

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Inneren Medizin III
Institut für Molekulare Kardiologie
(Direktor: Prof. Dr. A. M. Zeiher)

**Etablierung einer neuen Methode zur
Detektierung zirkulierender apoptotischer
Endothelzellen und
Untersuchung des Verhältnisses zu
endothelialen Progenitorzellen bei der
koronaren Herzkrankheit**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereiches Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Vorgelegt von
Ulrike Kämper
aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main
2005

Dekan: Herr Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referentin: Frau Prof. Dr. S. Dimmeler
Korreferent: Herr Priv.- Doz. Dr. med. Ralf P. Brandes

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Akronyme

Danksagung

1.	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose	1
1.1.1	Bedeutung des Endothels für die Atherosklerose	1
1.1.2	Klinik der koronaren Herzkrankheit	1
1.1.2.1	Angina pectoris	3
1.1.2.2	Myokardinfarkt	4
1.2	Das Endothel	5
1.2.1	Physiologie des Endothels	5
1.2.2	Pathophysiologie des Endothels	6
1.3	Apoptose von Endothelzellen	7
1.3.1	Definition der Apoptose	7
1.3.2	Bedeutung der Endothelzellapoptose	8
1.3.2.1	Diabetes mellitus	8
1.3.2.2	Oxidativer Stress und Ang II	9
1.3.2.3	Hypercholesterinämie	10
1.3.2.4	CRP	10
1.3.3	Inhibitoren der Apoptose	10
1.4	Gleichgewicht von Endothelzelluntergang und –ersatz	11
1.4.1	Endotheliale Progenitorzellen	11
1.4.2	Herkunft und Funktion endothelialer Progenitorzellen	13
1.4.3	EPC und Risikofaktoren für die KHK	13
1.4.4	EPC und Statine	14
1.5	Messung der Endothelzellapoptose	14
1.6	Ziel der Dissertation	16

2.	Material und Methoden	17
2.1	Patienten- und Probandenrekrutierung	17
2.2	Definition der Risikofaktoren	17
2.3	Methode	18
2.3.1	Bestimmung der Anzahl apoptotischer Endothelzellen	18
2.3.2	FACS-Analyse	18
2.3.2.1	Durchflusszytometrie (FACS)	18
2.3.2.2	Das Prinzip der Durchflusszytometrie	19
2.3.3	Antikörper zur Endothelzelldetektion	19
2.3.3.1	CD 45	19
2.3.3.2	CD146	20
2.3.3.3	Faktor VIII verwandtes Antigen / vWF (Ab-1)	20
2.3.3.4	KDR	21
2.3.3.5	Annexin	21
2.3.4	Bestimmung der Herkunft zirkulierender maturer apoptotischer Endothelzellen	22
2.3.5	Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen	22
2.3.5.1	Antikörper zur Detektion endothelialer Progenitorzellen	24
2.3.5.1.1	AC133	24
2.3.5.1.2	CD34	24
2.4	Laboranalysen	25
2.5	Statistik	25

3. Ergebnisse	26
3.1 Etablierung einer Methode zur Detektion von Endothelzellen und apoptotischen Endothelzellen	26
3.1.1 Blutabnahme und -aufbereitung	26
3.1.2 Zellverarbeitung und Antikörperinkubation	27
3.1.3 Bestimmung der Endothelzellzahl mittels FACS	28
3.1.4 Bestimmung der endothelialen Apoptoserate	31
3.1.5 Negativkontrolle	32
3.1.6 Bestimmung der Reliabilität, Validität und Objektivität der Messungen	32
3.1.7 Antikörperinkubation bei HUVEC	33
3.1.8 Apoptoseinduktion in HUVEC mittels Serumentzug	34
3.2 Reduzierte Anzahl zirkulierender EPC bei Patienten mit stabiler und mit aktiver koronarer Gefäßkrankheit	35
3.3 Zirkulierende mature Endothelzellen bei Patienten mit koronarer Gefäßkrankheit	37
3.4 Gleichgewicht verschiedener zirkulierender Endothelzellpopulationen bei der koronaren Gefäßkrankheit	39
3.5 Zirkulierende Endothelzellen und Risikofaktoren für die Koronare Herzkrankheit	40
3.6 Kardiale Herkunft zirkulierender maturer apoptotischer Endothelzellen	41

3.7	Auswirkung der Statineinnahme auf die Anzahl apoptotischer Endothelzellen	42
3.7.1	Retrospektive Analyse	42
3.7.2	Prospektive Studie	45
4.	Diskussion	47
4.1	Zirkulierende apoptotische Endothelzellen als Zeichen und Auslöser eines atherosklerotischen Krankheitsgeschehens	47
4.2	Endotheliale Progenitorzellen und koronare Herzkrankheit	48
4.3	Statine reduzieren die Anzahl apoptotischer Endothelzellen im peripheren Blut	50
5.	Literaturverzeichnis	52
6.	Zusammenfassung	66
7.	Summary	68
8.	Lebenslauf	70
9.	Ehrenwörtliche Erklärung	72

Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzym
ACS	engl. „Acute coronary syndrome“ = Akutes Koronarsyndrom
AMI	Akuter Myokardinfarkt
Ang	Angiotensin
AP	Angina pectoris
AT1	Angiotensin II-Rezeptor-Subtyp 1
ATRB	Angiotensin I -Rezeptor-Blocker
Ca²⁺	Calcium
CAEC	engl. „circulating apoptotic endothelial cells“ = zirkulierende apoptotische Endothelzellen
CEC	engl. „circulating endothelial cells“ = zirkulierende apoptotische Endothelzellen
CEPC	engl. „circulating endothelial progenitor cells“ = zirkulierende endotheliale Progenitorzellen
CK-MB	engl. „Creatin-Kinase Muscle-Brain“ = Creatinkinase (Myokardtyp)
CMV	Cytomegalie-Virus
CRP	C-reaktives Protein
CVRF	engl. „cardiovascular risc factors“ = kardiovaskuläre Risikofaktoren
DNA	engl. „Desoxyribonucleic Acid“ = Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylenglycoltetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase

EPC	engl. „Endothelial Progenitor Cell“ = Endotheliale Progenitorzelle
ERDF	engl. „endothelium derived relaxing factor“ = mit NO identischer Vasodilatator
FACS	engl. „Fluorescent Activated Cell Sorting“ = Durchflusszytometrie
FSC	engl. „Forward Scatter“
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym-A
hsCRP	engl. „high sensitive C-reactive-protein“
HUVEC	engl. „Human Umbilical Venous Endothelial Cells“ = humane Nabelschnurendothelzellen
KHK	Koronare Herzkrankheit
KDa	Kilo Dalton
KV	kardiovaskulär
LCA	engl. „left coronary artery“ = Arteria coronaria sinistra
LDL	engl. „Low Density Lipoproteins“ = Lipoproteine niedriger Dichte
LSD	engl. „Least Significant Difference“
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MI	Myokardinfarkt
mRNA	engl. „messenger Ribonucleid Acid“ = Boten- Ribonukleinsäure
n	Anzahl separat durchgeführter Experimente
NO	engl. „Nitric Oxide“
n.s.	nicht signifikant
NSTEMI	engl. „Non-ST-Elevation Myocardial Infarction“ = Nicht-ST-Hebungsinfarkt
OxLDL	oxidiertes „Low density Lipoprotein“

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	engl. „Phosphate Buffer Solution“
PCI	perkutane coronare Interventionen
PTCA	perkutane transluminare coronare Angioplastie
RAAS	Renin-Angiotensin-System
SCAD	engl. „stable coronary artery disease“ = stabile koronare Herzkrankheit
SD	Standardabweichung
SSC	engl. „Side Scatter“
STEMI	engl. „ST-Elevation Myocardial Infarction“ = - ST-Hebungsinfarkt
TUNEL	engl. „Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick- end labeling“
UA	engl. „Unstable Angina“ = Instabile Angina pectoris
VAS	engl. „vasculotropin“
VEGF	engl. „Vascular endothelial growth factor“
VPF	engl. „vascular permeability factor“
vs.	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor
WBC	engl. „white blood cells“ = weiße Blutkörperchen

Danksagung

Frau Prof. Dr. S. Dimmeler danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, die ausgezeichneten Möglichkeiten bei der Bearbeitung sowie für ihren umfangreichen fachlichen Rat.

Herrn Prof. Dr. A.M. Zeiher danke ich für seine konstruktiven Hinweise, die beim weiteren Fortgang der Arbeit sehr hilfreich waren.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. L. Rössig für seine ausgeprägte Hilfsbereitschaft, Großzügigkeit und Geduld, die er mir, trotz seiner Belastung in Klinik und Forschung, entgegenbrachte, sowie für die Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die schlussendlich zur Vollendung derselben führten.

Herrn Dr. S. Fichtlscherer und Frau Caroline Schmidt-Lucke danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Ein Dank auch an den Blutspendedienst/ Frankfurt und den Polizeichor/ Frankfurt für die freundliche Kooperation.

Ein ganz besonderer Dank gilt dem gesamten Fachlabor Molekulare Kardiologie für das gute Arbeitsklima und die vielseitigen Ratschläge, insbesondere Rebeca Salguero Palacios und Marga Müller-Ardogan für ihre große Hilfsbereitschaft.

Zum Schluß, aber nicht weniger wichtig, ein Dank an meine Familie und meinen Freund für die Unterstützung während der gesamten Aktivitäten im Zusammenhang mit der Dissertation.

1.1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Das Wort „Atherosklerose“ setzt sich aus den griechischen Wörtern athero (Paste, Schleim) und sklerosis (Härte) zusammen. Als Atherosklerose bezeichnet man die Anlagerung von Triglyzeriden, Cholesterin, zellulären Abfallprodukten und anderen Substanzen an der Innenseite der Arterienwand, bevorzugt bei großen und mittelgroßen Arterien (AHA, Heart and Stroke Encyclopedia: Atherosclerosis).

1.1.1 Bedeutung des Endothels für die Atherosklerose

Die Verletzung des Endothels ist ein wichtiger Auslöser für die Atheroskleroseentstehung (Ross R et al. 1977). Einen wegweisenden Anhaltspunkt für die Beteiligung von Endothelzellen am Pathomechanismus der Atherosklerose erbrachte die Beobachtung, dass gerade die Endothelzellen in den besonders empfindlichen Abschnitten des Gefäßbetts, in denen vermehrt atherosklerotische Plaques zu finden sind, eine erhöhte Umsatzrate haben (Caplan B.A., Schwartz C.J. 1973). Dies weist darauf hin, dass zwischen einer erhöhten Endothelzellumsatzrate und der Bildung atherosklerotischer Plaques ein Zusammenhang besteht. Da im intakten endothelialen Monolayer die Zellproliferation durch die Kontaktinhibition der Endothelzellen verhindert wird, ist eine erhöhte Endothelzellumsatzrate ein Zeichen dafür, dass Zellen des Endothelzellverbands verloren gegangen sein müssen. Damit war ein erster Hinweis auf das Absterben von Endothelzellen im Rahmen der Entstehung der Atherosklerose erbracht worden.

1.1.2 Klinik der koronaren Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die Haupttodesursache in den Industrienationen der westlichen Welt. Klinische Manifestationen der KHK sind die stabile Angina pectoris und akute Koronarsyndrome. Während die stabile Angina pectoris reproduzierbar und über längere Zeitverläufe in gleicher Intensität und Häufigkeit während körperlicher und / oder emotionaler Belastungssituationen auftritt, werden unter dem Begriff *Akutes Koronarsyndrom (ACS)* Stadien der koronaren Herzerkrankung zusammengefasst, die mit akuten Brustschmerzen und / oder einem akuten koronaren Ereignis einhergehen. In der klinischen Praxis sind dies die instabile Angina pectoris (engl. unstable angina, UA), der akute Myokardinfarkt und

der plötzliche Herztod. Jährlich werden in Deutschland ca. 350 000 – 400 000 Patienten mit akutem Koronarsyndrom ohne persistierende ST-Streckenhebung behandelt. Leitsymptom ist hierbei der akute thorakale Schmerz. Dahinter verbirgt sich ein großes Spektrum von funktionellen Beschwerden bis zur akut lebensbedrohlichen Myokardischämie. Maßgebliches Kriterium zur Einteilung von Patienten mit akuten thorakalen Schmerzen ist der Nachweis einer kritischen, zur Zellnekrose führenden myokardialen Ischämie mittels Bestimmung des Troponin-T-Werts im Serum (Braunwald E. 2002). Solange keine Myokardnekrose nachweisbar ist und der Troponin-T-Wert dementsprechend unter einem Grenzwert bleibt, spricht man von einem Troponin-T-negativen akutem Koronarsyndrom. Steigt der Troponin-T-Wert hingegen über einen Grenzwert an (positiver Troponin-T-Test), so liegt definitionsgemäß ein akuter Myokardinfarkt vor. Die klinische Präsentation von Patienten mit positivem Troponin-T-Test wird anhand des EKG-Befundes in Myokardinfarkte mit ST-Streckenhebung (ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt, STEMI) und ohne ST-Streckenhebung (Nicht-ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt NSTEMI) unterteilt (Hamm C.W. 2004). Abb.1.1.2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Stadien des akuten Koronarsyndroms (ACS)

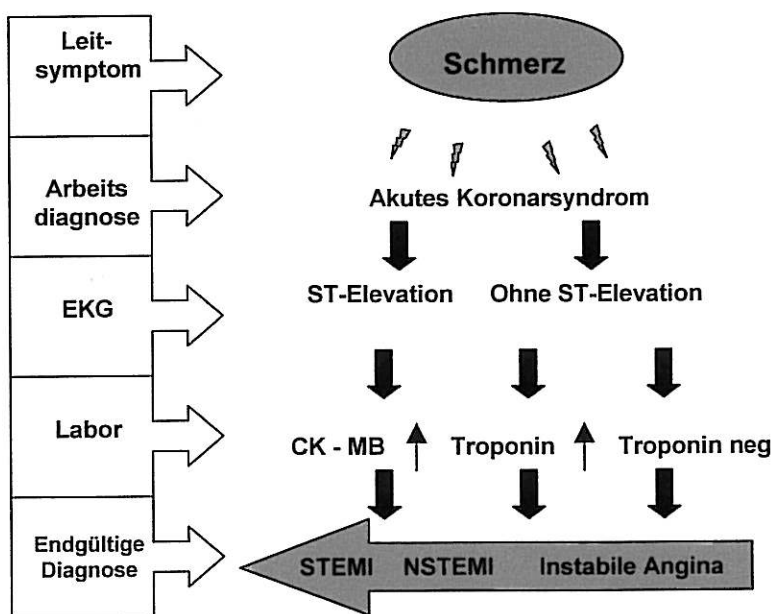


Abb. 1.1.2. Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien des akuten Koronarsyndroms (ACS) (aus den vom Vorstand der Deutsche Gesellschaft für Kardiologie herausgegebenen Empfehlungen (2004). Zeitschrift für Kardiologie 2004; 93:72-90).

1.1.2.1 Angina pectoris

Die klinische Symptomatik der Angina pectoris zeichnet sich durch Schmerzen in der Brust, der Schulter, dem Rücken oder dem Arm aus. Projektionen des Schmerzempfindens ins Epigastrium oder den Unterkiefer sind keine Seltenheit. Oftmals wird ein drückender oder brennender Schmerzcharakter geschildert. Körperliche Belastung, emotionaler Stress oder Kälteexposition löst die Symptomatik aus oder aggraviert sie, während die orale Applikation von Nitroglycerin die Beschwerden lindert oder behebt (sogenannte nitro-sensitive, typische Angina pectoris). Die Angina pectoris tritt typischerweise bei Patienten mit koronarer Ein- oder Mehrgefäßerkrankung auf, kann aber auch bei Patienten mit anderen kardiologischen Krankheitsbildern auftreten (Aortenstenose oder hypertensive Entgleisung mit relativer subendokardialer Ischämie bei erhöhten intraventrikulären Druckwerten; Gibbons R.J. 2002).

Während die Schmerzsymptomatik bei der stabilen Angina pectoris nur in den obengenannten Belastungssituationen mit erhöhter Herzaktivität und -frequenz auftritt, für wenige Minuten anhält und sich durch Ruhe bessert, trifft für die instabile Angina pectoris mindestens eines der folgenden drei Merkmale zu:

1. New-onset Angina (De novo AP): Die AP-Beschwerden treten zum ersten Mal auf und sind mit erheblichen Einschränkungen bei normaler körperlicher Tätigkeit verbunden.
2. Crescendo AP-Beschwerden (Increasing AP): Die AP ist erst kürzlich neu / erneut aufgetreten und hat seitdem in Frequenz und Dauer zugenommen.
3. Ruhe-Angina: Die AP-Beschwerden treten in Ruhe und über einen längeren Zeitraum (meistens mehr als 20 min) auf.

Nach Eugene Braunwald wird die instabile Angina pectoris entsprechend der Akuität der pektanginösen Symptomatik mittels folgender Klassifikation eingeteilt:

Klassifikation der instabilen Angina pectoris nach Braunwald	
Klasse I:	neu aufgetretene oder zunehmende Angina
Klasse II:	Ruheangina, nicht in den letzten 48 Stunden
Klasse III:	Ruheangina innerhalb der letzten 48 Stunden
Klasse A:	Sekundär instabile Angina (primär stabil, durch nichtkardiale auslösende Begleitfaktoren [Fieber, Anämie etc.] instabil geworden)
Klasse B:	Primär instabile Angina (ohne äußere Ursachen)
Klasse C:	Angina nach Myokardinfarkt (sogenannte Postinfarktangina)

Die laborchemische Definition der instabilen Angina pectoris beinhaltet zudem, dass der Patient keine serologischen Marker einer Myokardnekrose aufweist. Es muss also definitionsgemäß ein Troponin-T-negatives ACS vorliegen bzw. das Vorliegen eines akuten Myokardinfarktes muss serologisch ausgeschlossen sein (Braunwald E. 1989).

Pathophysiologisches Äquivalent der Angina pectoris von deren stabiler Form bis hin zum akuten Myokardinfarkt ist die myokardiale Ischämie auf dem Boden einer koronaren Insuffizienz. Diese tritt auf, wenn der myokardiale Sauerstoffbedarf die -zufuhr übersteigt. Eine solche koronare Insuffizienz kann verursacht werden durch einen gefäßverengenden oder verschließenden Thrombus auf einer vorbestehenden atherosklerotisch bedingten Erosion oder Plaque, der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque mit nachfolgender Stenosierung oder Okklusion des Gefäßlumens oder seltener einen sogenannten dynamischen vasokonstriktiven Verschluss (sogenannter Koronarspasmus). Hingegen kann es auch auf dem Boden einer gleichbleibenden, kompensierten Stenosierung der Koronargefäße infolge eines gesteigerten myokardialen Sauerstoffbedarfs, etwa im Rahmen einer Kreislaufbelastung durch Fieber, Anämie oder Thyreotoxikose zu einem relativen Sauerstoffmangel kommen (sogenannte präzipitierte Angina pectoris; Braunwald E. et al. 2002)

1.1.2.2 Myokardinfarkt

Ein Myokardinfarkt tritt ein, wenn die Blutversorgung eines Teils der Herzmuskulatur (Myokard) so stark reduziert oder unterbrochen ist, dass es zur Nekrose von Herzmuskelzellen kommt. Die heute übliche Diagnostik des akuten Myokardinfarktes beruht im Wesentlichen auf dem laborchemischen Nachweis eines charakteristischen Anstiegs und allmählichen Abfalls des Troponin-Werts als Serum-Marker einer Myokardnekrose, zusammen mit wenigstens einem der folgenden Symptome:

- a) Klinische Ischämiezeichen (u.a. lang anhaltende instabile pektanginöse Beschwerden, die durch Ruhe oder Nitroglycerin kaum beeinflussbar sind, Schwächegefühl, Angst und vegetative Begleitsymptomatik, Herzrhythmusstörungen, Blutdruckabfall, Symptome einer akuten /dekompensierten Linksherzinsuffizienz)
- b) Elektrokardiographische Ischämiezeichen (ST-Hebungen oder Senkungen; neu pathologische Q-Zacken / R-Verlust; neu aufgetretener kompletter

Schenkelblock). Entsprechend dem Auftreten von ST-Hebungen bzw. der Entwicklung pathologischer Q- oder QS-Zacken bzw. eines R-Verlusts als Ausdruck eines abgelaufenen transmuralen Infarktes unterscheidet man Myokardinfarkte mit ST-Streckenhebung (ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt, STEMI) und ohne ST-Streckenhebung (Nicht-ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt, NSTEMI)

- c) Koronarangiographischer Nachweis eines funktionell-anatomischen Korrelats (Gefäßverschluss)

1.2 Das Endothel

1.2.1 Physiologie des Endothels

Das Endothel setzt sich aus einem einschichtigen Zellbelag, einem sogenannten Monolayer, von Endothelzellen zusammen, die die gesamte Innenfläche des Gefäßsystems auskleiden. Das Endothel als ein lebenswichtiger Bestandteil der Gefäßwand umfasst 10^{13} Endothelzellen und macht circa 7 m^2 in einem durchschnittlich großen Erwachsenen aus (Cines D.B. et al. 1998). Die Endothelzellen stellen die physikalische Grenze zwischen dem Blutstrom und den umgebenden Geweben dar und regulieren den Nährstofftransport und die Gewebspassage weiterer zirkulierender Faktoren des Blutstroms. Sie regulieren Blutgerinnung und Blutgefäßneubildung, die sogenannte Angiogenese (Cines D.B. et al. 1998; Dejana E. et al. 1995; Carmeliet P. 2000; Isner J.M. 2000) und dienen als Transduktoren hormoneller und neurohumoraler Signale. Vor allem vermittelt dabei das Endothel über die Bildung vasoaktiver Substanzen den gefäßregulierenden Einfluss pharmakologischer und physiologischer Stimuli auf den Tonus der glatten Muskulatur (Vanhoutte P.M. 1989; Moncada S. et al. 1997). Dies geschieht durch die Freisetzung vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO; Ignarro L.J. et al. 1987 und Palmer R.M. et al. 1987). NO (ursprünglich ERDF=endothelium derived relaxing factor genannt; Furchgott R.F. & Zawadzki J.V. 1980), wird dabei von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) infolge Stimulation mit verschiedenen neurohumoralen Faktoren wie Acetylcholin (Furchgott R.F. 1983) und Bradykinin (O'Kane K.P.J. et al. 1994), aber auch unter der Einwirkung der Schubspannung des laminaren Blutflusses gebildet (Joannides R. et al. 1995). Obwohl NO eine sehr kurze Halbwertszeit hat, ist es ein bedeutender Vasodilatator, der maßgeblich zur

Relaxierung glatten Muskelzellen beiträgt (Arnold W.P. et al. 1977; Loscalzo J., Welch G. 1995).

1.2.2 Pathophysiologie des Endothels

Eine pathologische Störung der Endothelfunktion wurde erstmals im Jahre 1986 beschrieben (Ludmer P.L. et al. 1986). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich atherosklerotisch veränderte Koronararterien infolge Infusion von Acetylcholin kontrahieren (sogenannte paradoxe Vasokonstriktion), während Acetylcholin normalerweise zu einer Relaxation gesunder Koronararterien führt. Bereits das Vorliegen atherosklerotischer Risikofaktoren noch vor der klinischen Manifestation der Atherosklerose führt zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion (Celermajer D.S. et al. 1992). Und das Ausmaß dieser endothelialen Dysfunktion kann bei Patienten mit ACS als ein prognostischer Marker für ein zukünftiges kardiovaskuläres Ereignis fungieren (Fichtlscherer et al. 2004). Ursächlich für die Entstehung dieser endothelialen Dysfunktion sind die durch atherosklerotische Risikofaktoren hervorgerufenen Superoxidradikale. Dieser sogenannte oxidative Stress führt zu einer Inaktivierung von NO. Langzeitstudien von Patienten mit endothelialer Dysfunktion zeigen, dass eine eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einhergeht und dass das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist (Fichtlscherer S. et al. 2004). Diese klinischen Daten zeigen die Bedeutsamkeit der Aufrechterhaltung einer regelrechten Funktion des Endothels für die Verhinderung der Atheroskleroseentstehung und -progression.

Über die Bedeutung einer chronischen Störung der Endothelfunktion hinaus hat jedoch auch der akute Verlust einer intakten Endothelzellschicht im Rahmen einer Plaqueeosion oder einer Denudation infolge Ballondilatation direkte Konsequenzen für Manifestation oder Komplikationen der Atherosklerose. Aufgrund des Wegfalls der antithrombogenen Eigenschaften der Endothelzellschicht infolge einer Abschilferung der Endothelzellschicht kommt es zur Freilegung gerinnungsaktivierender Bestandteile der Gefäßwand mit der Folge der Auslösung einer intravasalen Gerinnung und konsekutiv einem thrombotischen Gefäßverschluss. Einen weiteren Hinweis auf die essentielle Notwendigkeit einer intakten Endothelzellschicht in einem anderen pathophysiologischen Zusammenhang, nämlich der Restenose nach Gefäßintervention, liefert die Beobachtung, dass eine gestörte Reendothelialisierung

nach Thombendarteriektomie der A. carotis mit einer erhöhten Neigung zur Restenosierung des Gefäßabschnitts verbunden ist. (Schwarcz T.H. et al. 1987) Zusammenfassend ist also die Aufrechterhaltung einer intakten Endothelzellschicht für die Verhinderung von Entstehung, Progression, Manifestation und Komplikationen der Atherosklerose von größter Wichtigkeit.

Die Integrität der Endothelzellschicht ist grundsätzlich von zwei Faktoren abhängig: vom Verlust vorhandener Endothelzellen und von deren Ersatz durch nachrückende, den Verlust der alten ausgleichende neue Endothelzellen. Im Folgenden werden die Faktoren, die diese Balance regulieren, vorgestellt. Es handelt sich dabei um die Apoptose, den programmierten Zelltod von Endothelzellen unter der Einwirkung atherosklerotischer Risikofaktoren und um die Regeneration der Endothelschicht durch sogenannte endotheliale Progenitorzellen.

1.3 Apoptose von Endothelzellen

1.3.1 Definition der Apoptose

Die Apoptose, der sogenannte programmierte Zelltod, ist ein energieabhängiger, enzymatisch gesteuerter Mechanismus des Zelltods (Kerr J.F.R. et al. 1972). Im Gegensatz hierzu stellt die Nekrose eine durch äußere Einflüsse hervorgerufene ungerichtete und unkontrollierte enzymatische Zersetzung der Zelle dar. Während des apoptotischen Zelltods werden typische morphologische Veränderungen der „aktiv“ sterbenden Zellen beobachtet: Zellschrumpfung, Zellmembranabschnürungen, eine Kondensation des Chromatins, die Spaltung der DNA in Fragmente von spezifischer Länge sowie die Externalisation des Membranphospholipids Phosphatidylserin.

Die Apoptose ist am Pathomechanismus neurodegenerativer Syndrome (Fiskum G. et al. 2003) oder der Atherosklerose beteiligt (Dimmeler S. et al. 2002). Andererseits steuert der kontrollierte apoptotische Zelltod den Untergang von überzähligen oder hochgeschädigten Zellen, reguliert die physiologische Größe zirkulierender Blutzellpopulationen und übt bedeutende Funktionen für die Organentwicklung während der Embryonalzeit aus (Glücksmann A. 1951).

1.3.2 Bedeutung der Endothelzellapoptose

Der Endothelzellapoptose kommt eine entscheidende pathophysiologische Rolle bei der Atheroskleroseentstehung zu. Endothelzellen zeichnen sich durch eine hohe Resistenz gegen die zytotoxischen, nutritiv oder immunologisch bedingten Faktoren, die über das vorbeiströmende Blut in ihre Nähe gebracht werden, aus. Diese Eigenschaft trägt zu der hohen Lebenserwartung einer Endothelzelle bei, die zwischen 47 und 23 000 Tagen beträgt. Im Gegensatz zu vielen anderen Zelltypen wie beispielsweise neutrophilen Leukozyten, die bereits etwa 24 Stunden nach Freisetzung aus dem Knochenmark apoptotisch werden und absterben, handelt es sich also beim Endothel um ein Gewebe mit einer sehr niedrigen Apoptoserate und einem dementsprechend niedrigen Bedarf an nachwachsenden Zellen, oder, zusammengefasst, einer niedrigen sogenannten Turnover-Rate. Die Bedeutsamkeit dieses Schutzmechanismus wird veranschaulicht durch die Beobachtung, dass die endotheliale Turnover-Rate an Prädilektionsstellen für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen in Regionen des Gefäßbaums, in denen dieser laminare Strom fehlt, deutlich erhöht ist (Davies P.F. et al. 1986), während die experimentelle Exposition gegenüber laminarer Schubspannung die Apoptose von Endothelzellen hemmt (Dimmeler S. et al. 1996). Aber nicht nur diese prä-atherosklerotischen Gefäßregionen, sondern auch die stromabwärts gelegenen Schulterregionen manifester atherosklerotischer Plaques sind einem turbulenten, nicht-laminaren Fluss ausgesetzt. Die für diese Bereiche besonders typische Prädisposition für das Auftreten von Plaqueerosionen ist wiederum mit einer auffällig erhöhten Apoptoserate der Endothelzellen verbunden (Tricot O. et al. 2000). Eine große Anzahl weiterer Studien erhärtet die Beteiligung einer gesteigerten endothelialen Apoptoserate an der Entwicklung und Destabilisierung atherosklerotischer Läsionen (Rössig L. et al. 2001). Auf eine mögliche kausale Rolle der Endothelzellapoptose für die Entstehung und das Fortschreiten der Atherosklerose weist außerdem die proapoptotische Aktivität verschiedener Risikofaktoren in Endothelzellen *in vitro* hin, die im folgenden erläutert werden.

1.3.2.1 Diabetes mellitus

Über lange Zeit unzureichend eingestellte, erhöhte Blutzuckerwerte beim Diabetes mellitus verursachen Gefäßwandschäden auf makro- und mikrovaskulärer Ebene. Die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion und eine Schädigung der

Endothelzellen sind dabei erste klinische Anzeichen pathologischer Gefäßveränderungen bei Patienten mit Diabetes mellitus (Lorenzi M., Cagliero E. 1991). Im Zellkulturmodell verändert die Inkubation von Endothelzellen mit hohen Glukosekonzentrationen *in vitro* die Proliferation und adhäsiven Eigenschaften (Lorenzi M. et al. 1985) der Endothelzellen und induziert deren Apoptose (Baumgartner-Parzer S.M. et al. 1995 ; Du Xi. et al. 1998).

1.3.2.2 Oxidativer Stress und Ang II

Die arterielle Hypertonie ist ebenfalls ein Risikofaktor für die Entstehung von atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen sowohl in Leitungsgefäßen als auch in Arteriolen und im Kapillargebiet. Auch hierbei stellt die Apoptose einen möglichen Mechanismus für die pro-atherogene Wirkung des arteriellen Hypertonus dar (Hamet R. 1995). Der Apoptoseinduktion im Rahmen des arteriellen Hypertonus liegt unter anderem erhöhter oxidativer Stress in der Mikrozirkulation zugrunde (Griendling K.K. et al. 2000; Auch- Schwelk W. et al. 1992). Diese pro-apoptotische Wirkung beruht auf der Aufhebung der protektiven, antithrombotischen und vasodilatierenden Wirkungen von NO durch Sauerstoffradikale, indem diese mit NO reagieren und hierbei inaktive und sogar toxische Reaktionsprodukte bilden. Darüber hinaus stellen Sauerstoffradikale einen Mechanismus der intrazellulären molekularen Apoptose-Signaltransduktion dar.

Bei Patienten mit arterieller Hypertonie ist die Serum-Konzentration von Angiotensin II, einem Produkt des Renin-Angiotensin-Systems (RAAS), erhöht. Neben der vasokonstringierenden und damit blutdrucksteigernden Wirkung wirkt Angiotensin als pro-apoptotischer Stimulus in Endothelzellen via Inaktivierung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 (Rössig L. et al. 2002; Li D. et al. 1999). Darüber hinaus erhöht Angiotensin II die Lipxygenaseaktivität der glatten Muskelzellen. Das damit verbundene Endzündungsgeschehen führt zur gesteigerten Bildung von Hydrogenperoxid und freien Radikalen wie Superoxidanionen und Hydroxylradikalen im Plasma (Lacy F. et al. 1998; Swei A. et al. 1997). Diese Sauerstoffradikalbildner bewirken oxidativen Stress und induzieren auf diese Weise Apoptose in Endothelzellen. Die Bedeutung der Radikalbildung für die Ang II-induzierte Apoptose zeigt sich darin, dass Antioxidantien die Apoptoseinduktion durch Ang II verhindern (Dimmeler S., Zeiher A.M. 2000).

1.3.2.3 Hypercholesterinämie

oxLDL ist ein proatherogener Faktor (Steinberg D. et al. 1989) und entsteht durch Autoxidation unter Anwesenheit von Übergangsmetallen (Morel D. et al. 1983; Lamb D. J. et al. 1995). Die pro-atherogenen Wirkungen von oxLDL sind ebenfalls mit den proapoptotischen Eigenschaften dieses Moleküls in Endothelzellen assoziiert (Dimmeler S. et al. 1997; Escargueil-Blanc I. et al. 1997), die von der neutralen Lipidfraktion des oxLDL ausgehen (Harada-Shiba M. et al. 1998). OxLDL induziert Apoptose auch in der glatten Muskulatur (Bjorkerud B. et al. 1996) und in Lymphozyten (Escargueil-Blanc I. et al. 1994). Wie bei der Ang II-induzierten Apoptose wird die oxLDL-induzierte Apoptose ebenfalls durch Antioxidantien gehemmt (Dimmeler S. et al. 1997).

1.3.2.4 CRP

C-reaktives Protein (CRP) ist ein Akutes-Phase-Protein, das als Antwort auf Infektionen, Ischämien, Traumen, Verbrennungen und Entzündungen auf den 1000-fachen Wert ansteigen kann (Westhuyzen J., Healy H. 2000). Neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren (arterieller Hypertonus, Hypercholesterinämie, Diabete mellitus, positive Familienanamnese und Nikotinabusus) wurde CRP kürzlich als inflammatorischer Surrogatmarker einer progredienten Atherosklerose identifiziert. Der mittels hochsensitivem Test gemessene CRP-Spiegel ist ein aussagekräftiger unabhängiger Parameter, um künftige kardiovaskuläre Ereignisse bei gesund erscheinenden Männern und Frauen vorauszusagen (Ridker P.M. et al. 2002; Blake G.J., Ridker P.M. 2001). Interessanterweise führt CRP *in vitro* in Konzentrationen, die ein Risiko für vaskuläre Ereignisse voraussagen, zu einer Herunterregulation der endothelialen NO-Synthase (eNOS), hemmt auf diese Weise die Bildung von NO und induziert ebenfalls Apoptose in Endothelzellen (Verma S. et al. 2002).

1.3.3 Inhibitoren der Apoptose

Während die oben genannten atherogenen Faktoren pro-apoptotisch wirken, weisen verschiedene anti-atherogene, d.h. gefäßprotektive Faktoren *in vitro* apoptosehemmende Eigenschaften auf. Neben Hormonen wie Östrogene (Vegeto E. et al. 1999) oder Wachstumsfaktoren (Gerber H.P. et al. 1998) gilt dies insbesondere auch für die physiologische Schubspannung des laminaren Blutflusses. Gezeigt wurde dies anhand von Carotisplaques, bei denen die endotheliale Apoptoserate in den

distalen Anteilen, wo aufgrund des turbulenten Flusses weniger laminare Schubspannung anliegt, höher als in den proximalen Bereichen ist. (Tricot O. et al. 2000). Interessanterweise ist dieser anti-apoptotische Effekt des laminaren Blutflusses mit einer seit vielen Jahren bekannten anti-atherosklerotischen Wirksamkeit verbunden, da sich atherosklerotische Plaques bevorzugt in Gefäßregionen mit turbulentem Fluss (Bifurkationen, Gefäßbiegungen), weniger aber an solchen entwickeln, die laminarem Fluss ausgesetzt sind (Davis et al. ca. 1986). Außerdem senken atheroprotektive HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren (Statine), die über eine Stabilisierung der eNOS mRNA (Laufs U., Liao J.K. 1998) und über die posttranslationale eNOS Aktivierung (Kureishi Y. et al. 2000) die endotheliale Bildung von NO fördern, die endotheliale Apoptoserate (Kureishi Y. et al. 2000).

1.4 Gleichgewicht von Endothelzelluntergang und -ersatz

Der Verlust von Endothelzellen durch Apoptose führt nur dann zu einem funktionellen Defizit, wenn der entstandene Defekt in der Endothelzellschicht nicht durch adäquaten Zellersatz gedeckt werden kann. Im gesunden, jugendlichen Organismus stehen offenbar Mechanismen zur Verfügung, die die Aufrechterhaltung eines funktionstüchtigen, integren endothelialen Monolayers gewährleisten. Unter homöostatischen Bedingungen ist diese regenerative Kapazität ausreichend, um den niedrigen Umsatz an absterbenden Endothelzellen auszugleichen, wohingegen unter dem Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren Defizite im Ausgleich der entstehenden Lücken in der Endothelzellschicht bestehen. Diese können sowohl auf einem gesteigerten Verbrauch aufgrund erhöhten Endothelzelluntergangs als auch auf einer Störung der regenerativen Mechanismen beruhen. Folge eines relativen Mangels an endothelialer Regeneration könnte eine negative Netto-Bilanz des Endothelzell-Turnovers und damit die Dekompensation des Gleichgewichts zwischen Endothelzell-Absterben und Endothelzell-Ersatz sein.

1.4.1 Endotheliale Progenitorzellen

Zwei verschiedene Mechanismen tragen zur Regeneration des Endothels nach denudierender Verletzung der Endothelzellschicht bei. Normalerweise verhindern interzelluläre Kontakte in einem intakten Endothelzellverband mittels Kontaktinhibition eine Proliferation der Endothelzellen. Nach denudierender

Endothelverletzung proliferieren und migrieren jedoch benachbarte mature Endothelzellen in unmittelbarer Nähe des Endotheldefekts in den Bereich der abgeschilferten, nunmehr fehlenden Endothelzellen, um diese zu ersetzen. Lange Zeit war man der Auffassung, dass die postnatale Neovaskularisation ausschließlich auf einer solchen Proliferation und Migration schon vorhandener Endothelzellen beruht, was auch als Angiogenese bezeichnet wurde (Risau W. 1995). Dieser ursprünglich für maßgeblich gehaltene Vorgang ist jedoch nur zum Teil für die Defektdeckung verantwortlich.

Aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation freigesetzte Stamm- und Progenitorzellen, sogenannte endotheliale Progenitorzellen (EPCs) sind nämlich in der Lage, einen endothelialen Phänotyp anzunehmen, sich in der geschädigten Endothelschicht zu inkorporieren oder in flächenhaft denudierten Arealen anzusiedeln und schließlich die Rolle von Endothelzellen einzunehmen (Asahara T. et al. 1999a, Walter D.H. et al. 2002). Diese Reparaturmechanismen tragen zur Suffizienz des geschädigten Endothels bei (Abb. 1.4.1)

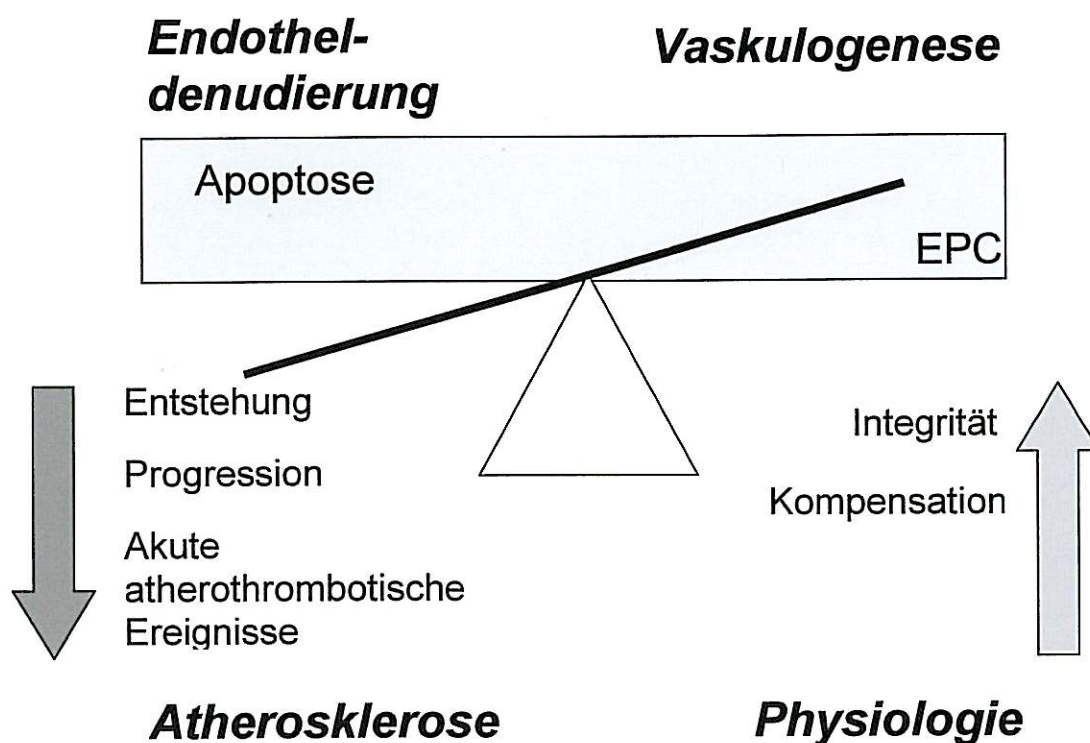


Abb. 1.4.1 Darstellung des homöostatischen Gleichgewichtes zwischen Endothelzelldenudierung und Vaskulogenese

1.4.2 Herkunft und Funktion endothelialer Progenitorzellen

Die aus dem Knochenmark freigesetzten EPCs stammen vermutlich von hämatopoetischen Stammzellen ab, die für CD34 und das unreifere Zellen markierende Protein CD133 positiv sind (Gehling U.M. et al. 2000).

Die Injektion isolierter CD34-positiver Zellen oder kultivierter EPCs, die aus dem Knochenmark, dem Nabelschnurblut oder dem peripheren Blut isoliert wurden, fördert die Gefäßneubildung (Murohara T. et al. 2000; Reyes M. et al. 2002; Lin Y. et al. 2000), trägt zur Reendothelialisierung geschädigter Arterien nach Ballonverletzung bei (Walter D.H. et al. 2002) und beschleunigt im Tiermodell und beim Menschen die Vaskularisierung ischämischer Bereiche (Schatteman G.C. et al. 2000; Asahara T. et al. 1999a; Asahara T. et al. 1999b; Tateishi-Yuyama E. et al. 2002). Klinische Pilotstudien weisen zudem darauf hin, dass die intrakoronare Infusion von autologen Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt möglicherweise Regenerationsprozesse begünstigt (Assmus B. et al. 2002; Wollert et al. 2004).

Für den natürlichen Verlauf nach akutem MI wurde beobachtet, dass zirkulierende CD34-positive Zellen im peripheren Blut von Patienten mit akutem MI mit einem Maximum am 7.Tag erhöht sind (Shintani S. et al. 2001). Hämatopoetische und angiogenetische Zytokine wie VEGF können EPCs mobilisieren. (Asahara T. et al. 1997; Asahara T. et al. 1999a). Bei Patienten mit AMI ist die myokardiale VEGF-Expression erhöht (Lee S.H. et al. 2000), und die Plasma-VEGF-Level korrelieren positiv mit der Anzahl CD34-positiver Zellen. (Shintani S. et al. 2001).

1.4.3 EPC und Risikofaktoren für die KHK

Die Angiogenese ist im hohen Lebensalter beeinträchtigt (Rivard A. et al. 1999). Parallel dazu korreliert das Lebensalter invers mit der Anzahl von EPCs und CD34/KDR-positiver zirkulierender Progenitorzellen (Vasa M. et al. 2001b). Zudem ist die funktionelle Aktivität isolierter Progenitorzellen entsprechend der Anzahl an vorliegenden kardiovaskulären Risikofaktoren eingeschränkt (Vasa M. et al. 2001b). Multivariate Analysen der einzelnen Risikofaktoren zeigen, dass das Rauchen als unabhängiger Risikofaktor der stärkste Prädiktor für eine Abnahme der EPC-Level ist. Die Migrationsfähigkeit der EPCs als bedeutendster Parameter der EPC-Funktion hingegen wird hauptsächlich durch die arterielle Hypertonie beeinträchtigt (Vasa M. et al. 2001b). Aber auch erhöhte Serum LDL-Cholesterinspiegel, hohes Lebensalter

und eine positive Familienanamnese haben *in vivo* Auswirkungen auf die Anzahl zirkulierender CD34/KDR-positiver Zellen und *in vitro* auf die EPC-Migrationsfähigkeit. Es lässt sich also vermuten, dass bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit aufgrund einer reduzierten Anzahl endothelialer Progenitorzellen mit verminderter Funktionsfähigkeit Neovaskularisations- und Regenerationsprozesse nur eingeschränkt stattfinden (Vasa M. et al. 2001b).

1.4.4 EPC und Statine

Erhöhte Serumcholesterinspiegel sind ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktaseinhibitoren, die sogenannten Statine, sind eine Klasse von Medikamenten, die besonders wirksam die Progression der Atherosklerose und ihre Manifestationen verhindern. In therapeutischen Dosen senken Statine beim Menschen das Serumcholesterin (Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) Group. 1994) und verbessern die Endothelfunktion (O'Driscoll G. et al. 1997).

Klinische und experimentelle Daten belegen, dass Statine neben ihrer Funktion als Cholesterinsenker noch über weitere, davon unabhängige sogenannte pleiotrophe Mechanismen protektiv wirken (Lefer A.M. et al. 2001). So können Statine vaskuläre Entzündungsreaktionen abschwächen (Bustos C. et al. 1998) und durch diese immunmodulatorischen Effekte sowohl eine Verhinderung der Plaquentstehung als auch die Stabilisierung bereits bestehender atherosklerotischer Plaques bewirken (Maron D.J. et al. 2000). Statine führen bei Patienten mit stabiler Angina zu einer Zunahme zirkulierender EPCs. (Vasa M. et al. 2001a; Dimmeler S. et al. 2001). Dies weist darauf hin, dass die Verbesserung der Endothelfunktion unter Statineinnahme möglicherweise auf einer verbesserten Endothelregeneration als ein zugrunde liegender Mechanismus beruht.

1.5 Messung der Endothelzellapoptose

Um ein indirektes Maß der Endothelverletzung zu erhalten, wurden in der Vergangenheit neben histopathologischen Untersuchungen auch immunologische Verfahren eingesetzt, um die abgeschilferten und in die periphere Blutzirkulation eintretenden Endothelzellen nachzuweisen. Bereits 1978 wurde eine vermehrte Endothelzellablösung bei Patienten mit Myokardinfarkt und instabiler Angina, nicht aber bei Patienten mit stabiler Angina festgestellt (Hladovec J. et al. 1978). Durch die

Entwicklung eines neuen zytofluorometrischen Assays, der einen an immunomagnetische Perlen gekoppelten Antikörper, den gegen HUVEC gerichteten S-Endo 1 Antikörper (George F. et al. 1991), verwendet, wurden zirkulierende Endothelzellen bei Patienten mit Mittelmeerfieber (Drancourt M. et al. 1992) und mit CMV-Infektion (Grefte A. et al. 1993) nachgewiesen. Mit Hilfe einer immunzytologischen Methode wurde in gesunden erwachsenen Probanden mittels S-Endo 1 eine Anzahl von $2,6 \pm 1,6$ zirkulierenden Endothelzellen pro ml peripheres Blut bestimmt (Solovey A. et al. 1997).

Als indirekte Apoptosemarker lassen sich durchflusszytometrisch sogenannte apoptotische Mikropartikel bestimmen, die zusätzlich anhand ihrer Affinität für Endothelzellmarker in solche endothelialen Ursprungs und solche nicht-endothelialen Ursprungs unterteilt werden können. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom sind erhöhte Spiegel apoptotischer Mikropartikel endothelialen Ursprungs im peripheren Blut nachweisbar (Mallat Z. et al. 1999). Diese Mikropartikel werden aus atherosklerotischen Läsionen freigesetzt und könnten aufgrund ihrer prokoagulatorischen Eigenschaften zur Bildung und Aufrechterhaltung intrakoronarer Thromben beitragen.

Eine erhöhte Anzahl apoptotischer Endothelzellen wurde in Gewebsschnitten von Aorta und Femoralarterien alter Affen detektiert (Asai K. et al 2000). Mittels TUNEL-gefärbter Zellkerne im Endothel der Aorta wurde auf dabei histopathologisch die Apoptose der Endothelzellen nachgewiesen (Asai K. et al 2000). Parallel dazu wurde als Indikator der Endothelfunktion der totale periphere Widerstand nach Applikation von Acetylcholin gemessen, der bei alten Affen weniger stark abnahm als bei jungen Affen. Diese Daten legen einen Zusammenhang zwischen der Endothelzellapoptose und einer endothelialen Dysfunktion noch vor der Manifestation atherosklerotischer Plaques und damit eine maßgebliche Rolle für die Pathogenese der Atherosklerose nahe (Asai K. et al. 2000).

In einem klinischen Kollektiv von Patienten mit koronarer Herzkrankheit ist jedoch bislang keine Bestimmung zirkulierender Endothelzellen als Folge einer apoptotischen Abschilferung dieser Zellen im Rahmen der Entstehung oder Manifestation vaskulärer Läsionen gelungen. Erst die neue Entwicklung eines mehrfarbigen Durchflusszytometers bietet die nötige Ausstattung einer differenzierenden Analyse zirkulierender Zellen im peripheren Blut. Mit Hilfe dieser Detektionsmethode wurde die Anzahl der gemessenen zirkulierender Endothelzellen

im gesunden Probandenkollektiv mit $9,1/\mu\text{l}$ bestimmt, wobei ca. 15% der gemessenen Zellen als Zeichen einer Endothelzellaktivierung die Marker CD105 bzw. CD106 trugen (Mancuso P. et al. 2001).

1.6 Ziel der Dissertation

Ziel der Dissertationsarbeit war es, eine Methode zu etablieren, mittels der apoptotische Endothelzellen mit Hilfe einer 4-Kanal-FACS-Messung *in vivo* zu detektieren sind. Mit diesem Ansatz soll untersucht werden, ob

1. die Endothelzellapoptose bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit erhöht ist.
2. die Endothelzellapoptose in Zusammenhang mit dem akuten Krankheitsverlauf der KHK steht.
3. die Endothelzellapoptose als Marker klinischer Ereignisse, die in Zusammenhang mit der Plaqueinstabilität stehen, herangezogen werden kann.
4. die Endothelzellapoptose durch eine die Plaques stabilisierende Therapie reduziert werden kann.
5. die Balance zwischen der Anzahl zirkulierender apoptotischer Endothelzellen (Schädigung) und endothelialer Progenitorzellen (Regeneration) bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit beeinträchtigt ist.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten- und Probandenrekrutierung

Es wurden 67 Patienten und Probanden in die Studie aufgenommen. 24 Patienten hatten eine angiographisch dokumentierte koronare Herzkrankheit mit stabiler Angina pectoris, der mindestens 3 Monate vor der Blutentnahme kein akutes Koronarsyndrom vorausgegangen war. Ferner wurden 14 Patienten mit instabiler Angina pectoris aufgenommen, darunter 8 Patienten mit negativem Troponin-T-Test, sowie 6 Patienten innerhalb einer Woche nach einem akuten Myokardinfarkt (Troponin-T-Test positiv). Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom wurden vor der Blutentnahme mittels PTCA revaskularisiert. Die Schwere der Erkrankung wurde bei allen Patienten durch die Anzahl der betroffenen Gefäße beurteilt.

Als Ausschlusskriterien galten klinische bzw. biochemische Hinweise auf das Vorhandensein einer zusätzlichen Entzündungsreaktion, einer chronischen Niereninsuffizienz, einer Herzinsuffizienz, einer Autoimmunkrankheit und eines Tumorgeschehens.

29 altersentsprechende gesunde Probanden ohne anamnestischen Hinweis auf das Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit und mit einem unauffälligen Untersuchungsbefund dienten als Kontrollgruppe.

Zusätzlich wurden 9 Patienten mit stabiler Angina pectoris prospektiv mit Atorvastatin (40 mg/Tag) für 4 Wochen behandelt.

Alle Patienten und Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde vom Ethik-Komitee der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt/Main genehmigt.

2.2 Definition der Risikofaktoren

Zur Einschätzung des kumulativen kardiovaskulären Risikos wurde ein Risikofaktorscore ermittelt. Dieser Summenwert setzte sich aus folgenden Risikofaktoren zusammen: Alter > 65 Jahre, männliches Geschlecht, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, positive Familienanamnese für eine koronare Herzkrankheit und Hypercholesterinämie.

Der Risikofaktor „arterielle Hypertonie“ wurde als vorliegend gewertet, wenn seit mindestens einem Jahr eine dokumentierte Hypertonie vorlag, d.h. wenn vom ersten

konsultierten Arzt vor mindestens einem Jahr eine antihypertensive Therapie begonnen wurde. Der Risikofaktor „Nikotinabusus“ wurde berücksichtigt, wenn der Patient zum Zeitpunkt der Anamneseerhebung weiterhin geraucht hat und / oder wenn er zu einem angegebenen Zeitpunkt in seiner Vorgeschichte mehr als 2 pack-years geraucht hatte. Eine positive Familienanamnese lag vor, wenn bei mindestens einem Verwandten 1.Grades nachweislich eine koronare Herzkrankheit vor dem 60.Lebensjahr dokumentiert wurde. Der Risikofaktor „Hypercholesterinämie“ wurde als positiv gewertet, wenn das Nüchternblut LDL-Cholesterinwerte von mindestens 120mg/dL aufwies bzw. wenn der Patient mit Statinen behandelt wurde. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus wurde definiert als die Notwendigkeit, orale antidiabetische Pharmaka einnehmen zu müssen bzw. Insulin zu injizieren.

2.3 Methoden

2.3.1 Bestimmung der Anzahl apoptotischer Endothelzellen

Peripheres Blut wurde den in die Studie aufgenommenen Patienten und Probanden abgenommen, wobei Blutproben neben der FACS-Analyse auch an das Zentrallabor und Molekularlabor weitergeleitet wurden. Das für die FACS-Messung bestimmte Heparinblut (10ml) wurde gepoolt, zentrifugiert und das Serum verworfen. Daraufhin wurden die Erythrozyten lysiert und das verbleibende Pellet wiederholt gewaschen. Für die durchflusszytometrische Bestimmung apoptotischer Endothelzellen wurde eine neue Methode etabliert, die im ersten Abschnitt der Ergebnisse ausführlich erläutert wird. Nach jeder Antikörperinkubation wurde die Zellsuspension mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Pellet mit Binding Puffer suspendiert und anschließend die FACS-Messung durchgeführt.

2.3.2 FACS-Analyse

2.3.2.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Abkürzung FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting (deutsch Durchflusszytometrie). Die Durchflusszytometrie ist für das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom geeignet. Am häufigsten wird diese Methode eingesetzt, um mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen, wie z.B. die Expression von Oberflächen- bzw. intrazellulären

Molekülen, auf Einzelzellebene zu analysieren. Zudem lassen sich mit Hilfe von RNA/DNA-Farbstoffen Zellzyklus-Analysen und Apoptoseassays durchführen.

2.3.2.2 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse dient der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Dem zugrunde liegt die Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen monochromatischen Laserstrahl wird dieser auf ein höheres Energieniveau gehoben und fällt unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf sein Ursprungsniveau zurück. Die ermittelte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle und erlaubt somit eine Aussage über die Expression von Oberflächenmolekülen. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zelle (Kerngröße, Granularität) gewonnen. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, wenn sich die eingesetzten Farbstoffe in den Emissionsspektren unterscheiden.

2.3.3 Antikörper zur Endothelzelldetektion

Um durchflusszytometrisch eine neue Methode zu entwickeln, mit der man apoptotische Endothelzellen im peripheren Blut detektieren kann, bedienen wir uns etablierter Antikörper, die im Folgenden näher beschrieben sind.

2.3.3.1 CD45

Das CD45-Antigen ist auf allen humanen Leukozyten im peripheren Blut einschließlich Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Eosinophile und Basophile vorhanden und spielt eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung, indem es Signale von anderen Oberflächenmolekülen modifiziert (Schwinzer R. 1989). Für den CD45-Antikörper wurde zudem eine schwache Reaktion mit reifen zirkulierenden Erythrozyten und Thrombozyten beschrieben (Schwinzer R. 1989). Der Antikörper gegen CD45 wird als Diagnostikum im FACS-Durchflusszytometer verwendet. Es identifiziert Zellen, die das CD45-Antigen exprimieren.

Der von uns verwendete 30-F11-Antikörper (PharMingen, PerCP-conjugated Anti-mouse CD45 monoclonal Antibody BD) reagiert dabei sowohl mit Alloantigenen als auch mit Isoformen des „CD45- Leukozyten-gemeinsamen Antigens (180-220kDa)“, auch bekannt als Ly-5 oder T200. In unserer Studie diente CD45-PerCP zum einen dazu, mittels der dadurch detektierten leukozytären (CD45-positiven) Zellen und dem Leukozytenwert/ml vom Zentrallabor die Endothelzellzahl/ μ l ausrechnen zu können. Zum anderen wurde mit Hilfe des Antikörpers eine Selektion nicht-leukozytärer mononukleärer Zellen (CD45-negativ) und somit eine weitere Testung auf Endothelzellmarker durchgeführt.

2.3.3.2 CD 146

CD146, auch bekannt als Mel-CAM, MUC 18, A32-Antigen bzw. S-Endo-1 ist ein Membranglykoprotein, das als ein Ca^{2+} -unabhängiges Zelladhäsionsmolekül fungiert und bei verschiedenen Zell-Zellinteraktionen beteiligt ist. Aufgrund der Homologie der Nukleotidsequenz wird CD 146 als ein Mitglied der „Immunglobulin Gene Superfamily“ betrachtet, da es die charakteristische V-V-C2-C2-C2 Immunglobulin-typische Domänenstruktur besitzt (Shih I.M. 1999).

Der hier verwendete FITC- konjugierte monoklonale Antikörper P1H12 (Chemicon International Inc.) reagiert spezifisch mit CD146. Da er im Blut und Knochenmark mit Endothelzellen und nicht mit hämatopoetischen oder epithelialen Zellen (St Croix B. et al. 2000) reagiert, wird er in humanen und in Säugetierproben zur Detektierung von zirkulierenden Endothelzellen verwendet. Obwohl der Antikörperklon P1H12 weder die Tumorzelllinie HT-29, COLO 205 und m21, noch die T-Zelllinien Jurkat und HUT78, Fibroblasten, HC 60-, CHO-Zellen oder EBV-transformierte B-Zelllinien markiert, ist die Expression von CD 146 nicht auf das Endothel begrenzt, sondern wird auch auf anderen nicht-malignen und malignen Zelltypen wie Melanomzellen und Trophoblastzellen gefunden (Shih I.M. et al. 1999).

2.3.3.3 Faktor VIII verwandtes Antigen / vWF (Ab-1)

Von Willebrand Faktor (vWF) ist ein großes Glykoprotein, das in Thrombozyten, Endothelzellen und im Plasma gefunden wird. vWF wird von Endothelzellen gebildet und in Weibel Palade-Körperchen aufbewahrt, von denen aus dieser Faktor entweder kontinuierlich bzw. über einen regulierten Mechanismus freigesetzt wird. vWF spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Thrombozytenadhäsion in verletzten Blutgefäßen (Mazurier C. et al. 1998; Fischer B.E. et al. 1996) und wird

traditionell als Zellmarker zur Identifizierung von Endothelzellen und Megakaryozyten sowie als Angiogenesemarker bei Tumoren (Ward C.M. et al. 1997; Jenkins P.V. et al. 1998) verwendet.

Der von uns eingesetzte Antikörper erkennt ein Glykoprotein mit einer Größe von 270 kDa, das als Faktor VIII-verwandtes Antigen oder als vWF identifiziert wurde. Er reagiert spezifisch mit Endothelzellen aus normalen, reaktiven und neoplastischen Blut- und Lymphgefäßen und zeigt eine granulöse, zytoplasmatische Färbung. Außerdem reagiert er mit dem Endokard, mit Thrombozyten und Megakaryozyten. Um daher die Möglichkeit einer Kreuzreaktion mit Blutplättchen auszuschließen, haben wir initial Thrombozyten anhand eines Größen- (FSC) und Kompartimentalisierungs (SSC)-Filters aus unserer Messung ausgeschlossen (Oncogene Research Products; Polyclonal Antibodies).

2.3.3.4 KDR

VEGF (vascular endothelial growth factor), auch VAS (vasculotropin) bzw. VPF (vascular permeability factor) genannt, gehört zur Familie der endothelialen, mitogenen und angiogenen Faktoren. VEGF ist ein homodimeres, Heparin-bindendes Glykoprotein, das spezifisch die Proliferation endothelialer Zellen stimuliert, die sowohl von kleinen als auch von großen Gefäßen isoliert wurden. Die mitogene Aktivität von VEGF scheint durch spezifische VEGF-Rezeptoren stimuliert zu werden (110 kDa), die auf der Oberfläche von zahlreichen Endothelzellen gefunden wurden. VEGF bindet an zwei strukturell ähnliche Tyrosinkinaserzeptoren. Dies sind Flt 1, auch bekannt als VEGF-R₁, und KDR, bekannt als VEGF-R₂. Flt1 wird vorrangig in der humanen Plazenta und humanen Gefäßendothelzellen exprimiert, während KDR in allen Endothelzellen (Asahara T. et al. 1997), aber kaum in der humanen und Rinderplazenta exprimiert wird.

Der monoklonale Anti-VEGF Rezeptor-2 (KDR) ist eine homogene (einheitliche) Population von Antikörpermolekülen, die für die Detektion von VEGF Rezeptor-2 (KDR) benutzt werden kann. (SIGMA ProductInformation)

2.3.3.5 Annexin

Die Apoptose ist durch bestimmte morphologische Veränderungen charakterisiert. Zum einen sind dies Veränderungen in der Plasmamembran wie ein Verlust der Membransymmetrie und des Membrangefüges, zum anderen eine Kondensation des Zytoplasmas und die Zerlegung der Zelle in Vesikel. Veränderungen der

Plasmamembran sind eines der frühesten Ereignisse während des Apoptoseprozesses. In apoptotischen Zellen gelangt das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Seite des Phospholipid-Bilayers, wodurch PS an der Außenseite der Zelle exprimiert wird.

Annexin V ist ein 35-36 kDa großes, Ca^{2+} abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität für PS hat und an Zellen mit exprimiertem PS bindet. Da die Externalisation von PS in den frühen Stadien der Apoptose stattfindet, lassen sich mittels Annexin V (APC)-Färbung frühere Stadien der Apoptose nachweisen als mit Assays, die auf der Detektion von Kernveränderungen wie der DNA-Fragmentation basieren. Für die Annexin-V-Bindung werden bestimmte Ca^{2+} -Konzentrationen benötigt (bei Konzentrationen unter 3 mM verminderte Bindungsfähigkeit), die mittels angepasstem Binding Puffer hergestellt wurden.

2.3.4 Bestimmung der Herkunft zirkulierender maturer apoptotischer Endothelzellen

Um die Herkunft der maturen zirkulierenden Endothelzellen zu lokalisieren, verglichen wir die Anzahl apoptotischer Endothelzellen aus verschiedenen Gefäßabschnitten. Um eine mögliche Anreicherung dieser Zellen nach Passage der Koronarstrombahn zu bestimmen, wurden selektive Blutentnahmen aus der Aortenwurzel und der V. cordis magna durchgeführt, die eine spezifische Unterscheidung zwischen dem Stromgebiet der LCA und des restlichen Kreislaufes gestatten (Buffon A. et al. 2001).

2.3.5 Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen

Die Bestimmung endothelialer Progenitorzellen erfolgte nach einer bereits zuvor etablierten Methode (Vasa M. et al. 2001b). 100 μl peripheres Blut wurden mit FITC bzw. PerCP-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD34 (Becton Dickinson) inkubiert. Zudem wurden die selben Blutproben mit monoklonalen Antikörpern gegen humanes CD133 (Milteny, PE-konjugiert), das speziell unreife Progenitorzellen erkennt, und humanes KDR (Sigma) zusammen mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Isotyp-identische Antikörper (Becton Dickinson) dienten als Kontrolle (Tab. 2.3.5.1). Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert, mit PBS gewaschen und in 4% Paraformaldehyd fixiert.

60 000 Zellen wurden daraufhin analysiert (Abb. 2.3.5.1)

Röhrchen-#	FL1	FL2	FL3
6	KDR/ RAM-FITC	AC133-PE	CD34-PerCP
7	CD34-FITC	KDR/ DAM-PE	CD34-PerCP
8	IgG/ RAM-FITC	Iso-PE	Iso-PerCP
9	Iso-FITC	IgG/ DAM-PE	Iso-PerCP

Tab. 2.3.5.1. Inkubationsschema zur Detektierung von endothelialen Progenitorzellen

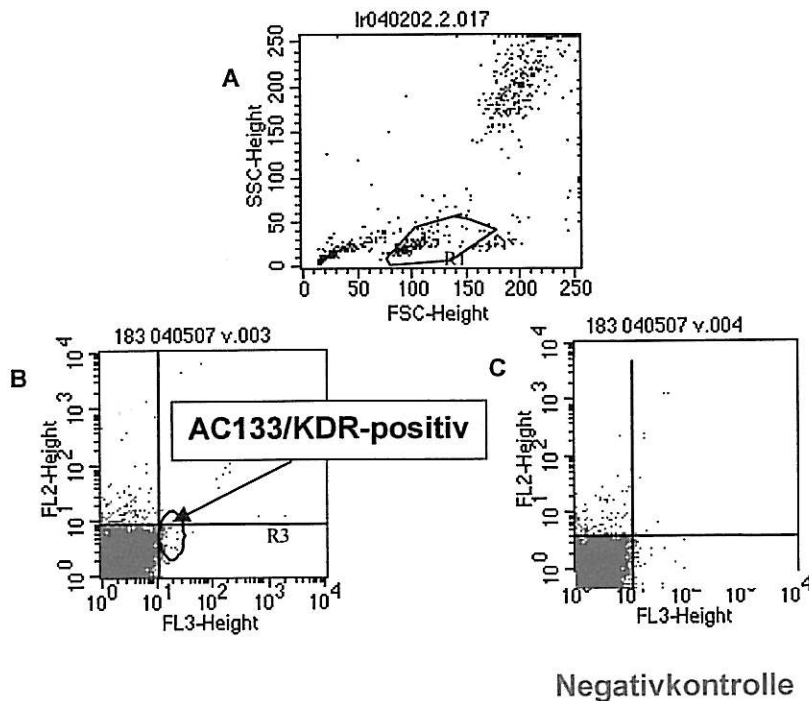


Abb. 2.3.5.1 Durchflusszytometrische Darstellung zur Detektierung von endothelialen Progenitorzellen. (A) Repräsentative Darstellung des Untersuchungsbereiches (R1), der Thrombozyten und abgestorbene Zellreste von der Messung ausschließt. (B) Messbereich, der AC133+/ KDR+- Zellen einschließt. (C) Negativkontrolle der in (B) dargestellten Messung.

2.3.5.1 Antikörper zur Detektion endothelialer Progenitorzellen

2.3.5.1.1 AC133

CD133 wird von endothelialen Vorläuferzellen (Gehling U.M. et al. 2000; Peichev M. et al. 2000) und von fetalen Stammzellen des Nervensystems (Uchida N. et al. 2000) sowie während der endothelialen Differenzierung exprimiert (Corbeil D. et al. 2000). Die Expression von CD133 wird stark herunterreguliert, wenn hämatopoetische Vorläuferzellen und Stammzellen zu reiferen, „postmitotischen“ Zellen differenzieren. Daher exprimieren alle maturen hämatopoetischen Zellen, Megakaryozyten, erythrozytäre und lymphozytäre Zellen und vollständig differenzierte hämatopoetische Zellen kein CD133 mehr (Miraglia S. et al. 1997; Yin A.H. et al. 1997).

Der CD133/1 (MACS Klon AC133 -PE)-Antikörper erkennt das „Epitop 1“ des CD133 Antigens (Yin A.H. et al. 1997), während das Epitop 2 von den AC141- und 293C3-Klonen erkannt wird. Da dieser Marker eine sehr hohe Spezifität für immature Progenitorzellen besitzt, haben wir ihn uns zu Nutze gemacht für die Abgrenzung gegenüber maturen (reifen, möglicherweise abgeschilferten) Endothelzellen.

2.3.5.1.2 CD34

Hämatopoetische Stammzellen sind in der Lage, sich entweder selbst mit pluripotentem Stammzellpotential zu reproduzieren oder in Progenitorzellen aller hämatopoetischen Zelllinien zu differenzieren (Quesenberry P., Levitt L. 1979). Ein Teil der hämatopoetischen Stammzellen exprimiert das Oberflächenantigen CD34, ein Einzelketten-Transmembran-Glykoprotein von 105 bis 120 Kilodalton (kD). Es findet sich neben unreifen hämatopoetischen Vorläuferzellen auf allen koloniebildenden hämatopoetischen Zellen im Knochenmark und Blut.

CD34 wird zudem auf dem Kapillarendothel exprimiert und fungiert in dieser Form als ein Ligand für L-Selektin. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung färbt der CD34-Antikörper (PharMingen) Endothelzellen in der Milz, im Thymus und in postkapillären HEVs in den Lymphknoten. Normale Lymphozyten im peripheren Blut, Monozyten, Granulozyten und Thrombozyten hingegen exprimieren das CD34-Antigen nicht. Es besteht der generelle Konsens, dass CD34 ein zuverlässiger Marker ist, um endotheliale Progenitorzellen zu detektieren.

2.4 Laboranalysen

Während der Blutabnahme wurde von allen Patienten Serum für die Bestimmung der CRP- bzw. hsCRP-Plasmalevels (turbidimetric test; Boehringer Mannheim and ultrasensitive N Latex CRP mono test, Behring) und der Serumlipidfraktion gesammelt (Boehringer Mannheim).

2.5 Statistik

Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler oder Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Fortlaufende Variablen werden mittels Kolmogorov-Smirnov Test auf ihre Normalverteilung geprüft. Die statistische Analyse zum Vergleich der zwei Behandlungsgruppen wurde mittels eines univariaten allgemeinen linearen Modells durchgeführt, gefolgt von einer post-hoc-Analyse mittels LSD- oder Bonferroni-Justierung. Kategorische Variablen wurden mittels des Pearson χ^2 test oder des Fisher's Exact test verglichen.

Multivariate Regressionsanalysen und nichtparametrische bivariate Korrelationen (Spearman rank correlation coefficient (rs)) wurden verwendet, um die Anzahl zirkulierender apoptotischer Endothelzellen mit verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren (CVRF) zu vergleichen. Die Ergebnisse werden als statistisch signifikant gewertet, wenn die Nullhypothese mit einem $p = 0,05$ negiert werden konnte. Die gesamte statistische Analyse wurde mittels SPSS für Windows 11.0 (SPSS Inc.) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung einer Methode zur Detektion von Endothelzellen und apoptotischen Endothelzellen

Mit dem Ziel, mit Hilfe der FACS-Analyse eine neue Methode zu etablieren, mit der sich zirkulierende apoptotische Endothelzellen aus peripheren Blutproben bestimmen lassen, wurde ein der Methode von Mancuso et al. (2001) und Monestiroli et al (2001) angelehntes Analyseverfahren entwickelt, das im Folgenden im Detail dargestellt wird. Dieses Verfahren beruht auf einer Mehrkanal-Durchflusszytometrie zirkulierender Zellen des peripheren Blutes, das mittels immunzytologischer Anfärbung anhand ihrer leukozytären und endothelialen Marker charakterisiert wurde und deren Apoptose unter Verwendung der Annexinbindungskapazität bestimmt wurde.

3.1.1 Blutabnahme und -aufbereitung

Peripheres Blut wurde den Patienten in den in Tabelle 3.1.1 gezeigten Mengen und unter Verwendung der dort angegebenen Antikoagulantien abgenommen.

	<u>Menge</u>	<u>Anti-koagulanz</u>	<u>Monovetten (ml)</u>	<u>Bestimmungen</u>
FACS	15 ml	Heparin (blau)	1x10 (oder 2x4,9)	CEC, CAEC, CEPC
			+	
Zentrallabor		Heparin (blau)	1x4,9	Klinische Chemie
	5,4 ml	EDTA (rot)	2,7	Kleines Blutbild
			+	
Molekularlabor		EDTA (rot)	2,7	Buffy coat für DNA
	10 ml	Citrat (grün)	1x10	Plättchenfreies Plasma für Mikropartikelbestimmung
	30 ml	Serum (weiß)	1x10	Serumproben für Cytokine etc.
	60 ml			

Tab. 3.1.1: Blutentnahmen für klinische Apoptoseuntersuchung

3.1.2 Zellverarbeitung und Antikörperinkubation

Die in 10ml peripherem Heparinblut vorhandenen Erythrozyten wurden mit lysing solution (*Becton Dickinson, BD*) lysiert. Daraufhin wurden die zirkulierenden apoptotischen Endothelzellen mittels folgendem Inkubationsschema analysiert:

#	FL1	FL2	FL3	FL4
1	(2) CD146- FITC	(1) vWF/DAR-PE	(2) CD45- PerCP	(3) annexin-ACP
2	(2) CD146- FITC	(1) vWF/DAR-PE	(2) CD45- PerCP	(3) Streptav.- APC
3	(2) KDR/ RAM-FITC	(1) vWF/DAR-PE	(3) CD45- PerCP	(4) annexin-ACP
4	(2) KDR/ RAM-FITC	(1) vWF/DAR-PE	(3) CD45- PerCP	(4) Streptav.- APC
5	(2) IgG/ RAM-FITC	(1) IgG/ DAR-PE	(3) Iso-PerCP	(4) annexin- APC

Messung: Rot markiert: je 1 µl
Blau markiert: je 0,5 µl

Tab. 3.1.2. Inkubationsschema zur Detektierung von apoptotischen Endothelzellen

Die Inkubation erfolgte mit den Antikörpern CD45-PerCP, CD146-FITC, vWF/DAR-PE und Annexin-APC bzw. Streptavidin-APC als Negativkontrolle. Zweck der CD45-PerCP-Inkubation war es zum einen, mittels der FACS-Analyse eine erste Selektion der Endothelzellen vorzunehmen, da diese zu den nicht leukozytären mononukleären Zellen gehören und demnach CD45-negativ sind. Zum anderen ermittelten wir mittels der gemessenen CD45-positiven Zellen die relative Anzahl der gemessenen Endothelzellen/µl, indem wir parallel zur FACS-Messung die Leukozytenzahl bestimmen ließen. Mit Hilfe der Leukozytenzahl und der Anzahl CD45-positiver Zellen der Probe ließ sich im Umkehrschluss die Endothelzellzahl bestimmen:

$$\text{Endothelzellzahl}/\mu\text{l} = \frac{\text{Leukozytenzahl}/\mu\text{l} \times \text{CD146/vWF-positive Zellen} \times 100\,000}{\text{CD45-positive Zellen} \times 100\,000}$$

Die Markierung mit CD146-FITC und vWF/DAR-PE diente der exakten Detektierung von murenen Endothelzellen, da nur die Schnittmenge aus CD146-positiven und vWF-positiven Zellen gezählt wurde. Mittels der Annexin-Inkubation erhielt man zusätzlich Informationen über den morphologischen Zustand der Zellen, also ob sie intakt oder apoptotisch sind. Des weiteren wurde das Zellsuspensat anstatt mit CD146-FITC mit KDR/RAM-FITC, einem weiteren Endothelzellmarker, inkubiert, um

zu sehen, inwieweit die Wahl des Endothelzellmarkers Auswirkung auf die Signifikanz der Ergebnisse hat.

3.1.3 Bestimmung der Endothelzellzahl mittels FACS

Zunächst wurde ein Gebiet im side/forward scatter abgegrenzt, das Plättchen und Zelltrümmer von weiteren Untersuchungen ausschließt. Von den verbleibenden Zellen wurde die Anzahl CD45-positiver Ereignisse mittels eines PerCP- konjugierten monoklonalen Antikörpers gegen CD45 (BD) ermittelt, um jede gemessene Zellpopulation bzgl. der Gesamtzellzahl dieser Population im peripheren Blut normieren zu können.

Da nur reife Endothelzellen gemessen werden sollten, wurde die Subgruppe der CD45-negativen Zellen aussortiert und mittels einer zweifachen Antikörperinkubation gegen die endothelzellspezifischen Epitope CD146 (Mel-CAM; MUC 18; S-Endo 1 monoklonaler, direkt FITC-konjugierter Mausantikörper; Chemicon; Shih I.M, et al. 1999) und von Willebrand Faktor (vWF; rabbit; Oncogene) zusammen mit einem PE-konjugierten anti-rabbit Zweitantikörper auf das Vorhandensein von endothelzell-typischen Oberflächenmarkern untersucht. Abb. 3.1.3.1 zeigt eine repräsentative FACS-Messung zur Bestimmung zirkulierender Endothelzellen.

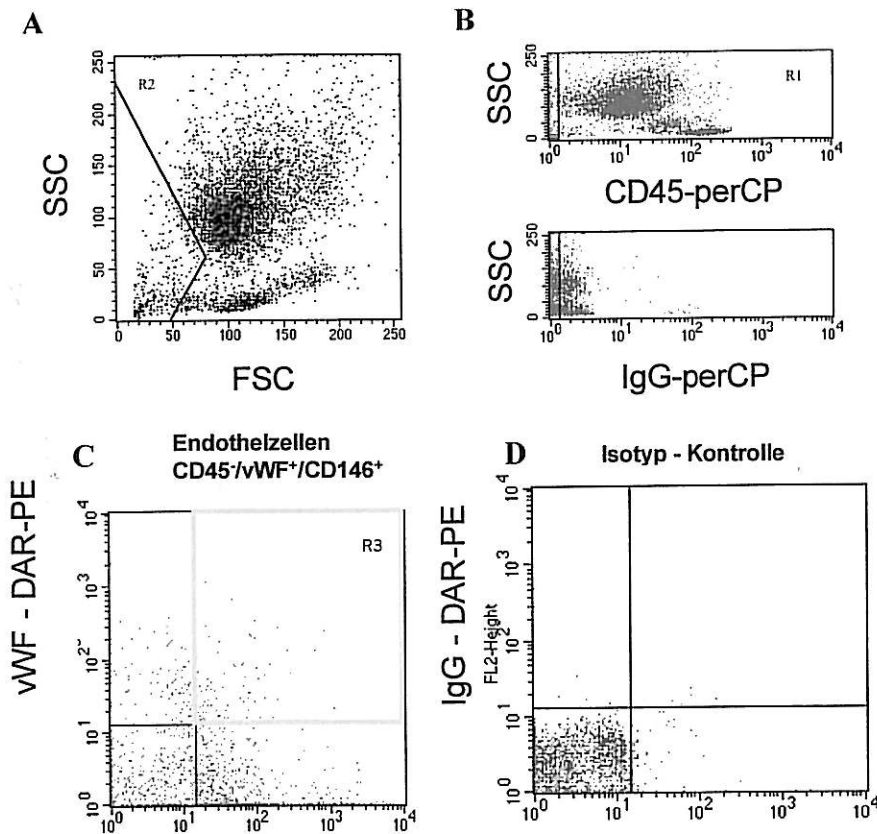


Abb. 3.1.3.1 Durchflusszytometrische Darstellung zur Detektion von apoptotischen, vWF⁺/CD146⁺- Endothelzellen. (A) Repräsentative Darstellung des Untersuchungsbereiches, der Thrombozyten und abgestorbene Zellreste von der Messung ausschließt. **(B)** Bild oben rechts: Messbereich, der zum Ausschluss hämatopoetischer Zellen, die das CD45-Antigen präsentieren, dient. Bild Mitte rechts: Negativkontrolle der oben rechts dargestellten Messung. **(C)** Anzahl vWF⁺/CD146⁺-Zellen aus dem zuvor selektierten CD45-negativen Zellpool. **(D)** Negativkontrolle der in (C) dargestellten Messung.

Um die Anzahl zirkulierender Endothelzellen auch quantitativ bestimmen zu können, wurde parallel zu jeder Messung die Leukozytenzahl/ μ l bestimmt und aufgrund des relativen Zusammenhangs zwischen Leukozytenzahl/ μ l und der Zellzahl in der von uns definierten Region 2 (CD45-positive Ereignisse) / 100 000 Zellen die Endothelzellzahl/ μ l berechnet.

Parallel dazu wurden bei den Patienten Zellen, die neben vWF auch KDR exprimieren, mittels eines anti-KDR-Antikörpers (Sigma) zusammen mit einem PE-konjugierten anti-mouse Zweitantikörper detektiert. CD45⁻/CD146⁺/vWF⁺ und CD45⁻/KDR⁺/vWF⁺ Zellen wurden aufgrund der endothelzellspezifischen Marker-

kombination als Endothelzellen definiert. In Abbildung 3.1.3.2 ist eine Beispielmessung dieser Antikörperkonstellation zu sehen.

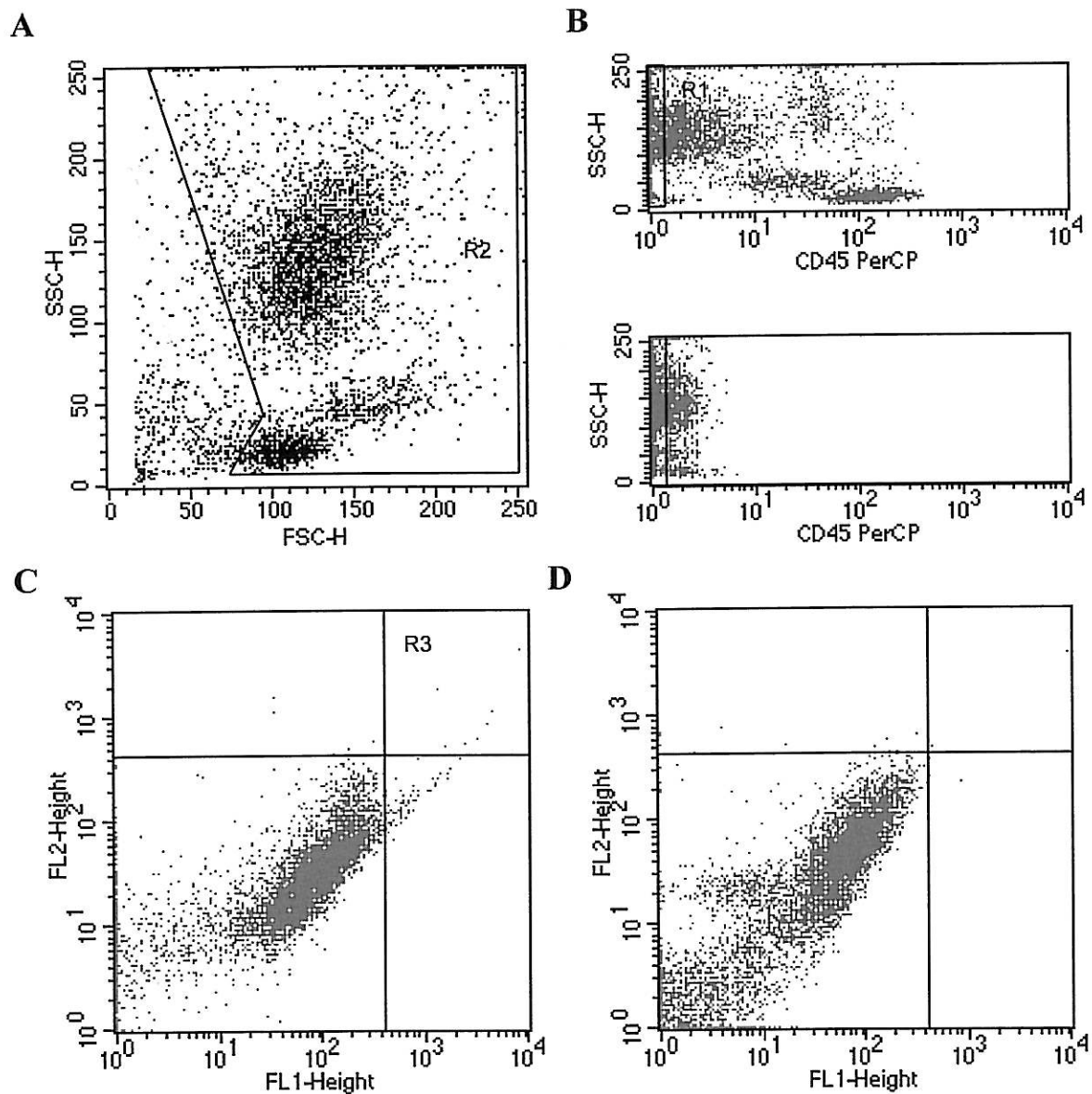


Abb. 3.1.3.2 Durchflusszytometrische Darstellung zur Detektion von apoptotischen, vWF+/KDR+/- Endothelzellen. (A) Repräsentative Darstellung des Untersuchungsbereiches, der Thrombozyten und abgestorbene Zellreste von der Messung ausschließt. (B) Bild oben rechts: Messbereich, der zum Ausschluss hämatopoetischer Zellen, die das CD45-Antigen präsentieren, dient. Bild Mittel rechts: Negativkontrolle der oben rechts dargestellten Messung. (C) Anzahl KDR+/vWF+ -Zellen (R3) aus dem zuvor selektierten CD45-negativen Zellpool (D) Negativkontrolle der in (C) dargestellten Messung.

3.1.4 Bestimmung der endothelialen Apoptoserate

Da bei apoptotischen Zellen im frühen Stadium eine Umverteilung von Phosphatidylserin von der Membraninnen- auf die Außenseite stattfindet, an das der Antikörper Annexin V bindet, wurden Annexin V-bindende Zellen mittels primärer Annexin V-APC Konjugate bestimmt (Bender Medical Systems; van Engeland M. et al. 1998). Abbildung 3.1.4 zeigt links oben die Endothelzellpopulation, die aufgrund ihres apoptotischen Zustandes Annexin-APC auf ihrer Oberfläche bindet. Die Abbildung rechts oben zeigt die Negativkontrolle mit Streptavidin.

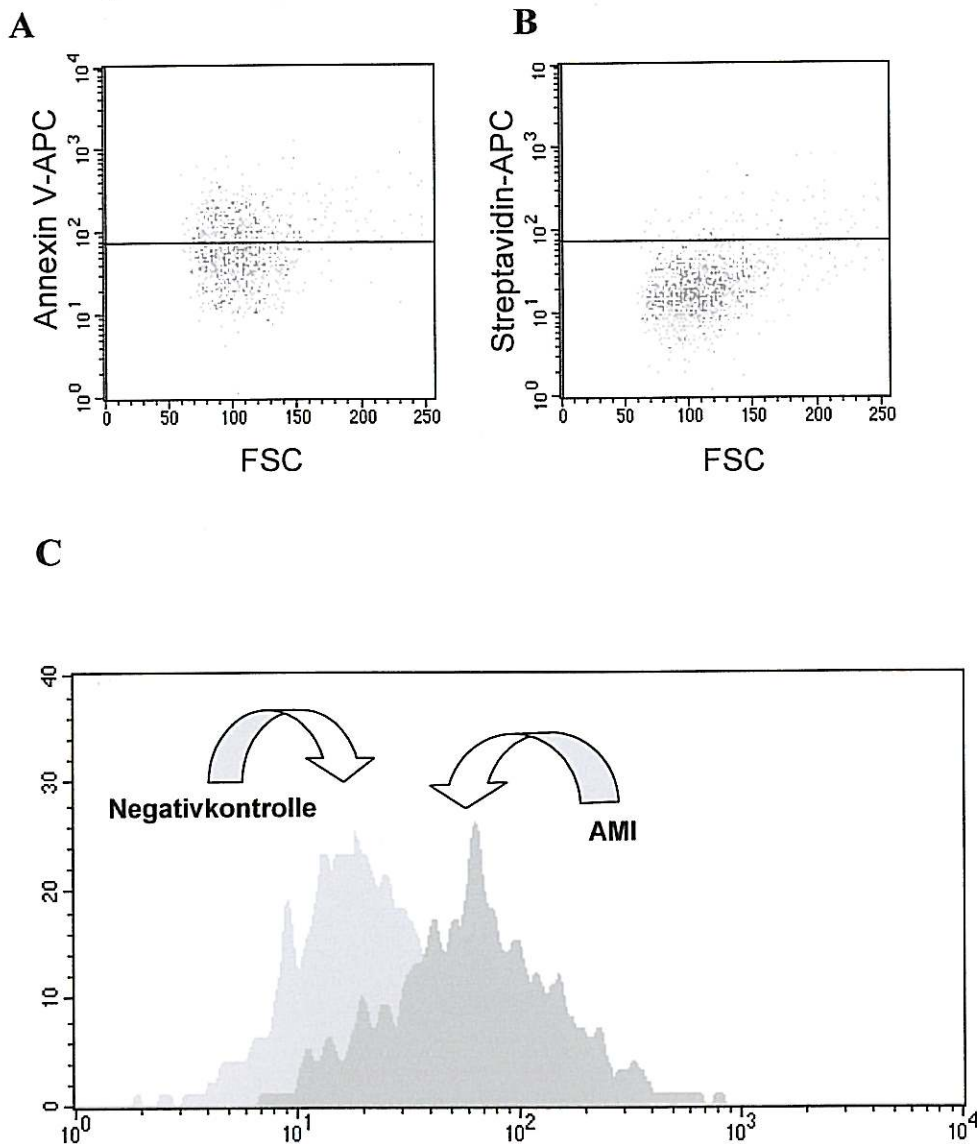


Abb. 3.1.4. (A) Repräsentative Darstellung einer Endothelzellpopulation, die aufgrund ihres apoptotischen Zustandes Annexin-APC auf ihrer Oberfläche bindet. (B) Negativkontrolle der in (A) gezeigten Messung mit Streptavidin. (C) Schematische Darstellung der Zunahme apoptotischer Endothelzellen bei Patienten mit AMI im Vergleich zur Negativkontrolle.

3.1.5 Negativkontrolle

Isotypgleiche Antikörper dienten bei der Detektierung von Endothelzellen als Negativkontrolle (IgG1- phycoerythrin und IgG2a-FITC, Becton Dickinson), die Bindungsspezifität von Annexin wurde mittels Streptavidin-gekoppeltem APC bzw. mit IgG- APC kontrolliert. Signale, die aufgrund der Isotypkontrollen entstanden, wurden als falsch positiv bewertet und vom Rohwert abgezogen. Jede Analyse umfasste 100 000 Ereignisse.

3.1.6 Bestimmung der Reliabilität, Validität und Objektivität der Messungen

Um die richtige Einstellung des Durchflusszytometers zu überprüfen, wurden die Endothelzellen der peripheren Blutproben gesunder Probanden *ex vivo* mit zytotoxischen Dosen des Proteinkinase C-Inhibitors Staurosporin inkubiert, dessen endothelzellapoptotische Wirkung bei der morphologischen Analyse und der DNA-Fragmentation sichtbar wird.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu untersuchen, wurden die apoptotischen zirkulierenden Endothelzellen von einer Subgruppe des Patienten- und Probandenkollektives (n=10) zweimal aus zwei verschiedenen Blutproben bestimmt und von zwei unabhängigen Beobachtern ausgewertet. Der Korrelationskoeffizient für die Korrelation der Messergebnisse beider Beobachter betrug dabei $r=0.98$ ($p<0,0001$), während die Messergebnisse bei einem Beobachter, der denselben Patienten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersuchte, mit einem Korrelationskoeffizienten von $r=0.91$ ($p<0,0001$) korrelierten.

Für die Gesamtzahl der zirkulierenden Endothelzellen korrelierten die Messergebnisse zweier Beobachtern mit $r=0.95$ ($p<0,0001$), wohingegen die Messergebnisse bei einem Beobachter, der zwei zeitlich versetzt abgenommene Blutproben eines Patienten untersuchte, mit $r=0.89$ ($p<0,0001$) korrelierten.

3.1.8 Apoptoseinduktion in HUVEC mittels Serumentzug

Um zu untersuchen, ob Annexin typischerweise apoptotische Zellen markiert und ob Streptavidin eine hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften geeignete Negativkontrolle ist, wurden HUVEC für 4 Stunden ohne Serum kultiviert, anschließend mit CD146 und vWF inkubiert und die Apoptoserate der HUVEC mittels Annexin-Inkubation bestimmt. Gegenüber der Negativkontrolle mit Streptavidin zeigte sich nach Serumentzug eine deutliche Zunahme der Annexin-positiven Zellen mit einer ermittelten Apoptoserate von 10.09%, während in der Kontrolle ohne Serumentzug kein solches Signal auftrat. Dies zeigt, dass die Bindung von Annexin durch Kontrollinkubation mit Streptavidin kontrolliert werden kann, und dass Annexin spezifisch an apoptotische Endothelzellen bindet.

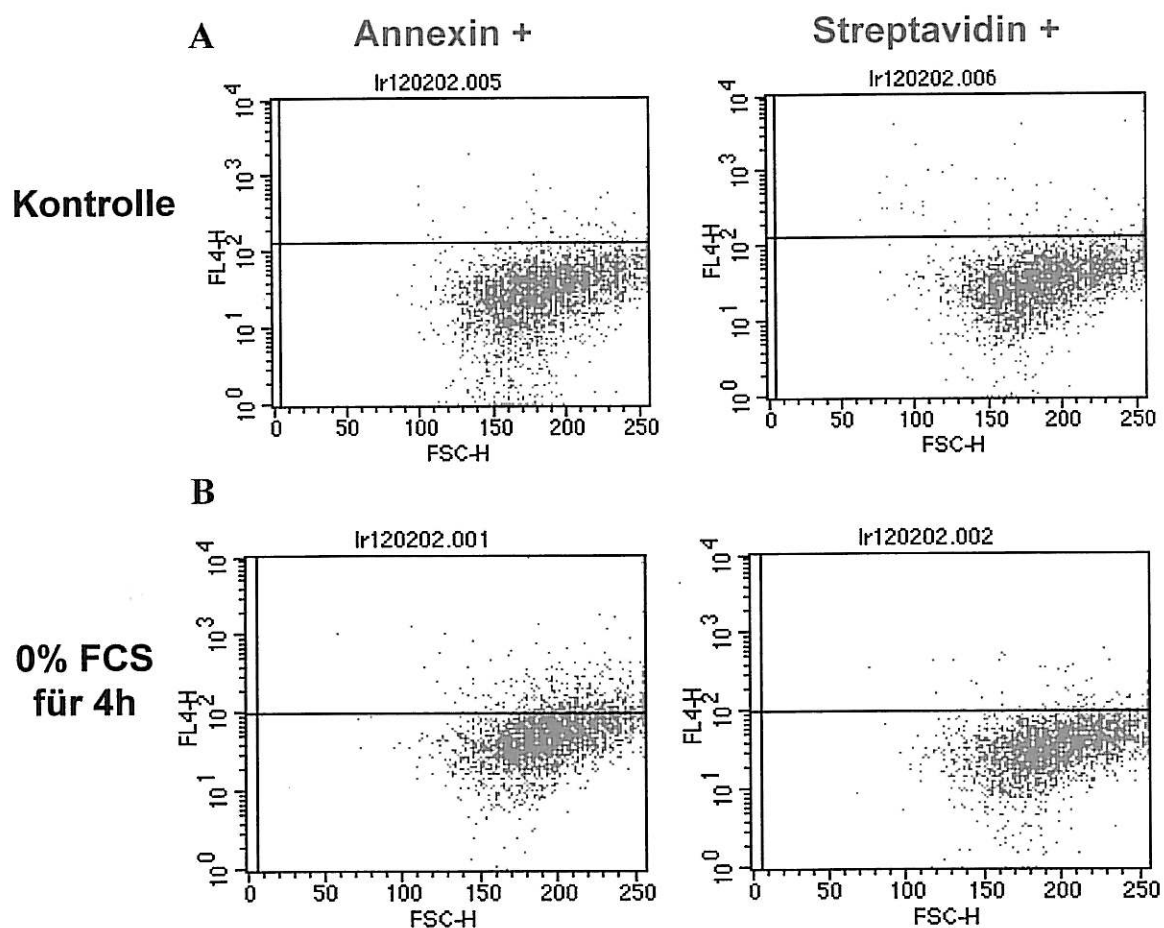


Abb. 3.1.8. Messung der Apoptoserate von HUVEC vor und nach 4h Serumentzug. (A) Bild oben links: Darstellung der geringen Bindungskapazität von Annexin an HUVEC. Bild oben rechts: Negativkontrolle der im Bild oben links gezeigten Messung mit Streptavidin. (B) Bild unten links: Darstellung der erhöhten Bindungskapazität von Annexin an HUVEC, die für 4h ohne Serum kultiviert wurden. Bild unten rechts: Negativkontrolle der im Bild unten links gezeigten Messung mit Streptavidin.

Zusammenfassend zeigen diese Messungen, dass der hier erstmals etablierte Essay die quantitative Bestimmung zirkulierender Zellen des peripheren Blutes mit endothelialen Oberflächeneigenschaften sowie die selektive Messung deren Apoptose gestattet.

3.2 Reduzierte Anzahl zirkulierender EPC bei Patienten mit stabiler und mit aktiver koronarer Gefäßkrankheit

Die klinischen Charakteristika der untersuchten Patienten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Mehr als 71% der Patienten hatten eine Mehrgefäßerkrankung, also atherosklerotische Veränderungen in mehr als einem Gefäß. Das mittlere Alter der 29 gesunden Probanden betrug 57 ± 13 Jahre (Mittelwert \pm SD), von denen 25 (=86%) männlich waren.

Patienten mit stabiler koronarer Gefäßkrankheit hatten um das 2,5 fache reduzierte Zahlen an CD133-positiven endothelialen Progenitorzellen (CD133-positiv/ KDR-positiv; Fig 3.2).

Auch bei Patienten mit instabiler Angina pectoris ohne myokardiale Nekrose (Troponin-T-negatives ACS) war die Anzahl zirkulierender EPC signifikant niedriger als bei gesunden Probanden (Fig. 3.2). Patienten nach einem akuten Myokardinfarkt hatten die niedrigsten Werte an zirkulierenden EPCs (Fig. 3.2; ca. 3,5 fach niedriger als die Kontrollgruppe).

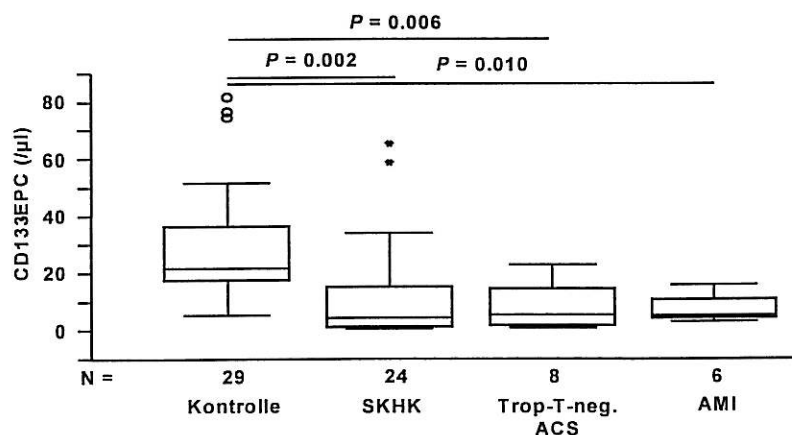


Fig. 3.2. Anzahl CD133+-EPC/µl beim Probandenkollektiv sowie bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit, Trop-T-negativem ACS und akutem Myokardinfarkt

	STABIL	INSTABIL	AMI	P
N	24	8	6	
Alter-Jahre	64±5	65±10	56±4	
Männliches Geschlecht– Nr. (%)	22 (92)	7 (88)	6 (100)	
Risikofaktor – Score	3,63±1,28	4,13±1,89	3,33±1,03	
Risikofaktoren – Nr. (%)				
Arterielle Hypertonie	12 (50)	5 (63)	4 (67)	
Diabetes mellitus	4 (17)	3 (38)	0 (0)	
Nikotin	9 (38)	3 (38)	5 (83)	
Positive Familienanamnese	7 (29)	4 (50)	2 (33)	
LDL Cholesterin (mg/dL)	119±32	134±54	135±35	
HDL Cholesterin (mg/dL)	50±13	50±16	40±5	
C-reaktives Protein (mg/L)	3,6±5,7	11,2±13,8	22,3±7,7	P<0,005 instabil vs. stabil P<0,005 AMI vs. instabil
Leukozyten (/mm ³)	6,36±1,50	7,69±2,28	8,12±2,41	P<0,05 AMI vs. stabil
LV - Auswurffraktion(%)	57±6	58±7	51±11	P<0,05 AMI vs. stabil
Beta-blocker	21 (88)	8 (100)	5 (83)	
ACE Hemmer / AT ₁ Blocker	18 (75)	6 (75)	5 (83)	
Statine	14 (58)	1 (13)	1 (17)	
Aspirin / Clopidogrel	22 (92)	8 (100)	6 (100)	

Tab. 3.2: Klinische Daten des Patientenkollektives. Mittelwert ±SD.

Obwohl in der Literatur beschrieben wird, dass in der Frühphase nach einem Myokardinfarkt die Anzahl zirkulierender EPCs erhöht ist (Massa M. et al., 2005), blieben die Zahlen zirkulierender EPCs nach sofortiger perkutaner Revaskularisation bei Patienten mit ACS oder akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu gesunden Probanden erniedrigt.

3.3 Zirkulierende mature Endothelzellen bei Patienten mit koronarer Gefäßkrankheit

Um zwischen verschiedenen Arten von zirkulierenden Endothelzellen unterscheiden zu können, ermittelten wir in den peripheren Blutproben neben EPCs auch die Anzahl maturer Endothelzellen. Im Gegensatz zu der Anzahl zirkulierender EPCs hatten Patienten mit einem AMI eine erheblich erhöhte Gesamtzahl (ca. 5fach) zirkulierender maturer Endothelzellen (Fig. 3.3.1)

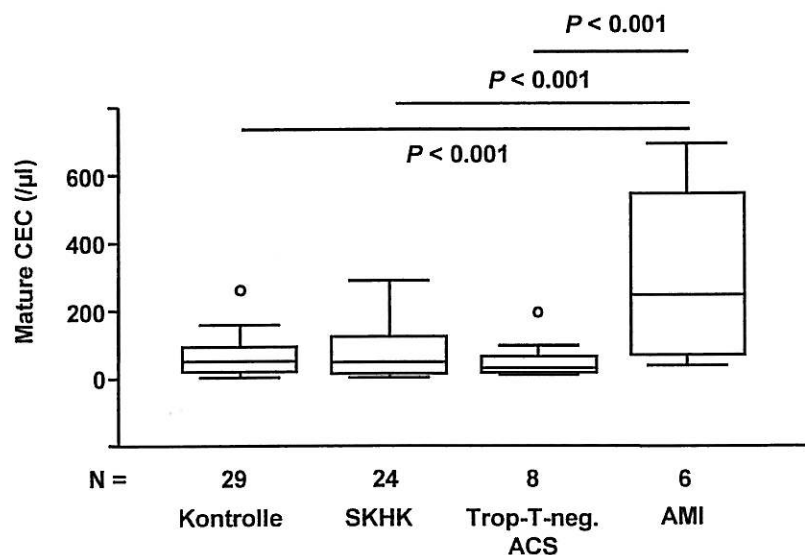


Fig. 3.3.1. Anzahl maturer zirkulierender Endothelzellen/ μ l beim Probandenkollektiv sowie bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit, Trop-T-negativem ACS und akutem Myokardinfarkt

Lag hingegen keine Myokardnekrose vor, wie z.B. bei Patienten mit einem Troponin-T-negativen ACS, unterschieden sich die Level zirkulierender maturer Endothelzellen nicht wesentlich von denen bei Patienten mit stabiler koronarer Gefäßkrankheit.

Da die Endothelzellapoptose einer endothelialen Ablösung bzw. Abschilferung zugrunde liegen könnte, welche wiederum zu einer Plaqueerosion und einer Thrombose führen kann, identifizierten wir diese Zellen anhand des Apoptose-Markers Phosphatidylserin mittels Messung der Annexin V-Bindung.

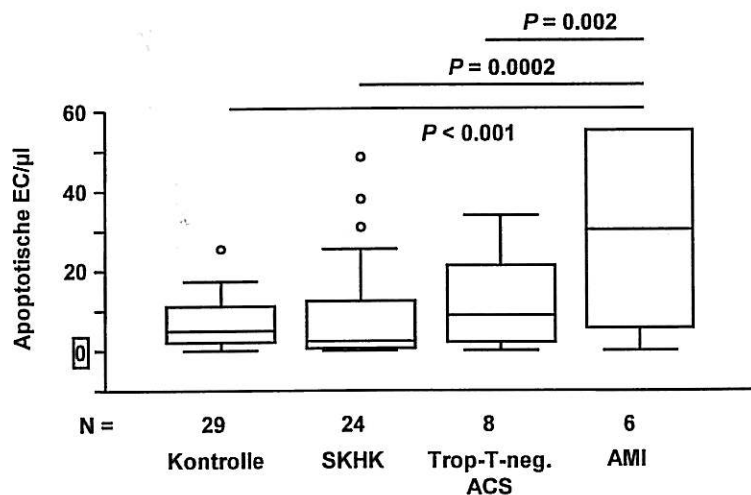


Fig. 3.3.2. Anzahl apoptotischer Endothelzellen/ μ l beim Probandenkollektiv sowie bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit, Trop-T-negativem ACS und akutem Myokardinfarkt

Werden nun ausschließlich die Annexin V-positiven muren Endothelzellen berücksichtigt, so weisen Patienten mit AMI im Vergleich zu gesunden Probanden ca. 10-fach erhöhte Spiegel an zirkulierenden apoptotischen Endothelzellen auf (Fig. 3.3.2).

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde bei einem Teil des Studienkollektives (n=54) das periphere Blut mit anderen Endothelzellmarkern, nämlich VEGF (vascular endothelial growth factor) Rezeptor-1 (KDR) und vWF inkubiert. Obwohl die absolute Anzahl an KDR/vWF-positiven Endothelzellen niedriger war als die CD146/vWF-positiver Endothelzellen, hatten Patienten mit ACS ebenfalls höhere Werte ($63 \pm 54/\mu\text{L}$) als Patienten mit einem Troponin-T-negativen ACS ($7 \pm 8/\mu\text{L}$; $p < 0,005$), einer stabilen koronaren Gefäßkrankheit ($12 \pm 5/\mu\text{L}$; $p < 0,02$) und gesunde Probanden. Das Bindungsverhalten von Annexin V an zirkulierenden CD45-/KDR+/vWF+ Zellen bestätigte, dass Patienten mit einem AMI signifikant höhere Level an zirkulierenden apoptotischen muren Endothelzellen ($10 \pm 8/\mu\text{L}$) aufweisen als Patienten mit stabiler KHK ($2 \pm 1/\mu\text{L}$; $p < 0,05$), wohingegen bei Troponin-T-negativen Patienten mit

ACS die Anzahl zirkulierender apoptotischer maturaer Endothelzellen nicht erhöht ist (1+/-1/ μ L; $p < 0,05$ vs. AMI). Demzufolge besitzen Patienten mit einem AMI erheblich höhere Level an zirkulierenden apoptotischen Endothelzellen.

3.4 Gleichgewicht verschiedener zirkulierender Endothelzellpopulationen bei der koronaren Gefäßkrankheit

Um ein Maß für die homöostatische Balance verschiedener zirkulierender Endothelzellen zu erhalten, berechneten wir den Quotienten aus maturaen apoptotischen Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen. Dieser „Schädigungs-Index“ spiegelt die Beziehung zwischen dem Ausmaß der apoptotischen Endothelzellschädigung und der regenerativen Kapazität durch zirkulierende EPCs wider.

Bereits bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit zeigte dieser Index ein grenzwertig signifikantes Überwiegen des relativen Anteils der Apoptose bei gleichzeitig unzureichend niedrigen EPC-Zahlen an. Während bei Patienten mit einem Troponin-T-negativem ACS dieser Schädigungsindex weiter anstieg, bestand die ungünstigste Konstellation bei Patienten mit einem AMI, die neben einer massiv erhöhten Endothelzellapoptose viel zu niedrige EPC-Zahlen aufweisen, um den resultierenden Mangel auszugleichen. Ihr „Schädigungs-Index“ war im Vergleich zum gesunden Probandenkollektiv um das 30fache erhöht (Fig. 3.4)

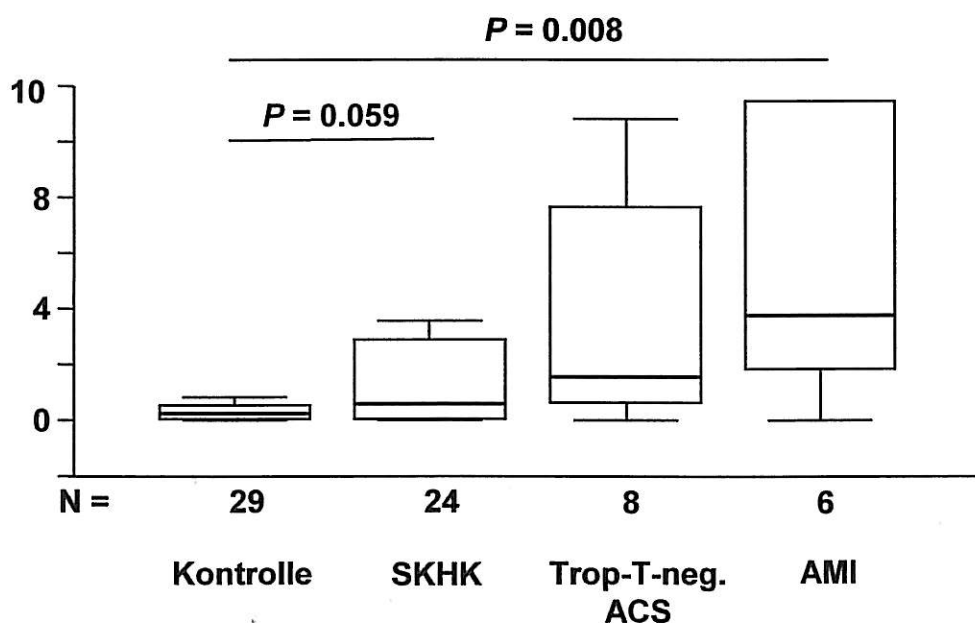


Fig. 3.4. Quotient aus apoptotischen Endothelzellen und CD133- positiven EPCs bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit, Trop-T-negativem ACS und akutem Myokardinfarkt

3.5 Zirkulierende Endothelzellen und Risikofaktoren für die Koronare Gefäßkrankheit

In zahlreichen Studien ist ein Zusammenhang zwischen Arterioskleroseentstehung bzw. -progression und dem Vorhandensein kardiovaskulärer Risikofaktoren gezeigt worden. Da in unserem Patientenkollektiv in Abhängigkeit von der Aktivität des Krankheitsgeschehens, i.e., dem Eintreten eines akuten Koronarsyndroms als klinischem Korrelat eines akuten atherothrombotischen Ereignisses, reduzierte EPC-Zahlen nachweisbar waren, untersuchten wir, ob kardiovaskuläre Risikofaktoren einen Einfluss auf die Anzahl zirkulierender CD133-positiver EPCs haben.

Mittels univariater Analyse zeigt sich eine inverse Korrelation der Anzahl zirkulierender CD133-positiver EPC mit dem Vorhandensein einer arteriellen Hypertonie, einer positiven Familienanamnese und einem kumulativen kardiovaskulären Risikofaktorindex (risk factor score). Das Vorhandensein eines Diabetes mellitus erwies sich als grenzwertig signifikant (Tabelle 3.5.1). Unter Berücksichtigung der Krankheitsaktivität der koronaren Gefäßkrankheit (mit den Kategorien 0: kein Anzeichen oder Vorgeschichte für KHK; 2: Troponin-T-negatives akutes Koronarsyndrom und 4: akuter Myokardinfarkt) ergab sich eine starke inverse signifikante Korrelation mit der Anzahl zirkulierender EPCs (Tab. 3.5.1).

N=67 INDIVIDUEN	<i>R</i>	<i>P</i>
Alter	-0,167	0,178
Männliches Geschlecht		0,808
Krankheitsaktivität (SA, SKHK, IKHK, MI)	-0,527	< 0,00001
Arterielle Hypertonie		0,01
Diabetes mellitus		0,072
Nikotin		0,246
Positive Familienanamnese		< 0,001
Hypercholesterinämie		0,199
LDL Cholesterin	0,160	0,197
HDL Cholesterin	0,148	0,233

KV Risikofaktor –Score	-0,418	< 0,001
C-reaktives Protein (hsCRP)	-0,189	0,125
WBC	-0,194	0,115

Tab. 3.5.1: Univariate Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität, kardiovaskulären Risikofaktoren und zirkulierenden EPC

In einer multivariaten Analyse unter Berücksichtigung aller Parameter mit univariat signifikanter Korrelation sowie der Einnahme von Statinen, die mit erhöhten EPC-Leveln einhergeht (Dimmeler S. et al. 2001), blieben die Krankheitsaktivität der koronaren Gefäßkrankheit und eine positive Familienanamnese als unabhängige signifikante Prädiktoren einer reduzierten Anzahl zirkulierender CD133-positiver EPCs bestehen (Tab. 3.5.2).

N= 67 INDIVIDUEN	<i>BETA</i>	<i>T</i>	<i>P</i>
Krankheitsaktivität	-0,301	-2,422	0,018
Arterielle Hypertonie	-0,106	-0,712	0,479
Positive Familienanamnese	-0,260	-2,125	0,038
KV Risiko-Score	-0,030	-0,197	0,845

Tab. 3.5.2: Multivariate Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität, kardiovaskulären Risikofaktoren und zirkulierenden EPC

3.6 Kardiale Herkunft zirkulierender maturer apoptotischer Endothelzellen

Um eine mögliche Anreicherung maturer zirkulierender apoptotischer Endothelzellen nach Passage der Koronarstrombahn zu bestimmen, wurden selektive Blutentnahmen aus der Aortenwurzel und der V. cordis magna durchgeführt, die eine spezifische Unterscheidung zwischen dem Stromgebiet der LCA und des restlichen Kreislaufes gestatten (Buffon A. et al. 2001). Patienten mit ACS wiesen einen

transkoronaren Anstieg der zirkulierenden apoptotischen EC um 35% [+23% bis +59%] (Median und Interquartilenbereich; $P < 0.05$) in der V. cordis magna verglichen mit der Aorta auf. Ebenso war bei Patienten mit ACS der „Schädigungsindex“, also das Verhältnis von zirkulierenden apoptotischen maturen Endothelzellen zur Anzahl der zirkulierenden EPC, nach Passage des LCA-Stromgebiets in der V. cordis magna signifikant höher als in der Aorta (13,2 [0,48 - 28] vs. 4,9 [0,3 - 9,3], $P < 0,05$). Im Gegensatz bestand bei Patienten mit stabiler KHK und bei der Kontrollgruppe ohne KHK keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl zirkulierender Endothelzellen zwischen Proben aus der Aorta und der V. cordis magna. Zudem zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl zirkulierender apoptotischer maturer Endothelzellen aus der Femoralarterie und der korrespondierenden Vene in allen drei Patientenkollektiven.

3.7 Auswirkung der Statineinnahme auf die Anzahl apoptotischer Endothelzellen

3.7.1 Retrospektive Analyse

Statinpräparate senken die kardiovaskuläre Ereignisrate sowohl in der Primär- als auch in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen. Die akute kurzfristige Einstellung auf ein Statinpräparat (40 mg Atorvastatin) führte zu einer Steigerung der peripheren EPC-Zahlen bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit. Aus diesem Grund wurde retrospektiv im hier untersuchten Patientenkollektiv ermittelt, ob die Einnahme eines Statins Auswirkungen auf die Anzahlen zirkulierender apoptotischer Endothelzellen hat. Die klinischen Charakteristika der mit Statinen behandelten Patienten und die verwendeten Präparate sind den Tabellen 3.7.1.1 und 3.7.1.2 zu entnehmen.

N=68 PATIENTEN	<i>N</i>	<i>mg</i>
Kein Statin	34	
Statin	34	21 ± 2
Atorvastatin	16	18 ± 3
Simvastatin	14	24 ± 2
Pravastatin	3	17 ± 3
Fluvastatin	1	40

Tab. 3.7.1.1 Eingenommene Statinpräparate

Klinische Daten	Statine	KHK-Kontrolle	P
N	34	34	n.s.
Alter (Jahre)	63±1	60±1	n.s.
Männliches Geschlecht	26 (77)	29 (85)	n.s.
Risikofaktor-Index	3,97±0,19	3,82±0,23	n.s.
Risikofaktoren - Anzahl (%)			
Arterielle Hypertonie	21 (62)	22 (65)	n.s.
Diabetes mellitus	6 (18)	8 (24)	n.s.
Nikotinabusus	17 (50)	20 (59)	n.s.
Positive Familienanamnese	15 (44)	15 (44)	n.s.
LDL-Cholesterin (mg/dL)	107±6	135±7	0,0002
HDL-Cholesterin (mg/dL)	48±2	40±2	0,02
Linksventrikuläre EF (%)	57±1	56±2	n.s.
β-Blocker	31 (91)	27 (79)	n.s.
ACE-Hemmer/ATRB	26 (77)	23 (68)	n.s.

Tab. 3.7.1.2: Patientencharakteristika für retrospektive Analyse des Einflusses von Statinen. Mittelwert ±SD.

Patienten, die mit Statinpräparaten vorbehandelt wurden (mittlere Dosis 21 mg/Tag), wiesen eine signifikant geringere Anzahl zirkulierender apoptotischer Endothelzellen als Patienten ohne Statinbehandlung auf (Fig. 3.7.1.1). In Übereinstimmung mit Angaben aus der Literatur waren die Anzahlen zirkulierender endothelialer Progenitorzellen bei Patienten unter Statinbehandlung ca. 3-fach erhöht (Fig. 3.7.1.2).

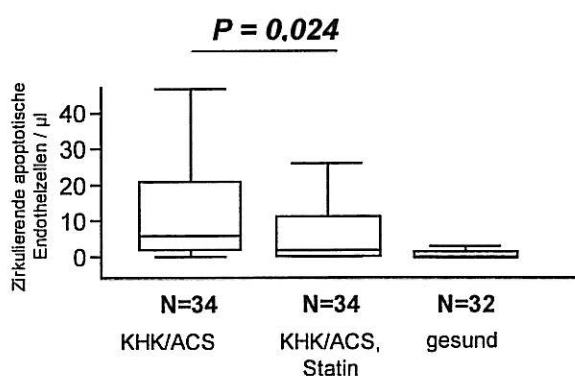


Fig. 3.7.1.1 Anzahl zirkulierender apoptotischer Endothelzellen / µl bei Patienten mit KHK/ACS ohne und mit Statintherapie sowie beim Probandenkollektiv

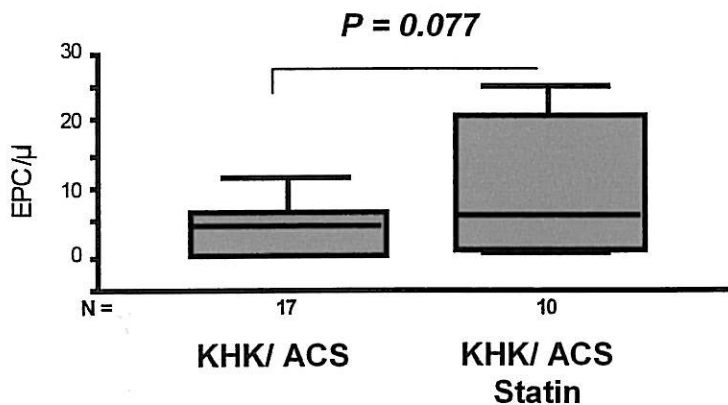


Fig. 3.7.1.2 Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit KHK/ACS ohne und mit Statintherapie

Die oben aufgeführten Daten könnten darauf hinweisen, dass endotheliale Progenitorzellen Bestandteil eines Kompensationsmechanismus für den Verlust von Endothelzellen durch Apoptose sind. Um die Beziehung zwischen der apoptotischen EC-Schädigung und der regenerativen Kapazität durch zirkulierende EPCs quantitativ darzustellen, berechneten wir den Quotienten aus zirkulierenden apoptotischen Endothelzellen (CAEC) und CD133-positiven EPC als sogenannten endothelialen Schädigungsindex. Die Einnahme von Statinen war im oben charakterisierten Patientenkollektiv mit einem 15fach reduzierten Schädigungsindex assoziiert (Fig. 3.7.1.3).

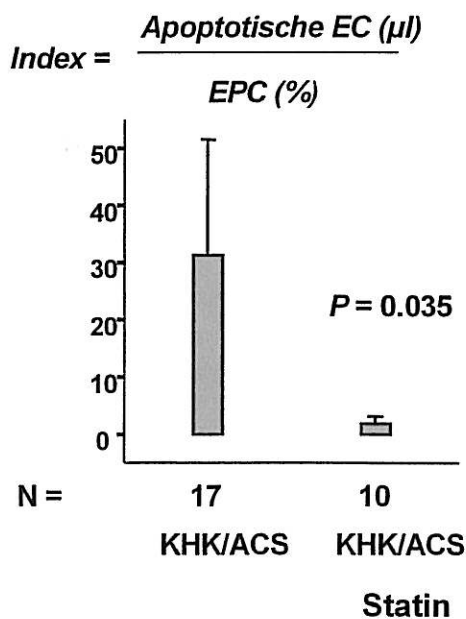


Fig. 3.7.1.3 Schädigungsindex (apoptotische EC(μl)/EPC(%)) bei Patienten mit KHK/ACS ohne und mit Statintherapie

3.7.2 Prospektive Studie

Diese Daten weisen darauf hin, dass Statine nicht nur zu einer Erholung der Anzahlen zirkulierender EPCs führen, sondern dass sie möglicherweise die homöostatische Balance der endothelialen Integrität auch über eine Hemmung der Apoptoserate günstig beeinflussen können. Daher untersuchten wir in einer prospektiven Studie, ob die Kurzzeitbehandlung mit Atorvastatin (40 mg/Tag) die Anzahl apoptotischer Endothelzellen bei Patienten mit stabiler Angina reduziert. Die klinische Charakteristik der hierfür eingeschlossenen Patienten ist der Tabelle 3.7.2.1 zu entnehmen.

N	9
Alter – Jahre	64 ± 4
Männlich – Anzahl (%)	6 (67)
Stabile KHK / ACS	6 / 3
Risikofaktoren – Gesamtzahl	3,89 ± 0,59
Risikofaktoren – Anzahl (%)	
Arterieller Hypertonus	5 (56)
Diabetes mellitus	2 (29)
Rauchen	4 (45)
Positive Familienanamnese	5 (56)
LDL - Cholesterol (mg/dl)	154 ± 16
HDL / LDL Verhältnis	0,32 ± 0,04
C-reactives Protein (mg/dl)	1,41 ± 0,53
Leukozyten (/µl)	7,77 ± 0,75
LVEF (%)	54 ± 5
β-Blocker	8 (89)
ACE-Hemmer / AT ₁ Blocker	5 (56)
Aspirin / Clopidogrel	9 (100)

Tab. 3.7.2.1. Patientencharakteristika für prospektive Analyse des Einflusses von Statinen.
Mittelwert ±SD.

Die Atorvastatinbehandlung über 4 Wochen führte sowohl zu einer signifikanten Reduktion der zirkulierenden apoptotischen Endothelzellen als auch der prozentualen Apoptoserate (Abb. 3.7.2.1).

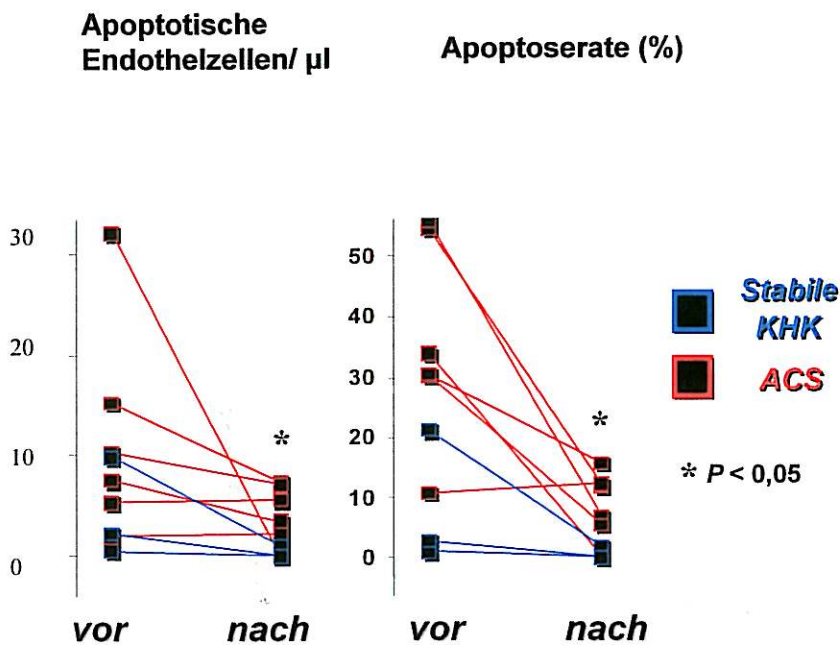


Fig. 3.7.2.1 Anzahl apoptotischer Endothelzellen/µl und prozentuale Apoptoserate bei Patienten mit stabiler KHK (blau) und ACS (rot) vor und nach 4-wöchiger Atorvastatintherapie

Als Kontrolle für die regelmäßige Einnahme des Statinpräparats bestimmten wir nach 4 Wochen die LDL-Cholesterinspiegel, die gegenüber dem Ausgangswert signifikant erniedrigt waren (Fig. 3.7.2.2). Ebenso sanken die CRP-Werte als Zeichen des rückläufigen Entzündungsgeschehens (Fig. 3.7.2.2).

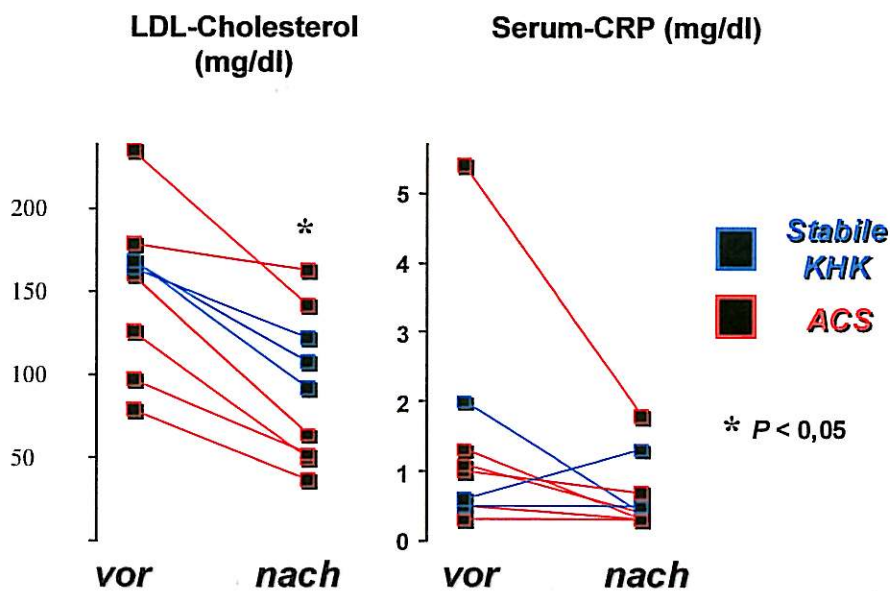


Fig. 3.7.2.2 Abfall des LDL-Cholesterin und Serum-CRP bei Patienten mit stabiler KHK (blau) und ACS (rot) vor und nach 4-wöchiger Atorvastatintherapie

4. Diskussion

4.1 Zirkulierende apoptotische Endothelzellen als Zeichen und Auslöser eines atherosklerotischen Krankheitsgeschehens

Eine durch Apoptose verursachte Endothelzellablösung kann bei Patienten mit KHK zu akuten atherothrombotischen Ereignissen führen. Somit könnte der Nachweis zirkulierender apoptotischer Endothelzellen einen Hinweis auf das Vorliegen eines atherosklerotischen Krankheitsgeschehens geben.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die verschiedenen Arten zirkulierender Endothelzellen bei Patienten mit KHK - abhängig vom Krankheitsstadium – auf unterschiedliche Weise reguliert sind. Während Patienten mit stabiler KHK im Vergleich zum gesunden Probandenkollektiv bereits eine niedrigere Anzahl zirkulierender EPCs haben, wiesen Patienten mit Troponin-T-negativem ACS oder AMI nach Revaskularisation des Infarktgefäßes ebenfalls erniedrigte EPC-Zahlen auf. Da bei diesen Patienten der Anteil apoptotischer zirkulierender ECs im Blutkreislauf erhöht ist, könnte der Quotient aus murenen apoptotischen ECs und Progenitorzellen unabhängig von etablierten kardiovaskulären Risikofaktoren als ein aussagekräftiger Indikator für die Schwere der Erkrankung dienen.

Das Auftreten von Zellen im peripheren Blut, die die morphologischen Kriterien von Endothelzellen besitzen, wurde zuerst 1978 beschrieben (Hladovec J. et al. 1978). Spezielle Selektionsmethoden und immunologische Detektierung bestätigten die Anwesenheit von zirkulierenden Endothelzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, nicht hingegen aber bei Patienten mit stabiler Angina (Mutin M. et al. 1999). Jedoch hat erst die Entwicklung von Mehrkanal - Durchflusszytometriegeräten die nötige Voraussetzung geliefert, um zwischen verschiedenen Arten von Endothelzellen unterscheiden und möglicherweise die Viabilität der ECs feststellen zu können (Mancuso P. et al. 2001). Ansteigende Level zirkulierender sogenannter apoptotischer Mikropartikel bei Patienten mit ACS (Mallat Z. et al. 2000) lassen eine mögliche Induktion der EC-Apoptose bei Patienten mit ACS vermuten, die zu einer endothelialen Ablösung und dem Vorkommen apoptotischer ECs im Blutkreislauf führen kann. Unsere Messungen zeigen nun, dass die Anzahl zirkulierender

apoptotischer ECs tatsächlich bei Patienten mit AMI im Vergleich zum gesunden Probandenkollektiv um das 10-fache erhöht ist.

Da die Apoptoseinduktion bei Endothelzellen von der Zytotoxizität zahlreicher kardiovaskulärer Risikofaktoren abhängig ist und diese Faktoren systemisch im gesamten Kreislaufsystem auftreten, könnte der Herkunftsort der apoptotischen maturen Endothelzellen ebenfalls im gesamten Gefäßbett lokalisiert sein. Andererseits könnte ein erodierter oder aufbrechender Plaque oder eine Myokardischämie zu einem regionalen Auftreten von EC- Apoptose mit anschließender Ablösung aus dem Endothelverband führen. Unsere Daten, die zeigen, dass sich apoptotische ECS bei Patienten mit ACS während der Passage der Koronarien im Blut anreichern, während dies bei Patienten mit stabiler KHK nicht der Fall ist, weisen darauf hin, dass eine lokal begrenzte Endothelzellapoptose zugrunde liegt. Da dieser „transkoronare“ Anstieg sowohl bei Patienten mit Myokardnekrose (AMI) als auch bei Patienten mit Trop-T-negativem ACS zu beobachten war, ist dies möglicherweise ein Hinweis darauf, dass die EC-Apoptose nicht nur Zeichen eines postischämischen Gewebeschadens und unzureichender Durchblutung ist, sondern dass der Ursprung der abgelösten apoptotischen Endothelzellen wahrscheinlich im aktiven Koronar-Plaque liegt.

4.2 Endotheliale Progenitorzellen und koronare Herzkrankheit

Als bedeutendster Pathomechanismus der Atheroskleroseentstehung wird zur Zeit die Verletzung des endothelialen Monolayer angenommen (Ross R. 1999). Zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Integrität kann es erst kommen, wenn das Gleichgewicht zwischen vaskulären Reparaturmechanismen und endothelialer Verletzung nachhaltig gestört wird. Kürzlich veröffentlichte Daten belegen, dass endotheliale Progenitorzellen zur Reparatur verletzter Gefäßwandbezirke beitragen, indem sie u.a. Endothelzellen mit eingeschränkter Funktion ersetzen (Hill J.M. et al. 2003) oder zu den Orten wandern, die durch eine Ballon-Dilatation verletzt worden sind (Walter D. et al 2002; Griesse D. et al. 2003). Eine reduzierte Anzahl zirkulierender EPCs könnte daher das homöostatische Gleichgewicht zugunsten einer zunehmenden endothelialen Verletzung verschieben.

Die Höhe der zirkulierenden EPC-Zahlen wird offenbar durch mindestens vier pathophysiologische Faktoren beeinflusst:

1. Eine Abnahme des Stamm- Progenitorzellpools im Knochenmark
2. Eine eingeschränkte Mobilisierung der EPCs aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf
3. Eine eingeschränkte Überlebenszeit der EPCs im Blutkreislauf
4. Eine Änderung der EPC-Funktion hinsichtlich der Anhaftung an freiliegenden oder verletzten Gefäßoberflächen (sog. homing) und/oder der Wanderung in Gefäßstrukturen während der Gefäßneubildung (sog. incorporation)

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen in direktem Zusammenhang mit dem Schweregrad einer kardiovaskulären Erkrankung steht. Bereits frühere Studien belegen, dass die Anzahl zirkulierender EPCs sowohl mit der vasodilatierenden Funktion des Endothels (Hill J.M et al. 2003), als auch mit der Kollateralbildung im Koronarsystem bei Patienten mit KHK (Lambiase P.D. et al 2004) korreliert, hingegen war eine inverse Korrelation im Zusammenhang mit der Häufigkeit eines zerebralen Insultes (Taguchi A. et al. 2004) beobachtet worden. Zudem besitzen sowohl Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren als auch mit einer stabilen Koronaren Gefäßkrankheit niedrigere Zahlen an zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen als gesunde Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren (Vasa M. et al, 2001b; Hill J.M et al. 2003). Die Anzahl und Funktion zirkulierender EPCs korreliert dabei invers mit einem klinischen Risikofaktor-Score, der die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren inklusive Diabetes mellitus zusammenfasst (Vasa M. et al, 2001b). Außerdem altern EPCs von Hochrisikopatienten schneller (Hill J.M. et al. 2003), ein Vorgang, der zum Teil durch die Aktivierung des Akt-Nitrit-Oxid-Synthase-Pfades reversibel ist (Dimmeler S., et al. 2001 & Assmus B., et al. 2003)

Tierexperimentelle und klinische Studien zeigen eine Mobilisierung der EPCs aus dem Knochenmark infolge einer Ischämie. Dies wird auf die Freisetzung von pro-angiogenetischen Faktoren aus ischämischem Gewebe zurückgeführt. Unsere Daten zeigen, dass CD133-positive EPCs nicht nur bei Patienten mit stabiler KHK im Vergleich zum gesunden Probandenkollektiv reduziert sind, sondern dass trotz eines geringfügigen relativen Anstiegs im ACS im Vergleich zur stabilen KHK die EPC-Zahlen gegenüber Kontroll-Probanden erniedrigt sind. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Blutentnahmen zu einem Zeitpunkt nach der Revaskularisation durchgeführt worden sind, zu dem sich mobilisierte EPCs möglicherweise bereits an Orten

erhöhter Zellumsatzraten abgesetzt hatten (homing), um nach der durch Ischämie und Reperfusion induzierten Apoptose zur Reendothelisation und Vaskulogenese beizutragen. Unterstützung findet diese Hypothese durch kürzlich publizierte Daten, die belegen, dass autologe zirkulierende mononukleäre Zellen mit endothelialem Phänotyp nach ex vivo Kultur die Kollateralbildung bei Patienten mit AMI nach Revaskularisation verbessern (Assmus B. et al. 2002).

Eine Limitation dieser Arbeit beruht allerdings darauf, dass keine sequentiellen Blutentnahmen zur Bestimmung des Zeitverlaufs der EPC-Zahlen nach Schmerzbeginn bzw. in Relation zur Revaskularisierung durchgeführt wurden. Ein Nachweis des mobilisierten EPC homings, repräsentiert durch erhöhte Zahlen vor Rescue-PCI und ein anschließender rascher Abfall war somit nicht möglich. Da die Mobilisation und das homing der Zellen von der Knochenmarkskapazität und der Revaskularisationsmaßnahme entscheidend mitbestimmt wurde, sind weitere Untersuchungen notwendig, um die zugrunde liegenden Mechanismen im Rahmen einer kontrollierten Untersuchung zu entschlüsseln. In einem Nachfolgeprojekt zu dieser Arbeit wurde dafür aus selektiv aus dem Koronarsinus entnommenen Proben die EPC-Zahlen im Vgl. zur systemischen Zirkulation bestimmt, um so ein homing nach Passage durch das Infarktgefäß zu untersuchen.

4.3 Statine reduzieren die Anzahl apoptotischer Endothelzellen im peripheren Blut

Parallel und unabhängig von ihrer ursprünglichen Indikation, einen erhöhten Cholesterinspiegel zu senken, haben Statine zusätzliche gefäßprotektive Wirkungen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl die Anzahl als auch die Funktion zirkulierender endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit KHK erheblich durch die Therapie mit Statinen verbessert werden kann (Vasa M. et al. 2001a; Dimmeler S. et al. 2001). Zudem senken Statine signifikant die Mortalität von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Shepherd J. et al. 1995) und verbessern –auch bei einem parallel weiterbestehenden hohen Serumcholesterin – die Endothelfunktion (O'Driscoll G. et al. 1997). Eine bereits von Buston C. et al. (1998) beobachtete Hemmung vaskulärer Entzündungsreaktionen konnte in der vorliegenden Studie durch eine signifikante CRP-Abnahme nach 4-wöchiger Atorvastatintherapie bei Patienten mit stabiler KHK bestätigt werden. Des Weiteren können Statine direkt in

die Regulation intrazellulärer Signalkaskaden eingreifen und antiapoptotische Wirkungen entfalten, indem sie die eNOS-Hochregulierung und auf diese Weise die Bildung von NO, einem kardioprotektiven (Jones S.P. et al. 1999) und antiinflammatorischen (Lefer D.J. et al. 1999) Faktor induzieren. Die hier vorliegenden Daten könnten ein in vivo Korrelat solcher molekularbiologischen Effekte darstellen. In der Tat weist sowohl das retrospektiv ausgewertete als auch das prospektiv behandelte Patientenkollektiv eine signifikant niedrigere Anzahl apoptotischer Endothelzellen auf als das Patientenkollektiv ohne Statinbehandlung. Die antiapoptotische Wirkung der Statine könnte der Hemmung der Plaquentstehung und der Stabilisierung bereits vorhandener atherosklerotischer Plaques zugrunde liegen. Statine könnten somit über mehrere Mechanismen wie der Hemmung der Apoptose maturer Endothelzellen und der Steigerung der endogenen Endothel-Regeneration durch Anhebung der EPC-Zahlen einer Atheroskleroseentstehung entgegenwirken. Da die Einstellung auf eine dauerhafte Statineinnahme ein etabliertes, vielfach bewährtes sekundärpräventionelles Vorgehen sowohl zur Verhinderung atherothrombotischer Manifestationen bei erhöhtem kardiovaskulären Risiko und bei stabiler Angina Pectoris als auch zur Senkung der Mortalität nach einem Myokardinfarkt ist, ist es aufgrund dieses eindeutigen Nutzen der Statintherapie ethisch nicht vertretbar, im Rahmen einer doppel-blind randomisierten Studie ein Kontrollkollektiv mit einem Placebo- anstelle des Statinpräparats zu behandeln. Dies mag die Aussagekraft der Daten limitieren. Allerdings weist in ersten Vorversuchen ein pharmakologisch unterschiedlicher, nicht-resorbierbarer Lipidsenker, der unabhängig von der pleiotropen Wirkung der Statine zu einer LDL-Senkung führt, im Vergleich zu Statinen einen deutlich geringeren Effekt auf die Anzahlen zirkulierender apoptotischer Endothelzellen und endothelialer Progenitorzellen auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass neben der lipidsenkenden die weiteren, sogenannten pleiotropen Eigenschaften der Statine für den protektiven Effekt verantwortlich sein könnten.

Zusammenfassend lassen unsere Daten vermuten, dass bei Patienten mit stabiler KHK zirkulierende EPCs eine fortlaufende Regeneration des Endothels und damit dessen Integrität gewährleisten und der endothelialen Verletzung durch die Apoptoseinduktion unter dem Einfluss von Risikofaktoren entgegenwirken. Bei überhöhtem Bedarf hingegen dekompenziert dieser Mechanismus, da die Kapazität des zirkulierenden EPC-Reservoirs erschöpft ist.

5. Literaturverzeichnis

American Heart Association. (2003) Heart & Stroke Encyclopedia: Heart Attack

Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3': 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 3203-3207

Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M. (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967

Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearne M., Magner M., Isner J.M. (1999a) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228

Asahara T., Takahashi T., Masuda H., Kalka C., Chen D., Iwaguro H., Inai Y., Silver M., Isner J.M. (1999b) VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18, 3964-3972

Asai K., Kudej R.K., Shen Y.T., Yang G.P., Takagi G., Kudej A.B., Geng Y.J., Sato N., Nazareno J.B., Vatner D.E., Natividad F., Bishop S.P., Vatner S.F. (2000) Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1493-1499

Assmus B., Schachinger V., Teupe C., Britten M., Lehmann R., Dobert N., Grunwald F., Aicher A., Urbich C., Martin H., Hoelzer D., Dimmeler S., Zeiher A.M. (2002) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106, 3009-3017

Auch-Schwelk W., Katusic Z.S., Vanhoutte P.M. (1992) Nitric oxide inactivates endothelium-derived contracting factor in the rat aorta. *Hypertension* 19, 442-445

Baumgartner-Parzer S.M., Wagner L., Pettermann M., Grillari J., Gessl A., and Waldhäusl W. (1995) High glucose triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 44, 1323-1327

Blake G.J., Ridker P.M. (2001) High sensitive C-reactive protein for predicting cardiovascular disease: an inflammatory hypothesis. *European Heart Journal* 22, 349-352

Bjorkerud, B., Bjorkerud, S. (1996) Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 16, 416-424

Braunwald E. (1989) Unstable Angina: a classification. *Circulation* 80, 410- 414

Braunwald E. MD. (2002) Management of Patients with Unstable Angina and Non-ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. ACC/AHA Pocket Guideline Update. American College of Cardiology Foundation and AHA. *J Am Coll Cardiol* 40, 1366-1374; *Circulation* 106, 1893-1900

Braunwald E. MD. Chair, Antman E.M., MD, FACC, Vice Chair.(2002) ACC/AHA Guideline Update for the Management of Patients with Unstable Angina and Non-ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. A Report of the American College of Cardiology/AHA.

Buffon A., Biasucci L.M., Liuzzo G., D'Onofrio G., Crea F., Maseri A. (2002) Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 347, 5-12

Bustos C., Hernandez-Presa M.A., Ortego M., Tunon J., Ortega L., Perez F., Diaz C., Hernandez G., Egido J. (1998) HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 32, 2057-2064

Caplan B.A., Schwartz C.J. (1973) Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans Blue uptake in the pig aorta. *Atherosclerosis* 17, 401-417

Carmeliet P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-95

Celermajer D.S., Sorensen K.E., Gooch V.M., Spiegelhalter D.J., Miller O.I., Sullivan I.D., Lloyd J.K., Deanfield J.E. (1992) *Lancet* 340, 1111-1115

Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A.M., Stern D.M. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527-3561. Review.

Corbeil D., Roper K., Hellwig A., Tavian M., Miraglia S., Watt S.M., Simmons P.J., Peault B., Buck D.W., Huttner W.B. (2000) The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 275, 5512-5520

Davies P.F., Remuzzi A., Gordon E.J., Dewey C.F. Jr, Gimbrone M.A. Jr. (1986) Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 2114-2117

Dejana E., Gorada M., Lampugnani M.G. (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* 9, 910-918

Dimmeler S., Haendeler J., Rippmann V., Nehls M., Zeiher A.M. (1996) Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 399, 71-74

Dimmeler S., Haendeler J., Galle J., Zeiher A.M. (1997) Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the „response to injury“ hypothesis. *Circulation* 95, 1760-1763

Dimmeler, S., Zeiher, A.M. (2000) Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept* 90, 19-25

Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C., Adler K., Tiemann M., Rutten H., Fichtlscherer S., Martin H., Zeiher A.M. (2001) HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 108, 365-366

Dimmeler S., Haendeler J., Zeiher A.M. (2002) Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol* 13, 531-536

Drancourt M., George F., Brouqui P., Sampil J., Raoult D. (1992) Diagnosis of Mediterranean spotted fever by indirect immunofluorescence of *Rickettsia conorii* in circulating endothelial cells isolated with monoclonal antibody-coated immunomagnetic beads. *J Infect Dis* 166, 660-663

Du X.L., Sui G.Z., Stockklauser-Färber K., Weiss J., Zink S., Sewippert B., Wu Q.X., Tschöpe D., and Rösen P. (1998) Induction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species. *Diabetologia* 41, 249-256

Escargueil-Blanc, I., Meilhac, O., Pieraggi, M.-T., Arnal, J.-F., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A. (1997) Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurointricarboxylic acid. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 17, 331-339

Escargueil-Blanc I., Salvayre R., Negre-Salvayre A. (1994) Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *FASEB J.* 8, 1075-80

Fichtlscherer S., Breuer S., Zeiher A.M. (2004) Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the "vulnerable" patient. *Circulation* 110, 1926-1932

Fischer, B.E., Kramer, S., Mitterer, A., Grillberger, L., Reiter, M., Mundt, W., Dorner, F., and Eibl, J. (1996) Effect of multimerization of human and recombinant von Willebrand factor of platelet aggregation, binding to collagen and binding of coagulation factor VIII. *Thromb Res* 84, 55-66

Fiskum G., Starkov A., Polster B.M., Chinopoulos C. (2003) Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 111-119.

Furchgott R.F., Zawadzki J.V.(1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376

Furchgott R.F. (1983) Role of endothelium in responses in vascular smooth muscle. *Circ Res* 53, 557-573

Gehling U.M., Ergun S., Schumacher U., Wagener C., Pantel K., Otte M., Schuch G., Schafhausen P., Mende T., Kilic N., Kluge K., Schafer B., Hossfeld D.K., Fiedler W. (2000) In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106-3112

George F., Poncelet P., Laurent J.C., Massot O., Arnoux D., Lequeux N., Ambrosi P., Chicheportiche C., Sampol J. (1991) Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody. *J Immunol Methods* 139, 65-75

Gerber H.P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B.A., Dixit V., Ferrara N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273, 30336-43

Gibbons R.J. (2002) Management of Patients with Chronic stable Angina. 2003. ACC/AHA Pocket Guideline. *Circulation* 106, 1883-1892

Glücksman, A.(1951) Cell deaths in normale vertebrate ontogeny. *Bio Rev* 26, 59-

Grefte A., van der Giessen M., van Son W., The T.H. (1993) Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* 167, 270-277

Griendling K.K., Sorescu D., Lassegue B., Ushio-Fukai M. (2000) Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2175-2183

Griese D., Ehsan A., Melo L., Kong D., Zhang L., Mann M., Pratt R., Mulligan R., Dzau V. (2003) Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 108, 2710-2715

Hamet P., Richard L., Dam T-V, Teiger E., Orlov S.N., Gaboury L., Gossard F., Tremblay J. (1995) Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26, 642-648

Hamm C.W. (2004) Leitlinien Akutes Koronarsyndrom. *Z Kardiol* 93, 72–90

Harada-Shiba M., Kinoshita M., Kamido H., Shimokado K. (1998) Oxidized Low Density Lipoprotein Induces Apoptosis in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells by Common and Unique Mechanisms. *J Biol Chem* 273, 9681-9687

Hill J.M., Zalos G., Halcox J.P., Schenke W.H., Waclawiw M.A., Quyyumi A.A., Finkel T. (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348, 593-600

Hladovec J., Prerovsky I., Stanek V., Fabian J.(1978) Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klin Wochenschr* 56, 1033-1036

Ignarro L.J., Byrns R.E., Buga G.M., Wood K.S. (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61, 866-879

Isner J.M. (2000) Angiogenesis: a "breakthrough" technology in cardiovascular medicine. *J Invasive Cardiol* 12, 14A-7A.

Jenkins, P.V., Pasi K.J., Perkins, S.J. (1998) Molecular modeling of ligand and mutation sites of the type A domains of human von Willebrand factor and their relevance to von Willebrand's disease. *Blood* 91, 2032-2044

Joannides R., Haefeli W.E., Linder L., Richard V., Bakkali E.H., Thuillez C., Lüscher T. (1995) nitric oxide is responsible for flow- dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circ* 91, 1314-1319

Jones S.P., Girod W.G., Palazzo A.J., Granger D.N., Grisham M.B., Jourdain D., Huang P.L., Lefer D.J. (1999) Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 276, H1567-H1673

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257

Kureishi Y., Luo Z., Shiojima I., Bialik A., Fulton D., Lefer D.J., Sessa W.C., Walsh K. (2000) The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 6, 965-966

Lacy F., O'Connor D.T., Schmid-Schönbein G.W. (1998) Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 16, 291-303

Lamb, D. J., Michinson, M. J., Leake, D. S. (1995) Transition metal ions within human atherosclerotic lesions can catalyse the oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *FEBS Lett* 374, 12-16

Lambiase P.D., Edwards R.J., Anthopoulos P., Rahman S., Meng Y.G., Bucknall C.A., Redwood S.R., Pearson J.D., Marber M.S. (2004) Circulating humoral factors and endothelial progenitor cells in patients with differing coronary collateral support. *Circulation* 109, 2986-2992.

Laufs U., Liao J.K. (1998) Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273, 24266–24271

Lee S.H., Wolf P.L., Escudero R., Deutsch R., Jamieson S.W., Thistlethwaite P.A. (2000) Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 342, 626-633

Lefler D.J., Jones S.P., Girod W.G., Baines A., Grishan M.B., Cockrell A.S., Huang P.L., Scalia R. (1999) Leukozyte- endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol* 276, H1943-H1950

Lefler A.M., Scalia R., Lefler D.J. (2001) Vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 49, 281-287

Li D., Yang B., Philips M.I., Mehta J.L. (1999) Proapoptotic effects of ANG II in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol* 276, 786-92

Lin Y., Weisdorf D.J., Solovey A., Hebbel R.P. (2000) Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105, 71-77

Lorenzi M., Cagliero E., Toledo S. (1985) Glucose toxicity for human endothelial cells in culture. Delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. *Diabetes* 34, 621-627

Lorenzi M., Cagliero E. (1991) Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus. *Diabetes* 40, 653-659

Loscalzo J., Welch G. (1995) Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 38, 87-104

Ludmer P.L., Selwyn A.P., Shook T.L., Wayne R.R., Mudge G.H., Alexander R.W., Ganz P. (1986) Paradoxical vasoconstriction induced by Acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315, 1046-1051.

Mallat Z., Hugel B., Ohan J., Leseche G., Freyssinet J.M., Tedgui A. (1999) Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99, 348-353

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. (2000). Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101, 841-843

Mancuso P., Burlini A., Pruneri G., Goldhirsch A., Martinelli G., Bertolini F. (2001) Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 97, 3658-3661

Massa M., Rosti V., Ferrario M., Campanelli R., Ramajoli I., Rosso R., De Ferrari G.M., Ferlini M., Goffredo L., Bertoletti A., Klersy C., Pecci A., Moratti R., Tavazzi L. (2005) Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 105; 199-206

Maron D.J., Fazio S., Linton M.F. (2000) Current perspectives on statins. *Circulation* 101, 207-213

Mazurier, C., Ribba, A.S., Gaucher, C., Meyer, D. (1998) Molecular genetics of von Willebrand disease. *Ann Genet* 41, 34-43

Miraglia S., Godfrey W., Yin A.H., Atkins K., Warnke R., Holden J.T., Bray R.A., Waller E.K., Buck D.W. (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90, 5013-5021

Moncada S., Herman A.G., Higgs E.A., Vane J.R. (1997) Differential formation of prostacyclin (PGX or PG12) by layers of the arterial wall. An explanation of the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res* 11, 323-344

Monestiroli S., Mancuso P., Burlini A., Pruneri G., Dell'Agnola C., Gobbi A., Martinelli G., Bertolini F. (2001) Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma. *Cancer Res* 61, 4341-4344

Morel, D. W., Hessler, J. R., Chisolm, G. M. (1983) Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* 24, 1070-1076

Murohara T., Ikeda H., Duan J., Shintani S., Sasaki K., Eguchi H., Onitsuka I., Matsui K., Imaizumi T. (2000) Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105, 1527-1536

Mutin M., Canavy I., Blann A., Bory M., Sampol J., Dignat-George F. (1999) Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 93, 2951-2958

O'Driscoll G., Green D., Taylor R.R. (1997) Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 95, 1126-1131

O'Kane K.P.J., Webb D.J., Collier J.G., Wallace P.J.T. (1994) Local L-NG-monomethyl-arginine attenuates the vasodilator action of bradykinin in the human forearm. *Br J Clin Pharmacol* 38, 311-315

Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526

Peichev M., Naiyer A.J., Pereira D., Zhu Z., Lane W.J., Williams M., Oz M.C., Hicklin D.J., Witte L., Moore M.A., Rafii S. (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958

PharMingen Technical Data Sheet; PerCP- conjugated Anti-mouse CD45 monoclonal Antibody BD

Quesenberry, P., Levitt, L. (1979) Haematopoietic stem cells. *N Engl J Med* 301, 755-761

Reyes M., Dudek A., Jahagirdar B., Koodie L., Marker P.H., Verfaillie C.M. (2002) Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J. Clin Invest* 109, 337-346

Ridker P.M., Rifai N., Rose L., Buring J.E., Cook N.R. (2002) Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 347, 1557-1565

Risau W. (1995) Differentiation of endothelium. *FASEB J* 9, 926-933

Rivard A., Fabre J.E., Silver M., Chen D., Murohara T., Kearney M., Magner M., Asahara T., Isner J.M. (1999) Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 99, 111-120

Ross, R., Glomset, J., Harker, L. (1977) Response to injury and atherogenesis, *Am J Pathol* 86,675-684

Rössig L., Hermann C., Haendeler J., Assmus B., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2002) Angiotensin II-induced upregulation of MAP kinase phosphatase-3 mRNA levels mediates endothelial cell apoptosis. *Basis Res Cardiol* 97, 1-8

Rössig L., Dimmeler S., Zeiher A.M. (2001) Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 96, 11-22

Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) Group. (1994) Randomized trial of cholesterol lowering in 4,444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Lancet* 344, 1383-1389

Schatteman G.C., Hanlon H.D., Jiao C., Dodds S.G., Christy B.A. (2000) Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* 106, 571-578

Schwarcz T.H., Yates G.N., Ghobrial M. et al. (1987) Pathologic characteristic of recurrent carotid artery stenosis. *J Vasc Surg*, 5 280-288

Schwinzer R. (1989) Cluster report: CD45/CD45R. In: Knapp W., Dörken B., Gilks W.R., et al (1989) eds. *Leukozyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens*. New York, NY: Oxford University Press 628-634

Shepherd J., Cobbe S., Ford I., Isles C., Lorimer A., MacFarlane P., McKillop J., Packard C. (1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 333, 1301-1307

Shih IM. (1999) The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol* 189, 4-11

Shintani S., Murohara T., Ikeda H., Ueno T., Honma T., Katoh A., Sasaki K., Shimada T., Oike Y., Imaizumi T. (2001) Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103, 2776-2779

Solovey A., Lin Y., Browne P., Choong S., Wayner E., Hebbel R.P. (1997) Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 337, 1584-1590

St Croix B., Rago C., Velculescu V., Traverso G., Romans K.E., Montgomery E., Lal A., Riggins G.J., Lengauer C., Vogelstein B., Kinzler K.W. (2000) Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 289, 1197-1202.

Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., Witztum, J. L. (1989) *New Engl J Med* 320, 915-924

Swei A., Lacy F., DeLano F.A., Schmid-Schönbein G.W. (1997) Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 30, 1628-1633

Taguchi A., Matsuyama T., Moriwaki H., Hayashi T., Hayashida K., Nagatsuka K., Todo K., Mori K., Stern D.M., Soma T., Naritomi H. (2002) Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 105, 1567-1572

Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T., Ikeda U., Shintani S., Masaki H., Amano K., Kishimoto Y., Yoshimoto K., Akashi H., Shimada K., Iwasaka T., Imaizumi T. (2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 427-435

Tricot O., Mallat Z., Heymes C., Belmin J., Leseche G., Tedgui A. (2000) Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 101, 2450-2453

Uchida N., Buck D.W., He D., Reitsma M.J., Masek M., Phan T.V., Tsukamoto A.S., Gage F.H., Weissman I.L. (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14720-14725

Vanhoutte P.M. (1989) Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 13, 658-667

Vasa M., Fichtlscherer S., Adler K., Aicher A., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2001a) Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103, 2885-2890

Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2001b) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89, E1-7

Verma S., Wang C.H., Li S.H., Dumont A.S., Fedak P.W., Badiwala M.V., Dhillon B., Weisel R.D., Li R.K., Mickle D.A., Stewart D.J. (2002) A Self-Fulfilling Prophecy – C-Reactive Protein Attenuates Nitric Oxide Production and Inhibits Angiogenesis. *Circulation* 106, 913-919

Vegeto E., Pollio G., Pellicciari C., Maggi A. (1999) Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF-alpha-induced apoptosis; *FASEB G* 13, 793-803

Walter D.H., Rittig K., Bahlmann F., Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. (2002) Statin therapy accelerates reendothelialisation: a novel effect involving mobilisation and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 105, 3017-3024

Ward, C.M., Tetaz, T.J., Andrews, R.K., Berndt M.C. (1997) Binding of the von Willebrand factor A1 domain to histone. *Thromb Res* 86, 469-477

Westhuyzen J., Healy H. (2000) Review: Biology and relevance of C-reactive protein in cardiovascular and renal disease. *Ann Clin Lab Sci* 30, 133-143

Wollert K.C., Meyer G.P., Lotz J., Ringes-Lichtenberg S., Lippolt P., Breidenbach C., Fichtner S., Korte T., Hornig B., Messinger D., Arseniev L., Hertenstein B., Ganser A., Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Circulation* 103, 2885-90

Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D., Almeida-Porada G., Ogawa M., Leary A.G., Olweus J., Kearney J., Buck D.W. (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012

6. Zusammenfassung

Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) wird angenommen, dass es aufgrund der Apoptose von Endothelzellen zu einer Störung des endothelialen Zusammenhaltes kommt, was ein Fortschreiten der Atherosklerose zur Folge hat. Unter normalen Bedingungen bewirkt eine Gefäßwandverletzung eine Mobilisierung von im Knochenmark befindlichen endothelialen Progenitorzellen, was möglicherweise zur Reendothelisation der verletzten Gefäßwand beiträgt. Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und einer manifesten KHK jedoch haben eine niedrigere Anzahl zirkulierender EPCs. Aus diesem Grund untersuchten wir bei Patienten mit stabiler KHK und mit ACS das Gleichgewicht zwischen zirkulierenden EPC und zirkulierenden apoptotischen maturen endothelialen Zellen (CAEC), und beobachteten, ob Statine ECs bei Patienten mit KHK vor der Apoptose schützen.

Die Bestimmung der EPCs erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) durch die Inkubation mit CD133 und KDR. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem AMI im Vergleich zur Kontrollgruppe die niedrigsten Werte an zirkulierenden EPCs aufwiesen (ca. 3,5fach niedriger), gefolgt von Patienten mit instabiler und stabiler KHK. Die Anzahl zirkulierender ECs hingegen (CD45-negativ, CD146-positiv und vWF-positiv) war bei Patienten mit AMI im Vergleich zur Kontrollgruppe um das 5fache erhöht ($P < 0,01$).

Um die Anzahl an CAEC zu bestimmen, ermittelten wir mittels einer 4-Kanal-Durchflusszytometrie die Annexin V-positiven Zellen aus CD45-negativen, CD146-positiven und vWF-positiven zirkulierenden Zellen aus peripheren Blutproben von Patienten mit KHK.

Wir konnten zeigen, dass diese Zellen bei Patienten mit AMI im Vergleich zu einem gesunden alters- und geschlechtskompatiblen Probandenkollektiv um das 10fache erhöht waren. ($P < 0,05$)

Um ein Maß für die veränderte Balance verschiedener Endothelzellen zu erhalten, ermittelten wir einen „Schädigungsindex“ (Quotient aus CAEC und EPC), der bei Patienten mit stabiler KHK bereits ein relatives Überwiegen der Apoptose bei unzureichend erniedrigten EPCs anzeigte und bei Patienten mit AMI die ungünstigste Konstellation mit einem um das 30fache erhöhten Index ergab.

Da kardiovaskuläre Risikofaktoren bekanntermaßen die Atheroskleroseentstehung begünstigen, untersuchten wir, ob sie auch Einfluss auf die Anzahl zirkulierender

CD133- positiver EPCs haben. In einer multivariaten Analyse blieben die Krankheitsaktivität der KHK und eine positive Familienanamnese als unabhängige signifikante Prädiktoren einer reduzierten Anzahl zirkulierender CD133-positiver EPCs bestehen.

Um die Herkunft der ECs zu bestimmen, wurden selektiv Blutproben aus der Aortenwurzel und der V.cordis magna untersucht. Patienten mit ACS wiesen einen transkoronaren Anstieg der CAEC um 35% in der V.cordis magna verglichen mit der Aorta auf. Ebenso war bei Patienten mit ACS der „Schädigungsindex“ in der V.cordis magna signifikant höher als in der Aorta.

Hydroxymethyl- Glutaryl- Coenzym-A-Reduktasenhhibitoren (Statine) senken die kardiovaskuläre Ereignisrate sowohl in der Primär- als auch in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen.

Eine retrospektive Studie mit n = 34 Patienten mit KHK zeigte, dass die Anzahl an CAEC bei Patienten ohne Statin signifikant niedriger war als bei den Patienten, die ein Statin bekommen hatten (mittlere Dosis 20mg per os). Zudem zeigte sich bei der Berechnung des Schädigungsindex, dass die Statintherapie eine Abnahme des Quotienten um das 15- fache bewirkte. Um dieses Ergebnis zu bestätigen maßen wir in einer prospektiven Studie die CAEC-Level bei n = 9 Patienten mit KHK vor und nach einer 4- wöchigen Behandlung mit Atorvastatin. Die Behandlung mit Atorvastatin führte zu einer signifikanten Abnahme sowohl der CAEC- Level als auch der prozentualen Apoptoserate.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass bei Patienten mit akuter KHK das Gleichgewicht zwischen EPC und apoptotischen maturen Endothelzellen gestört ist und dass eine Statintherapie das Gleichgewicht zwischen Endothelzellverletzung und vaskulären Reparaturmechanismen in Richtung einer Erhaltung des endothelialen Zusammenhaltes beeinflusst.

7. Summary

In patients with coronary artery disease (CAD) endothelial cell apoptosis may contribute to disturbances of the endothelial integrity leading to the progression of atherosclerosis. Under normal conditions, vascular traumatization mobilizes endothelial progenitor cells (EPC) from the bone marrow, which may contribute to the re-endothelialization of the injured vessel wall. However, individuals at cardiovascular risk and with manifest CAD have decreased levels of circulating EPC. Therefore we aimed to characterise the equilibrium between circulating EPC and circulating apoptotic mature endothelial cells (CAEC) in patients with stable CAD and with ACS and tested if statins protect EC from apoptosis in patients with CAD.

The determination of EPCs was taken by FACS, using CD133 and KDR staining. We showed that the number of cells were about 3,5-fold lower in patients with an AMI compared to age- and gender matched healthy control subjects, followed by patients with unstable and stable CAD. However, in patients with an AMI, the number of circulating ECs (CD45-negative, CD146-positive and vWF-positive) was elevated by about 5-fold. ($P < 0,01$)

In order to measure CAEC by 4-channel flow sorting (FACS), we used annexin V staining of CD45-negative, CD146-positive, vWF-positive circulating cells in peripheral blood samples from patients with CAD.

We showed that these cells were elevated by about 10-fold in patients with an AMI compared to age- and gender matched healthy control subjects.

In order to document the altered balance between circulating EC, we calculated the ratio of apoptotic mature EC to EPC ("damage index"), which demonstrated in patients with stable CAD a relative extend of apoptotic endothelial damage to the EPC-mediated repair capacity. The most disadvantageous constellation of elevated EC apoptosis and relatively low supplies of circulating EPC was observed in patients with an AMI, who had an 30-fold elevated damage index compared to healthy volunteers.

Considering the fact that cardiovascular risk factors influence the progression of atherosclerosis, we examined their influence on the number of circulating CD133-positive EPC. Following a multivariate analysis CAD activity and a positive family history remained the only significant independent predictors of decreased numbers of circulating CD133-positive EPC

In order to detect the origin of EC, we examined blood samples both of the aortic root and of the V. cordis magna. We showed that patients with an ACS had a transcoronary elevation of CAEC by 35% in the V.cortis magna compared to the aortic root. In addition, in patients with an ACS, the “damage index” was significantly higher in the V.cordis magna compared to the aortic root.

Hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins) decrease the rate of cardiovascular events both in the primary and secondary prevention of cardiovascular diseases.

A retrospective analysis of 34 patients with CAD revealed that the number of CAEC was significantly lower in these patients which received a statin (mean dose 20mg o.d.). In addition, the calculation of the “damage index” showed, that statin therapy was associated with a 15 -fold decreased damage index. In order to confirm this effect, we prospectively measured CAEC levels in n = 9 patients with CAD before and after treatment with atorvastatin 40 mg for 4 weeks. Atorvastatin led to a significant decrease both in CAEC levels and in apoptosis ratio (%)

In conclusion, in patients with acute stages of CAD, the balance between EPC and apoptosis of mature EC is disturbed and statin therapy shifts the balance between endothelial injury and vascular repair towards a well maintained preservation of endothelial integrity.

8. Lebenslauf

Personalien

Name und Vorname:	Ulrike Kämper
Geburtsdatum:	01.09.1978
Geburtsort:	Offenbach/Main
Familienstand:	ledig
Vater:	Siegfried Kämper
Mutter:	Karin Kämper, geb. Jungnik Freifrau von Wittken

Schulischer Werdegang:

1986 - 1989	J. Gutenberg- Grundschule / Hainburg
1989 - 1998	Einhardschule / Seligenstadt
15.06.1998	Abitur

Universitärer Werdegang:

WS 1998/99	Beginn des Studiums der Medizin an der J.W. Goethe- Universität/ Frankfurt
14.09.2000	Ärztliche Vorprüfung
28.08.2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29.03.2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19.04.2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005	Approbation als Ärztin

Promotion

2005	Thema: „Etablierung einer neuen Methode zur Detektierung zirkulierender apoptotischer Endothelzellen und
------	--

Untersuchung des Verhältnisses zu endothelialen Progenitorzellen bei der koronaren Herzkrankheit“ unter der Leitung von Prof. Dr. S. Dimmeler, Leiterin des Institutes für Molekulare Kardiologie des Zentrums der Inneren Medizin III an dem Universitätsklinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main

Berufstätigkeit

2005

Kerckhoff- Klinik Bad Nauheim

Sonstiges

2005

Caroline Schmidt- Lucke, Lothar Rössig, Stephan Fichtlscherer, Mariuca Vasa, Martina Britten, Ulrike Kämper, Stefanie Dimmeler, Andreas M. Zeiher (2005). Reduced Number of Circulating Endothelial Progenitor Cells Predicts Future Cardiovascular Events. Circulation, 111: 2981-2987

Bad Homburg, den 08. August 2005



Ulrike Kämper

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich der Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Etablierung einer neuen Methode zur Detektierung zirkulierender apoptotischer Endothelzellen und Untersuchung des Verhältnisses zu endothelialen Progenitorzellen bei der koronaren Herzkrankheit

in der Molekularen Kardiologie des Zentrums der Inneren Medizin III der Johann Wolfgang Goethe Universität unter der Leitung von Prof. Dr. S. Dimmeler ohne fremde Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung keine anderen als in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Bad Homburg, den 08.08.2005



Ulrike Kämper