

**Der Effekt von Rosuvastatin auf die Mobilisation endothelialer  
Progenitorzellen und deren Auswirkung auf die  
Endothelzellregeneration im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Stefan Hubertus Leo Junk  
aus Dillingen/Saar

2009

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. N. Werner

2. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Hartmann

Tag der Mündlichen Prüfung: 4. November 2009

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
mit Schwerpunkten Kardiologie, Pneumologie, Angiologie  
des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

*Für meine Eltern*



## **Inhalt**

<b>Abkürzungen.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Atherosklerose.....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Ätiologie der Atherosklerose.....	11
1.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose.....	11
1.1.3 Plaquebildung bei der Atherosklerose.....	13
1.1.4 Therapie der Atherosklerose.....	15
<b>1.2 Endotheliale Progenitorzellen.....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Endotheliale Progenitorzellen und Atherosklerose.....	16
1.2.2 Endotheliale Progenitorzellen und Statine.....	17
<b>1.3 Hypothese.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>19</b>
<b>1.5 Publikation der Arbeit.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Material.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Chemikalien.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Antikörper.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Lösungen.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 Medien.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6 Versuchstiere.....</b>	<b>26</b>
<b>2.7 OP-Besteck.....</b>	<b>26</b>
<b>2.8 Technische Geräte, Software.....</b>	<b>27</b>

<b>3. Methoden</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1 <i>in vivo</i> - Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.1.1 Rosuvastatinbehandlung.....	28
3.1.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung.....	28
3.1.1.2 Zeitverlauf.....	28
3.1.1.3 Kontrollen.....	29
3.1.1.4 Messung der Rosuvastatin-Plasma-Konzentration.....	29
3.1.2 Endothelzelldenudationsmodell.....	30
3.1.3 Organentnahmen.....	33
3.1.3.1 Splenektomie.....	33
3.1.3.2 Blutentnahme.....	33
3.1.3.3 Gewinnung der Knochenmarksuspension.....	33
3.1.3.4 Gewinnung der Gefäßpräparate.....	34
<b>3.2 <i>in vitro</i> - Methoden</b> .....	<b>35</b>
3.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus der Milz.....	35
3.2.2 Endotheliale Progenitorzell-Kultur.....	37
3.2.3 Zellfärbung mit acDi-LDL und Lectin.....	37
3.2.4 Auswertung der gefärbten Zellen.....	38
3.2.5 Fluoreszenzmarkierung mit PKH-26.....	38
3.2.6 Gefäßschnitte und immunhistochemische Auswertung.....	38
3.2.7 Evans-Blue-Färbung.....	40
3.2.8 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	40
<b>3.3 Durchflusszytometrie (FACS)</b> .....	<b>41</b>
3.3.1 FACS-Analyse endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark.....	43
3.3.2 FACS-Analyse endothelialer Progenitorzellen aus dem EDTA-Vollblut.....	43
3.3.3 FACS-Analyse endothelialer Progenitorzellen aus Splenozyten.....	44
<b>3.4 Statistische Analyse</b> .....	<b>44</b>

<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Rosuvastatinbehandlung.....</b>	<b>45</b>
4.1.1 Rosuvastatin-Mevalonatplasmakonzentration.....	45
4.1.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung.....	47
4.1.2.1 Rosuvastatin führt dosisabhängig zu einer Heraufregulation von endothelialen Progenitorzellen in peripherem Blut und Knochenmark.....	47
4.1.2.2 Rosuvastatin führt dosisabhängig zu einer Heraufregulation von endothelialen Progenitorzellen im mononukleären Zellpool der Mäusemilz.....	48
4.1.3 Zeitabhängigkeit.....	50
4.1.3.1 Rosuvastatin führt zeitabhängig zu einer Heraufregulation von endothelialen Progenitorzellen in peripherem Blut und Knochenmark.....	50
4.1.3.2 Rosuvastatin führt zeitabhängig zu einer Heraufregulation von endothelialen Progenitorzellen im mononukleären Zellpool der Mäusemilz.....	52
4.1.4 Die Rolle der Milz in der endothelialen Progenitorzell-Regulation.....	53
4.1.5 Einfluss einer Splenektomie auf die knochenmarkständigen und frei zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen.....	54
<b>4.2 <i>in vivo</i>-Evaluation der aus der Milz stammenden endothelialen     Progenitorzellen und Monozyten im Retransfusionsmodell.....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Charakterisierung der endothelialen Progenitorzellen aus der Milz.....	56
4.2.2 Reendothelialisierung und Neointimaausbildung.....	57
4.2.2.1 Mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark und der Milz sowie EPCs wandern nach intravenöser Injektion zu ihrem Zielorgan und nicht in die Intimaläsion nach Endothelzelldenudation.....	57
4.2.2.2 Eine vorherige Splenektomie ermöglicht den transfundierten mononukleären Zellen und den EPCs ein Einwandern im Bereich der Intimaläsion nach Endothelzelldenudation.....	57
4.2.2.3 Intravenös transfundierte milzstämmige mononukleäre Zellen und EPCs führen zu einer Reduktion der Neointima-Formation.....	61

<b>5. Diskussion.....</b>	<b>64</b>
<b>5.1 Statine und endotheliale Progenitorzellen.....</b>	<b>65</b>
<b>5.2 EPC-assoziierte Reduktion einer Neointima nach Endothelzelldenudation.....</b>	<b>67</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>72</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>81</b>



## **Abkürzungen**

Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BSA	Bovines Serum Albumin
CFU	colony forming units
CFU-EC	colony forming unit endothelial cells
CoA	Coenzym A
CRP	C-Reaktives Protein
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ECFC	endothelial colony forming cells
eNOS	endotheliale Stickoxid-Synthase
EPC	endothelial progenitor cell / endotheliale Progenitorzelle
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
h	Stunde/n
HDL	High Density Lipoprotein
HE-Färbung	Färbung mit Hämatoxylin nach Ehrlich und Eosin
HMG-CoA-Reduktase	β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
IE	internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzerkrankung
l	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
min	Minute/n
mg	Milligramm

ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MNC	mononukleäre Zellen
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
s.c.	subkutan
U/min	Umdrehungen pro Minute
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
Vol.	Volumen

# **1. Einleitung**

## **1.1 Atherosklerose**

### **1.1.1 Ätiologie der Atherosklerose**

Herz-Kreislaufkrankungen sind nach wie vor die führende Todesursache in Deutschland, Europa und den Industrienationen. Die zugrunde liegende Erkrankung ist die Atherosklerose. Es handelt sich dabei um pathologische Veränderungen der arteriellen Gefäßwand, die eine drastische Einschränkung der Gefäßfunktion nach sich ziehen. Diese pathologischen Veränderungen sind das Ergebnis eines multifaktoriellen Geschehens, welches die kardiovaskulären Risikofaktoren als äussere Einflüsse miteinbezieht. Hier sind als beeinflussbare Größen zu nennen: Bewegungsmangel, Adipositas, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, erhöhter Cholesterinspiegel, erhöhte Triglyceride und andere bislang noch nicht identifizierte Faktoren (54). Es gibt aber auch nicht beeinflussbare Risikofaktoren wie zum Beispiel das Alter, das männliche Geschlecht und eine genetische Veranlagung (54). Die Atherosklerose tritt klinisch als koronare Herzkrankheit (KHK), Herzinsuffizienz, akutes Koronarsyndrom, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und als Schlaganfall in Erscheinung (39; 54). Beim Auftreten von mehreren kardiovaskulären Risikofaktoren multipliziert sich das Risiko einer Komplikation (63).

### **1.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose**

Das Verständnis der Pathophysiologie der Atherosklerose hat sich in den letzten Jahren verändert. Während zunächst angenommen wurde, dass es sich bei der Atherosklerose im Wesentlichen um einen Ablagerungsprozess von Lipiden und Lipoproteinen in der Gefäßwand handelt, ist heute bekannt, dass es sich um einen komplexen Prozess handelt, charakterisiert durch eine unspezifische inflammatorische Reaktion der Gefäßwand (60). Bei dem frühen Stadium der Atherosklerose handelt es sich um die endotheliale Dysfunktion (39) (vgl. Abb. 1).

Durch kardiovaskuläre Risikofaktoren kommt es zu einer Schädigung des Endothels mit Endothelzellapoptose. In der Folge kommt es zum einen zu einer Erhöhung der Endothelpermeabilität für Lipide und andere zirkulierende Substanzen, zum anderen zu einer Aktivierung der Endothelzellen, was zu einer Expressierung von Rezeptormolekülen auf der Endothelzelloberfläche führt. Blutzellen wie Monozyten und T-Lymphozyten werden in Folge über Selektine und andere Adhäsionsmoleküle zunächst temporär, dann dauerhaft an die Endothelzelloberfläche gebunden (60). Prädilektionsstellen für die endotheliale Dysfunktion sind solche Stellen im arteriellen Gefäßsystem, an denen der optimale laminare Blutstrom gestört ist. Vermehrt auftretende mechanische Scherkräfte verringern die Synthese von endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) (88), was zu einer Abnahme der Fähigkeit zur Gefäßdilatation führt (32). Weiterhin besitzt Stickstoffmonoxid antiinflammatorische Eigenschaften (32), die bei einer Stickstoffmonoxid Abnahme ebenfalls rückläufig sind. Mechanische Scherkräfte haben ebenfalls über eine Aktivierung der Endothelzellen eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen zur Folge (66).

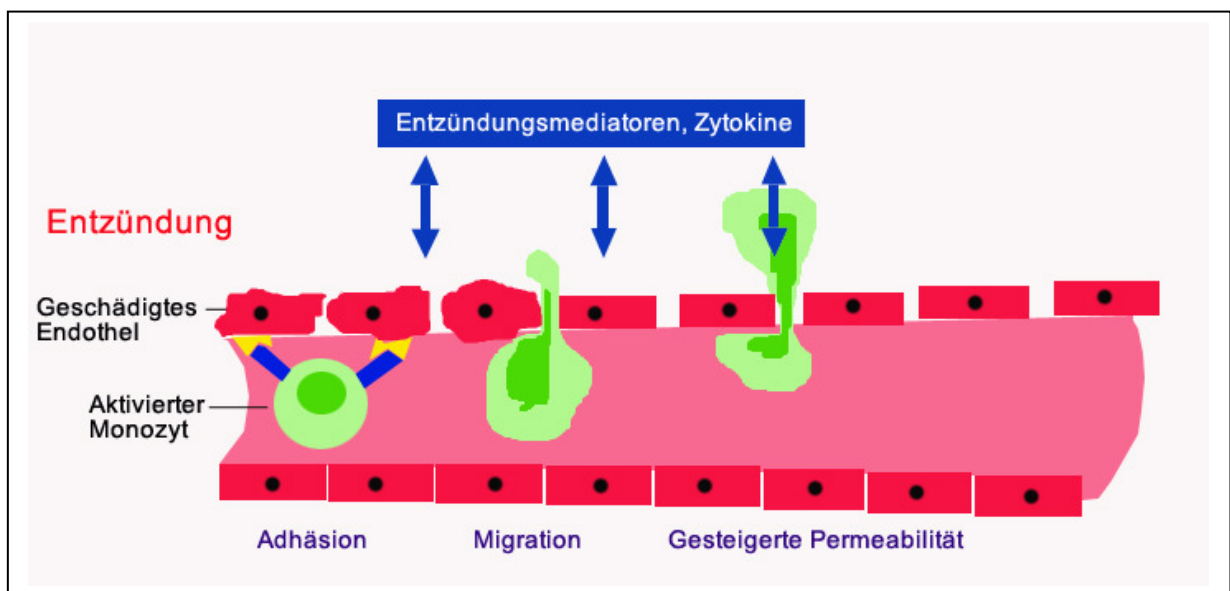


Abb. 1: Endotheliale Dysfunktion: Durch den Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren kommt es zu einer Endothelschädigung mit Endothelzellapoptose. In der Folge werden zytokingesteuert Monozyten und T-Lymphozyten adhären. Bei einer gesteigerten Permeabilität können diese ebenso wie Lipide und andere zirkulierende Substanzen in die Gefäßwand einwandern und dauerhaft verbleiben.

### **1.1.3 Plaquebildung bei der Atherosklerose**

Bei bestehender endothelialer Dysfunktion entwickeln sich im weiteren Verlauf der Erkrankung durch subintimale Einwanderung von T-Lymphozyten und vor allem Monozyten frühe atherosklerotische Plaques, sogenannte Fettstreifen („Fatty streaks“) (16; 67). Nach einer Differenzierung in Makrophagen kommt es durch Lipidbeladung zur Ausbildung sogenannter Schaumzellen, den charakteristischen Zellen der atherosklerotischen Plaque (16; 60; 67). Die lipidbeladenen Makrophagen und auch die T-Lymphozyten setzen nun proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie Tumor Nekrose Faktor alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ), Interleukine, Wachstumsfaktoren und andere Mediatoren frei (14). Dadurch werden glatte Muskelzellen in der Media aktiviert und wandern in die entstehende intimale Läsion aus, wo sie sich weiterhin teilen (60). Sowohl die Endothelzellen als auch die glatten Muskelzellen sind in der Lage, Botenstoffe zu bilden und auszuschütten. Damit halten sie zusammen mit den Makrophagen und den aktivierten T-Lymphozyten den inflammatorischen Prozess der Plaque-Entstehung in Gang (99).

Im weiteren Verlauf kann es durch Akkumulation der Schaumzellen, durch weitere Lipidaufnahme, sowie durch Apoptose zur Bildung eines Lipidkerns innerhalb der Läsion kommen (78). Glatte Muskelzellen und extrazelluläre Matrix bilden eine fibröse Kappe, die zirkulierendes Blut und atherosklerotische Plaque voneinander trennen (78). Zunächst sind solche atherosklerotischen Plaques als stabil zu bezeichnen.

Makrophagen und Schaumzellen produzieren sogenannte Metalloproteinasen, die zu einem Abbau der extrazellulären Matrix führen (59). Ist der Abbau der extrazellulären Matrix stärker als deren Bildung, tritt die atherosklerotische Läsion in einen Zustand der Instabilität über und kann rupturieren (59). Ebenfalls von Bedeutung für eine Plaqueinstabilität sind die Gesamtgröße der Läsion und der zentralen Nekrose, sowie die mechanischen Scherkräfte. Die Ruptur der fibrösen Kappe führt zur Freilegung des thrombogenen Lipidkerns und von Kollagen (57; 59). Durch eine derartige Ruptur wird zum einen der lokale inflammatorische Prozess erneut induziert und zum anderen kommt es durch Aktivierung der Hämostase, vor allem durch den sogenannten „Tissue factor“, zur Thrombusbildung (4; 59) (vgl. Abb. 2).

Bei einer Plaqueruptur kann es je nach Lokalisation klinisch zu einem akuten Koronarsyndrom, einem apoplektischen Insult, einem akuten arteriellen Verschluss oder anderen Komplikationen der Erkrankung kommen (39; 54).

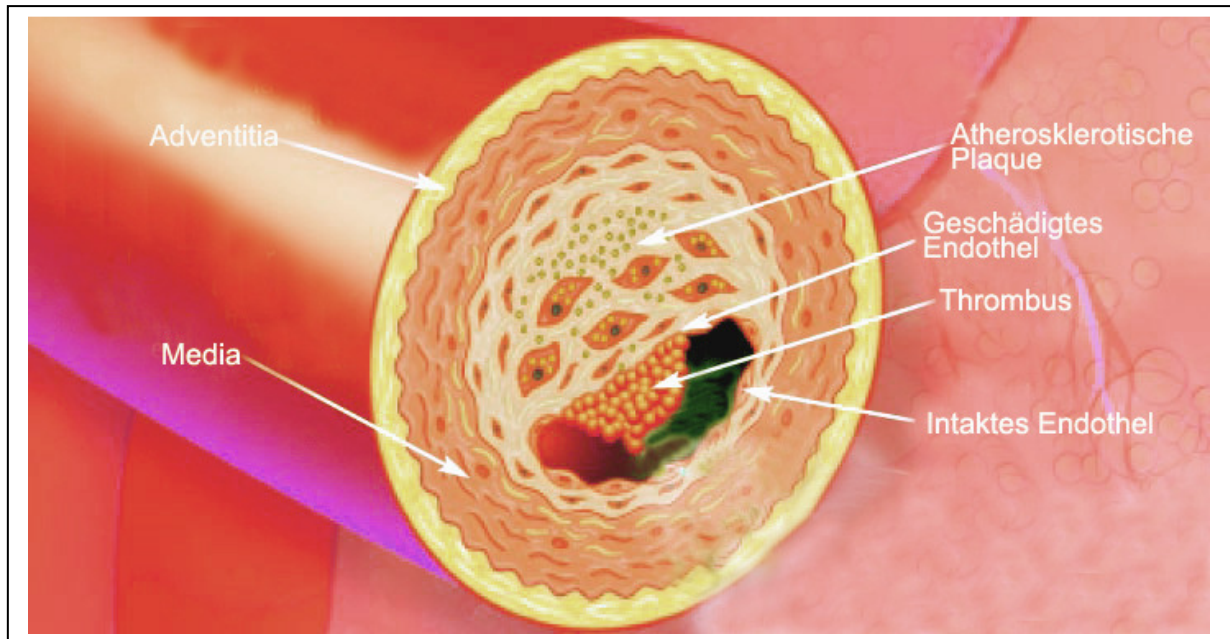


Abb. 2: Atherosklerotische Plaque: In Folge der endothelialen Dysfunktion differenzieren sich subintimal eingewanderte Monozyten und T-Lymphozyten weiter zu Makrophagen. Diese nehmen eingewanderte Lipide auf und werden dadurch zu Schaumzellen, dem Hauptbestandteil einer atherosklerotischen Plaque. Durch eine Endothelzellschädigung kann es zu einer Ruptur der atherosklerotischen Plaque mit nachfolgender Atherothrombose mit Gefäßverschluss kommen.

(aus Minnpost.com / Health, 16. Juni 2008)

### **1.1.4 Therapie der Atherosklerose**

Die Therapie der Atherosklerose stützt sich im Wesentlichen auf die Vermeidung bzw. die Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren im Sinne einer Primär- bzw. Sekundärprävention. So muss bei jedem Patienten ein individuelles Therapiekonzept aufgestellt werden. Dabei ist bei vielen Punkten, so zum Beispiel beim Einstellen des Nikotinkonsums, beim Umstellen einer Fehl- oder Überernährung, bei der Intensivierung der sportlichen Aktivität, bei der Reduktion von psychischem Stress oder bei der Reduktion des Übergewichts die Compliance des Patienten ausschlaggebend für den Therapieerfolg. Bei einigen Kausalitäten gibt es zusätzlich die Möglichkeit, eine medikamentöse Therapie einzuleiten, so zum Beispiel bei der arteriellen Hypertonie, beim Diabetes mellitus, bei der Hyperlipidämie oder bei Depressionen.

Ein weiterer medikamentöser Therapieansatz besteht in der präventiven Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern wie zum Beispiel Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel zur Vermeidung von kardiovaskulären Ereignissen.

Neben diesen präventiven Maßnahmen gibt es die Möglichkeit von interventionellen Verfahren. Durch die PTCA (perkutane transluminale Koronarangioplastie) ist es möglich, atherosklerotisch verengte Herzkranzgefäße mittels Ballondilatation und Stenteinlage zu therapieren. Eine weitere operative Option besteht in der Bypass-Anlage unter Verwendung von körpereigenen Gefäßen (Arteria radialis, Arteria thoracica interna, Vena saphena magna).

Eine kausale Therapie der Atherosklerose gibt es bislang nicht. Ein möglicher neuer kausaler Therapieansatz besteht in der Reparatur der geschädigten Endothelzellschicht.

## **1.2 Endotheliale Progenitorzellen**

### **1.2.1 Endotheliale Progenitorzellen und Atherosklerose**

Die Schädigung des Endothels durch kardiovaskuläre Risikofaktoren führt bei fehlender effektiver Regeneration der Endothelzelle über den Zustand der endothelialen Dysfunktion zur Entstehung einer atherosklerotischen Läsion (vgl. 1.1). Aus dem Knochenmark stammende endotheliale Progenitorzellen sind an Reparaturvorgängen des kardiovaskulären Systems beteiligt (6; 7; 40; 70). Es konnte nach experimentell induzierter Ischämie gezeigt werden, dass endotheliale Progenitorzellen aktiv an der Neoangiogenese bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) und der koronaren Herzkrankheit (KHK) beteiligt sind (7; 24; 40; 50; 52; 55; 82). Der Einsatz von endothelialen Progenitorzellen führt zur Beschleunigung der Reendothelialisierung, sowohl nach lokaler endothelialer Zellläsion im Tiermodell, als auch in der klinischen Behandlung von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose (92; 94; 96). Die Anzahl der frei im peripheren Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen scheint von bestehenden kardiovaskulären Risikofaktoren abhängig zu sein. Dabei korreliert eine Abnahme der im peripheren Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen mit einer gleichzeitigen Zunahme des kardiovaskulären Risikoprofils (46; 75; 90). Bei Patienten mit einer manifesten koronaren Herzkrankheit ist die Anzahl der frei zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen als prognostischer Parameter bezüglich der kardiovaskulären Mortalität und Morbidität zu nutzen (93). Folglich können Patienten mit einer manifesten koronaren Herzkrankheit von der Zunahme eines zirkulierenden Zellpools von endothelialen Progenitorzellen durch die Erneuerung der verletzten Endothelschicht zur Prävention von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose profitieren.

Nach den neuesten Erkenntnissen lassen sich endotheliale Progenitorzellen in zwei morphologisch und funktionell unterschiedliche Populationen trennen, nämlich in early outgrowth EPCs, sogenannte colony forming units (CFU), und in late outgrowth EPCs, sogenannte endothelial colony forming cells (ECFC). Die early outgrowth EPCs weisen dabei im Vergleich zu den late outgrowth EPCs eine verminderte Proliferationskapazität auf und wirken über die Produktion von angiogenetischen



Zytokinen. Die late outgrowth EPCs werden mit einer deutlich erhöhten Proliferationskapazität als zirkulierende Angioblasten verstanden (48; 98).

### 1.2.2 Endotheliale Progenitorzellen und Statine

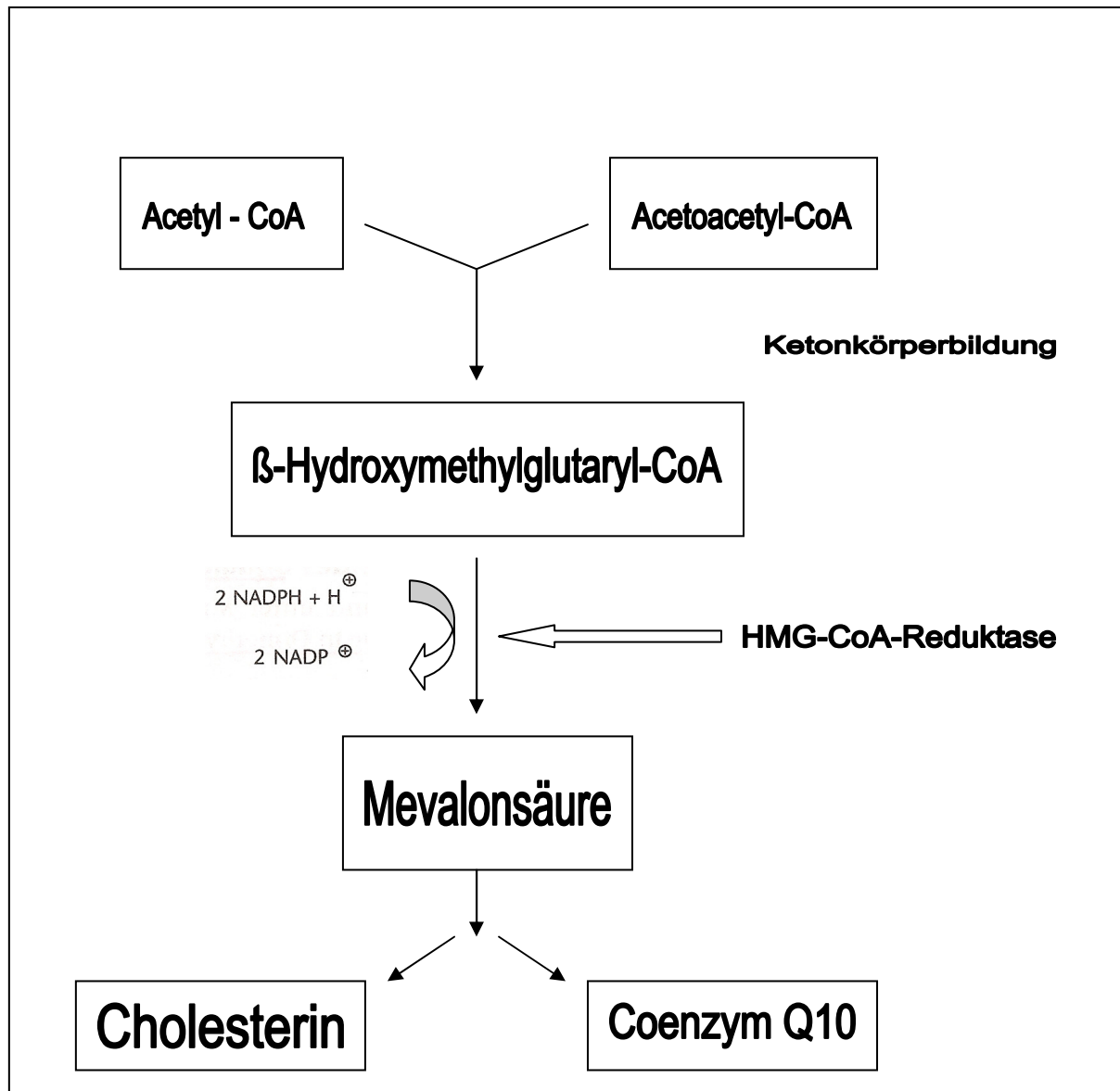


Abb. 3: Erste Stufe der Cholesterinbiosynthese: Nach der Bildung von  $\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) wird dies durch die HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonsäure (Mevalonat) reduziert. Die HMG-CoA-Reduktase ist das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese.

Statine senken die Häufigkeit von kardiovaskulären Ereignissen, ein Effekt, der auf ihre lipidsenkende Eigenschaft zurückgeführt wird (1; 2; 81). Bei Statinen handelt es sich um Derivate der Hydroxyheptansäure. Sie hemmen die Hydroxymethylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) in der Leber, ein Enzym der Cholesterinbiosynthese (vgl. Abb. 3). Statine sind Mittel der Wahl bei Patienten mit Hypercholesterinämie, koronarer Herzerkrankung und/oder Atherosklerose. Es konnte gezeigt werden, dass bei diesen Patienten über die Senkung des Low Density Lipoproteins (LDL-Cholesterin) eine Reduktion der koronaren Ereignisse und der Gesamtmortalität erreicht werden kann (9; 64). Weiterhin wird der Plasmaspiegel des Very Low Density Lipoproteins (VLDL) und der Triglyceride durch Statine gesenkt. Gleichzeitig steigt der Plasmaspiegel des High Density Lipoproteins (HDL), welches sich positiv auf die Atherogenese auswirkt (42; 69).

Heute weiß man, dass auch sogenannte pleiotrope Effekte, unabhängig von der Lipidsenkung, für den klinischen Benefit der Statine verantwortlich sind.

Statine beeinflussen eine große Anzahl an Systemen, darin eingeschlossen sind vasodilatative (34; 35; 51), antithrombotische (3; 43; 44), antioxidative (25; 28; 73; 74), antiproliferative (12; 36; 37; 41), antiinflammatorische (84; 97) und plaque-stabilisierende (5; 12; 83) Effekte. Diese werden für die bemerkenswerten kardiovaskulären Vorteile verantwortlich gemacht, die in Zusammenhang mit Statintherapien in großen klinischen Studien auftreten (11; 25-31; 38).

So konnten zum Beispiel *Laufs et al.* zeigen, dass Statin induziert eine Stabilisierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) mRNA zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und damit zu einer Verbesserung der Dilatationsfähigkeit des Endothels und Verringerung der Wahrscheinlichkeit eines kardiovaskulären Ereignisses oder eines apoplektischen Insultes führt (34; 35; 51).

Sowohl vaskuläre Wachstumsfaktoren, als auch Statine führen zu einer Erhöhung der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen, im Mausmodell wie beim Menschen (62; 89). Was die Freisetzung von endothelialen Progenitorzellen betrifft, scheint die Aktivierung von PI3-kinase und von Akt-abhängigen Stoffwechselwegen von Bedeutung zu sein (33; 62).

### **1.3 Hypothese**

Statine vermitteln ihre vaskuloprotektive Wirkung über eine Vielzahl von pleiotropen Effekten und schützen so vor einer Progression der Atherosklerose. Wir stellten die Hypothese auf, dass ein Teil der Statin-vermittelten Vaskuloprotektion über endotheliale Progenitorzellen vermittelt wird.

### **1.4 Ziele der Arbeit**

In der folgenden Arbeit wurde untersucht, in welcher Weise Statine (hier: Rosuvastatin) die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen im Knochenmark, in der Milz und im peripheren Blut von Mäusen beeinflusst. Weiterhin wurde die Rolle der Milz im Prozess der Proliferation, der Differenzierung und des Einwanderungspotentials („Homing“) der endothelialen Progenitorzellen untersucht.

In einem Retransfusionsmodell wurde untersucht, inwieweit intravenös verabreichte endotheliale Progenitorzellen in der Lage sind, sich in einer definierten endothelialen Läsion anzusiedeln.

### **1.5 Publikation der Arbeit**

Wesentliche Anteile dieser Arbeit wurden 2003 in Circulation Research publiziert (Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Boehm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. Circulation Research 2003; 93: e17-e24).

## **2. Material**

### **2.1 Chemikalien**

- Ampuwa, Aqua ad iniectabilia (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany)
- BSA (Bovines Serum Albumin)  
(SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany)
- Carprofen (Rimadyl, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Germany)
- acDi-LDL, 200µg/ml, (mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tertamethylindocarbocyanine gelabeltes acetyliertes Low Density Lipoprotein)  
(Cellsystems, St. Katharinen, Germany)
- Eisessig (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Entellan (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Eosin-G-Lösung 0,5% wässrig (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Ethylendiamintetra-Essigsäure (EDTA) (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Evans-Blue (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Fibronectin (from human plasma, 0,1% solution)  
(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Fc-Block, purified anti-mouse CD16/CD32 (Fc  $\nu$ III/II Receptor)  
(Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)
- Ficoll (Biocoll, isotonic, density 1,077g/ml)  
(Biochrom AG, Berlin, Germany)
- FKS (fetales Kälberserum) (Invitrogen Gibco, Karlsruhe, Germany)
- Fluorescent Mounting Medium (DAKO Cytomation, California Inc., USA)
- Reinstes Glycerin (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Hämatoxylin (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Heparin-Natrium Ratiopharm Injektionslösung (Ratiopharm, Ulm, Germany)
- Isopropanol (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)  
(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Kaliumchlorid (KCL) (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck KG, Darmstadt, Germany)

- Ketaminhydrochlorid (Ketavet, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Germany)
- Lectin, L-9006 Trockensubstanz, FITC (Fluorescein Isothiocyanat) from ULEX europeus UEA I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Lectin, FL-1101/02 Griffonia (Linaris, Wertheim, Germany)
- Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ) (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Natriumchloridlösung 0,9% ( $\text{NaCl}$  0,9%)  
(B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)
- Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ ) (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Paraformaldehyd (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Pharmlyse (Ammonium chloride lysing reagent)  
(Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)
- PKH26 Red fluorescent cell linker kit  
(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany)
- Rosuvastatin Trockensubstanz  
(Astra Zeneca, Pharmaceuticals LP, Wilmington USA)
- Salzsäure 1% ( $\text{HCl}$  1%) (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Stickstoff, flüssig (Messer Griesheim, Siegen, Germany)
- Tissue Freezing Medium (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany)
- Türks-Lösung (Merck KG, Darmstadt, Germany)
- Vectashield Mounting medium for fluorescence with DAPI  
(4',6-Diamidino-2-phenylindol) (Vector/Linaris, Wertheim, Germany)
- Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, Bayer AG, Leverkusen, Germany)
- Xylol (Merck KG, Darmstadt, Germany)

## **2.2 Verbrauchsmaterialien**

- Blutentnahmeröhrchen (S-Monovette EDTA, 1,6mg EDTA/ml Blut)  
(Sarstedt, Nümbrecht, Germany)
- Deckgläser
  - Cell culture cover slip (steril, rund, 13mm Ø)  
(Thermanox, NUNC Brand Products, Rochester NY, USA)
  - 24x60mm (Marienfeld, Germany)
- Eppendorfgefäße 0,5ml / 1,5ml / 2ml (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Falcons (PP-Test Tubes), 15ml, steril  
(Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)
- Falcons (PP-Test Tubes), 50ml, steril  
(Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)
- Kanülen
  - 26 G x ½" 0,45 x 13mm BD Microlance
  - 18 G x ½" 1,2 x 40mm BD Microlance
 (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)
- Objektträger (75 x 25 x 1mm)  
(Histo Bond, Marienfeld, Germany)
- Röhrentubes (FACS), 11,5ml (100 x 15,7cm Ø)  
(Sarstedt, Nümbrecht, Germany)
- Seidenfaden (6/0), schwarz, geflochten (Suprama, Berlin, Germany)
- 1ml-Spritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)
- 20ml-Spritzen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)
- Wattestäbchen, kleiner Kopf (Karl Beese GmbH & Co, Barrbüttel, Germany)
- Zellfilter (70µm Nylon-Mesh) (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)
- Zellkultur-Testplatte (24-well plate, gamma sterilisiert)  
(TPP, Trasadingen, Switzerland)

### **2.3 Antikörper**

CD117 (c-kit) (PE)	PE-anti-mouse IgG1 Hersteller-Konzentration: 0,1mg/ml (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)
CD34 (FITC )	FITC-anti-mouse IgG1 Hersteller-Konzentration: 0,5mg/ml (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)
Isotypenkontrollen	FITC - Rat IgG G <sub>2a,k</sub> isotype control PE - Rat IgG G <sub>2a,k</sub> isotype control (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)
Sca-1 (FITC)	FITC-anti-mouse Ly-6A/E Hersteller-Konzentration: 0,5mg/ml (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)
VEGF-R2 (PE)	PE-anti-mouse FIK-1 Hersteller-Konzentration: 0,2mg/ml (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)

**2.4 Lösungen**

Alkohol-Verdünnungsreihe	96%: 480ml Isopropanol und 20ml Ampuwa 80%: 400ml Isopropanol und 100ml Ampuwa
EDTA-Lösung	PBS, 0,1% NaN <sub>3</sub> , 1,0% FKS, 20mmol EDTA 100ml PBS-Stammlösung 1g NaN <sub>3</sub> 10ml FKS 20ml 1mM EDTA Auf 1000ml mit Ampuwa auffüllen Sterile Filtration
FACS-Puffer	500ml PBS (einfache Lösung) 25ml FKS (über Leucozytenfilter gefiltert) 2,5g BSA 0,07% 3,5ml NaN <sub>3</sub> 0,1%
Hämatoxylin nach Ehrlich	1g Hämatoxylin in 50ml 96% Isopropanol auflösen 1,5g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun) in 50ml Ampuwa unter Aufkochen lösen 50ml Glycerin in warme Kalialaunlösung zugeben Zugabe der Hämatoxylinlösung zur Kalialaunlösung 5ml Eisessig zugeben Lösung für 14 Tage reifen lassen
Heparin-Lösung	0,5 IE Heparin / 0,1ml NaCl 0,9% 10µl Heparin-Natrium / 10ml NaCl 0,9% (25.000 IE Heparin / 5ml NaCl 0,9%)
Lectin L-9006 (Sigma)	1mg Trockensubstanz in 1ml PBS (einfache Lösung)



Narkoselösung	Ketaminhydrochlorid (Ketavet, Pharmacia) 150mg/kg Körpergewicht Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, Bayer) 0,1mg/kg Körpergewicht	
4% Paraformaldehyd	24g Paraformaldehyd in 300ml Ampuva Erhitzen auf 60 °C 300µl NaOH 1M Auf Raumtemperatur abkühlen lassen 300ml 2-fach PBS (10-fach PBS 1:5 verdünnt)	
PBS-Stammlösung (10-fach)	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung 80g NaCl 2g KCl 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6,149g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 800ml Ampuva pH-Abgleich auf 7,2 Auf 1000ml mit Ampuva auffüllen	
PBS (einfache Lösung)	100ml	PBS-Stammlösung
	900ml	Ampuva
Rosuvastatin–Stammlösung	0,4mg Rosuvastatin-Trockensubstanz / 1ml NaCl Ansatz: 6mg Rosuvastatin auf 15ml NaCl 0,9%	

## **2.5 Medien**

EBM            Endothelial Cell Basal Medium  
(Clonetics, Cambrex Bio Science, Walkersville, Inc., USA)

### **EBM-Additiva:**

- hEGF (human Epidermal Growth Factor)	0,5ml (Clonetics)
- Hydrocortisone	0,5ml (Clonetics)
- GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin B)	0,5ml (Clonetics)
- BBE (Bovine Brain Extract)	2,0ml (Clonetics)
- FKS (fetales Kälberserum)	100ml (Invitrogen Gibco)

## **2.6 Versuchstiere**

C57 black/6N-Mäuse (Wildtyp), männlich, 6 Wochen alt  
(Charles River Laboratories Germany GmbH, Sulzfeld, Germany)

## **2.7 OP-Besteck**

- Hemostat (Klemmen), gerade 12,5cm  
(Fine Science Tools, North Vancouver, Canada)
- Draht zum Sondieren des Gefäßes (Ø 0,13mm; an der Spitze 30° gebogen)
- Vannas, gerade 7,5cm (Fine Science Tools, North Vancouver, Canada)
- Nadel 0b 552-5E (Suprama, Berlin, Germany)
- Nadelhalter, 12,5cm (Fine Science Tools, North Vancouver, Canada)
- Pinzette, straight tip, 0,05x0,01mm Inox, 11cm  
(Fine Science Tools, North Vancouver, Canada)
- Schere, gerade 10,5cm (Fine Science Tools, North Vancouver, Canada)

## **2.8 Technische Geräte, Software**

- Aufsichtmikroskop Nikon SM7800 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany)
- Brutschrank HeraCell (Heraeus, Holding GmbH, Hanau, Germany)
- Cellquest Software (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)
- FACS Calibur (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany)
- Fluoreszenzmikroskop Nikon E600 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany)
- LUCIA G Software, Version 4.81 (Laboratory Imaging Ltd., Praha, Czech Republic)
- Neubauer Zählkammer (Roth GmbH, Karlsruhe, Germany)
- Kryostat, Leica CM 1900 (Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Germany)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, NY, USA)
- Zentrifuge Megafuge 1.0 (Heraeus, Holding GmbH, Hanau, Germany)

### **3. Methoden**

#### **3.1 *in vivo* - Methoden**

##### **3.1.1 Rosuvastatinbehandlung**

Tiergruppen mit je 5 Mäusen wurden zeit- oder dosisabhängig mit Rosuvastatin behandelt. Die entsprechenden Dosierungen wurden aus dem durchschnittlichen Gewicht einer 6 Wochen alten Maus von etwa 20g errechnet. Die Behandlung erfolgte über eine intraperitoneale Injektion.

###### **3.1.1.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung**

Die Tiere wurden täglich mit den folgenden Dosen behandelt. Die Behandlungsdauer betrug 10 Tage. Am 11. Tag erfolgte die Tötung der Tiere zur Auswertung.

Gruppe A	1mg/kg Körpergewicht
Gruppe B	5mg/kg Körpergewicht
Gruppe C	10mg/kg Körpergewicht
Gruppe D	20mg/kg Körpergewicht

###### **3.1.1.2 Zeitverlauf**

Die Tiere wurden täglich mit 10mg/kg Körpergewicht für den entsprechenden Zeitraum behandelt. Einen Tag nach Beendigung der Behandlung wurden die Tiere zur Auswertung getötet.

Gruppe E	1 Tag
Gruppe F	10 Tage
Gruppe G	20 Tage

### 3.1.1.3 Kontrollen

Es wurde die gleiche Zahl an Tieren mit äquivalentem Volumen Placebo (NaCl 0,9%) behandelt und entsprechend als Kontrollgruppe ausgewertet.

### 3.1.1.4 Messung der Rosuvastatin-Plasma-Konzentration

8 Gruppen mit je 5 Tieren wurden für 10 Tage mit 10mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin bzw. Placebo behandelt. Zur Messung der Konzentrationen von Rosuvastatin und Mevalonat im Plasma wurde eine Blutentnahme direkt, 15 Minuten, 30 Minuten, 1, 2, 3, 5, 8 und 24 Stunden nach der letzten Applikation von Rosuvastatin durchgeführt.

10 Minuten vor der Blutentnahme wurden die Tiere mit 0,4ml Heparin (0,5IE/0,1ml NaCl 0,9%) über intraperitoneale Injektion vorbehandelt. Zur Blutentnahme wurde die nach medianer Laparatomie freipräparierte Vena cava inferior punktiert. Zur Gewinnung des Plasmas wurde das Vollblut mit 2000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C asserviert.

Die Messung der Rosuvastatin- und Mevalonat- Konzentrationen im Plasma wurde von Astra Zeneca durchgeführt.

### **3.1.2 Endothelzelldenudationsmodell**

Die Operation erfolgte mit Hilfe eines OP-Mikroskopes vom Typ Nikon SM7800 (Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany). Alle Tierexperimente erfolgten nach Genehmigung und in Übereinstimmung mit den institutionellen Richtlinien.

Nach intraperitonealer Anästhesie mit 0,4ml der Narkoselösung (Ketavet/Rompun) erfolgte die Darstellung der Bifurkation der Arteria carotis links über einen ventromedialen Zugang (vgl. Abb. 7). Nach Ligatur der distalen Arteria carotis externa und temporärer Ligatur der Arteria carotis interna und der proximalen Arteria carotis communis wurde eine transverse Arteriotomie im Bereich der proximalen Arteria carotis externa durchgeführt (vgl. Abb. 8-10). Durch retrogrades Einführen eines flexiblen, an der Spitze um 30° gebogenen Drahtes (Ø 0,13mm, vgl. Abb. 5, Abb. 6) in die Arteria carotis communis erfolgte die Endothelzelldenudation (vgl. Abb. 11). Nach Entfernen des Drahtes wurde die temporäre Unterbrechung des Blutflusses in der Arteria carotis interna und Arteria carotis communis aufgehoben (vgl. Abb. 12 und 13). Anschließend wurden die anatomischen Verhältnisse schichtweise von innen nach außen rekonstruiert.

Während der Operation wurde die Körpertemperatur mittels einer Heizplatte konstant gehalten. Es erfolgte ein kontinuierliches Monitoring der Vitalparameter. Postoperativ erfolgte eine Volumengabe (500µl 0,9% NaCl) sowie eine Schmerztherapie mit Rimadyl (4mg/kg Körpergewicht) über intraperitoneale Injektion. Nach Erwachen aus der Narkose erfolgte ein funktioneller Test zum Ausschluss eines ischämischen Hirninfarktes. Die Tiere wurden postoperativ für mindestens 24 Stunden engmaschig überwacht.

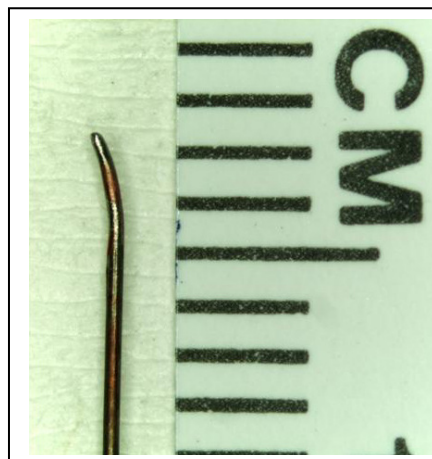
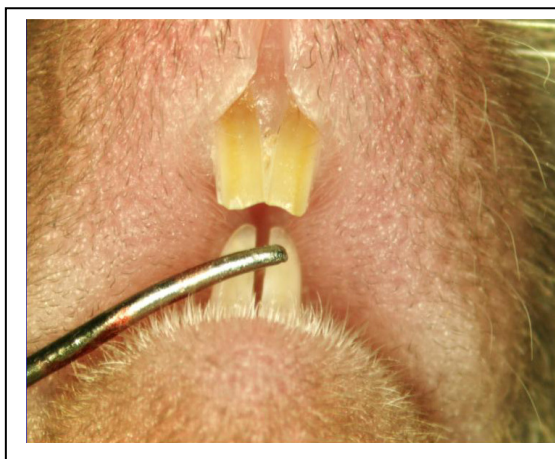


Abb. 5, 6: Größendarstellung des Drahtes (Ø 0,13mm) zur Endothelzelldenudation

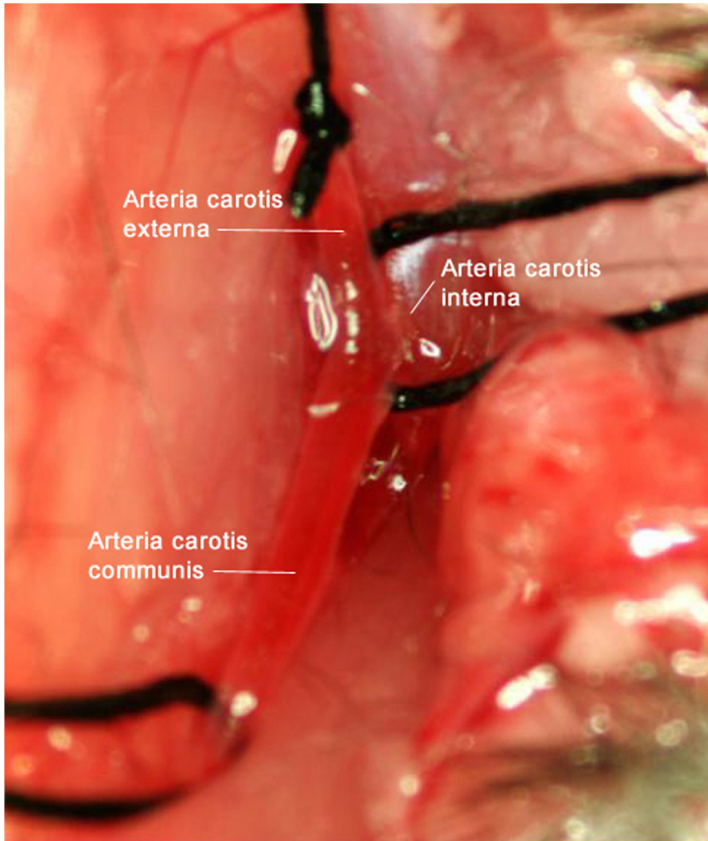


Abb. 7:  
Darstellung der Carotis-  
bifurkation links.  
Hier sind die Arteria  
carotis communis und  
die Arteria carotis  
interna bereits um-  
schlungen.  
Außerdem wurde  
eine distale Ligatur der  
Arteria carotis  
externa durchgeföhrt.

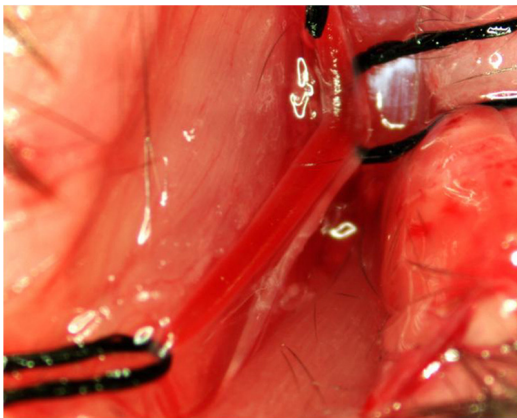


Abb. 8: Temporäre Blutsperre  
der Arteria carotis communis  
und der Arteria carotis interna durch  
Anziehen der Fadenschlingen

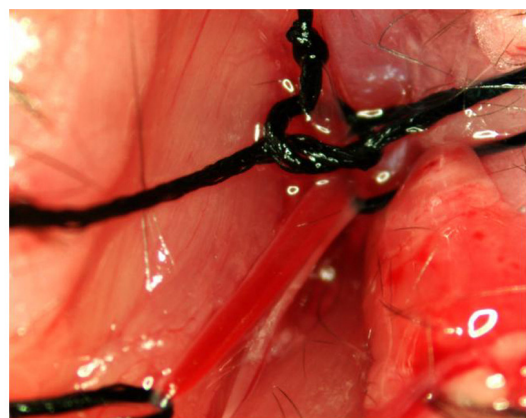


Abb. 9: Vorlage einer Ligatur an  
der Arteria carotis externa  
bifurkationsnah

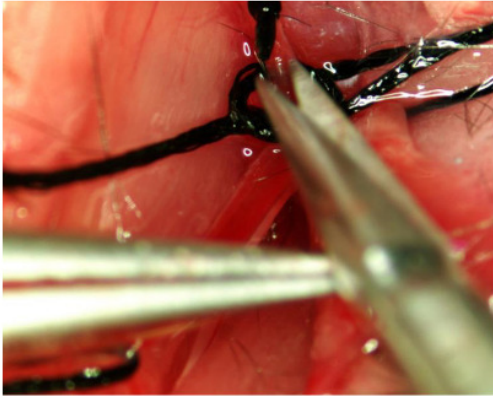


Abb. 10: Transverse Arteriotomie der Arteria carotis externa

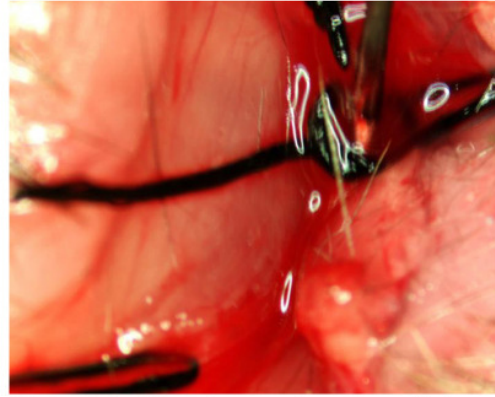


Abb. 11: Einführen des Spezialdrahtes zur Endotheldenudation

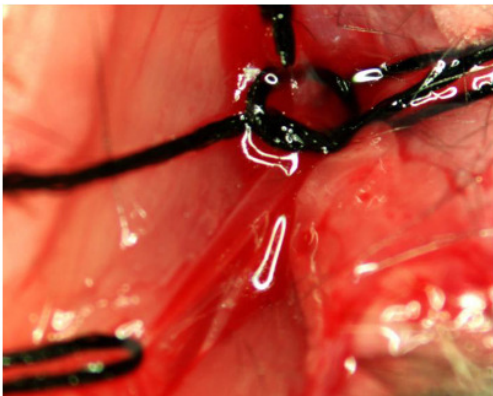


Abb. 12: Fixieren der bifurkationsnahen Ligatur nach Entfernen des Drahtes und anschließend Aufhebung der Blutsperrre



Abb. 13: Entfernen der Fadenschlingen und Prüfung des OP-Situs auf Bluttrockenheit.



### **3.1.3 Organentnahmen**

#### **3.1.3.1 Splenektomie**

Nach intraperitonealer Anästhesie mit 0,4ml der Ketavet/Rompun-Lösung (Ketaminhydrochlorid 150mg/kg Körpergewicht, Xylazinhydrochlorid 0,1mg/kg Körpergewicht) wurde die Milz über eine linksseitige laterale Laparatomie dargestellt. Nach Ligatur der Gefäße am Hilus wurde die Milz entnommen und das Abdomen schichtweise mit einem 6/0 Seidenfaden verschlossen.

#### **3.1.3.2 Blutentnahme**

Den Tieren wurde eine letale Dosis der Narkoselösung (0,8ml der Ketavet/Rompun-Lösung) intraperitoneal verabreicht. In tiefer Narkose erfolgte die zervikale Dislokation. Nach einer medialen Laparatomie wurde die Vena cava inferior freipräpariert und punktiert. Die verwendete s.c.-Kanüle wurde zuvor mit dem Heparin eines Blutentnahmeröhrchens durchgespült, um eine Koagulation zu vermeiden. Es wurden zwischen 0,6ml und 0,8ml peripheres Vollblut zur FACS-Analyse gewonnen.

#### **3.1.3.3 Gewinnung der Knochenmarksuspension**

An Femur und Tibia wurde ein proximaler und distaler Zugang zum Markraum freipräpariert. Die Knochen wurden mit insgesamt 5ml FACS-Puffer je Tier durchspült. Die Zellsuspension wurde über einen Zellfilter (70µm Nylon-Mesh) filtriert und in einem 50ml-Falcon auf Eis gelagert.

#### 3.1.3.4 Gewinnung der Gefäßpräparate

Im Endothelzelldenudationsmodell erfolgten die Perfusion und Organentnahme am 11. postoperativen Tag. 30 Minuten vor der Organentnahme bekamen die Tiere 0,1ml Lectin intravenös (Schwanzvene) verabreicht. In intraperitonealer Anästhesie (0,4ml der Ketavet/Rompun-Narkoselösung) wurde nach medianer Sternotomie das rechte Atrium am Herzen eröffnet und 20ml 4% Paraformaldehyd in den linken Ventrikel injiziert, was zum Tod des Tieres führte. Nach adäquater Perfusion des Gewebes wurden unter einem OP-Mikroskop vom Typ Nikon SM7800 die Arteriae carotides freipräpariert, entnommen und nach Einbettung in Tissue Freezing Medium zur Konservierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Anfertigung der Gefäßschnitte wurden die Präparate bei -80 °C gelagert.

## **3.2 in vitro - Methoden**

### **3.2.1 Isolation mononukleärer Zellen aus der Milz**

Die Milz wurde in zuvor beschriebener Weise entfernt und zur Verwahrung auf Eis in steriles PBS (einfache Lösung) gegeben. Die Isolation der mononukleären Zellen erfolgte mittels Ficoll-Trennung.

Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, das aufgrund seiner Dichte für Erythrozytenaggregate und tote Zellen durchgängig ist. Granulozyten dringen in die Ficoll-Phase ein, während sich Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten in der Interphase ansammeln. So werden durch isopyknische Zentrifugation periphere mononukleäre Zellen (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) von Erythrozyten Granulozyten und toten Zellen getrennt.

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

- Eröffnen der Milzkapsel und Herstellung einer homogenen Zellsuspension in 15ml EDTA-Lösung
- Filtration der Zellsuspension über Zellfilter (70µm Nylon-Mesh) in einen neuen 50ml-Falcon
- Auffüllen mit sterilem PBS (einfache Lösung) auf 40ml
- Vorlage von 15ml Ficoll in einem weiteren sterilen 50ml-Falcon
- Vorsichtiges Überschichten des Ficolls mit der Zellsuspension
- Zentrifugation bei 2400 U/min ohne Bremse bei Raumtemperatur für 20 Minuten
- Abpipettieren der Interphase (Population der mononukleären Zellen) und Überführung in je einen neuen 50ml-Falcon (vgl. Abb. 14)
- 2 Waschschrirte mit je 50ml sterilem PBS (einfache Lösung) und je 10 Minuten Zentrifugation bei 2400 U/min mit Bremse und bei Raumtemperatur
- Verwerfen des Überstands und Resuspension des Zellpellets in 10ml EBM-Medium
- Zählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer (20µl Zellsuspension und 20µl Türks-Lösung).

Die Auszählung eines Quadranten erfolgte unter Verwendung der folgenden Formel:

$$\text{Gesamtzahl} / 10\text{ml} = \text{gezählte Zellen} \times 10^4 \times 2 \times 10$$

Die Zahl 2 entspricht dem Verdünnungsfaktor, die Zahl 10 dem Faktor des Gesamtvolumen.

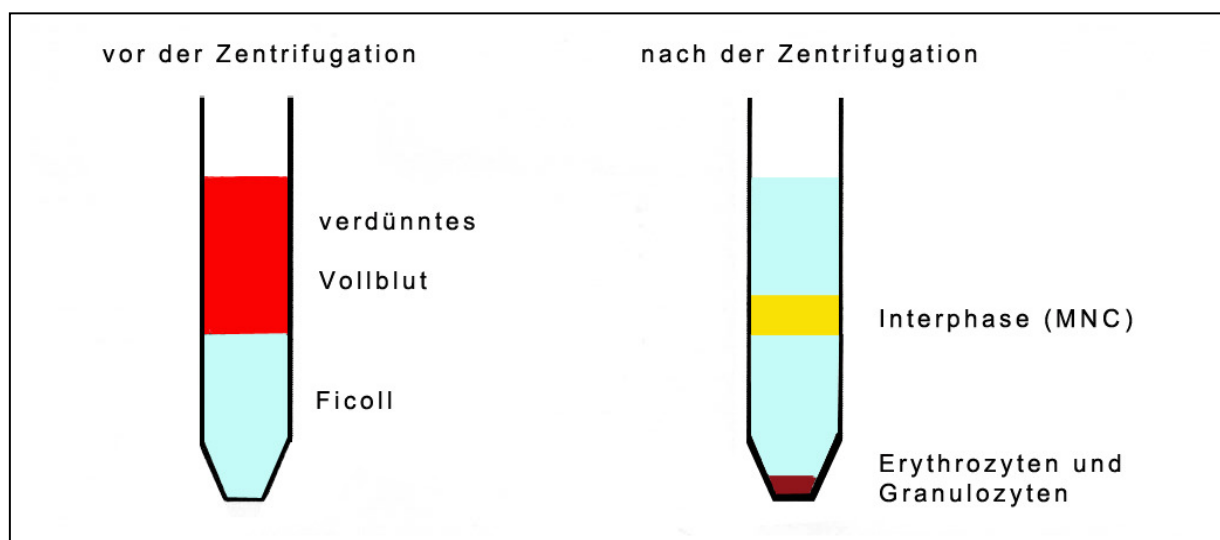


Abb. 14: Ficoll-Trennung: Über einen Ficollgradienten wird durch Zentrifugation von Vollblut die Zellpopulation der mononukleären Zellen (MNC) gewonnen. Nach Zentrifugation mit 2400 U/min kann die Interphase mit den mononukleären Zellen abgeschöpft werden. Als Pellet verbleiben Erythrozyten, Granulozyten und Zelldedritus.

### **3.2.2 Endotheliale Progenitorzell-Kultur**

Es wurden  $4 \times 10^6$  der aus der Milz gewonnenen mononukleären Zellen pro well ausgesät. Diese wurden zuvor mit Fibronectin beschichteten Deckgläschen bestückt. Nach 2 Tagen Inkubation wurde ein Medienwechsel (EBM-Medium) durchgeführt. Nach 4 Tagen Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> erfolgte eine Anfärbung der Zellen mit acDi-LDL und Lectin.

### **3.2.3 Zellfärbung mit acDi-LDL und Lectin**

Lectin ist ein spezifischer Oberflächenmarker für Endothelzellen. 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tertamethylindocarbocyanine gelabeltes acetyliertes LDL (acDi-LDL, CellSystems) wird von Endothelzellen und ihren Vorläufern aktiv aufgenommen. Eine Doppelmarkierung mit PE gelabeltem acDi-LDL und FITC gelabeltem Lectin weist das Vorhandensein von early outgrowth EPCs nach.

Bis zur Fixation erfolgten die im Folgenden aufgezeigten Färbeschritte unter sterilen Bedingungen.

- Absaugen des Überstands und Waschen der Zellen mit sterilem PBS (einfache Lösung)
- Zugabe des acDi-LDL Farbstoffs (je well 500µl EBM-Medium und 10µl acDi-LDL)
- Inkubation für 1 Stunde im Brutschrank (37°C und 5% CO<sub>2</sub>)
- Absaugen des Überstands und Waschen der Zellen mit sterilem PBS (einfache Lösung)
- Fixieren mit Paraformaldehyd 2% (200µl PFA 2% / Well für 10 Minuten)
- Absaugen des Paraformaldehyds 2%
- Zugabe von 200µl Lectin (FITC-gelabelt)-Lösung pro well (10µl Lectin / 1ml PBS (einfache Lösung))
- Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Dunkelheit
- 3 Waschschrte mit PBS (einfache Lösung)
- Eindecken mit Fluorescent Mounting Medium

### **3.2.4 Auswertung der gefärbten Zellen**

Die gefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Nikon E600) begutachtet. Doppelt positive Zellen für acDi-LDL und Lectin wurden als endotheliale Progenitorzellen (early outgrowth EPCs) definiert. Die quantitative Bestimmung erfolgte mittels computergestütztem Auswertprogramm (Lucia G, Laboratory Imaging Ltd.).

### **3.2.5 Fluoreszenzmarkierung mit PKH26**

Die Markierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen und umfasste folgende Schritte:

- Zentrifugation mit 1000 U/min für 5 Minuten
- Resuspension in 1ml EBM-Medium
- Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer
- Resuspension von  $1 \times 10^7$  Zellen in 1ml Diluent C
- Vorlage von 1ml Diluent C und 4 $\mu$ l Stocking solution in 15ml-Falcon
- Zugabe der Zellsuspension
- Inkubation für 4 Minuten im Brutschrank (37 °C und 5% CO<sub>2</sub>)
- Mehrfache Resuspension
- Zugabe von 2ml FKS und 4ml EBM-Medium (Reaktionsstop)
- Zweifacher Waschschrift in sterilem PBS (einfache Lösung)
- Resuspension in NaCl 0,9% zur intravenösen Injektion in die Schwanzvene

### **3.2.6 Gefäßschnitte und immunhistochemische Auswertung**

Aus den eingebetteten Gefäßen (vgl. 3.1.3.4 „Gewinnung der Gefäßpräparate“) wurden an einem Kryostat vom Typ Leica CM 1900 bei -24 °C 8 $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt. Ein Teil der Objektträger wurde mit DAPI-haltigem Mounting Medium eingedeckt, der andere Teil mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung).

Zur Quantifizierung der Gefäßläsion erfolgte die morphometrische Bestimmung der Neointima. Hierzu wurden HE-gefärbte Kryoschnitte unter dem Mikroskop

begutachtet und mit Hilfe der LUCIA G Software (Version 4.81, Laboratory Imaging Ltd.) die Mediafläche und die Fläche des Gefäßinnenlumens bestimmt. Die Neointima ist definiert als die Differenz aus der durch die Media eingeschlossenen Fläche und dem Gefäßinnenlumen.

Bei den mit DAPI eingedeckten Schnitten wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop nach doppelt angefärbten (PKH26 und Lectin) Zellen im Bereich der Gefäßläsionen gesucht. In gleicher Weise wurde die Milz immunhistochemisch untersucht.

Weitere immunhistochemische Färbungen wurden mit den CD34 und CD117 (c-kit) durchgeführt. Dabei wurden Antikörper, die mit einem Fluorochrom (PE oder FITC) gekoppelt sind, verwendet.

- Fixierung der Präparate mit 4% Paraformaldehyd für 5 Minuten
- Waschen mit PBS (einfache Lösung)
- Blockierung der unspezifischen Antikörperbindungen mit PBS (einfache Lösung) mit 0,5% Anteil an bovinem Serumalbumin (BSA) für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Waschen mit PBS (einfache Lösung)
- Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper für 3 Stunden in feuchter Kammer
- 2-3 mal Waschen mit PBS (einfache Lösung)
- Abspülen mit Leitungswasser
- Eindecken mit DAPI-haltigem Fluorescent Mounting Medium

Zur Auswertung wurde die LUCIA G Software (Version 4.81, Laboratory Imaging Ltd.) verwendet.

### **3.2.7 Evans-Blue-Färbung**

Die Färbung erfolgte mit 2% Evans-Blue in PBS (einfache Lösung) in Färbeküvetten

- Zweimalige Fixation der Schnitte in absteigend konzentrierter Alkoholreihe (Isopropanol 100%, Propanol 96% und Propanol 80%) für die Dauer von je 2 Minuten
- Spülen in einer Küvette mit Ampuwa
- Inkubation in 2% Evans-Blue für 2 Minuten
- Zweimalige Fixation der Schnitte in aufsteigend konzentrierter Alkoholreihe (Propanol 96%; Isopropanol 100%) für die Dauer von je 2 Minuten
- Eindecken der Schnitte mit Mounting Medium

### **3.2.8 Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung**

Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin (nach Ehrlich) und Eosin in Färbeküvetten.

- Zweimalige Fixation der Schnitte in absteigend konzentrierter Alkoholreihe (Isopropanol 100%, Propanol 96% und Propanol 80%) für die Dauer von je 2 Minuten
- Spülen in einer Küvette mit Ampuwa
- Inkubation in Hämatoxylin nach Ehrlich für 2 Minuten
- „Bläuen“ der Schnitte durch einen kontinuierlichen, moderaten Fluss Leitungswasser in die Küvette für 15 Minuten
- Spülen in einer Küvette mit Ampuwa
- Kurzes Eintauchen in 0,2% Eosin (ca. 10 Sekunden)
- Spülen in einer Küvette mit Ampuwa
- Zweimalige Fixation der Schnitte in aufsteigend konzentrierter Alkoholreihe (Propanol 96%; Isopropanol 100%) für die Dauer von je 2 Minuten
- Dreimalige Fixation der Schnitte mit Xylol für die Dauer von je 3 Minuten
- Eindecken der Schnitte mit Entellan



### **3.3 Durchflusszytometrie (FACS)**

Die FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen von Zellen in einer Zellsuspension unter der Berücksichtigung von physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen. Die zu quantifizierenden Zellen werden vor der Analyse mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern in einer Antigen-Antikörperreaktion gekoppelt. Während der Analyse hebt ein Laser die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau. Bei Abfallen auf das ursprüngliche Energieniveau werden Photonen emittiert, welche dann über einen Photodetektor sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise können die markierten Zellen quantifiziert werden (vgl. Abb. 15). Außerdem können durch Beurteilung der Lichtbeugung und Lichtstreuung Informationen über die morphologische Beschaffenheit der Zelle (Zellgröße, Binnenstruktur) gewonnen werden. Das Laserlicht wird in seinem Focus abhängig von Größe und Gestalt der Indexpartikel in verschiedene Richtungen gelenkt. Diese Eigenschaften werden im Forward Scatter (FSC) und im Side Scatter (SSC) gemessen, wobei der Forward Scatter die Partikelgröße repräsentiert. Der Side Scatter berücksichtigt ebenfalls die Partikelgröße, repräsentiert aber im Wesentlichen die Oberflächenbeschaffenheit und Binnenstrukturen der Indexpartikel. Die Verwendung von mehreren Farbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren ermöglicht eine gleichzeitige Analyse unter verschiedenen Gesichtspunkten.

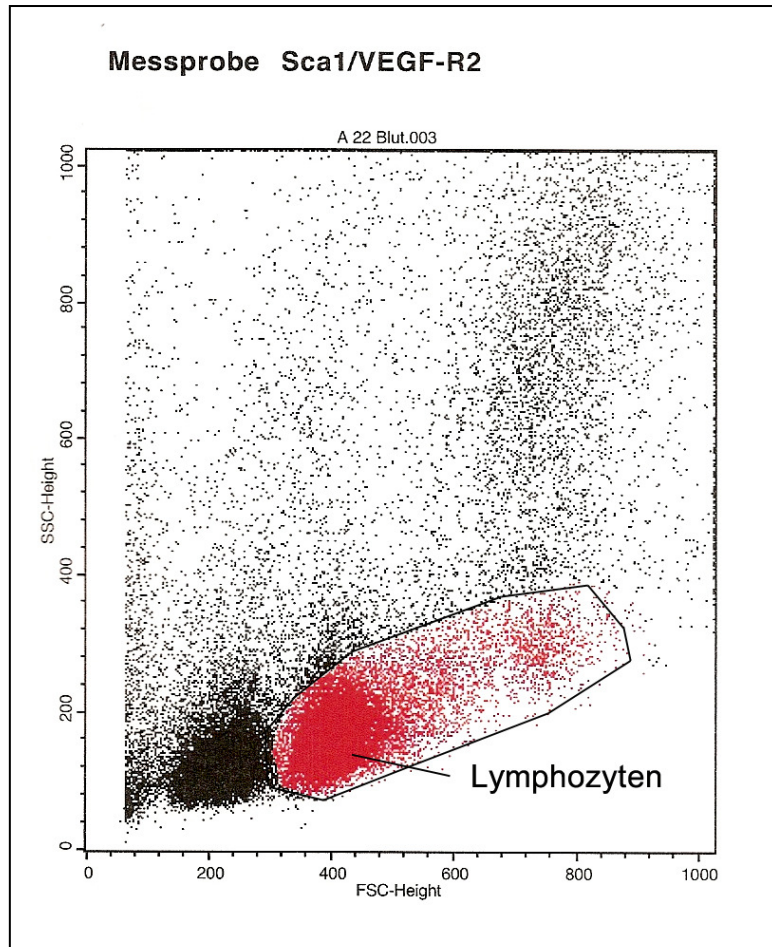


Abb. 15: Darstellung der Lymphozyten-Zellpopulation (im Gate) aus peripherem Vollblut der Maus in der FACS-Analyse

Um die Analyse spezifisch einzugrenzen, wird ein Gate um die entsprechende Zellpopulation gelegt. Die Analyse kann dann entsprechend den zuvor definierten, unterschiedlichen Parametern durchgeführt werden.

In diesem Fall wurde das Gate um die Population der Lymphozyten gelegt und die Antikörper Sca-1 (FITC) und VEGF-R2 (PE) verwendet. Die mit beiden Antikörpern doppelt markierten Zellen wurden als endotheliale Progenitorzellen definiert.

### **3.3.1 FACS-Analyse endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark**

- Zentrifugation der Knochenmarkszellsuspension für 10 Minuten bei 1000 U/min und 4 °C mit Bremse
- Absaugen des Überstands
- Resuspension des Pellets in 1ml Pharmlyse (1:10 verdünnt)
- Inkubation für 5 Minuten auf Eis
- Resuspension in 2ml FACS-Puffer
- Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 U/min und 4 °C mit Bremse
- Resuspension des Pellets in 1ml FACS-Puffer
- Gabe von je 50µl Zellsuspension (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen) in die Analyseröhrchen
- Zugabe von 10µl Fc-Block
- Vortexen und Inkubation der Proben für 10 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit
- Zugabe von je 10µl Sca-1 (FITC-gelabelt) und VEGF-R2 (PE-gelabelt) bzw. 10µl der Isotypenkontrollen (PE- und FITC-gelabelt)
- Vortexen und Inkubation bei 4 °C im Dunkeln (Kühlschrank) für 30 Minuten
- 2 Waschschrirte (Zentrifugation bei 1000 U/min und 4 °C für 10 Minuten)
- Resuspension in 0,5ml PBS (einfache Lösung)
- FACS-Analyse

### **3.3.2 FACS-Analyse endothelialer Progenitorzellen aus dem EDTA-Vollblut**

- Zunächst werden je 90µl aus den EDTA-Vollblutproben entnommen und in je ein Analyseröhrchen gegeben.
- Zugabe von je 3ml Pharmlyse (1:10 verdünnt)
- Vortexen und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur
- Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 U/min und 4 °C
- Resuspension in je 100µl FACS-Puffer
- Zugabe von je 10µl Fc-Block
- Nach der Zugabe des Fc-Blocks werden die weiteren Schritte äquivalent zum FACS-Protokoll des Knochenmarkes weitergeführt.

### **3.3.3 FACS-Analyse endothelialer Progenitorzellen aus Splenozyten**

Zunächst erfolgte die Gewinnung der mononukleären Zellpopulation aus Splenozyten mittels Ficoll-Trennung wie bereits zuvor beschrieben. Die mononukleären Zellen (MNCs) aus je einer Milz wurden in 100µl FACS-Puffer resuspendiert, zur Analyse in je 50µl (50µl für die Antikörper und 50µl für die Isotypenkontrollen) aufgeteilt und in je ein Analyseröhrchen gegeben. Die weitere Vorgehensweise erfolgte nach dem Protokoll zur FACS-Analyse des EDTA-Vollblutes.

### **3.4 Statistische Analyse**

Die Ergebnisse werden als Mittelwert +/- Standardabweichung präsentiert. Die Signifikanz der Differenz zwischen zwei Messungen wurde über einen t-Test für unabhängige Stichproben (unpaired Student's t-test) berechnet. Multiple Vergleiche wurden mittels des Newman-Keuls Multiple Comparison Test durchgeführt. Werte von  $p < 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Rosuvastatinbehandlung**

#### **4.1.1 Rosuvastatin- und Mevalonatplasmakonzentrationen**

Die Plasmakonzentrationen von Rosuvastatin und Mevalonat wurden zu verschiedenen Zeiten (unmittelbar nach der Behandlung, nach 15 Minuten, 30 Minuten, 1, 2, 3, 5, 8 und 24 Stunden) nach vorheriger Applikation von 10mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin über 10 Tage bestimmt.

Die Rosuvastatin Konzentrationen nahmen bereits nach einer Stunde mit einer gleichzeitigen Abnahme der Plasmamevalonatkonzentration ab. Abgesehen von Atorvastatin haben alle Statine relativ kurze Eliminationshalbwertzeiten im Mittel von ca. 2 bis 3 Stunden, so dass sie nicht im Blut akkumulieren. Im Falle von Atorvastatin beträgt die Eliminationshalbwertzeiten zwischen 11 und 30 Stunden. Die hier erhobenen Werte entsprechen somit der zu erwartenden Pharmakokinetik von Rosuvastatin. Eine Normalisierung der Mevalonatkonzentration wurde bei abgeklungener Rosuvastatinwirkung nach 24 Stunden erreicht (vgl. Abb. 16).

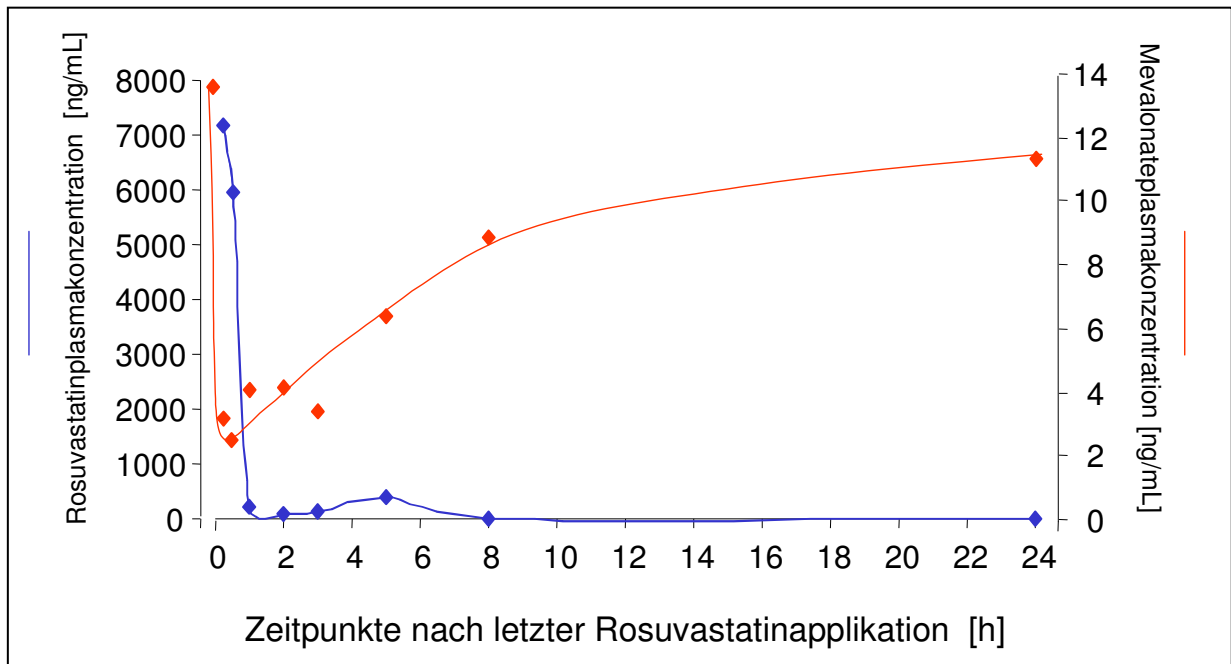


Abb. 16: Darstellung der Rosuvastatin- (blau) und Mevalonatplasmakonzentration (rot) [ng/ml] in Abhängigkeit der Zeit [h]. Im Vorfeld wurden je 5 Tiere für 10 Tage mit 10mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin behandelt. Die Zeitachse zeigt die Zeitpunkte der Plasmagewinnung (unmittelbar nach der letzten Behandlung, nach 15 Minuten, 30 Minuten, 1, 2, 3, 5, 8 und 24 Stunden).

## 4.1.2 Dosis-Wirkungsbeziehung

### 4.1.2.1 Rosuvastatin führt dosisabhängig zu einer Heraufregulation von endothelialen Progenitorzellen in peripherem Blut und Knochenmark

Die Anzahl der durchflusszytometrisch bestimmten Sca-1/VEGF-R2 positiven endothelialen Progenitorzellen (EPCs) wurde durch die Behandlung mit Rosuvastatin dosisabhängig im peripheren Blut und im Knochenmark hochreguliert (vgl. Abb. 17). Die Anzahl der Sca-1/VEGF-R2 positiven Zellen im peripheren Blut nahm signifikant zu in den Gruppen, die mit 1mg, 5mg, 10mg und 20mg/kg Körpergewicht behandelt wurden ( $30,45 \pm 15,93$  vs.  $224,33 \pm 22,74$ ;  $254,75 \pm 14,56$ ;  $232 \pm 46,96$ ;  $269,75 \pm 14,59$  [EPCs/50.000 gezählte Zellen]).

Auf Knochenmarkebene konnte unter 5mg/kg Körpergewicht eine Heraufregulation der Sca-1/VEGF-R2 positiven endothelialen Progenitorzellen gezeigt werden. Höhere Dosierungen führten zu keiner weiteren Zunahme des EPC-Pools auf Knochenmarkebene ( $82,45 \pm 11,31$  vs.  $124,8 \pm 14,78$  [EPCs/50.000 gezählte Zellen]) (vgl. Abb. 18).

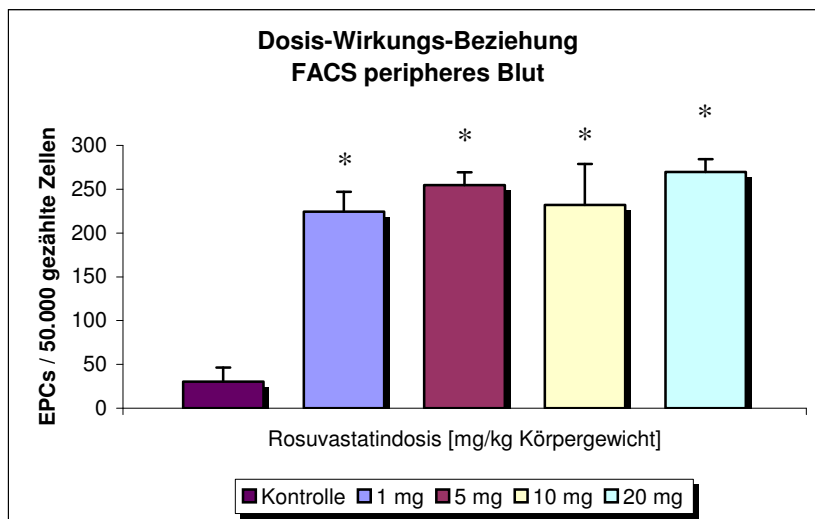


Abb. 17: FACS-Analyse des peripheren Blutes (Sca-1 (FITC) und VEGF-R2 (PE)) nach einer 10 tägigen Rosuvastatin-Behandlung mit den Dosierungen 1, 5, 10 und 20 mg/kg Körpergewicht (n=5). Die Bestimmung der EPC-Zahlen erfolgte an Tag 11. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte mit Standardabweichung (\*  $p < 0,05$ ).

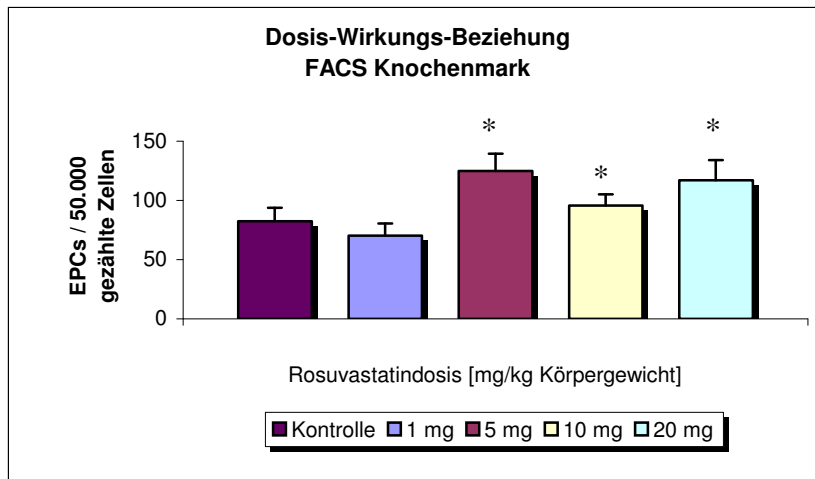


Abb. 18: FACS-Analyse des Knochenmarkes (Sca-1 (FITC) und VEGF-R2 (PE)) nach einer 10 tägigen Rosuvastatin-Behandlung mit den Dosierungen 1, 5, 10 und 20 mg/kg Körpergewicht (n=5). Die Bestimmung der EPC-Zahlen erfolgte an Tag 11. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte mit Standardabweichung (\* p<0,05).

#### 4.1.2.2 Rosuvastatin führt dosisabhängig zu einer Heraufregulation der endothelialen Progenitorzellen im mononukleären Zellpool der Mäusemilz

Die Anzahl der acDi-LDL/Lectin doppelt positiven early outgrowth endothelialen Progenitorzellen aus dem mononukleären Zellpool der Mäusemilz war signifikant erhöht nach Behandlung mit 5mg und 10mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin ( $52,35 \pm 2,41$  vs.  $74,04 \pm 1,38$ ;  $80,46 \pm 0,95$  [EPCs/cm<sup>2</sup>]). Die Applikation von 20mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin ( $57,61 \pm 0,63$  [EPCs/cm<sup>2</sup>]) führte hier zu keinem weiteren Anstieg der Zellzahl (vgl. Abb. 19, Abb. 20, A-C).



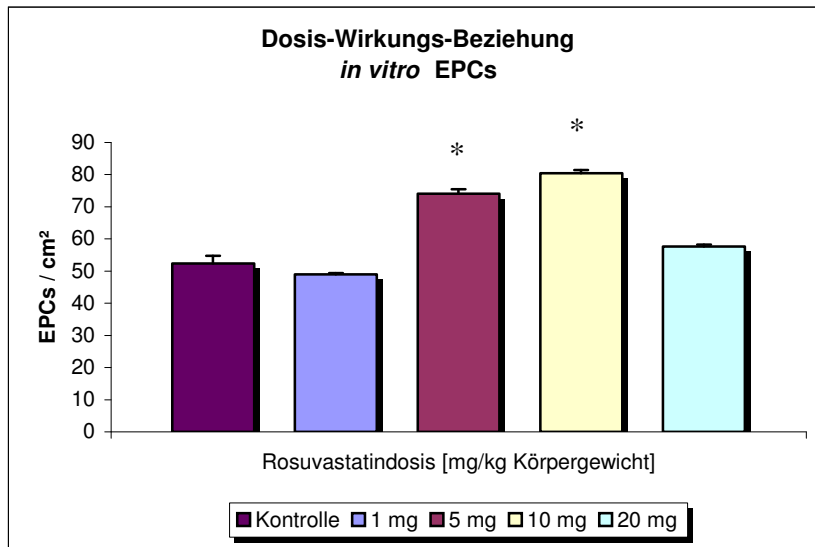
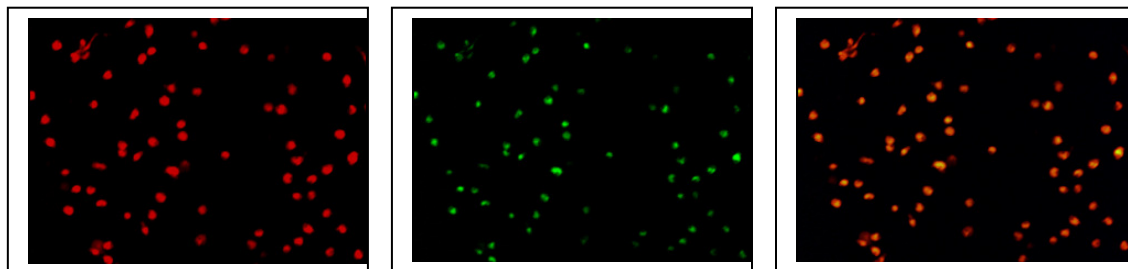


Abb. 19: Auszählung der mit Lectin und acDi-LDL zweifach markierten early outgrowth EPCs nach 4 Tagen in Zellkultur nach einer 10 tägigen Rosuvastatinbehandlung mit den Dosierungen 1, 5, 10 und 20 mg/kg Körpergewicht (n=5). Die Bestimmung der EPC-Zahlen erfolgte an Tag 11. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte mit Standardabweichung (\* p<0,05).



A B C  
Abb. 20: early outgrowth EPCs nach 4 Tagen in Zellkultur

- A: acDi-LDL - markierte mononukleäre Zellen nach 4 Tagen in Zellkultur
- B: Lectin - markierte mononukleäre Zellen nach 4 Tagen in Zellkultur
- C: Überlagerung von A und B: Doppelt markierte Zellen wurden als early outgrowth EPCs definiert.

### 4.1.3 Zeitabhängigkeit

#### 4.1.3.1 Rosuvastatin führt zeitabhängig zu einer Heraufregulation von endothelialen Progenitorzellen in peripherem Blut und Knochenmark

Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) wurden nach Rosuvastatinbehandlung zeitabhängig im peripheren Blut hochreguliert bei gleichzeitiger Abnahme des endothelialen Progenitorzell-Pools im Knochenmark. Die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen wurde mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie ermittelt.

Die FACS-Analyse ergab im peripheren Blut während des Zeitverlaufs über 1, 10 und 24 Tage ( $17,86 \pm 4,23$  vs.  $70,67 \pm 8,5$ ;  $208 \pm 32,92$ ;  $358,5 \pm 2,4$  [EPCs/50.000 gezählte Zellen]) eine kontinuierliche Hochregulation der Sca-1/VEGF-R2 positiven EPCs mit dem Erreichen eines Maximums an Tag 24 (vgl. Abb. 21).

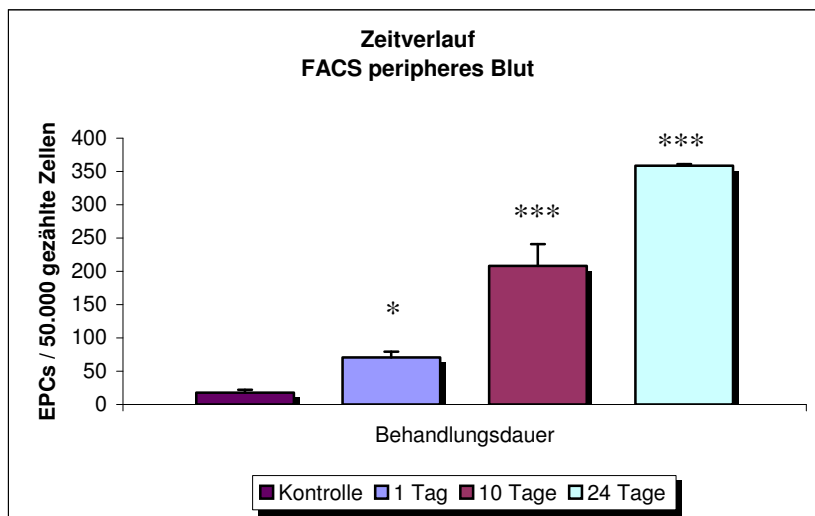


Abb. 21: FACS-Analyse des peripheren Blutes (Sca-1 (FITC) und VEGF-R2 (PE)) nach täglicher intraperitonealer Rosuvastatinbehandlung mit 10mg/kg Körpergewicht über 1, 10 und 24 Tage (n=5). Die Bestimmung der EPC-Zahlen erfolgte je 24h nach letzter Behandlung. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte mit Standardabweichung (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Auf Knochenmarkebene zeigte der Zeitverlauf eine kontinuierliche Abnahme der Sca-1/VEGF-R2 positiven endothelialen Progenitorzellen. Dabei wurde ein minimaler endothelialer Progenitorzell-Level nach 24 Tagen erreicht ( $79,2 \pm 15,1$  vs.  $98,76 \pm 16,72$  [EPCs/50.000 gezählte Zellen]) (vgl. Abb. 22).

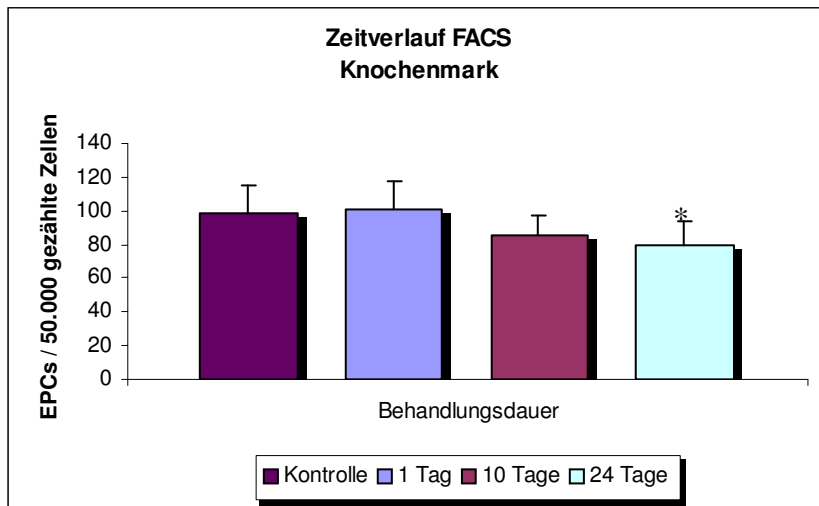


Abb. 22: FACS-Analyse des Knochenmarks (Sca-1 (FITC) und VEGF-R2 (PE)) nach täglicher intraperitonealer Rosuvastatinbehandlung mit 10mg/kg Körpergewicht über 1, 10 und 24 Tage (n=5). Die Bestimmung der EPC-Zahlen erfolgte je 24h nach letzter Behandlung. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte mit Standardabweichung (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3.2 Rosuvastatin führt zeitabhängig zu einer Heraufregulation der endothelialen Progenitorzellen im mononukleären Zellpool der Mäusemilz

Es erfolgte die Bestimmung der early outgrowth endothelialen Progenitorzellen in der *in vitro* – Kultur mittels acDi-LDL/Lectin-Färbung. Hier zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der EPC Zahlen nach 24 Stunden ( $50,8 \pm 6,25$  vs.  $184,86 \pm 15,58$  [EPCs/cm<sup>2</sup>]). Nach einem vorübergehender Abfall nach 10 Tagen ( $136,34 \pm 3,1$  [EPCs/cm<sup>2</sup>]) ließ sich ein erneuter Anstieg nach 24 Tagen ( $199,29 \pm 2,84$  [EPCs/cm<sup>2</sup>]) verzeichnen (vgl. Abb. 23).

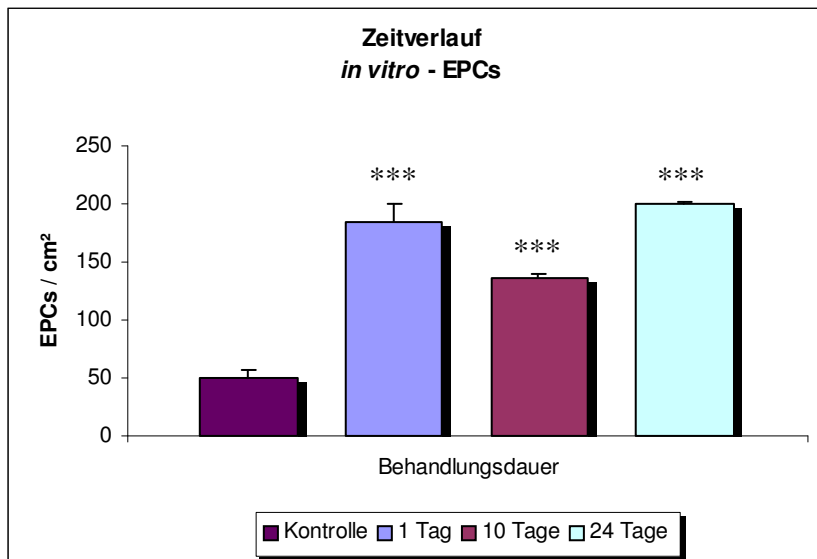


Abb. 23: Auszählung der mit Lectin und acDi-LDL zweifach markierten early outgrowth EPCs nach 4 Tagen in Zellkultur nach täglicher intraperitonealer Rosuvastatinbehandlung mit 10mg/kg Körpergewicht über 1, 10 und 24 Tage (n=5). Die Kultivierung der Zellen erfolgte je 24h nach letzter Behandlung. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte mit Standardabweichung (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

#### **4.1.4 Die Rolle der Milz in der endothelialen Progenitorzell-Regulation**

Zur Untersuchung der Rolle der Milz in der endothelialen Progenitorzell-Regulation wurde bei einer Tiergruppe zunächst eine 10 tägige Behandlung mit 10mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin durchgeführt. Anschließend wurde aus der Milz die Population der mononukleären Zellen isoliert und mittels FACS-Analyse mit den mausspezifischen Antikörpern Sca-1 (FITC) und VEGF-R2 (PE) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Zellpool der mit Rosuvastatin behandelten Tiere mehr Sca-1/VEGF-R2 positive endotheliale Progenitorzellen nachzuweisen waren als bei den Tieren der Kontrollgruppe, die unter gleichen Bedingungen mit NaCl 0,9% behandelt wurden ( $151 \pm 17,08$  vs.  $298,5 \pm 17,99$  [EPCs/50.000 gezählte Zellen]) (vgl. Abb. 24).

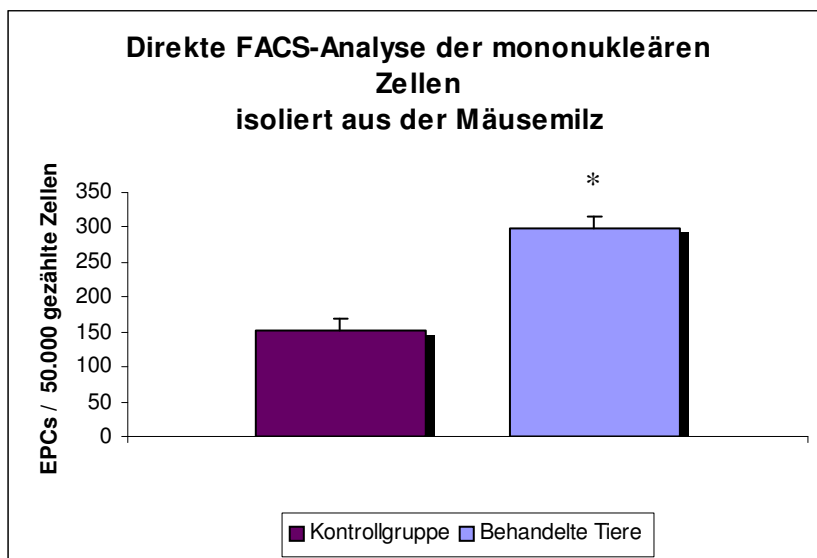


Abb. 24: FACS-Analyse von mononukleären Zellen (Sca-1 (FITC) und VEGF-R2 (PE)), isoliert aus der Mäusemilz, nach 10 tägiger Behandlung mit 10mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin (n=5). Die Bestimmung der EPC-Zahlen erfolgte an Tag 11. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte mit Standardabweichung (\*  $p < 0,05$ ).

#### **4.1.5 Einfluss einer Splenektomie auf die knochenmarkständigen und frei zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen**

Bei Nagetieren sind Stamm- und Progenitorzellen sowohl im Knochenmark als auch in der Milz präsent. Es konnte gezeigt werden, dass eine Rosuvastatin-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der Sca-1/VEGF-R2 positiven Zellen in der Milz führt ( $151,0 \pm 17,08$  vs.  $298,5 \pm 17,99$  [EPCs/50.000 gezählte Zellen]) (vgl. Abb. 24). Um die Zusammenhänge zwischen Knochenmark, Milz und dem begleitenden Effekt der HMG-CoA-Reduktase-Hemmung zu untersuchen, wurden splenektomierte Tiere für 10 Tage täglich mit 10mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin oder Placebo intra-peritoneal behandelt. Als Kontrolle dienten „scheinoperierte“ Tiere, die linkslateral laparotomiert wurden, ohne dass jedoch eine Splenektomie durchgeführt wurde. Die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen im Knochenmark und peripheren Blut wurde mittels FACS-Analyse ermittelt.

Die Zahl der peripher zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen war in splenektomierten Mäusen im Vergleich zu den „scheinoperierten“ Tieren signifikant erhöht ( $77,6 \pm 19,89$  vs.  $138,66 \pm 18,01$  [EPCs/50.000 gezählte Zellen]). Die Behandlung mit Rosuvastatin führte in splenektomierten Mäusen zu einem weiteren Anstieg der zirkulierenden Sca-1/VEGF-R2 positiven endothelialen Progenitorzellen im peripheren Blut ( $77,6 \pm 19,89$  vs.  $209,66 \pm 29,94$  [EPCs/50.000 gezählte Zellen]) (vgl. Abb. 25).

Die Zahl der Sca-1/VEGF-R2 positiven, knochenmarkständigen endothelialen Progenitorzellen war bei den splenektomierten Tieren im Vergleich zu den „scheinoperierten“ Tieren signifikant höher ( $76,85 \pm 1,56$  vs.  $105,75 \pm 6,45$  [EPCs/50.000 gezählte Zellen]). Die zusätzliche Behandlung der splenektomierten Tiere mit Rosuvastatin führte zu einer Reduktion der knochenmarkständigen Sca-1/VEGF-R2 positiven Zellen ( $105,75 \pm 6,45$  vs.  $57,5 \pm 21,11$  [EPCs/50.000 gezählte Zellen]) (vgl. Abb. 26).

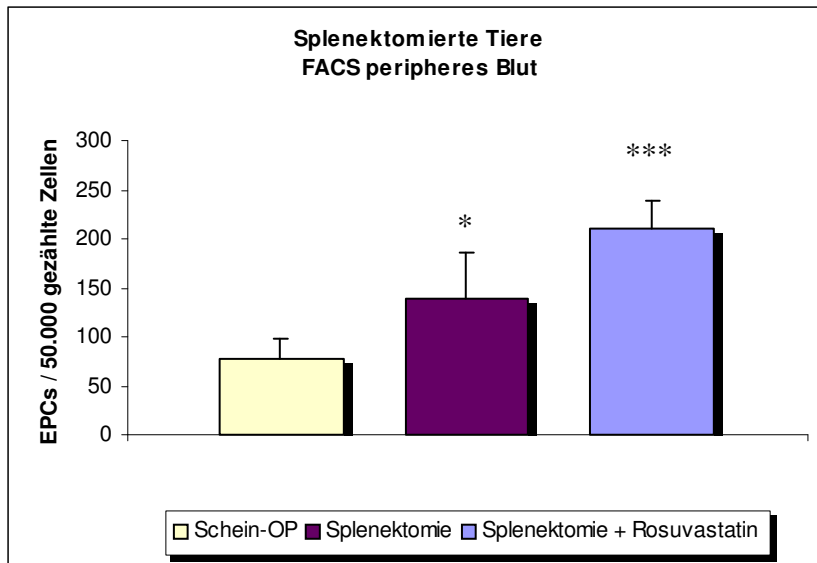


Abb. 26: FACS-Analyse des peripheren Blutes von splenektomierten Tieren (Sca-1 (FITC) und VEGF-R2 (PE)) nach 10 tägiger Behandlung mit 10mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin oder Placebo im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (n=5). Die Bestimmung der EPC-Zahlen erfolgte an Tag 11. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte mit Standardabweichung (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

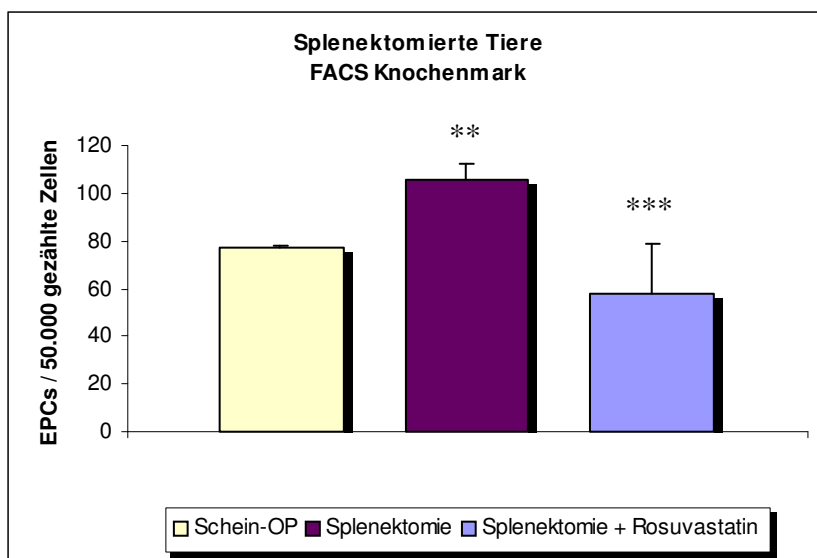


Abb. 25: FACS-Analyse des Knochenmarkes von splenektomierten Tieren (Sca-1 (FITC) und VEGF-R2 (PE)) nach 10 tägiger Behandlung mit 10mg/kg Körpergewicht Rosuvastatin oder Placebo im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (n=5). Die Bestimmung der EPC-Zahlen erfolgte an Tag 11. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte mit Standardabweichung (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## **4.2 *in vivo* – Evaluation der aus der Milz stammenden endothelialen Progenitorzellen und Monozyten im Retransfusionsmodell**

### **4.2.1 Charakterisierung der endothelialen Progenitorzellen aus der Milz**

Die Zahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen im peripheren Blut ist sehr gering. Aus diesem Grund wurde die Milz als mögliche Quelle für endotheliale Progenitorzellen in der Maus untersucht. Aus der Milz isolierte mononukleäre Zellen wurden in Zellkultur genommen. Nach vier Tagen in EBM-Medium zeigten 91,8±3,2% der im well angehefteten Zellen zum einen die Fähigkeit acetyliertes Low Density Lipoprotein (acDi-LDL) aufzunehmen und zum anderen Lectin zu binden. Somit wiesen die doppelt markierten Zellen der mononukleären Zellpopulation Charakteristika der early outgrowth EPCs auf.

Nach 4 Tagen *in vitro* Differenzierung wurden zusätzliche histochemische Färbungen durchgeführt. Die kultivierten aus der Mäusemilz stammenden mononukleären Zellen zeigten, sowohl die Expression des Mausstammzellmarkers Sca-1 (85,0±4,8%), als auch die von CD34 (88,6±3,1%) und c-kit (67,3±5,4%) im Zusammenhang mit dem Antigen der endothelialen Zelllinie VEGFR-2 (82,9±5,2%). Dies zeigt, dass die aus der Milz stammenden Zellen nach *in vitro* Kultur in EBM-Medium typische Charakteristika von early outgrowth EPCs aufweisen. Die Unversehrtheit der Zellen wurde mit einer korrespondierenden nukleären Färbung gezeigt (DAPI).

Die Kultivierung von aus der Milz isolierten mononukleären Zellen über einen längeren Zeitraum zeigte nach 14 Tagen Inkubation traubenartig angeordnete Haufen von spindelförmigen Zellen in der Peripherie im Sinne von colony forming unit-endothelial cells (CFU-EC).



## **4.2.2 Reendothelialisierung und Neointimaausbildung**

### **4.2.2.1 Mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark und der Milz sowie EPCs wandern nach intravenöser Injektion zu ihrem Zielorgan und nicht in die Intimaläsion nach Endothelzelldenudation**

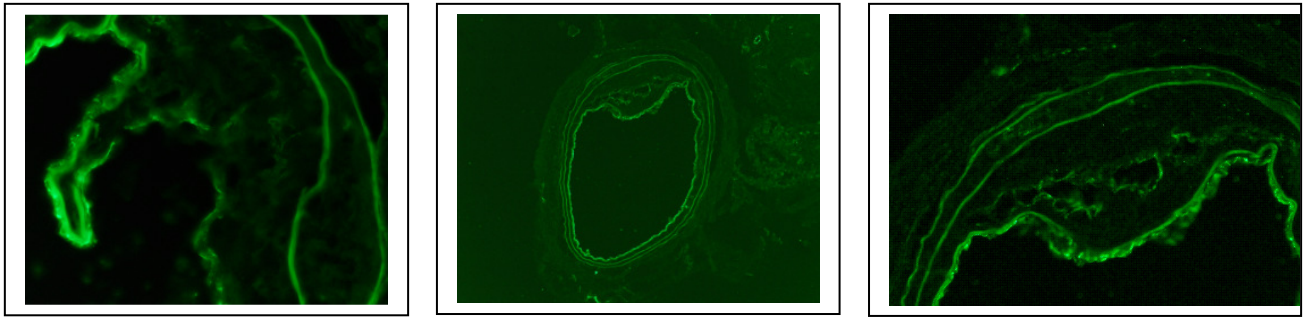
Um den Effekt einer Zell-Transfusion auf die Reendothelialisierung genauer zu untersuchen, wurden Mäusen nach stattgehabter Endothelzelldenudation postoperativ direkt und nach 24 Stunden erneut je  $1 \times 10^6$  PKH-26 markierte, milzstämmige, native mononukleäre Zellen oder zuvor für vier Tage kultivierte, Di-ac-LDL markierte early EPC intravenös transfundiert. Im Aufsichtmikroskop und immunhistochemisch konnten in beiden Gruppen nur vereinzelt transfundierte Zellen im Bereich der Endothelzelldenudation nachgewiesen werden. In zusätzlichen histologischen Untersuchungen konnte eine Vielzahl der markierten, transfundierten Zellen in der Milz nachgewiesen werden.

### **4.2.2.2 Eine vorherige Splenektomie ermöglicht den transfundierten mononukleären Zellen und den EPCs ein Einwandern im Bereich der Intimaläsion nach Endothelzelldenudation**

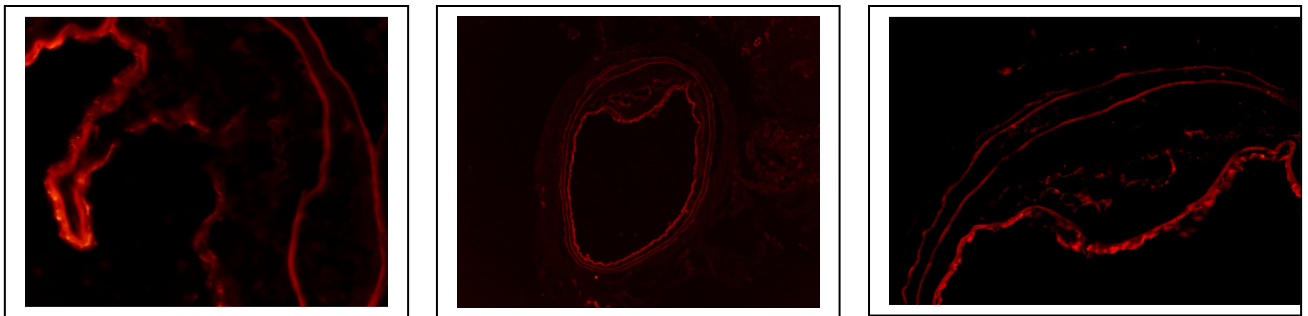
Um das Einwandern („Homing“) der transfundierten Zellen im Bereich der Neointima nach Endothelzelldenudation zu steigern, wurden die Mäuse 7 Tage vor der operativen Endothelzellschädigung splenektomiert. Erneut wurden je  $1 \times 10^6$  PKH-26 markierte, milzstämmige mononukleäre Zellen oder zuvor für vier Tage kultivierte, Di-ac-LDL markierte early EPC direkt postoperativ und nach 24 Stunden intravenös transfundiert. 14 Tage nach Endothelzelldenudation und Transfusion zeigten sich im Aufsichtmikroskop Inseln von transfundierten Zellen im deendothelialisierten Bereich der splenektomierten Tiere. Dabei zeigte sich nach Transfusion der mononukleären Zellen eine deutlich höhere Anzahl an eingewanderten Zellen ( $204,3 \pm 15,4 \text{ mm}^2$ ) als nach Transfusion der zuvor kultivierten early EPC ( $88,6 \pm 8,6 \text{ mm}^2$ ). Das „Homing“ der transfundierten Zellen beschränkte sich ausschließlich auf den Gefäßbereich nach stattgehabter Deendothelialisierung. In den Gefäßabschnitten ohne Endothel-

zelldenudation oder in den kontralateralen Gefäßen konnten keine transfundierten Zellen nachgewiesen werden.

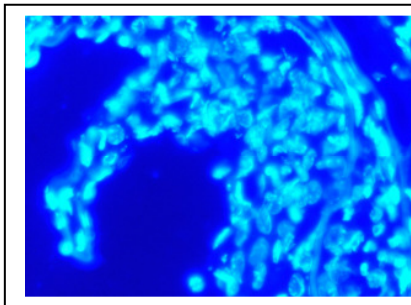
Eine halbe Stunde vor Gewebeentnahme wurde den Mäusen FITC-gelabeltes Lectin intravenös verabreicht um zu zeigen, dass die in der Läsion angelagerten Zellen einen endothelialen Phänotyp aufweisen. In der immunhistochemischen Analyse konnte gezeigt werden, dass die transfundierten Zellen im deendothelialisierten Gefäßabschnitt vorwiegend den intraluminären Rand der Neointima säumen (vgl. Abb. 27 A, B). In der Lectin-Färbung zeigten sich die an der Neointima angelagerten Zellen als Lectin-positiv. Die zusätzliche nukleäre Färbung mit DAPI und Überlagerungen zeigten den endothelialen Phänotyp der transfundierten Zellen (vgl. Abb. 27 C). In der Placebogruppe konnten lediglich einige vereinzelte endogene endotheliale Zellen (Lectin-positiv, acDi-LDL-negativ) nachgewiesen werden. Im Vergleich der Ergebnisse zeigte sich, dass es nach Zelltransfusion (sowohl von mononukleären Zellen als auch von kultivierten early EPCs) zu einer deutlich verbesserten Reendothelialisierung gekommen ist (vgl. Abb. 28).



A FITC-Darstellung



B PE-Darstellung



C DAPI-Darstellung

Abb. 27: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Gefäßschnitte nach Endothelzelldenudation und Transfusion von mononukleären Zellen bei splenektomierten Tieren. Es können zuvor mit PKH-26 (PE) fluoreszenzmarkierte Zellen im Bereich der Endothelläsion dargestellt werden. Um den endothelialen Phänotyp der Zellen zu zeigen, wurde den Tieren 30 Minuten vor Gefäßentnahme FITC-gelabeltes Lectin intravenös verabreicht. Die korrespondierende nukleäre Färbung mit DAPI zeigt die Unversehrtheit der Zellen.

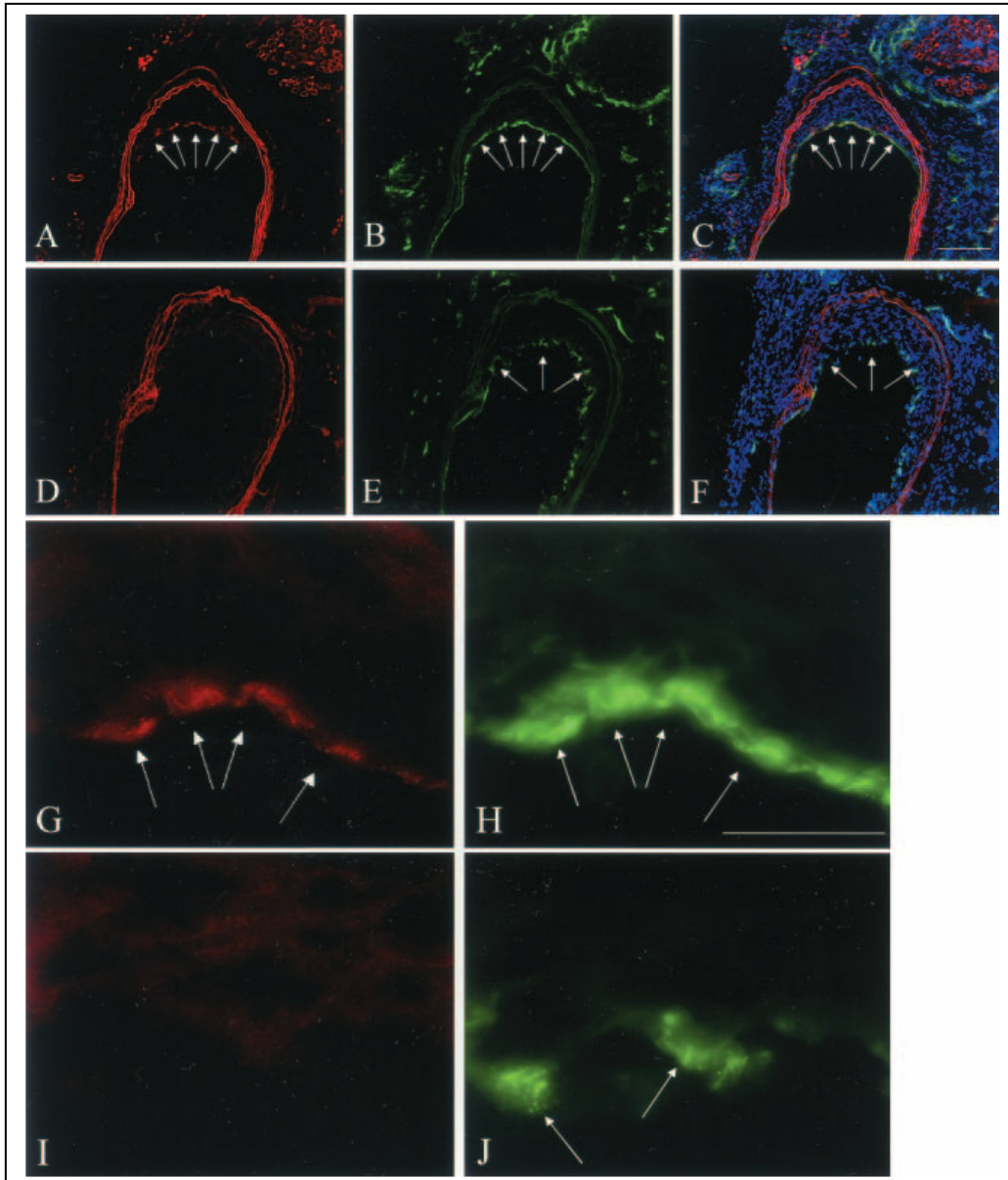


Abb. 28: Transfundierte endotheliale Progenitorzellen (early EPC, Di-ac-LDL-markiert nach 4 Tagen in Kultur) führen zu einer verbesserten Reendothelialisierung nach statt-gehabter Endothelzelldenudation. Um zu zeigen, dass es sich bei den angelagerten Zellen um Zellen mit endotheliale Phänotyp handelt, wurde den Mäusen 30 Minuten vor der Organentnahme FITC-gelabeltes Lectin intravenös verabreicht.

A,B: FITC und PE Darstellung der Neointima nach Transfusion mit acDi-LDL gelabelten EPCs (entsprechende Vergrößerungen in G und H)

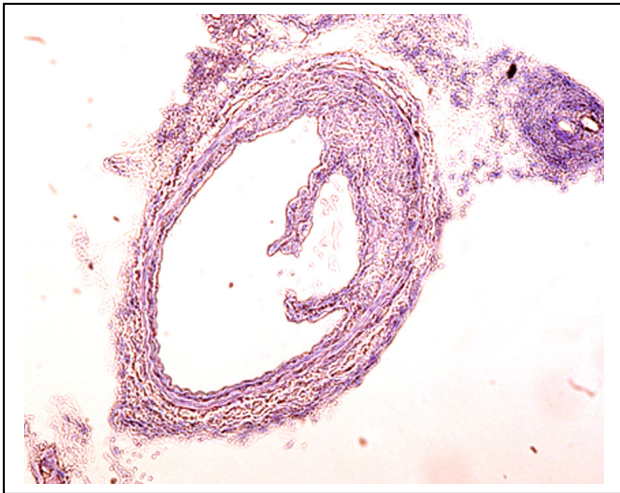
D,E: FITC und PE Darstellung der Neointima in der Placebogruppe (entsprechende Vergrößerungen in I und J)

C: korrespondierende nukleäre Färbung mit DAPI in der transfundierten Gruppe

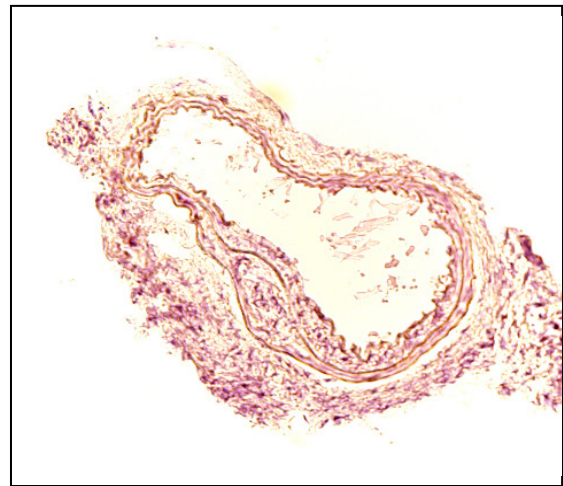
F: korrespondierende nukleäre Färbung mit DAPI in der Placebogruppe

#### 4.2.2.3 Intravenös transfundierte milzstämmige mononukleäre Zellen und EPCs führen zu einer Reduktion der Neointima-Formation

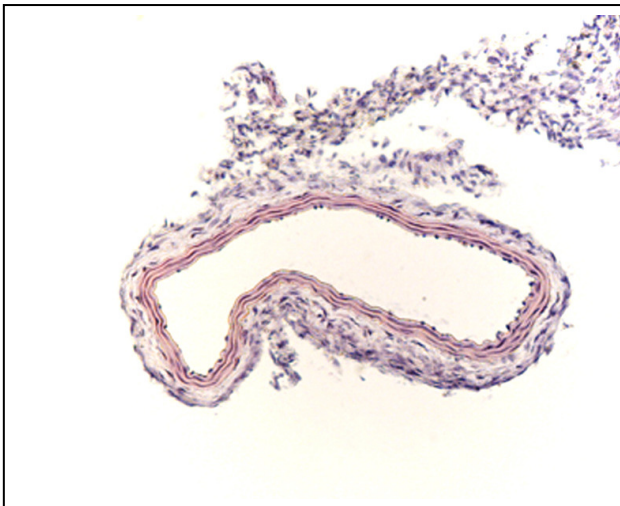
Der biologische Effekt von transfundierten PKH-26 gelabelten mononukleären Zellen und von endothelialen Progenitorzellen auf die Reendothelialisierung und Neointima-Ausbildung wurde bei transfundierten und mit Placebo behandelten Tieren über eine Evans-Blue Färbung bestimmt. Dazu wurde das Gefäß 14 Tage nach stattgehabter Endothelzelldenudation präpariert. Die Untersuchung zeigte, dass die Transfusion von endothelialen Progenitorzellen im Vergleich zu der Placebogruppe zu einer deutlichen Zunahme der Reendothelialisierung führt ( $86,4\% \pm 5,0\%$  vs.  $71,3\% \pm 6,0\%$ ). Eine computergestützte morphometrische Analyse von circa 25 Gefäßschnitten in HE-Färbung pro Tier zeigte, dass nach Transfusion von mononukleären Zellen ( $18.854 \pm 2639 \mu\text{m}^2$ ) und endothelialen Progenitorzellen ( $30.592 \pm 1028 \mu\text{m}^2$ ) die Ausbildung der Neointima im Vergleich mit der Placebogruppe ( $37.724 \pm 2719 \mu\text{m}^2$ ) deutlich reduziert war (vgl. Abb. 29, 30). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Mediadichte nach Transfusion mit mononukleären Zellen ( $20.904 \pm 4013 \mu\text{m}^2$ ) und endothelialen Progenitorzellen ( $24.286 \pm 1305 \mu\text{m}^2$ ) im Vergleich mit der Placebogruppe ( $20.075 \pm 1343 \mu\text{m}^2$ ). Der korrespondierende Quotient aus Intima zu Media zeigte eine Reduktion der Intima nach Transfusion von mononukleären Zellen ( $0,9 \pm 0,15$ ) und endothelialen Progenitorzellen ( $1,26 \pm 0,06$ ) im Vergleich zur Placebogruppe ( $1,88 \pm 0,26$ ). vs.  $0,9 \pm 0,15$ ).



A Behandlung mit Placebo (NaCl 0,9%)



B Behandlung mit mononukleären Zellen



C Darstellung eines Gefäßschnittes ohne stattgehabe Endothelzelldenudation

Abb. 30: Morphometrische Auswertung der HE-gefärbten Gefäßschnitte. A und B zeigen Gefäße nach Endothelzelldenudation bei splenektomierten Tieren. In der Placebogruppe (A) zeigt sich die zu erwartende Ausbildung einer Neointima. Nach intravenöser Behandlung mit mononukleären Zellen (B) kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Neointima. C zeigt als Kontrolle ein Gefäßschnitt ohne stattgehabe Endothelzelldenudation. Ein Gefäß nach Transfusion mit EPCs kommt hier nicht zur Darstellung.

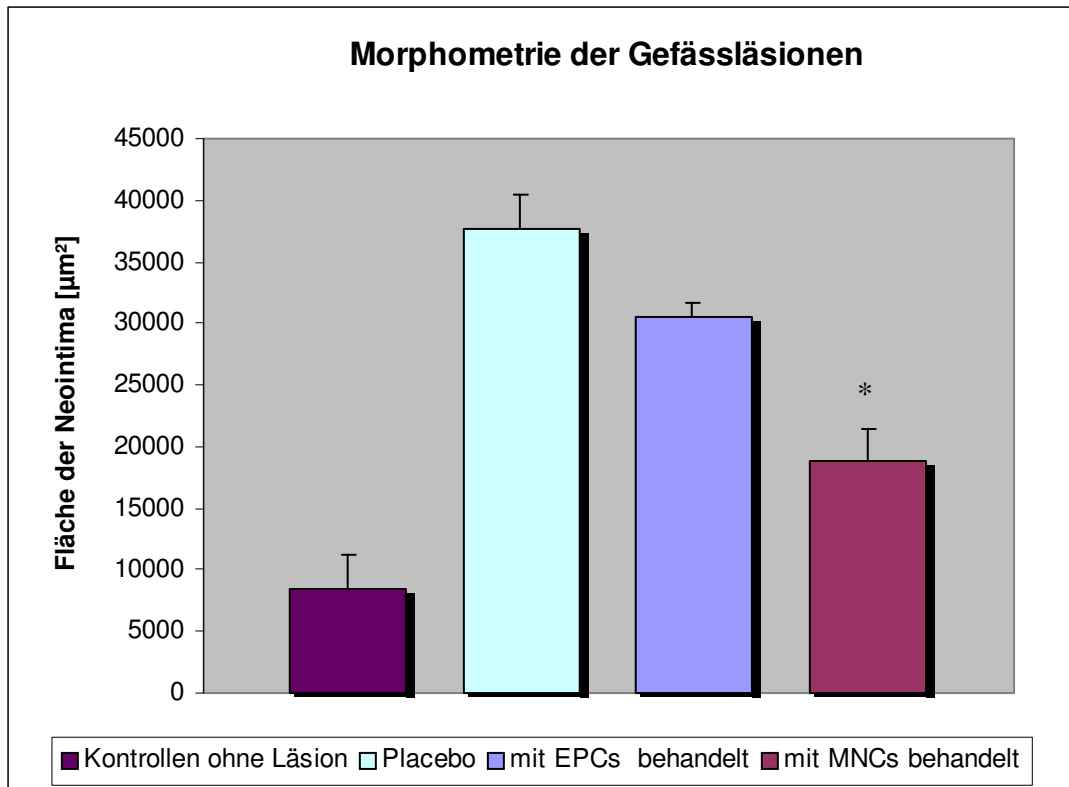


Abb. 31: Zusammenfassung der morphometrischen Auswertung der Gefäßschnitte von zuvor splenektomierten Tieren ( $n=25$ ). Die Neointima ist definiert als die Differenz aus der durch die Media eingeschlossenen Fläche und dem Gefäßinnenlumen. Als Kontrolle dienten Gefäße ohne Läsion.

Die Neointimaformation bei mit mononukleären Zellen behandelten Tieren war im Vergleich zur Placebogruppe signifikant reduziert. Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte mit Standardabweichung (\*  $p < 0,05$ ).

## **5. Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der Rolle von Statinen bei der Reduktion der Endothelschädigung durch Mobilisation endothelialer Progenitorzellen im Sinne eines kausalen Therapiekonzeptes für die Atherosklerose. Wir konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Statinen (hier: Rosuvastatin) sowohl dosis- als auch zeitabhängig zu einer Erhöhung der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen führt. Dabei kam der Milz eine besondere Bedeutung zu. Sie wies nach einer Statinbehandlung eine deutlich höhere Anzahl an endothelialen Progenitorzellen auf. Wir konnten weiterhin zeigen, dass nach Splenektomie statininduziert die Abnahme der knochenmarkständigen endothelialen Progenitorzellen mit einer Zunahme der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen korreliert. Dies weist auf eine mögliche Reservoirfunktion der Milz hin. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass endotheliale Progenitorzellen in der Lage sind, gezielt in den Bereich geschädigten Endothels einzuwandern, wodurch es zu einer Verbesserung der lokalen Reparaturvorgänge und nachfolgend zur Reduktion einer Neointimaformation kommt.

Vaskuläre Progenitorzellen wurden therapeutisch bereits eingesetzt, um die Neoangiogenese nach Gewebischämie zu erhöhen, um die Reendothelialisierung nach lokaler und systemischer Zerstörung endothelialer Zellen zu verbessern und um Atherosklerose zu verlangsamen. Anzahl und Funktion der endothelialen Progenitorzellen hängen von kardiovaskulären Risikofaktoren und begleitender koronarer Herzkrankheit ab (46; 75; 90). Es wurden bereits verschiedene experimentelle und klinische Studien durchgeführt, um Anzahl und Funktion der zirkulierenden Progenitorzellen zu erhöhen und um Reperaturmechanismen bei kardiovaskulären Erkrankungen zu verbessern (20; 46; 53; 71; 85; 91; 92; 96).

Die Mobilisierung einer adäquaten Anzahl von Stamm- und Progenitorzellen ist die Voraussetzung für ihren erfolgreichen therapeutischen Einsatz. Eine anschließende Regeneration des Stammzellpools im Knochenmark muss ebenfalls im Therapiekonzept berücksichtigt werden. Der Mobilisierung muss dann ein selektives Einwandern („Homing“) der Zellen folgen, um die unerwünschten Effekte der Mobilisationstherapie (z.B. Tumorangiogenese) zu minimieren (68).



Traditionell verwendete Zytokine zur Stammzellmobilisation wie G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) und GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) mobilisieren nicht nur allein Stamm- und Progenitorzellen, sondern auch den gesamten Pool von Entzündungszellen in das periphere Blut. So haben klinische Studien mit G-CSF gezeigt, dass die durch G-CSF induzierte Leukozytose im Stadium der akuten Myokardischämie möglicherweise schädliche Effekte hat (53).

### **5.1 Statine und endotheliale Progenitorzellen**

Es ist bekannt, dass Statine die Anzahl kardiovaskulärer Ereignisse durch direkte lipidsenkende Effekte (1; 2; 81) und durch zusätzliche lipidunabhängige (pleiotrope) Effekte (11-13; 18; 22; 23; 25; 28; 29; 95) senken. Unerwünschte Effekte sind hauptsächlich beschränkt auf die sehr selten auftretende Rhabdomyolyse. Es konnte gezeigt werden, dass HMG-CoA-Reduktase-Hemmer die Anzahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen bei Mäusen und Menschen in einem PI3-Kinase und Akt abhängigen Stoffwechselweg erhöhen können (33; 62; 89; 95). Statin induzierte Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen ist assoziiert mit vermehrter Reendothelialisierung und verminderter Bildung einer Neointima (91; 96).

Statine bieten deshalb eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche, auf Stammzellen basierende therapeutische Nutzung bei kardiovaskulären Erkrankungen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben den bekannten mobilisierenden Effekten der Statine die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zu einer Vergrößerung des Progenitorzellpools im Knochenmark, in der Milz und im peripheren Blut führt. Die Anzahl der frei zirkulierenden Progenitorzellen ist unter Statinbehandlung zeitabhängig mit einem Maximum nach 24 Tagen steigend. Gleichzeitig erreicht die Zahl der endothelialen Progenitorzellen im Knochenmark ein Minimum. In der Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigte sich jedoch dosisabhängig auch eine Zunahme der Anzahl der knochenmarkständigen endothelialen Progenitorzellen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Statine nicht nur in der Lage sind, endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut zu mobilisieren, sondern auch die Vergrößerung des Progenitorzellpools in Knochenmark und Milz durch Proliferation und/oder Differenzierung des vorbestehenden Stammzellpools zu bewirken.

Bei Nagetieren stellt die Milz einen extramedullären Pool an endothelialen Progenitorzellen dar (92). Wir konnten zeigen, dass eine Rosuvastatin-Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung des in der Milz ortsansässigen Pools von Sca-1/VEGF-R2 positiven Zellen führt. Um den Zusammenhang zwischen Knochenmark und Milz nach Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zu untersuchen, wurden Mäuse splenektomiert. Der Pool von Sca-1/VEGF-R2 positiven Zellen im Knochenmark vergrößerte sich nach durchgeführter Splenektomie signifikant im Vergleich zu nicht splenektomierten, „scheinoperierten“ Tieren, was eine kompensatorische Hochregulation der Progenitorzellen im Knochenmark vermuten lässt. Es ist höchst interessant zu spekulieren, ob es einen Feedback Mechanismus zwischen Milz und Knochenmark gibt, der in der Lage ist, die Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden Progenitorzellen zu regulieren. Die Rolle der Milz als ein zusätzliches Reservoir für Progenitorzellen oder als ein Organ zur Ausreifung von Stammzellen ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Überraschenderweise wurde bei splenektomierten Tieren nach der Behandlung mit Rosuvastatin beobachtet, dass die Anzahl der Sca-1/VEGF-R2 positiven Zellen im Knochenmark abnimmt. Gleichzeitig zeigten splenektomierte, mit Rosuvastatin behandelte Mäuse einen signifikanten Anstieg der frei im peripheren Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen. Diese Beobachtung unterstreicht den wichtigen Mobilisierungseffekt der Statine auf knochenmarkständige, adulte Stammzellen.

*Walter et al.* (91) zeigten, dass Statine die Expression von Fibronectin-Rezeptoruntereinheiten auf kultivierten menschlichen endothelialen Progenitorzellen verbessern und damit zur Adhäsion *in vivo* beitragen. Man muss an dieser Stelle hinzufügen, dass neben den bereits identifizierten Adhäsionsmolekülen eine Vielzahl an Selektinen und Integrinen an dem gezielten Einwandern („Homing“) von Stammzellen beteiligt sind. *Schmidt et al.* (79) zeigten, dass in den Endothelzellen menschlicher Nabelvenen die Expression von Selektinen und Zelladhäsionsmolekülen um 100-200% potenziert werden kann, wenn die Zellen mit dem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Lovastatin vorbehandelt werden. Der durch Lovastatin potenzierte Anstieg von E-Selektinen und Zelladhäsionsmolekülen ist assoziiert mit einem korrespondierenden Anstieg von Selektin- und CAM-spezifischer mRNA. Dies lässt vermuten, dass die Behandlung mit Statinen die Adhäsion zirkulierender endothelialer Progenitorzellen im Bereich des geschädigten Endothels durch Modulation des Expressionsmusters auf Adhäsionsmolekülen fördert.

Statine erfüllen somit wichtige Voraussetzungen zur therapeutischen Nutzung von endothelialen Progenitorzellen durch Induktion von EPC-Proliferation im Knochenmark, durch Mobilisation einer adäquaten Anzahl von Stamm- und Progenitorzellen, durch Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und durch die Erhöhung der Migrationskapazität der endothelialen Progenitorzellen. Dabei gilt es zu beachten, dass die messbare Konzentration der Statine im Plasma innerhalb der ersten Stunden rapide abfällt. Die beschriebenen Beobachtungen unterstreichen jedoch die wichtige Rolle der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer über ihre lipidsenkende Funktion hinaus bei der Therapie der kardiovaskulären Erkrankungen.

## **5.2 EPC-assoziierte Reduktion einer Neointima nach Endothelzelldenudation**

Bislang ging man davon aus, dass Regeneration und Proliferation von endothelialen Zellen nach Gewebsschädigung im Rahmen einer Neoangiogenese oder nach stattgehabter Endothelzelldenudation ausschließlich ein lokaler Prozess ist, bei dem benachbarte endotheliale Zellen und intakte Teile der Intima die wesentliche Rolle spielen (19). In den letzten Jahren konnte allerdings gezeigt werden, dass zirkulierende adulte Stammzellen und aus dem Knochenmark stammende Progenitorzellen in der Lage sind, in verschiedene Organe einzuwandern, um sich dort in die jeweiligen organspezifischen Zellen zu differenzieren oder an dem bestehenden Stammzellpool zu partizipieren (15). Mehrere Studien haben die Rolle der knochenmarkstämmigen endothelialen Progenitorzellen nach Gewebsschädigung oder während der Angiogenese untersucht mit dem Resultat, dass nach stattgehabtem gewebsschädigendem Ereignis (Myokardinfarkt, Anlage eines koronaren Bypasses) die Anzahl der frei zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen signifikant angestiegen ist (40; 82). Andererseits zeigte sich, dass die Anzahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren signifikant erniedrigt ist (47; 87; 90). Als logische Konsequenz zeigte sich, dass durch die Applikation von endothelialen Progenitorzellen, sowohl Angiogenese, als auch myokardiale Regeneration nach myokardialer Ischämie deutlich verbessert werden kann (8; 52; 55; 56). Die Bedeutung der endothelialen Progenitorzellen als Risikoprädiktoren im Rahmen der kardiovaskulären Erkrankungen konnte von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen bei Patienten mit

stabiler und instabiler KHK gezeigt werden. In der "Endothelial Progenitor Cells in Patients with Coronary Artery Disease (EPCAD)-Studie" konnte gezeigt werden, dass die offensichtlich gefäßschätzenden endothelialen Progenitorzellen ein wichtiger zellulärer Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit sind (93). In einer davon unabhängigen Studie konnten *Schmidt-Lucke et al.* ebenfalls zeigen, dass das Outcome von KHK-Patienten mit der Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen korreliert (80).

Somit vereinen endotheliale Progenitorzellen die komplexen Interaktionen multipler kardiovaskulärer Risikofaktoren und vaskuloprotektiver Substanzen in einem zellulären Marker und können damit als prädiktiver Risikomarker für kardiovaskuläre Ereignisse angesehen werden. In welchem Umfang sich knochenmarkstämmige Stamm- und Progenitorzellen mit ihrem protektiven Potential auf die Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose, vor allem in den frühen Stadien, auswirken, gilt weiter zu klären.

Aus dem Knochenmark stammende endotheliale Progenitorzellen sind an dem Prozess der Reendothelialisierung und an vaskulären Reparaturvorgängen nach Schädigung an erwachsenen arteriellen Gefäßen massgeblich beteiligt (91; 96). In Studien am Tiermodell wurde die Anzahl der frei zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen durch eine Statintherapie angehoben, was zu einer deutlichen Reduktion der Neointimaformation führte (49; 91; 96). Nach diesem experimentellen Erfolg ist allerdings nicht vollständig geklärt, ob der vaskuläre Benefit nach Einsatz von Statinen auf die Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder auf die direkte Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen zurückzuführen ist. Die hier aufgezeigten Daten lassen darauf schließen, dass die durch Retransfusion von milzstämmigen mononukleären Zellen erhöhte Anzahl frei zirkulierender endothelialer Progenitorzellen zu einer Erhöhung der Reendothelialisierung und damit zu einer deutlichen Abnahme der Neointimaformation führt (92). Eine verbesserte Reendothelialisierung ist direkt mit einer Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen assoziiert (10). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Retransfusion von milzstämmigen mononukleären Zellen die Reparaturvorgänge im Bereich eines geschädigten Endothels deutlich beschleunigt.

Im gleichen Versuchsaufbau wurde die Reduktion der Neointima nach Transfusion von weiter differenzierten endothelialen Progenitorzellen (milzstämmige mononukleäre Zellen nach vier Tagen in Zellkultur) untersucht. Diese kultivierten

Zellen werden als „early outgrowth“ endotheliale Progenitorzellen oder „colony forming units“ (CFU) bezeichnet (48). Dabei wurde im direkten Vergleich mit frisch isolierten mononukleären Zellen gezeigt, dass in beiden Gruppen eine deutliche Reduktion der Neointimaformation erreicht werden konnte, dieser Effekt jedoch in der Gruppe der frisch isolierten mononukleären Zellen deutlich ausgeprägter war (92). Ursache dafür könnte eine Interaktion zwischen parakrinen Zellen und Progenitoren sein, die im gegenseitigen Wechselspiel massgeblich die Endothelzellregeneration verbessern.

*Rehman et al.* konnten zeigen, dass sich beim Menschen aus dem Blut kultivierte endotheliale Progenitorzellen, sowohl aus Makrophagen, als auch aus Monozyten differenziert haben (76). Der erhöhte Anteil an Monozyten und Makrophagen im Zellpool der milzstämmigen mononukleären Zellen mit entsprechend erhöhtem Differenzierungspotential (76) bietet eine mögliche Erklärung für die deutliche Reduktion der Neointimaformation und die deutlich erhöhte Reendothelialisierung nach Transfusion der milzstämmigen mononukleären Zellen. Weitere Untersuchungen mit *ex vivo* differenzierten, aus dem Knochenmark stammenden hämatopoetischen Stammzellen zeigten, dass die Einwanderungspotenz dieser *ex vivo* kultivierten Zellen nach intravenöser Injektion im Vergleich zu frisch isolierten Zellen deutlich reduziert ist (77; 86). Dies wird assoziiert mit der Herabregulation von Integrinen während der *ex vivo* Differenzierung (86). Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die Unterschiede zwischen frisch isolierten mononukleären Zellen und kultivierten endothelialen Zellen bezüglich ihrer Oberflächenmarker und ihrem Differenzierungsstatus aufzuklären.

Einwanderungssignale von lokal geschädigtem Gewebe sind vermutlich verantwortlich für das Homing von zirkulierende Stamm- oder Progenitorzellen im Zielgewebe (6; 71). In dieser Arbeit zeigten wir, dass zirkulierende endotheliale Progenitorzellen nur dann den Bereich der Endothelzellen denudation erreichten, wenn zuvor eine Splenektomie durchgeführt wurde. Bei nicht splenektomierten Tieren konnten keine eingewanderten endothelialen Progenitorzellen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass hämatopoetische Stammzellen vor allem in Knochenmark und Milz einwandern (72). Es ist interessant zu spekulieren, ob die Verlängerung der Zirkulationsdauer der endothelialen Progenitorzellen in der Peripherie nach Splenektomie eine Stimulation der Oberflächenmarker bewirkt so dass ein „Homing“

auch tatsächlich ermöglicht wird. Die Interaktion von endothelialen Progenitorzellen mit Wachstums- und Differenzierungsfaktoren führt möglicherweise zur Aktivierung von gewebsspezifischen Genen und damit zur Differenzierung der Progenitorzellen in Zellen des zielgeweblichen Phänotyps (15; 17).

Da die Atherosklerose unweigerlich zu einer Schädigung des Endothels mit einer resultierenden Neoangiogenese führt, ist eine Spekulation über den therapeutischen Einsatz von endothelialen Progenitorzellen unabdingbar. Die Endothelzellregeneration stellt durch endogene oder transfundierte endotheliale Progenitorzellen einen neuen wichtigen Denkansatz für die Therapie der Atherosklerose gerade in den frühen Stadien der Erkrankung dar. Zusätzlich könnte die lokale Applikation von endothelialen Progenitorzellen im Bereich atherosklerotisch veränderter Koronararterien nach durchgeführter perkutaner transluminaler Koronar-Angioplastie (PTCA) eine Therapieoption zur Prävention einer Restenosierung des Gefäßes darstellen, da die Angioplastie eine der Atherogenese ähnliche Kaskade auslöst (61). Die Effizienz von mit endothelialen Progenitorzellen-bindenden Antikörper-beschichteten Stents wird derzeit untersucht (21; 65). In diesem Zusammenhang ist bereits bekannt, dass bei Patienten nach durchgeführter perkutaner transluminaler Koronarangioplastie ein erhöhter Spiegel frei zirkulierender endothelialer Progenitorzellen mit einer erniedrigten Restenosierungsrate und einem besseren Outcome korreliert (58; 93).

Das Wissen, dass Stamm- und Progenitorzellen verschiedenen Ursprungs in der Lage sind, Endothelzellschädigungen zu regenerieren, lässt weiter in Richtung Entwicklung einer Stammzell-basierenden Therapie denken. Dazu wird eine weitere Fokussierung auf die beteiligten Oberflächenmarker und Einwanderungssignale notwendig sein, um die relevanten Marker und Zytokine zu definieren, die ein Anheften im Zielgewebe ermöglichen. Weiterhin muss neben der Steuerung der Einwanderung der Progenitorzellen auch untersucht werden, in welcher Weise die Differenzierung der im Zielgewebe adhärenen Zellen zu funktionsfähigen Zellen des gewünschten Phänotyps beeinflusst werden kann.

Diese Arbeit zeigt die potentielle Tragweite der Stammzellbiologie und der stammzellbasierenden Therapie. Statine werden hierbei möglicherweise weiter eine tragende Rolle spielen.

## **6. Zusammenfassung**

Die Atherosklerose stellt eine der Haupttodesursachen in den Industrienationen dar. Das früheste Stadium der Atherosklerose ist die endotheliale Dysfunktion, die u.a. durch eine Endothelschädigung charakterisiert ist. Bisher gibt es noch keine etablierte kausale Therapie für die Atherosklerose. Daher gilt es neue Konzepte für eine kausale Therapie zu finden. Ein möglicher Therapieansatz besteht in der Förderung von Reparaturvorgängen der geschädigten Endothelzellschicht zur Prävention der Atherosklerose.

Ziel dieser Arbeit war, zu zeigen, dass ein Teil der statinvermittelten Vaskuloprotektion über endotheliale Progenitorzellen erreicht wird. Dazu wurde die Mobilisation, Proliferation und das Einwanderungspotential („Homing“) von endothelialen Progenitorzellen nach Statinbehandlung unter besonderer Berücksichtigung der Milz untersucht.

Wir konnten zeigen, dass Rosuvastatin in der Lage ist, knochenmarkständige, adulte endotheliale Progenitorzellen (EPCs) ins periphere Blut zu mobilisieren. In einem Retransfusionsmodell konnten wir zeigen, dass die intravenöse Transfusion von fluoreszenzmarkierten endothelialen Progenitorzellen zu einer Reduktion der Neointimaformation nach stattgehabter Endothelzeldenudation führt. Dabei zeigte die Transfusion frisch isolierter milzstämmiger mononukleärer Zellen einen grösseren Effekt als die Transfusion von zuvor kultivierten EPCs. Neben einer deutlichen Reduktion der Neointima konnten auch gezielt in die Gefäßläsion eingewanderte endotheliale Progenitorzellen nachgewiesen werden.

In weiteren Untersuchungen wurde die Rolle der Milz beim Einwanderungsprozess der endothelialen Progenitorzellen in ihre Zielorgane bestimmt. Dabei zeigte sich im Tiermodell, dass eine effiziente Einwanderung der endothelialen Progenitorzellen in die Region des geschädigten Endothels nur bei zuvor splenektomierten Tieren erfolgte. Daraus lässt sich folgern, dass die Milz als natürlicher Filter oder primäres Zielorgan für die ausgeschwemmten Stammzellen fungiert.

Die Ergebnisse dieser und anderer publizierter Arbeiten zeigen die Bedeutung von endothelialen Progenitorzellen auf und stellen eine Grundlage für weitere Untersuchungen dar, die helfen sollen, die Rolle der endothelialen Progenitorzellen bei Reparaturvorgängen geschädigten Endothels und den möglichen therapeutischen Einsatz von Statinen zur Steuerung der EPC-Mobilisierung zu verstehen.

## **7. Literatur**

- (1) [No authors listed] Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-1389.
- (2) [No authors listed] Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *New England Journal of Medicine* 1998; 339: 1349-1357.
- (3) Aarons CB, Cohen PA, Gower A, Reed KL, Leeman SE, Stucchi AF, Becker JM. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) decrease postoperative adhesions by increasing peritoneal fibrinolytic activity. *Annals of Surgery* 2007; 245: 176-184.
- (4) Aidinian G, Weiswasser JM, Arora S, Abularrage CJ, Singh N, Sidawy AN. Carotid plaque morphologic characteristics. *Perspectives in Vascular Surgery and Endovascular Therapy* 2006; 18: 63-70.
- (5) Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001; 103: 276-283.
- (6) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Research* 1999; 85: 221-228.
- (7) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967
- (8) Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbrich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-3017.
- (9) Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005; 366: 1267-1278.
- (10) Bauters C, Isner JM. The biology of restenosis. *Progress in Cardiovascular Diseases* 1997; 40: 107-116.



- (11) Bellosta S, Bernini F, Ferri N, Quarato P, Canavesi M, Arnaboldi L, Fumagalli R, Paoletti R, Corsini A. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 1998; 137 Suppl: S101-S109.
- (12) Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1998; 18: 1671-1678.
- (13) Black DM. Statins and fibrinogen. *Lancet* 1998; 351: 1430-1432.
- (14) Blake GJ, Ridker PM. Tumour necrosis factor-alpha, inflammatory biomarkers, and atherogenesis. *European Heart Journal* 2002; 23: 345-347.
- (15) Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001; 105: 829-841.
- (16) Botham KM, Moore EH, De Pascale C, Bejta F. The induction of macrophage foam cell formation by chylomicron remnants. *Biochemical Society Transactions* 2007; 35: 454-458.
- (17) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-1779.
- (18) Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Ortega L, Perez F, Diaz C, Hernandez G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* 1998; 32: 2057-2064.
- (19) Carmeliet P, Moons L, Stassen JM, De Mol M, Bouche A, van den Oord JJ, Kockx M, Collen D. Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *American Journal of Pathology* 1997; 150: 761-776.
- (20) Cho HJ, Kim HS, Lee MM, Kim DH, Yang HJ, Hur J, Hwang KK, Oh S, Choi YH, Chae IH, Oh BH, Choi YS, Walsh K, Park YB. Mobilized endothelial progenitor cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor accelerate reendothelialization and reduce vascular inflammation after intravascular radiation. *Circulation* 2003; 108: 2918-2925.
- (21) Co M, Tay E, Lee CH, Poh KK, Low A, Lim J, Lim IH, Lim YT, Tan HC. Use of endothelial progenitor cell capture stent (Genous Bio-Engineered R Stent) during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: intermediate- to long-term clinical follow-up. *American Heart Journal* 2008; 155: 128-132.
- (22) Corsini A, Bernini F, Quarato P, Donetti E, Bellosta S, Fumagalli R, Paoletti R, Soma VM. Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology* 1996; 87: 458-468.

- (23) Corsini A, Pazzucconi F, Arnaboldi L, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, Sirtori CR. Direct effects of statins on the vascular wall. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1998; 31: 773-778.
- (24) Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope CF. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circulation Research* 2000; 87: 728-730.
- (25) Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 2004; 109: III39-III43.
- (26) Davignon J. Cardioprotective and other emerging effects of statins. *International Journal of Clinical Practice* 2004; 143: 49-57.
- (27) Davignon J. The cardioprotective effects of statins. *Current Atherosclerosis Report* 2004; 6: 27-35.
- (28) Davignon J, Jacob RF, Mason RP. The antioxidant effects of statins. *Coronary Artery Disease* 2004; 15: 251-258.
- (29) Davignon J, Laaksonen R. Low-density lipoprotein-independent effects of statins. *Current Opinion in Lipidology* 1999; 10: 543-559.
- (30) Davignon J, Leiter LA. Ongoing clinical trials of the pleiotropic effects of statins. *Vascular Health and Risk Management* 2005; 1: 29-40.
- (31) Davignon J, Mabile L. [Mechanisms of action of statins and their pleiotropic effects]. *Annales d'Endocrinologie (Paris)* 2001; 62: 101-112.
- (32) De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *The Journal of Clinical Investigation* 1995; 96: 60-68.
- (33) Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; 108: 391-397.
- (34) Endres M, Laufs U. [HMG-CoA reductase inhibitor and risk of stroke]. *Nervenarzt* 1998; 69: 717-721.
- (35) Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998; 95: 8880-8885.
- (36) Erl W. Statin-induced vascular smooth muscle cell apoptosis: a possible role in the prevention of restenosis? *Current Drug Targets - Cardiovascular and Haematological Disorders* 2005; 5: 135-144.

- (37) Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan ZQ, Hansson GK, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2003; 169: 251-258.
- (38) Farnier M, Davignon J. Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. *American Journal of Cardiology* 1998; 82: 3J-10J.
- (39) Giannotti G, Landmesser U. Endothelial Dysfunction as an Early Sign of Atherosclerosis. *Herz* 2007; 32: 568-572.
- (40) Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circulation Research* 2001; 88: 167-174.
- (41) Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circulation Research* 1998; 83: 490-500.
- (42) Haiat R, Bugugnani MJ. [Evaluation of the cardiovascular risk associated with atherosclerosis: HDL-cholesterol or apoproteins?]. *Nouvelle Presse Medicale* 1982; 11: 1487-1489.
- (43) Haslinger B, Goedde MF, Toet KH, Kooistra T. Simvastatin increases fibrinolytic activity in human peritoneal mesothelial cells independent of cholesterol lowering. *Kidney International* 2002; 62: 1611-1619.
- (44) Haslinger B, Kleemann R, Toet KH, Kooistra T. Simvastatin suppresses tissue factor expression and increases fibrinolytic activity in tumor necrosis factor-alpha-activated human peritoneal mesothelial cells. *Kidney International* 2003; 63: 2065-2074.
- (45) Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102: 1340-1346.
- (46) Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004; 109: 1615-1622.
- (47) Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine* 2003; 348: 593-600
- (48) Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2008; 28: 1584-1595.

- (49) Huang WJ, Xiao FY, Zhang HQ, Lin YN, Cai XL, Zhou H, Lin J, Yang DY. [Effects of endothelial progenitor cells and endothelial outgrowth cells in repair of injured carotid vessel: a comparative study with rabbits]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87: 3143-3147.
- (50) Ikenaga S, Hamano K, Nishida M, Kobayashi T, Li TS, Kobayashi S, Matsuzaki M, Zempo N, Esato K. Autologous bone marrow implantation induced angiogenesis and improved deteriorated exercise capacity in a rat ischemic hindlimb model. *Journal of Surgical Research* 2001; 96: 277-283.
- (51) John S, Schlaich M, Langenfeld M, Weihprecht H, Schmitz G, Weidinger G, Schmieder RE. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation* 1998; 98: 211-216.
- (52) Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000; 97: 3422-3427.
- (53) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo-Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-756.
- (54) Kannel WB. Overview of atherosclerosis. *Clinical Therapeutics* 1998; 20 Suppl B: B2-17.
- (55) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-637.
- (56) Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 107: 461-468.
- (57) Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1997; 17: 1859-1867.
- (58) Lei LC, Huo Y, Li JP, Li XX, Han YY, Wang HZ, Zhu Y. [Activities of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007; 87: 3394-3398.
- (59) Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001; 104: 365-372.
- (60) Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.

- (61) Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation* 1992; 86: III47-III52.
- (62) Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *The Journal of Clinical Investigation* 2001; 108: 399-405.
- (63) Martin MJ, Hulley SB, Browner WS, Kuller LH, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361,662 men. *Lancet* 1986; 2: 933-936.
- (64) Mathes P, Thiery J. [The role of lipid metabolism in the prevention of coronary heart disease]. *Zeitschrift für Kardiologie* 2005; 94 : III/43-III/55.
- (65) Miglionico M, Patti G, D'Ambrosio A, Di Sciascio G. Percutaneous coronary intervention utilizing a new endothelial progenitor cells antibody-coated stent: a prospective single-center registry in high-risk patients. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 2008; 71: 600-604.
- (66) Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* 1994; 94: 885-891.
- (67) Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN, Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2007; 27: 1159-1165.
- (68) Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 297: 1058-1061.
- (69) Newton RS, Krause BR. HDL therapy for the acute treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis Supplements* 2002; 3: 31-38.
- (70) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Annals of the New York Academy of Science* 2001; 938: 221-229.
- (71) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadel Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2001; 98: 10344-10349.
- (72) Papayannopoulou T, Craddock C. Homing and trafficking of hemopoietic progenitor cells. *Acta Haematologica* 1997; 97: 97-104.

- (73) Pietsch A, Erl W, Lorenz RL. Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells. *Biochemical Pharmacology* 1996; 52: 433-439.
- (74) Puddu GM, Cravero E, Arnone G, Muscari A, Puddu P. Molecular aspects of atherogenesis: new insights and unsolved questions. *Journal of Biomedical Science* 2005; 12: 839-853.
- (75) Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 2003; 108: 457-463.
- (76) Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107: 1164-1169.
- (77) Rombouts WJ, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 2003; 17: 160-170.
- (78) Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 1999; 340: 115-126.
- (79) Schmidt A, Goepfert C, Feitsma K, Buddecke E. Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF-alpha activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 2002; 164: 57-64.
- (80) Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 2005; 111: 2981-2987.
- (81) Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *New England Journal of Medicine* 1995; 333: 1301-1307.
- (82) Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776-2779.
- (83) Shiomi M, Ito T. Effect of cerivastatin sodium, a new inhibitor of HMG-CoA reductase, on plasma lipid levels, progression of atherosclerosis, and the lesional composition in the plaques of WHHL rabbits. *British Journal of Pharmacology* 1999; 126: 961-968.
- (84) Strandberg TE, Vanhanen H, Tikkanen MJ. Effect of statins on C-reactive protein in patients with coronary artery disease. *Lancet* 1999; 353: 118-119.

- (85) Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Boehm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003; 107: 3059-3065.
- (86) Szilvassy SJ, Meyerrose TE, Ragland PL, Grimes B. Homing and engraftment defects in ex vivo expanded murine hematopoietic cells are associated with downregulation of beta1 integrin. *Experimental Hematology* 2001; 29: 1494-1502.
- (87) Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106: 2781-2786.
- (88) Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA, Jr. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *The Proceedings of the National Acadademy of Sciences USA* 1996; 93: 10417-10422.
- (89) Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885-2890.
- (90) Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circulation Research* 2001; 89: E1-E7.
- (91) Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; 105: 3017-3024.
- (92) Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Boehm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circulation Research* 2003; 93: e17-e24.
- (93) Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Boehm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *New England Journal of Medicine* 2005; 353: 999-1007.
- (94) Werner N, Nickenig G. Endothelial progenitor cells in health and atherosclerotic disease. *Annals of Internal Medicine* 2007; 39: 82-90.
- (95) Werner N, Nickenig G, Laufs U. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Research in Cardiology* 2002; 97: 105-116.

- (96) Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Bohm M, Dirnagl, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2002; 22: 1567-1572.
- (97) Yamato M, Watanabe T, Higuchi K, Taira K, Tanigawa T, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Takeuchi K, Arakawa T. Anti-inflammatory effects of pravastatin on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mice. *Digestive Diseases and Sciences* 2007; 52: 2833-2839.
- (98) Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich F, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; 109: 1801-1809.
- (99) Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis* 2002; 88: 554-567.



## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei:

**Prof. Dr. med. Georg Nickenig** für die Bereitstellung des Themas und seine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten.

**Priv.-Doz. Dr. med. Nikos Werner** für die hervorragende und zielgerichtete Betreuung in jeder Hinsicht.

**Sybille Richter und Simone Jäger** für die tatkräftige und zuverlässige technische Unterstützung.

**Meiner Familie** für eine allzeitige und umfassende Unterstützung.

**Sarah** für einfach ALLES.