

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor Prof. Dr. med. Martin Reincke

Vaskuläre Stammzellen in der In-Stent-Restenose

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stefan Waas

aus

Rotthalmünster

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Andreas Schober
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. Bruno C. Huber Prof. Dr. Prof. h. c. Calin Vicol
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Ela Karshovska
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	27.02.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	a
Tabellenverzeichnis	c
1 EINLEITUNG	1
1.1 Koronarstenosen	1
1.2 Restenosen	2
1.3 Zirkulierende vaskuläre Progenitorzellen	3
1.3.1 Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)	4
1.3.2 Glattmuskel-Progenitorzellen (SPCs)	5
1.3.3 Detektion zirkulierender vaskulärer Progenitorzellen	6
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung	7
2 MATERIAL UND METHODEN	8
2.1 Materialien und Verbrauchsmittel	8
2.1.1 Antikörper	8
2.1.2 Verbrauchsmaterial	8
2.1.3 Lösungen	8
2.2 Geräte und Zubehör	9
2.2.1 Geräte	9
2.2.2 Software	9
2.3 Patientenkohorte und Studiendesign	9
2.4 Diagnostik, Operation	10
2.4.1 Anamnese	10
2.4.2 Stentimplantation	10
2.4.3 Quantitative Koronarangiografie	10
2.4.4 Blutabnahme	13
2.5 Durchflusszytometrie	13
2.5.1 Färbung der Proben	13
2.5.2 Durchflusszytometrie (FACS)	15
2.5.3 Auswertung der FACS-Daten	17
2.6 Statistische Auswertung	19

3 ERGEBNISSE	21
3.1 Patientencharakteristika	21
3.2 Peri-interventionelle Veränderung der SPC-Zahl bei Restenose	23
3.3 Korrelation der EPC-Zellzahl mit dem Auftreten der Restenose	26
3.4 Korrelation der CD34 ⁺ -Zellzahl mit dem Auftreten der Restenose	28
3.5 Korrelation der CD140b ⁺ -Zellzahl mit dem Auftreten der Restenose	30
3.6 Korrelation der KDR ⁺ -Zellzahl mit dem Auftreten der Restenose	32
3.7 Korrelation des Restenosegrad mit der Änderung der CD34 ⁺ -, CD140b ⁺ - und KDR ⁺ -Zellzahl	34
3.8 Korrelation von Stenosegrad und der Anzahl der SPC- und EPC-Zellen	36
4. DISKUSSION	38
4.1 Korrelation der EPC- Zellzahl mit einer Restenose	39
4.1.1 EPCs	39
4.1.2 EPCs in der Restenose	39
4.2 Korrelation der SPC-Zellzahl mit einer Restenose	41
4.2.1 SPCs	41
4.2.2 SPC in der Restenose	42
4.3 Therapeutische Implikationen	43
4.4 Limitation der Studie	44
5 Zusammenfassung.....	45
LITERATURVERZEICHNIS	46
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	56
DANKSAGUNG	58
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der SMC Differenzierung; Migration PDGF-stimulierter SMCs in die Intima (modifiziert nach Alexander & Owens, 2012).....	5
Abbildung 2: Auswertung der quantitativen Koronarangiografie.....	12
Abbildung 3: Prinzip der Durchflusszelle. Zellen passieren optischen Messpunkt (www.cytometryforlife.org)	16
Abbildung 4: Exemplarische Darstellung durchflusszytometrischer Analysen nach Doppelfärbung mit CD34 (FITC) und CD140b (PE).....	18
Abbildung 5: Negativkontrollen der Doppelfärbungen in der Durchflusszytometrie.....	24
Abbildung 6: Post-interventionelle SPC Zahl und die Entwicklung einer Restenose. Prozentualer Anteil der SPCs an mononukleären Zellen ermittelt mittels Durchflusszytometrie im Vollblut nach Intervention (T1) bei Patienten mit und ohne Restenose. *p<0,05, n=25.	25
Abbildung 7: Absolute Änderung der Anzahl der SPC-Zellen ($\times 10^6/l$) zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und ohne (n=20) Restenose ermittelt mittels Durchflusszytometrie. * p < 0,05.....	26
Abbildung 8: Prozentualer Anteil der EPCs an mononukleären Zellen im Vollblut nach Intervention (T1) bei Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie.....	27
Abbildung 9: Absolute Änderung der Anzahl der EPCs ($\times 10^6/l$) zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zum Zeitpunkt T0 bei Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie. *p<0,05.....	27

Abbildung 10: Prozentuale Änderung der Anzahl der EPC-Zahl im Vollblut zwischen T1 und T0 in Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie.	28
Abbildung 11: Absolute Änderung der Anzahl der CD34 ⁺ -Zellen (x 10 ⁶ /l) nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und bei Patienten ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie. *p<0,05.....	29
Abbildung 12: Prozentuale Änderung der Anzahl der CD34 ⁺ -Zellen im Vollblut nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie. **p<0,01.....	30
Abbildung 13: Absolute Änderung der Anzahl der CD140b ⁺ -Zellen (x 10 ⁶ /l) nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und bei Patienten ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie.....	31
Abbildung 14: Prozentuale Änderung der Anzahl der CD140b ⁺ -Zellen im Vollblut nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten (n=5) mit und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie.	32
Abbildung 15: Absolute Änderung der KDR ⁺ -Zellzahl (x 10 ⁶ /l) nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie.	33
Abbildung 16: Prozentuale Änderung der KDR ⁺ -Zellzahl nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie. *p<0,05.	33
Abbildung 17: Korrelation zwischen der Änderung der CD34 ⁺ -Zellzahl (x 10 ⁶ /l) zwischen Zeitpunkt T1 und T0 und dem Stenosegrad im Stent ermittelt bei der follow-up Koronarangiographie (n=25).	34
Abbildung 18: Korrelation zwischen der Änderung der CD140b ⁺ -Zellzahl (x 10 ⁶ /l) und Stenosegrad ermittelt bei der follow-up Koronarangiographie.....	35

Abbildung 19: Korrelation zwischen der Änderung der KDR ⁺ -Zellzahl (x 10 ⁶ /l) und dem Stenosegrad ermittelt bei follow-up Koronarangiographie.....	35
Abbildung 20: Korrelation zwischen der Änderung der SPC-Zahl (x 10 ⁶ /l) zwischen T1 und T0 und dem Stenosegrad ermittelt bei follow-up Koronarangiographie.....	36
Abbildung 21: Korrelation zwischen der Änderung der EPC-Zahl (x 10 ⁶ /l) zwischen T1 und T0 und dem Stenosegrad ermittelt bei der follow-up Koronarangiographie.....	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bei der Doppelfärbung verwendeten Antikörper und Konzentrationen	14
Tabelle 2: Klinische Basisdaten aus Befunden und Anamnesebögen.....	22
Tabelle 3: Läsions- und Behandlungsdaten (Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe).....	23

1 EINLEITUNG

1.1 Koronarstenosen

Kommt es zu einer Verkleinerung des Lumens eines Koronargefäßes, spricht man von einer Koronarstenose. Solche überwiegend arteriosklerotisch bedingten Stenosen sind die Hauptursache einer koronaren Insuffizienz, d. h. das Herz ist nicht in der Lage, den nötigen Blutfluss für die metabolischen und funktionalen Bedürfnisse des Organismus zu gewährleisten (Himbert *et al.*, 1990).

Die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) stellt heute einen wesentlichen Therapiezweig in der Behandlung koronarer Stenosen dar. Unter Verwendung eines Ballonkatheters wird das zu behandelnde Gefäß gedehnt. Der hierbei genutzte Ballon ist in den Katheter integriert und kann von außen aufgeblasen werden. Durch den ausgeübten Druck kann das Gefäß präzise gedehnt und so die Lumenreduktion durch die Stenose vermindert werden. Andreas Roland Grüntzig entwickelte die Methode der Ballondilatation, welche er zunächst in Tierversuchen erprobte und 1977 auch erstmals an einem verengten Herzkranzgefäß beim Menschen anwendete (Kaltenbach, 2005).

In über 90 % der Fälle kann mittels PTCA eine Koronarstenose erfolgreich behandelt werden, das Auftreten einer erneuten Gefäßverengung – einer Restenose – stellt jedoch immer noch ein bedeutendes Problem dar (Pan *et al.*, 2005).

In zunehmendem Maße kommen Stents während einer PCTA zum Einsatz (Krakau & Lapp, 2005). Dabei handelt es sich um gitterartige Gefäßstützen aus Metall, die im Bereich der Zielläsion implantiert werden und diese offenhalten. Im Vergleich zur reinen PTCA reduziert eine zusätzliche Stentimplantation das Risiko für die Entwicklung einer Restenose (Mercado *et al.*, 2001). Dieser Effekt der Stents wird auf den – im Vergleich zur alleinigen PCTA – initial größeren Gefäßlumengewinn und die Blockierung der elastischen Rückstellkräfte der Arterienwand zurückgeführt (Fischman *et al.*, 1994; Serruys *et al.*, 1994). Trotzdem tritt eine In-Stent-Restenose bei der Verwendung von Edelstahl-Stents bei 15-35 % der Patienten auf (Krakau & Lapp, 2005).

Einleitung

Die sogenannten Drug-Eluting-Stents (DES) stellen eine weitere Neuerung dar, die im Vergleich zu Bare-Metal-Stents (BMS) die Notwendigkeit einer wiederholten Revaskularisierung vermindern (Garro *et al.*, 2008). Studien wie die von Dangas *et al.* zeigen, dass durch Verwendung von beschichteten Stents die Inzidenz einer In-Stent-Restenose und somit auch das erneute Auftreten von kardialen Beschwerden zurückgeht (Dangas *et al.*, 2005).

1.2 Restenosen

Eine Restenose ist definitionsgemäß eine angiographisch nachgewiesene Stenose bei einem Koronarsegment, welches zuvor dilatiert worden ist, bei dem das Gefäßlumen mehr als fünfzig Prozent eingeschränkt ist. Obwohl sich die interventionelle Kardiologie schneller entwickelt hat als jede andere Art der Behandlung im kardiovaskulären Bereich, ist die Inzidenz einer Restenose nahezu unverändert hoch geblieben. Sie tritt nach PCTA bei 30 – 50 % der Patienten und nach Stentimplantation bei 15-30 % der Patienten innerhalb des ersten halben Jahres postoperativ auf (Erdmann, 2011).

Die Schädigung des Endothels und der glatten Muskelzellen durch koronare Interventionen gilt als Hauptursache für eine Restenose (Kastrati *et al.*, 1993). Sie führen zu überschießenden Reparaturvorgängen während der ersten Monate nach der Intervention (Gruberg *et al.*, 2000). Drei Faktoren sind an einer Restenose beteiligt: Die Rückstellkräfte des Gefäßes (Recoil), das nachfolgende arterielle Remodeling (Gefäßwandveränderung) im Läsionsbereich und die Neointimabildung (Bhargava *et al.*, 2003).

Der Pathomechanismus von Restenosen ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Mintz *et al.* 1996). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass es sich um einen multifaktoriellen Prozess handelt, der sich in mehrere Phasen aufteilt (Poon *et al.*, 2002). Gefäßverletzungen während der PCTA oder der Stenteinführung stellen einen Reiz für eine beschleunigte Intimahyperplasie dar (Hoffmann *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 1996). Dabei proliferieren und migrieren mediale glatte Muskelzellen (smooth muscle cells; SMCs) in die Region der Erweiterung nahe der Gefäßinnenwand und führen zur neointimalen Hyperplasie. Zusätzlich fördern Entzündungszellen – wie beispielsweise Monozyten und Makrophagen - die Proliferation der

Einleitung

SMCs und die Sezernierung von extrazellulärer Matrix. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem arteriellen Remodeling im Bereich der Läsion, wodurch es innerhalb weniger Monate postoperativ dazu kommt, dass die Gesamtzellmasse in der Intima und Media, durch eine gestörte Apoptose und eine gesteigerte Mitoserate der SMCs, gesteigert und damit das Gefäßlumen zusätzlich eingeengt wird. Der Umfang des arteriellen Remodeling korreliert mit der Schwere der primären Gefäßwand-Schädigung (Lafont *et al.*, 1995; Schwartz, 1997).

Die Verwendung von Stents kann die neointimale Hyperplasie zwar nicht verhindern, da es auch bei der Stentimplantation, wie bei der PTCA, zu einem Gefäßtrauma kommt. Verglichen mit einer PCTA als alleiniger Eingriff wird die Proliferation der Neointima durch Verwendung von Stents sogar gefördert (Mintz *et al.*, 1996).

1.3 Zirkulierende vaskuläre Progenitorzellen

Zirkulierende vaskuläre Progenitorzellen stammen aus dem Mark des Knochens und gelangen über die Gefäße in die Peripherie. Sie sind noch nicht ausgereift und besitzen pluripotente Eigenschaften (Hristov *et al.*, 2008). Studien zeigen, dass zirkulierende vaskuläre Progenitorzellen bei verschiedenen arteriosklerotischen Erkrankungen eine Rolle spielen (Hristov *et al.* 2008). Aufgrund ihres therapeutischen Potentials erfahren sie große Aufmerksamkeit. So wurde gezeigt, dass zirkulierende vaskuläre Progenitorzellen bei der Regeneration der Gefäßwand nach Verletzungen oder einer Ischämie eine Rolle spielen. Neben den gut untersuchten endothelialen Progenitorzellen (EPCs), spielen auch Vorläufer vaskulärer glatter Muskelzellen (SPCs) eine Rolle bei vaskulären Reparaturvorgängen und Arteriosklerose.

EPCs und SPCs scheinen dabei gegensätzliche Auswirkungen auf Arteriosklerose, Vaskulopathie und Neointimabildung nach Gefäßverletzung zu haben (Hristov & Weber, 2008). Während zirkulierende EPCs die Angiogenese fördern und ihnen eine atheroprotektive Wirkung zugeschrieben wird, scheinen SPCs die Läsionsbildung zu fördern.

1.3.1 Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)

EPCs zirkulieren im Blut, proliferieren und können zu Endothelzellen ausreifen (Schattemann *et al.*, 2007). Diese sind Bestandteil der Intima und bilden somit die innerste Gefäßschicht aus. Neben immunologischen und vasomotorischen Aufgaben spielen sie auch eine Rolle in der Angiogenese. Eine Verletzung von Endothelzellen kennzeichnet viele pathologische Zustände, so auch Arteriosklerose und Thrombosen (Sumpio *et al.*, 2002).

In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Studien die Funktion von EPCs bei der Neovaskularisation untersucht. Erstmals publizierte Asahara *et al.* eine Arbeit mit dem Begriff „endothelial progenitor cell“ im Jahr 1997 (Asahara *et al.*, 1997). Seither ist die Zahl der Publikationen zum Thema stetig gestiegen und lag Ende 2014 bei über 15.000 Einträgen in der medizinischen Datenbank PubMed.

EPCs spielen eine entscheidende Rolle bei der Endothelialisierung und Neoangiogenese (Hirschi *et al.*, 2008; Zampetaki *et al.*, 2008). Sie wandern bei Bedarf in hypoxische und ischämische Endothelgebiete zur Neovaskularisation und differenzieren dort *in situ* zu Endothelzellen (ECs) (Timmermans *et al.*, 2009) .

Im Mausmodell wurde die Eingliederung aus dem Knochenmark stammender Zellen in heilende Wunden (Tepper *et al.*, 2005), Gebiete endothelialer Denudation (Li *et al.*, 2006) und experimentellem Myokardinfarkt (Jackson *et al.*, 2001) gezeigt. Über Chemotaxis und Adhäsion am Zielort migrieren die Zellen ins Gewebe und differenzieren sich dort zu Neoendothel (Langer *et al.*, 2007). Diese Funktionen machen ihr bedeutendes therapeutisches Potenzial aus.

Darüber hinaus scheint die Anzahl zirkulierender EPCs negativ mit der Neigung zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen zu korrelieren. So wurde gezeigt, dass niedrige EPC-Konzentrationen im Blut ein Marker für die Progression der Koronaren Herzerkrankung (KHK) sind (Choi *et al.*, 2004; Liu & Velazquez, 2008; Schmidt-Lucke *et al.*, 2005). Dafür spricht auch, dass Patienten mit mehreren arteriosklerotisch veränderten Herzkranzgefäßen niedrigere EPC-Konzentrationen aufweisen (Makin *et al.*, 2004).

1.3.2 Glattmuskel-Progenitorzellen (SPCs)

Die bei einer Restenose gebildete Neointima besteht hauptsächlich aus vaskulären SMCs und Leukozyten (Farb *et al.*, 2002). Unabhängig von der Proliferation neointimaler SMCs nach einer Gefäßverletzung, führt die Rekrutierung und Differenzierung zirkulierender SPCs zusätzlich zu einer Akkumulierung von SMCs in der Neointima (Schober *et al.*, 2003; Simper *et al.*, 2002; Zerneck *et al.*, 2005). Diese sind hochspezialisierte Zellen, (Liu *et al.*, 2011; van Oostrom *et al.*, 2009) (Abb. 1) die in der Gefäßwand mittels Kontraktion Gefäßtonus und -widerstand regulieren. Voll ausdifferenzierte, residente SMCs proliferieren extrem selten und bilden wenig Matrix-Komponenten, im Gegensatz zu SMCs in der Vaskulogenese (Owens, 1995).

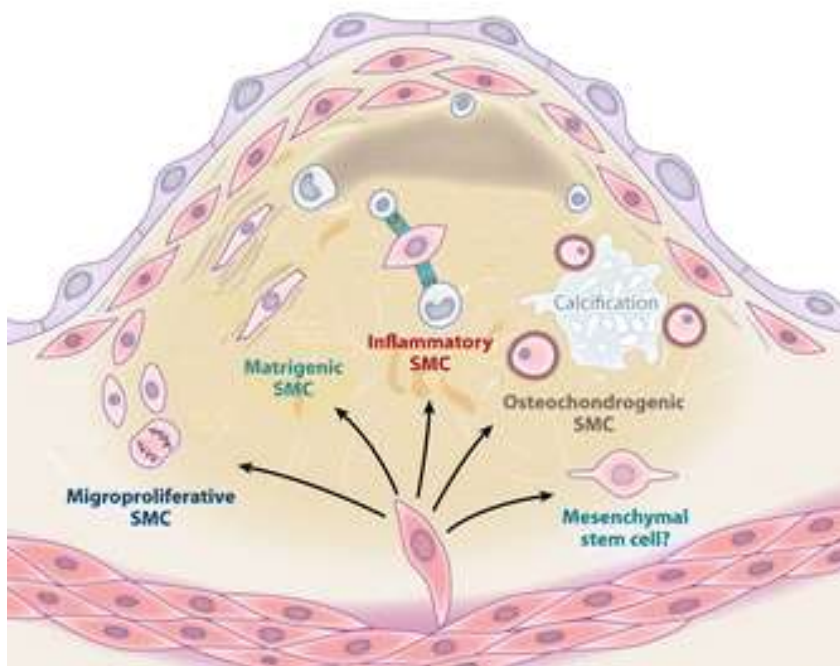


Abbildung 1: Mechanismus der SMC Differenzierung; Migration PDGF-stimulierter SMCs in die Intima (modifiziert nach Alexander & Owens, 2012)

SPCs sind ebenfalls entscheidend an der Neointimabildung und Restenose beteiligt (Schober *et al.*, 2011). So konnte im Maus-Modell bei Restenose nach Angioplastie, Transplantatvaskulopathie und Hyperlipidämie-induzierter Arteriosklerose gezeigt werden, dass Progenitorzellen aus dem Knochenmark zu einem Ansteigen der neointimalen SMCs im erkrankten Gefäß führen (Sata *et al.*, 2002). Ebenfalls im Maus-Modell wurde gezeigt, dass

Einleitung

zirkulierende SPCs zu Neointimabildung und Reendothelialisierung nach mechanischer Gefäßverletzung beitragen (Tanaka *et al.*, 2008).

Yu *et al.* (2011) fand in fortgeschrittenen arteriosklerotischen Plaques aus dem Knochenmark stammende SMC-ähnliche Zellen, die proinflammatorische Cytokine und Mitogene sezernieren und so Arteriosklerose fördern (Yu *et al.*, 2011). Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung besteht ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Gefäßverletzung und der Konzentration von SPCs im peripheren Blut. Mit zunehmender Endothelverletzung zeigte sich eine höhere Konzentration der SPCs (Jie *et al.*, 2010a). Basierend auf solchen Studien wird die Steuerung der Bildung von SPCs auch als vielversprechende Behandlungsstrategie für verschiedene arteriosklerotische Krankheiten angesehen.

1.3.3 Detektion zirkulierender vaskulärer Progenitorzellen

CD34 wird vorwiegend in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Auch die aus dem Knochenmark freigesetzten Vorläuferzellen für EPCs und SMCs sind CD34 positiv (CD34⁺) (Simper *et al.*, 2002). Viele Studien, die sich mit der Rolle der aus dem Knochenmark freigesetzten Zellen in der Gefäßreparatur beschäftigten, verwenden daher CD34 als Oberflächenmarker (Inoue *et al.*, 2007) .

Zahlreiche *in vivo* Studien zeigten Unterschiede in der Proliferation der zirkulierenden CD34⁺ Zellen bei Patienten mit und ohne Restenose. Die Mobilisierung von CD34⁺-Zellen nach Stent-Implantation ist assoziiert mit der Ausbildung einer In-Stent-Restenose (Inoue *et al.*, 2007; Schober *et al.*, 2005) und der gesteigerten Vermehrung von SMCs (Inoue *et al.*, 2007). Während bei Restenose-Patienten die Zahl der CD34⁺-Zellen im peripheren Blut im Vergleich zum Ausgangswert signifikant stieg, sank sie bei Patienten ohne Restenose (Schober *et al.*, 2005) Auch Inoue *et al.* fand eine signifikant erhöhte Freisetzung von CD34⁺-Zellen aus dem Knochenmark bei Patienten mit In-Stent-Restenose im Gegensatz zu Patienten ohne Restenose (Inoue *et al.*, 2007). Dagegen wies George *et al.* niedrigere Konzentrationen von CD34⁺ EPCs bei Patienten mit diffuser In-Stent-Restenose im Vergleich zu Patienten ohne Restenose nach (George *et al.*, 2003).

Einleitung

Zur Unterscheidung von EPCs und SPCs werden verschiedene Oberflächenmarker bei der Detektion verwendet. In vielen Untersuchungen wurden EPCs anhand ihrer Oberflächenmarker CD34 und VEGF-A (KDR) identifiziert (Bonello *et al.*, 2012; Fadini *et al.*, 2008; Schober *et al.*, 2011). Für die Identifizierung von SPCs wird als zusätzlicher Marker das Stammzell-spezifische Antigen PDGF- β (CD140b) verwendet (Schober *et al.*, 2011). CD140b wird nicht in EPCs exprimiert (Raines, 2004) und ist für die Rekrutierung von SMCs während der embryonalen Blutgefäßentwicklung essentiell (Hellstrom *et al.*, 1999).

In zahlreichen Versuchen konnte eine deutliche Steigerung der Expression des PDGF- β -Rezeptors nach Gefäßverletzung nachgewiesen werden, während die Expression von PDGF- α unverändert blieb. (Giese *et al.*, 1999) Wird dieser Rezeptor blockiert, kann die Bildung der Neointima inhibiert werden. (Giese *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2008)

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Untersuchung

In der vorliegenden Studie sollte die Rolle der Subpopulationen hämatopoetischer CD34⁺ Stammzellen beim Menschen bei der Ausbildung von Restenosen nach Stentimplantation untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden, ob der Anteil von EPCs und SPCs an den CD34⁺ Zellen im peripheren Blut mit dem Risiko einer Restenose nach der Implantation eines Stents korreliert. Zur Unterscheidung von SPCs und EPCs wurden spezielle Oberflächenmarker detektiert. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg der SPC-Zellzahl im peripheren Blut und dem Auftreten von Restenosen nach Stentimplantation vorliegt.

Material und Methoden

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien und Verbrauchsmittel

2.1.1 Antikörper

Monoklonaler Antikörper Maus IgG₁ anti-CD34-FITC, Becton Dickinson GmbH

Monoklonaler Antikörper Maus IgG_{2a} anti-PDGFR β (CD140b)-PE, Becton Dickinson GmbH

Monoklonaler Antikörper Maus IgG₁ anti-VEGFR2 (KDR)-PE, R&D Systems

Monoklonaler Antikörper Maus IgG₁ κ anti-human IFN- γ , Becton-Dickinson Pharmingen

Monoklonaler Antikörper Maus IgG_{2a}, Becton-Dickinson Pharmingen

Monoklonaler Antikörper Maus IgG₁, AbD Serotec

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Butterfly, Abbott, Irland

FACS-Röhrchen, Becton Dickinson GmbH

Filterpapier, Schleicher & Schnell BioScience

Monovetten[®] EDTA 7.5 ml, Sarstedt, Nümbrecht

Parafilm „M“, Brand

Pipettenspitzen, Gilson

Sterile Filter (Porengröße 0,20 μ m, Minisart), Sartorius Biotech GmbH

2.1.3 Lösungen

Lysis-Puffer:

8,29 g	Ammoniumchlorid
1 g	Kaliumhydrogencarbonat
37 mg	Natrium-EDTA
ad 100 ml	Aqua dest.

PBS 0,5 % BSA (pH 7,0 – 7,6; 0,01 M):

Material und Methoden

0,74 g	Dinatriumhydrogenphosphat
3,6 g	Natriumchlorid
0,21 g	Kaliumdihydrogenphosphat
2,5 g	BSA
ad 500 ml	Aqua dest.

2.2 Geräte und Zubehör

2.2.1 Geräte

Durchflusszytometer (FACSCalibur™), Becton Dickinson GmbH

Pipetman P20, P200, P1000, Gilson

Kühlzentrifuge (Mikro200R), Hettichlab

Magnetrührer, Heidolph

Rührmagnet, Roth

Waage (Adventurer™ Balances), Ohaus GmbH

Vortex

2.2.2 Software

Excel 2007, Microsoft

Prism 5.04, GraphPad

Win MDI 2.8®, J. Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, Ca, USA

2.3 Patientenkohorte und Studiendesign

Achtundfünfzig Patienten mit koronarer Herzerkrankung unterzogen sich im Zeitraum von November 2006 bis Juli 2007 einer PCTA mit Stentimplantation in der kardiologischen Abteilung der Medizinischen Poliklinik, Klinikum der LMU München. Bei 25 dieser Patienten erfolgte in einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren nach der Intervention eine Re-Angiographie. Diese Patienten stellen die Kohorte dieser Arbeit dar.

Material und Methoden

Zum Zeitpunkt der Implantation (T0) und 12 h nach Stent-Implantation (T1) wurde den in die Studie eingeschlossenen Patienten Vollblut zur Bestimmung der EPC- und SPC-Zellzahl entnommen. Bei allen 25 Patienten erfolgte drei bis 15 Monate später eine erneute Koronarangiografie zur Bestimmung des Lumendurchmessers.

Als Ausschlusskriterien galten eine Krebserkrankung, ein akutes entzündliches Geschehen und ein Herzinfarkt innerhalb der letzten zwei Wochen. Das Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Universität München stimmte dem Studienprotokoll zu. Nach Aufklärung der Patienten wurde deren schriftliche Zustimmung eingeholt.

2.4 Diagnostik, Operation

2.4.1 Anamnese

Bei einer Eingangsanamnese wurden Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index (BMI), Vorerkrankungen (Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Bluthochdruck), Rauchverhalten, Auftreten eines akuten oder früheren Herzinfarktes und die Medikation (β -Blocker, ACE Inhibitor, ASS + Clopidogrel, Statin) der Probanden erfasst.

2.4.2 Stentimplantation

Die Implantation der Stents erfolgte nach Standardprotokollen mittels Führungskatheter meist über die Arteria femoralis, welche in der Leistengegend punktiert wurde.

2.4.3 Quantitative Koronarangiografie

Die koronaren Angiogramme wurden von erfahrenen Kardiologen an einer digitalen biplanen Röntgenanlage (Polydiagnost C LARC, Philips) durchgeführt. Zur Sondierung des Ostiums der

Material und Methoden

rechten und linken Herzkranzarterie wurden in der Regel ein 6F Koronarkatheter (JR/JL 4 Cordis, Haan) und Iopromid (Ultravist® 370, Schering) als Röntgenkontrastmittel benutzt.

Nach steriler Abdeckung des Punktionsbereichs wurde unter lokaler Infiltrationsanästhesie der Leistenregion mit 1 %iger Xylocainlösung die Femoralarterie punktiert und eine Schleuse eingebracht. Nach intravenöser Applikation von durchschnittlich 5000 IE Heparin und Entlüftung der angeschlossenen Systeme, wurde unter Röntgenkontrolle ein Koronarkatheter zum Ostium der Koronararterien vorgeschoben. Zum Ausschluss von Koronarspasmen und um eine maximale Weitstellung der Gefäße sicherzustellen, wurden intrakoronar durchschnittlich 0,25 mg Nitroglycerin appliziert.

Zur Darstellung der Gefäße wurde über den Katheter durchschnittlich 10 ml Röntgenkontrastmittel als Bolus injiziert. Durch multiple, standardisierte Angulationen und Rotationen der zwei möglichst orthogonalen Durchleuchtungsebenen wurde eine verkürzungs- und überlagerungsfreie Darstellung der betreffenden Koronararteriensegmente angestrebt. Die so erhaltenen Angiografiesequenzen wurden gespeichert und standen digital zur Analyse zur Verfügung.

Um die Lumen-Dimensionen möglichst vergleichbar zu ermitteln, wurde ein automatisches Grenzerkennungssystem (QCA Version 1.0) angewandt. Nach Kalibrieren der Spitze des kontrastmittelgefüllten Katheters (meist 6 French) erfolgte die erste Auswertung kurz vor (Abb. 2A), die zweite unmittelbar nach der Stentimplantation (Abb. 2B). Die dritte Messung wurde im Anschluss an die Kontroll-Angiografie nach 3 bis 15 Monaten ausgewertet (Abb. 2C).

Es wurde versucht, für alle Messungen die gleichen Projektionen zu verwenden. Als Werte wurden minimaler Lumendurchmesser (MLD), Referenzdurchmesser (RD), sowie der prozentuale Wert der Stenose ermittelt. Eine Lumenzunahme nach der Intervention wurde anhand der Differenz zwischen dem MLD vor und nach der Intervention ermittelt. Ein späterer Lumenverlust wurde durch die Differenz zwischen dem MLD nach erfolgter Intervention und dem MLD bei der Follow-Up Angiografie ermittelt.

Material und Methoden

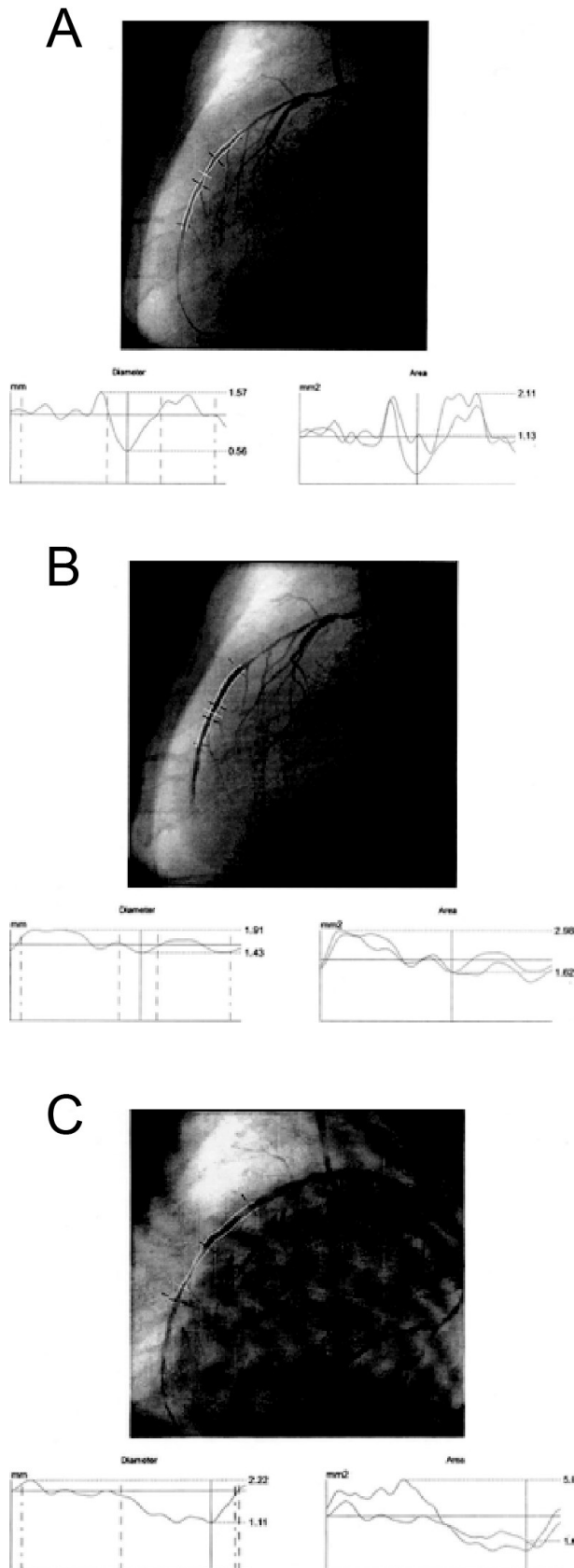


Abbildung 2: Auswertung der quantitativen Koronarangiografie.

(A) Analyse einer Koronarstenose unmittelbar vor der Intervention. Die hochgradige Stenose wurde zur Ermittlung des Stenosegrads markiert. (B) Koronarangiografie nach erfolgreicher Stentimplantation. Das verengte Lumen ist deutlich erweitert und die Durchblutung des Gefäßes sichtbar verbessert. (C) Erneute Einengung des Lumens über 50% im Bereich des implantierten Stents (sog. In-Stent-Restenose).

Material und Methoden

Die Beurteilung der Sequenzen sowie die Quantifizierung des Stenosegrades fand verblindet und ohne Kenntnis der Vorbefunde statt. Dabei entsprach Grad 1 einem Normalbefund, Grad 2 geringen Wandunregelmäßigkeiten mit einer Lumenreduktion $< 30\%$, Grad 3 Wandunregelmäßigkeiten mit einer Lumenreduktion $< 50\%$, Grad 4 einer signifikanten Gefäßstenose $\geq 50\%$ und Grad 5 einer hochgradigen Gefäßstenose $\geq 75\%$. Als Restenose wurde eine Lumenreduktion von mindestens 50% in der Kontroll-Angiografie definiert.

2.4.4 Blutabnahme

Das Vollblut wurde mit EDTA-Monovetten (7,5 ml) entnommen. Die ersten Proben (T0) stammten aus dem Herzkatheter-Labor und wurden über den arteriellen Zugang unmittelbar vor der Stentimplantation abgenommen. Eine Heparinisierung erfolgte bedarfsgerecht und gewichtsadaptiert nach dem üblichen Schema.

Die zweite Blutprobe (T1) wurden zwischen 12 und 72 h nach der Stent-Implantation auf der jeweiligen Station entnommen. Es wurden ebenfalls EDTA-Monovetten verwendet.

Beide Blutproben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert. Eine Weiterverarbeitung fand innerhalb von 7 h statt.

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Färbung der Proben

Zur Identifizierung einzelner Zellpopulationen mit dem Durchflusszytometer (fluorescent activated cell sorting, FACS) wurden die Epitope mittels monoklonaler Antikörper in direkter Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoresceinisothiocyanat (FITC – Kanal 1) oder Phycoerythrin (PE – Kanal 2) gekoppelt. (Tabelle 1).

Material und Methoden

Die Farbstoffe haben unterschiedliche Absorptions- und Emissionsmaxima. Dies macht die Differenzierung verschiedener Zellpopulationen abhängig von den Bindungseigenschaften der Zelle möglich.

Für die Färbungen wurden je 100 µl Vollblut aus EDTA-Monovetten mit Gilson Pipetman (20-200 µl) Pipetten in 5 FACS-Röhrchen aliquotiert und die entsprechenden Antikörper zugegeben (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: Bei der Doppelfärbung verwendeten Antikörper und Konzentrationen

CD34+CD140b	CD34+KDR	Iso-Kontrolle CD34+CD140b	Iso-Kontrolle KDR	Kontrolle
100 µl Vollblut	100 µl Vollblut	100 µl Vollblut	100 µl Vollblut	100 µl Vollblut
10 µl CD34 (FITC) + 10 µl CD140b (PE)	10 µl CD34 (FITC) + 10 µl VEGFR2/ KDR (PE)	10 µl Isotyp anti-mouse IgG ₁ (FITC) + 10 µl Isotyp anti-mouse IgG _{2a} (PE)	10 µl Isotyp anti-mouse IgG ₁ (FITC) + 5 µl Isotyp anti-mouse IgG ₁ (PE)	-

Die Autofluoreszenzkontrolle (Röhrchen 5) wurde der kompletten Prozedur unterzogen. Nach Zugabe der Antikörper-Lösung wurden die Röhrchen mit Parafilm verschlossen, jeweils ca. eine Sekunde mit dem Vortex suspendiert und anschließend zur Antikörperbindung 30 Minuten auf Eis im Dunklen inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation zur Lyse der Erythrozyten wurden die Proben mit BD FACS Lysing Solution 10x, das zuvor 1:10 mit Aqua dest. verdünnt wurde, aufgefüllt und gespült.

Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit, wurden die Zellen für 5 Minuten gewaschen. Zuerst wurden die Proben bei 350g (RCF; relative centrifugal force) ungekühlt zentrifugiert. Dadurch konnte der Überstand abgetrennt und entsorgt werden. Dann wurden die Probe zweimal mit 1 ml PBS 0,5 % BSA (bovines serum albumin) gespült, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, bevor sie erneut zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen

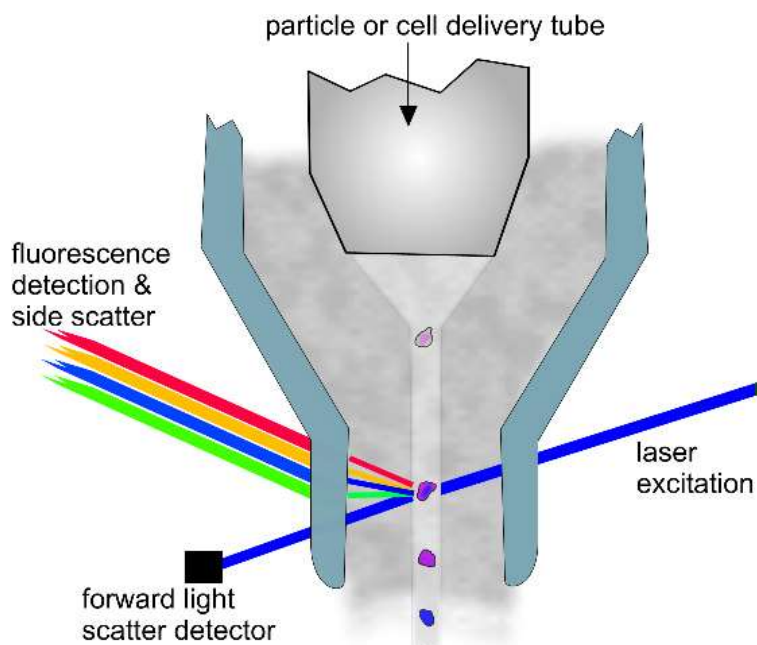
Material und Methoden

und das am Boden des Glasröhrchens verbliebene Zellmaterial wurde anschließend nach Resuspendierung durchflusszytometrisch untersucht.

Die Untersuchung der Proben fand innerhalb eines Zeitraums von sieben Tagen statt. In der Zwischenzeit wurden die Proben bei 4 °C Grad Celsius gelagert.

2.5.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting - FACS) ist es möglich, eine molekulare Charakterisierung intakter Zellen vorzunehmen. Die suspendierten Zellen werden innerhalb eines Hüllstroms im rechten Winkel an einer Lichtquelle vorbeigeführt. (



3)

Material und Methoden

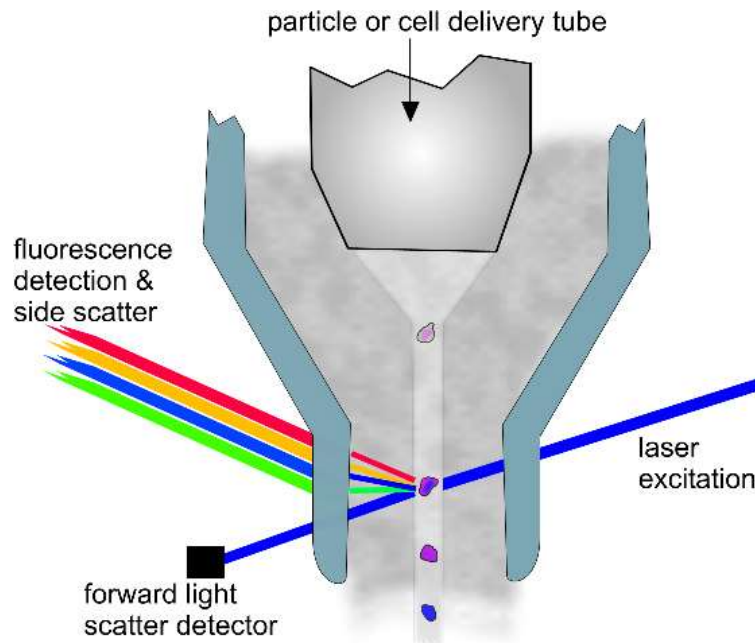


Abbildung 3: Prinzip der Durchflusszelle. Zellen passieren optischen Messpunkt
(www.cytometryforlife.org)

Ein langsam fließender Probenstrom und ein schneller Hüllstrom stellen sicher, dass die Zellen einzeln und hydrodynamisch fokussiert detektiert werden. Anschließend wurden die Zellen verworfen.

Bei dem verwendeten FACS-Gerät werden zwei Kanäle erfasst:

Kanal 1 (FL-1): Emission bei 530 nm, z. B. FITC

Kanal 2 (FL-2): Emission bei 580 nm, z. B. PE

Da in dieser Studie sehr kleine Zellpopulationen Gegenstand der Untersuchung waren, wurde verstärkt Wert daraufgelegt, potentielle Störfaktoren auszuschließen.

Da das Farbspektrum eines Farbstoffes (z. B. FITC) auch zu einem gewissen Teil in den für „PE“ vorgesehenen Kanal strahlt (sogenannte spektrale Überlappung), wurde das FACS-Gerät mittels Calibration-Beads kalibriert und so die korrekte Kompensation eingestellt. Es konnte so ein für das verwendete FACSCalibur spezifischer Wert ermittelt werden, um welchen ein Signal rechnerisch korrigiert werden muss, damit ein korrektes Ergebnis erhalten wird:

Kanal 1 (FL-1): Emission – 0,5 % (FL-2)

Material und Methoden

Kanal 2 (FL-2): Emission – 25,4 % (FL-2)

Kanal 3 (FL-3): nicht belegt

Mittels Isotypkontrollen wurde die Spezifität der markierenden Antikörper überprüft. Dafür wurden Antikörper aus der gleichen Spezies eingesetzt, die den gleichen Subtyp aufweisen wie der markierende Antikörper. Sie binden jedoch nicht spezifisch an die Zielzellen und markieren somit auch nicht die zu detektierende Zellpopulation. Folgende Isotypkontrollen wurden verwendet: Als Negativkontrollen für Maus anti-human CD34-FITC-konjugierten und für die PE-konjugierten Maus anti-human CD140b und KDR wurden anti-mouse IgG1 (FITC) und IgG2 (PE) Isotypkontrollen für die Doppelfärbungen verwendet. Die Einstellungen für die FITC und PE Kanäle wurden mit Hilfe der Isotypenkontrollen so justiert, dass sich alle gemessenen Zellen im unteren linken Quadranten befinden. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des proteinfreien Waschpuffer PBS am Fc-Fragment, wurde dem PBS 0,5 % bovines Serumalbumin (BSA) beigemischt.

2.5.3 Auswertung der FACS-Daten

Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mit dem Programm WinMDI, Version 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Zunächst wurde in einem farbigen Punktdiagramm (Dotplot) der Forward (FSC)- und Sidescatter (SSC) die Lymphozytenpopulation ermittelt (Abb. 4A). Der Zelldetritus wurde bei Erstellung der Grafik durch Einstellen eines Schwellenwertes, der sich auf die Kontroll-Proben bezog, ausgeblendet. Die detektierten Zellen liegen auf der FSC-Achse rechts davon. Bei jeder Messung wurden insgesamt 50.000 Zellen gemessen.

Material und Methoden

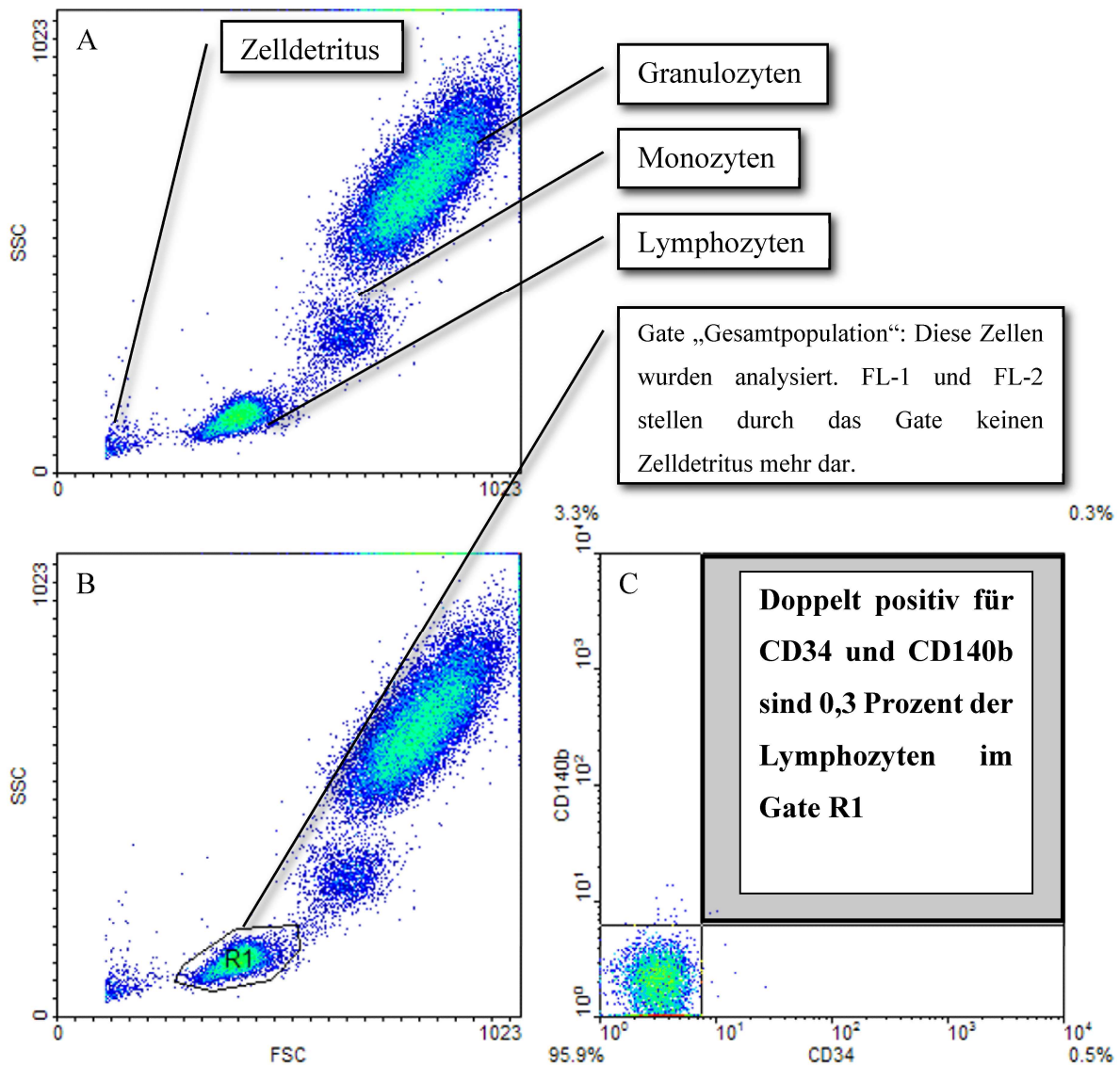


Abbildung 4: Exemplarische Darstellung durchflusszytometrischer Analysen nach Doppelfärbung mit CD34 (FITC) und CD140b (PE).

Exemplarisch am Beispiel der Doppelfärbung mit CD34 (Fluorochrom FITC) und CD140b (Fluorochrom PE) wurden die SPCs, die sich durch diese Oberflächenantigene auszeichnen, detektiert. (A) Gesamtzellpopulation; (B) Zellfraktion (Gate R1), die weiter analysiert wurde; (C) CD34⁺-CD140⁺-positive Zellen. Der grau markierte Bereich zeigt die doppelt positiven Zellen. SSC = Side scatter; FSC = Forward scatter

Es wurde die Lymphozyten-Population durch setzen eines Gates (R1) ausgewählt und hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten der Farbstoffe FITC und PE ausgewertet (Abb. 4B). Die Fluoreszenzintensitäten in Gate R1 wurden in der Y (PE)- und X-Achse (FITC) eines Punkt-Diagramms aufgetragen und die Zellzahl in den vier Quadranten bestimmt (Abb. 4C).

Material und Methoden

Die Quadranten enthielten entweder CD34⁺/CD140b⁻ bzw. KDR⁻, CD34⁺/CD140b⁺ bzw. KDR⁺, CD34⁻/CD140b⁻ bzw. KDR⁻, CD34⁻/CD140b⁺ bzw. KDR⁺ definiert. Die Aufteilung in CD34⁺ und CD140b⁺ (oder KDR⁺) Zellen ergibt sich aus der Doppelfärbung mit beiden Farbstoffen (FITC, PE). Die in der CD34⁺/CD140b⁺ Population enthaltenen Zellen wurden als SPCs und die in der CD34⁺/KDR⁺ Population als EPCs definiert. Zunächst wurde aus dem Differentialblutbild (x 106/l) die Gesamt-Lymphozytenzahl bestimmt. Diese Gesamtmenge wurde mit 100 Prozent gleichgesetzt. Dann wurden hieraus in den Quadranten jeweils 50.000 Zellen detektiert, der prozentuale Anteil CD34⁺ bestimmt und auf die absolute Zellzahl bezogen. Bei der Auswertung ging es um die Quantifizierung der Änderung der Konzentrationen von SPCs und EPCs.

2.6 Statistische Auswertung

Für paarweise Vergleiche wurde der t-Test für gepaarte Stichproben angewandt. p -Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Es wurde von einer Normalverteilung der Daten und einem ausreichend großen Stichprobenumfang ausgegangen. Ebenso wurde bei dem Test vorausgesetzt, dass die Varianz – das Maß für die Streuung der Stichproben – für beide Grundgesamtheiten gleich ist.

Mit dem **exakten Fisher-Test** (auch Fisher-Yates-Test und exakter Chi-Quadrat-Test genannt) wurde die statistische Signifikanz der Unabhängigkeit von Häufigkeiten in einer Kontingenztafel getestet. Als „exakt“ bezeichnet man diesen Test, da er im Gegensatz zu vielen anderen statistischen Verfahren auch bei kleinem Stichprobenumfang exakte Werte liefert, wohingegen viele andere Tests sich erst mit einer steigenden Probenzahl dem gesuchten Signifikanzwert nähern.

Über den **Korrelationskoeffizienten nach Pearson** wurde auf den linearen Zusammenhang (bzw. Korrelation) zweier Variablen geschlossen. Die erhaltenen, dimensionslosen Werte liegen zwischen -1 und 1, wobei 0 keinerlei linearem Zusammenhang entspricht, der Wert 1 (bzw. -1) für einen vollständig positiven (bzw. negativen) Zusammenhang.

Material und Methoden

Die statistische Auswertung dieser Tests wurde mittels GraphPad Prism 5.04 für Windows (©1992-2010 GraphPad Software, Inc.) sowie Microsoft Excel 2007 für Windows erstellt.

Ergebnisse

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientencharakteristika

Die Daten von achtundfünfzig Patienten die sich im Zeitraum dieser Arbeit einer Behandlung mit Stentimplantation in der kardiologischen Abteilung der Poliklinik München unterzogen, wurden initial gesichtet. In einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren nach der Intervention erfolgte allerdings nur bei 25 Patienten eine Re-Angiographie. Es konnten also letztendlich nur diese 25 Patienten ausgewertet werden.

Bei fünf der 25 Patienten trat angiografisch eine Restenose auf (Tab. 2). Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Alters, Geschlechts, Body Mass Index, Zigarettenkonsum, akutem Herzinfarkt und Vorerkrankungen (Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Bluthochdruck) zwischen Patienten mit und ohne Restenose gefunden. Dyslipidämie war in der Gruppe ohne Restenose etwas häufiger vorhanden (70 % gegenüber 40 %), jedoch bestand kein signifikanter Unterschied (Tab. 2). Auch die Einnahme von β -Blockern, ACE-Inhibitor, ASS und Clopidogrel oder Statin beeinflusste die Ausbildung einer Restenose nicht signifikant. Patienten mit Restenose hatten jedoch signifikant häufiger einen früheren Herzinfarkt als Patienten ohne Restenose.

Ergebnisse

Tabelle 2: Klinische Basisdaten aus Befunden und Anamnesebögen.

Variable	Patienten ohne Restenose	Patienten mit Restenose	p Wert
	n = 20	n = 5	
Klinische Basisdaten			
Alter (Jahre)	65,8 ± 11,0	59,8 ± 15,2	0,320
Geschlecht (%)			0,558
Männlich	18 (90 %)	4 (80 %)	
Weiblich	2 (10 %)	1 (20 %)	
Body Mass Index (kg/m ²)	28,5 ± 4,4	27,6 ± 3,2	0,687
Diabetes mellitus	11 (55 %)	3 (60 %)	0,848
Dyslipidämie	14 (70 %)	2 (40 %)	0,228
Bluthochdruck	15 (75 %)	3 (60 %)	0,524
Raucher	9 (45 %)	3 (60 %)	0,567
Akuter Herzinfarkt	2 (10 %)	0 (0 %)	0,482
Früherer Herzinfarkt	5 (25 %)	4 (80 %)	0,021
Medikation			
β-Blocker	18 (90 %)	4 (80 %)	0,558
ACE Inhibitor	11 (55 %)	4 (80 %)	0,328
ASS + Clopidogrel	17 (85 %)	4 (80 %)	0,796
Statin	16 (80 %)	4 (80 %)	1,000

18 der 25 Patienten hatten eine Mehrgefäßerkrankung (Tab. 3). Bei Restenosepatienten war nur der Ramus circumflexus und die Arteria coronaria dextra betroffen, während im Ramus interventricularis anterior keine Restenose gefunden wurde (Tab. 3). Der Ramus interventricularis anterior war jedoch das Gefäß, das bei der Hälfte der Patienten ohne

Ergebnisse

Restenose mit einem Stent versorgt wurde. Sowohl die Stentlängen (21,6 mm versus 18,8 mm) als auch die Stentdurchmesser (3,1 mm versus 3,2 mm) waren in beiden Gruppen nahezu identisch.

Tabelle 3: Läsions- und Behandlungsdaten (Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe).

Variable	Patienten ohne Restenose	Patienten mit Restenose	p-Wert
	n = 20	n = 5	
Ramus interventricularis anterior	10 (50 %)	0 (0 %)	0,0613
Ramus circumflexus	3 (15 %)	2 (40 %)	0,252
Arteria coronaria dextra	7 (35 %)	3 (60 %)	0,357
Mehrere Gefäße betroffen	15 (75 %)	3 (60 %)	0,597
Mittlere Stentlänge (mm)	21,6 ± 6,0	18,8 ± 5,1	0,823
Mittlerer Stentdurchmesser (mm)	3,1 ± 0,4	3,2 ± 0,3	0,905

3.2 Peri-interventionelle Veränderung der SPC-Zahl bei Restenose

Der Anteil der SPCs und EPCs im Vollblut der Patienten vor (T0) und 12 h (T1) nach einer PTCA mit Stentimplantation wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als SPCs wurden doppelt-positive CD34⁺/CD140b⁺ und als EPCs wurden doppelt-positive CD34⁺/KDR⁺ mononukleäre Zellen definiert.

Zum Zeitpunkt T0 war bei Patienten mit Restenose die Konzentration der EPCs etwas höher als bei Patienten ohne Restenose (0,34±0,12% versus 0,15±0,03%; p=0,037; n=25), während die SPC Konzentration in beiden Gruppen vergleichbar war (0,25±0,12% versus 0,188±0,04%; p=0,50; n=25).

Ergebnisse

Mittels Isotypkontrollen wurde die Spezifität der markierenden Antikörper überprüft. In beiden Zellpopulationen lag der Anteil unspezifischer Bindungen bei weniger als 0,1% der Gesamtpopulation (Siehe Abbildung 5).

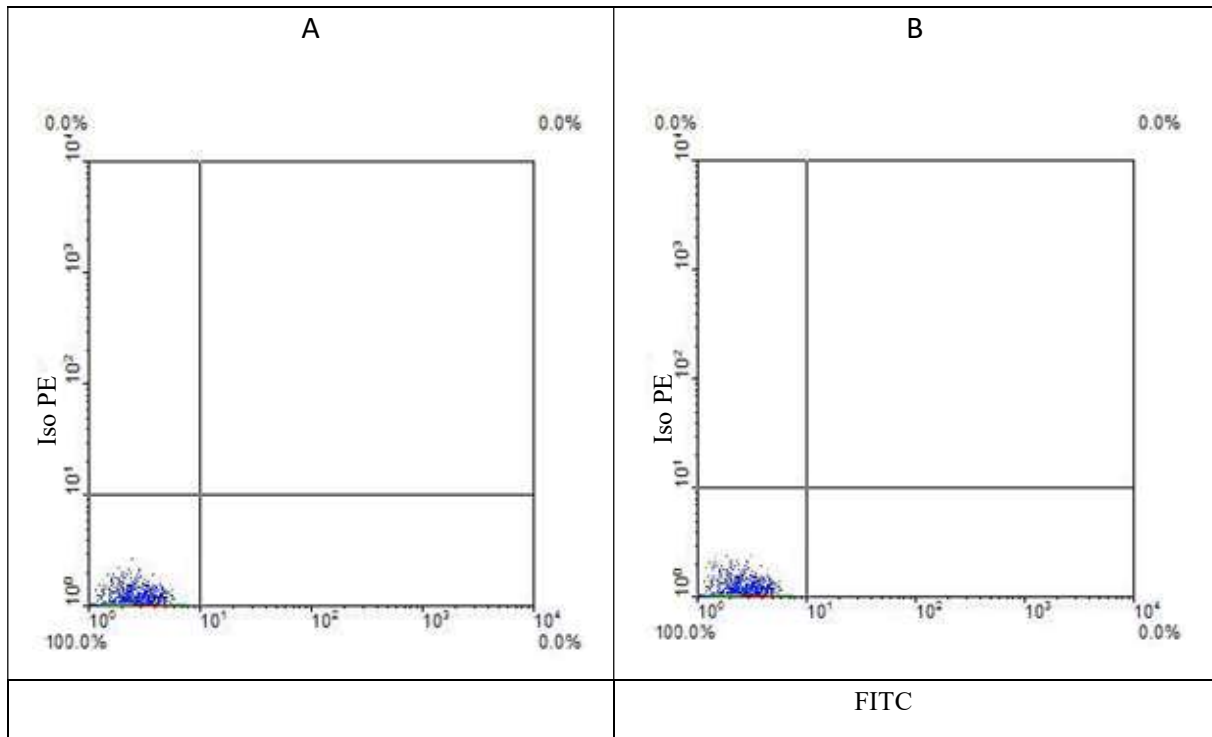


Abbildung 5: Negativkontrollen der Doppelfärbungen in der Durchflusszytometrie.

Doppelfärbung für die Maus anti-human IgG1-FITC-konjugiert (A und B) und Maus anti-human IgG2-PE konjugiert (A) und IgG1 – PE – konjugiert (B).

Um zu untersuchen, ob eine peri-interventionelle Mobilisierung von SPCs mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Restenose einhergeht, wurde der Anteil der zirkulierenden SPCs mit dem Auftreten einer Restenose verglichen. Der Anteil der SPCs ($CD34^+/CD140b^+$) an mononukleären Zellen im Vollblut war in der Restenosegruppe 12 h nach der Intervention signifikant höher als in der Vergleichsgruppe ohne Restenose ($0,260 \pm 0,067\%$ versus $0,115 \pm 0,050\%$; $p = 0,0083$; $n=25$, Abb. 6).

Ergebnisse

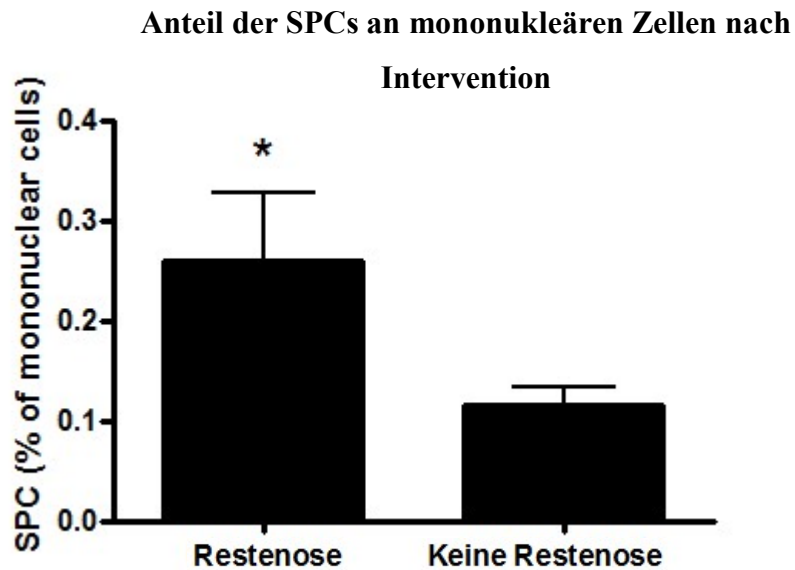


Abbildung 6: Post-interventionelle SPC Zahl und die Entwicklung einer Restenose. Prozentualer Anteil der SPCs an mononukleären Zellen ermittelt mittels Durchflusszytometrie im Vollblut nach Intervention (T1) bei Patienten mit und ohne Restenose. * $p < 0,05$, $n = 25$.

Betrachtet man die absolute Änderung der SPC-Zahl zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zum Zeitpunkt T0 (Abb. 7) zeigte sich, dass die mittlere SPC-Zahl in der Restenosegruppe zunahm ($0,134 \pm 0,080 \times 10^6/l$, $n = 5$) und in der Gruppe ohne Restenose abnahm ($-0,073 \pm 0,037 \times 10^6/l$, $n = 20$). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant ($p = 0,0225$).

Ergebnisse

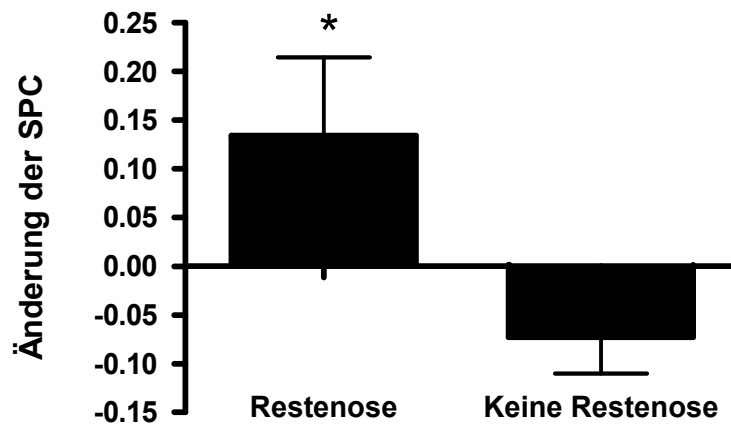


Abbildung 7: Absolute Änderung der Anzahl der SPC-Zellen ($\times 10^6/l$) zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zu T0 bei Patienten mit ($n=5$) und ohne ($n=20$) Restenose ermittelt mittels Durchflusszytometrie. * $p < 0,05$.

3.3 Korrelation der EPC-Zellzahl mit dem Auftreten der Restenose

Der Anteil der EPCs ($CD34^+/KDR^+$) an mononukleären Zellen im Vollblut war nach der Intervention in beiden Gruppen etwa gleich ($0,146 \pm 0,052$ % in der Restenosegruppe versus $0,112 \pm 0,016$ %; $p = 0,1133$; Abb. 8).

Ergebnisse

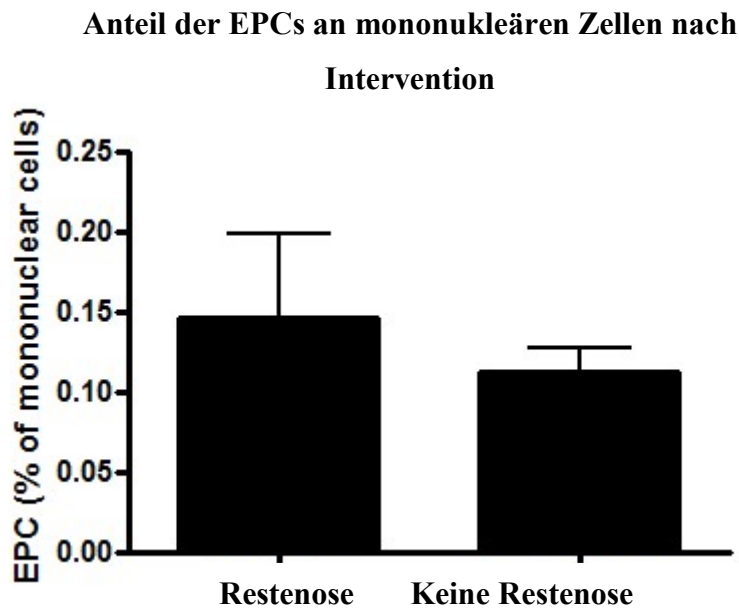


Abbildung 8: Prozentualer Anteil der EPCs an mononukleären Zellen im Vollblut nach Intervention (T1) bei Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie.

Die Abnahme der EPC-Konzentration zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zum Zeitpunkt T0 war in der Restenosegruppe signifikant größer als in der Gruppe ohne Restenose ($-0,266 \pm 0,165 \times 10^6/l$ versus $-0,038 \pm 0,024 \times 10^6/l$; $p = 0,0199$; Abb. 9).

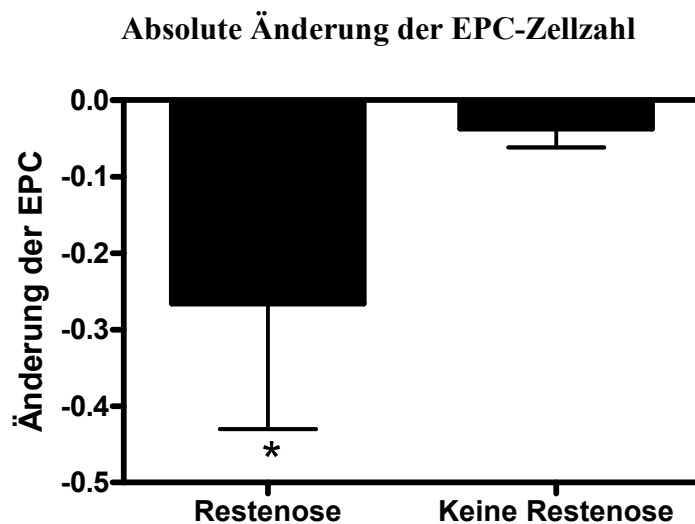


Abbildung 9: Absolute Änderung der Anzahl der EPCs ($\times 10^6/l$) zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zum Zeitpunkt T0 bei Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie. * $p < 0,05$.

Ergebnisse

Ferner wurde die prozentuale Änderung der EPC Zahl zwischen Zeitpunkt T1 und T0 bestimmt. Die EPC Zahl nahm in der Restenosegruppe geringfügig ab und stieg in der Nicht-Restenosegruppe leicht an. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war jedoch nicht statistisch signifikant. ($-43,52 \pm 22,31\%$ versus $15,63 \pm 14,97\%$; $p = 0,0788$; Abb. 10).

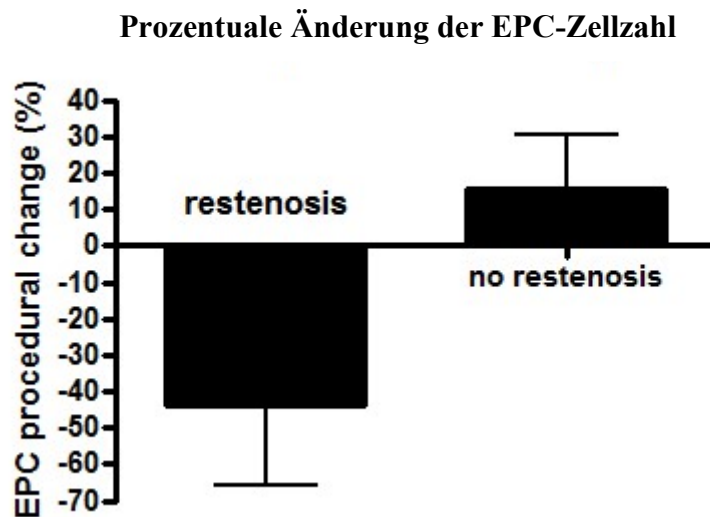


Abbildung 10: Prozentuale Änderung der Anzahl der EPC-Zahl im Vollblut zwischen T1 und T0 in Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie.

3.4 Korrelation der CD34⁺-Zellzahl mit dem Auftreten der Restenose

Die Konzentration CD34⁺ hämatopoetischer Progenitorzellen in der Zirkulation veränderte sich zwischen Zeitpunkt T0 und T1 signifikant in der Restenosegruppe (Abb. 11). Es zeigte sich in dieser Gruppe ein Anstieg um $0,286 \pm 0,2741 \times 10^6/l$ CD34⁺ Zellen. Im Unterschied dazu nahmen die CD34⁺ Zellen in der Gruppe ohne Restenose nach der Intervention um $0,078 \pm 0,058 \times 10^6/l$ ab. Die Differenz zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant ($p = 0,048$).

Ergebnisse

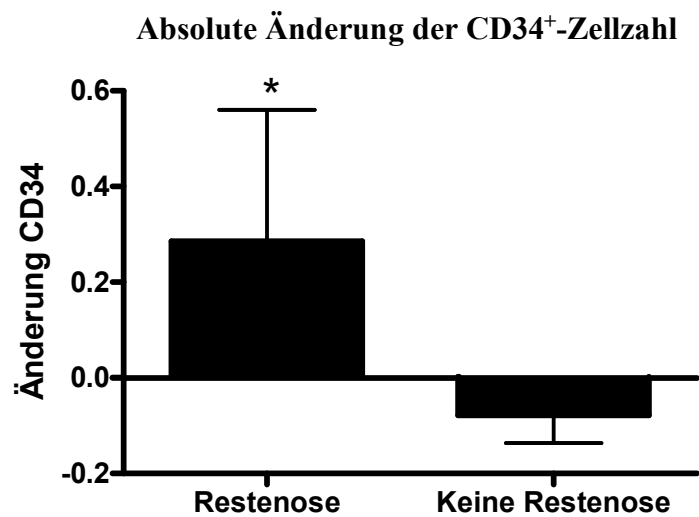


Abbildung 11: Absolute Änderung der Anzahl der CD34⁺-Zellen (x 10⁶/l) nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und bei Patienten ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie. *p<0,05.

Entsprechend der absoluten Änderung der Zellkonzentration, zeigte auch die Auswertung der prozentualen Änderung der CD34⁺-Zellen (Abb. 12) einen Anstieg zwischen T1 und T0 in der Restenosegruppe (118,4 ± 73,8%) und einen Abfall in der Gruppe von Patienten ohne Restenose (-11,5 ± 7,7%). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant (p=0,002).

Ergebnisse

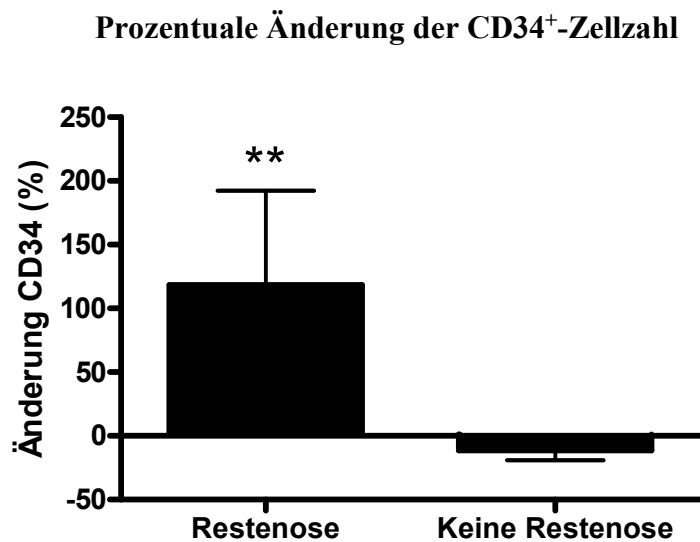


Abbildung 12: Prozentuale Änderung der Anzahl der CD34⁺-Zellen im Vollblut nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie. **p<0,01.

3.5 Korrelation der CD140b⁺-Zellzahl mit dem Auftreten der Restenose

Die Anzahl der platelet derived growth factor receptor β^+ -(CD140b⁺) Zellen im Vollblut der Patienten der Restenosegruppe nahm von T0 auf T1 um $0,79 \pm 1,1 \times 10^6/l$ zu, während sie in der Nicht-Restenosegruppe um $0,63 \pm 0,5 \times 10^6/l$ abnahm (Abb. 13). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,231$).

Ergebnisse

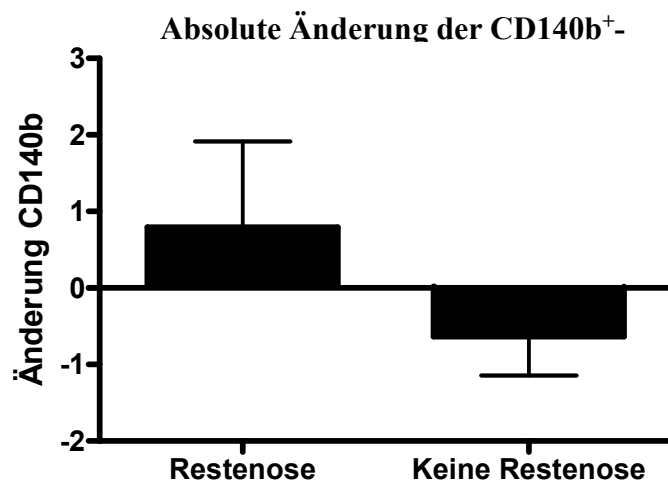


Abbildung 13: Absolute Änderung der Anzahl der CD140b⁺-Zellen (x 10⁶/l) nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und bei Patienten ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie.

Die Auswertung der prozentualen Änderung der Anzahl zirkulierender CD140b⁺-Zellen nach der Intervention (Abb. 14) ergab ebenfalls eine größere Zunahme in der Restenosegruppe als in der Nicht-Restenose-Gruppe (244,1 ± 233,1% versus 6,93 ± 19,9%). Trotz eines niedrigen p Wertes von 0,052 erreichte die Differenz der Werte der zwei Gruppen nicht die Signifikanzgrenze von p = 0,05.

Ergebnisse

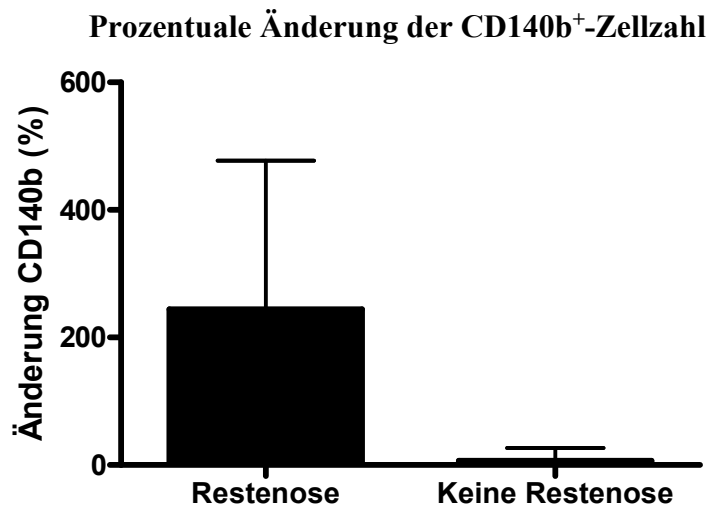


Abbildung 14: Prozentuale Änderung der Anzahl der CD140b⁺-Zellen im Vollblut nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten (n=5) mit und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie.

3.6 Korrelation der KDR⁺-Zellzahl mit dem Auftreten der Restenose

Die Konzentration von zirkulierenden KDR⁺ Zellen (Abb. 15) war zum Zeitpunkt T1 in der Restenosegruppe um $0,65 \pm 0,2 \times 10^6/l$ vermindert und in der Nicht-Restenose-Gruppe um $1,3 \pm 0,5 \times 10^6/l$ angestiegen. Die Differenz zwischen den beiden Gruppen war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,074$).

Ergebnisse

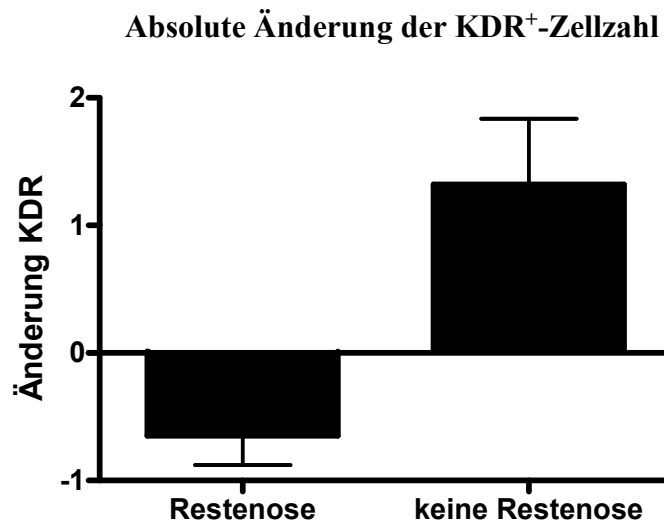


Abbildung 15: Absolute Änderung der KDR⁺-Zellzahl (x 10⁶/l) nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie.

Betrachtet man die prozentuale Änderung ergibt sich ein ähnliches Ergebnis (Abb. 16). Während in der Restenosegruppe die KDR⁺-Zellzahl nach der Intervention um $41,1 \pm 13\%$ abnahm, kam es in der Gruppe von Patienten ohne Restenose zu einem Anstieg der KDR⁺-Zellen um $40,5 \pm 13\%$. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant ($p=0,0062$).

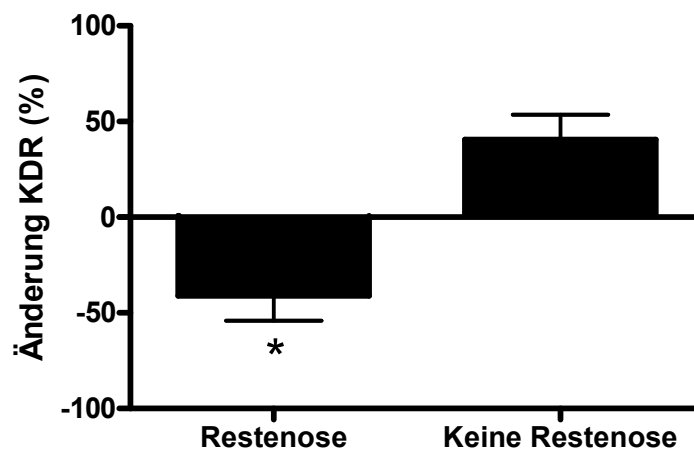


Abbildung 16: Prozentuale Änderung der KDR⁺-Zellzahl nach Intervention im Vergleich zu T0 bei Patienten mit (n=5) und ohne Restenose (n=20) ermittelt mittels Durchflusszytometrie. * $p<0,05$.

Ergebnisse

3.7 Korrelation des Restenosegrad mit der Änderung der CD34⁺-, CD140b⁺- und KDR⁺-Zellzahl

Die absolute Änderung der CD34⁺-Zellekonzentration in der Zirkulation zwischen dem Zeitpunkt T1 und T0 korrelierte gering mit dem Restenosegrad (Pearson $r = 0,3684$; Abb. 17) ermittelt im Zielgefäß der Stentimplantation bei der Follow-up Koronarangiographie. Diese Korrelation lag mit einem Wert von $p=0,07$ knapp unterhalb der Signifikanzgrenze.

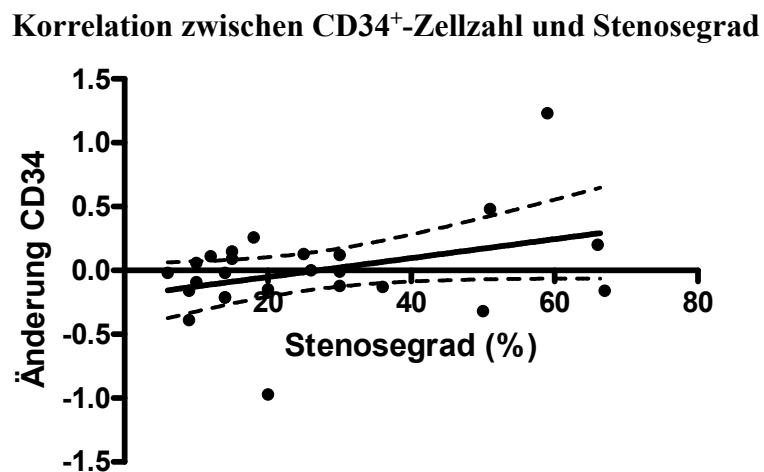


Abbildung 17: Korrelation zwischen der Änderung der CD34⁺-Zellzahl ($\times 10^6/l$) zwischen Zeitpunkt T1 und T0 und dem Stenosegrad im Stent ermittelt bei der follow-up Koronarangiographie (n=25).

Ein Zusammenhang zwischen dem Restenosegrad und der Anzahl der CD140b⁺-Zellen war nicht nachweisbar (Pearson $r = 0,200$; $p = 0,33$; Abb. 18).

Ergebnisse

Korrelation zwischen CD140^{b+}-Zellzahl und Stenosegrad

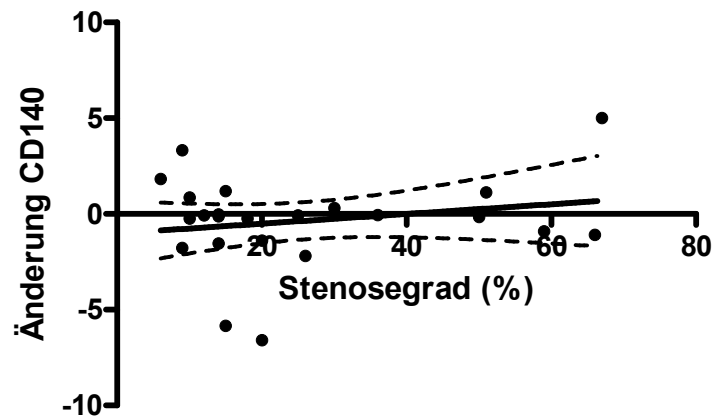


Abbildung 18: Korrelation zwischen der Änderung der CD140^{b+}-Zellzahl (x 10⁶/l) und Stenosegrad ermittelt bei der follow-up Koronarangiographie.

Die Anzahl der KDR⁺-Zellen war negativ korreliert mit dem Stenosegrad (Pearson $r = -0,3737$). Allerdings war diese Korrelation gering und erreicht nicht das geforderte Signifikanzniveau ($p = 0,0658$; Abb. 19).

Korrelation zwischen KDR⁺-Zellzahl und Stenosegrad

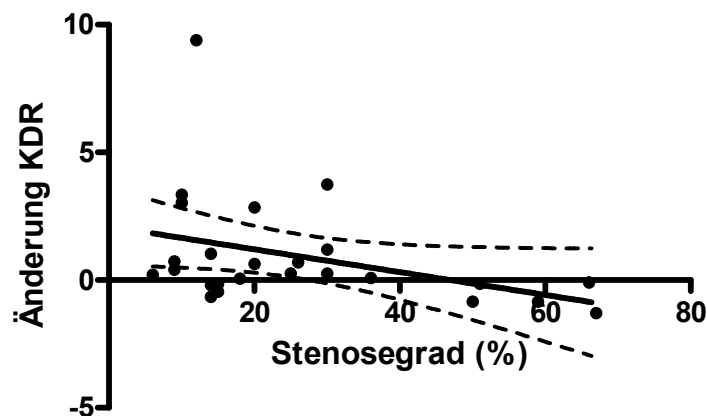


Abbildung 19: Korrelation zwischen der Änderung der KDR⁺-Zellzahl (x 10⁶/l) und dem Stenosegrad ermittelt bei follow-up Koronarangiographie.

Ergebnisse

3.8 Korrelation von Stenosegrad und der Anzahl der SPC- und EPC-Zellen

Die Anzahl der SPC-Zellen war signifikant positiv mit dem Stenosegrad, der mittels quantitativer Koronarangiographie bestimmt wurde, korreliert (Pearson $r = 0,43$; $p < 0,03$; Abb. 20).

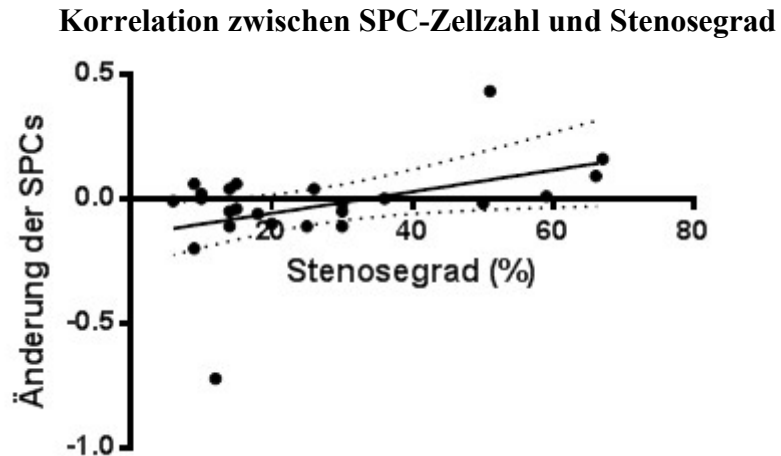


Abbildung 20: Korrelation zwischen der Änderung der SPC-Zahl ($\times 10^6/l$) zwischen T1 und T0 und dem Stenosegrad ermittelt bei follow-up Koronarangiographie.

Ein Zusammenhang zwischen dem Stenosegrad und der Anzahl der EPC-Zellen konnte nicht ermittelt werden (Pearson $r = -0,12$; $p = 0,560$; Abb. 21).

Ergebnisse

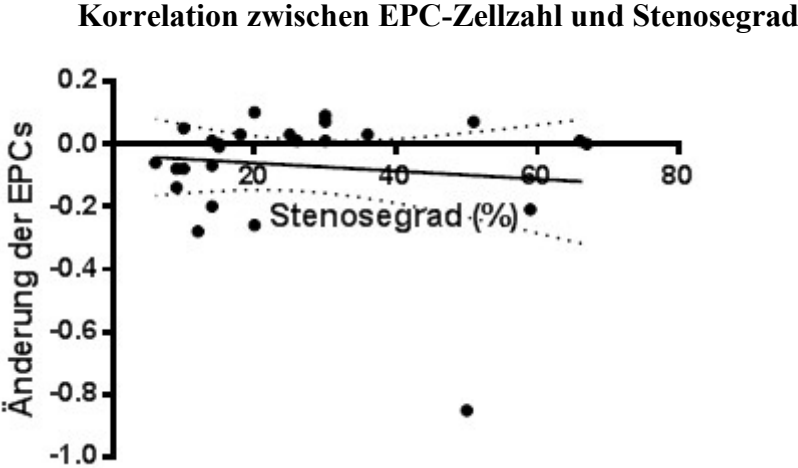


Abbildung 21: Korrelation zwischen der Änderung der EPC-Zahl ($\times 10^6/l$) zwischen T1 und T0 und dem Stenosegrad ermittelt bei der follow-up Koronarangiographie.

4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit untersuchte inwieweit bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, die mittels PCTA behandelt wurden, ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Restenosen nach Stentimplantation und SPC- bzw. EPC-Spiegel besteht. Es wurde mittels CD34/KDR (EPCs) und CD34/CD140b (SPCs) Doppelfärbung untersucht, ob ein Zusammenhang anhand der Anzahl bzw. der Veränderung der Zellzahlen zwischen dem Interventionszeitpunkt und mindestens 12 h später nachweisbar ist. Dabei soll geklärt werden, ob die Bestimmung der Anzahl der SPC- und EPC-Zellen im peripheren Blut tatsächlich helfen kann, das Risiko einer Restenose nach Stentimplantation abzuschätzen und ob ein hoher EPC-Spiegel die Gefäßreparatur positiv beeinflusst und eine überschießende Intimahyperplasie verhindern kann.

CD34 wird überwiegend in hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Zirkulierende CD34⁺-Zellen stellen Progenitorzellen für Endothelzellen und SMCs dar (Simper *et al.*, 2002). Deshalb erlaubt die alleinige Bestimmung der CD34 Expression nicht zwischen EPCs und SPCs zu unterscheiden. Da diese beiden Zelltypen vermutlich gegensätzliche Effekte auf die Restenoseentwicklung haben, ist es erforderlich mittels zusätzlicher Marker, wie CD140b und KDR, die Veränderung von Subpopulationen der CD34⁺ Zellen zu untersuchen.

Einige der bisher veröffentlichten Studien zeigten Unterschiede in der Mobilisierung der CD34⁺-Zellen nach einer Stentimplantation bei Patienten mit und ohne Restenose. Schober *et al.* (2005) fanden nach Bare-Metal-Stent-Implantation eine signifikant erhöhte Freisetzung von CD34⁺-Zellen bei Patienten mit In-Stent-Restenose im Vergleich zu Patienten ohne Restenose.

Das Problem, dass eine genauere Differenzierung zwischen CD34⁺ SPCs und CD34⁺ EPCs in vielen Studien fehlt, führt dazu, dass die Ergebnisse oftmals schlecht zu vergleichen sind. Während sich die Bestimmung der EPCs durch gleichzeitigen Nachweis von CD34 und KDR weitgehend durchgesetzt hat und anerkannt ist, war die Definierung der CD34⁺ SPCs lange schwierig.

Diskussion

4.1 Korrelation der EPC- Zellzahl mit einer Restenose

4.1.1 EPCs

Seit 1997 (Asahara *et al.* 1997) gibt es eine steigende Zahl an Studien, die die Rolle von EPCs bei kardiovaskulären Erkrankungen untersuchen. Tierversuche zeigen, dass EPCs an der endothelialen Homöostase beteiligt sind und die Formation neuer Blutgefäße stimulieren (Werner *et al.*, 2002). Der EPC-Spiegel im peripheren Blut ist bei Patienten mit kardiovaskulärem Risiko und/oder Arteriosklerose reduziert (Fadini *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wird der EPC-Spiegel als Marker für fortschreitende vaskuläre Schäden betrachtet (Rosenzweig *et al.*, 2005). Auch ist ein niedriger EPC-Spiegel ein unabhängiger Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse (Werner *et al.*, 2005).

Ein Beschleunigen der Heilung behandelter Gefäßabschnitte wird in der Praxis gewünscht, um Komplikationen wie Restenosen oder Thrombosen vorzubeugen. Ein erhöhter EPC-Spiegel (z. B. durch EPC-Infusionen) wird mit einer beschleunigten Wundheilung in Verbindung gebracht (Zampetaki *et al.*, 2008). So zeigten beispielsweise Jie *et al.*, dass EPCs, die aus dem Knochenmark freigesetzt werden, in die Reparaturfunktion des Körpers nach Ischämie eingebunden sind (Jie *et al.*, 2010b). Umgekehrt scheint ein zu niedriger EPC-Spiegel zu Problemen bei der Gefäßneubildung zu führen, was sich nicht nur auf den kardiovaskulären Bereich auszuwirken scheint (Garolla *et al.*, 2009).

Zelltherapien, die den EPC-Spiegel wiederherstellen, wurden erfolgreich bei Patienten mit koronaren und peripheren Herzerkrankungen angewandt (Assmus *et al.*, 2002).

4.1.2 EPCs in der Restenose

George *et al.* zeigten anhand der EPC Quantifizierung mittels Bestimmung von colony forming units, dass die zirkulierende EPC Konzentration bei Patienten mit diffuser In-Stent-Restenose im Vergleich zu Patienten ohne Restenose verringert ist (George *et al.*, 2003).

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenfalls in der Restenosegruppe eine Abnahme der EPC-Konzentration nach der Stentimplantation im Vergleich zur Gruppe ohne Restenose. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Daten von George *et al.*, in der die EPCs allerdings mit einer anderen Methode quantifiziert wurden (George *et al.*, 2003). Eine verstärkte Abnahme der EPC-Zellzahl könnte zu einer verlangsamten Re-endothelialisierung nach der Stentimplantation führen und dadurch die Bildung einer In-Stent-Restenose fördern. Allerdings zeigte sich keine Korrelation zwischen der Veränderung der EPC-Zellzahl nach der Stentimplantation und dem Stenosegrad. Ferner war in der aktuellen Studie die EPC-Konzentration bereits vor der Intervention in der Restenosegruppe deutlich höher als in der Gruppe von Patienten ohne Restenose. Diese Daten stehen in Widerspruch zu den Ergebnissen von Haine *et al.*, die bei 124 Patienten keinen Zusammenhang zwischen der EPC Zellzahl vor der Stentimplantation und der Entwicklung einer Neointima gefunden haben (Haine *et al.*, 2014).

Betrachtet man die Oberflächenmarker CD34 und KDR unabhängig voneinander, zeigt sich, dass KDR⁺-Zellen nach der Intervention in der Restenosegruppe abnehmen, während sie in der Gruppe ohne Restenose zunehmen. Dahingegen steigen CD34⁺ Zellen, wie SPCs, in der Restenosegruppe signifikant an. Dies deutet daraufhin, dass sich die Mehrzahl der CD34⁺ Zellen entsprechend den SPCs verhalten und die Doppelbestimmung von KDR und CD34 zur Analyse der EPCs im Vergleich zur alleinigen Quantifizierung der KDR⁺ Zellen wenig zur Steigerung der Spezifität beiträgt.

Die sich widersprechenden Ergebnisse aus verschiedenen Studien können teilweise darauf beruhen, dass es bis heute kein universell akzeptiertes Durchflusszytometrieprotokoll zur spezifischen Detektion von EPCs gibt. Die verschiedenen verwendeten Protokolle führen dazu, dass die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Methoden zur EPC-Quantifizierung moderat bis schlecht ist (Van Craenenbroeck *et al.*, 2008).

In der Zusammenschau der Ergebnisse kristallisiert sich die Erkenntnis heraus, dass ein Nachweis von EPCs ausschließlich mit Hilfe des KDR-Markers alleine, also ohne die Doppelfärbung mit CD34, mindestens genauso gut, wenn nicht sogar besser zu funktionieren scheint.

Diskussion

4.2 Korrelation der SPC-Zellzahl mit einer Restenose

4.2.1 SPCs

Vorläuferzellen von glatten Muskelzellen scheinen eine Rolle bei der Zusammensetzung arteriosklerotischer Plaques zu spielen (Zoll *et al.*, 2008).

In gesunden Gefäßen läuft die Proliferation und Migration von SMCs kontrolliert ab. Eine Überzahl an SMCs scheint einen negativen Einfluss auf die Heilung eines beschädigten Gefäßes zu haben. Die Revaskularisierung eines arteriosklerotisch veränderten Gefäßes mit Stenose führt zwar meistens zu einer Vergrößerung des Lumens und damit einem verbesserten Blutfluss, gleichzeitig aber auch zu einer Beschädigung des Endothels. Bypass-Gefäße hingegen sind frei von Endothelzellen (Vallieres *et al.*, 2009).

Betrachtet man die Komplikationen, die mit einem erhöhten SMC-Spiegel einhergehen, so wäre es ideal die SMC-Proliferation zu reduzieren und trotzdem die Gefäßheilung und Endothelialisierung zu fördern.

Auch die vorliegende Arbeit bestätigte den Zusammenhang zwischen einem Ansteigen der SPCs und dem Vorkommen von Restenosen. Nicht nur der Ausgangsspiegel der SPCs ist signifikant erhöht gegenüber der Nicht-Restenosegruppe. Auch steigt die SPC-Zellzahl in der Restenosegruppe signifikant an, während in der Vergleichsgruppe am Tag nach der Intervention ein Rückgang der CD34⁺/CD140⁺-Zellzahl zu verzeichnen ist. Zahlreiche Studien zeigen ähnliche Ergebnisse (Sata *et al.*, 2002).

Allerdings spielen nicht SPCs alleine eine Rolle bei der Arteriogenese oder beeinflussen die Reparaturmechanismen. MCP-1/CCR2, RANTES/CCR5 sowie Fractalkine/CX₃CR1 sind Chemokin-Chemokin Rezeptor-Paare und regeln die Leukozyteninfiltration. MCP-1/CCR2 und Fractalkine/CX₃CR1 beschleunigt die SMC-Expansion der Neointima, wie Schober *et al.* gezeigt haben (Schober, 2008).

Diskussion

Die Reparaturmechanismen sind gerade im Zusammenspiel der einzelnen Systeme noch zu wenig analysiert und verstanden. Gerade um umfassende therapeutische Konzepte hinsichtlich der vielen beteiligten Komponenten entwickeln und gezielt sowie differenziert die Angiogenese beeinflussen zu können, bedarf es noch erheblicher Forschungsanstrengungen in diesem Sektor. Neben SPCs und EPCs scheinen auch Chemokine eine Rolle bei der Angiogenese und Gefäßreparatur zu spielen. So wurde gezeigt, dass die Hauptstimuli für ihre Proliferation und Freisetzung VEGF, GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor), Erythropoietin, HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren und eine Gewebe-Ischämie sind (Gross & Herbrig, 2004). Es gilt die Mechanismen und Zusammenhänge genau zu analysieren und Möglichkeiten zu finden, in die Abläufe einzugreifen, um therapeutische Konzepte ableiten zu können. Dazu bedarf es jedoch noch erheblicher Forschungsanstrengungen.

4.2.2 SPC in der Restenose

Einen ersten Hinweis darauf, dass zirkulierende $CD34^+CD140b^+$ Zellen vorwiegend SPCs enthalten konnte in der Arbeit von Schober *et al.* gewonnen werden (Schober *et al.*, 2011). In dieser Studie wurde anhand von 187 Patienten untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den zirkulierenden SPC- und EPC-Zahlen und arteriosklerotischen Veränderungen in Herz-Transplantaten besteht. Es konnte bei 87 Patienten eine Transplantatvaskulopathie nachgewiesen werden. Das Auftreten einer Transplantatvaskulopathie war mit erhöhten SPC-Konzentrationen ($CD34^+/CD140b^+$) korreliert. Ein Zusammenhang mit der EPC-Zellzahl ($CD34^+/KDR^+$) konnte nicht festgestellt werden (Schober *et al.*, 2011). Pelliccia *et al.* (2010) zeigten eine höhere Zellzahl von $CD34^+/KDR^+/CD45^-$ -Zellen bei Patienten mit verglichen mit Patienten ohne In-Stent-Restenose. Inoue *et al.* (2007) fanden 3-fach erhöhte $CD34^+$ -Zellzahlen 7 Tage nach Bare-Metal-Stent-Implantation und einen um 30% reduzierten $CD34^+$ -Spiegel 7 Tage nach Implantation eines Drug-Eluting-Stents. Die Mobilisierung von $CD34^+$ -Zellen nach Stent-Implantation war mit der gesteigerten Vermehrung von SMCs assoziiert (Inoue *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Studie stieg bei den Restenosepatienten die $CD34^+$ -Zellzahl nach Stentimplantation signifikant, während sie bei Nicht-Restenosepatienten nicht signifikant sank.

Diskussion

Dabei korrelierte der Stenosegrad stark mit der CD34⁺-Zellzahl. Je ausgeprägter die Stenose war, umso höher war der CD34⁺-Spiegel. Die CD140b⁺-Zahl zeigte keine signifikanten Änderungen nach der Intervention. Sie stieg bei Restenosepatienten und sank bei Patienten ohne Restenose. Die CD140b⁺-Zahl korrelierte auch nicht mit dem Stenosegrad.

Die SPC-Zellzahl stieg bei Patienten mit Restenose nach der Intervention signifikant an, während sie bei Patienten ohne Restenose im Vergleich zur Zellzahl vor der Intervention leicht verringert war. Ferner wurde eine positive Korrelation zwischen dem Stenosegrad und der Änderung der SPC-Zellzahl nach der Stentimplantation gefunden. Diese Resultate geben Hinweis darauf, dass, ähnlich wie im Mausmodell, die Mobilisierung von SPCs durch die akute Gefäßverletzung während der Stentimplantation zu einer vermehrten Neointimabildung führt und auf diese Weise zu einer Restenose beiträgt. In Mausmodellen wurde gezeigt, dass die zirkulierenden SPCs in die verletzte Gefäßwand rekrutiert werden und dort in SMCs differenzieren (Schober et al. 2003).

Insgesamt hat sich im Rahmen dieser Arbeit die Doppelfärbung mit CD34/CD140b für den Nachweis von SPCs bewährt.

4.3 Therapeutische Implikationen

Koronare Stentimplantationen haben zum Ziel eine adäquate Durchblutung des Gefäßes wiederherzustellen. Eine häufige Komplikation nach Stentimplantation ist die Restenose, die eine hohe Mortalitätsrate mit sich bringt. Trotz zahlreicher Forschungsvorhaben in den letzten Jahrzehnten ist der Mechanismus der In-Stent-Restenose noch nicht vollständig verstanden. Auch verlässliche Biomarker, anhand derer Patienten, die eine Reintervention benötigen identifiziert werden können, sind noch nicht bekannt. EPCs und SPCs scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Jedoch ist der Einsatz von EPCs bei der Behandlung von KHK-Patienten noch nicht ausgereift (Barsotti *et al.*, 2009). Um eine Restenose zu verhindern, scheinen hohe EPCs positiv zu sein, während sich hohe SPCs negativ auszuwirken scheinen. Dies mag ein Grund sein, warum die neu auf dem Markt verfügbaren CD34-Antikörper-Stents nicht gut funktionieren und keine guten Resultate liefern. Das Institut für Qualität und

Diskussion

Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) kommt nach einer aktuellen Analyse der verfügbaren Studienlage zu dem Thema zu der Erkenntnis: „*Der Nutzen oder Schaden einer Behandlung mit antikörperbeschichteten medikamentenfreisetzenden Stents (AK-DES) im Vergleich zu nur medikamenten-freisetzenden Stents (DES) bei koronarer Herzerkrankung ist unklar*“ (Deutsches Ärzteblatt, 2015).

4.4 Limitation der Studie

In die vorliegende Studie wurden nicht genug Patienten eingeschlossen, um auszuschließen, dass keine grundlegenden Gruppenunterschiede in den Baseline-Charakteristika vorlagen. Dies ist besonders im Hinblick darauf wichtig, dass die Zahl zirkulierender EPCs bei Patienten mit dem Alter und kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, erhöhtem LDL, Cholesterin, Diabetes mellitus und Bluthochdruck sinkt. Die einzelnen Risikofaktoren scheinen auch kumulativ zu wirken. Zudem bedingen die sehr geringen Zellzahlen, um die es bei den CD34/KDR und CD34/140b geht, ein Quantifizierungsproblem.

Die Oberflächenmarker CD34 und KDR werden auch von ausgereiften Endothelzellen exprimiert. Da die Identifizierung der EPCs nur anhand dieser Oberflächenmarker erfolgte und nicht zusätzlich z.B. durch CD133, ist nicht auszuschließen, dass auch ausgereifte Endothelzellen detektiert wurden, was die Ergebnisse verfälschen haben könnte (Grisar *et al.*, 2005, Gill *et al.*, 2001).

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Arteriosklerosebedingte Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die Haupttodesursache in der deutschen Bevölkerung. Die PCTA ist eine anerkannte Strategie, um im Lumen stark reduzierte Gefäße wieder ausreichend zu öffnen. Trotz großer Erfolge kann es zu einem Wiederverschluss - einer Restenose - des Gefäßes kommen. EPCs und SPCs sind in die Reparaturfunktion des Körpers, in die Angiogenese und in der Neointimabildung eingebunden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war herauszufinden, ob bestimmte Spiegel dieser Zellen mit einem erhöhten bzw. verminderten Restenoserisiko post Stentimplantation einhergehen. Es wurde jeweils vor und nach der Intervention Blut abgenommen. 25 Patienten wurden im Nachgang reangiografiert und die Untersuchungen mittels Durchflusszytometer durchgeführt. Es wurde die Methode der Doppelfärbung CD34/CD140b (SPCs) und CD34/KDR (EPCs) angewandt.

Bei der Auswertung ging es um die Quantifizierung der Änderung der Konzentrationen von SPCs und EPCs. Es konnte gezeigt werden, dass die SPC-Zellzahl bei Patienten mit Restenose nach Stentimplantation signifikant anstieg, während die SPC Anzahl bei Patienten ohne Restenose leicht sank. Es wurde eine positive Korrelation des Stenosegrades mit der SPC-Zellzahl gefunden. Die EPC-Zellzahl sank dagegen bei Patienten mit Restenose nach Stentimplantation signifikant, während sie bei Patienten ohne Restenose nahezu unverändert blieb. Es wurde keine Korrelation des Stenosegrades mit der EPC-Zellzahl gefunden. Die Zellzahl der CD34⁺ Zellen stieg zwar mit geringerem Restlumen des betroffenen Gefäßes an, allerdings sankt die KDR⁺-Konzentration erheblich.

Es erscheint sinnvoll die Konzentration der SPCs gering zu halten bzw. deren Proliferation zu verhindern um möglicherweise dem Ziel eines geringeren Restenoseaufkommens näher zu kommen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aicher, A., Rentsch, M., Sasaki, K.I., Ellwart, J.W., Fändrich, F., Siebert, R., . . . Heeschen, C. (2007). Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res.*, *100*, 581-599.
- Alexander, M. R. & Owens, G. K. (2012). Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. [Review]. *Annu Rev Physiol*, *74*, 13-40.
- 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*(5302), 964-967.
- Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Döbert, N., . . . Zeiher, A.M. (2002). Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, *106*, 3009-3017.
- Bhargava, B., Karthikeyan, G., Abizaid, A.S. & Mehran, R. (2003). New approaches to preventing restenosis. *BMJ*, *327*(7409), 274-279.
- Barsotti, M. C., Di Stefano, R., Spontoni, P., Chimenti, D. & Balbarini, A. (2009). Role of endothelial progenitor cell mobilization after percutaneous angioplasty procedure. [Review]. *Curr Pharm Des*, *15*(10), 1107-1122.
- Bonello, L., Harhour, K., Baumstarck, K., Arnaud, L., Lesavre, N., Piot, C., . . . Sabatier, F. (2012). Mobilization of CD34+ KDR+ endothelial progenitor cells predicts target lesion revascularization. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Thromb Haemost*, *10*(9), 1906-1913.
- Choi, J. H., Kim, K. L., Huh, W., Kim, B., Byun, J., Suh, W., . . . Kim, D. K. (2004). Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *24*(7), 1246-1252.

- Dangas, G., Ellis, S. G., Shlofmitz, R., Katz, S., Fish, D., Martin, S., . . . Stone, G. W. (2005). Outcomes of paclitaxel-eluting stent implantation in patients with stenosis of the left anterior descending coronary artery. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 45(8), 1186-1192.
- Deutsches Ärzteblatt. (07. Juli 2015). *Nutzen von medikamentenbeschichteten Antikörper-Stents unklar*. Abgerufen am 25. Februar 2017 von <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/63404/Nutzen-von-medikamentenbeschichteten-Antikoerper-Stents-unklar>.
- Erdmann, E. (2011) *Klinische Kardiologie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 39.
- Fadini, G. P., Baesso, I., Albiero, M., Sartore, S., Agostini, C. & Avogaro, A. (2008). Technical notes on endothelial progenitor cells: ways to escape from the knowledge plateau. [Review]. *Atherosclerosis*, 197(2), 496-503.
- Fadini, G.P., Agostini, C., Sartore, S. & Avogaro, A. (2007). Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 194, 46–54.
- Farb, A., Weber, D.K., Kolodgie, F.D., Burke, A.P. & Virmani, R. (2002). Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulatio.*, 105, 2974–2980.
- Fischman, D.L., Leon, M.B., Baim, D.S., Schatz, R.A., Savage, M.P., Penn, I., . . . Nobuyoshi, M. (1994). A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.*, 331(8), 496-501.
- Garolla, A., D'Inca, R., Checchin, D., Biagioli, A., De, T. L., Nicoletti, V., . . . Foresta, C. (2009). Reduced endothelial progenitor cell number and function in inflammatory bowel disease: a possible link to the pathogenesis. *Am.J.Gastroenterol.*, 104(10), 2500-2507.
- Garro, N., Capodanno, D., Cammalleri, V. & Tamburino, C. (2008). Very late thrombosis in acute myocardial infarction: drug-eluting versus uncoated stents. [Clinical Trial Comparative Study]. *EuroIntervention*, 4(3), 324-330.

Literaturverzeichnis

- George, J., Herz, I., Goldstein, E., Abashidze, S., Deutch, V., Finkelstein, A., . . . Keren, G. (2003). Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis. [Comparative Study]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(12), e57-60.
- Giese, N. A., Marijjanowski, M. M., McCook, O., Hancock, A., Ramakrishnan, V., Fretto, L. J., . . . Hanson, S. R. (1999). The role of alpha and beta platelet-derived growth factor receptor in the vascular response to injury in nonhuman primates. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 19(4), 900-909.
- Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M.L., Hicklin, D., Witte, L., . . . Rafii, S. (2001). Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2+AC133+ endothelial precursor cells. *Circ Res*, 88, 167–174.
- Grisar, J., Aletaha, D., Steiner, C.W., Kapral, T., Steiner, S., Seidinger, D., . . . Smolen JS. (2005). Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*, 111, 204–211.
- Gross, P. & Herbrig, K. (2004). Role of endothelial progenitor cells in cardiovascular pathology. [Review]. *Rocz Akad Med Bialymst*, 49, 174-177.
- Gruberg, L., Waksman, R., Satler, L.F., Pichard, A.D. & Kent, K.M. (2000). Novel approaches for the prevention of restenosis. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(11), 2555-2578.
- Haine, S.E., Van Craenenbroeck, E.M., Hoymans, V.Y., Miljoen, H.P., Vandendriessche, T.R., Claeys, M.J., . . . Vrints CJ. (2014). Levels of circulating CD34+/KDR+ cells do not predict coronary in-stent restenosis. *Can J Cardiol.*, 30(1), 102-108.
- Hellstrom, M., Kalen, M., Lindahl, P., Abramsson, A. & Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126, 3047–3055.
- Himbert, D., Jaeger, P., Steg, P. G., Makowski, S. & Gourgon, R. (1990). [Cardiac insufficiency. Definition, mechanisms, principles of treatment]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 83(13), 1913-1918.

Literaturverzeichnis

- Hirschi, K.K., Ingram, D.A. & Yoder, M.C. (2008). Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 28(9), 1584-1595.
- Hoffmann, R., Radke, P. W., Ortlepp, J. R., Haager, P. K., Blindt, R., Iofina, E., . . . Hanrath, P. (2004). Intravascular ultrasonic comparative analysis of degree of intimal hyperplasia produced by four different stents in the coronary arteries. *Am.J.Cardiol.*, 94(12), 1548-1550.
- Hristov, M. & Weber, C. (2008) Ambivalence of progenitor cells in vascular repair and plaque stability. *Curr.Opin.Lipidol.*, 19(5), 491-97.
- Hristov, M., Zernecke, A., Schober, A. & Weber, C. (2008). Adult progenitor cells in vascular remodeling during Atherosclerosis. *Biol. Chem*, 389(7), 837-844.
- Ii, M., Takenaka, H., Asai, J., Ibusuki, K., Mizukami, Y., Maruyama, K., . . . Losordo, D. W. (2006). Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Circ Res*, 98(5), 697-704.
- Inoue, T., Sata, M., Hikichi, Y., Sohma, R., Fukuda, D., Uchida, T., . . . Node, K. (2007). Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Circulation*, 115(5), 553-561.
- Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., . . . Goodell, M. A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Clin Invest*, 107(11), 1395-1402.
- Jie, K. E., Zaikova, M. A., Bergevoet, M. W., Westerweel, P. E., Rastmanesh, M., Blankestijn, P. J., . . . Verhaar, M. C. (2010a). Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nephrol Dial Transplant*, 25(6), 1875-1882.

Literaturverzeichnis

- Jie, K. E., Zaikova, M. A., Bergevoet, M. W., Westerweel, P. E., Rastmanesh, M., Blankestijn, P. J., . . . Verhaar, M. C. (2010b). Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease. *Nephrol.Dial.Transplant.*, 25(6), 1875-1882.
- Kaltenbach, M. (2005). The first coronary angioplasties in Germany. *Z.Kardiol.*, 94(3), 152-162.
- Kastrati, A., Schomig, A., Dietz, R., Neumann, F.J. & Richardt, G. (1993). Time course of restenosis during the first year after emergency coronary stenting. *Circulation*, 87, 1498–1505.
- Krakau, I. & Lapp, H. H. (2005). *Das Herzkatheterbuch - Diagnostische und interventionelle Kathetertechnik* (Vol. 2. Auflage). Stuttgart, New York: Thieme.
- Lafont, A., Durand, E., Rahal, S., de Oliveira, M., Guerin, Y., Fernandez, F., . . . Guerot, C. (1995). Restenosis: Physiopathology, treatments and prevention. *Ann Cardiol Angiol*, 44(7), 349-353.
- Langer, H. F., May, A. E., Vestweber, D., De Boer, H. C., Hatzopoulos, A. K. & Gawaz, M. (2007). Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Semin Thromb Hemost*, 33(2), 136-143.
- Liu, Y., Liu, M., Niu, W., Luo, Y., Zhang, B. & Li, Z. (2011). Phenotype and differentiation of bone marrow-derived smooth muscle progenitor cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 38(9), 586-591.
- Liu, Z. J. & Velazquez, O. C. (2008). Hyperoxia, endothelial progenitor cell mobilization, and diabetic wound healing. [Review]. *Antioxid Redox Signal*, 10(11), 1869-1882.
- Makin, A. J., Blann, A. D., Chung, N. A., Silverman, S. H. & Lip, G. Y. (2004). Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. [Clinical Trial Controlled Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Eur Heart J*, 25(5), 371-376.

- Mercado, N., Boersma, E., Wijns, W., Gersh, B. J., Morillo, C. A., de Valk, V., . . . Serruys, P. W. (2001). Clinical and quantitative coronary angiographic predictors of coronary restenosis: a comparative analysis from the balloon-to-stent era. [Meta-Analysis Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Am Coll Cardiol*, 38(3), 645-652.
- Mintz, G. S., Popma, J. J., Pichard, A. D., Kent, K. M., Satler, L. F., Wong, C., . . . Leon, M. B. (1996). Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Circulation*, 94(1), 35-43.
- Owens, G. K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Physiol Rev*, 75(3), 487-517.
- Pan, M., Suarez de, L. J., Romero, M., Segura, J., Pavlovic, D., Ojeda, S., . . . Ariza, J. (2005). [Interventional cardiology. Where are we and where are we going from here?]. *Rev.Esp.Cardiol.*, 58(3), 290-300.
- Pelliccia, F., Cianfrocca, C., Rosano, G., Mercurio, G., Speciale, G. & Pasceri, V. (2010). Role of Endothelial Progenitor Cells in Restenosis and Progression of Coronary Atherosclerosis After Percutaneous Coronary Intervention. *JACC: Cardiovascular interventions*, 3(1), 78-86.
- Poon, M., Badimon, J. J. & Fuster, V. (2002). Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. [Review]. *Lancet*, 359(9306), 619-622.
- Raines, E.W. (2004). PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15, 237–254.
- Rogers, C., Parikh, S., Seifert, P. & Edelman, E.R. (1996). Endogenous Cell Seeding: Remnant Endothelium After Stenting Enhances Vascular Repair. *Circulation*, 94, 2909-2914.
- Rosenzweig, A. (2005). Circulating endothelial progenitors—cells as biomarkers. *N Engl J Med*, 353, 1055–1057.

Literaturverzeichnis

- Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., . . . Nagai, R. (2002). Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat.Med.*, 8(4), 403-409.
- Schatteman, G.C., Dunnwald, M. & Jiao, C. (2007). Biology of bone marrowderived endothelial cell precursors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 292, 1–18.
- Schmidt-Lucke, C., Rossig, L., Fichtlscherer, S., Vasa, M., Britten, M., Kamper, U., . . . Zeiher, A. M. (2005). Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Circulation*, 111(22), 2981-2987.
- Schober, A., Hristov, M., Kofler, S., Forbrig, R., Lohr, B., Heussen, N., . . . Sohn, H. Y. (2011). CD34+CD140b+ cells and circulating CXCL12 correlate with the angiographically assessed severity of cardiac allograft vasculopathy. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Eur Heart J*, 32(4), 476-484.
- Schober, A. (2008). Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 28(11), 1950-1959.
- Schober, A., Hoffmann, R., Oprea, N., Knarren, S., Iofina, E., Hutschenreuter, G., . . . Weber, C. (2005). Peripheral CD34+ cells and the risk of in-stent restenosis in patients with coronary heart disease. *Am.J.Cardiol.*, 96(8), 1116-1122.
- Schober, A., Knarren, S., Lietz, M., Lin, E.A. & Weber, C. (2003). Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 108, 2491–2497.
- Schwartz, R.S. (1997). The vessel wall reaction in restenosis. *Semin Interv Cardiol*, 2(2), 83-88.
- Serruys, P.W., de Jaegere, P., Kiemeneij, F., Macaya, C., Rutsch, W., Heyndrickx, G., . . . et. al. (1994). A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent study Group. *N Engl J Med*, 331(8), 489-495.

Literaturverzeichnis

- Simper, D., Stalboerger, P. G., Panetta, C. J., Wang, S. & Caplice, N. M. (2002). Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*, 106(10), 1199-1204.
- Song, G., Fang, Y., Wang, X., Wu, S. & Song, H. (2008). The effects of platelet-derived growth factor in rat cardiac allograft vasculopathy and fibrosis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Transplant Proc*, 40(8), 2716-2719.
- Sumpio, B. E., Riley, J. T. & Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. [Review]. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(12), 1508-1512.
- Tanaka, K., Sata, M., Natori, T., Kim-Kaneyama, J. R., Nose, K., Shibamura, M., . . . Nagai, R. (2008). Circulating progenitor cells contribute to neointimal formation in nonirradiated chimeric mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *FASEB J*, 22(2), 428-436.
- Tepper, O. M., Capla, J. M., Galiano, R. D., Ceradini, D. J., Callaghan, M. J., Kleinman, M. E. & Gurtner, G. C. (2005). Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Blood*, 105(3), 1068-1077.
- Timmermans, F., Plum, J., Yoder, M. C., Ingram, D. A., Vandekerckhove, B. & Case, J. (2009). Endothelial progenitor cells: identity defined? [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Review]. *J Cell Mol Med*, 13(1), 87-102.
- Vallieres, K., Petitclerc, E. & Laroche, G. (2009). On the ability of imatinib mesylate to inhibit smooth muscle cell proliferation without delaying endothelialization: an in vitro study. *Vascul.Pharmacol.*, 51(1), 50-56.
- Van Craenenbroeck, E.M., Conraads, V.M., Van Bockstaele, D.R., Haine, S.E., Vermeulen, K., Van Tendeloo, V.F., . . . Hoymans, V.Y. (2008). Quantification of circulating endothelial progenitor cells: a methodological comparison of six flow cytometric approaches. *J Immunol Methods*, 332, 31-40.

Literaturverzeichnis

- van Oostrom, O., Fledderus, J. O., de Kleijn, D., Pasterkamp, G. & Verhaar, M. C. (2009). Smooth muscle progenitor cells: friend or foe in vascular disease? [Review]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 4(2), 131-140.
- Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A., . . . Nickenig, G. (2005). Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 353, 999–1007.
- Werner N, Priller J, Laufs U, Endres, M., Böhm, M., Dirnagl, U. & Nickenig, G. (2002). Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 1567–1572.
- www.cytometryforlife.org: Zugriff am 17.06.2016 unter URL: http://images.google.de/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.cytometryforlife.org%2Findex_files%2Fchamber1.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.cytometryforlife.org%2Fcd4_testing.html&h=487&w=555&tbnid=Vj_m8pE1sNGQKM%3A&docid=yKggvCWiNGj43M&ei=m8VaV9f6OZG6Up2Sr7gP&tbm=isch&iact=rc&uact=3&dur=469&page=2&start=35&ndsp=39&ved=0ahUKEwiXtJuOzZ3NAhURnRQKHR3JC_cQMwihASg_MD8&bih=899&biw=1527
- Yu, H., Stoneman, V., Clarke, M., Figg, N., Xin, H. B., Kotlikoff, M., . . . Bennett, M. (2011). Bone marrow-derived smooth muscle-like cells are infrequent in advanced primary atherosclerotic plaques but promote atherosclerosis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(6), 1291-1299.
- Zampetaki, A., Kirton, J. P. & Xu, Q. (2008). Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc.Res.*, 78(3), 413-421.
- Zernecke, A., Schober, A., Bot, I., von Hundelshausen, P., Liehn, E. A., Mopps, B., . . . Weber, C. (2005). SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Circ Res*, 96(7), 784-791.

Literaturverzeichnis

Zoll, J., Fontaine, V., Gourdy, P., Barateau, V., Vilar, J., Leroyer, A., . . . Tedgui, A. (2008).
Role of human smooth muscle cell progenitors in atherosclerotic plaque development
and composition. *Cardiovasc.Res.*, 77(3), 471-480.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
BD	Becton Dickinson
BM	Bone marrow (Knochenmark)
BMI	Body mass index (Einheit: kg/m ²)
BMS	Bare metal stents (unbeschichtete Metall-Stents)
BSA	Bovine serum albumin (Albumin aus Rinderserum)
Bzw.	Beziehungsweise
CAV	Coronary artery vasculopathie (Koronararterienvasculopathie)
CCR	β -Chemokine receptor
CD	Cluster of differentiation (System zur Unterscheidung von Oberflächenmerkmalen auf Zellen)
CXCR	α -Chemokine receptor
Cy5	Indotricarbocyanin
DES	Drug eluting stents (Wirkstoff-freisetzender Stent)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM	Endothelium leukocyte adhesion molecule
EPCs	Endothelial progenitor cells
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forwardscatter
Ggü.	Gegenüber
GFP	Green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IE	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton

Abkürzungsverzeichnis

KDR	Kinase insert domain receptor
KHK	Koronare Herzkrankheit
LacZ	Laktose Z Gen
LDL	Low density lipoprotein
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MLD	Minimaler Lumendurchmesser
PBS	Phosphate buffered saline (0,01 M phosphatgepufferte, isotone Kochsalzlösung)
PDGF	Platlet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PTCA	Percutaneous transluminal coronary angioplasty (Perkutane transluminale koronare Angioplastie)
QCA	Quantitative coronary angiography (Quantitative Koronarangiographie)
RD	Referenzdurchmesser
Sca	Scatter
SMCs	Smooth muscle cells
SPCs	Smooth muscle progenitor cells
SSC	Sidescatter
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSMC	Vascular smooth muscle cell
YFP	Yellow fluorescent protein (gelb fluoreszierendes Protein)

Danksagung

DANKSAGUNG

Hiermit danke ich Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Schober für die Ermöglichung
dieser

Dissertation in seinem Arbeitskreis und die äußerst interessante

Themenstellung. Ohne seine wissenschaftliche Betreuung wäre die Fertigstellung
dieses Projekts nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich dem Arbeitskreis Schober, den Mitgliedern des Labors,
in dem ich den experimentellen Teil dieser Arbeit durchgeführt habe herzlich
danken, allen voran Dr. Ela Karshovska und Dr. Güler Seemüller.

Herzlich danke ich auch meiner Familie, meinen Freunden und meinem Partner für
die Unterstützung und Motivation bei der Durchführung der Arbeit.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Vaskuläre Stammzellen in der In-Stent-Restenose“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 27.02.2018

Stefan Waas

Ort, Datum

UnterschriftDoktorandin/Doktorand