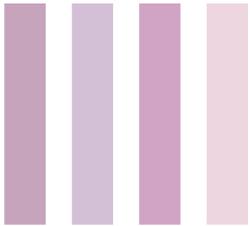
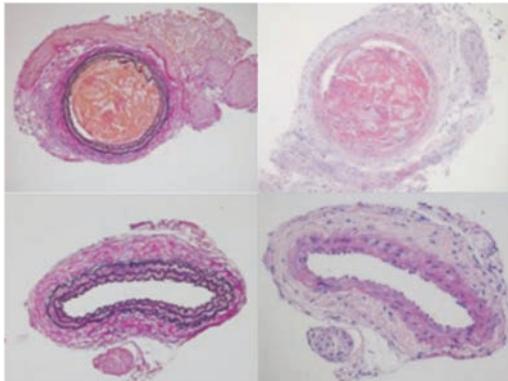




Einfluss von Progenitorzellen auf die vaskuläre Regeneration im Mausmodell

Ramona Hafner



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Kleintiere, Innere Medizin
der Justus- Liebig- Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Matthias Schneider

und

aus der Medizinischen Klinik, Abteilung III
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Betreuer: Prof. Dr. Andreas May

Einfluss von Progenitorzellen auf die vaskuläre Regeneration im Mausmodell

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Ramona Hafner
Tierärztin aus Zweibrücken
Gießen, 2011

Mit der Genehmigung des Fachbereichs der Veterinärmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. M. Schneider
Prof. Dr. A. May

Tag der Disputation: 14. Februar 2011

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ramona Hafner

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	Gefäßsystem	2
2.1.1	Aufbau arterieller Gefäße	2
2.2	Gefäßverletzung	4
2.2.1	Art der Gefäßverletzung bzw. Verletzungsmodelle	4
2.2.2	Pathophysiologie der vaskulären Regeneration	5
2.2.3	Einsatz von Stammzellen im Hinblick auf die vaskuläre Regeneration	6
2.3	Atherosklerose/Arteriosklerose	9
2.3.1	Definition	9
2.3.2	Pathogenese der Atherosklerose	10
2.3.3	Folgeerscheinungen der Erkrankung	14
2.3.4	Therapieansätze	15
2.4	Thrombozyten	17
2.4.1	Aufbau der Thrombozyten	17
2.4.2	Rolle der Thrombozyten bei Gefäßverletzung	19
2.4.3	Rolle der Thrombozyten bei der Atheroskleroseentstehung	19
2.5	Oberflächenrezeptoren der Thrombozytenmembran	21
2.5.1	Integrine	21
2.5.2	Leuzinreiche Glykoproteine	22
2.5.3	Selektine	22
2.5.4	Glykoproteine der Immunglobulin-Superfamilie	23
2.5.4.1	Bedeutung des Glykoproteins VI	23

2.5.4.2	Rekombinantes lösliches Glykoprotein VI	25
2.6	Stamm- und Progenitorzellen	26
2.6.1	Einteilung der Stammzellen	26
2.6.2	Bedeutung der Stammzellen in der regenerativen Medizin	28
2.6.3	Endotheliale Stammzellen	29
2.6.3.1	Interaktionen von Thrombozyten mit endothelialen Stammzellen	32
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	34
3.1	Herstellung des bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-CD133	34
3.2	Isolation und Vorbereitung der CD34⁺ Zellen aus Leukapherisat	35
3.2.1	Isolation der Zellen	35
3.2.2	Färbung der Zellen mit PKH26	35
3.2.3	Inkubation der CD34 ⁺ Zellen mit GPVI-Fc-CD133-Konstrukt bzw. Einzelkomponenten	36
3.3	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	36
3.4	Versuchsablauf	37
3.4.1	Vorbereitung der Mäuse zur Operation	38
3.4.1.1	Carotis-Ligatur-Verletzungsmodell	38
3.4.1.2	Verletzung der A. carotis mittels Drahtdenudation	39
3.4.2	Myokardinfarkt-Modell	41
3.4.3	Applikation der Zellen und Intravitalmikroskopie	43
3.4.4	Rekonvaleszenzphase der Maus nach Gefäßverletzung	44
3.4.5	Doppler-Ultraschall nach Denudation der A. carotis	44
3.4.6	Tötung und Gefäß- bzw. Organentnahme	46
3.4.6.1	Gefäßverletzungsmodelle	46
3.4.6.2	Myokardinfarkt-Modell	46

3.5	Histologische Untersuchung	47
3.5.1	Probenaufarbeitung	47
3.5.2	Färbungen der histologischen Schnitte	48
3.5.2.1	Elastica van Gieson-Färbung	48
3.5.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	48
3.6	Histomorphometrische Auswertung	49
3.6.1	Gefäße	49
3.6.2	Herz	50
3.7	Statistische Berechnungen	51
3.8	Ergebnisse	51
3.8.1	Ergebnisse der Untersuchungen am Carotis-Ligatur-Modell	51
3.8.1.1	Darstellung der histomorphometrischen Daten der linken A. carotis nach Gabe des GPVI-Fc-CD133-Konstrukts im Vergleich zur Kontrollgruppe	52
3.8.2	Ergebnisse der Untersuchungen am Verletzungsmodell mittels Drahtdenudation	53
3.8.2.1	Untersuchungsergebnisse des Versuchsansatzes mit Ultraschalluntersuchung und Tötung 2 Wochen post operationem	53
3.8.2.1.1	Vergleich der Widerstandsindizes der Verumgruppe mit der Kontrollgruppe	53
3.8.2.1.2	Darstellung der histomorphometrischen Daten der linken A. carotis nach Gabe des GPVI-Fc-CD133-Konstrukts im Vergleich zur Kontrollgruppe	54
3.8.2.2	Untersuchungsergebnisse des Versuchsansatzes mit Ultraschalluntersuchung und Tötung 5 Wochen post operationem	56
3.8.2.2.1	Vergleich der Widerstandsindizes der Verumgruppe mit der Kontrollgruppe	56
3.8.2.2.2	Darstellung der histomorphometrischen Daten der linken A. carotis nach Gabe des GPVI-Fc-CD133- Konstrukts im Vergleich zur Kontrollgruppe	58
3.8.2.3	Untersuchungsergebnisse des Versuchsansatzes mit Ultraschalluntersuchung und Tötung 3 Wochen post operationem mit	

	Erhöhung der Zellzahl auf 500 000 CD34 ⁺ Zellen pro Injektionsdosis	60
3.8.2.3.1	Vergleich der Widerstandsindizes der Verumgruppe mit der Kontrollgruppe	60
3.8.2.3.2	Darstellung der histomorphometrischen Daten der linken A. carotis nach Gabe des GPVI-Fc-CD133-Konstrukts im Vergleich zur Kontrollgruppe	62
3.8.3	Einfluss des bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-CD133 auf die Organregeneration am Beispiel des Myokardinfarkts	65
4	DISKUSSION	66
4.1	Diskussion der Versuchsdurchführung	66
4.1.1	Das Mausmodell	66
4.1.2	Wahl des Verletzungsmodells	66
4.1.3	Myokardinfarkt-Modell zur Untersuchung der Geweberegeneration	67
4.1.4	Schwierigkeiten bei der Durchführung der Drahtdenudation an der A. carotis	68
4.1.5	Verwendung von endothelialen Stammzellen	69
4.1.6	Einsatz des löslichen bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-CD133	70
4.1.7	Doppler-Sonographie zur Untersuchung des Gefäßflusses nach Drahtdenudation	72
4.1.8	Charakterisierung der histomorphometrischen Auswertung im Hinblick auf die Gefäßregeneration	73
4.2	Diskussion der Ergebnisse	73
4.2.1	Allgemeine Beobachtungen	73
4.2.2	Betrachtung der Einzelergebnisse	74
4.2.2.1	Vergleich der Widerstandsindizes nach Drahtdenudation in Verum- und Kontrollgruppe	74
4.2.2.1.1	Untersuchung nach 2 Wochen	74
4.2.2.1.2	Untersuchung nach 5 Wochen	75

4.2.2.1.3	Untersuchung nach 3 Wochen und Erhöhung der Zellzahl	76
4.2.2.2	Vergleich der histomorphometrischen Daten der denudierten A. carotis sinistra in Verum- und Kontrollgruppe	76
4.2.2.2.1	Tötung nach 2 Wochen	76
4.2.2.2.2	Tötung nach 5 Wochen	77
4.2.2.2.3	Tötung nach 3 Wochen	78
4.2.3	Einfluss der verabreichten Zellen auf die Gefäßheilung	79
4.2.4	Beeinflussung der Myokardregeneration mit Hilfe der kombinierten Gabe von CD34 ⁺ Zellen und dem GPVI-Fc-CD133-Fusionsprotein	80
4.2.5	Bedeutung der Stammzelltherapie im Rahmen der Behandlung des akuten Myokardinfarktes	81
4.2.6	Schlussfolgerung und Ausblick	82
5	ZUSAMMENFASSUNG	84
6	SUMMARY	86
7	LITERATURVERZEICHNIS	88
8	TABELLENVERZEICHNIS	105
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	106
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	109
11	ANHANG	111
12	DANKSAGUNG	120

1 EINLEITUNG

Die Atherosklerose, welche umgangssprachlich auch als Arterienverkalkung bezeichnet wird, stellt eine der bedeutendsten Zivilisationskrankheiten dar. Sie führt nicht selten zu Verschlusskrankungen wie dem akuten Myokardinfarkt oder dem Schlaganfall.

Im Bericht des Statistischen Bundesamtes von 2006 werden die Herz-Kreislaufkrankungen als häufigste Todesursache in Deutschland genannt. An oberster Stelle sind auch dort die ischämische Herzerkrankung mit 9,5% und der akute Myokardinfarkt mit 7,3% zu finden. Gawaz et al. sehen die Ruptur der atherosklerotischen Plaque als Hauptursache des akuten Myokardinfarktes³⁷.

Die Behandlung der Atherosklerose kann nach heutigem Wissensstand chirurgisch (Ballondilatation, Stentimplantation) oder medikamentell erfolgen. Der Einsatz von Stammzellen zur Regeneration dieser Gefäßerkrankung könnte hierbei zukünftig eine alternative oder zumindest eine ergänzende Therapiemethode darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst eine Gefäßverletzung der A. carotis mittels Drahtdenudation im Mausmodell induziert und anschließend werden endotheliale Progenitorzellen systemisch verabreicht. Die Stammzellen sind an ein Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-CD133 gekoppelt. In früheren Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe³⁶ konnte mit Hilfe der Intravitalmikroskopie gezeigt werden, dass durch diese Kombination eine verbesserte Adhäsion der Stammzellen im verletzten Gefäßareal erreicht werden kann.

In dieser Arbeit soll nun gezeigt werden, ob man durch die Anreicherung der Stammzellen am geschädigten Gefäßendothel eine verringerte Neointimabildung und daraus resultierend eine schnellere Reendothelialisierung herbeiführen kann und somit die Gefahr der Thrombosierung des verletzten Gefäßes reduziert werden kann.

Diese Erkenntnisse sind von entscheidender Bedeutung für die Therapie der Atherosklerose im Rahmen einer Angioplastiebehandlung.

Da in unserer Arbeitsgruppe das Myokardinfarkt-Modell kürzlich etabliert worden ist, wurden auch hierzu erste Untersuchungen im Hinblick auf die Regenerationsfähigkeit des Myokards im Rahmen der Stammzelltherapie in Kombination mit dem Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-CD133 durchgeführt. Zum jetzigen Zeitpunkt sind erst wenige Tiere in die Untersuchungen eingeschlossen.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Gefäßsystem

Das Gefäßsystem dient der Versorgung des Organismus mit Sauerstoff und Nährstoffen über das Blut. Dabei wird das Blut innerhalb eines Kreislaufsystems durch den Körper geleitet. Dieser wird in einen kleinen Kreislauf, auch Lungenkreislauf genannt, welcher für die Sauerstoffanreicherung des Blutes zuständig ist, und in einen großen Kreislauf, welcher der Versorgung des Gesamtorganismus dient, eingeteilt. Beide sind über das Herz miteinander verbunden. Das Herz fungiert innerhalb dieses Kreislaufes als Pumpe, welche den kontinuierlichen Blutfluss gewährleistet¹³⁹.

Dabei herrschen in den Arterien und Venen beider Kreisläufe unterschiedliche Druckverhältnisse. Diese werden im Falle des Körperkreislaufes als Hochdrucksystem und im Lungenkreislauf als Niederdrucksystem bezeichnet¹³⁹.

Als Arterien bezeichnet man Gefäße, welche das Blut vom Herzen in Richtung Peripherie leiten; im Gegensatz dazu werden Gefäße, welche das Blut zum Herzen hinführen, Venen genannt¹³⁹.

Im Hinblick auf den Sauerstoffgehalt führen Arterien in der Regel sauerstoffreiches Blut, während in Venen sauerstoffarmes Blut fließt. Lediglich im Lungenkreislauf stellen sich diese Verhältnisse umgekehrt dar¹³⁹.

Allerdings unterscheiden sich die Gefäße nicht nur durch ihre Flussrichtung und in der Qualität des darin fließenden Blutes, sondern auch durch ihren Aufbau. In dem folgenden Kapitel wird aufgrund der Bedeutung für die nachfolgenden Untersuchungen nur auf den Aufbau der Arterien eingegangen¹³⁹.

2.1.1 Aufbau der arteriellen Blutgefäße

Der Aufbau einer Arterie ist sehr charakteristisch und besteht im Prinzip aus 3 Schichten, der *Tunica intima (Intima)*, der *Tunica media* und der *Tunica adventitia*.

Die Intima liegt dem Lumen direkt an und besteht im Wesentlichen aus Endothelzellen, einer subendothelialen Bindegewebsschicht und der Lamina elastica interna. Die Elastica interna stellt eine Schicht aus einer bis z.T. zwei kräftigen

elastischen Membranen dar und ist am besten bei mittelgroßen Arterien in histologischen Schnitten sichtbar¹³⁹.

Die *Tunica media*, welche sich der Intima nach außen hin anschließt, enthält überwiegend zirkulär angeordnete glatte Muskelfasern und Bindegewebe. Sie kann in ihrer Dicke je nach Gefäßtyp (auf diese wird im Folgenden noch eingegangen) und Beanspruchung sehr variieren¹³⁹.

Die *Tunica adventitia* geht ohne scharfe Begrenzung in das umliegende Gewebe über und wird von Kollagenfasern, Fibroblasten und zahlreichen elastischen Fasern gebildet. Die *Lamina elastica externa*, welche sich an der Grenze zwischen Media und Adventitia befindet, ist in vielen Arterien weniger klar abgrenzbar.

Bei den Arterien unterscheidet man zwei Gefäßtypen. Zum einen spricht man von Gefäßen vom elastischen Typ, zu denen z.B. die Aorta gehört, und zum anderen von Gefäßen vom muskulären Typ¹³⁹.

Die Arterien vom elastischen Typ befinden sich im herznahen Kreislaufbereich und weisen zahlreiche Elastinlamellen auf, die vorwiegend in der *Tunica media* zu finden sind. Diese Lamellen sind durch Lücken unterbrochen, was zu einer vermehrten Elastizität führt. Diese ist besonders wichtig, da es während der Systole und Diastole zu großen Druckschwankungen kommt¹³⁹.

In der Systole werden diese Lamellen gedehnt und während der Diastole führen sie zu einer Aufrechterhaltung der Spannung und gewährleisten so einen gleich bleibenden Blutfluss. Dieses Phänomen nennt man Windkesselfunktion; ohne diese Gegenregulation würde der Blutstrom in der Diastole verlangsamt oder sogar sistieren. Die *Tunica media* weist darüber hinaus eine geringere Zahl an glatten Muskelzellen auf¹³⁹. Im Gegensatz dazu verfügen die Arterien des muskulären Typs über eine sehr ausgeprägte *Tunica media*, die sehr zahlreich an glatten Muskelzellen ist. Diese dienen nicht nur als kontraktile Elemente, sondern spielen eine entscheidende Rolle bei der Produktion der Kollagenfasern, des Elastins und der Proteoglykane (Bestandteile der extrazellulären Matrix)¹³⁹.

Allerdings ist der Übergang zwischen den Arterientypen fließend. Somit nimmt die A. carotis hinsichtlich ihrer Wandstruktur eine Intermediärstellung ein. Die Anzahl der Elastinlamellen ist geringer als in der Aorta, die Ausprägung der glatten Muskelzellen hingegen ist höher als in anderen mittelgroßen oder kleineren Gefäßen.

In den Gefäßen vom muskulären Typ ist die *Lamina elastica interna* sehr gut ausgeprägt und in der Histologie durch ihren gewellten Verlauf leicht zu erkennen¹³⁹.

2.2 Gefäßverletzung

2.2.1 Art der Gefäßverletzung bzw. mögliche Verletzungsmodelle

Die Atherothrombose ist eine komplexe Erkrankung, welche zwei verschiedene Pathomechanismen verfolgt. Zum einen stellt die Atherosklerose, welche durch den Prozess der Plaqueformation gekennzeichnet ist, ein wichtiger Wegbereiter der Erkrankung dar. Zum anderen kommt es durch eine Ansammlung eines Blutkoagels durch eine rupturierende Plaque zu einer intraluminalen Thrombose¹³⁴.

Um die Verletzung des Gefäßendothels bei atherosklerotischen Erkrankungen nachzuempfinden, bestehen in der derzeitigen Forschung zahlreiche Verletzungsmodelle, welche entweder auf die Thrombose oder die Atherosklerose abzielen.

Thrombosemodelle

Thrombosemodelle dienen der Untersuchung und der Evaluierung von antithrombotischen Therapien⁵⁷. Die Modelle können einerseits durch Applikation prothrombotischer Substanzen⁷ oder durch das Anlegen einer Gefäßverletzung herbeigeführt werden. Die Verletzungen können entweder mechanisch¹⁰⁹, chemisch¹³¹ oder mittels Lasereinwirkung⁹⁰ erreicht werden. Dieses Prozedere resultiert in einer Endothelschädigung und initiiert ein Entzündungsgeschehen im betroffenen Gefäßareal.

Atherosklerosemodelle

Da die Atherosklerose in engem Zusammenhang mit hohen Serumcholesterolkonzentrationen steht, können zur Generierung von Atherosklerosemodellen fettreiche Fütterungen verwandt werden. Der Prozess der Atherogenese kann dabei durch Defekte im physiologischen Stoffwechsel verstärkt werden.

In der heutigen Forschung spielen sowohl Kaninchen als auch Mäuse eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung solcher Modelle. Bei Kaninchen konnte nachgewiesen werden, dass diese nach einer cholesterinreichen Fütterung innerhalb von 4-16 Wochen deutliche Plaqueformationen entwickeln. Diese Ablagerungsprozesse sind in erster Linie in Bereichen der Aorta zu finden¹³⁵.

Innerhalb der Mäusestämme konnten sich zwei verschiedene Linien im Hinblick auf die Atheroskleroseentstehung etablieren. Bei beiden Mauslinien handelt es sich um

Knockouts bezüglich eines Proteins (Apolipoprotein E, LDL₁-Rezeptor), welches in den Atheroskleroseprozess eingebunden ist. Bei beiden Knockout-Stämmen können deutlich erhöhte Serumcholesterolwerte festgestellt werden. Zusätzlich treten atherosklerotische Veränderungen des Gefäßendothels schon zu einem frühen Zeitpunkt in Erscheinung⁹³.

2.2.2 Pathophysiologie der vaskulären Regeneration

Bei dem Begriff der Regeneration unterscheidet man zwischen der *physiologischen* und der *reparativen Regeneration*. Laut Definition handelt es sich bei der *physiologischen Regeneration* um einen Ersatz von Zellen oder Geweben im Rahmen des normalen Verschleißes. Dieser Ersatz kann sowohl permanent (Epidermis, Darmepithel, Gefäßendothel, etc.), zyklisch (Endometrium nach der Menstruation) oder einmalig (Ersatz des Milchzahngebisses durch bleibendes Gebiss) erfolgen.

Eine *reparative Regeneration* wird dann vollzogen, wenn in einem Zellsystem oder einem Gewebe Defekte entstanden sind. Diese Defekte werden durch Proliferation von Ersatzgewebe ausgeglichen¹⁰³. Dabei kann der Vorgang in zweierlei Richtung vollzogen werden.

Von einer vollständigen pathologischen Regeneration spricht man, wenn die geschädigten Zellen durch Zellen desselben Typs ersetzt werden. Dabei wird die Histoarchitektur des Gewebes vollständig wiederhergestellt. Eine vollständige Regeneration ist daher nur möglich, wenn die Basalmembran und/oder das perivaskuläre Bindegewebsgerüst in Gestalt des „formativen Mikroenvironments“ erhalten ist¹⁰³.

Anders verhält es sich bei der unvollständigen pathologischen Regeneration; hierbei wird das geschädigte, ursprünglich spezialisierte Gewebe durch kollagenreiches Bindegewebe ersetzt. Es entsteht das sogenannte Narbengewebe, welches in seiner Funktion oftmals eingeschränkt ist¹⁰³.

Betrachtet man diese Mechanismen im Hinblick auf die vaskuläre Regeneration, so sind am Heilungsprozess der Gefäßwand sowohl Endothelzellen als auch glatte Muskelzellen beteiligt¹⁰.

Unter dem Begriff der „Endothelialen Dysfunktion“ versteht man verschiedene Formen von potentiell reversiblen Veränderungen des Funktionszustandes des

Endothels. Die Endothelzellen können auf pathologische Reize reagieren, indem sie ihre Funktion modulieren und auch neue Eigenschaften entwickeln. Im Anschluss daran kommt es zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, einer Inhibierung der Stickoxid-Freisetzung und zu einer Umverteilung der P-Selektine durch Thrombin und Histaminstimulation. Die Proteinneusynthese durch das Gefäßendothel bleibt dabei unverändert. Die Endothelaktivierung dagegen führt zu einer Veränderung der zellulären Genexpression und damit auch der Proteinbiosynthese¹⁰.

Die Aktivierung wird durch inflammatorische Prozesse, hämodynamischen Stress und Lipidablagerungen, wie sie bei atherosklerotischen Veränderungen vorzufinden sind, gefördert. Dabei können die Endothelzellen ein neues Spektrum an Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, pro- und antikoagulatorischen Substanzen sowie andere Genprodukte freisetzen¹⁰.

Vaskuläre Schädigungen stimulieren außerdem das Wachstum der glatten Muskelzellen. Dies führt zu einer Migration der Muskelzellen aus der Media in die Intima und einer anschließenden Proliferation dieser Intimazellen. Zusätzlich werden extrazelluläre Matrixproteine synthetisiert und abgelagert. Im Rahmen des Heilungsprozesses der Gefäßwandläsion entsteht auf diese Weise die sogenannte Neointima¹⁰.

Die Zellen der Neointima weisen im Gegensatz zu den üblicherweise „kontraktilen“ Muskelzellen einen „proliferativ-synthetisierenden“ Phänotyp auf. Dies zeigt sich in einer Abnahme der kontraktilen Elemente und der gesteigerten Mitosefrequenz.

Eine überschießende Proliferation der glatten Muskelzellen führt zu einer Intimaverdickung, welche als Komplikation des Heilungsprozesses zu Stenosen und Verschlüssen kleinerer Gefäße führen kann. Dieser Pathomechanismus spielt bei verschiedenen Gefäßerkrankungen, wie der Restenose nach Angioplastie, der Transplantatvaskulopathie und der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Erst nach Wiederherstellung der Endothelintegrität können die neointimalen Myozyten wieder in ihren nicht proliferierenden Zustand zurückkehren¹⁰.

2.2.3 Einsatz von Stammzellen im Hinblick auf die vaskuläre Regeneration

In der derzeitigen Forschung ist der Einsatz von Stammzellen zur Verbesserung der Regenerationsfähigkeit von Blutgefäßen nach Endothelschädigung ein vielseitig untersuchtes Themengebiet. Allerdings ist es in diesem Zusammenhang nicht nur

entscheidend die verwendeten Stammzellen und deren Applikationsart zu charakterisieren, sondern es ist ebenso von Bedeutung das Verletzungsmodell zu berücksichtigen¹³⁰. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Schädigung des Gefäßendothels und der darunterliegenden Schicht aus glatten Muskelzellen zu einer verstärkten Proliferation derselben führt, was als Neointimabildung bezeichnet wird. Diese Gefäßverletzung ist demnach je nach eingesetztem Verletzungsmodell sehr unterschiedlich. So konnten Tanaka et al. nachweisen, dass bei einer Drahtdenudation die Alterationen an der Gefäßwand am größten sind und daraus eine starke Neointimabildung resultiert¹³⁰. In diesem Zusammenhang konnten sie außerdem zeigen, dass zur Rekrutierung der Stammzellen die Apoptose der glatten Muskelzellen eine entscheidende Rolle spielt. So scheint die daraus resultierende Zelllosigkeit der *Tunica media* zu einem verstärkten Homing der Progenitorzellen zu führen. Bei einer Ligatur des Gefäßes bleiben diese Beobachtungen weitestgehend aus¹³⁰.

Bei Werner et al. wird von einer Reduzierung der Neointimabildung infolge einer intravenösen Transfusion von endothelialen Progenitorzellen berichtet. Demnach führt die Anreicherung der Stammzellen im verletzten Gefäßwandareal zu einer verbesserten Reendothelialisierung und somit zu einem verminderten Stenosegrad des Gefäßlumens¹⁴¹.

Sahara et al. legten bei ihren Untersuchungen ihr Augenmerk auf das Regenerationspotential von hämatopoetischen Stammzellen (HSC)¹¹².

Wie bereits bei Yeh et al. beschrieben, können sich hämatopoetische Progenitorzellen nicht nur zu jeder Art von Blutzellen, sondern auch zu Kardiomyozyten und Endothelzellen differenzieren¹⁴⁶. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass unfraktionierte Zellen des Knochenmarks ein höheres Regenerationspotential besitzen als spezialisierte HSCs. Sie konnten zusätzlich zeigen, dass sich die Zellen vermehrt in der Neointima und der *Tunica media* anreichern¹⁴⁶.

Allerdings können Stammzellen auch aus bestimmten Ressourcen des Körpers durch Applikation bestimmter Zytokine rekrutiert werden und sich in geschädigten Bezirken anreichern.

So konnten Zerneck et al. zeigen, dass eine Freisetzung von Stromal-derived Factor 1 (SDF-1), welcher bei der Apoptose der glatten Muskelzellen vermehrt exprimiert wird, zu einer verstärkten Rekrutierung von Entzündungszellen, wie z.B. Makrophagen, Leukozyten, aber auch Thrombozyten und letztlich Progenitorzellen

aus dem Knochenmark führt¹⁵⁰. Durch diese zunehmende Entzündungsreaktion kann eine verstärkte Neointimabildung beobachtet werden. SDF-1 fungiert in diesem Zusammenhang als Mobilisationsmediator für die im Knochenmark befindlichen Progenitorzellen¹⁵⁰.

Einer neuen Studie zur Folge führt eine kombinierte Gabe von SDF-1 und Statinen zu einer 9 bis 18-fach gesteigerten Anzahl an zirkulierenden EPCs¹²². Die Arbeitsgruppe um Shao et al. konnte im „Hindlimb-Modell“ an der Maus zusätzlich zeigen, dass durch eine zuvor durchgeführte intraperitoneale Injektion von Fluvastatin und eine nach Ischämie der Hintergliedmaße intramuskulär verabreichte Injektion von SDF-1 die Regenerationsfähigkeit des ischämischen Gewebes verbessert werden konnte. Die endothelialen Progenitorzellen führten zu einer deutlichen Erhöhung der Kapillardichte und somit zu einer verbesserten Reperfusion der betroffenen Gliedmaße, da keines der mit dieser Kombinationstherapie behandelten Tiere eine postoperativ auftretende Fußnekrose zeigte¹²².

In früheren Veröffentlichungen von Werner et al. wurden Statine als Stimulatoren für die Angiogenese bei normocholesterinämischen Tieren angesehen¹⁴⁰.

Ein weiteres Zytokin, welches im Rahmen der Mobilisation von Stammzellen diskutiert wird, ist der Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)¹²⁹.

Es konnte gezeigt werden, dass die präoperative Injektion von G-CSF in Drahtdenudationsversuchen die Zahl der zirkulierenden CD34⁺ Zellen im peripheren Blut erhöht. In den verletzten Gefäßen kommt es infolgedessen zu einer verminderten Neointimaformation und einer verbesserten Reendothelialisierung. Zusätzlich zeigen die Gefäße eine erhöhte Fähigkeit zur Vasodilatation, welche auf eine verbesserte Ansprechbarkeit auf Stickoxide zurückgeführt werden kann¹²⁹.

Allerdings ist der Einsatz von G-CSF nicht ohne Risiken zu sehen, da eine erhöhte Expression von G-CSF und daraus resultierend die Anlockung zahlreicher Entzündungszellen im Umkehrschluss zu einer verringerten Heilungstendenz führen kann¹²⁹. Die positiven Effekte im Hinblick auf die Neointimaformation und die Rekrutierung der Stammzellen sind daher dosisabhängig.

Die Neointimahyperplasie infolge Gefäßverletzung kann außerdem durch bestimmte Chemokine, welche in das Entzündungsgeschehen eingebunden sind, beeinflusst werden. So zeigen Ott et al., dass durch einen Defekt des Tissue Factor (TF), welcher ein wichtiger Faktor in der Gerinnungskaskade darstellt, eine verringerte Neointimabildung erreicht werden kann. Die Anhaftungsfähigkeit vieler Entzündungszellen ist

durch den Verlust der zytoplasmatischen Domäne des Tissue Factors nicht mehr gewährleistet⁹⁶.

Ein gegenteiliges Phänomen spiegelt sich bei Fas-defizienten Mäusen wider⁷⁹. Fas gehört zu der Familie der Tumornekrose-Faktoren und wird von Lymphozyten, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen freigesetzt. Er induziert die Apoptose der geschädigten Zellen. Fehlt nun dieser Faktor selbst bzw. ist der jeweilige Rezeptor nicht vorhanden, so verringert sich die Apoptoserate und es kommt zu einer überschießenden Proliferation, welche durch eine verstärkte Neointimaformation charakterisiert ist⁷⁹.

2.3 Atherosklerose/ Arteriosklerose

2.3.1 Definition

Bei der Atherosklerose bzw. Arteriosklerose, welche umgangssprachlich auch als Arterienverkalkung bezeichnet wird, handelt es sich um eine krankhafte Veränderung der Arterien, welche mit Verhärtung, Verdickung und Elastizitätsverlust der Arterienwand einhergeht⁹⁸.

Die entzündlich bedingte Atherosklerose führt fokal zu einer Dickenzunahme der Intima mit einer Akkumulation von Lipiden und lipidreichen Makrophagen (Schaumzellen) und einer ausgeprägten Bildung einer kollagenreichen Bindegewebsschicht (atherosklerotischer Plaque). Die Erkrankung manifestiert sich vor allem an Prädilektionsstellen mit hämodynamischen Besonderheiten, wie z.B. Bifurkationen und Abzweigungen von Gefäßästen sowie sonstige Engpässe innerhalb des Gefäßsystems. Häufig von der Atherosklerose beim Menschen betroffen sind die A. carotis interna, die A. femoralis, die Bauchaorta, die Koronargefäße und der Circulus arteriosus cerebri¹¹⁶.

2.3.2 Pathogenese der Atherosklerose

Verschiedenste Erkrankungen und Prädispositionen werden mit der Entstehung der Atherosklerose in Verbindung gebracht. Allerdings wird ihr Einfluss innerhalb des Entzündungsgeschehens in der Literatur viel und z.T. kontrovers diskutiert. Vielfach in diesem Zusammenhang benannte Erkrankungen sind Hypercholesterinämie, Hypertonie¹⁸, Diabetes mellitus⁵, aber auch Alkoholabusus, Übergewicht und das Rauchen von Tabakzigaretten^{13, 67, 107}.

Die Entstehung der Atherosklerose ist ein sehr komplexes Geschehen, in welches eine Reihe hochspezifischer zellulärer und molekularer Reaktionen involviert sind. Sie ist in erster Linie als entzündliche Erkrankung des Gefäßsystems zu verstehen^{105, 106, 107}. An ihrem Beginn steht eine rein entzündliche Läsion des Endothels, welche als *Fatty streak* bezeichnet wird. Sie ist histologisch durch ihren Reichtum an Makrophagen und T-Lymphozyten deutlich vom restlichen intakten Endothel abzugrenzen¹²⁷.

Bei Personen mit Hypercholesterinämie werden diese Zellen durch extrazelluläre Ablagerungen von Lipiden an der Gefäßwand angelockt⁸⁵. Die erhöhte Serumkonzentration von Cholesterol, den modifizierten Lipiden und deren Lipoproteinen im peripheren Blut wird auch vielfach als einer der Risikofaktoren für die Atherogenese diskutiert. Das Low Density Lipoprotein (LDL) wird als Hauptursache für die Entstehung der Endothelverletzung und der nachfolgenden Schädigung der glatten Muskelzellen angesehen⁸⁵. Nach Anreicherung der LDL-Partikel am lumenseitigen Gefäßwandbereich kommt es zu einer progressiven Oxidationsreaktion. Die oxidierten Lipoproteine (z.B. oxLDL) werden über Scavenger-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen gebunden und anschließend von diesen phagozytiert⁶⁷. Die dabei entstehenden Schaumzellen migrieren in die Intima des Gefäßes und führen dort zu *Fatty streaks*.

Allerdings gibt es auch Lipoproteine, die eine protektive Wirkung innerhalb des Entzündungsgeschehens besitzen. Wie bei Libby et al. beschrieben, weist das High Density Lipoprotein (HDL) eine solche Funktion auf. Dieses führt einerseits zu einem reversen Transport von Cholesterol und andererseits transportiert es antioxidative Enzyme, welche die oxidierten Lipide spalten können und so deren proinflammatorischen Effekt außer Kraft setzen⁶⁷.

In der westlichen Welt gewinnt das Übergewicht als Zivilisationskrankheit immer mehr an Bedeutung und wird als weiterer Risikofaktor vielfach in wissenschaftlichen

Kreisen diskutiert. Die Obesitas prädisponiert nicht nur für eine Insulinresistenz, sondern führt auch zu einer Dyslipidämie¹⁴⁹. Die Lipoproteine werden dabei in ihrem physiologischen Verhältnis zueinander negativ beeinflusst. Hohe Konzentrationen an freien Fettsäuren stimulieren die Freisetzung von triglycerid-reichen Lipoproteinen, wie das Very Low Density Lipoprotein (VLDL) durch die Hepatozyten. Dieser Anstieg der VLDL führt zu einer Abnahme der HDL, da diese gegen VLDL ausgetauscht werden und somit wird deren protektive Wirkung reduziert. Zusätzlich synthetisiert das Fettgewebe TNF α und Interleukine, welche die Entzündung vorantreiben und die Atherogenese begünstigen¹⁴⁹.

Burke et al. konnten in Studien an Patienten mit koronarer Herzerkrankung zeigen, dass abnorme Serumkonzentrationen von Cholesterol, insbesondere niedrige Werte an HDL, zu einem erhöhten Risiko für Plaquerupturen führen¹³.

Die Integrität des Gefäßendothels ist von entscheidender Bedeutung für die Verhinderung der Plaquerosion bzw. -ruptur und somit der Prävention eines ischämischen Gewebeschadens, wie z.B. dem Myokardinfarkt oder dem Schlaganfall¹³. Außerdem konnten sie eine Prädisposition der Zigarettenraucher für das Auftreten einer akuten Thrombose nachweisen¹³.

Wie bereits bei Ross et al. beschrieben, handelt es sich um eine *response-to-injury Erkrankung*¹⁰⁷. Dies bedeutet, dass der Erkrankung eine Gefäßschädigung vorausgeht, welche eher als Dysfunktion, weniger als Verletzung des Endothels zu verstehen ist. Durch die anschließende Entzündungsreaktion steigt die Adhäsivität der Endothelzellschicht, in deren Folge zahlreiche Zellen, besonders Thrombozyten und Lymphozyten, anhaften können. Zusätzlich werden von den Endothelzellen Mediatoren freigesetzt, die prothrombotisch wirksam sind^{67, 107}. Eine unkontrollierte plättchenassoziierte Thrombusformation führt zu einer akuten Gefäßeinengung und kann infolgedessen durch Anlagerung weiterer Entzündungszellen zur Entstehung einer atherosklerotischen Plaque führen⁴².

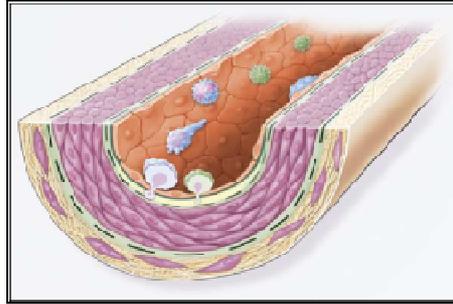
Führen die Entzündungsmechanismen nicht zu einer Neutralisation bzw. einer Eliminierung des auslösenden Agens, so migrieren glatte Muskelzellen ins entzündliche Gewebe ein und proliferieren. Durch eine überschießende oder länger andauernde Proliferation der glatten Muskelzellen kommt es zu einer Wandverdickung des betroffenen Gefäßes. Reichen die Energiereserven nicht mehr aus, entsteht eine Gefäßdilatation⁴⁴. Dieser Prozess wird als *Remodeling* bezeichnet¹²⁶.

Die fortschreitende Entzündungsreaktion führt schließlich zu einer Fibrosierung der Endothelläsion; es entsteht eine fibröse Kappe. Unter dieser befinden sich Lipidablagerungen und nekrotisches Gewebe. Durch den daraus resultierenden Elastizitätsverlust ist es dem Gefäß nicht mehr möglich die Dysfunktion zu kompensieren und die Plaque kann sich weiter ins Gefäßlumen erstrecken und schlimmstenfalls zum Gefäßverschluss führen^{67, 107}.

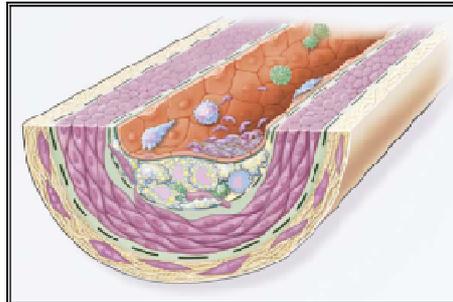
Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Atherosklerose stellen die Strömungsverhältnisse innerhalb des Gefäßes dar. Die atherosklerotischen Veränderungen treten vermehrt an Aufzweigungen von Gefäßen auf. Gotlieb et al. konnten zeigen, dass im Bereich von Gefäßaufzweigungen verminderte Scherkräfte auftreten, während die Turbulenzen innerhalb des Gefäßlumens an diesen Stellen erhöht sind⁴⁶. Dies führt zu charakteristischen Veränderungen des Blutstroms. Durch die Strömungsverhältnisse werden vom Endothel bestimmte Adhäsionsfaktoren freigesetzt, die mit Rezeptoren auf der Oberfläche anderer Zellen in Kontakt treten können¹²⁵. Die Adhärenz von Thrombozyten und Leukozyten führt ihrerseits ebenfalls zu einer Expression von Chemokinen, welche chemotaktisch wirksam sind und weitere Zellen rekrutieren¹²⁵. Wie bei Daub et al. beschrieben, stellen Makrophagen, die sich zu Schaumzellen differenzieren, einen weiteren wichtigen Zelltyp bei der Atherogenese dar²⁵. Sie entwickeln sich aus Monozyten des peripheren Blutes. Nach Aktivierung sind Makrophagen über den Molecular Histocompatibility Complex-II-Rezeptor (MHC II) befähigt Antigene an ihrer Oberfläche zu präsentieren. Sie können auf diese Weise sowohl CD4- als auch CD8-T-Lymphozyten stimulieren⁵⁰. Bei Folcik et al. wird in diesem Zusammenhang oxLDL als mögliches Antigen diskutiert³³. Die entzündlichen Reaktionen führen aber nicht nur zur Entstehung der atherosklerotischen Plaque, sondern sie fördern auch die sich daraus ergebenden Risiken für akute thrombotische Ereignisse⁶⁷.

Komplikationen bzw. Folgeerscheinungen der Atherosklerose treten durch Erosion oder Plaqueruptur in Erscheinung³⁴. Dabei kommt es zum Einreißen der fibrösen Kappe und nekrotisches Gewebe, sowie die subendotheliale Matrix werden freigelegt. Durch T-Zellen und Makrophagen kann dieser Prozess beschleunigt werden, da sie Metalloproteinasen produzieren, welche für die Auflösung der fibrösen Bedeckung der Plaque nötig sind⁶⁷.

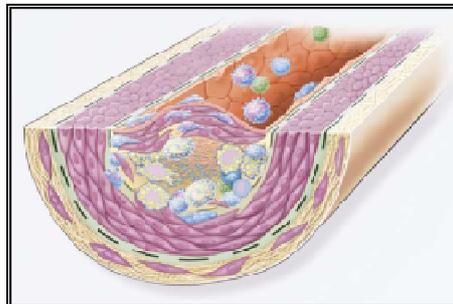
Endotheliale Dysfunktion



Fatty Streak-Formation



Atherosklerotische Plaque



Fibröse Plaque → Rupturgefahr

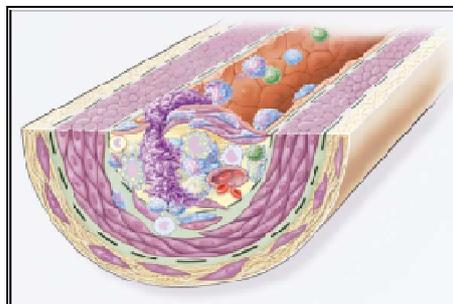


Abbildung 1: Darstellung der verschiedenen Endothelveränderungen bei der Atheroskleroseentwicklung (Ross, 1999)

2.3.3 Folgeerscheinungen der Erkrankung

ACS (akutes Koronarsyndrom)

Diese Erkrankung weist sowohl thrombotische als auch vasokonstriktorische Veränderungen der Gefäße auf. Infolgedessen kommt es zu einer Verengung des Gefäßlumens und daraus resultierend zu einer Minderdurchblutung des durch das jeweilige Gefäß versorgten Gebietes. Durch die lokale Thrombusformation kommt es zu einer massiven Freisetzung von Serotonin, Thromboxan A₂ und Thrombonin. Alle diese Substanzen wirken vasokonstriktorisch, nicht nur in den thrombotischen Bezirken sondern auch in entfernteren Arterien- und Kapillargebieten⁴⁹. Problem dieser Erkrankung ist es, dass trotz vasodilatatorischer Therapie oftmals die Einengung nicht völlig behoben werden kann. Daher kommt es bei 12 bis 16% der Patienten zu erneutem Auftreten von kardialen Problemen¹⁶.

AMI (akuter Myokardinfarkt)

Beim akuten Myokardinfarkt handelt es sich um eine ischämische Gewebsnekrose des Myokards. Diese Mangel durchblutung kann durch länger anhaltende Gefäßspasmen oder auch eine Gefäßokklusion, z.B. infolge einer Plaqueruptur entstehen⁹⁸.

Bei den meisten Patienten erscheint der Myokardinfarkt als Folge einer Erosion der Plaque oder einer Ruptur derselben. Dabei kommt es durch Freisetzung von Metalloproteinasen durch Entzündungszellen allmählich zu einer Auflösung der fibrösen Kappe und somit zu einem Austritt des nekrotischen Materials in das Gefäßlumen³⁵. Zusätzlich können Gefäßthromben infolge Erosion bzw. Ruptur der atherosklerotischen Plaque entstehen, was letztlich eine Einengung des Gefäßlumens hervorrufen kann³⁵.

Schlaganfall (Apoplexie, Stroke)

Der sogenannte Schlaganfall stellt einen ischämischen Hirninfarkt dar. Dieser wird meist durch eine Embolie, ausgehend von atherosklerotischen Veränderungen

extrakranieller Gefäße oder vom Herzen, ausgelöst. Häufig betroffen ist das Versorgungsgebiet der A. cerebri media. Typische Symptome der Apoplexia cerebri sind Hemiparesen, Sensibilisations- und Sprachstörungen⁹⁸.

2.3.4 Therapieansätze

Der Atherosklerose kann durch unterschiedliche therapeutische Ansätze begegnet werden. Zum einen ist es möglich bei symptomlosen Patienten bzw. bei milden klinischen Fällen eine medikamentelle Therapie einzuleiten. Diese ist in erster Linie in Richtung auf eine antithrombotische Behandlung⁷² mit Aspirin und Clopidogrel gerichtet. Ein weiterer Ansatzpunkt stellt die Reduktion der Lipidablagerungen²⁴ im Gefäßlumen dar, welche durch Verabreichung von Statinen erreicht werden kann. Afilalo et al. konnten in einer klinischen Studie zeigen, dass eine intensive Therapie mit Statinen nach einem akuten Koronarsyndrom die Mortalität um 25% reduziert¹. Zusätzlich können Antihypertensiva²³ eingesetzt werden. Eine Umstellung der Lebensgewohnheiten, wie z.B. ein mäßiger Alkoholkonsum und eine Nikotinentwöhnung¹⁴³ können die Therapie unterstützen.

Die Substitution von Omega-3 Fettsäuren bei atherosklerotischen Erkrankungen wird bei Rosendorff et al. beschrieben. Demnach führen die ungesättigten Fette zu einer Senkung des Blutdrucks und zu verringerten Triglyceridkonzentrationen. Infolgedessen wird das HDL mit Hilfe dieser Fettsäuren erhöht¹⁰⁴.

Bei schweren klinischen Fällen von Atherosklerose im Bereich mittelgroßer bis großer Gefäße ist allerdings eine chirurgische Intervention anzuraten, um weitere Risiken eines ischämischen Gewebes Schadens zu verringern. Es stehen zwei chirurgische Eingriffe zur Wahl. Bei der bereits 1954 von Eastcott et al. beschriebenen Endarterektomie der A. carotis handelt es sich um eine Entfernung der intraluminal gelegenen Plaque und der angrenzenden Endothelzellschicht. Barnett et al. konnten zeigen, dass eine Endarterektomie bei symptomatischen Patienten mit einem Stenosegrad von über 70% einer medikamentellen Therapie deutlich überlegen ist⁴. Allerdings ist der chirurgische Eingriff mit nicht unerheblichen Risiken⁴⁵, wie Wundhämatomen, Nervenverletzung oder -reizung, sowie Hyperperfusions-Syndromen⁸ behaftet.

Eine zweite Möglichkeit der chirurgischen Therapie stellt die Angioplastie und das Stenting der betroffenen Gefäße dar. Diese wurde von Mathias et al. erstmals beschrieben und bietet eine gute Alternative zur Endarterektomie⁷⁸. Durch zahlreiche Studien konnte belegt werden, dass die Angioplastie ohne Stentimplantation einen weniger hohen Erfolg verspricht, als wenn beide Verfahren miteinander kombiniert werden. Der Vorteil der Stentimplantation ist dabei nicht nur in der Dilatation des Gefäßes, sondern auch in der mechanischen Stabilisierung der Plaque zu sehen⁷⁸. Allerdings birgt das Stenten die Gefahr einer anschließenden Embolisierung von Plaqueanteilen oder Thromben, welche letztendlich das Schlaganfallrisiko erhöht⁴⁸. Daher ist diese Methode nicht als Mittel der ersten Wahl anzusehen und wird nur in schweren Fällen angewendet.

Als letzter, aber nicht unbedeutender Therapieansatz ist die zellbasierte Transplantation infolge einer Gefäßschädigung anzusehen. In den letzten Jahren wurde auf diesem Gebiet sehr intensiv geforscht und in zahlreichen Studien konnte der regenerative Effekt bewiesen werden^{141, 130, 53}. Dabei wurde hauptsächlich der inhibierende Einfluss der nach Endothelverletzung verabreichten EPCs auf die Neointimaproliferation beurteilt.

In weiteren Studien konnte belegt werden, dass aufgrund der Applikation von Zytokinen, wie G-CSF^{94, 129, 27} oder SDF-1 α ^{150, 74} eine verstärkte Rekrutierung von Stammzellen aus dem Knochenmark erfolgt. Diese siedeln sich vermehrt im verletzten Gefäßareal an und differenzieren sich zu muren Endothelzellen^{61, 62}.

Die Behandlung des akuten Myokardinfarktes (mögliche Folge der Atherosklerose) sieht ähnliche Therapiemaßnahmen vor. Zunächst erfolgt je nach Schwere der Symptome eine medikamentöse Versorgung des Patienten mit Hilfe von gefäßerweiternden und herzstabilisierenden Präparaten (Nitroglycerin, ACE-Hemmer, β -Rezeptoren-Blocker, Antiarrhythmika u.a.)⁹⁸. Nach Abschluss der Akuttherapie wird eine Koronarangiographie durchgeführt, um die Notwendigkeit weiterer Maßnahmen, wie eine Angioplastie oder eine Bypass-Operation, einschätzen zu können.

Bei der Bypass-Operation handelt es sich um eine *Umgehungsplastik*⁹⁸. Hierbei wird der Gefäßverschluss mittels anlegen von Anastomosen durch Gefäßtransplantation umgangen bzw. überbrückt. Es entsteht somit ein Kollateralkreislauf, welcher die Blutversorgung der minderdurchbluteten Areale wiederherstellt.

2.4 Thrombozyten

2.4.1 Aufbau der Thrombozyten

Wie bereits bei Ruggeri et al. beschrieben, handelt es sich bei Thrombozyten um kernlose Zellen, welche sich aus Megakaryozyten aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut entwickeln können¹⁰⁹. Die Blutplättchen zirkulieren bis zu 10 Tagen im Blutstrom, bevor sie von Makrophagen phagozytiert und in Leber und Milz abgebaut werden¹³³. Innerhalb des Kreislaufsystems dienen die Thrombozyten dem Erhalt der Integrität des Endothels. Beim Auftreten von Läsionen aggregieren sie am verletzten Endothel und an durch die Verletzung freigelegten Strukturen der extrazellulären Matrix¹⁰⁹. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche verschiedene Membranproteine (näher erläutert in Kapitel 2.4) mit denen sie mit anderen zirkulierenden Zellen oder auch der subendothelialen Matrix in Kontakt bzw. Wechselwirkung treten können⁴¹.

Die Blutplättchen sind durch ihre Kernlosigkeit nur eingeschränkt zur Neusynthese von Proteinen befähigt. Außerdem wird täglich ein Drittel der Thrombozytenzahl erneuert und portionsweise über die Milz mit dem peripheren Blut ausgetauscht. Die Thrombozyten weisen in nicht aktiviertem Zustand eine diskoide Form auf, welche sich durch Aktivierung dahingehend verändern lässt, dass die Blutplättchen sogenannte Pseudopodien ausbilden, mit welchen sie mit anderen Zellen in Kontakt treten und auch migrieren können. Die Oberfläche der Thrombozyten wird durch diesen Prozess entscheidend vergrößert. Sie können somit eine Größe von bis zu 13 μm erreichen (inaktiver Thrombozyt 8 μm)⁴⁰.

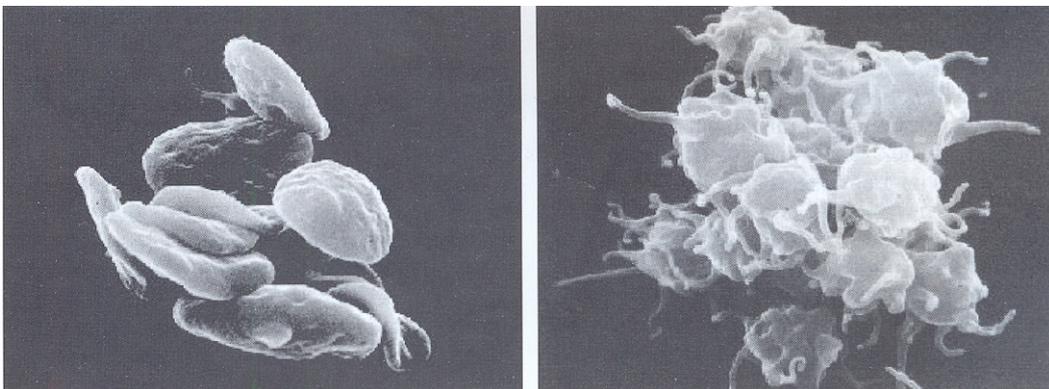


Abbildung 2 : Ruhende (links) und aktivierte (rechts) Thrombozyten (Gawaz, 1999)

Das Innere der Thrombozyten lässt sich in 4 verschiedene Regionen einteilen:

1. periphere Zone
2. strukturelle Zone
3. Zone der Organellen
4. Membransystem

Die *periphere Zone* wird von der zytoplasmatischen Membran gebildet. Diese exprimiert an ihrer Oberfläche zahlreiche Rezeptoren, welche als Bindungsstellen für verschiedene Substanzen aus dem peripheren Blutstrom dienen⁴⁰.

In der *strukturellen Zone* sind zahlreiche Strukturproteine zu finden, welche in ein Netzwerk von Mikrotubuli eingebunden sind. Durch dieses Zytoskelett erhalten die Thrombozyten ihre diskoide Form. Bei Aktivierung der Thrombozyten durch ADP, Thrombin oder deren Adhäsion ans Endothel werden die Mikrotubuli in ihrer Struktur verändert und ermöglichen dem Thrombozyten auf diese Weise dessen Eigenbewegung⁴⁰.

Die *Zone der Organellen* besteht aus Mitochondrien, Glykogenvesikel und weiteren Speichergranula. Die Speichergranula werden je nach Inhalt in verschiedene Granulatypen eingeteilt.

Die *Dense bodies*, welche aufgrund ihrer Dichteteerscheinung im Elektronenmikroskop benannt wurden, dienen als Speicher für niedermolekulare Proteine, wie ADP, ATP, Serotonin, etc.⁴⁰.

Die *alpha-Granula* hingegen stellen die größte Gruppe der Speichergranula dar. Sie beinhalten Proteine, die für die Funktion der Thrombozyten von Bedeutung sind.

In den *Lysosomen* werden hydrolytische Enzyme gespeichert, welche durch Exozytose an der Oberflächenmembran freigesetzt werden⁴⁰.

Das *Membransystem* der Thrombozyten besteht aus einem kanalikulären und einem tubulären Anteil. Das kanalikuläre System dient der Kontaktaufnahme mit anderen Zellen und ist nach außen hin offen. Der tubuläre Anteil der Blutplättchen besteht aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum, welches ein Residuum der Megakaryozyten darstellt. Das endoplasmatische Retikulum dient als Calciumionen-Speicher. Calciumionen sind ein wichtiger Trigger für die Membranregulation und die Aktivierung der Thrombozyten; diese führt zur Pseudopodienausbildung und Degranulation der zytoplasmatischen Speicher⁴⁰.

2.4.2 Rolle der Thrombozyten bei Gefäßverletzung

Infolge einer Gefäßverletzung kommt es zur Aggregation der Thrombozyten und zur anschließenden Thrombusbildung. Bei diesem physiologischen Reaktionsmechanismus können die Blutplättchen allerdings nicht zwischen traumatischem und pathologischem Gefäßschaden differenzieren. Infolgedessen können okklusive Thromben entstehen, welche Ursache von vaskulären Erkrankungen sein können und schlussendlich einen ischämischen Gewebeschaden herbeiführen können¹¹⁰.

Physiologischerweise dienen Thrombozyten dem Wundverschluss nach akuter Gefäßverletzung. Dabei lagern sich die Blutplättchen dem Gefäßdefekt an und setzen Mediatoren frei, welche wiederum Thrombozyten, aber auch andere Zellen, wie z.B. Leukozyten, an den Ort des Geschehens locken³⁸. Durch die Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel kommt es zu einer Aktivierung der Zellen und einer Aggregation der Blutplättchen. Der daraus resultierende Thrombus führt zur Abdichtung des Defekts und eventuell zu einem Gefäßverschluss^{110, 111}. Die Aggregation der Thrombozyten wird dabei sowohl durch Calcium- als auch durch ADP-Freisetzung, welches bei Schädigung des Gefäßes durch Spaltung von ATP entsteht, induziert¹¹. Infolge der ADP-Sekretion aggregieren die Blutplättchen und setzen an ihrer Oberfläche Thrombin frei. Dieses führt zu einer Umwandlung von Fibrinogen zu unlöslichem Fibrin und es entsteht ein weißer Plättchentrombus, der auch Agglutinationstrombus genannt wird¹¹.

2.4.3 Rolle der Thrombozyten bei der Atheroskleroseentstehung

Die Arteriothrombose ist ein akuter Gefäßverschluss, welcher durch chronische Gefäßwandschädigung und atherosklerotische Veränderungen entstehen kann. Diese Komplikation führt nicht selten zu einem akuten Herzinfarkt oder Schlaganfall³⁷.

Sowohl bei der Entstehung der Atherosklerose als auch der Thrombose spielen Blutplättchen eine entscheidende Rolle¹¹¹. Die Thrombozyten sind dabei in ein komplexes Entzündungsgeschehen involviert, in welchem zahlreiche Zellen, wie z.B. neutrophile Granulozyten, Monozyten und Endothelzellen, miteinander interagieren³⁸. Dadurch wird deutlich, dass den Thrombozyten, welche nach Verletzung als erster Zelltyp adhären, nicht nur eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Hämostase

zukommt, sondern sie auch in das Entzündungsgeschehen und ganz besonders in die Atheroskleroseentstehung eingebunden sind³⁸.

Durch eine Schädigung des Gefäßendothels werden subendotheliale Strukturen, wie z.B. Kollagen, freigelegt, an welche sich Thrombozyten über bestimmte Oberflächenrezeptoren anlagern können^{111, 37, 38}. Bei dieser initialen Kontaktaufnahme sind zwei Rezeptoren von entscheidender Bedeutung für die Adhäsion der Thrombozyten. Das Glykoprotein GPIb-V-IX, welches auch als Rezeptor des von Willebrandt-Faktors bekannt ist, führt über die Bindung von P-Selektin zu einer eher lockeren Bindung der Plättchen an die extrazelluläre Matrix. Über das Glykoprotein GPVI, welches an der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert wird, treten diese mit den Kollagenfibrillen in Kontakt und werden dadurch aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer Freisetzung von weiteren Chemokinen, welche hauptsächlich Leukozyten an die geschädigte Gefäßwand rekrutieren. Diese können dann in das geschädigte Gewebe migrieren, proliferieren und somit eine Inflammation hervorrufen³⁸. Außerdem bedingt die Thrombozytenaktivierung eine Modulation der Integrine ($\alpha_2\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$) auf der Plättchenmembran. Die Thrombozyten zeigen außerdem das sogenannte „spreading“; es werden Pseudopodien sichtbar, welche den Thrombozyten eine Migrationsfähigkeit verleihen^{38, 40}.

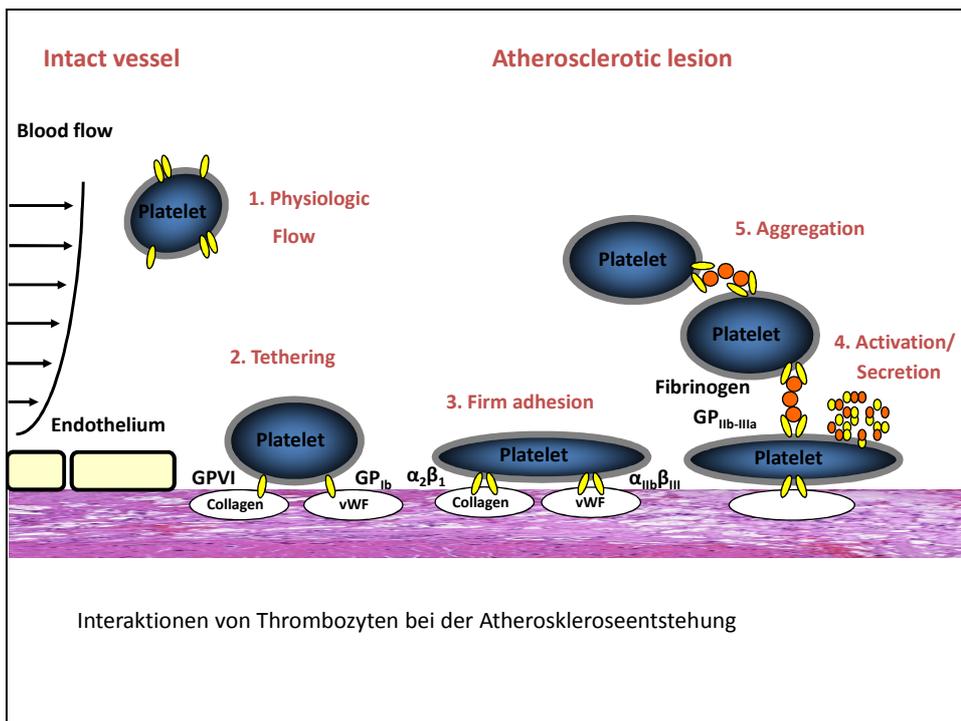


Abbildung 3: Interaktionen von Thrombozyten bei der Atherogenese (Langer 2008)

Massberg et al. konnten zeigen, dass aktivierte Thrombozyten am intaktem Endothel adhären und als eine Art Entzündungsmediator fungieren, welcher als möglicher Auslöser der Atherogenese angesehen werden kann. Dabei exprimieren die Blutplättchen an ihrer Oberflächenmembran P-Selektine und setzen CD40-Liganden und Interleukin-1 β frei, welche die Endothelzellen stimulieren und somit zu einer proatherosklerotischen Gefäßwandveränderung führen⁷⁵.

2.5 Oberflächenrezeptoren der Thrombozytenmembran

Die Mechanismen der Hämostase und Thrombose sind sehr komplex und in deren Prozess sind sehr viele verschiedene Faktoren involviert. Hierbei spielen auch die Interaktionen zwischen den Blutplättchen, dem Endothel und der extrazellulären Matrix, zu der auch das Kollagen gehört, eine entscheidende Rolle. Für die Adhäsion der Thrombozyten sind hierbei spezielle Adhäsionsrezeptoren erforderlich. Diese werden von den Blutplättchen an deren Oberfläche exprimiert und können schließlich mit Oberflächenstrukturen anderer Zellen oder auch mit dem Endothel in Kontakt treten. Diese Oberflächenrezeptoren werden anhand ihrer Molekülstruktur in 4 Gruppen eingeteilt⁴¹.

1. Integrine
2. Glykoproteine
3. Selektine
4. Glykoproteine vom Immunglobulin-Typ

2.5.1 Integrine

Integrine treten mit Strukturen des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix in Kontakt. Sie sind ubiquitär und somit auf den meisten Zellen zu finden. Diese Oberflächenrezeptoren sind bei zahlreichen Zellinteraktionen, wie z.B. bei der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten, der Entwicklung und Differenzierung von Geweben (besonders auch im Hinblick auf das Tumorstadium), aber auch bei der Anlagerung, Migration und Anreicherung von Leukozyten im Gewebe, beteiligt⁴¹.

Die Integrine stellen ein Dimer aus einer α - und β -Untereinheit dar, welche über eine nicht-kovalente Bindung miteinander verknüpft sind. Die α -Untereinheit dient dabei der strukturellen Klassifizierung, während die β -Untereinheit der Spezifität des Moleküls dient. Die Untereinheiten bestehen jeweils aus einer endständigen Amino-gruppeneinheit, welche die extrazelluläre Domäne darstellt, einem transmembranären Abschnitt und einem N-terminalen Ende. Die Integrine können mit zahlreichen Molekülen interagieren, wie z.B. mit Glykoproteinen der extrazellulären Matrix. Ein weiterer Effekt der Integrine ist es, dass sie ihre Konformation ändern können und somit eine schnelle Regulation und eine Verbesserung deren Affinität möglich ist⁴¹.

2.5.2 Leuzinreiche Glykoproteine

Diese Glykoproteine zeichnen sich durch ihren Reichtum an der Aminosäure Leuzin aus und werden als GPIb-V-IX und GPIV bezeichnet. Sie bestehen aus mehreren Untereinheiten, die über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Das Protein GPIb-V-IX spielt besonders bei der Adhäsion von zirkulierenden Blutplättchen nach Aktivierung von von Willebrandt-Faktor durch freiliegende Kollagenfibrillen eine Rolle. Es ist somit ein wichtiger Mediator für die primäre Hämostase⁴¹.

2.5.3 Selektine

Selektine haben ihre herausragende Bedeutung in der Interaktion mit anderen Zellen. Sie sind aus einer extrazellulären lektinhaltigen Domäne, welche einer Region benachbart liegt, die dem EGF sehr ähnlich ist und zahlreicheren kleineren Bezirken, die dem Komplementsystem homolog sind, aufgebaut. Man unterscheidet drei verschiedene Typen von Selektinen⁴¹.

Die *E-Selektine* treten bei der Aktivierung durch Zytokine in Erscheinung, werden vom Endothel exprimiert und führen zu einer Adhäsion von Granulozyten am geschädigten Gewebe⁴¹.

Die *L-Selektine* hingegen werden lediglich in Leukozyten gefunden. Diese werden an der Oberfläche der weißen Blutzellen nach Aktivierung und Anhaftung am Endothel freigesetzt⁴¹.

Die letzte Gruppe der Selektine, welche als *P-Selektine* bezeichnet wird, werden sowohl von Thrombozyten als auch von Endothelzellen exprimiert. Allerdings kommt es erst nach Aktivierung dieser Zellen zu einem raschen Anstieg der Freisetzung und daraus resultierend zu einer Anlagerung von Leukozyten an der Endothelläsion.

P-Selektin ist somit maßgeblich an der sekundären Hämostase beteiligt und ein wichtiger Mediator im Entzündungsgeschehen⁴¹.

2.5.4 Glykoproteine der Immunglobulin-Superfamilie

Zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen vom Immunglobulin-Typ gehören die Moleküle Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecul 1 (PECAM-1) und Intercellular Adhesion Molecul 1 (ICAM-1). Beide Rezeptoren werden bei Thrombozyten gefunden. PECAM-1 wird von Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und auch Monozyten exprimiert. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Blutplättchen an der subendothelialen Matrix und scheint bei der Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten beteiligt zu sein⁴¹. Dem interzellulären Adhäsionsmolekül (ICAM-1), welches bei aktivierten Plättchen zu finden ist, kommt eine entscheidende Bedeutung beim Entzündungsgeschehen zu; dort trägt es zu einer Adhäsion sowohl von Thrombozyten als auch von Leukozyten bei⁴¹.

Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe stellt das Glykoprotein VI dar¹⁹. Es wird von den Blutplättchen und Megakaryozyten auf deren Oberfläche exprimiert und dient der Adhäsion an Kollagen, welches einen entscheidenden Schritt bei der Aggregation der Thrombozyten an der Gefäßwand darstellt⁸². GPVI mit einem Molekulargewicht von 62kDa ist der bedeutendste Kollagenrezeptor¹⁹. Es besteht aus zwei immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domänen, welche durch Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Darüber hinaus besitzt es ein muzin-ähnliches Zwischenstück, eine transmembranäre Region und einen kurzen zytoplasmatischen Teil¹³⁸.

2.5.4.1 Bedeutung des Glykoproteins VI

Moroi et al. konnten durch Untersuchung einer Patientin mit Glykoprotein VI-Defizienz zeigen, dass der Verlust dieses Oberflächenrezeptors auf der

Thrombozytenmembran zu einer Adhäsions- und Aggregationshemmung an Kollagen führt⁸². Kollagen ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix, welche bei Verletzungen des Endothels freigelegt wird.

Die Patientin zeigte im Gegensatz zu Patienten, deren Thrombozyten ein Defizit im GPIIb-Komplex besitzen, lediglich eine milde Blutungsneigung, was auf eine untergeordnete Rolle des GPVI-Rezeptors bei der Hämostase schließen lässt. Darüber hinaus bleiben die Adhäsion und die anschließende Aggregation durch andere Mediatoren, wie ADP oder sonstige thrombogene Substanzen unbeeinflusst.

Diese frühen Erkenntnisse lassen vermuten, dass das Glykoprotein VI als ein wichtiger Kollagenrezeptor fungiert⁸².

Durch die Bindung an Kollagen werden die Thrombozyten aktiviert und der Tyrosin-Kinase-Signaltransduktionsweg wird eingeschlagen. Dabei tritt der GPVI-Rezeptor mit dem FcR γ -Fragment in Kontakt, was zu einer Phosphorylierung der FcR-Kette führt^{43, 88}. Dieser Schritt leitet somit die Aktivierung weiterer Enzyme ein und das Entzündungsgeschehen schreitet auf diese Weise voran. Es ist allerdings zu bemerken, dass das Glykoprotein VI zu den non-Fc Rezeptoren gehört, aber trotzdem mit der FcR γ -Kette in Kontakt tritt⁴³.

Nieswandt et al. konnten zeigen, dass durch die spezifische Blockade des GPVI-Rezeptors über einen monoklonalen Antikörper (mAB JAQ-1) die Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen deutlich reduziert, aber zu keiner Zeit vollständig blockiert wird⁸⁶.

Ein interessanter Aspekt dieser Untersuchungen ist außerdem, dass die Applikation des mAB JAQ-1 zu einem kompletten Knockdown des GPVI-Rezeptors auf der Thrombozytenmembran führen kann, welcher erst nach einigen Wochen wieder behoben ist. Die Thrombozytenzahl und deren Funktion sind dabei nicht beeinflusst.

Daher stellt der Glykoprotein VI-Rezeptor einen guten Angriffspunkt für die antithrombotische Therapie dar⁸⁶.

Die Interaktion des GPVI-Rezeptors der Thrombozyten mit Kollagen ist essentiell für die Aktivierung der Integrine, besonders von $\alpha_2\beta_1$ -Integrin, und führt dadurch zu einer stabileren Anhaftung der Blutplättchen an der Gefäßwand⁸⁷. GPVI kann dabei zwei verschiedene Signalwege beschreiten. Zum einen kann GPVI an fibrilläres Kollagen binden und dadurch die Plättchen-Kollagen-Interaktion durch die Integrine triggern. Dabei gewinnt der Rezeptor im Hinblick auf die Kollagenbindung mit Zunahme der Scherkräfte innerhalb des Gefäßsystems an Bedeutung⁸⁷. Ein anderer Weg spielt im

Zusammenhang mit löslichem Kollagen eine Rolle, welches auch oft bei *in vitro*-Versuchen verwandt wird. Hierbei ist der GPVI-Rezeptor auf die Kooperation mit den Integrinen angewiesen. Dieser Reaktionsmechanismus ist auch notwendig, wenn der Rezeptor z.B. durch JAQ-1 blockiert wird⁸⁶. In diesem Fall wird die Bindungsstelle des C-reaktiven Proteins (CRP) blockiert, was zu einer mangelhaften Bindung desselben führt.

In einer Studie von Massberg et al. wird die Bedeutung von GPVI im Hinblick auf die Rekrutierung der Thrombozyten an das Gefäßendothel beschrieben. Demnach stellt die Adhäsion der Blutplättchen an die extrazelluläre Matrix (ECM) eine Art Schlüsselereignis dar. Es werden weitere Thrombozyten an den Ort der Endothelverletzung rekrutiert und die Aggregation der Zellen führt zur Thrombusformation^{75,76}.

Das Ausmaß der Adhäsion und der Aggregation der Thrombozyten, sowie die Stärke der Rekrutierung aus dem zirkulierenden Blutstrom ist von der Schädigung des Gefäßendothels abhängig. So konnten Dubois et al. in verschiedenen Verletzungsmodellen zeigen, dass die Art und die Ausprägung der Gefäßwandverletzung auf die Interaktion des GPVI-Rezeptors mit der ECM einen entscheidenden Einfluss nimmt. Bei massiver Freilegung von Kollagen kommt es innerhalb kürzester Zeit zu einer starken Thrombusbildung, welche dann zu einem Gefäßverschluss führen kann³².

2.5.4.2 Rekombinantes lösliches Glykoprotein VI

Bei dem in dieser Arbeit verwandten Glykoprotein VI handelt es sich um ein lösliches Dimer. Wie bei Massberg et al. beschrieben, wurde die extrazelluläre Domäne des humanen Glykoprotein VI kloniert und anschließend mit dem Fc-Anteil des humanen Immunglobulins fusioniert⁷⁷. Die Herstellung erfolgte durch Integration der Gensequenz in ein bakterielles Plasmid und dessen Klonierung. Anschließend wurde das Plasmid in Zellen transfiziert. Das Molekulargewicht des Dimers beträgt 85 kDa⁷⁷. Das Protein wurde anschließend in verschiedenen Versuchsansätzen untersucht. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Bindung des GPVI-Dimers an Kollagen spezifisch erfolgt und sich somit der extrazellulären Matrix anlagert. Diese Versuche wurden sowohl unter statischen als auch Flussbedingungen überprüft. Die Bindung

des GPVI-Fc-Moleküls an Kollagen führt zu einer verminderten Anlagerung von Thrombozyten, da weniger freiliegendes Kollagen vorhanden ist. Dieser Prozess ist allerdings von der Konzentration der GPVI-Fc-Lösung abhängig⁷⁷.

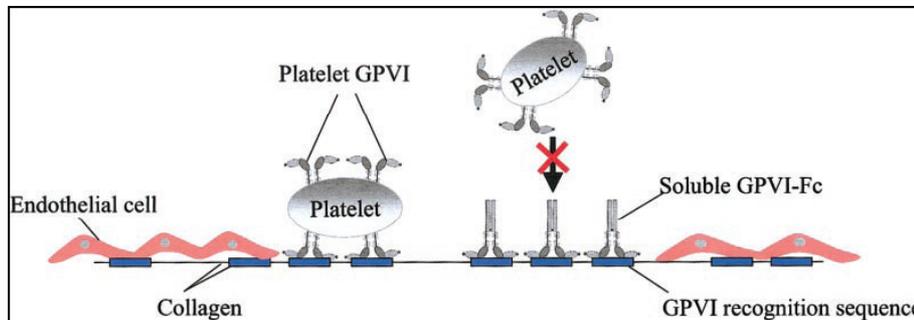


Abbildung 4: Interaktionen des löslichen GPVI-Fc mit der subendothelialen Matrix (Massberg, 2003)

Im Tierversuch beschreiben Massberg et al. nach Verletzung der A. carotis durch Drahtdenudation und anschließender Gabe von GPVI-Fc eine Abnahme der Plättchenrekrutierung und eine daraus resultierende Reduktion der Adhäsion und Aggregation der Plättchen am verletzten Endothel. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Tiere nach Applikation des Fusionsprotein eine verlängerte Blutungszeit aufwiesen, was ebenso auf die verminderte Thrombozytenaggregation zurückzuführen ist⁷⁷.

Durch die spezifische Bindung des Fusionsmoleküls an der Gefäßverletzung stellt dieses ein vielversprechendes Werkzeug zur Detektion und Therapie von Gefäßverletzungen dar^{63, 117}. Es ist allerdings noch zu überprüfen, ob es mit einem weniger hohen Risiko für das Auftreten von Hämorrhagien behaftet ist, als der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen das Glykoprotein VI.

2.6 Stamm- und Progenitorzellen

2.6.1 Einteilung der Stammzellen

Definitionsgemäß sind Stammzellen in der Lage sich unendlich oft zu teilen und sich wenigstens in einen ausgereiften Zelltyp zu differenzieren. Stammzellen werden nach der Spezies und dem Gewebe, aus dem sie stammen, und nach ihrem Potential, sich in

eine oder mehrere Arten ausgereifter Zellen differenzieren zu können, klassifiziert⁵². Verschiedene Untersuchungen der vergangenen Jahre konnten zeigen, dass Stammzellen in jedem adulten Organ des Körpers zu finden sind. Stamm- und Progenitorzellen finden sich im Knochenmark, in der peripheren Zirkulation, insbesondere dann, wenn sie durch eine lokale Gewebsschädigung mobilisiert wurden, und in peripheren Organen, wie z.B. Leber, Herz, Niere und Gehirn^{30, 81}. Im Knochenmark findet man verschiedene Arten von Stammzellen, unter anderem hämatopoetische Stammzellen, die sich in jeden beliebigen Typ ausgereifter Blutzellen differenzieren können. Außerdem findet man endotheliale Progenitorzellen, pluripotente adulte Stammzellen und mesenchymale Stammzellen, welche zu Chondrozyten, Osteoblasten, Fibroblasten, Adipozyten, Kardiomyozyten, Neuronen, Endothelzellen und Monozyten ausreifen können^{52, 9, 148}. Mesenchymale Stammzellen kommen außerhalb des Knochenmarks auch in anderen Geweben vor, wie dem Fettgewebe, dem peripheren Blut, dem Nervensystem, der Leber und im fetalen Gewebe⁹. Die Leber, die Muskulatur, das zentrale Nervensystem, die Niere, das Pankreas, die Lunge, die Haut und der Gastrointestinaltrakt besitzen grundsätzlich die Fähigkeit ihr Gewebe aus zirkulierenden und residenten Stamm- bzw. Progenitorzellen zu regenerieren^{52, 30, 83}.

Progenitorzellen sind definiert als Vorläuferzellen zahlreicher verschiedener ausgereifter Zelltypen. Sie stammen von pluripotenten Stammzellen ab, zu denen sowohl die hämatopoetischen, die mesenchymalen als auch die gewebsständigen Stammzellen gehören. Sie werden entsprechend ihres Differenzierungsgrades in Richtung einer bestimmten adulten Zellart oder ihrer Lokalisation in peripheren Organen eingeteilt als endotheliale Progenitorzelle, Progenitorzelle glatter Muskelzellen, kardiale Progenitorzelle oder hepatische Progenitorzelle. Durch zahlreiche Studien konnte gezeigt werden, dass die Progenitorzelle für die Geweberegeneration und den Gewebeumbau eine entscheidende Rolle spielt. So stammt etwa 25% des Endothels in transplantierten Herzen aus extrakardialen Quellen und bis zu 90% der glatten Muskelzellen in der Neointima stammen aus Progenitorzellen des Knochenmarks¹¹³. Jüngste präklinische und klinische Studien benutzten Stammzell- und Progenitorzelltransplantation zur Organvaskularisation und -regeneration⁹⁹. Sie konnten zeigen, dass aus dem Knochenmark stammende hämatopoetische und endotheliale Progenitorzellen die Vaskularisation nach ischämischen Ereignissen in den Extremitäten, in der Retina und im Myokard

wiederherstellen können⁹⁹. Endotheliale Progenitorzellen sind dabei die am besten untersuchten Progenitorzellen, da sie in der Lage sind sich zu Endothelzellen zu differenzieren und einen Gefäß- und Gewebeschaden wieder rückgängig zu machen, indem sie z.B. an der Regeneration und Angiogenese mitwirken und diese Prozesse fördern^{3,54}. Die Interaktion von Thrombozyten mit Vorläuferzellen wurde ebenfalls vor allem an endothelialen Progenitorzellen untersucht^{73, 61, 62, 29, 66}.

2.6.2 Bedeutung der Stammzellen in der regenerativen Medizin

In den letzten Jahren wurden viele Studien im Rahmen der Regenerationsmedizin mit Stammzellen durchgeführt. Dabei kamen verschiedenen Stammzelltypen, wie z.B. Stammzellen aus dem Knochenmark, adulte kardiale, mesenchymale oder auch embryonale Stammzellen zum Einsatz.

Das Knochenmark stellt das am besten untersuchte Organ im Hinblick auf den Ursprung von Stammzellen dar. In zahlreichen Studien konnte eine Regeneration des Myokardgewebes nach einem ischämischen Infarkt durch diese Art von Stammzellen erreicht werden^{91 94, 95}. Dabei unterscheiden sich die Untersuchungen meist sowohl in der Art der verwandten Stammzelltypen als auch in der Applikationsart.

Eine intrakoronare oder transkoronare Applikation z.B. führt zu einer moderaten, aber dennoch signifikanten Verbesserung der myokardialen Funktion, was sich besonders in der Zunahme der Ejektionsfraktion widerspiegelt^{2, 115}.

Die Skelettmuskelzelle per se verfügt über eine hohe Regenerationsfähigkeit, wodurch sie für die regenerative Medizin an Bedeutung im Hinblick auf die zellbasierte Therapie gewinnt⁹⁷. Der Myoblast stellt die Vorläuferzelle der Skelettmuskelzelle dar und ist einer der ersten Kandidaten im Rahmen klinischer Studien und der Behandlung von Herzerkrankungen gewesen⁹⁷. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Myoblasten zu einer funktionellen Wiederherstellung der Herzen nach Myokardinfarkt führt⁹⁷.

Im Herzmuskelgewebe selbst konnten allerdings ebenfalls Progenitorzellen gefunden werden, welche sich zu Kardiomyozyten, aber auch Blutgefäßen differenzieren können. Diese Zellen besitzen unterschiedliche Oberflächenmarker, wie c-kit⁶, Sca-1⁹², Abc2g⁷³ und/oder Isl-1¹⁵.

Allerdings führen diese Zelltypen unter physiologischen Umständen nicht zu einer Regeneration des geschädigten Gewebes. Dieses Phänomen ist bis heute weitestgehend ungeklärt.

Eine weitere wichtige Gruppe von Stammzellen stellen die mesenchymalen Vorläuferzellen dar. Sie gehen aus dem Knochenmark hervor und können sich zu Knochen, Knorpel, Bindegewebe, Muskulatur, Fett und anderen mesenchymalen Geweben differenzieren. Makino et al. konnten zeigen, dass sie sich zusätzlich zu Kardiomyozyten entwickeln können⁷¹, so dass Shake et al. daraufhin eine lokale Applikation dieser Zellen bei Schweinen nach Myokardinfarkt durchführten¹²¹. Man bewies, dass die mesenchymalen Stammzellen zum Infarktbezirk rekrutiert werden¹²¹ und dort lokal SDF-1⁷⁰ freisetzen, was zu einer Förderung der Angiogenese führt.

Während sich all die vorher genannten Stammzelltypen auch im adulten Organismus finden lassen, handelt es sich bei den embryonalen Stammzellen um Zellen, welche lediglich in der frühen Fetalphase zu finden sind. Embryonale Stammzellen von Mäusen wurden im Rahmen von Untersuchungen in der Tumorbilogie bereits in den 50er Jahren gefunden¹²⁴. Die undifferenzierten Stammzellen zeichnen sich durch die Expression von charakteristischen Markern aus, welche im Verlaufe der Entwicklung rasch verschwinden. Doetschman et al. konnten erstmalig 1985 das kardiogene Potential der embryonalen Mauszellen nachweisen³¹. Allerdings birgt der Einsatz embryonaler Stammzellen die Gefahr der Entstehung von Teratomen¹³⁶. Bei der Applikation von embryonalen Stammzellen von Mäusen bei anderen Tierarten, sowie beim Einsatz am Menschen muss eine mehr oder weniger heftige Immunreaktion berücksichtigt werden⁶⁰. Die Isolation von humanen embryonalen Stammzellen erfolgte erstmals durch Thomson et al. im Jahre 1998¹³². Auch bei diesen Zellen konnte die Differenzierung zu Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt⁵⁹ und deren Aktivierung durch Wachstumsfaktoren, wie z.B. dem Insulin-like Growth Factor (ILGF) nachgewiesen werden⁸⁰.

2.6.3 Endotheliale Stammzellen

Frühe Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene Oberflächenrezeptoren, wie z.B. CD133, CD34 und VEGF2 (Vascular Endothelial Growth Factor 2). Sie besitzen die Fähigkeit zu proliferieren und sich zu

maturen Endothelzellen zu differenzieren^{147, 54}. Ein Zeichen für die Entwicklung hin zur maturaen Endothelzelle sehen Yin et al. in dem Verlust von CD133. Dieser Oberflächenmarker ist lediglich bei EPCs aus dem Knochenmark, dem Nabelschnurblut und in früher Phase in der peripheren Zirkulation zu finden.

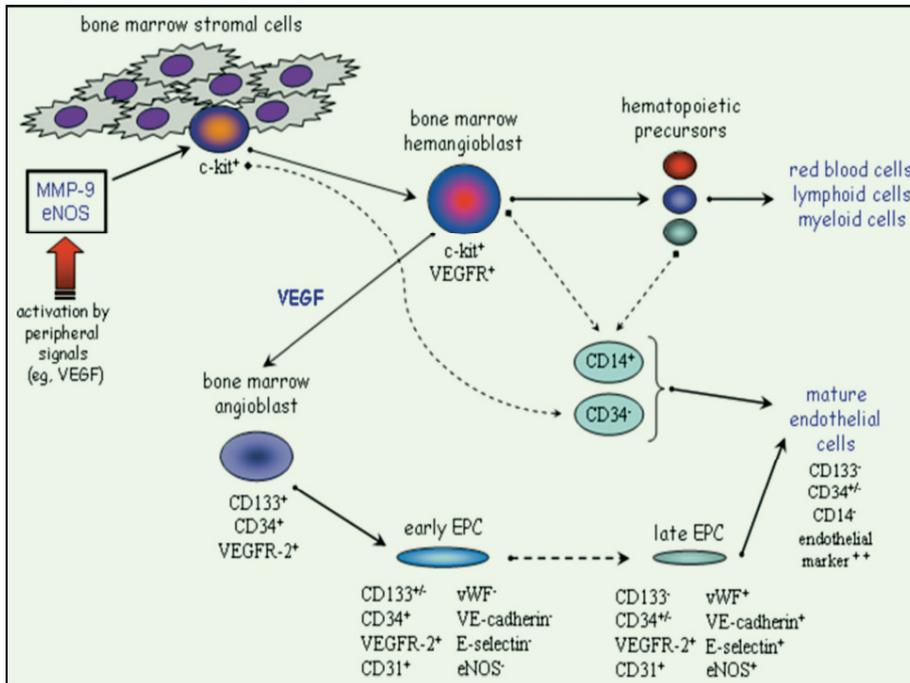


Abbildung 5: Mobilisation und Differenzierung von Stammzellen aus dem Knochenmark (Hristov, 2003)

Nach Verlust des CD133-Oberflächenantigens kann die Expression von CD31, Cadherin und vWF beobachtet werden. Diese Umwandlungsprozesse sind Zeichen der Ausdifferenzierung der EPCs zu maturaen Endothelzellen¹⁴⁷.

Zur Isolation der endothelialen Stammzellen aus dem Knochenmark bzw. dem peripheren Blut dienen, wie bereits bei Asahara et al. beschrieben, die Marker CD133 und CD34³.

Die CD34⁺ Zellen können ihrerseits wiederum über weitere Oberflächenantigene mit anderen Zellen in Kontakt treten; in besonderem Maße lässt sich dies bei der Interaktion mit Blutplättchen beobachten⁵⁶.

Interessanterweise können endotheliale Progenitorzellen nicht direkt mit Kollagen interagieren, sondern deren Adhäsion am verletzten Endothel erfolgt über die Thrombozyten²⁴. Diese sind nicht nur für das Homing, sondern auch für die Proliferation dieser Zellen von entscheidender Bedeutung⁶⁵. Lev et al. konnten

außerdem zeigen, dass dieser Prozess wahrscheinlich calciumabhängig ist, da der Effekt bei Verabreichung von EDTA nicht auftrat. Des Weiteren lässt sich durch deren Untersuchungen zeigen, dass die P-Selektine für die Interaktion von entscheidender Bedeutung sind. Durch die Blockade der P-Selektine wird die Adhäsion der endothelialen Progenitorzellen an den Thrombozyten und letztendlich an der geschädigten Gefäßwand verhindert⁶⁵.

Die Anzahl der zirkulierenden endothelialen Stammzellen scheint in direkter Korrelation zu dem anschließenden Entzündungsgeschehen zu stehen. So konnten Werner et al. in einer Studie nachweisen, dass bei Patienten mit einer geringen Progenitorzahl die Entzündung am verletzten Gefäß deutlich verstärkt auftritt, was zu einer verminderten Regeneration führt¹⁴².

Hill et al. konnten außerdem zeigen, dass die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen bei Patienten mit Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, Hyperlipidämie oder Hypertonie deutlich verringert ist⁵³. Die Zellen werden zusätzlich in ihrer Funktion und ihrer Migrationsfähigkeit durch die Risikofaktoren negativ beeinflusst, so dass sie sich infolgedessen weniger zu Kolonien zusammenschließen, was wiederum die Heilungstendenzen verschlechtert¹⁴⁴.

Daub et al. konnten zeigen, dass sich die EPCs nicht nur in den endothelialen Phänotyp differenzieren können, sondern einige der CD34⁺ Zellen zu großen lipidreichen Zellen, welche zahlreiche Granula in ihrem Zytoplasma besitzen, transformieren. Dieses Erscheinungsbild ist charakteristisch für Schaumzellen. Diese entstehen aus Makrophagen nach Aktivierung durch oxidiertes LDL^{25, 26}.

Bereits frühere Studien lassen vermuten, dass es einen engen Zusammenhang zwischen der Differenzierung von EPCs zur endothelialen Zelllinie und der Monozyten/Makrophagen-Linie gibt. Ribatti et al. führen dies auf einen gemeinsamen Ursprung im Knochenmark und auf die beiden Linien gemeinsame Vorläuferzelle, dem Hämangioblasten, zurück¹⁰². Die einzelnen Zelltypen unterscheiden sich in ihren Oberflächenantigenen. Demnach exprimieren Monozyten und Makrophagen unter anderem CD14-Antigen, welches den muren Endothelzellen völlig fehlt¹⁰⁰.

2.6.3.1 Interaktionen von Thrombozyten mit endothelialen Stammzellen

Physiologischerweise binden zirkulierende Thrombozyten nicht am Endothel^{137, 47}. Wie bei Gawaz et al. beschrieben, bedarf es einer Aktivierung des Endothels, wie dies z.B. durch erhöhten „Scherstress“ vorkommt³⁸. Die Thrombozyten adhären anschließend am Endothel und werden dadurch ebenfalls aktiviert. Sie setzen weitere Mediatoren frei, die zu einer Anlockung weiterer Entzündungszellen führen. Eine wichtige Triggerfunktion bei der Aktivierung nehmen Kollagen und vWF ein¹¹¹. Infolgedessen kommt es zu einer Modulation der Integrine, besonders der β_3 -Untergruppe, wodurch eine stärkere Anhaftung der Thrombozyten an das Endothel erfolgt. Die Interaktion der Blutplättchen mit dem Gefäßendothel stellt einen mehrstufigen Prozess dar, welcher durch Adhäsion, Rollen der Zellen entlang des Endothels, Aggregation und Thrombusbildung gekennzeichnet ist³⁸. Die Anhaftung der Blutplättchen an die Endothelzelle und die anschließende Freisetzung von weiteren Botenstoffen führt zu einer Aktivierung anderer Entzündungszellen. Interleukin-1 β scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Es wird nach Adhäsion durch den Thrombozyten freigesetzt und initiiert die Expression von Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) und Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) auf der Oberfläche von Endothelzellen³⁸. Durch diese Moleküle werden Leukozyten, insbesondere Monozyten, zum Gefäßschaden gelockt, welche sich dann im Gewebe zu Makrophagen differenzieren und letztendlich zu Schaumzellen werden können. Darüberhinaus scheint die Freisetzung von P-Selektinen zu einer transienten Adhäsion der Thrombozyten ans Endothel zu führen. Dieser Prozess wird als „Rolling“ bezeichnet³⁸.

Zerneck et al. konnten zeigen, dass SDF-1 α , welches von apoptotischen glatten Muskelzellen der Gefäßwand gebildet wird, an die Thrombozyten bindet und dann die Interaktion mit den EPCs über P-Selektine und den CXCR4-Rezeptor gesteuert wird. SDF-1 α stellt dabei den spezifischen Ligand für den CXCR4-Rezeptor dar¹⁵⁰. Allerdings treten die Blutplättchen nicht nur mit den Endothelzellen in direkten Kontakt, sondern sie nehmen auch Einfluss auf deren Chemotaxis und Migration. Langer et al. konnten zeigen, dass sich murine endotheliale Progenitorzellen nach Inkubation mit Thrombozyten vermehrt anreichern und sich anschließend zu muren Endothelzellen differenzieren. Somit spielen die Thrombozyten eine entscheidende Rolle für das Homing der EPCs an geschädigten Gefäßwänden^{61, 62}.

Bei Massberg et al. konnte gezeigt werden, dass bei der Rekrutierung von aus dem Knochenmark stammenden CD34⁺ Zellen den Blutplättchen eine entscheidende Rolle zukommt⁷⁴. Dabei führen die Thrombozyten nicht nur zu einem Homing der endothelialen Progenitorzellen, sondern sie erhöhen auch deren Überlebensfähigkeit. Nach Kokultivierung von Blutplättchen mit EPCs werden deutlich weniger apoptotische Zellen gefunden²⁹. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe um de Boer nachweisen, dass die Migrationsbereitschaft der CD34⁺ Zellen unter dem Einfluss von Thrombozyten und Fibrin enorm verstärkt wird²⁹.

Die Interaktion von Thrombozyten mit Endothelzellen ist auch von entscheidender Bedeutung was die Entstehung und das Voranschreiten der Atherosklerose betrifft. An Stellen, an denen atherosklerotische Veränderungen entstehen, findet man eine Dysfunktion des Endothels und auch Gefäßschädigungen, welche größtenteils durch Fettablagerungen hervorgerufen werden⁶⁹.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Herstellung des bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-CD133

Das Adhäsionsmolekül setzt sich aus dem löslichen GPVI-Fc-Dimer und einem Antikörper zusammen. Dieser Antikörper ist gegen den Oberflächenmarker CD133, wie er auf hämatopoetischen Stammzellen zu finden ist, gerichtet. Massberg et al. haben die Entwicklung der löslichen Form des GPVI bereits beschrieben; hierbei wird der extrazelluläre Anteil des humanen GPVI kloniert und anschließend mit der humanen Immunglobulin-Fc-Domäne verbunden. Zur Produktion des Proteins werden Hela Zellen herangezogen. Diese produzieren das Protein, welches nach Zentrifugation dem Überstand entnommen werden kann⁷⁷. Der monoklonale Antikörper W6B3C1 gegen CD133 wurde von Bühring et al. entwickelt und aus Überständen von Hybridomzellen gewonnen (Bühring CD133 cluster report). Durch die Konjugation dieser beiden Proteine erhält man das Konstrukt GPVI-Fc-CD133⁵⁸, welches in Kombination mit den CD34⁺ Zellen den Mäusen über die Schwanzvene injiziert wird. In *Abbildung 6* ist das Adhäsionsmolekül schematisch dargestellt. Es zeigt zum einen die Bindung an die Progenitorzelle und zum anderen an freiliegende Strukturen der extrazellulären Matrix, wie z.B. Kollagen.

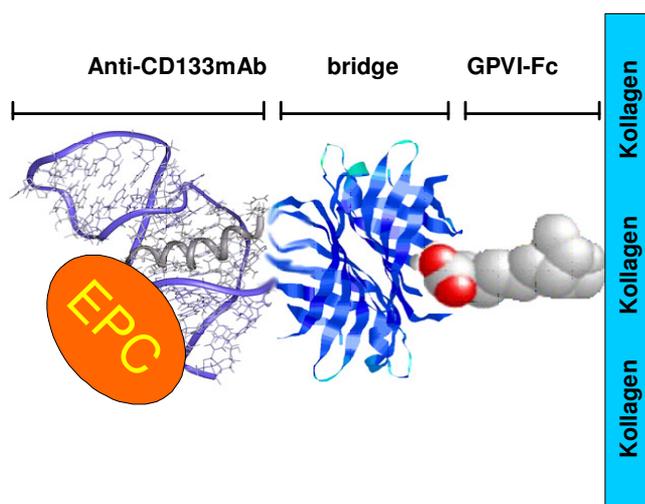


Abbildung 6: Bispezifisches Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-CD133 (nach Langer, unveröffentlicht).

3.2 Isolation und Vorbereitung der CD34⁺ Zellen aus Leukapherisat

3.2.1 Isolation der Zellen

Das Leukapherisat wird zu gleichen Teilen mit PBS versetzt und in einen 50 ml Falcon verbracht und gut vermischt. Anschließend wird in 15 ml Ficoll-Lösung (Biocoll Separating Solution; Biochrom AG, Berlin) 20 ml des verdünnten Blutes gegeben und bei 900g für 15 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Danach wird die Interphase abgenommen und erneut zentrifugiert (600g, 10 Min., mit Bremse). Anschließend werden die Zellen mittels CD34⁺ Progenitor Cell Isolating Kit (Direct CD34⁺ Progenitor Cell Isolating Kit, human; Miltenyi Biotec Reagents; Bergisch Gladbach) aus dem Zellpellet isoliert. Bis zum Gebrauch am nächsten Tag werden die Zellen schließlich in eine Glaspetrischale verbracht und mit Kulturmedium IMDM (Zusammensetzung: Grundmedium IMDM + Glutamax , 1x; Gibco, invitrogen GmbH, Karlsruhe; 10% FCS (bovines fetales Serum Gold); PAA, Österreich; 1% PenStrep(Penicillin-Streptomycin) Gibco, invitrogen GmbH, Karlsruhe; 1% MEM NEAA, 100x (nicht essentielle Aminosäuren) Gibco, invitrogen GmbH, Karlsruhe; MEM Vitamins (Vitamine) Gibco, invitrogen GmbH, Karlsruhe) überschichtet.

3.2.2 Färbung der Zellen mit PKH26

Um die Zirkulation der CD34⁺ Zellen im Blutstrom und besonders im Bereich der verletzten A. carotis communis mit Hilfe der Intravitalmikroskopie überprüfen zu können, erfolgt eine Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Zur Färbung der CD34⁺ Zellen mit dem Farbstoff PKH 26 (Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma, USA) werden die Zellen zunächst bei 1200ppm für 8 Min. zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 1 ml Diluent C aufgenommen, 1 ml des Farbstoffs hinzugegeben und für 4 Min. inkubiert.

Nach dieser ersten Inkubation erfolgt eine zweite nach Zugabe von 1% igem bovinem Serumalbumin und Vollmedium (IMDM-Medium) unter Bewegung. Die Zellen werden danach erneut zentrifugiert und dreimal mit Vollmedium gewaschen und anschließend einer erneuten Zentrifugation unterzogen.

Das Zellpellet wird in Tyrodepuffer bei einem pH 7,4 resuspendiert und schließlich in die benötigten Injektionsdosen aufgeteilt.

3.2.3 Inkubation der CD34⁺ Zellen mit GPVI-Fc-CD133-Konstrukt bzw. den Einzelkomponenten

Die isolierten bzw. die gefärbten CD34⁺ Zellen werden, falls nötig, durch mehrmaliges Resuspendieren vom Untergrund, auf welchem sie adhärirt haben, abgelöst und in 15 ml Falcons (PP-Test tubes, Greiner bio- one, Cellstar, Frickenhausen) verteilt. Anschließend werden die Zellen bei 1200pm 5 Min. zentrifugiert und in 1 ml Medium überführt, in welchem sie bis zur endgültigen Verarbeitung gelagert werden. Zur Zellinjektion befinden sich die Zellen in PBS.

Das Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-CD133 wird in einer Konzentration von 10 µg/ml bzw. für die Versuche mit Tötung 3 Wochen post operationem in einer Konzentration von 20 µg/ml zugegeben. Anschließend folgt die Inkubation mit dem GPVI-Fc-CD133- Konstrukt bzw. den Einzelkomponenten GPVI-Fc und a-CD133 für 30 Min. Nach dieser Inkubationsphase können die Zellen schließlich über die Schwanzvene appliziert werden und ihre Zirkulation im peripheren Blutkreislauf durch Intravitalmikroskopie an der A. carotis communis kontrolliert werden.

3.3 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Sowohl zur Drahtdenudation bzw. Verletzung durch Ligatur der A. carotis als auch zum Myokardinfarkt-Modell werden ausschließlich NOD/Scid-Mäuse der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbour, USA) herangezogen. Es handelt sich dabei um eine immundefiziente Mausstamm-Linie, welche einen B- und T-Zelldefekt besitzt. Die Mäuse werden meist in Gruppen zu je 5 Tieren in IVC-Käfigen (isoliert ventilierten Makrolonkäfigen vom Typ II long) gehalten. Als Einstreu dient entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat aus Espenholz (Abedd-Lab & Vet Service GmbH, Wien), welches einmal wöchentlich gewechselt wird. Die Tiere erhalten außerdem ein Stück sterilisierten Zellstoff als Nestbaumaterial (Nestlets, Indulab AG, Gams, Schweiz). Die Einstreu und das Nistmaterial dienen auch der Beschäftigung der Tiere.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Raumtemperatur in der Tierhaltung beträgt 21°C bei konstanter Entlüftung und einer Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 60%. Frisches Futter (Provimi Kliba, Kaiseraugst, Schweiz) und Wasser steht den Mäusen ad libitum zur Verfügung. Für einen geregelten Hell-Dunkel-Rhythmus sorgt eine Beleuchtungsanlage, wobei in der Helligkeitsphase 50 Lux im Käfig erreicht werden.

Das vorliegende Versuchsvorhaben wurde am 27.09.2005 vom Regierungspräsidium Tübingen gemäß § 8 Tierschutzgesetz (Neufassung vom 25.08.1998) unter der Versuchsnummer M3/05 genehmigt. Die Untersuchungen zum Myokardinfarkt wurden vom Regierungspräsidium unter der Genehmigungsnummer M3/06 am 5.10.06 genehmigt.

3.4 Versuchsablauf

	Ligatur Tötung nach 2 Wo	Denudation Tötung nach 2 Wo	Denudation Tötung nach 5 Wo	Denudation Tötung nach 3 Wo
Verumgruppe	50 000 CD34 ⁺ + GPVI-Fc- CD133 (10µg/ml) i.v.(Schwanzvene) (n= 4)	50 000 CD34 ⁺ + GPVI-Fc- CD133 (10µg/ml) i.v.(Schwanzvene), Wiederholung 3 Tage post Op (n= 5)	50 000 CD34 ⁺ + GPVI-Fc- CD133 (10µg/ml) i.v.(Schwanzvene), Wiederholung 3 Tage post Op (n= 3)	500 000 CD34 ⁺ + GPVI-Fc- CD133 (20µg/ml) i.v.(Schwanzvene), Wiederholung 3Tage post Op (n= 7)
Kontrollgruppe	50 000 CD34 ⁺ + GPVI-Fc + aCD133 i.v.(Schwanzvene) (n= 3)	50 000 CD34 ⁺ + GPVI-Fc + aCD133 i.v.(Schwanzvene), Wiederholung 3 Tage post Op (n= 4)	50 000 CD34 ⁺ + GPVI-Fc + aCD133 i.v.(Schwanzvene), Wiederholung 3 Tage post Op (n= 3)	500 000 CD34 ⁺ + GPVI-Fc + aCD133 i.v.(Schwanzvene), Wiederholung 3 Tage post Op (n= 7)

Tabelle 1: Übersicht des Versuchsablaufs

3.4.1 Vorbereitung der Mäuse zur Operation

Die Mäuse werden im Alter von ca. 12 Wochen und mit einem Gewicht von ca. 32 g der nachfolgenden Operation unterzogen.

Die Mäuse werden mittels einer Narkosekammer (Plexiglasröhre; Eigenbau), in die 5% Isofluran in reinem Sauerstoff (Isoflo®; Albrecht GmbH, Aulendorff) eingeleitet wird, kurzzeitig anästhesiert, so dass die eigentliche Injektionsnarkose (nach Henke und Erhardt, 2004)⁵¹ verabreicht werden kann. Die Injektionsnarkose besteht aus einer Kombination aus Midazolam (5 mg/kg; Midazolam-ratiopharm®; ratiopharmGmbH, Ulm), Medetomidinhydrochlorid (0,5 mg/kg; Domitor®; Pfizer, Karlsruhe) und Fentanylcitrat (0,05 mg/kg; CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe) und wird intraperitoneal verabreicht. Nach einer kurzen Einschlafphase wird der ventrale Halsbereich der Maus großzügig mit Enthaarungscreme bestrichen und nach wenigen Minuten Einwirkzeit mit Wattestäbchen von Haarresten befreit. Zur Vermeidung einer Austrocknung der Cornea wird Bepanthen-Augensalbe® (Roche, Grenzach) auf die Augen aufgetragen. Anschließend wird die Maus in Rückenlage (Kopf liegt in Richtung Operateur) auf eine Heizmatte verbracht und mit Klebeband (Leukopor®, BSN medical GmbH, Hamburg) an allen vier Füßen auf der Unterlage befestigt. Dabei wird die Schnauze des Tieres in eine Kopfkammer, welche aus einem zurechtgeschnittenen Spritzenkörper besteht und in welche reiner Sauerstoff eingeleitet wird, vorgeschoben. Der OP-Bereich wird anschließend mit NaCl gereinigt und schließlich mit Povidon-Jod (Braunol®; Braun, Melsungen) desinfiziert. Die Operation wird unter einem Stereo-Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen) bei einer 10-fachen Vergrößerung durchgeführt. Eine Kaltlichtquelle (Carl Zeiss, Göttingen) dient der optimalen Ausleuchtung des kompletten Operationsfeldes. Nun wird im mittleren Halsbereich median eine ca. 1 cm lange Inzision gesetzt und das Gewebe vorsichtig präpariert. Wichtig dabei ist es, das umliegende Gewebe möglichst nicht zu verletzen. Besonders der N. vagus muss unbedingt geschont werden.

3.4.1.1 Carotis-Ligatur-Verletzungsmodell

Die linke A. carotis communis wird in ihrem Verlauf freipräpariert und mit einem Faden für 5 Min. ligiert, dabei wird der Faden (Prolene® 7-0; Ethicon, Norderstedt)

lediglich über eine Schlaufe zugezogen, so dass die Ligatur anschließend leicht wieder eröffnet werden kann. Nach Eröffnen der Ligatur erfolgt die Zelinjektion (CD34⁺ Zellen, entweder vorinkubiert mit den Einzelkomponenten GPVI-Fc und aCD133 oder dem GPVI-Fc-CD133-Dimer in einer Konzentration von 10µg/ml) über die Schwanzvene. Im Anschluss wird unter die A. carotis communis ein schwarzes, flexibles Stück Plastikfolie vorgeschoben und die Maus zur weiterführenden Untersuchung unter das Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200; Carl Zeiss, Göttingen) gelegt.

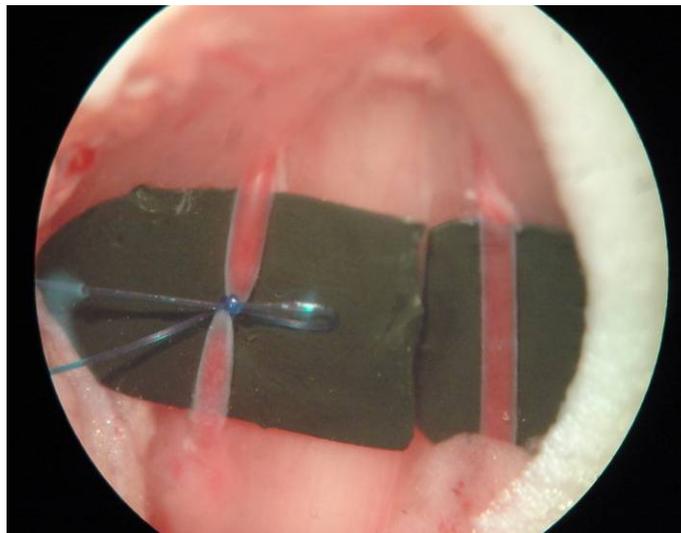


Abbildung 7: Ligatur der linken A. carotis

3.4.1.2 Verletzung der A. carotis mittels Drahtdenudation

Nach Freilegen der linken A. carotis communis und deren Aufzweigung in die A. carotis interna und externa werden sogenannte Haltefäden (Prolene® 6-0; Ethicon, Norderstedt) vorgelegt. Einer wird zunächst um die A. carotis communis, der zweite weit proximal an der A. carotis externa unter dem Gefäß hindurchgezogen und mit Klemmen (Pean- Kocher), zunächst ohne Zug auf die Gefäße auszuüben, fixiert. Ein dritter Faden (Prolene® 7-0; Ethicon, Norderstedt) wird unter die A. carotis interna gelegt und weit proximal ligiert, ein weiterer wird nahe der Bifurkation lediglich als Schleife vorgelegt.

Die Haltefäden an der A. carotis externa und communis werden unter Spannung gesetzt, so dass der Blutfluss für kurze Zeit im vorgelagerten Bereich sistiert. Nun kann mittels Scherenschlag die A. carotis interna eröffnet werden. Das austretende Blut wird mit Hilfe von Wattestäbchen beseitigt und anschließend wird ein dünner Angioplastie-Führungsdraht (HI- Torque Floppy II Guide Wire; 0,014“; Abbott Vascular, USA) in die Arterie vorgeschoben. Der Draht wird dreimal an der Gefäßwand entlang geführt, wobei durch die angeraute Drahtoberfläche das Endothel des Gefäßes deutlich verletzt wird. Die Gewebeschädigung wird durch die Ausbildung eines mehr oder weniger großen Thrombus im Gefäß sichtbar. Nach Entfernung des Drahtes wird die vorgelegte Schleife an der A. carotis interna festgezogen und mit einem chirurgischen Knoten verschlossen. Anschließend wird das Gefäß auf Dichtigkeit überprüft. Tritt aus der Gefäßinzision kein Blut mehr aus, werden die Haltefäden entfernt. Es folgt die Injektion der Zellen über die Schwanzvene (CD34⁺ Zellen, entweder vorinkubiert mit den Einzelkomponenten GPVI-Fc und aCD133 oder dem GPVI-Fc-CD133-Dimer in einer Konzentration von 10µg/ml für die Versuche mit Tötung der Tiere nach 2 bzw. 5 Wochen post operationem; bei den 3-Wochen-Versuchen wurde eine Konzentration von 20µg/ml gewählt). Die Maus wird anschließend auf der Wärmematte liegend unter das Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200; Carl Zeiss, Göttingen) geschoben.

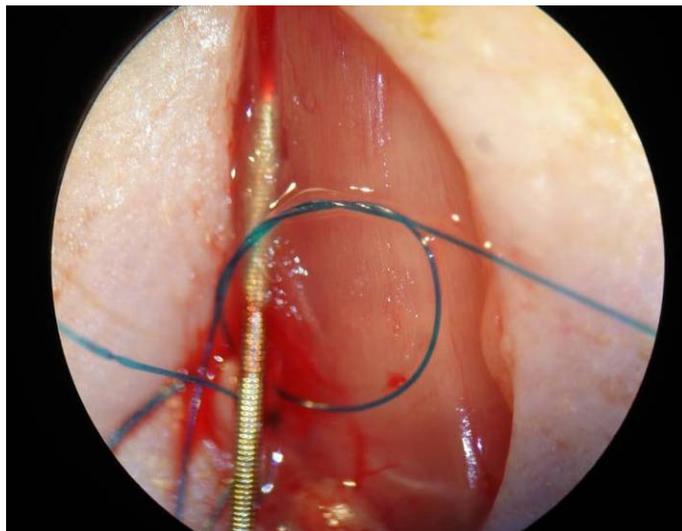


Abbildung 8: Drahtdenudation an linker A. carotis

3.4.2 Myokardinfarkt-Modell

Nach Erhalt der Injektionsnarkose und großzügigem Scheren und Enthaaren des ventralen Halsbereiches und der linken Thoraxseite, wird die Maus zunächst in Rückenlage auf einer Wärmematte (5 x 12,5 cm) an allen vier Pfoten fixiert. Zur Überprüfung der Körperinnentemperatur wird eine Sonde in das Rektum eingeführt. Sowohl Wärmematte als auch Rektalsonde sind an ein Thermomessgerät (temperature control; Frederik Haer & Co, Bowdoinham, USA) angeschlossen, bei welchem bei Abfall der Temperatur jederzeit manuell gegengesteuert werden kann.

Am ventralen Halsbereich wird eine kleine Schnittinzision gesetzt und die Trachea vorsichtig freipräpariert. Die parallel verlaufenden Muskelbäuche des M. sterno-hyoideus werden vorsichtig von der Trachea getrennt und jeweils mit Haltefäden (Prolene® 5-0; Ethicon, Norderstedt) seitlich fixiert. Die Trachea wird anschließend zwischen erster und zweiter Trachealspange eröffnet und die caudale Knorpelspange mit Hilfe eines weiteren Haltefadens (Prolene® 7-0; Ethicon, Norderstedt) erfasst. Nach Überprüfung der Durchgängigkeit des Tubus (Intubation Cannula for mouse OD 1,1 mm, L 28 mm) wird dieser bis zur Verjüngung desselben vorgeschoben. Die Maus wird über ein Beatmungsgerät (Mini Vent Typ 845; Hugo Sachs, March) konstant mit einem Atemzugvolumen von 180 µl, einem Sauerstoffflow von 0,8-1 l/Min. und einer Atemfrequenz von 120/Min. beatmet. Zusätzlich zur Injektionsnarkose wird Isofluran (Isoflo; Albrecht GmbH, Aulendorf) in einer Konzentration von 1% zugeleitet. Anschließend wird die Maus in die rechte Seitenlage verbracht und die linke Thoraxseite mit Povidon-Jod (Braunol®; Braun, Melsungen) desinfiziert. Die Haut wird im Bereich der 3. bzw. 4. Rippe in einer Länge von ca. 2 cm eröffnet. Das Unterhautfettgewebe wird stumpf präpariert und anschließend die Muskulatur mittels Schere durchtrennt. Der Zugang zum Thorax wird über den 3. Interkostalraum gewählt und ebenfalls mit der Schere vorsichtig eröffnet. Die craniale Rippe wird mit einer Pinzette erfasst und schließlich ein Rippenspreizer (17008-07; FST, Heidelberg) eingeführt, welcher anschließend vorsichtig aufgeschraubt wird.

Nach Freilegen des Herzens aus dem Herzbeutel wird dieses mittels Saugtupfer (Ethikeil®; Ethicon, Norderstedt) geringgradig vorgelagert. Die Arteria coronaria sinistra (LAD) ist zumeist an der ventrolateralen Seite des Herzens zu finden und nimmt ihren Ursprung in einer Kuhle unter dem Herzohr. Mit einem Vicryl® 8-0 Faden (Ethicon, Norderstedt) wird das Gefäß vorsichtig 1-2 mm unterhalb des

ventralen Herzohrlandes unterstochen und anschließend ein chirurgischer Knoten vorgelegt. Zur einfacheren Lösung des Knotens nach Beendigung der Ischämiezeit wird unter den Knoten ein kurzes Polyethylenschlauchstück (Polyethylen tubing, ID 0,28 mm; OD 0,61 mm, SIMS, Portex, UK) gelegt und der Knoten schließlich festgezogen und mittels zwei weiterer Knoten fixiert. Die Ligatur wird für 1 Stunde belassen.

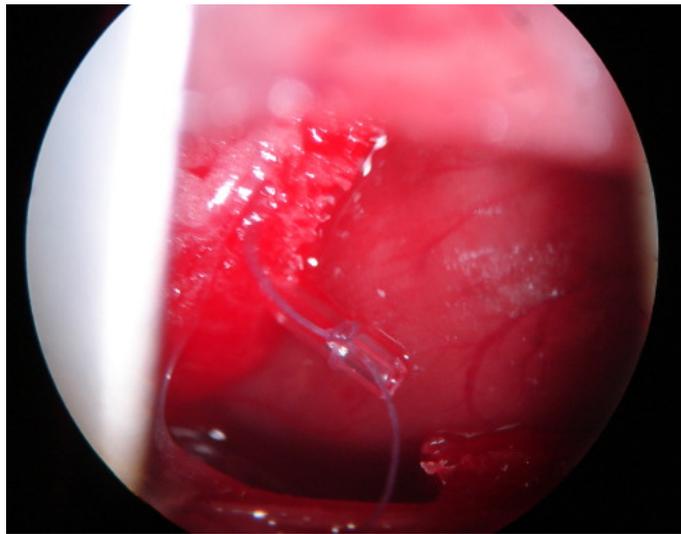


Abbildung 9: vorgelagertes Herz mit Ligatur der LAD (links: Blick auf Herzohrtrand)

Nach Ablauf der Ligaturzeit wird der Knoten entfernt und die Reperfusion des Gefäßes beobachtet. Anschließend werden die Rippen mittels Einzelhefte (Vicryl® 6-0; Ethicon, Norderstedt) und die darüberliegende Muskelschicht mit einer fortlaufenden Naht (Vicryl® 6-0; Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Die Hautnaht erfolgt mit einem Prolene® Faden der Stärke 6-0 (Ethicon, Norderstedt) über Einzelhefte.

Die Naht wird mit Povidon-Jod (Braunol®; Braun, Melsungen) abgedeckt und die Maus erneut in Rückenlage verbracht.

Nach Ausleiten der Isoflurannarkose und gleichzeitigem Anfluten von reinem Sauerstoff wird um die caudale Trachealspange ein Vicryl® 8-0 (Ethicon, Norderstedt) vorgelegt. Sobald die Maus mit der Spontanatmung beginnt, wird sie extubiert und die Trachea anschließend mittels Knopfheft verschlossen. Die Hautnaht

erfolgt ebenfalls mit 1-2 Einzelheften. Die Maus erhält abschließend 0,5 ml Glucose-Ringerlösung und das Antidot bestehend aus Flumazenil (0,5 mg/kg, Flumazenil; Fresenius Kabi, Bad Homburg) und Atipamezolhydrochlorid (2,5 mg/kg, Antisedan®; Pfizer, Karlsruhe) subkutan. Die Analgesie erfolgt mit Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic; Essex Pharma, München) in einer Dosierung von 0,05-0,1 mg/kg (nach Henke, Erhardt, 2004). Zusätzlich erhalten die Tiere 2-3 Tage Trimethoprim/Sulfamethazol (Cotrim E-ratiopharm Saft®; ratiopharm GmbH, Ulm) in einer Dosierung von 5 ml auf 150 ml H₂O über das Trinkwasser.

3.4.3 Applikation der Zellen und Intravitalmikroskopie

Die Applikation der CD34⁺ Zellen erfolgt bei den hier durgeführten Tiermodellen über die Schwanzvene mittels einer feinen Insulinspritze (BD-Micro-Fine, U-40, 0,33x 12,7 mm; Becton Dickinson, Heidelberg); beim Myokardinfarkt-Modell werden die Zellen allerdings erst in der Aufwachphase verabreicht. Je nach Versuchsgruppe wurden die Zellen zuvor mit dem GPVI-Fc-CD133-Konstrukt oder den jeweiligen Einzelkomponenten in einer Konzentration von 10µg/ml (Carotis-Ligatur, Denudation der A. carotis mit Tötung nach 2 bzw. 5 Wochen post operationem) oder 20µg/ml (Denudation der A. carotis mit Tötung nach 3 Wochen und im Myokardinfarkt-Modell) inkubiert. Die Zellinjektion wurde bei den 2-, 3- bzw. den 5-Wochen-Versuchen nach 3 Tagen wiederholt. Lediglich bei den Tieren, die der Gefäßverletzung unterzogen wurden, wird die Ansammlung der Zellen in der verletzten A. carotis interna mittels Intravitalmikroskopie dargestellt. Dazu wird zunächst unter das verletzte Gefäß ein schwarzes flexibles Stück Plastikfolie vorgeschoben um einen besseren Kontrast für die nachfolgende Aufnahme im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200; Carl Zeiss, Göttingen) zu erzeugen. Die zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH 26 gefärbten Zellen lassen sich nun als aufleuchtende Punkte im Blutfluss unter dem Mikroskop darstellen und können mit der angeschlossenen CCD-Kamera (Charged Coupled Device-Kamera, FK 6990-IQ-S, Pieper GmbH, Schwerte) aufgezeichnet werden. Somit kann sichergestellt werden, dass die Zellen in der Blutzirkulation wiedergefunden werden und schließlich am Gefäßschaden adhären können.

3.4.4 Rekonvaleszenzphase der Maus nach Gefäßverletzung

Nach Abschluss der Intravitalmikroskopie kann die Hautinzision durch 2-3 Einzelhefte (Prolene® 6-0; Ethicon, Norderstedt) verschlossen werden und die Maus erhält ein Antidot, bestehend aus Flumazenil (0,5 mg/kg, Flumazenil; Fresenius Kabi, Bad Homburg) und Atipamezolhydrochlorid (2,5 mg/kg, Antisedan®; Pfizer, Karlsruhe), welches subkutan im Nackenbereich appliziert wird⁵¹. Danach wird die Maus noch einige Minuten am Sauerstoff belassen, bis sie sich aus eigener Kraft wegbewegt und sie in den Käfig zurückgesetzt werden kann. Vor dem Käfig wird eine Wärmelampe platziert, so dass die Maus in der Aufwachphase nicht auskühlt.

Die Analgesie erfolgt mit Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic; Essex Pharma, München) in einer Dosierung von 0,05-0,1 mg/kg, außerdem wird die Maus mit Trimethoprim/Sulfamethazol (Cotrim E-ratiopharm Saft; ratiopharm GmbH, Ulm) in einer Dosierung von 5 ml auf 150 ml H₂O über das Trinkwasser für mehrere Tage abgedeckt.

3.4.5 Doppler-Ultraschall nach Denudation der A. carotis

Die Doppler-Sonographie erfolgt entweder 2, 3 oder 5 Wochen post operationem, jeweils vor der Tötung des Tieres. Die Ultraschallmessung erfolgt mit einem humanmedizinischen Ultraschallgerät (Acuson CV 70, Diagnostic Ultrasound System, Model 7848513; Siemens AG, Erlangen). Die Maus wird für die Untersuchung erneut mit der 3er-Kombinationsnarkose (siehe Kap. 3.4.1) anästhesiert und nach großzügiger Enthaarung der ventralen Halsseite mittels Enthaarungscreme in Rückenlage verbracht. Dabei wird sie auf einer Heizmatte an allen vier Füßen mit Klebeband (Leukopor®, BSN medical GmbH, Hamburg) fixiert. Ein 10x10 cm großes Gelpad (Sonopad, Sonotec Ultraschallsensorik GmbH, Halle) wird als Vorlaufstrecke vorsichtig auf die Maus gelegt und mit Ultraschallgel bedeckt. Nun wird mit einem 10MHz-Linear-Schallkopf die A. carotis communis durch die Vorlaufstrecke hindurch im Ultraschallbild dargestellt. Es ist wichtig diese Untersuchung sehr vorsichtig und mit wenig Druck durchzuführen, da die Mäuse sonst sehr schnell mit Dyspnoe bzw. Atemstillstand reagieren und dann unverzüglich Gegenmaßnahmen eingeleitet werden müssen. Um die A. carotis gut

im Sonographiebild darstellen zu können, wird der Farb-Doppler zugeschaltet. Zunächst wird das Herz aufgesucht und dann der Schallkopf in Richtung Kopf weitergeführt. Auf diese Weise lassen sich die Strömungsverhältnisse beurteilen. Anschließend wird der Widerstandsindex (RI) berechnet. Dieser berechnet sich aus den systolischen und diastolischen Volumina mittels Formel $RI = (V_{sys} - V_{dia}) / V_{sys}$. In den *Tabellen im Anhang* sind zusätzlich die systolischen und diastolischen Volumina aufgelistet, welche bei der Messung an den jeweiligen Gefäßen erhoben wurden. Die Messung erfolgte jeweils dreimal pro eingestellter Sequenz und wurde anschließend gemittelt.

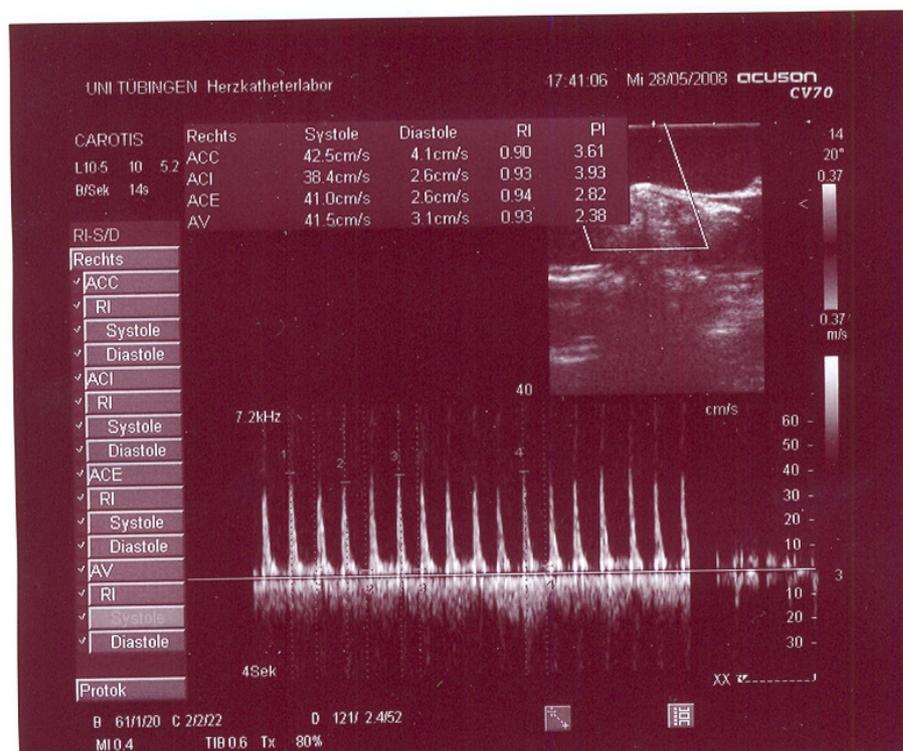


Abbildung 10: Doppler-Sonographie der linken A. carotis

Nach Abschluss der Untersuchung wird die Narkose antagonisiert (siehe Kapitel 3.3.4) und die Maus in Brustlage auf einer Wärmematte platziert. Sobald die Maus aus der Narkose erwacht ist und sich fortbewegen kann, wird sie in ihren Käfig zurückgesetzt.

3.4.6 Tötung und Gefäß- bzw. Organentnahme

3.4.6.1 Gefäßverletzungsmodelle

Die Maus wird zur Tötung in einen möglichst luftundurchlässigen Käfig gesetzt und anschließend in diesen CO₂ eingeleitet. Die Gefäßentnahme erfolgt am getöteten Tier. Dabei wird es erneut in Rückenlage verbracht, auf der Unterlage fixiert und eine Inzision im ventralen Halsbereich gesetzt, welche bis zum Ende des Sternums fortgeführt wird. Die A. carotis communis wird bis zur Aufzweigung in A. carotis externa und interna auf beiden Halsseiten freipräpariert. Anschließend werden die beiden Abgänge jeweils durchtrennt und nach Eröffnung des Brustkorbes vom Herzen her mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%; Fresenius Kabi, Bad Homburg) und schließlich mit Formalinlösung (Formaldehyd 4%; Otto Fischar GmbH, Saarbrücken) perfundiert.

Nach Entfernung jeglicher Blutreste werden die Gefäße vorsichtig entnommen und in Eppendorf-Cups (Save-Lock Tube 1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg) verbracht. Die Proben werden unverzüglich in flüssigen Stickstoff gegeben und dann bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

3.4.6.2 Myokardinfarkt-Modell

Bei den Mäusen, die der Myokardinfarkt-Operation unterzogen wurden, erfolgt die Tötung der Tiere 1 Woche postoperativ. Dazu werden die Tiere erneut wie in Kapitel 3.4.1 narkotisiert, intubiert und in Rückenlage verbracht. Anschließend erfolgt die Inzision der Haut vom Xyphoid bis zum caudalen Abdomen. Nach Eröffnung des Peritoneums in der Linia alba werden zunächst die Gedärme vorgelagert und die A. abdominalis vorsichtig von Fettgewebe und der unmittelbar anliegenden V. cava caudalis freipräpariert. Die A. abdominalis wird mit einer gebogenen mikrochirurgischen Pinzette erfasst und mittels Scherenschlag eröffnet. Nach dem Entbluten wird ein 0,61 mm dicker Katheter mit einem Innendurchmesser von 0,28 mm in die Arterie vorgeschoben und diese nach Eröffnen der V. cava mit NaCl (NaCl 0,9%; Fresenius Kabi, Bad Homburg) gespült. Anschließend wird eine 50 ml Perfusionspritze (BD Perfusion, Luer Lock PP, steril; Becton Dickinson, Drogheda,

Irland) über eine Heidelberger Verlängerung (Perfusionsleitung D 1,5 mm x 2,8 mm Luer Lock; Oriplast GmbH, Neunkirchen/Saar) an einen Perfusor (Braun, Melsungen) mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 ml/h angeschlossen. Die Perfusion erfolgt mittels einer 1%igen TTC-Lösung (2,3,5-Triphenyltetrazolium-chloride; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim). Da der Farbstoff lediglich von vitalen Zellen aufgenommen werden kann, ist es möglich den Infarktbezirk vom umliegenden Gewebe abzugrenzen.

Nach Abschluss der Perfusion werden alle Organe einschließlich des Herzens entnommen und bei -80°C gelagert.

3.5 Histologische Untersuchung

3.5.1 Probenaufarbeitung

Die Gefäße werden aus dem Gefrierschrank (-80°C) entnommen. Nun wird von den Gefäßen unter dem Mikroskop (Carl Zeiss AG, Göttingen) Fett- und sonstiges Gewebe vorsichtig abpräpariert. Die Präparate werden dann für ca. 2½ Stunden in Formalin (Formaldehyd-Lösung 4,0%; Otto Fischar GmbH, Saarbrücken) fixiert und anschließend in Einbettkassetten (Neo Lab-Einbettkassetten; Neo Lab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg) gelegt und diese zunächst für 1 Stunde in 70%igen Ethanol (Ethanol S99% verg. mit 1% MEK; SAV LP Flintsbach) gegeben. Daraufhin folgt eine aufsteigende Alkoholreihe. Die Präparate werden jeweils 1 Stunde im jeweiligen Alkohol belassen. Anschließend werden die Proben zweimal für je 1 Stunde in 100%igen Ethanol, danach gleichermaßen in Xylolersatz (Roti-Histol; Carl Roth, Karlsruhe) eingelegt. Abschließend werden sie einem Paraffinbad von ca. 60°C für mindestens 2 Stunden unterzogen. Ist dieses Prozedere vollzogen, können die Proben in Paraffin eingebettet werden und nach vollständiger Aushärtung mit einem Mikrotom (Modell: 2045 Multicut; Leica Instruments GmbH, Nussloch) zu 5 µm dicken histologischen Schnitten verarbeitet werden. Die Schnitte werden in ein sogenanntes Streckbad gegeben und dann vorsichtig auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte werden, nachdem sie trocken sind, vor der jeweiligen Färbung einer Entparaffinierung unterzogen. Die Objektträger werden dabei in absteigender

Reihenfolge in Xylolersatz (Roti-Histol; Carl Roth, Karlsruhe) bzw. Ethanol für je 10 bzw. 5 Min verbraucht. Der Entparaffinierung folgt dann das jeweilige Färbeprotokoll.

3.5.2 Färbungen der histologischen Schnitte

3.5.2.1 Elastica van Gieson-Färbung

Zur Elastica van Gieson-Färbung werden die Objektträger direkt aus dem 70%igen Ethanol in Resorcsinfuchsin (Resorcsin-Fuchsin, Weigert; Waldeck GmbH & Co KG, Münster) überführt und für 30 Min. belassen. Anschließend werden die Schnitte dreimal in 80%igem Ethanol gespült und dann für 15 Min. mit Weigert-Lösung, die zu gleichen Teilen aus einer handelsüblichen Weigert's Hämatoxylinlösung A (Carl Roth, Karlsruhe) und Weigert's Hämatoxylinlösung B (Carl Roth, Karlsruhe) hergestellt wird, versetzt. Danach werden die Schnitte mit H₂O gewaschen und kurz in HCl-Alkohol fixiert. Die Objektträger werden unter fließendem Leitungswasser für 10 Min. gebläut und dann für 2 Min. in eine Färbeschale mit Picrofuchsin (Pikrinsäure-Lösung 1,2%ig; Applichem GmbH, Darmstadt, 2%ige wässrige Fuchsin Säure (Fuchsin Acid; Sigma-Aldrich, Steinheim) und 1%ige Essigsäure (Essigsäure; 100%; Merck KGaA, Darmstadt) gegeben. Diesem Färbeschritt folgt eine aufsteigende Alkoholreihe, wobei die Proben allerdings in den niederen Konzentrationen nur kurz geschwenkt werden und lediglich im 100%igen Ethanol und im Xylolersatz für einige Minuten verbleiben. Die Objektträger können anschließend mit Deckgläsern versehen und mit Eukitt (Eukitt; O. Kindler GmbH, Freiburg) luftdicht verschlossen werden.

3.5.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung schließt ein etwas anderes Färbeprotokoll an. Hier werden die Schnitte nach der Alkoholreihe zunächst in Aqua dest. gespült und mit Hämalaunlösung (Hämalaunlösung sauer nach Mayer; Carl Roth, Karlsruhe) für 15 Min. gefärbt. Anschließend werden die Hämalaunreste unter fließendem Wasser entfernt und danach für 15 Min. gebläut. Danach werden die Objektträger für 3 Min. in 1%iges Eosin (Eosin G; Carl Roth, Karlsruhe) verbraucht und dann in Aqua dest.

gespült. Diesem Prozedere folgt, wie oben beschrieben, eine aufsteigende Alkoholreihe und das Eindecken der Objektträger mit Eukitt.

3.6 Histomorphometrische Auswertung

3.6.1 Gefäße

Zur Auswertung der Histomorphometrie werden jeweils die Elastica van Gieson gefärbten Schnitte herangezogen.

Die Objektträger werden unter einem Mikroskop (Nikon- Optiphot-2; Nikon GmbH, Düsseldorf) mit einer integrierten Kamera (Nikon Digital-Sight DS-U1; Nikon GmbH, Düsseldorf) in der 10-fachen Vergrößerung fotografiert und im JPEG-Format abgespeichert. Anhand dieser Fotos erfolgt mit Hilfe des Programms „NIS Elements“ (Version BR 2.10; Nikon GmbH Düsseldorf) die anschließende Auswertung. Dabei werden jeweils die Flächen zwischen der Lamina elastica externa bzw. der Lamina elastica interna und dem Lumen vermessen.

Am Computer können letztlich die Daten mit Hilfe des Programms „Microsoft Excel“ in Relation gesetzt werden und somit die Neointimafläche, die Mediadicke und der Stenosegrad bestimmt werden.

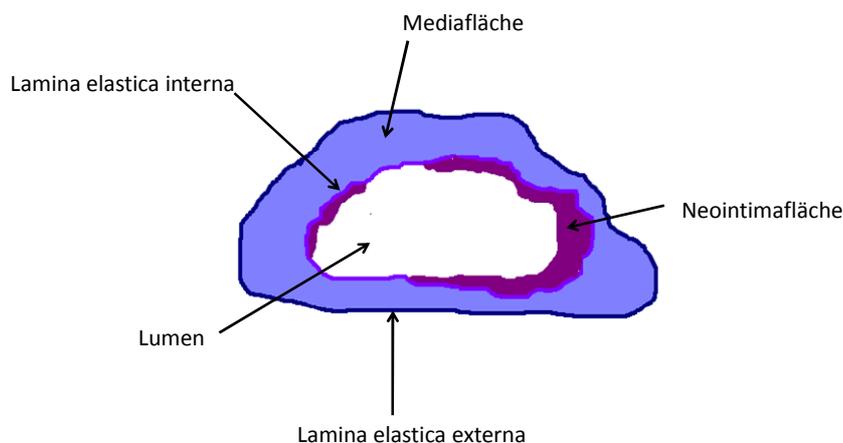


Abbildung 11: Schematische Darstellung der histomorphologischen Gefäßdaten

3.6.2 Herz

Die tiefgefrorenen Herzen werden nach kurzfristigem Antauen mit einem gekühlten Schneidegerät (Eigenbau), bei welchem 4 parallel zueinander angeordnete Rasierklingen miteinander verbunden sind, in 6 ca. 1 mm dicke Herzscheiben geschnitten. Anschließend werden die Herzscheiben in Eppendorf-Gefäße (Save-Lock Tube 1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg) mit Formalin (Formaldehyd-Lösung 4,0%; Otto Fischar GmbH, Saarbrücken) gegeben und für ca. 30 Min darin belassen.

Die Herzscheiben werden schließlich mittels Stereo-Mikroskop (Carl Zeiss AG, Göttingen) und angeschlossener Digitalkamera von beiden Seiten fotografiert und anschließend mit Hilfe des Computer-Programms „NIS- Elements“ (Version BR 2.10; Nikon GmbH Düsseldorf) histomorphometrisch ausgewertet. Dabei werden die Gesamtfläche des Herzens, die Fläche des linken und rechten Ventrikels, deren Lumina, sowie die Infarktgröße ausgemessen und in Relation gesetzt.

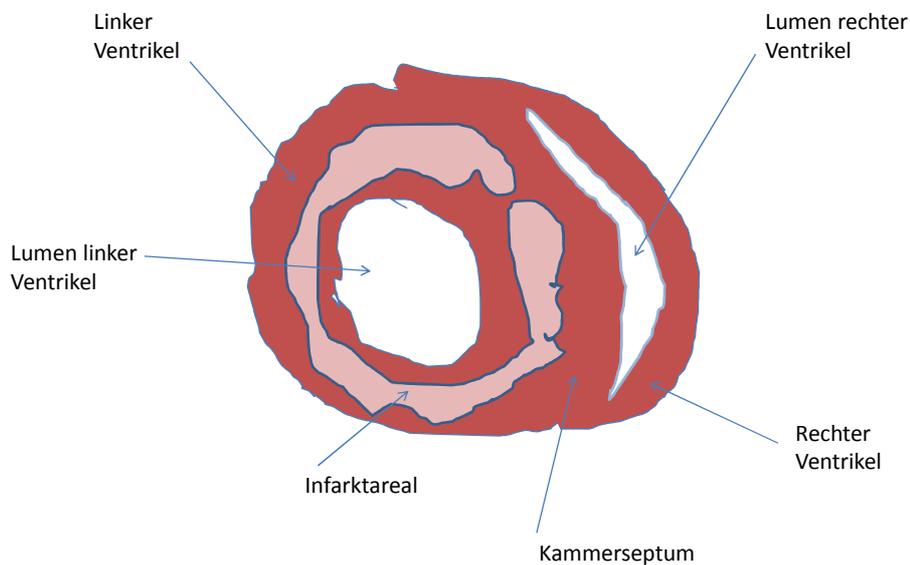


Abbildung 12: Schematische Darstellung der morphologischen Daten der einzelnen Herzscheiben

3.7 Statistische Berechnungen

Die Ergebnisse sind, wenn nicht abweichend angegeben, als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Der Standardfehler SEM („Standard Error of the Mean“) dient zur Berechnung der Streuung der Mittelwerte und wird als Quotient aus der Standardabweichung und der Wurzel des Stichprobenumfangs definiert.

Da wir zu Beginn unserer Studie aufgrund publizierter Daten von einer Normalverteilung der Ergebnisse ausgegangen sind, wurde ein zweiseitiger, gepaarter Student'scher t-Test zur statistischen Berechnung herangezogen. Die Mittelwerte der jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppe werden mit dem t-Test verglichen und auf ihre Signifikanz hin überprüft. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant definiert und ist in den Schaubildern mit einem Stern markiert. Die statistischen Berechnungen erfolgen mit dem Programm GraphPad Prism (Version 3.0; GraphPad Software Incorporated).

3.8 Ergebnisse

3.8.1 Ergebnisse der Untersuchungen am Carotis-Ligatur-Modell

In diesem Abschnitt werden die Daten der Verumgruppe, welche nach Ligatur der linken A. carotis das Adhäsionsmolekül mittels i.v. Injektion über die Schwanzvene erhalten haben, der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Zur Auswertung dienen die histomorphometrischen Daten, welche aus den histologischen Schnitten der linken A. carotis erhoben wurden.

3.8.1.1 Darstellung der histomorphometrischen Daten der linken A. carotis nach Gabe des GPVI-Fc-CD133- Konstrukts im Vergleich zur Kontrollgruppe

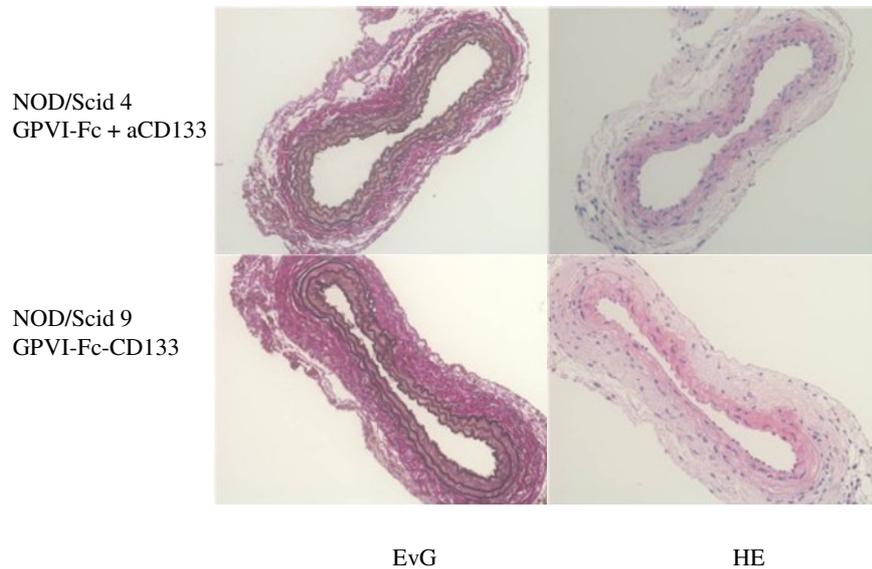


Abbildung 13: Histologische Schnitte der linken denudierten A. carotis bei NOD/Scid 4 bzw. NOD/Scid 9 nach Ligatur. Es ist jeweils die EvG- und die HE-Färbung dargestellt. Beide Tiere stehen dementsprechend für die restlichen Tiere beider Gruppen.

Wie in den obigen Schaubildern zu sehen ist, kommt es bei dieser Art der Gefäßverletzung weder in der Verumgruppe (4 untersuchte Carotiden), noch in der Kontrollgruppe (3 untersuchte Carotiden) zu einer Neointimabildung. Daher kann die Untersuchung dieses Parameters nicht zugrunde gelegt werden und der Vergleich zwischen beiden Gruppen ist histomorphometrisch deshalb nicht möglich. In einer anschließend durchgeführten *in situ* Hybridisierung (Ergebnisse nicht gezeigt) konnte allerdings die Anhaftung der humanen Stammzellen nachgewiesen werden.

3.8.2 Ergebnisse der Untersuchungen am Verletzungsmodell mittels Drahtdenudation

In den nachfolgenden Abschnitten werden jeweils die Daten der Doppler-Sonographie und der histomorphometrischen Auswertung der Verumgruppe mit der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen. Dabei unterscheiden sich die Abschnitte in den jeweiligen Zeitpunkten der Untersuchung und der Tötung der Tiere.

3.8.2.1 Untersuchungsergebnisse des Versuchsansatzes mit Ultraschalluntersuchung und Tötung 2 Wochen post operationem

3.8.2.1.1 Vergleich der Widerstandsindizes der Verumgruppe mit der Kontrollgruppe

Das folgende Schaubild zeigt die jeweils an der linken und rechten A. carotis gemessenen Widerstandsindizes der Gruppe, welche das GPVI-Fc-CD133-Konstrukt im Anschluss an die Operation erhalten hat, und der Kontrollgruppe mit Applikation der Einzelkomponenten.

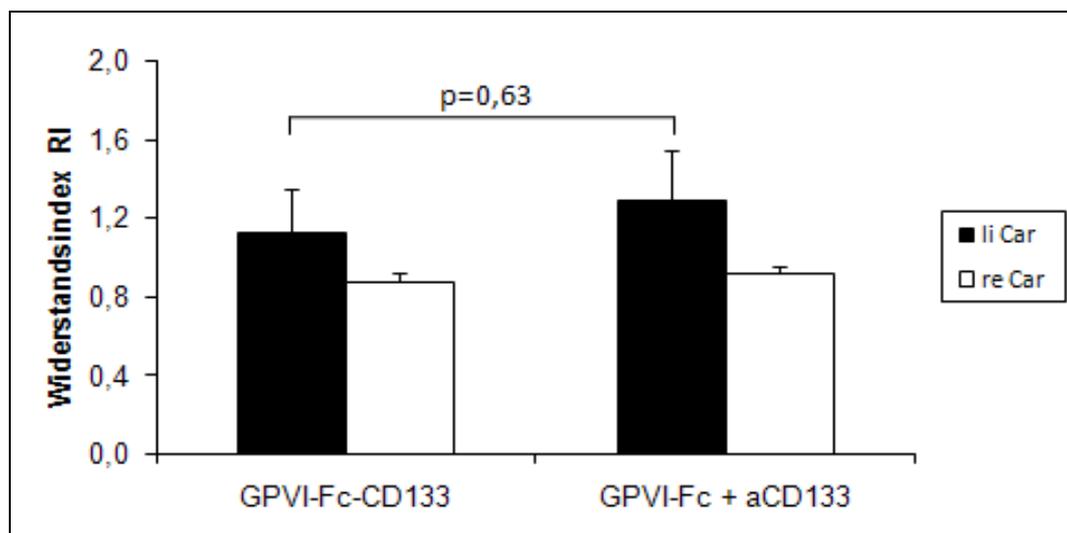


Abbildung 14: Widerstandsindex RI in der Verumgruppe (GPVI-Fc-CD133, n= 5) und der Kontrollgruppe (GPVI-Fc + aCD133, n= 4), jeweils gemessen an linker und rechter A. carotis

In der Verumgruppe zeigt die linke denudierte A. carotis einen Widerstandsindex von $1,123 \pm 0,228$. In der rechten Carotis nimmt RI einen Wert von $0,874 \pm 0,043$ ein. In der Kontrollgruppe weist die linke denudierte A. carotis einen Wert von $1,285 \pm 0,254$. Der Widerstandsindex in der rechten A. carotis zeigt mit $0,921 \pm 0,036$ einen ähnlichen Wert wie in der Verumgruppe. Beim Vergleich der linken denudierten Gefäße in Verum- (5 Tiere) und Kontrollgruppe (4 Tiere) ergibt sich kein signifikanter Unterschied.

3.8.2.1.2 Darstellung der histomorphometrischen Daten der linken A. carotis nach Gabe des GPVI-Fc-CD133- Konstrukts im Vergleich zur Kontrollgruppe

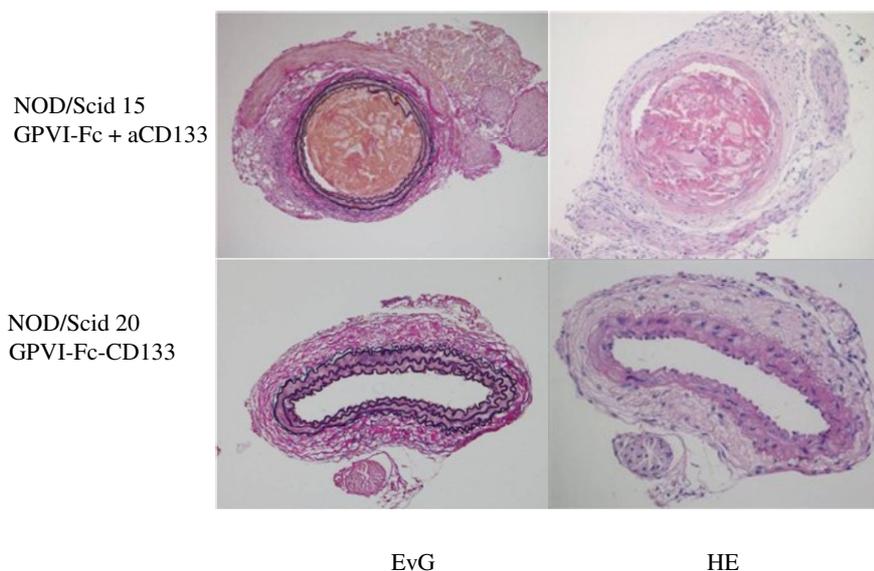


Abbildung 15: Histologische Schnitte der linken A. carotis bei NOD/Scid 15 bzw. NOD/Scid 20 nach Drahtdenudation. Die Schnitte sind jeweils EvG und HE gefärbt. Beide Tiere stehen stellvertretend für die jeweilige Gruppe

Die folgenden Graphiken zeigen die histomorphometrischen Messdaten jeweils im Vergleich der Gruppe, die GPVI-Fc-CD133 erhalten hat, zu der Kontrollgruppe. Dabei findet die Mediadicke, die Fläche der Neointima und der Stenosegrad Berücksichtigung. Es wird jeweils nur die verletzte A. carotis vermessen.

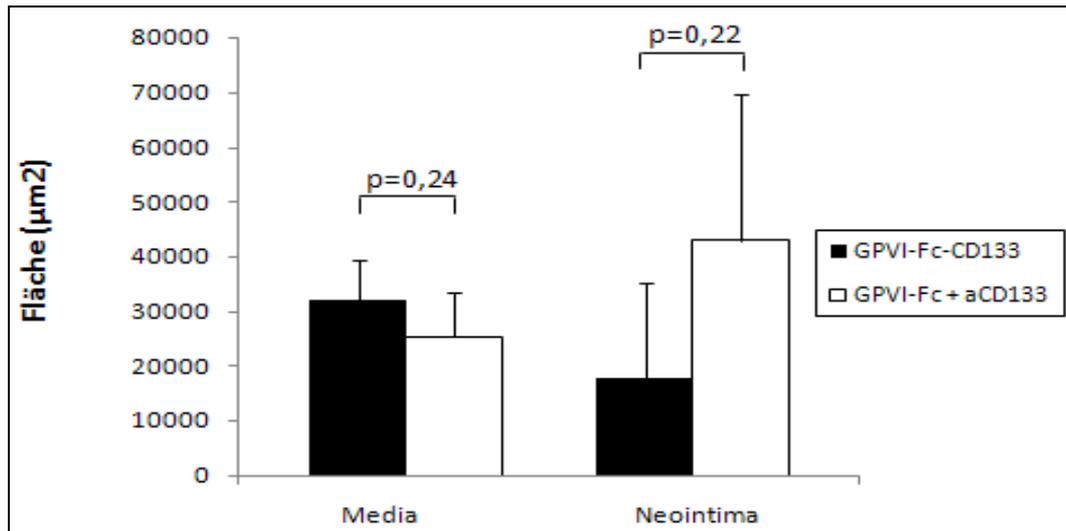


Abbildung 16: Vergleich der Flächenmaße der Media und Neointima bei Verum- und Kontrollgruppe (GPVI-Fc-CD133, n= 5; GPVI-Fc + aCD133, n= 4)

In der oben eingefügten Graphik werden die Flächenausmaße der Media und der Neointima in der Verumgruppe den Daten in der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Die Mediafläche zeigt in der GPVI-Fc-CD133-Gruppe eine Größe von $32.113,63 \mu\text{m}^2 \pm 3.155,61$ und in der Kontrollgruppe, welche die Einzelkomponenten des Konstruktes erhalten hat, ein Ausmaß von $25.351,84 \mu\text{m}^2 \pm 4.102,74$.

Die Fläche der Neointima beträgt bei der Verumgruppe $17.920,52 \mu\text{m}^2 \pm 7.641,04$. Ihre Ausprägung ist demnach in der Kontrollgruppe mit einer Fläche von $42.812,69 \mu\text{m}^2 \pm 13.405,89$ mäßig stärker.

Es zeigt sich weder bei der Media- noch bei der Neointimafläche zwischen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied.

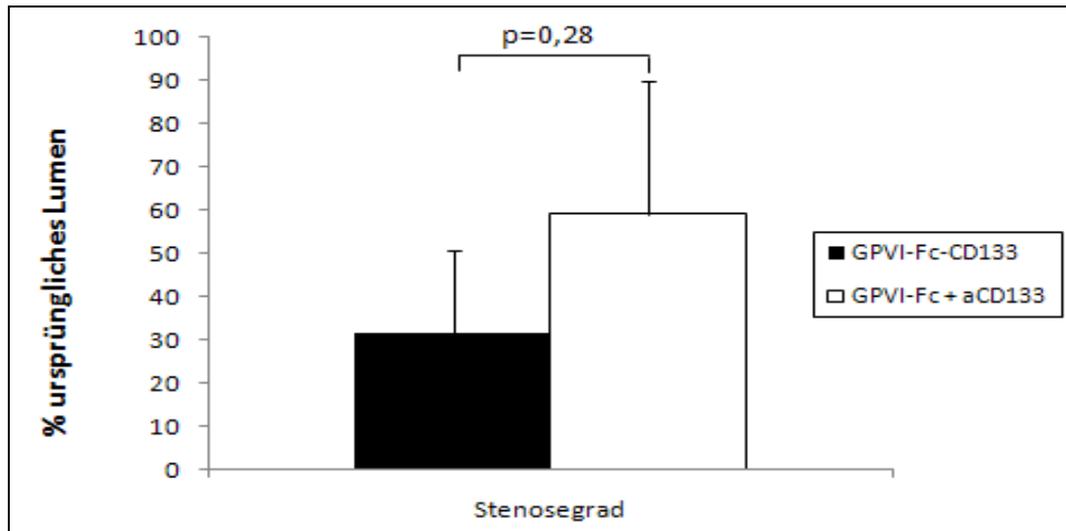


Abbildung 17: Darstellung des Stenosegrades in der linken A. carotis bei Verum- und Kontrollgruppe (GPVI-Fc-CD133, n= 5; GPVI-Fc + aCD133, n= 4)

In der angeführten Abbildung wird der Stenosegrad der linken denudierten A. carotis in beiden Gruppen miteinander verglichen. Die Stenose tritt in der Kontrollgruppe mit $58,92\% \pm 15,33$ im Vergleich zur Verumgruppe mit $31,39\% \pm 8,61$ deutlich in Erscheinung. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist allerdings nicht signifikant.

3.8.2.2 Untersuchungsergebnisse des Versuchsansatzes mit Ultraschalluntersuchung und Tötung 5 Wochen post operationem

3.8.2.2.1 Vergleich der Widerstandsindizes der Verumgruppe mit der Kontrollgruppe

Die angefügte Graphik stellt die Widerstandsindizes in der linken und rechten A. carotis der Verumgruppe den Daten der Kontrollgruppe gegenüber.

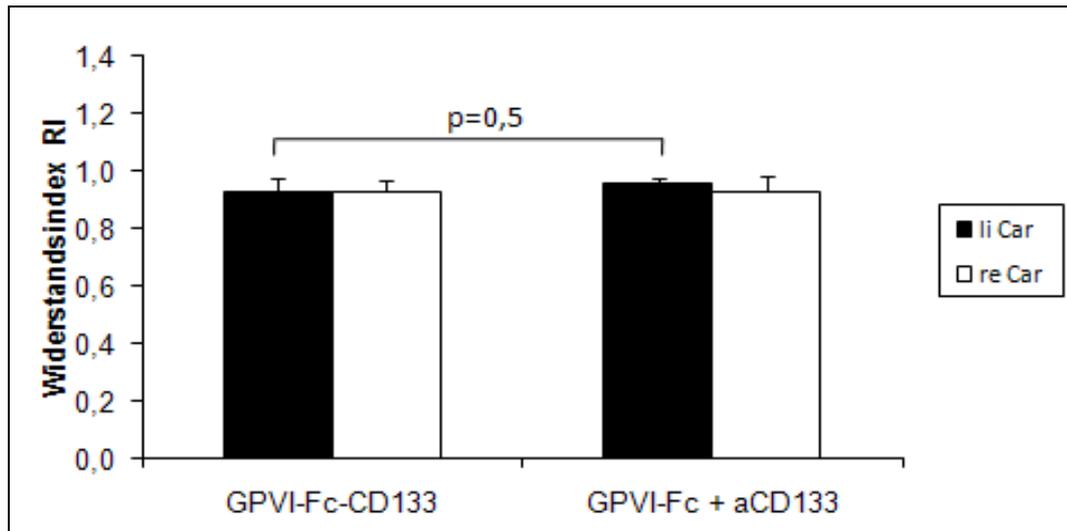


Abbildung 18: Widerstandsindex RI in der Verumgruppe (GPVI-Fc-CD133, n= 3) und der Kontrollgruppe (GPVI-Fc + aCD133, n= 3), jeweils gemessen an linker und rechter A. carotis

Bei der Verumgruppe liegen die Werte von RI in der linken A. carotis bei $0,929 \pm 0,047$ und in der rechten A. carotis bei $0,928 \pm 0,042$. In der Kontrollgruppe zeigen sich ähnliche Verhältnisse zwischen beiden Gefäßen. Die linke A. carotis liegt mit einem Widerstandsindex von $0,954 \pm 0,024$ geringgradig oberhalb des RI in der rechten A. carotis, welche einen Wert von $0,929 \pm 0,054$ aufweist. Beim Vergleich der Widerstandsindizes in Verum- und Kontrollgruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

3.8.2.2.2 Darstellung der histomorphometrischen Daten der linken A. carotis nach Gabe des GPVI-Fc-CD133-Konstrukts im Vergleich zur Kontrollgruppe

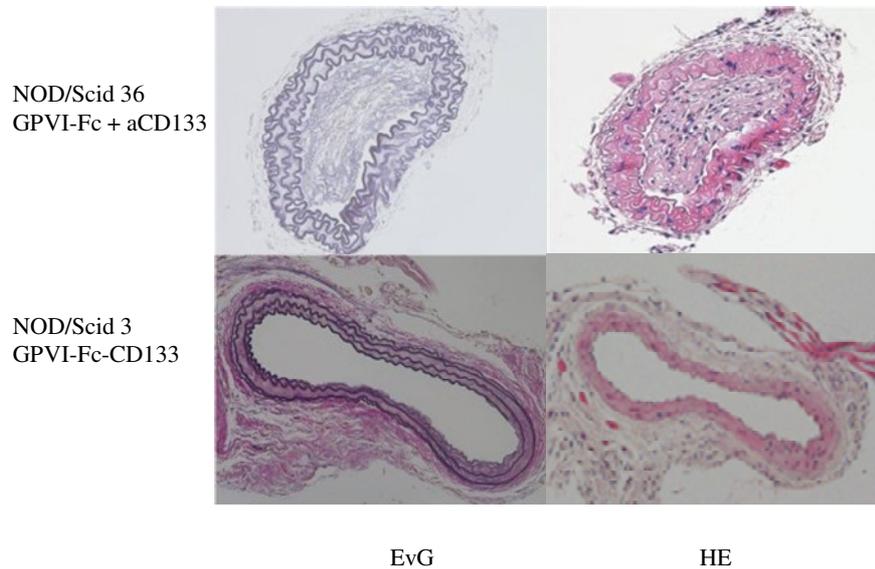


Abbildung 19: Histologische Schnitte der linken A. carotis bei NOD/Scid 36 bzw. NOD/Scid 3 nach Drahtdenudation. Es ist jeweils die EvG- und die HE-Färbung aufgeführt. Jeweils ein Tier jeder Gruppe dient als Anschauungsobjekt für das gesamte Kollektiv.

Die folgenden Schaubilder geben einen Überblick über die histomorphometrischen Messdaten (Mediadicke, Neointimafläche und Stenosegrad) der linken A. carotis bei Verum- und Kontrollgruppe.

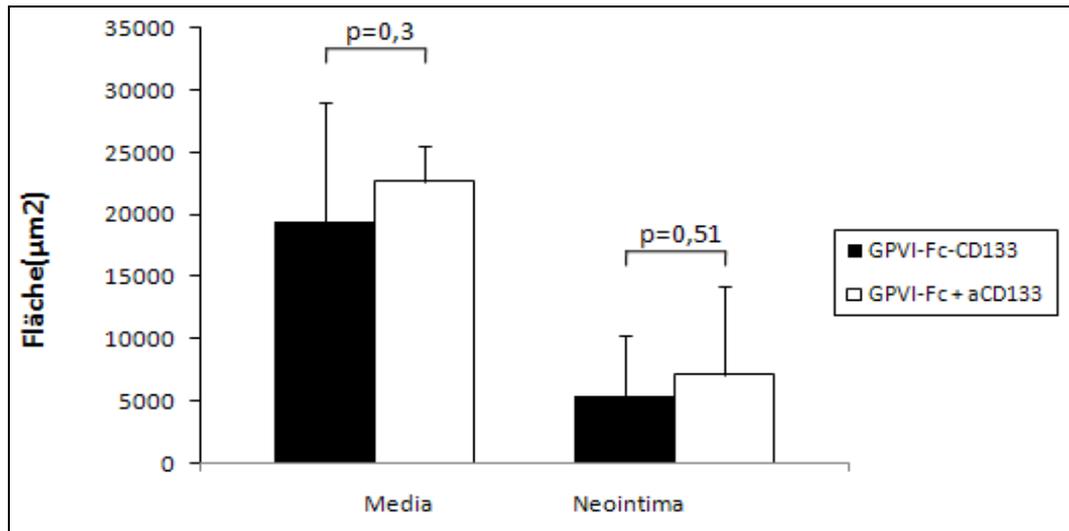


Abbildung 20: Vergleich der Flächenmaße der Media und Neointima bei Verum- und Kontrollgruppe (GPVI-Fc-CD133, n=3; GPVI-Fc + aCD133, n= 3)

In dieser Graphik werden jeweils die Flächen der Media und der Neointima der beiden Versuchsgruppen in Relation gesetzt. Die Mediafläche weist in der Verumgruppe eine Größe von $19.471,47 \mu\text{m}^2 \pm 5.486,77$ auf. Hingegen nimmt sie in der Kontrollgruppe einen Wert von $22.704,99 \mu\text{m}^2 \pm 1.590,59$ an. Die Neointimafläche in der Kontrollgruppe stellt sich mit einem Wert von $7.151,71 \mu\text{m}^2 \pm 7.151,71$ etwas größer als in der Konstruktgruppe dar ($5.423,38 \mu\text{m}^2 \pm 2.855,88$). Weder bei der Media- noch der Neointimafläche konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

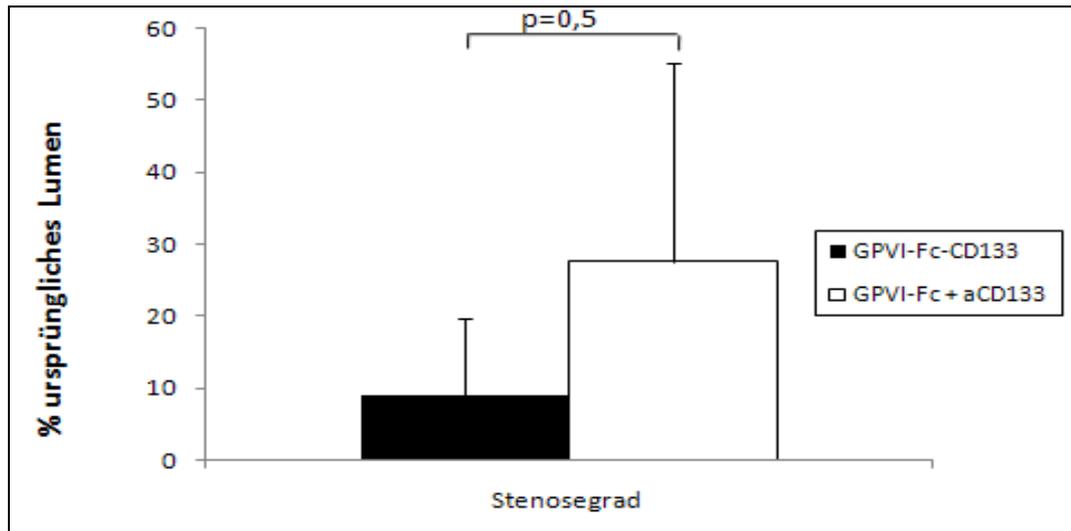


Abbildung 21: Darstellung des Stenosegrades in der linken A. carotis bei Verum- und Kontrollgruppe (GPVI-Fc-CD133, n= 3; GPVI-Fc + aCD133, n=3)

Der Stenosegrad liegt in der Kontrollgruppe bei 27,57 % ± 27,57 während in der Verumgruppe eine Stenose von 8,88 % ± 6,15 erreicht wird. Der Unterschied ist nicht signifikant.

3.8.2.3 Untersuchungsergebnisse des Versuchsansatzes mit Ultraschalluntersuchung und Tötung 3 Wochen post operationem mit Erhöhung der Zellzahl auf 500 000 CD34⁺ Zellen pro Injektionsdosis

3.8.2.3.1 Vergleich der Widerstandsindizes der Verumgruppe mit der Kontrollgruppe

In dem folgenden Schaubild werden jeweils die Widerstandsindizes der linken und rechten A. carotis der Verumgruppe mit den Daten der Kontrollgruppe verglichen.

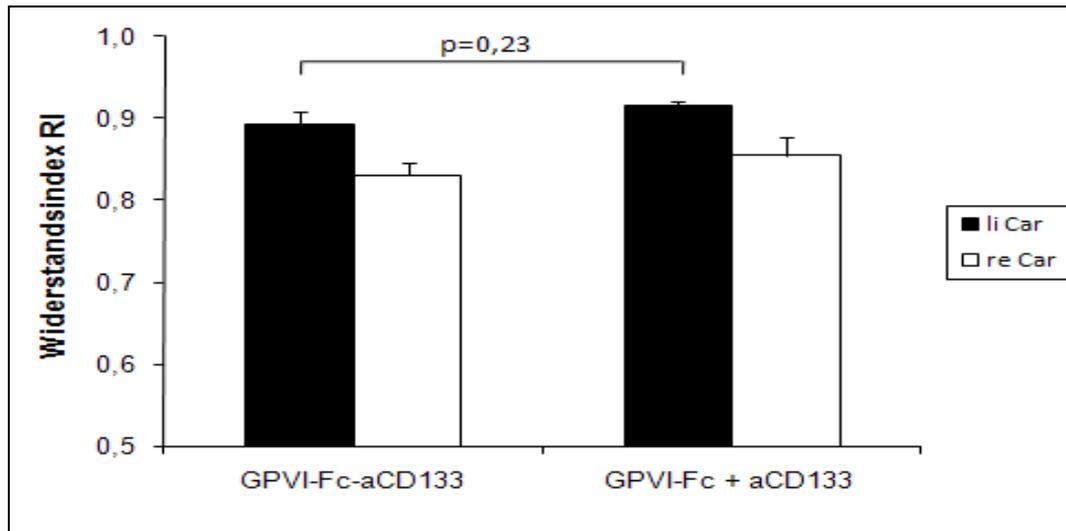


Abbildung 22: Widerstandsindex RI in Verum- (GPVI-Fc-CD133, n= 7) und Kontrollgruppe (GPVI-Fc + aCD133, n= 7), jeweils gemessen an linker und rechter A. carotis

In der Verumgruppe liegt der Widerstandsindex in der linken A. carotis bei $0,893 \pm 0,016$, während er in der rechten A. carotis einen Wert von $0,831 \pm 0,014$ annimmt. In der Kontrollgruppe liegen die Widerstandsindizes mit Werten von $0,916 \pm 0,0052$ bzw. $0,855 \pm 0,0218$ in einem ähnlichen Verhältnis vor, wobei der RI im verletzten Gefäß der Kontrollgruppe etwas höher liegt. Es zeigt sich allerdings kein signifikanter Unterschied im Vergleich der verletzten A. carotis beider Gruppen.

3.8.2.3.2 Darstellung der histomorphometrischen Daten der linken A. carotis nach Gabe des GPVI-Fc-CD133-Konstrukts im Vergleich zur Kontrollgruppe

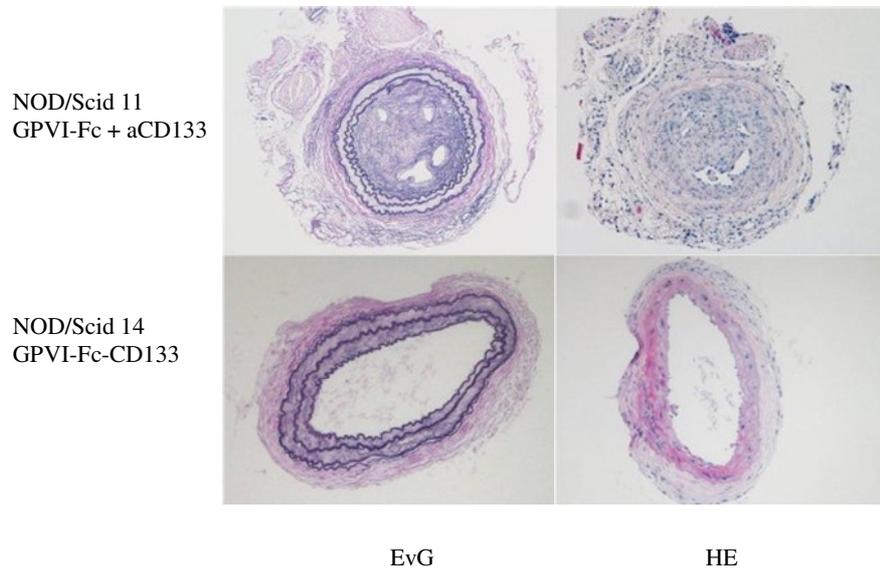


Abbildung 23: Histologische Schnitte der linken A. carotis bei NOD/Scid 11 und NOD/Scid 14 nach Drahtdenudation. Es ist jeweils die EvG- und die HE-Färbung dargestellt. Jeweils ein Tier jeder Gruppe steht stellvertretend für das Gesamtkollektiv.

Die folgenden Graphiken zeigen die histomorphometrischen Messgrößen Mediadicke, Neointimafläche und Stenosegrad in Verum- und Kontrollgruppe.

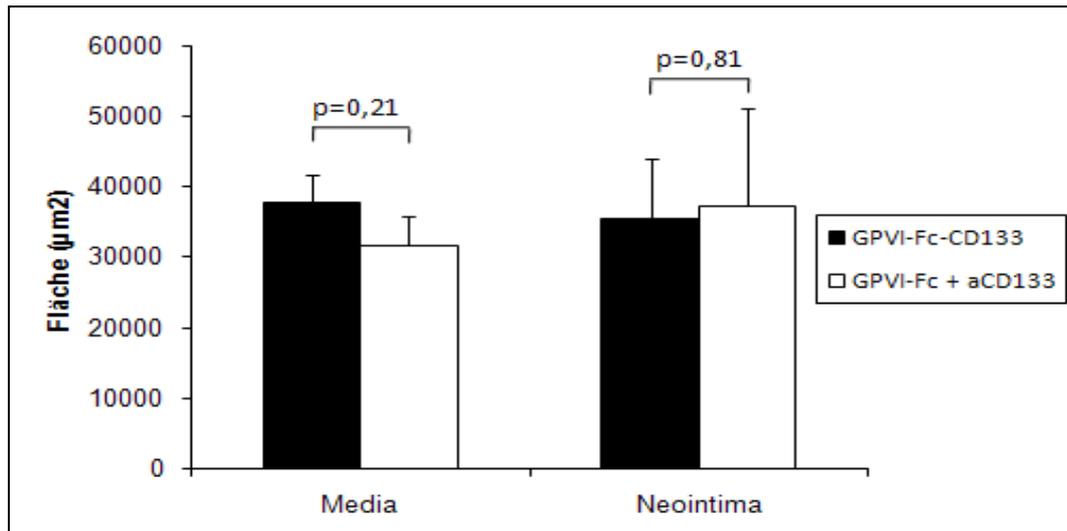


Abbildung 24: Vergleich der Flächenmaße der Media und Neointima bei Verum- und Kontrollgruppe (GPVI-Fc-CD133, n=7; GPVI-Fc + aCD133, n= 7)

In dieser Graphik werden jeweils die Flächenausmaße der Media und Neointima beider Gruppen miteinander verglichen. In der Verumgruppe nimmt die Media eine Fläche von $37.909,57 \mu\text{m}^2 \pm 3.661,13$ ein, während sie in der Kontrollgruppe Werte von durchschnittlich $31.746,89 \mu\text{m}^2 \pm 3.972,55$ erreicht. Die Neointimafläche liegt in der Verumgruppe bei $35.613,61 \mu\text{m}^2 \pm 8.213,08$ gegenüber $37.237,3 \mu\text{m}^2 \pm 13.885,48$ in der Kontrollgruppe. Es zeigt sich weder bei der Betrachtung der Media- noch der Neointimafläche im Vergleich beider Gruppen miteinander ein signifikanter Unterschied.

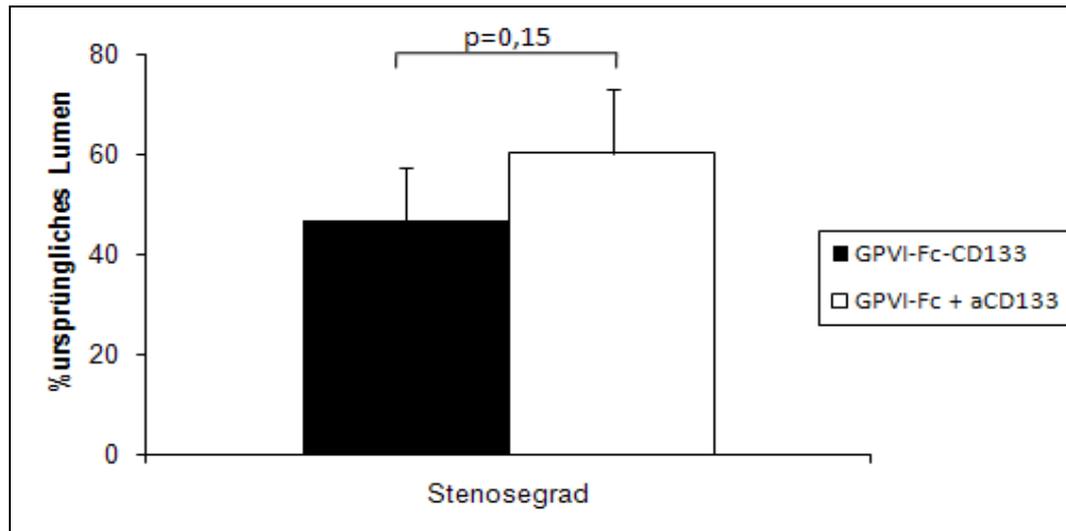


Abbildung 25: Darstellung des Stenosegrades in der linken A. carotis bei Verum- und Kontrollgruppe (GPVI-Fc-CD133, n= 7; GPVI-Fc + aCD133, n=7)

Im obigen Schaubild ist der Stenosegrad der linken A. carotis der Verum- und Kontrollgruppe gegenübergestellt. Es zeigt sich in der Gruppe, die das GPVI-Fc-CD133-Konstrukt erhalten hat, ein Stenosegrad von $46,6\% \pm 10,89$. In der Kontrollgruppe liegt der Stenosegrad der denudierten A. carotis bei $60,33\% \pm 12,66$. Es liegt kein signifikanter Unterschied vor.

3.8.3 Einfluss des bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-CD133 auf die Organregeneration am Beispiel des Myokardinfarkts

Da die Resultate, welche durch die Gabe des bispezifischen Moleküls GPVI-Fc-CD133 im Rahmen der Gefäßregeneration erreicht werden konnten, gewisse Tendenzen in Richtung verbesserter Regenerationsfähigkeit aufzeigten, wollten wir in unserer Arbeitsgruppe den Einfluss des Moleküls auf die Gewebe- bzw. Organregeneration des Herzens nach akutem Myokardinfarkt untersuchen.

Im nachfolgenden Schaubild ist die Infarktgröße in Abhängigkeit zum linken Ventrikel dargestellt.

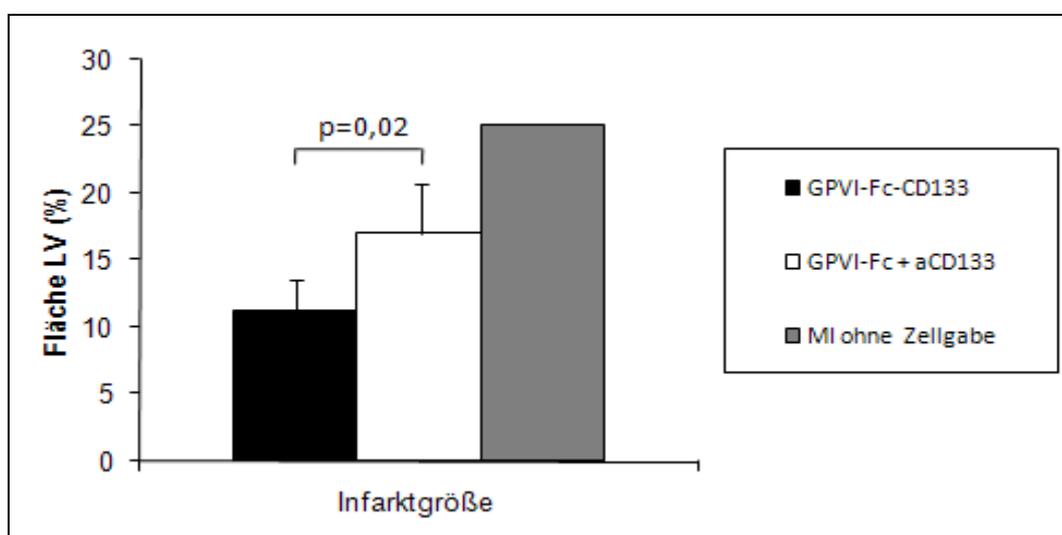


Abbildung 26: Vergleich der Infarktgrößen in Relation zur Fläche des linken Ventrikels bei den 3 Versuchsgruppen: GPVI-Fc-CD133 (Konstrukt (n= 4)), GPVI-Fc + aCD133 (Kontrolle (n= 4)) und Myokardinfarkt (MI) ohne Zellgabe (n= 2)

Im vorangehenden Diagramm ist die Infarktgröße in Abhängigkeit zur Fläche des linken Ventrikels dargestellt.

In der Verumgruppe liegt die Infarktgröße bei $11,24\% \pm 2,36$, während sie in der Kontrollgruppe einen Wert von $16,97\% \pm 3,72$ annimmt. Dieser Unterschied ist signifikant ($p=0,02$). In der Gruppe, welche nach akutem Myokardinfarkt keine Zellen erhalten hat, erreicht die Infarktgröße Flächenausmaße von $25,12\% \pm 0,94$.

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

4.1.1 Das Mausmodell

In der derzeitigen Forschung stellt die Maus das wichtigste und häufigste Versuchstier dar. Aufgrund ihrer kurzen Generationszeit, ihrer kostengünstigen Unterbringung und ihrer wenig pflegeintensiven Haltung hat sie sich als Labortier bewährt. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist in der Zucht transgener Tiere und der Generierung von Knockout-Tieren zu sehen. Beide Maßnahmen werden zu großen Teilen an Mäusen durchgeführt.

Da in der vorliegenden Arbeit humane Stammzellen zum Einsatz kommen sollten und durch diese heterologe Transplantation mit eventuell auftretenden Abwehrreaktionen gerechnet werden musste, wurde in den Versuchen eine immundefiziente Maus eingesetzt. Es handelt sich dabei um eine NOD-CB17-Prkd^{scid}/J, kurz NOD/Scid genannt. Diese weist einen B- und T-Zelldefekt auf.

4.1.2 Wahl des Verletzungsmodells

Um die Regenerationsprozesse, die sich aus einer atherosklerotischen Veränderung der Gefäßwand oder infolge einer zuvor durchgeführten Ballonangioplastie nach Gefäßverschluss ergeben, möglichst exakt nachahmen zu können, muss man sich eines Verletzungsmodells bedienen.

Da in der vorliegenden Arbeit die Regenerationsfähigkeit der Gefäßwand nach Endothelverletzung untersucht werden sollte, erschien ein mechanisches Verletzungsmodell als geeignet. Hierfür stehen zum einen die Ligatur des Gefäßes und zum anderen die Drahtdenudation zur Verfügung.

Die Drahtdenudation der A. carotis der Maus wurde erstmals 1993 von Lindner et al. beschrieben. Sie konnten zeigen, dass die Schädigung, welche durch einen 0,35 mm dünnen flexiblen Draht verursacht wurde, zu einer kompletten Denudation des Endothels führt⁶⁸. Infolgedessen beginnen die glatten Muskelzellen schon wenige Tage nach der Verletzung von der Tunica media ausgehend in Richtung Intima zu

migrieren und sich zu replizieren, was sich nach 14 Tagen in einer deutlichen Neointimabildung widerspiegelt. Lindner et al. konnten außerdem bereits 3 Wochen nach Drahtdenudation eine komplette Reendothelialisierung des Gefäßlumens beobachten⁶⁸.

Diese Beobachtungen blieben bei einer an der Ratte durchgeführten Ballondenudation weitestgehend aus. Hier konnte auch nach mehreren Wochen keine vollständige Wiederherstellung des Endothels festgestellt werden¹⁰¹.

Somit zeigt sich, dass die Wahl des geeigneten Verletzungsmodells im Hinblick auf die Fragestellung von entscheidender Bedeutung ist.

So konnten Tanaka et al. zeigen, dass die Verteilung und auch das Regenerationspotential der applizierten Stammzellen von der Art der Gefäßverletzung abhängig ist¹³⁰. In deren Studie wurden verschiedene Verletzungsmodelle miteinander verglichen und gezeigt, dass bei einer Drahtdenudation sowohl das Endothel als auch die Media der Gefäßwand stark geschädigt wird. Dies führt zu einer deutlichen Neointimabildung. Bei der Ligatur des Gefäßes oder auch der Cuff-off-Methode, bei der das Gefäß kurzzeitig durch Scherenschlag eröffnet und anschließend mittels Ligatur wieder verschlossen wird, kommt es hingegen zu keiner oder allenfalls zu einer sehr geringen Neointimaformation. Es konnten daher wesentlich weniger Stammzellen im verletzten Gefäßareal detektiert werden und auch die Expression von vaskulären Faktoren war deutlich verringert¹³⁰.

Da sich diese Beobachtungen auch in der vorliegenden Arbeit bestätigten, wurde das Verletzungsmodell geändert und somit konnte die Neointima als Parameter für die beginnende Reendothelialisierung herangezogen werden.

In der Literatur wird auch die Drahtdenudation an der A. femoralis beschrieben^{114, 118}. Da allerdings in unserer Arbeitsgruppe das Verletzungsmodell an der A. carotis etabliert ist, wurde dieses Modell zur Untersuchung der oben genannten Fragestellung herangezogen.

4.1.3 Myokardinfarkt-Modell zur Untersuchung der Geweberegeneration

Das Herz stellt im Organismus das mitunter wichtigste Organ dar. Es ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Kreislaufes, ohne welchen alle Körperfunktionen sistieren würden.

Früher galt die Meinung, dass das Herzmuskelgewebe nicht zur Regeneration befähigt sei. Es wurde als postmitotisches Gewebe angesehen, in welchem keine Zellerneuerung möglich ist.

Diese Einschätzung konnte unter anderen die Arbeitsgruppe um Beltrami revidieren. Denn Beltrami et al. konnten zeigen, dass im adulten Herzen cardiale Progenitorzellen vorhanden sind, welche Schädigungen im Myokard regenerieren können. Es handelt sich hierbei um eine heterogene Population multipotenter Stammzellen⁶.

Kurze Zeit später wurde von Yeh et al. das Regenerationspotential von EPCs näher beleuchtet. Es hat sich gezeigt, dass sich aus diesen Zellen sowohl glatte Muskelzellen, Endothelzellen, wie auch Kardiomyozyten entwickeln, die die geschädigten Zellen ersetzen können¹⁴⁶.

Seither wurden zahlreiche Studien verschiedener Arbeitsgruppen durchgeführt um die Regenerationsfähigkeit des Myokards zu untersuchen. Mehrheitlich diente das, wie auch in der vorliegenden Arbeit verwendete, LAD-Ligatur-Modell als Modell für den akuten Myokardinfarkt. Hierbei wird, wie unter Kap. 3.4.2 beschrieben, die LAD für eine gewisse Zeitspanne ligiert und anschließend wiedereröffnet. Durch die unterbundene Blutversorgung kommt es im betroffenen Herzmuskelgewebe zur Ischämie und schließlich zur Nekrose der Myozyten.

Da es sich beim akuten Myokardinfarkt um kein statisches Geschehen handelt, spielt die anschließende Reperfusion eine entscheidende Rolle im Modell. Der Gefäßverschluss wird durch die Entfernung der Ligatur teilweise wieder aufgehoben. Dies empfindet die Situation beim AMI nach, da hier durch Entzündungszellrekrutierung Umbauprozesse in Gang gesetzt werden, welche die Perfusion bestimmter Infarktbezirke wiederherstellen. Es entsteht somit ein eng umschriebenes Areal kompletter Ischämie, welches von minderdurchbluteten Bereichen umschlossen wird, welche *Periinfarktzone* genannt wird.

Das Myokardinfarktmodell wird größtenteils an der Maus und an der Ratte durchgeführt.

4.1.4 Schwierigkeiten bei der Durchführung der Drahtdenudation an der A. carotis

Die A. carotis communis und ihre beiden Äste, die A. carotis externa und interna, sind durch vorsichtiges Präparieren seitlich der Trachea sehr gut zugänglich. Allerdings

können auch hierbei Schwierigkeiten auftreten. So muss von Anfang an dafür gesorgt werden, dass alle umliegenden Strukturen weitestgehend geschont werden und die Gefäße selbst nicht bereits bei der Präparation verletzt werden. Nach Anlegen der Haltefäden ist anschließend darauf zu achten, dass durch deren Spannung der Blutfluss in der A. carotis kurzzeitig unterbunden wird, so dass bei der Inzision des Gefäßes keine größeren Blutverluste auftreten.

Bei der Drahtdenudation selbst stellt die eigentliche Verletzung des Endothels die größte Schwierigkeit dar. So kommt es bei manchen Arterien bereits beim Einführen des Drahtes in das Gefäßlumen zu einer Denudation des Endothels. Die Endothelzellschicht legt sich dabei an die Spitze des Drahtes und wird somit bei jeder Rotation weiter in Richtung A. communis vorgeschoben. Demnach entwickelt sich eine heftige Verletzung der Gefäßwand und es kommt nicht selten zu einer verstärkten Thrombusformation. Das Problem hierbei zeigt sich im mangelhaften Blutfluss, wodurch auch die Versorgung mit den applizierten Stammzellen in solch einem Gefäß fraglich erscheint, so dass von Fall zu Fall entschieden werden muss, ob solche Präparate in die Auswertung miteinbezogen werden können.

4.1.5 Verwendung von endothelialen Stammzellen

Bei einer Verletzung des Gefäßendothels bedingt durch atherosklerotische Veränderungen oder auch infolge einer Ballonangioplastie kommt es zu einem Verlust der antithrombotischen Eigenschaft des Endothels, was auch als Dysfunktion bezeichnet wird¹⁰⁷. An der durch die Verletzung freigelegten subendothelialen Matrix können vermehrt Zellen adhären und auf diese Weise das Entzündungsgeschehen unterhalten. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, dass schnellstmöglich Reparationsprozesse in Gang gesetzt werden, welche die Integrität des Endothels wiederherstellen¹⁰⁷. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass endotheliale Progenitorzellen an diesen Vorgängen maßgeblich beteiligt sind^{140, 99}. Zwar finden sich im peripheren Blut auch zahlreiche mature endotheliale Zellen, aber deren Proliferationspotential ist aufgrund der fortgeschrittenen Differenzierung eingeschränkt; somit sind diese Zellen nur bedingt zur Gefäßregeneration befähigt.

Asahara et al. gelang es 1997 erstmals endotheliale Progenitorzellen aus dem peripheren Blut von Erwachsenen zu isolieren und diese *in vitro* zu kultivieren³. Zur

Isolation wurden die für EPCs typischen Oberflächenmarker CD34, CD133 und VEGF herangezogen¹⁴⁷.

Die endothelialen Vorläuferzellen finden ihren Ursprung im Knochenmark und gehen gemeinsam mit der Monozyten-Makrophagenzelllinie auf den Hämangioblasten als Ursprungszelle zurück. Der Hämangioblast besitzt die Fähigkeit sich zu vaskulären und hämatopoetischen Zellen zu differenzieren¹⁰⁰.

In der regenerativen Medizin stellt die endotheliale Progenitorzelle den am besten untersuchten und auch am häufigsten eingesetzten Zelltyp dar. Sie diene außerdem der Erforschung der Interaktionen zwischen Stammzellen und Thrombozyten^{29, 61, 74}. EPCs finden ihren Einsatz allerdings nicht nur im Hinblick auf die Gefäßregeneration^{112, 129}, sondern werden auch mit gutem Erfolg in der Therapie des akuten Myokardinfarktes eingesetzt^{2, 28, 93, 94, 146}. Diese Untersuchungen wurden sowohl an Tiermodellen durchgeführt als auch in neuerer Zeit in Patientenstudien belegt. Die Applikation der Stammzellen nach Myokardinfarkt führt zu einer verbesserten Vaskularisierung des betroffenen Infarktareals⁹⁴, zu einer verbesserten Ventrikelfunktion^{2, 28, 6} und auch zu einer Risikoverringerng für erneut auftretende kardiovaskuläre Ereignisse¹¹⁵. In einer Studie von Yeh et al. konnte gezeigt werden, dass EPCs, und hier besonders die CD34⁺ Zellen, die Fähigkeit besitzen sich sowohl zu Endothelzellen, Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen zu differenzieren¹⁴⁶.

Da es in der vorliegenden Arbeit als Schwerpunktthema um die Gefäßregeneration nach Verletzung geht, wurde daher ebenfalls die endotheliale Progenitorzelle als Zelltyp verwendet. Zur Zellisolation wurde ebenso der Oberflächenmarker CD34 eingesetzt, so dass die applizierte Zellfraktion lediglich CD34⁺ Zellen beinhaltet.

4.1.6 Einsatz des löslichen bispezifischen Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-CD133

Das Glykoprotein VI stellt den wichtigsten Kollagenrezeptor auf der Oberfläche von Thrombozyten dar^{128, 82, 43, 19}. Ende der 80er Jahre entdeckten die Arbeitsgruppen um Sugiyama und Moroi in ihrem jeweiligen Patientenkollektiv, dass Patienten mit milder Blutungsneigung vorstellig wurden, welche allerdings lediglich bei einer Kollagen-induzierten Aggregation der Thrombozyten mit einer verminderten Thrombusformation reagierten^{128, 82}.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass GPVI von entscheidender Bedeutung für die Adhäsion und die Aggregation von Thrombozyten am Gefäßendothel ist^{86, 87, 88, 76}. Dies spielt besonders nach Verletzung des Endothels eine wichtige Rolle. Hier kommt es durch Zerstörung des Endothelzellverbandes zu einer Freilegung der subendothelialen Matrix, welche zu großen Teilen aus fibrillärem Kollagen besteht^{110, 111}. Dieser Mechanismus liegt den folgenden Untersuchungen zugrunde.

Massberg et al. entwickelten im Rahmen ihrer Forschungsarbeit ein lösliches Molekül, welches durch Fusion des humanen GPVI-Proteins und des Fc-Fragments generiert und anschließend durch Transfizierung in eine Zelllinie (HELA-Zellen) kloniert werden konnte. Sie konnten zeigen, dass infolge der Bindung des löslichen GPVI an Kollagen, die Adhäsion von Thrombozyten im Bereich der Gefäßwandläsion und somit die Thrombosegefahr verringert wird⁷⁷.

Bültmann et al. konnten diese Ergebnisse verifizieren. So konnte nach einer ballon-induzierten Verletzung mit anschließender lokaler Applikation des GPVI-Dimers ebenso eine verminderte Thrombusformation beobachtet werden¹⁴. Daher erscheint den Wissenschaftlern um Bültmann die Gabe dieses löslichen GPVI-Fusionsproteins als eine erfolgversprechende Behandlung nach Stentimplantation oder auch Ballonangioplastie¹⁴.

Gawaz et al. sehen in der Verwendung dieses löslichen Kollagenrezeptors eine Möglichkeit zur frühzeitigen Detektion von Gefäßläsionen im Verlauf der Atheroskleroseentstehung. Sie konnten durch Markierung des GPVI-Dimers mit radioaktivem Jod zeigen, dass sich das verabreichte GPVI-Protein bereits an kleineren Gefäßwandschäden anlagert und so mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nachgewiesen werden kann^{39, 63}.

In einer aktuellen Studie von 2008 konnte gezeigt werden, dass durch eine Langzeitapplikation von löslichem GPVI-Fc eine verminderte Plaqueeentwicklung bei Apo E-defizienten Mäusen beobachtet werden konnte. Somit kommt dem medikamentellen Einsatz des löslichen Glykoproteins VI im Rahmen der Atherosklerosebehandlung eine entscheidende Bedeutung zu¹¹⁷.

In der vorliegenden Arbeit wird mit Verwendung des bispezifischen GPVI-Dimers, welches an den Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD133 gekoppelt ist, das Ziel verfolgt, eine Rekrutierung der Progenitorzellen an den Ort der Verletzung zu erreichen. Der Antikörper dient dabei als Bindungsstelle für die CD34⁺ Zellen, welche

mit dem GPVI-Fc-CD133 vorinkubiert wurden. Durch die Adhäsion der GPVI-Domäne an die subendotheliale Matrix wird somit gleichzeitig die Anreicherung der Stammzellen im Verletzungsbereich erzielt.

4.1.7 Doppler-Sonographie zur Untersuchung des Gefäßflusses nach Drahtdenudation

Die Doppler-Sonographie stellt eine etablierte Methode zur Untersuchung der Strömungsverhältnisse im Gefäßsystem dar. Es können hierbei Aussagen über die Flussgeschwindigkeit des Blutes getroffen werden, aber auch Veränderungen der Gefäßwand, wie z.B. atherosklerotische Plaque oder Wanddickenzunahmen, detektiert werden. Im Rahmen von Ballonangioplastiebehandlungen oder auch bei Stentimplantationen kann die Doppler-Sonographie als Diagnostikum zur Beurteilung der Reendothelialisierung und somit der Erfolgskontrolle der Behandlung eingesetzt werden. Die farbkodierte Darstellung des Ultraschallbildes dient dabei als Orientierung, da mit deren Hilfe die Flussrichtung des Blutes erfasst werden kann. Verschiedene Messfunktionen ermöglichen das Erfassen von Stenosen und Widerständen im Gefäßsystem.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung der Doppler-Sonographie der A. carotis ein humanmedizinisches Gerät herangezogen und der Widerstandsindex als Vergleichsparameter für die verschiedenen Versuchsgruppen ermittelt. Bei der verwandten Sonde handelt es sich um einen 10MHz-Linear-Schallkopf. Dieser besitzt zwar eine hohe Eindringtiefe, allerdings zeigt sich aufgrund der niederen Frequenz eine schlechtere Auflösung im Ultraschallbild. Um eine Diagnostik der Mäuse-Carotiden durchführen zu können, vergleichbar der Untersuchung beim Menschen, bedarf es einer Sonde mit wesentlich höheren Frequenzen. Aufgrund der besseren Sensitivität des Ultraschallgerätes könnten exaktere Messungen vorgenommen werden. Ein solches Gerät steht unserer Arbeitsgruppe zurzeit leider noch nicht zur Verfügung. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ein deutlicher Unterschied zwischen der verletzten und unverletzten A. carotis zu sehen ist. Deshalb wurden die Untersuchungsergebnisse auch in die Auswertung miteinbezogen.

4.1.8 Charakterisierung der histomorphometrischen Auswertung im Hinblick auf die Gefäßregeneration

Zur histomorphometrischen Auswertung wurden die histologischen Schnitte der linken denudierten A. carotis herangezogen. Dazu wurden diese in Serie angefertigt, davon jeweils 6 Objektträger, auf denen meist 3 Präparate aufgezogen sind, mittels Mikroskop und integrierter Kamera fotografiert und anschließend mit dem Computerprogramm „NIS Elements“ vermessen. Als Messgrößen dienten die Fläche innerhalb der *Lamina elastica externa*, die Fläche innerhalb der *Lamina elastica interna* und das Gefäßlumen. Die Differenz zwischen *Lamina elastica interna* und *externa* spiegelt die Mediafläche wider. Die Neointima lässt sich mit Hilfe der Fläche innerhalb der *Lamina elastica interna* abzüglich des Gefäßlumens ermitteln.

Diese Neointimabildung ist Ausdruck für die Regenerationsprozesse, welche nach einer Verletzung des Endothels in Gang gesetzt werden. Sie wird zu einem großen Teil durch die Proliferation der glatten Muskelzellen hervorgerufen¹³⁰. Im Verlauf der Heilung kommt es dann zu einer Progression der Reendothelialisierung. Eventuell vorhandene Gefäßthromben werden organisiert und das Lumen wieder vollständig passierbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von endothelialen Stammzellen und deren verbesserte Anreicherung im geschädigten Gefäßbezirk, durch die zusätzliche Gabe des Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-CD133, die Neointimaformation tendenziell zurückgedrängt werden konnte und so die Reendothelialisierung angestoßen bzw. beschleunigt werden kann.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Allgemeine Beobachtungen

Bei den Versuchen mit Ligatur der A. carotis sinistra wurden keine postoperativen Ultraschalluntersuchungen durchgeführt. Die Beurteilung der Ergebnisse dieses Versuchsansatzes erfolgt lediglich anhand der histologischen Präparate der verletzten Gefäßabschnitte.

Erst im Laufe der Untersuchungen ergab sich die Möglichkeit der Durchführung einer Doppler-Sonographie zur Erfassung der Strömungsverhältnisse im verletzten Gefäß. Alle Tiere eines Versuchstages, meist vier Tiere, erhielten Zellen derselben Charge. Dabei wurden in den meisten Fällen zwei Zelldosen mit dem Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-CD133 vorinkubiert, während zu den beiden anderen Zelldosen die Einzelkomponenten zugegeben wurden.

4.2.2 Betrachtung der Einzelergebnisse

Nachfolgend werden jeweils die Ultraschalldaten bzw. die histomorphometrischen Parameter der einzelnen Versuchsansätze der Verum- und Kontrollgruppen miteinander verglichen.

4.2.2.1 Vergleich der Widerstandsindizes nach Drahtdenudation in Verum- und Kontrollgruppe

4.2.2.1.1 Untersuchung nach 2 Wochen

Bei Betrachtung des Schaubildes ist zunächst ersichtlich, dass sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Verumgruppe die Widerstandsindizes der rechten Aa. carotidae annähernd gleich sind. Dies ist darauf zurückzuführen, dass jeweils die rechten Carotiden bei beiden Gruppen unverletzt sind. Sie weisen demnach physiologische Werte auf. Diese dienen jeweils als Kontrolle für die denudierte linke A. carotis. Es zeigt sich demnach in beiden Versuchsgruppen ein deutlicher Unterschied zwischen den verletzten und unverletzten Gefäßen. Durch die Drahtdenudation wird an der Gefäßwand eine Endothelzellschädigung hervorgerufen, welche aufgrund der freigelegten extrazellulären Matrix zu einer verstärkten Thrombusformation führt^{110, 111}. Im Anschluss daran werden regenerative Prozesse in Gang gesetzt, welche durch Einwanderung von Entzündungszellen im histologischen Bild nachgewiesen werden können⁸⁹. Darüberhinaus kann im Gefäßlumen bereits 1 Woche post operationem eine deutliche Neointimabildung vorgefunden werden^{68, 101, 114}, welche zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstandes führen kann.

Beim Vergleich der Indizes der linken Carotiden wird deutlich, dass in der Kontrollgruppe die Widerstände einen höheren Wert annehmen als in der Verumgruppe. Dies lässt vermuten, dass die Stenose in den Kontrollgefäßen deutlich ausgeprägter ist und somit die Flussgeschwindigkeit innerhalb des Gefäßes stärker eingeschränkt wird.

Es ist daher möglich, dass das applizierte Adhäsionsmolekül bereits 2 Wochen post operationem zu einer verbesserten Anreicherung der Stammzellen im betroffenen Gefäßareal geführt hat und somit die Regenerationsfähigkeit des Endothels positiv beeinflusst werden konnte. Diese Vermutung soll mit Hilfe der histomorphometrischen Messung der histologischen Schnitte der linken A. carotis bestätigt werden (siehe Kapitel 4.2.2.2.1).

4.2.2.1.2 Untersuchung nach 5 Wochen

Im zweiten Versuchsansatz, in welchem die Tiere jeweils 5 Wochen post operationem einer Ultraschalluntersuchung unterzogen wurden, zeigen sich bei der Betrachtung des Schaubildes kaum Unterschiede. Beim Vergleich zwischen beiden Gruppen ergeben sich lediglich minimal erhöhte Werte des Widerstandsindex in den linken Carotiden der Kontrollgruppe. Es ist außerdem auffällig, dass keine deutlichen Unterschiede zwischen verletzter und unverletzter A. carotis vorzufinden sind. Es liegt die Vermutung nahe, dass bereits nach 5 Wochen das betroffene Gefäßareal abgeheilt ist. Diese Art der spontanen Abheilung wurde bereits von Sata et al. am Verletzungsmodell der A. femoralis beschrieben¹¹⁴. Sie konnten zeigen, dass die Neointimaformation lediglich bis zu 4 Wochen nach Denudation voranschreitet und sich anschließend zurückbildet. Durch die Regression der Neointimaformation kommt es letztlich zum Abfall des Gefäßwiderstandes im einst verletzten Gefäß und somit können erneut physiologische Werte erreicht werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein weiterer Versuchsansatz mit Ultraschalluntersuchung und Tötung der Tiere 3 Wochen post operationem aufgegriffen.

4.2.2.1.3 Untersuchung nach 3 Wochen und Erhöhung der Zellzahl

Zunächst ist zu erwähnen, dass bei den 3-Wochen-Versuchen vorab die Zellzahl der CD34⁺ Zellen von 50 000 auf 500 000 Zellen pro Injektionsdosis erhöht wurde.

Die ursprüngliche Zellzahl ist auf frühere Versuche in unserer Arbeitsgruppe zurückzuführen³⁶. Es hat sich gezeigt, dass mit einer Zellzahl von 50 000 CD34⁺ Zellen und der anschließenden Inkubation mit dem Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-CD133 eine deutliche Anreicherung im Bereich der Gefäßverletzung erzielt werden kann. Da in der vorliegenden Arbeit das Augenmerk auf das Regenerationspotential dieser Zellen gelegt werden soll, erscheint es von Vorteil größere Zelldosen einzusetzen, weil im Laufe der Regenerationsprozesse zahlreiche Zellen erneut abgeschwemmt werden. Diese Zellen reichern sich letztlich in anderen Geweben, wie z.B. Milz und Lunge ab und stehen somit dem Körper nicht mehr zur Verfügung.

In der Graphik ist jeweils bei beiden Versuchsgruppen ein deutlicher Unterschied zwischen der linken und rechten A. carotis zu beobachten. Es zeigt sich demnach, dass die Denudation des jeweiligen Gefäßes zu einer deutlich sichtbaren Einengung des Gefäßlumens durch die voranschreitende Neointimahyperplasie führt und letztlich eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes hervorruft.

Beim Vergleich beider Gruppen miteinander sind lediglich minimale Unterschiede erkennbar. Demnach liegen die Widerstandsindizes sowohl im gesunden als auch verletzten Gefäß etwas höher als bei der Verumgruppe. Dies lässt sich eventuell auf die mangelhafte Sensitivität des humanmedizinischen Gerätes beim Einsatz an der Maus zurückführen. Daher ist in diesem Fall die Aussage über die Effektivität des Adhäsionsmoleküls im Hinblick auf die Beeinflussung des Gefäßwiderstandes schwierig.

In erster Linie sollten also auch hier die histomorphometrischen Daten betrachtet werden.

4.2.2.2 Vergleich der histomorphometrischen Daten der denudierten A. carotis sinistra in Verum- und Kontrollgruppe

4.2.2.2.1 Tötung nach 2 Wochen

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung der linken Carotiden im Rahmen der 2-Wochen-Versuche, ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen Verum- und Kontrollgruppe.

In der Konstruktgruppe nimmt die Mediafläche einen höheren Wert als in der Kontrollgruppe ein, was wahrscheinlich auf die stärker in Gang gesetzten Regenerationsprozesse zurückzuführen ist. So konnten Lindner et al. zeigen, dass schon bereits 1 Woche nach durchgeführter Drahtdenudation an der A. carotis eine verstärkte Replikation der glatten Muskelzellen (SMCs) nachweisbar ist. Diese proliferierenden SMCs migrieren anschließend aus der *Tunica media* in Richtung Intima und führen dort zu einer Neointimaformation⁶⁸.

Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Sowohl in der Konstrukt- als auch in der Verumgruppe ist eine Neointimabildung vorzufinden. Allerdings ist bei näherer Betrachtung auffällig, dass in der Kontrollgruppe die Neointimafläche fast doppelt so stark ausgeprägt ist. Dies lässt vermuten, dass der Einsatz des GPVI-Fc-CD133-Moleküls zu einer Reduktion der Neointimaformation und somit zu einer verbesserten Regenerationsfähigkeit des verletzten Gefäßareals führt.

Des Weiteren führt diese Neointimahyperplasie, wie auch im zweiten Schaubild ersichtlich, zu einer deutlichen Einengung des Gefäßlumens, welches sich in einem höheren Stenosegrad widerspiegelt.

Allerdings sind die Ausprägungen bei den einzelnen Tieren der Gruppen sehr unterschiedlich, so dass der „Standard Error of the Mean“ ebenfalls einen höheren Wert annimmt. Es ist jedoch tendenziell in der Verumgruppe eine verbesserte Regenerationsfähigkeit zu erkennen. Um diese Tendenz verifizieren zu können, wäre eine Erhöhung der Tierzahl nötig gewesen. Dies konnte aber aufgrund der mangelnden Zeit nicht umgesetzt werden. Außerdem wurde bei den Untersuchungen nach 2 Wochen häufig ein noch nicht völlig organisierter Thrombus gesehen, so dass eine Verlängerung des Untersuchungsintervalles auf 3 Wochen sinnvoll erschien.

4.2.2.2.2 Tötung nach 5 Wochen

Beim Vergleich der Mediafläche der linken Carotiden 5 Wochen post operationem zeigt sich in den Gefäßen der Kontrollgruppe eine Zunahme der Mediadicke.

Auffällig allerdings dazu ist, dass die Neointimafläche in beiden Gruppen sehr gering ist. Des Weiteren ergibt sich bei der histomorphometrischen Ausmessung eine deutliche Verödung der Gefäße, besonders in der Konstruktgruppe. Diese zeigt sich durch den z.T. vollständigen Verlust der Wandstrukturen (*Lamina elastica interna und externa*) und der fehlenden Durchlässigkeit der Gefäße. Es ist daher schwierig diese Daten exakt miteinander zu vergleichen. Lediglich der Stenosegrad weist einen deutlichen Unterschied zwischen Kontroll- und Verumgruppe auf. Hier liegt der Wert über dem 2-fachen Wert der Verumgruppe. Allerdings weisen auch zwei der verletzten Gefäße überhaupt keine Stenose auf (Auflistung aller Daten in Tabelle im Anhang). Verwunderlich ist allerdings, dass diese starken Verödungen und auch Stenosen zu keiner funktionellen Einschränkung geführt haben (vgl. Kapitel 4.2.2.1.2).

Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Ultraschalluntersuchung und der anschließenden Histologie können möglicherweise auf die mangelhafte Sensitivität der Sonographiesonde beim Einsatz an einem kleinen Untersuchungsobjekt, wie einer Maus, zurückzuführen sein.

Aufgrund ausführlicher Literaturrecherche und der Erkenntnis, dass bereits 4 bis 5 Wochen post operationem die Umbauprozesse weitestgehend abgeschlossen sein müssten^{20, 21, 22, 101, 118, 119, 120}, wurde von diesem Versuchsansatz Abstand genommen. Es wurde ein neuer Zeitpunkt zur Untersuchung gewählt.

4.2.2.2.3 Tötung nach 3 Wochen

Die histomorphometrische Auswertung der linken Carotiden der 3-Wochen-Versuche ergibt in der Kontrollgruppe eine verringerte Mediafläche. Die Neointimaformation hingegen weist im Vergleich zur Verumgruppe einen höheren Wert auf. Der Stenosegrad der linken A. carotis ist in der Kontrollgruppe deutlich erhöht. Es zeigt sich auch in diesem Versuchsansatz der Trend, dass durch Gabe des GPVI-Fc-CD133-Fusionsmolekül die Neointimabildung reduziert werden konnte und somit die Stenose des Gefäßes verringert wird.

4.2.3 Einfluss der verabreichten Zellen auf die Gefäßheilung

Die Endothelzellschädigung ist ein entscheidendes Ereignis im Rahmen der Atheroskleroseprogression, spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer Restenose nach Angioplastie oder Stentimplantation.

Daher wird zurzeit in renommierten Forscherkreisen intensiv nach Möglichkeiten der beschleunigten Reendothelialisierung gesucht.

Werner et al. konnten im Carotis-Verletzungsmodell an der Maus zeigen, dass die Applikation von endothelialen Progenitorzellen zu einer verringerten Neointimabildung führt und somit die Reendothelialisierung gefördert wird¹⁴¹. Außerdem ist es bewiesen, dass ein schwerwiegender Gefäßschaden zu einem deutlichen Anstieg von Stammzellen im zirkulierenden Blut führen kann und somit die Reaktivität des Gefäßes entscheidend verbessert wird⁵³. Des Weiteren ist es möglich durch eine Applikation von Cytokinen, wie G-CSF^{94, 129} oder SDF-1^{74, 150} Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder auch dem peripheren Blut zu mobilisieren und diese verstärkt zum verletzten Gefäßendothel zu rekrutieren.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Fusionsmolekül GPVI-Fc-CD133 kann ebenso als eine Art Aktivator für die Rekrutierung der endothelialen Progenitorzellen angesehen werden. Über den Antikörper, welcher gegen den Oberflächenmarker CD133 gerichtet ist, können Stammzellen an das Molekül gebunden werden und werden über den Bindungspartner GPVI, welcher verstärkt an Kollagenstrukturen bindet, direkt zur Gefäßverletzung geleitet. Demzufolge kommt es an der Endothelläsion zu einer vermehrten Anreicherung der CD34⁺ Zellen³⁶.

In der Literatur ist an zahlreichen Stellen beschrieben, dass Stammzellen an Endothelverletzungen rekrutiert werden und dort Umbauprozesse in Gang setzen^{141, 130, 112}. Tanaka et al. konnten außerdem zeigen, dass die Rekrutierung bzw. das Homing der Progenitorzellen von der Art und der Schwere der Verletzung abhängig ist¹³⁰. Ein wichtiges Schlüsselereignis für die Proliferation der Zellen scheint die Apoptose und in diesem Zusammenhang besonders das Zugrundegehen der glatten Muskelzellen zu sein¹³⁰.

Diese Beobachtungen konnten auch in der vorliegenden Arbeit gemacht werden. Demnach entwickelte sich in den sehr schwer durch die Drahtdenudation verletzten Gefäßen eine deutliche Neointima, während die Media weniger stark ausgeprägt erscheint. Die Media ist zudem relativ zellarm. Dies ist besonders in der

Kontrollgruppe zu beobachten. In der Konstruktgruppe hingegen ist die Neointimaformation geringer, was sich meist durch eine deutliche Reorganisation des Gewebes innerhalb des Gefäßlumens äußert. Das Gefäßlumen wird zusehends durchlässiger und die Stenose des Gefäßes wird dabei fortschreitend reduziert oder auch komplett aufgehoben.

Die Mediadickenzunahme innerhalb der Verumgruppe dürfte auf die massive Proliferation der glatten Muskelzellen im Rahmen der Regeneration zurückzuführen sein.

4.2.4 Beeinflussung der Myokardregeneration mit Hilfe der kombinierten Gabe von CD34⁺ Zellen und dem GPVI-Fc-CD133-Fusionsprotein

Bei der Betrachtung des Schaubildes zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Demnach stellt sich die Infarktgröße bei den Tieren, die nach Ligatur der linken Koronararterie keine Zellen erhalten haben, deutlich größer dar als in Verum- und Kontrollgruppe. Beim Vergleich der Infarktgröße bezogen auf den linken Ventrikel zwischen Verum- und Kontrollgruppe zeigt sich ein signifikanter Unterschied. Die Infarktgröße ist somit in der Kontrollgruppe annähernd 1,5-fach so stark ausgeprägt. Dies lässt den Rückschluss zu, dass durch die kombinierte Gabe von Stammzellen mit dem Adhäsionsmolekül GPVI Fc-CD133 eine verbesserte Regenerationsfähigkeit erreicht werden kann. Wir vermuten, dass die Zellen stärker zum Infarktareal rekrutiert werden, da durch die voranschreitende Fibrosierung des Herzmuskelgewebes im Rahmen der Umbauprozesse nach erfolgtem Verschluss der Koronararterie vermehrt Kollagenstrukturen freigelegt werden, an welche sich das Protein GPVI binden kann. Somit stehen mehr Stammzellen zur Ausdifferenzierung zu intaktem und funktionsfähigem Herzmuskelgewebe zur Verfügung. In diesen ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Infarktgröße durch die Applikation von CD34⁺ Zellen unter Zuhilfenahme des Adhäsionsmoleküls deutlich verkleinert werden kann. Die Überprüfung der tatsächlichen Funktionalität des neu regenerierten Gewebes muss allerdings in zukünftigen Studien erfolgen. Dazu könnte sowohl die Echokardiografie als auch die MRT-Untersuchung ihren Beitrag leisten.

4.2.5 Bedeutung der Stammzelltherapie im Rahmen der Behandlung des akuten Myokardinfarktes

Wie bereits bei Orlic et al. beschrieben, führt die Minderdurchblutung in den distalen Myokardarealen zu einem Zelluntergang der betroffenen Kardiomyozyten und infolgedessen kommt es zur Nekrose dieser infarzierten Bezirke^{94, 95}. Yang et al. konnten in Untersuchungen am Herzen nach akutem Myokardinfarkt zeigen, dass bereits nach 1 bis 2 Tagen eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten und im Anschluss daran eine Einwanderung von Makrophagen stattfindet¹⁴⁵. Diese Zellen sind verantwortlich für das beginnende Entzündungsgeschehen. Nach 7 bis 14 Tagen beginnen anschließend die Umbauprozesse im geschädigten Myokardgewebe. Dies zeigt sich in einer massiven Einwanderung von Lymphozyten und Fibroblasten. Letztere führen zu einer Fibrosierung des betroffenen Myokardareals, welche durch Ausbildung von Kollagenfibrillen charakterisiert werden kann¹⁴⁵.

Da das Glykoprotein VI einen bedeutenden Kollagenrezeptor^{43, 82} darstellt, kann dieses an kollagenreiche Strukturen, wie sie z.B. bei Umbauprozessen infolge eines Myokardinfarktes vorliegen, binden. Da es sich bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protein um ein Fusionsmolekül aus dem humanen GPVI-Fc und dem mAb anti-CD133 handelt, konnte über den GPVI-Fc-Anteil des Moleküls eine Anreicherung der CD34⁺ Zellen im Infarktareal erzielt werden. Anhand der Infarktgrößenmessung konnte anschließend gezeigt werden, dass die adhärierenden Progenitorzellen zu einer verbesserten Regenerationsfähigkeit im Myokardgewebe beitragen.

In zahlreichen Veröffentlichungen wird die Differenzierung von Progenitorzellen verschiedenen Ursprungs, wie z.B. cardiale Progenitorzellen^{28, 108}, Stammzellfraktionen aus dem Knochenmark^{70, 2, 115} oder endotheliale Progenitorzellen (CD34⁺),^{146, 12} in Kardiomyozyten, Endothel- und glatte Muskelzellen beschrieben.

Die applizierten Stammzellen führen demnach im geschädigten Myokard zu einer verbesserten Vaskularisierung, welche durch Erhöhung der Kapillardichte charakterisiert ist, und einem Ersatz des infarzierten Gewebes durch funktionell kompetentes Herzmuskelgewebe^{94, 95, 108}. Diese Regenerationsfähigkeit führt nicht selten zu einer deutlichen Steigerung der Ventrikelfunktion^{28, 94, 2, 108}. Es konnte in einer Patientenstudie nach durchgeführter Zellinjektion von cardialen Stammzellen

eine erhöhte linksventrikuläre Ejektionsfraktion, eine Wanddickenzunahme und eine verringerte Dilatation des Ventrikels beobachtet werden²⁸.

Schächinger et al. untersuchten in einer Langzeitpatientenstudie inwiefern die intrakoronare Gabe von Stammzellen einen Einfluss auf die Genesung des Patienten nimmt. Dabei wurde das Risiko für das erneute Auftreten eines Myokardinfarktes, die Notwendigkeit einer abermals durchzuführenden Katheterintervention und das Auftreten von Todesfällen innerhalb eines Jahres nach Infarkt erfasst. Alle diese Folgeerscheinungen des AMI zeigten eine positive Korrelation zur Applikation der Progenitorzellen¹¹⁴.

In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings lediglich die Beeinflussung der Infarktgröße durch das Adhäsionsmolekül berücksichtigt. In nachfolgenden Arbeiten ist es demnach erforderlich Funktionsmessungen des Herzens nach erfolgter Stammzelltherapie mit und ohne Gabe des Konstruktes vorzunehmen, um Aussagen über den Effekt des GPVI-Fc-CD133 auf die Ventrikelfunktion machen zu können. Denn nicht nur eine Reduktion der Infarktgröße, sondern auch die Verbesserung der Ventrikelfunktion tragen entscheidend zu der Überlebensfähigkeit des Patienten bei. Daher sollte der Einfluss des Adhäsionsmoleküls auf die Regenerationsfähigkeit des Herzens in Langzeitstudien überprüft werden.

4.2.6 Schlussfolgerung und Ausblick

In unserer Arbeitsgruppe haben frühere Studien gezeigt, dass mit Hilfe des löslichen GPVI-Fc-CD133-Fusionsprotein eine gesteigerte Adhäsion der Progenitorzellen im geschädigten Gewebe erreicht werden kann³⁶.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Applikation von CD34⁺ Zellen in Kombination mit dem Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-CD133 nach Drahtdenudation an der A. carotis bereits innerhalb von 2 Wochen tendenziell zu einer verminderten Neointimabildung des verletzten Gefäßabschnittes führt und somit Stenosen verringert werden können.

Dies bietet einen entscheidenden Beitrag zur Behandlung der Restenose nach Stentimplantation und Ballonangioplastie im Rahmen der Atherosklerosebehandlung. Der Einsatz des Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-CD133 bietet somit möglicherweise eine unkompliziertere Applikationsmöglichkeit von Stammzellen. Durch die

verbesserte Anreicherung der Stammzellen im geschädigten Gewebe kann die injizierte Menge an Stammzellen auf ein Minimum reduziert werden oder sogar auf den Einsatz exogen zugeführter Stammzellen vollkommen verzichtet werden. Es ist erwiesen, dass in der peripheren Zirkulation von Personen mit Myokardinfarkt die Anzahl an Progenitorzellen deutlich erhöht ist¹²³, so dass es denkbar wäre, dass alleine durch den Einsatz des Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-CD133 und daraus folgend der Rekrutierung körpereigener Progenitorzellen eine verbesserte Anreicherung der Zellen im geschädigten Gefäßareal oder auch ischämischen Gewebe erreicht werden kann. Der Einfluss des bispezifischen Dimers auf die Regeneration nach akutem Myokardinfarkt wird in unserer Arbeitsgruppe derzeit ausführlich am Myokardinfarktmodell an der Maus untersucht. Erste Ergebnisse hierzu werden bereits in der vorliegenden Arbeit erwähnt. Auch hier zeigen sich mit Hilfe der Kombinationstherapie aus Progenitorzellen und dem Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-CD133 deutliche Erfolge im Hinblick auf die Reduktion der Infarktgröße. Es bleibt allerdings zu klären, ob die Regression des Infarktareals ebenso zu einer Verbesserung der Ventrikelfunktion führt. Dazu müsste auch beim Myokardinfarktmodell eine Ultraschalluntersuchung prä- und postoperativ angeschlossen werden. Denn nur so kann eine Aussage über die tatsächlich vorliegende Ventrikelfunktion gemacht werden. Ein weiteres Diagnostikum zur Erfassung der Herzfunktion stellt die MRT-Untersuchung dar; diese Methode ist allerdings in Tübingen im Bereich der experimentellen Forschung noch nicht vollständig etabliert.

Der mögliche Verzicht einer autologen Knochenmarksspende zur Isolation von Stammzellen und die anschließende Reinjektion dieser Zellen könnte die Belastung des Patienten nach Katheterintervention reduzieren und somit möglicherweise einen Beitrag zur besseren Rekonvaleszenz des Patienten leisten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Atherosklerose stellt in der westlichen Welt eine häufig diagnostizierte Gefäß-erkrankung dar. Sie führt nicht selten zu schwerwiegenden Verschlusskrankheiten wie dem akuten Myokardinfarkt oder dem Schlaganfall. Die atherosklerotischen Veränderungen selbst, aber auch die therapeutisch angewandten Verfahren, wie z.B. die Ballonangioplastie und die Stentimplantation, führen zu einer Endothelschädigung, in deren Folge es zur Freilegung der extrazellulären Matrix kommt. Dieser Prozess stellt ein Schlüsselereignis in der Aktivierung der Gerinnungskaskade mit anschließender Thrombusformation dar. Da dieser thrombogene Zustand erst nach vollständiger Wiederherstellung der Endothelzellschicht wiederaufgehoben wird, wird in der derzeitigen wissenschaftlichen Forschung intensiv nach Möglichkeiten gesucht diese Reendothelialisierung zu beschleunigen. Im Rahmen der Regenerationsprozesse kommt es zu einer starken Neointimabildung, welche hauptsächlich durch eine Proliferation der glatten Muskelzellen hervorgerufen wird. Diese führt nicht selten zu einer Restenose des betroffenen Gefäßes, so dass vielfach versucht wird, diese Neointimaformation weitestgehend durch Zelltherapie zurückzudrängen.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand zweier Verletzungsmodelle an der A. carotis eine Endothelschädigung herbeigeführt und anschließend eine Injektion von humanen CD34⁺ Progenitorzellen durchgeführt. Die CD34⁺ Zellen wurden zuvor entweder mit dem Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-CD133 oder den jeweiligen Einzelkomponenten, welche als Kontrolle dienen, vorinkubiert. Das GPVI-Fc-CD133- Molekül stellt dabei ein Fusionsprotein aus dem humanen GPVI-Fc und einem Antikörper dar, der gegen den auf Progenitorzellen befindlichen Oberflächenrezeptor CD133 gerichtet ist. Es führt zu einer verbesserten Anreicherung der Stammzellen an der jeweiligen Gefäßverletzung.

Die Beurteilung der Regenerationsfähigkeit des geschädigten Gefäßendothels infolge der Stammzelltherapie wurde anhand histomorphometrischer Daten vorgenommen. Dabei wurden unterschiedliche Tötungszeitpunkte berücksichtigt. Zusätzlich erfolgte am Tag der Tötung eine Doppler-Sonographie.

ZUSAMMENFASSUNG

Als einen weiteren Einsatzbereich der kombinierten Stammzelltherapie ist die Behandlung des akuten Myokardinfarkts zu nennen. In der vorliegenden Arbeit werden erste Ergebnisse im Rahmen der Untersuchungen am Myokardinfarktmodell an der Maus angeführt.

In den jeweiligen Versuchen zur Gefäßverletzung konnte gezeigt werden, dass durch die kombinierte Gabe von CD34⁺ Progenitorzellen und dem Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-CD133 tendenziell eine verbesserte Regenerationsfähigkeit des geschädigten Gewebes herbeigeführt werden kann.

Im Myokardinfarkt-Modell führt die Applikation von EPCs und dem Fusionsmolekül GPVI-Fc-CD133 zu einer deutlichen Verringerung der Infarktgröße. Zukünftige Studien müssen allerdings zeigen, ob diese Infarktgrößenreduktion ebenso zu einer verbesserten Funktionalität des Herzmuskelgewebes nach akutem Myokardinfarkt führt.

Somit stellt der Einsatz des Adhäsionsmoleküls GPVI-Fc-CD133 eine neue Strategie in der Stammzelltherapie dar, da durch die Gabe des Fusionsproteins auch eine verbesserte Anreicherung körpereigener zirkulierender Progenitorzellen denkbar ist und daher möglicherweise auf eine Stammzellinjektion verzichtet werden könnte.

6 SUMMARY

The influence of progenitor cells to vascular regeneration in mouse model

Atherosclerosis is one of the most frequently diagnosed vascular diseases in the western civilization. It often results in severe arterial occlusive diseases, such as infarction of the myocardium or stroke.

Atherosclerotic lesions, and therapeutic intervention (e.g. balloon dilatation and stent implantation) induce a vascular injury, which uncovers extracellular matrix. This process plays a key role in the activation of coagulation and thrombus formation. Until the endothelial monolayer has been repaired, the thrombogenic state will remain. For this reason scientists are searching for new ways to expedite the reendothelialisation. The regeneration proceedings lead to a neointima formation, which is mainly caused by proliferation of smooth muscle cells. In many cases the consequence is restenosis of the injured vessel. Therefore, it is often tried to repress this neointima formation by cell therapy.

In this study two different mouse models of vascular injury were used to induce a endothelial damage, afterwards human CD34⁺ progenitor cells were injected. The CD34⁺ cells were either incubated with the adhesion molecule GPVI-Fc-CD133 or its single components which were used as controls. GPVI-Fc-CD133 is a fusion protein. It is designed by the human soluble GPVI-Fc and an antibody against CD133 which is an important surface marker of endothelial progenitor cells. This adhesion molecule leads to an improved homing of stem cells at the endothelial lesion.

The evaluation of the regeneration process of the injured vessel is based on histomorphometric data. Therefore, different time points were considered. Furthermore, a doppler ultrasound was carried out before sacrifice.

A further application of the combined cell therapy could be the myocardium infarction. In this study, first results of the experiments on this mouse model are published.

In the different injury models in mice it could be shown that by combined administration of CD34⁺ progenitor cells and the adhesion molecule GPVI-Fc-CD133 the regeneration of the injured vessel wall can be advanced.

SUMMARY

In the model of infarcted myocardium the application of EPCs within the fusion protein GPVI-Fc-CD133 leads to a clear reduction of the infarct area. Future studies will have to show if this reduction can also lead to improved functionality of the cardiac muscle after an acute myocardium infarction.

The application of the adhesion molecule GPVI-Fc-CD133 could be a new strategy in stem cell therapy. Its administration could possibly increase the number of circulating progenitors and improve their enhancement without heterologous stem cell injection.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. AFILALO J, MAJDAN AA, EISENBERG MJ

Intensive statin therapy in acute coronary syndromes and stable coronary heart disease: a comparative meta-analysis of randomised controlled trials
Heart 2007; 93: 914-921

2. ASSMUS B, HONOLD J, SCHACHINGER V, BRITTEN M, FISCHER-RASOKAT U, LEHMANN R, TEUPE C

Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction
New England Journal of Medicine 2006; 355: 1222-1232

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

Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis
Science 1997; 275: 964-967

4. BARNETT HJ, TAYLOR DW, ELIASZIW M, FOX AJ, FERGUSON GG, HAYNES RB, RANKIN RN, CLAGETT GP, HACHINSKI VC, SACKETT DL, THORPE KE, MELDRUM HE, SPENCEJD

North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis
New England Journal of Medicine 1998; 339: 1415-1425

5. BAYNES JW, THORPE SR

Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm
Diabetes 1999; 48: 1-9

6. BELTRAMI AP, BARLUCCHI L, TORELLA D

Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration
Cell 2003; 114: 763-776

7. BERRY CN, LUNVEN C, LECHAIRE I

Antithrombotic activity of a monoclonal antibody inducing the substrate form of plasminogen activator inhibitor type 1 in rat models of venous and arterial thrombosis
British Journal of Pharmacology 1998; 125: 29-34

8. BILLER J, FEINBERG WM, CASTALDO JE, WHITTEMORE AD, HARBAUGH RE, DEMPSEY RJ, CAPLAN LR, KRESOWIK TF, MATCHAR DB, TOOLE JF, EASTON JD, ADAMS HP, BRASS LM, HOBSON RW, BROTT TG, STERNAU L

Guidelines for carotid endarterectomy: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the stroke Council, American Heart Association
Circulation 1998; 97: 501-509

9. BOBIS S, JAROCHA D, MAIKA M

Mesenchymal stem cells: Characteristics and clinical applications
Folia Histochemia et Cytobiologica 2006; 44: 215-230

10. BÖCKER, DENK, HEITZ

Pathologie,
3. Auflage, S.483-484
Urban& Fischer Verlag München, Jena, 2004

11. BORN GVR, CROSS MJ

The aggregation of blood platelets
Journal of Physiology 1963; 168: 178-195

12. BOTTA R, GAO E, STASSI G, BONCI D, PELOSI E, ZWAS D, PATTI M, COLONNA L, BAIOCCHI M, COPPOLA S, MA X, CONDORELLI G, PESCHLE C

Heart infarct in Nod-Scid mice: Therapeutic vasculogenesis by transplantation of human CD34⁺ cells and low dose CD34⁺KDR⁺ cells
The FASEB Journal 2004; 18: 1392-1394

13. BURKE AP, FARB A, MALCOM GT, LIANG YH, SMIALEK J, VIRMANI R

Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly
New England Journal of Medicine 1997; 336: 1276-1282

14. BÜLTMANN A, HERDEG C, LI Z, MÜNCH G, BAUMGARTNER C, LANGER H, KREMMER E, GEISLER T, MAY A, UNGERER M, GAWAZ M

Local delivery of soluble platelet collagen receptor glycoprotein VI inhibits thrombus formation in vivo
Journal of Thrombosis and Haemostasis 2006; 95: 763-766

15. CAI CL, LIANG X, SHI Y

ISL 1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart
Developmental Cell 2003; 5: 877-889

16. CANNON CP, WEINTRAUB WS, DEMOPOULOS LA

Comparison of early invasive and conservative strategies in patients with unstable coronary syndromes treated with the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor tirofiban
New England Journal of Medicine 2001; 344: 1879-1887

17. CHEN D, WEBER M, SHIELS PG, DONG R, WEBSTER Z, MCVEY JH, KEMBALL-COOK G, TUDDENHAM EGD, LECHLER RI, DORLING A

Postinjury vascular intimal hyperplasia in mice is completely inhibited by CD34+

bone marrow-derived progenitor cells expressing membrane-tethered anticoagulant fusion proteins

Journal of Thrombosis and Haemostasis 2006; 4: 2191-2198

18. CHOBANIAN AV, DZAU VJ

Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease

In Fuster V, Ross R, Topol EJ

Atherosclerosis and coronary artery disease, Vol. 1

Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 237-242

19. CLEMETSON JM, POLGAR J, MAGNENAT E, WELLS TN, CLEMETSON KJ

The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin-superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors

Journal of Biological Chemistry 1999; 274: 29019-29024

20. CLOWES AW, REIDY MA, CLOWES MM

Mechanismen of stenosis after arterial injury.

Laboratory Investigation 1983(a); 49: 208-215

21. CLOWES AW, REIDY MA, CLOWES MM

Kinetics and cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium

Laboratory Investigation 1983(b); 49: 327-333

22. CLOWES AW, CLOWES MM, FINGERLE J, REIDY MA

Kinetics and cellular proliferation after arterial injury. V. Role of acute distension in the induction of smooth muscle proliferation

Laboratory Investigation 1989; 60: 360-364

23. COLLINS R, PETO R, MACMHON S, HEBERT P, FIEBACH NH, EBERLEIN KA, GODWIN J, QIZILBASH N, TAYLOR JO, HENNEKENS CH

Blood pressure stroke, and coronary heart disease. Part 2, short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context.

Lancet 1990; 335: 827-838

24. CORVOL JC, BOUZAMONDO A, SIROL M, HULOT JS, SANCHEZ P, LECHAT P

Differential effects of lipid-lowering therapies on stroke prevention: a metaanalysis of randomized trials

Archives of Internal Medicine 2003; 163: 669-676

25. DAUB K, LANGER H, SEIZER P, STELLOS K, MAY A, GOYAL P, BIGALKE B,

Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells

The FASEB Journal, 2006; 20: 2559-2561

26. DAUB K, LINDEMANN S, LANGER H, SEIZER P, STELLOS K, SIEGEL-AXEL D, GAWAZ M
The evil in atherosclerosis: adherent platelets induce foam cell formation
Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2007; 33: 173-178
27. DAWN B, GUO Y, REZAZADEH A, HUANG Y, STEIN AB, HUNT G, TIWARI S, VARMA J, GU Y, PRABHU SD, KAJSTURA J, ANVERSA P, ILDSTAD ST, BOLLI R
Postinfarct cytokine therapy regenerate cardiac tissue and improves left ventricular function
Circulation Research 2006, 98: 1098-1105
28. DAWN B, STEIN AB, URBANEK K, ROTA M, WHANG B, RASTALDO R, TORELLA D, TANG XL, REZAZADEH A, KAJSTURA J, LERI A, HUNT G, VARMA J, PRABHU SD, ANVERSA P, BOLLI R
Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function
Proceedings of National Academy of the United States of America (PNAS) 2005; 102: 3766-3771
29. DE BOER HC, VERSEYDEN C, ULFMAN LH, ZWANINGA JJ, BOT I, BIESSEN AE, RABELINK TJ,
Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotyp
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2006; 26: 1653-1659
30. DOCHEVA D, POPOV C, MUTSCHLER W
Human mesenchymal stem cells in contact with their environment : surface characteristics and the integrin system
Journal of Cellular and Molecular Medicine 2007; 11: 21-38
31. DOETSCHMAN TC, EISTETTER H, KATZ M
The in vitro development of blastocyte-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium
Journal of Embryology and Experimental Morphology 1985; 87: 27-45
32. DUBOIS C, PANICOT-DUBIOS L, MERRILL-SKOLOFF G, FURIE B, FURIE BC
Glycoprotein VI-dependent and –independent pathways of thrombus formation in vivo
Blood 2006; 107: 3902-3906
33. FOLCIK VA, AAMIR R, CATHCART MK
Cytokine modulation of LDL oxidation by activated human monocytes
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 1997; 17: 1954-1961
34. FUSTER V
Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology
Circulation 1994; 90: 2126-2146

35. GALIS ZS, SUKHOVA GK, LARK MW, LIBBY P
Increased expression of metalloproteinase and matrix degrading activity in vulnerable regions of humane atherosclerotic plaque
Journal of Clinical Investigation 1994; 94: 2493-2503
36. GAUS ALEXANDRA
Dissertation: Der Einfluss des Adhäsionsmoleküls GPVI-aCD133 auf die Adhäsion von endothelialen Progenitorzellen in zwei Verletzungsmodellen der Maus
- Untersuchungen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie-
München, 2008 (Online-Veröffentlichung)
37. GAWAZ M
Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium
Cardiovascular Research 2004; 61: 498-511
38. GAWAZ M, LANGER H, MAY AE
Platelets in inflammation and atherosclerosis
Journal of Clinical Investigation 2005; 115: 3378-3384
39. GAWAZ M, KONRAD I, HAUSER A, SAUER S, LI Z, SCHWAIGER M, SCHÖMIG A, MASSBERG S, HAUBNER R
Non- invasive imaging of glycoprotein VI binding to injured arterial lesions
Journal of Thrombosis and Haemostasis 2005; 93: 910-913
40. GAWAZ
Blood Platelets
Kapitel II, Platelets and Primary Hemostasis
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001; 4-12
41. GAWAZ
Blood Platelets
Kapitel VI, Platelet Membrane Glycoproteins
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001; 30-39
42. GEORGE JN.
Platelets
Lancet. 2000; 355: 1531-1539
43. GIBBINS JM, OKUMA M, FARNDAL R, BARNES M, WATSON SP
Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelet which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc-receptor γ chain
FEBS Letters 1997; 413: 255-259
44. GLAGOV S, WEISENBERG E, ZARINS CK, STANKUNAVICIUS R, KOLETTIS GJ
Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries

New England Journal of Medicine 1987; 316: 1371-1375

45. GOLDSTEIN LB, SAMSA GP, MATCHAR DB, ODDONE EZ

Multicenter review of preoperative risk factors for endarterectomy for asymptomatic carotid artery stenosis

Stroke 1998; 29: 750-753

46. GOTLIEB AI, LANGILLE BL

The role of rheology in atherosclerotic coronary artery disease

In Fuster V, Ross R, Topol EJ

Atherosclerosis and coronary artery disease, Vol. 1

Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 595-606

47. GROSS PL, AIRD WC

The endothelium and thrombosis

Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2000; 26: 463-478

48. GRÖSCHEL K, RIECKER A, SCHULZ JB, ERNEMANN U, KASTRUP A

Systematic review of early recurrent stenosis after carotid angioplasty and stenting

Stroke 2005; 36: 367-373

49. HACKETT D, DAVIS G, CHIERCHIA S

Intermittent coronary occlusion in acute myocardial infarction: value of combined thrombolytic and vasodilator therapy

New England Journal of Medicine 1987; 317: 1055-1059

50. HANSSON GK, LIBBY P

The role of the lymphocyte

In Fuster V, Ross R, Topol EJ

Atherosclerosis and coronary artery disease, Vol. 1

Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 557-568

51. HENKE J, ERHARDT W

Speziesspezifische Anästhesie Nager

In Erhardt W, Henke J, Haberstroh J

Anästhesie & Analgesie beim Klein- und Heimtier

Schattauer Verlag, Stuttgart, 2004: 624-663

52. HERZOG EL, CHAI L, KRAUSE DS

Plasticity of marrow-derived stem cells

Blood 2003; 102: 3483-93

53. HILL JM, ZALOS G, HLCOX JP, SCHENKE WH, WACLAWIW MA, QUYYUMI AA, FINKEL T

Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk

New England Journal of Medicine 2003; 348: 593-600

54. HRISTOV M, WEBER C

Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology and possible clinical relevance
Journal Cellular Molecular Medicine 2004; 8: 498-508

55. HRISTOV M, ERL W, WEBER C

Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation and homing
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2003; 23: 1185-1189

56. JANOWSKA-WIECZOREK A, MAJKA M, KIJOWSKI J ET AL

Platelet-derived microparticles bind to haematopoietic stem/ progenitor cells and enhance their engraftment
Blood 2001; 98: 3143-1349

57. JESKE WP, IQBAL O, FAREED J

A survey of animal models to develop novel antithrombotic agents
In A.A. Sasahara and J. Loscalzo: New therapeutics agents in Thrombosis and Thrombolysis
Marcel Dekker, New York 2003; 9-32

58. JUNG G, HONSIK CJ, REISFELD RA, MÜLLER-EBERHARD HJ

Activation of human peripheral blood mononuclear cells by anti-T3: killing of tumor target cells coated with anti-target-anti-T3 conjugates.
Proceedings of National Academy of the United States of America (PNAS) 1986; 83: 4479-4483.

59. KEHAT I, KENYAGIN-KARSENTI D, SNIR M

Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes
Journal of Clinical Investigation 2001; 108: 407-414

60. LAFLAMME MA, MURRY CE

Regenerating the heart
Nature Biotechnology 2005; 23: 845-856

61. LANGER H, MAY A, DAUB K, HEINZMANN U, LANG P, SCHUMM M, VESTWEBER D, MASSBERG S, SCHÖNBERGER T, PFISTERER I, HATZOPOULOS A, GAWAZ M

Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro
Circulation Research 2006; 98: e2-e10

62. LANGER H, MAY A, VESTWEBER D, DE BOER HC, HATZOPOULOS A, GAWAZ M

Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells

Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2007; 33: 136-143

63. LANGER H, SCHÖNBERGER T, BIGALKE B, GAWAZ M
Where ist he Trace? Molecular imaging of vulnerable atherosclerotic plaques
Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2007; 33: 151-155

64. LANGER H, HAUBNER R, PICHLER B, GAWAZ M
Radionuclide imaging: a molecular key to the atherosclerotic plaque
Journal of American College of Cardiology 2008; 52 (1): 1-12

65. LEV EI, KLEIMAN NS, BIRNBAUM Y ET AL
Circulating endothelial progenitor cells and coronary collaterals in patients with non-ST
segment elevation myocardial infarction
Journal of Vascular Research 2005; 42: 408-414

66. LEV EI, ESTROV Z, ABOULFATOVA K
Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to
subendothelial matrix
Thrombosis and Haemostasis 2006, 96: 498-504

67. LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A
Inflammation and Atherosclerosis
Circulation 2002; 105: 1135-1143

68. LINDNER V, FINGERLE J, REIDY MA
Mouse model of arterial injury
Circulation Research 1993; 73: 792-796

69. LUSIS AJ
Atherosclerosis
Nature 2000; 407: 233-241

70. MA J, GE J, ZHANG S
Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of
intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial
infarction
Basic Research in Cardiology 2005; 100: 217-223

71. MAKINI S, FUKUDA K, MIYOSHI S
Cardiomyocytes can be generated from bone marrow stromal cells in vitro
Journal of Clinical Investigation 1999; 103: 697-705

72. MARKUS HS, DROSTE DW, KAPS M, LARRUE V, LEES KR, SIEBLER M,
RINGELSTEIN EB

LITERATURVERZEICHNIS

Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin in symptomatic carotid stenosis evaluated using doppler embolic signal detection: the clopidogrel and aspirin for reduction of emboli in symptomatic carotid stenosis (CARESS) trial
Circulation 2005; 111: 2233-2240

73. MARTIN CM, MEESON AP, ROBERTSON SM

Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart
Developmental Biology 2004; 265: 262-275

74. MASSBERG S, KONRAD I, SCHÜRZINGER K, LORENZ M, SCHNEIDER S, ZOHLNHOEFER D, HOPPE K, SCHIEMANN M, KENNERKNECHT E, SAUER S, SCHULZ C, KERSTAN R, RUDELIUS M, SEIDL S, SORGE F, LANGER H, PELUSO M, GOYAL P, VESTWEBER D, EMAMBOKUS NR, BUSCH DH, FRAMPTON J, GAWAZ M

Platelets secrete stromal cell-derived factor 1 alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo
Journal of Experimental medicine 2006; 203: 1221-1233

75. MASSBERG S, BRAD K, GRUNER S, PAGE S, MÜLLER E, MÜLLER I, BERGMEIER W

A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation
Journal of Experimental Medicine 2002; 196: 887-896

76. MASSBERG S, GAWAZ M, GRÜNER S, SCHULTE V, KONRAD I, ZOHLNHÖFER D, HEINZMANN U, NIESWANDT B

A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo
Journal of Experimental Medicine 2003; 197: 41-49

77. MASSBERG S, KONRAD I, BÜLTMANN A, SCHULZ C, MÜNCH G, PELUSO M, LORENZ M, SCHNEIDER S, BESTA F, MÜLLER I, HU B, LANGER H, KREMMER E, RUDELIUS M, HEINZMANN U, UNGERER M, GAWAZ M

Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall
The FASEB Journal 2003; 18: 397-399

78. MATHIAS K, MITTERMAYER CH, ENSINGER H

Perkutane Katheterdilatation von Karotisstenosen
ROFO 1980; 3: 47-50

79. MATTER CM, CHADJICHRISTOS CE, MEIER P, VON LUKOWICZ T, LOHMANN C, SCHULER PK, ZHANG D, ODERMATT B, HOFMANN E, BRUNNER T, KWAK BR, LÜSCHER TF

Role of endogenous Fas Ligand in balloon-induced apoptosis, inflammation and neointimal formation

Circulation 2006; 113: 1879-1887

80. MC DEVITT TC, LAFLAMME MA, MURRY CE

Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3- Kinase /Akt signalling pathway

Journal of Molecular and Cellular Cardiology 2005; 39: 865-873

81. MENDEZ-FERRER S, ELLISON GM, TORELLA D

Resident progenitors and bone marrow stem cells in myocardial renewal and repair

Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine 2006; 3 suppl 1: 83-89

82. MOROI M, JUNG SM, OKUMA M, SHIUMYOZU K

A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion

Journal of Clinical Investigation, 1989; 84: 1440-1445

83. MURRY C, REINECKE H, PABON L

Regeneration Gaps. Observations on stem cells and cardiac repair

Journal of American College of Cardiology 2006; 47: 1777-1785

84. NAPOLI C, D`ARMIENTO FP, MANCINI FP, POSTIGLIONE A, WITZTUM JL, PALUMBO G, PALINSKI W

Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia; intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions

Journal of Clinical Investigation 1997; 100: 2680-2690

85. NAVAB M, BERLINER JA, WATSON AD

The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak: a review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture

Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 1996; 16: 831-842

86. NIESWANDT B, SCHULTE V, BERGMEIER W, MOKHTARI-NEJAD R,

RACKEBRANDT K, CAZENAVE JP, OHLMANN P, GACHET C, ZIRNGIBL H

Longterm antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein VI in mice

Journal of Experimental Medicine 2001; 193: 459-469

87. NIESWANDT B, BRAKEBUSCH C, BERGMEIER W, SCHULTE V, BOUVARD D, MOKHTAR-NEJD R, LINDHOUT T, HEEMSKERK JWM, ZIRNGIBL H, FÄSSLER R

Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen

The EMBO Journal 2001; 20 : 2120-2130

88. NIESWANDT B, BERGMEIER W, SCHULTE V, RACKEBRANDT K, GESSNER JE, ZIRNGIBL H

Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcR γ chain

Journal of Biological Chemistry 2000; 275: 23998-24002

89. NOBUYOSHI M, KIMURA T, OHISHI H, HORIUCHI H, NOSAKA H, HMASAKI N, YOKOI H, KIM K

Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 patients

Journal of American College of Cardiology 1991; 17: 433-439

90. NONNE C, LENAIN N, HECHLER B

Importance of platelet phospholipase C γ 2 signaling in arterial thrombosis as a function of lesion severity

Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2005; 25: 1293-1298

91. NYGREN JM, JOVINGE S, BREITBACH M

Bone marrow-derived hematopoietic cells regenerate cardiomyocytes at low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation

Nature Medicine 2004; 10: 494-501

92. OH H, BRADFUTE SB, GALLARDO TD

Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction

Proceedings of National Academy of the United States of America (PNAS) 2003; 100: 12313-12318

93. OHASHI R, MU H, YAO Q, CHEN C

Cellular and molecular mechanism of atherosclerosis with mouse models

Trends of Cardiovascular Medicine 2004; 14: 187-190

94. ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LIMANA F, JAKONIUK I, QUAINI F, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LER A, ANVERSA P

Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival

Proceedings of National Academy of the United States of America (PNAS) 2001; 98: 10344-10349

95. ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S

Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium

Nature 2001; 410: 701-705

96. OTT I, MICHAELI C, SCHUERMAN M, STEPPICH B, SEITZ I, DEWERCHIN M, ZOLNHOFER D, WESSELY R, RUDELIUS M, SCHÖMIG A, CARMELIET P

Vascular Remodeling in mice lacking the cytoplasmatic domain of tissue factor

Circulation Research 2005; 97: 293-298

97. PAGANI FD, DERSIMONIAN H, ZAWADZKA A
Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans.
Histological analysis of cell survival and differentiation
Journal of American College of Cardiology 2003; 41: 879-888
98. PSCHYREMBEL
Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage
Walter de Gruyter-Verlag, Berlin, New York, 1998
99. RAFII S, LYDEN D
Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and
regeneration
Nature Medicine 2003; 9: 702-712
100. REHMAN J, LI J, ORSCHELL CM, MARCH KL
Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/ macrophages and
secrete angiogenic growth factors
Circulation 2003; 107: 1164-1169
101. REIDY MA, CLOWES AW, SCHWARTZ SM
Endothelial regeneration: inhibition of endothelial regrowth in arteries of rat and rabbit
Laboratory Investigation 1983; 49: 569-575
102. RIBATTI D, VACCA A, NICO B, RIA R, DAMMACCO F
Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signalling pathways
Current Molecular Medicine 2002; 2: 537-543
103. RIEDE, WERNER, SCHÄFER
Allgemeine & Spezielle Pathologie
5.Auflage, S.332-335
Thieme Verlag, 2004
104. ROSENDORFF C, BLACK HR, CANNON C
Treatment of hypertension in the prevention and management of ischemic heart disease
Circulation 2007; 115: 2761-2788
105. ROSS R
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's
Nature 1993; 362: 801-809
106. ROSS R
Atherosclerosis: a defense mechanism gone away
American Journal of Pathology 1993; 143: 987-1002
107. ROSS R

Atherosclerosis- an inflammatory disease

New England Journal of Medicine 1999; 340: 115-126

108. ROTA M, PADIN-IRUEGAS ME, MISAO Y, DE ANGELIS A, MAESTRONI S, FERREIRA-MARTINS J, FIUMANA E, RASTALDO R, ARCARESE ML, MITCHELL TS, BONI A, BOLLI R, URBANEK K, HOSODA T, ANVERSA P, LERI A, KAJSTURA J

Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function

Circulation Research 2008; 103: 107-116

109. ROUX S, CARTEAUX P, HESS P

Experimental carotid thrombosis in the Guinea Pig

Thrombosis and Haemostasis 1994; 71: 252-256

110. RUGGERI ZM

Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions

Journal of Thrombosis and Haemostasis 2003; 1: 1335-1342

111. RUGGERI ZM

Platelets in atherothrombosis

Nature Medicine 2002; 8: 1227-1234

112. SAHARA M, SATA M, MATSUZAKI Y, TANAKA K, MORITA T, HIRATA Y, OKANO H, NAGAI R

Comparison of various bone marrow fractions in the ability to participate in vascular remodelling after mechanical injury

Stem Cells 2005; 23: 874-878

113. SATA M, SAIURA A, KUNISATO A, TOJO A, OKADA S, TOKUHISA T, HIRAI H, MAKUUCHI M, HIRATA Y, NAGAI R

Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis

Nature Medicine 2002; 8: 403-409

114. SATA M, MAEJIMA Y, ADACHI F, FUKINO K, SAIURA A, SUGIURA S, AOYAGI T, IMAI Y, KURHARA H, KIMURA K, OMATA, NAGAI R

A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia

Journal of Molecular Cardiology 2000; 32: 2097-2104

115. SCHÄCHINGER V, ERBS S, ELSASSER A, HABERBOSCH W, HAMBRECHT R, HOLSCHERMANN H, YU J

Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone- marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1 year results of the REPAIR-AMI trial

European Heart Journal 2006; 27: 2775-2783

116. SCHMIDT, LANG, THEWS

Physiologie des Menschen, 29. Auflage

Teil VI Herz und Kreislauf, Kapitel 28 Kreislauf, Abschnitt 28.8 Endothel: zentraler Modulator vaskulärer Funktionen, Absatz 28.7 Atherosklerose; S.639-640

Springer-Verlag, Heidelberg, 2005

117. SCHULZ C, PENZ S, HOFFMANN C, LANGER H, GILLITZER A, SCHNEIDER S, BRANDLE R, SEIDL S, MASSBERG S, PICHLER B, KREMMER E, STELLOS K, SCHÖNBERGER T, SIESS W, GAWAZ M

Platelet GPVI binds to collagenous structures in the core region of human atheromatous plaque and is critical for atheroprogession in vivo

Basic Research in Cardiology 2008; 103: 356-367

118. SCHWARZT RS

Neointima and arterial injury: dogs, rats, pigs, and more

Laboratory Investigation 1994; 71: 789-791

119. SCHWARZT RS

Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodeling

American Journal of Cardiology 1998; 81: 14E-17E

120. SCHWARTZ RS, TOPOL EJ, SERRUYS PW, SANGIORGI G, HOLMES DR

Artery size, neointima, and remodeling. Time for some standards

Journal of American College of Cardiology 1998; 32: 2087-2094

121. SHAKE JG, GRUBER PJ, BAUMGARTNER WA

Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects

Annual of Thoracal Surgery 2002; 73: 1919-1925

122. SHAO H, TAN Y, ETON D, YANG Z, UBERTI MG, LI S, SCHULIK A, YU H

Statin and stromal cell-derived factor additively promote angiogenesis by enhancement or progenitor cells incorporation into new vessels

Stem Cells 2008; 26: 1376-1384

123. SHINTANI S, MUROHARA T, IKEDA H, UENO T, HONMA T, KATOH A, SASAKI K, SHIMADA T, OIKE Y, IMAIZUMI T

Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction

Circulation 2001; 103: 2776-2779

124. SOLTER D

From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research

Nature Reviews Genetics 2006; 7: 319-327

125. SPRINGER TA, CYBULSKY MI

Traffic signals on endothelium for leukocytes in health, inflammation, and atherosclerosis
In Fuster V, Ross R, Topol EJ
Atherosclerosis and coronary artery disease, Vol. 1
Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 511-538

126. STARY HC

The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries
In Fuster V, Ross R, Topol EJ
Atherosclerosis and coronary artery disease, Vol. 1
Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 463-74

127. STARY HC, CHANDLER AB, GLAGOV S, GUYTON JR, INSULL W JR, ROSENFELD ME, SHAFFER SA, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD, WISSLER RW

A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Ass.
Circulation 1994; 89: 2462-2478

128. SUGIYAMA T, OKUMA M, USHIKUBI F, SENSAKI S, KANAJ K, UCHINO H

A novel platelet aggregation factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and in autoimmune thrombocytopenia
Blood 1987; 69: 1712-1720

129. TAKAMIYA M, OKIGAKI M, JIN D, TAKAI S, NOZAWA Y, ADACHI Y, URAO N, TATEISHI K, NOMURA T, ZEN K, ASHIHARA E, MIYAZAKI M, TARSUMI T, TAKAHASHI T, MATSUBARA, HIROAKI

Granulocyte Colony-stimulating Factor-mobilized circulating c-kit+/Flk-1+ progenitor cells regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2006; 26: 751-757

130. TANAKA K, SATA M, HIRATA Y, NAGAI R

Diverse Contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries
Circulation Research 2003; 93: 783-790

131. TANAKA T, SATO R, KURIMOTO T

Z-335, a new thromboxane A₂ receptor antagonist, prevents arterial thrombosis induced by ferric chloride in rats
European Journal of Pharmacology 2000; 401: 413-418

132. THOMSON JA, ELDOR-ITSKOVITZ J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts
Science 1998; 287: 1145-1147

133. VARGA-SZABO D, PLEINES I, NIESWANDT B
Cell adhesion Mechanisms in Platelets
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2008; 28: 403-412
134. VERBEUREN
Experimental Models of thrombosis and atherosclerosis
Therapy 2006; 61: 379-387
135. VERBEUREN TJ, JORDAENS FH, ZONNEKEYN LL
Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit: Endothelium-dependent and endothelium-independent contractions and relaxations in isolated arteries of control and hypercholesterolemic rabbits
Circulation Research 1986; 58: 552-564
136. WAKITANI S, TAKAOKA K, HATTORI T
Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint
Rheumatology 2003; 42: 162-165
137. WARE JA, HEISTAD DD
Platelet-endothelium interactions
New England Journal of Medicine 1993; 328: 628-635
138. WATSON SP, GIBBINS J
Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of ITAM
Immunology Today 1998; 19:260-264
139. WELSCH
SOBOTTA Lehrbuch Histologie, 2. Auflage (2006)
Urban & Fischer Verlag München, Jena
140. WERNER N, PRILLER J, LAUFS U, ENDRES M, BOHM M, DIRNAGL U, NICKENING G
Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointima formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2002; 22: 1567-1572
141. WERNER N, JUNK S, LAUFS U, LINK A, WALENTA K, BÖHM M, NICKENING G
Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury
Circulation Research 2003; 93: e17-e24
142. WERNER N, KOSIOL S, SCHIEGL T, AHLERS P, WALENTA K, LINK A, BOHM M
Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes

New England Journal of Medicine 2005; 353: 999-1007

143. WOLF PA, D'AGOSTINO RB, KANNEL WB, BONITA R, BELANGER AJ
Cigarette smoking as a risk factor for stroke
Journal of the American Medical Association (JAMA) 1988; 259: 1025-1029

144. XU Q
The impact of progenitor cells in atherosclerosis
Nature Clinical Practise Cardiovascular Medicine 2006; 3: 94-101

145. YANG F, LIU YH, YANG XP, XU J KAPKE A, CARRETERO OA
Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice
Experimental Physiology 2002; 87.5: 547-555

146. YEH ETH, ZHANG S, WU HD, KÖRBLING M, WILLERSON JT, ESTROV Z
Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺- enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells and smooth muscle cells in vivo
Circulation 2003; 108: 2070-2073

147. YIN AH, MIRAGLIA S, ZANJANI ED, ALMEIDA-PORADA G, OGAWA M, LEARY AG, OLWEUS J, KEARNEY J, BUCK DW
AC 133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells
Blood 1997; 90: 5002-5012

148. YIN T, LI L
The stem cell niches in bone
Journal of Clinical Investigation 2006; 116: 1195-1201

149. YUDKIN JS STEHOUWER CD, EMEIS JJ
C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue
Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 1999; 19: 972-978

150. ZERNECKE A, SCHOBER A, BOT I, HUNDELSHAUSEN P; LIEHN EA, MÖPPS B, MERICKSKAY M, GIERSCHIK P, BIESSEN EA, WEBER C
SDF1 α /CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells
Circulation Research 2005; 96: 784-791

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Übersicht des Versuchsablaufs	37
----------------	-------------------------------	----

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Darstellung der verschiedenen Endothelveränderungen bei der Atheroskleroseentwicklung	S. 13
Abb. 2:	ruhende (links) und aktivierte (rechts) Thrombozyten	S. 17
Abb. 3:	Interaktionen von Thrombozyten bei der Atheroskleroseentwicklung	S. 20
Abb. 4:	Interaktionen des löslichen GPVI-Fc mit der subendothelialen Matrix	S. 26
Abb. 5:	Mobilisation und Differenzierung von Stammzellen aus dem Knochenmark	S. 30
Abb. 6:	Bispezifisches Adhäsionsmolekül GPVI-Fc-aCD133	S. 34
Abb. 7:	Ligatur der linken A. carotis	S. 39
Abb. 8:	Drahtdenudation der linken A. carotis	S. 40
Abb. 9:	Vorgelagertes Herz mit Ligatur der LAD	S. 42
Abb. 10:	Doppler-Sonographie der linker linken A. carotis	S. 45
Abb. 11:	Schematische Darstellung der histomorphologischen Gefäßdaten	S. 49
Abb. 12:	Schematische Darstellung der morphologischen Daten der einzelnen Herzscheiben	S. 50
Abb. 13:	Histologische Schnitte der NOD/Scid 4 bzw. der NOD/Scid 9 nach Ligatur der linken A. carotis. Es sind jeweils die EvG- und die HE-Färbung dargestellt	S. 52

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 14:** Widerstandsindex RI in der Verum- und der Kontrollgruppe, jeweils gemessen an linker und rechter A. carotis S. 53
- Abb. 15:** Histologische Schnitte der linken A. carotis bei NOD/Scid 15 bzw. NOD/Scid 20 nach Drahtdenudation. Die Schnitte sind jeweils EvG und HE gefärbt. S. 54
- Abb. 16:** Vergleich der Flächenmaße der Media und der Neointima bei Verum- und Kontrollgruppe S. 55
- Abb. 17:** Darstellung des Stenosegrades in der linken A. carotis bei Verum- und Kontrollgruppe S. 56
- Abb. 18:** Widerstandsindex RI in der Verumgruppe und der Kontrollgruppe, jeweils gemessen an linker und rechter A. carotis S. 57
- Abb. 19:** Histologische Schnitte der linken A. carotis bei NOD/Scid 36 bzw. NOD/Scid 3 nach Drahtdenudation. Es sind jeweils die EvG- und die HE- Färbung aufgeführt S. 58
- Abb. 20:** Vergleich der Flächenmaße der Media und der Neointima bei Verum- und Kontrollgruppe S. 59
- Abb. 21:** Darstellung des Stenosegrades in der linken a. carotis bei Verum- und Kontrollgruppe S. 60
- Abb. 22:** Widerstandsindex RI in Verum- und Kontrollgruppe, jeweils gemessen an linker und rechter A. carotis S. 61
- Abb. 23:** Histologische Darstellung der linken A. carotis bei NOD/Scid 11 bzw. NOD/Scid 14 nach Drahtdenudation. Es sind jeweils die EvG- und die HE- Färbung dargestellt S. 62
- Abb. 24:** Vergleich der Flächenmaße der Media und der Neointima bei

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Verum- und Kontrollgruppe	S. 63
Abb. 25:	Darstellung des Stenosegrades in der linken A. carotis bei Verum- und Kontrollgruppe	S. 64
Abb. 26:	Vergleich der Infarktgröße in Relation zur Fläche des linken Ventrikels bei den 3 Versuchsgruppen	S. 65

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A:	Arteria
ACS:	akutes Koronarsyndrom
AMI:	akuter Myokardinfarkt
ADP:	Adenosin-Diphosphat
ATP:	Adenosin-Triphosphat
bzw.:	beziehungsweise
CD:	Cluster of Differentiation
CRP:	c-reaktives Protein
ECM:	extrazelluläre Matrix
EGF:	epidermal Growth-factor
EPC:	Endotheliale Progenitorzellen
EvG:	Elastica-van-Gieson
ext.:	externa
FcR:	Fc-Region
g:	Zentrifugalbeschleunigung
G-CSF:	Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor
GP:	Glykoprotein
HDL:	High Density Lipoprotein
HE:	Hematoxylin-Eosin
HSC:	Hämatopoetische Stammzellen
ICAM:	Intercellular Adhesion Molecule
int.:	interna
kDA:	Kilodalton
kg:	Kilogramm
LDL:	Low Density Lipoprotein
mAB:	monoklonaler Antikörper
MCP:	Monocyte Chemoattractant Protein
mg:	Milligramm
MHz:	Megahertz
Min.:	Minute
mind.:	mindestens

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ml:	Milliliter
MMP:	Matrix-Metalloprotease
NO:	Stickoxid
oxLDL:	oxidiertes Low Density Lipoprotein
PECAM:	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
SDF:	Stromal-derived Factor
TF:	Tissue Factor
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL:	Very Low Density Lipoprotein
vgl.:	vergleiche
vWF:	van Willebrandt-Faktor
z.B.:	zum Beispiel
z.T.:	zum Teil
µm:	Mikrometer

ANHANG

11 ANHANG

11.1 Ultraschalldaten nach Denudation der linken A. carotis

11.1.1 Ultraschalldaten der Tiere mit Untersuchung und Tötung 2 Wochen post operationem

Maus ID	Injektion	V sys	V dys	RI	re Carotis RI	SEM	Li Carotis RI	SEM
2 re	GPVI-Fc-CD133	24,1	3,8	0,84	0,85	0,0191		
	GPVI-Fc-CD133	22,6	2,4	0,89				
	GPVI-Fc-CD133	22,6	3,8	0,83				
14 re	GPVI-Fc-CD133	33,8	5,6	0,83	0,73	0,1097	1	0
	GPVI-Fc-CD133	37,9	5,6	0,85				
	GPVI-Fc-CD133	13,8	6,7	0,51				
14 li	GPVI-Fc-CD133	62,5	0	1				
	GPVI-Fc-CD133	11,3	0	1				
	GPVI-Fc-CD133	39,9	0	1				
16 re	GPVI-Fc-CD133	22,5	0	1	0,88	0,0685	0,83	0,0231
	GPVI-Fc-CD133	21,5	5,1	0,76				
	GPVI-Fc-CD133	27,6	3,1	0,89				
16 li	GPVI-Fc-CD133	26,6	4,1	0,85				
	GPVI-Fc-CD133	24,1	5,1	0,79				
	GPVI-Fc-CD133	37,9	5,1	0,87				
20 re	GPVI-Fc-CD133	35,3	5,1	0,86	0,91	0,0475	1,8	0,0073
	GPVI-Fc-CD133	33,8	0	1				
	GPVI-Fc-CD133	39,9	5,6	0,86				
20 li	GPVI-Fc-CD133	-10,8	8,7	1,81				
	GPVI-Fc-CD133	9,2	-7,2	1,78				
	GPVI-Fc-CD133	10,2	-8,2	1,80				
24 re	GPVI-Fc-CD133	46,1	0	1	1	0	0,86	0,0197
	GPVI-Fc-CD133	41	0	1				
	GPVI-Fc-CD133	43,5	0	1				
24 li	GPVI-Fc-CD133	39,9	5,1	0,87				
	GPVI-Fc-CD133	45	5,1	0,89				
	GPVI-Fc-CD133	23	4,1	0,82				
					MW=0,874		MW=1,123	
					SEM=0,043		SEM=0,228	
1 re	GPVI+ aCD133	18,3	3,4	0,81	0,84	0,91	0,91	0,0041
	GPVI+ aCD133	16,8	1,9	0,89				
	GPVI+ aCD133	18,3	2,9	0,84				
1 li	GPVI+ aCD133	38,5	3,4	0,91				
	GPVI+ aCD133	37,5	3,4	0,91				
	GPVI+ aCD133	37,5	2,9	0,92				
12 re	GPVI+ aCD133	50,2	5,1	0,90	0,88	0,0100	0,79	0,0193
	GPVI+ aCD133	49,7	6,7	0,87				
	GPVI+ aCD133	46,6	5,1	0,90				
12 li	GPVI+ aCD133	26,6	6,7	0,75				
	GPVI+ aCD133	34,8	6,7	0,81				
	GPVI+ aCD133	26,1	5,1	0,80				
15 re	GPVI+ aCD133	38,9	0	1	0,96	0,0415	1,75	0,1957

ANHANG

	GPVI+ aCD133	45	5,6	0,88				
	GPVI+ aCD133	48,6	0	1				
15 li	GPVI+ aCD133	15,4	-14,3	1,93				
	GPVI+ aCD133	20	-7,2	1,36				
	GPVI+ aCD133	13,8	-13,3	1,96				
17 re	GPVI+ aCD133	41,5	0	1	1	0	1,69	0,1280
	GPVI+ aCD133	38,9	0	1				
	GPVI+ aCD133	35,3	0	1				
17 li	GPVI+ aCD133	11,3	-9,7	1,86				
	GPVI+ aCD133	9,2	-7,2	1,78				
	GPVI+ aCD133	13,8	-6,1	1,44				
					MW=0,921		MW=1,285	
					SEM=0,036		SEM=0,254	

11.1.2 Ultraschalldaten der Tiere mit Untersuchung und Tötung 5 Wochen post operationem

Maus ID	Injektion	V sys	V dys	RI	re Carotis RI	SEM	li Carotis RI	SEM
7 re	GPVI-Fc-CD133	23	0	1	0,93	0,07	1	0
	GPVI-Fc-CD133	26,6	5,6	0,79				
	GPVI-Fc-CD133	21,5	0	1				
7 li	GPVI-Fc-CD133	34,8	0	1				
	GPVI-Fc-CD133	32,3	0	1				
	GPVI-Fc-CD133	34,8	0	1				
9 re	GPVI-Fc-CD133	29,2	4,1	0,86	0,85	0,03	0,84	0,27
	GPVI-Fc-CD133	26,1	3,1	0,88				
	GPVI-Fc-CD133	23	4,1	0,82				
9 li	GPVI-Fc-CD133	29,2	3,1	0,89				
	GPVI-Fc-CD133	28,7	5,1	0,82				
	GPVI-Fc-CD133	39,9	7,7	0,81				
10 re	GPVI-Fc-CD133	18,9	0	1	1	0	0,95	0,055
	GPVI-Fc-CD133	29,8	0	1				
	GPVI-Fc-CD133	25	0	1				
10 li	GPVI-Fc-CD133	32,8	0	1				
	GPVI-Fc-CD133	23	0	1				
	GPVI-Fc-CD133	28,7	4,7	0,84				
					MW=0,928		MW=0,929	
					SEM=0,042		SEM=0,047	
8 re	GPVI+ aCD133	83,9	0	1	0,96	0,36	0,92	0,041
	GPVI+ aCD133	43,3	0	1				
	GPVI+ aCD133	50,1	5,4	0,89				
8 li	GPVI+ aCD133	41,3	0	1				
	GPVI+ aCD133	39,9	4,1	0,90				
	GPVI+ aCD133	39,9	5,4	0,86				
13 re	GPVI+ aCD133	31,8	0	1	1	0	1	0
	GPVI+ aCD133	38,6	0	1				
	GPVI+ aCD133	31,8	0	1				
13 li	GPVI+ aCD133	37,9	0	1				

ANHANG

	GPVI+ aCD133	35,2	0	1				
	GPVI+ aCD133	39,9	0	1				
36 re	GPVI+ aCD133	24,9	4,9	0,80	0,82	0,0126	0,94	0,0073
	GPVI+ aCD133	24,4	4,4	0,82				
	GPVI+ aCD133	25,4	3,9	0,85				
36 li	GPVI+ aCD133	57,6	2,9	0,95				
	GPVI+ aCD133	53,7	2,9	0,95				
	GPVI+ aCD133	45,9	3,4	0,93				
					MW=0,929		MW=0,954	
					SEM=0,054		SEM=0,024	

11.1.3 Ultraschalldaten der Tiere mit Untersuchung und Tötung 3 Wochen post operationem

Maus ID	Injektion	V sys	V dys	RI	re Carotis RI	SEM	li Carotis RI	SEM
1 re	GPVI-Fc-CD133			0,9	0,85	0,0206	0,89	0,063
	GPVI-Fc-CD133			0,86				
	GPVI-Fc-CD133			0,81				
	GPVI-Fc-CD133			0,82				
1 li	GPVI-Fc-CD133			0,89				
	GPVI-Fc-CD133			0,88				
	GPVI-Fc-CD133			0,89				
	GPVI-Fc-CD133			0,9				
2 re	GPVI-Fc-CD133			0,8	0,81	0,0065	0,90	0,0041
	GPVI-Fc-CD133			0,82				
	GPVI-Fc-CD133			0,81				
	GPVI-Fc-CD133			0,79				
2 li	GPVI-Fc-CD133			0,9				
	GPVI-Fc-CD133			0,89				
	GPVI-Fc-CD133			0,91				
	GPVI-Fc-CD133			0,9				
13 re	GPVI-Fc-CD133			0,75	0,82	0,0248	0,81	0,0065
	GPVI-Fc-CD133			0,82				
	GPVI-Fc-CD133			0,86				
	GPVI-Fc-CD133			0,85				
13 li	GPVI-Fc-CD133			0,81				
	GPVI-Fc-CD133			0,8				
	GPVI-Fc-CD133			0,82				
	GPVI-Fc-CD133			0,83				
14 re	GPVI-Fc-CD133			0,74	0,77	0,0147	0,92	0,0082
	GPVI-Fc-CD133			0,8				
	GPVI-Fc-CD133			0,79				
	GPVI-Fc-CD133			0,75				
14 li	GPVI-Fc-CD133			0,94				
	GPVI-Fc-CD133			0,9				
	GPVI-Fc-CD133			0,92				

ANHANG

	GPVI-Fc-CD133			0,92				
8 re	GPVI-Fc-CD133	32,8	3,6	0,89	0,86	0,0108	0,93	0,0085
	GPVI-Fc-CD133	29,7	4,6	0,84				
	GPVI-Fc-CD133	30,7	4,6	0,85				
	GPVI-Fc-CD133	44,5	6,1	0,86				
8 li	GPVI-Fc-CD133	48,1	2,6	0,95				
	GPVI-Fc-CD133	44,0	2,6	0,94				
	GPVI-Fc-CD133	51,7	3,6	0,93				
	GPVI-Fc-CD133	47,6	4,1	0,91				
17 re	GPVI-Fc-CD133	29,8	6,3	0,79	0,83	0,0165	0,87	0,0168
	GPVI-Fc-CD133	38,0	4,8	0,87				
	GPVI-Fc-CD133	33,2	5,3	0,84				
	GPVI-Fc-CD133	20,2	3,4	0,83				
17 li	GPVI-Fc-CD133	26,5	2,4	0,91				
	GPVI-Fc-CD133	23,6	2,9	0,88				
	GPVI-Fc-CD133	20,2	3,4	0,83				
	GPVI-Fc-CD133	27,9	3,8	0,86				
9 re	GPVI-Fc-CD133	28,2	3,6	0,87	0,88	0,0091	0,93	0,0041
	GPVI-Fc-CD133	28,7	3,1	0,89				
	GPVI-Fc-CD133	36,3	5,1	0,86				
	GPVI-Fc-CD133	29,7	3,1	0,9				
9 li	GPVI-Fc-CD133	46,1	3,1	0,93				
	GPVI-Fc-CD133	46,1	3,1	0,93				
	GPVI-Fc-CD133	47,6	3,1	0,94				
	GPVI-Fc-CD133	49,1	4,1	0,92				
					MW=0,831		MW=0,893	
					SEM=0,014		SEM=0,016	
3 re	GPVI+ aCD133	41,9	5,8	0,86	0,86	0,0041	0,91	0,0132
	GPVI+ aCD133	39	5,8	0,85				
	GPVI+ aCD133	39,4	5,3	0,87				
	GPVI+ aCD133	41,9	5,8	0,86				
3 li	GPVI+ aCD133	49,1	5,8	0,88				
	GPVI+ aCD133	53,4	4,8	0,91				
	GPVI+ aCD133	58,2	3,4	0,94				
	GPVI+ aCD133	54,4	5,8	0,89				
4 re	GPVI+ aCD133	39,4	5,3	0,87	0,87	0,0082	0,91	0,0041
	GPVI+ aCD133	35,1	5,3	0,85				
	GPVI+ aCD133	34,2	3,8	0,89				
	GPVI+ aCD133	37	4,8	0,87				
4 li	GPVI+ aCD133	41,4	3,8	0,91				
	GPVI+ aCD133	42,8	4,3	0,9				
	GPVI+ aCD133	43,3	3,4	0,92				
	GPVI+ aCD133	25,5	2,4	0,91				
11 li	GPVI+ aCD133	32,8	3,1	0,91			0,92	0,0225
	GPVI+ aCD133	44	2	1				
	GPVI+ aCD133	41,5	4,1	0,9				
	GPVI+ aCD133	41	3,1	0,93				
12 re	GPVI+ aCD133	22,5	3,1	0,86	0,84	0,0119	0,92	0,0041
	GPVI+ aCD133	22,5	4,1	0,82				
	GPVI+ aCD133	26,6	3,6	0,87				
	GPVI+ aCD133	24,1	4,1	0,83				
12 li	GPVI+ aCD133	33,8	2,6	0,92				
	GPVI+ aCD133	31,2	2,6	0,92				

ANHANG

	GPVI+ aCD133	33,8	3,1	0,91				
	GPVI+ aCD133	43,5	3,1	0,93				
5 re	GPVI+ aCD133	31,7	6,1	0,81	0,78	0,0255	0,90	0,0619
	GPVI+ aCD133	16,9	3,6	0,79				
	GPVI+ aCD133	22	3,6	0,84				
	GPVI+ aCD133	16,9	5,1	0,72				
5 li	GPVI+ aCD133	26,1	4,1	0,84				
	GPVI+ aCD133	27,6	0	1				
	GPVI+ aCD133	20,5	5,1	0,75				
	GPVI+ aCD133	29,2	0	1				
6 li	GPVI+ aCD133	28,7	0	1			0,91	0,0303
	GPVI+ aCD133	28,2	3,6	0,87				
	GPVI+ aCD133	25,6	3,1	0,88				
	GPVI+ aCD133	28,7	3,1	0,89				
7 re	GPVI+ aCD133	41,5	3,6	0,91	0,92	0,0085	0,94	0,0306
	GPVI+ aCD133	43	2,6	0,94				
	GPVI+ aCD133	39,9	3,1	0,92				
	GPVI+ aCD133	42,5	4,1	0,9				
7 li	GPVI+ aCD133	45	4,6	0,9				
	GPVI+ aCD133	48,5	4,1	0,92				
	GPVI+ aCD133	35,3	0	1				
					MW=0,855		MW=0,916	
					SEM=0,0218		SEM=0,0052	

Bei den Mäusen 1, 2, 13 und 14 fehlen die Einzelwerte für V_{sys} und V_{dys} , da Widerstandsindex vom Ultraschallgerät berechnet wurde.

11.2 Histomorphometrische Daten der linken A. carotis

11.2.1 Tötung 2 Wo post operationem

CD34⁺ Zellen + GPVI-Fc-CD133

Tier	Media			Neointima		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 14	34902,72	32113,63	3155,612	13692,81	17920,52	7641,037
Nr. 16	25700,02			46291,02		
Nr. 20	35334,17			2814,26		
Nr. 24	23955,27			19563,49		
Nr. 2	40675,97			7241,02		

Tier	Lumen			Stenosegrad		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 14	51,57	68,61	8,614	48,43	31,39	8,614

ANHANG

Nr. 16	49,03			50,97		
Nr. 20	94,82			5,18		
Nr. 24	67,96			32,04		
Nr. 2	79,69			20,31		

CD34⁺ Zellen + GPVI + aCD133

Tier	Media			Neointima		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 12	13786,23	25351,84	4102,739	4583,89	42812,68	13405,893
Nr. 15	31730,94			58072,54		
Nr. 17	25291,46			44334,09		
Nr. 1	30598,72			64260,22		

Tier	Lumen			Stenosegrad		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 12	79,72	41,08	15,334	20,28	58,92	15,334
Nr. 15	42,84			57,16		
Nr. 17	36,85			63,15		
Nr. 1	4,92			95,08		

11.2.2 Tötung 5 Wo post operationem

CD34⁺ Zellen + GPVI-Fc-CD133

Tier	Media			Neointima		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 7	26058,59	19471,47	5486,768	269,27	5423,38	2855,882
Nr. 9	8577,17			10132,23		
Nr. 10	23778,65			5868,64		

Tier	Lumen			Stenosegrad		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 7	99,18	91,12	6,155	0,82	8,88	6,155
Nr. 9	95,14			4,86		
Nr. 10	79,03			20,97		

CD34⁺ Zellen + GPVI + aCD133

Tier	Media			Neointima		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 8	23850,86	22704,99	1590,590	0,000	7151,71	7151,710
Nr. 13	24702,10			0,000		
Nr. 36	19562,00			21455,13		

Tier	Lumen			Stenosegrad		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 8	100,00	72,43	27,567	0,00	27,57	27,567
Nr. 13	100,00			0,00		
Nr. 36	17,30			82,70		

11.2.3 Tötung 3 Wo post operationem

CD34⁺ Zellen + GPVI-Fc-CD133

Tier	Media			Neointima		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 1	54073,58	37909,57	3661,128	33481,98	35613,61	8213,077
Nr. 2	40850,88			66564,23		
Nr. 13	39341,15			18931,10		
Nr. 14	43031,50			19420,48		
Nr. 8	30623,28			10245,68		
Nr. 17	24092,60			61587,60		
Nr. 9	33354,00			39064,18		

Tier	Lumen			Stenosegrad		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 1	79,19	53,40	10,888	20,81	46,60	10,888
Nr. 2	20,60			79,40		
Nr. 13	72,81			27,19		
Nr. 14	67,67			32,33		
Nr. 8	77,92			22,08		
Nr. 17	8,49			91,51		
Nr. 9	47,09			52,91		

CD34⁺ Zellen + GPVI + aCD133

Tier	Media			Neointima		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 11	36135,62	31746,89	3972,547	69733,55	37237,30	13885,476
Nr. 12	37612,09			27537,44		
Nr. 3	35212,43			102590,70		
Nr. 4	43701,58			6598,57		
Nr. 5	33450,24			2798,54		
Nr. 6	24245,10			13747,39		
Nr. 7	11871,20			37654,94		

Tier	Lumen			Stenosegrad		
		mean	SEM		mean	SEM
Nr. 11	5,94	39,67	12,658	94,06	60,33	12,658
Nr. 12	35,13			64,87		
Nr. 3	10,88			89,12		
Nr. 4	90,25			9,75		
Nr. 5	68,99			31,01		
Nr.6	58,16			41,84		
Nr. 7	8,32			91,68		

11.3 Ausmessung der Infarktgrößen

11.3.1 CD34⁺ Zellen + GPVI-Fc-CD133

Nod/Scid	Infarktgröße (LV)	Infarktgröße (Gesamt)
2	8,5	5,7
9	6,9	5,01
22	17,58	10,26
29	11,96	8,5
MW	11,24	7,37
SD	4,728	2,449
SEM	2,364	1,224

11.3.2 CD34⁺ Zellen + GPVI-Fc + aCD133

Nod/Scid	Infarktgr(LV)	Infarktgr.(Gesamt)
1	12,39	7,4
5	9,5	6,8
10	25,85	18,68
23	20,15	14,66
MW	16,97	11,89
SD	7,433	5,769
SEM	3,716	2,885

11.3.3 Myokardinfarkt ohne Zellgabe

Nod/Scid	Infarktgr(LV)	Infarktgr.(Gesamt)
x	24,18	16,08
44	26,05	18,42
MW	25,12	17,25
SD	1,322	1,655
SEM	0,935	1,17

12 DANKSAGUNG

Ich danke herzlich Herrn PD Dr. med. vet. M. Schneider für die Übernahme meiner Arbeit und deren Einreichung am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus Liebig Universität Gießen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. A. May für seine kompetente wissenschaftliche Betreuung und die abschließende Durchsicht meiner Dissertation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz, dass er es mir ermöglicht hat, in der Arbeitsgruppe im Rahmen der Atheroskleroseforschung die vorliegende Arbeit zu erstellen. Vielen lieben Dank für alle richtungsweisenden Ratschläge in diesem Zusammenhang.

Ein ganz besonderes Dankeschön auch an Frau Dr. med. vet. T. Schönberger für die ausgezeichnete Projektbetreuung und die Einführung in die verschiedenen Operationstechniken. Sie stand mir jederzeit mit Engagement, Fachkunde und einem stets offenen Ohr für alle Fragen im Rahmen dieses Projektes zur Seite.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei allen Kolleginnen der Arbeitsgruppe Gawaz für die freundschaftliche und hilfsbereite Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Dr. Bühring und seiner Arbeitsgruppe gilt ein Dankeschön, dass ich mit dem Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD133 arbeiten durfte.

Herrn Prof. Dr. G. Jung danke ich für die Herstellung des Konstruktes GPVI-Fc-CD133, welches in meiner Arbeit vielfach Anwendung fand.

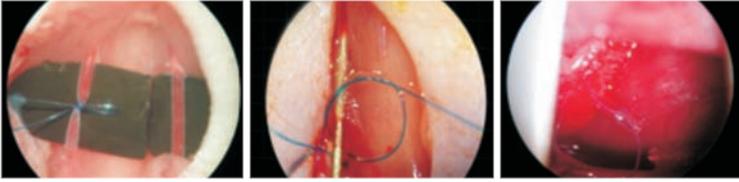
Ein großes Dankeschön auch an Herrn Dr. med. Harald Langer, der mir bei vielerlei Fragen mit seiner wissenschaftlichen Kompetenz und seiner Erfahrung im Veröffentlichenden von wissenschaftlichen Daten stets behilflich war.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau J. Kwiatkowska, Frau C. Neff, Fr. J. Wenz und Fr. Hanna Schnell für die Isolierung der im Mausmodell verwendeten Zellen sowie die Herstellung der Paraffinschnitte bedanken.

Mein Dank gilt auch dem gesamten Tierpflegerteam des FORS Tübingen für die verantwortungsvolle und zuverlässige Betreuung unserer Tiere.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern und Großeltern für ihre liebevolle Unterstützung und die Kraft, welche sie mir durch ihre Anwesenheit in schwierigen Zeiten, gegeben haben.

Schließlich danke ich ganz besonders meinen Freunden, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten und mir daher sehr viel Rückhalt geboten haben.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5724-4



9 17 8 3 8 3 5 19 5 7 2 4 4