter in Richtung Peripherie. Der pulsatile vom Herz vorgegebene Blutfluss kann somit in einen kontinuierlichen Blutstrom umgewandelt werden. Die mittelgroßen und kleineren Arterien des Körpers sind vom muskulären Typ. Sie enthalten mehrere Schichten glatter Muskelzellen in der Media, welche der Erhaltung des intravasalen Drucks dienen. Nach außen wird die Schicht von einer Membrana elastica externa umgeben. Die fibroelastische *Adventitia* stellt eine Verschiebeschicht zum angrenzenden Gewebe dar.

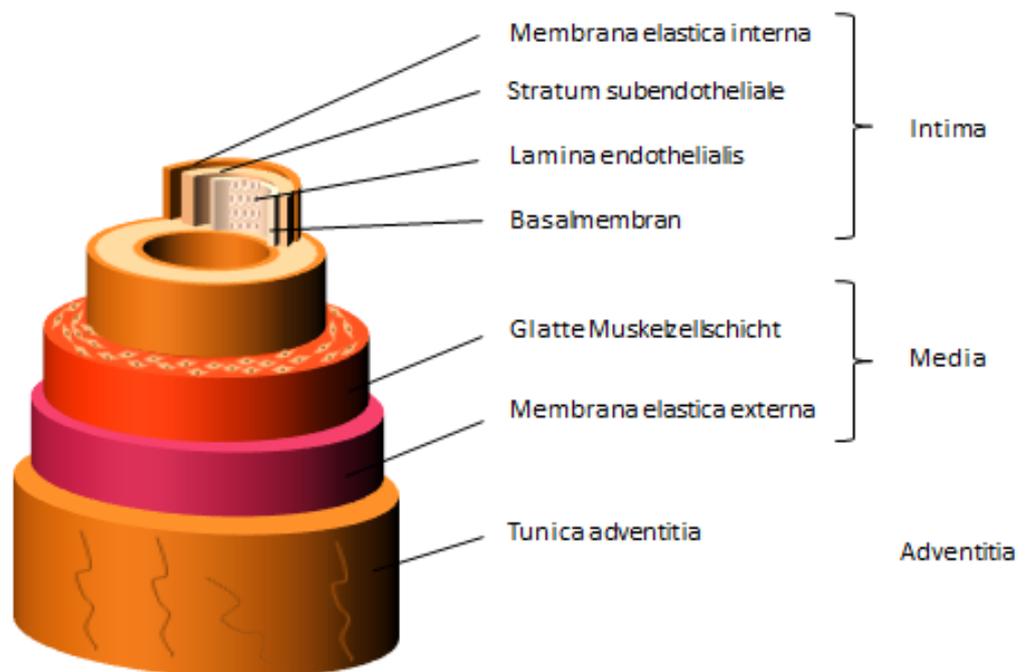


Abb. 3 Wandbau einer Arterie (eigene Darstellung)

4. Arteriosklerose

4.1. Definition

Arteriosklerose (altgriechisch; arteria: Ader, sklerós: hart) wird umgangssprachlich häufig auch als Arterienverkalkung bezeichnet. Es handelt sich um eine degenerative Erkrankung der Arterien, die mit Ablagerung von Cholesterin, Fettsäuren, Thromben, Kollagen, Proteoglykanen und in geringem Anteil auch Calciumphosphat in der Wand von Arterien einhergeht. Die verhärtete und verdickte Gefäßwand verliert an Elastizität, was letztlich zu einer Einengung des Lumens führt. So entstandene Läsionen können rupturieren und eine Thrombusformation hervorrufen.

Die Folgeerkrankungen der Arteriosklerose sind die häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen. Die Arteriosklerose entwickelt sich häufig über Jahrzehnte symptomlos, bis sie sich durch Herzinfarkt, Schlaganfall oder periphere arterielle Verschlusskrankheit manifestiert.

Ursache kann die erhöhte Konzentration an Apolipoprotein B-haltigen Lipoproteinen im Blut sein, wovon LDL (Low density lipoprotein) die am häufigsten vorzufindende Form ist (Bentzon et al., 2014). Dies ist beispielsweise der Fall bei familiärer Hypercholesterinämie oder anderen genetischen Hyperlipidämien. Häufiger ist es jedoch eine Kombination verschiedener Risikofaktoren, die das Krankheitsbild auslösen. Man spricht deswegen auch von einer multifaktoriellen Erkrankung. Bekannte prädisponierende Faktoren sind zum Beispiel: Alter, männliches Geschlecht, familiäre Belastung, Bewegungsmangel, Adipositas, Rauchen, Diabetes mellitus, Hypertonie und Gicht.

Die Arteriosklerose ist vor allem in Bereichen lokalisiert, wo niedrige oder schwingende Scherspannungen auftreten, vornehmlich also an Gefäßabzweigungen und entlang innerer Kurvaturen.

4.2. Pathogenese der Arteriosklerose

Laut Russell Ross stellt die Arteriosklerose die Antwort auf einen Insult der Arterienwand dar. Lipoproteine niedriger Dichte, sogenannte LDL, aus dem Plasma werden in die Intima rekrutiert und dort durch Oxidation und Aggregation in einen entzündlichen Phänotyp modifiziert (Bentzon et al., 2014). Folglich werden Endothelzellen und glatte Muskelzellen aktiviert, exprimieren Oberflächenadhäsionsmoleküle und sezernieren Chemokine und Wachstumsfaktoren. T-Lymphozyten und Monozyten aus der Zirkulation interagieren mit den Oberflächenmolekülen und migrieren in die Endothelzellschicht. Monozyten differenzieren sich unter dem Einfluss von Monocyte colony stimulating factor (M-CSF) in Makrophagen. Makrophagen und T-Lymphozyten produzieren Zytokine, die ein weiteres Anlocken von Monozyten und T-Lymphozyten bewirken, und treiben so den Entzündungsprozess weiter voran (Frostegard et al., 1999). Makrophagen phagozytieren Lipoproteine und entwickeln sich damit zu Schaumzellen. Ansammlungen von Schaumzellen sind makroskopisch als Xanthome oder streifige Fettablagerungen sichtbar. Durch Apoptose und Nekrose von Schaumzellen und glatten Muskelzellen entstehen nekrotische Herde. Mit dem Vorliegen eines nekrotischen Herdes wird die Läsion als Fibroatherom bezeichnet. Im Laufe der Läsionsprogression nimmt die Anzahl glatter Muskelzellen in der Intima bedingt durch Migration und lokale Proliferation zu. Kollagen, Elastin und Proteoglykane werden von glatten Muskelzellen sezerniert und führen zu einer Stabilisierung der Läsion. Apoptotische Zellen, extrazelluläre Matrix und Material nekrotischer Herde können als Ausgangspunkt für die Ansammlung von Calciumablagerungen dienen. Nach und nach ersetzen die Kalzifizierungen den größten Teil des Plaquevolumens. Das von aktivierten T-Lymphozyten freigesetzte Interferon- γ hemmt die Kollagenproduktion von glatten Muskelzellen (Amento et al., 1991). Der Schwund von Kollagen einerseits und die Ansammlung von Makrophagen und Schaumzellen, welche Kollagen phagozytieren und proteolytische Substanzen freisetzen, andererseits führt zu einer Verschmälerung der bindegewebigen Kappe (Bentzon et al., 2014). Die Läsion wird so zunehmend instabiler und vulnerabler, woraus letztlich eine Plaqueruptur resultieren kann. Dabei wird die subendotheliale Gefäßschicht freigelegt, die ein hohes thrombogenes Potenzial aufweist. Die Plaqueruptur ist eine der häufigsten Ursachen von Thrombosen. In den meisten Fällen tritt die Ruptur im Randbereich, beziehungsweise in der Schulterregion der Plaques, auf. Abzugrenzen ist der Fall, in dem

knötchenförmige Calciumablagerungen durch die bindegewebige Kappe in das Gefäßlumen hervorragen. Man spricht dann von einer Plaqueerosion.

4.3. Tiermodelle der Arteriosklerose

Die erste Tierart, in welcher experimentell Arteriosklerose induziert und nachgewiesen werden konnte, war das Kaninchen (Drobnik et al., 2000). Es entwickelt zwar keine spontanen Läsionen, ist aber als Tiermodell dennoch geeignet, da es sehr sensibel auf Abweichungen im Cholesteringehalt des Futters reagiert und bereits nach kurzer Zeit Läsionen entwickelt. Verglichen mit der Arteriosklerose des Menschen enthalten die Läsionen allerdings mehr Fett und haben einen entzündlicheren Phänotyp.

Schweine und nichtmenschliche Primaten sind besser geeignete Modellorganismen für die Arteriosklerose (Jawien et al., 2004). Heutzutage werden Affen aus Tierschutz- und Kostengründen kaum noch herangezogen. Nach Fettfütterung des Schweines sind Plasmacholesterolverte und auch die Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen vergleichbar mit denen des Menschen. Nachteilig beim Schwein sind die kosten- und arbeitsintensive Haltung und Versuchsdurchführung. Ratten und Hunde sind für die Untersuchung der Arteriosklerose ungeeignet, weil sie keine spontanen Läsionen entwickeln und zur Induktion von Gefäßläsionen schwerwiegende Modifikationen in der Diät erforderlich sind.

Mäuse sind im Allgemeinen resistent gegen Arteriosklerose. Einzige Ausnahme ist der C57BL/6-Stamm. Im Unterschied zum Menschen sind die Läsionen bei der Maus verstärkt inflammatorisch. Nachteilig sind die geringe Größe der Läsionen, die Beschränkung der Läsionslokalisation vor allem auf den Aortenursprung und fehlende fortgeschrittene Arteriosklerosestadien. Natürlicherweise haben Mäuse hohe HDL (High density lipoprotein)- und niedrige LDL-Plasmakonzentrationen. Im Menschen ist das Verhältnis umgekehrt. Dort wird HDL außerdem als protektiv für Arteriosklerose betrachtet. Mäusen fehlt das Cholesterinester-Transferprotein, welches Cholesterinester von HDL in VLDL (Very low density lipoprotein) und LDL verwandelt.

4.4. Die ApoE^{-/-}-Maus

Das Apolipoprotein E (ApoE) ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 34 kD, welches bei Maus und Mensch in der Leber und im Gehirn synthetisiert wird. Es ist mit Ausnahme der LDL Bestandteil aller Lipoproteine. Durch Interaktion mit dem Apolipoprotein B-, Apolipoprotein E- und Chylomikron-Remnant-Rezeptor vermittelt es eine spezifische Aufnahme von Fetten aus dem Blut in die Leber.

Durch homologe Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen konnte 1992 das ApoE-Gen gezielt inaktiviert werden (Piedrahita et al., 1992, Plump et al., 1992). Die manipulierten embryonalen Stammzellen wurden in Blastozysten mikroinjiziert und in den Uterus einer zyklussynchronisierten Amme transplantiert. Ergebnis war die ApoE^{-/-} (ApoE-Knockout)-Maus. Sie hat bis zu fünffach erhöhte Plasmacholesterolverwerte im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen. Was das Lipoproteinprofil betrifft, zeigen ApoE^{-/-}-Mäuse eine Verschiebung von HDL zu Chylomikronen-Remnants und VLDL.

Bei Verabreichung einer Haltungsdiät werden bereits bei 5 bis 6 Wochen alten Tieren eine Monozytenadhäsion und eine transendotheliale Monozytenmigration in der Aorta beobachtet (Jawien et al., 2004). In 6 bis 10 Wochen alten Tieren finden sich bereits streifige Fettablagerungen. Im weiteren Verlauf können auch ein Schaumzell-Stadium und eine fibroproliferative Phase mit fibröser Kappe und nekrotischen Fettzentren nachgewiesen werden. Bei Verabreichung einer „Western Type“ Diät, welche zu 21% aus Fett und 0,15% aus Cholesterol besteht, treten die Läsionen beschleunigt und verstärkt auf. Im Unterschied zur Pathogenese beim Menschen findet man in Mausmodell keine Plaqueruptur. Dies ist vermutlich auf den kleineren Gefäßdurchmesser in der Maus und die damit verhältnismäßig vergrößerte Oberflächenspannung zurückzuführen. Der Durchmesser der murinen Aorta beträgt weniger als 1 mm und ist somit kleiner als die Hauptkoronargefäße des Menschen.

4.5. Weitere Mausmodelle

Durch gezielte Mutation konnte eine LDL-Rezeptor-Knockout Maus geschaffen werden (Ishibashi et al., 1993). Die Abweichungen in Lipoproteinprofil fallen bei diesen Mäusen

moderater aus als bei ApoE^{-/-}-Mäusen. Bei der Verabreichung von normaler Diät entwickeln die Mäuse keine Arteriosklerose. Erhalten die Mäuse eine „Western Type“ Diät, so formen sich atherosklerotische Läsionen bis zum fibroproliferativen Stadium. Die Pathologie der Läsionen ist jedoch nicht so gut charakterisiert wie in ApoE-Knockout Mäusen.

Die transgene Maus, die humanes Apolipoprotein B in der Leber synthetisiert, weist leicht erhöhte LDL- und Gesamtcholesterolwerte auf (Linton et al., 1993, Callow et al., 1994). Was das Lipoproteinprofil betrifft, zeichnen sich diese Mäuse durch einen ausgeprägten LDL-Peak aus. Bei Verabreichung von normaler Diät entwickeln die Mäuse keine atherosklerotischen Läsionen, wird jedoch die „Western Type“ Diät gefüttert, so wird Arteriosklerose induziert.

Die LDL-Rezeptor- und ApoE-Doppelknockout Maus entwickelt schwerwiegende Hyperlipidämie und Arteriosklerose auch ohne Verabreichung einer atherogenen Diät (Bonhthou et al., 1997, Witting et al., 1999).

5. Arteriellles Remodeling

5.1. Bedeutung

Der Begriff des arteriellen Remodelings findet im Zusammenhang mit verschiedenen vaskulären Erkrankungen Erwähnung. Arteriellles Remodeling beschreibt dabei die Umbauvorgänge in der Gefäßwand, welche sowohl die extrazelluläre Matrix als auch die Gefäßzellen an sich betreffen. Es wird zwischen positivem und negativem Remodeling unterschieden (Ward et al., 2000).

Positives Remodeling bedeutet eine Zunahme der Gefäßgröße, welche im Zusammenhang mit der Bildung von Plaques dazu beiträgt, dass die Lumengröße gewahrt wird. Beteiligt daran ist das Endothel, welches vermehrt NO (Stickstoffmonoxid) freisetzt. NO wiederum aktiviert die Matrix-Metalloproteinasen (MMP)-2 und -9, die die Proliferation glatter Muskelzellen hemmen und deren Apoptose vorantreiben. In atherosklerotischen Läsionen sind es Schaumzellen, die MMP sezernieren. Einerseits wird der Blutfluss dadurch aufrechterhalten, andererseits ist die Gefahr von Plaquerupturen erhöht.

Negatives Remodeling hingegen geht mit einer Abnahme der Gefäßgröße einher. Man findet es als Stenose beziehungsweise Restenose bei transplantationsassoziierten Vaskulopathien, nach Angioplastien, Atherektomien, Bypass-Operationen und Stentimplantationen. Histopathologisch zeigen sich häufig eine Intimahypertrophie, die sogenannte Neointima, aber auch Hypertrophien der Media, Thrombusbildung und Vasokonstriktion können beobachtet werden. Das Ergebnis ist ein verkleinertes Lumen. Die Neointimabildung resultiert aus einer Migration von glatten Muskelzellen aus der Media. Die ursprünglich kontraktile glatte Muskelzelle differenzieren sich in einen vermehrt sekretorischen Phänotyp und führen auf diese Weise zu einer vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix (EZM) (Thyberg et al., 1997). Außerdem werden hämatopoetische Stammzellen in die Läsion rekrutiert, die sich in Endothelzellen und glatte Muskelzellen differenzieren (Simper et al., 2002).

5.2. Mausmodelle

Es gibt verschiedene Methoden, um Umbauprozesse in der murinen Gefäßwand zu induzieren. Durch den Einsatz genetisch modifizierter Mäuse kann der Effekt von spezifischen Genen und von dessen Produkten auf arterielles Remodeling untersucht werden.

5.2.1. Drahtverletzung

Durch Einführen eines Herzkatheter-Führungsdrahtes wird das Endothel des entsprechenden Gefäßes entfernt. Hierzu verwendet man in der Maus vornehmlich die A. carotis communis und die A. femoralis communis. Das Modell wurde von Lindner (Lindner et al., 1993) und Mendelsohn (Sullivan et al., 1995, lafrati et al., 1997) etabliert.

Zunächst wird der Blutfluss in dem betreffenden Gefäß durch Stauschlingen vorübergehend unterbrochen (d'Uscio et al., 2007). Zur Denudation der A. carotis comm. sin. erfolgt das Einführen des Drahtes über die A. carotis externa. Diese wird dafür distal ligiert. Proximal

wird an ihr eine Schlinge vorgelegt. Zwischen Ligatur und Schlinge wird das Gefäß quer angeschnitten und der Draht eingeführt. Bei dem Draht handelt es sich um einen 0,08mm breiten, in der Hälfte gefalteten Draht, der mit der Schlaufe voran eingeführt wird. Unter Rotation wird dieser entlang der A. carotis comm. bis zum Aortenbogen dreimal vor- und zurückgeschoben. Im Anschluss wird die vorgelegte Ligatur der A. carotis externa zugezogen. In einer anderen Publikation wird anstelle des doppelt gefalteten Drahtes ein 0,35mm breiter Draht ungefaltet eingeführt (Tsuzuki, 2009).

Ganz ähnlich ist das Vorgehen im A. femoralis-Verletzungsmodell. Zur Denudation der linken A. femoralis comm. wird ein 0,25mm breiter Draht eingeführt und dreimal vor- und zurückgeschoben (Urao et al., 2006).

Durch mechanische Entfernung des Endothels spielt der mögliche Einfluss von Endothelzellen auf glatte Muskelzellen keine Rolle in diesem Modell (Roque et al., 2000). Die Antwort des Organismus ist gekennzeichnet durch eine schnelle Anlagerung von Adhäsionsmolekülen aus der Zirkulation und einem Anheften von Leukozyten. Anfänglich handelt es sich bei den anhaftenden Zellen hauptsächlich um neutrophile Granulozyten, während eine Woche nach Induktion vermehrt Makrophagen und Thrombozyten nachgewiesen werden. 2 bis 4 Wochen nach Gefäßverletzung ist eine konzentrische Neointimaformation zu erwarten.

5.2.2. Ligatur

Die linke A. carotis comm. wird nahe ihrer Aufzweigung in A. carotis externa und interna ligiert (Janmaat et al., 2010). Im Gegensatz zur Drahtverletzung bleibt in diesem Modell das Endothel intakt. Es produziert also weiterhin vasoaktive Faktoren, wie beispielsweise NO. Zusätzlich wird durch die Ligatur der Blutfluss unterbunden. Die glatten Muskelzellen proliferieren, was sich in einem Wachstum von Media und Intima äußert und letztlich zu einer Verengung des Gefäßlumens führt. Die Neointimaformation beruht in diesem Modell auf einer Stase des Blutflusses (Roque et al., 2000).

6. Arterielle Thrombose

6.1. Pathogenese

Bei der Thrombose handelt es sich um eine intravasale Blutgerinnung, die zu einem vollständigen Gefäßverschluss führen kann.

Zur Beschreibung der Pathogenese kann die Virchow-Trias herangezogen werden. Der Trias zufolge sind die 3 Hauptursachen für Thrombosen:

- Endothelzellalterationen
- Stase des Blutflusses beziehungsweise Veränderungen der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes
- Veränderungen in der Zusammensetzung des Blutes

(Esmon, 2009). Im arteriellen System entsteht die Thrombose in den meisten Fällen im Rahmen von atherosklerotischen Prozessen oder in Aneurysmen. Im Gegensatz zu venösen Thromben, welche einen hohen Anteil an Erythrozyten enthalten, sind arterielle Thromben reich an Thrombozyten (Casa et al., 2015).

6.2. Hämostase

Bei Endothelläsionen wird die subendotheliale Matrix freigelegt (Engelhardt, 2005). Der vWF, welcher aus α -Granula von Megakaryozyten und Endothelzellen freigesetzt wird, bindet an Kollagenstrukturen des Stratum subendotheliale. Der vWF erfährt hierdurch eine Konformationsänderung, wodurch dessen Bindung an den GPIIb/IX-Rezeptorkomplex an der Oberfläche von Thrombozyten ermöglicht wird. Die Thrombozytenadhäsion bewirkt eine Aktivierung der Thrombozyten, worauf diese mit Freisetzung von Granula reagieren. Der Inhalt der Granula, wie ADP, Serotonin und ThromboxanA₂, aktiviert weitere Thrombozyten. Stimulierte Thrombozyten exprimieren den GPIIb/IIIa-Rezeptorkomplex an ihrer Oberfläche, welcher an Fibrinogen bindet. Bei der arteriellen Thrombose spielt vornehmlich die durch

vWF vermittelte Thrombozytenadhäsion eine Rolle, während bei niedrigen Scherkräften im venösen System eine Quervernetzung von aktivierten Thrombozyten über Fibrinogenbrücken erfolgt.

6.3. Mausmodelle

6.3.1. Induktion der arteriellen Thrombose durch Eisen-3-Chlorid

In diesem Modell wird eine Eisen-3-Chlorid (FeCl_3)-Lösung oberflächlich auf ein intaktes Gefäß gegeben. Dazu werden hauptsächlich die A. carotis comm. und mesenteriale Arteriolen verwendet. Durch Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen wird die Gefäßwand geschädigt und das Endothel denudiert (Silverstein et al., 2010, Li et al., 2010). Blutkomponenten gelangen in Kontakt mit dem Stratum subendotheliale und initiieren eine Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung. Li et al. konnten nachweisen, dass Erythrozyten bei der Thrombusbildung eine untergeordnete Rolle spielen (Li et al., 2016).

Bei der Verletzung der A. carotis comm. wird diese zunächst über eine Länge von etwa 5mm freigelegt. Die umgebende Adventitia wird entfernt, um einen direkten Kontakt zwischen Filterpapier und Gefäßwand zu gewährleisten und eine gleichmäßige Verletzung zu ermöglichen. Die Arterie wird mit einem U-förmigen Plastikstück unterminiert, um sie vom umliegenden Gewebe zu separieren, eine Diffusion von FeCl_3 zu vermeiden und gegebenenfalls Hintergrundfluoreszenz zu blocken.

Die Zeitspanne zwischen Induktion der Verletzung und komplettem Gefäßverschluss kann zur Auswertung herangezogen werden. Diese lässt sich zum einen mittels Doppler-Sonographie-gestützter Blutflussmessung und zum anderen auch durch direkte intravitalmikroskopische Beobachtung bestimmen. Um Thrombozyten und deren Akkumulation bei der Intravitalmikroskopie veranschaulichen zu können, werden Thrombozyten einer Spendermaus im Vorhinein mit Rhodamin 6G angefärbt und über einen Jugularvenenkatheter in das Versuchstier appliziert. Je nach Messverfahren, Narkose, OP-Technik, Alter und genetischem Hintergrund der Mäuse sind Okklusionszeiten zwischen 5 und 30 Minuten zu erwarten.

Das mesenteriale Thrombosemodell erfordert höhere FeCl_3 -Konzentrationen, da die Gefäße von mehr Fettgewebe umgeben sind, welches die Diffusion hin zum Gefäß behindert und somit möglicherweise vor FeCl_3 -Schädigung schützt (Li et al., 2016).

Untersuchungen von Eckly et al. zeigen, dass abhängig von der Konzentration der FeCl_3 -Lösung die Thrombusbildung vorangetrieben wird (Eckly et al., 2011). Geeignet für die Visualisierung sind Konzentrationen zwischen 2,5 und 10%, da bei höheren Konzentrationen eine Trübung des Gefäßes auftritt.

6.3.2. Arterielle Thrombose mit Ligatur und Manschette

In der A. carotis comm. wird durch gleichzeitiges Anlegen einer Ligatur und einer Manschette eine Thrombose erzeugt (Sasaki et al., 2004). Dafür wird die A. carotis comm. sin. proximal ihrer Bifurkation mit einem 5-0 Seidenfaden ligiert. Zusätzlich wird eine nicht-okklusive Manschette etwa 2 mm proximal der Ligatur angebracht. 7 Tage nach dem Eingriff können im Bereich der Manschette okklusive Thrombi gefunden werden, nicht jedoch proximal und distal der Manschette. Durch die Kombination von Ligatur und Manschette wird das Endothel geschädigt, was zu einer Exposition von subendothelialer Matrix und damit zur Induktion einer Thrombose führt. Durch die im Vergleich zu anderen Modellen verzögerte Thrombusbildung bietet dieses Modell den Vorteil, dass Verlauf und Mechanismen der Endothelzellschädigung besser untersucht werden können.

6.3.3. Thromboseinduktion mittels Laser

Bei diesem Modell werden die Mesenterialarterien abdominalchirurgisch freigelegt (Perez et al., 2014). Nach intravenöser Applikation von 25 oder 50 mg/kg Bengalrosa werden die Arterien einem Laser mit einer Leistung von 5 mW ausgesetzt. Abhängig von der Bengalrosakonzentration tritt eine Thrombusbildung innerhalb von 30 bis 45 Minuten auf, welche in Echtzeit unter einem Epifluoreszenzmikroskop beobachtet wird. Zur mikroskopischen Darstellung werden den Mäusen vor der Schädigung Calcein-markierte

Thrombozyten infundiert. Die Darstellung des Blutflusses erfolgt für 60 Minuten. Als Okklusion des Gefäßes wird in diesem Modell ein Stillstand des Blutflusses für 3 Minuten definiert. Eine entscheidende Rolle für die Gefäßschädigung spielen reaktive Sauerstoffradikale, welche durch die Interaktion von Bengalrosa mit dem Laser entstehen.

Bengalrosa sammelt sich in der Fett-Doppelmembran von Endothelzellen und anderen Zellen an (Day et al., 2004). Die Einwirkung von grünem Licht auf Bengalrosa initiiert eine photochemische Reaktion, bei welcher Singulett-Sauerstoff und reaktive Sauerstoffradikale entstehen, welche wiederum das Endothel schädigen und eine Thrombusbildung auslösen.

III. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Tg(Epo)-Maus mit dauerhafter und sauerstoffunabhängiger Überexpression von humanem EPO. Die Maus dient als Modell für die längerfristige Erythropoetintherapie anämischer Patienten. Da das Vorkommen von EPO-R in Endothelzellen (Anagnostou et al., 1994, Beleslin-Cokic et al., 2004) und glatten Muskelzellen (Heidenreich et al., 1991, Ammarguellat et al., 1996, Morakkabati et al., 1996) nachgewiesen werden konnte, wird neben Auswirkungen des sekundär erhöhten Hämatokrits auch ein nicht-hämatopoetischer EPO-Effekt erwartet.

1. Demonstration der splenektomiebedingten Hämatokritabsenkung

Zur Abmilderung des hämatopoetischen Effekts sollen die Versuchstiere aller im Folgenden genannten Gruppen splenektomiert werden. Es wird dadurch eine Absenkung des stark erhöhten Hämatokrits erwartet. Mithilfe von Blutuntersuchungen soll demonstriert werden, dass die Splenektomie den hämatopoetischen Effekt abmildert, ihn jedoch nicht komplett beseitigt.

2. Untersuchung des Einflusses von EPO auf das Ausmaß der Arteriosklerose

Kardiovaskuläre Komplikationen sind ein bekanntes Problem bei anämischen, niereninsuffizienten Patienten (Rahn et al., 2000). Todesfälle durch Herzinfarkte und Schlaganfälle, welche oftmals Folge atherosklerotischer Gefäßveränderungen sind, treten bei dialysepflichtigen Patienten gehäuft auf. Untersuchungen in der Maus haben gezeigt, dass ein erhöhter Hämatokrit mit einer beschleunigten Arterioskleroseprogression einhergeht (Tous et al., 2004). Ziel ist es zu klären, inwiefern sich eine dauerhafte EPO-Therapie auf den Verlauf der Arteriosklerose auswirkt.

3. Untersuchung des Einflusses von EPO auf arterielles Remodeling

Es wird vermutet, dass nicht-hämatopoetisches EPO-Signaling vaskuläre Umbauprozesse nach Gefäßschädigung beeinflussen könnte. Beohar et al. konnten nachweisen, dass unter dem Einfluss von EPO sowohl die Apoptose glatter Muskelzellen als auch die Neointimahyperplasie vermindert werden (Beohar et al., 2004). Es wird demnach eine Verminderung der Stenose beziehungsweise Restenose nach gefäßchirurgischen Eingriffen unter der Wirkung von EPO erwartet. Ziel der Untersuchung ist es, den Einfluss von EPO auf Veränderungen des Lumendurchmessers nach gefäßchirurgischen Eingriffen zu ermitteln.

4. Untersuchung des Einflusses von EPO auf die arterielle Thrombose

Untersuchungen im Menschen haben dargelegt, dass unter EPO-Therapie die Anzahl und Aktivität der Thrombozyten gesteigert ist (Stohlawetz et al., 2000, Homoncik et al., 2004). Auch die kurzzeitige, hoch dosierte EPO-Verabreichung in der Maus führte zu einer erhöhten Thrombozytenaktivität (Kirkeby et al., 2008). Dies lässt zusammen mit dem sekundär erhöhten Hämatokrit eine prothrombotische Wirkung des EPOs vermuten. Ziel ist es, den Effekt einer langfristigen EPO-Therapie auf die Entstehung arterieller Thrombosen zu untersuchen.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Haltungsbedingungen

Im Tierhaltungsbereich des Deutschen Herzzentrums München erfolgte die Haltung und Zucht der Mäuse unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen.

Die Mäuse wurden in isoliert ventilierten Käfigen gehalten, sogenannten IVC (Individually ventilated cage). Es handelte sich um Typ III H Käfige (Firma Tecniplast, Hohenpeißenberg) mit einer Grundfläche von 800 cm². Laut Empfehlungen der GV-Solas (Gesellschaft für Versuchstierkunde) sind diese ausreichend groß für die Haltung von maximal 13 Tieren pro Käfig, wenn die Tiere leichter als 20 g sind. Werden Mäuse mit einem Körpergewicht von mehr als 20 g gehalten, so ist eine Haltung von maximal 8 Tieren pro Käfig zulässig. Die Mäuse wurden in Gruppen gehalten. Ausnahme war die Einzelhaltung unverträglicher männlicher Zuchttiere (GV-Solas, 2007).

Die Käfige wurden mit einem speziellen Deckel verschlossen und so von der Raumluft abgeschirmt. Die Luftversorgung erfolgte stattdessen über eine Gebläseeinheit mit High efficiency particulate air filter (HEPA)-gefilterter Raumluft. Auf diese Weise wurde eine hygienische Abschirmung der Tiere gewährleistet. Die Luftaustauschrate lag bei 50 bis 70 Luftwechseln pro Stunde. Das Mikroklima in den Käfigen wurde durch ein komplexes Belüftungssystem bei einer Luftfeuchtigkeit von 25-45% und einer Temperatur von 20 bis 24°C gesichert. Ein 12h-Zeitschalter für die Beleuchtung im Tag-Nacht-Rhythmus war vorhanden. In der Hell-Phase wurden 50-100 Lux erreicht.

Die Fütterung der Tiere erfolgte ad libitum mit Standardfutter für Labornager (ssniff® R/M-H 10 mm Pellets, Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen und sniff® M-Z 10 mm Pellets, Alleinfuttermittel für die Zucht von Mäusen, Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Leitungswasser stand den Tieren aus Trinkflaschen unbegrenzt zur Verfügung.

Als Einstreu wurde ein spezielles Weichholzgranulat (Classic chips, Firma Abedd, Wien, Österreich) verwendet, welches sich durch seine weiche Beschaffenheit und besondere Saugfähigkeit auszeichnete. In der Regel war der einmal pro Woche stattfindende Austausch

der Käfige ausreichend. Bei Bedarf wurden Käfige und Einstreu auch häufiger gewechselt.

Um dem Spiel- und Nestbautrieb der Tiere gerecht zu werden und somit das Wohlbefinden der Tiere zu steigern, wurden die Käfige mit Enrichment ausgestattet. Dafür standen rote Plastikhäuschen (Mouse house, Firma Tecniplast, Hohenpeißenberg), Häuser aus Zellstoff (Smart-Haus für Mäuse, Firma Zoonlab, Castrop-Rauxel) und Nistmaterial (ARBOCEL complet crinklets natural, Firma J. Rettenmaier & Söhne GmbH, Rosenberg) zur Verfügung.

2. Mäuse und Zucht

Für die hämatologischen Analysen (Zielsetzung 1) und die Untersuchung des Einflusses von EPO auf arterielles Remodeling (Zielsetzung 3) und arterielle Thrombose (Zielsetzung 4) wurden Tg(Epo)-Tiere verwendet. WT(Epo)-Tiere kamen in den Kontrollgruppen zum Einsatz.

In der Arteriosklerosegruppe (Zielsetzung 2) wurden ApoE^{-/-};Tg(Epo)- und ApoE^{-/-};WT(Epo)-Mäuse genutzt. Es handelt sich dabei um Doppelmutanten, die humanes EPO überexprimieren und denen das Apolipoprotein E fehlt. Die Zuchttiere wurden freundlicherweise von Thomas Rülcke von der VetmedUni Vienna zur Verfügung gestellt. Zur Erzeugung der Linie wurde die TgN(PDGFBEP0)321Zbz-Maus zunächst auf einen B6N-Hintergrund zurückgekreuzt. Die so entstandene Mauslinie B6N.B6D2-Tg(PDGFB-EPO)321Zbz wurde mit der Mauslinie B6J.129P2-Apoetm1Bres gekreuzt. Ergebnis dessen ist die B6N.B6D2-Tg(PDGFB-EPO)321Zbz;B6J.129P2-Apoetm1Bres-Mauslinie, welche im Folgenden als ApoE^{-/-};Tg(Epo) bezeichnet wird. Als Kontrolltiere dienten ApoE^{-/-};WT(Epo)-Mäuse. Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums gezüchtet.

Den Empfehlungen von Thomas Rülcke zufolge wurden in der Zucht splenektomierte Böcke verwendet. An der Universität Zürich und an der VetmedUni Vienna wurde festgestellt, dass splenektomierte Tg(Epo)- bzw. ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Tiere eine höhere Lebenserwartung aufweisen und damit länger in der Zucht einsetzbar sind. Die Tg(Epo)- bzw. ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Männchen wurden deshalb in einem Alter zwischen 6 und 8 Wochen splenektomiert. Zuchtpartner waren WT(Epo)- und ApoE^{-/-};WT(Epo)-Weibchen.

Es wurden also folgende Verpaarungsschemata angewandt:

Tg(Epo)-Männchen x WT(Epo)-Weibchen

ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Männchen x ApoE^{-/-};WT(Epo)-Weibchen

Männliche Tiere wurden ab einem Alter von 8 Wochen, weibliche Tiere ab 10 Wochen in der Zucht eingesetzt. Der Einsatz erfolgte in der Regel bis zu einem Alter von 40 Wochen. Jungtiere wurden im Alter von 3 Wochen von ihren Eltern getrennt. Alle Zucht- und Versuchstiere wurden genotypisiert. Aus den bei der Markierung der Tiere angefallenden Ohrlochstanzen wurde DNA isoliert (DNeasy Blood & Tissue Kit, Firma Qiagen, Hilden). Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde mittels einer PCR amplifiziert und anschließend bei einer Gelelektrophorese visualisiert. Die zugehörigen Protokolle für die PCR und Gelelektrophorese finden sich unter 1.1 und 1.2 im Anhang dieser Arbeit.

Gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes ist für Tierversuchsvorhaben eine Genehmigung der zuständigen Behörde erforderlich. Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und unter den Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-47-14 und 55.2-1-54-2532-199-12 geführt.

3. Blutanalysen

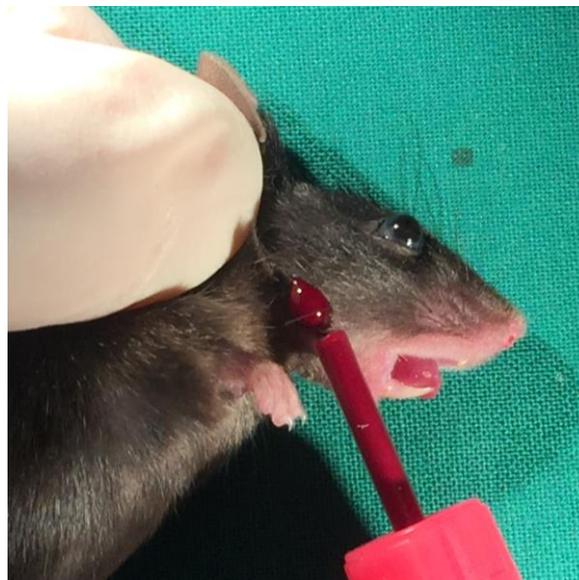
3.1. Entnahmetechnik

3.1.1. V. facialis-Punktion

Die Mäuse wurden hierfür manuell fixiert. Die Blutentnahme erfolgte unter kurzzeitiger Isoflurannarkose. Dazu wurde der Kopf der Tiere in ein 50 ml Falconröhrchen (Firma Corning, New York, USA) gehalten, in welchem sich eine mit Isofluran (Isofluran cp, Firma cp-pharma, Burgdorf) getränkte Gazebinde befand. Nach Verlust der Stellreflexe wurde der Falcon verschlossen und die Maus im Nacken gestaut. Mithilfe einer Lanzette (Firma Feather, Osaka, Japan) wurde 3 bis 4 mm dorsokaudal eines Haarwirbels an der Mandibula die V. facialis punktiert. Wie in Abb. 4 dargestellt, wurden die austretenden Blutropfen mit einer

EDTA-Microvette (Firma Sarstedt, Nümbrecht) aufgenommen. Für hämatologische Untersuchungen wurden etwa 100 µl Blut benötigt. Nach Beendigung der Blutentnahme wurde der Stau gelöst und die Blutung mit einem Wattetupfer gestillt. Die sorgfältige Blutstillung war wichtig, um eine Hämatombildung und damit zusätzliche Belastungen für das Tier zu verhindern. Anschließend wurde die Maus in ihren Käfig zurückgelegt und bis zur vollständigen Erholung beobachtet.

Das Blutröhrchen wurde geschwenkt und schnellstmöglich weiterverwertet.



**Abb. 4 Aufnahme der aus der V. facialis
austretenden Blutstropfen mit einer Microvette**

3.1.2. Finale Herzpunktion

Nach Beendigung der Untersuchungen zur arteriellen Thrombose wurden die Mäuse durch kompletten Blutentzug euthanasiert. Auch die Tiere zur Ermittlung der Thrombozytenaktivierbarkeit mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen wurden durch totalen kardialen Blutentzug getötet. (beides Zielsetzung 4) Die Tiere befanden sich währenddessen in einer Kombinations-Vollnarkose aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl. Die Maus wurde auf dem Rücken gelagert und mit Klebeband (Firma 3M, Health

Care, Neuss) auf dem Untergrund fixiert. Nach Prüfung des Zwischenzehenreflexes wurde die Haut über dem Sternum entfernt. Der Einstich erfolgte auf der linken Seite des Tieres etwa 2 mm lateral des Sternums zwischen der zweiten und dritten Rippe. Dazu wurde eine 24G x 1 Kanüle (Firma Becton Dickinson, Heidelberg) mit aufgesetzter 2 ml Spritze (Firma B. Braun, Melsungen) unter Aspiration senkrecht zur Unterlage vorgeschoben. War Blut im Konus der Spritze sichtbar, wurde die Position unter Aspiration beibehalten. Auf diese Art und Weise war die Gewinnung von bis zu 1,5 ml Blut möglich. Anschließend wurde das Blut zügig in EDTA-Röhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) umgefüllt und geschwenkt.

3.2. Hämatologische Untersuchungen

Große Blutbilder wurden aus dem mit EDTA antikoagulierten Blut im Labor des Deutschen Herzzentrums mit einem hämatologischen Analysegerät (Sysmex XS-800i, Firma Sysmex, Norderstedt) erstellt.

3.2.1. Gruppengröße und –zusammensetzung

Es wurden durch V. facialis-Punktion gewonnene EDTA-Blutproben von 76 WT(Epo)- und 89 Tg(Epo)-Tieren hämatologisch analysiert. Bei den WT(Epo)-Tieren handelte es sich um 39 Männchen und 37 Weibchen. Die Tg(Epo)-Gruppe bestand aus 33 Männchen und 56 Weibchen. Das mittlere Alter der untersuchten WT(Epo)-Tiere lag bei $13,4 \pm 7,92$ Wochen, das der Tg(Epo)-Tiere betrug $14,68 \pm 6,24$ Wochen. Zusätzlich wurden durch V. facialis-Punktion gewonnene EDTA-Blutproben von splenektomierten Mäusen analysiert. Es handelte sich um eine Gruppe von Tieren bestehend aus 20 WT(Epo)-Mäusen und 163 Tg(Epo)-Mäusen. Bei den WT(Epo)-Mäusen wurden Blutproben von 8 Männchen und 12 Weibchen untersucht, bei den Tg(Epo)-Mäusen waren es Proben von 84 Männchen und 79 Weibchen. Die WT(Epo)-Mäuse hatten ein mittleres Alter von $12,02 \pm 2,73$ Wochen, die Tg(Epo)-Tiere waren durchschnittlich $31,77 \pm 21,39$ Wochen alt. Der Abstand zwischen Splenektomie und Blutentnahme betrug $5,09 \pm 2,68$ Wochen bei den WT(Epo)-Mäusen und $25,2 \pm 21,39$ Wochen bei den Tg(Epo)-Mäusen.

4. Narkose

Die Mäuse erhielten eine vollständig antagonisierbare Kombinationsnarkose aus Fentanyl, Medetomidin und Midazolam. Die Steuerbarkeit der Narkose ist beim Kleinsäuger besonders wichtig, da dieser möglichst schnell nach Beendigung der Narkose wieder einen normalen Stoffwechsel haben soll, um das Auftreten von Hypothermie, Hypoglykämie, Ateminsuffizienz und Kreislaufinsuffizienz zu verhindern. Keines der eingangs genannten Pharmaka erfüllt allein die Kriterien der Allgemeinanästhesie (Hypnose, Analgesie, Relaxation). Durch deren Kombination jedoch konnte das chirurgische Toleranzstadium erreicht werden. Chirurgische Toleranz wurde angenommen, wenn nach Zwicken in den Zwischenzehenraum kein Zucken beziehungsweise Anziehen der Gliedmaße beobachtet wurde. Die Einzeldosis jedes Pharmakons kann aufgrund der Ausnutzung additiver Effekte reduziert werden. Damit wird auch das Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen vermindert.

Fentanyl ist ein starkes Analgetikum aus der Gruppe der Opiode. Es ist etwa 30 Minuten lang wirksam. Als Nebenwirkungen können Atemdepressionen und Bradykardien beobachtet werden. Die Wirkung kann durch Opioidantagonisten, wie Naloxon, aufgehoben werden.

Medetomidin ist ein Sedativum aus der Gruppe der α_2 -Adrenozeptoragonisten, welches durch die Erregung zentraler postsynaptischer α_2 -Rezeptoren sympathische Impulse unterdrückt und so den Sympathikotonus herabsetzt. Es wirkt sedativ, muskelrelaxierend und hat eine gewisse, vor allem viszerale, analgetische Potenz. Allerdings können Nebenwirkungen auftreten, die das Herz-Kreislauf-System beeinträchtigen. Neben einem initialen Blutdruckanstieg mit anschließendem Blutdruckabfall können Bradykardien und eine Atemdepression beobachtet werden. Die Antagonisierung von Medetomidin ist mit Atipamezol möglich.

Midazolam ist ein Sedativum aus der Gruppe der Benzodiazepine. Es dämpft die Aktivität des Thalamus, des Hypothalamus und des limbischen Systems und wirkt sedativ und muskelrelaxierend. Ein analgetischer Effekt fehlt ihm. Vorteil sind seine geringgradige Wirkung auf die Herzfunktion und Atmung. Durch Verabreichung von Flumazenil kann die Wirkung von Midazolam antagonisiert werden.

Die genauen Dosierungen der Pharmaka sind der Tab. 1 zu entnehmen.

Tab. 1 Dosierung der MMF-Narkose

Wirkstoff	Handelsname	Konzentration	Dosierung	Darreichung
Fentanyl	Fentadon	50 µg/ml	0,05 mg/kg	i.p.
Medetomidin	Dorbene	1 mg/ml	0,5 mg/kg	i.p.
Midazolam	Midazolam-ratiopharm®	15 mg/3ml	5 mg/kg	i.p.

Das Narkosegemisch wurde intraperitoneal (i.p.) mit einer 1 ml-Tuberkulinspritze (Firma B. Braun, Melsungen) und einer 0,3 mm x 13 mm Kanüle (Firma Becton Dickinson, Heidelberg) injiziert. Die Injektion erfolgte im spitzen Winkel im linken kaudalen Quadranten mit Stichrichtung auf das kontralaterale Vorderbein. Um eine Injektion in den Darm zu vermeiden, wurden die Mäuse schräg kopfabwärts gehalten.

Bis zum nach etwa 5 Minuten eintretenden Anfluten der Narkose wurde die Maus in einer perforierten Box gelagert, um sie bestmöglich von optischen und akustischen Reizen abzuschirmen. Bei fehlender chirurgischer Toleranz wurde die Hälfte der Ausgangsdosis nachdosiert. Die initiale MMF-Dosis wirkte für etwa 60 Minuten. Die Narkosetiefe wurde durch Prüfung des Zwischenzehenreflexes alle 10 Minuten überwacht.

Nach Beendigung des Eingriffs wurde die Narkose durch s.c. Injektion von Atipamezol, Flumazenil und Naloxon antagonisiert. Die genaue Dosierung ist der Tab. 2 zu entnehmen.

Tab. 2 Dosierung zur Antagonisierung der MMF-Narkose

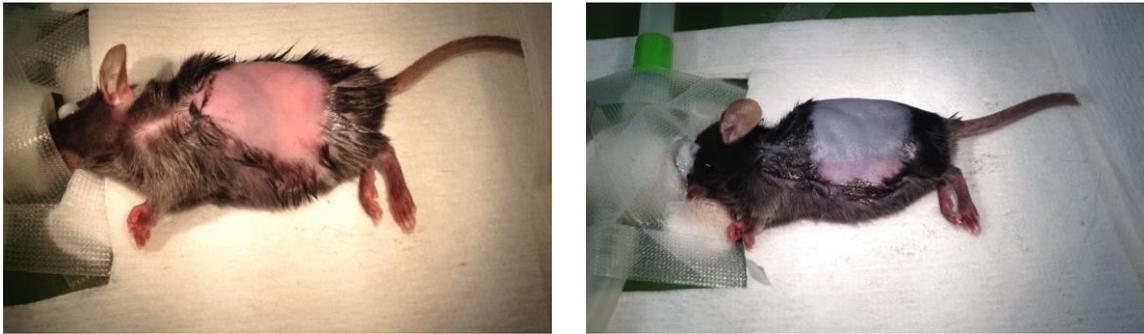
Wirkstoff	Handelsname	Konzentration	Dosierung	Darreichung
Atipamezolhydrochlorid	Antisedan	5 mg/ml	2,5 mg/kg	s.c.
Flumazenil	Flumazenil Hexal	0,1 mg/ml	0,5 mg/kg	s.c.
Naloxonhydrochlorid	Naloxon-ratiopharm®	0,4 mg/ml	1,2 mg/kg	s.c.

5. Splenektomie

5.1. Operationstechnik

Nachdem die Narkose wie beschrieben induziert worden war, wurde die Maus gewogen und das Gewicht notiert, um den postoperativen Zustand des Tieres besser beurteilen zu können. Um ein Austrocknen der Kornea zu verhindern, wurden die Augen mit Dexpanthenol-Salbe (Bepanthen Nasen- und Augensalbe, Firma Bayer, Leverkusen) bedeckt. Die linke Flanke wurde in dem Bereich zwischen Hüfthöcker und etwa 0,5 cm kranial des Brustkorbes geschoren. Dazu wurde eine Kleintier-Schermaschine (ISIS, Firma B. Braun und Aesculap, Melsungen) verwendet. Wie in Abb. 5 dargestellt, erfolgte die Lagerung der Maus in rechter Seitenlage auf einer Wärmematte (Thermolux®, Firma Witte und Sutor, Murrhardt). Zwischen Maus und Wärmematte befand sich ein Labortuch (Wypall, Kimberly-Clark, Koblenz). Restliche Haare wurden mit Enthaarungscreme (Pilca®, Firma Diedrichs Markenvertrieb, Bad Pyrmont) entfernt. Über eine an einen Isofluranverdampfer (Ser. No DE0128, Firma Völker, Kaltenkirchen) angeschlossene Kopfkammer wurde die Maus mit einem 0,5 Vol.% Isofluran-Sauerstoff-Gemisch versorgt, wobei die Sauerstoffdurchflussrate 1,6 bis 1,8 l/min betrug. Das OP-Feld wurde mit Alkohol (Octeniderm, Firma Schülke) benetzt. Die Operation erfolgte unter Zuhilfenahme einer OP-Lupe (Modell Stemi 2000, Firma Zeiss, Oberkochen) mit Ausleuchtung durch eine Kaltlicht-Schwanenhalslampe (Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Zeiss, Oberkochen).

Zunächst wurde die Haut eröffnet. Etwa 0,5 cm unterhalb der Wirbelsäule und knapp kaudal des Brustkorbs wurde ein vertikaler Hautschnitt gesetzt. Bei der WT(Epo)-Maus hatte der Schnitt eine Länge von 1 cm, bei der Tg(Epo)-Maus bedingt durch die größere Milz eine Länge von etwa 1,5 cm.



**Abb. 5 Zustand der Maus intra op. nach Fellentfernung;
Tg(Epo)-Tiere bei denen sich die Milz durch die Haut abzeichnet**

Die Muskulatur wurde mit einer Pinzette angehoben, stumpf vom Unterhautfettgewebe gelöst und mit einem Scherenschlag eröffnet. Blutungen der Haut- und Muskulaturgefäße wurden mit einem Wattetupfer gestillt. Im Anschluss wurde die Milz mit einer gebogenen anatomischen Pinzette (Firma Fine Science Tools, Heidelberg) vorsichtig von kaudal gegriffen und aus der Bauchhöhle vorgelagert. Da das Milzgewebe nach Austrocknung schnell brüchig wurde, erfolgte etwa alle 5 Minuten ein Benetzen der Milz mit physiologischer Kochsalzlösung (Firma Deltamedica, Reutlingen). Die versorgenden Arterien und Venen der Milz wurden mit 7-0 Prolene-Faden (Firma Ethicon, Norderstedt) umschlungen und ligiert, wie in Abb. 6 dargestellt ist. Das Abbinden erfolgte mit dem Schifferknoten.

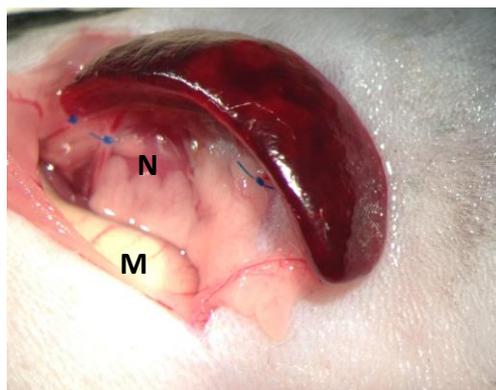


Abb. 6 Ligierte Gefäße einer WT(Epo)-Milz (M=Magen, N=Niere)

Nach erfolgreicher Ligatur der Gefäße wurden diese ausgehend von der Ligatur milzwärts durchtrennt. Das Milz-Magen-Band wurde durchgeschnitten. Die Gefäßstümpfe wurden auf Blutungen kontrolliert und anschließend, sofern nicht bereits eigenständig durch Zug

zurückverlagert, in die Bauchhöhle reponiert. Die Naht von Haut und Muskulatur erfolgte mit 7-0 Prolene in 2 Schichten mit Einzelknopfheften. Nach Fertigstellen des Wundverschlusses wurde die Narkose, wie vorher beschrieben, antagonisiert. Bis auf den Nadelhalter (Firma Medicon, Tuttlingen) waren alle chirurgischen Instrumente von Fine Science Tools, Heidelberg.

5.2. Postoperative Überwachung und Analgesie

Etwa 30 Minuten vor Antagonisierung der Narkose erhielt die Maus 0,1 mg/kg Buprenorphin (Buprenovet, 0,3mg/ml, Firma Bayer, Leverkusen), welches s.c. injiziert wurde. Dazu wurden eine 1 ml-Tuberkulinspritze und eine 0,3 mm x 13 mm Kanüle verwendet. Postoperativ wurde die Maus in den ersten 6 Stunden nach der Operation mindestens alle 2 Stunden inspiziert. In den ersten 72 Stunden post op. wurde alle 8 Stunden 0,1 mg/kg Buprenorphin s.c. injiziert. Der Zustand des Tieres wurde auf einem Score Sheet beurteilt und notiert. Mit diesem waren auch die Abbruchkriterien des Versuchsvorhabens definiert.

6. Cholesterinfütterung

6.1. Versuchsaufbau und -ablauf

Die Versuchsdurchführung in dieser Gruppe startete mit einer Splenektomie der Tiere im Alter von 5 bis 8 Wochen. Die Operationsdurchführung und postoperative Analgesie erfolgten wie bereits beschrieben.

Nach einer Rekonvaleszenzzeit von einer Woche post Splenektomie wurde mit der 60-tägigen Fütterung der Cholesterindiät (Altromin 1314 mod. corresponding to Purina 5015, Firma Altromin, Lage) begonnen. Die Diät setzte sich wie folgt zusammen: 12% Rohfett, 7,5% Casein und 1,25% Cholesterin. Die exakte Zusammensetzung der Cholesterindiät ist im Anhang in Tab. 12 gelistet. Nach Beendigung des 60-tägigen Fütterungszeitraums wurden die Tiere geopfert.

6.2. Ölrot-en face-Aortenfärbung

6.2.1. Gruppengröße und –zusammensetzung

Insgesamt wurden 20 Tiere analysiert, darunter waren 10 ApoE^{-/-}; WT (Epo)- und 10 ApoE^{-/-}; Tg(Epo)-Tiere. In beiden Gruppen wurde auf eine gerechte Geschlechterverteilung geachtet, d.h. es wurden jeweils 5 Männchen und 5 Weibchen untersucht. Das mittlere Alter der ApoE^{-/-};WT(Epo)-Tiere betrug 16,6±0,91 Wochen, das der ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Tiere lag bei 16,11±0,69 Wochen. Für die ApoE^{-/-};WT(Epo)-Mäuse konnte prä op. und vor Fütterungsbeginn ein Gewicht von 19,43±1,63g ermittelt werden, nach Fütterungsende lag das Gewicht bei 25,52±2,15g. Bei den ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Tieren betrug das Gewicht vor OP und der Fütterung 19,07±1,59g, nach Beendigung der Fütterung 27,03±1,29g.

6.2.2. Entnahme und Aufarbeitung des Gewebes

Die Tiere wurden durch eine Isofluranüberdosierung euthanasiert. Anschließend wurde zur Durchführung von hämatologischen Untersuchungen kardial Blut entnommen. Danach wurde der Brustkorb eröffnet und die Vena cava caudalis kranial des Zwerchfells durchtrennt. Es erfolgte eine Spülung der Mäuse über den linken Ventrikel. Die Tiere wurden zunächst mit 10 ml Ringerlösung perfundiert, um restliches Blut aus der Aorta zu entfernen. Zur Fixierung der Plaques wurden anschließend 10 ml 40%iges gepuffertes Formalin injiziert.

Die Aorta wurde in situ grob von anhaftendem Gewebe befreit und vom Aortenbogen bis zum Abgang der linken Nierenarterie entnommen. Die Abgänge des Truncus brachiocephalicus, der A. carotis comm. sin. und der A. subclavia sin. wurden in einer Länge von etwa 2 mm am Aortenbogen belassen. Die Aorten wurden in Petrischalen gegeben, welche mit 1 x Phosphat buffered saline (PBS) (Herstellung aus 10xPBS der Firma Life technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA) gefüllt waren. Unter Zuhilfenahme einer OP-Lupe wurden nun anhaftende Gewebereste entfernt und die Adventitia vorsichtig abpräpariert.

6.2.3. Protokoll

Die Aorta wurde nach folgendem Protokoll mit Ölrot gefärbt:

1. 5 min waschen in 78% Methanol
2. 90 min Färbung in Ölrot-Färbelösung
3. 5 min waschen in 78% Methanol

Bei dem Reagenz Ölrot handelt es sich um einen fettlöslichen Azofarbstoff, der Fettzellen und neutrales Fett rot anfärbt. Die Ölrot-Färbelösung ist eine 0,5%ige Lösung in Methanol (Methanol: Firma Applichem, Darmstadt; Ölrot: Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen).

An der konvexen Seite wurde der Aortenbogen der Länge nach eröffnet. Die Stümpfe der abgehenden Gefäße wurden dabei mit einbezogen. Die Aorta wurde auf dieser Seite nicht weiter eröffnet. Die Aorta wurde an der konkaven Seite des Aortenbogens beginnend der Länge nach aufgeschnitten. Die Schnittlinien sind in Abb. 7 in rot dargestellt. Ergebnis ist eine y-förmig aufgeklappte Aorta.



Abb. 7 Schematische Darstellung der Schnittlinien

Zur anschaulichen Darstellung der Plaques wurde die aufgeklappte Aorta mit kleingeschnittenen Minutien Pins (Firma Fine Science Tools, Heidelberg) auf ein 2%iges Agarosegel gepinnt.

6.2.4. Ausmessung und Auswertung

Die Aorta wurde unter einer OP-Lupe (Stemi 2000, Firma Zeiss, Oberkochen) mit angeschlossener Kamera (AxioCam ERc 5s, Firma Zeiss, Oberkochen) fotografiert. Die Ausmessung erfolgte mit der Zen2-Software (Firma Zeiss, Oberkochen). Hierzu wurden die komplette Aorta und die einzelnen rot angefärbten Areale per Hand umfahren. In der Auswertung wurden die positiven Areale anteilig zur gesamten Aortenfläche, der positiv rote Anteil in Aortenbogen sowie der positive Anteil in der restlichen thorakalen/abdominalen Aorta betrachtet.

6.3. Ölrot-Färbung des Aortenursprungs

6.3.1. Gruppengröße und –zusammensetzung

In dieser Gruppe wurden 7 ApoE^{-/-}; WT(Epo)- (♂=4, ♀=3) mit 6 ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Mäusen (♂=4, ♀=2) verglichen. Das mittlere Alter der ApoE^{-/-};WT(Epo)-Mäuse betrug 16,92±0,92 Wochen, ihr Gewicht lag bei 25,72±2,33g. Die ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Tiere waren im Mittel 16,19±0,55 Wochen alt und 27,43±1,21g schwer.

6.3.2. Entnahme und Aufarbeitung des Gewebes

Nach der beschriebenen Entnahme der Aorta wurde der Aortenursprung mit dem umgebenden Myokard entnommen und kurzzeitig in flüssigem Stickstoff gelagert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Gewebe in Einbettmedium (Tissue Tek, O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek, Staufen) positioniert. Tissue Tek wurde dafür in Kryoeinbettformen gegeben. Die Proben wurden mit einem Kryomikrotom (Modell CM 1850, Firma Leica, Wetzlar) bei einer Umgebungstemperatur von -22°C in 5 µm breite Präparate geschnitten. Die Schnitte des Aortensinus und der beginnenden Aorta ascendens wurden auf Objektträger gezogen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Objektträger bei -20°C aufbewahrt. Pro Maus wurden 6 Schnitte

gefärbt. Bei der Auswahl der Objektträger wurde auf das Vorhandensein möglichst intakter Taschen geachtet.

6.3.3. Protokoll

Die Objektträger wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur angewärmt. Es folgte eine dreiminütige Lagerung in 1 x PBS und eine 5 minütige Aufbewahrung in 60%igem Ethanol. Als nächstes wurden die Objekte für 10 Minuten in Ölrot-Gebrauchslösung gefärbt. Drei Teile der Stammlösung, bei welcher es sich um eine 0,5%ige Ölrot in Ethanollösung handelte, wurden mit zwei Teilen destilliertem Wasser gemischt, um eine Gebrauchslösung herzustellen. Dem Färbeschritt folgte eine dreisekündige Differenzierung in 60%igem Ethanol. Die Schnitte wurden mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte eine zwei Minuten andauernde Kernfärbung in Hämalaun. Zum Bläuen wurden die Objektträger dann für 5 Minuten in lauwarmes Leitungswasser gestellt. Die Schnitte wurden dann mit einem Eindeckmedium für wasserhaltige Präparate (Roti^R-Mount Aqua, Firma Carl Roth, Karlsruhe) benetzt und mit Deckgläschen abgedeckt. Der Spalt zwischen Deckglas und Objektträger wurde zum Schutz der Präparate vor Luftfeuchtigkeit und Austrocknung mit klarem Nagellack versiegelt.

6.3.4. Ausmessung und Auswertung

Pro Maus wurden 6 Schnitte gefärbt, ausgemessen und ausgewertet. Das Mikroskopieren und Fotografieren erfolgte mit einem Mikroskop (DMRB, Firma Leica, Wetzlar) und einer angeschlossenen Kamera (DFC450C, Firma Leica, Wetzlar). Zum Ausmessen wurde die LAS4.5.-Software (Firma Leica, Wetzlar) verwendet. Durch die Färbung nach geschildertem Protokoll wurden Fettzellen und neutrales Fett rot und Zellkerne blau angefärbt. Per Hand wurde die Plauefläche, welche sich rot darstellte, umfahren. Anschließend wurde für jedes Tier der arithmetische Mittelwert der Plauefläche aus den 6 Schnitten ermittelt.

7. Drahtverletzung der A. femoralis communis

7.1. Versuchsaufbau

Die Mäuse wurden im Alter von 7 Wochen splenektomiert. Nach einer einwöchigen Rekonvaleszenzphase erfolgte die experimentelle Verletzung der Oberschenkelarterie. 3 Wochen nach Induktion der Gefäßschädigung wurden die Mäuse euthanasiert, die Femoralarterien entnommen, in Paraffin eingebettet und histologisch analysiert.

7.2. Gruppengröße und –zusammensetzung

Es wurden 6 WT(Epo)-, darunter 3 Weibchen und 3 Männchen, und 6 Tg(Epo)-Mäuse, ebenfalls 3 Männchen und 3 Weibchen, miteinander verglichen. Die WT(Epo)-Tiere waren durchschnittlich $10,9 \pm 0,13$ Wochen alt und $22,27 \pm 3,1g$ schwer. Die Tg(Epo)-Tiere hatten im Mittel ein Alter von $10,7 \pm 0,15$ Wochen und ein Gewicht in Höhe von $22,36 \pm 2,05g$.

7.3. Operationstechnik

Zunächst erfolgte die Narkoseinduktion wie beschrieben. Der linke Oberschenkel wurde medial geschoren. Die Maus wurde auf einer Wärmematte, auf welcher ein Labortuch befestigt war, gelagert. Die Lagerung erfolgte in Rückenlage, die Gliedmaßen wurden mit Klebeband seitlich gestreckt fixiert. Das OP-Feld wurde anschließend mit Ethanol desinfiziert. Im Folgenden wurde unter der OP-Lupe gearbeitet. Medial am linken Oberschenkel wurde nun die Haut etwa 1 cm lang eingeschnitten. Die in das OP-Feld ragende Milchdrüse wurde zur Seite gelegt. Der N. femoralis wurde vorsichtig von Arterie und Vene getrennt und zur Seite verlagert. Die A. femoralis communis wurde zunächst locker mit einem 7-0 Prolene Faden umschlungen. Die A. profunda femoris wurde distal ligiert. Die Stauschlinge um die A. femoralis communis wurde nun angezogen. In die A. profunda femoris wurde proximal der Ligatur mit einem Mikro-Dissektor (Artikelnummer 15003-08, Firma Fine Science Tools, Heidelberg) ein Loch in die Gefäßwand geschnitten, durch welches anschließend ein 0,36 mm breiter Herzkatheter-Führungsdraht (Fixed Core Wire Guide Straight, Cook Inc.,

Bloomington, USA) eingeführt wurde. Danach wurde ein 0,38 mm breiter Führungsdraht (HI TORQUE-FLOPPY II, 0,014“, Abbot vascular, Abbot Park, USA) in das geweitete Gefäß eingeführt, bis zur Stauschlinge in die A. femoralis communis vorgeschoben und für 1 min im Gefäß belassen. In der Zeit wurde die A. profunda femoris proximal der bereits bestehenden Ligatur locker mit einem Faden umschlungen. Die Lokalisation von Stauschlingen und vorgelegten Ligaturen ist in Abb. 8 schematisch dargestellt.

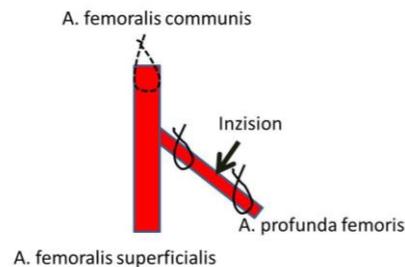


Abb. 8 Schematische Darstellung der Lokalisation

Beim Herausziehen des Drahtes wurde die vorgelegte Ligatur zugezogen. Nach Prüfung auf Dichtigkeit aller Ligaturen wurden alle Haltefäden entfernt, Drüse und Nerv reponiert und die Hautwunde mit Knopfnähten verschlossen. Im Anschluss an den Eingriff wurde die Narkose, wie beschrieben, antagonisiert.

7.4. Postoperative Überwachung und Analgesie

30 min vor Antagonisierung der Narkose wurden 0,1 mg/kg Buprenorphin s.c. injiziert. Bis 72 Stunden postoperativ erhielt die Maus alle 8 Stunden s.c. Injektionen von 0,1 mg/kg Buprenorphin. Im Zeitraum bis 6 Stunden post op. wurde die Maus engmaschig alle 2 Stunden inspiziert und die Befunde in Score Sheets dokumentiert. Nachfolgend erfolgte eine Kontrolle der Maus mit entsprechender Dokumentation jeweils zum Zeitpunkt der Schmerzmittelbehandlung. Nach Beendigung der Buprenorphingabe wurde die Maus täglich kontrolliert.

7.5. Gefäßentnahme und Vorbereitung der Histologie

3 Wochen nach Induktion der Gefäßschädigung wurde die Maus in einem abgedeckten Becherglas mit Isofluran getränkter Gaze euthanasiert. Für hämatologische Untersuchungen wurde danach kardial Blut entnommen. Dann wurden Brustkorb und Bauchhöhle eröffnet und die V. cava caudalis kranial vom Zwerchfell durchtrennt. Anschließend wurde die Maus mit 4 ml Ringerlösung (Firma B. Braun, Melsungen) gespült, welche mittels einer 5 ml-Spritze (Firma B. Braun, Melsungen) und einer 0,55 mm x 25 mm-Kanüle (Firma Becton Dickinson, Heidelberg) in den linken Ventrikel appliziert wurde. Damit der interessierende Gefäßabschnitt möglichst frei von Blut war, erfolgte eine weitere Spülung mit 2 ml Ringerlösung über ein in die kaudal des Abgangs der A. renalis sinistra in die Aorta eingebrachtes 23 GA Micro-Flo Perfusionsbesteck mit Flügel (Firma DKS Loversan, Gemonio, Italien). Abfluss wurde dabei durch die bei der Präparation der Aorta perforierte V. cava caudalis gewährleistet.

Bei der Entnahme wurde die Femoralarterie von V. und N. femoralis getrennt und das geschädigte Segment entnommen. Das Gefäß wurde über Nacht in 4%igem gepufferten Formalin (Firma Applichem, Darmstadt) aufbewahrt und danach in eine 70%ige Alkohollösung (Herstellung aus destilliertem Wasser und absolutem Ethanol der Firma Merck, Darmstadt) überführt, in welcher es bis zur Entwässerung verblieb. Die Entwässerung erfolgte über Nacht in einem Gewebeeinbettautomat (Microm Spin Tissue Processor 120, Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA). Die Probe wurde in einer Ausgießstation (Microm AP280-2, Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA) in Paraffin (Richard-AllanScientific TM Paraffin Type 6, Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA) eingebettet. Anschließend erfolgte ein Erkalten der Proben auf einer Kälteplatte (Tissue Cool Plate COP20, Firma Medite, Burgdorf) und die Weiterverarbeitung mit einem Mikrotom (Microm HM 340E, Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA) zu 2 µm breiten Schnitten. Die Schnitte wurden in einem 40°C warmen Wasserbad (Tissue Flotation Bath TBF 45, Firma Medite Burgdorf) gestreckt, auf Objektträger (SuperFrost®, Firma A. Hartenstein, Würzburg) gezogen, auf dem Rand des Wasserbades getrocknet und anschließend weiterverarbeitet.

7.6. Elastica mit van Gieson-Pikrofuchsin-Färbung

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert, indem sie für 2 x 10 Minuten in Xylol (Firma Carl Roth, Karlsruhe), 2 x 2 Minuten in absolutem Alkohol (Firma Merck, Darmstadt), 2 Minuten in 96%igem Alkohol (Firma Carl Roth, Karlsruhe) und 2 Minuten in 70%igem Alkohol gelagert wurden, bevor anschließend eine kurzzeitige Lagerung in Wasser stattfand. Sie wurden dann für 15 Minuten in Resorcin-Fuchsin (Firma Carl Roth, Karlsruhe) gefärbt und 1 Minute unter fließendem Leitungswasser gespült. Der nächste Färbeschritt erfolgte in Weigerts Eisenhämatoxylin (Stamm; 1:1) (Firma Carl Roth, Karlsruhe) für 5 Minuten. Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten ausgewaschen. Die Schnitte wurden 10 Sekunden in 1%igem Salzsäurealkohol (Herstellung aus 70%igem Alkohol und Salzsäure 2mol/l der Firma Carl Roth, Karlsruhe) differenziert und für 5 Sekunden mit destilliertem Wasser gespült. Es folgte ein zweiminütiger Färbeschritt in van Gieson-Pikrofuchsin Lösung (Firma Carl Roth, Karlsruhe). Anschließend wurden die Schnitte erneut mit destilliertem Wasser gespült. Letztlich erfolgte eine Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe, was durch kurzes Eintauchen der Schnitte in 70%igen Alkohol, 96%igen Alkohol, zweimal in absolutem Alkohol und zweimal in Xylol erreicht wurde. Nach Benetzen der Objektträger mit Pertex Medium (Firma Medite, Burgdorf) und möglichst luftblasenfreiem Auftragen eines Deckgläschens wurden die Schnitte mikroskopiert, fotografiert und ausgewertet.

7.7. Ausmessung und Auswertung

Die Elastica mit van Gieson-Pikrofuchsin-Färbung ist eine Mehrfach-Übersichtsfärbung zur Differenzierung von Kernen, Fasern, elastischen Fasern und verschiedenen Substanzen der extrazellulären Matrix. Mit ihr wurden Kerne braun-schwarz, Bindegewebe rot, elastische Fasern schwarz, Muskulatur gelb und Zytoplasma gelb angefärbt. Abb. 9 zeigt beispielhaft angefärbte histologische Präparate der geschädigten Femoralarterien eines WT(Epo)- und eines Tg(Epo)-Tieres.

Die Gefäße wurden in 100 µm-Schritten gefärbt. Das Mikroskopieren und Fotografieren

erfolgte mit einem Mikroskop (DMRB, Firma Leica, Wetzlar) und einer Kamera (DFC450C, Firma Leica, Wetzlar). Zum Ausmessen wurde eine Bildverarbeitungssoftware (LAS4.5, Firma Leica, Wetzlar) genutzt. Dazu wurden das Lumen sowie die Lamina elastica interna und externa manuell nachgefahren. Die Fläche des Lumens konnte somit direkt gemessen werden. Die Neointima- und Mediafläche wurden primär berechnet. Aus diesen primär berechneten Werten ließ sich die Neointima-Media-Ratio sekundär berechnen. Alle vorhandenen Schnitte wurden ausgemessen und berechnet. Zur Auswertung wurden dann die 3 Schnitte mit der größten Neointimabildung herangezogen. In diesen wurden folgende Punkte analysiert:

- Neointimafläche
- Mediafläche
- Neointima-Media-Ratio

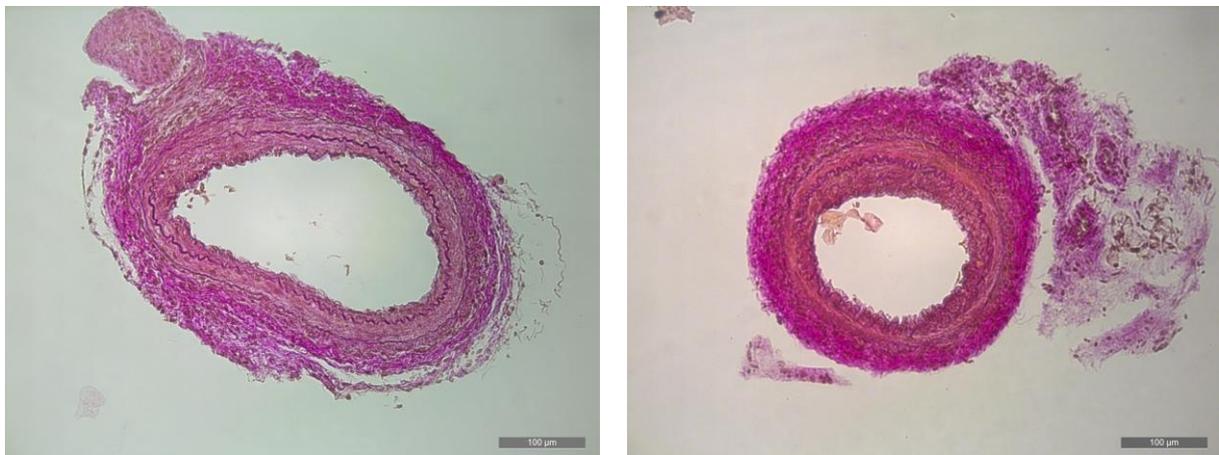


Abb. 9 Femoralarterien gefärbt mit Elastica van Gieson-Picrofuchsin-Färbung;
links: geschädigte Femoralarterie einer Tg(Epo)-Maus;
rechts: geschädigte Femoralarterie einer WT(Epo)-Maus

8. Arterielle Thrombose

8.1. Durchflusszytometrische Bestimmung der Thrombozytenaktivierbarkeit

8.1.1. Prinzip der Messung

Die Thrombozyten in den entnommenen Blutproben wurden durch ein kollagenähnliches Peptid (Collagen-related peptide; CRP) und durch einen Protease-aktivierten Rezeptor 4-Agonisten (PAR4), beide in jeweils 8 verschiedenen Verdünnungsstufen, aktiviert. CRP ist ein synthetisches Peptid, das die Struktur von Kollagen imitiert und durch Bindung an den Glykoprotein VI-Rezeptor von Thrombozyten als Agonist für diese fungiert. (Polanowska-Grabowska et al., 2003) PAR4-Agonisten ähneln strukturell dem Thrombin. Bei Bindung an den PAR4-Rezeptor vermitteln auch sie eine Aktivierung der Thrombozyten. Im Gegensatz zu Thrombin bewirken sie rein durch eine Konformationsänderung des Rezeptors, das heißt ohne proteolytische Aktivität, eine Induktion der zyttoplasmatischen G-Protein-gekoppelten Reaktion. (Chung et al., 2002)

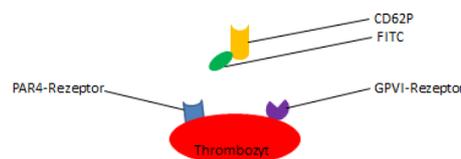


Abb. 10 Nicht aktivierter Thrombozyt



Abb. 11 Aktivierte Thrombozyten;

links: CRP-vermittelte Aktivierung; rechts: PAR4-Agonist-vermittelte Aktivierung

Aktivierte Thrombozyten exprimieren, wie in Abb. 11 gezeigt, P-Selektin auf ihrer Oberfläche. Durch Bindung von mit FITC (Fluoreszeinisothiozyanat) markiertem CD62P an P-Selektin können aktivierte Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie erkannt werden. Abb. 10 stellt dar, dass nicht aktivierte Thrombozyten kein P-Selektin an ihrer Oberfläche exprimieren und CD62P somit nicht bindet.

Mittels Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence-activated cell scanning) können Zellen anhand von Größe, Granularität und entsprechender Färbung differenziert werden (Universität-Salzburg, 2017). Das Prinzip der Messung beruht auf Emission von optischen Signalen, sobald die Zelle den Laserstrahl passiert. Die Zellen aus der Probe werden zunächst in einen Flüssigkeitsstrom, den sogenannten Hüllstrom, injiziert. Wie sich vom Namen ableiten lässt, umgibt der Hüllstrom den Probenstrom. Um eine Injektion gewährleisten zu können, muss der Druck im Probenstrom größer sein als im Hüllstrom. Die Fließgeschwindigkeit im Hüllstrom ist hingegen höher als im Probenstrom. Die Zellen werden mitgerissen und zu einem feinen Strahl fokussiert und in die Messküvette geleitet. Man spricht von hydrodynamischer Fokussierung. Trifft der Laserstrahl in der Messküvette auf eine Zelle, entsteht Streulicht. Dieses wird durch einen Detektor ausgewertet. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und ihrer Komplexität. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter=FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und steigt proportional mit dem Volumen der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter=SSC) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel und korreliert mit der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur des Zellkerns und dem Gehalt an intrazellulären Vesikeln. Zusätzlich zum gestreuten Licht ist das FACS in der Lage Fluoreszenzlicht zu detektieren. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern, welche an Oberflächenantigene binden, ist so eine weitere Phänotypisierung der Zellen möglich. In diesem Versuch wird FITC-gekoppeltes CD62P verwendet. Die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden bei exakter Anregung durch den Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau gehoben. FITC wird durch den blauen Laser des Durchflusszytometers angeregt. Nach Beendigung der Laserstrahlexposition fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. FITC emittiert dabei Strahlung mit einer Wellenlänge von 530 nm. Die emittierte Photonenkonzentration wird mittels Photodetektor ermittelt und verhält sich proportional zur gebundenen Antikörpermenge.

8.1.2. Gruppengröße und -zusammensetzung

Es wurden Blutproben von 8 Tg(Epo)-Tieren mit denen von 5 Wt(Epo)-Tieren verglichen. Bei den Tg(Epo)-Mäusen handelte es sich um 4 Männchen und 4 Weibchen, bei den WT(Epo)-Tieren um 3 Männchen und 2 Weibchen. Das Alter der WT(Epo)-Tiere betrug $102,6 \pm 15,19$ Wochen, das der Tg(Epo)-Tiere lag bei $96,89 \pm 20,25$ Wochen.

8.1.3. Probenentnahme und -aufarbeitung

Die Blutentnahme erfolgte über kardiale Punktion wie beschrieben. 720 μ l Blut wurden mit 80 μ l Citratlösung, welche aus Citrat-Monovetten (Firma Sarstedt, Nümbrecht) in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Firma Eppendorf, Hamburg) überführt wurde, vermischt.

Das Blut wurde 1:20 in Hapes buffered saline (HBS)-Puffer verdünnt. Die genaue Zusammensetzung des HBS-Puffers findet sich in Tab. 3.

12,5 μ l des Blut-Puffer-Gemischs wurden zu 12,5 μ l eines Antikörper-Thrombozytenrezeptor-Agonisten-Gemischs gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die exakte Zusammensetzung des Antikörper-Thrombozytenrezeptor-Agonisten-Gemisches ist in Tab. 3 gelistet. CRP und das PAR4-Rezeptor-aktivierende-Peptid wurden in jeweils 8 Verdünnungsstufen analysiert, das heißt, es wurden 16 Proben je Maus durchflusszytometrisch ausgewertet. Die Verdünnungsstufen für PAR4-Rezeptor-aktivierendes-Peptid (Firma Bachem, Bubendorf, Schweiz) waren 0,078 mM; 0,156 mM; 0,313 mM; 0,625 mM; 1,25 mM; 2,5 mM; 5 mM und 10 mM. Die Verdünnungsstufen für CRP, welches freundlicherweise von Prof. Farndale aus Cambridge zur Verfügung gestellt wurde, waren 0,086 μ g/ml; 0,17 μ g/ml; 0,34 μ g/ml; 0,69 μ g/ml; 1,38 μ g/ml; 2,75 μ g/ml; 5,5 μ g/ml und 10,9 μ g/ml.

Anschließend wurden die Thrombozyten mit 500 μ l 0,2%iger Formaldehydlösung fixiert. Die genaue Zusammensetzung der Fixierlösung findet sich in Tab. 3. Die P-Selektin-Expression der Thrombozyten wurde noch am selben Tag gemessen.

Tab. 3 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
HBS, pH=7,4	10 mM HEPES (Firma Applichem, Darmstadt) 150 mM NaCl (Firma Carl Roth, Karlsruhe) 1 mM MgSO ₄ (Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 5 mM KCl (Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Agonistengemisch	9,75 µl HBS 0,25 µl FITC Ratte-Anti-Maus CD62P (Clone RB40.34, Firma Becton Dickinson, Heidelberg) 2,5 µl CRP beziehungsweise PAR4-Rezeptor aktivierendes Peptid
Fixierlösung	154 mM NaCl (Firma Carl Roth, Karlsruhe) 0,2% Formaldehyd (Firma Carl Roth, Karlsruhe)

8.1.4. Analyse der Thrombozytenaktivierbarkeit

Die Thrombozytenaktivierbarkeit wurde mittels eines Durchflusszytometers (FACSCalibur, Firma Becton Dickinson, Heidelberg) und entsprechender Software (CellQuest, Firma Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

Zur Auswertung wurde zunächst das Vorwärtsstreulicht gegen das Seitwärtsstreulicht in einem Dotplot-Diagramm aufgetragen. Aufgrund ihrer geringen Größe und Granularität sind Thrombozyten als eine Population in der Nähe des Koordinatenursprungs auszumachen. Um diese Population wurde ein Gate gelegt. Durch Bestimmung des Anteils der P-Selektin-Expression konnte der Anteil aktivierter Thrombozyten an der Gesamthrombozytenpopulation errechnet werden. (P-Selektin wurde durch das zugegebene CD62P gebunden, welches mit FITC markiert war. FITC wurde durch den blauen Laser des Durchflusszytometers zur Emission von Strahlung mit einer Wellenlänge von 530nm angeregt. Diese Strahlung wurde vom Durchflusszytometer detektiert.)

8.2. Eisen-3-Chlorid-Verletzung

8.2.1. Versuchsaufbau

Die Splenektomie der Tiere erfolgte im Alter von 6 bis 8 Wochen. Die Durchführung der Operation und der postoperativen Analgesie und Überwachung erfolgte wie beschrieben. Nach einer Rekonvaleszenzphase von einer Woche wurde mit Eisen-3-Chlorid (FeCl_3) eine Thrombose der A. carotis communis dextra induziert und die Zeit bis zum Sistieren des Blutflusses mittels Doppler-Sonographie gemonitort.

8.2.2. Gruppengröße und –zusammensetzung

Die Gruppengröße für dieser Versuchsgruppe beträgt 17 Tiere, wobei es sich um 8 WT(Epo)- und 9 Tg(Epo)-Tiere handelt. In der WT(Epo)-Gruppe wurden 4 Weibchen und 4 Männchen, bei den Tg(Epo)-Tieren 4 Weibchen und 5 Männchen untersucht. Die Tiere der WT(Epo)-Gruppe waren $7,46 \pm 1,02$ Wochen alt, die Tg(Epo)-Tiere hatten ein Alter von $7,94 \pm 0,77$ Wochen.

8.2.3. Operationstechnik

Die Induktion der arteriellen Thrombose erfolgte unter MMF-Narkose, die wie vorher beschrieben eingeleitet und überwacht wurde. Die Maus wurde unter Fixierung der Gliedmaßen mit Klebeband in Rückenlage auf einer Wärmematte gelagert. Über eine Kopfkammer wurde die Maus mit einem 0,5%igem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch versorgt. Nach alkoholischer Desinfektion wurde ein ca. 1 cm langer Hautschnitt am ventralen Hals gesetzt. Die Lappen der Glandula mandibularis wurden auf die Seiten verlagert und mittels 7-0 Prolene-Haltefäden und Baby-Moskitoklemmen (Firma WDT, Garbsen) fixiert. Die A. carotis communis dextra wurde freigelegt und vorsichtig vom Truncus vagosympathicus getrennt. Etwa 0,5 cm proximal der Bifurkation wurde die A. carotis comm. dextra von einer Folie unterminiert. Für diesen Zweck hat es sich als praktisch erwiesen, ein zerkleinertes

Stück eines Strohhalmes zu verwenden, da sich dieses aufgrund der gebogenen Form und der Stabilität des Materials relativ einfach unter das Gefäß schieben ließ. Vor Induktion der Verletzung wurde der Blutfluss mit einer 8 MHz-Stiftsonde eines Doppler-Ultraschallgerätes (Vasolab 320 mit 8 MHz-Stiftsonde, Firma Elcat, Wolfratshausen) gemessen. Als Kontaktmedium wurde Ultraschallgel (Aquasonic® 100, Firma Parker Laboratories Inc., Fairfield/New Jersey, USA) verwendet. Das Ultraschallgel wurde entfernt, das zu untersuchende Areal mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigt und anschließend trockengetupft. Dann wurde ein 1 x 2 mm² großes in 10%iger FeCl₃-Lösung (Herstellung aus destilliertem Wasser und FeCl₃ der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen) getränktes Filterpapier für 90 s auf der mit der Folie unterminierten A. carotis comm. dextra platziert. In Abb. 12 ist die mit FeCl₃-Plättchen versehene A. carotis comm. dextra dargestellt.



Abb. 12 Eröffneter ventraler Halsbereich mit freiliegender, unterminierter und mit FeCl₃-Plättchen versehener A. carotis comm. dextra, Kopf nach unten zeigend

Nach Entfernung des Plättchens wurde eine Stoppuhr gestartet. Das Gefäß wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigt und mit Kontaktgel benetzt. Der Schallkopf wurde poststenotisch positioniert und mit einem Laborstativ fixiert, um Artefakte durch Bewegungen beim Halten der Sonde zu vermeiden. Auf diese Weise konnte der Blutstrom dargestellt werden. Dieser wurde so lange gemessen, bis kein Blutfluss mehr detektierbar war. Es wurde dann die Uhr gestoppt und die Zeit notiert. Die Tiere wurden im Anschluss durch kompletten Blutentzug aus dem Herzen getötet. Das Blut diente der Durchführung hämatologischer Untersuchungen.

Abb. 13 zeigt die mittels Doppler-Sonographie ermittelte Blutflussgeschwindigkeit vor Induktion der Gefäßschädigung. In Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16 ist die graduelle Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit im zeitlichen Verlauf abgebildet.

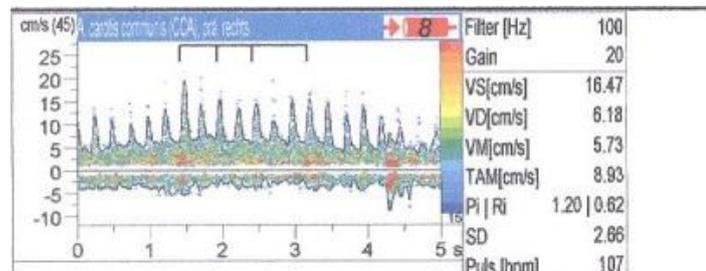


Abb. 13 Doppler-Sonographie der A. carotis comm. vor Schädigung

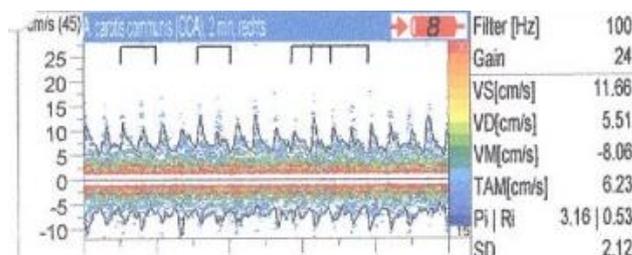


Abb. 14 Doppler-Sonographie der A. carotis comm. 2 min nach Schädigung

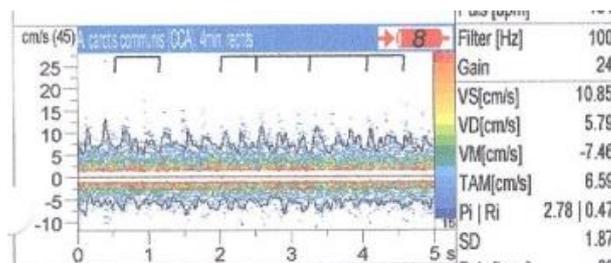


Abb. 15 Doppler-Sonographie der A. carotis comm. 4 min nach Schädigung

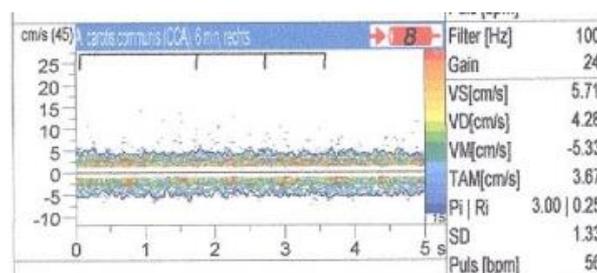


Abb. 16 Doppler-Sonographie der A. carotis comm. 6 min nach Schädigung

8.2.4. Auswertung

Durch Blutflussmessung mittels Doppler-Sonographie wurde die Zeit bis zur Okklusion des Gefäßes gemessen, welche sich in einem Sistieren des Blutflusses äußerte. Die Doppler-Untersuchung erfolgte fortlaufend, die Aufnahme und Speicherung des Gemessenen wurde minütlich durchgeführt.

9. Dokumentation

Für jedes Tier wurde, wie von der Regierung von Oberbayern im Genehmigungsbescheid zum Tierversuchsvorhaben gefordert, ein Aufzeichnungsplan geführt. In diesem wurden Datum und Art des Eingriffs, die Tiernummer, das Geschlecht, das Geburtsdatum, das Gewicht und die Menge der verwendeten Narkotika notiert. Zusätzlich wurden Score Sheets erstellt, in welchen der Allgemeinzustand der Tiere bis eine Woche nach Splenektomie oder Femoralisverletzung täglich dokumentiert wurde. Bei der Fütterung der Cholesterindiät wurden die Tiere während des Fütterungszeitraumes täglich kontrolliert. Dabei wurde das Verhalten, die Körperhaltung, die Nahrungsaufnahme, der Pflegezustand, der Kotabsatz, der Zustand der Operationswunden und das Hautbild der Tiere überwacht. Jeder einzelne Punkt wurde mit einem Score von 0 bis 2 bewertet, wobei 0 dem physiologischen Zustand entsprach, 1 für geringgradige und 2 für hochgradige Abweichungen stand. Mit diesem Score Sheet sind auch die Abbruchkriterien des Versuchs definiert worden. Ein Score von 2 oder ein dreimal aufeinanderfolgender Score von 1 bedeutete, dass das Tier unverzüglich euthanasiert werden musste.

10. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erzielten Ergebnisse wurde mit dem Programm GraphPad Prism 7 (Firma GraphPad, La Jolla/Kalifornien, USA) durchgeführt.

Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die graphische Darstellung erfolgte als Dotplot mit überprojiziertem Mittelwert und Standardabweichungen.

Bedingt durch Fallzahlen <15 konnte keine zuverlässige Aussage über die Verteilung der Daten getroffen werden. Es wurden jeweils 2 Gruppen auf das Vorliegen eines Unterschiedes geprüft. Wegen der kleinen Gruppengrößen wurde dazu generell der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Es handelt sich dabei um ein Rang-basiertes Testverfahren. Voraussetzung für die Anwendung des Mann-Whitney-U-Testes sind ungepaarte, also voneinander unabhängige Stichproben. Diese Bedingung war bei den vorliegenden Untersuchungen erfüllt, da die Werte unterschiedlicher Mäuse verglichen wurden. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

Weiterhin wurden verschiedene Effektgrößen quantifiziert. Nakagawa und Cuthill empfehlen die Verwendung von Effektmaßen zur Beurteilung der Beziehung zwischen Daten in biologischen Studien (Nakagawa and Cuthill, 2007). Diese sind geeignet, um Größe und Richtung eines Unterschiedes darzustellen. Es wurden die relativen Differenzen zum Mittelwert der Kontrolle ermittelt. Außerdem wurde Cohen's d, ein standardisiertes, dimensionsloses Effektstärkemaß für den Vergleich von 2 Mittelwerten, berechnet. Es liefert Informationen über die Größe des Effektes bezogen auf die Standardabweichung. Laut Cohen wird eine Effektgröße von $d=0,2$ als kleiner Effekt, von $d=0,5$ als mittlerer Effekt und von $d=0,8$ als starker Effekt gedeutet.

Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurden zudem mittels MedCalc Flächen unter den Kurven (AUC; area under the curve) bestimmt. Die Überprüfung auf das Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes wurde mit dem Programm SPSS Statistics 24 durch Anwendung des Mann-Whitney-U-Testes durchgeführt.

V. ERGEBNISSE

1. Hämatologische Parameter vor und nach Splenektomie

Tab. 4 Hämatologie ohne Splenektomie

	WT(Epo) (n=76)	Tg(Epo) (n=89)	Relative Differenz [%]	Cohen's d	p
HCT [l/l]	0,5±0,05	0,79±0,09	58	3,9	<0,001
PLT [$10^3/\mu\text{l}$]	622±241	316±109	-49,2	-1,68	<0,001
RET [$10^6/\mu\text{l}$]	0,23±0,06	0,63±0,15	173,91	3,4	<0,001
WBC [$10^3/\mu\text{l}$]	10,44±3,75	10,72±4	2,68	0,07	0,826
Neutrophile [%]	22,73±9,16	17,84±15,44	-21,51	-0,38	0,039
Lymphozyten [%]	75,1±11,18	79,71±15,42	6,14	0,34	0,073
Monozyten [%]	1,68±4,15	2,1±2,24	25	0,13	0,005

Mit den durch V. facialis-Punktion gewonnenen und mit EDTA antikoagulierten Blutproben wurden im hauseigenen Labor hämatologische Untersuchungen durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse daraus sind in Tab. 4 gelistet. Aufgeführt finden sich dort Mittelwerte, Standardabweichungen, relative Differenzen zwischen den Mittelwerten, Cohen's d- und p-Werte. Entsprechend der Beschreibung des Mausmodells konnte ein starker Effekt des EPOs auf den Hämatokrit demonstriert werden. Der durchschnittliche Hämatokrit der Tg(Epo)-Mäuse in Höhe von 0,79 l/l war signifikant höher als bei WT(Epo)-Tieren, wo er 0,5 l/l betrug. Dies entspricht einem um 58% höheren Hämatokrit in der Tg(Epo)-Gruppe. Außerdem konnte ein starker EPO-Effekt auf die Thrombozytenzahlen beobachtet werden. Hierbei handelt es sich jedoch um eine Beeinflussung der Werte in die entgegengesetzte Richtung. Dies äußerte sich in um 49,2% verminderten Thrombozytenzahlen bei Tg(Epo)-Mäusen. Auch auf die Retikulozytenzahlen übt EPO einen

starken Effekt aus. Der Cohen's d-Wert in Höhe von 3,4, die um 173,91% erhöhten Retikulozytenwerte bei der Tg(Epo)-Maus und ein p-Wert von $< 0,001$ spiegelten diesen sehr starken Effekt auch wider. Hinsichtlich der Gesamtleukozytenzahl und ihres Anteils von neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten wurde nur eine geringe Beeinflussung dieser Werte durch EPO festgestellt. Der p-Wert in Höhe 0,005 zeigte dennoch einen signifikanten Unterschied des Monozytenanteils zwischen WT(Epo)- und Tg(Epo)-Tieren auf.

Tab. 5 Hämatologie nach Splenektomie

	WT(Epo) (n=20)	Tg(Epo) (n=163)	Relative Differenz [%]	Cohen's d	p
HCT [l/l]	0,48±0,04	0,68±0,12	41,67	1,75	<0,001
PLT [$10^3/\mu\text{l}$]	633±126	656±230	3,63	0,1	0,955
RET [$10^6/\mu\text{l}$]	0,17±0,05	0,34±0,12	100	1,48	<0,001
WBC [$10^3/\mu\text{l}$]	14,88±7,51	13,4±4,97	-9,95	-0,28	0,533
Neutrophile [%]	8,67±0,93	8,94±8,28	3,11	0,03	0,780
Lymphozyten [%]	90±0,99	85,8±8,09	-4,67	-0,55	0,446
Monozyten [%]	1,2±0,91	4,43±2,93	269,17	1,16	0,009

Die Ergebnisse der Blutuntersuchungen von splenektomierten Tieren sind in Tab. 5 aufgeführt. Auch nach Splenektomie konnte ein starker EPO-Effekt auf den Hämatokrit nachgewiesen werden. Bei Tg(Epo)-Mäusen betrug der Hämatokrit durchschnittlich 0,68 l/l und war damit signifikant höher als bei der WT(Epo)-Maus, wo er im Mittel bei 0,48 l/l lag. Der Hämatokrit post Splenektomie war demnach bei der Tg(Epo)-Maus um 41,67% gegenüber dem Hämatokrit der WT(Epo)-Maus erhöht. Ein Cohen's d-Wert von 1,48 deutet auf einen starken EPO-Effekt auf Retikulozytenzahlen auch nach Splenektomie hin. Die Retikulozytenzahlen der Tg(Epo)-Maus post Splenektomie waren verdoppelt, was sich auch in einem signifikanten Unterschied zwischen WT(Epo)- und Tg(Epo)-Retikulozytenwerten äußerte. Nach Splenektomie konnte nur noch ein schwacher EPO-Effekt auf Thrombozytenzahlen nachgewiesen werden. Ein p-Wert von 0,955 verdeutlichte zudem das

Fehlen eines signifikanten Unterschiedes zwischen WT(Epo)- und Tg(Epo)-Thrombozytenzahlen nach Splenektomie. Die Gesamtleukozytenzahlen und die Granulozytenanteile unterscheiden sich dagegen kaum. Entsprechend wurde hier kein signifikanter Unterschied gefunden. Ein mittelstarker EPO-Effekt zeichnete sich im Hinblick auf den Lymphozytenanteil ab. Bei der Betrachtung des p-Wertes konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen relativen WT(Epo)- und Tg(Epo)-Lymphozytenzahlen festgestellt werden. Den Monozytenanteil betreffend, bestand ein starker EPO-Effekt, was mit einer Erhöhung des Monozytenanteils in Tg(Epo)-Tieren um 269,17% assoziiert war. Ein p-Wert von 0,009 deutete außerdem auf signifikante Unterschiede zwischen relativen Monozytenwerten hin.

Vergleicht man den Hämatokrit vor und nach Splenektomie bei WT(Epo)-Mäusen, so war eine signifikante, wenn auch geringgradige Absenkung von 0,5 l/l auf 0,48 l/l zu verzeichnen. Bei den Tg(Epo)-Tieren fiel die Absenkung des Hämatokrit stärker aus. Nach Splenektomie wurde der Hämatokrit in Tg(Epo)-Tieren von ursprünglich 0,79 l/l auf 0,68 l/l signifikant gesenkt. Sowohl bei WT(Epo)-Tieren als auch bei Tg(Epo)-Mäusen betrug der mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelte p-Wert für den Hämatokrit mit und ohne Splenektomie $<0,001$.

2. Der Einfluss von EPO auf Arteriosklerose

Tab. 6 Hämatologie in atherosklerotischen, splenektomierten WT(Epo)- und Tg(Epo)-Mäusen

	WT(Epo) (n=10)	Tg(Epo) (n=10)	Relative Differenz [%]	Cohen's d	p
HCT [l/l]	0,42±0,04	0,79±0,03	88,1	10,47	<0,001
PLT [$10^3/\mu\text{l}$]	584±233	402±154	-31,16	-0,92	0,061
RET [$10^6/\mu\text{l}$]	0,23±0,07	0,4±0,09	73,91	2,11	0,001
WBC [$10^3/\mu\text{l}$]	6,8±2,1	8,7±2,9	27,94	0,75	0,235
Neutrophile [%]	26±24	20±12	-23,08	-0,32	>0,999
Lymphozyten [%]	67±24	71±15	5,97	0,2	>0,999
Monozyten [%]	6,8±2,6	8,1±4,2	19,12	0,37	0,852

Wie in Tab. 6 ersichtlich, sind in atherosklerotischen Mäusen starke EPO-Effekte auf den Hämatokrit, die Thrombozytenzahlen, die Retikulozytenzahlen und die Gesamtleukozytenzahlen nachweisbar. Der um 88,1% höhere Hämatokrit der ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus unterschied sich signifikant vom Hämatokrit der ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus, was sich in einem p-Wert von unter 0,001 widerspiegelte. Auch die Retikulozytenzahlen betreffend, konnten höhere Werte in ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Tieren aufgezeigt werden. Die Retikulozytenzahlen waren dort um 73,91% gesteigert. Dies ging einher mit einem p-Wert von 0,001 und damit einem signifikanten Unterschied zwischen ApoE^{-/-};WT(Epo)- und ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Retikulozytenwerten. Die Effektzahlen geben einen deutlichen Hinweis auf einen Einfluss von EPO auf Thrombozytenzahlen, der in weiterführenden Untersuchungen mit größeren Fallzahlen verifiziert werden muss. Ähnliches gilt auch für die Effektzahlen, welche einen starken Effekt von EPO auf Gesamtleukozytenzahlen vermuten lassen. Die Analyse der Cohen's d-Werte von den Anteilen neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten an der Leukozytenpopulation ergab eine geringe Beeinflussung dieser Werte durch EPO. Eine

signifikante Unterscheidung der Werte war entsprechend nicht gegeben.

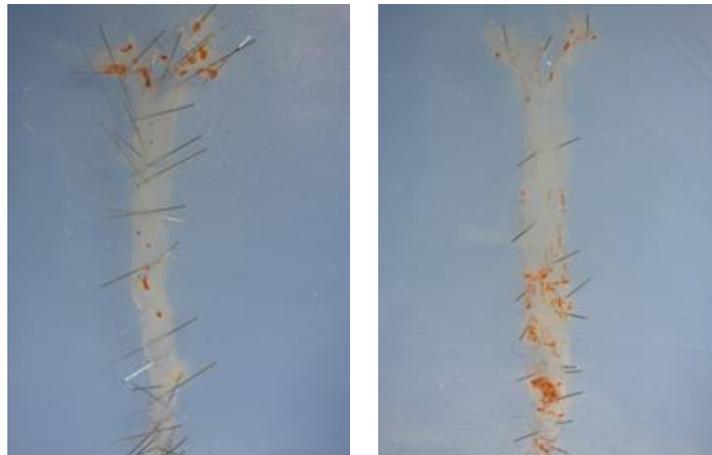


Abb. 17 Ölrot gefärbte Aorten;
links: Aorta einer ApoE^{-/-}; WT(Epo)-Maus;
rechts: Aorta einer ApoE^{-/-}; Tg(Epo)-Maus

Wie der Abb. 17 zu entnehmen, sind nach einer achtwöchigen Fütterung mit cholesterinreicher Diät sowohl bei ApoE^{-/-}; WT(Epo)- als auch bei ApoE^{-/-}; Tg(Epo)-Mäusen Plaqueansammlungen in der Aorta festzustellen. Die exemplarisch gezeigten Aorten zeigen außerdem, dass sich die Lokalisation der Plaques unterscheidet.

Um das Ausmaß der Plaquebildungen vergleichen zu können, wurden anhand von Fotos die Gesamtfläche der Aorta und die Fläche der Plaquebildungen ausgemessen. Es wurde ein schwacher Effekt von EPO auf die Gesamtplaquefläche und den relativen Anteil der Plaquefläche an der Gesamtaorta ermittelt. Im Vergleich zur ApoE^{-/-}; WT(Epo)-Maus war in der ApoE^{-/-}; Tg(Epo)-Maus die Gesamtplaquefläche um 30,31% vergrößert und der Plaqueanteil an der Gesamtfläche um 12,5% verringert. Sowohl die absolute als auch die relative Gesamtplaquefläche in der Aorta betreffend, bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen ApoE^{-/-}; WT(Epo)- und ApoE^{-/-}; Tg(Epo)-Tieren. Die graphische Darstellung der Einzelwerte, der Mittelwerte und der zugehörigen Standardabweichungen findet sich in Abb. 18 und Abb. 19.

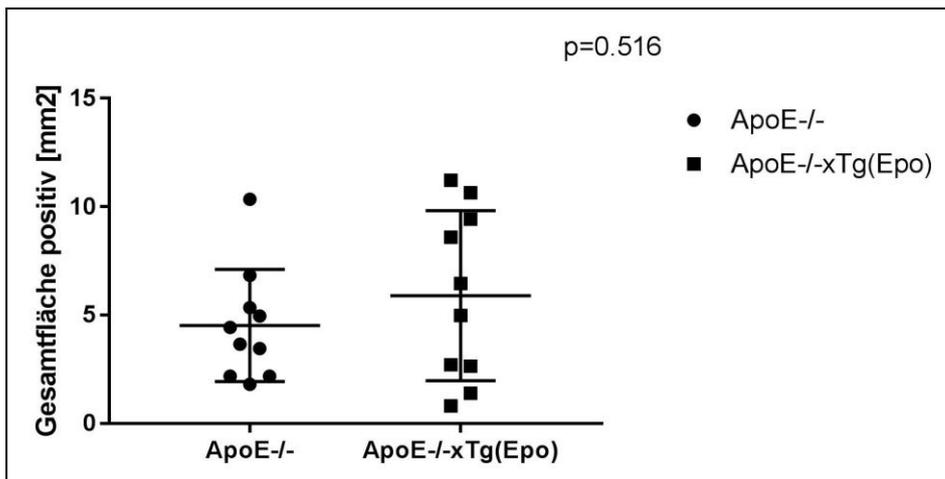


Abb. 18 Darstellung der Gesamtplaquefläche in der Aorta
(Relative Differenz: 30,31%; Cohen's d: 0,43)

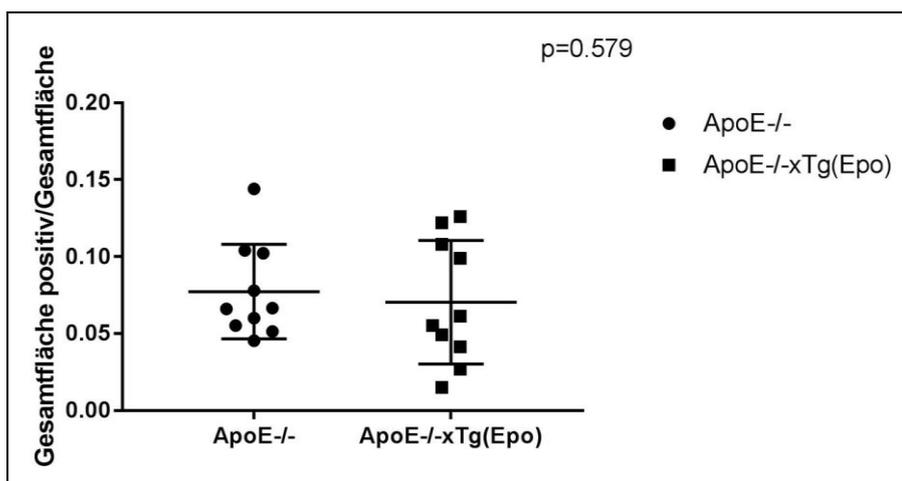


Abb. 19 Darstellung des prozentualen Anteils der Plauefläche
an der Gesamtfläche der untersuchten Aorta
(Relative Differenz: -12,5%; Cohen's d: -0,28)

Zusätzlich zur Betrachtung der Gesamtaorta wurden jeweils der Aortenbogen und der restliche Anteil der Aorta bis zum Abgang der A. renalis sinistra gesondert analysiert, um die Lokalisation der Plaques zu beleuchten.

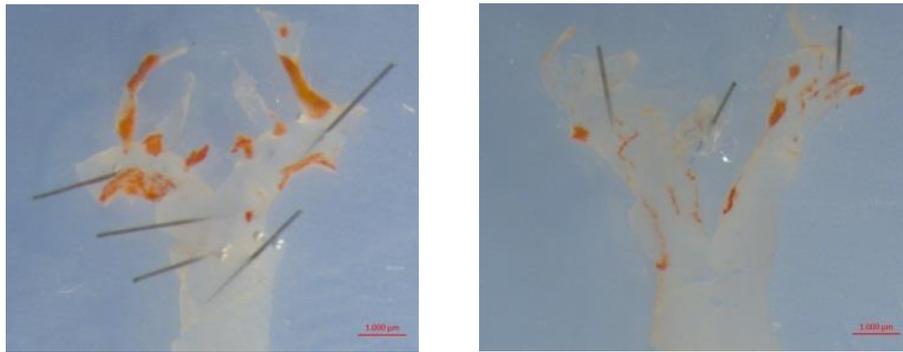


Abb. 20 Ölrot gefärbte Aortenbögen;
links: Aortenbogen einer ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus;
rechts: Aortenbogen einer ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus

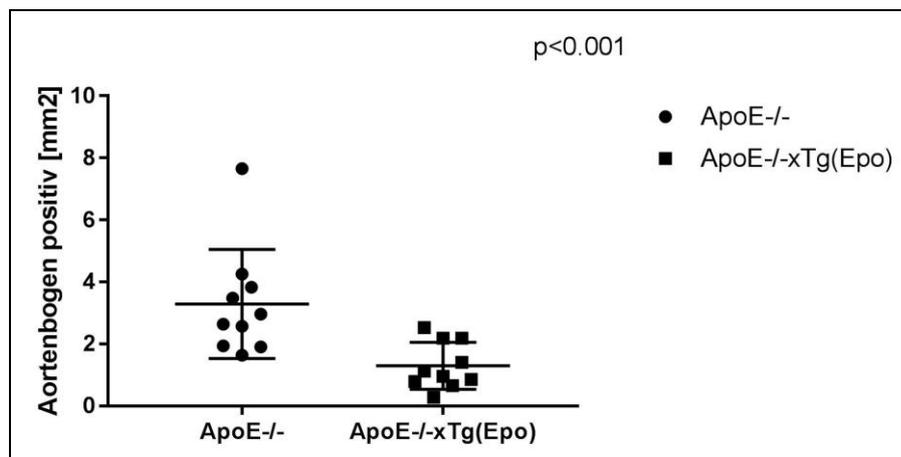
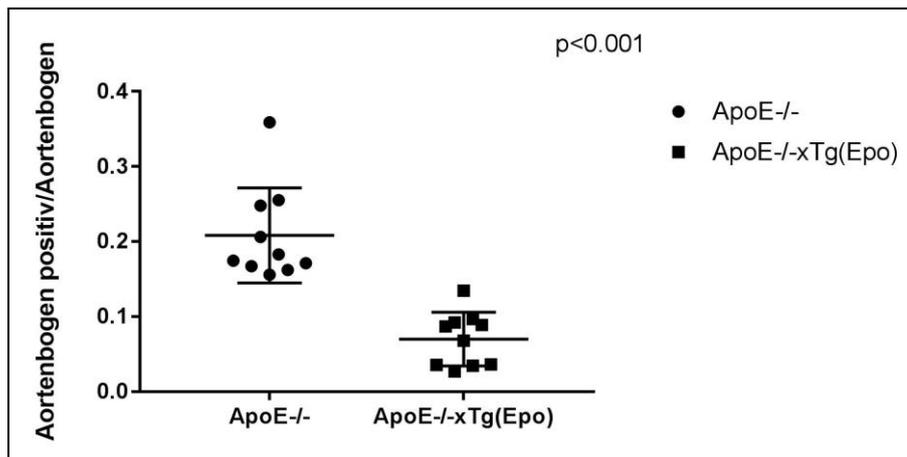
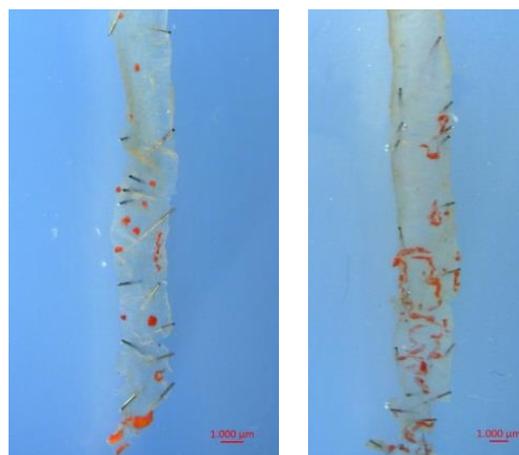


Abb. 21 Darstellung der Plaquefläche im Aortenbogen
(Relative Differenz: -60,49%; Cohen's d: -1,55)



**Abb. 22 Darstellung des prozentualen Anteils
der Plauefläche im Aortenbogen (Relative Differenz: -66,67%; Cohen's d: -2,95)**

In der Abb. 20 entsteht der Eindruck, dass der Aortenbogen der ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus weniger Plaques aufweist. Dieser bestätigt sich auch bei der graphischen Darstellung in den Diagrammen in Abb. 21 und Abb. 22. Die Cohen's d-Werte verraten einen starken Effekt des EPOs auf das Ausmaß der Plaquebildung im Bereich des Aortenbogens. Die mittels Mann-Whitney-U-Test errechneten p-Werte belegen, dass die absolute Plaquefläche im Aortenbogen und auch der prozentuale Plaqueanteil im Aortenbogen der ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus signifikant reduziert sind. Beide Werte sind um mehr als 60% vermindert.



**Abb. 23 Ölrot gefärbte Aorta descendens;
links: Aorta descendens einer ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus;
rechts: Aorta descendens einer ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus**

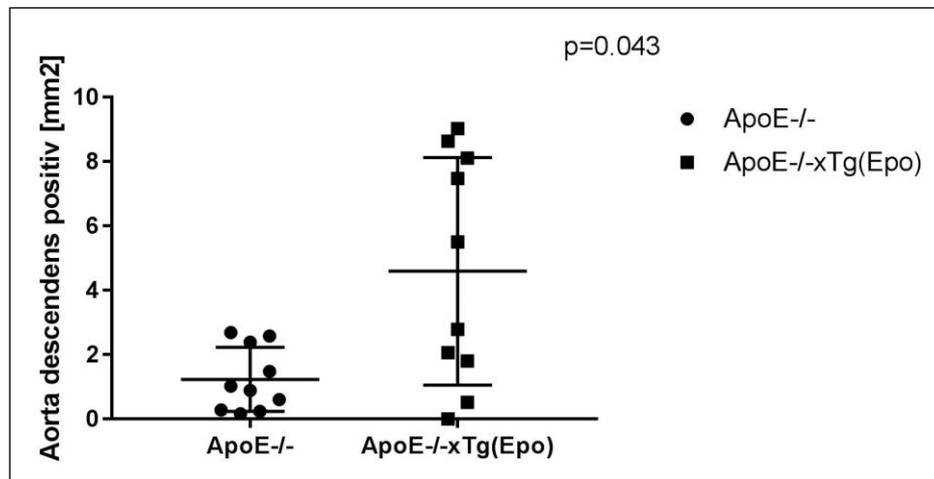


Abb. 24 Darstellung der Plauefläche in der Aorta zwischen dem Abgang der A. subclavia sinistra und Abgang der A. renalis sinistra (Relative Differenz: 273,17%; Cohen's d: 1,36)

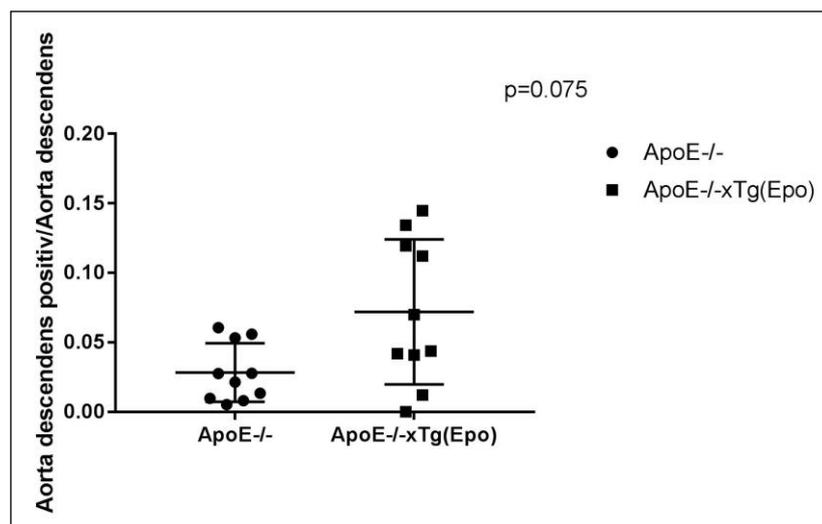


Abb. 25 Darstellung des prozentualen Anteils der Plauefläche in der Aorta zwischen dem Abgang der A. subclavia sinistra und Abgang der A. renalis sinistra (Relative Differenz: 133,33%; Cohen's d: 1,05)

Abb. 23 zeigt die Plaques in der Aorta descendens. EPO scheint sowohl auf die absolute Plaquebildung als auch auf den Anteil der Plaquebildung in der Aorta descendens einen starken Effekt zu haben. Bei der ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus war die absolute Plaquefläche in der Aorta descendens signifikant vergrößert. Im Vergleich zur ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus war die Plaquefläche um 273,17% vermehrt. Dies wird in Abb. 24 veranschaulicht. Auch der

prozentuale Anteil der Plauefläche in diesem Bereich, welcher in Abb. 25 dargestellt ist, scheint unter dem Einfluss von EPO vermehrt zu sein. Zur Bestätigung sind weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen erforderlich.

Abb. 26 zeigt beispielhaft Ölrot gefärbte Aortenursprünge einer ApoE^{-/-};Tg(Epo)- und einer ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus. Die histologische Analyse der Plauefläche hat einen starken EPO-Effekt auf das Ausmaß der Plauebildungen in diesem Bereich ergeben. Der Cohen's d-Wert betrug 1,21. Im Mittel war die Plauefläche im Aortensinus der ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus um 43,45% vergrößert. Der durch Mann-Whitney-U-Test ermittelte p-Wert in Höhe von 0,014 bezeugt eine signifikante Unterscheidung der Plauefläche in diesem Bereich zwischen ApoE^{-/-};WT(Epo)- und ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Mäusen. Die grafische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 27.

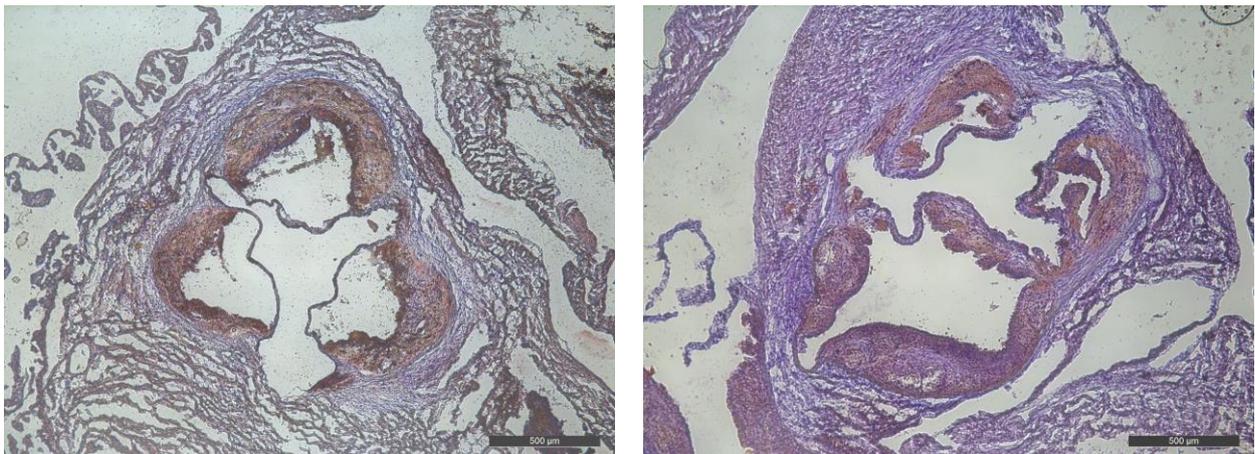


Abb. 26 Ölrot gefärbte Aortenursprünge;
links: Aortensinus einer ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus;
rechts: Aortensinus einer ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus

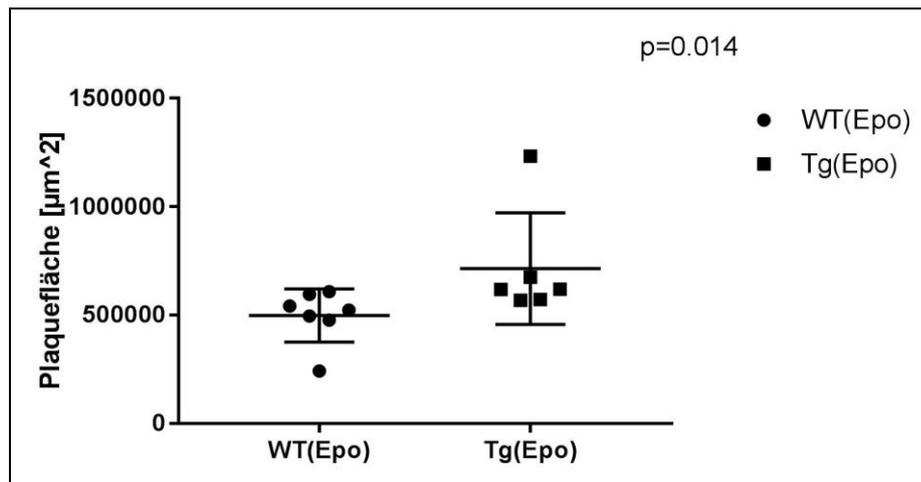


Abb. 27 Darstellung der Plaquerfläche im Aortenursprung
(Relative Differenz: 43,45%; Cohen's d: 1,21)

3. Der Einfluss von EPO auf arterielles Remodeling

Tab. 7 Hämatologische Parameter 4 Wochen nach Splenektomie und 3 Wochen nach Drahtverletzung der A. femoralis communis

	WT(Epo) (n=6)	Tg(Epo) (n=6)	Relative Differenz [%]	Cohen's d	p
HCT [l/l]	0,49±0,03	0,76±0,08	55,1	4,47	<0,001
PLT [$10^3/\mu\text{l}$]	797±201	587±313	-26,35	-0,8	0,102
RET [$10^6/\mu\text{l}$]	0,46±0,15	0,4±0,05	-13,04	-0,54	0,818
WBC [$10^3/\mu\text{l}$]	7,5±1,9	10,4±1,8	38,67	1,57	0,039
Neutrophile [%]	7,3±1,5	9,4±2,2	28,77	1,12	0,262
Lymphozyten [%]	91,5±1,5	88,4±2,5	-3,39	-1,5	0,143
Monozyten[%]	1±0,5	1,98±1,83	98	0,73	0,905

4 Wochen nach Splenektomie und damit 3 Wochen nach Durchführung der Drahtverletzung der A. femoralis communis zeigte sich ein starker Effekt des EPOs auf den Hämatokrit, die Thrombozytenzahlen, die Gesamtleukozytenzahlen und den Anteil von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten an der Leukozytenpopulation. Während der Hämatokrit, die Gesamtleukozytenzahl und der Neutrophilenanteil erhöht waren, waren Thrombozytenzahlen und der Lymphozytenanteil bei der Tg(Epo)-Maus reduziert. Der Hämatokrit der Tg(Epo)-Maus war um 55,1% erhöht, die Leukozytenzahlen um 38,67% gesteigert. Beides war signifikant erhöht im Vergleich zur WT(Epo)-Maus. Die Cohen's d-Werte geben außerdem Hinweis auf einen starken Effekt des EPOs auf Thrombozytenzahlen und den Anteil von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten an Gesamtleukozyten, was in weiterführenden Untersuchungen mit größerem Stichprobenumfängen bestätigt werden muss. Es besteht ein mittelstarker Effekt des EPOs auf Retikulozytenzahlen und den Monozytenanteil an der Leukozytenpopulation. Die Retikulozytenzahlen der Tg(Epo)-Maus waren um 13,04% geringer als die der WT(Epo)-Maus. Der Monozytenanteil der Tg(Epo)-Maus war sogar nahezu verdoppelt. Um den Einfluss von EPO auf Retikulozytenzahlen und den Monozytenanteil zu verifizieren, sind auch hier weiterführende Untersuchungen mit größeren Fallzahlen nötig.

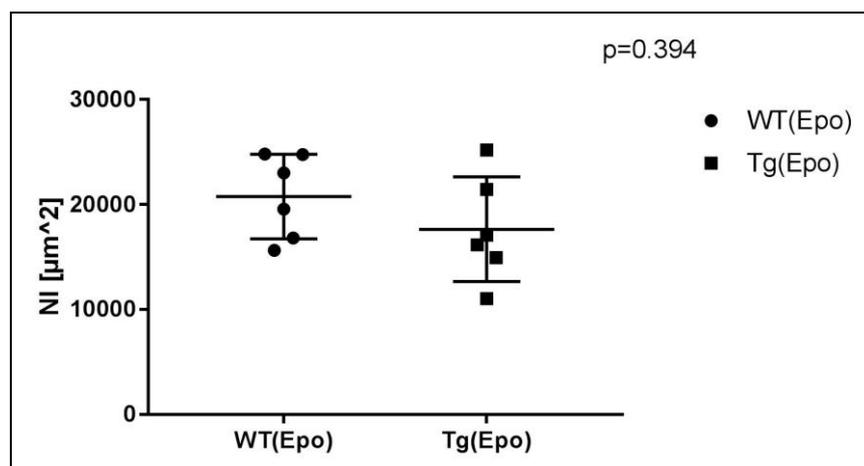


Abb. 28 Neointimafläche in der A. femoralis comm. 3 Wochen nach Drahtverletzung
(Relative Differenz: -15,01%; Cohen's d: -0,75)

Aus dem Cohen's d-Wert von -0,75 lässt sich ein mittelstarker bis starker EPO-Effekt auf das Ausmaß der Neointimabildung nach Gefäßschädigung ableiten. Die Neointimafläche bei der

Tg(Epo)-Maus war im Mittel zwar um 15,01% kleiner, ein signifikanter Unterschied in der Neointimafläche zwischen WT(Epo)- und Tg(Epo)-Mäusen ließ sich jedoch nicht ausmachen. Mittels Mann-Whitney-U-Test wurde ein p-Wert von 0,394 ermittelt, der dies bestätigte. Die graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 28.

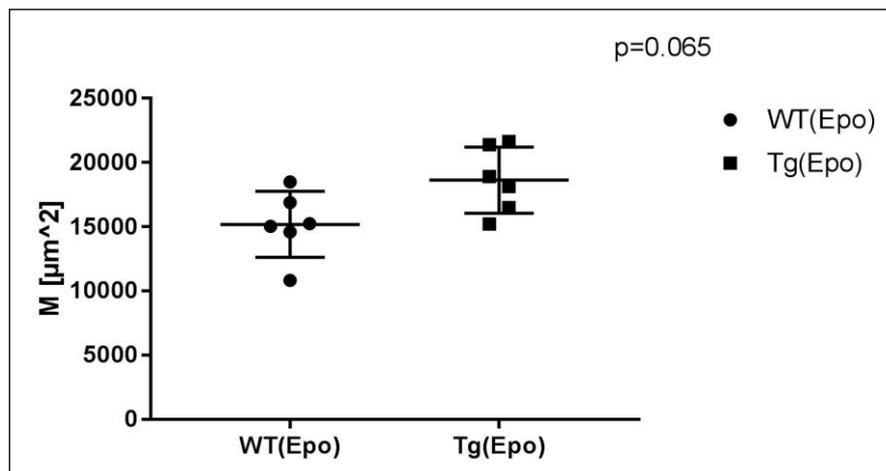


Abb. 29 Mediafläche in der A. femoralis comm. 3 Wochen nach Drahtverletzung
(Relative Differenz: 22,68%; Cohen's d: 1,46)

Die Mediafläche nach Gefäßschädigung betreffend, wurde ein Cohen's d-Wert von 1,46 ermittelt. Dies impliziert einen starken Effekt des EPOs auf die Größe der Mediafläche. Die Media der Tg(Epo)-Maus war um 22,68% größer als die der WT(Epo)-Maus. Der durch Mann-Whitney-U-Test ermittelte p-Wert betrug 0,065. Insgesamt zeigte sich also ein deutlicher Hinweis auf einen Effekt des EPOs auf die Mediafläche, welcher in weiterführenden Untersuchungen mit größeren Fallzahlen verifiziert werden muss. Die graphische Darstellung der Mediafläche 3 Wochen nach Gefäßverletzung findet sich in Abb. 29.

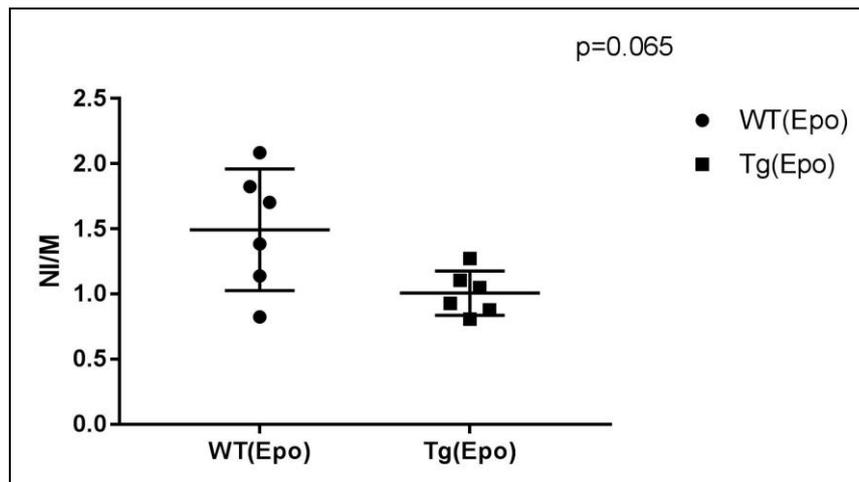


Abb. 30 Neointima-Media-Ratio in der A. femoralis comm. 3 Wochen nach Drahtverletzung
(Relative Differenz: -32,21%; Cohen's d: -1,49)

Durch Erstellung des Verhältnisses aus den vorher dargestellten Parametern wurde die Neointima-Media-Ratio ermittelt. Ein Cohen's d-Wert von -1,49 bezeugt einen starken Effekt des EPOs auf die Ratio. Wie in Abb. 30 ersichtlich, war die Neointima-Media-Ratio der Tg(Epo)-Maus um 32,21% geringer als die der WT(Epo)-Maus. Dies ist als klarer Hinweis auf eine verminderte Neointima-Media-Ratio unter dem Einfluss von EPO zu deuten, welchen es im Rahmen weiterführender Untersuchungen zu beweisen gilt.

4. Der Einfluss von EPO auf die Thrombozytenaktivierbarkeit

Tab. 8 Analytische Statistik der CRP-Thrombozytenstimulation

Konzentration an CRP [µg/ml]	0,086	0,17	0,34	0,69	1,38	2,75	5,5	10,9
Aktivierte Thrombozyten Tg(Epo) [%] (n=5)	1,34 ±0,55	1,49 ±0,77	1,6 ±1,05	1,64 ±0,31	4,13 ±2,14	8,38 ±1,93	17,35 ±6,24	26,64 ±7,25
Aktivierte Thrombozyten WT(Epo) [%] (n=8)	1,34 ±0,55	1,48 ±0,44	1,48 ±0,55	2,71 ±1,24	12,68 ±10,09	29,85 ±16,96	49,95 ±19,34	67,87 ±16,68
Relative Differenz [%]	0	0,68	8,11	-39,48	-67,43	-71,93	-65,27	-60,75
Cohen's d	0	0,02	0,16	-1,06	-1,05	-1,58	-2,05	-2,94
p	1,000	1,000	0,833	0,045	0,041	0,008	0,006	0,002

In Tab. 8 sind die Ergebnisse der analytischen Statistik der Thrombozyten nach CRP-Stimulation gelistet. Nach Stimulation der Thrombozyten mit CRP in Konzentrationen bis zu 0,34 µg/ml konnte maximal ein geringer Effekt des EPOs detektiert werden. Relative Differenzen der Mittelwerte deuteten auf einen größeren Anteil aktivierter Tg(Epo)-Thrombozyten hin, die berechneten p-Werte belegen jedoch das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes. Ab CRP-Konzentrationen von 0,69 µg/ml zeigte sich ein starker EPO-Effekt in einem signifikant verringerten Anteil aktivierter Tg(Epo)-Thrombozyten. Der Anteil aktivierter Tg(Epo)-Thrombozyten war im Vergleich zu WT(Epo)-Thrombozyten um bis zu 71,93% vermindert.

Tab. 9 Analytische Statistik der PAR4-Thrombozytenstimulation

Konzentration an PAR4-Agonist [mM]	0,078	0,156	0,313	0,625	1,25	2,5	5	10
Aktivierte Thrombozyten Tg(Epo) [%] (n=5)	2,03±0,65	3,04±1,03	14,61±4,9	45,58±7,24	72,36±6,84	78,55±6,36	78,63±9,45	19,75±21,45
Aktivierte Thrombozyten WT(Epo) [%] (n=8)	1,91±0,73	2,67±2,14	16,45±14,2	81,89±16,9	93,72±2,85	95,97±1,15	94,61±1,48	39,57±25,52
Relative Differenz [%]	6,28	13,86	-11,19	-44,34	-22,79	-18,15	-16,89	-50,09
Cohen's d	0,17	0,2	-0,16	-2,56	-4,54	-4,42	-2,75	-0,82
p	0,943	0,222	>0,999	0,019	0,002	0,002	0,002	0,202

Die Ergebnisse der analytischen Statistik der Thrombozytenstimulation mit PAR4-Agonisten finden sich in Tab. 9. Bei Verwendung von einer bis zu 0,313 millimolaren Lösung war kein signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil an aktivierten Tg(Epo)- und WT(Epo)-Thrombozyten feststellbar. Die Effektgrößen in niedrigen Konzentrationen waren klein. Ab Stoffmengenkonzentrationen von 0,625 mM zeigte sich ein starker Effekt des EPOs. Bei der Verwendung von 0,625 bis 5 millimolaren PAR4-Agonisten-Lösungen war der Anteil aktivierter Tg(Epo)-Thrombozyten im Vergleich zu WT(Epo)-Thrombozyten um bis zu 44,34% signifikant vermindert. Die Stimulation mittels einer 10 mM PAR4-Agonisten-Lösung ließ zwar einen starken Effekt des EPOs auf den Anteil aktivierter Thrombozyten erkennen, ein signifikanter Unterschied zwischen den Anteilen aktivierter Thrombozyten war allerdings nicht mehr nachweisbar.

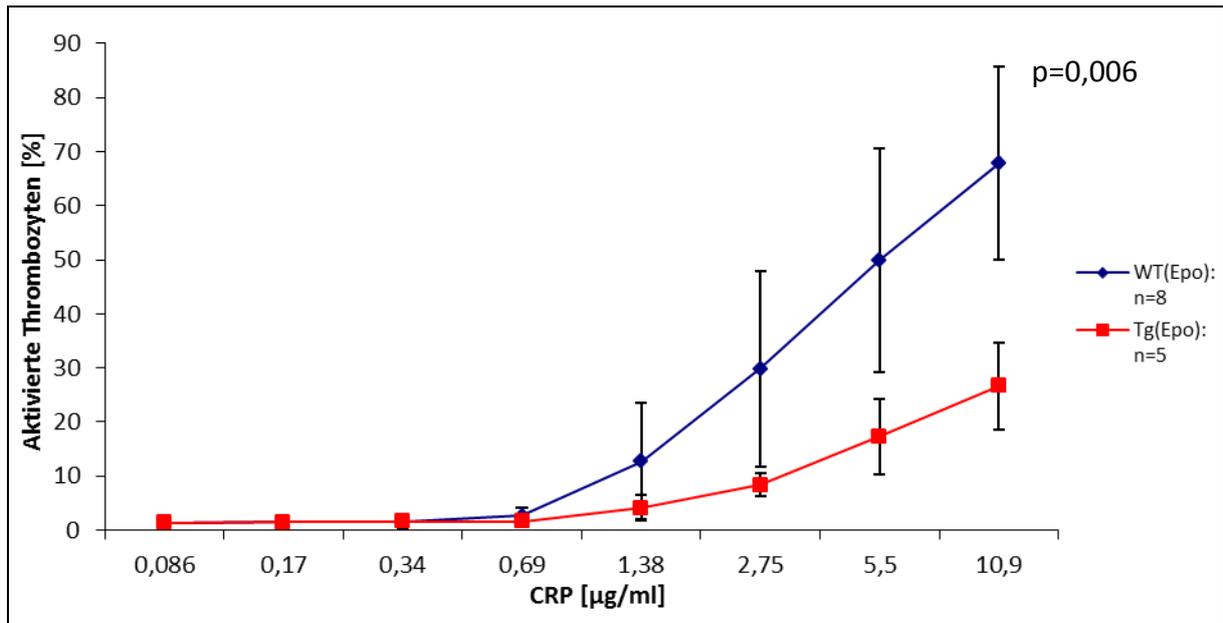


Abb. 31 Anteil aktivierter Thrombozyten an Gesamtthrombozyten nach Stimulation mit CRP

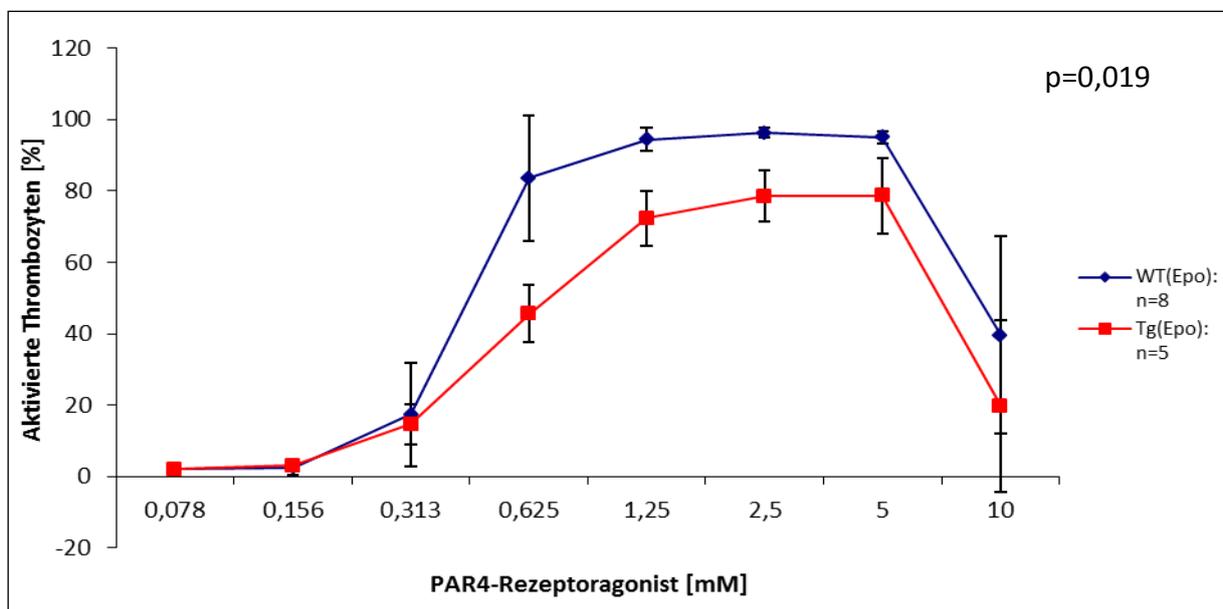


Abb. 32 Anteil aktivierter Thrombozyten an Gesamtthrombozyten nach Stimulation mit PAR4-Agonisten

In Abb. 31 und Abb. 32 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung von Thrombozyten graphisch dargestellt. Der Anteil aktivierter Thrombozyten ist gegen die Konzentration von CRP und PAR4-Agonist aufgetragen. Die Werte von Tg(Epo)-Tieren sind in rot, die von WT(Epo)-Tieren in blau dargestellt. Wie den Abbildungen zu entnehmen, ist eine Mindestkonzentration an Agonist erforderlich, um eine Thrombozytenaktivierung zu induzieren. Bei CRP lag diese bei etwa 0,69 µg/ml. Der PAR4-Rezeptoragonist zeigte Wirkung ab Verwendung von einer etwa 0,156 mM Lösung. Mit zunehmender Konzentration stieg auch der Anteil aktivierter Thrombozyten. Beim PAR4-Peptid war ab ca. 0,5 mM Lösung ein Plateauwert erreicht. Bei Verwendung einer höher als 5 mM konzentrierten Lösung war eine Abnahme des Anteils aktivierter Thrombozyten zu verzeichnen. Es zeigt sich einheitlich in beiden Diagrammen, dass die Kurven der Tg(Epo)-Thrombozytenstimulation flacher verlaufen als die zugehörigen WT(Epo)-Kurven. In beiden Versuchsansätzen wurden bei den Tg(Epo)-Mäusen also weniger Thrombozyten durch Stimulation aktiviert.

Um das Ausmaß der verringerten Tg(Epo)-Thrombozytenstimulation zu quantifizieren, wurde mittels MedCalc die AUC jedes einzelnen Tieres berechnet. Die Tab. 10 listet die Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die Ergebnisse der analytischen Statistik. Der Vergleich der AUC-Werte ermöglicht die Analyse der graphischen Daten. Die p-Werte in Höhe von 0,006 und 0,019 zeigen, dass sich die Thrombozytenstimulationskurven von WT(Epo)- und Tg(Epo)-Tieren sowohl nach CRP- als auch nach PAR4-Peptid-Stimulation signifikant unterscheiden.

Tab. 10 Analyse der AUC nach Thrombozytenstimulation

	WT(Epo) (CRP: n=8; PAR4: n=7)	Tg(Epo) (n=5)	Relative Differenz [%]	Cohen's d	p
AUC (CRP)	463,36±174,48	167,54±57,53	-64	-2,06	0,006
AUC (PAR4-Agonist)	764,12±67,02	584,58±108,45	-23	-2,09	0,019

5. Der Einfluss von EPO auf arterielle Thrombose

Tab. 11 Hämatologie nach arterieller Thrombose

	WT(Epo) (n=8)	Tg(Epo) (n=9)	Relative Differenz [%]	Cohen's d	p
HCT [l/l]	0,51±0,04	0,82±0,06	60,78	6,16	0,001
PLT [$10^3/\mu\text{l}$]	857±554	1130±616	31,86	0,46	0,852
RET [$10^6/\mu\text{l}$]	0,2±0,04	0,34±0,09	70	1,97	<0,001
WBC [$10^3/\mu\text{l}$]	4,69±4,15	8,18±1,27	74,41	1,17	0,043
Neutrophile [%]	27,6±4,2	23,5±4,8	-14,86	-0,91	0,533
Lymphozyten [%]	68,9±5,3	71,3±6,6	3,48	0,4	0,800
Monozyten [%]	3,1±1,9	4,6±1,7	48,39	0,84	0,533

Wie Tab. 11 zu entnehmen, ergab die Analyse der hämatologischen Parameter nach Induktion der arteriellen Thrombose einen starken EPO-Effekt auf den Hämatokrit, die Retikulozytenzahlen, die Gesamtleukozytenzahl und den Anteil von neutrophilen Granulozyten und Monozyten an der Leukozytenpopulation. Bis auf den Neutrophilen- und Monozytenanteil unterschieden sich die genannten Parameter signifikant zwischen WT(Epo)- und Tg(Epo)-Mäusen. Untersuchungen mit größeren Stichprobenumfängen sind also erforderlich, um den Einfluss von EPO auf den Anteil von neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu evaluieren. Aus den ermittelten Cohen's d-Werten ließ sich zudem ein geringer bis mittelstarker EPO-Effekt auf Thrombozytenzahlen und die relativen Lymphozytenwerte ableiten. Sowohl Thrombozytenzahlen als auch der Lymphozytenanteil unterschieden sich jedoch nicht signifikant zwischen WT(Epo)- und Tg(Epo)-Tieren.

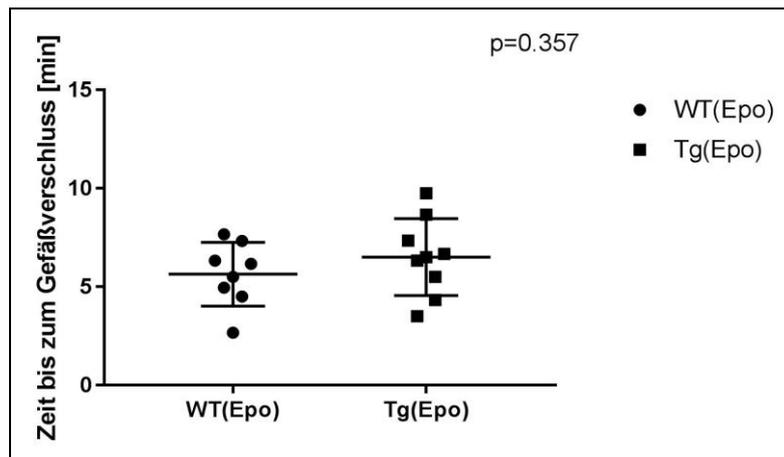


Abb. 33 Arterielle Verschlusszeit nach FeCl_3 -Schädigung
(Relative Differenz: 15,43%; Cohen's d: 0,51)

Betrachtet man die arterielle Verschlusszeit nach FeCl_3 -Schädigung, wie in Abb. 33 dargestellt, so kann eine um 15,43% verlängerte Zeitspanne bis zum Eintritt der kompletten Gefäßokklusion bei der Tg(Epo)-Maus beobachtet werden. Der Effekt des EPOs wird dabei als mittelstark interpretiert. Der p-Wert von 0,357 zeigt allerdings, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Okklusionszeiten von WT(Epo)- und Tg(Epo)-Tieren besteht. Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen könnten Aufschluss über die Beeinflussung der arteriellen Okklusionszeiten durch EPO geben.

VI. DISKUSSION

1. Wahl von Mausmodell und Methoden

Die Maus wurde als Tiermodell gewählt, da Haltung und Handling der Tiere vergleichsweise einfach sind. Auch der relativ kurze Reproduktionszyklus ist von Vorteil. Mäuse sind ab einem Alter von 7 bis 8 Wochen zuchtreif. Sie sind polyöstrisch mit einem 4 bis 5 Tage dauernden Brunstzyklus. Die Trächtigkeitsdauer beträgt 18 bis 21 Tage. Ab einem Alter von 3 Wochen können Jungtiere von den Elterntieren abgesetzt werden. Insgesamt ermöglichen Mäuse damit einen verhältnismäßig schnellen Erkenntnisgewinn. Außerdem stehen Mäuse mit verschiedensten genetischen Modifikationen zur Verfügung. So gibt es auch für arterielle Erkrankungen diverse Modelle. Neben der Vielfalt an genetischen Modifikationen sind in der Literatur diverse OP-Modelle für verschiedene Erkrankungen beschrieben.

Die Tg(Epo)-Linie wurde gewählt, da die Integration von humaner EPO-cDNA in das Genom eine endogene Produktion von humanem EPO gewährleistet. Die kontinuierliche Bildung von humanem EPO ermöglicht die Untersuchung einer langfristigen EPO-Exposition auf die Entstehung verschiedener arterieller Erkrankungen. Die Kombination des EPO-Transgens mit dem ApoE-Knockout resultiert in einer Doppelmutante, welche neben der dauerhaften EPO-Exposition atherosklerotische Läsionen aufweist. Die ApoE^{-/-}-Maus ist ein gut charakterisiertes Modell für die Arteriosklerose. Die Doppelmutante ist somit ein geeignetes Modell, um den Einfluss von langfristiger EPO-Exposition auf die Läsionsbildung in der Arteriosklerose zu untersuchen.

Eine der Hauptursachen für arterielle Thrombosen ist die Plaqueruptur. Da diese in der Maus nicht beobachtet wird, wird die Thrombose in der Maus artifiziell induziert. Die FeCl₃-Schädigung erschien dafür als ein probates Modell, da die Pathogenese in der Literatur ausführlich beschrieben wurde und die Morphologie der entstehenden thrombozytenreichen Thromben dem Aufbau humaner arterieller Thromben ähnelt (Li et al., 2010, Silverstein et al., 2010).

Arteriell Remodeling wurde mittels einer Drahtverletzung der A. femoralis communis induziert. Dieses Modell der Drahtverletzung wurde verwendet, da es sich dabei, im

Gegensatz zur Ligatur, um einen intraluminalen Eingriff handelt. Beim Patienten sind es gefäßchirurgische Eingriffe, meist perkutane Interventionen, die eine Endothelzellschädigung hervorrufen. Verglichen mit der Verletzung der A. carotis communis sind weniger Reservetiere notwendig, da Morbidität und Mortalität in diesem Modell geringer sind (Roque et al., 2000).

2. Der Einfluss von EPO auf hämatologische Parameter

Wie in der Literatur beschrieben, ist der Hämatokrit von Tg(Epo)-Tieren signifikant höher als der von WT(Epo)-Tieren. Verschiedene Autoren berichten von Hämatokritwerten von bis zu 0,89 l/l. (Camici et al., 2007, Vogel et al., 2003, Wagner et al., 2001) Bei eigenen Untersuchungen wurden Hämatokritwerte von Tg(Epo)-Tieren bis zu 0,98 l/l gefunden. Im Mittel war der Hämatokrit der Tg(Epo)-Maus um 58% gegenüber dem Hämatokrit der WT(Epo)-Maus erhöht. Der berechnete Cohen's d-Wert in Höhe von 3,9 impliziert einen sehr starken Effekt des EPOs auf den Hämatokrit, was wegen der bekannten hämatopoetischen Wirkung des EPOs nicht verwunderlich erscheint. Der hohe Hämatokrit in der Tg(Epo)-Maus ist nur möglich, da sich das Mausmodell durch verschiedene Mechanismen daran anpasst. Dazu zählen die vermehrte Expression von endothelialer NO-Synthase und die damit verbundene verstärkte NO-medierte Vasodilatation sowie die erhöhte Flexibilität der Erythrozyten, wie sie von Camici et al. nachgewiesen werden konnte (Camici et al., 2007). Durch Splenektomie konnte in eigenen Untersuchungen der durchschnittliche Hämatokrit von 0,79 l/l auf 0,68 l/l gesenkt werden. Dies entspricht auch den Erfahrungen von Gassmann et al., die gezeigt haben, dass nach Splenektomie mit dem Wegfall der extramedullären Erythropoese der Hämatokrit der Tg(Epo)-Maus auf 0,75 l/l bis 0,6 l/l abgesenkt werden konnte (Gassmann et al., 2008). Bei WT(Epo)-Tieren betrug der durchschnittliche Hämatokrit 0,5 l/l und war damit niedriger als der von splenektomierten Tg(Epo)-Tieren. Nach Splenektomie beträgt der Cohen's d-Wert des Hämatokrits 1,75 und ist somit kleiner als in nicht-splenektomierten Tieren. Er ist dennoch als ein starker Effekt zu interpretieren. Dies macht deutlich, dass nicht nur die lienale Erythropoese an dem hohen

Hämatokrit der Tg(Epo)-Maus beteiligt ist, sondern vermutlich auch die medulläre Erythropoese. In den durchgeführten Untersuchungen ist also zu beachten, dass nicht nur nicht-hämatopoetische Effekte des EPOs beobachtet wurden, sondern auch Folgen des erhöhten Hämatokrits. Bei den meisten Patienten wird EPO zur Anhebung des Hämatokrits eingesetzt. Aufgrund der Einstellung von Patienten auf gewisse Hämoglobin-Zielwerte fällt die Erhöhung des Hämatokrits jedoch deutlich moderater aus als in dem untersuchten Mausmodell. Je nach Indikation werden Hämoglobin-Zielwerte von 100-110 g/l empfohlen (Jelkmann, 2013). Bei der Tg(Epo)-Maus hingegen wurden in eigenen Untersuchungen durchschnittlich Werte von $240,2 \pm 28,6$ g/l beobachtet. Auf eine weitere Absenkung des Hämatokrits durch eine Phenylhydrazinbehandlung, wie sie in der Literatur beschrieben wird (Vannucchi et al., 2001), ist gezielt verzichtet worden, da damit ein Störfaktor in die verschiedenen Modelle eingebracht worden wäre. Der Einfluss von Phenylhydrazin auf Arteriosklerose, arterielle Thrombose und vaskuläres Remodeling ist nicht untersucht. Die Hämatokritsenkung des Phenylhydrazins beruht auf dessen hämolytischem Potenzial. Bei der Interaktion von Phenylhydrazin und Hämoglobin entsteht Wasserstoffperoxid, welches durch Entstehung von freien Radikalen zu einer Zerstörung des Hämoglobins führt. Da 5 Tage nach Injektion von 60 mg/kg Phenylhydrazin bereits wieder Ausgangshämatokritwerte erreicht werden, wären außerdem wiederholte Injektionen erforderlich. Dies würde mit einer Belastung für die Tiere einhergehen und könnte die Ergebnisse so nachhaltig beeinflussen. Ein weiterer Ansatz zur Umgehung der Hämatokritdifferenzen könnte die Injektion von EPO in geringer Dosierung oder von nicht-hämatopoetischen EPO-Analoga, wie cEPO oder asialoEPO, in WT-Mäuse sein. Die Verwendung von cEPO oder asialoEPO würde allerdings keinen Anstieg des Hämatokrits nach sich ziehen, sondern lediglich die Untersuchung der nicht-hämatopoetischen EPO-Effekte ermöglichen. Die Maus dient in dem Fall also nicht als Modell für den anämischen Patienten mit dauerhafter EPO-Therapie. Da auch die Stressbelastung ein Störfaktor ist, gilt es diese zu vermeiden. Um die zusätzliche Stressbelastung durch wiederholte Injektionen zu umgehen, könnten in Zukunft subkutan Minipumpen implantiert werden, welche kontinuierlich EPO oder nicht-hämatopoetische EPO-Analoga freisetzen.

Auch bei WT(Epo)-Mäusen wurde nach der Splenektomie ein reduzierter Hämatokrit nachgewiesen. Sowohl das Ausmaß der Absenkung, welches im Mittel bei 4% lag, als auch die niedrige Effektstärke in Höhe von -0,42 sprechen dafür, dass es sich dabei nicht um einen

direkten Effekt der Splenektomie handelt. Stattdessen könnte der mit der Splenektomie verbundene Blutverlust die Hämatokritsenkung bedingt haben.

Bei der Analyse der Blutbilder von Mäusen ohne Splenektomie konnte ein Cohen's d-Wert für Retikulozytenzahlen in Höhe von 3,4 festgestellt werden, was sich als starker Effekt des EPOs auf die Retikulozytenzahl deuten lässt. Außerdem zeigen sich signifikant höhere Retikulozytenzahlen bei Tg(Epo)-Mäusen. Verantwortlich für die vermehrte Produktion von Retikulozyten bei der Tg(Epo)-Maus ist unter anderem vermutlich die extramedulläre, lienale Erythropoese. Bestätigt wird dies durch den nach der Splenektomie abgemilderten Effekt des EPOs auf die Retikulozytenzahlen. Während der Cohen's d-Wert der Retikulozytenzahlen nicht splenektomierter Mäuse 3,4 beträgt, so ist in splenektomierten Mäusen ein Cohen's d-Wert von 1,48 feststellbar. Auch in verminderten relativen Differenzen zwischen Retikulozytenzahlen von WT(Epo)- und Tg(Epo)-Mäusen nach Splenektomie spiegelt sich dies wider. So sind Retikulozytenzahlen von nicht splenektomierten Tg(Epo)- Mäusen um 173,91% erhöht, während in splenektomierten Tg(Epo)-Tieren eine Erhöhung der Werte um 100% vorliegt. Durch den Wegfall der extramedullären Erythropoese in der Milz nimmt somit die Zahl der peripheren Retikulozyten bei der Tg(Epo)-Maus ab. Bei der WT(Epo)-Maus, wo keine Erythropoese in der Milz stattfindet, ist die Bildung von Erythrozyten nach der Splenektomie demnach nicht reduziert.

Die nach Splenektomie beobachteten signifikant erhöhten relativen Monozytenwerte könnten durch EPO bedingt sein. Auch der zugehörige Cohen's d-Wert in Höhe von 1,16 deutet darauf hin. Obwohl bisher keine Effekte von EPO auf CFU-GM (Colony-forming-unit-Granulozyten/Monozyten) beschrieben wurden, welches die Vorläuferzellen von Monozyten sind, lässt sich ein Einfluss von EPO auf Monozytenzahlen nicht ausschließen. Ebenso ist auch eine Beeinflussung von neutrophilen Granulozyten, welche auch aus CFU-GM hervorgehen, durch EPO denkbar. Die hämatologische Analyse des Blutes nicht splenektomierter Tiere ergab zwar nur einen Cohen's d-Wert von -0,38 für den Neutrophilenanteil, was als geringer bis mittelstarker EPO-Effekt interpretierbar ist, ein p-Wert von 0,039 zeigt jedoch signifikante Unterschiede zwischen WT(Epo)- und Tg(Epo)-Tieren auf.

Der Cohen's d-Wert für Thrombozytenzahlen in Höhe von -1,68 deutet auf einen starken Effekt des EPOs auf Thrombozytenzahlen hin. In Tieren ohne Splenektomie konnten zudem signifikant reduzierte Thrombozytenzahlen bei Tg(Epo)-Mäusen im Vergleich zu WT(Epo)-

Mäusen nachgewiesen werden. (Tg(Epo): $316 \pm 109 \times 10^3/\mu\text{l}$, WT(Epo): $622 \pm 241 \times 10^3/\mu\text{l}$) Dies bestätigen auch Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe von M. Avneon (Tg(Epo): $652,8 \pm 115 \times 10^3/\mu\text{l}$, WT(EPO): $1314 \pm 122 \times 10^3/\mu\text{l}$) (Avneon et al., 2009). Auffällig sind dabei jedoch die Abweichungen in absoluten Zellzahlen zwischen Untersuchungen von Avneon et al. und eigenen Untersuchungen. Ursächlich hierfür könnten einerseits die unterschiedlichen Entnahmemethoden und andererseits die verwendeten Analysegeräte sein. Für eigene Untersuchungen wurde das Blut aus der V. facialis entnommen, mit EDTA antikoaguliert und mit einem Sysmex XS-800i-Hämatologie-Analysegerät ausgewertet. Die Arbeitsgruppe von Avneon et al. hat das Blut retrobulbär mit einer heparinisierten Kapillare in ein EDTA-Röhrchen entnommen und mittels eines ADVIA Hämatologie-Analysegeräts untersucht. Ein Vergleich der Studien untereinander ist daher nur bedingt möglich. Die Blutwerte aus eigenen Untersuchungen beruhen auf derselben Entnahmetechnik, Probenverwertung und der Analyse mit demselben Gerät. Eine Vergleichbarkeit der eigenen Ergebnisse untereinander ist demnach gegeben. Nach Splenektomie ist ein Anstieg in Thrombozytenzahlen bei Tg(Epo)-Tieren auf durchschnittlich $656 \pm 230 \times 10^3/\mu\text{l}$ zu beobachten. Bei den WT(Epo)-Tieren ist post Splenektomie kein Anstieg der Thrombozytenzahlen festzustellen. Nach der Splenektomie liegen die Thrombozytenzahlen bei WT(Epo)-Tieren und Tg(Epo)-Tieren in der gleichen Größenordnung, was sich auch in fehlender Signifikanz widerspiegelte. Eine Beeinflussung der Thrombozytenzahlen durch EPO scheint demnach post Splenektomie nicht mehr vorzuliegen. Diese Ergebnisse entsprechen auch den Beobachtungen von Tsukada et al., die zeigten, dass durch Kombination von einer kurzzeitigen hoch dosierten EPO-Therapie (50 IU, einmal täglich über 4 Tage) mit einer Splenektomie in WT-Mäusen periphere Thrombozytenzahlen anstiegen (Tsukada et al., 1990). Dies ging einher mit erhöhten CFU-Meg (Colony-forming-unit-Megakaryozyten)-Zahlen im Knochenmark. Bei CFU-Meg handelt es sich um thrombozytäre Vorläuferzellen. Die alleinige Gabe von EPO ohne Splenektomie erhöhte weder Thrombozytenzahlen noch die Anzahl von deren Vorläuferzellen im Knochenmark. Daraus wurde geschlossen, dass die Gabe von EPO in Kombination mit einer Splenektomie zu einer Stimulation der medullären Thrombopoese führt. Neben der verstärkten Bildung könnte auch ein verminderter Abbau zur Erhöhung der Thrombozytenzahlen geführt haben. Eine andere Ursache könnte also auch der Wegfall der Milz als Abbauorgan für Thrombozyten sein. Dies wirkt sich bei der Tg(Epo)-Maus bedingt durch die Splenomegalie vermutlich besonders stark aus und hat

daher nur bei Tg(Epo)-Tieren einen messbaren Effekt. Das Milzgewicht der Tg(Epo)-Maus ist fünffach erhöht (Vogel et al., 2003). Damit geht wahrscheinlich auch eine Funktionsverstärkung in Form von Sequestrierung und Degradation von Thrombozyten einher (Hypersplenismus). Die Beeinflussung der Thrombozytenzahlen in der Tg(Epo)-Maus wäre in dem Fall kein direkter EPO-Effekt. Zur Abklärung, ob es sich bei der Erhöhung der Thrombozytenzahlen in der Tg(Epo)-Maus nach Splenektomie um eine Verminderung des Abbaus oder um eine Splenektomie-bedingte Förderung der Thrombopoese handelt, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Histologische Untersuchungen der Milz durch Anfärbung mit spezifischen Markern für Thrombozyten, wie zum Beispiel CD42, könnten weiteren Aufschluss geben. Die erhöhten Thrombozytenzahlen bei gesunden Probanden, denen EPO verabreicht wurde, (Stohlawetz et al., 2000) und bei thrombozytopenischen Leberzirrhosepatienten und chronisch niereninsuffizienten Patienten unter EPO-Therapie (Homoncik et al., 2004, Eschbach et al., 1989, Kaupke et al., 1993) werden mit einem Effekt von EPO auf Megakaryozyten im Knochenmark erklärt. Die Ursache für die abweichenden Verhältnisse in Mensch und Maus könnten in unterschiedlichen EPO-Konzentrationen und Hämatokritwerten begründet sein.

Alles in allem konnte, wie erwartet, gezeigt werden, dass der Hämatokrit der Tg(Epo)-Maus nach Splenektomie sinkt. Eine Absenkung auf WT(Epo)-Niveau wurde nicht erreicht. Dies deutet auf eine Abmilderung der hämatopoetischen EPO-Wirkung hin. Nach Splenektomie ist also neben der nicht-hämatopoetischen EPO-Wirkung auch weiterhin eine Stimulation der Hämatopoese zu erwarten. Die Maus ist somit geeignet als Modell für den anämischen Patienten, der zur Steigerung des Hämatokrits EPO erhält.

3. Der Einfluss von EPO auf Arteriosklerose

Die eigenen Untersuchungen haben ergeben, dass EPO keinen Einfluss auf das Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen zu haben scheint. Sowohl die absolute als auch die relative Plaquerfläche in der Aorta zwischen Aortenbogen bis zur Abzweigung der A. renalis sin. lag bei ApoE^{-/-};Tg(Epo)- und ApoE^{-/-};WT(Epo)-Mäusen in einer vergleichbaren Größenordnung. Eine Förderung der Arterioskleroseprogression unter dem Einfluss von EPO, wie sie in der

Literatur für Mensch und Maus beschrieben wird (Tous et al., 2004, Rahn et al., 2000), konnte demnach nicht nachgewiesen werden.

Während das Ausmaß der Läsionen durch EPO unbeeinflusst zu sein scheint, ist es die Plaquelokalisation nicht. Im Bereich des Aortenursprungs und in der Aorta descendens zwischen den Abgängen von der A. subclavia sinistra und der A. renalis sinistra verstärkte EPO atherosklerotische Läsionen. Im Aortensinus wurde in der ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus eine im Mittel um 43,45% vergrößerte Plauefläche festgestellt, in der Aorta descendens war die absolute Plauefläche sogar um 273,17% vergrößert. Im Aortenbogen hingegen traten unter EPO-Wirkung im Mittel um 60,49% kleinere Läsionen auf. Die ermittelte Effektgröße, welche für den Aortenursprung, den Aortenbogen und die Aorta descendens vom Betrag her jeweils größer als 1 ist, kann somit als starker Effekt des EPOs gedeutet werden. Die in der ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus vorgefundenen Verhältnisse entsprechen den Beschreibungen der Literatur. Es ist bekannt, dass Endothelzellen in Gefäßbereichen mit laminarer Strömung vor Arteriosklerose geschützt sind, während im Bereich turbulenter Strömungen an Gefäßbiegungen und Gefäßverzweigungen verstärkt Arteriosklerose auftritt (Zaragoza et al., 2012). EPO kehrt die Verhältnisse also um. Einerseits könnte es sich um eine direkte Wirkung des Erythropoetins auf Endothelzellen handeln. Das würde eine ungleichmäßige Verteilung von EPO-R in der Aorta beziehungsweise eine lokalisationsabhängige schwankende Ansprechbarkeit der Rezeptoren bedeuten. Andererseits könnte auch der erhöhte Hämatokrit als indirekte Wirkung des Erythropoetins an der Läsionsausbildung beteiligt gewesen sein. Trotz Splenektomie war der Hämatokrit bei der ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus um 88,1% erhöht im Vergleich zum Hämatokrit der ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus. Ein Cohen's d-Wert von 10,47 unterstreicht den sehr starken Effekt von EPO auf den Hämatokrit. Während bei der ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus 67 Tage nach Splenektomie ein durchschnittlicher Hämatokrit von 0,42±0,04 l/l beobachtet wurde, wurde bei den ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Tieren ein Hämatokrit von 0,79±0,03 l/l festgestellt. Die fehlende Absenkung des Hämatokrits trotz Wegfall der extramedullären Erythropoese könnte auf eine kompensatorisch gesteigerte medulläre Erythropoese zurückzuführen sein. Der starke Effekt von Epo auf die Retikulozytenzahlen auch nach Splenektomie, welcher sich in einem Cohen's d-Wert von 2,11 zeigt, stützt diese Hypothese. Ein erhöhter Hämatokrit geht mit einer verminderten Scherspannung und einer vermehrt turbulenten Strömung einher. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen von Tous et al. wider, die einen erhöhten Hämatokrit in der ApoE^{-/-}-Maus mit einer gesteigerten

Arteriosklerose assoziieren (Tous et al., 2004). Die eigenen Ergebnisse entsprechen dem allerdings nicht, da insgesamt keine Vergrößerung der Läsionen festgestellt werden konnte. Diese Diskrepanz könnte in unterschiedlichen betrachteten Gefäßabschnitten begründet sein. Tous et al. haben den Aortensinus histologisch durch Anfärbung mit Sudan IV untersucht. Den Beobachtungen von Tous et al. entsprechend, konnte bei der vorliegenden Analyse des Aortenursprungs eine signifikant vergrößerte Plauefläche bei der ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Maus im Vergleich zur ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus festgestellt werden. Da außerdem intraindividuell von keiner Hämatokritschwankung auszugehen ist, erscheint eine Beeinflussung der Läsionslokalisierung durch den erhöhten Hämatokrit als unwahrscheinlich. Um den hämatopoetischen Effekt und damit den erhöhten Hämatokrit als Ursache auszuschließen, könnte in zukünftigen Forschungsarbeiten der Einfluss von nicht-hämatopoetischen EPO-Analoga auf die Lokalisation atherosklerotischer Läsionen untersucht werden. Es gibt zwar Untersuchungen, die den Einfluss von Darbepoetin- α auf die Arteriosklerose in der ApoE^{-/-} Maus beleuchten, jedoch wurde in diesen die Läsionslokalisierung nicht untersucht (Arend et al., 2014). In Analogie zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde dabei kein Einfluss des EPO-Analogons auf das Ausmaß der Läsionen erkannt.

Die vorliegenden Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Thrombozytenzahlen im Blut von atherosklerotischen ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-};WT(Epo)-Mäusen verringert sind. Um dies zu verifizieren, sind weiterführende Untersuchungen mit größeren Stichprobenumfängen erforderlich. Allerdings ist zu bedenken, dass es sich bei den Tieren dieser Versuchsgruppe um Doppelmutanten handelt, die neben der EPO-Überexpression durch Fehlen des Apolipoproteins E auch durch atherosklerotische Läsionen gekennzeichnet sind. Somit ist auch ein Zusammenspiel zwischen dem fehlenden Lipoprotein und der Überexpression von humanem EPO als Ursache für verminderte Thrombozytenzahlen denkbar.

Neben der eigentlichen Senkung des Hämatokrits hat die Splenektomie einen weiteren beschriebenen Effekt, welcher sich in den vorliegenden Untersuchungen als nützlich erwiesen haben könnte. Rezende et al. konnten nachweisen, dass durch Splenektomie atherosklerotische Läsionen in der Maus verstärkt werden (Rezende et al., 2011). Ferner wurde ein weiterer beschriebener Verstärker der Arteriosklerosebildung in den vorliegenden Untersuchungen genutzt. Bei dem C57Bl/6-Stamm wurde im Vergleich zu anderen

Mausstämmen, wie dem FVB-Stamm, eine beschleunigte und verstärkte Arteriosklerosebildung festgestellt (Jawien et al., 2004). Auch der C57Bl/6-Hintergrundstamm der verwendeten ApoE^{-/-};Tg(Epo)- und der ApoE^{-/-};WT(Epo)-Maus fungierten somit als Verstärker. Vor allem im Hinblick auf den Tierschutz durch Verkürzung des Versuchszeitraums erscheinen die Splenektomie und der C57Bl/6-Hintergrundstamm als sinnvolle Umstände.

Wichtige inflammatorische Aspekte der Plaquebildung sind die Rekrutierung von Monozyten aus der Zirkulation in die Gefäßwand, deren Differenzierung in Makrophagen und dendritische Zellen und die Transformation in Schaumzellen. In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Plaquemorphologie nicht beleuchtet. Eine Möglichkeit, die Beeinflussung der Monozyten- und Makrophagenbeteiligung zu untersuchen, wäre der Einsatz immunhistochemischer Methoden. Dazu könnten atherosklerotische Läsionen mit Markern für myeloische Zellen, wie CD11b, oder Makrophagenmarkern, wie zum Beispiel F4/80, angefärbt und analysiert werden. Auch mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen atherosklerotischer Läsionen durch Anfärbung mit fluoreszenzgekoppelten Oberflächenmarkern könnte der inflammatorische Status der Plaques näher beschrieben werden.

Zusammenfassend hat EPO keinen Effekt auf das Ausmaß der Arteriosklerose in diesem Modell. Die unter der EPO-Therapie veränderte Plaquelokalisation wird als Nebenbefund gedeutet, da mit Verschiebung der Lokalisation keine Verschlimmerung des Krankheitsbildes verbunden ist. Übertragen auf den anämischen Patienten unter dauerhafter EPO-Therapie bedeuten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Einsatz von EPO im Hinblick auf das Ausmaß der Läsionen bedenkenlos zu sein scheint. Um Aussagen bezüglich des EPO-Einflusses auf eine mögliche Verzögerung oder Beschleunigung der Arterioskleroseprogression treffen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

4. Einfluss von EPO auf arterielles Remodeling

Die Neointima-Media-Ratio ist ein gängiges Maß, um vaskuläres Remodeling nach Gefäßverletzung zu quantifizieren. Gemäß den Beobachtungen von Beohar et al. (Beohar et al., 2004) wurde im Vorhinein die Vermutung aufgestellt, dass EPO die Neointimahyperplasie vermindert und dass es durch seine antiapoptotische Potenz, die Apoptose von glatten Muskelzellen in der Tunica media abmildert. Die antiapoptotische Potenz wird, wie eingangs beschrieben, durch nicht-hämatopoetisches EPO-Rezeptor-Signaling vermittelt. Resultierend aus einer verminderten Neointima und einer vergrößerten Media wurde demnach eine verminderte Neointima-Media-Ratio unter dem Einfluss von EPO erwartet.

Die vorliegenden Untersuchungen geben deutliche Hinweise darauf, dass die Tunica media der Tg(Epo)-Maus 3 Wochen nach Endothelzelldenudation breiter ist als die der WT(Epo)-Maus. Durchschnittlich war die Tunica media in der Tg(Epo)-Maus um 22,68% größer als in der WT(Epo)-Maus. Ein Cohen's d-Wert in Höhe von 1,46 lässt einen starken Effekt des EPOs vermuten. Weitere Untersuchungen mit größeren Stichprobenumfängen sind allerdings erforderlich, um die Verbreiterung der Tunica media unter dem Einfluss von EPO zu bestätigen. Auch zur Beurteilung des Einflusses von EPO auf die Neointimafläche sind größere Tierzahlen notwendig. In dieser Studie zeichnet sich ab, dass EPO, wie im Vorhinein vermutet, die Neointimafläche vermindert. Ein Cohen's d-Wert von -0,75 lässt dabei einen mittelstarken bis starken EPO-Effekt vermuten. Zusätzlich bekräftigt die im Mittel um 15,01% kleinere Neointimafläche bei der Tg(Epo)-Maus im Vergleich zur WT(Epo)-Maus den Neointima-hemmenden EPO-Effekt. Setzt man die Neointimafläche mit der Fläche der Media ins Verhältnis, so zeigt sich insgesamt die Tendenz zu einer verminderten Neointima-Media-Ratio bei der Tg(Epo)-Maus. Im Mittel ist die Ratio der Tg(Epo)-Maus 32,21% niedriger als die der WT(Epo)-Maus. Dies ist assoziiert mit einem starken Effekt des EPOs, welcher sich in einem Cohen's d-Wert von -1,49 widerspiegelt. Die Höhe der berechneten Effekte und die p-Werte weisen darauf hin, dass die verminderte Neointima-Media-Ratio im Wesentlichen auf eine Verbreiterung der Media zurückzuführen ist. Alles in allem sind jedoch weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen erforderlich, um die in dieser Orientierungsstudie gefundenen Effekte zu verifizieren.

In der Literatur wird der Einfluss von EPO auf vaskuläres Remodeling kontrovers diskutiert.

Andere Autoren haben Gefäßumbauprozesse zum Beispiel durch eine Drahtverletzung oder Ligatur der A. carotis communis initiiert. Beide Versuchsansätze wurden in WT-Tieren durchgeführt, denen EPO appliziert worden ist. Die Drahtverletzung führt zu einer abgeschwächten Mediaflächenzunahme in der EPO-Gruppe (d'Uscio et al., 2007). Die Ligatur unter dem Einfluss von EPO bewirkt eine verstärkte Neointimabildung (Janmaat et al., 2010). Diese beiden Ergebnisse entsprechen nicht dem, was bei eigenen Untersuchungen herausgestellt werden konnte. Die lokal abweichenden anatomischen und physiologischen Bedingungen, die unterschiedliche Methodik zum Auslösen des Remodelings, die verwendeten Mauslinien, die Dynamik der EPO-Plasmakonzentrationen sowie die EPO-Expositionsdauer - all das könnte Abweichungen der Pathogenese nach sich gezogen haben, sodass sich eine Vergleichbarkeit mit eigenen Ergebnissen als schwierig gestaltet.

Lediglich Urao et al. untersuchen das Remodeling nach Drahtverletzung der A. femoralis communis (Urao et al., 2006). Anstelle einer langfristigen EPO-Verabreichung findet eine kurzzeitige EPO-Gabe statt. Die Gabe erfolgte direkt post Verletzung und an Tag 1 und 2 nach Verletzung (jeweils 1000IU/kg, i.p.). Die Tiere wurden 2 Wochen nach der Schädigung geopfert. Ergebnis ist eine signifikant verminderte Neointima-Media-Ratio unter dem Einfluss von EPO, welche auf eine verminderte Neointimafläche zurückgeführt wird. Insgesamt verhindert die kurzzeitige Gabe also eine Verdickung der Gefäßwand und ist als protektiv im Hinblick auf die Stenosierung zu werten.

Die hämatologischen Analysen haben einen starken EPO-Effekt auf den Hämatokrit, die Thrombozyten- und Gesamtleukozytenzahlen sowie auf die Anteile von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten herausgestellt. Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch lediglich beim Hämatokrit und der Gesamtleukozytenzahl, welche bei der Tg(Epo)-Maus beide erhöht waren. Wie bereits erörtert, ist in der Tg(Epo)-Maus auch nach Wegfall der extramedullären lienalen Erythropoese von einer medullären Hämatopoieseförderung durch EPO auszugehen. Eine Beeinflussung von leukozytären Vorläuferzellen durch EPO ist bisher nicht beschrieben, dies gilt es weiter zu untersuchen. Im Gegensatz zu den hämatologischen Untersuchungen nach Splenektomie (Zielsetzung 1), wo nach Splenektomie bloß ein geringer Effekt des EPOs auf Thrombozytenzahlen beobachtet wurde (Cohen's d-Wert=0,1), war in der Femoralis-Drahtverletzungsgruppe trotz Splenektomie ein starker Effekt des EPOs auf Thrombozytenzahlen festzustellen. Dies äußerte sich in einem Cohen's d-Wert in Höhe von - 0,8. Ursächlich könnte einerseits der unterschiedliche Abstand zwischen Splenektomie und

Blutentnahme sein, welcher in der Versuchsgruppe für die hämatologischen Untersuchungen durchschnittlich 24,9 Wochen betrug, während er sich bei der Femoralis-Drahtverletzungsgruppe auf 4 Wochen belief. Andererseits könnte auch der Eingriff der Gefäßverletzung an sich oder das anschließende Remodeling die abweichenden Thrombozytenzahlen bedingen. Histologische Untersuchungen geschädigter Gefäße im Hinblick auf eine möglicherweise gesteigerte Thrombozytenaggregation oder auch eine weitere Verlängerung der Zeitspanne zwischen Splenektomie und Schädigung der Femoralarterie könnten eventuell Aufschluss über die Ursache geben.

Die verminderte Neointima-Media-Ratio in der Tg(Epo)-Maus ist begründet in einer verringerten Neointimadicke, maßgeblich jedoch in einer verbreiterten Media. Im Gegensatz zum Mausmodell mit kurzzeitiger EPO-Wirkung bedeutet das eine Wandverdickung. Die Verbreiterung der Gefäßwand führt zu einer Einengung des Lumens und ist demnach als negatives Remodeling anzusprechen. Die Wirkung der langfristigen EPO-Exposition in der Tg(Epo)-Maus ist also als stenose- beziehungsweise restenosefördernd zu werten. Übertragen auf den anämischen Patienten unter EPO-Therapie bedeutet dies, dass das Risiko für Stenosen beziehungsweise Restenosen nach Angioplastien, Atherektomien, Bypass-Operationen, Transplantationen und Stentimplantationen erhöht sein könnte. Im Rahmen von gefäßchirurgischen Eingriffen bei anämischen Patienten könnte das kurzzeitige Absetzen der EPO-Therapie demnach eine Option sein, um nachteilige EPO-Wirkungen zu umgehen.

5. Der Einfluss von EPO auf die arterielle Thrombose

Es wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, dass in der Tg(Epo)-Maus durch den höheren Hämatokrit und die in der Literatur beschriebene gesteigerte Thrombozytenaktivität beim Menschen unter EPO-Therapie (Stohlawetz et al., 2000) kürzere arterielle Verschlusszeiten vorliegen als in der WT(Epo)-Maus.

Die veränderte Zusammensetzung des Blutes ist einer der 3 Hauptgründe für Thrombosen, die die Virchow-Trias benennt. Der gesteigerte Hämatokrit der Tg(Epo)-Maus ist verbunden mit einer vierfach höheren Blutviskosität als in der WT(Epo)-Maus (Frietsch et al., 2007b).

Der Hypothese und den Angaben der Literatur entsprechend war der Hämatokrit der Tg(Epo)-Maus eine Woche post Splenektomie mit durchschnittlich 0,82 l/l höher als der der WT(Epo)-Maus, bei der der Hämatokrit zu diesem Zeitpunkt im Mittel 0,51 l/l betrug. Dies entspricht einem um 60,78% erhöhten Hämatokrit bei der Tg(Epo)-Maus. Wie erwähnt, kann der Hämatokrit durch Splenektomie nicht vollständig auf WT(Epo)-Niveau gesenkt werden. Aufgrund der Zeitspanne von lediglich einer Woche zwischen Splenektomie und der Induktion der arteriellen Thrombose war zudem keine maximale Absenkung des Hämatokrits möglich. Dies liegt begründet in der Lebensdauer der murinen Erythrozyten. Bei der WT(Epo)-Maus beträgt diese etwa 60 Tage, während die Erythrozyten der Tg(Epo)-Maus nur etwa 20 Tage alt werden (Bogdanova et al., 2007). Eine Woche nach der Splenektomie ist ein Großteil der in der Milz produzierten Erythrozyten, die in die Zirkulation abgegeben worden sind, noch nicht abgebaut worden und schlägt sich somit auch weiterhin noch im Hämatokrit nieder. Dies erklärt auch den Cohen's d-Wert des Hämatokrits in Höhe von 6,16, was als sehr starker EPO-Effekt auf den Hämatokrit interpretiert werden kann. Das Fehlen spontaner Thrombembolien in dem Tg(Epo)-Mausmodell (Heinicke et al., 2006) trotz einer stark ausgeprägten Hämatokriterhöhung deutet auf die Effizienz der Adaptationsmechanismen hin. Der Cohen's d-Wert für Retikulozytenzahlen in Höhe von 1,97 legt dar, dass der EPO-Effekt auf Retikulozyten nach Induktion der arteriellen Thrombose trotz fehlender Milz stark ist. Außerdem waren signifikant erhöhte Retikulozytenwerte in der Tg(Epo)-Maus detektierbar. Beides ist vermutlich auf eine kompensatorische Erythropoese im Knochenmark zurückzuführen, welche die weggefallene lienale Erythrozytenproduktion ersetzen soll. Weiterhin fällt auf, dass die Thrombozytenzahlen von WT(Epo)- und Tg(Epo)-Tieren nach Induktion der arteriellen Thrombose in einer vergleichbaren Größenordnung liegen. Ursache hierfür könnte, wie bereits bei der Analyse der hämatologischen Parameter (Zielsetzung 1) erwähnt, der Wegfall der Milz als Sequestrationsorgan oder die mit der Splenektomie einhergehende Thrombopoese-förderung durch EPO sein. Entgegen der Annahme, dass durch die Gabe von EPO Thrombozyten stimuliert werden, wurde bei der durchflusszytometrischen in vitro Analyse ein signifikant verminderter Anteil aktivierter Thrombozyten bei der Tg(Epo)-Maus gemessen. Dies zeigte sich sowohl bei Stimulation durch CRP als auch bei der Par4-getriggerten Aktivierung. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Untersuchungen am Menschen, wo nach Applikation von EPO ein erhöhter Anteil aktivierter Thrombozyten im Blut festgestellt wurde (Stohlawetz et al., 2000,

Homoncik et al., 2004). Auch in Mausexperimenten konnte eine erhöhte Aktivität von Thrombozyten unter dem Einfluss von EPO nachgewiesen werden (Kirkeby et al., 2008). Im Gegensatz zum Tg(Epo)-Mausmodell erhielten die Mäuse eine kurzzeitige, hoch dosierte EPO-Therapie. Es wurden über 3 Tage täglich 50 µg/kg EPO verabreicht. Im Hinblick auf die Tatsache, dass Retikulozyten 3 bis 4 Tage bis zur Ausreifung zu Erythrozyten brauchen, ist direkt nach der kurzzeitigen EPO-Gabe von keinem relevanten Anstieg des Hämatokrits auszugehen. Wie erwähnt, wird beim Menschen EPO bis zum Erreichen eines Hämoglobin-Zielwertes dosiert. Der stark erhöhte Hämatokrit in der Tg(Epo)-Maus könnte mit der Messung der Thrombozytenreaktivität interferiert haben. Die Hämatokritabhängigkeit der Thrombozytenaktivitätsmessung ist in der Literatur beschrieben (Kim et al., 2014, Pendyala et al., 2014). Es ist bekannt, dass die Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Thrombosen spielen. Über von-Willebrand-Faktor vermittelt adhären sie am Stratum subendotheliale und bewirken so einen Verschluss von Gefäßläsionen. Die verminderte Thrombozytenaktivität unter EPO-Einfluss stellt demnach einen Schutz vor Thrombose dar.

Bei der Betrachtung der Effektstärken von Gesamtleukozytenzahlen und dem Neutrophilen- und Monozytenanteil fallen starke EPO-Effekte ins Auge. Zudem waren bei der Tg(Epo)-Maus signifikant erhöhte Gesamtleukozytenzahlen nachweisbar. Dies zeigt abermals, dass eine Beeinflussung leukozytärer Vorläuferzellen durch EPO nicht ausgeschlossen werden kann.

Ein weiterer Punkt der Virchow-Trias sind Endothelzellalterationen. Ogunshola et al. konnten morphologische Abweichungen in Gehirngefäßen von Tg(Epo)-Mäusen in Form von luminalen Protrusionen nachweisen (Ogunshola et al., 2006). Da im Rahmen der eigenen Untersuchungen keine histologischen Analysen von ungeschädigten Gefäßen durchgeführt wurden, kann keine Aussage über den Phänotyp von Endothelzellen getroffen werden.

Der letzte Punkt der Virchow-Trias sind Veränderungen der Blutflussgeschwindigkeit. Veränderungen der Blutflussgeschwindigkeit sind vor allem dort zu erwarten, wo Turbulenzen auftreten. Turbulenzen sind vornehmlich an Bifurkationen, Abzweigungen, Aussackungen und Einengungen des Lumens zu beobachten. Da Thrombosen jedoch nicht spontan auftraten, sondern bei allen Tieren an der gleichen Lokalisation induziert wurden, ist es nicht sinnvoll, diesen Punkt zu betrachten.

Die Analyse der Thromboseursachen laut Virchow-Trias deutet auf einen eher prothrombotischen Zustand in der Tg(Epo)-Maus hin. Tatsächlich wurden aber arterielle

Verschlusszeiten vergleichbarer Größenordnung bei den beiden Genotypen festgestellt. Vermutlich war ein derzeit nicht bekannter schützender Effekt durch nicht-hämatopoetisches EPO-R-Signaling daran beteiligt. Dafür sprechen auch die Ergebnisse einer Untersuchung von Bohr et al., die durch nicht-hämatopoetisches EPO-Signaling in der Maus das Auftreten von mikrovaskulären Thrombosen im Rahmen von Hautverbrennungen verhindern konnten (Bohr et al., 2013). Da bei den eigenen Untersuchungen neben dem nicht-hämatopoetischen Signaling auch hämatopoetisches Signaling von Bedeutung war, könnte ein protektiver nicht-hämatopoetischer EPO-Effekt von dem hämatopoetischen prothrombotischen Effekt ausgeglichen worden sein.

Es ist weiterhin zu beachten, dass die Splenektomie einen Einfluss auf das Auftreten der Thrombose gehabt haben könnte. In einem Mausmodell der venösen Thrombose nach Splenektomie konnte gezeigt werden, dass in der splenektomierten Gruppe initial die Thrombusbildung verstärkt war und dass dieser eine verzögerte Rückbildung des Thrombus folgte (Frey et al., 2014). Da jedoch in den vorliegenden Untersuchungen beide Gruppen splenektomiert wurden, und nicht die venöse, sondern die arterielle Thrombose beleuchtet wurde, ist eine Vergleichbarkeit der Tg(Epo)-Tiere mit den WT(Epo)-Mäusen gegeben.

Alles in allem scheint EPO trotz stark ausgeprägter Förderung der Erythropoese und entgegen der anfänglich postulierten Hypothese keine prothrombotische Funktion in der Maus auszuüben. Überträgt man die Ergebnisse auf den Patienten, so sollte die dauerhafte EPO-Therapie nicht mit einem erhöhten Thromboserisiko in Verbindung stehen. Es gilt dabei jedoch zu beachten, dass beim Menschen, im Gegensatz zur gesunden Maus, Begleiterkrankungen, wie zum Beispiel Arteriosklerose, an der Entstehung von Thrombosen beteiligt sein könnten.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer dauerhaften Exposition mit humanem Erythropoetin (EPO) auf arterielle Erkrankungen untersucht. Ziel war es, hämatopoetische und nicht-hämatopoetische Effekte auf das vaskuläre System zu detektieren und daraus protektive Effekte und möglicherweise unerwünschte Nebenwirkungen für den anämischen EPO-Patienten abzuleiten. Die Tg(Epo)-Maus, welche humanes EPO sauerstoffunabhängig überexprimiert, wurde dafür als Modell verwendet. Es wurden 3 Krankheitsbilder näher betrachtet. ApoE^{-/-};Tg(Epo)-Mäuse dienten zur Beurteilung von Arteriosklerose, durch Drahtverletzung der A. femoralis comm. wurde arterielles Remodeling ausgelöst und mittels Eisen-3-Chlorid wurde eine arterielle Thrombose in der A. carotis comm. induziert.

Das Ausmaß atherosklerotischer Plaques bei ApoE^{-/-};Tg(Epo)- und ApoE^{-/-};WT(Epo)-Tieren lag in einer ähnlichen Größenordnung. Während ApoE^{-/-};WT(Epo) vornehmlich Läsionen im Aortenbogen entwickelten, zeigten sich die Plaques bei ApoE^{-/-};Tg(Epo) im Bereich der Aortenursprünge und in der Aorta descendens. Es wird vermutet, dass eine ungleichmäßige Verteilung beziehungsweise Ansprechbarkeit von EPO-R in der Aorta die abweichende Plaquelokalisation bedingt.

Die Drahtverletzung der A. femoralis ergab Hinweise auf eine größere Media und eine kleinere Neointima-Media-Ratio bei der Tg(Epo)-Maus. Verantwortlich ist dafür wahrscheinlich ein antiapoptotischer Effekt auf die glatten Muskelzellen der Media.

Die Okklusionszeiten nach Eisen-3-Chlorid-Verletzung der A. carotis comm. bei Tg(Epo)- und WT(Epo)-Mäusen waren vergleichbar. Als Ursache wird das Zusammenspiel der erhöhten Blutviskosität mit einem derzeit nicht bekannten, nicht-hämatopoetischen Effekt vermutet. Zudem deutet eine verminderte Thrombozytenaktivierbarkeit bei der Tg(Epo)-Maus auf einen Schutz vor Thrombose hin.

Es konnte gezeigt werden, dass die langfristige EPO-Wirkung keine nachteiligen Effekte auf Arteriosklerose und arterielle Thrombose ausübt. Arteriell Remodeling betreffend, scheint EPO die mediale Hyperplasie zu fördern und somit das Stenose- beziehungsweise Restenoserisiko zu erhöhen.

VIII. SUMMARY

This dissertation examined the influence of long term exposure to human erythropoietin (EPO) on various arterial diseases. The aim was to determine the hematopoietic and non-hematopoietic effects for evaluation of advantageous or possibly disadvantageous effects for anaemic patients in EPO therapy. Therefore the Tg(Epo) mouse strain served as model organism, as it overexpresses human EPO independently from oxygen levels.

Three major areas were investigated. Atherosclerosis was studied in ApoE^{-/-};Tg(Epo) mice, arterial remodeling was initiated by wire injury of the common femoral artery and arterial thrombosis was induced through ferric chloride injury of the common carotid artery.

The examination of the extent of atherosclerotic lesions showed comparable results between ApoE^{-/-};Tg(Epo) and ApoE^{-/-};WT(Epo) mice. While lesions in ApoE^{-/-};WT(Epo) mice mainly developed in the aortic arch, lesions in ApoE^{-/-};Tg(Epo) were located in the aortic sinus and the descending aorta between the branching of the left subclavian artery and the left renal artery. The formation of plaques is suspectedly caused by uneven distribution and responsiveness of EPO-R within the aorta.

Resulting from the wire injury Tg(Epo) mice showed hints of enlargement of the tunica media and of a reduced neointima-media-ratio. This observation is likely to be an antiapoptotic effect of EPO on medial smooth muscle cells.

Inspecting occlusion times of arteries, a similar range in Tg(Epo)- and WT(Epo) animals was observed. An interaction among increased blood viscosity and a yet unknown non-hematopoietic effect of EPO in Tg(Epo) might be causal. Flow cytometric measurements revealed a reduced platelet activity in Tg(Epo) mice, which might be protective in regard to thrombosis.

In this study we were able to show that long term EPO doesn't exert neither advantageous nor disadvantageous effects on atherosclerosis and arterial thrombosis. Regarding arterial remodeling EPO seems to aggravate restenosis and stenosis through enhancement of media formation.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) AGORAM, B., AOKI, K., DOSHI, S., GEGG, C., JANG, G., MOLINEUX, G., NARHI, L. & ELLIOTT, S. 2009. Investigation of the effects of altered receptor binding activity on the clearance of erythropoiesis-stimulating proteins: Nonerythropoietin receptor-mediated pathways may play a major role. *J Pharm Sci*, 98, 2198-211.
- (2) AMENTO, E. P., EHSANI, N., PALMER, H. & LIBBY, P. 1991. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*, 11, 1223-30.
- (3) AMMARGUELLAT, F., GOGUSEV, J. & DRUEKE, T. B. 1996. Direct effect of erythropoietin on rat vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. *Nephrol Dial Transplant*, 11, 687-92.
- (4) ANAGNOSTOU, A., LIU, Z., STEINER, M., CHIN, K., LEE, E. S., KESSIMIAN, N. & NOGUCHI, C. T. 1994. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 3974-8.
- (5) ANDRATSCHKE, N., SCHNAITER, A., WEBER, W. A., CAI, L., SCHILL, S., WIEDENMANN, N., SCHWAIGER, M., MOLLS, M. & NIEDER, C. 2006. Preclinical evaluation of erythropoietin administration in a model of radiation-induced kidney dysfunction. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 64, 1513-8.
- (6) AREND, N., HILGERS, K. F., CAMPEAN, V., KARPE, B., CORDASIC, N., KLANKE, B. & AMANN, K. 2014. Darbepoetin alpha reduces oxidative stress and chronic inflammation in atherosclerotic lesions of apo E deficient mice in experimental renal failure. *PLoS One*, 9, e88601.
- (7) AVNEON, M., LIFSHITZ, L., KATZ, O., PRUTCHI-SAGIV, S., GASSMANN, M., MITTELMAN, M. & NEUMANN, D. 2009. Non-erythroid effects of erythropoietin: are neutrophils a target? *Leuk Res*, 33, 1430-2.

- (8) BAHLMANN, F. H., DE GROOT, K., SPANDAU, J. M., LANDRY, A. L., HERTEL, B., DUCKERT, T., BOEHM, S. M., MENNE, J., HALLER, H. & FLISER, D. 2004. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*, 103, 921-6.
- (9) BAZAN, J. F. 1989. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun*, 164, 788-95.
- (10) BAZAN, J. F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6934-8.
- (11) BELESLIN-COKIC, B. B., COKIC, V. P., YU, X., WEKSLER, B. B., SCHECHTER, A. N. & NOGUCHI, C. T. 2004. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood*, 104, 2073-80.
- (12) BENNETT, C. L., LUMINARI, S., NISSENSON, A. R., TALLMAN, M. S., KLINGE, S. A., MCWILLIAMS, N., MCKOY, J. M., KIM, B., LYONS, E. A., TRIFILIO, S. M., RAISCH, D. W., EVENS, A. M., KUZEL, T. M., SCHUMOCK, G. T., BELKNAP, S. M., LOCATELLI, F., ROSSERT, J. & CASADEVALL, N. 2004. Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N Engl J Med*, 351, 1403-8.
- (13) BENTZON, J. F., OTSUKA, F., VIRMANI, R. & FALK, E. 2014. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*, 114, 1852-66.
- (14) BEOHAR, N., FLAHERTY, J. D., DAVIDSON, C. J., MAYNARD, R. C., ROBBINS, J. D., SHAH, A. P., CHOI, J. W., MACDONALD, L. A., JORGENSEN, J. P., PINTO, J. V., CHANDRA, S., KLAUS, H. M., WANG, N. C., HARRIS, K. R., DECKER, R. & BONOW, R. O. 2004. Antirestenotic effects of a locally delivered caspase inhibitor in a balloon injury model. *Circulation*, 109, 108-13.
- (15) BESARAB, A., BOLTON, W. K., BROWNE, J. K., EGRIE, J. C., NISSENSON, A. R., OKAMOTO, D. M., SCHWAB, S. J. & GOODKIN, D. A. 1998. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin.

- N Engl J Med*, 339, 584-90.
- (16) BOGDANOVA, A., MIHOV, D., LUTZ, H., SAAM, B., GASSMANN, M. & VOGEL, J. 2007. Enhanced erythro-phagocytosis in polycythemic mice overexpressing erythropoietin. *Blood*, 110, 762-9.
- (17) BOHLIUS, J., WILSON, J., SEIDENFELD, J., PIPER, M., SCHWARZER, G., SANDERCOCK, J., TRELLE, S., WEINGART, O., BAYLISS, S., DJULBEGOVIC, B., BENNETT, C. L., LANGENSIEPEN, S., HYDE, C. & ENGERT, A. 2006. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *J Natl Cancer Inst*, 98, 708-14.
- (18) BOHR, S., PATEL, S. J., SHEN, K., VITALO, A. G., BRINES, M., CERAMI, A., BERTHIAUME, F. & YARMUSH, M. L. 2013. Alternative erythropoietin-mediated signaling prevents secondary microvascular thrombosis and inflammation within cutaneous burns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 3513-8.
- (19) BONTHU, S., HEISTAD, D. D., CHAPPELL, D. A., LAMPING, K. G. & FARACI, F. M. 1997. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17, 2333-40.
- (20) BRINES, M. 2010. The therapeutic potential of erythropoiesis-stimulating agents for tissue protection: a tale of two receptors. *Blood Purif*, 29, 86-92.
- (21) BRINES, M., GRASSO, G., FIORDALISO, F., SFACTERIA, A., GHEZZI, P., FRATELLI, M., LATINI, R., XIE, Q. W., SMART, J., SU-RICK, C. J., POBRE, E., DIAZ, D., GOMEZ, D., HAND, C., COLEMAN, T. & CERAMI, A. 2004. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14907-12.
- (22) BRINES, M. L., GHEZZI, P., KEENAN, S., AGNELLO, D., DE LANEROLLE, N. C., CERAMI, C., ITRI, L. M. & CERAMI, A. 2000.

- Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10526-31.
- (23) BROUDY, V. C., LIN, N., BRICE, M., NAKAMOTO, B. & PAPAYANNOPOULOU, T. 1991. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*, 77, 2583-90.
- (24) BUEMI, M., GALEANO, M., STURIALE, A., IENTILE, R., CRISAFULLI, C., PARISI, A., CATANIA, M., CALAPAI, G., IMPALA, P., ALOISI, C., SQUADRITO, F., ALTAVILLA, D., BITTO, A., TUCCARI, G. & FRISINA, N. 2004. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock*, 22, 169-73.
- (25) BUEMI, M., VACCARO, M., STURIALE, A., GALEANO, M. R., SANSOTTA, C., CAVALLARI, V., FLOCCARI, F., D'AMICO, D., TORRE, V., CALAPAI, G., FRISINA, N., GUARNERI, F. & VERMIGLIO, G. 2002. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta Derm Venereol*, 82, 411-7.
- (26) BUHRER, C., FELDERHOFF-MUESER, U. & WELLMANN, S. 2007. Erythropoietin and ischemic conditioning--why two good things may be bad. *Acta Paediatr*, 96, 787-9.
- (27) CAI, Z., MANALO, D. J., WEI, G., RODRIGUEZ, E. R., FOX-TALBOT, K., LU, H., ZWEIER, J. L. & SEMENZA, G. L. 2003. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 108, 79-85.
- (28) CALLOW, M. J., STOLTZFUS, L. J., LAWN, R. M. & RUBIN, E. M. 1994. Expression of human apolipoprotein B and assembly of lipoprotein(a) in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2130-4.
- (29) CAMENISCH, G., STROKA, D. M., GASSMANN, M. & WENGER, R. H. 2001. Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Pflugers Arch*, 443, 240-9.
- (30) CAMICI, G. G., STALLMACH, T., HERMANN, M., HASSINK, R.,

- DOEVENDANS, P., GRENACHER, B., HIRSCHY, A., VOGEL, J., LUSCHER, T. F., RUSCHITZKA, F. & GASSMANN, M. 2007. Constitutively overexpressed erythropoietin reduces infarct size in a mouse model of permanent coronary artery ligation. *Methods Enzymol*, 435, 147-55.
- (31) CASA, L. D., DEATON, D. H. & KU, D. N. 2015. Role of high shear rate in thrombosis. *J Vasc Surg*, 61, 1068-80.
- (32) CHAMORRO, M. E., WENKER, S. D., VOTA, D. M., VITTORI, D. C. & NESSE, A. B. 2013. Signaling pathways of cell proliferation are involved in the differential effect of erythropoietin and its carbamylated derivative. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 1960-8.
- (33) CHAVEZ-MACGREGOR, M., FANG, S., SROKOWSKI, T. P., HORTOBAGYI, G. N. & GIORDANO, S. H. 2009. Complications associated with erythropoietin stimulating agents (ESAs) in patients with metastatic breast cancer: A surveillance, epidemiology, and end results (SEER)-Medicare study. *J Clin Oncol*, 27, 1034.
- (34) CHEN, S. A., SAWCHUK, R. J., BRUNDAGE, R. C., HORVATH, C., MENDENHALL, H. V., GUNTHER, R. A. & BRAECKMAN, R. A. 2000. Plasma and lymph pharmacokinetics of recombinant human interleukin-2 and polyethylene glycol-modified interleukin-2 in pigs. *J Pharmacol Exp Ther*, 293, 248-59.
- (35) CHEN, S. Y., CRESSMAN, S., MAO, F., SHAO, H., LOW, D. W., BEILAN, H. S., CAGLE, E. N., CARNEVALI, M., GUERIGUIAN, V., KEOGH, P. J., PORTER, H., STRATTON, S. M., WIEDEKE, M. C., SAVATSKI, L., ADAMSON, J. W., BOZZINI, C. E., KUNG, A., KENT, S. B., BRADBURNE, J. A. & KOCHENDOERFER, G. G. 2005. Synthetic erythropoietic proteins: tuning biological performance by site-specific polymer attachment. *Chem Biol*, 12, 371-83.
- (36) CHUNG, A. W., JURASZ, P., HOLLENBERG, M. D. & RADOMSKI, M. W. 2002. Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets. *Br J Pharmacol*, 135, 1123-32.

- (37) CONSTANTINESCU, S. N., KEREN, T., SOCOLOVSKY, M., NAM, H., HENIS, Y. I. & LODISH, H. F. 2001. Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4379-84.
- (38) CORWIN, H. L. 2007. Erythropoietin use in critically ill patients: forest and trees. *Cmaj*, 177, 747-9.
- (39) CORWIN, H. L., GETTINGER, A., FABIAN, T. C., MAY, A., PEARL, R. G., HEARD, S., AN, R., BOWERS, P. J., BURTON, P., KLAUSNER, M. A. & CORWIN, M. J. 2007. Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients. *N Engl J Med*, 357, 965-76.
- (40) D'USCIO, L. V., SMITH, L. A., SANTHANAM, A. V., RICHARDSON, D., NATH, K. A. & KATUSIC, Z. S. 2007. Essential role of endothelial nitric oxide synthase in vascular effects of erythropoietin. *Hypertension*, 49, 1142-8.
- (41) DAY, S. M., REEVE, J. L., MYERS, D. D. & FAY, W. P. 2004. Murine thrombosis models. *Thromb Haemost*, 92, 486-94.
- (42) DEBELJAK, N., SOLAR, P. & SYTKOWSKI, A. J. 2014. Erythropoietin and cancer: the unintended consequences of anemia correction. *Front Immunol*, 5, 563.
- (43) DIAZ, V., GAMMELLA, E., RECALCATI, S., SANTAMBROGIO, P., NALDI, A. M., VOGEL, J., GASSMANN, M. & CAIRO, G. 2013. Liver iron modulates hepcidin expression during chronically elevated erythropoiesis in mice. *Hepatology*, 58, 2122-32.
- (44) DORDAL, M. S., WANG, F. F. & GOLDWASSER, E. 1985. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology*, 116, 2293-9.
- (45) DROBNIK, J., DABROWSKI, R., SZCZEPANOWSKA, A., GIERNAT, L. & LORENC, J. 2000. Response of aorta connective tissue matrix to injury caused by vassopressin-induced hypertension or hypercholesterolemia. *J Physiol Pharmacol*, 51, 521-33.

- (46) DRUEKE, T. B., LOCATELLI, F., CLYNE, N., ECKARDT, K. U., MACDOUGALL, I. C., TSAKIRIS, D., BURGER, H. U. & SCHERHAG, A. 2006. Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N Engl J Med*, 355, 2071-84.
- (47) EBERT, B. L. & BUNN, H. F. 1999. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood*, 94, 1864-77.
- (48) ECKLY, A., HECHLER, B., FREUND, M., ZERR, M., CAZENAVE, J. P., LANZA, F., MANGIN, P. H. & GACHET, C. 2011. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*, 9, 779-89.
- (49) EGRIE, J. C., DWYER, E., BROWNE, J. K., HITZ, A. & LYKOS, M. A. 2003. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Exp Hematol*, 31, 290-9.
- (50) ELLIOTT, S., EGRIE, J., BROWNE, J., LORENZINI, T., BUSSE, L., ROGERS, N. & PONTING, I. 2004. Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp Hematol*, 32, 1146-55.
- (51) ELLIOTT, S., LORENZINI, T., ASHER, S., AOKI, K., BRANKOW, D., BUCK, L., BUSSE, L., CHANG, D., FULLER, J., GRANT, J., HERNDAY, N., HOKUM, M., HU, S., KNUDTEN, A., LEVIN, N., KOMOROWSKI, R., MARTIN, F., NAVARRO, R., OSSLUND, T., ROGERS, G., ROGERS, N., TRAIL, G. & EGRIE, J. 2003. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat Biotechnol*, 21, 414-21.
- (52) ELLIOTT, S., LORENZINI, T., CHANG, D., BARZILAY, J. & DELORME, E. 1997. Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin. *Blood*, 89, 493-502.
- (53) ELLIOTT, S., LORENZINI, T., YANAGIHARA, D., CHANG, D. & ELLIOTT, G. 1996. Activation of the erythropoietin (EPO) receptor by bivalent anti-EPO receptor antibodies. *J Biol Chem*, 271, 24691-7.
- (54) ENGELHARDT, BREVES 2005. *Physiologie der Haustiere*, Medizinverlage Stuttgart.

- (55) ESCHBACH, J. W., ABDULHADI, M. H., BROWNE, J. K., DELANO, B. G., DOWNING, M. R., EGRIE, J. C., EVANS, R. W., FRIEDMAN, E. A., GRABER, S. E., HALEY, N. R. & ET AL. 1989. Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal disease. Results of a phase III multicenter clinical trial. *Ann Intern Med*, 111, 992-1000.
- (56) ESMON, C. T. 2009. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev*, 23, 225-9.
- (57) FAN, Q., LEUTHER, K. K., HOLMES, C. P., FONG, K. L., ZHANG, J., VELKOVSKA, S., CHEN, M. J., MORTENSEN, R. B., LEU, K., GREEN, J. M., SCHATZ, P. J. & WOODBURN, K. W. 2006. Preclinical evaluation of Hematide, a novel erythropoiesis stimulating agent, for the treatment of anemia. *Exp Hematol*, 34, 1303-11.
- (58) FANDREY, J. 2004. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286, R977-88.
- (59) FANDREY, J. & BUNN, H. F. 1993. In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood*, 81, 617-23.
- (60) FOLLER, M., KASINATHAN, R. S., KOKA, S., HUBER, S. M., SCHULER, B., VOGEL, J., GASSMANN, M. & LANG, F. 2007. Enhanced susceptibility to suicidal death of erythrocytes from transgenic mice overexpressing erythropoietin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293, R1127-34.
- (61) FREY, M. K., ALIAS, S., WINTER, M. P., REDWAN, B., STUBIGER, G., PANZENBOECK, A., ALIMOHAMMADI, A., BONDERMAN, D., JAKOWITSCH, J., BERGMEISTER, H., BOCHKOV, V., PREISSNER, K. T. & LANG, I. M. 2014. Splenectomy is modifying the vascular remodeling of thrombosis. *J Am Heart Assoc*, 3, e000772.
- (62) FRIETSCH, T., GASSMANN, M., GROTH, G., WASCHKE, K. F., VOGEL, J., CABRALES, P., VAJKOCZI, P., DORN-BEINEKE, A., INTAGLIETTA, M. & KERGER, H. 2007a. Excessive erythrocytosis does not elevate capillary

- oxygen delivery in subcutaneous mouse tissue. *Microcirculation*, 14, 111-23.
- (63) FRIETSCH, T., MAURER, M. H., VOGEL, J., GASSMANN, M., KUSCHINSKY, W. & WASCHKE, K. F. 2007b. Reduced cerebral blood flow but elevated cerebral glucose metabolic rate in erythropoietin overexpressing transgenic mice with excessive erythrocytosis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 469-76.
- (64) FROSTEGARD, J., ULFGREN, A. K., NYBERG, P., HEDIN, U., SWEDENBORG, J., ANDERSSON, U. & HANSSON, G. K. 1999. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*, 145, 33-43.
- (65) GALEANO, M., ALTAVILLA, D., BITTO, A., MINUTOLI, L., CALO, M., LO CASCIO, P., POLITO, F., GIUGLIANO, G., SQUADRITO, G., MIONI, C., GIULIANI, D., VENUTI, F. S. & SQUADRITO, F. 2006. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit Care Med*, 34, 1139-46.
- (66) GALEANO, M., ALTAVILLA, D., CUCINOTTA, D., RUSSO, G. T., CALO, M., BITTO, A., MARINI, H., MARINI, R., ADAMO, E. B., SEMINARA, P., MINUTOLI, L., TORRE, V. & SQUADRITO, F. 2004. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*, 53, 2509-17.
- (67) GASSMANN, M., MANINI, A., STALLMACH, T., SAAM, B., KUHN, G., GRENACHER, B., BOGDANOVA, A. Y. & VOGEL, J. 2008. Abortion in mice with excessive erythrocytosis is due to impaired arteriogenesis of the uterine arcade. *Biol Reprod*, 78, 1049-57.
- (68) GEORGE, J., GOLDSTEIN, E., ABASHIDZE, A., WEXLER, D., HAMED, S., SHMILOVICH, H., DEUTSCH, V., MILLER, H., KEREN, G. & ROTH, A. 2005. Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner. *Cardiovasc Res*, 68, 299-306.

- (69) GONG, H., WANG, W., KWON, T. H., JONASSEN, T., LI, C., RING, T., FROKI, A. J. & NIELSEN, S. 2004. EPO and alpha-MSH prevent ischemia/reperfusion-induced down-regulation of AQPs and sodium transporters in rat kidney. *Kidney Int*, 66, 683-95.
- (70) GOODSON, R. J. & KATRE, N. V. 1990. Site-directed pegylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site. *Biotechnology (N Y)*, 8, 343-6.
- (71) GRIMM, C., WENZEL, A., GROSZER, M., MAYSER, H., SEELIGER, M., SAMARDZIJA, M., BAUER, C., GASSMANN, M. & REME, C. E. 2002. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med*, 8, 718-24.
- (72) GUNELI, E., CAVDAR, Z., ISLEKEL, H., SARIOGLU, S., ERBAYRAKTAR, S., KIRAY, M., SOKMEN, S., YILMAZ, O. & GOKMEN, N. 2007. Erythropoietin protects the intestine against ischemia/ reperfusion injury in rats. *Mol Med*, 13, 509-17.
- (73) GV-SOLAS. 2007. Tiergerechte Haltung: Labormäuse. Available: http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/hal_maushaltung.pdf [Accessed 15.01.2017].
- (74) HAROON, Z. A., AMIN, K., JIANG, X. & ARCASOY, M. O. 2003. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am J Pathol*, 163, 993-1000.
- (75) HE, X. H., SHAW, P. C. & TAM, S. C. 1999. Reducing the immunogenicity and improving the in vivo activity of trichosanthin by site-directed pegylation. *Life Sci*, 65, 355-68.
- (76) HEESCHEN, C., AICHER, A., LEHMANN, R., FICHTLSCHERER, S., VASA, M., URBICH, C., MILDNER-RIHM, C., MARTIN, H., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2003. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*, 102, 1340-6.
- (77) HEIDENREICH, S., RAHN, K. H. & ZIDEK, W. 1991. Direct

vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessels. *Kidney Int*, 39, 259-65.

- (78) HEINICKE, K., BAUM, O., OGUNSHOLA, O. O., VOGEL, J., STALLMACH, T., WOLFER, D. P., KELLER, S., WEBER, K., WAGNER, P. D., GASSMANN, M. & DJONOV, V. 2006. Excessive erythrocytosis in adult mice overexpressing erythropoietin leads to hepatic, renal, neuronal, and muscular degeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291, R947-56.
- (79) HENKE, M., LASZIG, R., RUBE, C., SCHAFER, U., HAASE, K. D., SCHILCHER, B., MOSE, S., BEER, K. T., BURGER, U., DOUGHERTY, C. & FROMMHOLD, H. 2003. Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 362, 1255-60.
- (80) HEWITSON, K. S., MCNEILL, L. A. & SCHOFIELD, C. J. 2004. Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway: applications from cardiovascular disease to cancer. *Curr Pharm Des*, 10, 821-33.
- (81) HIRATA, A., MINAMINO, T., ASANUMA, H., FUJITA, M., WAKENO, M., MYOISHI, M., TSUKAMOTO, O., OKADA, K., KOYAMA, H., KOMAMURA, K., TAKASHIMA, S., SHINOZAKI, Y., MORI, H., SHIRAGA, M., KITAKAZE, M. & HORI, M. 2006. Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. *J Am Coll Cardiol*, 48, 176-84.
- (82) HOLSTEIN, J. H., MENGER, M. D., SCHEUER, C., MEIER, C., CULEMANN, U., WIRBEL, R. J., GARCIA, P. & POHLEMANN, T. 2007. Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life Sci*, 80, 893-900.
- (83) HOMONCIK, M., JILMA-STOHLAWETZ, P., SCHMID, M., FERLITSCH, A. & PECK-RADOSAVLJEVIC, M. 2004. Erythropoietin increases platelet reactivity and platelet counts in patients with alcoholic liver cirrhosis: a

- randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*, 20, 437-43.
- (84) IAFRATI, M. D., KARAS, R. H., ARONOVITZ, M., KIM, S., SULLIVAN, T. R., JR., LUBAHN, D. B., O'DONNELL, T. F., JR., KORACH, K. S. & MENDELSON, M. E. 1997. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice. *Nat Med*, 3, 545-8.
- (85) IHLE, J. N. & KERR, I. M. 1995. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet*, 11, 69-74.
- (86) IHLE, J. N., THIERFELDER, W., TEGLUND, S., STRAVOPODIS, D., WANG, D., FENG, J. & PARGANAS, E. 1998. Signaling by the cytokine receptor superfamily. *Ann N Y Acad Sci*, 865, 1-9.
- (87) ISEKI, K. & FUKIYAMA, K. 2000. Long-term prognosis and incidence of acute myocardial infarction in patients on chronic hemodialysis. The Okinawa Dialysis Study Group. *Am J Kidney Dis*, 36, 820-5.
- (88) ISHIBASHI, S., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L., GERARD, R. D., HAMMER, R. E. & HERZ, J. 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*, 92, 883-93.
- (89) JACKSON DB, S. M., VOSS H, BROCK S. 2012. *Tissue protective erythropoietin receptor (nepor) and methods of use, European Patent Application EP 2 492 355 A1*
- (90) JANMAAT, M. L., HEERKENS, J. L., DE BRUIN, A. M., KLOUS, A., DE WAARD, V. & DE VRIES, C. J. 2010. Erythropoietin accelerates smooth muscle cell-rich vascular lesion formation in mice through endothelial cell activation involving enhanced PDGF-BB release. *Blood*, 115, 1453-60.
- (91) JARSCH, M., BRANDT, M., LANZENDORFER, M. & HASELBECK, A. 2008. Comparative erythropoietin receptor binding kinetics of C.E.R.A. and epoetin-beta determined by surface plasmon resonance and competition binding assay. *Pharmacology*, 81, 63-9.

- (92) JAWIEN, J., NASTALEK, P. & KORBUT, R. 2004. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*, 55, 503-17.
- (93) JELKMANN, I. & JELKMANN, W. 2013. Impact of erythropoietin on intensive care unit patients. *Transfus Med Hemother*, 40, 310-8.
- (94) JELKMANN, W. 2004. Molecular biology of erythropoietin. *Intern Med*, 43, 649-59.
- (95) JELKMANN, W. 2013. Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfus Med Hemother*, 40, 302-9.
- (96) JEWELL, U. R., KVIETIKOVA, I., SCHEID, A., BAUER, C., WENGER, R. H. & GASSMANN, M. 2001. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *Faseb j*, 15, 1312-4.
- (97) JING, M., SHINGO, T., YASUHARA, T., KONDO, A., MORIMOTO, T., WANG, F., BABA, T., YUAN, W. J., TAJIRI, N., UOZUMI, T., MURAKAMI, M., TANABE, M., MIYOSHI, Y., ZHAO, S. & DATE, I. 2009. The combined therapy of intrahippocampal transplantation of adult neural stem cells and intraventricular erythropoietin-infusion ameliorates spontaneous recurrent seizures by suppression of abnormal mossy fiber sprouting. *Brain Res*, 1295, 203-17.
- (98) JUNGERS, P., MASSY, Z. A., NGUYEN KHOA, T., FUMERON, C., LABRUNIE, M., LACOUR, B., DESCAMPS-LATSCHA, B. & MAN, N. K. 1997. Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant*, 12, 2597-602.
- (99) JUUL, S. E., LEDBETTER, D. J., JOYCE, A. E., DAME, C., CHRISTENSEN, R. D., ZHAO, Y. & DEMARCO, V. 2001. Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine. *Gut*, 49, 182-9.
- (100) KAUPKE, C. J., BUTLER, G. C. & VAZIRI, N. D. 1993. Effect of recombinant human erythropoietin on platelet production in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 3, 1672-9.

- (101) KELLERT, B. A., MCPHERSON, R. J. & JUUL, S. E. 2007. A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res*, 61, 451-5.
- (102) KERTESZ, N., WU, J., CHEN, T. H., SUCOV, H. M. & WU, H. 2004. The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol*, 276, 101-10.
- (103) KHARAGJITSINGH, A. V., KOREVAAR, J. C., VANDENBROUCKE, J. P., BOESCHOTEN, E. W., KREDIET, R. T., DAHA, M. R. & DEKKER, F. W. 2005. Incidence of recombinant erythropoietin (EPO) hyporesponse, EPO-associated antibodies, and pure red cell aplasia in dialysis patients. *Kidney Int*, 68, 1215-22.
- (104) KIERAN, M. W., PERKINS, A. C., ORKIN, S. H. & ZON, L. I. 1996. Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9126-31.
- (105) KIM, Y. G., SUH, J. W., PARK, J. J., OH, I. Y., YOON, C. H., CHO, Y. S., YOUN, T. J., CHAE, I. H. & CHOI, D. J. 2014. Different influences of hematocrit on the results of two Point-Of-Care platelet function tests, the VerifyNow assay and multiple electrode platelet aggregometry. *PLoS One*, 9, e114053.
- (106) KIRKEBY, A., TORUP, L., BOCHSEN, L., KJALKE, M., ABEL, K., THEILGAARD-MONCH, K., JOHANSSON, P. I., BJORN, S. E., GERWIEN, J. & LEIST, M. 2008. High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb Haemost*, 99, 720-8.
- (107) KOBAYASHI, T., YANASE, H., IWANAGA, T., SASAKI, R. & NAGAO, M. 2002. Epididymis is a novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs. *Biochem Biophys Res Commun*, 296, 145-51.
- (108) KOURY, S. T., BONDURANT, M. C., KOURY, M. J. & SEMENZA, G. L. 1991. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in

- situ hybridization. *Blood*, 77, 2497-503.
- (109) KUBATZKY, K. F., LIU, W., GOLDGRABEN, K., SIMMERLING, C., SMITH, S. O. & CONSTANTINESCU, S. N. 2005. Structural requirements of the extracellular to transmembrane domain junction for erythropoietin receptor function. *J Biol Chem*, 280, 14844-54.
- (110) KUMAR, S. R., SINGH, J., XIA, G., KRASNOPEROV, V., HASSANIEH, L., LEY, E. J., SCEHNET, J., KUMAR, N. G., HAWES, D., PRESS, M. F., WEAVER, F. A. & GILL, P. S. 2006. Receptor tyrosine kinase EphB4 is a survival factor in breast cancer. *Am J Pathol*, 169, 279-93.
- (111) LACOMBE, C. & MAYEUX, P. 1998. Biology of erythropoietin. *Haematologica*, 83, 724-32.
- (112) LAPPIN, T. 2003. The cellular biology of erythropoietin receptors. *Oncologist*, 8 Suppl 1, 15-8.
- (113) LASNE, F. & DE CEARRIZ, J. 2000. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*, 405, 635.
- (114) LEE, S. H., LI, C., LIM, S. W., AHN, K. O., CHOI, B. S., KIM, Y. S., MOON, I. S., KIM, J., BANG, B. K. & YANG, C. W. 2005. Attenuation of interstitial inflammation and fibrosis by recombinant human erythropoietin in chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol*, 25, 64-76.
- (115) LEYLAND-JONES, B. 2003. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol*, 4, 459-60.
- (116) LEYLAND-JONES, B., SEMIGLAZOV, V., PAWLICKI, M., PIENKOWSKI, T., TJULANDIN, S., MANIKHAS, G., MAKHSON, A., ROTH, A., DODWELL, D., BASELGA, J., BIAKHOV, M., VALUCKAS, K., VOZNYI, E., LIU, X. & VERCAMMEN, E. 2005. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J Clin Oncol*, 23, 5960-72.

- (117) LI, L., TAKEMURA, G., LI, Y., MIYATA, S., ESAKI, M., OKADA, H., KANAMORI, H., KHAI, N. C., MARUYAMA, R., OGINO, A., MINATOBUCHI, S., FUJIWARA, T. & FUJIWARA, H. 2006. Preventive effect of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation*, 113, 535-43.
- (118) LI, W., FEBBRAIO, M., REDDY, S. P., YU, D. Y., YAMAMOTO, M. & SILVERSTEIN, R. L. 2010. CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs. *J Clin Invest*, 120, 3996-4006.
- (119) LI, W., NIEMAN, M. & SEN GUPTA, A. 2016. Ferric Chloride-induced Murine Thrombosis Models. *J Vis Exp*.
- (120) LIEBICH, H.-G. 2004. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*, Schattauer.
- (121) LIN, A. Y., RYU, J. K., HARVEY, D., SIERACKI, B., SCUDDER, S. A. & WUN, T. 2004. Incidence of symptomatic venous thrombosis in cervical and vulvo-vaginal carcinoma treated with concurrent chemoradiation, erythropoietin, and coumadin. *J Clin Oncol*, 22, 8101.
- (122) LIN, C. S., LIM, S. K., D'AGATI, V. & COSTANTINI, F. 1996. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev*, 10, 154-64.
- (123) LIN, F. K., SUGGS, S., LIN, C. H., BROWNE, J. K., SMALLING, R., EGRIE, J. C., CHEN, K. K., FOX, G. M., MARTIN, F., STABINSKY, Z. & ET AL. 1985. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 7580-4.
- (124) LINDNER, V., FINGERLE, J. & REIDY, M. A. 1993. Mouse model of arterial injury. *Circ Res*, 73, 792-6.
- (125) LINTON, M. F., FARESE, R. V., JR., CHIESA, G., GRASS, D. S., CHIN, P., HAMMER, R. E., HOBBS, H. H. & YOUNG, S. G. 1993. Transgenic mice expressing high plasma concentrations of human apolipoprotein B100 and lipoprotein(a). *J Clin Invest*, 92, 3029-37.

- (126) LIU, C., SHEN, K., LIU, Z. & NOGUCHI, C. T. 1997. Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem*, 272, 32395-400.
- (127) LONG, D. L., DOHERTY, D. H., EISENBERG, S. P., SMITH, D. J., ROSENDAHL, M. S., CHRISTENSEN, K. R., EDWARDS, D. P., CHLIPALA, E. A. & COX, G. N. 2006. Design of homogeneous, monopegylated erythropoietin analogs with preserved in vitro bioactivity. *Exp Hematol*, 34, 697-704.
- (128) MACDOUGALL, I. C. 2005. CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator): a new erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. *Curr Hematol Rep*, 4, 436-40.
- (129) MAIESE, K., LI, F. & CHONG, Z. Z. 2005. New avenues of exploration for erythropoietin. *Jama*, 293, 90-5.
- (130) MAOUCHE, L., TOURNAMILLE, C., HATTAB, C., BOFFA, G., CARTRON, J. P. & CHRETIEN, S. 1991. Cloning of the gene encoding the human erythropoietin receptor. *Blood*, 78, 2557-63.
- (131) MARTI, H. H., BERNAUDIN, M., PETIT, E. & BAUER, C. 2000. Neuroprotection and Angiogenesis: Dual Role of Erythropoietin in Brain Ischemia. *News Physiol Sci*, 15, 225-229.
- (132) MARTI, H. H., WENGER, R. H., RIVAS, L. A., STRAUMANN, U., DIGICAYLIOGLU, M., HENN, V., YONEKAWA, Y., BAUER, C. & GASSMANN, M. 1996. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*, 8, 666-76.
- (133) MARTIN, K. J. 2007. The first human cell line-derived erythropoietin, epoetin-delta (Dynepo), in the management of anemia in patients with chronic kidney disease. *Clin Nephrol*, 68, 26-31.
- (134) MASCHIO, G. 1995. Erythropoietin and systemic hypertension. *Nephrol Dial Transplant*, 10 Suppl 2, 74-9.
- (135) MASUDA, S., KOBAYASHI, T., CHIKUMA, M., NAGAO, M. & SASAKI,

- R. 2000. The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278, E1038-44.
- (136) MASUDA, S., NAGAO, M., TAKAHATA, K., KONISHI, Y., GALLYAS, F., JR., TABIRA, T. & SASAKI, R. 1993. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem*, 268, 11208-16.
- (137) MASUDA, S., OKANO, M., YAMAGISHI, K., NAGAO, M., UEDA, M. & SASAKI, R. 1994. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*, 269, 19488-93.
- (138) MATSUSHITA, H., JOHNSTON, M. V., LANGE, M. S. & WILSON, M. A. 2003. Protective effect of erythropoietin in neonatal hypoxic ischemia in mice. *Neuroreport*, 14, 1757-61.
- (139) MCPHERSON, R. J. & JUUL, S. E. 2007. High-dose erythropoietin inhibits apoptosis and stimulates proliferation in neonatal rat intestine. *Growth Horm IGF Res*, 17, 424-30.
- (140) MORAKKABATI, N., GOLLNICK, F., MEYER, R., FANDREY, J. & JELKMANN, W. 1996. Erythropoietin induces Ca²⁺ mobilization and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. *Exp Hematol*, 24, 392-7.
- (141) MORISHITA, E., MASUDA, S., NAGAO, M., YASUDA, Y. & SASAKI, R. 1997. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*, 76, 105-16.
- (142) MORITA, M., OHNEDA, O., YAMASHITA, T., TAKAHASHI, S., SUZUKI, N., NAKAJIMA, O., KAWAUCHI, S., EMA, M., SHIBAHARA, S., UDONO, T., TOMITA, K., TAMAI, M., SOGAWA, K., YAMAMOTO, M. & FUJII-KURIYAMA, Y. 2003. HLF/HIF-2alpha is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *Embo j*, 22, 1134-46.
- (143) MULCAHY, L. 2001. The erythropoietin receptor. *Semin Oncol*, 28,

19-23.

- (144) NAKAGAWA, S. & CUTHILL, I. C. 2007. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 82, 591-605.
- (145) NAKAZAWA, J., ISSHIKI, K., SUGIMOTO, T., ARAKI, S., KUME, S., YOKOMAKU, Y., CHIN-KANASAKI, M., SAKAGUCHI, M., KOYA, D., HANEDA, M., KASHIWAGI, A. & UZU, T. 2010. Renoprotective effects of asialoerythropoietin in diabetic mice against ischaemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)*, 15, 93-101.
- (146) NOGUCHI, C. T., BAE, K. S., CHIN, K., WADA, Y., SCHECHTER, A. N. & HANKINS, W. D. 1991. Cloning of the human erythropoietin receptor gene. *Blood*, 78, 2548-56.
- (147) NOREN, N. K. & PASQUALE, E. B. 2007. Paradoxes of the EphB4 receptor in cancer. *Cancer Res*, 67, 3994-7.
- (148) OGUNSHOLA, O. O., DJONOV, V., STAUDT, R., VOGEL, J. & GASSMANN, M. 2006. Chronic excessive erythrocytosis induces endothelial activation and damage in mouse brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R678-84.
- (149) OHLSSON, A. & AHER, S. M. 2006. Early erythropoietin for preventing red blood cell transfusion in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd004863.
- (150) PATEL, N. S., SHARPLES, E. J., CUZZOCREA, S., CHATTERJEE, P. K., BRITTI, D., YAQOOB, M. M. & THIEMERMANN, C. 2004. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo. *Kidney Int*, 66, 983-9.
- (151) PENDYALA, L. K., LOH, J. P., LHERMUSIER, T., MINHA, S., MAGALHAES, M. A., TORGUSON, R., CHEN, F., SATLER, L. F., PICHARD, A. D. & WAKSMAN, R. 2014. Does baseline hematocrit influence the assays of on-treatment platelet reactivity to clopidogrel? *Am Heart J*, 168, 545-51.

- (152) PENNY, L. A. & FORGET, B. G. 1991. Genomic organization of the human erythropoietin receptor gene. *Genomics*, 11, 974-80.
- (153) PEREZ, P., ALARCON, M., FUENTES, E. & PALOMO, I. 2014. Thrombus formation induced by laser in a mouse model. *Exp Ther Med*, 8, 64-68.
- (154) PHILO, J. S., AOKI, K. H., ARAKAWA, T., NARHI, L. O. & WEN, J. 1996. Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction. *Biochemistry*, 35, 1681-91.
- (155) PHROMMINTIKUL, A., HAAS, S. J., ELSIK, M. & KRUM, H. 2007. Mortality and target haemoglobin concentrations in anaemic patients with chronic kidney disease treated with erythropoietin: a meta-analysis. *Lancet*, 369, 381-8.
- (156) PIEDRAHITA, J. A., ZHANG, S. H., HAGAMAN, J. R., OLIVER, P. M. & MAEDA, N. 1992. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4471-5.
- (157) PISONI, R. L., BRAGG-GRESHAM, J. L., YOUNG, E. W., AKIZAWA, T., ASANO, Y., LOCATELLI, F., BOMMER, J., CRUZ, J. M., KERR, P. G., MENDELSSOHN, D. C., HELD, P. J. & PORT, F. K. 2004. Anemia management and outcomes from 12 countries in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis*, 44, 94-111.
- (158) PLUMP, A. S., SMITH, J. D., HAYEK, T., AALTO-SETALA, K., WALSH, A., VERSTUYFT, J. G., RUBIN, E. M. & BRESLOW, J. L. 1992. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71, 343-53.
- (159) POLANOWSKA-GRABOWSKA, R., GIBBINS, J. M. & GEAR, A. R. 2003. Platelet adhesion to collagen and collagen-related peptide under flow: roles of the $\alpha_2\beta_1$ integrin, GPVI, and Src tyrosine kinases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1934-40.

- (160) PRUNIER, F., PFISTER, O., HADRI, L., LIANG, L., DEL MONTE, F., LIAO, R. & HAJJAR, R. J. 2007. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H522-9.
- (161) RAHN, K. H., BARENBRÖCK, M., HAUSBERG, M., KOSCH, M., SUWELACK, B. & WITTA, J. 2000. Vessel wall alterations in patients with renal failure. *Hypertens Res*, 23, 3-6.
- (162) REZENDE, A. B., NETO, N. N., FERNANDES, L. R., RIBEIRO, A. C., ALVAREZ-LEITE, J. I. & TEIXEIRA, H. C. 2011. Splenectomy increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E deficient mice. *J Surg Res*, 171, e231-6.
- (163) RIBATTI, D., PRESTA, M., VACCA, A., RIA, R., GIULIANI, R., DELL'ERA, P., NICO, B., RONCALI, L. & DAMMACCO, F. 1999. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*, 93, 2627-36.
- (164) ROQUE, M., FALLON, J. T., BADIMON, J. J., ZHANG, W. X., TAUBMAN, M. B. & REIS, E. D. 2000. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 335-42.
- (165) RUSCHER, K., FREYER, D., KARSCH, M., ISAEV, N., MEGOW, D., SAWITZKI, B., PRILLER, J., DIRNAGL, U. & MEISEL, A. 2002. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci*, 22, 10291-301.
- (166) RUSCHITZKA, F. T., WENGER, R. H., STALLMACH, T., QUASCHNING, T., DE WIT, C., WAGNER, K., LABUGGER, R., KELM, M., NOLL, G., RULICKE, T., SHAW, S., LINDBERG, R. L., RODENWALDT, B., LUTZ, H., BAUER, C., LUSCHER, T. F. & GASSMANN, M. 2000. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 11609-13.

- (167) SASAKI, R., MASUDA, S. & NAGAO, M. 2000. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 64, 1775-93.
- (168) SASAKI, T., KUZUYA, M., CHENG, X. W., NAKAMURA, K., TAMAYAMORI, N., MAEDA, K., KANDA, S., KOIKE, T., SATO, K. & IGUCHI, A. 2004. A novel model of occlusive thrombus formation in mice. *Lab Invest*, 84, 1526-32.
- (169) SASU, B. J., HARTLEY, C., SCHULTZ, H., MCELROY, P., KHAJA, R., ELLIOTT, S., EGRIE, J. C., BROWNE, J. K., BEGLEY, C. G. & MOLINEUX, G. 2005. Comparison of epoetin alfa and darbepoetin alfa biological activity under different administration schedules in normal mice. *Acta Haematol*, 113, 163-74.
- (170) SAWADA, K., KRANTZ, S. B., KANS, J. S., DESSYPRIS, E. N., SAWYER, S., GLICK, A. D. & CIVIN, C. I. 1987. Purification of human erythroid colony-forming units and demonstration of specific binding of erythropoietin. *J Clin Invest*, 80, 357-66.
- (171) SAYAN, H., OZACMAK, V. H., SEN, F., CABUK, M., ATIK, D. Y., IGDEM, A. A. & OZACMAK, I. D. 2009. Pharmacological preconditioning with erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the small intestine of rats. *Life Sci*, 84, 364-71.
- (172) SERENO, M., GARCIA-CABEZAS, M. A., DE CASTRO, J., CEJAS, P., SAENZ, E. C., BELDA-INIESTA, C., FEIJOO, J. B., LARRAURI, J., NISTAL, M. & BARON, M. G. 2006. Immunohistochemical expression of p53, Bcl-2, COX-2, C-erb-B2, EPO-R, beta-catenin, and E-cadherin in non tumoral gastric mucous membrane. *Eur J Histochem*, 50, 285-92.
- (173) SEUBERT, N., ROYER, Y., STAERK, J., KUBATZKY, K. F., MOUCADEL, V., KRISHNAKUMAR, S., SMITH, S. O. & CONSTANTINESCU, S. N. 2003. Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer. *Mol Cell*, 12, 1239-50.
- (174) SHARPLES, E. J., PATEL, N., BROWN, P., STEWART, K., MOTA-

- PHILIPPE, H., SHEAFF, M., KIESWICH, J., ALLEN, D., HARWOOD, S., RAFTERY, M., THIEMERMANN, C. & YAQOUB, M. M. 2004. Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol*, 15, 2115-24.
- (175) SHARPLES, E. J. & YAQOUB, M. M. 2006. Erythropoietin in experimental acute renal failure. *Nephron Exp Nephrol*, 104, e83-8.
- (176) SHINGO, T., SOROKAN, S. T., SHIMAZAKI, T. & WEISS, S. 2001. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*, 21, 9733-43.
- (177) SILVERSTEIN, R. L., LI, W., PARK, Y. M. & RAHAMAN, S. O. 2010. Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 121, 206-20.
- (178) SIMPER, D., STALBOERGER, P. G., PANETTA, C. J., WANG, S. & CAPLICE, N. M. 2002. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*, 106, 1199-204.
- (179) SINGH, A. K., SZCZECH, L., TANG, K. L., BARNHART, H., SAPP, S., WOLFSON, M. & REDDAN, D. 2006. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med*, 355, 2085-98.
- (180) SIREN, A. L., FRATELLI, M., BRINES, M., GOEMANS, C., CASAGRANDE, S., LEWCZUK, P., KEENAN, S., GLEITER, C., PASQUALI, C., CAPOBIANCO, A., MENNINI, T., HEUMANN, R., CERAMI, A., EHRENREICH, H. & GHEZZI, P. 2001. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4044-9.
- (181) SKRIFVAR, M. B., BAILEY, M., PRESNEILL, J., FRENCH, C., NICHOL, A., LITTLE, L., DURANTEAU, J., HUET, O., HADDAD, S., ARABI, Y., MCARTHUR, C., COOPER, D. J. & BELLOMO, R. 2016. Venous thromboembolic events in critically ill traumatic brain injury patients.

Intensive Care Med.

- (182) SOLOMON, S. D., UNO, H., LEWIS, E. F., ECKARDT, K. U., LIN, J., BURDMANN, E. A., DE ZEEUW, D., IVANOVICH, P., LEVEY, A. S., PARFREY, P., REMUZZI, G., SINGH, A. K., TOTO, R., HUANG, F., ROSSERT, J., MCMURRAY, J. J. & PFEFFER, M. A. 2010. Erythropoietic response and outcomes in kidney disease and type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 363, 1146-55.
- (183) SONODA, A., NITTA, N., TSUCHIYA, K., OTANI, H., WATANABE, S., MUKAISHO, K., TOMOZAWA, Y., NAGATANI, Y., OHTA, S., TAKAHASHI, M. & MURATA, K. 2014. Asialoerythropoietin ameliorates bleomycin-induced acute lung injury in rabbits by reducing inflammation. *Exp Ther Med*, 8, 1443-1446.
- (184) SPANDOU, E., TSOUCHNIKAS, I., KARKAVELAS, G., DOUNOUDI, E., SIMEONIDOU, C., GUIBA-TZIAMPURI, O. & TSAKIRIS, D. 2006. Erythropoietin attenuates renal injury in experimental acute renal failure ischaemic/reperfusion model. *Nephrol Dial Transplant*, 21, 330-6.
- (185) STOHLAWETZ, P. J., DZIRLO, L., HERGOVICH, N., LACKNER, E., MENSIK, C., EICHLER, H. G., KABRNA, E., GEISLER, K. & JILMA, B. 2000. Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood*, 95, 2983-9.
- (186) STUCKMANN, I., EVANS, S. & LASSAR, A. B. 2003. Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol*, 255, 334-49.
- (187) STUDER, L., CSETE, M., LEE, S. H., KABBANI, N., WALIKONIS, J., WOLD, B. & MCKAY, R. 2000. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci*, 20, 7377-83.
- (188) SULLIVAN, T. R., JR., KARAS, R. H., ARONOVITZ, M., FALLER, G. T., ZIAR, J. P., SMITH, J. J., O'DONNELL, T. F., JR. & MENDELSON, M. E. 1995. Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model.

J Clin Invest, 96, 2482-8.

- (189) SUZUKI, N., OHNEDA, O., TAKAHASHI, S., HIGUCHI, M., MUKAI, H. Y., NAKAHATA, T., IMAGAWA, S. & YAMAMOTO, M. 2002. Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality. *Blood*, 100, 2279-88.
- (190) SYED, R. S., REID, S. W., LI, C., CHEETHAM, J. C., AOKI, K. H., LIU, B., ZHAN, H., OSSLUND, T. D., CHIRINO, A. J., ZHANG, J., FINER-MOORE, J., ELLIOTT, S., SITNEY, K., KATZ, B. A., MATTHEWS, D. J., WENDOLOSKI, J. J., EGRIE, J. & STROUD, R. M. 1998. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature*, 395, 511-6.
- (191) TADA, H., KAGAYA, Y., TAKEDA, M., OHTA, J., ASAUMI, Y., SATOH, K., ITO, K., KARIBE, A., SHIRATO, K., MINEGISHI, N. & SHIMOKAWA, H. 2006. Endogenous erythropoietin system in non-hematopoietic lineage cells plays a protective role in myocardial ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*, 71, 466-77.
- (192) TAKEYAMA, T., TAKEMURA, G., KANAMORI, H., KAWAGUCHI, T., OGINO, A., WATANABE, T., MORISHITA, K., TSUJIMOTO, A., GOTO, K., MARUYAMA, R., USHIKOSHI, H., KAWASAKI, M., YAMADA, K., NIKAMI, H., FUJIWARA, T., FUJIWARA, H. & MINATOBUCHI, S. 2012. Asialoerythropoietin, a nonerythropoietic derivative of erythropoietin, displays broad anti-heart failure activity. *Circ Heart Fail*, 5, 274-85.
- (193) TAN, C. C., ECKARDT, K. U. & RATCLIFFE, P. J. 1991. Organ distribution of erythropoietin messenger RNA in normal and uremic rats. *Kidney Int*, 40, 69-76.
- (194) THYBERG, J., BLOMGREN, K., ROY, J., TRAN, P. K. & HEDIN, U. 1997. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem*, 45, 837-46.
- (195) TOUS, M., FERRE, N., VILELLA, E., RIU, F., CAMPS, J. & JOVEN, J. 2004. Circulating blood cells modulate the atherosclerotic process in

- apolipoprotein E-deficient mice. *Metabolism*, 53, 95-100.
- (196) TRAMONTANO, A. F., MUNIYAPPA, R., BLACK, A. D., BLENDEA, M. C., COHEN, I., DENG, L., SOWERS, J. R., CUTAIA, M. V. & EL-SHERIF, N. 2003. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 308, 990-4.
- (197) TSAI, P. T., OHAB, J. J., KERTESZ, N., GROSZER, M., MATTER, C., GAO, J., LIU, X., WU, H. & CARMICHAEL, S. T. 2006. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci*, 26, 1269-74.
- (198) TSUKADA, J., MISAGO, M., KIKUCHI, M., SATO, T., OGAWA, R., ODA, S., CHIBA, S. & ETO, S. 1990. The effect of high doses of recombinant human erythropoietin on megakaryocytopoiesis and platelet production in splenectomized mice. *Br J Haematol*, 76, 260-8.
- (199) TSUZUKI, M. 2009. Bone marrow-derived cells are not involved in reendothelialized endothelium as endothelial cells after simple endothelial denudation in mice. *Basic Res Cardiol*, 104, 601-11.
- (200) UNIVERSITÄT-SALZBURG. 2017
- (201) Versuch 2: Grundlagen der Durchflusszytometrie. Available: http://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle_file_imports/2081233.PDF [Accessed 14.01.2017].
- (202) URAO, N., OKIGAKI, M., YAMADA, H., AADACHI, Y., MATSUNO, K., MATSUI, A., MATSUNAGA, S., TATEISHI, K., NOMURA, T., TAKAHASHI, T., TATSUMI, T. & MATSUBARA, H. 2006. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res*, 98, 1405-13.
- (203) VANNUCCHI, A. M., BIANCHI, L., CELLAI, C., PAOLETTI, F., CARRAI, V., CALZOLARI, A., CENTURIONE, L., LORENZINI, R., CARTA, C., ALFANI, E., SANCHEZ, M., MIGLIACCIO, G. & MIGLIACCIO, A. R. 2001. Accentuated

- response to phenylhydrazine and erythropoietin in mice genetically impaired for their GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). *Blood*, 97, 3040-50.
- (204) VILLA, P., BIGINI, P., MENNINI, T., AGNELLO, D., LARAGIONE, T., CAGNOTTO, A., VIVIANI, B., MARINOVICH, M., CERAMI, A., COLEMAN, T. R., BRINES, M. & GHEZZI, P. 2003. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*, 198, 971-5.
- (205) VOGEL, J., KIESSLING, I., HEINICKE, K., STALLMACH, T., OSSENT, P., VOGEL, O., AULMANN, M., FRIETSCH, T., SCHMID-SCHONBEIN, H., KUSCHINSKY, W. & GASSMANN, M. 2003. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood*, 102, 2278-84.
- (206) VOORMOLEN, N., GROOTENDORST, D. C., URLINGS, T. A., BOESCHOTEN, E. W., SIJPKENS, Y. W., HUISMAN, R. M., KREDIET, R. T. & DEKKER, F. W. 2010. Prevalence of anemia and its impact on mortality and hospitalization rate in predialysis patients. *Nephron Clin Pract*, 115, c133-41.
- (207) WAGNER, K. F., KATSCHINSKI, D. M., HASEGAWA, J., SCHUMACHER, D., MELLER, B., GEMBRUCH, U., SCHRAMM, U., JELKMANN, W., GASSMANN, M. & FANDREY, J. 2001. Chronic inborn erythrocytosis leads to cardiac dysfunction and premature death in mice overexpressing erythropoietin. *Blood*, 97, 536-42.
- (208) WANG, L., ZHANG, Z., WANG, Y., ZHANG, R. & CHOPP, M. 2004. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, 35, 1732-7.
- (209) WARD, M. R., PASTERKAMP, G., YEUNG, A. C. & BORST, C. 2000. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 102, 1186-91.

- (210) WATANABE, D., SUZUMA, K., MATSUI, S., KURIMOTO, M., KIRYU, J., KITA, M., SUZUMA, I., OHASHI, H., OJIMA, T., MURAKAMI, T., KOBAYASHI, T., MASUDA, S., NAGAO, M., YOSHIMURA, N. & TAKAGI, H. 2005. Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, 353, 782-92.
- (211) WEBER, A., DZIETKO, M., BERNS, M., FELDERHOFF-MUESER, U., HEINEMANN, U., MAIER, R. F., OBLADEN, M., IKONOMIDOU, C. & BUHRER, C. 2005. Neuronal damage after moderate hypoxia and erythropoietin. *Neurobiol Dis*, 20, 594-600.
- (212) WHO. 1997. Guidelines on the use of international nonproprietary names (INNs) for pharmaceutical substances. Available: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/63779/1/WHO PHARM S NO M 1570.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/63779/1/WHO_PHARM_S_NO_M_1570.pdf) [Accessed 29.01.2017].
- (213) WITTING, P. K., PETERSSON, K., OSTLUND-LINDQVIST, A. M., WESTERLUND, C., ERIKSSON, A. W. & STOCKER, R. 1999. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *Faseb j*, 13, 667-75.
- (214) WOLF, R. F., GILMORE, L. S., FRIESE, P., DOWNS, T., BURSTEIN, S. A. & DALE, G. L. 1997. Erythropoietin potentiates thrombus development in a canine arterio-venous shunt model. *Thromb Haemost*, 77, 1020-4.
- (215) WRIGHT, J. R., UNG, Y. C., JULIAN, J. A., PRITCHARD, K. I., WHELAN, T. J., SMITH, C., SZECHTMAN, B., ROA, W., MULROY, L., RUDINSKAS, L., GAGNON, B., OKAWARA, G. S. & LEVINE, M. N. 2007. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of erythropoietin in non-small-cell lung cancer with disease-related anemia. *J Clin Oncol*, 25, 1027-32.
- (216) WU, H., LEE, S. H., GAO, J., LIU, X. & IRUELA-ARISPE, M. L. 1999. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development*, 126, 3597-605.
- (217) WU, H., LIU, X., JAENISCH, R. & LODISH, H. F. 1995. Generation of

committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, 83, 59-67.

- (218) YANG, C. W., LI, C., JUNG, J. Y., SHIN, S. J., CHOI, B. S., LIM, S. W., SUN, B. K., KIM, Y. S., KIM, J., CHANG, Y. S. & BANG, B. K. 2003. Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Faseb j*, 17, 1754-5.
- (219) YASUDA, Y., FUJITA, Y., MUSHI, T., TANAKA, H., SHIOKAWA, S., NAKAMATSU, K., MORI, S., MATSUO, T. & NAKAMURA, Y. 2001. Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. *Ital J Anat Embryol*, 106, 215-22.
- (220) YASUDA, Y., MASUDA, S., CHIKUMA, M., INOUE, K., NAGAO, M. & SASAKI, R. 1998. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem*, 273, 25381-7.
- (221) YU, X., LIN, C. S., COSTANTINI, F. & NOGUCHI, C. T. 2001. The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse. *Blood*, 98, 475-7.
- (222) YU, X., SHACKA, J. J., EELLS, J. B., SUAREZ-QUIAN, C., PRZYGODZKI, R. M., BELESLIN-COKIC, B., LIN, C. S., NIKODEM, V. M., HEMPSTEAD, B., FLANDERS, K. C., COSTANTINI, F. & NOGUCHI, C. T. 2002. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*, 129, 505-16.
- (223) ZARAGOZA, C., MARQUEZ, S. & SAURA, M. 2012. Endothelial mechanosensors of shear stress as regulators of atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*, 23, 446-52.

X. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tab. 1 Dosierung der MMF-Narkose</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 2 Dosierung zur Antagonisierung der MMF-Narkose</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 3 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen</i>	<i>56</i>
<i>Tab. 4 Hämatologie ohne Splenektomie</i>	<i>62</i>
<i>Tab. 5 Hämatologie nach Splenektomie</i>	<i>63</i>
<i>Tab. 6 Hämatologie in atherosklerotischen, splenektomierten WT(Epo)- und Tg(Epo)-Mäusen</i>	<i>65</i>
<i>Tab. 7 Hämatologische Parameter 4 Wochen nach Splenektomie und 3 Wochen nach Drahtverletzung der A. femoralis communis.....</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 8 Analytische Statistik der CRP-Thrombozytenstimulation.....</i>	<i>76</i>
<i>Tab. 9 Analytische Statistik der PAR4-Thrombozytenstimulation</i>	<i>77</i>
<i>Tab. 10 Analyse der AUC nach Thrombozytenstimulation.....</i>	<i>79</i>
<i>Tab. 11 Hämatologie nach arterieller Thrombose</i>	<i>80</i>
<i>Tab. 12 Genaue Zusammensetzung der Diät Altromin 1314 mod. corresponding to Purina 5015.....</i>	<i>134</i>

XI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1 Nicht-hämatopoetischer EPO-R mit Beteiligung der βcR-Untereinheit,.....</i>	7
<i>Abb. 2 NEPOR-Komplex, in Anlehnung an Debeljak et al. 2014;.....</i>	7
<i>Abb. 3 Wandbau einer Arterie (eigene Darstellung).....</i>	20
<i>Abb. 4 Aufnahme der aus der V. facialis</i>	37
<i>Abb. 5 Zustand der Maus intra op. nach Fellentfernung;</i>	42
<i>Abb. 6 Ligierte Gefäße einer WT(Epo)-Milz (M=Magen, N=Niere)</i>	42
<i>Abb. 7 Schematische Darstellung der Schnittlinien.....</i>	45
<i>Abb. 8 Schematische Darstellung der Lokalisation</i>	49
<i>Abb. 9 Femoralarterien gefärbt mit Elastica van Gieson-Pichrofuchsin-Färbung; 52</i>	
<i>Abb. 10 Nicht aktivierter Thrombozyt.....</i>	53
<i>Abb. 11 Aktivierte Thrombozyten;</i>	53
<i>Abb. 12 Eröffneter ventraler Halsbereich mit freiliegender, unterminierter und mit $FeCl_3$-Plättchen versehener A. carotis comm. dextra, Kopf nach unten zeigend ..</i>	58
<i>Abb. 13 Doppler-Sonographie der A. carotis comm. vor Schädigung.....</i>	59
<i>Abb. 14 Doppler-Sonographie der A. carotis comm. 2 min nach Schädigung</i>	59
<i>Abb. 15 Doppler-Sonographie der A. carotis comm. 4 min nach Schädigung</i>	59
<i>Abb. 16 Doppler-Sonographie der A. carotis comm. 6 min nach Schädigung</i>	59
<i>Abb. 17 Ölrot gefärbte Aorten;</i>	66
<i>Abb. 18 Darstellung der Gesamtplaquefläche in der Aorta.....</i>	67
<i>Abb. 19 Darstellung des prozentualen Anteils der Plauefläche</i>	67
<i>Abb. 20 Ölrot gefärbte Aortenbögen;</i>	68
<i>Abb. 21 Darstellung der Plauefläche im Aortenbogen.....</i>	68
<i>Abb. 22 Darstellung des prozentualen Anteils</i>	69
<i>Abb. 23 Ölrot gefärbte Aorta descendens;.....</i>	69
<i>Abb. 24 Darstellung der Plauefläche in der Aorta.....</i>	70
<i>Abb. 25 Darstellung des prozentualen Anteils der Plauefläche in der Aorta.....</i>	70
<i>Abb. 26 Ölrot gefärbte Aortenursprünge;.....</i>	71
<i>Abb. 27 Darstellung der Plauefläche im Aortenursprung</i>	72
<i>Abb. 28 Neointimafläche in der A. femoralis comm. 3 Wochen nach</i>	

<i>Drahtverletzung</i>	73
<i>Abb. 29 Mediafläche in der A. femoralis comm. 3 Wochen nach Drahtverletzung</i>	74
<i>Abb. 30 Neointima-Media-Ratio in der A. femoralis comm. 3 Wochen nach</i> <i>Drahtverletzung</i>	75
<i>Abb. 31 Anteil aktivierter Thrombozyten an Gesamtthrombozyten</i>	78
<i>Abb. 32 Anteil aktivierter Thrombozyten an Gesamtthrombozyten</i>	78
<i>Abb. 33 Arterielle Verschlusszeit nach FeCl₃-Schädigung</i>	81

XII. ANHANG

1. Protokolle

1.1. Genotypisierung der ApoE-Mäuse

Ansatz:

2 µl DNA

1,2 µl 10xPuffer (Firma Qiagen, Hilden)

0,24 µl dNTPmix 10mM (Firma Qiagen, Hilden)

0,6 µl Primer GCCTAGCCGAGGGAGACCCG, 10 µM

0,6 µl Primer TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC, 10 µM

0,6 µl Primer GCCGCCCCGACTGCATCT, 10 µM (alle Primer sind von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg)

0,2 µl Taq-Polymerase (Firma Qiagen, Hilden)

6,56 µl destilliertes Wasser

PCR-Programm:

Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	3 min	
94°C	45 s	30 Zyklen
62°C	45 s	
72°C	45 s	
72°C	2 min	
4°C	dauerhaft	

Gelanalyse:

Die Gelelektrophorese wurde auf einem 2%igem Agarosegel (Firma Biozym, Hessisch Oldendorf) in 1xTBE (Firma Carl Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Es wurde

dazu eine Gelelektrophoresekammer (Modell 40-1214, Firma PEQLAB, Erlangen) verwendet. Die DNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 3 µl DNA Gel Loading Dye (Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA) vermischt. Es handelt sich um ein Reagenz, das Nukleasen hemmt und DNA bindet und damit sicherstellt, dass sie auf den Boden der Taschen absinkt. Die Nukleinsäuren wurden zur Visualisierung außerdem mit einem Fluoreszenzfarbstoff (RotiR-GelStain, Firma Carl Roth, Karlsruhe) markiert. Dazu wurden bei der Herstellung eines 100 ml Agarosegels 5 µl Fluoreszenzfarbstoff zu Agarosepulver und TBE-Puffer hinzugefügt.

Bei den unterschiedlichen Genotypen konnten Banden folgender Größen detektiert werden:

ApoE+/+	155 Basenpaare
ApoE+/-	245 + 155 Basenpaare
ApoE-/-	245 Basenpaare

1.2. Genotypisierung der Tg(Epo)-Mäuse

Ansatz:

- 4 µl DNA
- 2,5 µl 10xPuffer (Firma Qiagen, Hilden)
- 1,5 µl MgCl₂ (Firma Qiagen, Hilden)
- 0,5 µl dNTPmix 10mM (Firma Qiagen, Hilden)
- 2,5 µl CCATCTCCAGGTTGAGG-Primer, 10µM
- 2,5 µl GTCTCTGAGAGCCGAGCA-Primer, 10 µM (alle Primer sind von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg)
- 0,2 µl Taq-Polymerase (Firma Qiagen, Hilden)
- 11,3 µl destilliertes Wasser

PCR-Programm:

Temperatur	Dauer	Zyklen
94°C	3 min	
94°C	30 s	35 Zyklen
62°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	5 min	
4°C	dauerhaft	

Gelanalyse:

Die Gelelektrophorese wurde auf einem 1,5%igem Agarosegel (Firma Biozym, Hessisch Oldendorf) in 1xTBE (Firma Carl Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Es wurde dazu eine Gelelektrophoresekammer (Modell 40-1214, Firma PEQLAB, Erlangen) verwendet. Die DNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 3 µl DNA Gel Loading Dye (Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA) vermischt. Es handelt sich um ein Reagenz, das Nukleasen hemmt und DNA bindet und damit sicherstellt, dass sie auf den Boden der Taschen absinkt. Die Nukleinsäuren wurden zur Visualisierung außerdem mit einem Fluoreszenzfarbstoff (RotiR-GelStain, Firma Carl Roth, Karlsruhe) markiert. Dazu wurden bei der Herstellung eines 100 ml Agarosegels 5 µl Fluoreszenzfarbstoff zu Agarosepulver und TBE-Puffer hinzugefügt.

Bei der Tg(Epo)-Maus konnten Banden mit einer Größe von 344 Basenpaaren detektiert werden, bei WT(Epo)-Mäusen war keine Bande auffindbar.

2. Diätzusammensetzung

Tab. 12 Genaue Zusammensetzung der Diät Altromin 1314 mod. corresponding to Purina 5015

Inhaltsstoff	Einheit	Gehalt
Rohprotein	mg/kg	236758,822
Rohfett	mg/kg	119979,562
Rohfaser	mg/kg	30360,041
Rohasche	mg/kg	69218,462
Feuchtigkeit	mg/kg	94589,931
Monosaccharide(s)	mg/kg	28500
Disaccharide(s)	mg/kg	52255,487
Polysaccharide(s)	mg/kg	274396,321
Umsetzbare Energie	kcal/kg	3798,169
Lysin	mg/kg	15835,39
Methionin	mg/kg	5336,59
Cystin	mg/kg	3575,59
Threonin	mg/kg	9145,985
Tryptophan	mg/kg	3028,38
Arginin	mg/kg	15046,645
Histidin	mg/kg	6202,345
Isoleucin	mg/kg	10244,61
Leucin	mg/kg	18613,335
Phenylalanin	mg/kg	10855,335
Valin	mg/kg	9570,32
Alanin	mg/kg	8841,8
Asparaginsäure	mg/kg	18132,27
Glutaminsäure	mg/kg	42546,035
Glycin	mg/kg	8698,95
Prolin	mg/kg	15496,09
Serin	mg/kg	10684,95
Tyrosin	mg/kg	9270,105

Vitamin A	I.E./kg	15000
Vitamin D3	I.E./kg	550
Vitamin E	mg/kg	113,945
Vitamin K3	mg/kg	6,6
Vitamin B1	mg/kg	19,015
Vitamin B2	mg/kg	16,121
Vitamin B6	mg/kg	12,113
Vitamin B12	mg/kg	0,031
Nikotinsäure	mg/kg	43,064
Pantothensre.	mg/kg	35,54
Folsäure	mg/kg	6,5404
Biotin	mg/kg	0,432
Cholinchlorid	mg/kg	982,013
Inosit	mg/kg	54,125
Vitamin C	mg/kg	28
Calcium	mg/kg	8337,805
Ges.Phosphor	mg/kg	7761,55
Verdaubarer Phosphor	mg/kg	5461,677
Magnesium	mg/kg	1764,868
Natrium	mg/kg	3244,036
Kalium	mg/kg	9628,446
Schwefel	mg/kg	1848,162
Chlor	mg/kg	5400,19
Eisen	mg/kg	179,155
Mangan	mg/kg	72,901
Zink	mg/kg	61,537
Kupfer	mg/kg	10,314
Jod	mg/kg	0,919
Molybdän	mg/kg	1,181
Fluor	mg/kg	7,768
Selen	mg/kg	0,353

Kobalt	mg/kg	0,369
Palmitinsäure	mg/kg	23174,1
Palmitoleinsäure	mg/kg	92,4
Stearinsäure	mg/kg	26021,2
Ölsäure	mg/kg	33109,7
Linolsäure	mg/kg	19602,15
Linolensäure	mg/kg	2382
Arachinsäure	mg/kg	148
Eicosaensäure	mg/kg	299,4
Arachidonsäure	mg/kg	400,4
Eicosapentaensäure	mg/kg	178,2
Canthaxanthin	mg/kg	1,05
Cholesterin	mg/kg	11875
B-Apo-8-Carotinsäure	mg/kg	1,4

3. Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn PD Dr. med. vet. Sven Reese für die wertvollen Statistik- und Histologietipps sowie die Übernahme der Arbeit, deren Durchsicht und Einreichung an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. med. Ilka Ott bedanken, die es mir ermöglicht hat, dieses interessante Thema zu bearbeiten und die mich während des Projektes kompetent wissenschaftlich betreut und jederzeit unterstützt hat.

Mein herzlicher Dank gilt Julia Werner für die Durchführung der Femoralarterienverletzung, ihr jederzeit offenes Ohr und ihre Anregungen bei tiermedizinischen Fragestellungen.

Außerdem bin ich Dr. med. Philipp Groha dankbar für seine Hilfestellung bei der Durchführung der Doppler-Sonographie und die außerordentlich angenehme Zusammenarbeit.

Des Weiteren danke ich Dr. med. vet. Martina Knödler für die Einführung in die Versuchstierkunde, Sophie Schober für die Einweisung in die Splenektomie, Elisabeth Kennerknecht für die gemeinsame Erarbeitung der Aortenpräparation für die en face-Färbung, Herrn Prof. Dr. med. vet. Thomas Rüllicke, Herrn Prof. Dr. med. vet. Max Gassmann und Dr. Mark Roest als Kooperationspartnern des EpoCan-Projektes für die Bereitstellung von Mäusen und Materialien sowie den Mitarbeitern der Laboratoriumsmedizin des Deutschen Herzzentrums für die Durchführung der vielen Blutuntersuchungen.

Außerdem danke ich den Tierpflegern Birgit Zahn und Melanie Blount für die verantwortungsvolle Betreuung meiner Tiere.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bedanken bei meinen Kollegen und Freunden Jana Ohl, Anna-Sophia Zimmermann, Nicolás López Armbruster, Marlène Stroth, Ann-Marie Kahlert und Dr. med. Hendrik Sager für die freundschaftliche und herzliche Arbeitsatmosphäre und die einmalige

Unterstützung und Motivation, besonders in der Endphase dieser Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön gilt Victoria Kayser, die mich durch die Dissertation begleitet hat und es immer wieder geschafft hat, mich in die Natur zu locken.

Zuletzt gilt der Dank meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht, mich jederzeit liebevoll unterstützt und immer zu mir gehalten hat. Von Herzen danke ich Thomas Goller für die wertvollen Formatierungstipps und viel mehr noch dafür, auch in Phasen des Zweifels immer an mich geglaubt zu haben.