

Der Vascular Repair Index:  
Nicht-invasive Bestimmung des Schweregrades der koronaren Herzkrankheit

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

Sonja Mehnert geb. Kosiol  
aus Neunkirchen/(Saar)

2010

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr PD Dr. med. Nikos Werner
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. A. Welz

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.07.2010

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Von ganzem Herzen für René  
und  
meine Eltern Gregor und Klaudia Kosiol

Der Mensch hat drei Wege, klug zu handeln.  
Erstens durch Nachdenken: das ist der Edelste.  
Zweitens durch Nachahmung: das ist der Leichteste.  
Drittens durch Erfahrung: das ist der Bitterste.

(Konfuzius)



## **Inhaltsverzeichnis**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>1. Einleitung</b> .....  | <b>9</b>  |
| 1.1. Koronare Herzkrankheit und Atherosklerose.....                           | 9         |
| 1.1.1. Epidemiologie und Pathogenese .....                                    | 9         |
| 1.1.2. Risikofaktoren der Atherosklerose.....                                 | 10        |
| 1.2. Endotheliale Dysfunktion und Plaqueeinstellung.....                      | 11        |
| 1.3. Endotheliale Mikropartikel (EMP).....                                    | 14        |
| 1.3.1. Charakterisierung von Mikropartikeln.....                              | 14        |
| 1.4. Endotheliale Progenitorzellen (EPC).....                                 | 17        |
| 1.4.1. Die Rolle der endothelialen Progenitorzellen bei der Atherogenese..... | 18        |
| 1.5. Therapieoptionen der Atherosklerose.....                                 | 19        |
| 1.5.1. Primärprävention.....  | 19        |
| 1.5.2. Sekundärprävention.....  | 19        |
| 1.6. Fragestellung der Arbeit.....  | 21        |
| <b>2. Material und Methodik</b> .....   | <b>22</b> |
| 2.1. Material.....  | 22        |
| 2.1.1. Verwendete Substanzen.....   | 22        |
| 2.1.1.1. Antikörper/ Oberflächenmarker.....                                   | 22        |
| 2.1.1.2. Verwendete Geräte .....  | 23        |
| 2.1.1.3. Weitere Materialien .....  | 23        |
| 2.2. Methodik.....  | 23        |
| 2.2.1. Studiendesign.....   | 23        |
| 2.2.2. Probanden.....   | 23        |
| 2.2.3. Herzkatheteruntersuchung.....  | 24        |
| 2.2.4. Blutentnahme.....  | 25        |
| 2.3. Durchflußzytometrie.....   | 25        |
| 2.3.1. Allgemeines.....   | 25        |
| 2.4. Messung endothelialer Mikropartikel.....                                 | 27        |
| 2.4.1. Herstellung des Bindungspuffers EMP .....                              | 27        |
| 2.4.2. Herstellung des plättchenfreien Serums (PFS).....                      | 27        |
| 2.4.3. Herstellung des FACS-Ansatz (EMP).....                                 | 27        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.4.4.    | Analyse und Auswertung (EMP).....  | 28        |
| 2.5.      | Messung endothelialer Progenitorzellen.....  | 28        |
| 2.5.1.    | Isolation der mononukleären Zellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.....                          | 28        |
| 2.5.2.    | Colony forming unit (CFU)-Assays.....  | 29        |
| 2.5.3.    | Herstellung FACS-Ansatz (EPC).....   | 29        |
| 2.5.4.    | Auswertung und Analyse (EPC).....  | 31        |
| 2.6.      | Statistik.....   | 32        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse.....</b>   | <b>33</b> |
| 3.1.      | Patientencharakteristika.....  | 33        |
| 3.2.      | Analyse der Einzelkomponenten des Vascular repair Index mit kardiovaskulären Risikofaktoren.....               | 36        |
| 3.2.1.    | Kardiovaskuläre Risikofaktoren und CD34 <sup>pos</sup> /KDR <sup>pos</sup> -endotheliale Progenitorzellen..... | 36        |
| 3.2.2.    | Kardiovaskuläre Risikofaktoren und CD133 <sup>pos</sup> -Progenitorzellen.....                                 | 37        |
| 3.2.3.    | Kardiovaskuläre Risikofaktoren und CFU-EC.....   | 37        |
| 3.2.4.    | Kardiovaskuläre Risikofaktoren und endotheliale Mikropartikel.....   | 38        |
| 3.2.5.    | Vascular-Repair-Index und Schweregrad der KHK.....   | 39        |
| 3.2.6.    | Analyse der Einzelkomponenten des Vascular-Repair-Index mit dem Schweregrad der KHK.....                       | 40        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>  | <b>45</b> |
| <b>6.</b> | <b>Anhang.....</b>   | <b>47</b> |
| 7.        | Literaturverzeichnis.....  | 50        |
| 8.        | Danksagung.....  | 59        |

## Abkürzungsverzeichnis

|              |  |
|--------------|--|
| Abb.         | Abbildung  |
| ACE-Hemmer   | Angiotensin-converting-enzyme-Hemmer   |
| AK           | Antikörper   |
| ASS          | Acetylsalizylsäure   |
| BSA          | Bovines Serumalbumin   |
| CCS          | Canadian Cardiovascular Society  |
| CD           | Cluster of Differentiation   |
| CFU          | Colony forming Unit (Kolonie-bildende- Einheit)                                      |
| CFU-EC       | Circulating endothelial colony forming cells (zirkulierende Kolonie-bildende Zellen) |
| DNA          | Desoxyribonukleinsäure   |
| EBM          | Endothelial cell Basal Medium  |
| EC           | Endothelzelle  |
| EDTA         | Ethylendiamintetraacetat   |
| EF           | Ejektionsfraktion  |
| EMP          | Endothelial microparticle (Endotheliale Mikropartikel)                               |
| EPC          | Endothelial progenitor cells (Endotheliale Progenitorzellen)                         |
| EPCAD-Studie | Endothelial Cells in Patient with Coronary disease-Studie                            |
| FACS         | Fluorescence activated cell sorter   |
| FFC          | Forward light scatter (Vorwärtsstreulicht)   |
| FITC         | Fluoresceinisothiocyanat   |
| GM-CSF       | Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor                                |
| HEPES        | 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure                                |
| HDL          | High Density Lipoprotein   |
| HMG-CoA      | Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A  |
| Ig           | Immunglobulin  |
| IL           | Interleukin  |
| KDR          | Kinase-insert domain containing receptor   |
| KHK          | Koronare Herzkrankheit   |
| LDL          | Low Density Lipoprotein  |

|               |   |
|---------------|---|
| Min.          | Minute  |
| MNC           | Mononukleäre Zellen   |
| MP            | Mikropartikel   |
| NADPH         | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat                                       |
| NO            | Stickstoffmonoxid   |
| NYHA          | New York Heart Association  |
| pAVK          | Periphere arterielle Verschlusskrankheit                                      |
| ROS           | Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)                          |
| Sec.          | Sekunde   |
| SSC           | Sideward light scatter (Seitwärtsstreulicht)                                  |
| Tab.          | Tabelle   |
| TNF- $\alpha$ | Tumor-Nekrosefaktor-alpha   |
| VEGF          | Vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) |
| VRI           | Vascular repair-Index (vaskulärer Repair-Index)                               |
| VSMC          | Glatte Gefäßmuskelzelle   |

## **1. Einleitung**

### **1.1. Koronare Herzkrankheit und Atherosklerose**

#### **1.1.1. Epidemiologie und Pathogenese**

Herz-Kreislaufkrankungen gehören zu den häufigsten Ursachen für Tod und Behinderung in den USA, Europa und Japan (Ross, 1993). Der koronaren Herzkrankheit (KHK) liegt die Atherosklerose der Herzkranzgefäße zugrunde. Durch Stenosierung der Koronarien entsteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels. Schweregrad und Dauer der hierdurch hervorgerufenen Ischämie bestimmen die Manifestation in Form von stabiler oder instabiler Angina pectoris, ischämisch bedingter Herzinsuffizienz, stummer Myokardischämie, Herzrhythmusstörungen und akutem Myokardinfarkt.

Atherosklerose ist ein multifaktorielles Krankheitsbild und ist definiert als eine variable Kombination von Intimaveränderungen. Diese sind charakterisiert durch eine Dysfunktion des Endothels, Entzündung, Ansammlungen von Lipiden und Kalzium in der Intima der Gefäßwand (Ross, 1993). Während die Atherosklerose noch vor einigen Jahren als degenerative Alterserkrankung mit führender Verfettung der Gefäße und daraus resultierender Gefäßverkalkung verstanden wurde, liegt der Atherosklerose nach heutigem Kenntnisstand pathophysiologisch die „Response-to-injury“-Hypothese nach Ross zugrunde (Ross, 1993). Demnach handelt es sich bei der Entstehung der Atherosklerose um einen komplexen inflammatorischen Vorgang, der in mehreren Stadien verläuft und durch eine vielgestaltige Wechselwirkung zwischen Endothel, glatten Muskelzellen der Tunica media der Arterien, Blutplättchen, Monozyten bzw. Makrophagen, aktivierten T-Lymphozyten sowie Wachstumsfaktoren und Zytokinen charakterisiert ist. Man geht davon aus, daß Endothelverletzungen unterschiedlicher Art zu einer Funktionsänderung und –aktivierung des Endothels führen. Diese Verletzungen können mechanischer, metabolischer oder immunologischer Art oder durch Toxine oder Viren bedingt sein. Durch die Funktionsänderung und Apoptose des Endothels kommt es zu verstärkter Aufnahme von Lipoproteinen und zu vermehrter Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten am Endothel, die sich im subendothelialen Raum der Intima ablagern. Die veränderten Endothelzellen, anhaftende Leukozyten und auch die glatten Muskelzellen sezernieren Wachstumsfaktoren und chemotaktische Substanzen, die das Anhaften und Ansiedeln von weiteren Monozyten und deren Umwandlung in Makrophagen fördern (Stary et al., 1995). Die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen aus der mehrschichtigen Media in die Intima und die Bildung von

Schaumzellen in Intima und Media führt schlussendlich über einen längeren Zeitraum zur Bildung herdförmiger Plaques, welche für das mikroskopische Bild der Atherosklerose charakteristisch sind.

### **1.1.2. Risikofaktoren der Atherosklerose**

Epidemiologische Langzeitstudien (Framingham-Studie, Interheart-Studie) haben in den letzten Jahrzehnten einige Risikofaktoren identifiziert, die die Entstehung der Atherosklerose beschleunigen (Castelli et al., 1986; Kannel et al., 1961; Wilson et al., 1987). Dazu gehören die Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, höheres Lebensalter, körperliche Inaktivität und abdominell betonte Adipositas, psychosozialer Streß, genetische Disposition (Hyperhomozysteinämie, Hyperfibrinogenämie) und Gerinnungsstörungen (erhöhte prothrombotische Aktivität, verminderte Fibrinolyse, hoher Fibrinogenspiegel). Die Inzidenz der koronaren Herzerkrankung steigt mit der Anzahl der Risikofaktoren für beide Geschlechter. Das Vorhandensein mehrerer der bereits genannten Risikofaktoren erhöht hierbei exponentiell das Risiko für die Entwicklung der KHK (Cremer et al., 1997).

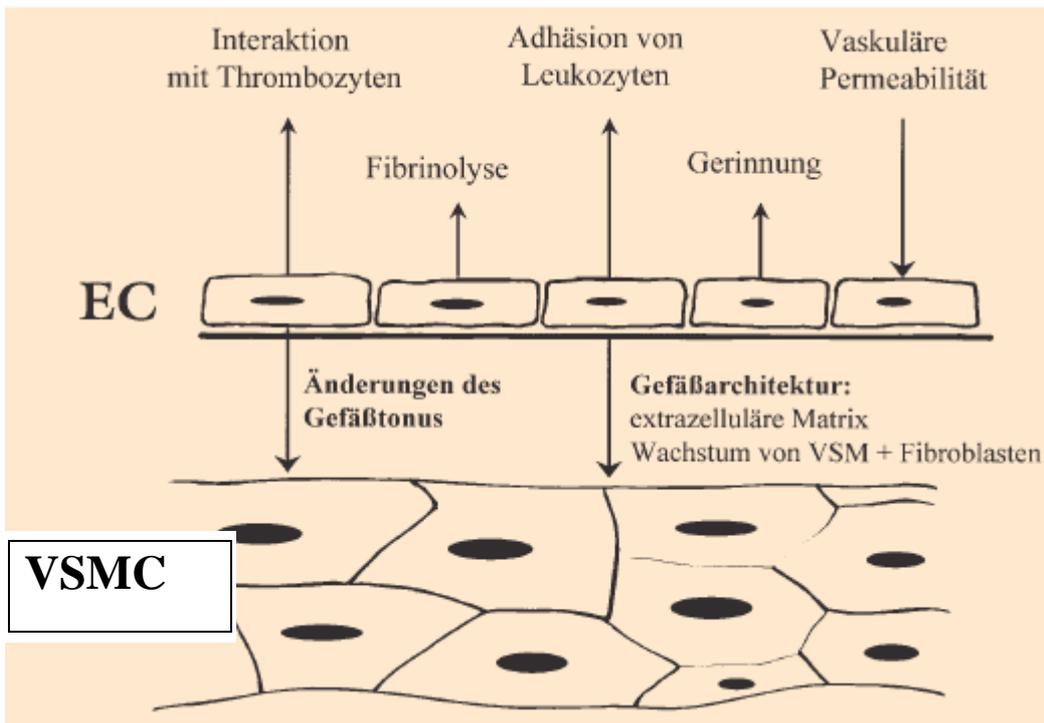
Im August 2004 wurde die „Interheart“-Studie veröffentlicht, welche in 52 Ländern angelegt wurde und die wichtigsten Risikofaktoren für Herzinfarkte quantifizierte und gleichzeitig den Einfluß regionaler Unterschiede oder einzelner ethnischer Gruppen erfasste. In diese Fall-Kontroll-Studie wurden ca. 15.000 Fälle und 15.000 Kontrollen eingeschlossen und die Zusammenhänge von Herzinfarkten und anderen Risikofaktoren untersucht und Risikowerte kalkuliert. Der Nikotinabusus stellt einen Hauptrisikofaktor dar. Des Weiteren folgen erhöhte Blutfette, Streß, Diabetes mellitus, positive Familienanamnese in Bezug auf arterielle Hypertonie und abdominell betonte Adipositas. Die „Interheart“-Studie belegt, daß die genannten Risikofaktoren zu 90% dafür verantwortlich sind, einen akuten Herzinfarkt zu erleiden (Yusuf et al., 2004). Das gemeinsame Auftreten von definierten Risikofaktoren wurde auch als metabolisches Syndrom beschrieben. Dieses häufige Risikofaktor-Cluster besteht aus: Hypertonie, Adipositas, Lipidstoffwechselstörung, Diabetes mellitus Typ 2 und Hyperurikämie. Die frühzeitige Risikoerfassung ist von besonderer Bedeutung, da das Zusammentreffen mehrerer Risikofaktoren das Atheroskleroserisiko potenziert. So erhöhen zwei Risikofaktoren das

Risiko um den Faktor vier, drei Faktoren um den Faktor zehn im Vergleich zur gesunden Referenzgruppe.

### **1. 2. Endotheliale Dysfunktion und Plaqueentstehung**

Die Dysfunktion der Endothelzellen in Verbindung mit einer vermehrten Apoptose von Endothelzellen führt zur Entstehung der sogenannten endothelialen Dysfunktion und ist der initial wichtigste Schritt in der Entwicklung der Atherosklerose sowie Ausgangspunkt atherosklerotischer Plaques. Aus diesem Grund soll im folgenden Abschnitt etwas näher auf die endotheliale Dysfunktion eingegangen werden, da der Schädigung der Endothelfunktion bereits eine prognostische Bedeutung zukommt. So besteht bei Patienten mit schwerer endothelialer Dysfunktion eine erhöhte kardiovaskuläre Ereignisrate und eine erhöhte Letalität (Schächinger et al., 2000; Suwaidi et al., 2000).

Das Endothel ist durch seine strategisch wichtige Lage zwischen zellulären Blutbestandteilen und der glatten Gefäßmuskelschicht für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion von wichtiger Bedeutung. Es moduliert den Gefäßtonus, die antithrombotischen und antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand, die Architektur der Gefäßwand und die Gefäßpermeabilität, siehe Abb. 1.



**Abb. 1:** Regulatorische Aufgaben des Endothels, die für die Aufrechterhaltung der Funktion und Architektur der Gefäßwand wesentlich sind (EC=Endothelzelle, VSMC=glatte Gefäßmuskelzelle); nach Kelm et al., 1999

Das Endothel setzt zahlreiche vasoaktive Faktoren frei, wie z.B. Angiotensin I, Serotonin, Bradykinin und Noradrenalin. Diese führen zu einer endothelvermittelten Vasodilatation oder Konstriktion. Störungen dieser Endothelfunktionen, die als frühe Phase noch vor der Entstehung der atherosklerotischen Läsionen vorzufinden sind, werden unter dem Begriff der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst.

Stickstoffmonoxid (NO) wird im funktionell intakten Gefäßendothel durch die endotheliale, konstitutiv exprimierte Isoform des Enzyms NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert. NO ist der bekannteste Vasodilatator und steht aktiv einer Vielzahl vasokonstriktorischer Einflüsse im gesunden Gefäßsystem entgegen und erhält einen vasodilatierenden Tonus aufrecht.

Eine Vielzahl von kardiovaskulären Risikofaktoren führen zur Verminderung der biologischen Aktivität von NO, z.B. Hypercholesterinämie, Nikotinkonsum und Hypertonie (Cooke et al., 1997). In experimentellen Untersuchungen wurde eine Reduktion der endothelabhängigen Vasodilatation in atherosklerotischen Koronararterien gefunden (Förstermann et al., 1988). Entsprechende Befunde konnten auch in koronarangiographischen Studien bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung gezeigt werden (Yeung et al., 1991). Die endotheliale Dysfunktion ist

auch in Stromgebieten vorhanden, die nicht direkt von atherosklerotischen Plaques betroffen sind, wie den Widerstandsgefäßen des Arms (Creager et al., 1990). Diese Tatsache weist auf einen systemischen Endotheldefekt als eine Ursache der Atherosklerose hin. Als wichtiger physiologischer Stimulus der NO-vermittelten Vasodilatation ist der Blutfluss zu nennen. Steigerungen der Flußgeschwindigkeit führen über eine Aktivierung eines „shear stress-responsive element“ zur Steigerung der NO-Synthese (Tsao et al., 1996).

Neben seiner vasodilatierenden Wirkung übt NO eine Reihe weiterer Effekte aus, die zum physiologischen Gleichgewicht der Gefäßwand beitragen, siehe Abbildung 2.

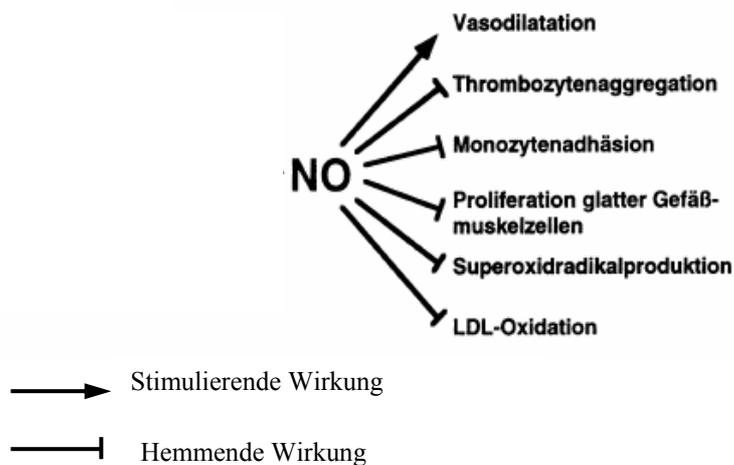


Abb. 2: Effekte von NO auf die Endothelzellschicht

Im Normalfall besteht ein Gleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)-produzierenden und ROS-abbauenden Enzymen in der Gefäßwand. Der Anteil des biologisch aktiven NO wird beeinflusst durch das Verhältnis zwischen der Aktivität antioxidativer und oxidativer Enzymsysteme, wie z.B. die NAD(P)H-Oxidase. Überwiegen ROS, so führt dies zu einem Ungleichgewicht und zu einer Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit. Diesem multifaktoriellen Geschehen wird als gemeinsamer Pathomechanismus die vermehrte Produktion freier Sauerstoffradikale, der sogenannte oxidative Stress, in der Gefäßwand angesehen. Eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO und eine Zunahme von ROS spielen dementsprechend eine wichtige Rolle in der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion und der manifesten Atherosklerose. Die Annahme, daß Änderungen der vaskulären NO-Wirkungen eine zentrale Rolle im atherosklerotischen Prozeß spielen, führten zu der Hypothese, daß die Wiederherstellung der normalen NO-Wirkung die Atherogenese verlangsamen könnte.

Auf zellulärer Ebene ist die endotheliale Dysfunktion gekennzeichnet durch Endothelzell-Aktivierung und Apoptose. Zeiher et al. sieht in der Apoptose speziell von Endothelzellen nicht nur eine Erklärung für die vieldiskutierte Response-to-injury-Hypothese, sondern auch einen möglicherweise zentralen Baustein in der frühen Atherogenese (Zeiher et al., 1993). Die Apoptose unterliegt einer streng kontrollierten und äußerst komplexen Signaltransduktion. Im Zentrum der Apoptoseexekution steht die sog. Caspase-Kaskade. Bei diesen Caspasen handelt es sich um cysteinhaltige Proteasen, die in einer Kaskade aktiviert werden und schließlich über die Aktivierung der DNAsen zur Degradation der chromosomalen DNA und somit zur Apoptose führen. Die spezifische DNA-Fragmentation ist eine der bezeichnendsten biochemischen Eigenschaften der Apoptose. Ausgelöst wird die Caspase-Kaskade und damit die Apoptose in Endothelzellen u.a. durch oxidativ modifiziertes LDL (ox-LDL), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Angiotensin II und TNF $\alpha$  (Zeiher et al., 1993). Eine Folge der Endothelzellaktivierung und -apoptose ist die Freisetzung von sogenannten Mikropartikeln in das periphere Blut. Die Messung zirkulierender Mikropartikel kann demnach möglicherweise Aufschluß über das Ausmaß der in vivo Endothelzellschädigung geben.

### **1.3. Endotheliale Mikropartikel (EMP)**

#### **1.3.1. Charakterisierung von Mikropartikeln**

Mikropartikel sind zwischen 0,05-1 $\mu$ m große Abschnürungen von Zellmembranen, die sowohl Membranbestandteile als auch zytoplasmatische Elemente ihrer Ursprungszelle tragen. Die Freisetzung von Membranvesikeln erfolgt in der Regel nach Aktivierung und Apoptose der Ursprungszelle (Barry et al., 1997; Mallat et al., 1999).

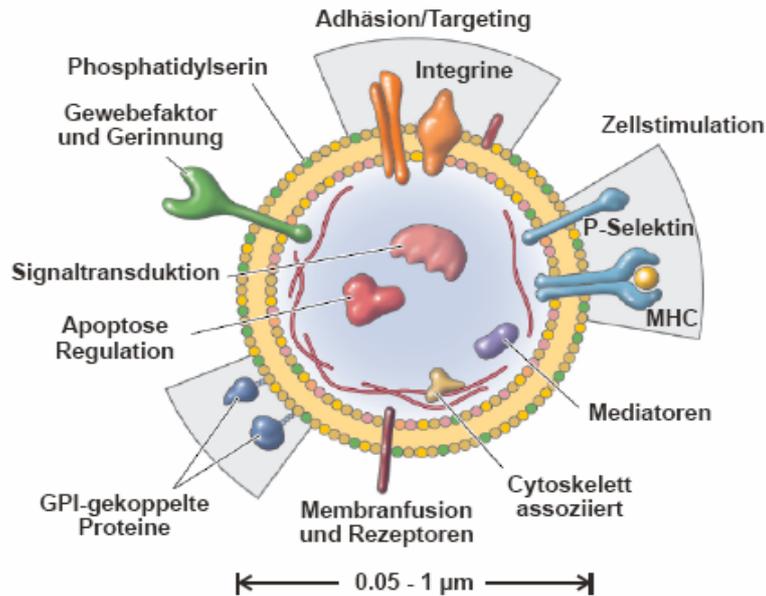


Abb. 3: Mikropartikel (modifiziert nach Hugel et al., 2005)

Die Zellmembranen eukaryontischer Zellen sind asymmetrische, flüssig-kristalline, dynamische Strukturen, die vorwiegend aus Lipiden und Proteinen bestehen. Die Plasmamembran von unstimulierten Zellen besteht aus einer Doppelschicht, in der die Phospholipide asymmetrisch verteilt sind. Neutrale ungeladene Phospholipide, wie Phosphatidylcholin sind primär in der äußeren Membranschicht (exoplasmatisch) lokalisiert, während die negativ geladenen Phosphatidylserine in der inneren Membranschicht (zytoplasmatisch) zu finden sind (Hugel et al., 2005).

Während einer Zellaktivierung und auch in der Apoptose löst sich die asymmetrische Verteilung der Plasmamembran und es kommt zur Translokation von Phosphatidylserinen von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Membran mit Freisetzung von Mikropartikeln.

Dieser Nachweis von frühen Schädigungen der Integrität der Zellmembran lässt sich durch das Phosphatidylserin-bindende Protein Annexin V nachweisen (Koopman et al., 1994; Verhoven et al., 1995; Vermes et al., 1995). Durch ein an Annexin V gekoppeltes Fluorchrom können Phosphatidylserine auf der Zellmembran von Mikropartikeln durchflußzytometrisch im peripheren Blut nachgewiesen werden.

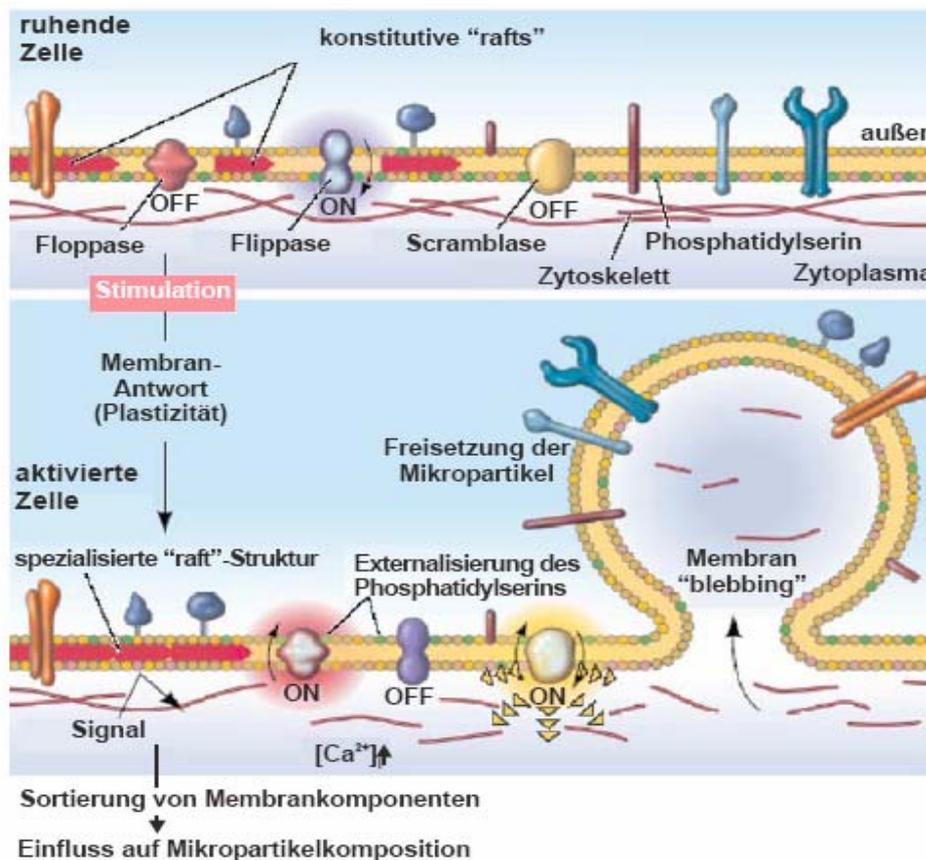


Abb. 4: Einfluß von Stimulation auf die Struktur der Plasmamembran und die Bildung von Mikropartikeln (modifiziert nach Hugel et al., 2005)

Im Blut zirkulierende Mikropartikel werden von Thrombozyten, Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen abgeschnürt (George et al., 1982). Signifikante Unterschiede von Mikropartikel-Fractionen im Blutkreislauf wurden zwischen gesunden Individuen (Berckmans et al., 2001; George et al., 1986) und Patienten mit Diabetes mellitus, Sepsis, atherosklerotischen vaskulären Erkrankungen, arteriellem Blutdruck oder Nierenversagen gefunden (Diamant et al., 2002; Mallat et al., 2000; Nieuwland et al., 2000; Sabatier et al., 2002).

Die Verteilung von Oberflächenmolekülen auf Mikropartikeln variiert entsprechend der Ursprungszellen. Dementsprechend finden sich auf den Mikropartikeln, die von Endothelzellen entstammen, u.a. die Oberflächenantigene CD31, CD34, CD51 (Vitronectin), CD62E und CD146 (Abid Hussein et al., 2003; Berckmans et al., 2001; Joop et al., 2001).

Eine erhöhte Anzahl von endothelialen Mikropartikeln lässt sich im peripheren Blut von Patienten mit Endothelschäden nachweisen, wie sie z.B. bei der KHK vorliegt (Jiminez et al., 2003). Auch bei anderen Erkrankungen, die mit endothelialen Schäden einhergehen, konnte eine signifikante Erhöhung der EMP nachgewiesen werden, so bei Myokardinfarkt (Boulanger et al., 2001), akutem Koronarsyndrom (Bernal-Mizrachi et al., 2003), arterieller Hypertonie (Preston et al., 2003) und Diabetes mellitus (Sabatier et al., 2002).

#### **1.4. Endotheliale Progenitorzellen (EPC)**

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) sind aus dem Knochenmark stammende, im Blut zirkulierende CD34<sup>pos</sup>- mononukleäre Zellen, die den frühen hämatopoetischen Stammzellmarker VEGF-R2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 oder KDR) tragen und mittels FACS-Analyse identifiziert werden können (Asahara et al., 1997; Gehling et al., 2000). Asahara gelang es 1997 mit Hilfe oben genannter Oberflächenmarker, einen Zelltyp aus menschlichem Erwachsenenblut zu isolieren, der morphologische Eigenschaften einer Stammzelle aufweist und in der Zellkultur in der Lage ist, Zellen mit endothelialen Eigenschaften auszubilden (Asahara et al., 1997). Diese Ergebnisse zeigten, daß auch im Blut erwachsener Menschen (adulte) endotheliale Vorläuferzellen zirkulieren, die in der Lage sind, zu Orten der Gefäßneubildung zu migrieren und dort weiter in Endorganzellen (hier: Endothelzellen) auszudifferenzieren. In weiteren experimentellen Untersuchungen konnte beobachtet werden, daß die systemische oder lokale Applikation von Stamm- und Progenitorzellen im Tiermodell und im Patienten zu einer Regeneration ischämischen Myokards führte (Hemetsberger et al., 2008; Schächinger et al., 2004 und 2006; Strauer et al., 2001 und 2002; Strehlow et al., 2003; Werner et al., 2002;). Die Definition endothelialer Progenitoren ist bislang uneinheitlich. Eine unreifere Subpopulation trägt den Oberflächenmarker CD133 (Gill et al., 2001; Handgretinger et al., 2003) während „klassische“ EPC über die Oberflächenmarker CD34 und VEGFR2 definiert werden und sich hierdurch von abgeschilferten zirkulierenden Endothelzellen unterscheiden. Darüberhinaus können EPC durch ihre Fähigkeit in Kultur koloniebildende Einheiten mit Differenzierungspotential auszubilden, definiert werden (early and late outgrowth-colony forming units endothelial cells).

#### 1.4.1. Die Rolle der endothelialen Progenitorzellen bei der Atherogenese

Für die Vermeidung der Atherosklerose ist ein intaktes Gefäßendothel von großer Bedeutung. In zahlreichen experimentellen und klinischen Studien konnte gezeigt werden, daß EPC an der Regeneration der Endothelzellschicht nach Gefäßwandschädigungen beteiligt zu sein scheinen und somit ein hohes angiogenetisches Reparaturpotential besitzen.

So führt die systemische Transfusion von EPC nach experimentell-induzierter Endothelzellschädigung in der Maus zu einer beschleunigten Reendothelialisierung im Vergleich zu Kontrollmäusen (Werner et al., 2004). Rauscher et al. konnten experimentell zeigen, daß ältere Mäuse weniger endotheliale Knochenmarksstammzellen in spontane aortale Endotheldefekte inkorporieren als jüngere Tiere und so größere atherosklerotische Plaques ausbilden. Diese Erkenntnisse unterstützen das Konzept der kontinuierlichen Erneuerung von Gefäßstrukturen durch zirkulierende EPC (Werner et al., 2004), aber auch der Erschöpfung des EPC-Pools im höheren Alter als mögliche Ursache progredienter atherosklerotischer Läsionen (Rauscher et al., 2003). Diese Erkenntnisse sind Grundlage zur Entwicklung neuer zellulärer Therapieansätze und verdeutlichen, dass ein Verlust funktionstüchtiger regenerativer Zellen mit der Entstehung und Progression einer atherosklerotischen Läsion einhergehen könnte.

Interessanterweise beeinflussen klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren die Anzahl und Funktion der zirkulierenden EPCs im peripheren Blut im Sinne einer Herabregulation, während vaskuloprotektiv wirkende Substanzen und Maßnahmen wie körperliche Aktivität, Östrogene und Statine die Zahl und Funktion zirkulierender Progenitoren heraufreguliert (Dimmeler et al., 2001; Laufs et al., 2004; Llvadot et al., 2001; Strehlow et al., 2003; Vasa et al., 2001). So weisen Diabetiker nicht nur niedrigere Spiegel endothelialer Progenitorzellen auf, auch die Funktion der Vorläuferzellen ist gestört (Tepper et al., 2002). In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, daß körperliche Aktivität die Zahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen erhöht (Laufs et al., 2005; Sandrl et al., 2005). Weiterhin scheinen Wachstumsfaktoren sowie eine Therapie mit Statinen die Anzahl an zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen positiv zu beeinflussen (Werner et al., 2004). Zirkulierende CD34/VEGFR2<sup>pos</sup>-Zellen sind ein wichtiger unabhängiger zellulärer Risikomarker für Morbidität und Mortalität. In der *Endothelial Progenitor Cells in Patients with Coronary Artery Disease* (EPCAD)-Studie konnte gezeigt werden, daß das Risiko für das Eintreten eines kardiovaskulären Ereignisses (Myokardinfarkt, Angina pectoris und damit verbundene Hospitalisierung, neuerliche PTCA oder Tod durch kardiovaskuläre Komplikationen)

mit der Anzahl steigender EPC bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit schrittweise abnimmt und somit eine erniedrigte Anzahl von EPC im Blut einen Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse darstellt (Werner et al., 2005). Die Daten weisen darauf hin, daß adulte Stammzellen eine pathophysiologische Bedeutung im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung zukommt und sie möglicherweise ein innovatives und vielversprechendes Therapieprinzip zur Behandlung der Atherosklerose darstellt. Ob dies durch selektive medikamentöse Ansätze zur Stammzellmobilisation oder durch eine Zelltherapie umgesetzt werden kann, ist derzeit Fokus der Forschung.

## **1.5. Therapieoptionen der Atherosklerose**

### **1.5.1. Primärprävention**

Ein intaktes Gefäßendothel ist für die Vermeidung der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose von besonderer Bedeutung. In der Primärprävention der Atherosklerose steht die Modifikation der Risikofaktoren an erster Stelle. Die Ergebnisse der „Interheart“-Studie zeigen, daß Lebensstil-Veränderungen wie das Vermeiden des Rauchens, der erhöhte Konsum von Früchten und Gemüse und eine moderate körperliche Aktivität (in Verbindung mit einer Verringerung der Blutfette) Eckpunkte für die Prävention der koronaren Herzkrankheit bei allen Populationen weltweit darstellen und so das Risiko für einen akuten Myokardinfarkt bis zu 80% gesenkt werden kann (Yusuf et al., 2004). Trotz eindeutiger Datenlage und kausalen Therapieansätzen ist die Umsetzung von Lebensstil-Veränderungen bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren schwer zu vermitteln und umzusetzen.

### **1.5.2. Sekundärprävention**

Bislang existieren über die Primärprävention hinaus keine therapeutischen Ansätze, die die Entstehung der Atherosklerose verhindern können. Alle pharmakologischen Therapieansätze sind lediglich in der Lage, das Fortschreiten der Atherosklerose zeitlich zu verzögern und Komplikationen zu reduzieren. Hierzu gehören z.B. die Gabe eines Thrombozytenaggregationshemmers, Betarezeptoren-Blocker, Angiotensin II Rezeptor 1-Antagonisten, Statine und Kalziumantagonisten.

Eine kausale Therapie der Atherosklerose bestünde in der effektiven Regeneration der geschädigten Endothelzellschicht. Experimentelle Untersuchungen zeigen, daß aus dem Knochenmark stammende endotheliale Progenitorzellen an der Regeneration der geschädigten Endothelzellschicht beteiligt sind und möglicherweise zu einer Prävention atherosklerotischer Läsionen beitragen können. Bisläng ist es allerdings nicht möglich, Patienten mit beginnender Atherosklerose zu identifizieren. Risiko-Scores in der Primärprävention (PROCAM-Score, Framingham-Risk-Score und der europäische SCORE) erlauben zwar die Identifizierung von Risikopatienten ohne allerdings eine Abschätzung über das Ausmaß und den Schweregrad der Atherosklerose und koronaren Herzkrankheit zu erlauben.

Eine Möglichkeit zur Erfassung von Patienten mit Endothelzellschäden könnte die durchflußzytometrische Messung endothelialer Mikropartikel im peripheren Blut darstellen. Die gleichzeitige Erfassung des regenerativen Potentials des betreffenden Patienten, z.B. in Form von zirkulierenden EPC, könnte zu einer Abschätzung des Gleichgewichts zwischen Endothelzellschädigung und -Regeneration an der Gefäßwand beitragen.

### 1.6. Fragestellung der Arbeit

Die Prävention der endothelialen Dysfunktion, Atherosklerose und kardiovaskulären Ereignisse ist offensichtlich sowohl mit der Prävention des endothelialen Zelluntergangs als auch mit der effektiven Regeneration der Endothelzellschicht verknüpft.

Um die Interaktion zwischen Endothelzellschaden, beeinträchtigter Regeneration der Endothelzellschicht und atherosklerotischen Erkrankungen beim Menschen besser beschreiben zu können, wurde von uns der sogenannte „Vascular repair index“ (VRI) definiert, welcher die Anzahl und Funktion der endothelialen Progenitorzellen (EPC) und die Anzahl der CD 31<sup>pos</sup> / Annexin V<sup>pos</sup> – Mikropartikel (MP) umfasst:

$$\left( \frac{CD34^{pos} / KDR^{pos} \text{ Zellen} \times CFU - EC}{CD31^{pos} / AnnexinV^{pos} MP} \right)$$

Die Interaktion zwischen diesen Komponenten, repräsentiert durch den VRI, vereint die einzelnen Bestandteile von Schädigung und Regeneration der Gefäßwand und könnte somit eine Annäherung an die in vivo Situation der Gefäßendothelzellschicht darstellen.

Ziel dieser Doktorarbeit war in einer prospektiven, monozentrischen Studie zu untersuchen, ob die Interaktion zwischen Endothelzell-Apoptose und Endothelzell-Regeneration, ausgedrückt im VRI, den Schweregrad der koronaren Atherosklerose nicht- invasiv vorhersagen kann.

## **2. Material und Methodik**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Verwendete Substanzen**

- HEPES, Serva<sup>®</sup>, Deutschland
- NaCl, Roth<sup>®</sup>, Deutschland
- NaOH, Merck<sup>®</sup>, Deutschland
- CaCl<sub>2</sub>, Merk<sup>®</sup>, Deutschland
- Phosphate -buffered saline (PBS): 137mM Natriumchlorid, 2,7mM Kaliumchlorid, 8,1mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,5mM Kaliumhydrogenphosphat
- Paraformaldehyd- Lösung 2% (PFA)
- Goat- Serum 0,5%: Becton Dickinson<sup>®</sup>
- Human IgG- Lösung: Polyglobulin 10% BAYER<sup>®</sup>
- FACS-Puffer: 1x PBS, 0,1% bovines Serumalbumin (BSA), - 0,1% Natriumnitrit (NaN<sub>3</sub>), 20µg/ml Aprotinin
- Endothelial Cell Basal Medium (EBM) CellSystems<sup>®</sup> : 500ml Basislösung, 0,5ml Hydrocortison, 0,5ml Gentamicinsulfat, 0,5ml human endothelial growth factor (hEGF), 2,0ml bovine brain extract (BBE), 100ml fetal calf serum (FCS)

#### **2.1.1.1. Antikörper / Oberflächenmarker**

- anti CD31-PE: Immunotech<sup>®</sup>, Frankreich
- IgG<sub>1</sub> (FITC): Monoklonales Immunglobulin, zur Isotypenkontrolle, Becton Dickinson Biosciences<sup>®</sup>, Deutschland
- IgG<sub>1</sub> (PE): Monoklonales Immunglobulin, zur Isotypenkontrolle, Becton Dickinson Biosciences<sup>®</sup>, Deutschland
- Annexin V (FITC): Becton Dickinson Biosciences<sup>®</sup>, Deutschland
- Anti - CD 34 (PE): Becton Dickinson Biosciences<sup>®</sup>, Deutschland
- Anti - CD 117 (PE): Becton Dickinson Biosciences<sup>®</sup>, Deutschland
- Anti - CD 146 (PE): Becton Dickinson Biosciences<sup>®</sup>, Deutschland
- Anti - CD 146 (PE): Becton Dickinson Biosciences<sup>®</sup>, Deutschland
- Anti - CD 133/ 2(293C3)- (PE): Miltenyi Biotec<sup>®</sup>

- Anti - CD 133/ 2(293C3)- Allophycocyanin (APC): Miltenyi Biotec<sup>®</sup>
- Anti – vascular endothelial growth factor receptor2 (VEGF-R2): R&D Systems<sup>®</sup>
- Streptavidin: DAKO<sup>®</sup>

#### **2.1.1.2. Verwendete Geräte:**

- FACS-Calibur, Becton Dickinson Biosciences<sup>®</sup>, Deutschland
- Zentrifuge, Sigma/IK-15, B. Braun Biotech International GmbH<sup>®</sup>, Deutschland

#### **2.1.1.3. Weitere Materialien:**

- Na-Citrat-Röhrchen (S-Monovette), Sarstedt<sup>®</sup>, Deutschland
- FACS-Röhrchen, Becton Dickinson Falcon<sup>™</sup>, Deutschland
- Vortex
- Fibronektin beschichtete 24 – well – plates: SIGMA<sup>®</sup>
- Ficoll Dichtegradientenzentrifugationslösung: Biochrom<sup>®</sup>
- CellWash: Becton Dickinson<sup>®</sup>

## **2.2. Methodik**

### **2.2.1 Studiendesign**

Prospektive, monozentrische Studie zur Untersuchung, ob die Interaktion zwischen Endothelzell-Apoptose und Endothelzell-Regeneration, ausgedrückt im Vascular Repair Index, den Schweregrad der koronaren Atherosklerose nicht- invasiv vorhersagen kann.

### **2.2.2. Probanden**

In diese Studie wurden 75 Personen eingeschlossen. Alle Patienten erhielten eine Koronarangiographie bei pectanginösen Beschwerden oder nachgewiesener Ischämie im Rahmen eines nicht-invasiven Belastungstests. Patienten, welche eine maligne oder entzündliche Grunderkrankung hatten oder Patienten mit pectanginösen Beschwerden und Ausschluß einer

manifesten koronaren Herzerkrankung wurden nicht in dieser Studie erfasst. Sämtliche Blutproben wurden vor medikamentöser Gabe und vor der Koronarangiographie entnommen.

### **2.2.3. Herzkatheteruntersuchung**

Vor der Herzkatheteruntersuchung wurden die folgenden klinischen Daten im Patientengespräch vom ärztlichen Studienpersonal erhoben:

- Klassifikation der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association (NYHA)
- Klassifikation der Angina pectoris nach der Canadian Cardiovascular Society (CCS)

Im Rahmen der Herzkatheteruntersuchung wurden folgende Parameter erfasst:

- Anzahl der erkrankten Herzkranzgefäße (1, 2, 3-Gefässerkrankung, definiert als atherosklerotische Stenosen  $\geq 50\%$  in einer, zwei oder drei Gefäßprovinzen (Ramus interventrikularis anterior, Ramus circumflexus und rechte Koronararterie inkl. entsprechender Seitgefäße der genannten Gefäße)
- Eventuelle Koronarintervention während der Untersuchung
- Ejektionsfraktion (EF) in der Lävokardiographie
- Druckverhältnisse im linken Ventrikel
  - Linksventrikulärer systolischer Druck
  - Linksventrikulärer diastolischer Druck
  - Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
  - Systolischer und diastolischer Aortendruck
  - Endsystolisches Volumen (ESV)
  - Enddiastolisches Volumen (EDV)

Alle Daten, die während der Untersuchung erhoben wurden, unterlagen dem Datenschutz. Jene Personen, die an der Durchführung und an der Untersuchung beteiligt waren, unterlagen der ärztlichen Schweigepflicht. Eine Weitergabe der Patientendaten an andere Zentren zur Auswertung war nicht vorgesehen. Die Studie wurde von der Ethikkommission des Saarlandes begutachtet und genehmigt. Alle Teilnehmer wurden über die Studie aufgeklärt und gaben nach ausreichender Bedenkzeit ihr schriftliches Einverständnis. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig und die

Einwilligung konnte jederzeit ohne Angaben von Gründen rückgängig gemacht werden. In diesem Fall konnte der Studienteilnehmer auch das Löschen der erhobenen Daten verlangen.

Prüfstelle:

Medizinische Klinik und Poliklinik, Innere Medizin III, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg Saar

#### **2.2.4. Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung des Patienten zu Beginn der Herzkatheteruntersuchung über die liegende arterielle Schleuse, um eine Verfälschung der EPC – Zahlen durch spätere Koronarintervention zu verhindern und beschränkte sich auf 20ml Citratblut und je 10ml Lithium – Heparin - Blut, welches bis zur Weiterverarbeitung, die maximal 4 Stunden später stattfand, bei 4°C gelagert wurde.

Das Blut wurde zentrifugiert, aliquotiert und für spätere Untersuchungen bei minus 80°C eingefroren. Die FACS- Analysen wurden mit dem Citratblut durchgeführt.

### **2.3. Durchflußzytometrie**

#### **2.3.1. Allgemeines**

Bei der Durchflußzytometrie handelt es sich um eine Technik zur fluoreszenzabhängigen multiparametrischen Analyse von Zellen oder Zellfragmenten in Suspension. Diese werden durch einen Lichtstrahl (Laser) geführt und senden dabei in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels Detektoren nachgewiesen werden.

Die mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellsuspension wird aus dem Proberöhrchen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Meßküvette eingeführt. Durch die umgebende Trägerflüssigkeit (FACS-Flow, BD) werden die Zellen beschleunigt (bis zu 6 /sec), vereinzelt und dann zum Analysepunkt transportiert.

Die folgende Messung der Lichtstreuung wird durch die Richtungsänderung des anregenden Lichtes ermöglicht, verursacht durch Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile. Abhängig von verschiedenen physikalischen Zelleigenschaften wie

Querschnittsfläche, Membranstruktur, Refraktionsindex und intrazellulären Bestandteilen wird das Licht, das auf die Zelle trifft, unterschiedlich stark gestreut. Hierbei unterscheidet das Gerät zwischen:

1. Vorwärtsstreulicht (engl. forward light scatter, FSC) entlang der Richtung des einfallenden Lichtes korreliert mit dem Zellquerschnitt, welches ein Maß für die Größe der zu untersuchenden Zelle darstellt.

2. Seitwärtsstreulicht (engl. Sideward light scatter, SSC), welches sich in rechtwinkliger Abweichung ausbreitet und dem Refraktionsindex entspricht. Es demonstriert die intrazelluläre Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle.

Die zeitlich parallel ablaufende Messung der Fluoreszenz beruht auf der Absorption von Lichtenergie über einen für fluoreszierende Verbindung charakteristischen Wellenlängenbereich durch das Anheben von Elektronen auf ein höheres Energieniveau und der darauf folgenden Photonenemissionen durch das Zurückfallen auf das energetische Grundniveau. Das Problem der Autofluoreszenz der Zellsuspension wird mit Hilfe der Messung einer „negativen Kontrolle“ (mit Kontrollantikörpern versetzte Probe) kompensiert.

Die optischen Signale werden in elektrische Signale umgewandelt, die über entsprechende Software (CellQuestPro 4.0., BD Biosciences<sup>®</sup>, Heidelberg) graphisch dargestellt und ausgewertet werden. Für die Messung der Proben wurde eine geeignete Geräteeinstellung (Instrument Setting, siehe Anhang, Abb. 2) verwendet. Diese legt den Grad der Fluoreszenzverstärkung (Amplifikation), der Messschwelle (Treshold) und der Kompensationseinstellung fest. Dies ist notwendig, um die spektrale Überlagerung der Fluoreszenzfarbstoffe zu korrigieren. Hierbei wird der jeweils in das angrenzende Spektrum reichende Farbanteil von dem ursprünglichen Signal subtrahiert.

## 2.4. Messung endothelialer Mikropartikel

### 2.4.1. Herstellung des Bindungspuffers EMP

Zusammensetzung:

- 10mM HEPES/NaOH
- 140mM NaCl
- 2,5mM CaCl<sub>2</sub>

Nach Vermischen der Substanzen wurde der pH mittels Salzsäure (6,7%) auf 7,4 eingestellt und bei 3-8°C gelagert.

### 2.4.2. Herstellung des plättchenfreiem Serums (PFS)

Zunächst wurde 10ml peripheres Blut aus den Na-Citrat- Röhrchen entnommen und 15 min bei 1.500g zentrifugiert. Danach wurde das Plasma abgenommen und bei 13.000g 2 min zentrifugiert. Der Überstand (Plättchenfreies Plasma) wurde bei -80°C eingefroren.

### 2.4.3. Herstellung des FACS-Ansatz (EMP)

Endotheliales Mikropartikel (EMP)-Protokoll:

Pro Patient wurde die Gesamtzahl der zirkulierenden Mikropartikel (Annexin V<sup>pos</sup>) und der endothelialen Mikropartikel (CD31<sup>pos</sup>/Annexin V<sup>pos</sup>) bestimmt. Es erfolgten jeweils Kontrollmessungen mit anti-CD31 sowie den Isotypenkontrollen für die eingesetzten Fluorochrome.

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| Annexin V- positive Mikropartikel:    | 4µl Annexin V + 400µl Bindungspuffer + 50µl plättchenfreies Serum                  |
| CD31-positive Mikropartikel:          | 4µl Anti-CD31 + 400µl Bindungspuffer + 50µl plättchenfreies Serum                  |
| CD31/Annexin- positive Mikropartikel: | 4µl Annexin V + 4µl anti-CD31 + 400µl Bindungspuffer + 50 µl plättchenfreies Serum |
| Negativkontrolle:                     | 5µl IgG FITC + 5µl IgG PE + 400µl Bindungspuffer +50µl plättchenfreies Serum       |

Das Pipettierschema ist im Anhang, Abb.1 ersichtlich.

#### **2.4.4. Analyse und Auswertung (EMP)**

Nach diesem Verfahren wurden EMP aus dem plättchenfreien Serum der Patienten gemessen und mittels Quadrantenstatistik gezählt. Sowohl auf dem Meßblatt (s. Abb.3 Anhang) als auch auf dem Auswertblatt (s. Abb. 4, Anhang) wurden Name, Vorname und Klinik-Identifikationsnummer (hier die Herzkatheternummer) vermerkt.

Die zweiparametrische Darstellung der Daten erfolgte in einer Form, welche die Erkennung einzelner Messereignisse zulässt. Dies ist in einer Punktwolkendarstellung der Fall. Diese Form der Graphik ermöglicht die Darstellung jedes Einzelereignisses und somit auch die Wiedergabe von kleinsten Zellpopulationen.

#### **Auswertung**

1. Darstellung der Isotypenkontrolle:  
IgG FITC und IgG PE wurden im FSC (relative Größe (FSC = Vorwärtsstreulicht)) und SSC (relative Granularität (SSC= Seitwärtsstreulicht)) Blot in Form einer Punktwolkendarstellung aufgetragen.
2. Darstellung der positiven Ereignisse für die die Fluoreszenz Annexin V und CD 31 im SSC/FSC Punktwolkenblot.
3. Darstellung der Größe der Zellfragmente gegen die jeweilige Fluoreszenz der Antikörper.  
Die Graphik Annexin/CD31 stellt eine Doppelmarkierung dar und zeigt alle Annexin- und CD31 –positiven Mikropartikel auf.

### **2.5. Messung endothelialer Prognitorzellen**

#### **2.5.1. Isolation der mononukleären Zellen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation**

20 ml Citratblut wurde mit 20 ml physiologischer, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf das doppelte Volumen verdünnt. Mit dieser Blut-PBS- Mischung wurden 15 ml Ficoll-Lösung überschichtet und bei Raumtemperatur 20 Minuten lang bei 2400 Umdrehungen pro

Minute zentrifugiert. Die Rotorbremse des verwendeten Gerätes war bei diesem ersten Zentrifugationsvorgang ausgeschaltet, um ein Durchmischen der entstandenen Phasen beim Bremsvorgang zu verhindern. Anschließend wurden die mononukleären Zellen in der entstandenen Interphase abgenommen. Es folgten zwei 10 minütige Waschvorgänge mit je 50ml PBS bei Raumtemperatur und 2400 Umdrehungen pro Minute mit eingeschalteter Rotorbremse. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Pellet mit 5ml 37°C warmem Endothelial Cell Basal Medium (EBM)- Nährmedium unter der Sterilbank resuspendiert. Es folgte ein weiterer 10-minütiger Waschvorgang. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Pellet mit 700µl EBM- Nährmedium resuspendiert.

### **2.5.2. Colony forming unit (CFU)-Assays**

Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml Endothelial Cell Basal Medium (Cell Systems) auf Fibronectin - beschichtete 24 well - plates (SIGMA) übertragen und 48 Stunden lang bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die in der Lösung befindlichen Zellen gezählt.  $1 \times 10^6$  der nicht-adhärenen MNC wurden erneut auf Fibronectin-beschichtete 24 well- plates übertragen und 7 Tage lang bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Alle 3 Tage erfolgte der Wechsel des Nährmediums. Die Subkultivierung wurde vorgenommen, um eine Kontamination mit reifen Endothelzellen auszuschließen. Nach 7 Tagen erfolgte die Auszählung der CFU in der Durchlichtmikroskopie. Dabei wurde die Zahl der CFU in 3 Gesichtsfeldern bestimmt und der Mittelwert gebildet.

### **2.5.3. Herstellung FACS-Ansatz (EPC)**

Zur Messung der verschiedenen EPC – Subpopulationen erfolgte die Markierung mit unterschiedlichen Fluoreszenzantikörpern. Pro Patient wurden 6 Proben zu je 100µl der gewonnenen mononukleären Zell (MNC) – Suspension verarbeitet. Die Markierung mit CD 34, CD117, CD133 und CD 146, sowie IgG – FITC und IgG - PE erfolgte durch direkte Immunfärbung mittels primärer fluorochrommarkierter Antikörper.

- Zugabe des 1. AK,
- Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln

- Zugabe des 2. AK
- Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln
- Waschschrift mit je 2ml CellWash für 10 Minuten 4°C, Zentrifugation 1300 Umdrehungen pro Minute
- Absaugen des Überstandes
- Resuspension des Pellets und Fixation mit je 200µl CellWash und 200µl 2%iger Paraformaldehydlösung
- Aufbewahrung bei 4°C im Dunkeln bis zur FACS-Analyse

Die Markierung mit VEGF-R2 erfolgte durch indirekte Immunfärbung mittels biotinyliertem VEGF-R2 Antikörper, da ein fluorochrommarkierter Antikörper kommerziell zum Zeitpunkt der Studie nicht erhältlich war.

Zur Blockierung von Fc-Rezeptoren und Verhinderung unspezifischer Bindungen von Immunglobulinen an die Zelloberfläche wurden humanes IgG und Goat- Serum verwendet.

- Zugabe von Humanimmunglobulin
- Inkubation für 30 Minuten auf Eis
- Waschschrift mit 2ml FACS – Puffer für 10 Minuten 4°C, 1300 Umdrehungen pro Minute, Absaugen des Überstandes
- Zugabe von Goat – Serum und Resuspension,
- Inkubation für 10 Minuten auf Eis
- Zugabe von VEGF-R2 – Antikörper,
- Inkubation für 20 Minuten auf Eis
- Zugabe von verdünntem Streptavidin-PE
- Inkubation für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln
- Waschschrift mit 1ml FACS – Puffer für 5 Minuten, 4°C, 1300 Umdrehungen pro Minute, Absaugen des Überstandes
- Resuspension mit 1ml FACS - Puffer
- Wiederholung des vorangegangenen Waschschriftes
- Zugabe des 1. AK
- Inkubation für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln
- Zugabe des 2. AK

- Inkubation für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln
- Waschschrift mit je 2ml CellWash für 10 Minuten, 1300 Umdrehungen pro Minute
- Absaugen des Überstandes
- Resuspension des Pellets und Fixation mit je 200µl CellWash und 200µl 2%iger Paraformaldehydlösung
- Aufbewahrung bei 4°C im Dunkeln bis zur FACS-Analyse

Nach jeder Zugabe einer neuen Substanz wurde kurz mit Hilfe eines Vortex – Gerätes durchmischt. Beim Umgang mit den Fluoreszenzantikörpern wurde streng darauf geachtet, dass weder Sonnenlicht noch künstliches Licht direkt auf die Antikörper oder die Proben fiel, da dies ein Abblässen der Fluoreszenzfarbstoffe mit verminderter Registrierbarkeit durch das FACS-Gerät nach sich ziehen würde. Das detaillierte Pipettierschema ist im Anhang Abb. 5 dargestellt.

#### **2.5.4. Auswertung und Analyse (EPC)**

Die FACS-Analyse erfolgte mit dem Becton Dickinson FACS-Calibur-Gerät. Die Zellzählung wurde auf 500 000 gemessene MNC im Gate pro Patientenprobe limitiert. Es wurden die absoluten und prozentualen Zahlen der zirkulierenden EPC sowie der Isotypenkontrollen dokumentiert.

IgG-FITC und IgG-PE (Isotypenkontrollen)

CD34/CD146 positive Zellen

CD34/CD117 positive Zellen

CD34/KDR positive Zellen

CD34/CD133 positive Zellen

CD34/CD133/KDR positive Zellen

## 2.6. Statistik

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test für unverbundene Stichproben bestimmt. Der ANOVA-Test kann als Erweiterung des t-Tests auf mehr als 2 Stichproben angesehen werden und wurde für Vergleiche von kategorischen Variablen eingesetzt. Wir nutzten die natürlichen log-transformierten Werte für EMP und EPC als kontinuierliche Variablen. Die Normalverteilung wurde anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests aufgezeigt. Eine mögliche Korrelation zwischen einzelnen Parametern wurde mittels der linearen Regressionsanalyse untersucht. Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, arterieller Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Adipositas und familiäre Disposition für KHK, Myokardinfarkt, medizinische Begleittherapie bei kardiovaskulären Erkrankungen waren Variablen, die in die multivariaten Analysen eingesetzt wurden. Statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  angenommen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Software-Programms SPSS 11.5 für Windows.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Patientencharakteristika**

75 konsekutive Patienten mit koronarangiographisch gesicherter Herzerkrankung wurden eingeschlossen. Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer betrug 66,1 Jahre mit einer hohen Prävalenz für koronare Risikofaktoren (arterielle Hypertonie 85,3%, Hypercholesterinämie 78,7%, Diabetes mellitus 29,3%, Nikotinabusus 20,0%). Von diesen Patienten litten 23% an einer koronaren Ein-Gefäß-Erkrankung, 23% an einer Zwei-Gefäß-Erkrankung und bei 22% der Studienteilnehmer wurde eine koronare Drei-Gefäß-Erkrankung dokumentiert. Bei 28% der eingeschlossenen Patienten war bereits in der Vorgeschichte eine koronare Intervention mittels Stentimplantation durchgeführt worden. Die begleitende medikamentöse Therapie beinhaltete Betablocker (70,7%), Angiotensin-converting-enzyme (ACE) Hemmer (60,0%) und Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase-Hemmer (Statine, 52,0%). Detaillierte Patienten-Charakteristika sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Table 1. Base-Line Characteristics \*

| Characteristics of n=75 Patients |           |
|----------------------------------|-----------|
| Age – yr                         | 66.1±10.4 |
| Gender – no. (%)                 |           |
| Female sex                       | 27 (36.0) |
| Male sex                         | 48 (64.0) |
| CV Risk Factors – no. (%)        |           |
| Arterial Hypertension            | 64 (85.3) |
| Hyperlipidemia                   | 59 (78.7) |
| Diabetes                         | 22 (29.3) |
| Family History of CAD            | 19 (25.3) |
| Smoking                          | 15 (20.0) |
| Ex-Smoking                       | 21 (28.0) |
| Body-mass Index <sup>†</sup>     | 27.5±4.8  |
| Medical History – no. (%)        |           |
| Past Myocardial Infarction       | 38 (50.7) |
| Stroke                           | 9 (12.0)  |

|   |           |
|---|-----------|
| Peripheral Artery Disease                     | 10 (13.3) |
| Renal Insufficiency                           | 17 (22.7) |
| Coronary Artery Bypass Grafting               | 6 (8.0)   |
| Percutaneous Coronary Intervention            |           |
| Previous                                      | 28 (37.3) |
| current                                       | 40 (53.3) |
| Coronary Artery Disease – no. (%)             |           |
| 1-Vessel Disease                              | 24 (32.0) |
| 2-Vessel Disease                              | 23 (30.7) |
| 3-Vessel Disease                              | 22 (29.3) |
| Stenosis < 50%                                | 6 (9.0)   |
| Angina (CCS-Classification) – no. (%)         |           |
| CCS 0   | 22 (29.3) |
| CCS 1   | 5 (6.7)   |
| CCS 2   | 21 (28.0) |
| CCS 3   | 13 (17.3) |
| CCS 4   | 13 (17.3) |
| Heart Failure (NYHA-Classification) – no. (%) |           |
| NYHA I  | 39 (52.0) |
| NYHA II                                       | 21 (28.0) |
| NYHA III                                      | 14 (18.7) |
| NYHA IV                                       | 1 (1.3)   |
| Left Ventricular Ejection Fraction – %        | 57.4±15.1 |

Table 1. (Continued.)

| Medication – no. (%)          |           |
|-------------------------------|-----------|
| ACE inhibitors                | 45 (60.0) |
| Angiotensin-receptor blockers | 6 (8.0)   |
| Beta-blockers                 | 53 (70.7) |
| Calcium-channel blockers      | 11 (14.7) |
| Diuretics                     | 32 (42.7) |
| HMG-CoA reductase Inhibitors  | 39 (52.0) |
| Nitrates                      | 27 (36.0) |
| Aspirin                       | 46 (61.3) |
| Clopidogrel                   | 18 (24.0) |

Tab.1: Plus/Minus-Werte geben die Standardabweichung an. Daten bezüglich des Body-Mass-Index konnten bei 4 Patienten nicht erhoben werden; bezüglich der CCS-Klassifikation fehlten die Angaben für einen Patienten; die linksventrikuläre Ejektionsfraktion wurde bei 6 Patienten nicht bestimmt; die Anamnese zur Medikamenteneinnahme fehlte bei 2 Patienten.

† Der Body-Mass-Index errechnet sich aus dem Gewicht, geteilt durch das Quadrat der Körperlänge in Metern. HMG-CoA = Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A.

## 3.2. Analyse der Einzelkomponenten des Vascular Repair Index mit kardiovaskulären Risikofaktoren

### 3.2.1. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und CD34<sup>pos</sup> / KDR<sup>pos</sup> -endotheliale Progenitorzellen

Patienten mit Hypercholesterinämie zeigten signifikant erniedrigte CD34<sup>pos</sup>/KDR<sup>pos</sup> -EPC ( $p < 0.05$ ). In univariaten Analysen zeigte sich, daß die Anzahl der zirkulierenden CD34<sup>pos</sup>/KDR<sup>pos</sup> -EPC negativ mit LDL-Cholesterin ( $r = -0,206$ ,  $p = 0.03$ ) korreliert. Bei Patienten mit einer medikamentösen Therapie mittels eines Statins konnte dagegen eine positive Korrelation mit der Anzahl CD34<sup>pos</sup>/KDR<sup>pos</sup> endothelialer Progenitorzellen ( $r = 0,195$ ,  $p = 0.016$ ) gezeigt werden. HDL-Cholesterin korrelierte ebenso positiv mit CD34<sup>pos</sup>/KDR<sup>pos</sup> endothelialen Progenitorzellen ( $r = 0,142$ ,  $p = 0.017$ ). Ähnliche Abhängigkeiten ließen sich bei Hypertonikern beobachten. Ein hoher systolischer Blutdruck korreliert negativ mit der Anzahl zirkulierender Progenitorzellen ( $r = -0,238$ ,  $P < 0.001$ ). Patienten mit einer etablierten Therapie mit einem Angiotensin-converting-

enzyme (ACE) Hemmer zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl zirkulierender CD34<sup>pos</sup>/KDR<sup>pos</sup> endothelialer Progenitorzellen (p=0.006). Bei Patienten mit Diabetes mellitus (p=0.042), genetischer Disposition für koronare Herzerkrankungen (p=0.034), Adipositas (p=0.017) oder pAVK (p=0.013) zeigten sich signifikant erniedrigte Zahlen zirkulierender CD34<sup>pos</sup>/KDR<sup>pos</sup> - Zellen im Vergleich zu Patienten ohne die beschriebenen Risikofaktoren. Bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz (klassifiziert entsprechend des NYHA Stadiums) und bei akutem Myokardinfarkt bestand eine signifikante Assoziation mit einer erhöhten Anzahl CD34<sup>pos</sup>/KDR<sup>pos</sup> -Zellen im peripheren Blut (p=0.029 bzw. p=0.008).

Multivariate lineare Regressionsanalysen identifizierten arteriellen Bluthochdruck (p=0.006) und Hypercholesterinämie (p=0.009) als unabhängige Faktoren für eine reduzierte Anzahl zirkulierender CD34<sup>pos</sup>/KDR<sup>pos</sup> EPC.

### **3.2.2. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und CD133<sup>pos</sup> -Progenitorzellen**

Die Anzahl von CD133<sup>pos</sup>- Progenitorzellen korrelierte in univariaten Analysen negativ mit niedrigen LDL-Cholesterin Konzentrationen (r=-0.267, p=0.002), systolischen Blutdruckwerten (r=-0.139, p=0.008) sowie dem Lebensalter (r=-0.218, p=0.001). CD133<sup>pos</sup>-Zellen waren bei Männern (p=0.002), bei Patienten mit pathologischem BMI (BMI>30; p=0.002), bei Statin- (p=0.014) und ACE-Hemmer Einnahme (p=0.026) und bei Vorliegen eines akuten oder subakuten Myokardinfarktes (p=0.019 und p=0.008) in erhöhter Anzahl zu finden.

Die multivariate lineare Regressionsanalyse identifizierte das Alter als unabhängigen Faktor für eine reduzierte Anzahl zirkulierender CD133<sup>pos</sup> -Progenitorzellen (p=0.021).

### **3.2.3. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und CFU-EC**

Die Anzahl der CFU-EC korrelierte invers mit LDL-Cholesterin (r=-0,267, p=0.010) und Alter (r=-0,216, p=0.002). Das Vorhandensein von Diabetes mellitus (p=0.011), Nikotinabusus (p=0.002) und eine familiäre Disposition für koronare Herzerkrankungen (p=0.004) war assoziiert mit einer erniedrigten Anzahl von CFU-EC. Die Einnahme von Statinen (p=0.001) und ACE-Hemmern (p=0.028) korrelierte mit einer erhöhten Anzahl von CFU-EC. Kardiovaskuläre Erkrankungen (pAVK, Herzinsuffizienz entsprechend dem NYHA-Stadium, akutes

Koronarsyndrom und akuter Myokardinfarkt) waren assoziiert mit einer niedrigen Anzahl von CFU-EC ( $p=0.001$ ;  $p=0.006$ ;  $p=0.001$ ;  $p=0.034$ ).

Multivariate lineare Regressionsanalysen identifizierten Alter, familiäre Vorbelastung und Nikotinabusus als unabhängige Faktoren für eine reduzierte Fähigkeit zur Bildung von CFU-EC ( $p<0,001$ ;  $p=0,004$ ;  $p=0.028$ ).

### 3.2.4. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und endotheliale Mikropartikel

Die Anzahl von Annexin /CD31-positiven Zellen und Mikropartikeln war signifikant erhöht bei Patienten mit Hypercholesterinämie ( $p=0.012$ ), arteriellem Bluthochdruck ( $p=0.002$ ) und Diabetes mellitus ( $p= 0.047$ ).

Mittels multivariater Analyse konnte arterieller Bluthochdruck als einziger unabhängigen Risikofaktor identifiziert werden, der mit einer steigenden Anzahl von EMP assoziiert war ( $p<0.001$ ). Mit einer Zunahme der Zahl der Risikofaktoren stieg die Anzahl endothelialer Mikropartikel signifikant an ( $p<0.001$ ).

#### Number of circulating EMP

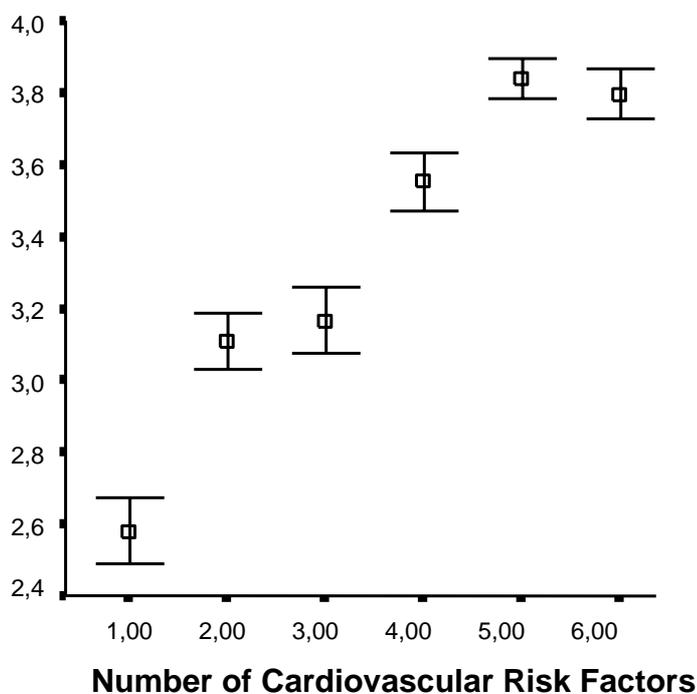


Abb.1: Korrelation Anzahl endothelialer Mikropartikel und Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren.

### 3.2.5. Vascular-Repair-Index und Schweregrad der KHK

Der Schweregrad der KHK wurde angiographisch bestimmt (Stenose < 50%, 1-, 2-, 3- Gefäßerkrankung entsprechend der Zahl der betroffenen Koronargefäße). Um den Einfluß von EPC und EMP und deren Interaktion an der Gefäßwand zu untersuchen, kalkulierten wir den Vascular-Repair-Index (VRI):

$$\text{VRI} = \frac{(\text{CD 34}^{\text{pos}}/\text{KDR}^{\text{pos}}\text{Zellen} \times \text{CFU-EC})}{(\text{Anzahl der EMPs})}$$

Der VRI korrelierte signifikant mit dem Schweregrad der angiographisch ermittelten KHK (beginnende KHK, koronare 1-, 2-, 3- Gefäßerkrankung,  $p < 0.001$ , Abb. 2).

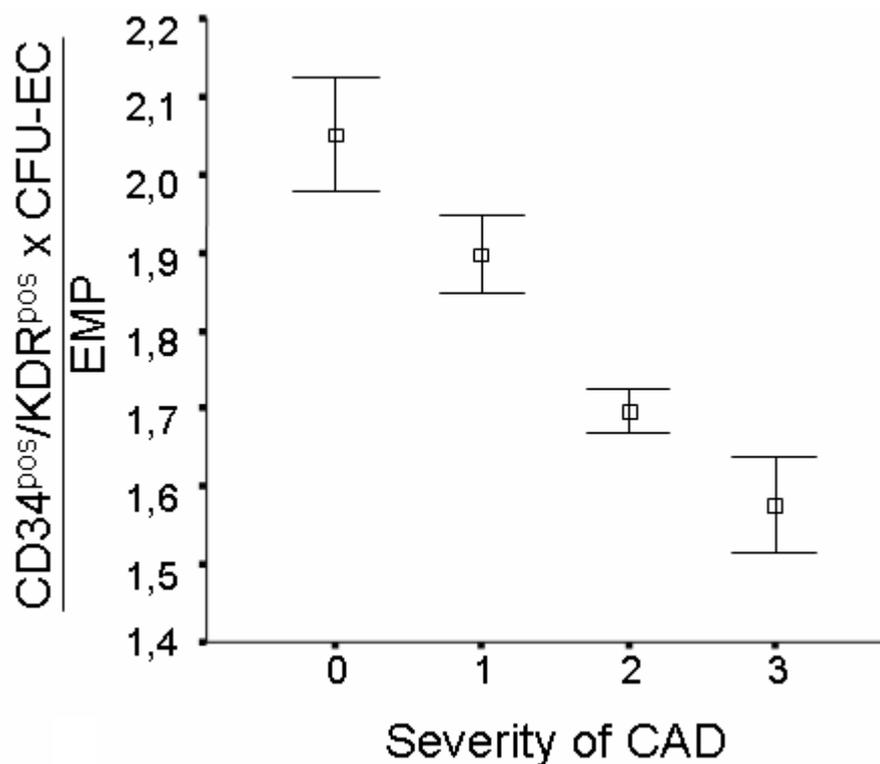


Abb. 2: Korrelation VRI und Schweregrad der KHK

In der multivariaten Analyse zeigte sich, dass unabhängig von Alter, Geschlecht, dem Vorliegen einer arteriellen Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, genetische Disposition für koronare Herzerkrankungen, Angiotensin-converting-enzyme (ACE) Hemmer, Betablocker-Einnahme sowie Statin- und ASS-Therapie und der linksventrikuläre Ejektionsfraktion, der VRI

ein unabhängiger Prädiktor für den Schweregrad der KHK war ( $p < 0.001$ ). Ein niedriger VRI - definiert über eine entsprechend reduzierte Zahl funktionseingeschränkter zirkulierender EPC mit einem hohem Grad an Endothelzellschädigung - war dabei ein starker Prädiktor für das Vorliegen einer schweren koronaren Herzerkrankung.

Vergleichbare Korrelationen zwischen VRI und dem Schweregrad der KHK zeigten sich, wenn die Zahl der zirkulierenden  $CD34^{pos}/KDR^{pos}$  EPC durch die Zahl zirkulierender  $CD133^{pos}$  Progenitoren ersetzt wurde ( $p = 0.001$  in der multivariaten Analyse). Keine Korrelation wurde beobachtet, wenn  $CD34^{pos}/CD117^{pos}$  Zellen in die Gleichung eingesetzt wurden, die eine hämatopoetische Subfraktion von Progenitorzellen repräsentieren.

### **3.2.6. Analyse der Einzelkomponenten des Vasculair Repair Index mit dem Schweregrad der KHK**

Die Korrelation zwischen  $CD31^{pos}/AnnexinV^{pos}$  Mikropartikeln, EPC oder der funktionalen Kapazität der EPC, ausgedrückt in der Anzahl der CFU-EC und der Grad der KHK wurde bestimmt.  $CD31^{pos}/AnnexinV^{pos}$  Mikropartikel und die funktionale Kapazität der EPC waren prädiktiv für den Schweregrad der KHK ( $p = 0.02$  und  $p = 0.001$ ).  $CD34^{pos}/KDR^{pos}$ ,  $CD133^{pos}$  und  $CD34^{pos}/CD117^{pos}$  EPC alleine korrelierten nicht mit dem Schweregrad der KHK.

#### **4. Diskussion**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass der Vascular Repair Index (VRI= $\frac{CD34^{pos} / KDR^{pos} \text{ Zellen} \times CFU - EC}{CD31^{pos} / AnnexinV^{pos} MP}$ ) nicht-invasiv den Schweregrad der koronaren Herzkrankheit bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener koronarer Herzkrankheit voraussagen kann. Dabei war der prädiktive Wert des VRI unabhängig von begleitenden Risikofaktoren, Begleitmedikation und Komorbiditäten.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren führen durch mechanische, inflammatorische und biochemische Verletzungen der gefäßauskleidenden Endothelzellschicht zur Endothelzellapoptose. Die sich daraus entwickelnde endotheliale Dysfunktion ist das früheste pathomorphologische Korrelat der sich hieraus entwickelnden koronaren Atherosklerose (Libby et al., 1997; Ross 1993). Die Entstehung atherosklerotischer Läsionen und deren Progression könnte potentiell durch eine effektive Endothelzellreparation der geschädigten Gefäßwand vermieden werden und wäre demnach eine wichtige Voraussetzung zur Prävention der Atherosklerose.

Im Rahmen unserer Studie bestimmten wir die Korrelation zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren, Anzahl und Funktion der EPC sowie die Zahl der zirkulierenden EMP. Es zeigte sich, daß EMP bei Patienten mit Diabetes mellitus, arteriellem Bluthochdruck und Hypercholesterinämie signifikant erhöht sind. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie LDL-Cholesterin, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, familiäre Disposition für koronare Herzerkrankungen, Nikotinabusus und Adipositas waren mit einer erniedrigten Anzahl endothelialer Progenitorzellen assoziiert. Diese Beobachtungen konnten auch von Kunz et al. in einer Untersuchung mit 122 Patienten bestätigt werden (Kunz et al., 2006). In der multiplen linearen Regressionsanalyse identifizierten wir Alter, systolische Blutdruckwerte und Hypercholesterinämie als unabhängige Vorhersagefaktoren für eine reduzierte Anzahl zirkulierender EPC. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß Alter, familiäre Disposition und Nikotinabusus unabhängige Vorhersagefaktoren für eine reduzierte Fähigkeit zur CFU-EC Bildung darstellten. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Vasa et al. beschrieben. So zeigte sich, daß die Anzahl und Funktion der EPC durch Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktasehemmer (Statine) verbessert werden kann (Vasa et al., 2001a). Ähnliche

Beobachtungen machten Vasa et al. hinsichtlich einer positiven Familienanamnese für eine KHK sowie Nikotinabusus (Vasa et al., 2001b). Hill et al. zeigten, daß auch Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und erhöhte Cholesterinspiegel im Serum mit einer verminderten Anzahl der EPC assoziiert sind (Hill et al., 2003). Weiterhin wurde eine inverse Korrelation zwischen der EPC-Anzahl und dem Alter der Probanden (Vasa et al., 2001b), dem LDL-Cholesterin (Vasa et al., 2001a; Chen et al., 2004), dem Gesamtcholesterin (Chen et al., 2004), dem HbA<sub>1c</sub>-Wert (Loomans et al., 2004) und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren (Vasa et al., 2001b) bzw. dem Framingham risk score (Hill et al., 2003) belegt.

Zusammenfassend beeinflussen kardiovaskuläre Risikofaktoren das Gleichgewicht an der Gefäßwand und führen somit auf zweierlei Wegen zur Atherosklerose: Durch Initiierung der Endothelläsionen und Apoptose wandständiger Endothelzellen als auch in ähnlichem Maße durch negative Beeinflussung der regenerativen, endothelialen Kapazität in Form der endothelialen Progenitoren.

Bislang ist es nicht möglich, Patienten mit beginnender Atherosklerose zu identifizieren. Risiko-Scores (PROCAM-Score, Framingham-Risk-Score und der europäische SCORE) erlauben zwar die Identifizierung von Risikopatienten ohne allerdings Patienten mit frühen Stadien einer manifesten Atherosklerose zu identifizieren. Gegenwärtig gibt es keinen nicht-invasiven Marker, der den Schweregrad und den Progress der KHK vorherbestimmen kann. In der hier präsentierten Studie an 75 Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung konnte mit Hilfe der Bestimmung von charakteristischen Subpopulationen endothelialer Progenitorzellen (CD 133<sup>pos</sup>, CD34<sup>pos</sup>/KDR<sup>pos</sup> Zellen) zusammen mit der funktionalen Kapazität der EPC (Anzahl der CFU-EC) das regenerative Potential der Patienten bestimmt werden. Umgekehrt ließ sich das Ausmaß der Endothelzell-Apoptose in Form der Anzahl zirkulierender EMP bestimmen. Die Kombination der genannten Faktoren im VRI erlaubte eine nicht-invasive Bestimmung des Schweregrades der KHK. Studien von Ashara, Masuda und Werner et al. unterstreichen die Bedeutung verschiedener Komponenten der endothelialen Regeneration und Apoptose auf die Gefäßwandhomeostase (Ashara et al., 1999; Masuda et al., 2003; Werner et al., 2003). Ähnliche Beobachtungen machten auch Sabatier et al. sowie Pirro et al. (Pirro et al., 2008; Sabatier et al., 2009). Pirro et al. zeigten in ihrer Studie, daß EPC in einem pro-apoptotischen Milieu vermehrt EMP abschnüren. Dies wiederum induziert eine verminderte Anzahl zirkulierender endothelialer

Progenitorzellen und trägt neben den bekannten traditionellen Risikofaktoren zu einem Progress der Atherosklerose bei (Pirro et al., 2008).

Der Einfluß einer jeden einzelnen Komponente des VRI wurde weiterführend analysiert und mit dem Schweregrad der KHK korreliert. Zusammenfassend scheint ein Einzelfaktor wie EPC oder EMP nicht in der Lage zu sein, zuverlässig den Schweregrad der KHK vorauszusagen. Diese Beobachtungen sind in Analogie zu sehen mit klassischen Risikofaktoren, die gut mit der kardiovaskulären Prognose korrelieren aber nicht in der Lage sind die Schwere der atherosklerotischen Erkrankung abzuschätzen. Erst die Kombination verschiedener Risikofaktoren bzw. die Kombination der einzelnen Komponenten des VRI scheinen das Ausmaß der koronaren Herzkrankheit realistischer abzubilden.

Aus experimentellen Studien ist bekannt, daß apoptotische Endothelzellen und Endothelregenerierende Zellen miteinander interagieren. So konnten Hristov et al. zeigen, daß apoptotische Vesikel die Anzahl und die Differenzierung von Progenitorzellen in vitro stimulierten (Hristov et al., 2004). Eigene unveröffentlichte Daten zeigen, dass eine Interaktion von EMP mit Endothelzellen und EPC über den Phosphatidylserinrezeptor vermittelt werden. Dabei beeinflusst die Aufnahme von EMP in die Zielzelle das biologische Verhalten der Zellen im Sinne einer gesteigerten Proliferation, anti-apoptotischer Effekte und eine vermehrte Differenzierung in Richtung reifer Endothelzelle (Werner et al., unveröffentlichte Daten). Möglicherweise besteht bei Patienten mit Endothelzellapoptose eine enge Interaktion zwischen apoptotischen Endothelzellen und regenerierenden EPC. Tierexperimentell führt die repetitive intravenöse Gabe von EMP in Mäusen zu einer Mobilisation zirkulierender Sca1/flk1 positiver EPC (Werner et al., unveröffentlichte Daten). Weitere Untersuchungen werden zeigen müssen, ob tatsächlich die apoptotische Endothelzellen durch Freisetzung von EMP Signale aussenden, die eine Aktivierung der regenerativen Kaskade triggern.

Die Vorhersagbarkeit des Schweregrades der KHK und insbesondere die Abschätzung der „Gefäßgesundheit“ mittels des Vaskular-Repair-Index könnten in Zukunft wichtige therapeutische Konsequenzen implizieren. Neben der obligaten Reduktion und Modifikation des kardiovaskulären Risikoprofils könnten neuartige therapeutische Strategien auf die gezielte Reduktion der Endothelzell-Apoptose bei Patienten mit vorwiegend Endothelzellschäden

abzielen. Auf der anderen Seite könnte bei Patienten mit nicht-modifizierbaren Risikofaktoren wie beispielsweise fortgeschrittenes Lebensalter und männliches Geschlecht das therapeutische Fenster in Richtung Verbesserung der Regenerationsfähigkeit durch Steigerung der Zahl zirkulierender EPC verschoben werden.

Zukünftige Studien werden untersuchen müssen, inwieweit die selektive Modifizierung des Ungleichgewichtes zwischen endothelialer Apoptose und Regenerationsfähigkeit an der Gefäßwand die Bildung und Progression der Atherosklerose vorzubeugen vermag.

## 5. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Hyperlipidämie, fortgeschrittenes Lebensalter, männliches Geschlecht und eine familiäre Disposition stellen die wichtigsten Risikofaktoren dar, die mit dem Auftreten einer Atherosklerose assoziiert sind. Der zentrale Ausgangspunkt der Atheroskleroseentwicklung ist die Endothelläsion, die zusammen mit einer vermehrten Apoptose von Endothelzellen zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion führt.

Das Ausmaß der Endothelzellschädigung lässt sich in vivo durch Messung endothelialer Mikropartikel (EMP) bestimmen. Die Zahl der zirkulierenden EMP korreliert dabei mit dem Grad der koronaren Endothelfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß endotheliale Progenitorzellen (EPC) an der Regeneration der geschädigten Endothelzellschicht beteiligt sind.

Bislang ist es nicht möglich, Patienten mit beginnender Atherosklerose nicht invasiv zu identifizieren. Um die Interaktion zwischen Endothelzellschaden, beeinträchtigter Regeneration der Endothelzellschicht und atherosklerotischen Erkrankungen beim Menschen besser beschreiben zu können, haben wir prospektiv einen Vascular-Repair-Index ( $VRI = \left( \frac{CD34^{pos} / KDR^{pos} \text{ Zellen} \times CFU - EC}{CD31^{pos} / AnnexinV^{pos} MP} \right)$ ) definiert, welcher die Anzahl und Funktion der endothelialen Progenitorzellen (EPC) und die Anzahl der  $CD31^{pos}/AnnexinV^{pos}$ -Mikropartikel umfasst.

In der hier präsentierten Studie an 75 Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung konnte mit Hilfe des VRI eine nicht-invasive Bestimmung des Schweregrades der KHK aufgezeigt werden. Der Einfluss einer jeden Einzel-Komponente des VRI auf die Prädiktion des Schweregrades der KHK war deutlich geringer als die Kombination der Einzel-Komponenten. Die Ergebnisse zeigen, daß Einzelfaktoren wie EPC oder EMP nicht in der Lage sind, zuverlässig den Schweregrad der KHK vorauszusagen. Erst die Kombination verschiedener Risikofaktoren bzw. die Kombination der einzelnen Komponenten des VRI scheinen das Ausmaß der koronaren Herzerkrankung prädiktiv abzubilden. Eine Abschätzung der Gefäßgesundheit mittels VRI könnte therapeutisch wichtige Konsequenzen im Sinne einer Steigerung des

regenerativen Potentials oder Inhibition Endothelapoptose-induzierender Faktoren implizieren. Ob dies durch selektive medikamentöse Ansätze oder eine Zelltherapie umgesetzt werden kann, ist Fokus gegenwärtiger Forschung.

**6. Anhang**

| Ansatz                          | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> |
|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| <b>IgG FITC</b><br>5 µl         | ×        |          |          |          |
| <b>IgG PE</b><br>5 µl           | ×        |          |          |          |
| <b>Annexin V</b><br>4 µl        |          | ×        |          | ×        |
| <b>Anti-CD 31</b><br>4 µl       |          |          | ×        | ×        |
| <b>Binding Puffer</b><br>400 µl | ×        | ×        | ×        | ×        |

Abb. 1: Pipettierschema zur Herstellung des FACS-Ansatzes zwecks Messung endothelialer Mikropartikel (EMP).

```

Cytometer Type:  FACSCalibur

Detectors/Amps:
Param  Detector Voltage  AmpGain  Mode
P1     FSC      E00      2.95    Lin
P2     SSC      396      1.85    Lin
P3     FL1      573      1.00    Log
P4     FL2      607      1.00    Log
P5     FL3      579      1.00    Log
P6     FL1-A     1.00     Lin
P7     FL4      643      1.00    Log

Threshold:
Primary Parameter:  FSC
Value:  0

Secondary Parameter:  None

Compensation:
FL1 - 76.2 % FL2
FL2 - 14.5 % FL1
FL2 - 3.6 % FL3
FL3 - 9.7 % FL2
FL3 - 0.3 % FL4
FL4 - 50.5 % FL3

```

Abb. 2: Instrumenteneinstellung („Instrument Setting“) des Zytometers zur Messung der Proben: Diese legt den Grad der Fluoreszenzverstärkung (Amplifikation), der Messschwelle (Treshhold) und der Kompensationseinstellung fest.

| Probe | Tube 1               | Tube 2                 | Tube 3                 | Tube 4                                | Tube 5                 | Tube 6                                |
|-------|----------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| MNC   | 100 µl               | 100 µl                 | 100 µl                 | 100 µl                                | 100 µl                 | 100 µl                                |
| AK-1  | 10 µl<br>IgG<br>FITC | 10 µl<br>CD 34<br>FITC | 10 µl<br>CD 34<br>FITC | 10 µl<br>CD 34<br>FITC                | 10 µl<br>CD 34<br>FITC | 10 µl<br>CD 34<br>FITC                |
|       |                      |                        |                        | 5 µl<br>KDR                           |                        | 5 µl<br>KDR                           |
| AK-2  | 10 µl<br>IgG<br>PE   | 10 µl<br>CD 146<br>PE  | 10 µl<br>CD 117<br>PE  | 100 µl<br>Streptavidin-<br>PE<br>1:10 | 10 µl<br>CD 133<br>PE  | 100 µl<br>Streptavidin-<br>PE<br>1:10 |
|       |                      |                        |                        | 3 µl<br>Human IgG                     |                        | 3 µl<br>Human IgG                     |
|       |                      |                        |                        | 6 µl<br>Goat-Serum<br>0,5%            |                        | 6 µl<br>Goat-Serum<br>0,5%            |
|       |                      |                        |                        |                                       |                        | 10 µl<br>CD 133<br>APC                |

Abb. 3: Detailliertes Pipettierschema des FACS-Ansatzes zwecks Messung der verschiedenen EPC-Subpopulationen.

## **7. Literaturverzeichnis**

1. **Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A.** Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo (2003). *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2434-2443
2. **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
3. **Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Wagner M, Isner JM.** Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228
4. **Barry OP, Pratico D, Lawson JA, Fitz GA.** Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; 99: 2118-2127
5. **Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing A.N, Romijn FP, Hack CE, Sturk A.** Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001; 85: 639-646
6. **Bernal-Mirrachi L, Jy W, Jiminez JJ.** High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2003; 145: 962-970
7. **Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T.** Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001; 104: 2649-2652
8. **Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB.** Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986; 256: 2835-2838

9. **Chen JZ, Zhang FR, Tao QM.** Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107: 273-280
10. **Cooke JP, Dzau VJ.** Nitric oxide synthase: Role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med* 1997; 48: 489-509
11. **Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn MD, Gallagher SG, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ.** Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990; 86: 228-234
12. **Cremer P, Nagel D, Mann H, Labrot B, Muller-Berninger R, Elster H, Seidel D.** Ten-year follow-up results from the Goettingen Risk, Incidence and Prevalence Study (GRIP). I. Risk factors for myocardial in a cohort of 5790 men. *Atherosclerosis* 1997; 129: 221-230
13. **Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW and Radder JK.** Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106: 2442-2447
14. **Dimmeler S, Aicher A, Vasa M.** HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108: 391-397
15. **Förstermann U, Mügge A, Ahlheid U, Haverich A, Fröhlich JC.** Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilatation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res* 1988; 62: 185-190
16. **Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafthausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W.** In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 3106-3112

17. **George J N, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA.** Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood* 1982; 60: 834-840
18. **George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, Newman PJ.** Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986; 78: 340-348
19. **Gill M, Dias S, Hattori K.** Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001; 88: 167-174
20. **Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T.** Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996: 141-151
21. **Hemetsberger H, Steimer S, Farhan S, Krakan H, Hermetsberger R, Pavo N, Kopp C.** Ischämisches Preconditioning führt zu einer Reduktion zirkulierender mesenchymaler Stammzellen im Ischämie/Reperusionsmodell bei Schweinen. *J Kardiologie* 2008; 348-352
22. **Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA.** Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593-600
23. **Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Feysinet JM.** Membrane Microparticles: Two Sides of the coin. *Physiology* 2005; 20: 22-27
24. **Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC.** Apoptotic Bodies from Endothelial Cells Enhance the Number and Initiate the Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells in vitro. *Blood* 2004; 104: 2761-2766
25. **Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS.** Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 2003; 109: 175-180
26. **Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R, Berkhout J, Romijn FP, Hack CE and Sturk A.** Microparticles from patients with multiple organ dysfunction Syndrome and Sepsis Support coagulation through multiple mechanisms. *Thromb Haemost* 2001; 85: 810-820

27. **Kannel WB, Dawber TR, Kagan A.** Factors of risk in the development of coronary heart disease-six years follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961; 55: 33-50
28. **Kelm M, Strauer B.** Endotheliale Dysfunktion. *Internist* 1999; 40: 1300-1307
29. **Koopman G, Reutelingsperger P, Kuijten GA, Keehnen, RM, Pals ST, MH van Oers.** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84: 1415-1420
30. **Kunz GA, Liang G, Cuculi F, Gregg D, Vata KC, Shaw LK, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Taylor DA, Peterson ED.** Circulating endothelial progenitor cells predict coronary artery disease severity. *Am Heart J* 2006; 152: 190-195
31. **Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G.** Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; 109: 220-226
32. **Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heltz A, Kissner G, Böhm M, Kindermann W, Nickenig G.** Running exercise of different duration and Intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005; 12: 307-314
33. **Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK.** Molecular biology of atherosclerosis. *Int J Cardiol* 1997; 2: S23-S29
34. **Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y.** HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone-marrow derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 399-405
35. **Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ.** Endothelial progenitor cell dysfunction : A novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 195-199
36. **Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A.** Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99: 348-353

37. **Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A.** Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101: 841-843
38. **Masuda H, Asahara T.** Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 390-398
39. **Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A.** Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000; 95: 930-935
40. **Pirro M, Schillaci G, Bagaglia F, Menecali C, Paltriccia R, Mandarino MR, Capanni M, Velardi A, Mandarino E.** Microparticles derived from endothelial progenitor cells in patients at different cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2008; 197: 757-767
41. **Preston RA, Jy W, Jiminez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS.** Effect of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 2003; 41: 211-217
42. **Rauscher FM, Goldschmidt-Clemont 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
43. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis — an update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488-500
44. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809
45. **Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F.** Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002; 51: 2840-2845

46. **Sabatier F, Camoin\_jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F.** Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors:key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Med* 2009; 13: 454-471
47. **Sabatier F, Darmon P, Hugel BCombes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F.** Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002; 51: 2840-2845
48. **Sandrl M, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Krantzel N, Lenz D, Erbs S, Schelnert D, Scheinert D, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R.** Effects of exercise and Ischemia on mobilization and functional activation on blood-derived progenitor cells in patients with Ischemic Syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation* 2005; 111: 3391-3399
49. **Schächinger V, Zeiher AM.** Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z Kardiol* 2000; 89: 70-74
50. **Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM.** Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690-1699
51. **Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM.** For the REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1210–1221
52. **Strauer BE, Brehm M, Zeus T.** Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-1918

53. **Strehlow K, Werner N, Berweiler J.** Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003; 107: 3059-3065
54. **Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Lerman A.** Long term follow up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101: 948-954
55. **Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE.** A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355-1374
56. **Strauer BE, Brehm M, Zeus T.** Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: 932-938
57. **Strehlow K, Werner N, Berweiler J.** Estrogen increases Bone marrow-Derived Endothelial Progenitor Cell production and Diminishes Neointima Formation. *Circulation* 2003; 107: 3059-3065
58. **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
59. **Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP.** Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* 1996; 94: 1682-1689
60. **Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsberger C.** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51

61. **Vasa M, Fichtlerer 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* 2001a; 103: 2885-2890
62. **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. *Circ Res* 2001b; 89: E1-E7
63. **Verhoven B, Schlegel RA, Williamsen P:** Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal on apoptotic t lymphocytes. *J Exp Med* 1995; 82: 1597-1601
64. **Werner N., Nickenig G.** Vaskuläre Progenitorzellen und Atherogenese- Regression und Regeneration durch das Knochenmark? *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129: 1269-1275
65. **Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig .** Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 2003; 93: e17-e24
66. **Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagel U, Nickenig G.** Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Modulate Vascular Reendothelialiation and Neointimal Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 1567-1572
67. **Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G.** Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcome. *N Engl J Med* 2005; 353: 999-1007
68. **Wilson PW, Castelli WP, Kannel WB.** Coronary risk prediction in adults (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 1987; 59: 91G-94G
69. **Yeung A, Vekshtein VI, Krantz DS, Vita JA, Ryan TJ, Ganz P, Selwyn AP.** The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. *N Engl J Med* 1991; 325: 1551-1556

- 70. Yusuf S.** Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (The Interheart-Study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 937-952
- 71. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B.** Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest* 1993; 92: 652-662

## **8. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Georg Nickenig danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe das wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen. Herrn PD Dr. med. Nikos Werner danke ich besonders neben der Betreuung meiner Doktorarbeit für seine fachliche Unterstützung, seine Hilfe bei der Planung und Umsetzung der Messungen, der konstruktiven Kritik als auch der Beantwortung meiner zahlreichen Fragen.

Mein Dank gilt auch dem Team des kardiologischen Forschungslabors an der Universitätsklinik Homburg, die über ihre tatkräftige Hilfe hinaus mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Der größte Dank gilt meiner Familie und vor allem meinen wunderbaren Eltern Klaudia und Gregor Kosiol. Ohne ihre liebevolle Unterstützung und ohne den bedingungslosen Rückhalt, den sie mir zu allen Zeiten meines Lebens und Studiums gegeben haben, wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Ich danke meinem lieben René, der mein Leben erfüllt.