

Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

(Direktor: Professor Dr. med. M.D. Menger)

**Reduktion der Ischämie-Reperfusion-induzierten
leukozytären Entzündungsreaktion durch
Maslinsäure**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2020

vorgelegt von Julian Berg,

geboren am 26.09.1995 in Saarlouis

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Henning Madry

Tag der Promotion: 24.06.2021

Inhalt

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung.....	4
3.1	Ischämie und Reperfusion.....	4
3.2	Maslinsäure.....	9
4	Ziel der Studie	12
5	Material und Methoden	13
5.1	Chemische und biologische Reagenzien.....	13
5.2	Antikörper.....	14
5.3	Zelluläre Untersuchungen	15
5.3.1	Zellkulturen	15
5.3.2	Hypoxie und Reoxygenierung	15
5.3.3	Water-soluble tetrazolium-1 Assay.....	15
5.3.4	Laktat Dehydrogenase Assay.....	16
5.3.5	Annexin V/Propidiumiodid Assay.....	16
5.3.6	Western Blot Analyse	17
5.3.7	Durchflusszytometrie.....	17
5.3.8	Immunfluoreszenzmikroskopie	18
5.4	Intravitale Untersuchungen.....	18
5.4.1	Tiere.....	18
5.4.2	Rückenhautkammermodell.....	19
5.4.3	Versuchsgruppen	21
5.4.4	Ischämie und Reperfusion am Rückenhautkammermodell	21
5.4.5	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	22
5.4.6	Mikrovaskuläre Perfusion	24
5.4.7	Mikrovaskuläre Leukozyten-Endothelzellinteraktion	27
5.4.8	Histologie und Blutzellanalyse	27
5.4.9	Immunhistochemie	27

5.5	Statistische Datenanalyse	28
6	Ergebnisse	29
6.1	Maslinsäure bei Hypoxie und Reoxygenierung <i>in vitro</i>	29
6.1.1	Mitochondriale Aktivität und Viabilität von Endothelzellen	29
6.1.2	Expression endothelialer Adhäsionsproteine	32
6.1.3	Aktivität des NFκB-Signalweges in Endothelzellen	34
6.1.4	Mitochondriale Aktivität und Viabilität von Perizyten	36
6.1.5	Expression von ICAM-1 auf Perizyten	38
6.1.6	Aktivität des NFκB-Signalweges in Perizyten	40
6.2	Maslinsäure bei Ischämie und Reperfusion <i>in vivo</i>	42
6.2.1	Mikrovaskuläre Leukozyten-Endothelzellinteraktion	42
6.2.2	Oxidativer Stress	49
7	Diskussion	51
8	Ausblick und Perspektiven	56
9	Literaturverzeichnis	57
10	Danksagung	63
11	Publikationen	64
11.1	Originalarbeiten	64
11.2	Kongressbeiträge	64
12	Lebenslauf	65

1 Zusammenfassung

Ischämie und Reperfusion (I/R) induzieren eine entzündliche Gewebereaktion. Diese führt zu einer verstärkten Leukozyten-Endothelzellinteraktion im Mikrogefäßsystem, die durch verschiedene Schritte (Rollen der Leukozyten entlang des Endothels, Adhärenz und Transmigration der Leukozyten über die endotheliale Barriere hinweg in das entzündete Gewebe) gekennzeichnet ist. Verantwortlich sind Hypoxie-induzierte Signalwege. Sie regulieren Transkription und Expression endothelialer Adhäsionsproteine in Endothelzellen und Perizyten.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Phytosubstanz Maslinsäure (MA) diese zellulären Mechanismen und dadurch die Leukozyten-Endothelzellinteraktion im I/R-Modell reduzieren kann. Die Untersuchung erfolgte in zwei Abschnitten. Im ersten Abschnitt wurden die Auswirkungen der MA auf Endothelzellen und Perizyten unter Bedingungen der Hypoxie und Reoxygenierung (H/R) *in vitro* untersucht. Im zweiten Abschnitt wurde der Effekt von MA auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktion im Tiermodell unter I/R-Bedingungen analysiert.

Mitochondriale Aktivität und Zellviabilität MA-inkubierter Endothelzellen und Perizyten wurden durch einen *Water-soluble tetrazolium (WST)-1 Assay*, einen *Laktat Dehydrogenase (LDH) Assay* sowie einen Annexin V/Propidiumiodid (PI) Assay untersucht. Die Wirkung von MA auf die H/R-induzierte Expression von E-Selektin, *intercellular adhesion molecule (ICAM)-1* und *vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1* wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blot Analyse erfolgte die subzelluläre Lokalisation von p65, einem wichtigen Bestandteil des *nuclear factor kappa B (NFκB)*-Signalweges. Die Leukozyten-Endothelzellinteraktion unter I/R-induzierter Entzündung wurde in MA- sowie Vehikel-behandelten Balb/c Mäusen untersucht. Als Modell wurde die Rückenhautkammer (RHK) verwendet. Die Quantifizierung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion erfolgte mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (IFM) und Immunhistochemie.

MA beeinflusste die Zellviabilität *in vitro* nicht. Hingegen wurde durch MA die mitochondriale Aktivität in Endothelzellen und Perizyten signifikant reduziert. Durch ihre inhibitorische Wirkung auf den NFκB-Signalweg supprimierte MA den Expressionsanstieg endothelialer Adhäsionsproteine auf Endothelzellen und Perizyten. *In vivo* bestätigte sich in post-ischämischem Gewebe MA-behandelter Mäuse eine signifikante Reduktion adhärenter und transmigrierter Leukozyten im Vergleich zu Vehikel-behandelten Mäusen. Zusätzlich konnte MA durch ihr antioxidatives Potential Zellen vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) schützen. Immunhistochemisch zeigten Gewebeproben MA-behandelter Mäuse in der 8-Hydroxydesoxyguanosin (OHdG)-Färbung deutlich weniger 8-OHdG-positive Zellen.

Dies zeigt, dass der oxidative DNA-Schaden in MA-behandelten im Vergleich zu Vehikel-behandelten Mäusen geringer ist.

Zusammenfassend kann MA durch ihren inhibitorischen Einfluss auf den NFκB-Signalweg die Hypoxie-induzierte Expression endothelialer Adhäsionsproteine signifikant vermindern. Entsprechend bewirkt MA *in vivo* eine signifikante Reduktion der I/R-induzierten Leukozyten-Endothelzellinteraktion sowie der Leukozytentransmigration.

Daher könnte MA ein attraktiver Therapieansatz zur Verhinderung des I/R-Schadens darstellen.

2 Summary

Ischemia and Reperfusion (I/R) induces an inflammatory tissue reaction. It causes increased microvascular rolling, adherence and transmigration of leukocytes. These steps are mediated by hypoxia-triggered signaling pathways, which upregulate the expression of adhesion molecules on endothelial cells and pericytes.

The present study analyzed, whether the phytochemical maslinic acid (MA) is capable of reducing the leukocyte-endothelial cell interaction after I/R. For this purpose, cell viability and mitochondrial activity of MA-exposed endothelial cells and pericytes were assessed by water-soluble tetrazolium (WST)-1 and lactate dehydrogenase (LDH) assays as well as Annexin V/propidium iodide (PI) stainings. The effects of MA on hypoxia and reoxygenation (H/R)-induced expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 were determined by flow cytometry. The subcellular localization of the *nuclear factor kappa B* (NFκB) subunit p65 was analyzed by immunofluorescence microscopy and Western blotting. *In vivo*, mouse dorsal skinfold chambers were prepared to assess the effect of MA on I/R-induced leukocytic inflammation. The analysis was made by intravital fluorescence microscopy (IFM) and immunohistochemistry.

The results demonstrate that MA did not affect viability but suppressed the mitochondrial activity of endothelial cells and pericytes. Furthermore, MA reduced adhesion molecule expression on endothelial cells and pericytes. This was due to an inhibitory action on NFκB signaling. *In vivo*, MA significantly reduced the numbers of adherent and transmigrated leukocytes in post-ischemic tissue when compared to vehicle-treated controls. In addition, MA decreased the number of 8-oxodeoxyguanosine (OHdG)-positive cells in the skinfold chamber tissue, indicating that MA inhibits reactive oxygen species (ROS) formation, which are responsible for oxidative DNA damage.

In conclusion, MA is capable of decreasing hypoxia-induced expression of endothelial adhesion proteins by inhibition of the NFκB-pathway. Further, MA diminishes the number of adherent and transmigrated leukocytes *in vivo* after I/R.

Hence, MA may represent an attractive compound for the development of a novel therapeutic approach against I/R-induced inflammation.

3 Einleitung

3.1 Ischämie und Reperfusion

Blutgefäße sind essenziell für das Funktionieren sämtlicher Organsysteme. Nahezu jedes Gewebe wird mit Blut versorgt, ausgenommen weniger Gewebearten, beispielsweise das Knorpelgewebe. Verantwortlich ist das Gefäßsystem für den Transport von Sauerstoff sowie Nährstoffen zu den Körperzellen. Grundlegend werden drei Arten von Blutgefäßen unterschieden. Arterien befördern sauerstoffreiches Blut vom Herzen in die Peripherie. In den Kapillaren findet der Austausch von Gasen und Nährstoffen statt. Venen dagegen sammeln sauerstoffarmes Blut und leiten es in Richtung Herz zurück. Im weiteren Gefäßverlauf zur Peripherie hin verringern die Arterien ihren Durchmesser sukzessive. Die ab einem Durchmesser von $< 100\mu\text{m}$ als Arteriolen definierten Gefäße münden in die Kapillaren. Ihr Durchmesser beträgt $5\text{-}10\mu\text{m}$. Postkapillär fließt das sauerstoffarme Blut über Venolen in die als Kapazitätsgefäße charakterisierten Venen und schlussendlich wieder zum Herzen zurück. Histologisch bestehen die Kapillaren aus Endothelzellen sowie einer Basalmembran. Diese sind von wenig differenzierten, kontraktilen Bindegewebszellen, den Perizyten, umgeben, zu deren Hauptaufgaben das Stützen und die Stabilisation der kapillären Gefäßwand zählen. Über einen kontraktilen Charakter können Perizyten die Durchblutung der Kapillaren regulieren (Murray et al., 2017). Die Gefäßwände von Arterien und Venen hingegen lassen eine Dreischichtung erkennen (*Abbildung 1*). Eine Bindegewebschicht, die Adventitia, verankert das Gefäß im umliegenden Gewebe. Als Media wird die aus glatten Muskelzellen bestehende mittlere Schicht bezeichnet. Sie ist maßgeblich für die Regulation der Gefäßweite verantwortlich. Die Intima als innere Schicht wird von den Endothelzellen gebildet (Lüllmann-Rauch, Paulsen, 2012). Diese kleiden die Oberfläche des Gefäßlumens aus.

Die Unterbrechung der arteriellen Gewebepfusion durch Gefäßverschluss, wie beispielsweise bei einem akuten Myokardinfarkt (akutes Koronarsyndrom, ACS), zieht einen gestörten Transport von Sauerstoff und Nährstoffen nach sich und hat gravierende zelluläre Funktionseinschränkungen sowie Gewebeschäden zur Folge. Mit eintretendem Sauerstoffmangel, der Hypoxie, läuft die Glykolyse unter anaeroben Bedingungen ab. Dadurch reduziert sich ihre Energieausbeute (Rassow, 2016a). Dieser Zustand ist als Ischämie definiert (aus dem Altgriechischen: ἴσχω - ich hindere und τὸ αἷμα - das Blut). Mit Beseitigung der Gefäßokklusion wird der Blutfluss (Reperfusion) wiederhergestellt, wodurch das Gewebe wieder mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt wird.

Unter hypoxischen Bedingungen werden in Endothelzellen bestimmte Signalkaskaden aktiviert. Heinicke et al. (Heinicke et al., 2002) zeigten, dass der heterodimere Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF)-1 hierbei eine übergeordnete Funktion übernimmt. (HIF)-1 setzt sich aus einer α - sowie einer β -Untereinheit zusammen. Während unter normoxischen

Bedingungen die α -Untereinheit proteasomal abgebaut wird, führt die Hypoxie zu einer Stabilisierung des Transkriptionsfaktors. Dadurch werden proinflammatorische Signalkaskaden aktiviert, welche die Expression proangiogener Gene, wie dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF), induzieren.

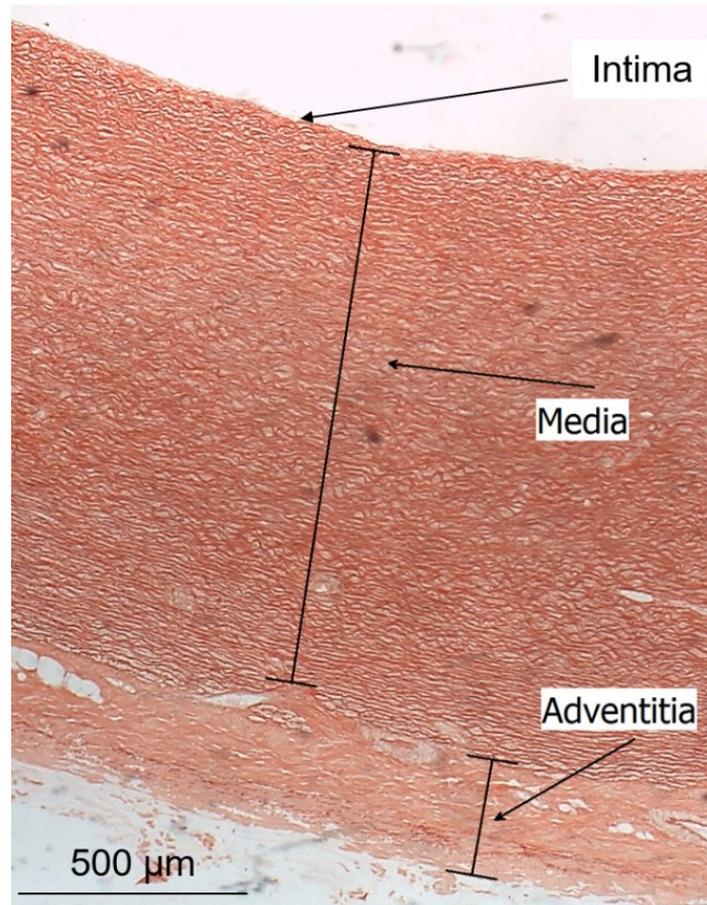


Abbildung 1: Histologischer Querschnitt einer humanen Aorta. Zu erkennen sind die drei Schichten: Intima, Media und Adventitia. Maßstab = 500µm (eigene Aufnahme, studentischer Kurs für mikroskopische Anatomie, Universität des Saarlandes, 2014).

Neben Faktoren der HIF-1-Familie spielt auch der *nuclear factor kappa B* (NFκB)-Signalweg unter hypoxischen Bedingungen eine entscheidende Rolle. Dieser besteht aus mehreren Proteinen, worunter sich die Transkriptionsfaktoren p65 sowie p50 befinden (*Abbildung 2*). Im Zytosol sind diese an den inhibierenden Faktor *inhibitory kappa B* (IκB) gebunden (Chen, Ghosh, 1999; Gilmore, 2006). Durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine wird die IκB-Kinase (IKK) aktiviert (Wang et al., 2001). Sie ist für die Phosphorylierung und Degradation des IκB-Komplexes verantwortlich, wodurch der Transkriptionsfaktor p65 in den Nukleus transloziert und dort die Transkription von Proteinen wie den Adhäsionsproteinen E-Selektin, *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 sowie *vascular adhesion molecule* (VCAM)-1 initiiert (Hayden, Ghosh, 2008).

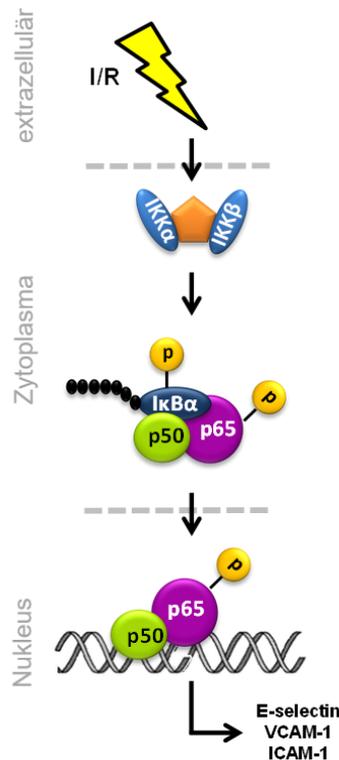


Abbildung 2: Der NFκB-Signalweg. Nach Phosphorylierung und Degradation des IκB-Komplexes erfolgt die Translokation des p65-Komplexes in den Nucleus. Dort wird die Transkription für die endothelialen Adhäsionsproteine initiiert (modifiziert nach E. Ampofo).

Zudem führt die Aktivierung des NFκB-Signalweges zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und rekrutiert auf diese Weise Leukozyten in das entzündete Gewebe.

Der als Leukozyten-Endothelzellinteraktion bezeichnete Prozess gliedert sich in die folgenden vier Schritte (*Abbildung 3*). Initial kommt es zum Kontakt zwischen aktivierten Endothelzellen und Leukozyten. Dieser Kontakt wird vermittelt durch Selektine, einer Gruppe von Transmembranproteinen. Es werden drei Arten von Selektinen unterschieden: E-, P- sowie L-Selektin. Während aktivierte Endothelzellen E- sowie P-Selektin exprimieren, besitzen Leukozyten L-Selektin und Thrombozyten P-Selektin auf ihren Oberflächen (Mcever, 2015). Durch die Interaktion von E-Selektin mit L-Selektin haften die Leukozyten an der Endotheloberfläche. Diese Bindung ist allerdings so schwach, dass ein Rollen entlang des Endothels noch möglich ist. Die sich anschließende Phase wird daher als *Rolling* bezeichnet (Kunkel, Ley, 1996; Langer, Chavakis, 2009; Nolte et al., 1994). In der Nähe des geschädigten Gewebes wird die Bindung verstärkt. Die Expression der endothelialen Membranproteine *intercellular adhesion molecule (ICAM)-1* und *vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1* führt zur Adhäsion der Leukozyten an den Endothelzellen. Diese Adhäsionsproteine zählen zur Gruppe der Immunglobuline und interagieren bei diesem Vorgang mit den leukozytären Integrinen *lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1* sowie *macrophage antigen*

(Mac)-1 (Anbarasan et al., 2015). Schließlich transmigrieren die Leukozyten über die endotheliale Barriere in das extravasale Zielgewebe.

Neben aktivierten Endothelzellen sind auch Perizyten an der Transmigration beteiligt. Die Sekretion von Zytokinen im Rahmen einer Inflammation führt zu verstärkter Adhärenz der Leukozyten an Perizyten (Pieper et al., 2013). Dabei zeigte sich, dass aktivierte Perizyten unter hypoxischen Bedingungen ebenfalls den NFκB-Signalweg induzieren und ICAM-1 exprimieren (Proebstl et al., 2012; Stark et al., 2013).

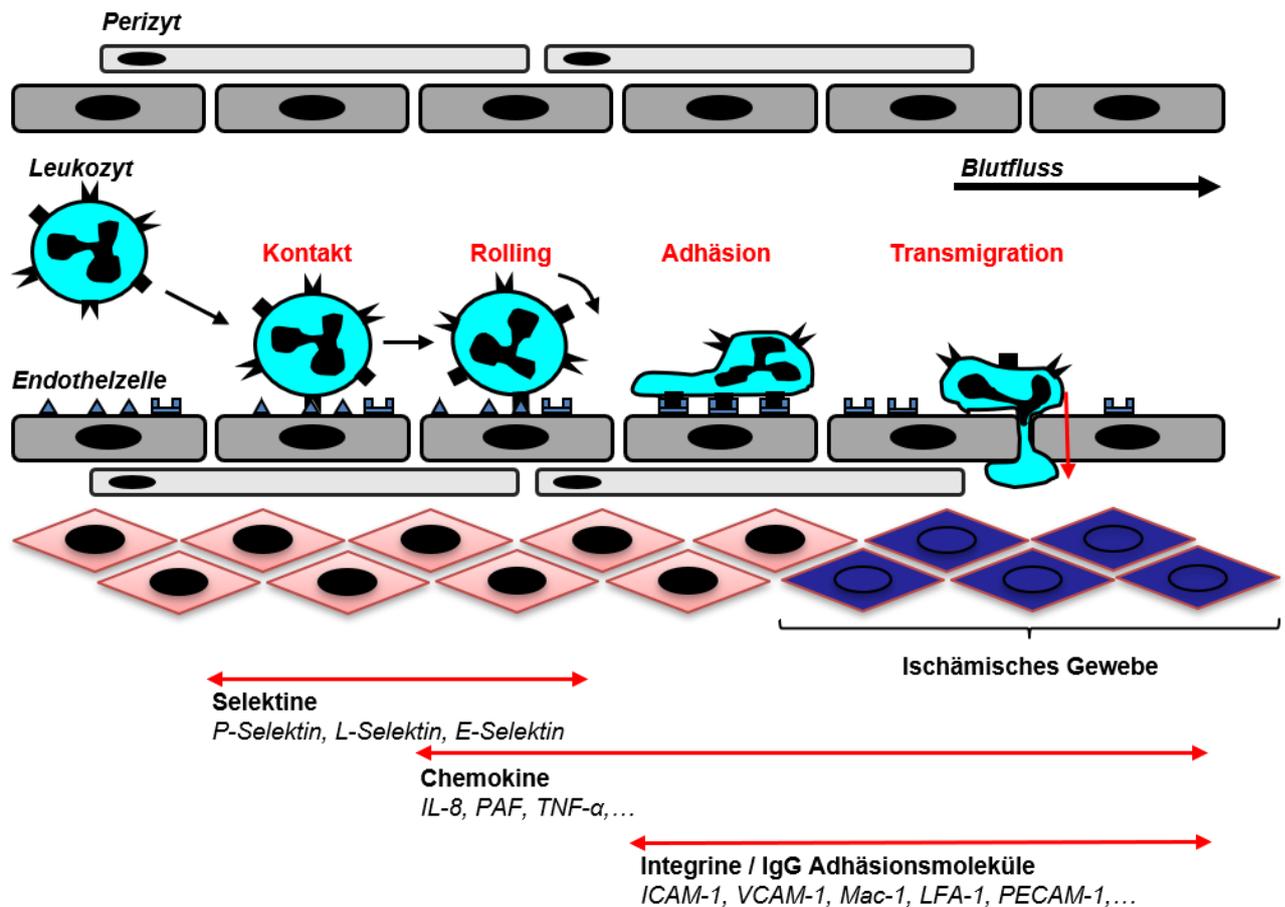


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion. Für jeden Schritt ist die Expression spezifischer Adhäsionsproteine notwendig (modifiziert nach E. Ampofo).

Die Reperfusion führt in Endothelzellen und Perizyten zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) (Garlick et al., 1987). ROS, zu denen beispielsweise das Superoxidradikal zählt, besitzen ein freies Elektron und sind deshalb sehr reaktionsstark (Rassow, 2016b). Sie können die DNA schädigen, wodurch dann der Vorgang der Apoptose induziert werden kann. Dies geschieht wiederum über Aktivierung des NFκB-Signalweges, was auch eine inflammatorische Reaktion hervorruft und Zytokine freisetzt (Bender, Martinou, 2013; Dan Dunn et al., 2015). NO wird als wichtiger physiologischer

Vasodilatator (Li, Forstermann, 2000; Li et al., 2002) durch die NO-Synthasen (NOS) gebildet. In Endothelzellen wird die endotheliale NOS (eNOS), eine der drei Isoformen, exprimiert und ist unter physiologischen Bedingungen für den größten Teil an NO in den Gefäßen verantwortlich (Forstermann, Sessa, 2012; Forstermann et al., 2017). Ihre Expression wird durch Scherkräfte des Blutstroms an den Gefäßwänden sowie durch Faktoren wie VEGF und Acetylcholin reguliert (Fleming, 2010). NO wiederum reduziert die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 (De Caterina et al., 1995; Gauthier et al., 1995; Tsao et al., 1996) und vermindert so indirekt die Leukozyten-Endothelzellinteraktion (Xia et al., 2017). Motterlini et al. (Motterlini et al., 1996) konnten zeigen, dass NO für eine erhöhte Aktivität der Hämoxxygenase (HO)-1 verantwortlich ist. Die HO-1 zählt zu den antioxidativen Enzymen, katabolisiert das Häm-Molekül und protektiert die Zelle vor oxidativem Stress. Weiterhin schützen Antioxidantien wie Glutathion vor ROS. Sie gehören der Gruppe körpereigener Antioxidantien an und reduzieren in einer Reduktions-Oxidations-(RedOx)-Reaktion die ROS, die daraufhin ihre Reaktionsbereitschaft verlieren. Durch die Reperfusion entwickelt sich ein Ungleichgewicht zwischen verstärkt anfallenden ROS gegenüber Antioxidantien, was allgemein als oxidativer Stress bezeichnet wird (Lushchak, 2014).

Zur Minimierung des Ischämie-bedingten Gewebeschadens ist eine zeitnahe Rekanalisierung des verschlossenen Gefäßes unabdingbar, welche letztlich interventionell, operativ oder pharmakologisch erfolgen kann. Im Falle eines ACS besteht die interventionelle Therapiemöglichkeit durch eine Katheter-gestützte Intervention (perkutane Koronarintervention, PCI). Dabei wird über einen arteriellen Zugang ein Katheter in das verschlossene Gefäß eingeführt. Auf diese Weise kann entweder ein Thrombus aspiriert und/oder im Bereich des Verschlusses ein Stent implantiert werden. Dieser rekanalisiert das verschlossene Gefäß und gewährleistet die Reperfusion. Eine chirurgische Therapieoption besteht in Form der Bypass-Operation, bei der körpereigene Gefäße zur Überbrückung der Stenose oder des Verschlusses dienen (Laukkanen et al., 2017). Dem gegenüber steht die pharmakologische Primärtherapie durch eine Fibrinolyse. Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (*European Society of Cardiology*, ESC) empfiehlt diese Therapieoption bei ACS, sofern die voraussichtliche Zeit zwischen Diagnosestellung und erfolgreicher Rekanalisation durch PCI 120min überschreitet (Ibanez et al., 2017).

Während die Revaskularisation eine sehr wichtige Therapiesäule in der klinischen Behandlung der Ischämie darstellt, existiert nach heutigem Forschungsstand bislang keine einheitliche Empfehlung zur Therapie des Reperfusionsschadens. Auf Grund der steigenden Relevanz dieses Themenkomplexes setzen sich vermehrt Studien mit dieser Thematik auseinander und orientieren sich an unterschiedlichen Strategien. Beispielsweise untersuchten Shan et al. (Shan et al., 2010) am Tiermodell die Auswirkungen eines antioxidativ wirkenden Proteins auf die postischämische neurologische Symptomatik nach Rückenmarkinfarkt. Sie zeigten, dass

eine vermehrte Aktivität von Antioxidantien vor Ischämie und Reperfusion (I/R)-induzierter Apoptose schützt. Einen anderen Ansatz verfolgten Huang et al. (Huang et al., 2015). Ihre Studie belegt, dass der I/R-Schaden durch Induktion einer Hypothermie gelindert werden kann. Die Vielfalt der experimentellen Therapieansätze unterstreicht dabei den bislang ausbleibenden Durchbruch in klinischen Studien (Binder et al., 2015).

3.2 Maslinsäure

Aus einigen Überlieferungen ist bekannt, dass viele antike Hochkulturen bereits um die heilsame Wirkung pflanzlicher Stoffe wussten. Die als Phytotherapeutika (altgriechisch: *το φυτό* - die Pflanze) bezeichnete Substanzgruppe beschreibt von Pflanzen synthetisierte Stoffe. Einige dieser Substanzen finden auf dem Gebiet der alternativen Medizin breite Anwendung (Lüllmann et al., 2016). Beispielsweise wird Johanniskraut als phytotherapeutisches Mittel gegen Depressionen oder Digoxin als Zweitlinienmedikament bei Herzinsuffizienz eingesetzt. Da das breite Wirkspektrum dieser Substanzen keineswegs vollständig verstanden ist, kommt den Phytotherapeutika ein besonderes pharmakologisches Interesse zu. Vor allem auf dem Gebiet kardiovaskulärer Erkrankungen wird der mediterranen Kochweise, zu deren Grundelementen die Olive gezählt wird, eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen (Keys, 1995). Auf Grund ihrer antiinflammatorischen Wirkung stellt die besonders in der Olivenrinde aber auch in einigen medizinischen Kräutern, essbaren Obst- und Gemüsesorten vorkommende Maslinsäure (MA) (Yap, Lim, 2015) einen interessanten pharmakologischen Ansatz gegen den I/R-Schaden dar.

Die MA (*Abbildung 4*) gehört zur Gruppe der pentazyklischen Triterpenoide und kann azyklisch, monozyklisch bis hin zu hexazyklisch vorliegen (Xu et al., 2004). Ihr werden zahlreiche protektive Eigenschaften, wie antiinflammatorische (Huang et al., 2011; Marquez Martin et al., 2006), antioxidative (Montilla et al., 2003) und kardioprotektive Aktivität (Hussain Shaik et al., 2012) zugesprochen.

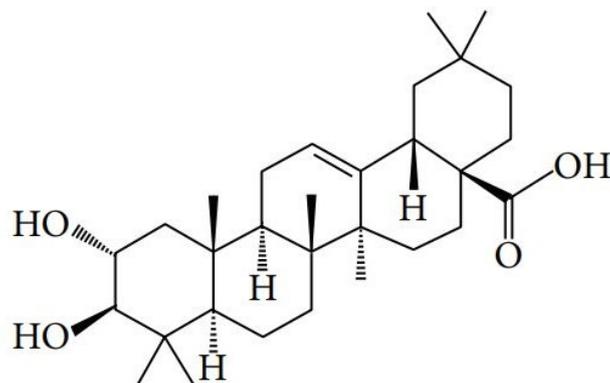


Abbildung 4: Strukturformel der Maslinsäure. Darstellung in der pentazyklischen Form (Yap, Lim, 2015).

Einige Studien konnten zeigen, dass MA die Proliferationsrate von Tumorzellen reduziert (Juan et al., 2008). Ursächlich hierfür ist das Eingreifen der MA in den Zellzyklus, das zu einem G0/G1-Arrest führt (Reyes et al., 2006). Daher ist MA Bestandteil zahlreicher onkologischer Studien (Li et al., 2010; Lin et al., 2018; Park et al., 2013; Thakor et al., 2017).

Neben dieser antiproliferativen Wirkung besitzt MA auch eine antiinflammatorische und antioxidative Wirkung. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass MA die Degradation des Faktors I κ B inhibiert (Abbildung 5). Dadurch unterbleiben sowohl die Translokation von p65 in den Nukleus als auch die Expression von NF κ B-abhängigen Zielgenen (Li et al., 2010). Die antioxidative Wirkung von MA beruht auf einer verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2). Dies führt zu einer vermehrten Expression der HO-1 und ist für die antioxidative Wirkung der MA verantwortlich (Qin et al., 2014).

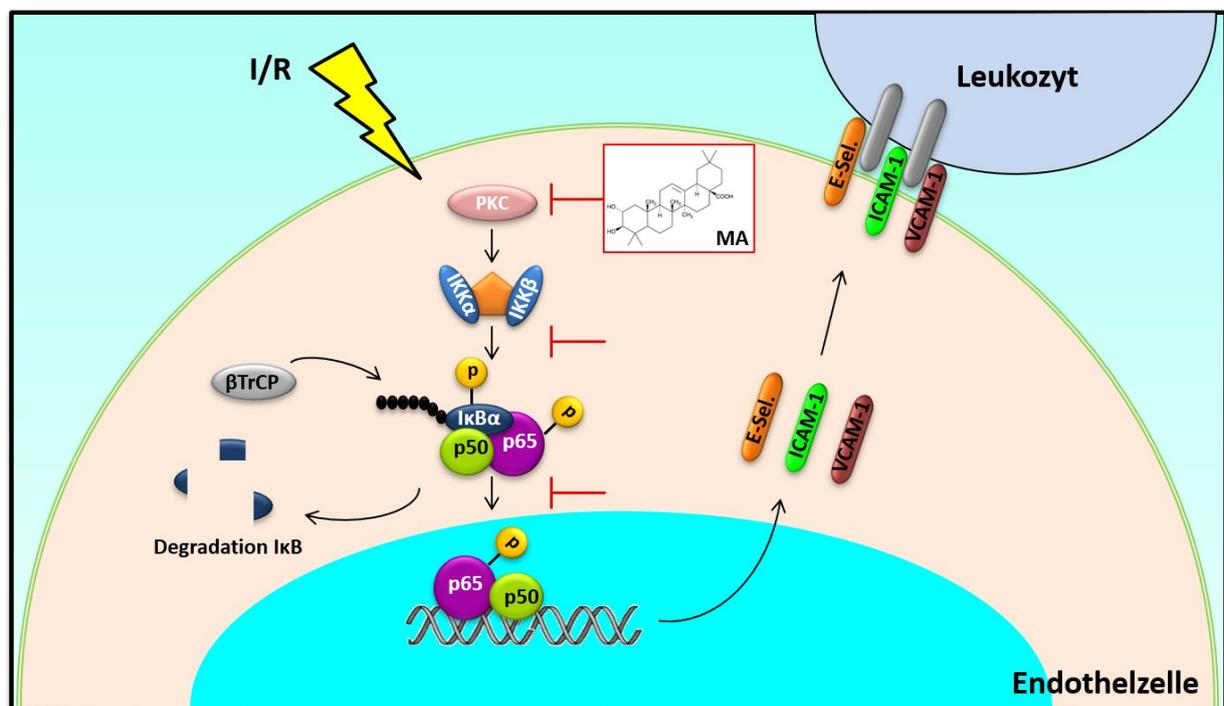


Abbildung 5: Einfluss der MA auf den NF κ B-Signalweg. MA verhindert sowohl die Degradation von I κ B als auch die Translokation von p65 in den Nukleus (modifiziert nach E. Ampofo).

Wie eingangs bereits erwähnt werden durch I/R bestimmte Signalkaskaden stimuliert, die eine inflammatorische Reaktion hervorrufen. Während ROS die Apoptose in geschädigten Zellen induzieren, führt die Aktivierung des NF κ B-Signalweges zu einer Expressionssteigerung endothelialer Adhäsionsmoleküle und somit zu einer Induktion der Leukozyten-Endothelzellinteraktion. Als Konsequenz nimmt die Anzahl adhärerender sowie transmigrierender Leukozyten deutlich zu. Leukozyten gelten als Immunantwort im geschädigten Gewebe und fördern durch Freisetzung von Zytokinen die Inflammation. Es ist

daher von Interesse, durch Inhibition der Leukozyten-Endothelzellinteraktion den I/R-Schaden zu minimieren. Für diese Zielsetzung scheint die MA ein attraktiver Kandidat. Auf Grund ihrer antiinflammatorischen Wirkung inhibiert die MA den NFκB-Signalweg auf mehreren Ebenen. Vermehrt anfallende ROS kann sie durch ihre antioxidativen Eigenschaften eliminieren und schützt Zellen vor ROS-induzierter Apoptose.

4 Ziel der Studie

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, die Auswirkungen der MA auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktion unter I/R-Bedingungen zu analysieren. Die Studie ist in zwei Abschnitte gegliedert. Zunächst wurde der Einfluss von MA auf Zellen unter Bedingungen der Hypoxie und Reoxygenierung (H/R) *in vitro* untersucht. Anschließend erfolgte die Analyse des Einflusses von MA *in vivo* nach I/R.

Im Rahmen dieser beiden Studienabschnitte wurden folgende Arbeitshypothesen erstellt und untersucht:

1. MA reduziert die H/R-induzierte Expression von endothelialen Adhäsionsproteinen
2. MA reduziert die H/R-induzierte Expression von perizytären Adhäsionsproteinen
3. MA reduziert die Aktivität des NFκB-Signalweges
4. MA reduziert die I/R-induzierte Leukozyten-Endothelzellinteraktion *in vivo*
5. MA reduziert die I/R-induzierte Transmigration von Leukozyten *in vivo*
6. MA erhöht die Expression antioxidativer Proteine und reduziert die ROS-induzierten DNA-Schäden

5 Material und Methoden

5.1 Chemische und biologische Reagenzien

Tabelle 1: Name und Bezugsquelle verwendeter Reagenzien

Endothelzell-Basal-Medium	PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Perizyten-Wachstumsmedium	
Humane Dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC)	
humane plazentäre Perizyten	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit niedrigem Glucosegehalt	Lonza GmbH (Köln, Deutschland)
Humanes TNF- α	Provitro AG (Berlin, Deutschland)
Maslinsäure	Santa Cruz Inc. (Heidelberg, Deutschland)
Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)- Dextran 150 000 (5%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)
Rhodamin 6G	
Peroxidase-markiertes Streptavidin	
Mayers Hämalaunlösung	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
3-Amino-9-ethylcarbazol	Abcam plc (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Ketamin (Ursotamin)	Pharmacia GmbH (Erlangen, Deutschland)
Xylazin (Rompun)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, Deutschland)

5.2 Antikörper

Tabelle 2: Bezeichnung und Bezugsquelle verwendeter Antikörper

Anti-p65 (sc-372)	Santa Cruz Inc. (Heidelberg, Deutschland)
Anti-PDGFR- β (sc-432)	
Anti- β -Aktin (sc-517582)	
Anti-NG2 (sc-166251)	
Anti-CD54 (ICAM-1; 555511)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Anti-CD62E (E-Selektin; 551145)	
Anti-CD106 (VCAM-1; 555647)	
Isotyp IgG1- κ Kontrolle (555749)	
Peroxidase-markierte anti-Kaninchen Antikörper (NIF 824)	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Peroxidase-markierte anti-Maus Antikörper (NIF 825)	
Anti-HO-1 (ADI-SPA-895)	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
Anti- α -Tubulin Antikörper (ab56676)	Abcam plc (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Anti-Myeloperoxidase (MPO) (ab9535)	
Anti-ICAM-1 (ab124760)	
Anti-8-OHdG (ab10802)	
Anti-eNOS (ab5589)	
Anti-VCAM-1 (ab134047)	
Anti-CD68 (ab1252212)	
sekundär biotinylierte Ziegen-Anti-Kaninchen Antikörper (ab64256)	

5.3 Zelluläre Untersuchungen

5.3.1 Zellkulturen

Die Kultivierung von HDMEC sowie humanen plazentären Perizyten erfolgte bei 37°C unter einer 95%/5% (vol/vol) befeuchteten Mischung aus Luft und CO₂. Die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz in einem Verhältnis von 1:3 passagiert. Für alle Experimente wurden konfluente Zellen zwischen der 3. und 7. Passage verwendet.

5.3.2 Hypoxie und Reoxygenierung

HDMEC und Perizyten wurden mit MA in den Konzentrationen 10µM, 20µM und 40µM und DMSO (Vehikel) oder nur DMSO kultiviert. Die Inkubation erfolgte in DMEM (niedrige Glucose ohne fetales Kälberserum) für 16h unter hypoxischen Bedingungen (95% N₂, 4% CO₂ und 1% O₂). Anschließend wurde das Medium durch Endothelzell-Basal-Medium oder Perizyten-Wachstumsmedium ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 4h oder 24h unter Normoxie (95% Luft und 5% CO₂) inkubiert, abhängig von den durchgeführten Analysen (*Abbildung 6*).

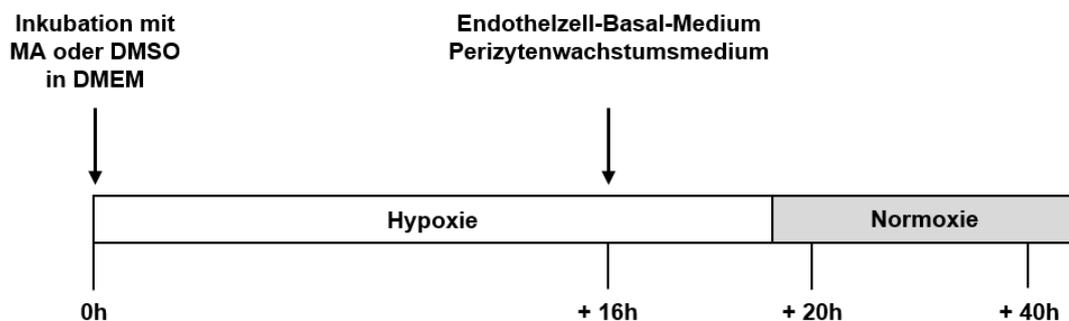


Abbildung 6: Schematische Darstellung des H/R-Versuchsprotokolls *in vitro*.

5.3.3 Water-soluble tetrazolium-1 Assay

Ein *Water-soluble tetrazolium* (WST)-1 Assay (Roche, Mannheim, Deutschland) wurde zur Evaluation der mitochondrialen Aktivität der HDMEC sowie Perizyten gemäß Herstelleranleitung verwendet. Die Zellen wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte kultiviert und mit definierten Konzentrationen MA und DMSO oder nur DMSO in ein Gesamtvolumen von 100µl für 5h versetzt. Im Anschluss erfolgte nach Hinzufügen von 10µl WST-1 Reagenz pro well die Inkubation für 1h unter 37°C.

Grundlage ist die Metabolisierung von Tetrazoliumsuccinat durch die mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase zu dunkelrotem Formazan. Die Messung erfolgte durch ein Mikrotitrierplattenphotometer über Bestimmung der Absorption bei 480nm. Als Referenz diente 620nm. Die Werte wurden auf Nullwerte bezogen (wells ohne Zellen) (Ampofo et al., 2015).

5.3.4 Laktat Dehydrogenase Assay

Ein Laktat Dehydrogenase (LDH) Assay (Cytotoxicity Detection KitPLUS, Roche) wurde zur Analyse der Zellviabilität von HDMEC sowie Perizyten gemäß Herstelleranleitung verwendet und soll eine zytotoxische Wirkung der MA ausschließen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen zunächst ähnlich dem WST-1 Assay in eine 96-well Mikrotiterplatte kultiviert und mit den definierten Konzentrationen MA und DMSO oder nur DMSO in ein Totalvolumen von 100µl für 5h versetzt. Im Anschluss wurde auf jedes well 100µl LDH-Reaktionslösung pro 100µl Medium hinzugefügt. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurde nach Hinzufügen von 50µl Stopplösung die Absorption bei 492nm mit 620nm Referenz bestimmt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 0,1% H₂O₂ behandelt. Die Messung erfolgte durch ein Mikrotitrierplattenphotometer. Die Werte wurden auf Nullwerte bezogen (wells ohne Zellen) (Ampofo et al., 2015).

5.3.5 Annexin V/Propidiumiodid Assay

Apoptotische sowie nekrotische Zellen wurden durch ein Annexin V/Propidiumiodid (PI) *detection kit* (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) erfasst. Nach H/R wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit Annexin V und PI für 30min inkubiert. Bei vitalen Zellen kann weder Annexin V noch PI nachgewiesen werden (*Abbildung 7*). Zellen in der frühapoptotischen Phase exprimieren Phosphatidylserin auf ihrer Membranaußenseite. Durch die Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin können diese Zellen erfasst werden. Bei fortgeschrittener Apoptose und auch bei Nekrose wird die Membran zunehmend permeabel. Dies ermöglicht PI durch die Membran in das Zytoplasma einzudringen.

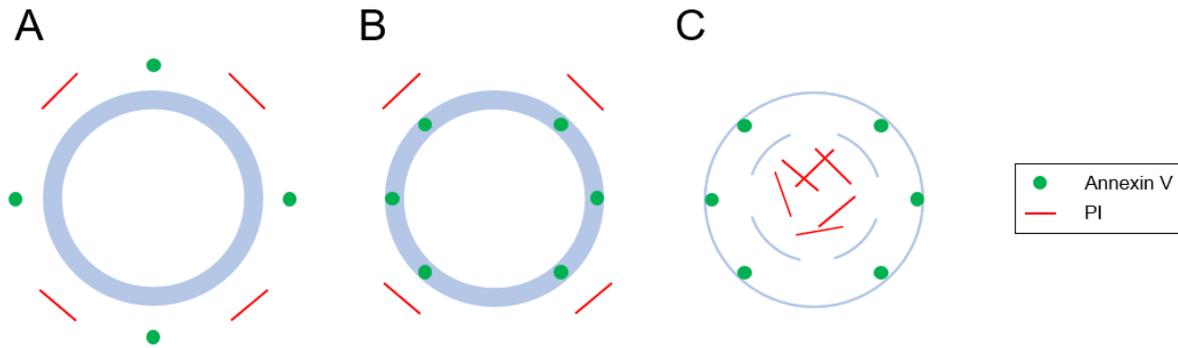


Abbildung 7: Schemazeichnung zur Interpretation eines Annexin V/PI Assays. Vitale Zellen sind Annexin V und PI negativ (A). Zellen in der frühapoptotischen Phase sind Annexin V positiv und PI negativ (B). Zellen in der spätapoptotischen Phase, beispielsweise nekrotische Zellen, sind Annexin V und PI positiv (C).

Die mittlere Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) von 5 000 Zellen wurde in dem FL-1 und FL-2 Kanal eines FACScan Durchflusszytometers (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) unter Verwendung der Software CellQuest analysiert.

5.3.6 Western Blot Analyse

Zunächst wurden zytoplasmatische sowie nukleäre Extrakte aus HMDEC, Perizyten sowie den Zellen aus Gewebeproben der Rückenhautkammer (RHK) gewonnen. Aus den Zellen bzw. dem RHK-Gewebe wurden Proteinextrakte generiert (Kaufmann, Thiel, 2002). Die Proteine der Zellextrakte wurden durch ein 12,5% SDS Polyacrylamidgel getrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran transferiert. Die Membran wurde in 5% Trockenmilch in PBS (0,1% Tween20) für 1h inkubiert und nachfolgend mit den Antikörpern anti-p65, anti-ICAM-1, anti-eNOS, anti-HO-1, anti- β -Aktin, anti- α -Tubulin sowie anti-Nucleolin Antikörpern inkubiert. Diese wurden im Verhältnis 1:500 in PBS (0,1% Tween20) mit 1% Trockenmilch gelöst. Nach Inkubation der Membran mit Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (anti Kaninchen 1:30 000 oder anti-Maus 1:10 000) für 1h, wurde die Proteinexpression mittels *Luminol-enhanced chemiluminescence* (ECL; GE Healthcare) bestimmt.

5.3.7 Durchflusszytometrie

HDMEC und Perizyten wurden unter H/R in Medium mit MA und Vehikel oder nur mit Vehikel kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen in PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,25% (w/v) Trypsin, 0,02% EDTA) für 5min bei 37°C vereinzelt. Die Zellen wurden daraufhin mit Phycoerythrin (PE)-markierten primären Antikörpern gegen E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 und den PE-markierten IgG Kontrollantikörpern für 30min bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und die MFI von 5 000 Zellen im FL-2 Kanal eines FACScan Durchflusszytometers (Becton Dickinson) mit Hilfe der Software CellQuest bestimmt.

5.3.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

HDMEC und Perizyten wurden auf Deckgläser ausgesät und mit den definierten Konzentrationen MA und Vehikel oder ausschließlich Vehikel inkubiert. Nach H/R wurden die Zellen in 3,7% Formalin für 10min fixiert und in PBS (0,2% Triton X-100) für 30min permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Zellen in PBS (2% BSA) für weitere 30min bei Raumtemperatur geblockt. Zur Bestimmung von intrazellulärem p65 wurden die Zellen mit einem anti-p65 Antikörper im Verhältnis 1:50 und einem sekundären anti-Kaninchen Antikörper im Verhältnis 1:250 inkubiert. Zur Identifikation der Perizyten erfolgte die Inkubation mit Antikörpern gegen die spezifischen Oberflächenproteine *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) β und *neural/glial* Antigen (NG)2. Nach Versiegelung mit *Mounting Medium* erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung (BX60; Olympus, Hamburg, Deutschland).

5.4 Intravitale Untersuchungen

5.4.1 Tiere

Die Experimente im Rahmen dieser Studie wurden an Mäusen des Typs Balb/c mit einem Alter von 8-20 Wochen und einem Körpergewicht von 20-30g durchgeführt. Die Tiere stammten aus institutseigener Zucht und wurden in offenen Käfigen in der konventionellen Tierhaltung des Instituts für Klinisch-experimentelle Chirurgie Homburg (Universität des Saarlandes, Deutschland) gehalten. Die Tiere wurden in temperaturkontrollierten Räumen unter einem 12h/12h Tag/Nacht Rhythmus gehalten und hatten jeder Zeit Zugang zu Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) sowie Wasser *ad libitum*. Zur Gewöhnung erfolgte drei Tage vor Operation eine Isolation der Mäuse in Einzelkäfigen. Nach der Operation wurden die Tiere für 72h in einem Wärmeschrank mit einer Raumlufttemperatur von 30°C untergebracht. Alle in dieser Studie durchgeführten Tierexperimente wurden von dem Landesamt für Verbraucherschutz, Abteilung C, Lebensmittel und Veterinärwesen in Saarbrücken, Deutschland unter der Versuchsnummer 15/2014 genehmigt und wurden in Übereinstimmung mit den Europäischen Rechtsvorschriften über Tierschutz (*Guide line* 2016/63/EU) sowie den *Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011) durchgeführt.

5.4.2 Rückenhautkammermodell

Die 2g schwere RHK ist ein Modell zur chronischen Beurteilung von Gefäßstrukturen, Mikrozirkulation und Hämodynamik sowie intravasaler Vorgänge *in vivo*. Sie besteht aus zwei Titanrahmen mit jeweils einem im Durchmesser 11mm großen Beobachtungsfenster (*Abbildung 8 A*). Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die RHK eine genaue Analyse der Interaktionen zwischen Endothelzellen und Thrombozyten (Buerkle et al., 2004) sowie zwischen Endothelzellen und Leukozyten (Laschke et al., 2005). Das Erfassen einer Neovaskularisation hypoperfundierter Gewebe ist ebenfalls möglich. Daraus ergibt sich ein sehr breites Anwendungsspektrum der RHK, das sich von Entzündungsreaktionen bis hin zur Tumorforschung (Vajkoczy et al., 1998) erstreckt. Im Rahmen dieser Studie wurde die RHK zur Analyse der Auswirkungen von MA auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktion unter I/R-Bedingungen verwendet.

Nach Gewichtskontrolle wurden die Mäuse mit dem Narkotikum Ketamin in der Konzentration 75mg/kg und Xylazin, einem α 2-Adrenozeptor-Agonist mit muskelrelaxierender, sedierender sowie analgetischer Wirkung, in der Konzentration 15mg/kg gewichtsadaptiert über eine intraperitoneale (i.p.) Injektion narkotisiert. Vor sowie während der Operation wurde eine ausreichende Narkosetiefe durch regelmäßige Kontrolle der Abwehrreflexe in Form von Muskelfremdreflexen überprüft. Maßgeblich war der Ausfall des Zwischenzehreflexes. Ausgelöst wurde dieser durch wohldosierten Druck auf die Mittelfüße der Mäuse. Um eine Auskühlung unter Narkose zu verhindern, wurden Rotlichtlampen mit ausreichender Distanz aufgestellt.

Für den operativen Eingriff wurden zunächst die Haare im Operationsgebiet auf der Rückenhaut entfernt. Nach grober Kürzung mit Hilfe einer elektrischen Haarschneidemaschine (Contura HS 61, Wella) erfolgte zur Epilierung das Auftragen der Enthaarungscreme asid-med (ASID, Neuschönau, Deutschland). Nach einer Einwirkzeit von 5 bis 10 Minuten wurde diese mit sämtlichen Haaren sorgfältig vom Rücken der Maus entfernt. Haarreste wurden vorsichtig unter warmem Wasser beseitigt. Für die nächsten Schritte wurde die Maus in Bauchlage positioniert. Nach Desinfektion mit Alkohol wurde die Rückenhautfalte angehoben und durch zwei Haltenähte am kranialen sowie kaudalen Rand mit einer Haltevorrichtung verbunden. Dadurch wurde die Haut vertikal in der Medianebene aufgespannt. Durch Gegenlichtkontrolle konnten große Gefäße der Rückenhaut erkannt und bei Präparation geschont werden. Es folgte die Fixierung eines Titanrahmens an der Rückenhaut mit 6 Einzelknopfnähten aus Seide. Im Anschluss wurden die Haltenähte entfernt und die Positionen der basalen Befestigungsschrauben auf der Vorderseite ermittelt. Mit einer Skalpellklinge wurden über den Schrauben befindliche Cutis, Subcutis und Rückenmuskulatur inzidiert und die Befestigungsschrauben vorsichtig von der Rückseite durch die Gewebeschichten geführt. Für

die weitere Präparation wurden diese durch zwei Klemmen fixiert. Unter Gegenlicht wurde die Position des Beobachtungsfensters (Durchmesser: 11mm) bestimmt und auf der vorderen Rückenhaut mit einem Durchmesser von etwa 15mm markiert. Durch eine großzügigere Entfernung des Gewebes kann eine Gewebekompression und resultierende Komplikationen der Mikrozirkulation nach Fixierung des zweiten Titanrahmens verhindert werden.

Die weiteren Schritte wurden in Rechtsseitenlage unter einem Stereo-Operationsmikroskop (M651; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit den Vergrößerungsstufen 6-fach, 10-fach, 25-fach sowie 40-fach durchgeführt. In den folgenden Arbeitsschritten wurde die gesamte Schicht der vorderen Rückenhaut (Cutis, Subcutis, M. panniculus carnosus, subcutanes Fettgewebe sowie M. retractor) operativ entfernt. Die Eröffnung der Cutis erfolgte mit Hilfe einer Hautschere entlang der zuvor eingezeichneten Markierung. Nach Entfernen der Cutis wurde der runde Operationssitus mit einem Durchmesser von 15mm mit NaCl (0,9%) gespült. Mikropinzette und Mikroschere dienten der Entfernung aller restlichen Gewebeschichten der vorderen Rückenhaut sowie der Entfernung des Retraktormuskels der hinteren Rückenhaut. Füllen und regelmäßiges Spülen des Operationssitus mit NaCl (0,9%) erleichterte das Abtrennen der einzelnen Schichten und verschaffte eine gute Übersicht über den Operationssitus. Nach vollständiger Präparation wurden die Fixierungsklemmen an den basalen Befestigungsschrauben gelöst, der zweite Titanrahmen der RHK angebracht und an den drei Schrauben durch Muttern fixiert. Verschlossen wurde das Beobachtungsfenster mit einem Deckglas, das durch einen Sprengring im Titanrahmen fixiert wurde. Am Operationsende stand die RHK in Sagittalebene parallel zur Wirbelsäule (*Abbildung 8 B*). Unmittelbar postoperativ wurde den Mäusen gewichtsadaptiert jeweils 0,1ml NaCl (0,9%) pro 10g Körpergewicht i.p. appliziert. Dadurch konnte der intraoperative Flüssigkeitsverlust abgefangen werden. Während der Aufwachphase wurden die Tiere unter Rotlicht in ihrem Käfig beobachtet. Mit Erreichen eines wachen Vigilanzgrades und Einsetzen von Spontanbewegungen wurden die Tiere in den Wärmeschränk der Tierhaltungsräume gebracht.



Abbildung 8: RHK der Maus. (A) Aufbau einer RHK. 1 Titanrahmen, 2 Beobachtungsfenster mit Deckglas, 3 Sprengring, 4 Halteschrauben. (B) Maus mit RHK. Maßstab = 10mm.

Während der 72h Erholungszeit wurden täglich der neurologische und der körperliche Zustand der Tiere sowie die Rückenhautpräparation kontrolliert. Als Abbruchkriterien für den Versuch galten eine Gewichtsabnahme um mehr als 10% des ursprünglichen Körpergewichtes, ein apathisches Verhalten der Versuchstiere oder aber sichtbare und somit massive Entzündungsreaktionen im Gewebe der RHK.

5.4.3 Versuchsgruppen

Es wurden drei Gruppen mit jeweils 8 Mäusen ($n=8$) gebildet. Die Kontrollgruppe erhielt 100 μ l DMSO (Vehikel). Eine zweite Gruppe wurde mit MA in niedriger Dosierung von 10mg/kg in 100 μ l DMSO untersucht. Die dritte Gruppe erhielt MA in einer Dosis von 20mg/kg in 100 μ l DMSO. Jede Maus erhielt vor Versuchsbeginn zwei Applikationen i.p. (Abbildung 9 A). Die erste erfolgte 19h, die zweite 1h vor Induktion der Ischämie.

Zur Analyse von Gewebeproben der RHK mittels Western Blot nach 3h Ischämie und 3h Reperfusion wurden zusätzlich 6 Tiere operiert und mit Vehikel ($n=3$) oder 20mg/kg MA ($n=3$) 19h sowie 1h vor Ischämie behandelt.

5.4.4 Ischämie und Reperfusion am Rückenhautkammermodell

Zur Untersuchung der Auswirkungen von MA auf die Pathologie von I/R im Gewebe wurde eine Ischämie mit Hilfe eines Druckstempels über einen Zeitraum von 3h induziert (Abbildungen 9 A und C). Dieser mechanische Stempel wurde über die obere Befestigungsschraube an der RHK fixiert. Um eine Narkotisierung und zusätzliche Belastung der Tiere zu vermeiden, wurden die Mäuse in einen seitlich sowie vorne mit Luftlöchern versehenen Plexiglaszylinder geführt. Durch einen schmalen Spalt an der Oberseite ragte die RHK aus dem Zylinder. Nach Fixieren des Stempels an der RHK wurde über eine

Kunststoffplatte in der Form des Kammerfensters wohldosiert Druck appliziert. Zur Vermeidung inhomogener Druckverteilung und lokaler Gewebeschäden wurde zwischen Kunststoffplatte und Haut eine kleine Platte aus Silikongewebe eingelegt, deren Dicke etwa 2mm betrug. Das Gewebe wurde mit langsam steigendem Druck zunehmend gegen das Deckglas gepresst. Bei einem Druck von etwa 40mmHg sistierte in sämtlichen arteriolen, kapillären und venulären Blutgefäßen der Blutfluss, wie die visuelle Kontrolle zeigte (Abbildungen 9 B und C). Zur Beruhigung der Mäuse wurden die Käfige mit einer Decke abgedunkelt. Nach 3h wurde der Stempel wieder entfernt (Abbildung 9 D). Es folgte eine 30-minütige Erholungszeit. Die mikroskopischen Analysen wurden während der Reperfusionphase durchgeführt.

A

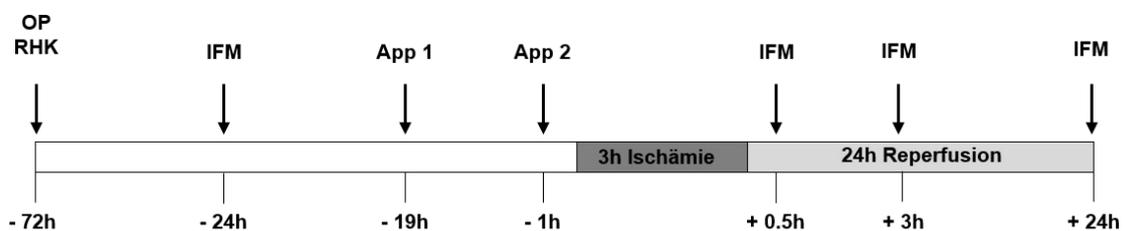


Abbildung 9: A Schematische Darstellung des I/R-Versuchsprotokolls *in vivo*. B-D Gewebe der RHK vor (B), während (C) sowie nach (D) Ischämie. Maßstab = 1mm.

5.4.5 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Durchführung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IFM) (Abbildung 10) wurde ein modifiziertes Axiotech-Mikroskop der Firma Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einer 100W HBO-Quecksilberdampf Lampe verwendet. In den Strahlengang können zwei Filter geschoben werden: Ein blauer Filter mit einer Anregungswellenlänge von 450-490nm und einer Emissionswellenlänge von >515nm sowie ein grüner Filter mit einer Anregungswellenlänge von 530-560nm und einer Emissionswellenlänge von >585nm. Die Aufnahmen wurden mittels einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-Videokamera (FK6990; Lichtempfindlichkeit 10^{-2} lux; Pieper, Schwerte, Deutschland) erfasst und auf einen Monitor

(Trinitron; Sony, Tokyo, Japan) sowie einen DVD-System (DVD-HR775; Samsung, Eschborn, Deutschland) überspielt (Menger et al., 1992) (*Abbildung 10*).

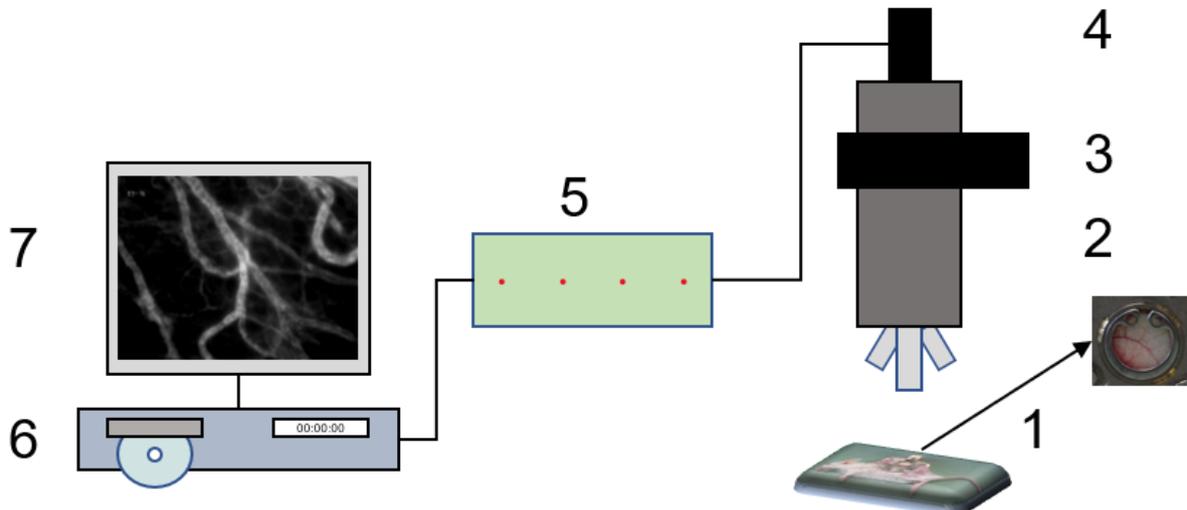


Abbildung 10: Aufbau der IFM. Die RHK der narkotisierten Maus wurde auf einer Plexiglasbühne (1) befestigt und unter dem Mikroskop (2) positioniert. Unter Verwendung eines blauen oder grünen Fluoreszenzfilters (3) erfolgte die Auflichtmikroskopie. Die von der Kamera (4) erfassten Aufnahmen wurden über einen Videotimer (5) an das Aufnahmegerät (6) weitergeleitet. Gleichzeitig wurden die Aufnahmen auf einen Monitor projiziert (7).

Insgesamt wurden an jedem Tier 4 IFM durchgeführt (*Abbildung 9 A*). 24h vor Versuchsbeginn wurde die Kontrollaufnahme durchgeführt. Weitere Untersuchungen folgten 30min, 3h sowie 24h nach Reperfusion. Hierfür wurden die Mäuse mit dem Narkotikum Ketamin (75mg/kg i.p.) und dem Muskelrelaxans Xylazin (15mg/kg i.p.) narkotisiert. Nach Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe wurde die RHK auf einer Plexiglasbühne fixiert. Eine Lösung aus 0,05ml 5% Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-Dextran 150 000 und 0,05ml 0,1% Rhodamin 6G wurden nach Aufsuchen des nasalen Augenwinkels in den retrobulbär befindlichen Venensack injiziert. FITC-Dextran besitzt ein sehr hohes Molekulargewicht (150kDa), verbleibt damit intravaskulär und eignet sich so zur Darstellung des Blutplasmas. Mit Rhodamin 6G können gezielt Leukozyten *in vivo* angefärbt und mikroskopisch analysiert werden.

Zunächst erfolgte die Aufnahme von 9 Kapillarfeldern unter Verwendung des FITC-Dextran-Blaufilters (*Abbildungen 11 A, B*). Anschließend wurden jeweils 8 Venolen mit einem Durchmesser von 20-40µm zuerst im Blaufilter (*Abbildung 11 C*) und danach unter Rhodamin für einen Zeitraum von 30 Sekunden zur Analyse Rhodamin 6G-markierter Zellen im Grünfilter (*Abbildung 11 D*) aufgenommen.

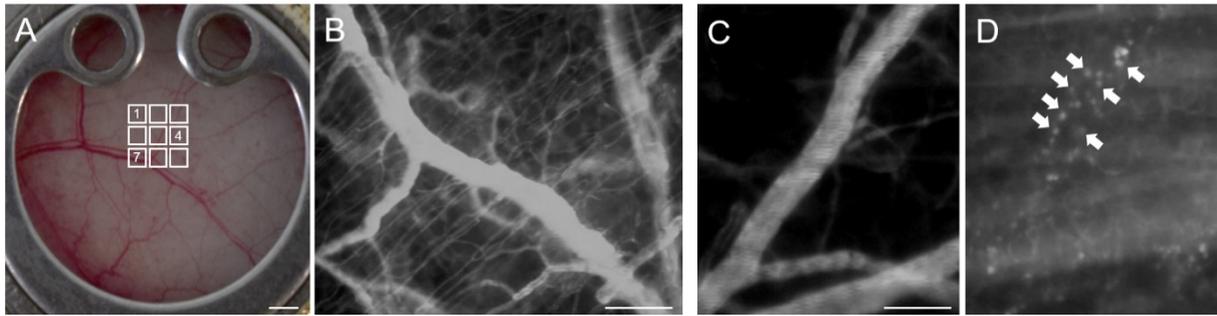


Abbildung 11: A, B Schematische Einteilung der RHK zur Kapillarmikroskopie. Begonnen wurde im linken oberen Feld (weiße Kästchen) entsprechend der Nummerierung (**A**), Maßstab = 1mm. Exemplarische Darstellung eines Kapillarfeldes. Es zeigt sich ein gut perfundiertes Kapillarbett mit venulären Gefäßen im Hintergrund (**B**), Maßstab = 100 μ m. **C, D Analyse venulärer Gefäße.** Zur Analyse der Leukozyten wurden Venolen zunächst mit FITC-Dextran visualisiert. Dies ermöglichte die Bestimmung mikrohämodynamischer Parameter (**C**). Danach erfolgte die Darstellung Rhodamin 6G-markierter Leukozyten im Grünfilter (weiße Pfeile) (**D**). Maßstab = 50 μ m.

5.4.6 Mikrovaskuläre Perfusion

Nach Aufzeichnung auf DVD fand die Analyse der Daten zu einem späteren Zeitpunkt mit dem computergestützten Bildverarbeitungsprogramm CapImage (Dr. Heinrich Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) statt.

5.4.6.1 Gefäßdurchmesser

FITC-Dextran ist ein Molekül mit sehr hohem Molekulargewicht (150kDa). Da es unter physiologischen Bedingungen intravasal verbleibt, ist es ideal zur Darstellung der Gefäßgrenzen. Durch Setzen von Randpunkten orthogonal zum Verlauf der Gefäßinnenwand konnte der Gefäßdurchmesser in μ m ermittelt werden.

5.4.6.2 Blutzellgeschwindigkeit

Mit Hilfe der von Klyscz et al. (Klyscz et al., 1997) entwickelten Line-Shift-Diagramm-Methode konnte die Blutzellgeschwindigkeit in den aufgenommenen Venolen computerassistent analysiert werden. Hierzu wurde eine Linie mit zur Flussrichtung parallelem Verlauf zentral im Gefäßlumen platziert. Das Computerprogramm ermittelte bei Abspielen des Bildträgers für 10s in Echtzeit für jedes Halbbild die Grauwerte entlang der eingezeichneten Messlinie. Die unterschiedlichen Grauwerte wurden in ein Line-Shift-Diagramm übertragen, in dem Grauwertprofile in Abhängigkeit zur aufgenommenen Zeit abgebildet sind. Nach Anfärbung des Blutplasmas mit FITC-Dextran wiesen Blutplasma und korpuskuläre Bestandteile

unterschiedliche Graustufen auf. Diese wurden entlang der Messlinie erfasst und in Form schräger Linien unterschiedlicher Kontraststufen abgebildet. Im Line-Shift-Diagramm wurden die Steigungen der Grauwertlinien ermittelt und so die Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) der Blutzellen errechnet.

5.4.6.3 Mikrovaskulärer Blutfluss

Der mikrovaskuläre Blutfluss, das Produkt aus Blutzellgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser, kann nach Auswertung des Line-Shift-Diagramms ermittelt werden. Es musste bedacht werden, dass die Line-Shift-Diagramm-Methode ausschließlich den zentralen Blutstrom berücksichtigt. Allerdings ist die Flussgeschwindigkeit von Flüssigkeiten bei Passage röhrenförmiger Gebilde im Zentrum eines Lumens höher als in peripheren Bereichen (Baker, Wayland, 1974). Dies machte eine Korrektur durch Differenzierung einer Newtonschen Flüssigkeit von einer nicht-Newtonschen Flüssigkeit zwingend erforderlich. Während Newtonsche Flüssigkeiten durch ein parabolisches Strömungsprofil charakterisiert sind, weisen nicht-Newtonsche Flüssigkeiten auf Grund fehlender linearer Beziehung zwischen wirkender Schubspannung und resultierendem Schergrad ein abgeflachtes Flussprofil auf. Da Blut durch seine korpuskulären Bestandteile zur Gruppe nicht-Newtonscher Flüssigkeiten gezählt wird, wurden die Parameter des mikrovaskulären Blutflusses um den Baker-Wayland Proportionalitätsfaktor korrigiert. Bei Gefäßdurchmessern zwischen $20\mu\text{m}$ und $40\mu\text{m}$ beträgt der Proportionalitätsfaktor den Wert 1,6 (Baker, Wayland, 1974).

Der mikrovaskuläre Blutfluss wurde anhand folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Mikrovaskulärer Blutfluss} = \pi \cdot (d/2)^2 \cdot v / K,$$

wobei d den Gefäßdurchmesser, v die Blutzellgeschwindigkeit und K den Baker-Wayland Proportionalitätsfaktor repräsentieren.

5.4.6.4 Scherrate

Durch die Wirkung von Reibungskräften nimmt die Flussgeschwindigkeit mit Nähe zum Gefäßrand ab. Die maximale Blutzellgeschwindigkeit wird im Zentrum des Gefäßes erreicht. Nach der Newtonschen Gleichung errechnet sich die Scherrate aus der Blutzellgeschwindigkeit im zentralen Blutstrom sowie dem Gefäßdurchmesser.

Die Scherrate wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$\text{Scherrate} = 8 \cdot v / d,$$

wobei v die Blutzellgeschwindigkeit und d den Gefäßdurchmesser repräsentieren.

5.4.6.5 Makromolekulare Gefäßpermeabilität

Die *Leakage* des makromolekularen Fluoreszenzfarbstoffes erlaubt die Erfassung der Gefäßwandpermeabilität. Starke Veränderungen lassen auf eine gestörte Endothelintegrität schließen. Inflammatorische Reaktionen oder Angiogenese schädigen das Gefäßendothel. Sie ermöglichen durch Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität den Austritt von FITC-Dextran in das paravasale Gewebe. Die unterschiedlichen Konzentrationen von paravasalem und intravasalem FITC-Dextran können mit Hilfe der Densitometrie erfasst werden (*Abbildung 12*). Dabei wurden die Grauwerte paravasal (E1) und intravasal (E2) ermittelt und ins Verhältnis gesetzt (Pries, 1988).

$$\text{Makromolekulare Gefäßwandpermeabilität} = E1/E2,$$

wobei E1 den Grauwert paravasal und E2 den Grauwert intravasal repräsentiert.

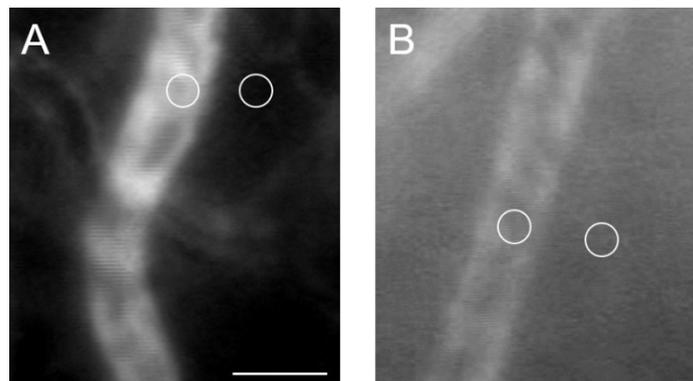


Abbildung 12: Bestimmung der makromolekularen Gefäßpermeabilität. Die Grauwerte wurden sowohl paravasal als auch intravasal bestimmt (weiße Kreise) und der Quotient berechnet. Dargestellt sind exemplarisch eine Venole vor (**A**) sowie 24h nach Ischämie (**B**). Maßstab = 50µm.

5.4.6.6 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte (FKD) beschreibt die Dichte perfundierter Kapillaren innerhalb der analysierten Fläche des Gewebes. Mit Hilfe des Computerprogramms wurden die perfundierten Kapillaren markiert. Die FKD ergibt sich dann als Quotient aus der Länge der perfundierten Kapillaren und der Fläche des analysierten Gewebes. Sie wurde mittels computergestütztem Bildverarbeitungsprogramm CapImage (Dr. Heinrich Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) ermittelt und ist in cm/cm^2 angegeben.

5.4.7 Mikrovaskuläre Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Leukozyten können in frei fließende, rollende und adhärenente Leukozyten eingeteilt werden. Rollende Leukozyten kennzeichnen sich durch ein langsames Fortbewegen entlang der Gefäßwand verglichen mit den im Zentralstrom frei fließenden Leukozyten. Die Zählung rollender Leukozyten erfolgte über einen Zeitraum von 30 Sekunden an einem gesetzten Referenzpunkt.

Als adhärenent wurden solche Leukozyten gezählt, die für den Zeitraum von 30 Sekunden fest am Gefäßendothel hafteten. Ihre Anzahl wurde über eine Referenzstrecke von 100µm entlang des Gefäßverlaufs erfasst und in adhärenente Leukozyten/Fläche Gefäßendothel (mm²) angegeben. Dabei wurde eine zylindrische Geometrie der Gefäße zugrunde gelegt. Die Untersuchung rollender sowie adhärenenter Leukozyten erfolgte jeweils im gleichen Gefäßabschnitt.

5.4.8 Histologie und Blutzellanalyse

Nach Versuchsende wurden Gewebeproben aus der RHK entnommen und zur immunhistologischen Verarbeitung in 4% Formalin fixiert. Gewebe zur Untersuchung mittels Western Blot wurde nach 3-stündiger Ischämie und 3-stündiger Reperfusion gewonnen, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Des Weiteren sollte eine systemische Wirkung der MA ausgeschlossen werden. Dafür wurde Blut über einen abdominalen Zugang aus der V. cava inferior gewonnen. Die Auswertung erfolgte mittels *Coulter AcT diff Analyzer* (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) (Ampofo et al., 2016).

5.4.9 Immunhistochemie

Ziel war die Erfassung transmigrierter Leukozyten im fixierten Präparat. Unterschieden wurde zwischen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Nach 24h Fixierung in 4% Formalin erfolgten die Einbettung in Paraffin und die Anfertigung von Schnitten mit einer Dicke von 3µm. Die Anfärbung wurde mit polyklonalen Kaninchen anti-Maus Antikörpern gegen den neutrophilen Granulozyten-Marker Myeloperoxidase (MPO) oder Makrophagen-Marker CD68 gefolgt von einem biotinylierten sekundären Ziege anti-Kaninchen Antikörper Typ IgG durchgeführt. Die biotinylierten Antikörper wurden durch Peroxidase-markiertes Streptavidin detektiert. Als Chromogen wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol verwendet. Zuletzt wurden die Schnitte mit Mayers Hämalaunlösung gegengefärbt. Als Kontrolle wurde die alleinige Anfärbung mit dem biotinylierten sekundären Antikörper verwendet. Die Auswertung wurde

lichtmikroskopisch (BX60F; Olympus, Hamburg, Germany) durchgeführt. MPO-positive und CD-68-positive Zellen wurden in 10 *high power fields* (HPF) pro Schnitt gezählt und in Zellen/HPF angegeben. Oxidative DNA-Schäden wurden durch Markierung mit spezifischen Antikörpern gegen 8-Hydroxydesoxyguanosin (OHdG) detektiert. 8-OHdG gilt als eines der toxischsten DNA-Oxidationsprodukte. Die Schnitte wurden zur Quantifizierung von 8-OHdG mit dem polyklonalen Ziege anti-Maus Antikörper gegen anti-8-OHdG und dem sekundären, gekoppelten Fluoreszenzantikörper gefärbt. Als Negativkontrolle wurden Schnitte ausschließlich mit dem sekundären Antikörper inkubiert. 8-OHdG-positive Zellen wurden in 10 HPF pro Schnitt gezählt und sind in Zellen/HPF angegeben.

5.5 Statistische Datenanalyse

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardabweichung (standard deviation, SD) angegeben (Mittelwert \pm SD). Nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung und Varianzgleichheit wurden Unterschiede zwischen zwei Gruppen mittels ungepaartem t-Test oder dem Mann-Whitney-U-Test geprüft. Bei mehr als zwei Gruppen erfolgte eine Varianzanalyse (*One-Way Analysis of Variance*, ANOVA). Ein geeigneter post hoc Test mit Korrektur des alpha-Fehlers (SigmaPlot 13.0; Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) erfasste Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Zur Testung auf zeitliche Auswirkungen innerhalb einzelner Gruppen wurde eine ANOVA für wiederholte Messungen angewandt, gefolgt von einem Bonferroni-t-Test. Von einer statistischen Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ ausgegangen.

6 Ergebnisse

6.1 Maslinsäure bei Hypoxie und Reoxygenierung *in vitro*

6.1.1 Mitochondriale Aktivität und Viabilität von Endothelzellen

Zur Analyse der Auswirkungen von I/R auf Endothelzellen wurden Vehikel- und MA-behandelte HDMEC für 16h unter Hypoxie kultiviert und anschließend für 24h reoxygeniert (Abbildung 13).

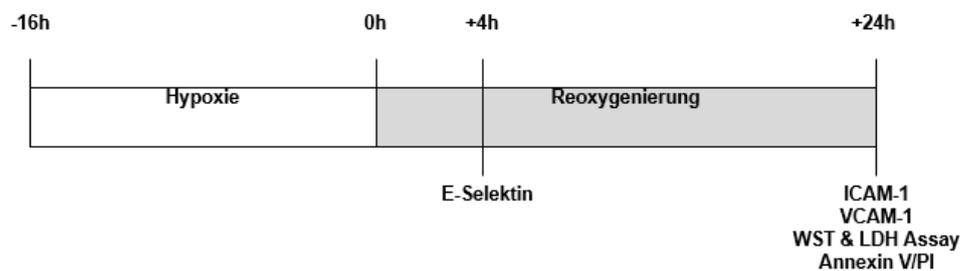


Abbildung 13: Schematische Darstellung des H/R-Versuchsprotokolls *in vitro*.

Der WST-1 Assay erfasst die mitochondriale Aktivität. Bei intakter Atmungskette wird das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsuccinat durch die Succinat-Tetrazolium-Reduktase zu dunkelrotem Formazan metabolisiert. Das veränderte Emissionsspektrum kann photometrisch erfasst werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass eine Kultivierung der Endothelzellen unter H/R die mitochondriale Aktivität im Vergleich zu unter Normoxie kultivierten Zellen nicht beeinträchtigt. Auch eine Kultivierung unter H/R in Gegenwart von MA (10 μ M) zeigte keine Auswirkungen. Hingegen konnte MA die mitochondriale Aktivität in den Konzentrationen 20 μ M und 40 μ M signifikant reduzieren (Abbildung 14).

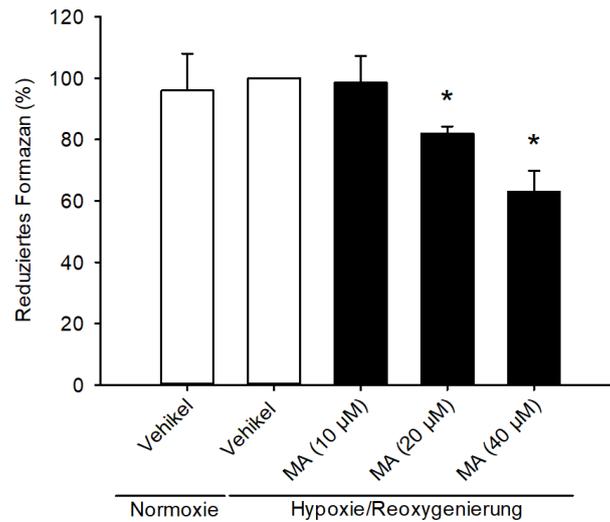


Abbildung 14: Einfluss von MA auf die mitochondriale Aktivität in HDMEC. HDMEC wurden für 16h mit den angegebenen Konzentrationen MA in DMSO (Vehikel) oder nur mit DMSO unter Normoxie oder Hypoxie behandelt. Nach 24h Reoxygenierung wurde die mitochondriale Aktivität und Viabilität durch einen WST-1 Assay bestimmt. Hypoxie-exponierte Vehikel-behandelte Zellen dienten als Kontrolle und definieren 100% (n=5). Mittelwerte \pm SD. * $p < 0.05$ vs. Vehikel+Hypoxie/Reoxygenierung.

Zum Ausschluss einer zytotoxischen Wirkung der MA und dadurch hervorgerufene Reduktion der Zellviabilität wurde zusätzlich ein LDH-Assay durchgeführt. Dabei wird die extrazelluläre Aktivität der LDH bestimmt, welche als direkter Nachweis einer Zellschädigung dient. Hierbei führte weder eine Kultivierung der Zellen unter H/R noch die Zugabe von MA zur LDH-Freisetzung (*Abbildung 15*).

Hohe Dosierungen von MA (20µM und 40µM) reduzieren die mitochondriale Aktivität, führen jedoch zu keiner Freisetzung der LDH. Daher sollte mittels Annexin V/PI Assay der Anteil an frühapoptotischen, spätapoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Dosierung von 40µM MA weder den Anteil an apoptotischen Zellen noch an nekrotischen Zellen erhöht (*Abbildung 16*).

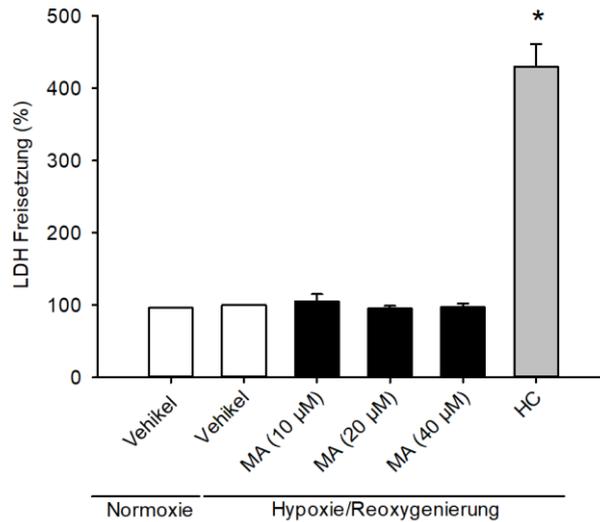


Abbildung 15: Untersuchung einer potentiellen Zytotoxizität der MA in Endothelzellen. HDMEC wurden für 16h mit den angegebenen Konzentrationen MA in DMSO (Vehikel) oder nur mit DMSO behandelt. Nach 24h Reoxygenierung wurde ein LDH Assay durchgeführt. Hypoxie-exponierte Vehikel-behandelte Zellen dienten als Kontrolle und definieren 100% (n=5). H₂O₂-behandelte Zellen dienten als positive Kontrolle (HC) (n=5). Mittelwerte ± SD. *p<0.05 vs. Vehikel+Hypoxie/Reoxygenierung.

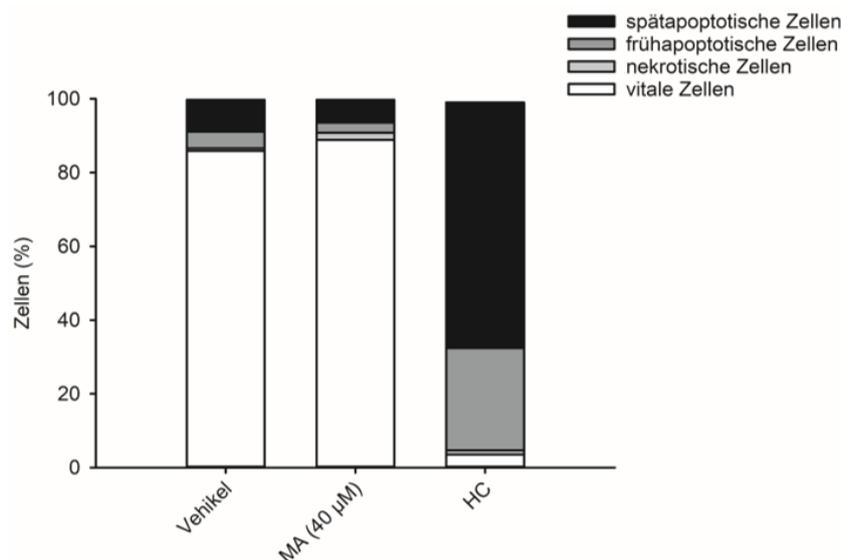


Abbildung 16: Einfluss von MA auf die Induktion von Apoptose und Nekrose in Endothelzellen. HDMEC wurden für 16h mit 40μM MA in DMSO (Vehikel) oder nur mit DMSO behandelt. Nach 24h Reoxygenierung wurden Annexin V/PI-positive Zellen in % aller Zellen durchflusszytometrisch erfasst (n=5). H₂O₂-behandelte Zellen dienten als positive Kontrolle (HC) (n=5).

6.1.2 Expression endothelialer Adhäsionsproteine

Als nächstes wurde der Einfluss von MA auf die Expression der endothelialen Adhäsionsproteine E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in der Phase der Reoxygenierung untersucht. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der Durchflusszytometrie. Die Expression von E-Selektin wurde 4h, die von ICAM-1 und VCAM-1 24h nach Beginn der Reoxygenierung analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression der drei Adhäsionsproteine durch H/R erheblich verstärkt wurde. Interessanterweise führte eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit steigenden Dosen von MA zu einer signifikanten Reduktion der Expression der Adhäsionsmoleküle (Abbildungen 17 A-C).

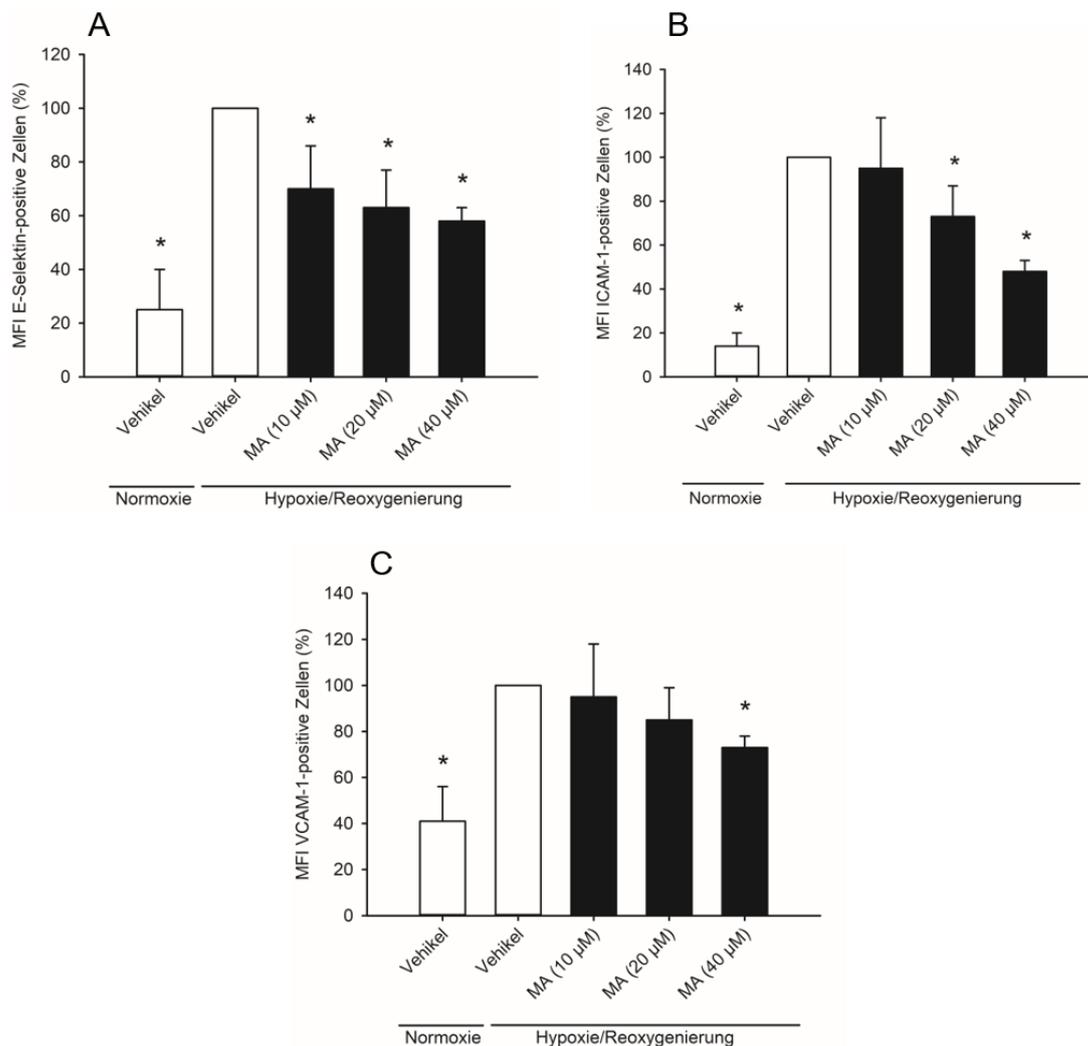


Abbildung 17: Einfluss von MA auf die Expression endothelialer Adhäsionsproteine nach H/R.

A-C HDMEC wurden für 16h mit den angegebenen Konzentrationen von MA in DMSO (Vehikel) oder nur mit DMSO unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen entweder für 4h oder 24h reoxygeniert. Die MFI von E-Selektin (**A**) wurde durchflusszytometrisch nach 4h, die MFI von ICAM-1 (**B**) und VCAM-1 (**C**) nach 24h ermittelt. Hypoxie-exponierte Vehikel-behandelte Zellen dienten als Kontrolle und definieren 100% (n=5). Mittelwerte \pm SD. * $p < 0.05$ vs. Vehikel+Hypoxie/Reoxygenierung.

Um die Expression der Adhäsionsproteine auf die Aktivität des NF κ B-Signalweges zurückführen zu können, wurden HDMEC mit TNF- α stimuliert. Dies ist ein spezifischer Aktivator der NF κ B-Signaltransduktion und induziert die Expression endothelialer Adhäsionsproteine. Wie erwartet reduzierte die Behandlung der TNF- α -stimulierten Zellen mit MA dosisabhängig die Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 (Abbildungen 18 A-C).

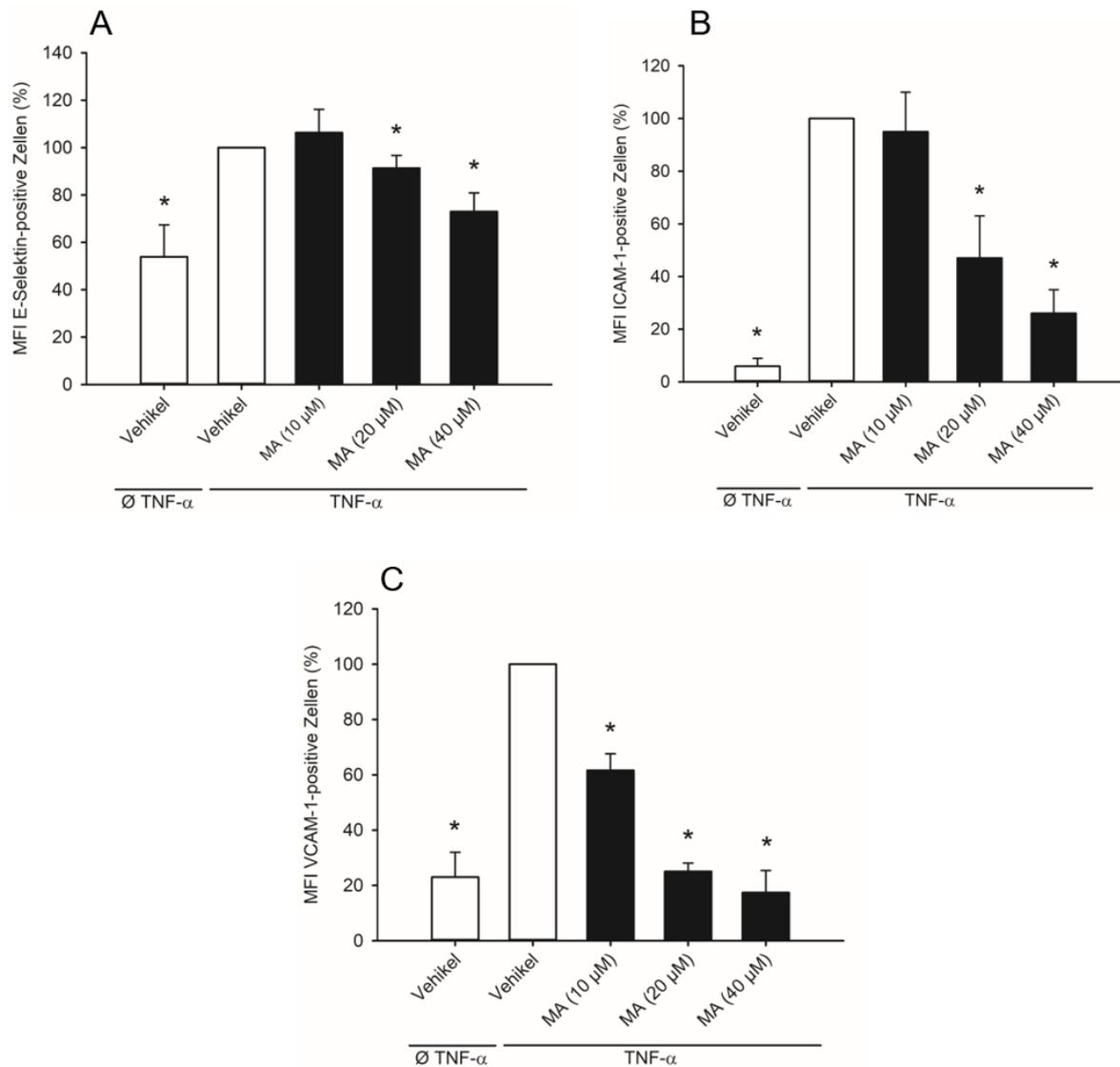


Abbildung 18: Einfluss von MA auf die Expression endothelialer Adhäsionsproteine unter Stimulation mit TNF- α . A-C HDMEC wurden mit den angegebenen Konzentrationen von MA in DMSO (Vehikel) oder nur mit DMSO mit oder ohne TNF- α für 4h oder 24h kultiviert. Danach wurde die MFI von E-Selektin (A), ICAM-1 (B) sowie VCAM-1 (C) durchflusszytometrisch bestimmt. Vehikel-behandelte TNF- α -exponierte Zellen dienen als Kontrolle und definieren 100% (n=5). Mittelwerte \pm SD. *p<0.05 vs. Vehikel+ TNF- α .

6.1.3 Aktivität des NFκB-Signalweges in Endothelzellen

Die Aktivität des NFκB-Signalweges wurde durch subzelluläre Lokalisation des p65-Komplexes beurteilt. Nach Inkubation mit einem anti-p65 Antikörper und einem sekundären Antikörper erfolgte die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass sich p65 unter normoxischen Bedingungen im Zytoplasma befindet. Nach H/R ließ sich p65 in den Zellkernen Vehikel-behandelter Zellen darstellen. Bei MA-behandelten Zellen verbleib p65 auch unter Hypoxie größtenteils im Zytoplasma (*Abbildungen 19 A, B*).

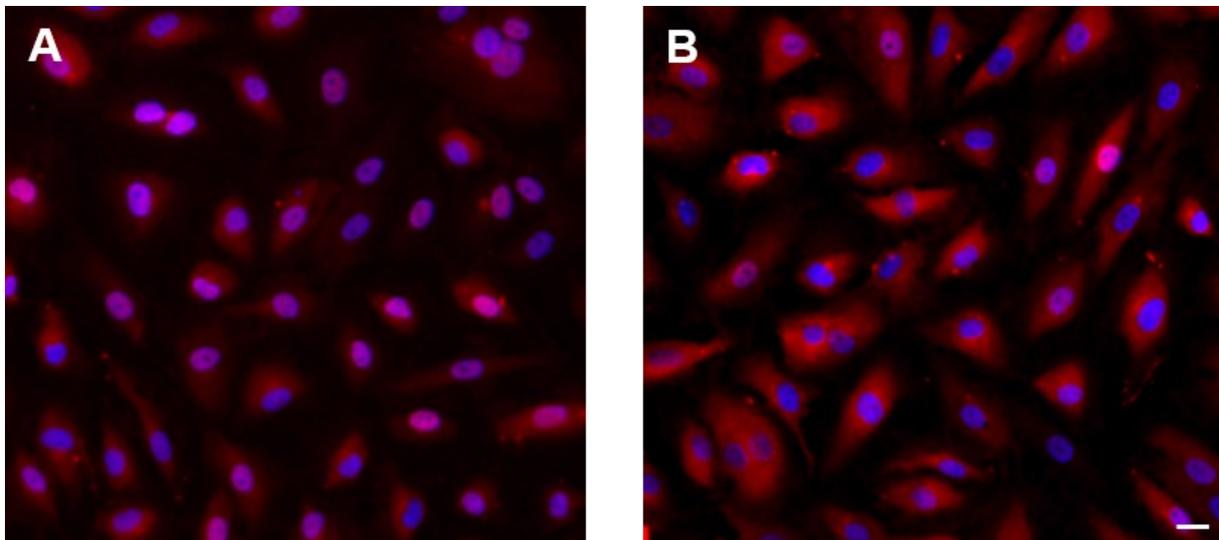


Abbildung 19: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen intrazellulärer p65-Komplexe in Endothelzellen. A, B HDMEC wurden mit dem Lösemittel DMSO (Vehikel) (A) oder MA (40µM) mit DMSO (B) für 16h unter Hypoxie kultiviert. Nach 4h Reoxygenierung wurde p65 mit einem anti-p65 Antikörper detektiert. Maßstab = 50µm.

Die immunhistochemischen Ergebnisse wurden weiterhin mittels Western Blot verifiziert. Auch hierbei zeigte sich eine deutliche Zunahme von p65 im Kernextrakt von Vehikel-behandelten Zellen unter Hypoxie (*Abbildungen 20 A-C*). Hingegen führte eine Behandlung der Zellen mit MA zu einem signifikant reduzierten Proteinlevel von p65 in den Kernextrakten. Zusammenfassend konnte die Western Blot Analyse die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse bestätigen.

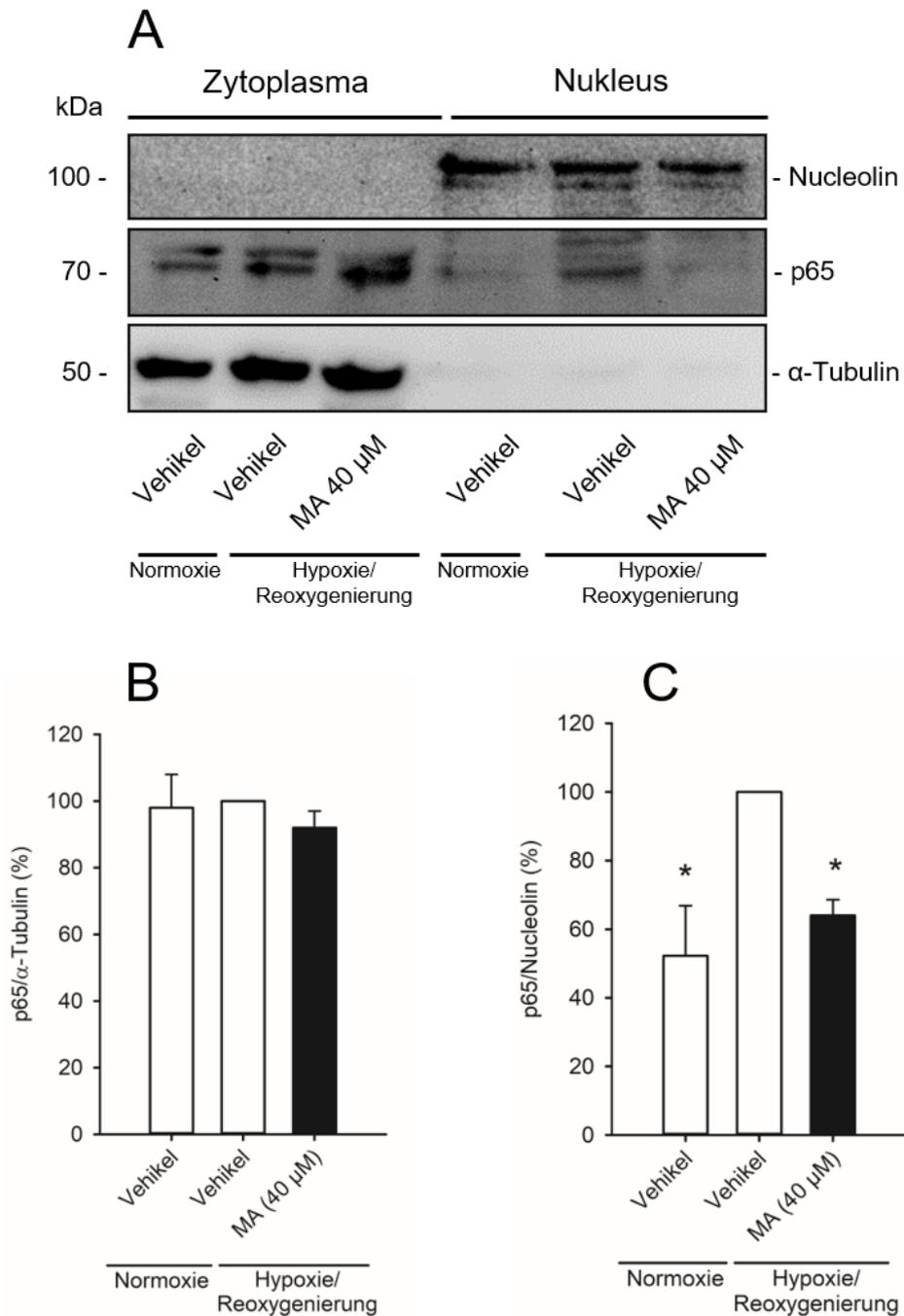


Abbildung 20: Zytoplasmatische und nukleäre Analyse von p65 in Endothelzellen mittels der Western Blot Analyse. HDMEC wurden in DMSO (Vehikel) oder MA (40 μ M) in DMSO für 16h unter Hypoxie kultiviert. Nach 4h Reoxygenierung wurde p65 durch einen anti-p65 Antikörper markiert und mittels Western Blot analysiert. **A** Abbildung der Banden von Zytoplasma und Kernextrakt. Die Banden entstammen unterschiedlichen Abschnitten des gleichen Gels. **B, C** Quantitative Analyse des Western Blots (n=5). Abgebildet sind p65/ α -Tubulin (**B**) und p65/Nucleolin (**C**) (% von Vehikel + Hypoxie). Mittelwerte \pm SD. *p<0.05 vs. Vehikel+Hypoxie/Reoxygenierung.

6.1.4 Mitochondriale Aktivität und Viabilität von Perizyten

Perizyten umgeben die Endothelzellen und dienen unter anderem der Stabilisierung der Gefäßwand. Durch ihre Fähigkeit zur Expression von ICAM-1 sind sie an der Transmigration der Leukozyten maßgeblich beteiligt (Pieper et al., 2013; Proebstl et al., 2012; Stark et al., 2013), weshalb auch der Einfluss von MA auf die Induktion der ICAM-1 Expression in Perizyten untersucht wurde. Zunächst erfolgte die immunfluoreszenzmikroskopische Identifikation der humanen Perizyten. Mit Antikörpern gegen die spezifischen Oberflächenproteine PDGFR β sowie NG2 wurden die in dieser Studie benutzten humanen Perizyten verifiziert. Dabei zeigte sich, dass die Perizyten positiv für beide Proteine sind (*Abbildungen 21 A und B*).

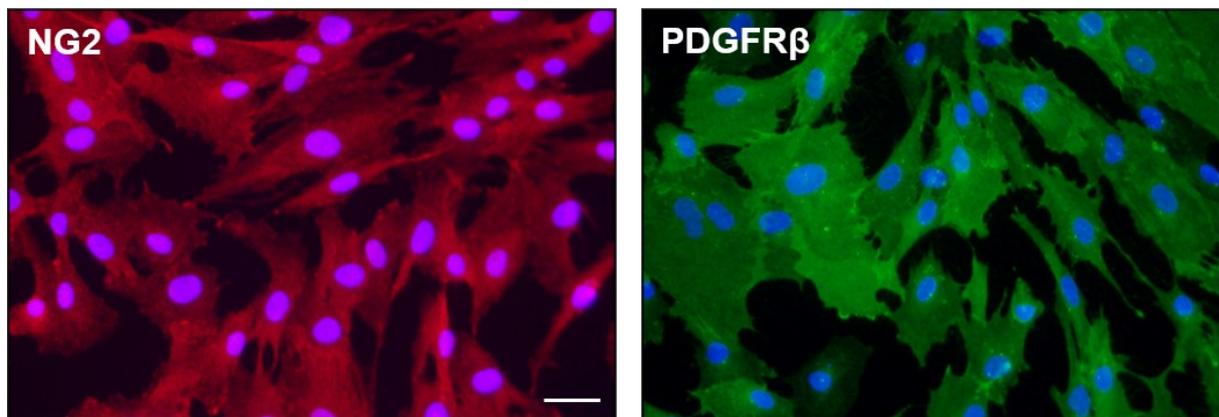


Abbildung 21: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Perizyten. A, B Perizyten wurden durch Expression der Proteine NG2 (A) und PDGFR β (B) charakterisiert. Maßstab = 50 μ m.

Der WST-1 Assay zeigte, dass H/R keinen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität in Perizyten hat verglichen mit Perizyten, die unter Normoxie kultiviert wurden. Auch eine Kultivierung unter H/R in Gegenwart von MA (10 μ M, 20 μ M und 40 μ M) hatte keine Auswirkungen (*Abbildung 22*).

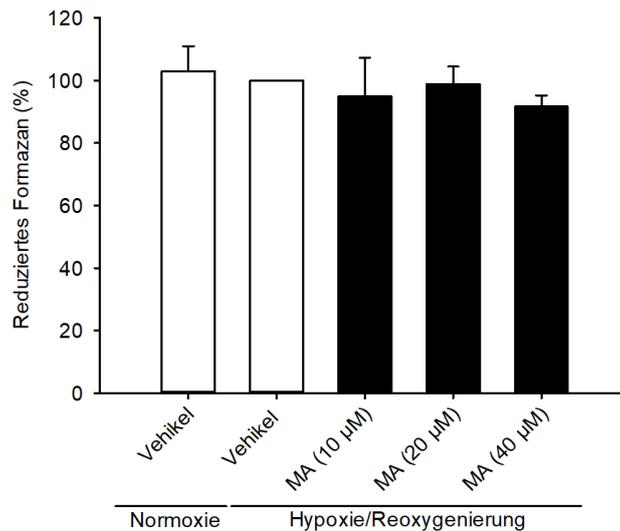


Abbildung 22: Einfluss von MA auf die mitochondriale Aktivität in Perizyten. Perizyten wurden für 16h mit den angegebenen Konzentrationen von MA in DMSO (Vehikel) oder nur mit DMSO unter Normoxie oder Hypoxie kultiviert. Nach 24h Reoxygenierung wurde die mitochondriale Aktivität durch einen WST-1 Assay erfasst. Hypoxie-exponierte Vehikel-behandelte Zellen dienen als Kontrolle und definieren 100% (n=5). Mittelwerte \pm SD.

Um eine zytotoxische Wirkung der MA auszuschließen, wurde nach Kultivierung der Perizyten die extrazelluläre LDH-Aktivität mittels LDH Assay ermittelt und die Zellviabilität untersucht. Weder die Kultivierung der Perizyten unter H/R noch die Zugabe von MA führten zu einer erhöhten LDH-Freisetzung (*Abbildung 23*).

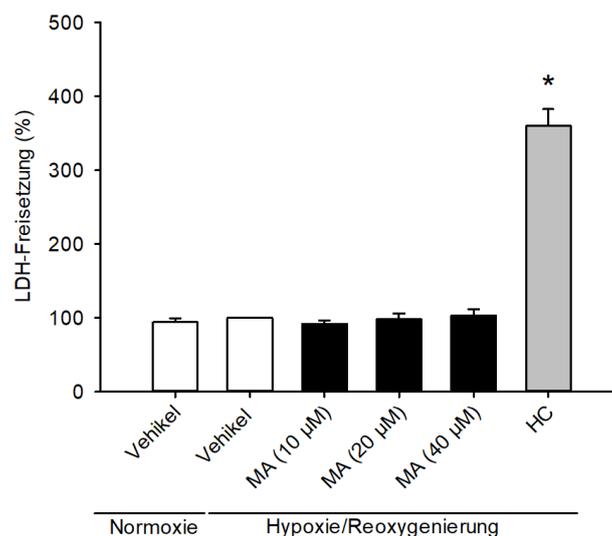


Abbildung 23: Zytotoxizitätsanalyse der MA in Perizyten. Perizyten wurden für 16h mit den angegebenen Konzentrationen von MA in DMSO (Vehikel) oder nur mit DMSO behandelt. Nach 24h Reoxygenierung wurde ein LDH Assay durchgeführt. Hypoxie-exponierte Vehikel-behandelte Zellen dienen als Kontrolle und definieren 100% (n=5). H₂O₂-behandelte Zellen dienen als positive Kontrolle (HC) (n=5). Mittelwerte \pm SD. *p<0.05 vs. Vehikel+Hypoxie/Reoxygenierung.

Die Bestimmung der Anteile frühapoptotischer, spätapoptotischer und nekrotischer Perizyten erfolgte durch einen Annexin V/PI Assay. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass eine Dosierung von 40 μ M MA weder den Anteil an apoptotischen Zellen noch an nekrotischen Zellen beeinflusst (*Abbildung 24*).

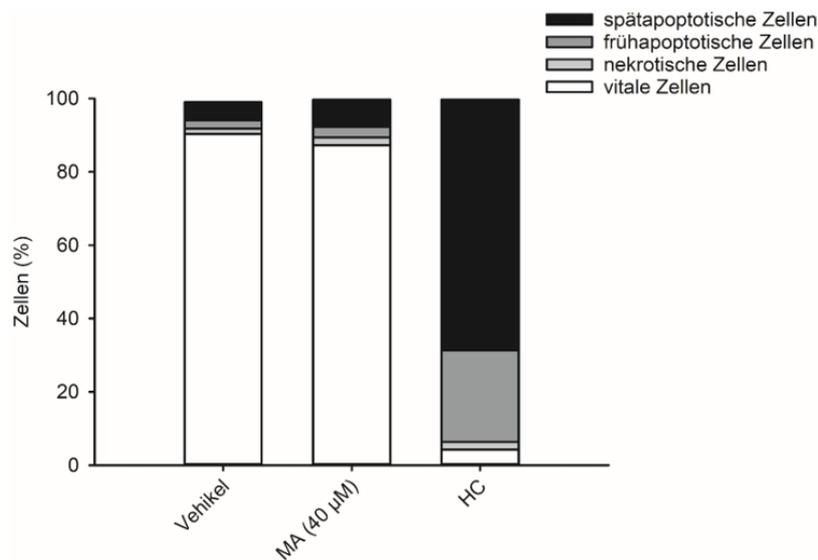


Abbildung 24: Einfluss von MA auf die Induktion von Apoptose und Nekrose in Perizyten. Perizyten wurden mit der angegebenen Konzentration von MA in DMSO (Vehikel) oder nur mit DMSO für 16h unter Hypoxie kultiviert. Nach 24h Reoxygenierung wurden Annexin V und PI-positive Zellen in % aller Zellen durchflusszytometrisch erfasst (n=5). H₂O₂-behandelte Zellen dienten als positive Kontrolle (HC) (n=5).

6.1.5 Expression von ICAM-1 auf Perizyten

Im Folgenden wurde der Einfluss von MA auf die perizytäre Expression von ICAM-1 unter H/R mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von ICAM-1 durch H/R erheblich verstärkt wurde. Analog zur Expression endothelialer Adhäsionsproteine führte eine gleichzeitige Behandlung der Perizyten mit steigenden Dosen an MA (10 μ M, 20 μ M und 40 μ M) zu einer signifikanten Reduktion der Expression von ICAM-1 (*Abbildung 25*).

Ein Zusammenhang zwischen der Expression von ICAM-1 und der Aktivität des NF κ B-Signalweges wurde durch die Stimulation der Perizyten mit TNF- α untersucht. Die Ergebnisse sind mit denen der Endothelzellen vergleichbar. Die Stimulation führte zu einer signifikanten Zunahme der Expression von ICAM-1. Die Inkubation der TNF- α -stimulierten Perizyten mit MA reduzierte dosisabhängig die Expression von ICAM-1 (*Abbildung 26*).

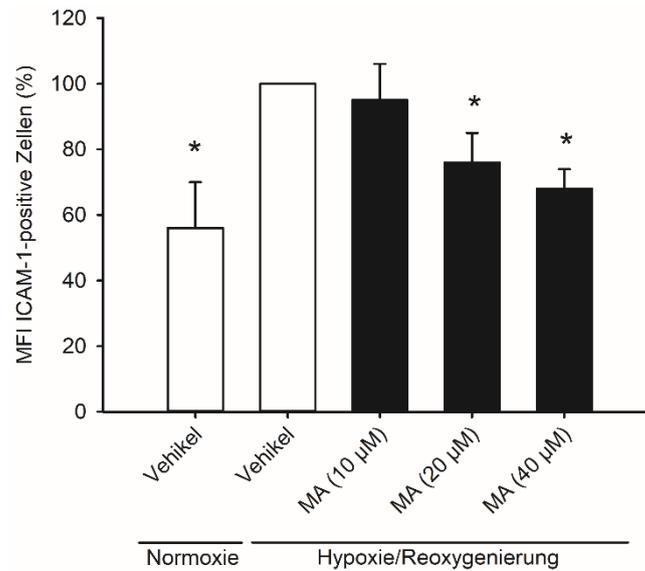


Abbildung 25: Einfluss von MA auf die perizytäre Expression des Adhäsionsproteins ICAM-1 nach H/R. Perizyten wurden mit der angegebenen Konzentration von MA in DMSO (Vehikel) oder nur mit DMSO für 16h unter Hypoxie oder Normoxie kultiviert. Im Anschluss an 24h Reoxygenierung wurde durchflusszytometrisch die MFI von ICAM-1 ermittelt. Hypoxie-exponierte Vehikel-behandelte Zellen dienten als Kontrolle und definieren 100% (n=5). Mittelwerte \pm SD. * $p < 0.05$ vs. Vehikel+Hypoxie/Reoxygenierung.

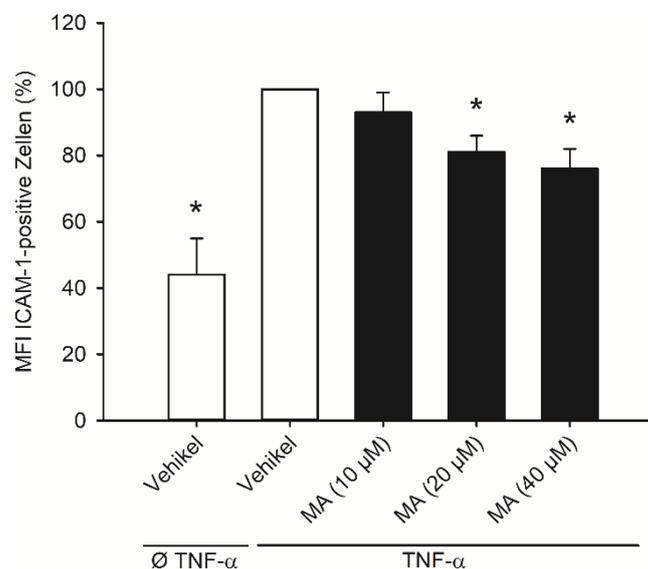


Abbildung 26: Einfluss von MA auf die perizytäre Expression des Adhäsionsproteins ICAM-1 nach TNF- α Stimulation. Perizyten wurden mit den angegebenen Konzentrationen von MA in DMSO (Vehikel) oder nur mit DMSO mit oder ohne TNF- α für 24h kultiviert. Danach wurde die MFI von ICAM-1 durchflusszytometrisch bestimmt. Vehikel-behandelte TNF- α -exponierte Zellen dienten als Kontrolle und definieren 100% (n=5). Mittelwerte \pm SD. * $p < 0.05$ vs. Vehikel+TNF- α .

6.1.6 Aktivität des NFκB-Signalweges in Perizyten

Durch eine immunfluoreszenzmikroskopische Analyse wurde die Aktivität des NFκB-Signalweges in Perizyten beurteilt. Dabei wurde p65 nach Inkubation mit einem anti-p65 Antikörper und einem sekundären Antikörper subzellulär lokalisiert. Unter Normoxie fand sich p65 im Zytoplasma. Nach H/R wurde deutlich, dass p65 in Vehikel-behandelten Perizyten in den Zellkern transloziert war. Bei MA-behandelten Perizyten verblieb p65 auch nach H/R größtenteils im Zytoplasma (*Abbildungen 27 A, B*).

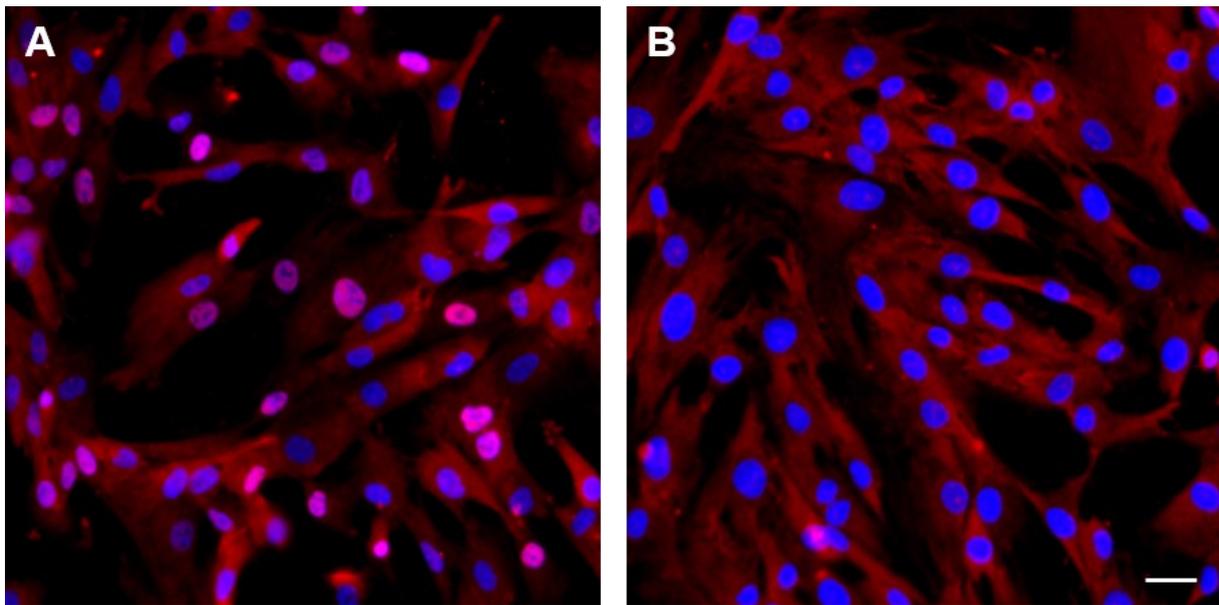


Abbildung 27: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von p65 in Perizyten. Perizyten wurden mit dem Lösemittel DMSO (Vehikel) (A) oder MA (40µM) (B) für 16h unter Hypoxie und 4h Reoxygenierung kultiviert. p65 wurde mit einem anti-p65 Antikörper detektiert. Maßstab = 50µm.

Ergänzt wurden diese Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung durch Western Blot-Analysen. Diese bestätigten sowohl eine Konzentrationszunahme von p65 im Kernextrakt Vehikel-behandelter Perizyten nach H/R als auch einen signifikant geringeren p65-Proteinlevel in den Kernextrakten von MA-behandelten Perizyten (*Abbildungen 28 A-C*).

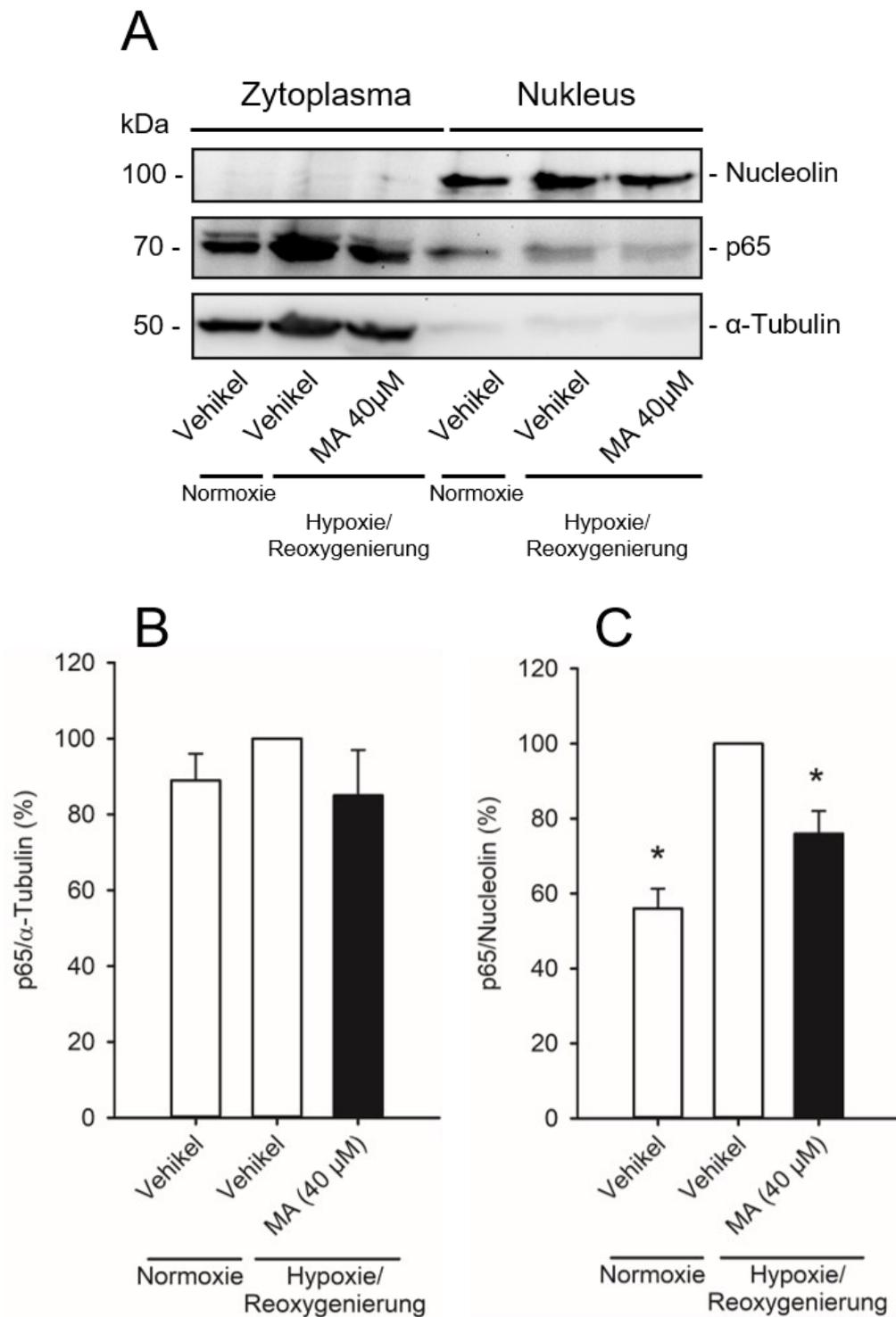


Abbildung 28: Zytoplasmatische und nukleäre Analyse von p65 in Perizyten mittels Western Blotting. Perizyten wurden mit dem Lösemittel DMSO (Vehikel) oder MA (40 μ M) für 16h unter Hypoxie und 4h Reoxygenierung kultiviert. Anschließend wurde p65 durch einen anti-p65 Antikörper markiert und mittels einer Western Blot Analyse untersucht. **A** Abbildung der Banden von Zytoplasma und Kernextrakt. Die Banden entstammen unterschiedlichen Abschnitten des gleichen Gels. **B, C** Quantitative Analyse des Western Blots (n=5). Abgebildet sind p65/ α -Tubulin (**B**) und p65/Nucleolin (**C**) (% von Vehikel + Hypoxie). Mittelwerte \pm SD. *p<0.05 vs. Vehikel+Hypoxie/Reoxygenierung.

6.2 Maslinsäure bei Ischämie und Reperfusion *in vivo*

6.2.1 Mikrovaskuläre Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Zur Untersuchung des Einflusses von MA auf die Leukozyten-Endothelzellinteraktion nach I/R wurde das Rückenhautkammermodell an Balb/c Mäusen angewandt. Drei Tage postoperativ wurden die Mäuse in drei Gruppen zu je 8 Tieren unterteilt. Abhängig von der Gruppe wurde MA in niedriger Dosierung von 10mg/kg in 100µl DMSO, MA in hoher Dosierung von 20mg/kg in 100µl DMSO oder nur 100µl DMSO als Vehikel appliziert. Jeweils 19h und 1h vor Versuchsbeginn wurden die Injektionen durchgeführt. Zur Beurteilung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion wurden an jedem Tier vier IFM durchgeführt. 24h vor Versuchsbeginn fand die Kontrollaufnahme statt. Nach Ende der Ischämie wurden die Mäuse nach 30min, 3h und 24h Reperfusion erneut mikroskopiert (*Abbildung 29*).

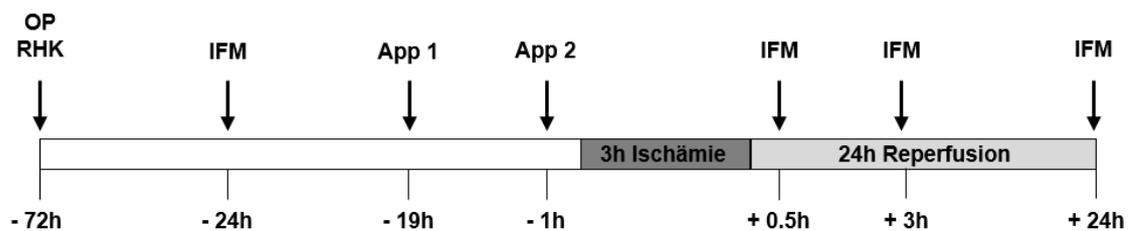


Abbildung 29: Schematische Darstellung des I/R-Versuchsprotokolls *in vivo*.

Mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurden die mikrohämodynamischen Parameter Gefäßdurchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, volumetrischer Blutfluss, Scherrate sowie die FKD und die mikrovaskuläre Permeabilität bestimmt. In den gleichen Venolen erfolgte im Anschluss die Analyse der Leukozyten-Endothelzellinteraktion. I/R führte zu einer Vasodilatation reperfundierter Venolen. Dies zeigte sich gleichermaßen in Vehikel-behandelten und MA-behandelten Mäusen (*Tabelle 3*). Die Blutzellgeschwindigkeit, der volumetrische Blutfluss und die Scherrate wurden durch I/R nicht beeinflusst (*Tabelle 3*). Im Vergleich zu Vehikel-behandelten Mäusen hatte MA keinen Einfluss auf die mikrohämodynamischen Parameter. Damit sind die Grundvoraussetzungen für eine vergleichende Analyse der Leukozyten-Endothelzellinteraktion von Vehikel- und MA-behandelten Mäusen gegeben, da eventuelle Unterschiede nicht durch unterschiedliche mikrovaskuläre Perfusionsbedingungen verursacht sein können.

Tabelle 3: Einfluss von MA auf mikrohämodynamische Parameter nach I/R. Bestimmung von Durchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, volumetrischem Blutfluss und Scherrate in postkapillären Venolen 24h vor Ischämie sowie nach 0.5h, 3h und 24h Reperfusion in DMSO (Vehikel)- oder MA (10mg/kg bzw. 20mg/kg)-behandelten Mäusen. Mittelwerte \pm SD, ^ap<0.05 vs -24h.

	- 24h	+ 0.5h	+ 3h	+ 24h
Durchmesser (μm)				
Vehikel	26.0 \pm 3.4	32.3 \pm 2.2 ^a	30.9 \pm 2.4 ^a	31.8 \pm 4.0 ^a
MA (10 mg/kg)	22.9 \pm 2.9	29.7 \pm 3.6 ^a	28.1 \pm 2.3 ^a	26.7 \pm 1.5 ^a
MA (20 mg/kg)	25.5 \pm 2.8	32.3 \pm 2.2 ^a	31.8 \pm 2.9 ^a	30.3 \pm 2.8 ^a
Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)				
Vehikel	308.8 \pm 142.4	186.2 \pm 117.8	227.9 \pm 127.6	243.6 \pm 129.1
MA (10 mg/kg)	270.4 \pm 101.4	265.4 \pm 175.5	239.5 \pm 134.2	186.6 \pm 70.2
MA (20 mg/kg)	533.8 \pm 166.9	463.9 \pm 184.5	388.1 \pm 147.1	348.8 \pm 117.7
Volumetrischer Blutfluss ($\mu\text{L/s}$)				
Vehikel	103.0 \pm 57.5	95.4 \pm 58.1	109.7 \pm 57.9	110.7 \pm 60.0
MA (10 mg/kg)	70.4 \pm 32.4	118.2 \pm 59.5	93.6 \pm 37.2	57.8 \pm 35.0
MA (20 mg/kg)	170.7 \pm 66.2	234.8 \pm 85.4	186.6 \pm 34.3	158.5 \pm 47.4
Scherrate (s^{-1})				
Vehikel	93.1 \pm 53.0	45.8 \pm 28.4	61.2 \pm 33.1	65.9 \pm 43.2
MA (10 mg/kg)	94.9 \pm 39.4	71.6 \pm 41.2	68.4 \pm 21.9	55.8 \pm 23.8
MA (20 mg/kg)	170.1 \pm 53.9	116.2 \pm 40.2	100.5 \pm 34.4	88.2 \pm 20.9

Bei der Leukozyten-Endothelzellinteraktion ist zwischen rollenden und adhärenen Leukozyten zu unterscheiden. Rollende Leukozyten kennzeichnen sich durch ein langsames Fortbewegen entlang der Gefäßwand verglichen mit nicht interagierenden Leukozyten im Zentralstrom des Gefäßes. Die Analyse rollender Leukozyten erfolgte über einen Zeitraum von 30 Sekunden an einem gesetzten Referenzpunkt. I/R bewirkte bei Vehikel-behandelten Mäusen verglichen mit Kontrollen keinen Anstieg der Anzahl rollender Leukozyten. Dies wurde ebenfalls bei niedriger Dosis MA beobachtet. Die hohe Dosis MA hingegen führte zu einer signifikanten Zunahme rollender Leukozyten während der Reperfusionsphase (*Abbildung 30*).

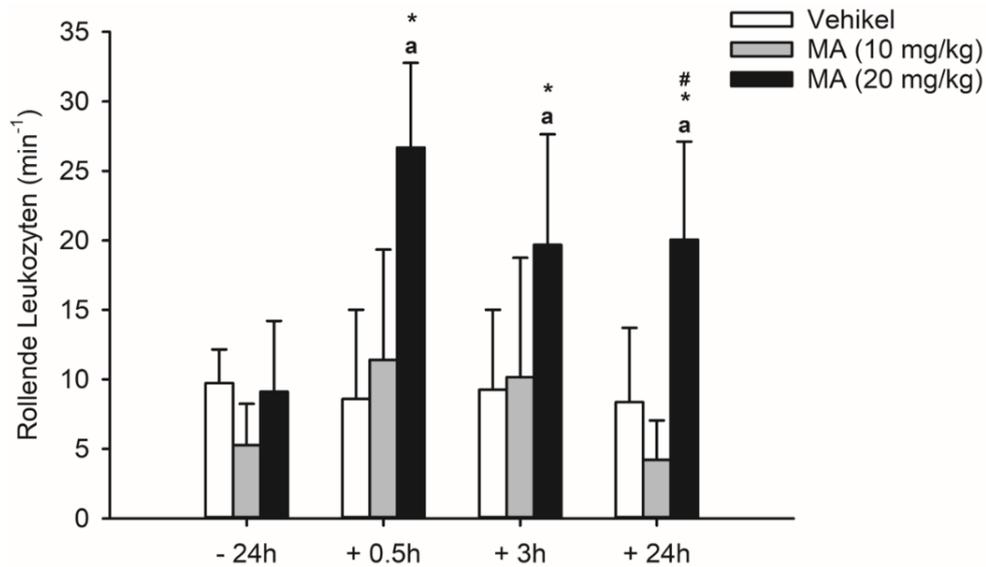


Abbildung 30: Auswirkungen von MA auf rollende Leukozyten nach I/R. Mäuse wurden mit Vehikel (DMSO), niedriger Dosis MA (10mg/kg) oder hoher Dosis MA (20mg/kg) behandelt. Durch IFM und computergestützter Bildanalyse erfolgte die Quantifizierung rollender Leukozyten 24h vor sowie 0.5h, 3h und 24h nach Ende der Ischämie (n=8). Mittelwert \pm SD. ^ap<0.05 vs. -24h (Ausgangswert) jeder individuellen Gruppe. *p<0.05 vs. Vehikel. #p<0.05 vs. niedrige Dosis MA (10mg/kg).

Als adhärenz wurden über eine Strecke von 100 μ m an dem Gefäßendothel festhaftende Leukozyten gezählt. Beispielhaft zeigt *Abbildung 31* Aufnahmen der IFM 3h nach Ischämie jeweils einer Vehikel- und MA-behandelten Maus. FITC-Dextran veranschaulicht den Gefäßverlauf, Rhodamin 6G markiert die Leukozyten. Exemplarisch sind einige adhärenz Leukozyten mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.

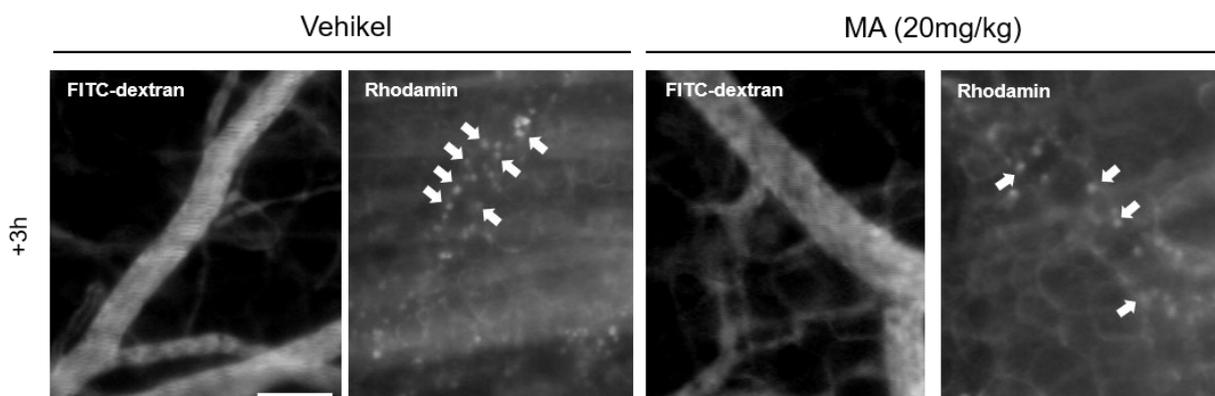


Abbildung 31: IFM von Venolen einer Vehikel (DMSO)-behandelten und einer MA (20mg/kg)-behandelten Maus nach 3h Ischämie und 3h Reperfusion. 5% FITC-Dextran wurde zur Visualisierung der Mikrogefäße verwendet. Rhodamin 6G diente der Färbung von Leukozyten *in vivo*. Zu erkennen sind die adhärenz Leukozyten (exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert) am Gefäßendothel. Man beachte die geringere Anzahl adhärenz Leukozyten in MA-behandelten Mäusen. Maßstab = 50 μ m.

Die adhärenenten Leukozyten nahmen während der Reperfusionphase in Vehikel-behandelten Mäusen deutlich zu. Der höchste Wert wurde nach 3h ermittelt. In MA-behandelten Mäusen konnte eine signifikant geringere Leukozytenadhärenz festgestellt werden. Während die adhärenenten Leukozyten unter niedriger Dosis MA nach 3h noch anstiegen, konnte die hohe Dosis MA die Anzahl über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant niedrig halten. Die entstandene Differenz adhärenenten Leukozyten zwischen niedriger und hoher Dosis MA nach 3h erwies sich ebenfalls als signifikant (*Abbildung 32*).

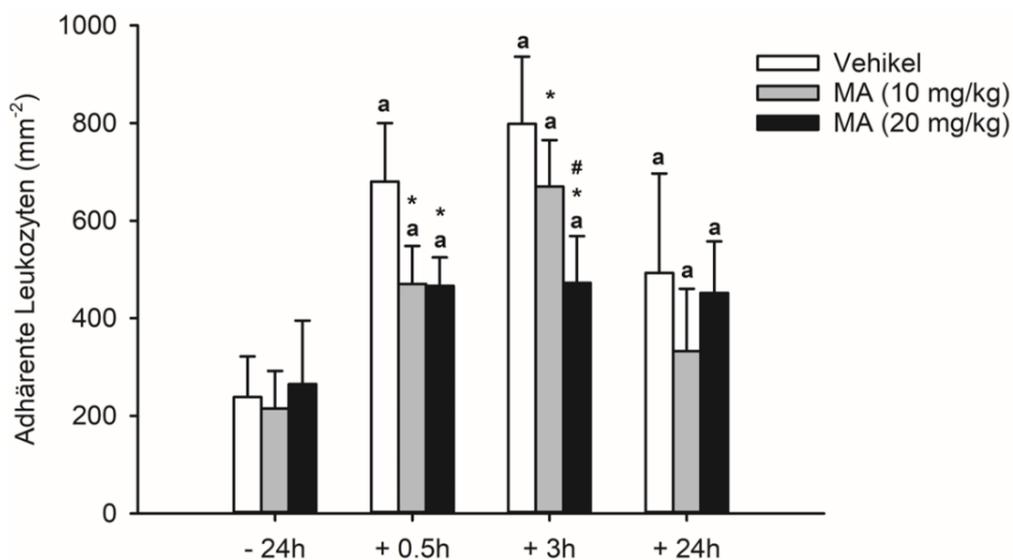


Abbildung 32: Auswirkungen von MA auf die Leukozytenadhärenz nach I/R. Mäuse wurden mit Vehikel (DMSO), niedriger Dosis MA (10mg/kg) oder hoher Dosis MA (20mg/kg) behandelt. Durch IFM und computergestützter Bildanalyse erfolgte die Quantifizierung adhärenenten Leukozyten 24h vor sowie 0.5h, 3h und 24h nach Ende der Ischämie (n=8). Mittelwert \pm SD. ^ap<0.05 vs. -24h (Ausgangswert) jeder individuellen Gruppe; *p<0.05 vs. Vehikel. #p<0.05 vs. niedrige Dosis MA (10mg/kg).

Die Beeinträchtigung der FKD sowie der mikrovaskulären Gefäßpermeabilität sind weitere durch IFM ermittelbare inflammatorische Parameter. Abhängig von der Anzahl perfundierter Kapillaren wurde die FKD durch I/R erheblich reduziert. Ein erneuter Anstieg konnte nicht nachgewiesen werden. Die MA konnte in keiner Dosierung die FKD beeinflussen (*Abbildung 33*).

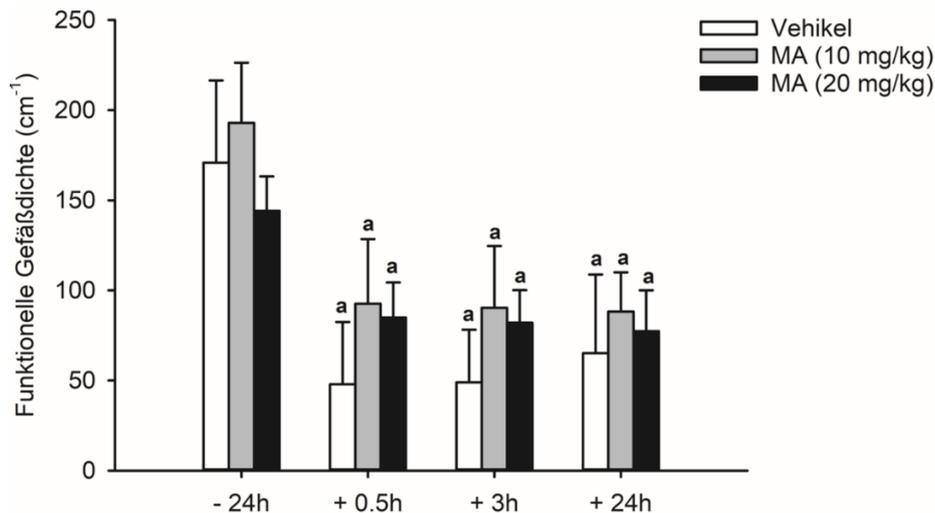


Abbildung 33: Auswirkungen von MA auf die FKD nach I/R. Die Mäuse wurden mit Vehikel (DMSO), niedriger Dosis MA (10mg/kg) oder hoher Dosis MA (20mg/kg) behandelt. Durch IFM und computergestützter Bildanalyse erfolgte die Bestimmung der FKD 24h vor sowie 0.5h, 3h und 24h nach Ende der Ischämie (n=8). Mittelwert \pm SD. ^ap<0.05 vs. -24h (Ausgangswert) jeder individuellen Gruppe.

Die makromolekulare *Leakage* ist ein Maß für die mikrovaskuläre Permeabilität und Schädigung des Gefäßendothels. Seine Bestimmung erfolgt über das Austreten von hochmolekularem FITC-Dextran über die endotheliale Barriere in das umliegende Gewebe. Infolge der I/R nahm die makromolekulare *Leakage* zu. Allerdings konnte MA die I/R-induzierte Erhöhung der *Leakage* nicht verhindern (*Abbildung 34*).

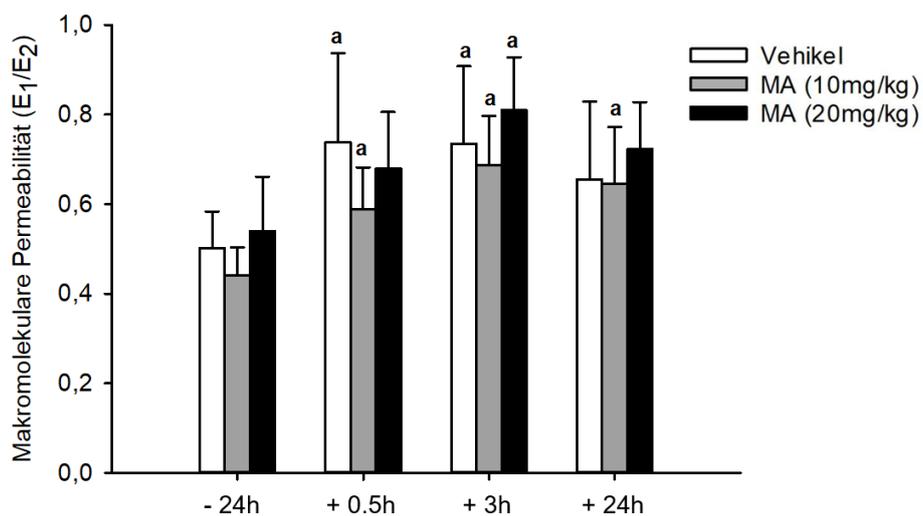


Abbildung 34: Auswirkungen von MA auf die makromolekulare Leakage nach I/R. Die Mäuse wurden mit Vehikel (DMSO), niedriger Dosis MA (10mg/kg) oder hoher Dosis (20mg/kg) behandelt. Durch IFM und computergestützter Bildanalyse erfolgte die Bestimmung der makromolekularen Leakage 24h vor sowie 0.5h, 3h und 24h nach Ende der Ischämie (n=8). Mittelwert \pm SD. ^ap<0.05 vs. -24h (Ausgangswert) jeder individuellen Gruppe.

Um den Effekt der MA auf die Expression der Adhäsionsproteine *in vivo* zu bestätigen, wurden Gewebeproben nach 3h Ischämie und 3h Reperfusion entnommen und mittels Western Blotting analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit hoher Dosis MA behandelt wurden, signifikant weniger ICAM-1 und VCAM-1 exprimieren als Vehikel-behandelte Mäuse (*Abbildung 35*).

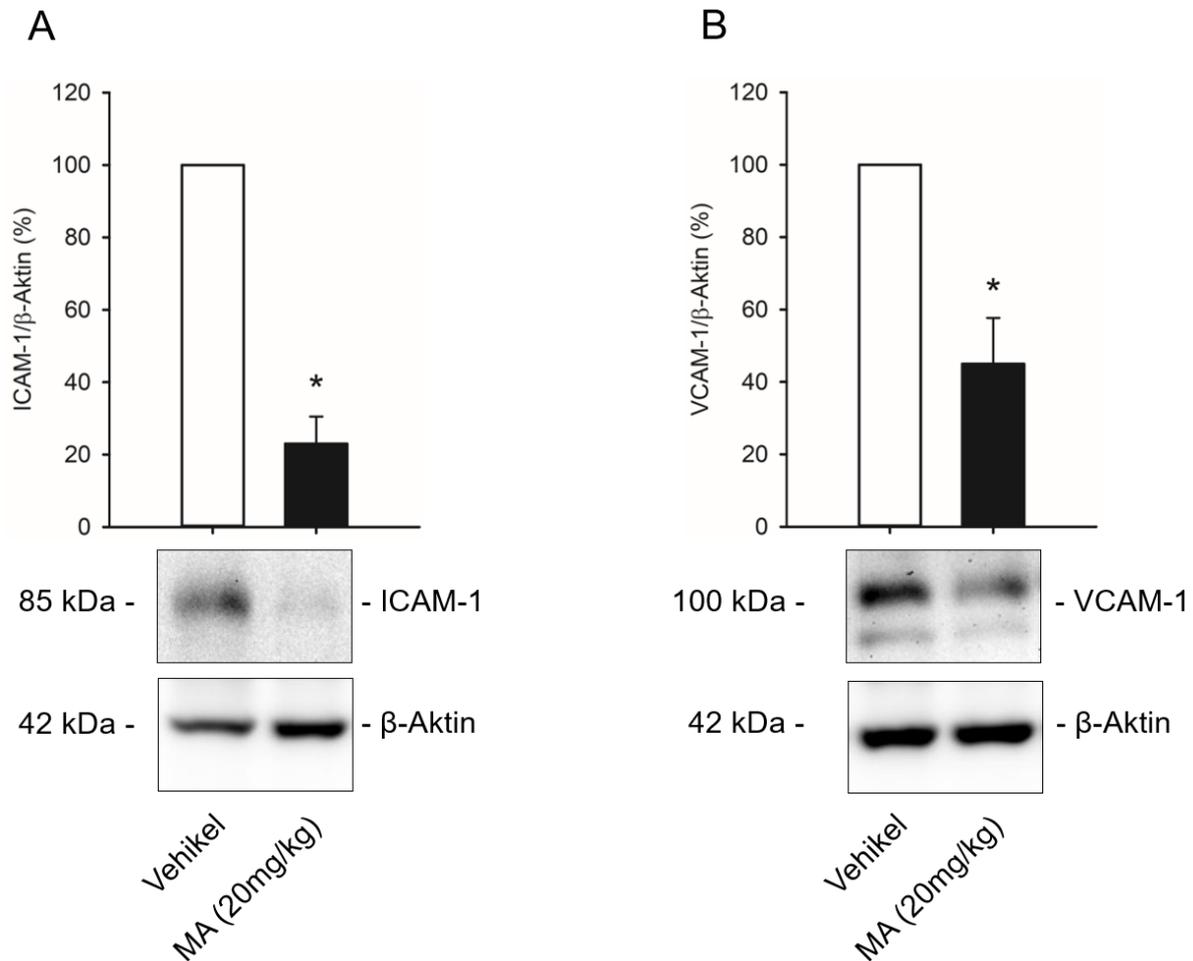


Abbildung 35: Effekt von MA auf die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 nach I/R. Die Expression von ICAM-1 (**A**) und VCAM-1 (**B**) in RHK-Gewebe Vehikel (DMSO)-behandelter sowie MA (20mg/kg) behandelte Mäuse nach 3h Ischämie und 3h Reperfusion wurden mittels Western Blotting analysiert. Quantitative Analyse der Western Blots (n=3) von ICAM-1/β-Aktin (% von Vehikel) (**A**) und VCAM-1/β-Aktin (% von Vehikel) (**B**). Mittelwert \pm SD. *p<0.05 vs. Kontrolle.

Weitere Gewebeproben wurden nach 24h Reperfusion entnommen. Sie wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen den neutrophilen Granulozyten-Marker MPO sowie gegen den Marker für Gewebsmakrophagen CD68 gefärbt. Dadurch wurde die Anzahl transmigrierter Leukozyten und Makrophagen erfasst. Immunhistochemisch zeigt sich eine deutlich geringere Anzahl transmigrierter Zellen im Gewebe MA-behandelter Mäuse im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen (*Abbildung 36*).

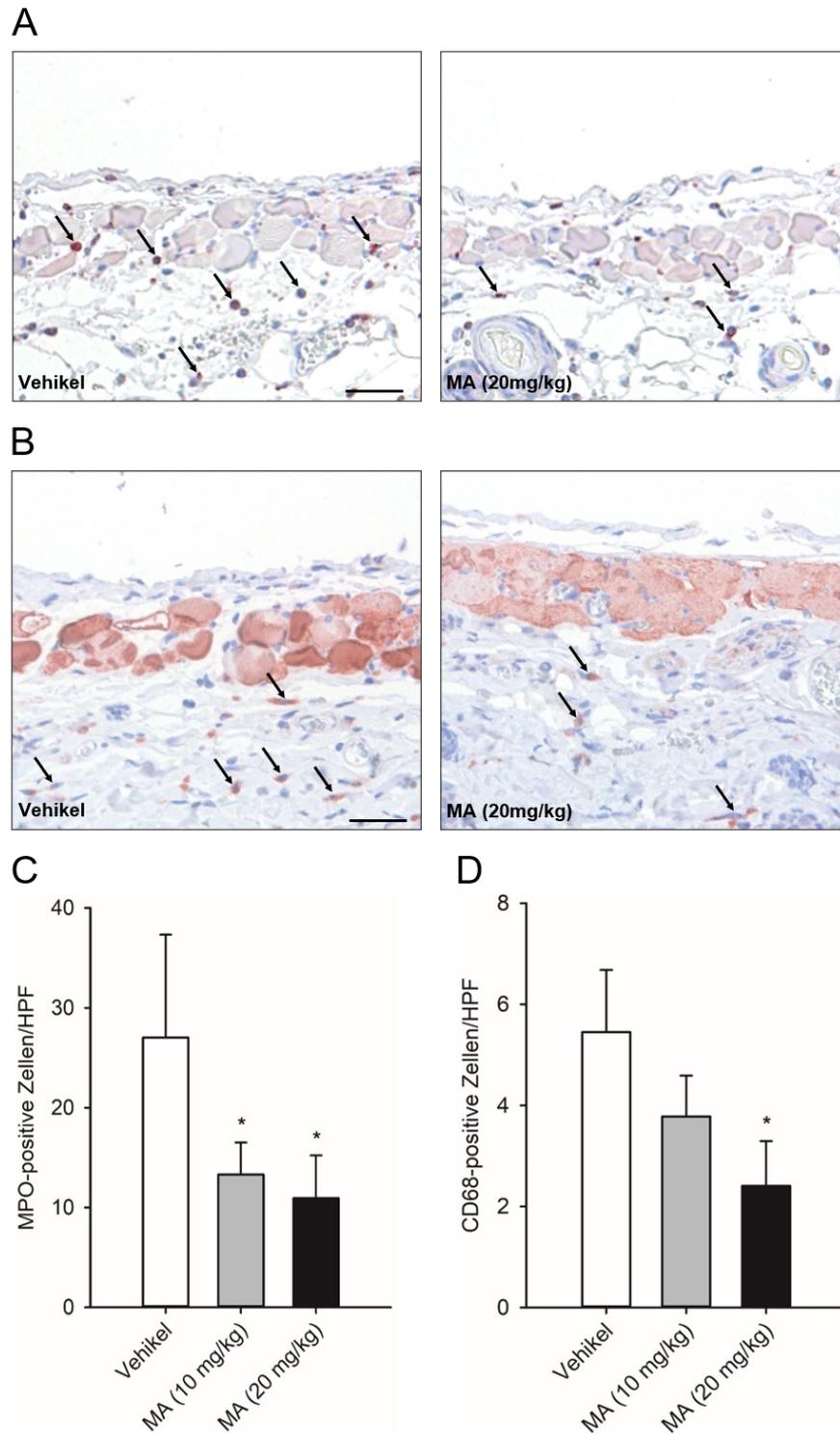


Abbildung 36: Immunhistochemische Analyse transmigrierter Leukozyten und Makrophagen nach I/R. **A, B** Transmigrierte MPO-positive neutrophile Granulozyten (exemplarisch schwarze Pfeile) (**A**) und CD68-positive Makrophagen (exemplarisch schwarze Pfeile) (**B**) in RHK Vehikel-behandelter und MA (20mg/kg)-behandelter Mäuse nach 3h Ischämie und 24h Reperfusion. Maßstab = 50µm. **C, D** Quantitative Analyse transmigrierter MPO-positiver neutrophiler Granulozyten (**C**) und CD68-positiver Makrophagen (**D**) (pro HPF) in Vehikel (DMSO)-behandelten, MA (10mg/kg)-behandelten und MA (20mg/kg)-behandelten Mäusen (n=8 pro Gruppe). Mittelwert ± SD. *p<0.05 vs. Vehikel.

6.2.2 Oxidativer Stress

Zur Untersuchung der antioxidativen Wirkung von MA auf durch I/R-induzierten oxidativen Stress wurden nach 3h Ischämie und 3h Reperfusion Gewebeproben der RHK entnommen. Untersucht wurde die Expression von eNOS sowie HO-1 mittels Western Blot. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von eNOS in Gewebe von Tieren, welche mit hohen Dosen von MA behandelt wurden im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen (*Abbildung 37 A*). Zudem wurde die Expression der HO-1 analysiert. Hierbei zeigte sich ein vergleichbarer Effekt. Die Behandlung von Tieren mit MA (20mg/kg) führte zu einer signifikant erhöhten HO-1 Expression im Vergleich zu Kontrollen (*Abbildung 37 B*).

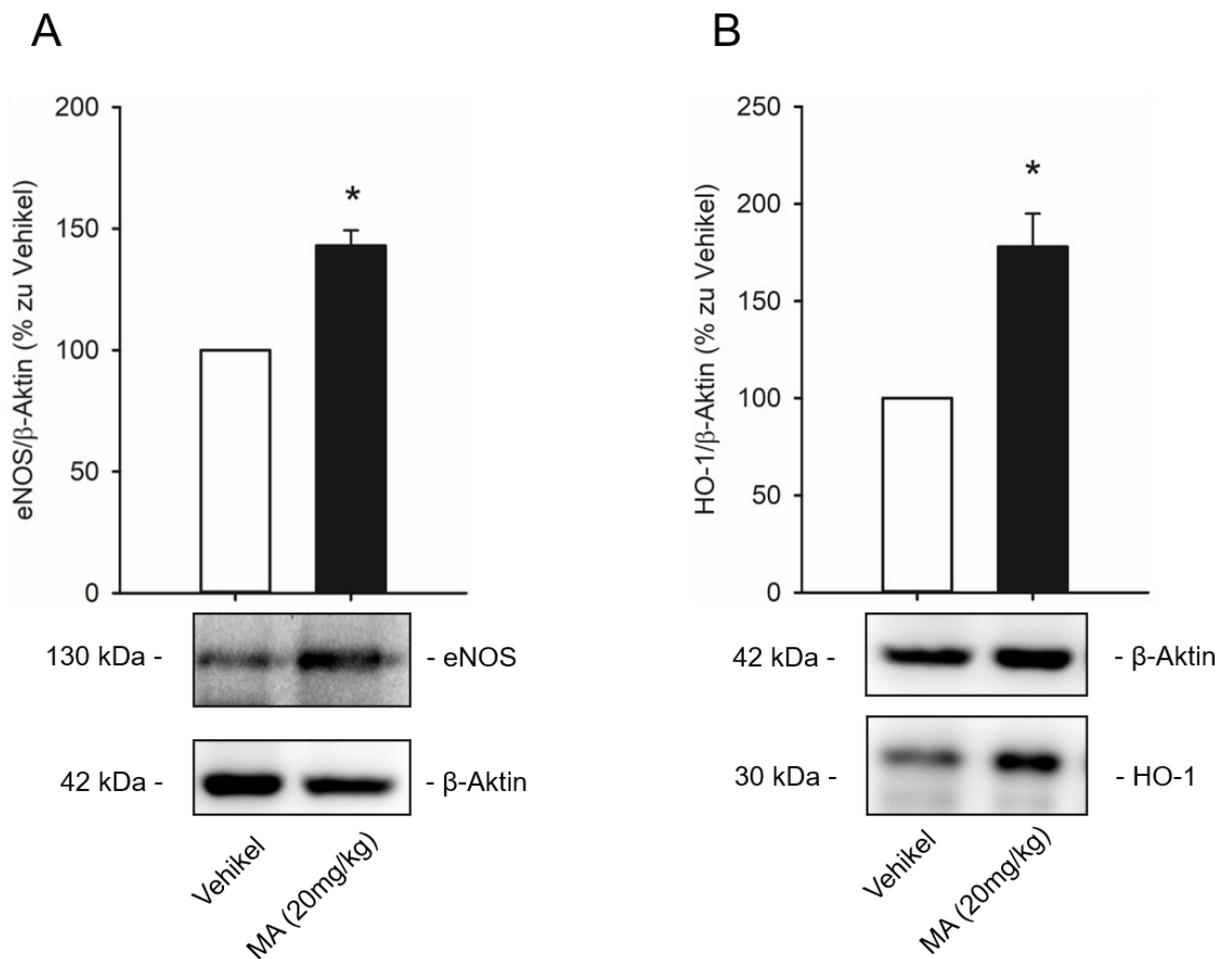


Abbildung 37: Effekt der MA auf die Expression antioxidativer Enzyme. Bestimmung der Expression von eNOS (**A**) und HO-1 (**B**) aus biotischem Material der RHK Vehikel (DMSO)-behandelter und MA (20mg/kg)-behandelter Tiere nach 3h Ischämie und 3h Reperfusion mittels Western Blot Analyse (n=3). Mittelwert \pm SD. * $p < 0.05$ vs. Vehikel.

Des Weiteren wurde die antioxidative Wirkung der MA immunhistochemisch analysiert. Hierzu erfolgte die Markierung der Zellen mit Antikörpern gegen 8-OHdG, einem spezifischen Marker für DNA-Schäden durch oxidativen Stress. Die Anzahl 8-OHdG-positiver Zellen war im RHK-Gewebe von MA-behandelten Tieren (20mg/kg) signifikant niedriger im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen (*Abbildung 38*).

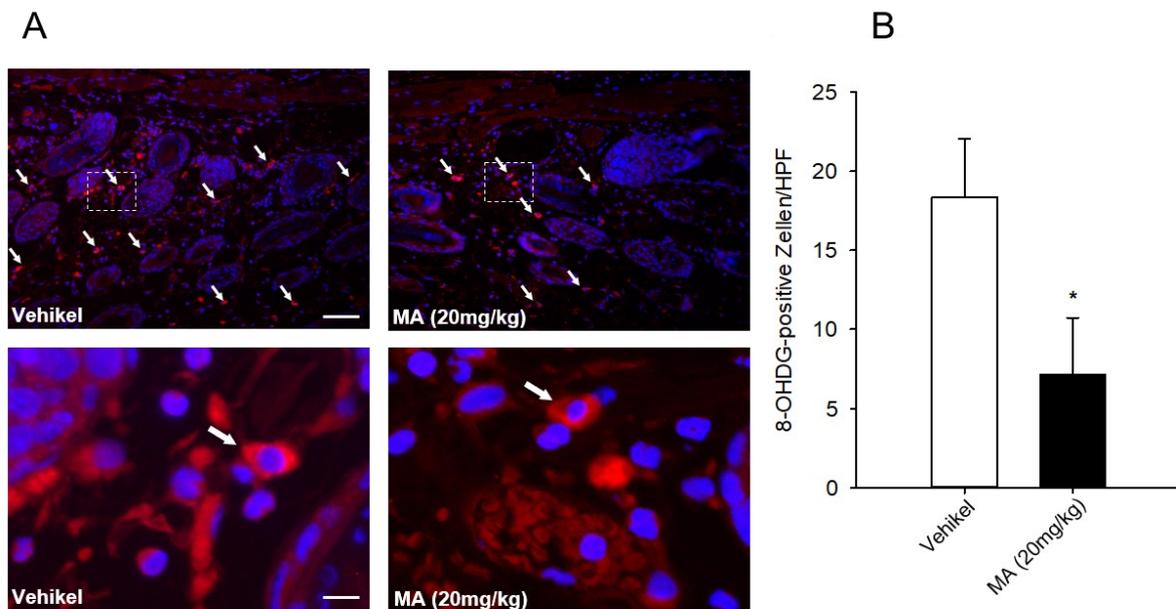


Abbildung 38: Analyse oxidativer Schäden durch Erfassung 8-OHdG-positiver Zellen.

A Immunhistochemische Detektion 8-OHdG-positiver Zellen (markiert mit weißen Pfeilen) in RHK Vehikel (DMSO)-behandelter und MA (20mg/kg)-behandelter Tiere nach 3h Ischämie und 24h Reperfusion. Maßstab = 75µm. Die untere Bildreihe (weiß umrandeter Bildausschnitt der oberen Bildreihe) zeigt 8-OHdG-markierte Zellen in höherer Vergrößerung. Maßstab = 10µm. **B** Quantitative Analyse 8-OHdG-positiver Zellen (pro HPF) in RHK Vehikel (DMSO)-behandelter und MA (20mg/kg)-behandelter Mäuse (n=8 pro Gruppe). Mittelwert ± SD. *p<0.05 vs. Vehikel.

7 Diskussion

Ischämie und Reperfusion gehören zu den klinisch bedeutsamsten Pathologien. Durch die Aktivierung der Signalwege von HIF-1 α sowie NF κ B wird eine inflammatorische Reaktion induziert (Taylor, Colgan, 2017). Leukozyten werden aktiviert und interagieren mit dem mikrovaskulären Endothel. Steigender oxidativer Stress erhöht die Apoptoserate und führt in der Reperusionsphase durch zusätzliche Gewebeschädigung zur Entstehung des Reperfusionsschadens. Aus diesem Grund ist auch die Reperfusion als therapierelevant einzustufen. Bisherige klinische Überlegungen zur Therapie des Reperfusionsschadens blieben wenig erfolgreich. Allerdings äußerte der Therapieansatz mit Entzündungshemmern (nichtsteroidale Antirheumatika, NSAR) in präklinischen Studien einen positiven Effekt auf den I/R-Schaden (Demiryilmaz et al., 2014; Zhu et al., 2014).

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen der MA auf den I/R-Schaden untersucht. Wegen ihrer vielfältigen Einsatzmöglichkeiten gewinnen Phytotherapeutika in der Medizin zunehmend an Bedeutung. Die MA besitzt, ähnlich den NSAR, eine antiinflammatorische Wirkung (Huang et al., 2011; Marquez Martin et al., 2006) und verfügt daher über therapeutisches Potenzial. Darüber hinaus besitzt die MA eine antioxidative Wirkung (Montilla et al., 2003). Sie kann durch I/R anfallende ROS eliminieren und bietet zusätzlichen Schutz vor erhöhtem oxidativem Stress (Qin et al., 2014). Während die MA bei einer Dosierung von über 100 μ M in gesunden Zellen das Zellwachstum hemmt und Apoptose induziert, beeinflussen Dosierungen unter 100 μ M ausschließlich das Wachstum der meisten Tumorzellen (Juan et al., 2008). Daher wurden die Versuche in dieser Studie mit MA in den Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M sowie 40 μ M durchgeführt. Für die Untersuchungen *in vivo* dienten zur Orientierung bisherige Publikationen. Diese zeigten, dass Konzentrationen von 10mg/kg bis 20mg/kg die Proliferation von Tumorzellen hemmen (Moneriz et al., 2011; Nieto et al., 2013; Zhang et al., 2014). Da MA eine sehr niedrige orale Bioverfügbarkeit besitzt (Sanchez-Gonzalez et al., 2014) wurde die Phytosubstanz i.p. appliziert.

Zunächst wurde der Einfluss der MA auf die Viabilität von Endothelzellen und Perizyten untersucht. Bisherige Publikationen konzentrierten sich hauptsächlich auf die dosisabhängige antikanzerogene Aktivität der MA (Chang et al., 2014; Dong et al., 2017; Sommerwerk et al., 2016). Dosierungen der MA unter 100 μ M reduzieren die Proliferationsrate von Tumorzellen, Dosierungen über 100 μ M können zudem Apoptosen induzieren (Juan et al., 2008). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass MA ab einer Dosierung von 20 μ M die mitochondriale Aktivität der Endothelzellen signifikant reduziert. Entgegen der Erwartungen blieb die mitochondriale Aktivität der Perizyten konstant. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die geringere Proliferationsrate der Perizyten im Vergleich zu den in dieser Studie verwendeten Endothelzellen (HDMEC) zurückzuführen. Reyes et al. (Reyes-Zurita et al., 2013) beschrieben

eine Zunahme der Apoptosen in Abhängigkeit zur Konzentration von MA in Zellen mit fehlender Funktion des Tumorsuppressorgens p53. Zellen mit mutiertem p53 besitzen eine hohe Teilungsrate. Es ist daher anzunehmen, dass HDMEC wegen ihrer höheren Proliferationsrate stärker von der antiproliferativen Wirkung der MA beeinflusst werden als Perizyten. Weiterhin ist bekannt, dass die MA in Zellen hoher Teilungsrate in den Zellzyklus eingreift und einen Arrest zwischen den Phasen G0/G1 hervorruft (Reyes et al., 2006). Dies unterstreicht die suppressive Wirkung von MA auf das zelluläre Wachstum.

Der LDH Assay zeigte, dass MA in Konzentrationen geringer als 100µM die Zellviabilität nicht beeinflusst. Der Annexin V/PI Assay demonstrierte zudem, dass MA nicht zu vermehrter Apoptose oder Nekrose in gesunden Zellen führt. Dadurch konnte eine zytotoxische Wirkung der MA in der verwendeten Konzentration ausgeschlossen werden.

Die Auswirkungen der MA auf die Expression endothelialer Adhäsionsproteine wurden *in vitro* nach Kultivierung der Zellen unter 16h Hypoxie und 24h Reoxygenierung untersucht. Durchflusszytometrisch konnte eine signifikante, dosisabhängige Reduktion der Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 durch die MA festgestellt werden. E-Selektin ist für einen ersten Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen sowie das sich anschließende *Rolling* verantwortlich (Kunkel, Ley, 1996). ICAM-1 sowie VCAM-1 tragen zu Adhärenz und Transmigration der Leukozyten bei (Dean et al., 1993; Lawson, Wolf, 2009). Sie interagieren mit den von Leukozyten exprimierten Integrinen LFA-1 sowie Mac-1 (Li et al., 2018; Proebstl et al., 2012). Diese leukozytären Rezeptoren werden infolge einer Hypoxie verstärkt exprimiert und sind an einer vermehrten Leukozytenadhärenz sowie Transmigration beteiligt (Ginis et al., 1993; Li et al., 2018; Ostermann et al., 2002). Neben Endothelzellen sind auch Perizyten durch Expression von ICAM-1 in den Prozess der Transmigration eingebunden (Proebstl et al., 2012; Stark et al., 2013). Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass MA auch in Perizyten die Expressionszunahme von ICAM-1 infolge Hypoxie signifikant reduziert.

Einen reprimierenden Effekt der MA auf die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 konnte bereits in Tumorstudien beobachtet werden. Tumorzellen besitzen eine erhöhte Expression von ICAM-1, die mit Tumorprogress sowie Metastasierungskapazität korreliert (Guo et al., 2014; Huang et al., 2017; Kotteas et al., 2014; Maruo et al., 2002; Schmidmaier et al., 2006). Park et al. (Park et al., 2013) beobachteten eine deutliche Reduktion sowohl der Migration als auch der Invasion von MA-behandelten Tumorzellen der Prostata ins umliegende Gewebe. Dies wurde auf eine Reduktion der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 durch MA zurückgeführt (Park et al., 2013). An Tumorzellen des Pankreaskarzinoms konnten Li et al. (Li et al., 2010) zeigen, dass MA die Zytokin-induzierte ICAM-1 Expression inhibiert und dadurch das invasive Potential der Tumorzellen reduziert.

Hypoxie induziert verschiedene Signalkaskaden, unter anderem die HIF-1 α -abhängige Aktivierung des NF κ B-Signalweges (Chen, Ghosh, 1999; Gilmore, 2006; Manning et al., 1995; Taylor, Cummins, 2009; Walmsley et al., 2005). Die inhibierende Wirkung der MA auf den NF κ B-Signalweg wurde bereits in einigen Studien untersucht. Es wurde gezeigt, dass MA die Phosphorylierung des I κ B-Komplexes sowie die Translokation und Bindung des p65-Komplexes an die DNA inhibiert (Hsum et al., 2011; Yap, Lim, 2015). Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie und der Western Blot Analyse erfolgte im Rahmen dieser Studie die subzelluläre Lokalisation von p65. Hierbei zeigte sich, dass die MA die Translokation von p65 in den Nukleus inhibiert. Allerdings ist der NF κ B-Signalweg nicht alleinig für die Expression der endothelialen Adhäsionsproteinen verantwortlich. Ein weiteres Enzym in diesem Prozess ist die Proteinkinase (PK)C. Aktiviert durch Hypoxie steigert sie sowohl Proteinstabilität als auch Transkriptionsaktivität von HIF-1 α (Kim et al., 2016; Lee et al., 2007) und gilt als weiterer Stimulus des NF κ B-Signalweges. Interessanterweise kann auch die Aktivität der PKC durch die MA reduziert werden (Marquez Martin et al., 2006; Mooi et al., 2012). Daher kann spekuliert werden, dass der supprimierte Expressionsanstieg endothelialer Adhäsionsproteine durch MA auf eine duale Hemmung der PKC und des NF κ B-Signalweg zurückgeführt werden kann.

Die im Rahmen dieser Studie bislang beschriebenen Versuche wurden unter H/R-Bedingungen *in vitro* durchgeführt. Allerdings benötigt die Analyse der Leukozyten-Endothelzellinteraktion das komplexe Zusammenspiel vieler Faktoren und Zellen, weshalb die weiteren Untersuchungen unter I/R-Bedingungen *in vivo* erfolgten.

Nach I/R blieb die Anzahl rollender Leukozyten in Vehikel-behandelten Mäusen unverändert. Allerdings konnte in MA (20mg/kg)-behandelten Mäusen verglichen zu Vehikel-behandelten Tieren eine signifikante Zunahme rollender Leukozyten erfasst werden. Langsames Rollen der Leukozyten wird durch E-Selektin kontrolliert, das ebenfalls an der Leukozytenadhärenz beteiligt ist. Kunkel et al. (Kunkel, Ley, 1996) berichteten, dass sich in Abwesenheit von E-Selektin die Geschwindigkeit rollender Leukozyten in Venolen mehr als verdoppelt. Die erhöhte Anzahl rollender Leukozyten in MA (20mg/kg)-behandelten Mäusen kann als Effekt der schnelleren Rollgeschwindigkeit gesehen werden, wodurch mehr Leukozyten im definierten Zeitintervall den untersuchten Gefäßabschnitt passieren. Entsprechend kann spekuliert werden, dass auch *in vivo* nach MA-Behandlung die Expression von E-Selektin auf Endothelzellen deutlich reduziert ist.

Die adhärenenten Leukozyten nahmen infolge I/R in Vehikel-behandelten Mäusen deutlich zu. Hingegen fiel der Anstieg adhärenenten Leukozyten in MA-behandelten Mäusen durch I/R erheblich geringer aus, was auf die reduzierte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 zurückgeführt werden kann. Um dies zu prüfen, wurden Gewebeproben der RHK nach 3h

Ischämie und 3h Reperfusion mittels Western Blot analysiert. Wie erwartet, zeigte sich eine deutlich geringere Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in MA-behandelten Tieren im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen und bestätigte somit die *in vitro* Ergebnisse.

Im Rahmen inflammatorischer Reaktionen werden Zytokine freigesetzt, die Immunzellen in das betroffene Gewebe rekrutieren (Nourshargh, Alon, 2014). Zu diesen proinflammatorischen Zytokinen zählen unter anderem TNF- α und Interleukin (IL)-6. Zur Erfassung transmigrierter Leukozyten wurden Gewebeproben der RHK immunhistochemisch analysiert. Bei Zählung transmigrierter Leukozyten wurde zwischen MPO-positiven neutrophilen Granulozyten und CD68-positiven Makrophagen unterschieden. Es zeigte sich, dass in MA-behandelten Mäusen erheblich weniger Leukozyten transmigrierten als in Vehikel-behandelten Mäusen. Es ist anzunehmen, dass die in einigen Studien beschriebene inhibierende Wirkung der MA auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine zu diesem Ergebnis beigetragen hat (Huang et al., 2011; Marquez Martin et al., 2006). Beispielweise konnten Yap et al. (Yap et al., 2016) einen inhibierenden Einfluss der MA auf die sekretorische Phospholipase (sPL) A2-IIA nachweisen. Die sPLA2 ist als ein Schlüsselenzym vaskulärer Inflammation an der Atherogenese beteiligt (Divchev, Schieffer, 2008). Durch die hemmende Wirkung der MA wird die sPLA2-IIA-induzierte Migration der Monozyten reduziert (Yap et al., 2016). Somit kann vermutet werden, dass dieser Mechanismus an der geringeren Rekrutierung von Makrophagen im Gewebe der RHK beteiligt ist.

Die MA wurde in einigen Studien als antioxidativ charakterisiert (Li et al., 2017; Montilla et al., 2003; Qin et al., 2014). Zur Quantifizierung ihres antioxidativen Effektes *in vivo* wurde die Expression der eNOS im Gewebe der RHK untersucht. In der hier durchgeführten Studie zeigte sich in Mäusen, die mit 20mg/kg MA behandelt wurden, eine signifikante Expressionszunahme von eNOS im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Li et al. (Li et al., 2017) und könnte für eine durch MA hervorgerufene intrazelluläre Konzentrationszunahme von NO verantwortlich sein. NO vermittelt seine antioxidative Wirkung durch Stimulation der Genexpression von Hämoxygenase (HO)-1 (Mottlerini et al., 1996). Aktiviert wird die Expression von HO-1 durch den Transkriptionsfaktor Nrf2. Qin et al. (Qin et al., 2014) konnten zeigen, dass MA zu einer nukleären Akkumulation von Nrf2 und vermehrten Expression von HO-1 führt. Auch in der vorliegenden Studie konnte eine erhöhte Expression der HO-1 in MA-behandelten Mäusen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis kann somit auf die Expressionszunahme von eNOS in MA-behandelten Mäusen zurückgeführt werden und bestätigt die antioxidative Wirkung der MA im Gewebe.

Während der Reperfusion werden in Endothelzellen und Perizyten vermehrt ROS freigesetzt (Garlick et al., 1987). ROS sind durch ihr freies Elektron (Rassow, 2016b) in der Lage,

DNA-Schäden hervorzurufen, die dann zur Induktion der Apoptose führen können. Dem gegenüberstehend heben Antioxidantien die Reaktionsbereitschaft der ROS auf. Ein durch verstärkt anfallende ROS hervorgerufenen Ungleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien führt zu oxidativem Stress, der gehäuft DNA-Schäden verursacht. Dieser oxidative Schaden der DNA wurde durch Markierung der Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen 8-OHdG untersucht. 8-OHdG ist ein toxisches DNA-Oxidationsprodukt (Biesalski et al., 2004) und damit ein Indikator für oxidativen Stress, eingeschränkten Zellmetabolismus sowie mitochondriale Dysfunktion (Long et al., 2012). Der Nachweis einer signifikant geringeren Anzahl 8-OHdG-positiver Zellen in MA-behandelten Mäusen im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen unterstreicht die antioxidative Wirkung der MA.

Die vorliegende Studie zeigt nun, dass MA die I/R-induzierte Entzündung inhibiert und die Leukozyten-Endothelzellinteraktion durch Reduktion der Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle supprimiert. Dies konnte auf die Inhibition des NFκB-Signalweges durch MA zurückgeführt werden. Aus der vorliegenden Studie geht ebenfalls hervor, dass MA die Zellen vor oxidativen DNA-Schäden schützt. Durch ihr günstiges Wirkprofil erwies sich die MA *in vitro* als attraktiver Lösungsansatz, was im Tiermodell dann auch bestätigt werden konnte.

8 Ausblick und Perspektiven

Durch ihre vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten ist die MA prinzipiell interessant für die klinische Forschung. Beispielsweise kann sie auf dem Gebiet entzündlicher Gelenkerkrankungen wie der Osteoarthritis durch ihre antiinflammatorische Wirkkomponente klinische Funktionen verbessern und Beschwerden lindern (Yoon et al., 2018). Qian et al. (Qian et al., 2011) konnten durch Zellkulturversuche *in vitro* zeigen, dass MA einen durch Sauerstoff-Glukose-Mangel hervorgerufenen Schaden kortikaler Nervenzellen reduziert. Gleichzeitig erweitert die MA das therapeutische Fenster des NDMA-Rezeptor-Antagonisten MK-801, dem eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen wird (Qian et al., 2016).

Zusammenfassend kommt die vorliegende Studie zu dem Ergebnis, dass die MA sowohl zur Prophylaxe als auch zur Therapie des I/R-Schadens empfohlen werden kann.

Vor dem Einsatz der MA im Rahmen klinischer Studien müssen allerdings noch weitere Untersuchungen zur Bestimmung einer genauen Dosierung sowie zur Charakterisierung des Nebenwirkungsprofils der MA folgen.

9 Literaturverzeichnis

1. (2011). Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (Institut of Health)
2. Ampofo E, Rudzitis-Auth J, Dahmke IN, Rossler OG, Thiel G, Montenarh M, Menger MD, Laschke MW (2015) Inhibition of protein kinase CK2 suppresses tumor necrosis factor (TNF)-alpha-induced leukocyte-endothelial cell interaction. *Biochim Biophys Acta* 1852:2123-2136
3. Ampofo E, Widmaier D, Montenarh M, Menger MD, Laschke MW (2016) Protein Kinase CK2 Regulates Leukocyte-Endothelial Cell Interactions during Ischemia and Reperfusion in Striated Skin Muscle. *Eur Surg Res* 57:111-124
4. Anbarasan C, Bavanilatha M, Latchumanadhas K, Ajit Mulasari S (2015) ICAM-1 molecular mechanism and genome wide SNP's association studies. *Indian Heart J* 67:282-287
5. Baker M, Wayland H (1974) On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7:131-143
6. Bender T, Martinou JC (2013) Where killers meet--permeabilization of the outer mitochondrial membrane during apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a011106
7. Biesalski HK, Gola U, Huber JC, Jacobi G, Baake N (2004) *Kursbuch Anti-Aging*, Thieme).
8. Binder A, Ali A, Chawla R, Aziz HA, Abbate A, Jovin IS (2015) Myocardial protection from ischemia-reperfusion injury post coronary revascularization. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 13:1045-1057
9. Buerkle MA, Lehrer S, Sohn HY, Conzen P, Pohl U, Krotz F (2004) Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo. *Circulation* 110:2053-2059
10. Chang T, Li X, Chen X, Zhang L, Yang F, Li Z, Li J (2014) Maslinic acid activates mitochondria-dependent apoptotic pathway in cardiac carcinoma. *Clin Invest Med* 37:E217-224
11. Chen FE, Ghosh G (1999) Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 18:6845-6852
12. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T (2015) Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol* 6:472-485
13. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96:60-68
14. Dean DC, Iademarco MF, Rosen GD, Sheppard AM (1993) The integrin alpha 4 beta 1 and its counter receptor VCAM-1 in development and immune function. *Am Rev Respir Dis* 148:S43-46
15. Demiryilmaz I, Turan MI, Kisaoglu A, Gulapoglu M, Yilmaz I, Suleyman H (2014) Protective effect of nimesulide against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: effects on oxidant/antioxidants, DNA mutation and COX-1/COX-2 levels. *Pharmacol Rep* 66:647-652
16. Divchev D, Schieffer B (2008) The secretory phospholipase A2 group IIA: a missing link between inflammation, activated renin-angiotensin system, and atherogenesis? *Vasc Health Risk Manag* 4:597-604
17. Dong X, Zhang J, Zhou Z, Ye Z, Chen J, Yuan J, Cao F, Wang X, Liu W, Yu W, Li X (2017) Maslinic acid promotes autophagy by disrupting the interaction

- between Bcl2 and Beclin1 in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Oncotarget* 8:74527-74538
18. Fleming I (2010) Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch* 459:793-806
 19. Forstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33:829-837, 837a-837d
 20. Forstermann U, Xia N, Li H (2017) Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res* 120:713-735
 21. Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF (1987) Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res* 61:757-760
 22. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM (1995) Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1652-1659
 23. Gilmore TD (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25:6680-6684
 24. Ginis I, Mentzer SJ, Faller DV (1993) Hypoxia induces lymphocyte adhesion to human mesenchymal cells via an LFA-1-dependent mechanism. *Am J Physiol* 264:C617-624
 25. Guo P, Huang J, Wang L, Jia D, Yang J, Dillon DA, Zurakowski D, Mao H, Moses MA, Auguste DT (2014) ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14710-14715
 26. Hayden MS, Ghosh S (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132:344-362
 27. Heinicke K, Hofer T, Wenger R, Gassmann M (2002) Die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 53:270-276
 28. Hsum YW, Yew WT, Hong PL, Soo KK, Hoon LS, Chieng YC, Mooi LY (2011) Cancer chemopreventive activity of maslinic acid: suppression of COX-2 expression and inhibition of NF-kappaB and AP-1 activation in Raji cells. *Planta Med* 77:152-157
 29. Huang C, Li N, Li Z, Chang A, Chen Y, Zhao T, Li Y, Wang X, Zhang W, Wang Z, Luo L, Shi J, Yang S, Ren H, Hao J (2017) Tumour-derived Interleukin 35 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell extravasation and metastasis by inducing ICAM1 expression. *Nat Commun* 8:14035
 30. Huang CH, Chiang CY, Pen RH, Tsai MS, Chen HW, Hsu CY, Wang TD, Ma MH, Chen SC, Chen WJ (2015) Hypothermia treatment preserves mitochondrial integrity and viability of cardiomyocytes after ischaemic reperfusion injury. *Injury* 46:233-239
 31. Huang L, Guan T, Qian Y, Huang M, Tang X, Li Y, Sun H (2011) Anti-inflammatory effects of maslinic acid, a natural triterpene, in cultured cortical astrocytes via suppression of nuclear factor-kappa B. *Eur J Pharmacol* 672:169-174
 32. Hussain Shaik A, Rasool SN, Abdul Kareem M, Krushna GS, Akhtar PM, Devi KL (2012) Maslinic acid protects against isoproterenol-induced cardiotoxicity in albino Wistar rats. *J Med Food* 15:741-746
 33. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P, Group ESD (2017) 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients

- presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* 39:119-177
34. Juan ME, Planas JM, Ruiz-Gutierrez V, Daniel H, Wenzel U (2008) Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells. *Br J Nutr* 100:36-43
 35. Kaufmann K, Thiel G (2002) Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *Journal of Cellular Biochemistry* 85:381-391
 36. Keys A (1995) Mediterranean diet and public health: personal reflections. *Am J Clin Nutr* 61:1321S-1323S
 37. Kim H, Na YR, Kim SY, Yang EG (2016) Protein Kinase C Isoforms Differentially Regulate Hypoxia-Inducible Factor-1 α Accumulation in Cancer Cells. *J Cell Biochem* 117:647-658
 38. Klyszcz T, Junger M, Jung F, Zeintl H (1997) [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)* 42:168-175
 39. Kotteas EA, Boulas P, Gkiozos I, Tsagkouli S, Tsoukalas G, Syrigos KN (2014) The intercellular cell adhesion molecule-1 (icam-1) in lung cancer: implications for disease progression and prognosis. *Anticancer Res* 34:4665-4672
 40. Kunkel EJ, Ley K (1996) Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* 79:1196-1204
 41. Langer HF, Chavakis T (2009) Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med* 13:1211-1220
 42. Laschke MW, Haufel JM, Thorlacijs H, Menger MD (2005) New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *J Biomed Mater Res A* 74:696-704
 43. Laukkanen JA, Kunutsor SK, Niemela M, Kervinen K, Thuesen L, Makikallio TH (2017) All-cause mortality and major cardiovascular outcomes comparing percutaneous coronary angioplasty versus coronary artery bypass grafting in the treatment of unprotected left main stenosis: a meta-analysis of short-term and long-term randomised trials. *Open Heart* 4:e000638
 44. Lawson C, Wolf S (2009) ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* 61:22-32
 45. Lee JW, Park JA, Kim SH, Seo JH, Lim KJ, Jeong JW, Jeong CH, Chun KH, Lee SK, Kwon YG, Kim KW (2007) Protein kinase C-delta regulates the stability of hypoxia-inducible factor-1 α under hypoxia. *Cancer Sci* 98:1476-1481
 46. Li C, Yang Z, Zhai C, Qiu W, Li D, Yi Z, Wang L, Tang J, Qian M, Luo J, Liu M (2010) Maslinic acid potentiates the anti-tumor activity of tumor necrosis factor α by inhibiting NF- κ B signaling pathway. *Mol Cancer* 9:73
 47. Li F, Li Q, Shi X, Guo Y (2017) Maslinic acid inhibits impairment of endothelial functions induced by high glucose in HAEC cells through improving insulin signaling and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 95:904-913
 48. Li H, Forstermann U (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190:244-254
 49. Li H, Wallerath T, Förstermann U (2002) Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7:132-147
 50. Li N, Yang H, Wang M, Lu S, Zhang Y, Long M (2018) Ligand-specific binding forces of LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion and crawling. *Mol Biol Cell* 29:408-418

51. Lin X, Ozbey U, Sabitaliyevich UY, Attar R, Ozcelik B, Zhang Y, Guo M, Liu M, Alhewairini SS, Farooqi AA (2018) Maslinic acid as an effective anticancer agent. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 64:87-91
52. Long JD, Matson WR, Juhl AR, Leavitt BR, Paulsen JS (2012) 8OHdG as a marker for Huntington disease progression. *Neurobiology of Disease* 46:625-634
53. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F (2012) Taschenlehrbuch Histologie, Thieme).
54. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M, Hein L (2016). Phytotherapie. In *Pharmakologie und Toxikologie*, Lüllmann H, K Mohr, M Wehling, L Hein, eds. (Georg Thieme Verlag).
55. Lushchak VI (2014) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 224:164-175
56. Manning AM, Bell FP, Rosenbloom CL, Chosay JG, Simmons CA, Northrup JL, Shebuski RJ, Dunn CJ, Anderson DC (1995) NF-kappa B is activated during acute inflammation in vivo in association with elevated endothelial cell adhesion molecule gene expression and leukocyte recruitment. *J Inflamm* 45:283-296
57. Marquez Martin A, de la Puerta Vazquez R, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V (2006) Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. *Free Radic Res* 40:295-302
58. Maruo Y, Gochi A, Kaihara A, Shimamura H, Yamada T, Tanaka N, Orita K (2002) ICAM-1 expression and the soluble ICAM-1 level for evaluating the metastatic potential of gastric cancer. *Int J Cancer* 100:486-490
59. McEver RP (2015) Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res* 107:331-339
60. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K (1992) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 263:H1901-1906
61. Moneriz C, Marin-Garcia P, Bautista JM, Diez A, Puyet A (2011) Parasitostatic effect of maslinic acid. II. Survival increase and immune protection in lethal *Plasmodium yoelii*-infected mice. *Malar J* 10:103
62. Montilla MP, Agil A, Navarro MC, Jimenez MI, Garcia-Granados A, Parra A, Cabo MM (2003) Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med* 69:472-474
63. Mooi LY, Yew WT, Hsum YW, Soo KK, Hoon LS, Chieng YC (2012) Suppressive effect of maslinic acid on PMA-induced protein kinase C in human B-lymphoblastoid cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 13:1177-1182
64. Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM (1996) NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol* 270:H107-114
65. Murray IR, Baily JE, Chen WCW, Dar A, Gonzalez ZN, Jensen AR, Petrigliano FA, Deb A, Henderson NC (2017) Skeletal and cardiac muscle pericytes: Functions and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 171:65-74
66. Nieto FR, Cobos EJ, Entrena JM, Parra A, Garcia-Granados A, Baeyens JM (2013) Antiallodynic and analgesic effects of maslinic acid, a pentacyclic triterpenoid from *Olea europaea*. *J Nat Prod* 76:737-740
67. Nolte D, Schmid P, Jager U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl E, Messmer K, Vestweber D (1994) Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am J Physiol* 267:H1637-1642
68. Nourshargh S, Alon R (2014) Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 41:694-707

69. Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schroder A, Weber C (2002) JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* 3:151-158
70. Park SY, Nho CW, Kwon DY, Kang YH, Lee KW, Park JH (2013) Maslinic acid inhibits the metastatic capacity of DU145 human prostate cancer cells: possible mediation via hypoxia-inducible factor-1alpha signalling. *Br J Nutr* 109:210-222
71. Pieper C, Pieloch P, Galla HJ (2013) Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood-brain barrier. *Brain Res* 1524:1-11
72. Pries AR (1988) A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 7:327-345
73. Proebstl D, Voisin MB, Woodfin A, Whiteford J, D'Acquisto F, Jones GE, Rowe D, Nourshargh S (2012) Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med* 209:1219-1234
74. Qian Y, Guan T, Tang X, Huang L, Huang M, Li Y, Sun H (2011) Maslinic acid, a natural triterpenoid compound from *Olea europaea*, protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation-induced injury. *Eur J Pharmacol* 670:148-153
75. Qian Y, Tang X, Guan T, Li Y, Sun H (2016) Neuroprotection by Combined Administration with Maslinic Acid, a Natural Product from *Olea europaea*, and MK-801 in the Cerebral Ischemia Model. *Molecules* 21
76. Qin X, Qiu C, Zhao L (2014) Maslinic acid protects vascular smooth muscle cells from oxidative stress through Akt/Nrf2/HO-1 pathway. *Mol Cell Biochem* 390:61-67
77. Rassow J (2016a). Die Glykolyse. In *Duale Reihe Biochemie*, Rassow J, K Hauser, R Netzker, R Deutzmann, eds. (Georg Thieme Verlag).
78. Rassow J (2016b). Transport von O₂ und CO₂ im Blut. In *Duale Reihe Biochemie*, Rassow J, K Hauser, R Netzker, R Deutzmann, eds. (Georg Thieme Verlag).
79. Reyes-Zurita FJ, Rufino-Palomares EE, Medina PP, Leticia Garcia-Salguero E, Peragon J, Cascante M, Lupianez JA (2013) Antitumour activity on extrinsic apoptotic targets of the triterpenoid maslinic acid in p53-deficient Caco-2 adenocarcinoma cells. *Biochimie* 95:2157-2167
80. Reyes FJ, Centelles JJ, Lupianez JA, Cascante M (2006) (2Alpha,3beta)-2,3-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid, a new natural triterpene from *Olea europea*, induces caspase dependent apoptosis selectively in colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 580:6302-6310
81. Sanchez-Gonzalez M, Colom H, Lozano-Mena G, Juan ME, Planas JM (2014) Population pharmacokinetics of maslinic acid, a triterpene from olives, after intravenous and oral administration in rats. *Mol Nutr Food Res* 58:1970-1979
82. Schmidmaier R, Morsdorf K, Baumann P, Emmerich B, Meinhardt G (2006) Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo. *Int J Biol Markers* 21:218-222
83. Shan LQ, Ma S, Qiu XC, Zhou Y, Zhang Y, Zheng LH, Ren PC, Wang YC, Fan QY, Ma BA (2010) Hydroxysafflor Yellow A protects spinal cords from ischemia/reperfusion injury in rabbits. *BMC Neurosci* 11:98
84. Sommerwerk S, Heller L, Kuhfs J, Csuk R (2016) Urea derivatives of ursolic, oleanolic and maslinic acid induce apoptosis and are selective cytotoxic for several human tumor cell lines. *Eur J Med Chem* 119:1-16
85. Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, von Bruhl ML, Gartner F, Khandoga AG, Legate KR, Pless R, Hepper I, Lauber K, Walzog B, Massberg

- S (2013) Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol* 14:41-51
86. Taylor CT, Cummins EP (2009) The role of NF-kappaB in hypoxia-induced gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 1177:178-184
87. Taylor CT, Colgan SP (2017) Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat Rev Immunol* 17:774-785
88. Thakor P, Song W, Subramanian RB, Thakkar VR, Vesey DA, Gobe GC (2017) Maslinic Acid Inhibits Proliferation of Renal Cell Carcinoma Cell Lines and Suppresses Angiogenesis of Endothelial Cells. *J Kidney Cancer VHL* 4:16-24
89. Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP (1996) Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* 94:1682-1689
90. Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD (1998) Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multicolor fluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:510-520
91. Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, Sobolewski A, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N, Chilvers ER (2005) Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med* 201:105-115
92. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ (2001) TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412:346-351
93. Xia N, Forstermann U, Li H (2017) Effects of resveratrol on eNOS in the endothelium and the perivascular adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1403:132-141
94. Xu R, Fazio GC, Matsuda SP (2004) On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65:261-291
95. Yap WH, Lim YM (2015) Mechanistic Perspectives of Maslinic Acid in Targeting Inflammation. *Biochem Res Int* 2015:279356
96. Yap WH, Ahmed N, Lim YM (2016) Inhibition of Human Group IIA-Secreted Phospholipase A2 and THP-1 Monocyte Recruitment by Maslinic Acid. *Lipids* 51:1153-1159
97. Yoon J, Kanamori A, Fujii K, Isoda H, Okura T (2018) Evaluation of maslinic acid with whole-body vibration training in elderly women with knee osteoarthritis. *PLoS One* 13:e0194572
98. Zhang S, Ding D, Zhang X, Shan L, Liu Z (2014) Maslinic acid induced apoptosis in bladder cancer cells through activating p38 MAPK signaling pathway. *Mol Cell Biochem* 392:281-287
99. Zhu SH, Zhou LJ, Jiang H, Chen RJ, Lin C, Feng S, Jin J, Chen JH, Wu JY (2014) Protective effect of indomethacin in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Zhejiang Univ Sci B* 15:735-742

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M.D. Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, für die Überlassung dieses Forschungsthemas.

Herrn Prof. Dr. med. Matthias W. Laschke danke ich für seine wissenschaftliche Beratung und kritischen Diskussionen, die mein wissenschaftliches Interesse erheblich gefördert haben.

Herrn Dr. rer. nat. Emmanuel Ampofo möchte ich für seine zahlreichen Ratschläge bei Durchführung der Versuche, Datenerhebung und Interpretation der Ergebnisse danken. Seine Hilfsbereitschaft hat meine wissenschaftliche Entwicklung maßgeblich geprägt.

Weiterhin möchte ich allen Institutsmitarbeitern für die großartige Unterstützung danken. Insbesondere Frau J. Becker sowie Frau C. Bickelmann danke ich für die Anfertigung der histologischen Präparate und immunhistologischen Färbungen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre Liebe danken. Ich danke meinem Vater, der mich trotz seines zu frühen Todes maßgeblich geprägt hat, sowie meiner Mutter, die mir in jeder Situation zur Seite steht.

Vielen Dank

11 Publikationen

11.1 Originalarbeiten

Ampofo E, **Berg JJ**, Menger MD, Laschke MW (2019) Maslinic acid alleviates ischemia/reperfusion-induced inflammation by downregulation of NFkappaB-mediated adhesion molecule expression. Sci Rep 9:6119

11.2 Kongressbeiträge

Berg JJ, Ampofo E, Laschke MW, Menger MD, Maslinic acid inhibits leukocyte-endothelial cell interaction during ischemia and reperfusion. 21. Chirurgische Forschungstage; Köln; September 2017

Berg JJ, Ampofo E, Laschke MW, Menger MD, Maslinic acid inhibits leukocyte-endothelial cell interaction during ischemia and reperfusion. 135. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie; Berlin; April 2018

12 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.