

Aus der
I. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schömig)
und aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ. Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

Angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. med. I. Ott

Vorgelegt über den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
des Instituts für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ. Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Die Transplantation von humanen endothelialen und
angiogenen Zellen verbessert die linksventrikuläre Funktion im
Myokardinfarktmodell der Nacktratte**

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

von
Weidl Eliane
aus
München

München, 2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. E. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Korreferent: Prof. Dr. Siebert

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

Meiner Familie

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Endothelzellen.....	3
2.1.1	Aufbau der Endothelzelle	5
2.1.2	Das Endothel als auto- und endokrines Organ.....	6
2.1.2.1	Homöostase des Gefäßtonus	6
2.1.2.2	Homöostase der Hämostase.....	9
2.1.2.3	Inflammatorischer Eigenschaften des aktivierten Endothels	11
2.1.3	Endotheliale Dysfunktion.....	14
2.1.4	Atherosklerose	15
2.2	Vaskularisation	18
2.2.1	Embryonale Vaskularisation.....	18
2.2.2	Vascular Endothelial Growth Factor	20
2.2.3	Angiogenese	22
2.2.4	Arteriogenese.....	24
2.3	Stamm- und Vorläuferzellen	25
2.3.1	Endotheliale Vorläuferzellen.....	28
2.3.2	Quellen endothelialer Vorläuferzellen	30
2.3.3	Unterschiedliche Arten endothelialer Vorläuferzellen.....	31
2.3.4	Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen.....	35
2.3.5	Homing und Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen	37
2.3.6	Aufgaben endothelialer Vorläuferzellen im Körper	38
2.3.7	Therapeutische Anwendungen endothelialer Vorläuferzellen	40
3	Eigene Untersuchungen	45
3.1	Zielvorstellung	45
3.2	Material und Methoden.....	46
3.2.1	Zellkultur.....	46
3.2.1.1	Isolation und Kultur der angiogenen Zellen.....	46
3.2.1.2	Isolation und Kultur der endothelialen Zellen	47
3.2.1.3	Isolation und Kultur der Human Umbilical Vein Endothelial Cells	49
3.2.2	Screening der Zellen	50
3.2.2.1	Morphologie	50
3.2.2.2	Durchflußzytometrie (FACS).....	50

3.2.2.3	Matrigel-Angiogeneseassay	51
3.2.3	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	52
3.2.4	Versuchsaufbau	53
3.2.5	Versuchsdurchführung	55
3.2.5.1	Anästhesie und Monitoring.....	55
3.2.5.2	Echokardiographie	56
3.2.5.3	Thorakotomie und Transplantation der Zellen.....	58
3.2.5.4	Intraoperative Komplikationen.....	60
3.2.5.5	Euthanasie und Organentnahme	60
3.2.6	Probenaufbereitung.....	61
3.2.6.1	Histologie	61
3.2.6.2	Ventrikelmorphologie	61
3.2.6.3	Immunhistochemie	62
3.2.6.4	Statistische Berechnung und Dokumentation	63
3.3	Ergebnisse	64
3.3.1	Screening der Zellen	64
3.3.1.1	Anzahl CD34-positiver Zellen nach immunomagnetischer Zellsortierung	64
3.3.1.2	Morphologie und Wachstumsverhalten der Zellen	65
3.3.1.3	Angiogeneseassay	66
3.3.1.4	Durchflußzytometrie	67
3.3.2	In vivo Untersuchungen	69
3.3.2.1	Mortalität	69
3.3.2.2	Komplikationen	70
3.3.2.3	Gewicht	72
3.3.2.4	Echokardiographische Untersuchung	73
3.3.3	Histologie	76
3.3.3.1	Infarktgröße.....	76
3.3.3.2	Ausdünnungsverhältnis.....	80
3.3.3.3	Expansionsindex	81
3.3.4	Immunhistochemie	82
3.3.4.1	Von-Willebrand-Faktorfärbung	82
3.3.4.2	Aktinfärbung.....	85

4	Diskussion	88
4.1	Einleitung der Diskussion	88
4.2	Diskussion der Ergebnisse der in vitro Versuche	89
4.2.1	Diskussion der Ergebnisse der Zellkultur	89
4.2.2	Diskussion der Ergebnisse der Durchflußzytometrie (FACS).....	90
4.2.3	Diskussion der Ergebnisse der Morphologie, des Wachstumsverhaltens und des Angiogeneseassays	92
4.3	Diskussion des Versuchsaufbaus.....	93
4.4	Diskussion der in vivo erhobenen Ergebnisse.....	95
4.4.1	Mortalität und Komplikationen	95
4.4.2	Echokardiographie	95
4.5	Diskussion der histologischen Ergebnisse	97
4.5.1	Infarktgröße.....	97
4.5.2	Ausdünnungsverhältnis und Expansionsindex.....	98
4.5.3	Angiogenese	104
4.6	Zusammenfassung der Diskussion	105
5	Zusammenfassung	107
6	Summary	109
7	Literaturverzeichnis	110
8	Tabellenverzeichnis	127
9	Abbildungsverzeichnis	128
10	Abkürzungsverzeichnis	129
11	Danksagung	133
12	Lebenslauf	134

1 EINLEITUNG

Zum ersten Mal in der Geschichte der Menschheit übertrifft die Zahl der übergewichtigen und fettleibigen Menschen die Zahl derer, die an Unterernährung leiden.

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) leiden weltweit über 1 Milliarde Menschen an Übergewicht. Demgegenüber stehen 800 Millionen Hungernde. Diese Epidemie der Fettleibigkeit bringt einen Anstieg der mit ihr verbundenen Krankheiten mit sich. Dazu zählen Diabetes Typ II, bestimmte Krebserkrankungen, und im Besonderen der Komplex der kardiovaskulären Erkrankungen, die Bluthochdruck, Schlaganfälle, Herzinfarkt und chronisches Herzversagen beinhalten (POPKIN, 2006). Laut Statistik der WHO liegen weltweit kardiovaskuläre Erkrankungen auf Platz 2 der Todesursachen für Männer zwischen 15 und 59 und auf Platz 1 für Männer und Frauen über 60 (WHO, 2003).

Andererseits hat sich das Verständnis der Pathophysiologie der Atherosklerose enorm weiterentwickelt. Bis in die 70er Jahre des letzten Jahrhunderts war der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die Verbindung zwischen Hypercholesterinämie und Atherombildung gesetzt worden, in den 80er Jahren wurde das Augenmerk auf Wachstumsfaktoren und proliferierende glatte Muskelzellen gelenkt und aus der Verbindung beider Erkenntnisse entwickelte sich das Konzept des Atheroms als Friedhof extrazellulärer Lipide, eingekapselt in eine Schicht proliferierender glatter Muskelzellen. Im letzten Jahrzehnt stellte sich dann heraus, dass es sich bei Atheromen nicht um blande Läsionen handelt, sondern dass Entzündungsprozesse und die Immunantwort des Körpers zu einem wesentlichen Teil an deren Entwicklung beteiligt sind (LIBBY, 2002). Neueste Studien berichten, dass eine Dysfunktion des Endothels sowie dessen inflammatorische Aktivierung, aber auch die Aktivierung von Blutzellen, wie z.B. Thrombozyten und Leukozyten, Vorstufen zur Atherombildung darstellen (MASSBERG et al. , 2002 und THEILMEIER et al. , 2002).

Und auch im Bereich der Therapie sind einige Fortschritte zu verzeichnen:

Vor allem die Revaskularisation der Koronargefäße ist durch die perkutane transluminale Angioplastie mit Hilfe von Ballonkathetern und anschließender Stentimplantation verbessert worden ebenso wie die medikamentelle Prophylaxe durch HMG-CoA-Reduktasehemmer (HRISTOV und WEBER, 2006). Doch bis jetzt

fehlt es an Mitteln die ventrikuläre Funktion nach einem Myokardinfarkt wieder herzustellen und so die Lebensqualität und –erwartung der Patienten zu steigern. Mit der Entdeckung der endothelialen Vorläuferzellen um die Jahrtausendwende schien dieses Ziel erreichbar zu werden (ASAHARA et al. , 1997). Viele Studien präklinische, wie klinische wurden auf diesem Gebiet durchgeführt, doch mit sehr unterschiedlichem Erfolg. Während einige Studien sehr positive Ergebnisse mit der Zelltherapie vorwiesen, fanden andere nur geringe oder keine Verbesserung der Herzleistung (ASSMUS et al. , 2002 und JANSSENS et al. , 2006). Neueste Veröffentlichungen berichten davon, dass durch verschiedene Kultivierungsmethoden verschiedene Zellpopulationen gewonnen werden, die sich vor allem in ihrer Proliferationsfähigkeit und Langlebigkeit unterscheiden (GULATI et al. , 2003 und HUR et al. , 2004 und YOON et al. , 2005). In dieser Studie sollen Zellen durch verschiedene Kultivierungsverfahren expandiert werden und hinsichtlich ihrer in vitro-Eigenschaften, aber auch ihres therapeutischen Potentials in einem Myokardinfarktmodell in der Nacktratte untersucht werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Endothelzellen

Im 19ten Jahrhundert entdeckte von Recklinghausen, dass es sich bei Blutgefäßen nicht nur um Hohlräume im Gewebe handelt, sondern dass sie mit Zellen ausgekleidet sind. Es dauerte allerdings noch bis zu den Studien von PALADE und GOWAN in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts, bis erkannt wurde, dass das Endothel ein dynamisches, disseminiertes und heterogenes Organ ist, das lebenswichtige sekretorische, synthetisierende, metabolische und immunologische Funktionen erfüllt (FISHMAN, 1982 und MAJNO, 1992).

Endothelzellen kleiden jedes Blutgefäß in jedem Organsystem im Körper aus. Selbst die Wände dickerer Blutgefäße sind durchzogen von feinen Vasa vasorum, die Endothel besitzen. Endothelzellen regulieren den Zufluss von Nährstoffen, vielen verschiedenen biologisch aktiven Molekülen und den Blutzellen selbst. Diese Torhüterfunktion des Endothels entsteht durch das Vorhandensein membran-gebundener Rezeptoren für zahlreiche Moleküle einschließlich Proteine (z.B. Wachstumsfaktoren, koagulatorische und antikoagulatorische Proteine), Lipidtransportpartikel (z.B. Low Density Lipoprotein = LDL), Stoffwechselprodukte (z.B. NO und Serotonin) und Hormone (z.B. Endothelin-1) ebenso wie durch spezielle Verbindungsproteine und Rezeptoren, die das Zell-Zell- und Zell-Matrix-Zusammenspiel regeln (CINES et al. , 1998).

Doch Endothelzelle ist nicht gleich Endothelzelle. Es bestehen funktionelle Unterschiede zwischen den Endothelzellen der großen Blutgefäße und denen der Mikrogefäße. Große Blutgefäße besitzen eine Schicht glatter Muskelzellen, deren Kontraktion und Relaxation die Höhe des Blutdrucks beeinflusst. Kapillaren hingegen sind nur grobmaschig von Perizyten umgeben, um dort den Gas- und Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe zu ermöglichen (KUMAR et al. , 1987).

Welche Moleküle diffundieren können, hängt vom Typ des Endothels ab. In kontinuierlichem Endothel gibt es keine Verbindung zwischen der luminalen und der gewebeseitigen Plasmamembran, außer an den Grenzen zur nächsten Zelle. Die Zell-Zell-Verbindungen bestehen aus Tight Junctions. Dies verhindert die freie Diffusion hydrophiler Moleküle und bietet einen hohen elektrischen Widerstand, wie es z.B. im Gehirn für die Blut-Hirn-Schranke notwendig ist (WOLBURG et al. , 1994).

SCHRIFTTUM

Diskontinuierliches (oder sinusoidales) und gefenstertes Endothel besitzt Fenestrae, Lücken oder Poren, die den Stoffaustausch ermöglichen. Bei diskontinuierlichem Endothel besitzt auch die Basalmembran Lücken, während sie bei gefensterter Endothel intakt ist. In der Leber, der Milz und im Knochenmark ist das Endothel diskontinuierlich und in den Zotten des Darms, endokrinen Drüsen und den Glomerula der Niere findet man gefenstertes Endothel, das durch seine selektive Permeabilität eine effiziente Absorption, Sekretion und Filtration gewährleistet (DEJANA, 1996).

Die Endothelröhren sind immer von einer Basalmembran umgeben, die vor allem Kollagen IV und Laminin enthält (CARMELIET, 2003).

2.1.1 Aufbau der Endothelzelle

Die Endothelzelle ist prinzipiell wie jede andere Zelle gebaut, verfügt aber zusätzlich über verschiedene Strukturen aus kontraktilen Proteinen. Das kortikale Netz (Cortical Web) innerhalb der Zellmembran gibt der Zelle Gestalt und Elastizität. Es reagiert auf steigenden intravaskulären Druck mit zunehmender Versteifung. Verschiedene Membranproteine sind darin verankert, wie z. B. Annexine, E-Selektine und Cadherine, welche die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten beeinflussen.

Das Aktinfilamentsystem des Zwischenzellraums (Junction-associated Actin Filament System) kann durch Zusammenziehen und Entspannen die Größe des Interzellulär-raums beeinflussen und damit den Austausch von Stoffen zwischen dem Blut und dem subendothelialen Raum. Entzündungsmediatoren, Sauerstoffradikale, Thrombin, Platelet activating factor (PAF) und steigende Kalziumkonzentration durch Ischämie, ATP-Erschöpfung und andere toxische Substanzen wirken lockernd auf das Filamentsystem und verändern so die endotheliale Permeabilität (SCHNITTLER et al. , 2001).

Belastungsfasern (Stress Fibers) verlaufen in allen Richtungen durch das Zytoplasma der Endothelzelle und ähneln in ihrem Aufbau den Aktin-Myosinfilamenten der quergestreiften Muskulatur. Sie können sich kontrahieren und so die Form der Zelle an die mechanischen Belastungen des Blutstroms anpassen. Bei schnellerem Blutfluss vergrößern sich die Scherkräfte und die Zelle plattet sich in Ausrichtung des Blutstroms ab (SQUIRE et al. , 2001).

Die Zellmembran enthält außerdem unterschiedliche lipidreiche Bereiche, die Caveolae, die dem Stoffaustausch zwischen vaskulärem und zellulärem Kompartiment dienen. Wird dieser durch Toxine oder vasoaktive Substanzen gestört, kommt es zu Ödembildung (MINSHALL et al. , 2003).

2.1.2 Das Endothel als auto- und endokrines Organ

Das Endothel produziert eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle, sowohl Agonisten als auch deren Antagonisten, die zur Homöostase notwendig sind. Dazu gehören Vasodilatoren und Vasokonstriktoren, Prokoagulanzen und Antikoagulanzen, entzündungsfördernde und –hemmende, fibrinolytische und antifibrinolytische, oxidative und antioxidative Substanzen. Dabei überwiegen im physiologischen, ungestörten Zustand, mit bestehendem Stimulus des laminaren Blutstroms, die Produktion der vasodilatatorischen, antikoagulatorischen, entzündungshemmenden und fibrinolytischen Substanzen. Wohingegen als Antwort auf Traumata, Mikroorganismen, Toxine und andere Noxen, welche die Erhaltung des intravaskulären Volumens und der Sauerstoffversorgung bedrohen, die Endothelzellen in einen aktivierten Zustand übergehen, der die Produktion der vasokonstriktorischen, koagulatorischen, entzündungsfördernden Substanzen begünstigt (CINES et al., 1998).

2.1.2.1 Homöostase des Gefäßtonus

Zu den potentesten Vasodilatoren zählt das Stickstoffmonoxid (NO). Es ist ein sehr kleines, lipophiles Molekül, das leicht Zellmembranen passieren kann. Gelangt es zu glatten Muskelzellen, verursacht es eine cGMP-gekoppelte Hemmung der Kalziumkanäle, die zur Relaxation des Muskels und damit zu Vasodilatation führt. NO wird in den Endothelzellen durch Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin durch die NO-Synthase (NOS) gebildet (STAMLER et al. , 1992).

Die in den Endothelzellen vorkommende Isoform eNOS ist durchwegs aktiv, kann aber noch zusätzlich durch rezeptorabhängige Agonisten wie Thrombin, Bradykinin und Substanz P sowie durch die einwirkenden Scherkräfte des Blutflusses stimuliert werden (TOPPER et al. , 1996). Der Anstieg der eNOS-Aktivität durch höhere Scherkräfte trägt zu dem Phänomen der durch steigenden Blutfluss vermittelten Vasodilatation bei. Dies ist ein wichtiger autoregulatorischer Mechanismus, durch den die Durchblutung als Reaktion auf Bewegung ansteigt (COOKE und TSAO,

1994). Die eNOS wird jedoch sowohl in der Menge als auch in der Dauer der Synthese von NO weit übertroffen durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die in Endothelzellen als Reaktion auf Entzündungsmediatoren gebildet wird (LOSCALZO und WELCH, 1995).

NO hat auch antithrombotische Eigenschaften. Es verhindert die Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation (MENDELSON et al. , 1990).

Des Weiteren vermindert NO die vaskuläre Permeabilität, die Synthese der Adhäsionsmoleküle für Leukozyten und Monozyten sowie die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen. Dagegen unterstützt es die Migration und Proliferation der Endothelzellen und die Fibrinolyse. Somit besitzt NO viele antiatherogene Eigenschaften (COOKE und TSAO, 1994).

Als Gegenspieler können Endothelzellen Angiotensin-I (ATI) mit Hilfe des Angiotensin-Convertierenden-Enzyme (ACE) durch Hydrolysierung zu Angiotensin-II (ATII) umwandeln. Dieses wirkt nicht nur vasokonstriktorisch, sondern auch prothrombotisch und antifibrinolytisch. Es stimuliert die Freisetzung von Aldosteron und antidiuretischem Hormon (ADH) und wirkt proliferativ auf die glatten Muskelzellen der Gefäßwände. Außerdem stimuliert es die Bildung von inflammatorischen Zytokinen und des Endothelin-Convertierenden-Enzyme. Dieses reduziert Proendothelin zu Endothelin-I (ET), welches wiederum ein sehr potenter Vasokonstriktor ist (DZAU, 1987). Die vasokonstriktorische Wirkung entsteht durch Bindung an den ET_A-Rezeptor der glatten Muskelzellen. Bindung an den ET_B-Rezeptor der Endothelzellen führt zu Freisetzung von NO, so dass die Wirkung von Endothelin-I nur von kurzer Dauer ist (LEVIN, 1995).

Ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen NO und ATII sorgt für die vaskuläre Homöostase. Sie wird nicht nur dann gestört, wenn eine der beiden Substanzen übermäßig produziert wird, sondern auch durch verminderte Produktion der anderen. Weitere vom Endothel produzierte vasopressorisch aktive Substanzen sind das Prostazyklin (PGI₂) als Vasodilatator und Hemmstoff der Thrombozytenaggregation, sowie der plättchenaktivierende Faktor (PAF), der sowohl vasodilatatorisch als auch -konstriktorisch wirken kann, je nach Konzentration und Lokalisation des Gefäßes (CINES et al., 1998).

SCHRIFTTUM

	Effekt	Andere Effekte	Sekretion	Verbindung	Vorstufe
NO (Stickstoffmonoxid)	Vasodilatation	Hält den basalen Gefäßtonus aufrecht, verhindert Leukozytenadhäsion, verhindert Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation, verhindert Proliferation und Migration glatter Muskelzellen	Parakrin, fortwährend und induziert durch Thrombin, ADP, Bradykinin, Substanz P, Muskarinagonisten, Stress durch Scherkräfte	Gasförmiges freies Radikal	L-Arginin
PGI₂ (Prostazyklin)	Vasodilatation	Verzögert Thrombozytenaggregation und -ablagerung	Parakrin, induziert an Stellen mit Verwirbelungen im Blutfluss	Eikosanoid	Arachidonsäure
Angiotensin II	Vasokonstriktion	Wirkt prothrombotisch, antifibrinolytisch, mitogen auf glatte Muskelzellen, stimuliert Bildung inflamm. Zytokine und ECE	Parakrin, induziert	Peptid mit 8 Aminosäuren	Angiotensin I durch ACE
PAF (Plättchenaktivierender Faktor)	Vasokonstriktion	Fördert Leukozytenadhäsion auf der Zelloberfläche	Juxtakrin, induziert	Phospholipid	Arachidonsäure
ET-1 (Endothelin-1)	Vasokonstriktion	Wirkt mitogen auf glatte Muskelzellen, verändert die Wirkung anderer Substanzen	Parakrin, induziert durch Hypoxie, Stress durch Scherkräfte und Ischämie	Peptid mit 21 Aminosäuren	Preproendothelin-1 (203 Aminosäuren)

Tabelle 1. Vasoregulatorische Substanzen, die von Endothelzellen synthetisiert oder aktiviert werden

ADP: Adenosindiphosphat; ACE: Angiotensin Converting Enzyme; ECE: Endothelin Converting Enzyme

2.1.2.2 Homöostase der Hämostase

Im ruhenden Endothel werden ebenso pro- wie antikoagulatorische Wirkstoffe gebildet. Unter normalen Umständen überwiegen die antikoagulatorische Eigenschaften, das System ist jedoch jederzeit bereit umzukippen, um auf den Notfall einer Gefäßverletzung zu reagieren.

Eigenschaften ruhenden Endothels:

Unstimulierte Thrombozyten können nicht an die Endothelzellmembran adhären. Doch unter Einfluss von Entzündungsmediatoren bilden Thrombozyten und Endothelzellen Selektine und Integrine aus, die es den Thrombozyten ermöglichen an der Endothelwand entlang zu rollen und sich schließlich fest daran zu verankern (FRENETTE et al. , 1995).

PGI₂, welches bei Einfluss von Thrombin aus Arachidonsäure gebildet wird, verhindert die Aggregation von Thrombozyten. Die Matrix, welche die Endothelzellen umgibt, enthält Heparansulfat und Glycosaminoglycane (GAGs), die als Katalysator auf Antithrombin III und Heparin Cofactor II wirken. Beide Substanzen formen zusammen mit Thrombin und Faktor Xa inaktive Protease-Antiprotease-Komplexe (MARCUM und ROSENBERG, 1984).

Endothelzellen verfügen über einen Rezeptor für Thrombin, das Thrombomodulin. Durch Bindung an ihn verliert das Thrombin seine prokoagulatorische Fähigkeiten (Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, Plättchenaktivierung, Aktivierung der Faktoren V, XIII) und Protein C wird aktiviert. Aktiviertes Protein C (APC) kann mit einem Cofaktor (Protein S auf Thrombozyten und in Endothelzellen) die Faktoren Va und VIIIa proteolytisch deaktivieren. Das an Thrombomodulin gebundene Thrombin wird abgebaut (ESMON, 1995).

Auch die exogene Aktivierung der Gerinnungskaskade wird unterbunden. Endothelzellen exprimieren Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), der an den Faktor X bindet und so den Faktor III/VIIa/Xa-Komplex inaktiviert (JESTY et al. , 1996). Unter der Einwirkung von Thrombin, Histamin und Bradykinin produzieren Endothelzellen Tissue Plasminogen Activator (TPA), der Plasminogen zu Plasmin spaltet. Fängt Plasmin an Fibrinklumpen abzubauen, so entstehen Fibrindegradationsprodukte (FDP), die inaktivierend auf Thrombin und Thrombozyten wirken (ERICKSON et al. , 1985).

Hämostatische Eigenschaften des aktivierten Endothel:

Selbst in Abwesenheit einer Gefäßverletzung kann die Gerinnungskaskade durch Aktivierung der Endothelzellen in Gang gesetzt werden. Der Gewebefaktor (Tissue Factor: TF) spielt eine entscheidende Rolle darin Endothelzellen von einer anti-koagulatorischen Oberfläche in eine prokoagulatorische umzuwandeln. Unter physiologischen Bedingungen wird dieser nicht von Endothelzellen, sondern von glatten Muskelzellen und Fibroblasten exprimiert. Wirken aber Entzündungsstimuli (z.B. Endotoxine, bakterielle Lipopolysaccharide, Tumornekrosefaktor, Interleukin 1, Immunkomplexe) auf die Endothelzellen oder Hypoxie und Scherkräfte, so beginnen die Endothelzellen TF zu synthetisieren (NEMERSON und NOSSEL, 1982). Dieser wird jedoch nicht ins Blut ausgeschüttet, sondern in Vesikeln in den Endothelzellen gespeichert (RYAN et al. , 1992). Statt dessen ist es den aktivierten Endothelzellen selbst möglich die Faktoren VII und IX zu binden und die Koagulation auszulösen (STERN et al. , 1985).

Die gleichen Stimuli wirken sich negativ auf die Protein C- und Thrombomodulinbildung der Endothelzellen aus (ESMON, 1995).

Wirkt Thrombin auf Endothelzellen ein, werden sie stimuliert den in den Weibel-Palade-Bodies gespeicherten, von-Willebrand-Faktor (vWF) auszuschütten. Freier vWF fördert Thrombozytenadhäsion und die Gerinnung.

Aktivierte Endothelzellen besitzen einen weiteren Rezeptor für Thrombin, den Protease-Activated-Receptor-1 (PAR-1). Eine Bindung verändert die Expressionseigenschaften vieler thrombotischer und antithrombotischer Moleküle, wie z.B. TF, NO, PAF und PGI₂, und lockert den Zell-Zell-Kontakt. Thrombin wirkt außerdem mitogen auf Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen (GARCIA et al. , 1995).

Die Bindung von Fibrin fördert Endothelzellproliferation und –migration, sowie Leukozytenadhäsion und die Inhibition der PGI₂-Synthese (CINES et al., 1998).

2.1.2.3 Inflammatorischer Eigenschaften des aktivierten Endothels

Werden Endothelzellen durch Entzündungsmediatoren aktiviert, exprimieren sie Adhäsionsmoleküle und produzieren ihrerseits Mediatoren, welche die Entzündungsreaktionen des Körpers anregen. Zu den wichtigsten Mediatoren der Aktivierung von Endothelzellen zählen Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor (TNF).

Solche Stimuli induzieren die Produktion von weiteren Zytokinen in den Endothelzellen. Zum Teil wirken diese proinflammatorisch, besonders diejenigen, die Leukozyten rekrutieren und aktivieren. IL-8 und Gro α gehören zu einer Gruppe von Mediatoren, die durch 4 Cys-Reste charakterisiert wird. Sie wirken chemotaktisch auf neutrophile und basophile Granulozyten sowie auf Lymphozyten.

Endothelzellen produzieren auch das Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1), das vor allem auf Monozyten wirkt und dessen Produktion z.B. durch oxidiertes Low Density Lipoprotein angeregt werden kann (MANTOVANI et al. , 1992).

Die Invasion der Leukozyten in das betroffene Gewebe läuft in mehreren Stufen ab. Zuerst rollen sie an der Gefäßwand entlang, werden langsamer, bis sie schließlich gebunden werden und in das Gewebe transmigrieren können. Um das zu ermöglichen sind verschiedene Adhäsionsmoleküle notwendig. Auf den Endothelzellen gehören dazu die Gruppe der Selektine und die Gruppe der interzellulären Adhäsionsmoleküle (Intercellular Adhesion Molecules, ICAM), die mit Immunglobulinen verwandt sind (CARLOS und HARLAN, 1994).

Selektine verfügen an dem von der Membran am weitesten entfernten Ende über eine Domäne, die Kohlenhydrate erkennt (Carbohydrate Recognition Domain, CDR). Sie bindet an Leukozyten und stellt den ersten Kontakt zwischen ihnen und den Endothelzellen her. Dadurch rollen die Leukozyten an der Gefäßwand entlang und feste Bindungen sowie die Transmigration werden ermöglicht (MICHIELS, 2003).

E-Selektin ist ein endotheliales Glykoprotein, das die Adhäsion von Neutrophilen, Monozyten, eosinophilen Granulozyten und einiger Lymphozyten unterstützt. Es wird von den Endothelzellen für maximal 48 h nach Aktivierung durch bakterielle Endotoxine und die Entzündungsmediatoren IL-1 und TNF biosynthetisiert und exprimiert (CARLOS und HARLAN, 1994).

P-Selektin wird von Endothelzellen und Thrombozyten fortwährend synthetisiert und in Granula gespeichert. Es kann innerhalb von Minuten zur Zelloberfläche verlagert

werden als Antwort auf Thrombin, Histamin, Komplementfaktoren und andere. Es unterstützt die Bindung von Neutrophilen, Monozyten und einiger Lymphozyten.

L-Selektin wird fortwährend von Leukozyten exprimiert und spielt eine Rolle bei der Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten zum Entzündungsgeschehen (EBNET und VESTWEBER, 1999).

Als Liganden für Selektine dienen Kohlenhydrate, die Bestandteil von Glykolipiden oder Glykoproteinen auf der Zelloberfläche sind, wie z.B. das Tetrasacharidsialyl Lewis x (sLex), das von Neutrophilen, Monozyten und einigen Lymphozyten exprimiert wird. Es bindet vor allem an E-Selektin, mit geringerer Affinität aber auch an P- und L-Selektin. Auch Proteine, die auf der Oberfläche mehrere Kohlenhydrate besitzen, wie z.B. Muzine, können als Liganden für P- und L-Selektine dienen (BEVILACQUA et al. , 1994).

Endothelzellen exprimieren auch eine Reihe von Molekülen, die der Immunglobulin (Ig)-familie angehören und die bei der festen Bindung der Leukozyten an die Gefäßwand, welche die Transmigration ermöglicht, mitwirken. An der Leukozytenadhäsion und -diapedese sind ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD 102), VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule, CD 106) und PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule, CD31) beteiligt (CINES et al., 1998).

ICAM-1 ist ein Glykoprotein, das fünf Ig-Domänen enthält und sowohl auf hämatopoetischen als auch nicht-hämatopoetischen Zellen gefunden wird. Von Endothelzellen wird es unter normalen Umständen in geringen Mengen exprimiert, kann jedoch durch Endotoxine, IL-1 und TNF für mehrere Tage hochreguliert werden.

ICAM-2 enthält zwei Ig-Domänen und wird von Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten exprimiert. Die Expression auf Endothelzellen erfolgt fortwährend und wird nicht durch Entzündungsmediatoren beeinflusst (BEVILACQUA et al., 1994). Endotheliale ICAM-1 und ICAM-2 unterstützen die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten durch Bindung an drei unterschiedliche β 2-Integrine. Diese bestehen aus zwei Untereinheiten: einer α -Kette, in der sie sich unterscheiden (α L, α M, α X) und einer gemeinsamen β -Kette. Sie werden als CD11a/CD18 (Leukozytenfunktionsantigen-1 = LFA-1), CD11b/CD18 (Macrophage Antigen Alpha = Mac-1) und CD11c/CD18 (CR4) bezeichnet. Granulozyten und Monozyten exprimieren alle drei β 2-Integrine, Lymphozyten nur LFA-1. LFA-1 bindet an ICAM-1 und ICAM-2. Mac-1 wird auf Granulozyten und Monozyten durch IL-8 hochreguliert und bindet an ICAM-1 (LUSCINSKAS und LAWLER, 1994). Die Bindungen benötigen eine vorherige

Aktivierung der Integrine, wie sie z.B. nach der Bindung von Selektinen an Kohlenhydratligenanden gegeben ist (CARLOS und HARLAN, 1994).

VCAM-1 wird vor allem von Endothelzellen exprimiert und kann, ähnlich wie ICAM-1, durch Endotoxine, IL1 und TNF für mehrere Tage hochreguliert werden. Es unterstützt die Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten durch Bindung an $\alpha 4\beta 1$ -Integrin (CD49d/CD29, VLA4), das von neutrophilen Granulozyten nicht exprimiert wird (CARLOS und HARLAN, 1994).

PECAM wird sowohl von Endothelzellen als auch von Thrombozyten und den meisten Leukozyten exprimiert und kann Bindungen mit sich selbst eingehen. Auf Endothelzellen kommt es vor allem an der Grenze zwischen den Zellen vor und trägt zur Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität bei sowie zur Diapedese von Leukozyten durch die Gefäßwand (MULLER et al. , 1993).

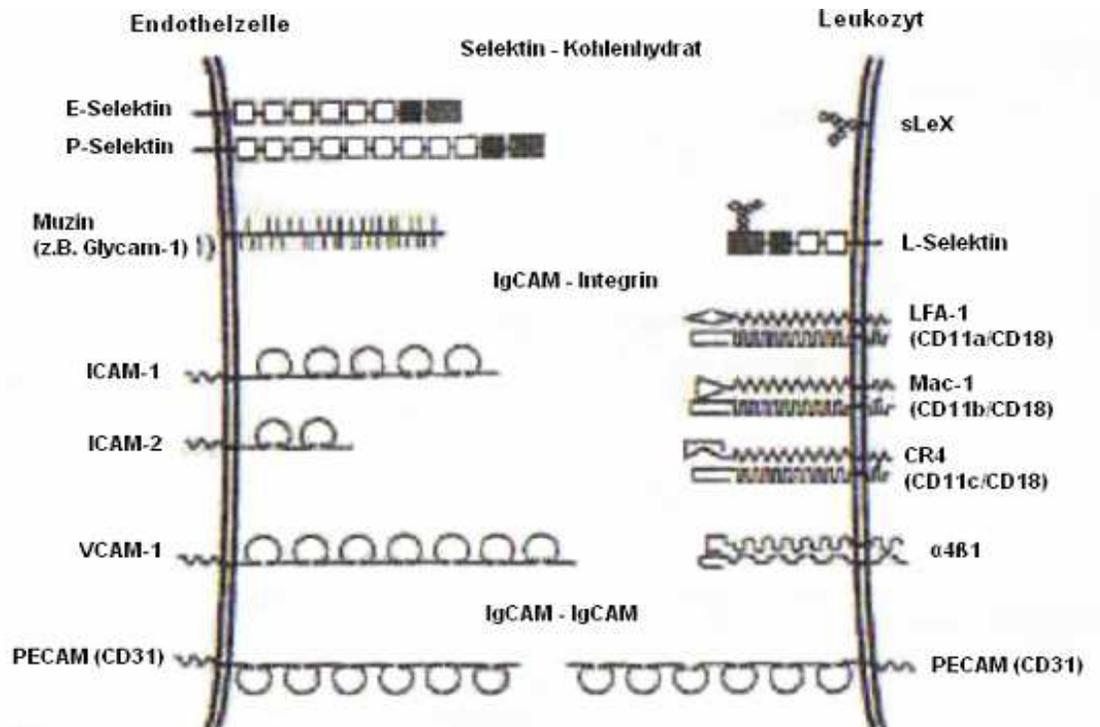


Abbildung 1. Oberflächenmoleküle der Endothelzell-Leukozyten-Adhäsion (modifiziert nach BEVILACQUA et al., 1994)

2.1.3 Endotheliale Dysfunktion

Intaktes gesundes Endothel, das durch den laminaren Blutstrom stimuliert wird, bietet eine Oberfläche, die antikoagulativ und fibrinolytisch ist, und die verhindert, dass Leukozyten und Monozyten in gesundes Gewebe einwandern. Bei steigendem Blutstrom sorgt es für die Vasodilatation des Gefäßes, und es verhindert die Proliferation von glatten Muskelzellen der Intima. Kommt es zu einer funktionellen Störung der Endothelzellen, so dass sie diese Aufgaben nicht mehr erfüllen können, entsteht in einem chronischen Pathogeneseprozess Atherosklerose. Verschiedene Faktoren sind bekannt, die das Risiko einer Erkrankung erhöhen (ESPER et al. , 2006).

Den meisten der Risikofaktoren gemeinsam ist, dass sie in der Gefäßwand die Produktion von reaktiven Oxidantien (Reactive Oxygen Species = ROS) anregen. Sie werden auch im normalen aeroben Stoffwechsel gebildet und der Körper verfügt über natürlich auftretende Antioxidantien wie z. B. die Enzyme Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase, Vitamin E und Vitamin C. Entstehen jedoch ROS im Überfluss, kann der Körper ihre Bildung nicht mehr ausgleichen und oxidativer Stress wirkt auf die Zellen, mit der Folge, dass das Endothel aktiviert wird. Es verkehrt sich von einer antikoagulatorischen, antiinflammatorischen Umgebung ins Gegenteil. Zu den unerwünschten Wirkungen der ROS gehören die oxidative Modifikation von DNA, Lipidoxidation, Modifikation von Proteinen und Aktivierung redoxsensitiver, proinflammatorischer Gene, wie z. B. VCAM-1, ICAM-1 und MCP-1 (NICKENIG und HARRISON, 2002).

Hinzu kommt, dass Tetrahydrobiopterin (BH₄) durch oxidativen Stress zerstört wird. BH₄ ist ein Coenzym für die endotheliale Nitric Oxide Synthase (eNOS) bei der Produktion von NO. Fehlt jedoch BH₄, wird die eNOS „entkoppelt“ und produziert statt NO Peroxynitrit (ONOO⁻) eine weitere hochoxidative Substanz. Dadurch wird der oxidative Stress weiter gesteigert, und die vasodilatative Wirkung von NO geht verloren (FORSTERMANN, 2006).

2.1.4 Atherosklerose

Atherosklerotische Läsionen (Atherome) sind asymmetrische Verdickungen der Intima von Arterien. Sie bestehen aus Zellen (v.a. Makrophagen, T-Zellen, glatten Muskelzellen), Bindegewebsbestandteilen, Lipiden und Zelltrümmern (HANSSON, 2005). Zur Bildung eines atheromatösen Plaques kommt es, wenn Low Density Lipoproteine (LDL) sich aufgrund einer Hyperlipidämie in die Gefäßwand einlagern und dort oxidiert werden (LDL-ox)(NAVAB et al. , 1996). LDL-ox ist hochgradig immunogen, wirkt zytotoxisch auf Endothelzellen und kann in der arteriellen Intima zur Freisetzung von Phospholipiden führen. Diese aktivieren Endothelzellen, so dass sie Entzündungsmediatoren (v.a. MCP-1) produzieren, welche Monozyten und T-Zellen anlocken und Adhäsionsmoleküle (v.a. V-CAM 1) exprimieren, die eine Bindung ermöglichen. Migrieren die Monozyten in die Intima, wandeln sie sich unter dem Einfluss von M-CSF in Makrophagen um und nehmen als solche die LDL-ox auf. Durch die Akkumulation der Lipidtröpfchen im Zytoplasma werden die Makrophagen zu Schaumzellen, dem Hauptbestandteil der Fettstreifen. Sie stellen die erste Stufe in der Bildung eines atheromatösen Plaques dar (LEITINGER, 2003 und LIBBY, 2002).

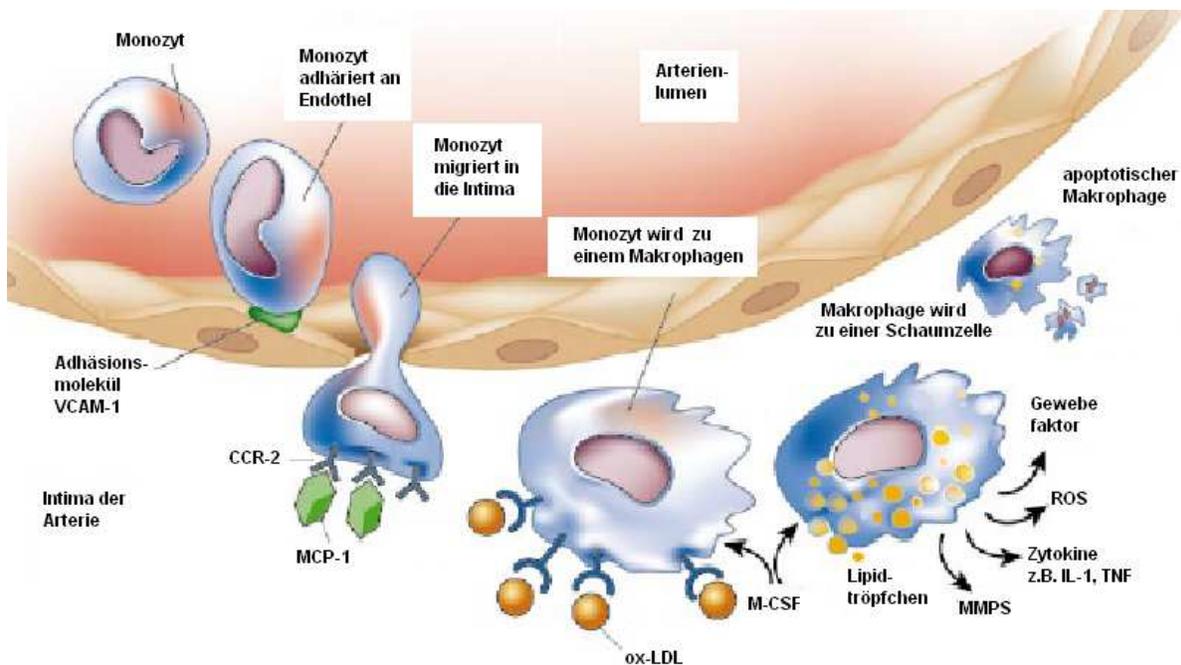


Abbildung 2. Die Rolle der Monozyten in der Entwicklung der Atherosklerose (modifiziert nach LIBBY, 2002)

Die Schaumzellen produzieren nun eine Vielzahl von proinflammatorischen Substanzen, unter ihnen ROS, TF, Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sowie IL-1 und TNF α , die auch von T-Zellen produziert werden. IL-1 und TNF α locken weitere Entzündungszellen an. Gleichzeitig verstärken sie die Bindung von LDL an das Endothel und die glatten Muskelzellen, so dass mehr LDL eingelagert wird. So kann ein Teufelskreis entstehen, durch den immer mehr Lipoproteine und Entzündungszellen in die Gefäßwand eingelagert werden, bis diese in der Mitte einen nekrotischen Kern bilden (ROSS, 1999).

Auffällig ist, dass atherosklerotische Läsionen vor allem an Stellen entstehen, an denen es zu Verwirbelungen im Blutfluss kommt, wie z.B. Bifurkationen und Aufzweigungen. Laminare Scherkräfte wirken positiv auf die Bildung einiger atheroprotektiver Substanzen, wie z.B. der antioxidativen Superoxiddismutase. Auch die Produktion von NO, das die Expression von VCAM-1 inhibiert, wird durch laminaren Blutfluss gesteigert (TOPPER und GIMBRONE, 1999).

Die Entzündungszellen produzieren Wachstumsfaktoren, welche die glatten Muskelzellen anregen, in die Läsion zu migrieren und überreichlich extrazelluläre Matrix zu synthetisieren, die eine fibrinöse Kappe über dem Plaque bildet. Einige Zeit kann das Gefäß die graduelle Wandverdickung noch durch Dilatation ausgleichen, so dass das Lumen nicht beeinträchtigt wird (ROSS, 1999). Entsteht aber ein plötzlicher rascher Anstieg der Größenzunahme, kommt es bei einer partiellen Verlegung des Lumens zu einer Minderdurchblutung, wie es z.B. bei der Angina pectoris der Fall ist. Bei einer vollständigen Okklusion des Gefäßes kommt es sogar zur Ischämie und Nekrose, wie es z.B. beim akuten Myokardinfarkt vorkommt. Dies kann durch unterschiedliche Vorgänge ausgelöst werden: zum einen ist es möglich, dass eine oberflächliche Erosion des Plaques auftritt, die eine lokale Thrombusentstehung verursacht. Die Endothelzellen, die das Atherom bedecken, können durch die inflammatorischen Zytokine darin oder durch einen Angriff der aktivierten T-Zellen den Zelltod erleiden. Durch die LDL-ox werden sie zudem dazu angeregt MMPs zu bilden, die sie von der extrazellulären Matrix ablösen. Wird diese entblößt, kann sich dort ein Thrombus bilden (LIBBY, 2002).

Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass die fibrinöse Kappe, die den Plaque bedeckt, reißt. Die Gefahr besteht, wenn die Kollagenschicht, die der stärkste Anteil der Kappe ist, vorher durch entzündliche Prozesse im Inneren ausgedünnt wurde. Entzündungsmediatoren, wie z.B. Interferon- γ , inhibieren die Kollagenproduktion der

glatten Muskelzellen und MMP1, -8 und -13, die von Monozyten und Endothelzellen produziert werden, können Kollagen spalten. Je höher also der Anteil proinflammatorischer Zellen und Substanzen im Plaque, desto dünner ist die Fibrinkappe und damit auch die Gefahr, dass sie reißt und der hochthrombotische Inhalt frei wird. So entstehen ca. $\frac{3}{4}$ aller akuten Myokardinfarkte (HANSSON, 2005).

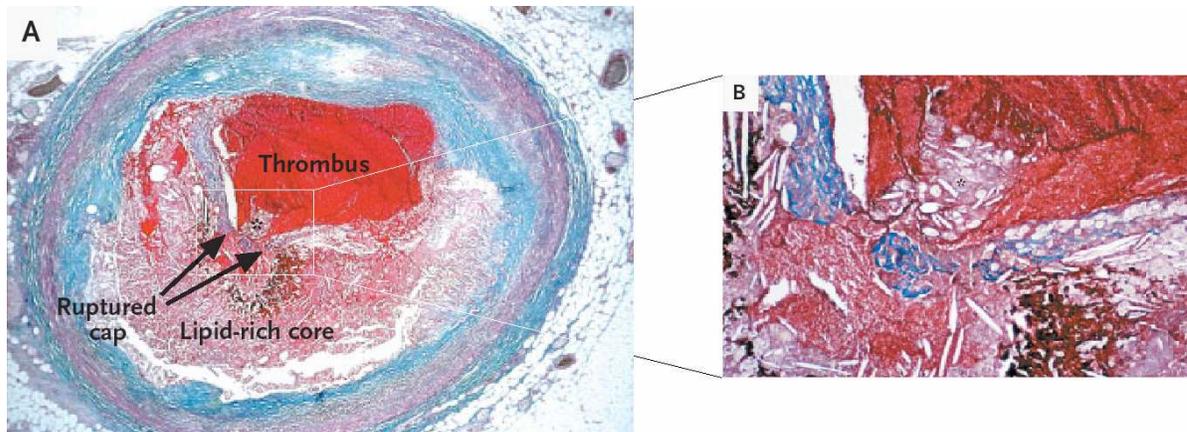


Abbildung 3. Thrombus verursacht durch ein rupturiertes Atherom

Die Stelle zwischen den Pfeilen bezeichnet die Ruptur, A: Querschnitt durch das Gefäß;
B: Detail Rupturstelle; Masson-Trichrom-Färbung (HANSSON, 2005)

2.2 Vaskularisation

2.2.1 Embryonale Vaskularisation

In der embryonalen Entwicklung ist das Blutgefäßsystem das erste Organsystem, das sich entwickelt. Aus dem Mesoderm wandern Zellen, angeregt durch das angrenzende Endoderm, Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in den Dottersack und bilden dort extraembryonale Blutinseln. Man unterscheidet äußere Zellen, Angioblasten, die sich abflachen und weiter entwickeln zu Endothelzellen, und innere Zellen, die sich abrunden und zu hämatopoetischen Stammzellen werden (PALIS et al. , 1995). Durch diese nahe Verwandtschaft der Zellen wurde die Vermutung begründet, dass sie eine gemeinsame Stammzelle, den Hämangioblasten, besitzen (BAILEY und FLEMING, 2003).

Den Vorgang der Gefäßbildung aus sich in situ zu Endothelzellen differenzierenden Angioblasten nennt man Vaskulogenese. Durch das Zusammenwachsen der Blutinseln und die Ausbildung eines Lumens darin entsteht ein primitives Netzwerk. Sprießen neue Kapillaren daraus und verzweigen sich, so nennt man das Angiogenese (RISAU, 1991).

Im Gegensatz zu den Angioblasten im Dottersack entwickeln sich die Angioblasten im Embryo ohne begleitende Entwicklung hämatopoetischer Zellen. Angioblasten aus der lateralen Mesodermplatte migrieren und bilden axial im Embryo präendotheliale strangartige Strukturen, aus denen sich dann Tubuli entwickeln. Diese bilden die Ausgangsformen für den Herzschlauch, die Aorta, die Dottersackvene und die Kardinalvenen. Daraufhin treten die extraembryonalen und die embryonalen Gefäße in Verbindung und die Vorläuferzellen der Blutzellen aus den Blutinseln des Dottersacks beginnen zu zirkulieren und sich zu differenzieren (FLAMME et al. , 1997). Der primitive Herzschlauch vereint sich mit den großen Gefäßen und beginnt sich zu kontrahieren (PATAN, 2000).

In Organen endodermalen Ursprungs, z.B. der Lunge, dem Pankreas und der Milz, entstehen Gefäße durch Vaskulogenese. Sind die Organe ektodermalen Ursprungs (z.B. die Nieren), werden sie durch Angiogenese vaskularisiert (PARDANAUD et al. , 1989).

Auch nach Einsetzen des Blutflusses wird das primitive Netzwerk noch oft umgestaltet, ehe es dem adulten Gefäßsystem gleicht. Gefäße werden zurückgebildet, der

Blutfluss wechselt die Richtung und es entwickeln sich Gefäße unterschiedlichen Kalibers. Etablieren sie sich als große Gefäße, werden sie mit glatten Muskelzellen und einer Lamina elastica interna umhüllt. Die dazu notwendigen Zellen sowie die Perizyten der Mikrogefäße werden durch Platelet Derived Growth Factor (PDGF) rekrutiert und zur Teilung angeregt (BECK und D'AMORE, 1997). Die Proliferationsrate der Endothelzellen, die während der gesamten Entwicklung hoch bleibt, ist dann aber beim Erwachsenen niedrig, bedingt durch den proliferationsinhibierenden Einfluss des transformierenden Wachstumsfaktors- β (Transforming Growth Factor = TGF- β)(D'AMORE und SMITH, 1993).

2.2.2 Vascular Endothelial Growth Factor

Der Stimulus zur Angiogenese wird durch Wachstumsfaktoren gegeben, die von den angrenzenden Perizyten und Lymphozyten freigesetzt werden. Zu diesen angiogenen Faktoren zählen der Acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF), der Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und die Thymidin Phosphorylase (TP), die direkt angiogen wirken, aber auch der Transforming Growth Factor β (TGF- β) und der Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), die indirekt wirken (ROBINSON und STRINGER, 2001). Diese Wachstumsfaktoren wirken jedoch nicht nur auf die Endothelzellen mitogen, sondern auch auf eine Vielzahl anderer Zellarten (THOMAS, 1996).

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist der einzige Wachstumsfaktor, der nur auf Endothelzellen wirkt. Er ist in der Angiogenese allgegenwärtig und spielt auch eine tragende Rolle in der Vaskulogenese, wie später noch besprochen werden soll (siehe 2. 3. 3 Mobilisierung der EPCs). Der Verlust des VEGF-Allels führt im Mausmodell zu schweren Entwicklungsstörungen des vaskulären Systems und schließlich zum Tod des Embryos zwischen dem 11. und 12. Tag (CARMELIET et al. , 1996). VEGF regt Endothelzellen zur Proliferation und Migration an und induziert die Expression von Proteasen, wie z.B. den urokinase-type und tissue-type Plasminogen Activator (uPA, tPA). Die Protease befreien die Endothelzellen aus ihren Bindungen und ermöglichen so deren Migration. Zudem erzeugen sie Spaltprodukte, die ihrerseits wieder angiogen wirken. VEGF erhöht auch die vaskuläre Permeabilität, so dass Plasmaproteine in das umliegende Gewebe austreten können. Außerdem fördert er das Überleben von Endothelzellen. Er kann von vielen verschiedenen Gewebszellen ausgeschieden werden, doch fast ausschließlich Endothelzellen exprimieren Rezeptoren für VEGF (ROBINSON und STRINGER, 2001).

VEGF ist eine homodimeres Glykoprotein, von dem 6 Isoformen bekannt sind. Die Isoformen VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃ und VEGF₁₈₉ sind weit verbreitet, dagegen scheinen die Isoformen VEGF₁₄₅ und VEGF₂₀₆ vor allem in der Plazenta vorzukommen. Die Isoformen unterscheiden sich in der Anzahl der Aminosäuren. Ihre Länge hat Einfluss auf die Bindungseigenschaften. (ANTHONY et al. , 1994). Mit zunehmender Länge, binden sie zunehmend stark an Heparin und an die extrazelluläre Matrix. So bindet VEGF₁₂ nicht an Heparin und ist frei beweglich, während VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ vollständig an die extrazelluläre Matrix gebunden sind. Sie können durch proteolytische Enzyme, wie z.B. uPA und tPA, aus ihrer Bindung gelöst

SCHRIFTTUM

und so aktiviert werden. Es existieren noch weitere Proteine, die VEGF stark ähneln. Platelet Derived Growth Factor (PDGF) enthält zu 20 % die gleichen Aminosäuren und Placenta Growth Factor (PIGF) sogar zu 53 %. VEGF-B (oder VEGF Related Factor) ähnelt PIGF und kommt vor allem im Herzen und in Skelettmuskeln vor. VEGF-C (oder VEGF Related Protein) und VEGF-D (oder c-fos-Induced Growth Factor) gleichen in der Aminosäuresequenz VEGF zu 30 %, und haben einen mitogenen Effekt auf Endothelzellen (ROBINSON und STRINGER, 2001).

Zwei homologe Rezeptoren, die VEGF binden, VEGFR-1 (oder FMS-like Tyrosin Kinase-1 = flt-1) und VEGFR-2 (oder Kinase Insert Domain Receptor = KDR und in der Maus fetale Leberkinase-1= flk-1), werden von Endothelzellen exprimiert. Die Bindung wird durch eine lange, extrazelluläre, immunglobulin-ähnliche Domäne, vermittelt. Außerdem besitzen sie eine kurze Domäne, die sich durch die Zellmembran erstreckt und einen intrazellulären Abschnitt, der eine Tyrosinkinase enthält (THOMAS, 1996). Lymphatisches Endothel verfügt noch über einen weiteren Rezeptor, VEGFR-3 oder Flt-4 (MUSTONEN und ALITALO, 1995).

Nicht allen VEGF-Isoformen und VEGF-ähnlichen Proteinen ist es möglich an alle Rezeptoren zu binden (siehe Tabelle 2). Nur die Aktivierung des VEGFR-2 erzeugt die mitogene und chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen. Aktivierung des VEGFR-1 dagegen scheint dafür verantwortlich zu sein, die Zellen zu Gefäßen zusammenzufügen (ROBINSON und STRINGER, 2001). Die Aktivierung von VEGFR-3 beeinflusst die Entscheidung, ob das Gefäß zu einer Arterie, einer Vene oder einem Lymphgefäß wird (CINES et al., 1998).

	VEGFR-1 (KDR)	VEGFR-2 (Flt-1)	VEGFR-3
VEGF	Bindung	Bindung	Keine Bindung
PIGF	Bindung	Keine Bindung	Keine Bindung
VEGF-B	Bindung	Keine Bindung	Keine Bindung
VEGF-C	Keine Bindung	Bindung	Bindung
VEGF-D	Keine Bindung	Bindung	Bindung

Tabelle 2. VEGF-Rezeptoren und ihre Bindungspartner

2.2.3 Angiogenese

Zellen benötigen Sauerstoff und Nährstoffe, deshalb sind sie nie weiter von einer Kapillare entfernt als 100-200 μm , dem Diffusionsabstand von Sauerstoff. Bricht die Versorgung ab, aktiviert die einsetzende Hypoxie den Hypoxia Inducible Transcription Factor (HIF) dadurch, dass der sauerstoffabhängige Abbau und die Inaktivierung der HIF- α -Untereinheit ausbleiben. Verbindet sich die α -Einheit mit der, bereits vorhandenen, β -Einheit, entsteht das funktionstüchtige Protein (WENGER, 2002). Es induziert die Expression angiogener Mediatoren wie z.B. VEGF, iNOS, PDGF und Angiopoetin-2 (Ang-2) in der hypoxischen Parenchymzelle. Auch Entzündungszellen wie Monozyten, Thrombozyten, Makrophagen, Mastzellen und andere Leukozyten produzieren Stoffe, die direkt oder indirekt die Angiogenese stimulieren (VEGF, Ang1, bFGF, TGF- β 1, PDGF, TNF- α , Hepatocyte Growth Factor (HGF), Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) und Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) (CARMELIET und JAIN, 2000).

Die unterschiedlichen Stoffe übernehmen dabei verschiedene Aufgaben. NO dilatiert das Gefäß, VEGF erhöht die Permeabilität des Gefäßes. Dadurch können Plasma-proteine (z.B. Fibrin) ausdiffundieren und eine vorläufige Trägersubstanz für die migrierenden Endothelzellen bilden. VEGF steigert auch die Proliferation und Migration der Endothelzellen, ebenso wie Angiopoetin-2, MCP-1 und PDGF (PUGH und RATCLIFFE, 2003). Damit die Endothelzellen aus ihrem Platz in der Gefäßwand auswandern können, müssen sie die interendothelialen Zellkontakte lockern und den periendothelialen Zellverband abbauen. Ang-2 löst die glatten Muskelzellen und lockert die extrazelluläre Matrix. VEGF und bFGF regen die Endothelzellen an Urokinase Type Plasminogen Activator (uPA) und Tissue Plasminogen Activator (tPA) zu exprimieren, die beide Plasmin aktivieren sowie unterschiedliche Matrix Metalloproteasen (MMP). Es gibt über 20 verschiedenen MMPs, die sich in 5 Gruppen einteilen lassen: Kollagenasen, Gelatinasen, Matrilysins, Stromelysins und Membrane-type MMPs (Mt-MMPs) (RUNDHAUG, 2005).

Sie spalten VE-Cadherin und brechen damit die interendothelialen Verbindungen sowie Integrinbindungen, welche die Endothelzellen in ihrem Platz halten. Gleichzeitig demaskieren sie neue Integrinbindungsstellen, welche die Migration ermöglichen. MMPs degradieren die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix und

setzen dadurch in der Matrix gebundene, angioregulatorische Wachstumsfaktoren frei (PEPPER, 2001).

Die Endothelzellen lösen sich aus ihrem Verband und wandern auf die chemotaktischen Stimuli zu, entlang einer provisorischen Matrix, die vor allem Typ I Kollagen, Fibronectin, Fibrin und Osteopontin enthält. Sie proliferieren und formen solide Endothelzellstränge, die unter Einfluss von Ang-1 und VEGF wieder ein Lumen bilden (RUNDHAUG, 2005). Den Stimulus stabile Gefäßwände zu bilden, erhalten die Zellen durch Angiopoetin, das an den Tie-1-Rezeptor bindet (SAHARINEN et al. , 2005). Die Bindung von Angiopoetin-1 (Ang-1) an den Tie-2-Rezeptor erhöht die Stabilität der Bindung der Endothelzellen an die sie umgebende Matrix. Angiopoetin-2 (Ang-2) dagegen wirkt als Antagonist (SURI et al. , 1996).

Um sich röhrenartig anzuordnen brauchen Endothelzellen den Stimulus ihrer Umgebung. Der wird durch die Rezeptorenfamilie der Integrine vermittelt, die gleichzeitig auch der Bindung an die extrazelluläre Matrix und der Migration dienen (SCHWARTZ et al. , 1995).

Außerdem müssen die Endothelzellen sich untereinander erkennen um nicht zufällig andere Zellen in die Gefäßwand zu integrieren. Dies wird durch die Membranproteine der Zell-Zell-Verbindungen vermittelt. Ein typisches Protein ist das Vascular Endothelial (VE)-Cadherin, das in Adherens Junctions von Endothelzellen gebildet wird (GEIGER und AYALON, 1992).

Der mechanische Stress der durchwandernden Endothelzellen induziert die Bildung von Platelet derived Growth Factor (PDGF). Er fördert die Proliferation und Differenzierung von Perizyten und glatten Muskelzellen. Lagern diese sich an die Endothelzellen, inhibieren sie deren weitere Proliferation und Migration und aktivieren den Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Der sorgt durch die Bildung einer neuen Basalmembran und die Ablagerung von extrazellulärer Matrix für die Stabilisierung des neuen Gefäßes (CARMELIET, 2003).

2.2.4 Arteriogenese

Der adaptive Prozess, während dessen sich kleine Kollateralgefäße nach arterieller Okklusion zu leitfähigen Arterien umwandeln, heißt Arteriogenese. Meist handelt es sich um arterio-arteriolare Anastomosen, die einen bis zu 20-fachen Umfang ihrer Ausgangsgröße erreichen können. Im Gegensatz zur Angiogenese spielt in diesem Prozess die Hypoxie keine Rolle. Der Blutstrom, der plötzlich in ein kleines Gefäß geleitet wird, steigert die Scherkräfte und die Wandspannung um ein Vielfaches. Der dadurch verursachte Stress wirkt als Auslöser für das Remodeling und aktiviert die Endothelzellen. Sie beginnen chemotaktische Faktoren (z.B. MCP-1, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor = GM-CSF, TGF- β 1) zu produzieren, die Monozyten anlocken und exprimieren Oberflächenmarker, an die diese binden können (ICAM-1). Durch die Anlagerung und Invasion der Monozyten, aber auch von Mastzellen und T-Lymphozyten gewinnt der Vorgang entzündlichen Charakter. Monozyten wandeln sich zu Makrophagen um und produzieren zusammen mit den aktivierten Endothelzellen Zytokine (z.B. bFGF, PDGF-B) und Proteasen (MMPs). Diese regen einerseits die glatten Muskelzellen und die Endothelzellen zu Proliferation an, andererseits lösen sie die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix auf. Dadurch wird die Migration der glatten Muskelzellen ermöglicht. Die glatten Muskelzellen verlieren während dieser Phase ihre kontraktilen Eigenschaften und verstärken stattdessen die Proteinsynthese. Das Gefäß nimmt an Umfang und Wandstärke, aber auch an Länge, zu. Diese Längenzunahme des Gefäßes, ohne Verlängerung des zu durchquerenden Gewebes, führt zu der typischen Korkenzieherstruktur der Kollateralen. Nach der akuten Phase folgt das Remodeling, während dessen das Gefäß eine neue Membrana elastica interna erhält und sowohl die Media als auch die Intima wieder aufgebaut werden (CARMELIET, 2000 und SCHAPER und SCHOLZ, 2003).

2.3 Stamm- und Vorläuferzellen

Der Großteil der Zellen in adulten Organen besteht aus ausdifferenzierten Zellen, die eine Vielzahl unterschiedlicher, spezifischer Gene exprimieren, angepasst an die Anforderungen des einzelnen Organs. Gehen diese Zellen zugrunde, gibt es zwei mögliche Mechanismen, wie die Geweberegeneration ablaufen kann: einige Zellarten können sich selbst regenerieren, da ihnen die Fähigkeit zu proliferieren erhalten geblieben ist. Von Hepatozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten wird angenommen, dass sie diese Fähigkeit besitzen. Jedoch ist ihr Proliferationspotential beschränkt. Die zweite Möglichkeit besteht darin, dass untergegangenen Zellen durch neu gebildete Zellen ersetzt werden, die von zirkulierenden oder gewebsstämmigen Stammzellen abstammen. Das bekannteste Beispiel für diesen Mechanismus sind die hämatopoetischen Stammzellen, die fortlaufend die Blutzellen erneuern (ASAHARA und KAWAMOTO, 2004)

Als embryonale Stammzellen werden die Zellen des Embryoblasten bezeichnet. Dabei handelt es sich um die innere Zellen der Blastozyste, die das Stadium der Embryogenese nach etwa 5 Tagen darstellt (50 – 150 Zellen). Aus diesen pluripotenten Zellen entwickelt sich der gesamte Embryo mit all seinen unterschiedlichen, hochspezialisierten Zellarten. Als totipotent werden Stammzellen bezeichnet, die sich sowohl in die Zellen des Embryos, als auch in die Zellen der Plazenta ausdifferenzieren können. Dazu sind nur befruchtete Eizellen bis zum Morulastadium in der Lage. Multipotent sind Stammzellen, die in der Lage sind, sich in mehrere verschiedene Zellarten auszdifferenzieren. Zu ihnen zählen auch die hämatopoetischen Stammzellen (BLAU et al. , 2001).

Die noch nicht ausdifferenzierten Zwischenstadien zwischen Stammzelle und reifer Zelle heißen Vorläufer- oder Progenitorzellen und sie exprimieren unterschiedliche Oberflächenmarker während der verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung. Stammzellen besitzen eine hohe Proliferationsrate, aber keine funktionellen Eigenschaften einer ausdifferenzierten Zelle. So besitzt z.B. eine adulte Endothelzelle die Fähigkeit NO zu synthetisieren. Je weiter eine Zelle sich ausdifferenziert, desto mehr Merkmale der adulten Zelle entwickelt sie. Dabei verliert sie ihre „Stammzellqualitäten“ (CAI et al. , 2004). Eine Stammzelle muss, im Idealfall ein Leben lang, ihre genetische Information unter Vermeidung der Akkumulation genetischer Mutationen bewahren, um Zellalterung und Tumorbildung zu verhindern. Mechanismen, die die Intaktheit

des Genoms wahren, sind Kontrolle der Telomerlänge, hohes Vorkommen DNA-reparierender Enzyme und Regulierung apoptotischer Pathways. Die Stammzelle muss sich selbst erneuern, aber auch das Reservoir sich ausdifferenzierender Vorläuferzellen auffüllen. Sie muss also unterschiedliche Teilungszyklen durchlaufen. Entweder entstehen bei der Teilung exakte Kopien ihrer selbst oder Abkommen, welche die nächste Stufe der Differenzierung darstellen (Vorläuferzellen). Die erste Teilungsart vermehrt dabei die Anzahl der Stammzellen, während die zweite sie vermindert. Teilung, bei gleich bleibender Anzahl, ist möglich, wenn sie sich asymmetrisch teilt, d.h. sie teilt sich in eine Kopie und eine Vorläuferzelle (MORRISON et al. , 1997).

Stammzellen benötigen eine geschützte Umgebung, in der sie zwischen Phasen hoher Aktivität während der Proliferation und anschließender Ruhe wechseln können. Diese Umgebung bietet ihnen die so genannte Stammzellnische. Sie besteht aus Stammzellen, deren Nachkommen und Nischenzellen, welche die Stammzellen von Stimuli abschirmen, die sie zur Differenzierung oder zur Apoptose anregen könnten. Gleichzeitig verhindern sie auch eine exzessive Stammzellproliferation, die zu Krebs führen würde. Vorläuferzellen hingegen müssen die Nische verlassen, zirkulieren und zu den Orten gelangen können, an denen sie alte Zellen ersetzen sollen. Im Falle der hämatopoetischen Stammzellen liegt die Stammzellnische im Knochenmark neben dem Endost, wobei Osteoblasten, Fibroblasten, aber auch Stromazellen und vaskuläre Zellen des Knochenmarks als Nischenzellen agieren (MOORE und LEMISCHKA, 2006).

Das Knochenmark enthält noch weitere Stammzellen, wie z. B. mesenchymale Stammzellen. Auch in anderem Gewebe finden sich Zellen mit Stammzeleigenschaften. Z. B. die Krypten des Darms und die Haarfollikel der Haut enthalten Stammzellen, die für Ersatz der abgeschilferten Zellen sorgen und so die Gewebs-homöostase aufrecht erhalten (URBICH und DIMMELER, 2004).

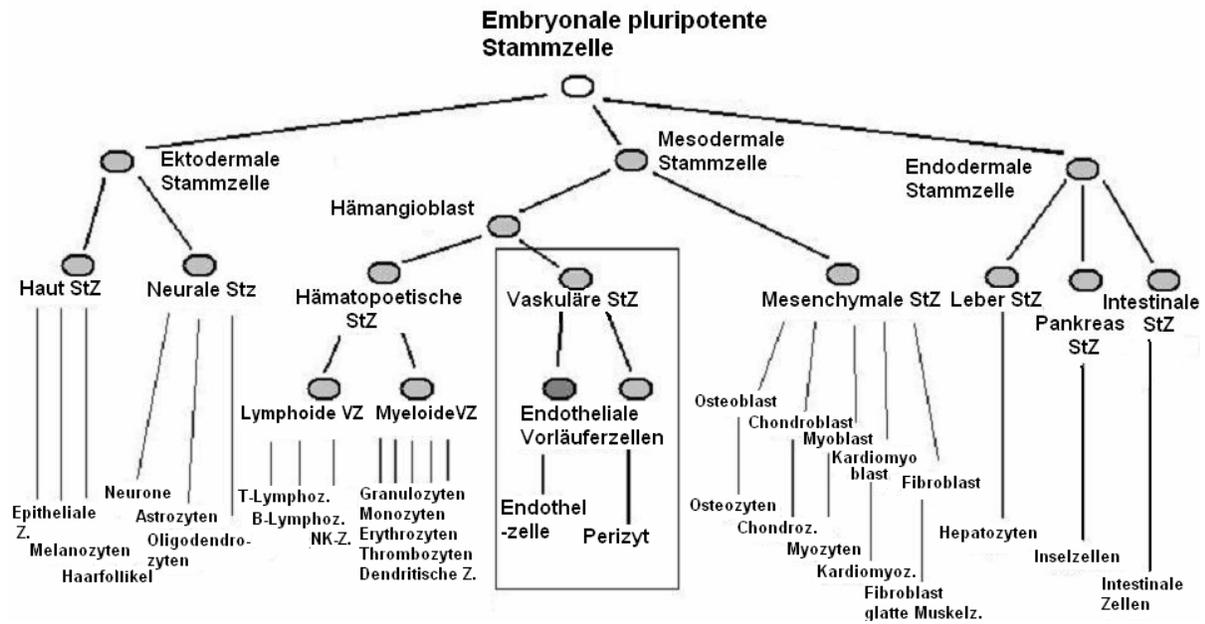


Abbildung 4. Stamm- und Vorläuferzellen

StZ: Stammzelle, VZ: Vorläuferzelle, Z: Zellen/-zyten, (Modifiziert nach ASAHARA und KAWAMOTO, 2004)

2.3.1 Endotheliale Vorläuferzellen

Lange wurde angenommen, dass Endothel sich durch Proliferation der ausdifferenzierten Zellen regeneriert. Doch 1997 entdeckten ASAHARA et al. , dass es möglich ist, dass sich aus CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen auch Zellen entwickeln, die Marker von Endothelzellen exprimieren und die sich in Ischämiegebieten in das Endothel neuer Blutgefäße einfügen. Diese Zellen wurden als endotheliale Vorläuferzellen (Endothelial Progenitor Cells = EPCs) bezeichnet (ASAHARA et al., 1997).

KHAKOO und FINKEL definierten diese folgendermaßen: EPCs sind Zellen, die im Blut zirkulieren, aus dem Knochenmark stammen und sich phänotypisch und funktionell von Endothelzellen unterscheiden. Sie können sich in vitro zu Endothelzellen ausdifferenzieren und in vivo zu Vaskulogenese und zur vaskulären Homöostase beitragen (KHAKOO und FINKEL, 2005).

Es wird angenommen, dass im Knochenmark ein gemeinsamer Vorläufer für hämatopoetische und endotheliale Zellen, der Hämangioblast, existiert (SHI et al. , 1998). Die im Knochenmark vorzufindenden unreifen EPCs gleichen in ihren Oberflächenmarkern den hämatopoetischen Stammzellen (z.B. CD133, CD34, KDR) und sind von diesen nicht zu unterscheiden. Verlassen die EPCs das Knochenmark und zirkulieren im peripheren Blut verlieren sie die Oberflächenmarker der unreifen Vorläuferzellen und exprimieren immer mehr Marker, die eine reife Endothelzelle aufweist (z.B. VE-cad, P1H12, vWF). Es handelt sich also bei den EPCs nicht um eine phänotypisch homogene Gruppe, sondern um eine Anzahl unterschiedlicher Stadien vom Hämangioblasten bis zur fertigen Endothelzelle (IWAMI et al. , 2004).

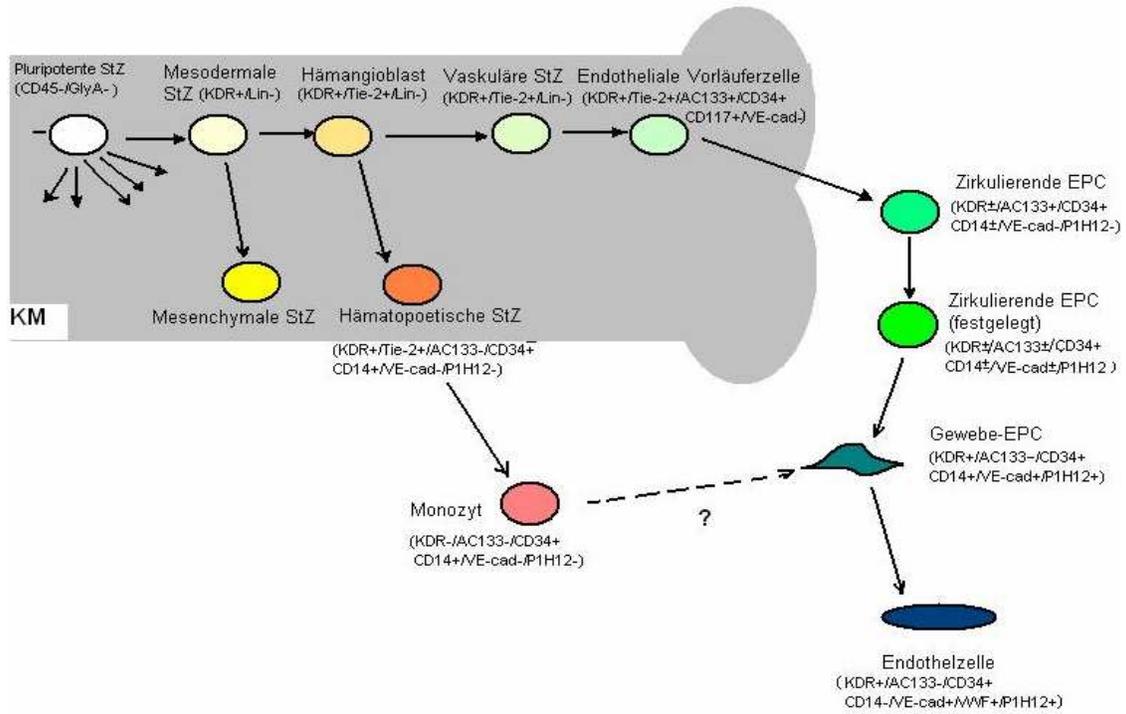


Abbildung 5. Mutmaßliche Differenzierungskaskade und Expressionsprofile der endothelialen Vorläuferzellen;

+: positiv, -: negativ, KM: Knochenmark, StZ: Stammzelle, EPC: endotheliale Vorläuferzelle (modifiziert nach ASAHARA und KAWAMOTO, 2004)

2.3.2 Quellen endothelialer Vorläuferzellen

Zur Gewinnung endothelialer Vorläuferzellen werden vor allem Knochenmark, Nabelschnurblut und peripheres Blut adulter Spender verwendet (HRISTOV et al. , 2003). Nabelschnurblut enthält zwar einen vergleichsweise hohen Anteil EPCs, die auch ein großes Proliferationspotential besitzen, da sie aber nicht autolog zum Empfänger sind, bringen sie das Problem der Immunsuppression mit sich (MUROHARA et al. , 2000).

Auch das Knochenmark enthält einen hohen Anteil an Vorläuferzellen, doch es enthält auch viele unreife EPCs ebenso wie viele Leukozyten, die proinflammatorisch wirken. Zudem ist für die Gewinnung von Knochenmark ein invasiveres Vorgehen als für eine Blutabnahme nötig (IWAMI et al., 2004).

Peripheres Blut adulter Spender hingegen ist relativ leicht zu gewinnen. Doch es enthält nur einen geringen Anteil endothelialer Vorläuferzellen, so dass für deren therapeutischen Einsatz eine in vitro Expansion sinnvoll wäre. Es gibt noch weitere Zellen außer den Abkommen des Hämangioblasten, die sich zu Endothelzellen ausdifferenzieren können, wenn sie in einer Umgebung kultiviert werden, die einen endothelialen Phänotyp fördert. Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) und deren Fraktion, die Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPCs) aus dem Knochenmark, können in vitro dazu angeregt werden einen endothelialen Phänotyp zu entwickeln (OSWALD et al. , 2004 und REYES et al. , 2002).

Außerhalb des Knochenmarks enthält Fettgewebe multipotente Zellen mesenchymalen Ursprungs, die sich zu Endothelzellen entwickeln können (PLANAT-BENARD et al., 2004). Im Herzen wurden c-Kit+ Zellen gefunden, die sich zu Myozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen ausdifferenzieren können (BELTRAMI et al. , 2003).

Gefäßwände selbst enthalten, in einer Zone zwischen den glatten Muskelzellen und der Adventitia, Zellen, die dazu fähig sind sowohl Endothelzellen als auch Immunzellen zu bilden (ZENGIN et al. , 2006).

2.3.3 Unterschiedliche Arten endothelialer Vorläuferzellen

Sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien wurde oft folgende Methode zur Gewinnung von EPCs aus peripherem Blut angewandt: die mononukleären Zellen wurden durch Zentrifugation gewonnen und in fibronectinbeschichteten Flaschen mit Gewebekulturmedium mit Zusätzen, die das Wachstum endothelialer Zellen fördern (z. B. VEGF, Fetal Calf Serum), ausgelegt. Zellen die nach einigen Tagen adhärirten, wurden auf endotheliale Marker (z.B. Aufnahme von Ac-LDL, vWF, KDR) untersucht und, im positiven Fall, wurden diese Zellen als EPCs bewertet (INGRAM et al. , 2005). Doch wie sich herausstellte, erhält man dadurch eine heterogene Population von Zellen, die sich in Phänotyp, Oberflächenmarkern und Proliferationsverhalten unterscheiden.

2003 teilte GULATI mononukleäre Blutzellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells = PBMCs) nach Expression des Monozytenmarkers CD14 auf und kultivierte diese. Er stellte fest, dass CD14+ Zellen bereits nach 7 Tagen auf dem Fibronectin adhärirten, von spindelförmiger Gestalt waren und einige endotheliale Marker exprimierten (CD31, KDR, Tie-2). Sie exprimierten jedoch kein eNOS oder VE-Cadherin und zeigten auf Matrigel nur geringe Angiogenese. Er bezeichnete diese Zellen als EPCs. Die CD14- Zellen hingegen adhärirten erst nach 2-3 Wochen, zeigten eine kopfsteinpflasterartige Gestalt, exprimierten alle endothelialen Marker und zeigten eine deutlich bessere Kapazität zur Angiogenese. Diese Zellen nannte er „Outgrowth Endothelial Cells“ (GULATI et al., 2003).

Ungefähr zur gleichen Zeit wies auch REHMAN nach, dass die Zellen, die man durch die bis dahin übliche Art der Zellkultur erhielt, zum großen Teil von Monozyten abstammten. Er schlug vor diese statt „Endothelial Progenitor Cells (EPC)“ besser „Circulating Angiogenic Cells (CAC)“ zu nennen (REHMAN et al. , 2003).

Auch HUR fand unterschiedliche Zellpopulationen, als er unfraktionierte PBMCs kultivierte. Nach ca. 5 Tagen fand er spindelförmige Zellen, die jedoch nach 2 Wochen nicht weiter proliferierten und nach 4 Wochen abstarben. Diese Zellen wurden von ihm als „Early EPCs (EEPCs)“ bezeichnet. Nach 2-4 Wochen traten kopfsteinpflasterähnliche Zellen in Erscheinung, die über viele Wochen proliferierten und sich von anfänglichen 1×10^4 auf 9×10^{10} nach 12 Wochen expandieren ließen. Diese Zellen nannte er „Late EPCs (LEPCs)“. Er verglich sie mit reifen Endothelzellen und zeigte, dass sie diese in ihrer Proliferationsrate und ihrer Lebensdauer

weit übertrafen. Er wies bei beiden Versuchsgruppen die Expression von CD45, Flt-1, eNOS, vWF, und CD31 nach und die Expression von VE-Cadherin und KDR stabil bei den LEPCs und transient bei den EEPCs. Auf Matrigel zeigten die LEPCs mehr Angiogenese, doch in einem Ischämiemodell der Hintergliedmaße der Maus zeigten beide Versuchsgruppen eine ähnlich gute Verbesserung der Angiogenese. Den Grund dafür sah HUR darin, dass die EEPCs im Gegensatz zu den LEPCs angiogene Zytokine (VEGF, IL-8) produzierten, die er im Zellüberstand nachwies (HUR et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei den als Late EPCs oder Outgrowth ECs bezeichneten Zellen um eine homogene Zellpopulation handelt, die aus dem Knochenmark stammt, den Phänotyp und viele Eigenschaften einer Endothelzelle besitzt, diese aber in der Proliferationsrate und Langlebigkeit übertrifft. Die Early EPCs hingegen sind ein heterogenes Gemisch verschiedener Zellen mit einem kleinen Anteil an Zellen, aus denen sich später Outgrowth EPCs entwickeln. Insgesamt besitzen sie jedoch ein geringes Proliferationspotential und eine kurze Lebensdauer, dafür sollen sie in der Lage sein Wachstumsfaktoren zu produzieren.

PEICHEV postulierte, dass die im Blut zirkulierenden CD34+ Zellen sowohl hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (Hematopoetic Stem cells = HSCs) als auch zirkulierende Endothelzellen (Circulating Endothelial Cells = CECs) miteinschloßen. Als Unterscheidungsmerkmal zu den HSCs zog er den endothelialen Marker VEGFR-2 (auch KDR, Flk-1, CD 309) heran.

Zur Abgrenzung von CECs verwendete er den Stammzellmarker CD133 (auch Prominin-like-1, AC133), gab allerdings zu bedenken, dass EPCs diesen Marker mit zunehmender Reife verlieren. Er stellte fest, dass von der Gesamtpopulation CD34+ Zellen nur etwa 2 % ebenfalls VEGFR-2+ und CD133+ sind (PEICHEV et al. , 2000). Im Folgenden werden die Zellen, die aus unfraktionierten PBMNCs und nach kurzer Kultivierungsphase gewonnen wurden, anders als in großen Teilen der Literatur, in Anlehnung an REHMAN „angiogene Zellen (AZ)“ genannt. Die Zellen jedoch, die nach Präselektion von CD34 und mehrwöchiger Kultivierungsphase gewonnen wurden, werden als „endotheliale Zellen (EZ)“ bezeichnet.

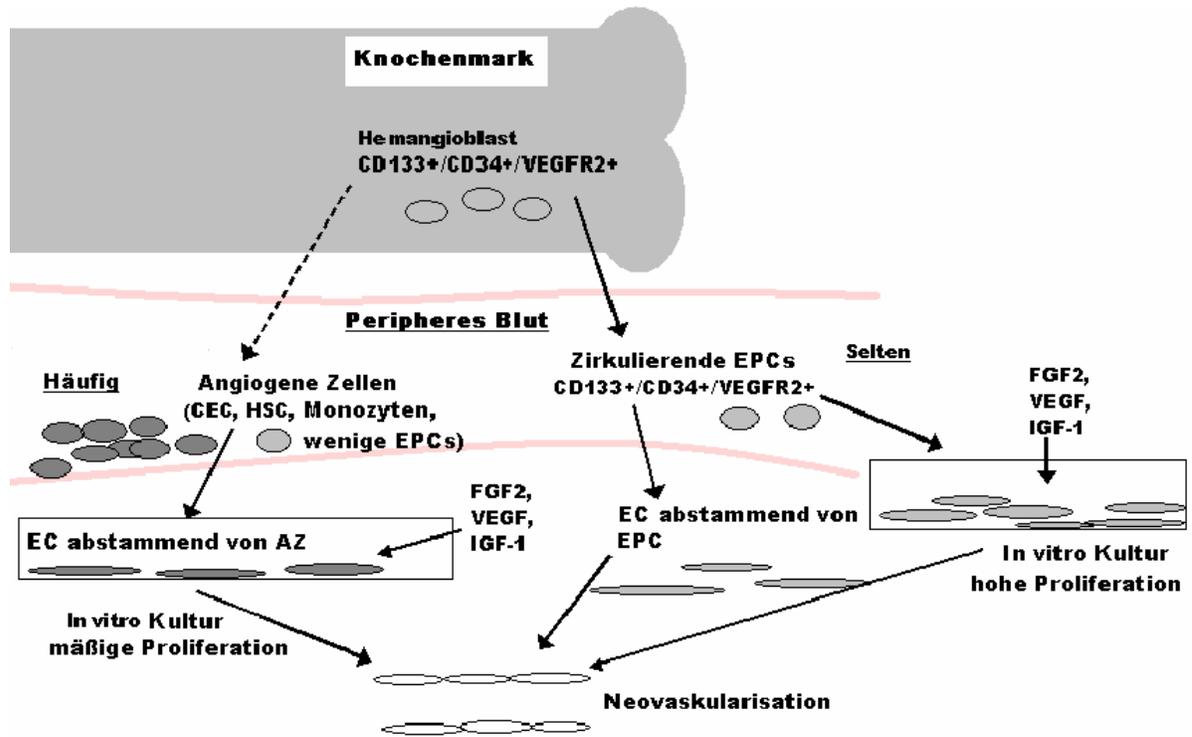


Abbildung 6. Unterschiedliche Arten der EPCs

CEC: Circulating Endothelial Cells, HSC: Hematopoietic Stem Cells, EPC: Endothelial Progenitor Cells, EC: Endothelial Cells

SCHRIFTTUM

CD-Nummer	Andere Bezeichnungen	Funktion	Vorkommen
CD14	Lipopolysaccharid-Rezeptor	Erkennt Antigene auf Bakterien und Pilzen	Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, B-Zellen
CD31	PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule)	Vermittelt Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion bei Entzündung und Angiogenese	Endothelzellen, die meisten Leukozyten und Thrombozyten
CD34	L-Selektin-Rezeptor, sca-1 (murin)	Vermittelt interzelluläre Zelladhäsion, Stammzellmarker	Kapilläre Endothelzellen, EPC, hämatopoetische Vorläuferzellen
CD45	LCA (Leukocyte common antigen)	T- und B-Zell-Aktivierung	Auf allen hämatopoetischen Zellen außer Erythrozyten
CD54	ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)	Neutrophilenadhäsion an Endothelzellen bei Entzündung	B- und T-Zellen, Monozyten, Endothelzellen, Epithelzellen
CD102	ICAM-2 (Intercellular Adhesion Molecule 2)	Stimuliert Immunantwort	Lymphozyten, Endothelzellen, Monozyten, Thrombozyten
CD106	VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule 3)	Vermittelt Leukozytenmigration durch aktivierte Endothelzellen	Endothelzellen, follikuläre dendritische Zellen
CD117	c-kit, Stem-Cell-Factor-Rezeptor	Reguliert Entwicklung und Überleben von Stammzellen	Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen,
CD133	AC133, Prominin-like-1	Stammzellmarker, zelluläre Funktion nicht bekannt	Unreife Zellen, besonders hämatopoetische und endotheliale Stamm- und Vorläuferzellen
CD141	Thrombomodulin	Thrombinmedierte Aktivierung von Protein C	Endothelzellen, neutrophile Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten
CD142	Tissue factor, Faktor III Thromboplastin	Aktiviert Gerinnung mit Faktor VIIa	Physiol. nicht auf Zellen, die Kontakt zum Blutstrom haben (Adventitia, glomeruläre Epithelzellen, Myokard, Keratinozyten, Stromazellen von Organen) nach Aktivierung auch auf Endothelzellen, Monozyten
CD144	VE-Cadherin	Interendotheliales Adhäsionsmolekül	Endothelzellen und manche Stammzellen
CD146	MUC1, MCAM (Melanoma Cell Adhesion Molecule)	Adhäsionsmolekül	Endothelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen, Melanomzellen, aktivierte T-Zellen
CD184	CXCR4, Stromal Derived Factor Receptor	Migration von EPC, EC, HSC, Proliferation von B-Lymphozyten, Entwicklung des Herzens	Endothelzellen, T- und B-Zellen, dendritische Zellen und Monozyten
CD202b	Tie-2, Angiopoetin-1 Rezeptor	Entwicklung und Proliferation von HSC, Reifung und Stabilisierung der Gefäßwände während Angiogenese	Endothelzellen, hämatopoetische Zellen
CD309	KDR (human), Flk-1 (murin), VEGF-Rezeptor 2	Schlüsselrolle in Vaskulogenese und Angiogenese	EPCs, Endothelzellen

Tabelle 3. CD-Oberflächenmarker (Cluster of Differentiation), die Relevanz bei der Charakterisierung von EPCs haben

2.3.4 Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen

Im Blut gesunder adulter Organismen zirkuliert nur eine sehr geringe Anzahl an EPCs, anders als im embryonalen Kreislauf und in Nabelschnurblut. PEICHEV schätzt ihren Prozentsatz auf 0,002 % und INGRAM nur auf 0,0001% der Blutzellen (INGRAM et al., 2005 und PEICHEV et al., 2000). Um im Bedarfsfall nach einem ischämischen Insult zur Vaskulogenese beitragen zu können, muss es dem Körper möglich sein, Zellen aus dem Knochenmark zu mobilisieren und diese über den Blutstrom zum Infarktgebiet zu transportieren. In den letzten Jahren sind einige endogene und exogene Substanzen bekannt geworden, welche die Zahl der zirkulierenden EPCs durch Mobilisation aus dem Knochenmark erhöhen. Zu den endogenen Wachstumsfaktoren gehören VEGF und Stromal Cell Derived Factor-1 (SDF-1), die von ischämischem Gewebe freigesetzt werden, sowie Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) und Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), die bei Entzündungen sezerniert werden. Weitere Wachstumsfaktoren sind Erythropoetin (EPO), das die Produktion der Erythrozyten anregt und Angiopoetin-1 (Ang-1), das in der Angiogenese eine Rolle spielt (HRISTOV und WEBER, 2004).

Auch von HmG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statinen), die zuerst zur Senkung der Lipidlast atherosklerotischer Patienten eingesetzt wurden, konnte eine Steigerung der EPC-Mobilisierung gezeigt werden (LLEVADOT et al. , 2001). Sport ist ein weiteres Mittel, die Zahl der zirkulierenden EPCs zu steigern (LAUFS et al. , 2004). Auch Östrogen soll dazu in der Lage sein (IWAKURA et al. , 2003).

Ein Hinweis darauf, dass die EPC-Mobilisierung eine Reaktion des Körpers ist, um auf ischämische Insulte zu antworten, ist die Tatsache, dass sowohl nach Myokardinfarkt als auch in der frühen Phase der kongestiven Herzinsuffizienz die Anzahl der zirkulierenden EPCs rapide ansteigt. Auch vaskuläre Traumata, wie eine Bypass-Operation oder Verbrennungen haben einen ähnlichen Effekt (HRISTOV und WEBER, 2004).

Der Mechanismus, welcher der Mobilisierung zugrunde liegt, ist erst ansatzweise verstanden. Die meisten Stammzellen im Knochenmark liegen in ihrer Stammzellnische in Kontakt mit Stromazellen und Osteoblasten in einer Umgebung, die dafür sorgt, dass sie in der G0-Phase des Zellzyklus bleiben. Einige andere befinden sich in der Nähe von sinusoidalen Gefäßen im Knochenmark. Diese so genannte vaskuläre Nische bietet eine Umgebung, welche die Proliferation und Differenzierung

der Stammzellen fördert und ihnen gestattet durch das Endothel in den Blutstrom zu transmigrieren (YIN und LI, 2006).

Damit die Stammzellen aus der Osteoblastennische in die vaskuläre Nische migrieren können, müssen die Zell-Zell-Verbindungen gelöst und die Zytokine gespalten werden, die an die ECM oder die Membranen der Stromazellen gebunden sind, wie z.B. Kit Ligand (KitL). KitL kann in zwei Formen vorliegen: soluble KitL (sKitL) und membrane bound KitL (mKitL). Die freie Form erlaubt Migration, während die membrangebundene sie unterbindet. Proteasen wie MMP9 können mKitL aus dessen Bindungen spalten und in die freie Form überführen (HEISSIG et al. , 2002). MMP9 wird z.B. durch NO aktiviert, das selbst ebenfalls proliferierend wirkt. Auch im Knochenmark wird NO durch die eNOS der Endothelzellen der dortigen Gefäße synthetisiert. Viele der mobilisierenden Faktoren wirken durch eine Aktivierung der eNOS im Knochenmark. VEGF aktiviert die eNOS durch Flk-1-vermittelte Phosphorylierung und auch die EPC-Erhöhungen durch Statine, Sport und Östrogen gehen wohl auf die Steigerung der Aktivität der eNOS zurück (AICHER et al. , 2005).

G-CSF hingegen sorgt für die Ausschüttung von Elastase und Kathepsin G aus Neutrophilen. Diese Proteasen brechen die Bindungen der Stammzellen zu den Stromazellen auf und spalten SDF-1, das von Stromazellen produziert wird. Dadurch kehrt sich der SDF-1-Gradient zwischen dem Knochenmarkstroma und den sinusoidalen Blutgefäßen um und sorgt für den Übertritt der Zellen in das Blut, da die Zellen dem SDF-1-Gradienten chemotaktisch folgen, wenn SDF-1 an den CXCR-4-Rezeptor auf den EPCs bindet (AICHER et al. , 2003).

2.3.5 Homing und Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen

Nach der Mobilisierung der Zellen müssen die EPCs gezielt zu dem Ort der Neovaskularisation gelangen, um dort effizient zum Einsatz zu kommen. Dieser Prozess wird als Homing bezeichnet. Er beinhaltet außerdem die initiale Adhäsion der Zellen an das aktivierte Endothel oder die offenliegende extrazelluläre Matrix, die Transmigration durch das Endothel und die Invasion in das Zielgebiet (DIMMELER et al. , 2005).

Auch hier sind die genauen Mechanismen nicht vollkommen bekannt, die diesen Vorgängen zugrunde liegen. Doch man weiß, dass in ischämischem Gewebe die Aktivierung von HIF zur Produktion von SDF-1 führt. In vitro zeigen EPCs eine dosisabhängige Migration auf SDF-1 zu und in vivo verursacht die lokale Applikation von SDF-1 eine dortige Akkumulation von EPCs (YAMAGUCHI et al. , 2003).

Integrine vermitteln die Adhäsion unterschiedlicher Zellen einschließlich Leukozyten und Stamm- und Vorläuferzellen an Proteine der extrazellulären Matrix und an Endothelzellen. Die Invasion der EPCs in ischämisches Gewebe erfolgt durch Adhäsion an aktiviertes Endothel und anschließende Transmigration. Dabei scheint besonders β 2-Integrin eine Rolle zu spielen (CHAVAKIS et al. , 2005).

Die Reendothelisierung von entblößten Gefäßen hingegen kommt durch Adhäsion der EPCs an extrazelluläre Matrix zustande. Dies wird vor allem durch Vitronectinrezeptoren (α β 3-Integrin, α β 5-Integrin) vermittelt (URBICH und DIMMELER, 2004). Der Differenzierungsprozess zur reifen Endothelzelle, den die Zellen mit Verlassen der Stammzellnische begonnen hat, wird nun abgeschlossen. Ein Stimulus dafür ist wiederum SDF-1 (DE FALCO et al. , 2004).

Da VEGF in der embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle in der Differenzierung der Endothelzellen spielt und auch in in vitro-Kulturen diesen Effekt hat, liegt der Schlusse nahe, dass er auch an dieser Stelle eine Rolle spielt (DIMMELER et al., 2005). Außerdem konnte in vitro nachgewiesen werden, dass Mikropartikel, die bei der Apoptose von Endothelzellen entstehen sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung von EPCs fördern (HRISTOV und WEBER, 2004).

2.3.6 Aufgaben endothelialer Vorläuferzellen im Körper

Lange Zeit wurde angenommen, dass Neovaskularisation postnatal nur noch durch Angiogenese mittels Proliferation der adulten Endothelzellen stattfindet. Diese ist jedoch sehr begrenzt. Neuere Studien haben gezeigt, dass das Blut und das Knochenmark Zellen enthalten, die in vitro endotheliale Merkmale ausbilden (ASAHARA et al., 1997 und SHI et al., 1998). Unterschiedliche Studien haben bewiesen, dass diese Zellen zur Neovaskularisation nach Gliedmaßenischämie, während der Wundheilung, nach Myokardinfarkt oder während der zyklischen Organogenese des Endometriums beitragen (ASAHARA et al., 1997 und IWAMI et al., 2004).

Allerdings variiert das Ausmaß der Beteiligung der EPCs an den neuen Gefäßen je nach Studie zwischen 0 und 90 % (ASAHARA et al., 1997 und KALKA et al., 2000 und ZIEGELHOEFFER et al., 2004). Hohe Beteiligung konnte meist in Tumorangiogenese festgestellt werden (ASAHARA et al., 1999). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Werte könnte darin liegen, dass verschiedene Modelle mit unterschiedlicher Intensität der Ischämie gewählt wurden. So wäre es möglich, dass eine geringgradige Ischämie nur zu einem geringen Stimulus der Mobilisierung und des Homing führt und dadurch den Anteil der EPCs in den Gefäßen beeinflusst. Da auch unterschiedliche Methoden zur Gewinnung der EPCs gewählt wurden, wäre es auch möglich, dass nicht die gleichen Subpopulationen von EPCs verwendet wurden. Da sich, trotz einer geringen Anzahl inkorporierter Zellen, eine verbesserte Neovaskularisation zeigte, liegt es nahe, dass EPCs diese auch auf anderem Weg unterstützen. Durch Expression von Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, und Zytokinen können sie sowohl zusätzlich die Angiogenese als auch das Überleben der adulten Endothelzellen fördern (URBICH und DIMMELER, 2004 und ZIEGELHOEFFER et al., 2004).

Doch nicht nur nach ischämischen Geschehen kommen die EPCs zum Einsatz. Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass EPCs auch für den Ersatz apoptotischer und nekrotischer Endothelzellen zuständig sind. In Studien konnte gezeigt werden, dass EPCs Gefäßwände, die nach Ballonverletzung entblößt waren, wieder reendothelialisierten (GRIESE et al., 2003) und dass sie die Atheroskleroselast ApoE-defizienter Mäuse, die cholesterinhaltiges Futter erhielten, senkten, ohne gleichzeitig den Cholesterinspiegel im Blut zu senken (RAUSCHER et al., 2003).

Des Weiteren ist bekannt, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Alter, Bluthochdruck, Rauchen, Diabetes, hoher LDL-Cholesterinspiegel sich sowohl auf die Anzahl als auch die Funktion der EPCs negativ auswirken (VASA et al. , 2001). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem besonders niedrigen EPC-Level eine höhere Wahrscheinlichkeit haben kardiovaskuläre Symptome zu entwickeln (WERNER et al. , 2005).

Viele der kardiovaskulären Risikofaktoren schädigen Endothelzellen direkt, indem sie Apoptose induzieren oder indirekt, indem sie oxidative Substanzen freisetzen, die zur Entkopplung der eNOS und so zur Dysfunktion des Endothels führen. Wird die Integrität des Endothels beeinträchtigt, fehlt ihr inhibitorischer Effekt auf die glatten Muskelzellen und sie fangen an zu proliferieren. Dadurch können Stenosen entstehen. Ersetzen jedoch EPCs die apoptotischen Zellen, ist der Prozess gestoppt. Da jedoch die kardiovaskulären Risikofaktoren auch die Anzahl der zirkulierenden EPCs senken, kann so ein Teufelskreis in Gang kommen, der dazu führt, dass die Atherosklerose fortschreiten kann und der schließlich in Thrombose und Infarkt endet.

Die Reduktion der zirkulierenden EPCs kann unterschiedliche Ursachen haben: zum einen wäre es möglich, dass im Knochenmark nur ein begrenzter Vorrat an Stamm- und Vorläuferzellen vorhanden ist, der durch den ständigen Verbrauch erschöpft wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die systemische Entkopplung von eNOS die Mobilisierung der EPCs aus dem Knochenmark beeinträchtigt. Auch könnten die EPCs selbst durch den oxidativen Stress zur Apoptose angeregt werden oder dieser verändert die Umgebung der EPCs dergestalt, dass sie nicht zu Endothelzellen ausdifferenzieren können (DIMMELER und ZEIHNER, 2004).

2.3.7 Therapeutische Anwendungen endothelialer Vorläuferzellen

Unterschiedliche klinische Anwendungen kommen für die EPCs in Frage: zum einen können sie zur Reendothelialisierung nach Stenting oder Ballonkatheterverletzung eingesetzt werden, ebenso wie für den Überzug vaskulärer Implantate mit einer anti-immunogenen Schicht. Auch die Möglichkeit Tumorwachstum zu stoppen, durch gezielte Applikation genetisch veränderter EPCs, die die Vaskularisation des Tumors aufhalten, wird untersucht (RUMPOLD et al. , 2004). Doch besonders für die Neovaskularisation ischämischer Gewebe können sie von Nutzen sein, da sie auf einzigartige Weise sowohl die Angiogenese als auch die Vaskulogenese anregen können. Auch mit dem therapeutischen Nutzen der EPCs nach Myokardinfarkt haben sich mehrere präklinische Studien beschäftigt. Bereits 1999 verabreichte ASAHARA et al. Mäusen, deren Knochenmark durch Bestrahlung zerstört worden war, markierte Zellen aus dem Knochenmark gleich alter Mäuse i. v. in die Schwanzvene. 4 Wochen nach Knochenmarktransfer wurde die Left Anterior Descending Artery (LAD) der Mäuse permanent ligiert. Nach weiteren 7 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert und das Herz histologisch untersucht. Die markierten Zellen fanden sich in Kapillaren und Arterien im Perinfarktgebiet wieder (ASAHARA et al., 1999).

KOCHER gewann PBMC durch Leukopherese aus dem Blut von Patienten, die 4 Tage lang mit G-CSF, zur Mobilisierung der hämatopoetischen Zellen, behandelt worden waren, sortierte daraus die CD34+ Zellen aus und überprüfte die Expression verschiedener endothelialer Marker (z.B. KDR, Tie-2, vWF, eNOS). Die Zellen wurden nach 7 Tagen in Kultur gelabelt und i.v. Ratten verabreicht, die 48 h zuvor eine Ligatur der LAD erhalten hatten. Die Herzfunktion wurde per Ultraschalluntersuchung verfolgt und nach 15 Wochen wurden die Ratten euthanasiert. In den Ratten, die Zellen erhalten hatten, zeigte sich sowohl eine verbesserte Funktion in vivo, als auch histologisch vermehrte Neovaskularisation sowie reduzierte Apoptose der Myozyten (KOCHER et al. , 2001).

KAWAMOTO gewann PBMC aus dem Blut gesunder Spender und brachte diese insgesamt in Kultur. Nach 7 Tagen wurden sie markiert und er verabreichte sie i.v. Ratten, die 3 h zuvor eine Ligatur der LAD erhalten hatten. Auch hier wurde in vivo durch Ultraschalluntersuchungen eine verbesserte ventrikuläre Funktion und histologisch eine geringere Fibrose festgestellt (KAWAMOTO et al. , 2001).

Bereits anhand dieser weniger Beispiele wird deutlich, wie viele Variablen in den Untersuchungen enthalten sind. Die Zellen können entweder aus dem Knochenmark oder aus dem peripheren Blut gewonnen werden. Wobei es in beiden Fällen möglich ist das Rohmaterial unfraktioniert zu verwenden ohne genau zu wissen, welche Zellen enthalten sind, oder bestimmte Subpopulationen anhand von Oberflächenmarkern auszusortieren (KHAKOO und FINKEL, 2005).

PEICHEV vertritt die Ansicht, dass für die Identifikation zirkulierender EPCs die Expression der Oberflächenmarker CD34+, CD133+ und VEGFR-2+ überprüft werden muss (PEICHEV et al., 2000).

Zudem hat die Expansion der Zellen in Kultur und deren Dauer einen Einfluss auf die letztendlich gewonnenen Zellen. Sowohl GULATI als auch HUR zeigten, dass in endothelialer Zellkultur die Zellen, die bereits nach 7 Tagen adhären und Kolonien bilden, nur geringe Proliferation zeigen und nur über wenige Generationen zu expandieren sind. Die EPCs aber, die sich erst nach ca. 4 Wochen zeigen, besitzen ein hohes Proliferationspotential, welches sie über mehrere Generationen hinweg behalten (GULATI et al., 2003 und HUR et al., 2004).

Da Patienten mit hohen kardiovaskulären Risikofaktoren und Atherosklerose, also die Risikogruppe für Myokardinfarkte, eine reduzierte Anzahl und Funktion der zirkulierenden EPCs zeigen, ist besonders hier eine Expansion der Zellen vor Injektion wünschenswert (VASA et al., 2001).

Hinzu kommt, dass typischerweise aus 100 ml Blut, selbst eines gesunden Spenders, nach 7 Tagen 5 Mio. EPCs in Kultur wachsen. Jedoch sind angesichts der Zahlen, die in Tierversuchen angewendet werden, ca. 500 – 2000 EPCs / g Körpergewicht notwendig, wenn diese systemisch appliziert werden sollen. Um die für einen durchschnittlich schweren Menschen notwendige Anzahl zu erreichen ohne die Zellen zu expandieren bräuchte man 12 l Blut (IWAMI et al., 2004).

Um die Anzahl der zirkulierenden EPCs zu erhöhen, ist es möglich die Substanzen, die ihre Mobilisierung stimulieren, systemisch zu verabreichen. Doch sind z.B. gegenüber der Verabreichung von G-CSF Sicherheitsbedenken laut geworden, da einige Studien von Nebenwirkungen berichteten (HILL et al. , 2005 und KANG et al. , 2004). Klinische Studien hingegen konnten zwar keine Nebenwirkungen, aber auch keine Verbesserung der Ventrikelfunktion oder Verkleinerung der Infarktgröße feststellen (ZOHLNHOFER et al. , 2006).

Die Gabe von Statinen dagegen, scheint sich nicht nur positiv auf die Lipidlast des Patienten und die Mobilisation der EPCs auszuwirken, sondern auch deren Differenzierung und Überleben zu steigern sowie der Entkopplung der eNOS entgegenzuwirken (DIMMELER und ZEIHNER, 2004 und FORSTERMANN, 2006). Eine weitere Strategie besteht darin entweder die Zellen selbst oder das ischämische Gewebe, durch Gentransfer, zur Expression überlebensfördernder oder angiogener Chemokine zu stimulieren (HRISTOV und WEBER, 2004).

In Nabelschnurblut ist etwa die 10-fache Menge an zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen (CEPCs) vorhanden, die außerdem noch über ein höheres Proliferationspotential verfügen. Der Nachteil an dieser Quelle ist jedoch, dass es sich hierbei nicht um autologes Material handelt und so eine Immunsuppression notwendig wäre. Außerdem besteht die Gefahr, dass es durch die hohe Proliferation zu Tumorbildung kommen könnte (MUROHARA et al. , 1999).

Schließlich beeinflusst auch die Art der Applikation die Anzahl der Zellen, die tatsächlich im Zielgewebe ankommen. Die Methode, die anfänglich gerne in Tierversuchen verwendet wurde, die Zellen intravenös zu applizieren, hat viele Nachteile. Viele Zellen gelangen nicht ins Zielgebiet sondern werden vorher, z.B. von der Milz, abgefangen, so dass wesentlich höhere Ausgangszahlen notwendig sind. Zudem gibt es Befürchtungen, dass die zirkulierenden Zellen an anderer Stelle zu unerwünschter Angiogenese, z.B. in Tumoren oder diabetische Retinopathie, beitragen könnten (ASAHARA und KAWAMOTO, 2004).

Die lokale Applikation hingegen beschränkt die notwendige Menge auf ein Minimum. Als Möglichkeiten kommen dafür in Betracht: intrakoronare Infusion über einen Ballonkatheter oder intramyokardiale Injektion, entweder endokardial über einen Katheter, oder epikardial während einer Operation. Für die intrakoronare Infusion spricht, dass die Zellen in eine überlebensfreundliche Umwelt gelangen, in der die Blutversorgung noch erhalten ist. Die Nachteile sind, dass nicht alle Gebiete erreicht werden können und dass die Zahl der infundierbaren Zellen begrenzt ist ohne das Risiko einer Embolie einzugehen. Beides könnte man durch die intramyokardiale Injektion umgehen, jedoch besteht hier das Risiko die Ventrikelwand zu perforieren. Auch die Injektion der Zellen in nekrotisches Gewebe ist kaum dazu geeignet deren Überleben und Differenzierung zu fördern. Hier bietet die Injektion intraoperativ die Möglichkeit die Zellen in das Randgebiet zu applizieren, in welchem das Myokard noch nicht nekrotisch, sondern nur „schlafend“ ist. Noch besser ist dies nach der

Identifikation dieser Gebiete durch elektromechanisches Mapping möglich (EMM) (DIMMELER et al., 2005).

Es sind bereits mehrere klinische Studien durchgeführt worden, die jedoch unterschiedliche Erfolge verzeichneten. Allerdings konnten in keiner Studie mit Zellen, die aus dem Knochenmark oder dem Blut stammen, nachteilige Nebenwirkungen festgestellt werden. An dieser Stelle seien vor allem Studien angeführt, die sich mit der Behandlung des akuten Myokardinfarkts (AMI) auseinandersetzten. Nur 3 der Studien waren als randomisierte Doppelblindversuche angelegt (BOOST, ERBS und JANSSENS). Die beiden größeren widersprachen sich in ihren Ergebnissen: während in der BOOST-Studie eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Auswurfraction (LVEF) der Gruppe, die Knochenmarkszellen erhielt, gegenüber der Placebogruppe, festgestellt werden konnte, fand Janssens keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (JANSSENS et al., 2006 und WOLLERT et al., 2004).

Sowohl in diesen beiden Studien als auch der Mehrzahl der anderen klinischen Studien sind bis jetzt vor allem unselektiert mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark eingesetzt worden (IWAMI et al., 2004). Die wenigen Studien, die Vorläuferzellen aus dem Blut verwendeten (TOPCARE-AMI, MAGIC, ERBS und WILLERSON), haben bis jetzt darauf verzichtet diese nach spezifischen Markern zu selektieren und sie über längere Zeit in Kultur zu expandieren. In der TOPCARE-AMI-Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass die Injektion zirkulierender Vorläuferzellen eine mit der Injektion von Zellen aus dem Knochenmark vergleichbare Verbesserung der Herzleistung bewirkt (ASSMUS et al., 2002 und BRITTEN et al., 2003 und SCHACHINGER et al., 2004).

Es wäre möglich, dass die unterschiedlichen Ergebnisse der klinischen Studien durch das heterogene Ausgangsmaterial der Zellen bedingt sind. Es wäre interessant zu sehen, ob bei einer genauer definierten Subpopulation, wie z.B. den EPCs, reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können. Da es sich bei den typischen Zielpatienten um Individuen mit reduzierten zirkulierenden Vorläuferzellzahlen handelt, wäre eine Zellart, die sich in Kultur auf eine Vielfaches expandieren ließe, wie die Late Outgrowth EPCs, wünschenswert. Noch ist jedoch unklar, ob sie sich auch aus dem Blut von Patienten gewinnen lassen und ob deren Zellen voll funktionsfähig sind und zur Neovaskularisation beitragen.

SCHRIFTTUM

Studie/Erstautor	Applikationsweg	Zelltyp	Anzahl Patienten	Dauer (Mon.)	Endpunkte	Ergebnis
Strauer et al., 2002	Intrakoronar	BM-MNCs Kultur über Nacht	10	3	Sicherheit LVEF Infarktgröße	Sicher Keine Verb. kleiner
TOPCARE-AMI Assmus et al., (Britten/Schachinger) 2002, 2003, 2004	Intrakoronar	29 BM-MNCs 30 CEPC	59	4	Sicherheit LVEF ESV LVWM	Sicher Verbesserung Verkleinerung Verbesserung
Stamm et al., 2003	Intra-myokardial	CD133+ BMC	5	9	LVEF Myokard-durchblutung	Verbesserung Verbesserung
MAGIC Kang et al., 2004	Intrakoronar	10 PBMC nach Stimulation mit G-CSF 7 G-CSF	20	6	Sicherheit LVEF	Sicher Verbesserung
BOOST Wollert et al., 2004	Intrakoronar	BMC	30	6	Sicherheit LVEF	Sicher Verbesserung
Fernandez-Aviles et al., 2004	Intrakoronar	BMC	20	6-11	Sicherheit LVEF ESV WMSI	Sicher Verbesserung Verkleinerung Verkleinerung
Erbs et al., 2005	Intrakoronar	PBEPC nach Stimulation mit G-CSF	13	3	LVEF LVWM CFR Infarktgröße	Verbesserung Verbesserung Verbesserung Verbesserung
Janssens et al., 2006	Intrakoronar	BMC	33	4	LVEF Infarktgröße LV-Funktion	Keine Verb

Tabelle 4. Klinische Studien, die autologe Vorläuferzellen nach AMI einsetzten

AMI: Akuter Myokardinfarkt, **BM-MNC:** Bone Marrow Mononuclear Cells, **BMC:** Bone Marrow Cells, **CEPC:** Circulating Endothelial Progenitor Cells, **PBMC:** Peripheral Blood Mononuclear Cells, **PBEPC:** Peripheral Blood Endothelial Progenitor Cells, **G-CSF:** Granulocyte Colony Stimulating Factor, **LVEF:** Left Ventricular Ejection Fraction, **ESV:** End-Systolic Volume, **LVWM:** Left Ventricular Wall Motion, **WMSI:** Wall Motion Score Index, **CFR:** Coronary Flow Reserve

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielvorstellung

Seit Bekannt werden der endothelialen Vorläuferzellen wurde versucht diese zur Verbesserung der Ventrikelfunktion nach myokardialem Infarkt einzusetzen. Dabei stellte sich heraus, dass unterschiedliche Methoden, diese aus peripherem Blut zu gewinnen, zu unterschiedlichen Zellpopulationen führten. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die bislang am häufigsten eingesetzte Methode zu deren Gewinnung, unfraktionierte mononukleäre Zellen über einen kurzen Zeitraum in Kultur anzuzüchten, eine Population heterogener, mäßig proliferativer und kurzlebiger Zellen hervorbringt. Werden die Zellen jedoch auf die Expression von CD34 vorselektiert und über längere Zeit in Kultur gehalten, so wurde berichtet, dass eine homogene Population hochproliferativer, langlebiger Zellen entsteht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es beide Methoden der Kultivierung von endothelialen Vorläuferzellen mit Zellen aus dem Blut menschlicher adulter Probanden durchzuführen und die gewonnenen Zellen in ihrer Morphologie, ihrem Wachstumsverhalten, der Expression von Oberflächenmarkern und ihrer Fähigkeit zur in vitro Angiogenese zu vergleichen.

Das therapeutische Potential beider Zellpopulationen für die Verbesserung der Ventrikelfunktion soll in einem Myokardinfarktmodell der Nacktratte untereinander und mit einer Kontrollgruppe, die Pufferlösung statt Zellen erhält, verglichen werden. In vivo wird die Ventrikelfunktion echokardiographisch durch die Messung der linksventrikulären Auswurffraktion untersucht. Histologisch wird die Infarktgröße, das Ausdünnungsverhältnis und der Expansionsindex vermessen und die Angiogenese untersucht.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 25. 05. 1998 von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Projektnummer lautet 209.1/211-2531-72/04.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten werden an einer sterilen Reinraumwerkbank (Kojair Biowizard, Kojair Oy Tech, Finnland) durchgeführt. Die Zellen werden in einem Begasungsbrutschrank (HeraCell, Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf) bei 37°C, 4% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97% inkubiert.

Alle Materialien und Geräte werden vor ihrem Einsatz desinfiziert oder sterilisiert. Die Hände werden mit Einmalhandschuhen bedeckt. Das Zellkulturlabor wird in regelmäßigen Abständen mittels UV-Lampen bestrahlt.

3.2.1.1 Isolation und Kultur der angiogenen Zellen

Zur Gewinnung der angiogenen Zellen wurden 10-14 ml venöses Blut von gesunden, adulten Probanden abgenommen. Es wird zu gleichen Teilen mit Ficollreagenz (Ficoll-Hypaque TM Plus, Amersham Bioscience, UK) gemischt und anschließend 20 min. bei 1900 U/min. ohne Bremse zentrifugiert (Megafuge, Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland). Dadurch separieren sich die Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten von den Erythrozyten und Granulozyten in einem Überstand, der durch das Ficollreagenz stabil abgetrennt wird. Dieser Überstand wird abgenommen und dann 2 x mit Phosphatase Buffered Saline (GIBCO, Paisley, UK)(PBS) gewaschen.

Der Zellüberstand wird in ein Falconröhrchen pipettiert und mit 50 ml PBS zweimal für 10 min. bei 1700 U/min. zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wird in 50 ml M199 (20 % Fetal Calf Serum, 5ml Penicillin/Streptomycin auf 500 ml Medium) überführt und erneut zentrifugiert. Wiederum wird das Zellpellet in (1 ml) resuspendiert und die darin enthaltenen Zellen mit einem Zählgerät (Sysmex KX21, Norderstedt, Deutschland) gezählt. Jeweils 13 Millionen Zellen werden in mit Fibronectin beschichteten T25 Flasche mit 4-5 ml M199 ausgelegt. Nach 48stündiger Inkubation bei 37 °C werden die Zellen, die nicht adhärirt sind, im Überstand entnommen und erneut zentrifugiert, resuspendiert, gezählt und in Fibronectin beschichteten Flaschen jeweils 13x10⁶ Zellen wieder ausgelegt. Die Zellen werden

in den Brutschrank verbracht und jeden 2. Tag das Medium (M199) gewechselt. Jeden Tag werden unter dem Lichtmikroskop in 8 Zählfeldern mit 100-facher Vergrößerung die adhärennten Zellen ausgezählt und deren Mittelwert errechnet. Ein Zählfeld besitzt bei 100-facher Vergrößerung eine Größe von 156,25 μm^2 . Die Werte werden auf 1 mm^2 hochgerechnet und eine Wachstumskurve erstellt.

Zur Gewinnung der Zellen werden sie mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und das Zellpellet in 150 μl EBM2 ohne Zusätze gelöst.

3.2.1.2 Isolation und Kultur der endothelialen Zellen

Die endothelialen Zellen werden aus dem venösen Blut von Patienten gewonnen, die an einer koronaren Herzerkrankung leiden und im Deutschen Herzzentrum behandelt werden. Die Proben werden innerhalb von 4 h nach ihrer Gewinnung bearbeitet und wie oben beschrieben einer Ficoll-Fällung unterzogen.

Die Leukozyten werden mit magnetischen Beads gemischt, die an den CD34-Rezeptor (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) binden und 30 min. bei 4° C inkubiert. Danach wird die Suspension durch eine Magnetic-Cell-Sorting (MACS)-Säule (Miltenyi Biotec) laufen gelassen, welche die markierten Zellen isoliert. Die MACS-Säule wird mehrfach mit HF-Puffer gespült, die Säule aus dem Magneten herausgenommen und mit 5 ml HF-Puffer nochmals gespült, damit die CD34+ Zellen aus der Säule gewaschen werden. Der Vorgang wird mit einer neuen Säule wiederholt, um eine höhere Reinheit der Zellen zu gewährleisten.

Nach Isolierung der CD34+ Zellen werden diese mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CD34 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG Maus anti-human CD34-APC BD Bioscience, USA) für 45-60 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die apoptotischen Zellen markiert, indem die Zellsuspension für 10 min mit 7-Aminoactinomycin D (5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 7-AAD, BD Bioscience, USA) auf Eis inkubiert wird. Die Anzahl der lebenden

CD34-positiven Zellen wird durch eine Durchflußzytometrie (siehe Kapitel 3. 2.2.2) bestimmt.

Die Zellen werden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend zirka 200 000 Zellen in T12,5 Flaschen (Falcon Flask, BD Bioscience, Bedford, USA), die mit Fibronectin (5 µg/cm², Cell Systems Biotechnologie, St. Katharinen) beschichtet wurden, ausgelegt und mit 3 ml EBM2 bedeckt. Das Nährmedium EBM2 (Endothelial Basal Medium, Cambrex, Walkersville, USA) enthält in 500 ml folgende Zusätze: 10 ml FBS; 0,2 ml Hydrocortison; 2 ml hFGF-B, 0,5 ml VEGF; 0,5 ml R³-IGF;1, 0,5 ml Ascorbinsäure; 0,5 ml hEGF; 0,5 ml GA-1000 und 0,5 ml Heparin und wird dreimal in der Woche gewechselt.

Bei jedem Mediumwechsel wird unter dem Lichtmikroskop begutachtet, ob Zellen adhären, Zellhaufen bilden oder konfluent werden. Erscheinen sie konfluent, werden sie mit Hilfe von Trypsin abgelöst, mit PBS gewaschen und ihre Anzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Aus den kontinuierlich bestimmten Zellzahlen wird ein Wachstumsprofil erstellt. Nach Zentrifugation der Zellen bei 1400 U/min. für 5 min. werden sie, je nach Anzahl, auf mehrere T25 oder T75 Flaschen verteilt.

Für die Transplantation in das Rattenherz werden die Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst, zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 150 µl von einem Gemisch aus 498 µl EBM2 ohne Zusätzen und 2 µl Heparin resuspendiert.

3.2.1.3 Isolation und Kultur der Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Die Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) werden aus Nabelschnüren gewonnen, die in der Abteilung für Geburtshilfe des Klinikums rechts der Isar von den Patienten zu Forschungszwecken freigegeben wurden.

Die Nabelschnur wird mit 70%igem Alkohol desinfiziert und dann in PBS eingelegt. Mit einem alkoholgetränkten Tuch wird das Blut ausgestrichen. Nach Abklemmen der beiden Enden wird die Vene aufgesucht, in diese an jedem Ende eine Knopfkanüle eingeführt und durch eine Ligatur die Vene an den Knopfkanülen fixiert. An beiden Knopfkanülen wird ein 3-Wegehahn angeschlossen. Über einen 3-Wegehahn wird die Vene zuerst 2-mal mit PBS, dann einmal mit HF-Puffer (100 ml Hank´s Balanced Salt Solution, GIBCO, USA; 860 ml Aqua dest.; 20 ml 2%iges Fetal Calf Serum, GIBCO; 10 ml Hefe Buffer Solution, GIBCO; 10 ml Penicillin-Streptomycin, GIBCO) gespült und anschließend einmal mit Luft durchgeblasen. Nach Schließen eines Hahns wird die Vene mit 5%iger Collagenase gefüllt, die Nabelschnur wird verschlossen und in Alufolie gewickelt. So wird sie für 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wird die Flüssigkeit abgelassen und durch zweimaliges Spülen mit HF-Puffer und einmaligem Durchblasen mit Luft möglichst viele Zellen gewonnen. Die Zellsuspension wird abzentrifugiert und die Zellen in fibronectin-beschichteten Flaschen in EBM2 mit Zusätzen ausgelegt. Der Mediumwechsel erfolgt dreimal die Woche.

3.2.2 Screening der Zellen

3.2.2.1 Morphologie

Die Beurteilung der Morphologie der Zellen findet unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 100 XE, Zeiss, Hallbergmoos, Deutschland) statt. Bei 100-facher Vergrößerung werden Aufnahmen mit einer digitalen Kamera (AxioCam, Zeiss) gemacht, die auf dem Computer in dem Programm Axiovision 3.0.6 (Zeiss) ausgewertet werden.

3.2.2.2 Durchflußzytometrie (FACS)

Es wird das Verfahren des fluorescence activated cell sorting (FACS) angewendet, um die Anzahl der Zellen mit spezifischen Oberflächenmarkern zu bestimmen.

Für diese Untersuchung müssen die Zellen mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert, in PBS gewaschen und das Zellpellet in 600 µl PBS resuspendiert werden. Die Zellen werden mit Antikörpern für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Sie binden an bestimmte Oberflächenantigene und sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Danach werden die Zellen mit PBS gewaschen, zentrifugiert und in 200 – 250 µl PBS wieder gelöst.

Das FACS-Gerät (FACSCalibur, Becton Dickinson, Bedford, USA) arbeitet auf dem Prinzip der Durchflußzytometrie. Die Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren dort einen Laserstrahl. Je nachdem, welche Antikörper gebunden wurden, emittieren sie unterschiedliches Streulicht. Anhand dessen kann das Gerät die Zellen aufteilen und zählen. Da verschiedenfarbige Laser eingesetzt werden, können immer 4 Oberflächenantigene gleichzeitig bestimmt werden. Die Ergebnisse werden auf Computer mit dem Programm CELL Quest 3.3 (Becton Dickinson) aufgezeichnet. Es werden pro Messung 50-100 000 Events gemessen, bei einer Messrate von 300-500 Events/sec.

Zum Eichen des Nullpunktes wird Aqua dest verwendet, als Isoprobe eine Zellsuspension, die nicht mit Antikörpern inkubiert wurde.

Sowohl die Early als auch die Late Outgrowth EPCs und die HUVECS werden auf die Expression der Marker CD14, CD31, CD45, CD34, CD133, VEGFR2, CXCR3 und CXCR4 untersucht.

Folgende Antikörper werden verwendet:

CD14: 5 µg/ml Maus IgG anti-human CD14-PerCP (BD Bioscience, USA)

CD31: 100 µg/ml Maus IgG anti-human CD31 –PE (BD Bioscience, USA)

CD34: 100 µg/ml IgG Maus anti-human CD34-APC (BD Bioscience, USA)

CD45: 50 µg/ml IgG Maus anti-human CD45-PE (Coulter Immunotech, Frankreich)

CD133: 100 µg/ml IgG CD133-PE (Miltenyi Biotech, Deutschland)

VEGFR-2: 50 µg/ml Maus IgG anti-human VEGFR-2-PE (R&D Systems, Deutschland)

CXCR3: 50 µg/ml Maus IgG anti-human CXCR-3-FITC (R&D Systems, Deutschland)

CXCR4: 50µg/ml Maus IgG anti-human CXCR-4-Fluorescein (R&D Systems, Deutschland)

3.2.2.3 Matrigel-Angiogeneseassay

Matrigel (Matrigel™Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, Bedford, USA) besteht aus Proteinen, die in der Basalmembran vorkommen. Seine Hauptbestandteile sind Laminin, Kollagen IV, Heparansulfatproteoglykane, Entactin und Nidogen. Da es aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Maussarkom gewonnen wird, enthält es dessen Wachstumsfaktoren: vor allem TGF-beta, Fibroblast Growth Factor und Tissue Plasminogen Activator. Werden Zellen auf diesem Substrat aufgebracht, können sie, je nach ihrer Veranlagung, netzartige Strukturen ausbilden.

Die Zellen werden aus den Flaschen mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl EBM2 gelöst. Die Suspension wird in eine, mit Matrigel ausgeschichtete, 96 Wellplatte verbracht und mit 150 µl EBM2 bedeckt.

Sie werden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag wird die Gefäßbildung unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 100 XE, Zeiss) in 50-facher Vergrößerung beurteilt und mit einer digitalen Kamera (AxioCam, Zeiss) fotografisch dokumentiert.

3.2.3 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienen männliche RNU-Nacktratten, da diese keinen Thymus besitzen und so auf Xenotransplantate nicht mit einer Immunantwort reagieren. Die Tiere stammen aus der Zucht der Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) und wiegen zwischen 180 und 280 g.

Sie benötigen aufgrund ihrer Immunsuppression eine möglichst pathogenarme Umwelt. Dies wird im Tierstall des Zentrum für präklinische Forschung im Klinikum Rechts der Isar durch folgende Maßnahmen gewährleistet: die Makrolon-Einzelkäfige vom Typ III werden vor der Verwendung dampfsterilisiert und mit entstaubter und entkeimter Holzfasereinstreu (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) befüllt. Die Atemluft wird durch einen Luftfilter (Fa. Techniplast, Italien) gefiltert und dann direkt in die Käfige eingeleitet. Dabei wird die Luftfeuchtigkeit bei 50-55% gehalten und die Temperatur bei 20-23 °C.

Als Futter erhalten die Tiere ein bestrahltes Zuchtfutter für Ratten und Mäuse (Rattenpellets, Fa. Altromin, Lage, Deutschland) sowie autoklaviertes Wasser ad libitum.

Eine Zeitschaltuhr sorgt für einen ausgeglichenen 12 h Tag/Nachtrhythmus.

Die Operationen, Ultraschalluntersuchungen sowie die Organentnahme finden in den Operationsräumen des Zentrum für präklinische Forschung im Klinikum Rechts der Isar statt.

3.2.4 Versuchsaufbau

1. Hauptversuch

Der Versuch dauert 14 Tage. Es gibt 3 Versuchstiergruppen:

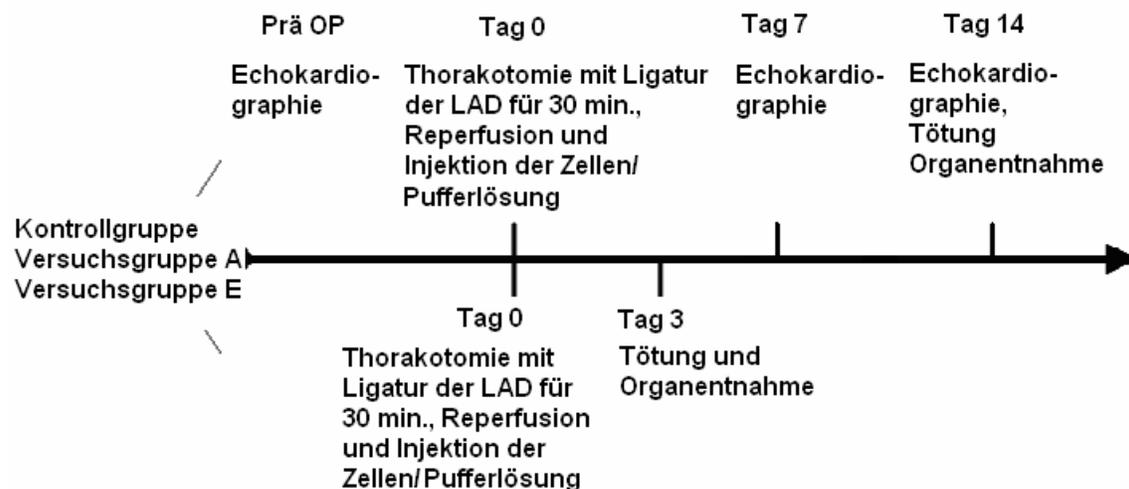
1.: Kontrollgruppe (10 Tiere): Injektion von 150 µl EBM2 ohne Zusätze

2.: Versuchsgruppe A (10 Tiere): Injektion von 1 Millionen angiogener Zellen gelöst in 150 µl EBM2 ohne Zusätze

3.: Versuchsgruppe E (14 Tiere): Injektion von 1 Millionen endothelialer Zellen gelöst in 150 µl EBM2 ohne Zusätze

Einige Tage vor der Operation wird eine Ultraschalluntersuchung durchgeführt und die Ausgangswerte des endsystolischen Volumens (ESV) und der Auswurffraktion (Ejection Fraction = EF) als Maß für die myokardiale Funktion ermittelt.

Am Tag 0 erfolgt die Thorakotomie mit Ligatur der LAD (Ramus interventricularis paraconalis der Arteria coronaria sinistra ; left anterior descending artery) und 30-minütiger Ischämie des Myokards. Daraufhin wird die Ligatur gelöst und es kommt zur Reperfusion. Den Tieren der Kontrollgruppe wird 150 µl EBM2 ohne Zusätze, an 5 Stellen im Perinfarktgebiet in das Myokard injiziert. Die Tiere der Versuchsgruppe A erhalten 1 Millionen angiogene Zellen und die Tiere der Versuchsgruppe E erhalten 1 Millionen endotheliale Zellen, jeweils gelöst in 150 µl EBM2 ohne Zusätze. Am Tag 7 und 14 wird erneut echokardiographisch die ESV und die EF gemessen und am Tag 14 wird im Anschluss daran die Ratte euthanasiert und das Herz entnommen.



2. Kurzzeitversuch

Der Versuch dauert 3 Tage. Es gibt 3 Versuchstiergruppen:

- 1.: Kontrollgruppe (10 Tiere): Injektion von 150 μ l EBM2 ohne Zusätze
- 2.: Versuchsgruppe A (10 Tiere): Injektion von 1 Millionen angiogener Zellen gelöst in 150 μ l EBM2 ohne Zusätze
- 3.: Versuchsgruppe E (14 Tiere): Injektion von 1 Millionen endothelialer Zellen gelöst in 150 μ l EBM2 ohne Zusätze

Am Tag 0 erfolgt die Thorakotomie mit 30 minütiger Ischämiephase nach Ligatur der LAD und anschließender Reperfusion. Die Tiere der Kontrollgruppe erhalten 150 μ l EBM2 ohne Zusätze intramyokardial, die Tiere der Versuchsgruppe A 1 Millionen angiogene Zellen und die Tiere der Versuchsgruppe E 1 Millionen endotheliale Zellen, jeweils gelöst in 150 μ l EBM2 ohne Zusätze.

Am Tag 3 wird die Ratte euthanasiert und die Organe werden entnommen.

3.2.5 Versuchsdurchführung

3.2.5.1 Anästhesie und Monitoring

Die Ratten werden mit einer vollständig antagonisierbaren Dreifachnarkose anästhesiert. Diese besteht aus einem alpha2-Adrenozeptoragonisten (0,15 mg/kg Medetomidin, Dormicum[®], Roche, Grenzach-Wyhlen), einem Benzodiazepin (2 mg/kg Midazolam, Dormitor[®], Pfizer, Karlsruhe) und einem Opioid (0,005 mg/kg, Fentanyl[®], ratiopharm, Ulm). Eine einmalige intramuskuläre Applikation hält ca. 40 – 60 Minuten und kann durch wiederholte Gaben verlängert werden.

Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums werden die Tiere mit einem Venenverweilkatheter (VENFLON PRO, 16GA, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) intubiert und an ein Beatmungsgerät (Anesthesia Workstation, Voelker GmbH, Kaltenkirchen) angeschlossen. Das Gerät beatmet die Ratten mit 100 % Sauerstoff mit einer Frequenz von 55 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 10 ml.

Um die Kornea vor Austrocknung zu schützen appliziert man Augensalbe (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Roche, Grenzach-Wyhlen).

Für die Operation werden die Ratten in Seitenlage auf einer Wärmeplatte gelagert und die Vorderbeine in nach kranial gestreckter Lage fixiert.

Zum Monitoring der Vitalfunktionen dienen ein Pulsoximeter (Nonin 8600V) und eine rektales digitales Thermometer. Die gemessene Temperatur liegt zwischen 36,5 und 37,5 °C.

Eine halbe Stunde vor Operationsende verabreicht man den Tieren Buprenorphin (0,1 mg/kg KG Temgesic[®], Essex, Deutschland) s.c. als Analgetikum. Die Gabe wird im Abstand von 12 h über 3 Tage wiederholt.

Die Anästhesie wird durch Atipamezol (0,75 mg/kg KG ANTISEDAN[®], Pfizer, Karlsruhe) und Flumazenil (0,2 mg/kg KG ANEXATE[®], Roche) s.c. antagonisiert.

Nach wiedererlangen des Schluckreflexes erhalten die Ratten Metamizol-Natrium (Novalgin[®], Sanofi-Aventis, Frankfurt a.M.) per os als zusätzliche Analgesie. Auch dies wird ebenfalls über 3 Tage in 12 stündigem Abstand wiederholt verabreicht.

3.2.5.2 Echokardiographie

Die Untersuchung erfolgt in Vollnarkose unter Sauerstoffbeatmung. Es wird ein mobiles Ultraschallgerät aus der Humanmedizin (GE Vivid Five, Horten, Norwegen) mit einer 10 MHz-Sonde verwendet.

Zur Ermittlung der Auswurfraction (Ejection Fraction = EF) wird die Sonde parallel zum Sternum angelegt um einen Längsschnitt des linken Ventrikel auf Mitralklappenebene im B-Mode zu erhalten. Planimetrisch wird das enddiastolische und das endsystolische Volumen ermittelt. Daraus errechnet man anhand der Simpson-Formel die EF, indem man das Schlagvolumen durch das enddiastolische Volumen teilt. Das Schlagvolumen ergibt sich aus der Subtraktion des endsystolischen Volumens vom enddiastolischen Volumen. Dieser Parameter gibt einen Hinweis auf das Pumpvermögen des Herzens. Das endsystolische Volumen vermittelt einen Eindruck der Dilatation des Ventrikels durch das Remodeling. Die Messung wird 4-mal pro Untersuchung durchgeführt und die Mittelwerte errechnet.

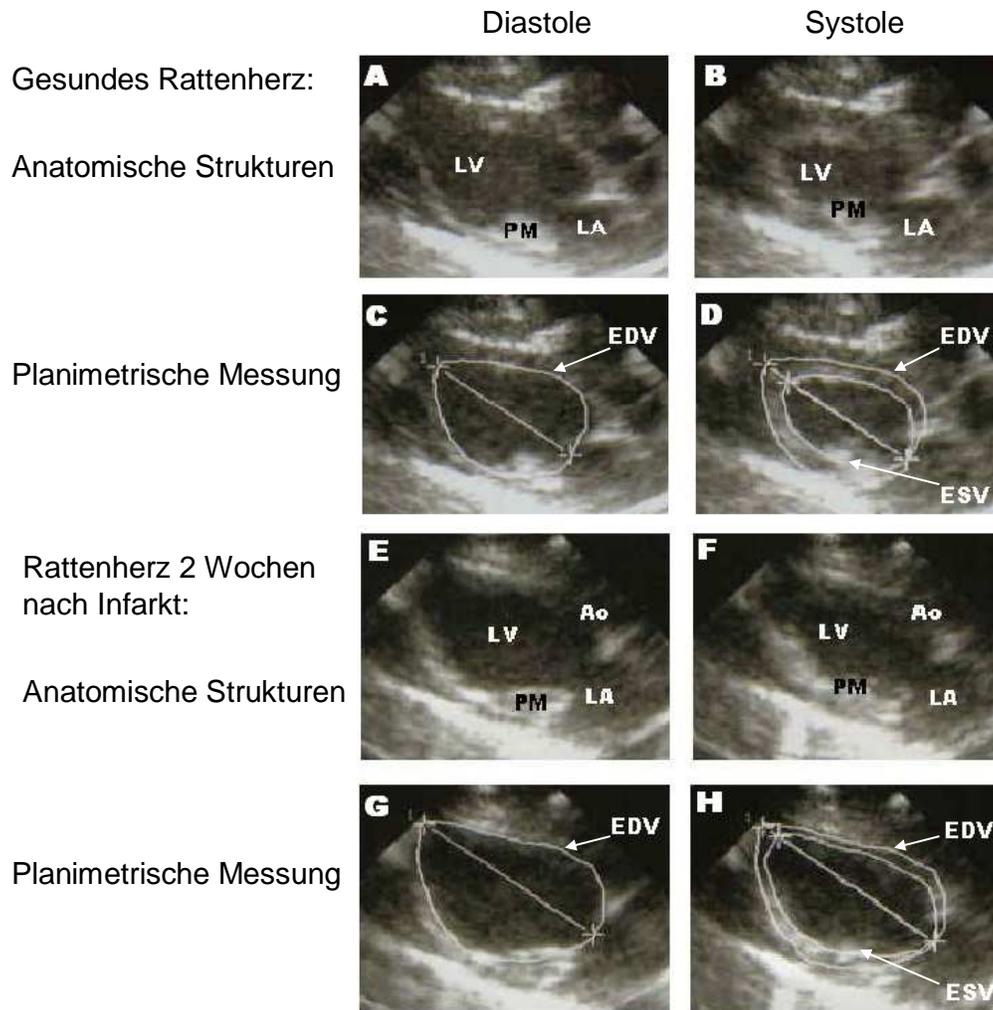


Abbildung 7. Sonographische Messung der Auswurfraction

A-D: Gesundes Rattenherz; E-H: Rattenherz 2 Wochen nach Infarkt

A/B, E/F: Anatomische Strukturen (LV: linker Ventrikel; LA: linkes Atrium;
PM: Papillarmuskel; Ao: Austreibungsbahn der Aorta)

C/D, G/H: Planimetrische Messung: (EDV: Enddiastolisches Volumen;
ESV: Endsystolisches Volumen)

3.2.5.3 Thorakotomie und Transplantation der Zellen

Die Operation erfolgt unter Vollnarkose mit Sauerstoffbeatmung.

Die Ratte wird auf der rechten Seite liegend auf einem Wärmetisch platziert und die Vorderbeine, nach kranial gestreckt, ausgebunden. Die linke Thoraxwand wird rasiert, mit Alkohol entfettet und mit Povidon-Jod-Lösung (Braunol®, Fa. Braun, Melsungen) desinfiziert. Mit einem sterilen Lochtuch wird das OP-Feld abgedeckt.

Die Haut wird mit einem Skalpell durchtrennt, beginnend auf halber Höhe des Thorax im 3. Interkostalraum ca. 4 cm nach ventral.

Mit einer Metzenbaumschere präpariert man sich stumpf durch den M. cutaneus trunci, den M. latissimus dorsi und den M. serratus ventralis. Die Mm. intercostales werden mit der geschlossenen Schere durchstoßen und die Öffnung durch Spreizen ihrer Schenkel erweitert, bis man einen Rippenspreizer einsetzen kann.

Das Perikard wird mit einem Mikrodissektor eröffnet, wobei es vermieden wird das darin eingelagerte Fett zu verletzen, da darin oft größere Blutgefäße verlaufen.

Der Ramus interventricularis paraconalis der A. coronaria sinistra wird mit einem Faden (Vicryl, 6-0, TF-1-Nadel, Ethicon, Norderstedt) umstochen und ein chirurgischer Doppelknoten vorgelegt. Ein kurzes Fadenstück (Prolene, 0-0, Ethicon) wird eingelegt um das Wiedereröffnen zu erleichtern. Durch Anziehen des Knotens verschließt sich der R. interventricularis paraconalis und es entsteht eine Myokardischämie. Diese zeigt sich durch eine blässere Farbe des Myokards im Infarktgebiet und einen deutlichen Anstieg der Herzfrequenz. Bei einigen Tieren kommt es auch zu Herzarrhythmien oder sogar zu Kammerflimmern. In diesem Fall wird 0,1 ml Amiodaron (Cordarex®, Sanofi-Aventis, Frankfurt a.M.) auf das Herz getropft und mit einem sterilen, feuchten Wattestab dem Herzen ein impulsgebender Stups versetzt.

Nach einer halben Stunde endet die Ischämiephase und die Ligatur wird mit einem Mikrodissektor eröffnet. Dies führt zu einer Reperfusion des Myokards, was erneut Arrhythmien hervorrufen kann.

Mit einer Insulinspritze (U-40, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) werden nun die jeweilige Zellen bzw. bei der Kontrollgruppe die Pufferlösung an 5-6 Stellen in der Periinfarktzone intramyokardial injiziert. Es wird versucht den Infarkt in gleichmäßigen Abständen ringförmig zu umstechen.

Ehe die Rippen mit Einzelheften (Vicryl, 3-0, SH-1-Nadel, Ethicon) verschlossen werden, wird durch kurzzeitig erhöhtes Atemvolumen die Luft aus dem Thorax

EIGENE UNTERSUCHUNGEN: MATERIAL UND METHODEN

entfernt. Die Muskulatur und die Unterhaut werden durch eine fortlaufende Naht (Vicryl 6-0, TF-1-Nadel, Ethicon) und die Haut mit U-Heften (Vicryl 3-0, SH-1-Nadel, Ethicon) verschlossen.

Nach Antagonisierung der Anästhesie, wird mit der Extubation bis zum Wiedererlangen des Schluckreflexes gewartet. Das Tier wird zur Erhaltung der Körpertemperatur unter eine Rotlichtlampe gesetzt und Sauerstoff in den Käfig eingeleitet. Da die Tiere als Nebenwirkung auf das Buprenorphin mit Allotriophagie reagieren, wird der Käfig mit autoklaviertem Heu eingestreut. Die postoperative Analgesie wird wie oben beschrieben durchgeführt.

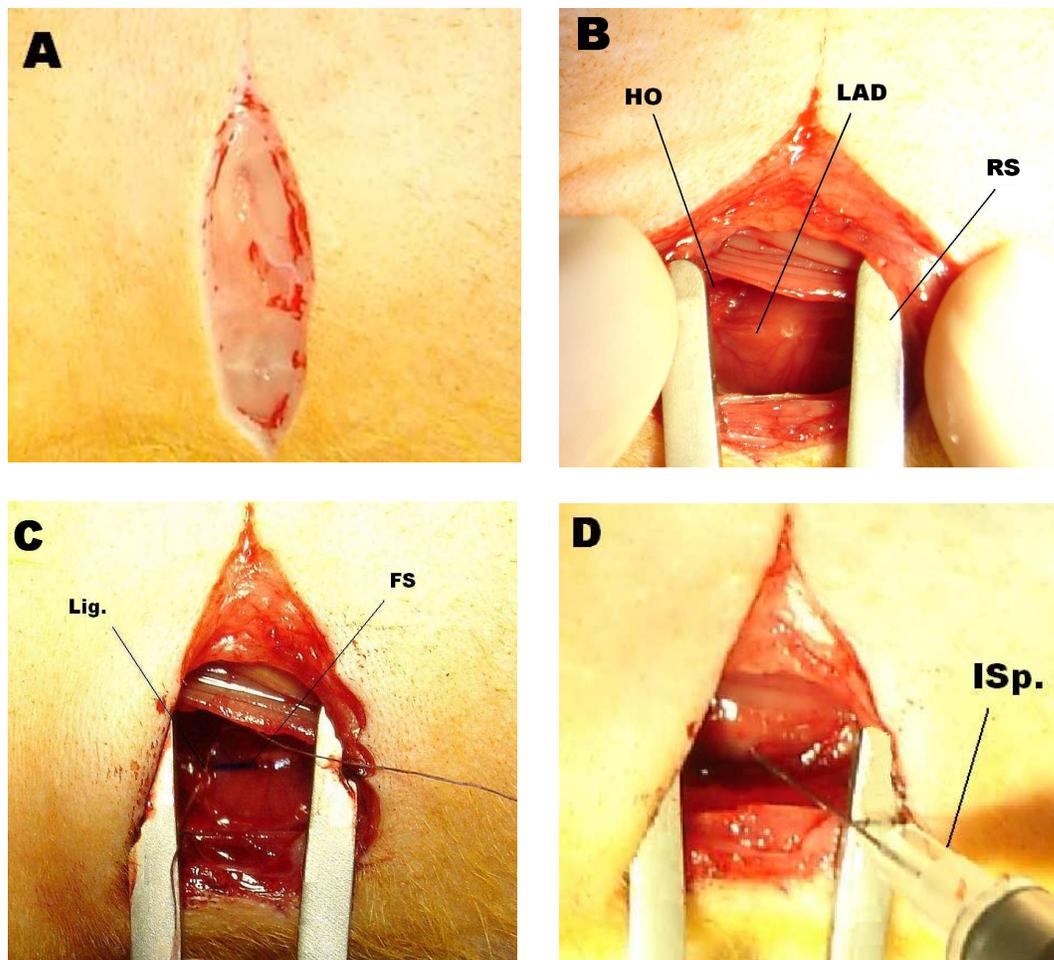


Abbildung 8. Thorakotomie mit Ligatur der LAD

A: Hautschnitt

B: Eröffnung des Thorax (HO: Herzohr, LAD: Left Anterior Descending Arterie, RS: Rippenspreizer)

C: Ligatur der LAD (Lig.: Ligatur, FS: Fadenstück zur Vereinfachung der Wiedereröffnung)

D: Injektion der Zellen in das Myokard nach Reperfusion (ISp.: Insulinspritze)

3.2.5.4 Intraoperative Komplikationen

Während der Operation treten drei verschiedene wesentliche Komplikationen auf: Blutverlust, reduzierte Sauerstoffsättigung und Arrhythmien.

Der Blutverlust wird unterschieden in geringgradigen, mittelgradigen und hochgradigen Blutverlust. Blutungen von weniger als 0,1 ml gelten als geringgradig und werden z.B. durch die Einstichlöcher im Myokard verursacht. Als mittelgradig werden Blutungen bis 0,5 ml gewertet und sie können z. B. dann entstehen, wenn bei der Zellinjektion ein anderes Koronargefäß, z.B. eine Vene verletzt wird. Was darüber hinaus geht, gilt als hochgradiger Blutverlust und tritt z. B. bei Verletzung der LAD oder der Vena thoracica interna auf.

Die periphere Sauerstoffsättigung wird während der Operation mit einem Pulsoximeter überwacht und beträgt zu Anfang der Operation 100 %. Sie wird beeinträchtigt durch die Eröffnung des Thorax, wodurch die linke Lunge kollabiert, und durch die Herzinsuffizienz nach Ligatur der LAD. Schwankungen im Bereich zwischen 90 und 100 % nach Ligatur werden in der Auswertung nicht berücksichtigt, da sie durch die Art des Eingriffes bedingt sind. Gewertet wird ein Abfall unter 90 % oder sogar unter 85 %, wobei die Überlebenschancen sich unter 90 % nach 5 Minuten und unter 85 % bereits nach 1 Minute deutlich verringern.

Herzrhythmusstörungen können zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Operation auftreten: während der Ischämiephase, zu Beginn der Reperfusion und nach Injektion der Zellen. In der Auswertung wird nur das deutlich sichtbare Auftreten von Kammerflimmern berücksichtigt, da nur in diesem Fall interveniert wird.

3.2.5.5 Euthanasie und Organentnahme

Die Tötung erfolgt in Vollnarkose, durch Injektion von Pentobarbital (300 mg/kg Narkoren[®], Merial, Rohrdorf) intravenös in den Venenwinkel.

Nach Eintritt des Todes wird der Thorax eröffnet und das Herz entnommen. Die Gefäßstämme sowie die Herzohren werden entfernt und aus den Kammern das Blut mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült. Das Herz wird anschließend mit einem Skalpell quergeteilt. Die apikale Hälfte wird in 4 %iger Formaldehydlösung fixiert. Aus der atrialen Hälfte wird das Infarktgebiet ausgeschnitten und beide Stücke bei – 80°C eingefroren.

3.2.6 Probenaufbereitung

3.2.6.1 Histologie

Die formalinfixierten Proben werden in Parafin eingebettet und aus den Blöcken werden mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM 335 E, Fa.: MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) 2 µm dicke Scheiben geschnitten. Pro Ebene werden Schnitte für folgende Färbungen angefertigt:

- Masson-Trichrom-Färbung (MT)
- Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Aktin glatter Muskelzellen
- Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen von-Willebrand-Faktor

Zwischen den Ebenen ist ein Abstand von 30 µm. Je nach der Größe des Herzens ergeben sich so 10-14 Ebenen pro Herz.

3.2.6.2 Ventrikelmorphologie

Zur Bestimmung der ventrikulären Morphologie werden die Masson-Trichrom-Schnitte ausgewertet. Das kollagene Bindegewebe, das mit Narbengewebe des infarzierten Gebietes gleichgesetzt wird, ist in dieser Färbung tiefblau, die Zellkerne rot und das Zytoplasma rosa.

Die Schnitte werden in 10-facher Vergrößerung fotografiert und mit dem Programm AXIO VISION (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Deutschland) gespeichert. Nach Eingabe in das Bildanalyseprogramm Sigma Scan Pro 5, Image Analysis Version 5.0.0 (Aspire Software International, Ashburn, USA) werden die Fläche des linken Ventrikels (total LV area), die Fläche der linken Kavität (cavity area) und der des blauen Infarktbereichs (infarction area) vermessen. Die Wanddicke im vernarbten Infarktbereich (scar thickness) und des nicht-infarzierten Septums (septal thickness) werden ebenfalls erfasst.

Daraus wird der prozentuale Anteil der Infarktgröße sowie der Kavität am gesamten linken Ventrikel ($\text{infarction area}/\text{total LV area}$; $\text{cavity area}/\text{total LV area}$), das Verdünnungsverhältnis (thinning ratio: $\text{scar thickness}/\text{septal thickness}$) der Herzwand und der Expansionsindex (expansion index: $(\text{cavity area}/\text{total LV area}) \times (\text{septal thickness}/\text{scar thickness})$) errechnet.

3.2.6.3 Immunhistochemie

Es werden folgende Färbungen angefertigt:

- Aktinfärbung: (Monoclonal Mouse Anti-Human Alpha Smooth Muscle Actin Clone 1a4, DakoCytomation, Carpinteria, USA)
- von-Willebrand-Faktorfärbung: (Rabbit anti-human vWF-Antikörper, Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)

a) Aktinfärbung

Aktin ist ein Filamentprotein in Muskelzellen. Der verwendete Antikörper in dieser Färbung bindet nur an das Aktin glatter Muskelzellen. Mit dieser Färbung lassen sich glatte Muskelzellen und somit Gefäßwände größerer Gefäße darstellen.

Die Schnitte werden über Nacht in einen 56°C warmen Brutschrank gestellt, mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparafiniert und mit einem Tris-Puffer (60,5g Trizma-Base, 700 ml Aqua dest., 2N HCL, 90 g NaCl) eingestellt. Der Antikörper wird aufgetragen und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit Tris-Puffer wird der biotinylierte Sekundärantikörper (Biotinylated anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulins in phosphate buffered saline, LSAB2-Reagenz 1, DakoCytomation) hinzugegeben und für 10 Minuten inkubiert. Wieder wird dreimal gespült und dann das, mit alkalischer Phosphatase markierte, Streptavidin für 10 Minuten dazugegeben (Streptavidin conjugated to alkaline phosphatase in PBS, LSAB2-Reagenz 2, DakoCytomation). Nach erneutem Spülen, folgt die Färbung mit Red Chromogen (Liquid permanent red chromogen, DakoCytomation) für 10 Minuten und schließlich die Gegenfärbung für 1 Minute mit Hämalun. In einer aufsteigenden Alkoholreihe werden die Schnitte entwässert und anschließend mit Eindeckmedium (Pertex®, Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland) eingedeckelt.

Die Färbung folgt dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. Der Primärantikörper bindet an das Protein, der biotinylierte Sekundärantikörper an den primären. Das Streptavidin hat eine hohe Affinität zu dem Biotin und kann durch seine Markierung mit alkalischer Phosphatase mit dem Chromogen reagieren. Dadurch entsteht die eigentliche Färbung.

Durch diese Färbung stellen sich die glatten Muskelfasern braunrot dar und das Herzmuskelgewebe blassrosa. Unter dem Lichtmikroskop werden in einer 200-

fachen Vergrößerung jeweils 8 Sichtfelder im Infarktgebiet und 8 im Randgebiet pro Schnitt ausgezählt.

b) von-Willebrand-Faktorfärbung

von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein, das an der Gerinnung beteiligt ist. Es ist vorhanden in Thrombozyten, subendothelialelem Gewebe und den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen. Er färbt die Endothelzellen in kleinen Kapillaren an.

Das Gewebe wird mit 0,05 g Protease (gelöst in 50 ml Tris-Puffer) für 20 Minuten demaskiert, anschließend dreimal mit Tris-Puffer gespült und mit Blockierlösung (Vectastain®, Blocking Kit) behandelt.

Der Primärantikörper wird aufgetropft und für 60 Minuten inkubiert. Es wird dreimal mit Tris-Puffer gespült. Der Sekundärantikörper (Vectastain®, Biotinylated Antibody IgG anti Rabbit) wird für 30 Minuten aufgetragen und danach dreimal gespült. Mit dem Avidin, das mit alkalischer Phosphatase markiert wurde (Vectastain®, ABC-AP-Kit, AP-Reagenz) werden die Objektträger für 60 Minuten inkubiert und danach dreimal gespült. Die Färbung erfolgt mit LPR-Chromogen für 10 Minuten und die Gegenfärbung mit Hämalun für 1 Minute. Nach erneutem Spülen werden die Schnitte in der Alkoholreihe entwässert und anschließend eingedeckelt.

Die braunrot angefärbten Strukturen können in einer 200-fachen Vergrößerung in jeweils 8 Gesichtsfeldern im Infarktgebiet und im Randgebiet ausgezählt werden.

3.2.6.4 Statistische Berechnung und Dokumentation

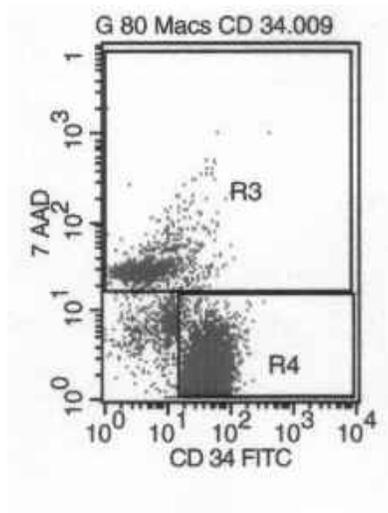
Die statistische Auswertung erfolgt mit SPSS10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Mittelwertsunterschiede zwischen den Gruppen werden anhand von t-Tests auf Signifikanz geprüft. Das Signifikanzniveau wird auf eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gesetzt, ist $p < 0,01$, werden die Mittelwertsunterschiede als hochsignifikant beurteilt. In den Klammern hinter den Mittelwerten wird der Standardfehler (SEM) angegeben.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Screening der Zellen

3.3.1.1 Anzahl CD34-positiver Zellen nach immunomagnetischer Zellsortierung

Die Gesamtzahl aller Zellen in der Zellsuspension wird in der Region 1 (R1) gemessen. Diese beträgt 56214 Zellen. Die Anzahl der apoptotischen Zellen wird in der Region 3 (R3) gemessen und beträgt 6315 Zellen. CD34+ Zellen werden in der Region 4 (R4) gemessen. Deren Anzahl beträgt 45195 Zellen. Daraus ergibt sich, dass 90,1 % der lebenden Zellen nach der immunomagnetischen Zellsortierung CD34+ sind.



Region	Zellen	Events	%
R1	Gesamtzellzahl	56214	100
R3	Apoptotische Zellen	6315	11,23
R4	CD34+ Zellen	45195	80,40

Abbildung 9. Bestimmung der Anzahl CD34+ Zellen

FACS-Analyse der CD34+ Zellen nach deren Anreicherung durch immunomagnetische Zellsortierung (repräsentatives Beispiel).
 R1: Gesamtzahl der Zellen; R3: apoptotische Zellen; R4: CD34+ Zellen; 7 AAD: 7 Amino-actinomycin D; FITC: Fluoresceinisothiocyanat

3.3.1.2 Morphologie und Wachstumsverhalten der Zellen

Angiogene Zellen:

Die anfänglich ausgelegten Zellen besitzen eine runde Gestalt. Nach ca. 4-5 Tagen adhäreren die ersten Zellen. Sie sind von spindelförmigem Aussehen. Sie vermehren sich bis etwa zum 7.-14. Tag in Kultur, erreichten dann ihr Wachstumsmaximum und gehen danach in der Anzahl wieder zurück. Initial werden 13×10^6 mononukleäre Zellen ausgelegt. Nur ein geringer Anteil von ihnen adhärert und bildet Kolonien. Das Wachstumsmaximum liegt zwischen $1-2 \times 10^6$ angiogener Zellen.

Endotheliale Zellen:

Die anfänglich ausgelegten Zellen besitzen eine runde Gestalt. Nach ca. 2-3 Wochen wachsen Kolonien. Diese Zellen sind von sehr regelmäßigem Aussehen und zeigen die für Endothelzellen typische kopfsteinpflasterähnliche Morphologie. Ihre Anzahl steigt rasch von einigen wenigen Zellen an, so dass sie nach kurzer Zeit eine konfluente Zellschicht bildeten. Das Wachstum hält über mehrere Wochen an. Die initial ausgelegte Menge liegt zwischen $1-8 \times 10^5$. Nach mehreren Wochen in Kultur können sie Zellzahlen von 1×10^{11} erreichen.

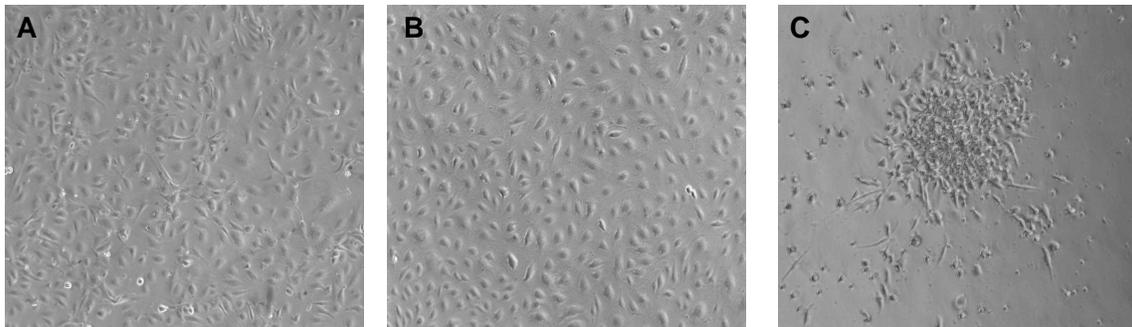


Abbildung 10. Morphologie der Zellen in Kultur

Aufnahme der Zellen in 100-facher Vergrößerung

A: HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) nach 9 Passagen mit kopfsteinpflasterähnlicher Morphologie

B: Endotheliale Zellen nach 5 Passagen mit kopfsteinpflasterähnlicher Morphologie

C: Angiogene Zellen nach 3 Tagen mit spindelförmiger Morphologie

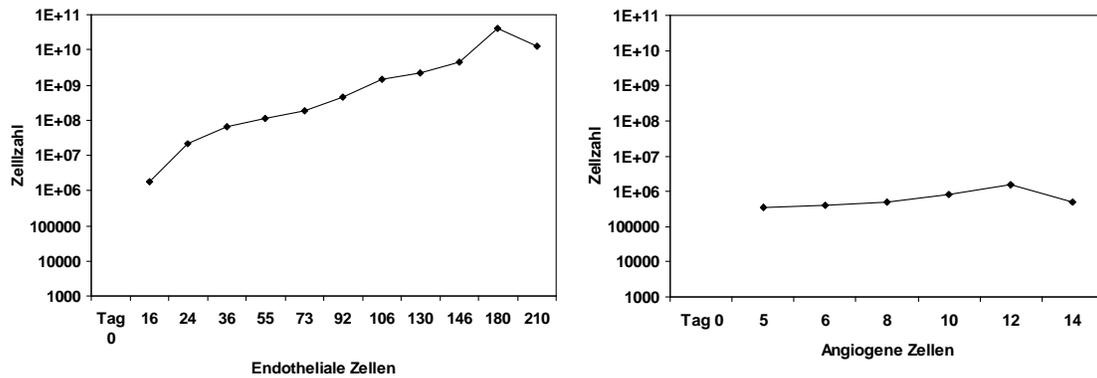


Abbildung 11. Wachstumszunahmen der Zellen

(Repräsentatives Beispiel) Die endotheliale Zellen vervielfachten sich von anfänglich 10E5 auf über 10E10, die angiogenen Zellen nur von 10E5 auf 10E6

3.3.1.3 Angiogeneseassay

Die Fähigkeit kapilläre Strukturen auf Matrigel zu bilden unterscheidet sich deutlich zwischen den Zellarten. Endotheliale Zellen sind, wie auch HUVECs, in der Lage ein Netzwerk kapillärer Strukturen auszubilden. Angiogene Zellen sind jedoch dazu nicht fähig.

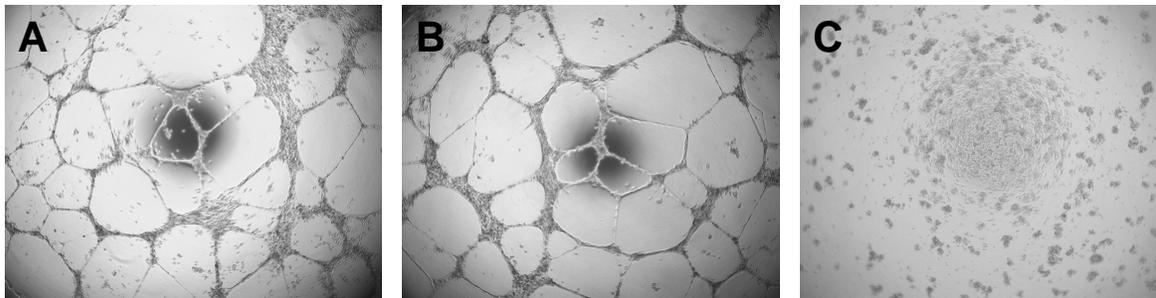


Abbildung 12. Angiogeneseassay auf Matrigel

30000 Zellen in 96 Wellplatte nach 24 h in 50-facher Vergrößerung

A: HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) bilden tubuläre Strukturen

B: Endotheliale Zellen bilden tubuläre Strukturen

C: Angiogene Zellen zeigen keine Tubulusformation

3.3.1.4 Durchflußzytometrie

Endotheliale Zellen:

Diese Zellen sind deutlich positiv für Marker, die auch von Endothelzellen exprimiert werden, wie z.B. CD31, VEGFR-2 und CXCR-4. Sie sind ebenfalls positiv für Marker, die als Marker endothelialer Vorläuferzellen gelten, wie z.B. CD 133 und CD34, sie sind hingegen negativ in der Expression von Oberflächenmarkern, die auf anderen Blutzellen zu finden sind, wie z.B. CD 14, CD 45, außer einer sehr geringgradigen Expression des Markers hämatopoetischer Vorläuferzellen CXCR-3.

Angiogene Zellen:

Bei den endothelialen Markern zeigen sich diese Zellen positiv für das relativ unspezifische CD 31, jedoch kaum für VEGFR-2 und CXCR4. Sie sind kaum für CD34 und nicht für CD133 positiv. Sie zeigen sich zwar für CD14 negativ, jedoch zeigen sie sich positiv für CD45, einem Marker, der vor allem von Leukozyten exprimiert wird, und für CXCR-3, der vor allem von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN: ERGEBNISSE

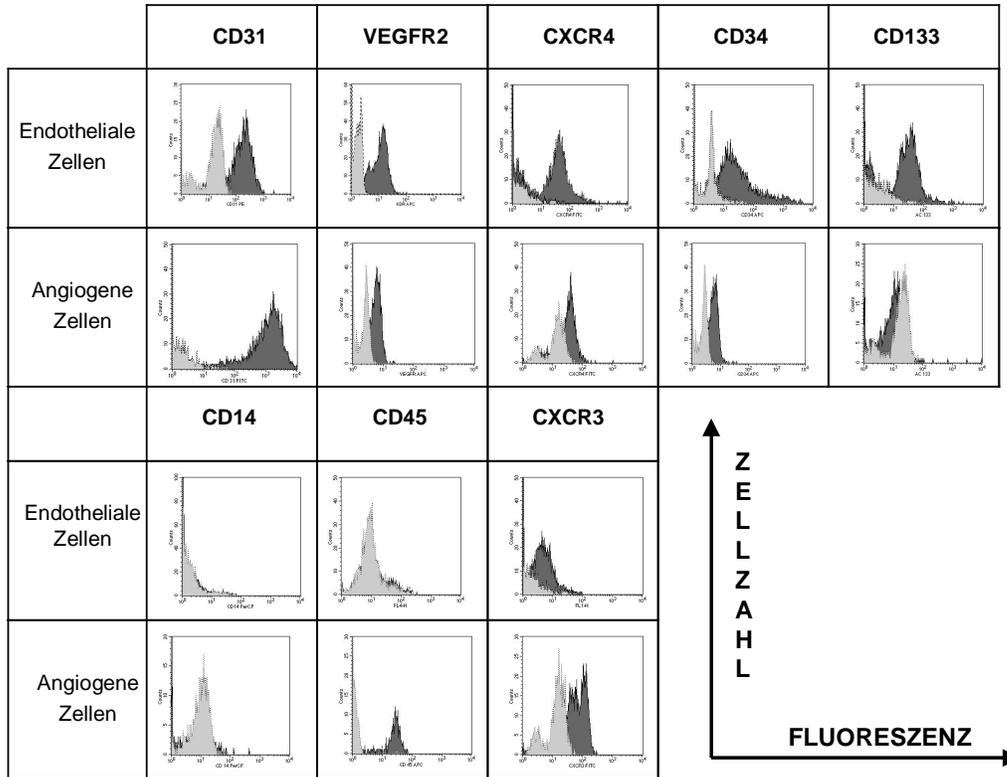


Abbildung 13. Expression der Oberflächenmarker

(Repräsentatives Beispiel)

Die helle Kurve stellt die Isoprobe bzw. die Eigenfluoreszenz der Zellen dar, die dunkle Kurve die Fluoreszenz der markierten Antikörper. Eine Überlagerung der beiden Kurven bedeutet, dass der Marker nicht exprimiert wird.

Endotheliale Marker: CD31, VEGFR-2 und CXCR-4

Progenitorzellmarker: CD34 und CD133

Monozytenmarker: CD14, Leukozytenmarker: CD45;

Marker auf hämatopoetischen Vorläuferzellen: CXCR-3

3.3.2 In vivo Untersuchungen

3.3.2.1 Mortalität

Kurzzeitversuch:

Von insgesamt 15 Tieren überleben 15. Dies entspricht einer Mortalität von 0 %. Alle Tiere können in die Auswertung einbezogen werden.

Hauptversuch:

Von insgesamt 42 Tieren überleben 34. Dies entspricht einer Mortalität von 19 %. In der Kontrollgruppe überleben 10 von 14, in der Versuchsgruppe E 14 von 18 und in der Versuchsgruppe A 10 von 10. Somit beträgt die Sterblichkeitsrate der Kontrollgruppe 29 %, der Versuchsgruppe E 22 % und der Versuchsgruppe A 0 %. Insgesamt 7 der Tiere sterben an hochgradigem Blutverlust während der Operation, 1 Tier der Kontrollgruppe stirbt an unkontrollierbaren Arrhythmien, nach Ligatur der LAD.

Die Versuchsauswertung bezieht sich auf 34 Tiere, die verstorbenen Tiere werden nicht in die Wertung mit einbezogen (siehe Tabelle 5).

3.3.2.2 Komplikationen

Kurzzeitversuch:

Im Kurzzeitversuch erleiden 60 % der Tiere sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Versuchsgruppe E nur einen geringgradigen oder keinen Blutverlust (3 Tiere) und jeweils 20 % einen mittelgradigen und einen hochgradigen Blutverlust (1 Tier). In der Versuchsgruppe A erleiden jeweils 40 % der Tiere keinen oder einen mittelgradigen (2 Tiere) und 20 % einen hochgradigen (1 Tier) Blutverlust.

Kammerflimmern tritt bei jeweils 20 % der Tiere der Kontrollgruppe und Versuchsgruppe A (1 Tier) auf.

Hauptversuch:

In der Kontrollgruppe treten bei 57 % der Tiere geringgradige oder keine Blutverluste auf (8 Tiere), bei 14 % mittelgradige Blutverluste (2 Tiere) und bei 29 % hochgradige (4 Tiere). Von diesen 4 Tieren sterben 3 an den Folgen des Blutverlustes.

In der Versuchsgruppe E verlieren 56 % der Tiere nur geringgradig oder kein Blut (10 Tiere), 17 % mittelgradig (3 Tiere) und 28 % verlieren hochgradig an Blut (5 Tiere). Von diesen 5 Tieren sterben 4 an den Folgen des Blutverlustes.

In der Versuchsgruppe A sind es 80 % der Tiere, die geringgradige oder keine Blutverluste erleiden (8 Tiere) und jeweils 10 %, die einen mittelgradigen oder hochgradigen Blutverlust erleiden (je 1 Tier).

Kammerflimmern tritt bei 36 % der Tiere der Kontrollgruppe auf (5 Tiere), bei 33 % der Tiere der Versuchsgruppe E (6 Tiere) und bei 20 % der Tiere der Versuchsgruppe A. Nur bei einem Tier der Kontrollgruppe kann das Kammerflimmern nicht durch lokale Gabe von Cordarex® unter Kontrolle gebracht werden und das Tier stirbt an den Folgen. Es können keine Signifikanzen zwischen den Unterschieden festgestellt werden.

Ein Absinken der O₂-Sättigung unter 90 % tritt nur in Zusammenhang mit hochgradigen, nicht stillbaren Blutungen auf.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant (siehe Tabelle 5).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN: ERGEBNISSE

		Kontrollgruppe		Versuchsgruppe E		Versuchsgruppe A	
3 Tage:		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Mortalität		0	0	0	0	0	0
Blutverlust	0	3	60	1	20	2	40
	+	0	0	2	40	0	0
	++	1	20	1	20	2	40
	+++	1	20	1	20	1	20
Kammerflimmern		1	20	0	0	1	20
14 Tage:		Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Mortalität		4	29	4	22	0	0
Blutverlust	0	3	21	9	50	6	60
	+	5	36	1	6	2	20
	++	2	14	3	17	1	10
	+++	4	29	5	28	1	10
Kammerflimmern		5	36	6	33	2	20

Tabelle 5. Mortalität und Komplikationen

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden; Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden; +: geringgradiger Blutverlust < 0,1 ml; ++: mittelgradiger Blutverlust 0,1-0,5 ml; +++: hochgradiger Blutverlust > 0,5 ml

3.3.2.3 Gewicht

Das durchschnittliche Gewicht der Ratten beträgt vor der Operation in der Kontrollgruppe 256 g (± 9), in der Versuchsgruppe E 264 g (± 11) und in der Versuchsgruppe A 227 g (± 6). Am Tag 14 beträgt es in der Kontrollgruppe 244 g (± 11), in der Versuchsgruppe E 274 g (± 9) und in der Versuchsgruppe A 237 g (± 11). Somit ergibt sich für die Ratten der Kontrollgruppe ein Gewichtsverlust von 12 g (± 6), für die Ratten der Versuchsgruppen A und E jedoch jeweils eine Gewichtszunahme von 10 g ($\pm 10/9$). Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant (siehe Tabelle 6, Abbildung 15).

	Kontrollgruppe		Versuchsgruppe E		Versuchsgruppe A	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Prä OP	256	9	264	11	227	6
Tag 14	244	11	274	9	237	11
Zunahme	-12	6	10	10	10	9

Tabelle 6. Gewicht und Gewichtszunahmen der Ratten in Gramm

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden; Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden; Prä OP: Ausgangswert vor Myokardinfarkt; Tag 14: Wert 14 Tage nach Myokardinfarkt; Zunahme: Differenz zwischen Tag 14 und Prä OP; MW: Mittelwert, SEM: Standardfehler

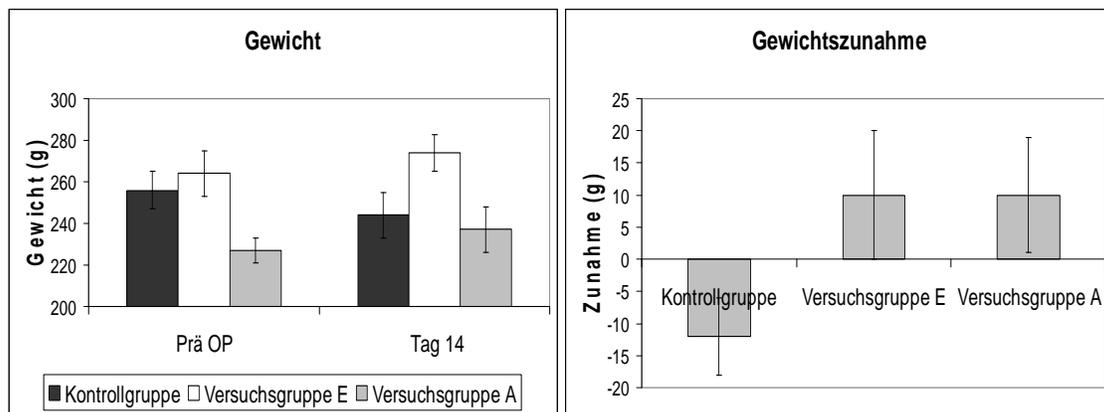


Abbildung 14. Gewicht und Gewichtszunahme der Ratten in Gramm

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden; Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant. Prä OP: Ausgangswert vor Myokardinfarkt; Tag 14: Wert 14 Tage nach Myokardinfarkt; Gewichtszunahme: Differenz zwischen Tag 14 und Prä OP

3.3.2.4 Echokardiographische Untersuchung

Die echokardiographische Messung des enddiastolischen und endsystolischen Volumens und die sich daraus ergebende Auswurffraktion (EF, %) erfolgt bei den drei Gruppen des Hauptversuchs, der Kontrollgruppe, der Versuchsgruppe E und der Versuchsgruppe A bei allen Tieren vor der Operation und am Tag 14.

Bei der Messung des endsystolischen Volumens (ESV) wurden folgende Werte ermittelt: sie betrug vor der Operation in der Kontrollgruppe 100 μl (± 8), in der Versuchsgruppe E 112 μl (± 9) und in der Versuchsgruppe A 90 μl (± 7). Nach 14 Tagen lag die ESV in der Kontrollgruppe bei 174 μl (± 2), in der Versuchsgruppe E bei 159 μl (± 1) und in der Versuchsgruppe A bei 139 μl (± 14). Die entspricht in der Kontrollgruppe einer Zunahme von 74 μl (± 2), in der Versuchsgruppe E von 47 μl (± 1) und in der Versuchsgruppe A von 49 μl (± 1). Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant, jedoch ist die Zunahme zwischen der ersten Messung (prä OP) zur zweiten Messung (14 Tage) innerhalb der Gruppe für alle 3 Gruppen signifikant (siehe Tabelle 7, Abbildung 16).

	Kontrollgruppe		Versuchsgruppe E		Versuchsgruppe A	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Prä OP	100	8	112	9	90	7
Tag 14	174	20	159	11	139	14
Zunahme	74	20	47	10	49	10

Tabelle 7. Endsystolisches Volumen in Mikroliter

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Prä OP: Ausgangswert vor Myokardinfarkt; Tag 14: Wert 14 Tage nach Myokardinfarkt; Zunahme: Differenz zwischen Tag 14 und Prä OP; MW: Mittelwert, SEM: Standardfehler

Die Werte des endsystolischen Volumens und des Gewichts vor der Operation zeigen eine Korrelation, die jedoch 14 Tage nach der Operation verloren geht (siehe Abb. 15).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN: ERGEBNISSE

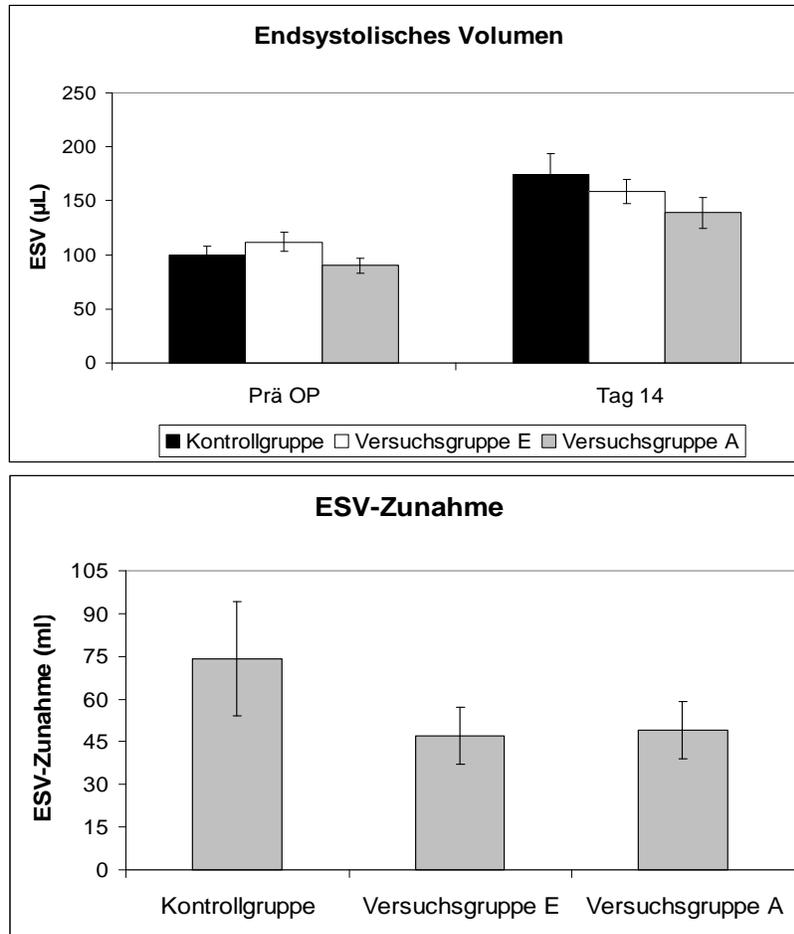


Abbildung 15. Endsystolisches Volumen und ESV-Zunahme in Mikroliter

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden; Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant. ESV: Endsystolisches Volumen; Prä OP: Ausgangswert vor Myokardinfarkt; Tag 14: Wert 14 Tage nach Myokardinfarkt

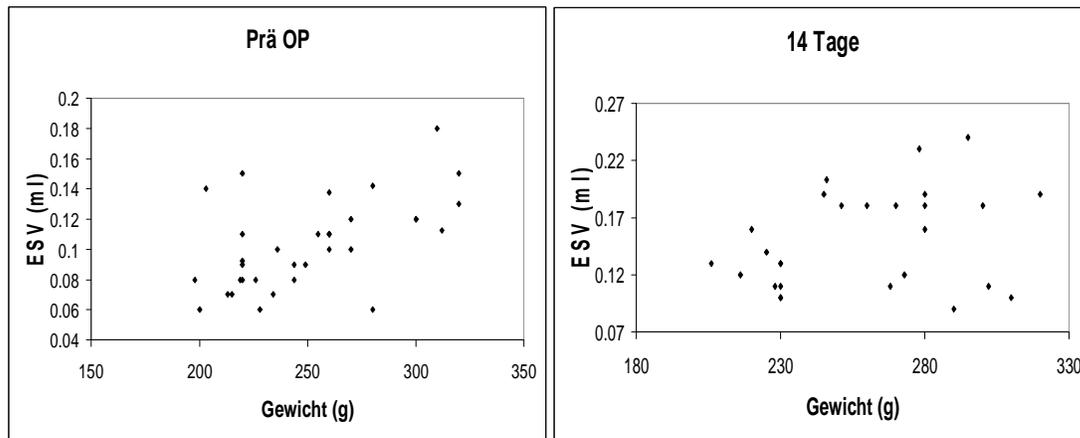


Abbildung 16. Korrelation zwischen endsystolischem Volumen und Gewicht

Vor dem Myokardinfarkt lässt sich eine Korrelation der Werte erkennen, diese geht jedoch 14 Tage nach Infarkt verloren. ESV: Endsystolisches Volumen; Prä OP: Ausgangswert vor Myokardinfarkt; Tag 14: Wert 14 Tage nach Myokardinfarkt

EIGENE UNTERSUCHUNGEN: ERGEBNISSE

Für die Auswurffraktion ergeben sich im arithmetischen Mittel folgende Werte: vor der Operation beträgt die EF der Kontrollgruppe 56 % ($\pm 2,1$), der Versuchsgruppe E 56 % ($\pm 2,6$) und die der Versuchsgruppe A 57 % ($\pm 0,9$). 7 Tage nach Ligatur der LAD sinkt die EF der Kontrollgruppe auf 46 % ($\pm 3,2$), die der Versuchsgruppe E jedoch nur auf 51 % ($\pm 5,2$) und die der Versuchsgruppe A auf 48 % (± 3). Nach 14 Tagen beträgt die EF der Kontrollgruppe 45 % ($\pm 4,7$), die der Versuchsgruppe E mit 51 % ($\pm 3,1$) und die der Versuchsgruppe A 50 % ($\pm 4,1$). Die beiden Versuchsgruppen A und E zeigen nach 14 Tagen eine signifikant höhere Auswurffraktion als die Kontrollgruppe (siehe Tabelle 8, Abbildung 18).

	Kontrollgruppe		Versuchsgruppe E		Versuchsgruppe A	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Prä OP	56	2.1	56	2.6	57	0.9
Tag 7	46	4,5	51	5.2	48	3
Tag 14	45	4.9	51	3.1	50	4.1

Tabelle 8. Linksventrikuläre Auswurffraktion in Prozent

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Prä OP: Ausgangswert vor Myokardinfarkt; Tag 7: Wert 7 Tage nach dem Myokardinfarkt; Tag 14: Wert 14 Tage nach dem Myokardinfarkt; MW: Mittelwert, SEM: Standardfehler

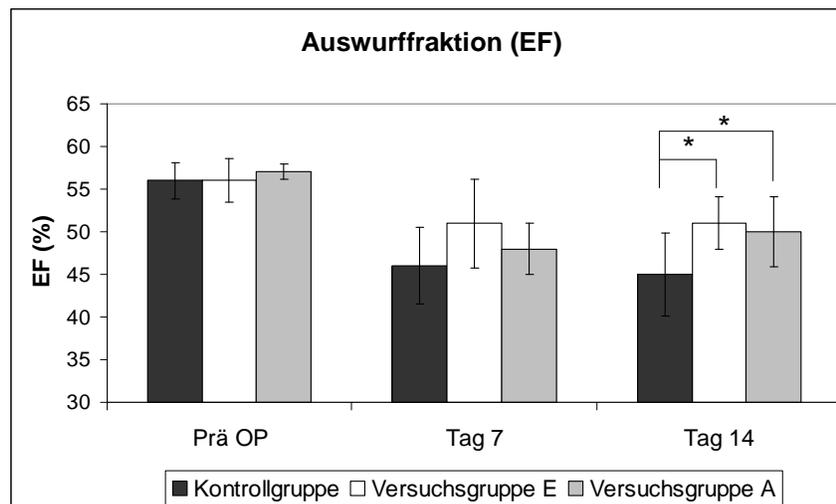


Abbildung 17. Linksventrikuläre Auswurffraktion in Prozent

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Prä OP und nach 7 Tagen sind die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant. Nach 14 Tagen sind die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen A und E und der Kontrollgruppe signifikant; * : Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$; Prä OP: Ausgangswert vor Myokardinfarkt; Tag 7: Wert 7 Tage nach dem Myokardinfarkt; Tag 14: Wert 14 Tage nach dem Myokardinfarkt

3.3.3 Histologie

3.3.3.1 Infarktgröße

Das Infarktareal wird auf den mit Masson-Trichrom gefärbten Schnitten, wie in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben, ausgemessen und daraus die relative Infarktgröße als prozentualen Anteil des linken Ventrikels errechnet.

Nach 3 Tagen werden folgende Mittelwerte errechnet: in der Kontrollgruppe 26 % (± 5), in der Versuchsgruppe E 24 % (± 4) und in der Versuchsgruppe A 27 % (± 5).

Nach 14 Tagen werden folgende Ergebnisse ermittelt: in der Kontrollgruppe 26 % (± 2), in der Versuchsgruppe E 21 % (± 2) sowie in der Versuchsgruppe A 21 % (± 2) des linken Ventrikels.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant (siehe Tabelle 9, Abbildung 20).

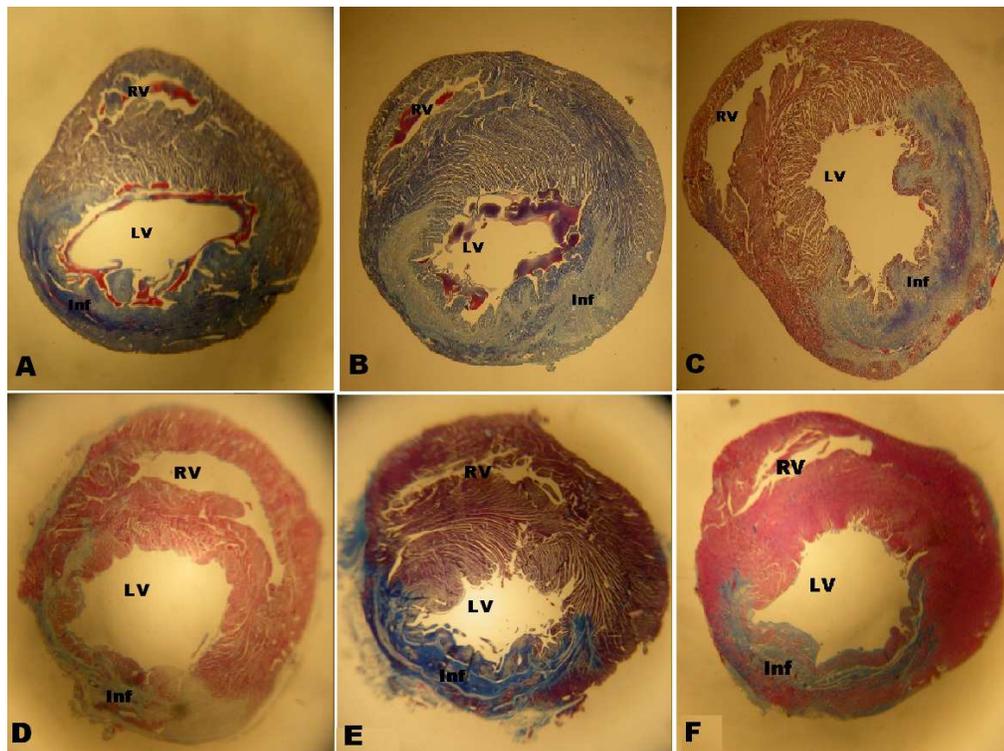


Abbildung 18. Infarktareal in der Masson-Trichrom-Färbung

Querschnitte der Rattenherzen, fotografiert in 7-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop. Blaues Gewebe (Inf.): Infarktareal, dunkelrotes Gewebe: gesundes Myokard, LV: linker Ventrikel, RV: rechter Ventrikel, A-C: Kurzzeitversuch (3 Tage); D-F: Hauptversuch (14 Tage); A/D: Kontrollgruppe, B/E: Versuchsgruppe E; C/F: Versuchsgruppe A

EIGENE UNTERSUCHUNGEN: ERGEBNISSE

	Kontrollgruppe		Versuchsgruppe E		Versuchsgruppe A	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
3 Tage	26	5	24	4	27	5
14 Tage	26	2	21	2	21	2

Tabelle 9. Relative Infarktgröße in Prozent des linken Ventrikels

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs; MW: Mittelwert; SEM : Standardfehler

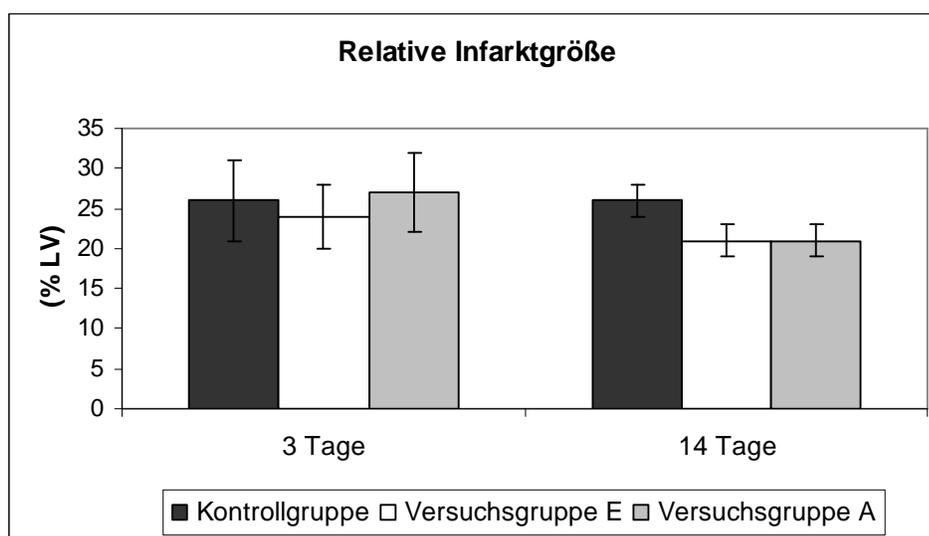


Abbildung 19. Relative Infarktgröße in Prozent des linken Ventrikels

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Die relative Infarktgröße gibt das Verhältnis von infarziertem Gebiet zur Gesamtgröße des linken Ventrikels an. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant. LV: linker Ventrikel; 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs

Die Spannweite der Infarktgrößen liegt nach 3 Tagen in der Kontrollgruppe zwischen 10 und 45 % des linken Ventrikels, in der Versuchsgruppe E zwischen 10 und 35 % und in der Versuchsgruppe A zwischen 13 und 45 %.

Im folgenden werden Infarkte von weniger als 10 % des linken Ventrikels als sehr klein bezeichnet, Infarkte zwischen 10-20 % als klein, Infarkte zwischen 20-30 % als mittelgroß, Infarkte zwischen 30-40 % als groß und Infarkte, die über 40 % des linken Ventrikels einnehmen als sehr große Infarkte.

Nach 3 Tagen zeigen 40 % der Herzen der Kontrollgruppe kleine Infarkte, aber jeweils 20 % der Herzen mittlere, große und sehr große Infarkte. Hingegen zeigen 40

EIGENE UNTERSUCHUNGEN: ERGEBNISSE

% der Herzen der Versuchsgruppe E mittelgroße Infarkte und große Infarkte und 20 % kleine. Jeweils 20 % der Herzen der Versuchsgruppe A zeigen mittelgroße, große und sehr große Infarkte und 40 % kleine Infarkte.

Keines der Herzen zeigt nach 3 Tagen einen sehr kleinen Infarkt.

Nach 14 Tagen können in der Kontrollgruppe Infarktgrößen zwischen 12 und 42 % des linken Ventrikels gefunden werden, in der Versuchsgruppe E zwischen 8 und 34 % und in der Versuchsgruppe A zwischen 10 und 32 %.

60 % der Herzen der Kontrollgruppe zeigen einen mittelgroßen Infarkt, 10 % einen kleinen, 20 % einen großen und 10 % einen sehr großen Infarkt. In der Versuchsgruppe E zeigten 57 % der Herzen einen mittelgroßen Infarkt, 21% einen kleinen, 14 % einen sehr kleinen und 7 % einen großen Infarkt. Bei den Herzen der Versuchsgruppe A fanden sich bei 40 % der Herzen mittelgroße Infarkte, bei 30 % kleine, bei 20 % sehr kleine und bei 10 % große Infarkte.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant (siehe Tabelle 10, Abbildung 21).

Infarktgröße	Kontrollgruppe		Versuchsgruppe E		Versuchsgruppe A	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
3 Tage						
0-10%	0	0	0	0	0	0
10-20%	2	40	1	20	2	40
20-30%	1	20	2	40	1	20
30-40%	1	20	2	40	1	20
>40%	1	20	0	0	1	20
14 Tage						
0-10%	0	0	2	14	2	20
10-20%	1	10	3	21	3	30
20-30%	6	60	8	58	4	40
30-40%	2	20	1	7	1	10
>40%	1	10	0	0	0	0

Tabelle 10. Verteilung der Infarktgrößen

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs; Infarktgröße: relative Infarktgröße in Prozent des linken Ventrikels

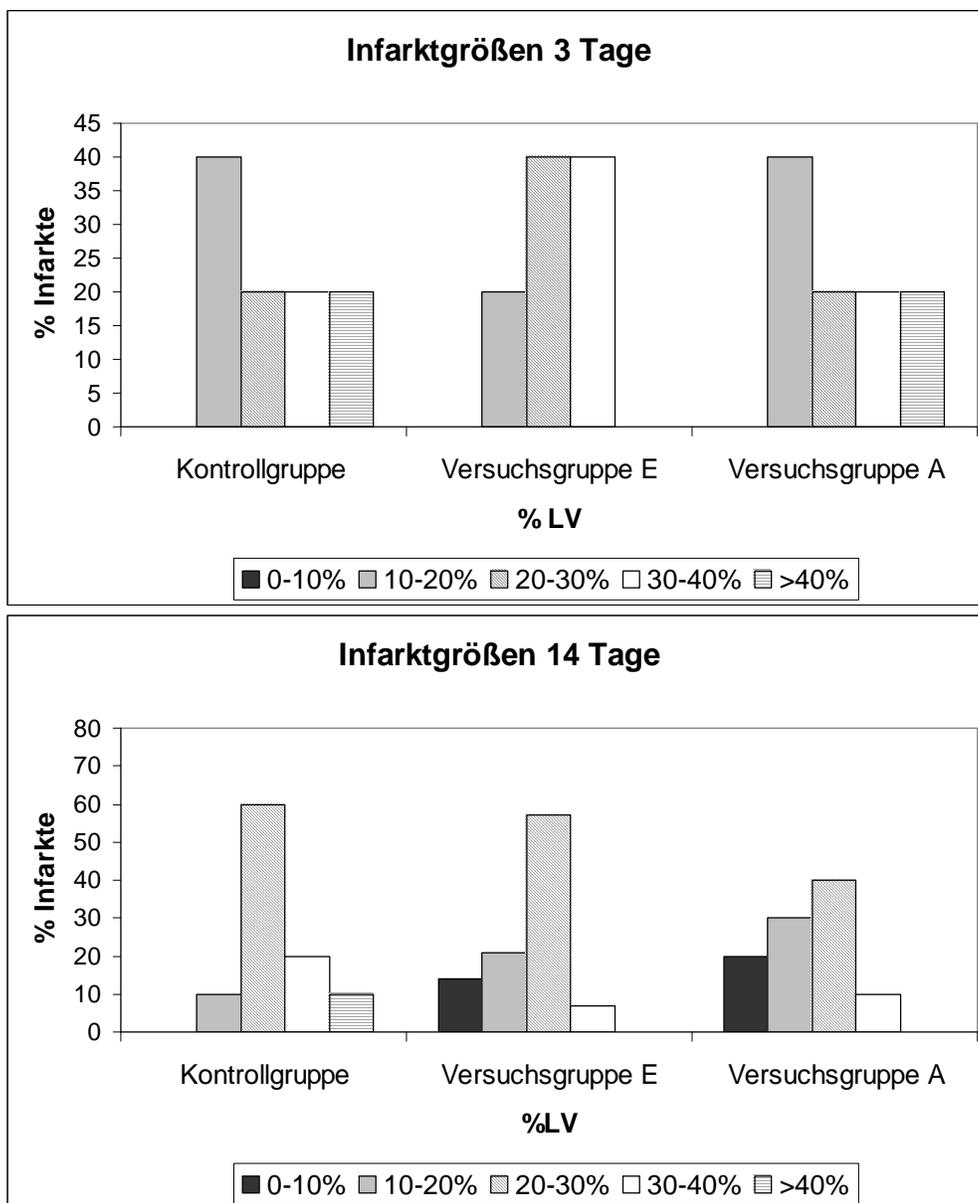


Abbildung 20. Verteilung der Infarktgrößen

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant. 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs; 0-10 %: sehr kleine Infarkte; 10-20 %: kleine Infarkte; 20-30 %: mittelgroße Infarkte; 30-40 %: große Infarkte; >40 %: sehr große Infarkte

3.3.3.2 Ausdünnungsverhältnis

Die durchschnittliche Dicke des infarzierten Wandabschnittes und des gesunden Septums werden ermittelt und ins Verhältnis gesetzt.

Die Mittelwerte nach 3 Tagen betragen in der Kontrollgruppe 1,07 (\pm 0,05), in der Versuchsgruppe E 1,16 (\pm 0,11) und in der Versuchsgruppe A 1,17 (\pm 0,05). Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

Nach 14 Tagen betragen die Werte in der Kontrollgruppe 0,85 (\pm 0,09), in der Versuchsgruppe E 1,1 (\pm 0,07) und in der Versuchsgruppe A 1,15 (\pm 0,09). Die Unterschiede sind signifikant zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe E ($p=0,05$) sowie der Versuchsgruppe A ($p=0,02$). Der Unterschied zwischen den Versuchsgruppen A und E ist nicht signifikant (siehe Tabelle 11, Abbildung 21).

	Kontrollgruppe		Versuchsgruppe E		Versuchsgruppe A	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
3 Tage	1,07	0,05	1,16	0,11	1,17	0,05
14 Tage	0,85	0,09	1,1	0,07	1,15	0,09

Tabelle 11. Das Ausdünnungsverhältnis (Thinning ratio)

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs MW: Mittelwert, SEM: Standardfehler

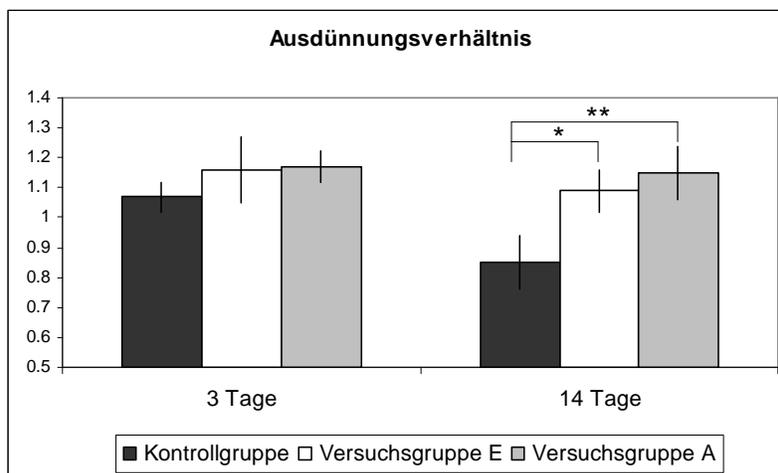


Abbildung 21. Das Ausdünnungsverhältnis (Thinning ratio)

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen nach 3 Tagen sind nicht signifikant, doch nach 14 Tagen sind die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen A und E und der Kontrollgruppe signifikant. * : $p=0,05$; ** : $p=0,03$. 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs

3.3.3.3 Expansionsindex

Der Expansionsindex wird aus der Größe des linken Ventrikels und der Kavität sowie aus den durchschnittlichen Wanddicken des Infarktes und des Septums errechnet.

Nach 3 Tagen ergeben sich folgende Werte: in der Kontrollgruppe 33 % (± 5), in der Versuchsgruppe E 21 % (± 3) und in der Versuchsgruppe A 22 % (± 3). Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

Nach 14 Tagen steigen die Werte an: in der Kontrollgruppe auf 61 % (± 5), in der Versuchsgruppe E auf 28 % (± 3) und in der Versuchsgruppe E auf 32 % (4). Die Unterschiede sind hochsignifikant zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe E ($p=0,001$) sowie der Versuchsgruppe A ($p=0,004$). Der Unterschied zwischen den Versuchsgruppen E und A ist nicht signifikant (siehe Tabelle 12, Abbildung 22).

	Kontrollgruppe		Versuchsgruppe E		Versuchsgruppe A	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
3 Tage	33	5	21	3	22	3
14 Tage	55	5	28	3	32	4

Tabelle 12. Der Expansionsindex

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden; Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden; 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs; MW: Mittelwert; SEM: Standardfehler

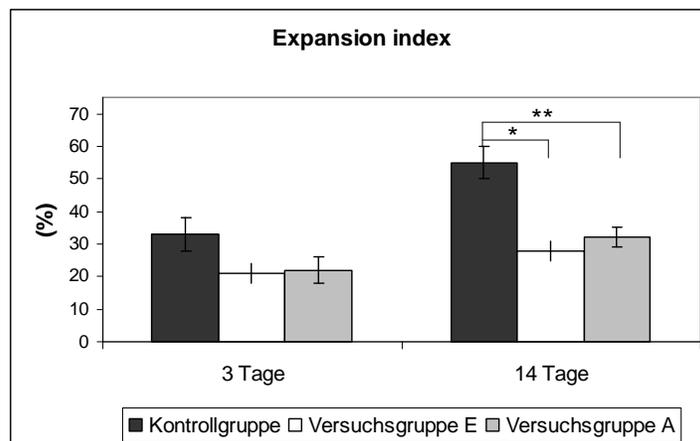


Abbildung 22. Der Expansionsindex (expansion index)

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden; Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen nach 3 Tagen sind nicht signifikant, doch nach 14 Tagen sind die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen E und A und der Kontrollgruppe signifikant. * : $p = 0,001$.

** : $p = 0,004$. 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs

3.3.4 Immunhistochemie

3.3.4.1 Von-Willebrand-Faktorfärbung

Zur Darstellung kleiner Gefäße werden die histologischen Schnitte mit einem Farbstoff, der an einen Antikörper gegen von Willebrand Faktor (vWF) gekoppelt ist, gefärbt und die Gefäßdichte, wie in Kapitel 3. 2. 3. 6 a) beschrieben, ermittelt. Nach drei Tagen ergeben sich folgende Werte: im Infarktgebiet in der Kontrollgruppe 2,6 (± 1), in der Versuchsgruppe E 4,7 ($\pm 2,1$) und in der Versuchsgruppe A 3,2 ($\pm 1,4$). Im Randgebiet beträgt die Anzahl der Gefäße pro Gesichtsfeld in der Kontrollgruppe 11,9 ($\pm 7,5$), in der Versuchsgruppe E 8,5 ($\pm 3,4$) und in der Versuchsgruppe A 13 ($\pm 7,1$). Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

Nach 14 Tagen steigt die Anzahl der Gefäße im Infarktgebiet in der Kontrollgruppe auf 10,7 ($\pm 1,7$), in der Versuchsgruppe E 11,1 ($\pm 1,5$) und in der Versuchsgruppe A auf 8,7 ($\pm 0,9$). Im Randgebiet ergeben sich nach 14 Tagen folgende Werte: in der Kontrollgruppe 3,8 ($\pm 0,4$), in der Versuchsgruppe E 5,8 (± 1) und in der Versuchsgruppe A 3,9 ($\pm 0,8$). Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant (siehe Tabelle 13, Abbildung 24).

		Kontrollgruppe		Versuchsgruppe E		Versuchsgruppe A	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
3 Tage	Infarkt	2,6	1	4,7	2,1	3,2	1,4
	Rand	11,9	7,5	8,5	3,4	13	7,1
14 Tage	Infarkt	10,7	1,7	11,1	1,5	8,7	0,9
	Rand	3,8	0,4	5,8	1	3,9	0,8

Tabelle 13. Anzahl der von-Willebrand-Faktor-positiven Gefäße

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde; Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs; MW: Mittelwert; SEM: Standardfehler

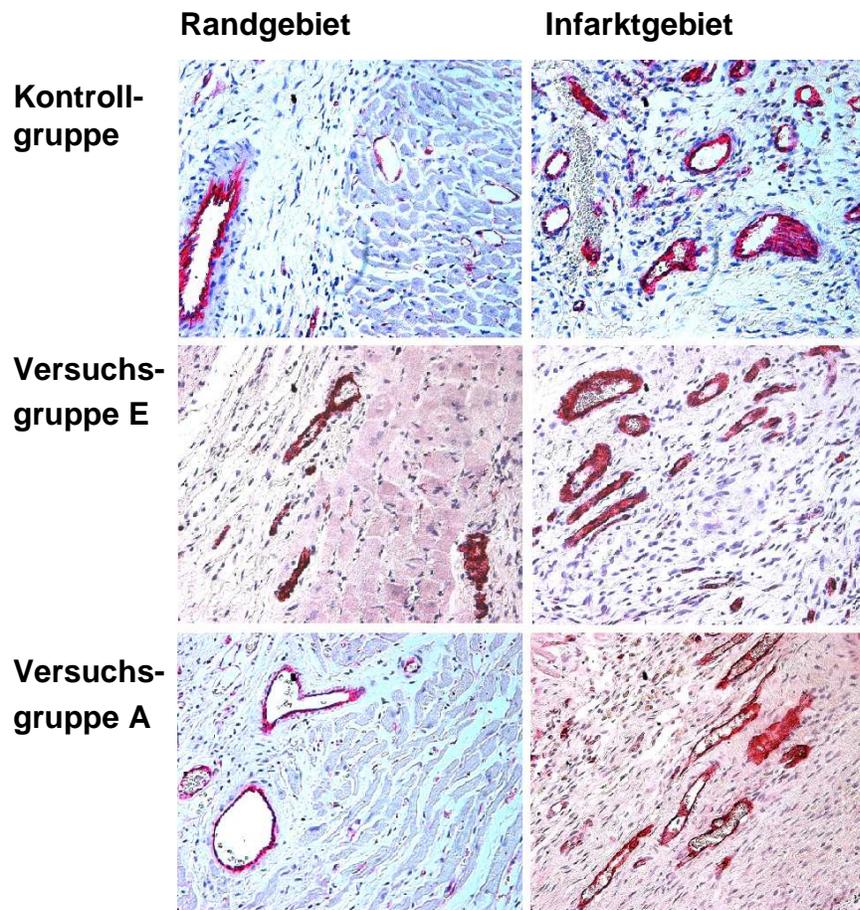


Abbildung 23. Von-Willebrand-Faktor-positive Zellen 14 Tage nach Infarkt

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde. Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Randgebiet: in einem Sichtfeld ist sowohl infarziertes, als auch gesundes Myokard sichtbar. Um die Gefäßdichte zu untersuchen wurden vWF-haltige Zellen in den Gefäßwänden mit einem Antikörper markiert. Reagiert dieser mit Chromogen, färben sich die Zellen rot an, während die umliegenden Zellen nur schwach rosa angefärbt werden. 200-fache Vergrößerung.

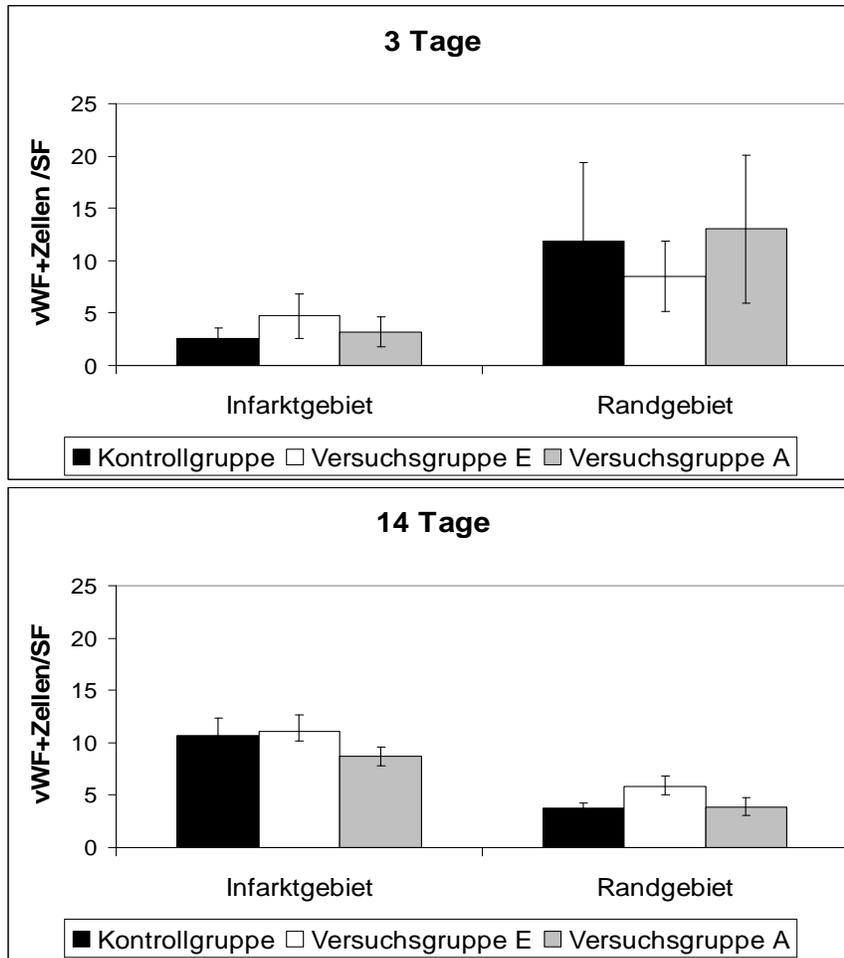


Abbildung 24. Anzahl der von-Willebrand-Faktor-positiven Gefäße

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde. Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant. 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs; SF: Sichtfeld

3.3.4.2 Aktinfärbung

Zur Darstellung größerer Gefäße werden die histologischen Schnitte mit einem Farbstoff gefärbt, der an einen Antikörper gegen das Aktin der glatten Muskelzellen gekoppelt ist. Die Schnitte werden, wie in Kapitel 3.2.3.6. beschrieben, ausgezählt.

Nach 3 Tagen werden im Infarktgebiet folgende Werte ausgezählt: in der Kontrollgruppe 9,6 (\pm 5), in der Versuchsgruppe E 8,2 (\pm 2,9) und in der Versuchsgruppe A 8,2 (\pm 1,6) Gefäße pro Gesichtsfeld. Im Randgebiet werden folgende Werte ermittelt: in der Kontrollgruppe 9 (\pm 6), in der Versuchsgruppe E 8,3 (\pm 3,9) und in der Versuchsgruppe A 5,1 (\pm 1,3) Gefäße. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen E und A und der Kontrollgruppe sind signifikant.

Im Durchschnitt werden nach 14 Tagen pro Sichtfeld im Infarktgebiet in der Kontrollgruppe 11,6 (\pm 1,8) aktinpositive Zellen gezählt, in der Versuchsgruppe E 7,6 (\pm 0,6) und in der Versuchsgruppe A 10,8 (\pm 2,8). Im Randgebiet werden folgende Werte ausgezählt: in der Kontrollgruppe 4,9 (\pm 0,7), in der Versuchsgruppe E 5,3 (\pm 0,5) und in der Versuchsgruppe A 3,2 (\pm 0,5) Gefäße. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant (siehe Tabelle 14, Abbildung 226).

		Kontrollgruppe		Versuchsgruppe E		Versuchsgruppe A	
		MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
3 Tage	Infarkt	9,6	5	8,2	2,9	8,2	1,6
	Rand	9	6	8,3	3,9	5,1	1,3
14 Tage	Infarkt	10,8	1,9	7,6	0,6	10,8	2,8
	Rand	4,7	0,8	5,3	0,5	3,2	0,5

Tabelle 14. Anzahl der aktinpositiven Gefäße

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde. Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs; MW: Mittelwert; SEM: Standardfe

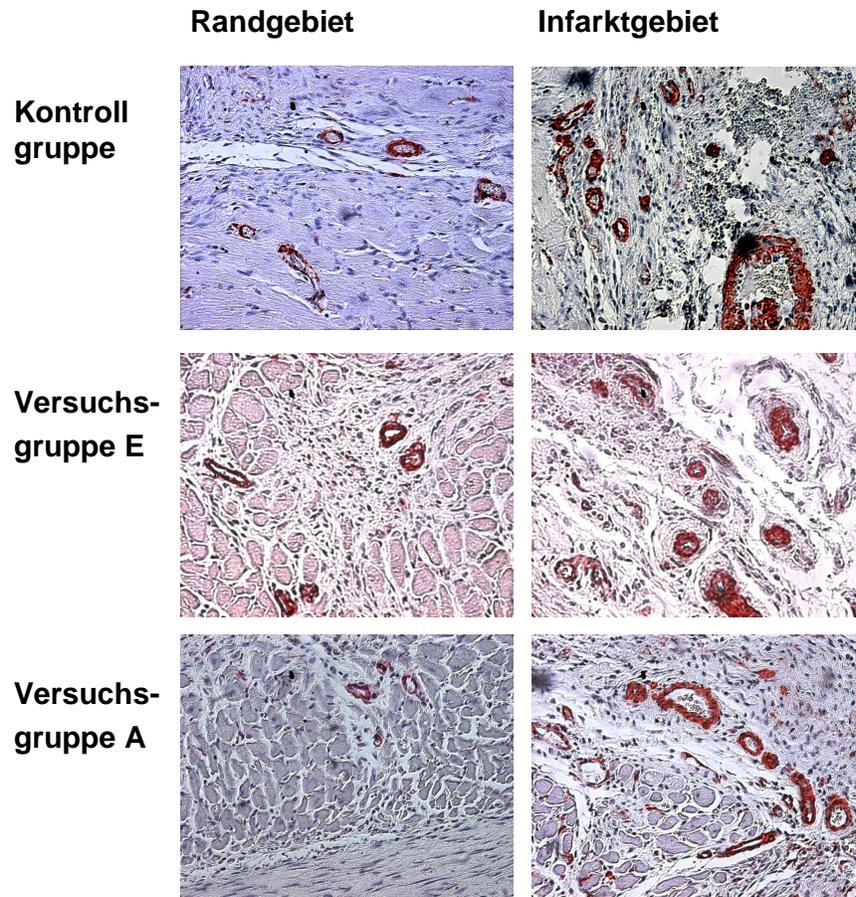


Abbildung 25. Smooth-Muscle-Cell-Actin-positive Zellen 14 Tage nach Infarkt
 Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde. Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Randgebiet: in einem Sichtfeld ist sowohl infarziertes, als auch gesundes Myokard sichtbar. Um die Gefäßdichte zu untersuchen wurden die glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden mit einem Antikörper gegen Aktin markiert. Reagiert dieser mit Chromogen, färben sich die Zellen rot an, während die umliegenden Zellen nur schwach rosa angefärbt werden. 200-fache Vergrößerung

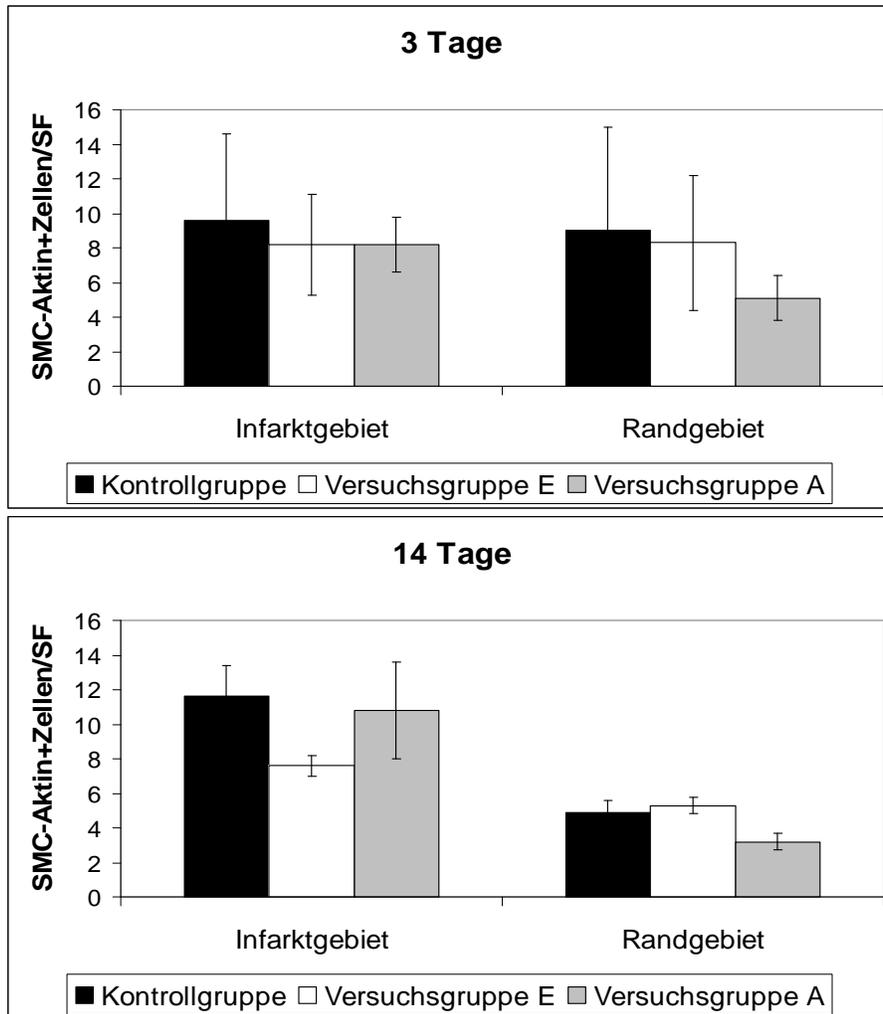


Abbildung 26. Anzahl der aktinpositiven Gefäße

Kontrollgruppe: Gruppe der Tiere, welchen Pufferlösung injiziert wurde. Versuchsgruppe E: Gruppe der Tiere, welchen endotheliale Zellen transplantiert wurden. Versuchsgruppe A: Gruppe der Tiere, welchen angiogenen Zellen transplantiert wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant. 3 Tage: Werte des Kurzzeitversuchs; 14 Tage: Werte des Hauptversuchs; SF: Sichtfeld

4 DISKUSSION

4.1 Einleitung der Diskussion

Nachdem ASAHARA 1997 berichtete, dass im peripheren Blut endotheliale Vorläuferzellen zirkulieren und diese in der Lage sind die Neovaskularisierung in einem Modell der Hintergliedmaßenischämie bei der Maus zu verbessern, wurden mehrere präklinische, wie klinische Studien durchgeführt, die versuchten, EPCs zur Verbesserung der myokardialen Funktion nach Infarkt anzuwenden (ERBS et al. , 2005 und KANG et al., 2004 und KAWAMOTO et al., 2001). In den Studien wurden unfraktionierte PBMNCs verwendet, die nur für kurze Zeit in Kultur expandiert wurden und von spindelförmiger Gestalt waren (ASSMUS et al., 2002 und BRITTEN et al., 2003). Diese Zellen zeigten nur begrenztes Proliferationspotential. Andere Studien berichteten jedoch von einer anderen Art von EPC, welche aus dem Knochenmark stammen und im peripheren Blut zirkulieren. In diesen Studien entwickelten sich nach längerdauernder Inkubation von mononukleären Zellen bei Anwesenheit von VEGF Zellen mit kopfsteinpflasterartigem Aussehen und wesentlichem höherem Proliferations- und Überlebenspotential. LIN wies nach, dass diese Zellen aus dem Knochenmark stammten und GULATI, dass sie von der CD14- Fraktion der mononukleären Zellen abstammten (GULATI et al., 2003 und LIN et al. , 2000). OTT et al. konnten 2005 zeigen, dass sich diese Zellen aus Nabelschnurblut und dem Blut G-CSF-behandelter Probanden gewinnen und expandieren ließen und die Ventrikel-funktion von Nacktratten nach Myokardinfarkt verbesserten (OTT et al. , 2005).

In der vorliegenden Studie wurden beide Arten von Zellen, die wir als angiogene Zellen und endotheliale Zellen bezeichneten, aus dem Blut adulter humaner Spender gewonnen und in vitro hinsichtlich ihrer Morphologie, ihres Wachstumsverhaltens, ihrer Überlebensdauer, der Expression von Oberflächenmarkern und ihres angiogenetischen Potentials verglichen. Wir verglichen sie auch mit Human Umbilical Vein Endothelial Cells, die wir als Prototyp der Endothelzelle heranzogen.

Um den therapeutischen Effekt auf infarziertes Myokard zu untersuchen, wendeten wir beide Zellarten in einem Myokardischämiemodell in der Nacktratte an. Es wurden die linksventrikuläre Funktion, die Infarktgröße und die Gefäßbildung in den Versuchsgruppen E, in der den Tieren endotheliale Zellen transplantiert wurden, und A, in der die Tiere angiogene Zellen erhielten, im Vergleich mit einer Kontrollgruppe untersucht.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der in vitro Versuche

4.2.1 Diskussion der Ergebnisse der Zellkultur

Als Ausgangsmaterial für beide Zellkulturen werden die mononukleären Zellen aus peripherem Blut adulter humaner Probanden verwendet. Für die Gewinnung der endothelialen Zellen werden die mononukleären Zellen mit immunomagnetischen Beads auf die Expression des Oberflächenmarkers CD34 vorselektiert. Diese Methode wurde ursprünglich von ASAHARA beschrieben, jedoch gab er an, dass die CD34+ Zellen, auch nach Selektion mit immunomagnetischen Beads, nur etwa 15% der Gesamtzellzahl ausmachten (ASAHARA et al., 1997). In der vorliegenden Studie werden die CD34+ Zellen auf circa 90 % angereichert.

CD34 wird von hämatopoetischen Stammzellen, endothelialen Vorläuferzellen und Endothelzellen kleiner Gefäße exprimiert. Monozyten, die eine hohe Plastizität besitzen und angeblich in einer, den endothelialen Phänotyp begünstigenden Kultur, zu Endothelzellen transdifferenzieren können (REHMAN et al., 2003), werden durch diesen Schritt entfernt.

Die angiogenen Zellen werden nach dem Protokoll gewonnen, das von HILL verwendet wurde (HILL et al., 2003). Nach diesem Protokoll werden die PBMNCs anfänglich über Nacht inkubiert, am nächsten Tag der Überstand abgenommen und die darin enthaltenen Zellen erneut ausgelegt. Durch diesen Schritt sollen schnell adhärierende Zellen, wie z.B. zirkulierende Endothelzellen, entfernt werden.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Durchflußzytometrie (FACS)

Mehrere unterschiedliche Zellarten, die im Blut zirkulieren können, in einer Umgebung, die den endothelialen Phänotyp fördert, diesen exprimieren: endotheliale Vorläuferzellen, hämatopoetische Vorläuferzellen, zirkulierende Endothelzellen und Monozyten (INGRAM et al., 2005). Endotheliale Vorläuferzellen sind die Abkommen des Hämangioblasten, die dem endothelialen Differenzierungsweg folgen. Diese sind ein sehr geringer Anteil der PBMNC, doch sie sind hochproliferativ. In der Literatur wird beschrieben, dass sie folgende Marker exprimieren: CD34, CD133 und VEGF-R2 (PEICHEV et al., 2000) und CD31 (GULATI et al., 2003 und HUR et al., 2004). Die hämatopoetischen Vorläuferzellen sollen anfänglich einen sehr ähnlichen Phänotyp besitzen wie die endothelialen Vorläuferzellen. Auch diese exprimieren anfänglich CD34, CD133 und VEGF-R2, verlieren aber CD133 und VEGF-R2, wenn sie beginnen sich zu Blutzellen auszudifferenzieren. Zirkulierende Endothelzellen, die aus der Gefäßwand abgeschwemmt wurden, besitzen den Phänotyp reifer Endothelzellen, d.h. sie exprimieren VEGF-R2 und kapilläre Endothelzellen auch CD34, jedoch nicht CD133. Sie besitzen jedoch ein geringeres Proliferationspotential und sind ebenfalls in nur in geringer Anzahl präsent. Ihre Anzahl wird bei gesunden Individuen auf ca. 5 Zellen/ml Blut geschätzt, nimmt aber durch Gefäßerkrankungen, unter anderem auch nach akutem Herzinfarkt, zu (BLANN und PRETORIUS, 2006 und WOYWODT et al. , 2002).

Eine weitere Zellpopulation in peripherem Blut, die in angiogener Zellkultur Zellen mit endothelialelem Phänotyp hervorbringen kann, sind Monozyten (SCHMEISSER et al. , 2001). Diese sind in großer Anzahl in peripherem Blut vertreten, bis zu 8 % der MNCs eines gesunden Menschen, und es gibt Grund zu der Annahme, dass ein Großteil der endothelähnlichen Zellen, die nach kurzzeitiger Kultivierung unfraktionierter PBMNCs entstehen, von Monozyten abstammen (GULATI et al., 2003 und REHMAN et al., 2003 und YOON et al., 2005). Reife Monozyten exprimieren CD14 und CD45.

Die FACS-Analyse der angiogenen Zellen zeigt, dass es sich dabei nicht um eine homogene Population endothelialer Vorläuferzellen handelt: die für diese Zellen typischen Marker (CD34, CD133 und VEGF-R2) werden nur von einem kleinen Anteil der Zellen exprimiert. Antikörper gegen unspezifische Marker, wie z.B. CD31 und CXCR4, die sowohl von Endothelzellen, wie auch von den meisten Leukozyten

DISKUSSION

exprimiert werden und CXCR3, das auf hämatopoetischen Vorläuferzellen und Leukozyten zu finden ist, werden von einem großen Anteil der Zellen gebunden. Auch CD45, ein Leukozytenmarker, wird von einigen Zellen exprimiert. Überraschend ist, dass CD14, der Monozytenmarker, nicht exprimiert wird. Da die Durchflußzytometrie jedoch erst nach längerer Zeit in Kultur durchgeführt wird, um die dafür notwendigen Zellzahlen zu erreichen, ist es möglich, dass die Zellen diesen Marker unter dem Differenzierungsdruck der Wachstumsfaktoren verlieren. Differenzieren sich Monozyten zu Makrophagen verlieren sie CD14 und auch SCHMEISSER 2001 beschrieb, dass CD14 von Monozyten nach einiger Zeit in Kultur herunterreguliert wird, während CD45 erhalten bleibt und endotheliale Marker hochreguliert werden. Die endothelialen Zellen hingegen zeigen eine deutliche Expression aller Marker endothelialer Vorläuferzellen (CD34 und CD133) und von Markern, die auch auf Endothelzellen zu finden sind (CD31, VEGFR-2 und CXCR4). Sie exprimieren keine Marker, die für Leukozyten (CD45) oder Monozyten (CD14) typisch sind. Die geringgradige Expression von CXCR3 kann möglicherweise das Vorhandensein einer geringen Anzahl an hämatopoetischen Vorläuferzellen bedeuten. Diese Zellen gleichen den endothelialen Vorläuferzellen. Sie besitzen ein hohes Proliferationspotential und die Potenz sich zu Endothelzellen auszudifferenzieren.

4.2.3 Diskussion der Ergebnisse der Morphologie, des Wachstumsverhaltens und des Angiogeneseassays

Die Untersuchung der Morphologie und des Wachstumsverhaltens der beiden Zellkulturen stimmt mit den Beschreibungen von GULATI und HUR überein (GULATI et al., 2003 und HUR et al., 2004): die angiogenen Zellen adhäreren schnell, sind von spindelförmiger Gestalt, geringer Proliferation und überleben nur 10-14 Tage in Kultur. Die endothelialen Zellen hingegen adhäreren erst nach etwa 2 Wochen, sie haben eine kopfsteinpflasterähnliche Morphologie, die stark derer reifer Endothelzellen ähnelt und sie überleben in Kultur über mehrere Wochen. Doch vor allem sind sie hochproliferativ und lassen sich bis auf mehrere Milliarden Zellen expandieren. Diese Eigenschaft deutet darauf hin, dass es sich bei diesen Zellen nicht um adulte Endothelzellen handelt, die aus der Gefäßwand ausgeschwemmt wurden, sondern um noch nicht ganz ausdifferenzierte frische Vorläuferzellen.

Das Matrigel-Angiogeneseassay zeigt den endothelialen Charakter der endothelialen Zellen: wie Endothelzellen bilden diese auf Matrigel tubuläre Strukturen. Die angiogenen Zellen hingegen sind dazu nicht in der Lage.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei den Zellen, die wir nach der Selektion von CD34+ Zellen und längerer Kultivierungsphase gewinnen, um eine Zellpopulation handelt, welche die typischen Marker endothelialer Vorläuferzellen exprimiert, eine endotheliale Morphologie besitzt, in Kultur sehr langlebig und hochproliferativ ist und die in vitro Angiogenese zeigt. Diese Zellen nennen wir endotheliale Zellen.

Bei den Zellen, die aus unfraktionierten mononukleären Zellen und kurzer Kultivierungsphase gewonnen wurden hingegen handelt es sich um Zellen, die kein eindeutiges Markerprofil besitzen, von spindelförmiger Gestalt sind, die in Kultur nur kurze Zeit überleben und wenig proliferieren und die in vitro keine Angiogenese zeigen. Diese Zellen nennen wir angiogene Zellen.

4.3 Diskussion des Versuchsaufbaus

Da die therapeutische Wirkung der beiden Zellpopulationen auf das infarzierte Myokard untersucht werden soll, ist es notwendig ein Myokardinfarktmodell zu wählen. In der vorliegenden Studie wird ein Ischämie/Reperusionsmodell verwendet. Dieses Modell ähnelt der Situation, die in der Praxis am häufigsten vorkommt, da das vordringlichste Therapieziel bei einem akuten Myokardinfarkt die rasche Eröffnung des betroffenen Gefäßes ist. Die Wiedereröffnung bewahrt zwar einerseits gefährdetes Myokard vor dem Untergang, verursacht andererseits jedoch Reperusionschäden. Verantwortlich dafür sind unter anderem osmotische Veränderungen, die Bildung freier Radikale, Änderungen im Gehalt des freien Kalziums und des pH-Werts sowie einwandernde Granulozyten (SEIFERT, 2000). Bei Ratten beginnt die Nekrose der Kardiomyozyten bereits 13 Minuten nach Ligatur der Koronararterie und setzt sich progressiv fort, bis sie nach ca. einer Stunde 100 % des Versorgungsgebietes betrifft (HORT und DACANALIS, 1965). Eine Ischämiephase von 30 Minuten bietet somit einen guten Kompromiss um ein möglichst großes Infarktgebiet bei einer kürzestmöglichen Narkosedauer für die Ratte zu erzielen.

JOHNS und OLSON beschrieben bereits 1954 den experimentellen Myokardinfarkt durch Ligatur der Koronargefäße bei Mäusen, Hamstern, Meerschweinchen und Ratten, nachdem sie festgestellt hatten, dass der Hund für dieses Modell nicht geeignet ist. Sie konnten nachweisen, dass durch diese Methode die höchste Inzidenz von Infarkten in der Ratte zu produzieren war (JOHNS und OLSON, 1954).

1997 modifizierten YE et al. die Operationsmethode um die Mortalität zu verringern und die Inzidenz der Infarkte zu erhöhen. Mehrere Punkte wurden abgewandelt: unter anderem verzichteten sie auf die Vorlagerung des Herzens aus dem Thorax, entfernten die Luft aus dem Thorax vor dessen Verschluss und sie reicherten die Atemluft der Tiere nach der Operation mit Sauerstoff an (YE et al. , 1997). In dieser Studie werden die dort beschriebenen Modifikationen angewendet.

Da menschliche Zellen verwendet werden, können diese nur Tieren, die eine angeborene Immunsuppression besitzen, transplantiert werden um eine Immunabwehr der körperfremden Zellen zu vermeiden. Die thymuslose Nacktratte erfüllt diese Voraussetzungen. Auch von Mäusen gibt es eine immunsupprimierte Variante, aber da die Echokardiographie zur Messung der Ventrikelfunktion angewandt wird, eignen

sich Mäuse nicht als Versuchstiere, da an diesen Tieren mit herkömmlichen Ultraschallgeräten keine verwertbaren Daten erhoben werden können.

Für die Applikation der Zellen gibt es folgende Möglichkeiten: die systemische Applikation in eine Vene, die intrakoronare Applikation über einen Ballonkatheter und die intramyokardiale Transplantation. In einer Studie wurden Patienten nach einem Myokardinfarkt Knochenmark entnommen, radioaktiv markiert und nach Applikation mit einem PET-Scanner der Verbleib der Zellen dokumentiert. Es zeigte sich, dass nach Verabreichung der Zellen über die Armvene sich 85 % von ihnen in Leber und Milz anreicherten, während im Myokard keine messbare Anreicherung zu finden war. Auch nach intrakoronarer Verabreichung der Zellen über einen Ballonkatheter, wurde ein Großteil von ihnen in Leber und Milz wiedergefunden und nur 1,3-2,6 % im Myokard. Wurden statt unfraktioniertem Knochenmark CD34+ Zellen verabreicht, steigerte sich deren Verbleib im Myokard auf 14 -39 % (HOFMANN et al. , 2005). In der vorliegenden Studie werden die Zellen während der Thorakotomie direkt ins Myokard transplantiert, um derartige Zellverluste zu vermeiden.

Durch die Transplantation in das Periinfarktgebiet soll sichergestellt werden, dass die Zellen nicht in nekrotisches „überlebensfeindliches“ Gewebe gelangen.

4.4 Diskussion der in vivo erhobenen Ergebnisse

4.4.1 Mortalität und Komplikationen

YE et al. gaben an, durch die, von ihnen eingeführten, Modifikationen die Mortalität des Myokardinfarktmodells auf 27 % gesenkt zu haben (YE et al., 1997). Die Mortalität des Hauptversuches beträgt 19 %. 87,5 % der frühzeitig verstorbenen Tiere erliegen einem zu hohen Blutverlust während der Operation, der durch Verletzung der LAD oder der A. thoracica interna verursacht wird. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Versuchsgruppe A: 0 %, Versuchsgruppe E: 22 %) und der Kontrollgruppe (29 %) sind nicht signifikant.

Die Häufigkeit des Kammerflimmerns beträgt in den meisten Gruppen 33-36 %. Ausnahmen bilden die Versuchsgruppe A im Hauptversuch (20 %) und die Versuchsgruppe E im Kurzzeitversuch (0 %). Nur ein Tier in der Kontrollgruppe verstarb an unkontrollierbaren Arrhythmien. Dies spricht dafür, dass die Transplantation der Zellen keine erhöhte Arrhythmieinzidenz verursacht, sondern dass das Auftreten von Kammerflimmern mit der individuellen Prädisposition der Ratten zusammenhängt. Insgesamt scheint die Transplantation der Zellen in das Myokard keine vermehrten Komplikationen zu verursachen.

4.4.2 Echokardiographie

In der vorliegenden Studie wird anhand der Echokardiographie das endsystolische Volumen (ESV) und die Auswurffraktion (Ejection Fraction = EF) des linken Ventrikels ermittelt. Das ESV gilt als Maß für Dilatation des Ventrikels, die durch das Remodeling nach dem Infarkt verursacht wird. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine zunehmende Dilatation des linken Ventrikels mit einer progressiven globalen kardialen Dysfunktion einhergeht (GAUDRON et al. , 1993). Zugleich ist das ESV der bestimmende Faktor für die Überlebensrate nach überstandenen Myokardinfarkt (WHITE et al. , 1987). Es wird zwar einerseits durch die Dilatation des Ventrikels beeinflusst, andererseits korreliert es jedoch auch mit der Größe des Herzens. Diese wiederum richtet sich bei den 8-12 Wochen alten Tieren, die sich noch im Wachstum befinden, nach der Körpergröße. Als Anhaltspunkt für die Körpergröße wurde das Gewicht der Ratten ermittelt. Hierbei fällt auf, dass die Tiere der Versuchsgruppen während der 2 Wochen nach dem Infarkt im Durchschnitt 10 g

DISKUSSION

zugenommen haben, die Tiere der Kontrollgruppe jedoch 12 g abgenommen haben. Dies spricht auch für eine größere Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Tiere. Aufgrund der hohen Varianz (SEM: 6-10) sind die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Betrachtet man das ESV, so ist zu bemerken, dass es in der Kontrollgruppe zu einer größeren Zunahme (74 μ l) als in den Versuchsgruppen A und E (ca. 50 μ l) kommt. Wiederum sind die Unterschiede aufgrund der hohen Varianz (SEM: 10-20) nicht signifikant. Betrachtet man nun beide Größen zusammen, so stellt man fest, dass das ESV und die Körpergröße der Ratten vor der Operation korrelieren: die schwersten Ratten (Versuchsgruppe E: 264 g) besitzen die größten Ventrikel (112 μ l), die etwas leichteren (Kontrollgruppe: 256 g) etwas kleinere (100 μ l) und die leichtesten Tiere (Versuchsgruppe A: 227 g) auch die kleinsten Ventrikel (90 μ l). Zwei Wochen nach dem Infarkt zeigen jedoch die Tiere, die sogar an Gewicht verloren haben (Kontrollgruppe: 12 g), die größte Zunahme des ESV (74 μ l). Dies spricht dafür, dass die Zunahme des Volumens nicht durch Wachstum, sondern durch Dilatation des Ventrikels verursacht wurde. Die geringere Volumenzunahme der Ventrikel der Versuchsgruppentiere (ca. 50 μ l) bei gleichzeitiger Gewichtszunahme (10 g) kann als geringere Dilatation durch günstigere Infarktheilung ausgelegt werden.

Die Auswurfraction gibt Auskunft über den Anteil des Blutvolumens, der durch die Kontraktion ausgetrieben wird, am Gesamtblutvolumen der linken Kammer (FLACHSKAMPF, 2002). Er berücksichtigt somit zwei Messgrößen, die sich nach einem Myokardinfarkt verändern: das Kammervolumen nimmt durch die Dilatation zu und das Schlagvolumen nimmt durch die Beeinträchtigung der Wandfunktion ab (PFEFFER und BRAUNWALD, 1990). Je niedriger die EF, desto schlechter ist die Ventrikelfunktion. Die LVEF ist der Parameter, der am häufigsten in den klinischen Studien, die Vorläuferzellen zur Therapie des Myokardinfarktes einsetzten, zur Einschätzung der Ventrikelfunktion herangezogen wurde (ASSMUS et al., 2002 und ERBS et al., 2005 und JANSSENS et al., 2006 und STRAUER et al., 2002 und WOLLERT et al., 2004).

Laut unseren Messungen liegt die LVEF einer gesunden Nacktratte bei ca. 56 % (+/- 2 %). Zwei Wochen nach Myokardinfarkt sinkt sie in der Kontrollgruppe auf 45 %, während sie in der Versuchsgruppe A nur auf 50 % und in der Versuchsgruppe E nur auf 51 % sinkt. Dies bedeutet eine signifikante Verbesserung der Ventrikelfunktion in beiden Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe.

4.5 Diskussion der histologischen Ergebnisse

4.5.1 Infarktgröße

Wie bereits KOCHER 2001 stellen wir das Bindegewebe des Infarktgebiets mit einer Masson-Trichrom-Färbung dar. Dies zeichnet sich mit einer deutlichen dunkelblauen Färbung gegen das dunkelrot gefärbte, unveränderte Myokard ab, so dass mit Hilfe eines Computers das Infarktgebiet planimetrisch vermessen und das Verhältnis zur Gesamtgröße des linken Ventrikels berechnet werden kann (PFEFFER et al. , 1979). Da bei der Ratte Fibronektin, Laminin und Kollagen vom Typ IV schon nach 2 Tagen in das Granulationsgewebe im Infarkt eingelagert werden, ist die Messung zu einem frühen Zeitpunkt möglich (SEIFERT, 2000).

Nach 3 Tagen zeigen alle drei Gruppen ähnlich große Infarktgebiete (Kontrollgruppe 26 %, endotheliale Zellen 24 % und angiogene Zellen 28 %). Die Unterschiede sind nicht signifikant. Nach 14 Tage sind die Infarktgebiete der beiden Versuchsgruppen (21 %) jedoch kleiner als die der Kontrollgruppe (26 %). Die Unterschiede sind wiederum nicht signifikant, lassen jedoch einen Trend erkennen ($p=0,1/0,08$).

Die Infarktgröße ist abhängig von der Größe des Versorgungsgebietes des ligierten Gefäßes, der Infaktdauer und davon, ob eine Reperfusion stattfindet oder nicht. Obwohl die beiden letzten Parameter in dem vorliegenden Versuch standardisiert sind, kann, wegen der variierenden Koronararterienmuster, bei verschiedenen Herzen eine Okklusion an derselben Stelle unterschiedliche Infarktgrößen verursachen (SEIFERT, 2000). Wie bereits von YE et al. beschrieben, gibt es bei Ratten unterschiedliche Verzweigungsmuster der linken Koronararterie, so dass es, auch bei einer standardisierten Vorgehensweise, nicht möglich ist gleichmäßig große Infarkte nach Ligatur der LAD zu produzieren (YE et al., 1997). ANVERSA fand bei der Untersuchung der Infarktgrößen von 23 Ratten Unterschiede zwischen den prozentualen Anteilen des Infarkts am Volumen des linken Ventrikels zwischen 1,3 % und 23 % (ANVERSA et al. , 1986). In der vorliegenden Studie schwankt die relative Infarktgröße aller Tiere des Hauptversuches zwischen 7 % und 42 %, und die der Tiere des Kurzzeitversuches zwischen 10 % und 45 %. Eine Aufschlüsselung der jeweiligen Gruppen in sehr kleine, kleine, mittelgroße, große und sehr große Infarkte lässt kein Verteilungsmuster erkennen. Es ist deshalb nicht möglich eine Aussage über den Einfluss der Zellen auf die Infarktgröße zu treffen.

4.5.2 Ausdünnungsverhältnis und Expansionsindex

Das Ausdünnungsverhältnis gibt an, wie stark die Ventrikelwand sich im Infarktgebiet, gegenüber dem gesunden Septum, verschmälert hat (PFEFFER und BRAUNWALD, 1990). Ein Ausdünnungsverhältnis knapp über 1 spiegelt die physiologische Situation wieder, in der das Septum etwas schmaler ist als die freie Wand. Nimmt jedoch die Wanddicke der freien Wand im Infarktgebiet ab, verschiebt sich das Verhältnis unter 1. In der vorliegenden Studie zeigen alle drei Gruppen 3 Tage nach dem Infarkt noch ein Ausdünnungsverhältnis von über 1, jedoch 14 Tage danach liegt es nur in der Kontrollgruppe unter 1, während beide Versuchsgruppen noch knapp über 1 liegen. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen E und A und der Kontrollgruppe sind signifikant.

Der Expansionsindex verbindet das Ausdünnungsverhältnis mit dem Verhältnis von Ventrikel zu Kavität. Er quantifiziert sowohl den Grad der Wandausdünnung, als auch den Grad der Dilatation des Ventrikels (HOCHMAN und CHOO, 1987). Auch hier zeigt sich bereits nach 3 Tagen ein erhöhter Expansionsindex in der Kontrollgruppe gegenüber den Versuchsgruppen. In allen drei Gruppen nimmt der Index im Verlauf der 14 Tage nach dem Infarkt zu, jedoch ist die Zunahme in der Kontrollgruppe wesentlich drastischer als in den Versuchsgruppen. Wiederum ist der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen nach 14 Tagen signifikant.

Beide Größen zusammen ergeben einen Eindruck, wie umfassend sich die Morphologie des linken Ventrikels im Rahmen des Remodelings verändert hat. In der vorliegenden Studie ist diese Veränderung in der Kontrollgruppe wesentlich deutlicher ausgeprägt, als in den Versuchsgruppen.

Der Umbau des Ventrikels wird durch drei Faktoren beeinflusst: die Infarktgröße, die Infarktteilung und hämodynamische Wandbelastungen.

Geht man davon aus, dass die Applikation der Zellen die Infarktgröße nicht beeinflusst, sondern diese nur von der Größe des Versorgungsgebietes der ligierten Arterie abhängt, so müssen die geringere Dilatation und die geringere Abnahme der Wanddicke durch Unterschiede in der Infarktteilung bedingt sein.

Remodeling nach Myokardinfarkt wird unterschieden in eine frühe Phase (<72 h), die vor allem das Infarkt- und Periinfarktgebiet betrifft und eine späte Phase (>72 h), während der sich die Geometrie und die Größe des gesamten linken Ventrikels verändert. In der frühen Phase findet vor allem die Infarktexpansion statt. Expansion

DISKUSSION

entsteht bevor und während das nekrotische Gewebe abgebaut wird, und noch ehe Kollagen eingelagert wird, um die Zugfestigkeit wiederherzustellen (PFEFFER und BRAUNWALD, 1990). In dieser Phase kann es zu einer akuten Dilatation und Verdünnung des Infarktgebietes kommen, die nicht durch zusätzliche Myokardnekrose, sondern durch Auseinanderrutschen der Myofibrillen entsteht (HUTCHINS und BULKLEY, 1978). Die Ursache dafür ist die Degradation der Kollagenverbindungen zwischen den Myozyten durch MMPs neutrophiler Granulozyten (SUTTON und SHARPE, 2000).

In der späten Phase soll der Ausfall der untergegangenen Kardiomyozyten von dem gesunden Gewebe kompensiert werden. Eine Steigerung der Kontraktilität wird durch Hypertrophie der verbliebenen Myozyten erreicht. Diese wird initiiert durch die myokardiale Dehnung, die das lokale Renin-Angiotensin-System sowie die Freisetzung autokriner und parokriner Faktoren (z.B. Noradrenalin, ET-1, bFGF und IGF-1) aktiviert (BOGOYEVITCH et al. , 1994 und YAMAZAKI et al. , 1995).

Gleichzeitig wird versucht, die reduzierte Auswurfleistung durch Vergrößerung des enddiastolischen Volumens auszugleichen, so dass das Schlagvolumen nicht verringert wird. Dies soll durch Dilatation des Ventrikels erreicht werden. Da aber gleichzeitig durch neuronale und hormonale Mechanismen die Vorlast erhöht wird, steigt die Wandspannung. Dadurch wird eine weitere Dilatation des Ventrikels und sogar die Apoptose weiterer Kardiomyozyten verursacht. Dieser Prozess kann schließlich zu einer Herzinsuffizienz führen (ANVERSA et al. , 1998 und PFEFFER und BRAUNWALD, 1990). Remodeling des Ventrikels kann sich über Wochen oder Monate hinziehen, solange bis die Zugfestigkeit des Narbengewebes die ausdehnend wirkenden Kräfte ausgleicht (SUTTON und SHARPE, 2000).

Insofern hat die Infarktteilung einen entscheidenden Einfluss auf das Remodeling. Die Infarktteilung läuft in drei Phasen ab: der inflammatorischen (3-72 h), der proliferativen (72 h-7 d) und der Reifungsphase (7-14 d) (Die Zeiträume beziehen sich auf reperfundierte Infarkte der Maus (FRANGOGIANNIS, 2006), da für die Ratte keine ähnlich detaillierten Angaben in der Literatur zu finden sind). Während der inflammatorischen Phase werden Leukozyten durch die Aktivierung der Chemokin- und Zytokinkaskade rekrutiert. Die Zytokinkaskade zeichnet sich durch hohe Komplexität aus: ein Zytokin übt dabei viele verschiedene, biologische Effekte auf unterschiedliche Zellarten aus, und ähnliche Zytokine können überlappende, ähnliche oder aber auch gegensätzliche Effekte auf die gleichen Zellarten haben

DISKUSSION

(KISHIMOTO et al. , 1995). Einige Zytokine sollen hier kurz aufgrund ihrer prominenten Rolle im Entzündungsgeschehen erwähnt werden. TNF- α wird sehr früh im infarzierten Myokard freigesetzt und gilt als Auslöser der Zytokinkaskade, da es die Expression von IL1 β , IL6 und IL10 in Monozyten und von IL1 β , IL6 in Endothelzellen induziert. Darüber hinaus beeinflusst es die Proliferation von Kardiofibroblasten sowie deren Synthese extrazellulärer Matrixproteine und soll zudem noch eine antiapoptotische Wirkung auf Kardiomyozyten haben (FRANGOIANNIS, 2006 und KURRELMAYER et al. , 2000).

IL8 besitzt chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten und reguliert die Aktivierung entzündlicher Prozesse. Gleichzeitig wirkt es stark angiogen, und soll auch in der Wundheilung eine wichtige Rolle spielen (FRANGOIANNIS, 2004 und MUKAIDA, 2000).

MCP-1 hingegen übt eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten, T-Zellen und natürliche Killerzellen aus. Es induziert ebenfalls Angiogenese sowie Arteriogenese, und steigert die Synthese von Kollagen und MMPs der Fibroblasten (FRANGOIANNIS, 2006 und GU et al. , 1999).

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen reinigen die Wunde von toten Zellen und Gewebstrümmern. Jedoch scheint es, als ob die neutrophilen Granulozyten dabei mitverantwortlich für die Reperfusionsschäden sind. Einerseits setzen sie Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme frei, die zytotoxisch auf die Kardiomyozyten wirken können (FRANGOIANNIS, 2004). Andererseits ist es möglich, dass sie die Mikrozirkulation nach Reperfusion beeinträchtigen, indem sie an das aktivierte Endothel binden und Leukotriene freisetzen, die eine intravasale Gerinnung auslösen können (GOLDSTEIN, 1990). Monozyten und die von ihnen abstammenden Makrophagen setzen weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die zu der Bildung von Granulationsgewebe und Angiogenese führen, wie z.B. bFGF, TGF- β und VEGF (GANZ, 1993).

Sind die nekrotischen Zellen beseitigt, muss die Entzündung abklingen und die Reparatur des Gewebes sowie die Narbenbildung beginnen. Dazu müssen die infiltrierten Neutrophilen abgeräumt werden, die Zytokin- und Chemokinproduktion inhibiert werden und die Fibroblasten aktiviert werden. Zu diesem Zeitpunkt kommt vor allem IL10 und TGF- β eine Schlüsselrolle zu. IL10 wird größtenteils von Lymphozyten und Monozyten exprimiert, und inhibiert die Produktion von IL1, TNF- α ,

DISKUSSION

IL6 und IL8. Gleichzeitig stabilisiert es die extrazelluläre Matrix durch Anregung der Produktion von Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)(MOSMANN, 1994).

TGF- β wird als inaktiver Komplex von vielen Zellen produziert und kann z.B. von Proteasen, wie Plasmin, MMP-2 und MMP-9 aktiviert werden. Es unterdrückt die Zytokin- und Chemokinproduktion der Makrophagen und Endothelzellen. Die Fibroblasten regt es zur Proliferation und TIMP-Expression an sowie zur Synthese extrazellulärer Matrix (CHEIFETZ et al. , 1988 und FRANGOIANNIS, 2006).

Während der proliferativen Phase produzieren aktivierte Myofibroblasten Proteine der extrazellulären Matrix und bilden so das Granulationsgewebe. Sie verfügen über kontraktile Proteine (smooth muscle cell actin) und können damit Zugkräfte ausüben (TOMASEK et al. , 2002).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Granulationsgewebes sind die Blutgefäße, die den hochgradig metabolisch aktiven Zellen die benötigten Nährstoffe und Sauerstoff liefern. Durch die Ischämie wird die Expression von HIF-1 initiiert. HIF-1 regt die Produktion von VEGF an, welches wiederum die Angiogenese in Gang setzt (siehe Kapitel 2.2). Auch Zytokine der Entzündungsreaktion sind in der Lage die VEGF-Expression anzuregen, wie z. B. TGF- β , IL-1 β und IL-6. Andere Faktoren, wie Ang-2, FGF, HGF und PDGF, vermögen die Angiogenese zu modulieren (WARE und SIMONS, 1997). Initial wird ein reiches Netzwerk an Kapillaren gebildet. Doch nur wenige Kapillaren werden mit Perizyten ummantelt, und diejenigen, die keine Hülle erhalten haben, werden wieder zurückgebildet, so dass das reife Narbengewebe blutgefäßarm ist (REN et al. , 2002).

In der anschließenden Reifungsphase gehen die Fibroblasten und vaskulären Zellen apoptotisch zugrunde, und Kollagen wird in das Narbengewebe eingelagert.

Es handelt sich bei der Infarktheilung und dem Remodeling um hochkomplexe Vorgänge, die durch hämodynamische, genetische und neurohumorale Faktoren beeinflusst werden können und deren geregelter Ablauf einer fein ausgewogenen Balance der beteiligten Zytokine und Chemokine bedarf.

Dadurch ergeben sich vielfältige Möglichkeiten, wie die transplantierten Zellen das Remodeling durch Freisetzung von Mediatoren beeinflussen könnten. Zytokine können sowohl zur Angiogenese beitragen, wie auch zu den verschiedenen Stadien der Entzündungsreaktion. MMPs und deren Inhibitoren können den Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix modifizieren, und Wachstumsfaktoren können Zellen vor Apoptose bewahren.

DISKUSSION

Doch bis jetzt gibt es nur unvollständige Informationen zu der Sekretion von Mediatoren durch adulte endotheliale Vorläuferzellen. KUPATT et al. analysierten die Genexpression embryonaler endothelialer Vorläuferzellen und fanden heraus, dass diese eine große Vielfalt an Proteinen unterschiedlicher Signalwege ausschütten können. Es fanden sich Zytokine (z.B. IL14, IL25 und CSF-1,), Chemokine, Wachstumsfaktoren (z.B. FGF), IGF-1, angiogene Faktoren (z.B. VEGF_A, VEGF_B, PDGF α und TGF- α) und verschiedene MMPs und Proteaseinhibitoren (z.B. MMP2, 14, 15 und 24 und TIMP1, 2 und 3). Inwieweit die Genexpression embryonaler und adulter Vorläuferzellen übereinstimmt, ist jedoch unklar, da ebenso Gene entdeckt wurden, die für die embryonale Entwicklung von Bedeutung sind (z.B. des BMP/wnt-Signalwegs) (KUPATT et al. , 2005).

Diese ausführliche Aufschlüsselung der Gene ist bis jetzt für adulte Vorläuferzellen noch nicht durchgeführt worden. XU et al. untersuchten die Zytokinproduktion der Knochenmarkszellen von Mäusen anhand eines ELISA. Es zeigte sich, dass diese VEGF, bFGF, SDF-1 und IGF-1 exprimierten und dass ihr Zellüberstand Kardiomyozyten vor Apoptose schützen konnte.

Sowohl HUR et al. als auch REHMANN et al. untersuchten die Sekretion der Zellen, die in der Literatur als „Early Endothelial Progenitor Cells“ bezeichnet werden, und die in dieser Arbeit angiogene Zellen genannt werden. HUR et al. wiesen nach, dass sie VEGF und IL8 produzierten, und REHMANN et al. wiesen die Sekretion von VEGF, HGF, G-CSF und GM-CSF nach (HUR et al., 2004 und REHMAN et al., 2003).

HE et al. hingegen beschäftigten sich mit der Zytokinexpression der Zellen, die in der Literatur „Late Outgrowth Endothelial Progenitor Cells“, und von uns endotheliale Zellen genannt werden. Sie konnten die Produktion von MCP-1, TGF- β und vor allem von IL8 nachweisen und zeigen, dass IL8 zu einem großen Teil verantwortlich für die mitogene Wirkung der EPCs auf Endothelzellen ist (HE et al. , 2005).

Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die Kokultur der endothelialen Zellen zusammen mit glatten Muskelzellen der Blutgefäße und Fibroblasten beide Zellarten zur Proliferation anregten. In dem Zellmedium, in dem die endothelialen Zellen kultiviert worden waren, konnten erhöhte Spiegel von IL8 und VEGF mittels ELISA nachgewiesen werden (GROHA, 2006).

Jedoch wurden in all diesen Studien Untersuchungsmethoden verwandt, die nur den Nachweis bringen, ob sich bestimmte, vorausgesetzte Proteine im Untersuchungsgut

DISKUSSION

befinden oder nicht. Es ist also wahrscheinlich, dass die so untersuchten Zellen noch weitere Mediatoren exprimieren, nach denen bislang nicht gesucht wurde.

Insgesamt gibt es Grund zu der Annahme, dass die geringere Dilatation des Ventrikels nach Verabreichung von EPCs zumindest zum Teil durch parakrine Effekte vermittelt ist. Die Applikation von Zellen, die eine Bandbreite verschiedener Mediatoren exprimieren, könnte dabei der Applikation einzelner Zytokine oder Wachstumsfaktoren überlegen sein.

Ob die parakrine Wirkung der Zellen die Hauptursache der Funktionsverbesserung ist, ließe sich durch eine Wiederholung der Versuches feststellen, in dem den Tieren statt der Zellen der Überstand der Zellkultur verabreicht wird.

Die Applikation der Zellen könnte noch einen weiteren Vorteil vor der einmaligen Verabreichung von Mediatoren bieten: je nachdem wie lange die Zellen im geschädigten Gebiet verbleiben, sezernieren sie die Substanzen über längere Zeit und üben so einen dauerhaften Stimulus aus. Es wäre jedoch auch möglich, dass sie nicht an der Injektionsstelle verbleiben, sondern von den einwandernden Entzündungszellen phagozytiert werden, in das umliegende Gewebe migrieren oder sich in bestehende oder neue Gefäße inkorporieren. Die bisherigen Studien beschäftigten sich vor allem mit der Möglichkeit, dass die Zellen als Bausteine neuer Gefäße dienen und konnten unterschiedlich hohe Beteiligung an vaskulären Strukturen feststellen. Während ASAHARA et al., KOCHER et al. und KAWAMOTO et al. in ihren Studien die Inkorporation von Vorläuferzellen in Blutgefäße nach Ligatur der LAD im Tierexperiment nachwiesen (ASAHARA et al., 1999 und KAWAMOTO et al., 2001 und KOCHER et al., 2001), konnten ZIEGLHOEFFER et al. nach Ischämie der Hintergliedmaße keine und KUPATT et al. nach Myokardinfarkt und Reperfusion keine klinisch relevante Beteiligung der Vorläuferzellen feststellen (KUPATT et al., 2005 und ZIEGLHOEFFER et al., 2004). Es ist unklar, ob diese Diskrepanzen durch Messfehler (z.B. falsch positive Ergebnisse durch Angrenzen fluoreszenzpositiver Zellen, statt Kolo-kalisation) oder durch Unterschiede im Versuchsaufbau (z.B. Ischämie und Reperfusion statt Ligatur) verursacht werden.

4.5.3 Angiogenese

Die Ergebnisse der Untersuchung der Angiogenese zeigen keine signifikanten Unterschiede. Weder die Anzahl der Kapillaren (von-Willebrand-Faktor), noch die Anzahl der Gefäße mit glatter Muskelschicht (smooth muscle actin) ist nach 3 oder nach 14 Tagen in den Versuchsgruppen signifikant gesteigert. Dies ist vor allem für die endothelialen Zellen überraschend, da diese in dem in vitro-Angiogeneseassay eine deutliche Bildung tubulärer Strukturen zeigten. Auch die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die besagen, dass die endothelialen Zellen IL8 und VEGF sezernieren, lassen eine Steigerung der Angiogenese erwarten, da beide Substanzen Angiogenese und Proliferation der Endothelzellen anregen (GROHA, 2006).

Es besteht die Möglichkeit, dass die Untersuchungszeitpunkte ungünstig gewählt sind, da die Angiogenese im Granulationsgewebe nur für kurze Zeit hochreguliert wird und viele der Gefäße während der Narbenreifung wieder zurückgebildet werden (REN et al., 2002). Andererseits ist es ebenso möglich, dass die gewählte Untersuchungsmethoden nicht geeignet ist dem komplexen Prozess der Angiogenese gerecht zu werden. So ist es nicht möglich zwischen neu gebildeten und bereits vorhandenen Gefäßen zu differenzieren. Da nur drei Schnitte aus dem gesamten Herzen gefärbt und ausgezählt werden, wird effektiv nur ein sehr kleiner Ausschnitt des relevanten Gebietes bewertet und die Varianz der Ergebnisse ist sehr hoch (Standardfehler bis zu 7,5). Der Nachweis des Anteils endothelspezifischer Proteine im Gewebe durch Immunoblotting oder der RNA-Nachweis könnten exaktere Angaben liefern (WARE und SIMONS, 1997).

4.6 Zusammenfassung der Diskussion

Die Ergebnisse der Zellkultur und der in vitro-Versuche bestätigen die Aussagen neuerer Untersuchungen, dass unterschiedliche Protokolle der Zellkultur zu unterschiedlichen Arten endothelialer Vorläuferzellen führen: nach Kultivierung der gesamten mononukleären Zellen treten nach kurzer Zeit Zellen in Erscheinung, die nur geringgradig proliferieren, kein eindeutiges Muster an Oberflächenmarkern exprimieren und vermutlich von Monozyten oder Makrophagen abstammen. Dagegen sind die Zellen, die nach Präselektion des CD34-Markers und längerer Zeit in Kultur auftreten, hochproliferativ, haben ein eindeutiges Markerprofil und sind vermutlich Abkommen des Hämangioblasten.

Überraschend sind die Ergebnisse des Tiermodells, bei dem beide Zelltypen nach Ischämie und anschließender Reperfusion in das Myokard von Nacktratten transplantiert wurden. Trotz der Unterschiede in der Zellkultur, zeigten die beiden Versuchsgruppen A und E eine etwa gleich hohe Verbesserung der Auswurffraktion. Außerdem konnten geringere Zunahmen des endsystolischen Volumens in beiden Versuchsgruppen, verglichen mit der Zunahme in der Kontrollgruppe, festgestellt werden und eine Zunahme des Körpergewichts, während die Tiere der Kontrollgruppe abnahmen. Jedoch konnte für beide Parameter, aufgrund der hohen Spannweite der Werte, keine Signifikanzen ermittelt werden. Die Auswahl gleich großer, ausgewachsener Tiere würde für diese Parameter den Vergleich erleichtern. Die Infarktgröße, die nach 3 Tagen nur geringe Unterschiede zwischen den drei Gruppen zeigte, ließ nach 14 Tagen einen Trend zu kleineren Infarkten in den Versuchsgruppen erkennen. Wiederum war die hohe Varianz der Werte der Grund dafür, dass die Unterschiede nicht signifikant waren.

Die Messung zweier Parameter, die das Remodeling des linken Ventrikels charakterisieren (Ausdünnungsverhältnis und Expansionsindex), gab deutliche Hinweise darauf, dass in den Versuchsgruppen ein geringerer Umbau des Ventrikel stattfand. Beide Parameter zeigten bereits nach 3 Tagen bessere Werte in den Versuchsgruppen und nach 14 Tagen waren die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe signifikant. Um das Remodeling weiter quantifizieren zu können, hätten Untersuchungen am intakten Herzen Aufschluss geben können, wie z.B. die Untersuchung des Herzgewichtes oder des

DISKUSSION

Kammervolumens. Leider wurde dies erst bei der Auswertung festgestellt, so dass neue Versuche nötig gewesen wären.

Der Mechanismus, durch den die transplantierten Zellen das Remodeling beeinflussen, konnte nicht ganz geklärt werden. Es gibt Hinweise aus der Literatur sowie aus unserer eigenen Arbeitsgruppe, dass endotheliale Vorläuferzellen verschiedene Mediatoren sezernieren, die in die Infarktheilung eingreifen könnten. Leider sind die Daten noch nicht vollständig, wie es z.B. für embryonale endotheliale Vorläuferzellen der Fall ist (KUPATT et al., 2005). Zur Abklärung inwieweit parakrine Mechanismen für die Funktionsverbesserung verantwortlich sind, könnte eine Studie beitragen, in der statt der Zellen der Überstand aus der Zellkultur verabreicht wird.

Die Untersuchung der Angiogenese mit Hilfe immunohistochemischer Färbungen ließ keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe erkennen. Dies Ergebnis widerspricht den meisten der bislang zu diesem Thema veröffentlichten Studien (ASAHARA et al., 1997 und KALKA et al., 2000 und KAWAMOTO et al., 2001). Ebenso widerspricht es den Erwartungen, geht man von der Annahme aus, dass die therapeutischen Effekte durch parakrine Mechanismen vermittelt sind, da in diesem Zusammenhang besonders die Expression von IL8 und VEGF immer wieder genannt wird. Beide Proteine haben eine proliferative Wirkung auf Endothelzellen und wirken angiogenetisch. Eine Untersuchung des Anteils endothelialer RNA im Gewebe könnte eine exaktere Bestimmung des Blutgefäßanteils im Gewebe liefern. Diese Untersuchung ist momentan in unserer Arbeitsgruppe in Vorbereitung.

Insgesamt scheinen die endothelialen und die angiogenen Zellen die gleiche oder eine sehr ähnliche, therapeutische Wirkung auszuüben, jedoch besitzen die endothelialen Zellen den Vorteil, dass sie sich in Kultur auf ein Vielfaches expandieren lassen. Dieser Vorgang kann allerdings mehrere Wochen in Anspruch nehmen, jedoch überstehen die Zellen das Einfrieren über längere Zeit nahezu unbeschadet. Sollte sich die therapeutische Wirksamkeit der Zellen auch in klinischen Versuchen erweisen, wäre es eine mögliche Strategie, Patienten mit einem bekannten erhöhten Herzinfarkttrisiko, eine prophylaktische Expansion ihrer endothelialen Zellen anzubieten um sie im Notfall einsetzen zu können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Durch neue Methoden der Intervention ist die Mortalität des akuten Myokardinfarktes drastisch reduziert worden, doch die Schädigung der Myozyten führt häufig im weiteren Verlauf zu Herzversagen und damit zu einer Beeinträchtigung der Lebensqualität und –erwartung der Patienten. Die Entdeckung adulter Stamm- und Vorläuferzellen erregte die Hoffnung, dass durch Transplantation der Zellen in das infarzierte Gewebe die kontraktile Funktion wiederhergestellt werden kann. Ein potentiell therapeutisch einsetzbarer Zelltyp sind endotheliale Vorläuferzellen, doch ist deren Anzahl im Blut begrenzt und bis jetzt fehlen exakte Protokolle zu ihrer Gewinnung.

In der vorliegenden Studie wurden zwei unterschiedliche Methoden der Kultivierung endothelialer Vorläuferzellen aus peripherem Blut angewandt, die häufig in vorhergehenden Studien eingesetzt wurden. Die Zellpopulationen wurden in vitro in ihrem Wachstumsverhalten, ihrer Morphologie, der Oberflächenmarkerexpression und ihrem angiogenetischen Potential verglichen. Dabei zeigte sich, dass Zellen, die aus unfraktionierten mononukleären Zellen gewonnen wurden, nur kurze Zeit in Kultur überlebten, wenig proliferativ waren und unterschiedliche Marker exprimierten. Diese Zellen nannten wir angiogene Zellen. Zellen, die aus CD34+ mononukleären Zellen gewonnen wurden, überlebten dagegen bis zu 20 Wochen in Kultur, waren hochproliferativ und sehr homogen in ihrer Markerexpression. Diese Zellen nannten wir endotheliale Zellen. Beide Zellarten wurden nach experimentellem Myokardinfarkt in das Myokard thymusloser Nacktratten transplantiert und die Ventrikelfunktion sonographisch überprüft. In beiden Versuchsgruppen zeigte sich nach 14 Tagen eine signifikante Verbesserung der Ventrikelfunktion, verglichen mit der Kontrollgruppe, die nur das Kulturmedium erhalten hatte. Doch es konnte keine signifikante Beeinflussung der Infarktgröße gemessen werden. Die Untersuchung der Morphologie des linken Ventrikels zeigte eine geringere Abnahme der Wanddicke des Infarktgebietes und einen kleineren Expansionsindex in den Versuchsgruppen. Die Untersuchung der Gefäßbildung nach 3 und nach 14 Tagen zeigte keine Steigerung in den Versuchsgruppen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unterschiedliche Kultivierungsmethoden deutlich unterschiedliche Zellpopulationen hervorbringen, die jedoch nach Transplantation in das Infarktgebiet sehr ähnliche Auswirkung haben, nämlich die Verbesserung der

ZUSAMMENFASSUNG

Ventrikelfunktion und günstige Beeinflussung des Remodelings, die vermutlich durch parakrine Effekte hervorgerufen wird.

6 SUMMARY

Mortality due to acute myocardial infarction has been drastically reduced by optimal means of intervention, but loss of myocytes is leading to heart failure later on and with it to an impaired quality and expectancy of the patient's life. The research of adult stem and progenitor cells gave hope that transplantation of these cells into infarcted tissue could restore its contractile function.

One potentially therapeutically viable kind of cells are endothelial progenitor cells, but there are only limited numbers of cells available. Also at present there is no consensus how best to obtain endothelial progenitor cells.

In this study we used two different procedures of culturing endothelial progenitor cells from peripheral blood that had been applied regularly in earlier studies and compared both cell types with each other, regarding their manner of growth, their morphology, expression of surface markers and their angiogenic potential on matrigel.

It turned out that cells, which were obtained from unfractionated mononuclear cells, survived only for a short period of time in culture, showed little proliferation and expressed different kinds of markers. We called these cells angiogenic cells.

Cells which were obtained from CD34+ mononuclear cells on the other hand survived in culture for up to 20 weeks, were highly proliferative and showed a homogenous expression of markers. We referred to these cells as endothelial cells.

Both kinds of cells were transplanted into the myocardium of athymic nude rats, after experimental infarction and the ventricular function was assessed via sonography.

After 14 days a significant improvement of the ventricular function was found in both cell groups compared to the control group that had only received culture medium, but no significant effect on the size of the infarction was found. Assessment of left ventricular morphology showed a significant decrease of ventricular dilation and wall thinning in infarction area.

Vessel formation was studied after 3 and 14 days, using markers for smooth muscle cells and von Willebrand factor-positive cells. No differences were found in angiogenesis.

These results show that different ways of obtaining endothelial progenitor cells lead to distinctly different cell populations which however have very similar effects after transplantation into the infarcted area, which is an improvement of ventricular function and remodeling, probably caused by paracrine effects.

7 LITERATURVERZEICHNIS

AICHER, A., C. HEESCHEN, C. MILDNER-RIHM, C. URBICH, C. IHLING, K. TECHNANU-IHLING, A. M. ZEIHNER and S. DIMMELER

Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells.

Nat Med 2003;9(11): 1370-6.

AICHER, A., A. M. ZEIHNER and S. DIMMELER

Mobilizing endothelial progenitor cells.

Hypertension 2005;45(3): 321-5.

ANTHONY, F. W., T. WHEELER, C. L. ELCOCK, M. PICKETT and E. J. THOMAS
Short report: identification of a specific pattern of vascular endothelial growth factor mRNA expression in human placenta and cultured placental fibroblasts.

Placenta 1994;15(5): 557-61.

ANVERSA, P., C. BEGHI, Y. KIKKAWA and G. OLIVETTI

Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth.

Circ Res 1986;58(1): 26-37.

ANVERSA, P., W. CHENG, Y. LIU, A. LERI, G. REDAELLI and J. KAJSTURA

Apoptosis and myocardial infarction.

Basic Res Cardiol 1998;93 Suppl 3: 8-12.

ASAHARA, T. and A. KAWAMOTO

Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis.

Am J Physiol Cell Physiol 2004;287(3): C572-579.

ASAHARA, T., H. MASUDA, T. TAKAHASHI, C. KALKA, C. PASTORE, M. SILVER, M. KEARNE, M. MAGNER and J. M. ISNER

Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization.

Circ Res 1999;85(3): 221-228.

ASAHARA, T., T. MUROHARA, A. SULLIVAN, M. SILVER, R. VAN DER ZEE, T. LI, B. WITZENBICHLER, G. SCHATTEMAN and J. M. ISNER

Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.

Science 1997;275(5302): 964-7.

ASSMUS, B., V. SCHACHINGER, C. TEUPE, M. BRITTEN, R. LEHMANN, N. DOBERT, F. GRUNWALD, A. AICHER, C. URBICH, H. MARTIN, D. HOELZER, S. DIMMELER and A. M. ZEIHNER

Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI).

Circulation 2002;106(24): 3009-17.

BAILEY, A. S. and W. H. FLEMING

Converging roads: evidence for an adult hemangioblast.

Exp Hematol 2003;31(11): 987-93.

LITERATURVERZEICHNIS

- BECK, L., JR. and P. A. D'AMORE
Vascular development: cellular and molecular regulation.
Faseb J 1997;11(5): 365-73.
- BELTRAMI, A. P., L. BARLUCCHI, D. TORELLA, M. BAKER, F. LIMANA, S. CHIMENTI, H. KASAHARA, M. ROTA, E. MUSSO, K. URBANEK, A. LERI, J. KAJSTURA, B. NADAL-GINARD and P. ANVERSA
Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.
Cell 2003;114(6): 763-76.
- BEVILACQUA, M. P., R. M. NELSON, G. MANNORI and O. CECCONI
Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease.
Annu Rev Med 1994;45: 361-78.
- BLANN, A. D. and A. PRETORIUS
Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells: two sides of the same coin, or two different coins?
Atherosclerosis 2006;188(1): 12-8.
- BLAU, H. M., T. R. BRAZELTON and J. M. WEIMANN
The evolving concept of a stem cell: entity or function?
Cell 2001;105(7): 829-41.
- BOGOYEVITCH, M. A., P. E. GLENNON, M. B. ANDERSSON, A. CLERK, A. LAZOU, C. J. MARSHALL, P. J. PARKER and P. H. SUGDEN
Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen- activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy.
J. Biol. Chem. 1994;269(2): 1110-1119.
- BRITTEN, M. B., N. D. ABOLMAALI, B. ASSMUS, R. LEHMANN, J. HONOLD, J. SCHMITT, T. J. VOGL, H. MARTIN, V. SCHACHINGER, S. DIMMELER and A. M. ZEIHNER
Infarct Remodeling After Intracoronary Progenitor Cell Treatment in Patients With Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI): Mechanistic Insights From Serial Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging.
Circulation 2003;108(18): 2212-2218.
- CAI, J., M. L. WEISS and M. S. RAO
In search of "stemness".
Exp Hematol 2004;32(7): 585-98.
- CARLOS, T. M. and J. M. HARLAN
Leukocyte-endothelial adhesion molecules.
Blood 1994;84(7): 2068-101.
- CARMELIET, P.
Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.
Nat Med 2000;6(4): 389-95.

CARMELIET, P.

Angiogenesis in health and disease.

Nat Med 2003;9(6): 653-60.

CARMELIET, P., V. FERREIRA, G. BREIER, S. POLLEFEYT, L. KIECKENS, M. GERTSENSTEIN, M. FAHRIG, A. VANDENHOECK, K. HARPAL, C. EBERHARDT, C. DECLERCQ, J. PAWLING, L. MOONS, D. COLLEN, W. RISAU and A. NAGY
Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.

Nature 1996;380(6573): 435-9.

CARMELIET, P. and R. K. JAIN

Angiogenesis in cancer and other diseases.

Nature 2000;407(6801): 249-57.

CHAVAKIS, E., A. AICHER, C. HEESCHEN, K.-I. SASAKI, R. KAISER, N. EL MAKHFI, C. URBICH, T. PETERS, K. SCHARFFETTER-KOCHANNEK, A. M. ZEIHNER, T. CHAVAKIS and S. DIMMELER

Role of β 2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells.

J. Exp. Med. 2005;201(1): 63-72.

CHEIFETZ, S., A. BASSOLS, K. STANLEY, M. OHTA, J. GREENBERGER and J. MASSAGUE

Heterodimeric transforming growth factor beta. Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors.

J Biol Chem 1988;263(22): 10783-9.

CINES, D. B., E. S. POLLAK, C. A. BUCK, J. LOSCALZO, G. A. ZIMMERMAN, R. P. MCEVER, J. S. POBER, T. M. WICK, B. A. KONKLE, B. S. SCHWARTZ, E. S. BARNATHAN, K. R. MCCRAE, B. A. HUG, A. M. SCHMIDT and D. M. STERN

Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.

Blood 1998;91(10): 3527-61.

COOKE, J. P. and P. S. TSAO

Is NO an endogenous antiatherogenic molecule?

Arterioscler Thromb 1994;14(5): 653-5.

D'AMORE, P. A. and S. R. SMITH

Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey.

Growth Factors 1993;8(1): 61-75.

DE FALCO, E., D. PORCELLI, A. R. TORELLA, S. STRAINO, M. G. IACHININOTO, A. ORLANDI, S. TRUFFA, P. BIGLIOLI, M. NAPOLITANO, M. C. CAPOGROSSI and M. PESCE

SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells.

Blood 2004;104(12): 3472-3482.

DEJANA, E.

Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis.

J Clin Invest 1996;98(9): 1949-53.

DIMMELER, S. and A. M. ZEIHNER

Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis?

J Mol Med 2004;82(10): 671-7.

DIMMELER, S., A. M. ZEIHNER and M. D. SCHNEIDER

Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair.

J Clin Invest 2005;115(3): 572-83.

DZAU, V. J.

Vascular angiotensin pathways: a new therapeutic target.

J Cardiovasc Pharmacol 1987;10 Suppl 7: S9-16.

EBNET, K. and D. VESTWEBER

Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines.

Histochem Cell Biol 1999;112(1): 1-23.

ERBS, S., A. LINKE, V. ADAMS, K. LENK, H. THIELE, K. W. DIEDERICH, F. EMMRICH, R. KLUGE, K. KENDZIORRA, O. SABRI, G. SCHULER and R. HAMBRECHT

Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study.

Circ Res 2005;97(8): 756-62.

ERICKSON, L. A., R. R. SCHLEEF, T. NY and D. J. LOSKUTOFF

The fibrinolytic system of the vascular wall.

Clin Haematol 1985;14(2): 513-30.

ESMON, C. T.

Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface.

Faseb J 1995;9(10): 946-55.

ESPER, R. J., R. A. NORDABY, J. O. VILARINO, A. PARAGANO, J. L. CACHARRON and R. A. MACHADO

Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal.

Cardiovasc Diabetol 2006;5: 4.

FISHMAN, A. P.

Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities.

Ann N Y Acad Sci 1982;401: 1-8.

FLACHSKAMPF, F. A.

Praxis der Echokardiographie.2002 Stuttgart, Thieme.

FLAMME, I., T. FROLICH and W. RISAU

Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis.
J Cell Physiol 1997;173(2): 206-10.

FORSTERMANN, U.
Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide.
Eur J Clin Pharmacol 2006;62 Suppl 13: 5-12.

FRANGOIANNIS, N. G.
Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis.
Inflamm Res 2004;53(11): 585-95.

FRANGOIANNIS, N. G.
The mechanistic basis of infarct healing.
Antioxid Redox Signal 2006;8(11-12): 1907-39.

FRENETTE, P. S., R. C. JOHNSON, R. O. HYNES and D. D. WAGNER
Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by
endothelial P-selectin.
Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92(16): 7450-4.

GANZ, T.
Macrophage function.
New Horiz 1993;1(1): 23-7.

GARCIA, J. G., F. M. PAVALKO and C. E. PATTERSON
Vascular endothelial cell activation and permeability responses to thrombin.
Blood Coagul Fibrinolysis 1995;6(7): 609-26.

GAUDRON, P., C. EILLES, I. KUGLER and G. ERTL
Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction.
Potential mechanisms and early predictors.
Circulation 1993;87(3): 755-763.

GEIGER, B. and O. AYALON
Cadherins.
Annu Rev Cell Biol 1992;8: 307-32.

GOLDSTEIN, R. E.
Involvement of leucocytes and leukotrienes in ischaemic dysfunction of the coronary
microcirculation.
Eur Heart J 1990;11 Suppl B: 16-26.

GROHA, O., GAWEHN, SEITZ, STEIN, PESCHEL, OTT
Late outgrowth endothelial progenitor cells stimulate vascular cell proliferation by
release of growth factors.
50. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 2006
Bern.

GU, L., S. C. TSENG and B. J. ROLLINS
Monocyte chemoattractant protein-1.
Chem Immunol 1999;72: 7-29.

GULATI, R., D. JEVREMOVIC, T. E. PETERSON, S. CHATTERJEE, V. SHAH, R. G. VILE and R. D. SIMARI

Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood.

Circ Res 2003;93(11): 1023-5.

HANSSON, G. K.

Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease.

N Engl J Med 2005;352(16): 1685-95.

HE, T., T. E. PETERSON and Z. S. KATUSIC

Paracrine mitogenic effect of human endothelial progenitor cells: role of interleukin-8.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289(2): H968-72.

HEISSIG, B., K. HATTORI, S. DIAS, M. FRIEDRICH, B. FERRIS, N. R. HACKETT,

R. G. CRYSTAL, P. BESMER, D. LYDEN, M. A. MOORE, Z. WERB and S. RAFII

Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand.

Cell 2002;109(5): 625-37.

HILL, J. M., M. A. SYED, A. E. ARAI, T. M. POWELL, J. D. PAUL, G. ZALOS, E. J.

READ, H. M. KHUU, S. F. LEITMAN, M. HORNE, G. CSAKO, C. E. DUNBAR, M. A.

WACLAWIW and R. O. CANNON, 3RD

Outcomes and risks of granulocyte colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease.

J Am Coll Cardiol 2005;46(9): 1643-8.

HILL, J. M., G. ZALOS, J. P. HALCOX, W. H. SCHENKE, M. A. WACLAWIW, A. A.

QUYYUMI and T. FINKEL

Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.

N Engl J Med 2003;348(7): 593-600.

HOCHMAN, J. S. and H. CHOO

Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage.

Circulation 1987;75(1): 299-306.

HOFMANN, M., K. C. WOLLERT, G. P. MEYER, A. MENKE, L. ARSENIEV, B.

HERTENSTEIN, A. GANSER, W. H. KNAPP and H. DREXLER

Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium.

Circulation 2005;111(17): 2198-202.

HORT, W. and S. DACANALIS

[Studies on the Rat Heart with Prolonged Ligation of the Left Coronary Artery with Special Reference to the Infarct Size.]

Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 1965;339: 53-60.

HRISTOV, M., W. ERL and P. C. WEBER

Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23(7): 1185-9.

- HRISTOV, M. and C. WEBER
Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance.
J Cell Mol Med 2004;8(4): 498-508.
- HRISTOV, M. and C. WEBER
The therapeutic potential of progenitor cells in ischemic heart disease Past, present and future.
Basic Res Cardiol 2006;101(1): 1-7.
- HUR, J., C. H. YOON, H. S. KIM, J. H. CHOI, H. J. KANG, K. K. HWANG, B. H. OH, M. M. LEE and Y. B. PARK
Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24(2): 288-93.
- HUTCHINS, G. M. and B. H. BULKLEY
Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction.
Am J Cardiol 1978;41(7): 1127-32.
- INGRAM, D. A., N. M. CAPLICE and M. C. YODER
Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells.
Blood 2005;106(5): 1525-31.
- IWAKURA, A., C. LUEDEMANN, S. SHASTRY, A. HANLEY, M. KEARNEY, R. AIKAWA, J. M. ISNER, T. ASAHARA and D. W. LOSORDO
Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury.
Circulation 2003;108(25): 3115-21.
- IWAMI, Y., H. MASUDA and T. ASAHARA
Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future.
J Cell Mol Med 2004;8(4): 488-97.
- JANSSENS, S., C. DUBOIS, J. BOGAERT, K. THEUNISSEN, C. DEROOSE, W. DESMET, M. KALANTZI, L. HERBOTS, P. SINNAEVE, J. DENS, J. MAERTENS, F. RADEMAKERS, S. DYMARKOWSKI, O. GHEYSENS, J. VAN CLEEMPUT, G. BORMANS, J. NUYTS, A. BELMANS, L. MORTELMANS, M. BOOGAERTS and F. VAN DE WERF
Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial.
Lancet 2006;367(9505): 113-21.
- JESTY, J., A. LORENZ, J. RODRIGUEZ and T. C. WUN
Initiation of the tissue factor pathway of coagulation in the presence of heparin: control by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor.
Blood 1996;87(6): 2301-7.

- JOHNS, T. N. and B. J. OLSON
Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals.
Ann Surg 1954;140(5): 675-82.
- KALKA, C., H. MASUDA, T. TAKAHASHI, W. M. KALKA-MOLL, M. SILVER, M. KEARNEY, T. LI, J. M. ISNER and T. ASAHARA
Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization.
Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(7): 3422-7.
- KANG, H. J., H. S. KIM, S. Y. ZHANG, K. W. PARK, H. J. CHO, B. K. KOO, Y. J. KIM, D. SOO LEE, D. W. SOHN, K. S. HAN, B. H. OH, M. M. LEE and Y. B. PARK
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(9411): 751-6.
- KAWAMOTO, A., H. C. GWON, H. IWAGURO, J. I. YAMAGUCHI, S. UCHIDA, H. MASUDA, M. SILVER, H. MA, M. KEARNEY, J. M. ISNER and T. ASAHARA
Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia.
Circulation 2001;103(5): 634-7.
- KHAKOO, A. Y. and T. FINKEL
Endothelial progenitor cells.
Annu Rev Med 2005;56: 79-101.
- KISHIMOTO, T., S. AKIRA, M. NARAZAKI and T. TAGA
Interleukin-6 family of cytokines and gp130.
Blood 1995;86(4): 1243-54.
- KOCHER, A. A., M. D. SCHUSTER, M. J. SZABOLCS, S. TAKUMA, D. BURKHOFF, J. WANG, S. HOMMA, N. M. EDWARDS and S. ITESCU
Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function.
Nat Med 2001;7(4): 430-6.
- KUMAR, S., D. C. WEST and A. AGER
Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels.
Differentiation 1987;36(1): 57-70.
- KUPATT, C., J. HORSTKOTTE, G. A. VLASTOS, A. PFOSSER, C. LEBHERZ, M. SEMISCH, M. THALGOTT, K. BUTTNER, C. BROWARZYK, J. MAGES, R. HOFFMANN, A. DETEN, M. LAMPARTER, F. MULLER, H. BECK, H. BUNING, P. BOEKSTEGERS and A. K. HATZOPOULOS

LITERATURVERZEICHNIS

Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia.

Faseb J 2005;19(11): 1576-8.

KURRELMEYER, K. M., L. H. MICHAEL, G. BAUMGARTEN, G. E. TAFFET, J. J.

PESCHON, N. SIVASUBRAMANIAN, M. L. ENTMAN and D. L. MANN

Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction.

Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97(10): 5456-61.

LAUFS, U., N. WERNER, A. LINK, M. ENDRES, S. WASSMANN, K. JURGENS, E.

MICHE, M. BOHM and G. NICKENIG

Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis.

Circulation 2004;109(2): 220-6.

LEITINGER, N.

Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis.

Curr Opin Lipidol 2003;14(5): 421-30.

LEVIN, E. R.

Endothelins.

N Engl J Med 1995;333(6): 356-363.

LIBBY, P.

Inflammation in atherosclerosis.

Nature 2002;420(6917): 868-74.

LIN, Y., D. J. WEISDORF, A. SOLOVEY and R. P. HEBBEL

Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood.

J Clin Invest 2000;105(1): 71-7.

LLEVADOT, J., S. MURASAWA, Y. KUREISHI, S. UCHIDA, H. MASUDA, A.

KAWAMOTO, K. WALSH, J. M. ISNER and T. ASAHARA

HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells.

J Clin Invest 2001;108(3): 399-405.

LOSCALZO, J. and G. WELCH

Nitric oxide and its role in the cardiovascular system.

Prog Cardiovasc Dis 1995;38(2): 87-104.

LUSCINSKAS, F. W. and J. LAWLER

Integrins as dynamic regulators of vascular function.

FASEB J. 1994;8(12): 929-938.

MAJNO, G.

Maude Abbott Lecture--1991. The capillary then and now: an overview of capillary pathology.

Mod Pathol 1992;5(1): 9-22.

- MANTOVANI, A., F. BUSSOLINO and E. DEJANA
Cytokine regulation of endothelial cell function.
FASEB J. 1992;6(8): 2591-2599.
- MARCUM, J. A. and R. D. ROSENBERG
Anticoagulant active heparin-like molecules from vascular tissue.
Biochemistry 1984;23(8): 1730-7.
- MASSBERG, S., K. BRAND, S. GRUNER, S. PAGE, E. MULLER, I. MULLER, W. BERGMEIER, T. RICHTER, M. LORENZ, I. KONRAD, B. NIESWANDT and M. GAWAZ
A Critical Role of Platelet Adhesion in the Initiation of Atherosclerotic Lesion Formation.
J. Exp. Med. 2002;196(7): 887-896.
- MENDELSON, M. E., S. O'NEILL, D. GEORGE and J. LOSCALZO
Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine.
J Biol Chem 1990;265(31): 19028-34.
- MICHIELS, C.
Endothelial cell functions.
J Cell Physiol 2003;196(3): 430-43.
- MINSHALL, R. D., W. C. SESSA, R. V. STAN, R. G. W. ANDERSON and A. B. MALIK
Caveolin regulation of endothelial function.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003;285(6): L1179-1183.
- MOORE, K. A. and I. R. LEMISCHKA
Stem cells and their niches.
Science 2006;311(5769): 1880-5.
- MORRISON, S. J., N. M. SHAH and D. J. ANDERSON
Regulatory mechanisms in stem cell biology.
Cell 1997;88(3): 287-98.
- MOSMANN, T. R.
Properties and functions of interleukin-10.
Adv Immunol 1994;56: 1-26.
- MUKAIDA, N.
Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation.
Int J Hematol 2000;72(4): 391-8.
- MULLER, W. A., S. A. WEIGL, X. DENG and D. M. PHILLIPS
PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes.
J Exp Med 1993;178(2): 449-60.
- MUROHARA, T., H. IKEDA, J. DUAN, S. SHINTANI, K. SASAKI, H. EGUCHI, I. ONITSUKA, K. MATSUI and T. IMAIZUMI

LITERATURVERZEICHNIS

- Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization.
J Clin Invest 2000;105(11): 1527-36.
- MUROHARA, T., B. WITZENBICHLER, I. SPYRIDOPOULOS, T. ASAHARA, B. DING, A. SULLIVAN, D. W. LOSORDO and J. M. ISNER
Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999;19(5): 1156-61.
- MUSTONEN, T. and K. ALITALO
Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis.
J Cell Biol 1995;129(4): 895-8.
- NAVAB, M., J. A. BERLINER, A. D. WATSON, S. Y. HAMA, M. C. TERRITO, A. J. LUSIS, D. M. SHIH, B. J. VAN LENTEN, J. S. FRANK, L. L. DEMER, P. A. EDWARDS and A. M. FOGELMAN
The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996;16(7): 831-42.
- NEMERSON, Y. and H. L. NOSSEL
The biology of thrombosis.
Annu Rev Med 1982;33: 479-88.
- NICKENIG, G. and D. G. HARRISON
The AT1-Type Angiotensin Receptor in Oxidative Stress and Atherogenesis: Part I: Oxidative Stress and Atherogenesis.
Circulation 2002;105(3): 393-396.
- OSWALD, J., S. BOXBERGER, B. JORGENSEN, S. FELDMANN, G. EHNINGER, M. BORNHAUSER and C. WERNER
Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro.
Stem Cells 2004;22(3): 377-84.
- OTT, I., U. KELLER, M. KNOEDLER, K. S. GOTZE, K. DOSS, P. FISCHER, K. URLBAUER, G. DEBUS, N. VON BUBNOFF, M. RUDELIUS, A. SCHOMIG, C. PESCHEL and R. A. OOSTENDORP
Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction.
Faseb J 2005;19(8): 992-4.
- PALIS, J., K. E. MCGRATH and P. D. KINGSLEY
Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants.
Blood 1995;86(1): 156-63.
- PARDANAUD, L., F. YASSINE and F. DIETERLEN-LIEVRE
Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny.
Development 1989;105(3): 473-85.
- PATAN, S.

LITERATURVERZEICHNIS

Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling.

J Neurooncol 2000;50(1-2): 1-15.

PEICHEV, M., A. J. NAIYER, D. PEREIRA, Z. ZHU, W. J. LANE, M. WILLIAMS, M. C. OZ, D. J. HICKLIN, L. WITTE, M. A. MOORE and S. RAFII

Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors.

Blood 2000;95(3): 952-8.

PEPPER, M. S.

Role of the Matrix Metalloproteinase and Plasminogen Activator-Plasmin Systems in Angiogenesis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001;21(7): 1104-1117.

PFEFFER, M. A. and E. BRAUNWALD

Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.

Circulation 1990;81(4): 1161-72.

PFEFFER, M. A., J. M. PFEFFER, M. C. FISHBEIN, P. J. FLETCHER, J. SPADARO, R. A. KLONER and E. BRAUNWALD

Myocardial infarct size and ventricular function in rats.

Circ Res 1979;44(4): 503-12.

POPKIN, B. M.

Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases.

Am J Clin Nutr 2006;84(2): 289-98.

PUGH, C. W. and P. J. RATCLIFFE

Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system.

Nat Med 2003;9(6): 677-84.

RAUSCHER, F. M., P. J. GOLDSCHMIDT-CLERMONT, B. H. DAVIS, T. WANG, D. GREGG, P. RAMASWAMI, A. M. PIPPEN, B. H. ANNEX, C. DONG and D. A. TAYLOR

Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis.

Circulation 2003;108(4): 457-63.

REHMAN, J., J. LI, C. M. ORSCHELL and K. L. MARCH

Peripheral Blood "Endothelial Progenitor Cells" Are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors.

Circulation 2003;107(8): 1164-1169.

REN, G., L. H. MICHAEL, M. L. ENTMAN and N. G. FRANGOIANNIS

Morphological Characteristics of the Microvasculature in Healing Myocardial Infarcts.

J. Histochem. Cytochem. 2002;50(1): 71-80.

REYES, M., A. DUDEK, B. JAHAGIRDAR, L. KOODIE, P. H. MARKER and C. M. VERFAILLIE

Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow.
J. Clin. Invest. 2002;109(3): 337-346.

RISAU, W.
Embryonic angiogenesis factors.
Pharmacol Ther 1991;51(3): 371-6.

ROBINSON, C. J. and S. E. STRINGER
The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors.
J Cell Sci 2001;114(Pt 5): 853-65.

ROSS, R.
Atherosclerosis -- An Inflammatory Disease.
N Engl J Med 1999;340(2): 115-126.

RUMPOLD, H., D. WOLF, R. KOECK and E. GUNSILIUS
Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis?
J Cell Mol Med 2004;8(4): 509-18.

RUNDHAUG, J. E.
Matrix metalloproteinases and angiogenesis.
J Cell Mol Med 2005;9(2): 267-85.

RYAN, J., J. BRETT, P. TIJBURG, R. R. BACH, W. KISIEL and D. STERN
Tumor necrosis factor-induced endothelial tissue factor is associated with
subendothelial matrix vesicles but is not expressed on the apical surface.
Blood 1992;80(4): 966-74.

SAHARINEN, P., K. KERKELA, N. EKMAN, M. MARRON, N. BRINDLE, G. M. LEE,
H. AUGUSTIN, G. Y. KOH and K. ALITALO
Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase
and promote its interaction with Tie2.
J. Cell Biol. 2005;169(2): 239-243.

SCHACHINGER, V., B. ASSMUS, M. B. BRITTEN, J. HONOLD, R. LEHMANN, C.
TEUPE, N. D. ABOLMAALI, T. J. VOGL, W. K. HOFMANN, H. MARTIN, S.
DIMMELER and A. M. ZEIHNER
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(8): 1690-9.

SCHAPER, W. and D. SCHOLZ
Factors regulating arteriogenesis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23(7): 1143-51.

SCHMEISSER, A., C. D. GARLICH, H. ZHANG, S. ESKAFI, C. GRAFFY, J.
LUDWIG, R. H. STRASSER and W. G. DANIEL
Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form
cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions.
Cardiovasc Res 2001;49(3): 671-80.

LITERATURVERZEICHNIS

- SCHNITTLER, H. J., S. W. SCHNEIDER, H. RAIFER, F. LUO, P. DIETERICH, I. JUST and K. AKTORIES
Role of actin filaments in endothelial cell-cell adhesion and membrane stability under fluid shear stress.
Pflugers Arch 2001;442(5): 675-87.
- SCHWARTZ, M. A., M. D. SCHALLER and M. H. GINSBERG
Integrins: emerging paradigms of signal transduction.
Annu Rev Cell Dev Biol 1995;11: 549-99.
- SEIFERT, G., HORT, W. (HRSG.), DOERR, W., UEHLINGER, E.
Pathologische Anatomie des Herzens und seiner Hüllen II.2000 Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.
- SHI, Q., S. RAFII, M. H. WU, E. S. WIJELATH, C. YU, A. ISHIDA, Y. FUJITA, S. KOTHARI, R. MOHLE, L. R. SAUVAGE, M. A. MOORE, R. F. STORB and W. P. HAMMOND
Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells.
Blood 1998;92(2): 362-7.
- SQUIRE, J. M., M. CHEW, G. NNEJI, C. NEAL, J. BARRY and C. MICHEL
Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering?
J Struct Biol 2001;136(3): 239-55.
- STAMLER, J. S., D. J. SINGEL and J. LOSCALZO
Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms.
Science 1992;258(5090): 1898-902.
- STERN, D., P. NAWROTH, D. HANDLEY and W. KISIEL
An endothelial cell-dependent pathway of coagulation.
Proc Natl Acad Sci U S A 1985;82(8): 2523-7.
- STRAUER, B. E., M. BREHM, T. ZEUS, M. KOSTERING, A. HERNANDEZ, R. V. SORG, G. KOGLER and P. WERNET
Repair of Infarcted Myocardium by Autologous Intracoronary Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation in Humans.
Circulation 2002;106(15): 1913-1918.
- SURI, C., P. F. JONES, S. PATAN, S. BARTUNKOVA, P. C. MAISONPIERRE, S. DAVIS, T. N. SATO and G. D. YANCOPOULOS
Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis.
Cell 1996;87(7): 1171-80.
- SUTTON, M. G. S. J. and N. SHARPE
Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy.
Circulation 2000;101(25): 2981-2988.

LITERATURVERZEICHNIS

- THEILMEIER, G., C. MICHIELS, E. SPAEPEN, I. VREYS, D. COLLEN, J. VERMYLEN and M. F. HOYLAERTS
Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia.
Blood 2002;99(12): 4486-4493.
- THOMAS, K. A.
Vascular Endothelial Growth Factor, a Potent and Selective Angiogenic Agent.
J. Biol. Chem. 1996;271(2): 603-606.
- TOMASEK, J. J., G. GABBIANI, B. HINZ, C. CHAPONNIER and R. A. BROWN
Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.
Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3(5): 349-63.
- TOPPER, J. N., J. CAI, D. FALB and M. A. GIMBRONE, 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.
Proc Natl Acad Sci U S A 1996;93(19): 10417-22.
- TOPPER, J. N. and M. A. GIMBRONE, JR.
Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype.
Mol Med Today 1999;5(1): 40-6.
- URBICH, C. and S. DIMMELER
Endothelial progenitor cells functional characterization.
Trends Cardiovasc Med 2004;14(8): 318-22.
- URBICH, C. and S. DIMMELER
Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology.
Circ Res 2004;95(4): 343-53.
- VASA, M., S. FICHTLSCHERER, A. AICHER, K. ADLER, C. URBICH, H. MARTIN, A. M. ZEIHNER and S. DIMMELER
Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.
Circ Res 2001;89(1): E1-7.
- WARE, J. A. and M. SIMONS
Angiogenesis in ischemic heart disease.
Nat Med 1997;3(2): 158-64.
- WERNER, N., S. KOSIOL, T. SCHIEGL, P. AHLERS, K. WALENTA, A. LINK, M. BOHM and G. NICKENIG
Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes.
N Engl J Med 2005;353(10): 999-1007.
- WHITE, H. D., R. M. NORRIS, M. A. BROWN, P. W. BRANDT, R. M. WHITLOCK and C. J. WILD

LITERATURVERZEICHNIS

- Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction.
Circulation 1987;76(1): 44-51.
- WHO (2003). World Health Report 2003. At: www.who.int/whr/2003/en.
- WOLBURG, H., J. NEUHAUS, U. KNIESEL, B. KRAUSS, E. M. SCHMID, M. OCALAN, C. FARRELL and W. RISAU
Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes.
J Cell Sci 1994;107 (Pt 5): 1347-57.
- WOLLERT, K. C., G. P. MEYER, J. LOTZ, S. RINGES-LICHTENBERG, P. LIPPOLT, C. BREIDENBACH, S. FICHTNER, T. KORTE, B. HORNIG, D. MESSINGER, L. ARSENEV, B. HERTENSTEIN, A. GANSER and H. DREXLER
Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial.
Lancet 2004;364(9429): 141-8.
- WOYWODT, A., F. H. BAHLMANN, K. DE GROOT, H. HALLER and M. HAUBITZ
Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer.
Nephrol Dial Transplant 2002;17(10): 1728-30.
- YAMAGUCHI, J.-I., K. F. KUSANO, O. MASUO, A. KAWAMOTO, M. SILVER, S. MURASAWA, M. BOSCH-MARCE, H. MASUDA, D. W. LOSORDO, J. M. ISNER and T. ASAHARA
Stromal Cell-Derived Factor-1 Effects on Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cell Recruitment for Ischemic Neovascularization.
Circulation 2003;107(9): 1322-1328.
- YAMAZAKI, T., I. KOMURO, S. KUDOH, Y. ZOU, I. SHIOJIMA, T. MIZUNO, H. TAKANO, Y. HIROI, K. UEKI, K. TOBE, T. KADOWAKI, R. NAGAI and Y. YAZAKI
Angiotensin II Partly Mediates Mechanical Stress-Induced Cardiac Hypertrophy.
Circ Res 1995;77(2): 258-265.
- YE, J., L. YANG, R. SETHI, J. COPPS, B. RAMJIWAN, R. SUMMERS and R. DESLAURIERS
A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality.
Mol Cell Biochem 1997;176(1-2): 227-33.
- YIN, T. and L. LI
The stem cell niches in bone.
J. Clin. Invest. 2006;116(5): 1195-1201.
- YOON, C. H., J. HUR, K. W. PARK, J. H. KIM, C. S. LEE, I. Y. OH, T. Y. KIM, H. J. CHO, H. J. KANG, I. H. CHAE, H. K. YANG, B. H. OH, Y. B. PARK and H. S. KIM
Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases.

LITERATURVERZEICHNIS

Circulation 2005;112(11): 1618-27.

ZENGIN, E., F. CHALAJOUR, U. M. GEHLING, W. D. ITO, H. TREEDE, H. LAUKE, J. WEIL, H. REICHENSPURNER, N. KILIC and S. ERGUN
Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis.
Development 2006;133(8): 1543-1551.

ZIEGELHOEFFER, T., B. FERNANDEZ, S. KOSTIN, M. HEIL, R. VOSWINCKEL, A. HELISCH and W. SCHAPER
Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature.
Circ Res 2004;94(2): 230-8.

ZOHLNHOFER, D., I. OTT, J. MEHILLI, K. SCHOMIG, F. MICHALK, T. IBRAHIM, G. MEISETSCHLAGER, J. VON WEDEL, H. BOLLWEIN, M. SEYFARTH, J. DIRSCHINGER, C. SCHMITT, M. SCHWAIGER, A. KASTRATI and A. SCHOMIG
Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial.
Jama 2006;295(9): 1003-10.

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.	Vasoregulatorische Substanzen,.....	8
Tabelle 2.	VEGF-Rezeptoren und ihre Bindungspartner.....	21
Tabelle 3.	CD-Oberflächenmarker (Cluster of Differentiation),	34
Tabelle 4.	Klinische Studien, die autologe Vorläuferzellen nach AMI einsetzten ..	44
Tabelle 5.	Mortalität und Komplikationen	71
Tabelle 6.	Gewicht und Gewichtszunahmen der Ratten in Gramm	72
Tabelle 7.	Endsystolisches Volumen in Mikroliter	73
Tabelle 8.	Linksventrikuläre Auswurffraktion in Prozent.....	75
Tabelle 9.	Relative Infarktgröße in Prozent des linken Ventrikels	77
Tabelle 10.	Verteilung der Infarktgrößen	78
Tabelle 11.	Das Ausdünnungsverhältnis (Thinning ratio)	80
Tabelle 12.	Der Expansionsindex.....	81
Tabelle 13.	Anzahl der von-Willebrand-Faktor-positiven Gefäße	82
Tabelle 14.	Anzahl der aktinpositiven Gefäße	85

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.	Oberflächenmoleküle der Endothelzell-Leukozyten-Adhäsion.....	13
Abbildung 2.	Die Rolle der Monozyten in der Entwicklung der Atherosklerose	15
Abbildung 3.	Thrombus verursacht durch ein rupturiertes Atherom	17
Abbildung 4.	Stamm- und Vorläuferzellen	27
Abbildung 5.	Mutmaßliche Differenzierungskaskade und Expressionsprofile.....	29
Abbildung 6.	Unterschiedliche Arten der EPCs	33
Abbildung 7.	Sonographische Messung der Auswurfraction	57
Abbildung 8.	Thorakotomie mit Ligatur der LAD	59
Abbildung 9.	Bestimmung der Anzahl CD34+ Zellen.....	64
Abbildung 10.	Morphologie der Zellen in Kultur	65
Abbildung 11.	Wachstumzunahmen der Zellen.....	66
Abbildung 12.	Angiogeneseassay auf Matrigel	66
Abbildung 13.	Expression der Oberflächenmarker	68
Abbildung 14.	Gewicht und Gewichtszunahme der Ratten in Gramm	72
Abbildung 15.	Endsystolisches Volumen und ESV-Zunahme in Mikroliter.....	74
Abbildung 16.	Korrelation zwischen endsystolischem Volumen und Gewicht.....	74
Abbildung 17.	Linksventrikuläre Auswurfraction in Prozent	75
Abbildung 18.	Infarktareal in der Masson-Trichrom-Färbung.....	76
Abbildung 19.	Relative Infarktgröße in Prozent des linken Ventrikels	77
Abbildung 20.	Verteilung der Infarktgrößen	79
Abbildung 21.	Das Ausdünnungsverhältnis (Thinning ratio)	80
Abbildung 22.	Der Expansionsindex (expansion index)	81
Abbildung 23.	Von-Willebrand-Faktor-positive Zellen 14 Tage nach Infarkt	83
Abbildung 24.	Anzahl der von-Willebrand-Faktor-positiven Gefäße	84
Abbildung 25.	Smooth-Muscle-Cell-Actin-positive Zellen 14 Tage nach Infarkt..	86
Abbildung 26.	Anzahl der aktinpositiven Gefäße	87

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
µl	Mikroliter
AAD	Aminoactinomycin
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
aFGF	Acidic Fibroblast Growth Factor
AMI	Akuter Myokardinfarkt
Ang	Angiopoetin
Ao	Aorta
APC	Aktiviertes Protein C
APC	Allophycocyanin
AT	AngioTensin
AZ	Angiogene Zellen
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMC	Bone Marrow Cells
BM-MNC	Bone Marrow Mononuclear Cells
CAC	Circulating Angiogenic Cell
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Carbohydrate Recognition Domain
CEC	Circulating Endothelial Cell
CEPC	Circulating Endothelial Progenitor Cells
CFR	Coronary Flow Reserve
EBM	Endothelial Basal Medium
EEPC	Early EPC
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPC	Endothelial Progenitor Cell
EPO	Erythropoetin
ESV	End-Systolic Volume,
ET	Endothelin
EZ	Endotheliale Zellen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FBS	Fetal Bovine Serum
FDP	Fibrindegredationsprodukte
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
flk-1	fetale Leberkinase-1
flt-1	FMS-like Tyrosin Kinase-1
FS	FadenStück
g	Gramm
GA	Gentamycin-Amphotericin
GAG	GlycosAminoGlykane
G-CSF	Granulocyte Colonie Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
hEGF	human Epidermal Growth Factor
hFGF-B	human Fibroblast Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia Inducible Transcription Factor
HO	Herzohr
HSC	Hematopoetic Stem Cell
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM	Intercellular Adhesion Molecules
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IL	Interleukin
iNOS	inducible NO-Synthase
ISp	Insulinspritze
KDR	Kinase Insert Domain Receptor
KitL	Kit Ligand
LA	Linkes Atrium
LAD	Left Anterior Descending Artery
LDL	Low Densitiy Lipoprotein
LEPC	Late EPCs
LFA-1	Leukozytenfunktionsantigen
Lig	Ligatur
LPS	Lipopolysacharide
LSAB	Labeled StreptAvidin Biotin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LV	Linker Ventrikel
LVEF	LinksVentrikulären AuswurfFraktion
LVWM	Left Ventricular Wall Motion
MACS	MAgnetic-Cell-Sorting
MAPC	Multipotent Adult Progenitor Cells
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein
mKitL	membrane bound KitL
MMP	Matrixmetalloproteinase
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MT-Färbung	Masson-Trichrom-Färbung
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PAF	PlättchenAktivierender Faktor
PAR	Protease-Activated-Receptor
PBEPC	Peripheral Blood Endothelial Progenitor Cells
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PerCP	Peridinin Chrolophyll Protein
PGI2	Prostazyklin
PIGF	Placenta Growth Factor
PM	PapillarMuskel
RAAS	Renin Angiotensin AldosteronSystem
RNA	RiboNucleic Acid
RS	RippenSpreitzer
RV	Rechter Ventrikel
SDF-1	Stromal Cell Derived Factor-1
SEM	Standard Error of the Mean
sKitL	soluble KitL
sLex	Tetrasacharidsialyl Lewis x
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TP	Thymin Phosphorylase
TPA	Tissue Plasminogen Activator
tPA	tissue-type Plasminogen Activator
uPA	urokinase-type
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VE-Cad	Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-B	VEGF Related Factor
VEGF-C	VEGF Related Protein
VEGF-D	c-fos-Induced Growth Factor
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organisation
WMSI	Wall Motion Score Index

11 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. vet. habil. W. Schmahl danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit an die tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. med. W. Gänsbacher, Direktor des Institutes für experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, möchte ich mich für die Arbeitsmöglichkeit bedanken.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. vet. J. Henke bedanken, für die stets freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau PD Dr. med. I. Ott für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit bei der praktischen Durchführung der Arbeit und die jederzeit gewährte Hilfe bei der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse.

Bei Frau Dr. med. M. Rudelius und Frau R. Hegenlohe bedanke ich mich herzlich für die Herstellung und Beratung bei der Auswertung der histologischen Präparate.

Besonders danken möchte ich den Tierpflegerinnen und Tierpflegern für ihre Hilfsbereitschaft und die verantwortungsvolle Tierpflege.

Weiterhin möchte ich mich bei Annette Stobbe, Birgitt Campbell und Christina Bauer für die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit bedanken.

12 LEBENS LAUF

21. 08. 1977: geboren in München
- 1983 – 1986: Besuch der Grundschule in der Oselstraße
1986 – 1996: Besuch des Louise-Schroeder-Gymnasium
- 1997 – 1999: Ausbildung zur Tierarzhelferin in der
Gemeinschaftspraxis Dres. med. vet. Schwarz und
Winzinger
- 1999 – 2005: Studium der Tiermedizin in der Ludwig-
Maximilians-Universität in München
29. 03. 2005: Approbation als Tierärztin
- 1999 – 2005: Arbeit als Bedienung im Kilians Irish Pub am Dom
01. 03. 2005 – 31. 01. 2007: Durchführung der praktischen Versuche zur
Erstellung der Dissertation mit dem Titel:
„Die Transplantation von humanen endothelialen und
angiogenen Zellen verbessert die linksventrikuläre
Funktion im Myokardmodell der Nacktratte“ im
Klinikum rechts der Isar
15. 10. 2005 – 15. 04. 2006: Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft im
Klinikum rechts der Isar
15. 01. 2006 - : Teilnahme an dem Seminar zur Fortbildung zum
Fachtierarzt für Anästhesiologie im Klinikum
rechts der Isar
15. 04. 2006 - : Teilnahme am Graduiertenkolleg „Vaskuläre
Biologie in der Medizin“ der Ludwig-Maximilians-
Universität München