

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen des
Deutschen Herzzentrums München der
Technischen Universität München

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Die Wirkung von Plasmamediatoren von Patienten mit koronarer
Herzkrankheit auf die Endothelzellfunktion**

Katharina Elisabeth Kunert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott
2. Univ.-Prof. Dr. St. Massberg

Die Dissertation wurde am 30.07.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 16.12.2009 angenommen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Koronare Herzkrankheit	6
1.2	Akutes Koronarsyndrom	6
	Instabile Angina pectoris und akuter Myokardinfarkt	
1.3	Stabile Angina pectoris	8
1.4	Atherosklerose und Inflammation	9
1.4.1	Vaskuläre Inflammation und Atherogenese	10
1.4.2	Plaquestabilisierung und Plaqueruptur	13
1.4.3	Myokardiale und systemische Inflammation	15
1.5	Zytokine und ihre Funktion	21
1.5.1	Tumornekrosefaktor	23
1.5.2	Wachstumsfaktoren	24
1.5.3	Chemokine	26
1.6	Endothelzellfunktion	31
1.7	Mechanismen der Entwicklung von Blutgefäßen	33
1.7.1	Migration	38
1.7.2	Proliferation	39
2.	Zielsetzung	40
3.	Material und Methoden	41
3.1	Materialien	
3.1.1	Geräte	42
3.1.2	Substanzen	42
3.2	Methoden	42
3.2.1	Studienprotokoll	43
3.2.2	Studiengruppe	45
3.2.3	Blutentnahmen	45
3.2.4	Zellkultur	46
3.2.5	Angiogeneseassay	46
3.2.6	Migrationsassay	48
3.2.7	Proliferationsassay	51
3.2.8	Immunoassay	53

3.2.8	Myokardszintigraphie	54
3.2.9	Statistik	54
4.	Ergebnisse	55
4.1	Klinische Daten des Patientenkollektivs	56
4.2	Die Wirkung der Plasmaproben auf Angiogenese, Proliferation und Migration von Endothelzellen	57
4.3	Konzentration von Chemokinen und Zytokinen im Plasma und Assoziation mit Endothelzellfunktionen	66
4.4	Die Assoziation von klinischen Parametern mit Endothelzellfunktionen	68
4.5	Die Assoziation von kardiovaskulären Risikofaktoren mit Endothelzellfunktionen	69
5.	Diskussion	70
5.1	Die Wirkung von Chemokinen und Zytokinen auf das angiogenetische, proliferative und migratorische Potential von Endothelzellen	70
5.1.1	Assoziation von CCL2 mit dem angiogenetischen Potential bei stabiler und instabiler Angina pectoris	70
5.1.2	Assoziation von CXCL9 mit dem angiogenetischen Potential von Endothelzellen bei stabiler Angina pectoris	72
5.1.3	Assoziation von VEGF mit dem angiogenetischen Potential von Endothelzellen bei stabiler und instabiler Angina pectoris	75
5.2	Die Assoziation von klinischen Parametern mit Endothelzellfunktionen bei Patienten mit KHK	76
5.2.1	Zusammenhang von szintigraphischer Infarktgröße und angiogenetischem Potential von Endothelzellen	76
5.3	Die Assoziation von kardiovaskulären Risikofaktoren mit Endothelzellfunktionen bei Patienten mit KHK	77
5.3.1	Assoziation von arterieller Hypertonie und angiogenetischem Potential von Endothelzellen	77
5.3.2	Assoziation von Diabetes mellitus mit dem proliferativen und angiogenetischen Potential von Endothelzellen	78
5.3.3	Assoziation von Hypercholesterinämie mit dem proliferativen Potential von Endothelzellen	79

5.4	Mögliche klinische Relevanz und therapeutische Anwendung	80
6.	Zusammenfassung	82
7.	Abkürzungen	83
8.	Verzeichnisse	85
8.1	Abbildungsverzeichnis	85
8.2	Tabellenverzeichnis	86
8.3	Literaturverzeichnis	87
9.	Publikation	99
10.	Lebenslauf	100
11.	Danksagungen	102

1. Einleitung

1.1 Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) und ihre Folgen stehen an erster Stelle der Todesursachenstatistik in der Bundesrepublik Deutschland und den anderen westlichen Industriestaaten.

Trotz einer breiten Aufklärung der Bevölkerung über die Risikofaktoren für die Entstehung einer KHK und einer ständigen Verbesserung der medikamentösen und interventionellen Therapie, versterben in Deutschland jährlich rund 170 000 Menschen an einer KHK und ihren Folgen. Als klassische Risikofaktoren für die Entstehung von Arteriosklerose und einer koronaren Herzerkrankung sind seit langem neben männlichem Geschlecht, familiärer Belastung und Lebensalter u.a. Hypercholesterinämie, Rauchen, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus bekannt (52).

Die KHK ist definiert als Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzarterien. Bedingt durch flusslimitierende Koronarstenosen kommt es zur Koronarinsuffizienz, einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und –angebot im Herzmuskel. Die dadurch hervorgerufene Myokardischämie hat verschiedene Manifestationsformen:

- Angina pectoris
- Herzinfarkt
- Ischämische Herzmuskelschädigung mit Linksherzinsuffizienz
- Herzrhythmusstörungen
- Plötzlicher Herztod

1.2 Akutes Koronarsyndrom

Unter dem Begriff Akutes Koronarsyndrom (ACS) werden die Phasen der koronaren Herzerkrankung zusammengefasst, die unmittelbar lebensbedrohlich sind (18,53). In der klinischen Praxis unterscheidet man zwischen dem akuten Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung (STEMI), dem akuten Myokardinfarkt ohne ST-Streckenhebung (NSTEMI) und der instabilen Angina pectoris.

Die instabile Angina pectoris beinhaltet jede Erstangina, Schmerzanfälle mit zunehmender Schwere, Dauer und Häufigkeit, sowie jede Ruhe-Angina. Bei instabiler Angina besteht ein

akutes Infarktrisiko. Der Übergang zum Infarkt wird meist durch einen Riss im atheromatösen Plaque mit nachfolgender Koronarthrombose eingeleitet.

In unserer Arbeit erfolgte nach der früheren Einteilung der American Heart Association die Definition einer instabilen Angina pectoris als Troponin T positiv, in Abgrenzung zum akuten Myokardinfarkt, sobald zusätzlich die Creatinkinase und das Isoenzym MB erhöht waren.

Jährlich werden in Deutschland ca. 350 000 – 400 000 Patienten mit akutem Koronarsyndrom behandelt. Leitsymptom ist der akute thorakale Schmerz, der allerdings eine niedrige Spezifität hat und von funktionellen Beschwerden bis zur akut lebensbedrohlichen Myokardischämie reichen kann (76,115). Verdächtig für das Vorliegen eines ACS und damit prognostisch bedeutsam sind Ruhebeschwerden von mehr als 20 Minuten Dauer. Charakteristisch ist die Besserung nach Gabe antiischämischer Medikamente wie z.B. sublinguale Nitrate innerhalb von wenigen Minuten. Bei jüngeren (<40Jahre) und älteren (>75 Jahre) Patienten, sowie Diabetikern und Frauen ist der Schmerz häufig atypisch. Die instabile Angina und der akute Myokardinfarkt sind zumeist Komplikationen der koronaren Herzerkrankung und stehen in Zusammenhang mit einer Myokardischämie bedingt durch eine instabile atherosklerotische Läsion der Gefäßwand, Plaqueruptur und Thrombusbildung. Zunächst reduziert das Myokard im Sinne einer Anpassungsreaktion an das verminderte Sauerstoffangebot seinen Stoffwechsel zulasten der kontraktilen Funktion (sog. „hibernating“ Myokard). Zu diesem Zeitpunkt ist der Herzmuskel noch in der Lage, durch Reperfusion die kontraktile Funktion wieder aufzunehmen. Erst wenn die Ischämie zu lange anhält, degeneriert das Myokard, wird nekrotisch und durch fibrotisches Narbengewebe ersetzt (91). Der Myokardinfarkt ist die Folge einer Myokardischämie, die durch eine Unterbrechung der Koronardurchblutung zur Ausbildung einer Gewebsnekrose führt. Der Infarktpatient ist hauptsächlich durch das Auftreten von Rhythmusstörungen gefährdet, die in Kammerflimmern übergehen können. Die Prognose des Infarktpatienten wird weitgehend durch die Größe des Infarktareals bestimmt und kann durch rechtzeitige Reperfuisionsmaßnahmen verbessert werden (32). Hierzu stehen die konservative Therapie mit Aktivatoren der Fibrinolyse (Thrombolyse) und die akute perkutane transluminale Koronarintervention (PCI) als Therapieoptionen zur Wahl.

In der Evaluierung des Patienten mit ACS ohne ST-Hebung sind biochemische Marker heute unverzichtbar. In der klinischen Routine stehen Marker der Zellnekrose für die Akutphase und Marker der Inflammation für die langfristige Prognosebeurteilung zur Verfügung.

Als Marker der Zellnekrose sind die Kreatinkinase (CK) und das Isoenzym MB bekannt und haben bei Erhöhung prognostische Aussagekraft (57,136).

Troponin T und Troponin I sind hinsichtlich Sensitivität und Spezifität überlegen (46,66) und nehmen eine zentrale Stellung bei Diagnosestellung und Risikostratifizierung ein (12,17).

Neue Erkenntnisse über inflammatorische Prozesse beim ACS haben nicht nur unser Verständnis bezüglich der Pathophysiologie dieses Krankheitsbildes verändert, sondern könnten uns zukünftig in der Identifizierung von Risikopatienten entscheidend helfen. Eine große Herausforderung besteht hierbei in der klinischen Etablierung neuer Biomarker, die eine Gefährdung dieser Patienten frühzeitig anzeigen.

1.3 Stabile Angina pectoris

Die stabile Angina pectoris ist durch kurzzeitig (Minuten) anhaltende Beschwerden charakterisiert, die durch körperliche Anstrengung, Kälte, oder ausgiebige Mahlzeiten ausgelöst werden können. Die thorakalen Schmerzen sind unangenehm, haben jedoch selten stärkste Ausprägung.

Die Beschwerden manifestieren sich von Anfall zu Anfall relativ gleichartig. Körperliche Ruhe und die Gabe von Nitropräparaten führen regelmäßig innerhalb von Minuten zu einer Besserung der Symptome.

Die stabile Angina hat unterschiedliche Verlaufsformen und kann von der stummen Ischämie (Grad 0 nach der CCS Klassifikation) bis zur Angina bei geringster körperlicher Belastung reichen (Grad IV nach der CCS Klassifikation).

1.4 Atherosklerose und Inflammation

Atherosklerose stellt die wichtigste und häufigste krankhafte Veränderung der Arterien dar, verbunden mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung. Der Zusammenhang zwischen verschiedenen exogenen und endogenen Noxen bzw. Krankheiten und der Entstehung und Förderung der Atherosklerose ist heute weitgehend bekannt.

Seit mehreren Jahrzehnten sind kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie und Nikotin bekannt, deren Präsenz mit der Entstehung und Progression atherosklerotischer Prozesse assoziiert ist.

Die Gründe jedoch, die zur Erosion oder Ruptur einer atherosklerotischen Plaque führen und somit als klinisches Korrelat ein akutes Koronarsyndrom auslösen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Der Nachweis, dass nur die Hälfte der auftretenden akuten Koronarsyndrome durch die traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren erklärbar sind, sowie die Erkenntnis, dass die Mehrzahl der Myokardinfarkte auf dem Boden von Koronarstenosen < 50% entstehen, hat die Suche nach neuen Risikofaktoren und pathogenetischen Mechanismen vorangetrieben (85).

Mit der Erkenntnis, dass der atherosklerotische Prozess ein entzündliches Geschehen darstellt, wurde zunehmend die Bedeutung von systemischen Inflammationsmarkern untersucht.

In den vergangenen Jahren konnten durch große epidemiologische Studien neben den klassischen Risikofaktoren auch einige neue Risikofaktoren identifiziert werden, z.B. unspezifische Entzündungsparameter wie das C-reaktive Protein (CRP), Leukozytenzahl und Fibrinogen, aber auch spezifische serologische Marker bakterieller und viraler Entzündungen (5,26,27,33).

Obwohl Atherosklerose ein fokales Geschehen darstellt, konnten Serummarker der systemischen Entzündungsreaktion mit dem Auftreten und der Prognose der KHK in Verbindung gebracht werden.

Die Bedeutung dieser neuen Parameter ist nicht nur als Risikofaktor in der Entwicklung akuter Koronarsyndrome zu sehen, sie bestimmen auch als Ausmaß der Entzündungsaktivität das klinische Ergebnis und somit die Prognose der Patienten (7, 29, 151). Es konnte gezeigt werden, dass eine CRP-Erhöhung einen prädiktiven Aussagewert für den kardialen Tod besitzt. Die Bestimmung des CRP-Wertes im Durchschnitt 9 Monate nach einem Myokardinfarkt in der CARE-Studie ergab, dass erhöhte CRP-Spiegel (>0,66 mg/dl) mit einem zweifach erhöhten Risiko für einen Reinfarkt oder Tod einhergehen.

Das proinflammatorische Zytokin IL-6 ist bei Patienten mit instabiler Angina pectoris erhöht (14). Kürzlich konnte auch bei initial gesunden Personen eine Assoziation eines erhöhten IL-6 Spiegels mit vermehrter Mortalität und kardiovaskulären Ereignissen nachgewiesen werden (123). Diese Assoziation wurde auch für das Zytokin TNF- α gezeigt (122).

Die Ursache der Zytokinerhöhung wird abgesehen vom akuten Myokardinfarkt kontrovers diskutiert. Sie könnte einerseits durch die atheromatösen Veränderungen selbst entstehen und somit deren Quantität im Sinne der atheromatösen Last widerspiegeln, oder auch deren Qualität, als inflammatorische Aktivität innerhalb der Plaque. Andererseits ist auch eine nicht vaskuläre Herkunft der Zytokine vorstellbar, eine Zytokinerhöhung könnte einen proinflammatorischen Zustand widerspiegeln, wie er z.B. bei einer chronischen Infektion herrschen könnte.

Bekannt ist, dass eine vaskuläre Entzündung eine systemische Zytokinantwort proinflammatorischer Moleküle wie Interleukin-1 β , TNF- α oder Interleukin-6 hervorruft, die ihrerseits zu einer gesteigerten Produktion der Akute-Phase-Marker CRP oder Fibrinogen führt. Durch diese neuen Erkenntnisse besteht nun die Vorstellung von Atherosklerose als ein komplexes immunologisches Geschehen, in dem Entzündungsvorgänge von Anfang an eine wichtige Rolle spielen (130). Die pathogenetische Vorstellung von Arteriosklerose als Folge einer mechanischen Ablagerung von Cholesterin an der Gefäßwand ist somit in den Hintergrund gerückt.

1.4.1 Vaskuläre Inflammation und Atherogenese

Die erste physiologisch erkennbare Manifestation der Atherosklerose äußert sich in einer verminderten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO). Die endotheliale Dysfunktion entsteht auf dem Boden einer Endothelverletzung, diese kann durch hämodynamische Veränderungen (shear stress), oxidiertes oder enzymatisch verändertes Low density lipoprotein (LDL), erhöhte glykolisierte Endprodukte, Toxine im Nikotin, vasoaktive Amine, Immunkomplexe oder Homozystein ausgelöst werden. Somit gehen die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren mit einem Verlust der endothelvermittelten Vasodilatation einher.

Dieser Verlust der NO-vermittelten Gefäßerweiterung ist das Kennzeichen einer endothelialen Dysfunktion, die bereits in der Frühphase der Atherosklerose nachweisbar und ursächlich mit der Erkrankung verbunden ist. Endotheliale Dysfunktion beinhaltet ein Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Antiproliferation, zwischen Pro- und Antithrombogenität und zwischen Gefäßwandkontraktion und -relaxation (132).

Der endothelialen Dysfunktion kommt nicht nur im Rahmen der frühen Atherogenese eine zentrale Bedeutung zu, sondern auch im akuten Koronarsyndrom. Auf dem Boden einer Plaqueruptur entwickelt sich eine Thrombozytenaktivierung mit nachfolgender Thrombose und Gefäßkonstriktion (11).

Ein entscheidender Schritt zur Bildung einer atherosklerotischen Läsion ist die Anlagerung von Leukozyten an die Gefäßintima. Im Rahmen der Endothelverletzung werden spezifische Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin oder vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (VCAM) exprimiert, die den temporären Kontakt zwischen Leukozyt und Endothelzelle vermitteln und überwiegend auf Endothelzellen exprimiert werden, die über atherosklerotischen Läsionen liegen. Vaskuläre Adhäsionsmoleküle binden vor allem in der frühen Phase der Atherogenese Lymphozyten und Monozyten fest an das Endothel und begünstigen deren Einwanderung in den subendothelialen Raum (25).

Zu Beginn der Atherogenese kommt es zu Lipideinlagerungen in die Gefäßwand. Dabei stellt der Lipidkern, anders als zunächst vermutet, keine inerte Akkumulation dar, welche zur stetigen Gefäßlumenreduktion führt, sondern bildet vielmehr den inflammatorischen Stimulus. Als Antwort auf die Einlagerung von Lipiden exprimieren Endothelzellen Adhäsionsmoleküle, welche die Leukodiapedese von Monozyten und T-Zellen in die Gefäßwand fördern. So ist die endotheliale Adhäsion von Monozyten mit nachfolgender Migration in den subendothelialen Raum ein zentraler Vorgang in der Entwicklung von frühen atherosklerotischen Läsionen („fatty streaks“).

„Fatty streaks“ sind mikroskopisch sichtbare, gelbliche Auflagerungen von lipidhaltigen Makrophagen und T-Lymphozyten in der innersten Schicht der Intima (101).

Im subendothelialen Raum transformieren diese Zellen zu Makrophagen und entwickeln sich schließlich durch unkontrollierte Aufnahme von oxidiertem LDL über den Scavenger-Rezeptor zu den typischen Schaumzellen.

Ebenso induziert eine Veränderung der Scherkraft an bestimmten Prädilektionsstellen des Koronarsystems (laminare versus turbulente Strömung) die gesteigerte Expression von Genen, die die Produktion von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen regulieren.

Der Einwanderungsprozess der Leukozyten in den subendothelialen Raum wird vornehmlich über das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) gesteuert. Seine Bedeutung im Rahmen der Atherosklerose wurde in mehreren Studien bestätigt. MCP-1 gehört zur CC-Familie der Chemokine und wurde beim Menschen und beim Kaninchen in makrophagenreichen Anteilen atherosklerotischer Plaques gefunden (161). Bei Patienten mit

ausgeprägtem kardiovaskulärem Risikoprofil oder klinisch evidenter koronarer Herzerkrankung konnten erhöhte MCP-1 Serumspiegel nachgewiesen werden (94).

Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass in genetisch veränderten Mäusen, denen der Rezeptor für MCP-1 (CCR-2) fehlte, die Bildung atherosklerotischer Läsionen vermindert war (15). Ein Antikörper gegen MCP-1 verhinderte die Einwanderung von Monozyten durch das Endothel in die Intima. MCP-1 verfügt über sehr wirkungsvolle Anziehungskräfte auf Monozyten, in vitro wird es von aktivierten Endothelzellen und von vaskulären, glatten Muskelzellen sezerniert (127). Die Freisetzung von MCP-1 scheint durch Mitglieder der Familie des Tumor-Nekrosefaktors induziert zu sein (73). Es gibt Anzeichen dafür, dass nicht nur die Aktivierung durch Zytokine, sondern auch die Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit endothelialen Zellen oder Monozyten die Sekretion von MCP-1 induzieren kann (43).

Monozyten wandern in die Intima ein, einem Konzentrationsunterschied von MCP-1 folgend, der durch die Aktivierung von endothelialen Zellen und Monozyten entsteht. Sobald die Intima erreicht ist, wird die Wirkung verstärkt, indem jeder einzelne Monozyt eigenes MCP-1 synthetisiert und sezerniert (128). MCP-1 ist auch für wichtige Schritte der Angiogenese verantwortlich und fördert unter anderem die Proliferation und Migration von Endothelzellen, sowie die Bildung von Gefäßtubuli.

Als zentraler inflammatorischer Mediator wird das aus aktivierten Lymphozyten freigesetzte Molekül Interferon- γ diskutiert (87). Interferon- γ kann die Expression von Adhäsionsmolekülen regulieren und proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) induzieren, die ihrerseits Monozyten, Lymphozyten und Makrophagen aktivieren und somit den subendothelialen inflammatorischen Prozeß unterhalten.

Der Tumor Nekrose Faktor ist ein pleiotropes Zytokin, das an der Vermittlung verschiedenster zellulärer Antworten beteiligt ist, wie an der nicht-adaptiven Immunantwort und an Entzündungsreaktionen. Die Mehrzahl biologischer Antworten wird durch die Bindung von TNF an den TNF-Rezeptor Typ 1 (TNF-R1) vermittelt. Es sind zwei bioaktive Formen von TNF bekannt, die membranständige Form des TNF-Moleküls und eine lösliche Form dieses Zytokins, die durch proteolytische Abspaltung der membranständigen Form entstehen kann. Ein TNF-Signal resultiert entweder überwiegend in der Geninduktion/Expression von proinflammatorischen Zytokinen, oder in der Induktion von Apoptose. Im Hypothalamus stimuliert TNF die Freisetzung des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH), in der Leber die Freisetzung des C-reaktiven Proteins (CRP). TNF-produzierende Zellen exprimieren oft auch

TNF-Rezeptoren, inwieweit jedoch membranständiges TNF an diesen autokrinen Signalschleifen beteiligt ist, ist bisher unklar.

Die Präsenz von Entzündungszellen und Schaumzellen innerhalb der Intima ist zunächst noch reversibel und hat keine klinischen Folgen, jedoch kann es zu einer Progression der atherosklerotischen Plaque und zur Entwicklung einer fibrösen oder komplizierten Plaque kommen.

Die Plaque besteht aus einer Deckplatte (Fibrous Cap), die fibröses Bindegewebe und glatte Muskelzellen beinhaltet. Die glatten Muskelzellen der Deckplatte produzieren Wachstumshormone, die ihre Proliferationsrate erhöhen. Ebenso produzieren sie auch Matrixproteine wie Kollagen und Elastin. So trägt die Deckplatte, die den hoch thrombogenen, lipid- und entzündungszellreichen Kern der Plaque vom Blutstrom trennt, zur Stabilität der atherosklerotischen Läsion bei (160).

1.4.2 Plaquestabilisierung und Plaqueruptur

Durch das Wachstum der fibrösen Plaque kommt es zur Ausweitung der Gefäßwand. Sobald die Elastizität nicht mehr ausreicht, kommt es zur Lumeneinengung des Gefäßes (48). Diese Mechanismen, die eine über lange Zeit stabile arteriosklerotische Plaque in eine rupturgefährdete Plaque verwandeln, sind von großer klinischer Bedeutung. Die vulnerable Plaque ist schließlich durch einen großen Lipidkern, eine dünne Deckplatte und eine Vielzahl inflammatorischer Zellen gekennzeichnet.

Da der Atheromgehalt starke thrombogene Potenz besitzt, kommt es im Fall einer Deckplattenruptur oder -erosion zu einem direkten Kontakt des Blutstroms mit den unter der Faserkappe liegenden stark prokoagulatorischen Faktoren wie Kollagen, von-Willebrand-Faktor (vWF) und Gewebsthromboplastin. Es kommt zu einer Thrombozytenaktivierung, zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade mit konsekutiver Thrombose und dem Auftreten eines akuten Koronarsyndroms (86).

Die Adhäsion der Blutplättchen an exponierte Matrix wird als initialer Schritt der Thrombusformation angesehen. Blutplättchen adhären an den von-Willebrand-Faktor und an Kollagen über membranäre Adhäsionsrezeptoren (Glykoprotein Ib/IX/V bzw. Glykoprotein VI). Nach der Thrombozytenadhäsion kommt es zur Thrombozytenaktivierung und zur Transformation des Fibrinogenrezeptors und des Kollagenrezeptors (Integrinrezeptoren), die die feste Bindung zu den entsprechenden Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) vermitteln (70). Der Fibrinogenrezeptor und der Kollagenrezeptor haben unterschiedliche

(patho-) physiologische Bedeutung. Der Kollagenrezeptor wird auf ruhenden Thrombozyten exprimiert. Die Bindung an Kollagen aktiviert den Thrombozyten, was eine Konformationsänderung und Aktivierung des Fibrinogenrezeptors auslöst. Der so aktivierte Fibrinogenrezeptor kann nun an plasmatisches Fibrinogen binden. Da ein Fibrinogenmolekül an zwei Fibrinogenrezeptoren unterschiedlicher Thrombozyten binden kann, kommt es zur Aggregation. Der Fibrinogenrezeptor bindet auch an subendotheliales Fibronectin so, dass ein Aggregat aktivierter Thrombozyten direkt mit der subendothelialen Matrix eine feste Verbindung eingehen und weitere Thrombozyten an die Endothelläsion rekrutieren kann.

Normalerweise verhindert ein intaktes, nichtaktiviertes Endothel die Thrombozytenadhäsion an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Während ein intaktes Endothel die Reaktivität der Thrombozyten über inhibitorische, modulierende Mechanismen kontrolliert, wobei die Cyclooxygenase-2 (COX-2), Prostacyclin (PGI₂) und das Prostaglandinsystem beteiligt sind, entwickelt entzündliches Endothel adhäsionsvermittelnde Eigenschaften.

Neben den physikalischen Kräften, die durch die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes, den Gefäßdurchmesser und die Elastizität der Gefäßwand bestimmt werden (69) zählen u.a. die Sezernierung von Matrix-Metalloproteinasen durch Makrophagen (13, 147) und das Einwachsen neuer Kapillaren (Angiogenese) in das Plaque zu den destabilisierenden Mechanismen (28, 84).

Eine große Bedeutung kommt der Aktivität der Entzündungszellen im arteriosklerotischen Plaque zu. An besonders ruptur-gefährdeten Stellen einer Plaques finden sich viele, teils aktivierte Entzündungszellen, wie Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen (54, 97, 153).

Wir wissen heute, dass Thrombozyten neben ihrer Rolle bei der Hämostase und Thromboseentstehung eine Vielzahl verschiedener inflammatorischer Reaktionen regulieren und eine Schlüsselrolle in der Atherothrombose einnehmen. Da atherothrombotische Erkrankungen die Hauptursache der Morbidität und Sterblichkeit in den hochentwickelten Industrienationen darstellen, stellt das Verständnis der Rolle der Thrombozyten bei der vaskulären Inflammation und Atherosklerose eine wichtige Herausforderung dar. Die weitere Aufklärung der spezifischen Mechanismen der Plättchenadhäsion an das Endothel könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien führen.

Der lösliche CD 40-Ligand (sCD40L) hat sich als ein Marker herausgestellt, der die komplexe Interaktion zwischen Inflammation und Thrombozytenaktivierung widerspiegelt. Die Plaqueruptur führt zur Aktivierung von Thrombozyten und gesteigerter Expression und Freisetzung von oberflächenständigem CD 40-Ligand. Dieser aktiviert CD40- Rezeptoren auf

Endothelzellen, Monozyten und T-Zellen und führt über die Induktion von Matrixmetalloproteinasen, „tissue factor“ und proinflammatorischer Zytokine zum Voranschreiten der Plaqueinstabilität.

1.4.3 Myokardiale und systemische Inflammation

Von der Entzündungsreaktion im Rahmen der Plaqueentstehung, ist somit die inflammatorische Reaktion abzugrenzen, die einem akuten Myokardinfarkt folgt.

Eines der wichtigsten Ziele in der modernen Kardiologie ist, Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, um die Nekrose des Myokards nach einem Infarkt zu minimieren und die körpereigenen Reparaturmechanismen zu optimieren.

Eine Voraussetzung hierzu ist die Analyse der zellulären und molekularen Mechanismen, welche die inflammatorische Reaktion nach Myokardischämie und Reperfusion regulieren.

Durch die myokardiale Ischämie kommt es zur Freisetzung der Nekrosemarker Creatinkinase, des MB-Isoenzym und des kardialen Troponin T und I, die in der klinischen Routine etablierte Marker für eine Risikoevaluation darstellen und entscheidend für die Therapiestrategie sind.

Die myokardiale Nekrose induziert eine Komplementaktivierung und die Bildung von freien Radikalen, was schließlich eine Kaskade an Zytokinen aktiviert. Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Mastzellen sezernieren Tumornekrosefaktor- α , einen zu den Zytokinen zählenden Signalstoff, der Einfluß nimmt auf die Entzündungsreaktion und als Initialfaktor anzusehen ist.

Falls es zur Reperfusion eines Infarktareals kommt, zieht diese eine ausgedehnte Entzündungsreaktion nach sich. Die Synthese von Interleukin 8 (IL8) und die Aktivierung des Komplementfaktors C5a spielen eine bedeutende Rolle in der Anlockung von Neutrophilen Granulozyten im ischämischen, reperfundierten Myokard.

Interleukin-8 ist ein Chemokin der CXC-Familie und wird u.a. durch Epithelzellen, Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten produziert. Die wesentliche biologische Wirkung von IL-8 auf Granulozyten beinhaltet die Förderung der Chemotaxis, die Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivierung mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Granula. IL-8 ist ein bedeutender Regulator der Neutrophilen Einwanderung und der Aktivierung inflammatorischer Prozesse, übt jedoch auch proangiogenetische Wirkungen aus und könnte bei der Wundheilung eine bedeutende Rolle spielen (119). Es konnte gezeigt werden, dass IL-8 die Mobilisierung von Stammzellen induziert, was eine Aktivierung von MMP-9 beinhaltet (117). In experimentellen

Infarktmodellen kam es dabei zur Hochregulation von IL-8 in inflammatorischen Zellen im Infarkttrandgebiet und in mikrovaskulären Endothelzellen. In Studien konnte gezeigt werden, dass bei einem akuten Myokardinfarkt der IL-8 Spiegel mit zirkulierenden Vorläuferzellen assoziiert ist. Zusätzlich zum proangiogenetischen Potential von IL-8 und VEGF, könnte dieser Mechanismus zur Bildung von neuen Gefäßen beitragen und dadurch die myokardiale Funktion verbessern (140).

Erhöhte CRP-Spiegel treten häufig im Rahmen eines Akuten Koronarsyndroms auf und wurden als prädiktiver Wert für weitere kardiovaskuläre Ereignisse identifiziert (151). Über zwanzig groß angelegte Studien zeigen, dass der inflammatorische Biomarker high-sensitivity C-reaktives Protein ein unabhängiger Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse ist, der zusätzlich das Risiko der Inzidenz einer arteriellen Hypertonie und Diabetes vorhersagt (121). Die Aktivierung endothelialer Zellen und Leukozyten innerhalb der Mikrozirkulation im Bereich der rupturierten Plaque oder der myokardialen Nekrose könnte zu dieser systemischen Entzündung beitragen.

Bei post-mortem-Untersuchungen der Koronararterien von an akutem Myokardinfarkt verstorbenen Patienten, fand sich eine diffuse T-Zell-Aktivierung sowohl in betroffenen, wie auch in nicht betroffenen Gefäßen (143). Von dieser diffusen T-Zell-Aktivierung scheinen nicht nur die Koronararterien, sondern auch das nicht in das Infarktgeschehen einbezogene, vermeintlich „gesunde“ Myokard betroffen zu sein (1).

Die Aktivierung von Entzündungsvorgängen im ACS ist somit nicht ausschließlich auf das Koronargefäßsystem und das ischämische Myokard beschränkt, sondern beinhaltet auch die Stimulation zirkulierender Monozyten und die folgende Induktion von Akute-Phase Proteinen (19). Da die Aktivierung von Monozyten zumindest teilweise von Interferon abhängig ist, könnte die Aktivierung von T-Lymphozyten und die adaptive Immunantwort zu den inflammatorischen Veränderungen beim Akuten Koronarsyndrom beitragen (107).

Monozyten tragen als Bestandteil des angeborenen Immunsystems direkt zur Atherosklerosebildung bei, wohingegen T-Zellen als Teil des erworbenen Immunsystems das Voranschreiten und die Aktivität der atherosklerotischen Plaque beeinflussen (9). Beim Akuten Koronarsyndrom ist in den verantwortlichen Läsionen der prozentuale Anteil von aktivierten T-Zellen signifikant erhöht und es konnte gezeigt werden, dass Proben aus Atherektomie-Material von Patienten mit instabiler Angina, jedoch nicht mit stabiler Angina eine Proliferation von Lymphozyten induzieren, was vermuten läßt, dass Antigenstimuli im Bereich der verantwortlichen Läsion liegen könnten (22).

Studien führten zu der Annahme, dass der Übergang einer stabilen zu einer instabilen Plaque T-Zell gesteuert ist und eine immunologische Aktivierung beinhaltet. Unterstützt wird diese Hypothese zudem durch die Korrelation von interferonproduzierenden, zirkulierenden CD4+CD28 T-Zellen und der Monozytenaktivierung (89). Aus dem Blut stammende CD4+CD28 T-Zellen könnten die koronare Plaque infiltrieren und eine Inflammation als Antwort auf lokal exprimierte Antigene induzieren.

Chemokine und Zytokine sind wichtige Faktoren für die Anlockung und Aktivierung von Leukozyten und könnten dadurch zur Plaqueinstabilität beitragen. Entsprechende Chemokinrezeptoren werden unterschiedlich auf T-Zellen exprimiert, abhängig von ihren Antigenprägungen und ihrem Polarisierungstyp. CXCR3 wird auf den meisten peripheren Gedächtniszellen exprimiert, auf Th1 Zellen stärker, als auf Th2 Zellen, wohingegen CCR3 mit Th2 Zellen assoziiert ist (134). Das charakteristische Th1 Zytokin Interferon-gamma (IFN- γ) inhibiert Th2 Antworten. Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 10 (IL-10) blockieren die Th1 abhängige Zytokinfreisetzung und Proliferation, wohingegen Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 12 (IL-12), p 70 und RANTES die Th1 Antwort verstärken (145).

Da die spezifische Lymphozytenaktivierung und zirkulierende Zytokine zur Plaqueinstabilität und zum myokardialen Remodeling beitragen könnten, wurden diese nun in Studien mit Patienten mit akutem Myokardinfarkt, instabiler und stabiler Angina untersucht.

Bei Patienten mit instabiler Angina kommt es zu einer spezifischen Lymphozytenaktivierung im Sinne einer Th1 Polarisierung. Dies konnte durch eine verstärkte IFN- γ , IL-12, p70 und RANTES Freisetzung der T-Lymphozyten, erhöhte Spiegel an Th1 induzierenden Zytokinen und einer verminderten Expression von CCR3 nachgewiesen werden was eine Suppression von Th2 widerspiegelt (9). Bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt dominiert eine systemische Inflammation mit verstärkter Expression der frühen Aktivierungsmarker CD 69 auf Lymphozyten. Dies war auch mit erhöhten Spiegeln der Zytokine IL-6 und IL-10 verbunden, welche die Th1 Aktivierung unterdrücken (9).

Unter Stimulation mit einem Antigen differenzieren sich CD4+ T-Zellen in Th1 und Th2 Subtypen, die sich durch die Freisetzung bestimmter Zytokine auszeichnen. Th1 Zellen sezernieren IFN- γ und induzieren die Aktivierung von Makrophagen. Th2 Zellen sezernieren IL-4, IL-6, IL-10 und inhibieren die Th1 Antwort, indem sie die lokale Inflammation herunter regulieren (135). Die T-Zell Polarisierung wird hauptsächlich durch Wirkung von Zytokinen nach Antigenpräsentation bestimmt. Obwohl bei instabiler Angina und akutem Myokardinfarkt ähnliche proinflammatorische Veränderungen beobachtet wurden (113), konnten unterschiedliche Zytokinprofile identifiziert werden. Bei instabiler Angina sind Th1

induzierende Zytokine wie IL-1, IL-12, p70 und RANTES erhöht, wohingegen die anti-Th1-Zytokine IL-6 und IL-10 bei akutem Myokardinfarkt dominieren (19).

Es ist bekannt, dass eine myokardiale Nekrose und folgende Reperfusion mit einer kaskadenartigen Aktivierung von Zytokinen einhergeht (134). Erhöhte IL-6 und IL-10 Plasmaspiegel bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt könnten daher als Teil einer systemischen Inflammation angesehen werden. Nachdem IL-12, p70, IL-1 und RANTES nicht im infarzierten Myokard nachgewiesen werden konnten, könnte die Zytokinfreisetzung im Rahmen einer instabilen Angina durch eine immunologische Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen verursacht sein. Passend zu dem Zytokinmuster bei Patienten mit instabiler Angina wurde eine verstärkte IFN- γ Sekretion von aktivierten T-Zellen und eine erhöhte Anzahl von CD4+CD28 Zellen gefunden, einer Subgruppe von T-Zellen, die große Mengen an IFN- γ freisetzen und ein hohes proinflammatorisches und gewebezerstörendes Potential besitzen.

Wenn die systemische T-Zellansammlung und das Zytokinmuster eine lokale Inflammation im Koronargefäßsystem widerspiegeln, könnte die Assoziation von erhöhter Th1 Zellzahl bei der instabilen Angina, nicht aber beim akuten Myokardinfarkt oder stabiler Angina mit einem Übergang einer stabilen Plaque in eine instabile Plaque verbunden sein (9).

Des Weiteren konnte bei isolierten CD4+CD28 Zellen aus instabilen Plaques eine Zytotoxizität gegenüber vaskulären Zellen beobachtet werden (105). Aktivierte T-Zellen könnten in atherosklerotische Läsionen einwandern und gewebezerstörende immunologische Prozesse einleiten, wie die IFN- γ vermittelte Aktivierung von Makrophagen und Zytolyse glatter Muskelzellen oder Endothelzellen, was schließlich zur Progression und Plaqueinstabilität führt. Fremde Antigene wie Chlamydia pneumoniae oder Zytomegalievirus und Autoantigene wie oxidiertes LDL und Hitzeschockprotein (HSP 60) werden als potentielle Antigenstimuli vermutet (55).

Seit kurzem wissen wir, dass die Stresshormone Glukokortikoide und Katecholamine die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12 und IFN- γ inhibieren und die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10, IL-4 und Transforming growth factor-beta (TGF- β) stimulieren. Besonders beim akuten Myokardinfarkt kommt der exzessiven Aktivierung der Stresshormone eine bedeutende Rolle zu, indem ein negatives Feedback erzeugt wird, das den Organismus vor einer überschießenden Anzahl an inflammatorischen Zytokinen und anderer gewebezerstörender Produkte aktivierter Makrophagen schützt (31). Dies könnte eine erhöhte Anzahl CD69+ T-Zellen mit reduzierter Interferon- γ Produktion im

akuten Myokardinfarkt erklären. Steroide und Katecholamine mobilisieren T-Zellen, reduzieren jedoch ihre inflammatorische Aktivität (9).

Inzwischen konnten auch antiinflammatorische Marker identifiziert werden, die von großer Bedeutung sind. CXCL10 wurde ursprünglich als CSIF (Cytokine synthesis inhibitory factor) beschrieben und ist in erster Linie ein Produkt aktivierter Th2-Zellen und endotoxin-stimulierter Makrophagen (98). Seine Wirkung entfaltet das Zytokin über Bindung an den CXCR3 Rezeptor. Es inhibiert den nukleären Faktor-(NF-) κ B, den zentralen Transkriptionsfaktor in der Entzündungskaskade und supprimiert die Zytokinproduktion in Monozyten.

CXCL10 inhibiert die Produktion von IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-8 durch aktivierte Makrophagen und unterdrückt damit die inflammatorische Reaktion z.B. nach Myokardinfarkt. CXCL10 könnte auch eine bedeutende Rolle in der Bildung von extrazellulärer Matrix spielen, indem es die Expression von Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren steuert (81). Auf die Angiogenese wirkt CXCL10 hemmend.

Auch CXCL9 zählt neben CXCL10 und CXCL11 zu den Angiogenese hemmenden Chemokinen, die durch Interferon- α , β und γ hochreguliert werden. Alle drei Chemokine entfalten ihre Wirkung über den Rezeptor CXCR3, der vorwiegend auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird. CXCL 9 und CXCL 10 wirken inhibierend auf Neovaskularisation, hämatopoetische Stammzellen und Tumorwachstum.

Für die Entwicklung eines ACS spielen somit auch entzündliche Prozesse im Blut eine bedeutende Rolle. Es handelt sich hierbei um die simultane Aktivierung entzündlicher und prothrombotischer Signaltransduktionskaskaden im peripheren Blut von Patienten mit ACS.

Durch die Nekrose von Myozyten kommt es im Rahmen einer Akut-Phase-Reaktion zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α , worauf die Leber mit einer gesteigerten CRP-Bildung reagiert. Durch die myokardiale Inflammation als Reaktion auf eine Ischämie und Nekrose folgt nun eine systemische Inflammation.

Dabei kommt der Reperfusion eine wichtige Rolle zu. Trotz rechtzeitiger Wiederherstellung der Sauerstoffzufuhr kommt es zu einer Zunahme des Gewebeschadens. Durch den Mangel an Sauerstoff verliert die Zelle ihre Fähigkeit Adenosintriphosphat (ATP) zu synthetisieren und kann schließlich das Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Raum nicht mehr aufrecht erhalten. Es kommt zu einem Verlust von wichtigen Ionen und Enzymen in den Extrazellulärraum ("cellular leakage"), während andererseits Calcium, Ionen und freies Wasser

in die Zelle strömen und so zur Schwellung der Zelle führen. Während der Ischämie kommt es außerdem zur Bildung von hochreaktiven freien Sauerstoffradikalen (156). Wird das verschlossene Koronargefäß rekanalisiert, kommt es durch den Blutfluss zu einem Auswaschen wichtiger Enzyme, durch den gestörten Calciumstoffwechsel zu einem Verlust der Kontraktilität des Myokards und möglicherweise zu lebensgefährlichen Herzrhythmusstörungen. Die schwer geschädigten Zellen sind nicht in der Lage den jetzt wieder vorhandenen Sauerstoff zu verarbeiten, wodurch zusätzlich freie Sauerstoffradikale entstehen. Dies setzt durch Komplementaktivierung und Zytokine eine Entzündungskaskade in Gang, wodurch es zu einer Aktivierung von Leukozyten, zur Infiltration des Gewebes u.a. durch Neutrophile, zu einem Ödem des betroffenen Gewebes, zu Schäden an den kleinen Blutgefäßen und zu einer Verstopfung der Mikrozirkulation durch Thrombozyten und Leukozyten ("microvascular plugging") kommt. Das Gewebe profitiert trotz Rekanalisation der Koronararterie nicht von der Sauerstoffzufuhr, was als „Low“ bzw. "No Reflow“-Phänomen bezeichnet wird (40). Ein solches Szenario ist bei etwa einem Drittel der primär mit PTCA behandelten Patienten mit akutem Myokardinfarkt zu beobachten. Die Infiltration der Neutrophilen in das Myokard wird dabei durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. Wesentlich ist dabei die Interaktion von CD11b mit ICAM-1 (162).

Um Patienten mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bzw. einen schlechten Verlauf bei eingetretenem Ereignis zu identifizieren und einer geeigneten Therapie zuzuführen ergibt sich die Notwendigkeit zur Etablierung zusätzlicher inflammatorischer Biomarker. Es finden sich lediglich bei 22-50% der Patienten mit einem ACS erhöhte Konzentrationen von Troponin im Serum (6). Darüber hinaus haben troponinnegative Patienten immer noch ein Risiko von 8,4% für Tod oder nicht tödlichen Myokardinfarkt innerhalb von 6 Monaten nach ACS (149). Erhöhte CRP-Konzentrationen stellen bei Patienten mit troponinnegativem ACS einen additiven Risikofaktor dar und identifizieren Patienten mit einer schlechten Kurz- und Langzeitprognose (88). Bei Patienten mit ACS, welche einer frühen Revaskularisierung zugeführt werden, ist CRP ebenfalls prädiktiv für die langfristige Mortalität (104). Da die Nekrose von Myozyten an sich eine Akute Phase-Reaktion der Leber mit gesteigerter CRP-Bildung bewirkt, weisen Patienten mit positivem Troponin signifikant höhere CRP-Konzentrationen auf als solche mit negativem Troponin (56). Inwieweit diese gesteigerte CRP-Freisetzung zur Aggravierung des Krankheitsverlaufes beiträgt, ist derzeit unklar. Die Analyse der GUSTO-IV-ACS Studiendaten weist darauf hin, dass die besondere Bedeutung von CRP

insbesondere in der langfristigen Prognoseabschätzung (>1 Jahr) von Patienten mit ACS zum Tragen kommt (68).

Weitere Untersuchungen zeigten einen engen Zusammenhang zwischen ACS, erhöhten CRP-Spiegeln sowie einer eingeschränkten endothelabhängigen Gefäßregulation, die als solches auch ein unabhängiger Prädiktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse ist (36).

Aufgrund des engen pathophysiologischen Zusammenhangs von Inflammation und Atherosklerose liegt es nahe, Marker der Entzündung zur Diagnostik und Risikoabschätzung bei Patienten mit verschiedenen Stadien der KHK einzusetzen.

1.5 Zytokine und ihre Funktion

Zytokine vermitteln die Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems und den restlichen Organen des menschlichen Körpers (141) und sind für eine normale Entwicklung und die Aktivierung des Immunsystems essentiell. Zytokine sind an der Ontogenese, Gewebereparatur, Immunabwehr, Entzündungsreaktion, Kontraktilität in Herz und Gefäßen, Aufrechterhaltung der Körperprozesse und des Zellsterbens beteiligt.

Dysregulierte Zytokine können Ursache von Immunerkrankungen sein. Diese Erkenntnis führte zu der Hypothese, dass eine gezielte Manipulation des Zytokinnetzwerkes eine gezielte Manipulation des Immunsystems erlauben könnte. Grundsätzlich sind hier zwei gegensätzliche Ansätze denkbar, die Substitution von fehlenden Zytokinen mithilfe von rekombinanten Proteinen und die Hemmung von Zytokinen. Erste therapeutische Ansätze wurden mit rekombinant hergestellten, aber unveränderten Zytokinen durchgeführt. Das Zytokin IL-2 wird in der Tumortherapie eingesetzt (67), der Granulozyten-stimulierende Faktor (G-CSF) wird zur Stammzellmobilisierung verwendet und rekombinantes Erythropoetin (EPO) wird zur Steigerung der Bildung der roten Blutkörperchen eingesetzt. Die Funktion der Zytokine wird durch die Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor, den darauf folgenden Signalweg und die anschließende Genaktivierung definiert.

Wie wir heute wissen, kommt den Indikatoren einer systemischen Entzündungsreaktion (Akutphase-Proteine, C-reaktives Protein (CRP), Zytokine, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)) bei der koronaren Herzerkrankung (KHK) eine prognostische Aussagekraft zu. Proinflammatorisch wirksame Zytokine sind zentrale Mediatoren der natürlichen Immunabwehr und werden bei einer Reihe von kardialen Erkrankungen erhöht im Blut gefunden. Bei plötzlich auftretenden Prozessen wie dem akuten Koronarsyndrom mit Herzinfarkt und instabiler Angina pectoris, der septischen Kardiomyopathie, wurden ebenso

wie in chronischen Situationen wie der stabilen Angina pectoris und der Herzinsuffizienz erhöhte Konzentrationen von inflammatorischen Markern gemessen (14, 122, 123).

Hierbei muß zwischen Ursache und Wirkung von erhöhten inflammatorischen Markern differenziert werden. Von der Entzündungsreaktion im Rahmen der Plaquettenstehung ist die inflammatorische Reaktion abzugrenzen, die einem akuten Myokardinfarkt folgt. In beiden Situationen sind inflammatorische Marker erhöht und können zum einen die Entzündung unterhalten, aber auch positive Wirkungen ausüben indem Heilungsprozesse induziert werden, im Sinne von Narbenbildung und Angiogenese.

Man unterscheidet vier Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktor und Kolonie-stimulierende Faktoren.

Interferone werden in Typ I-Interferone (IFN- α , IFN- β , IFN- τ , IFN- ω) und Typ II-Interferone (IFN- γ) unterteilt. Für IFN- α sind zahlreiche Subtypen bekannt. Typ I-Interferone werden als antivirale Zytokine und Typ II-Interferone als immunmodulatorische Zytokine mit antiviraler Aktivität angesehen. Neben der antiviralen Aktivität, die u.a. durch die Aktivierung von natürlichen Killerzellen zustande kommt, wird den Interferonen eine antiproliferative Aktivität zugeschrieben. Interferon- γ kann Makrophagen aktivieren und wurde früher auch als „macrophage activating factor“ (MAF) bezeichnet. Darüber hinaus können alle Interferone Moleküle der MHC-Klasse I („major histocompatibility class I“) induzieren. IFN- γ induziert die Expressierung der MHC-Klasse II und kann die Antigenpräsentation beeinflussen.

Interleukine werden als Mediatoren angesehen, die in erster Linie Funktionen im Immunsystem und zwischen Leukozyten vermitteln. Heute sind 23 verschiedene Interleukine bekannt. IL-18 ist ein von Monozyten hergestelltes Zytokin, das zur IL-1 Familie gehört und in Zusammenarbeit mit IL-12 die IFN- γ Produktion stimuliert. Die Funktionen der Interleukine reichen über die Stimulierung der Produktion weiterer Zytokine, zahlreicher anderer Mediatoren oder der Proliferation, bis hin zur Expressierung von Membranenzymen (124).

Die Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSF) wurden ursprünglich als Faktoren angesehen, die in der Hämatopoese die Differenzierung und Proliferation von Vorläuferzellen regulieren. Zu dieser Gruppe gehört der Granulozyten-stimulierende Faktor (G-CSF), der Makrophagen-stimulierende Faktor (M-CSF) und der Granulozyten/Makrophagen-stimulierende Faktor (GM-CSF), der die antimikrobielle Aktivität von Neutrophilen und die Zytokinproduktion von Monozyten stimuliert.

1.5.1 Tumornekrosefaktor

Neben dem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) gehört auch der TNF- β , auch als Lymphotoxin- α_3 bezeichnet zu dieser Zytokinfamilie. Mittlerweile werden eine Reihe weiterer Mediatoren (CD30L, CD40L, CD95L, TRAIL (TNF receptor-associated factors) oder NGF (nerve growth factor)) dieser Familie zugeordnet. Die Aktivitäten dieser Zytokine sind weit gespannt, sie reichen von der Immunregulation (z.B. TNF- α , CD40L), über die Regulierung der Lymphknotenentwicklung (Lymphotoxin- α_1/β_2), bis hin zur Antitumorwirkung (TNF- α) oder Apoptose-Auslösung (z. B. TNF- α , TRAIL).

Die potentielle Bedeutung des TNF bei kardialen Erkrankungen und insbesondere bei der chronischen Herzinsuffizienz geht daraus hervor, dass bestimmte pathophysiologische Phänomene der chronischen Herzinsuffizienz durch TNF imitiert werden können. So ist gesichert, dass der Tumornekrosefaktor (TNF) kardiodepressive Wirkungen entfaltet, sowohl im Tiermodell in vivo, als auch im Experiment in vitro (114). TNF führt nach intravenöser Gabe im Säugetierorganismus zu einer Funktionseinschränkung des Herzens. In transgenen Tiermodellen entwickelten Mäuse mit robuster kardialer Überexpression von TNF eine letale Myokarditis, während eine moderate Überexpression das klinische Bild einer dilatativen Kardiomyopathie auslöste. Diese Befunde belegen, dass TNF nicht nur als Immunzellmediator mit endokriner Wirkung, sondern auch über para- oder autokrine Mechanismen kardiodepressiv wirken kann.

Experimentelle Daten weisen darauf hin, dass die kardiodepressiven Effekte von TNF in hohen Konzentrationen über den Stickoxid (NO)-Stoffwechsel vermittelt werden (Induktion der Kalzium-unabhängigen NO-Synthase (iNOS), konsekutive Aktivierung der Guanylatzyklase durch NO und damit Erhöhung des cGMP). Unter Anwendung pathophysiologisch relevanter TNF-Konzentrationen konnte im neonatalen Rattenkardiomyozytenmodell eine NO-unabhängige Kardiodepression nachgewiesen werden (Suppression des Kalziumstroms (100), der Phosphatidylinositolbiphosphat-Synthese (92) und der α - und β -Adrenozeptor-stimulierten Kontraktilitätszunahme (99)). Kardiomyozyten sind darüber hinaus nicht nur Effektorzellen für Zytokine, sondern können selbst Zytokine synthetisieren. So kann der TNF die Freisetzung anderer inflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-6 aus Kardiomyozyten stimulieren, welches synergistisch mit TNF wirken kann (163). Die Wirkung von TNF auf das Herz beschränkt sich jedoch nicht allein auf die Kardiodepression, experimentelle Daten belegen ein potentiell günstiges antiarrhythmisches und trophisches Potential des TNF am Kardiomyozyten (118) sowie eine protektive Wirkung bei Ischämie (80).

1.5.2 Wachstumsfaktoren

Ein Wachstumsfaktor ist eine natürlich vorkommende, lösliche Substanz, die das Wachstum und die Teilung von nicht hämatopoetischen Zellen beeinflussen kann, indem sie spezifisch an bestimmte zelluläre Rezeptoren bindet und dadurch Signale in das Zellinnere überträgt. Wachstumsfaktoren wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Transforming Growth Factor (TGF- β) und Insulin Like Growth Factor (IGF) spielen eine zentrale Rolle für die Regulation der Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen des Bindegewebes wie z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, aber auch für die an entzündlichen Prozessen beteiligten Zellen des Immunsystems.

Bisher wurde diesen Wachstumsfaktoren eine zentrale Rolle vor allem in der Pathophysiologie des Tumorwachstums zugeschrieben. Hier hat insbesondere der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren, die wichtige Signaltransduktionswege der Wachstumsfaktoren blockieren, zu wesentlichen Fortschritten in einigen Bereichen der Tumorthherapie geführt. Neuere Untersuchungen sprechen für eine wesentliche Rolle dieser Faktoren auch in der Pathophysiologie rheumatischer Erkrankungen.

PDGF ist ein peptidischer Wachstumsfaktor der von zahlreichen Zelltypen inklusive Thrombozyten, Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen sezerniert wird und als Mitogen für Zellen mesenchymalen Ursprungs fungiert (58). PDGF ist ein dimeres Protein, das aus jeweils zwei der vier bekannten homologen Ketten (A, B, C, D) besteht, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und sowohl Homo- (PDGF-AA, PDGF-BB) als auch Heterodimere (PDGF-AB) bilden (129). Alle PDGF-Formen werden im endoplasmatischen Retikulum als inaktive Vorstufen synthetisiert und müssen durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form übergeführt werden. Expressionsanalysen in multiplen Geweben zeigten, dass die vier PDGF-Ketten ubiquitär exprimiert sind, jedoch weist jedes Gen ein spezifisches, z.T. überlappendes Expressionsmuster auf. Alle PDGF-Isoformen werden sowohl im Herzen, als auch in der Gefäßwand exprimiert (42). PDGF reguliert die Proliferation, Migration, Differenzierung und Transformation zahlreicher Zelltypen und ist an der Regulation der Genexpression und Apoptose sowie der O₂-Radikal-Bildung beteiligt (80,155). Die Ligandenbindung der PDGF-Isoformen führt zur Dimerisierung von 2 Rezeptoruntereinheiten (PDGF- α / β) mit konsekutiver Erhöhung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität und Autophosphorylierung des Rezeptors. Die unterschiedliche Aktivierung einzelner Rezeptorsubtypen ist von Bedeutung, da sich die beiden PDGF-Rezeptortypen sowohl hinsichtlich ihrer Signaltransduktionskaskaden als auch ihrer

biologischen Eigenschaften unterscheiden. Die Bindung spezifischer Signaltransduktionsmoleküle an phosphorylierte Tyrosine führt zur Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden, welche selektiv PDGF-induzierte zelluläre Reaktionen vermitteln, wie Proteinsynthese, Migration und die Induktion von „immediate early genes“ (IEGs) (63).

Seit seiner Identifizierung durch Senger und Ferrara, stellt der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-A (*VEGF-A*), auch bekannt als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF), einen der meist studierten Regulatoren des vaskulären Systems dar (34). Inzwischen sind neben *VEGF-A* andere Wachstumsfaktoren beschrieben die untereinander eine hohe strukturelle und funktionelle Homologie aufweisen und als Familie der *VEGF*-Moleküle mit *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGF-E* und plazentarer Wachstumsfaktor (PLGF) bezeichnet werden (112).

VEGF-A ist ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 35-45 kDa. Bisher wurden in humanen Zellen mindestens 6 verschiedene Isoformen identifiziert, die durch alternatives Spleißen der Vorläufer-mRNA aus einem einzelnen Gen hervorgehen. Ein wesentlicher biochemischer und letztlich funktioneller Unterschied der Isoformen besteht in ihrer Bindungseigenschaft an extrazellulär Matrixmoleküle und ihre unterschiedliche Affinität zu den *VEGF*-Rezeptoren (62). Die Expression von *VEGF-A* wird sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Translationsebene reguliert. Als wichtige Regulationsfaktoren gelten der Sauerstoffpartialdruck, Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine, proinflammatorische Mediatoren ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, Prostaglandine) und auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die Wirkung der *VEGF*-Proteine wird durch membranständige Rezeptoren der Tyrosinkinasefamilie $\text{VEGFR}_{1/2/3}$ vermittelt. Zusätzlich findet eine Regulation *VEGF*-vermittelter Effekte über die Korezeptoren Neuropilin $_{1/2}$ und Heparansulfatproteoglykan statt. Die Proteine der *VEGF*-Familie binden mit unterschiedlicher Affinität an die *VEGF*-Rezeptoren. Während VEGFR_1 und VEGFR_2 im Wesentlichen die Vaskulogenese, Angiogenese, Rekrutierung hämatopoietischer Vorläuferzellen und Monozyten regulieren, steuert VEGFR_3 Prozesse der Lymphangiogenese. Die *VEGF* Rezeptoren werden überwiegend auf proliferierenden Endothelzellen exprimiert, wurden aber auch auf inflammatorischen Zellen (Neutrophile Granulozyten, Makrophagen, T-Zellen), hämatopoetischen Vorläuferzellen und Perizyten nachgewiesen.

Zusätzlich gilt *VEGF-A* als ein Schlüsselmediator in der Regulation der Gefäßpermeabilität, inflammatorischer Prozesse und der Rekrutierung hämatopoetischer und vaskulärer Vorläuferzellen. In zahlreichen experimentellen Modellen konnte für *VEGF-A* eine essenzielle Rolle in physiologischen Prozessen wie der Wundheilung und Reproduktion, aber auch in

pathologischen Prozessen, insbesondere der Tumorgenese, kardiovaskulären Erkrankungen, diabetischer Retinopathie, Erkrankungen der weiblichen Reproduktionsorgane und chronisch-entzündlicher Erkrankungen, nachgewiesen werden (59).

Für das kardiovaskuläre System kann festgehalten werden, dass VEGF-A ein positiver Regulator der Endothelzellfunktion und der Angiogenese ist durch die Freisetzung von NO (79) sowie durch die Induktion der Proliferation und Migration von Endothelzellen (158). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass VEGF-A die Expression zahlreicher Proteine modulieren kann (eNOS, iNOS, MCP-1, Wachstumsfaktoren) (78), die direkt oder indirekt an der Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese beteiligt sind. VEGF-A ist weiterhin ein wichtiger Mediator inflammatorischer Prozesse und vermutlich auch der Arteriogenese, da es Monozyten chemotaktisch aktivieren kann (24). Monozyten können durch MCP-1 und VEGF-A chemotaktisch angelockt werden und über die Produktion von Wachstumsfaktoren die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen induzieren. Diese Effekte können durch eine VEGF-A induzierte Hochregulation der MCP-1-Expression verstärkt werden (95).

In den letzten Jahren wurden Konzepte entwickelt, die sich mit der möglichen therapeutischen Anwendung von VEGF-A im kardiovaskulären Bereich beschäftigen. Zum einen handelt es sich um „therapeutische Angiogenese“, darüber hinaus befindet sich das Konzept der Prävention der Restenose durch Induktion der Reendothelialisierung mittels VEGF-A in Erprobung (82).

Neben diesen positiven Funktionen von VEGF-A für das Endothel und das Gefäßwachstum wurde jedoch auch in den letzten Jahren diskutiert, dass VEGF-A eine Rolle bei der Plaqueangiogenese spielen könnte (110). Die Bildung von Plaques in den Gefäßen kann zur Induktion von VEGF-A und damit zur Angiogenese führen, da auf dem Boden von atherosklerotischen Plaques hypoxische Areale entstehen können (65). Dies wiederum induziert die Bildung von Kapillaren mit dem Resultat der Destabilisierung der Plaques bis hin zur Plaqueruptur mit dem nachfolgenden Ergebnis einer akuten Gewebeischämie.

1.5.3 Chemokine

Als Chemokine bezeichnet man chemotaktisch wirkende Zytokine, die von dendritischen Zellen und Gewebezellen sezerniert werden. Es handelt sich um relativ kleine Proteine, aus ca. 70-80 Aminosäuren, die über ein Molekulargewicht von 8-14 kDa verfügen. Man unterscheidet vier Familien von Chemokinen: die C-, CC-, CXC- und CX₃C-Chemokine, je nach relevanten

Zysteinen und Vorhandensein und Anzahl von Aminosäuren zwischen den ersten beiden Zysteinen (90).

Chemokine können Leukozyten anlocken und aktivieren und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Regulation einer gerichteten Leukozytenwanderung bei Entzündungsprozessen.

Um die Rolle der Chemokine bei Entzündungsreaktionen zu verstehen, muß man die Zusammenhänge der Interaktion von Leukozyten und Endothel genauer betrachten. Im Rahmen einer Entzündung werden von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen Chemokine ausgeschüttet, die von Endothelzellen präsentiert, ein Signal für „rolling leukocytes“ darstellen (16). Diese ausgeschütteten Chemokine sind dann im Sinne eines sich selbstverstärkenden Regelkreises für die weitere Sekretion von Chemokinen und für die Hochregulation chemokinpräsentierender Strukturen auf den Endothelzellen verantwortlich.

Das aktiviert chemotaktisch wirkende Protein des Komplementsystems C5a kann in diesem Prozess auch die vermehrte endotheliale Expression von P-Selektinen induzieren. Zusätzlich werden auf Leukozyten Chemokin vermittelt Integrine hochreguliert (62). Dies führt zu einer festen Bindung von Leukozyten an das Endothel und schafft damit die Grundlage für ihre Extravasation. Durch die Fähigkeit der Chemokine über Heparansulfat enthaltende Proteoglykane an die endotheliale Zell-Matrix zu binden, fungieren sie auch als direkte leukozytäre Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche von Endothelzellen (8).

Durch Chemokine hochregulierte und aktivierte Matrix-Metalloproteinasen sorgen für eine Lyse der Basalmembran, ein Vorgang, der wiederum die Transmigration der Leukozyten erleichtert (74). Durch all diese Mechanismen wird die Transmigration immunkompetenter Zellen aus den Kapillaren ins betroffene Gewebe von chemotaktisch wirkenden Zytokinen ermöglicht und verstärkt.

Chemokine wirken auch auf die Angiogenese ein, dabei sind solche, die das „ELR-Motiv“ enthalten (IL-8, CXCL1, CXCL5) bedeutende Angiogenese fördernde Faktoren und Chemokine ohne „ELR-Motiv“ (IP 10, CXCL9, CXCL11) Angiogenese hemmende Faktoren. Das „ELR-Motiv“ wird durch die Aminosäuresequenz Glutamin-Leucin-Arginin vor dem ersten Zysteinrest bestimmt.

Nach einem akuten Myokardinfarkt wird die Expression von Chemokinen in der Heilungsphase deutlich hochreguliert. Chemokine steuern die Leukozyteninfiltration und Aktivität und regulieren die Angiogenese und den Abtransport von fibrösem Gewebe. Dabei nimmt das CC-Chemokin Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) eine bedeutende Rolle ein. MCP-1 negative Mäuse zeigten in Studien eine verminderte Infiltration und Aktivierung von Makrophagen, eine unterdrückte Zytokinsynthese, eine verspätete Phagozytose

abgestorbener Kardiomyozyten, eine verminderte Akkumulation von Myofibroblasten und ein vermindertes ventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt (108). CXC Chemokine wie Interleukin 8 werden ebenfalls in der Heilungsphase nach Myokardinfarkt induziert und könnten die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und die Bildung neuer Gefäße beeinflussen. Die Induktion des Angiogenese hemmenden Chemokins CXCL10 hingegen könnte dazu dienen, eine vorzeitige Angiogenese zu verhindern, bevor das verletzte Myokard von abgetöteten Zellen befreit und eine fibrinreiche Matrix gebildet ist.

Tabelle 1: CXC-Chemokine und ihre Rezeptoren

Name	Ligand (human)	Ligand (murin)	Chemokinrezeptor
CXCL1	GRO α	GRO/MIP-2/KC?	CXCR2>CXCR1
CXCL2	GRO β	GRO/MIP-2/KC?	CXCR2
CXCL3	GRO γ	GRO/MIP-2/KC?	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4	unbekannt
CXCL5	ENA-78	GCP-2/LIX?	CXCR2
CXCL6	GCP-2	GCP-2/LIX?	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	unbekannt	CXCR2
CXCL8	IL-8	unbekannt	CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG	MIG	CXCR3
CXCL10	IP-10	IP-10/CRG-2	CXCR3
CXCL11	I-TAC	I-TAC	CXCR3
CXCL12	SDF-1 α/β	SDF-1/PBSF	CXCR4
CXCL13	BCA-1	BLC	CXCR5
CXCL14	BRAK	BRAK	unbekannt
(CXCL15)	unbekannt	Lungkine	unbekannt
CXCL16	CXCL16	CXCL16	CXCR6
XCL1	Lymphotactin	Lymphotactin	XCR1
XCL2	SCM-1 β	unbekannt	XCR1
CX3CL1	Fractalkine	Neurotactin/ABCD-3	CX3CR1

Table 2: CC-Chemokine und ihre Rezeptoren

Name	Ligand (human)	Ligand (murin)	Chemokinrezeptor
CCL1	I-309	TCA-3/P500	CCR8
CCL2	MCP-1/MCAF	JE?	CCR2
CCL3	MIP-1 α	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL3L1	LD78 β	unbekannt	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
(CCL6)	unbekannt	C10/MRP-1	unbekannt
CCL7	MCP-3	MARC?	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	MCP-2?	CCR3, CCR5
CCL9	unbekannt	MRP-2, MIP-1 γ	
CCL10	unbekannt	CCF18	
CCL11	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
(CCL12)	unbekannt	MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4	unbekannt	CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1	unbekannt	CCR1, CCR5
CCL15	HCC-2/MIP 1 δ	unbekannt	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4/LCC-1	unbekannt	CCR1, CCR2
CCL17	TARC	TARC/ABCD-2	CCR4
CCL18	DC-CK1/PARC	unbekannt	unbekannt
CCL19	MIP-3 β /ELC-exodus-3	MIP-3 β /ELC-exodus-3	CCR7
CCL20	MIP-3 α /LARC/exodus-1	MIP-3 α /LARC/exodus-1	CCR6
CCL21	6Ckine/SLC/exodus-2	6Ckine/SLC/exodus-2	CCR7
CCL22	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	MPIF-1/CK β 8	unbekannt	CCR1
CCL24	Eotaxin-2/MPIF-2	MPIF-2	CCR3
CCL25	TECK	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	unbekannt	CCR3
CCL27	CTACK/ILC	ALP/CTACK	CCR10
CCL28	MEC	unbekannt	CCR3/CCR10

1.6 Endothelzellfunktion

Das Endothel ist die Zellschicht, die das Innere der Blutgefäße auskleidet und als erstes mit den zirkulierenden Mediatoren in Kontakt kommt. Endothelzellen stehen über Zellkontakte miteinander in Verbindung. Je nach Bedarf, Funktion und Ort, finden wir Endothelien mit unterschiedlichen Eigenschaften. Blutgefäße sind größtenteils mit einem lückenlosen Endothel ausgekleidet, das eine Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und umliegendem Gewebe bildet und den Stoff- und Gasaustausch zwischen diesen Kompartimenten reguliert. Solche Endothelien sind vor allem in Gefäßen zu finden, in denen ein geringer oder kontrollierter Stoffaustausch stattfindet. Ein bekanntes Beispiel ist die Blut-Hirn-Schranke im Gehirn. Umgekehrt sind in Geweben, die besonders hohe Stoffaustauschraten aufweisen, lückenhafte Endothelien vorherrschend. Derartige Gefäße ermöglichen den Austausch größerer Partikel und Zellen und sind hauptsächlich in der Leber, der Milz, in Teilen der Niere und im Darm zu finden.

Aufgrund seiner Lage zwischen Blutstrom und solidem Gewebe erfüllt das Endothel eine Reihe hochdifferenzierter Aufgaben. Diese betreffen vor allem die Regulation des vaskulären Tonus und die Aktivierung glatter Muskelzellen. Das Endothel kontrolliert die Permeabilität und Thrombogenität der Gefäße und kann inflammatorische und immunologische Prozesse modulieren. Diese Vorgänge werden durch eine Vielzahl von Molekülen gesteuert, die vom Endothel teilweise selbst gebildet werden, wie z.B. vasoaktive Substanzen (NO, Prostacyclin, Endothelin, Angiotensin II), Zytokine und Wachstumsfaktoren (PDGF, VEGF-A, bFGF, TGF- β , MCP-1), inflammatorische Modulatoren (ICAM, VCAM), hämostatische und thrombolytische Faktoren (t-PA, PAI-1, tissue factor). Aus klinischer Sicht hat sich der Begriff der „Endothelfunktion“ etabliert und beschreibt die Fähigkeit des Endothels, auf bestimmte pharmakologische und mechanische Stimuli eine Vasodilatation zu vermitteln (77).

Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sind in entscheidender Weise an der Regulation der Endothelfunktion beteiligt (159). Sie vermitteln die Proliferation und Migration von Endothelzellen und glatten Muskelzellen und können Monozyten chemotaktisch aktivieren. Wachstumsfaktoren modulieren die Gefäßpermeabilität und die Produktion extrazellulärer Matrix und sind in umfassender Weise an der Regulation von inflammatorischen, immunologischen, thrombolytischen und fibrinolytischen Prozessen des Endothels beteiligt.

Die lokale Regulation des Gefäßtonus erfolgt über ein Zusammenspiel von Substanzen mit vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Eigenschaften. Einer der wichtigsten Vertreter unter den Vasodilatoren ist das Stickstoffmonoxid (NO). NO wurde zunächst als

Endothelium derived Relaxing Factor (EDRF) beschrieben und wird aus einer der terminalen Guanidinogruppen des L-Arginin durch das Enzym NO-Synthase (NOS) gebildet. Die NOS gehört zu einer Gruppe von Proteinen, in der die endotheliale NOS (eNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die neuronale NOS (nNOS) vertreten sind. Die Aktivierung der NOS kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Neben der klassischen Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung ist vor kurzem eine Aktivierung über die Proteinkinase Akt beschrieben worden (30). Die Freisetzung von NO aktiviert die Guanylatzyklase in Endothelzellen und in glatten Muskelzellen, was die Freisetzung von cGMP (zyklisches Guanylatmonophosphat) induziert. Neben der Regulation des Gefäßtonus reguliert NO die Proliferation vaskulärer Zellen, die Expression von Wachstumsfaktoren und die Interaktion der Endothelzellen mit Leukozyten und Blutplättchen (20).

Dysfunktionen des Endothels sind Ursachen für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Arteriosklerose mit den Sonderformen der Restenose nach Angioplastie und der Transplantations-assoziierten Arteriosklerose. Arteriosklerotische Veränderungen führen zu regionalen Gewebeschämien. In der Folge können endogene Kompensationsmechanismen initiiert werden, die als Angiogenese (die Neubildung von Gefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen heraus) bzw. Arteriogenese (Wachstum präformierter Kollateralen in funktionell bedeutsame Kollateralen) bezeichnet werden. Die Gefäßneubildung ist ein adaptiver Prozess, um die reduzierte Perfusion eines Organs zu kompensieren und somit die funktionelle Vitalität der ischämischen Gebiete zu verbessern (138). Das Endothel spielt im Rahmen arteriosklerotischer Prozesse eine wichtige Rolle, sowohl bei Reendothelialisierung nach Ballonkatheterdilatation wie auch bei der Neovaskularisation als Folge einer Gewebeschämie. Neben den Funktionen bei der Strukturbildung und dem Stoffaustausch, erfüllen Endothelzellen auch eine Reihe synthetischer Aufgaben und produzieren verschiedene Proteine zum Aufbau der Basalmembran. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Kollagen IV, Laminin und das Heparansulfat-Proteoglykan.

Ein weiteres Charakteristikum der Endothelzellen ist der Besitz spezieller Vesikel, die auch als Weibel-Palade-Körperchen bezeichnet werden. Diese Organellen dienen der Speicherung einer Reihe von Proteinen, die in der frühen Phase der Blutgerinnung von den Endothelzellen sezerniert werden. Hierzu zählen der von-Willebrand-Faktor (vWF), Endothelin, P-Selectin und IL-8. Der von-Willebrand-Faktor bewirkt die Adhäsion von Blutplättchen, und P-Selektin ist verantwortlich für die Interaktionen mit Leukozyten an den betroffenen Gefäßwänden.

Endothelzellen bilden eine Barriere zwischen Blut und Gewebe. Sie stehen in direktem Kontakt mit Leukozyten, den Abwehrzellen des Blutes und bestimmen darüber, wann und wo

Leukozyten das System der Blutgefäße verlassen können, um in Infektions- und Entzündungsherde einzudringen. Die Abwehrzellen müssen im schnell strömenden Blut aus dem intakten Blutgefäß heraus innerhalb von Sekunden erkennen, dass sie sich durch entzündetes Gewebe bewegen. Dieses Erkennen wird durch Proteine vermittelt, die in entzündetem Gewebe auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert werden. Leukozyten erkennen diese Proteine, sind in der Lage, an ihnen Halt zu finden und wandern durch die Endothelbarriere und die darunterliegende Basalmembran hindurch (Diapedese) (157).

Endothelzellen haben somit die Fähigkeit, sich voneinander zu lösen, zu migrieren und Leukozyten den Durchtritt in Entzündungsgebiete zu ermöglichen.

1.7. Mechanismen der Entwicklung von Blutgefäßen

Das Blutgefäßsystem ist das erste Organ, welches im Rahmen der Embryonalentwicklung entsteht. Es ist essentiell für die weitere Organentwicklung und Nährstoffversorgung des Embryos. Die Bildung von Blutgefäßen während der Embryonalentwicklung wird als Vaskulogenese bezeichnet und beginnt mit der Differenzierung von Hämangioblasten aus dem Mesoderm, die sich dann zu zellulären Aggregaten (Blutinseln) formieren. Die innere Schicht dieser Blutinseln entwickelt sich zu hämatopoetischen Vorläuferzellen, während sich die äußere Zellschicht in primitive Endothelzellen differenziert. Im weiteren fusionieren die Endothelzellen und bilden ein vaskuläres Netzwerk, was sich letztlich zu einem komplexen vaskulären System entwickelt (siehe *Abb. 1*) (125).

Angiogenese bezeichnet den Prozeß der Bildung von Blutgefäßen überwiegend durch Aussprossen („sprouting“) oder Einstülpungen (Intusseption) von vorbestehenden Gefäßen (siehe *Abb. 1*) (72).

Ischämie ist für die Angiogenese ein Hauptstimulus. Die Angiogenese ist von erheblicher biologischer und medizinischer Bedeutung und spielt eine Schlüsselrolle in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen wie Wundheilung, Entwicklung von Kollateralkreisläufen bei Ischämie, diabetischer Retinopathie und dem Wachstum solider Tumoren.

Initial spielen besonders eine Stickstoffmonoxid (NO)-induzierte Vasodilatation und eine durch VEGF stimulierte erhöhte Permeabilität der Gefäße eine wichtige Rolle. Jüngste Daten zeigen, dass NO ein wichtiger Mediator der Angiogenese ist. Knock-out Mäuse mit fehlender NO-Synthase zeigten eine deutlich verschlechterte Ischämie-induzierte Angiogenese, die auch

durch die zusätzliche Gabe eines Angiogenesefaktors wie VEGF-A nicht verbessert werden konnte (103).

Initiiert wird die Angiogenese durch die proteolytische Degradation der Basalmembran, nachdem Metalloproteinasen und Plasminogen-Aktivatoren von Endothelzellen sezerniert werden. Die Sezernierung von Proteinasen und die Ablösung der aktivierten Endothelzellen von der Basalmembran sind somit wichtige Schritte in der Vorbereitung zur Endothelzellmigration. Es kommt zur Freisetzung und Aktivierung zahlreicher Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF, IGF-1), wobei die VEGF-Isoformen (A, B, C, D) und PLGF die Migration und Proliferation von Endothelzellen stimulieren. VEGF erhöht die Permeabilität so, daß Plasmaproteine nun nach extravasal gelangen können. Die Enzyme lösen kleinste Löcher in bereits bestehende Gefäße, Matrixmetalloproteinasen lösen das Gewebe, welches die sich neu bildenden Gefäße umgibt auf. Obwohl eine erhöhte Gefäßpermeabilität eine Voraussetzung für die Angiogenese darstellt, kann eine enorme Leckage in Gefäßen zum Kreislaufkollaps, intrakranieller Hypertension und Erblindung führen. Angiopoietin (Ang) 1, ein Ligand des endothelialen Tie2 Rezeptors ist ein natürlicher Inhibitor der Gefäßpermeabilität und schützt die Gefäße vor Flüssigkeitsverlust, ohne ihre Morphologie zu verändern. Angiopoietin-2, ein Inhibitor von Tie2 Signalen könnte an der Loslösung der glatten Muskelzellen und der Matrix beteiligt sein (93).

Das Gefäß wird destabilisiert, Endothelzellen verlieren ihren engen Zellkontakt, können durch Proliferation und Migration in Richtung des angiogenen Stimulus gelangen und durch Fusion mit anderen Gefäßen ein neues Lumen bilden. Zahlreiche Wachstumsfaktoren wie die VEGF-Isoformen, PLGF, und ihre Rezeptoren VEGFR2, VEGFR3, Neuropilin-1, ein Korezeptor von VEGFR2, haben in dieser Situation spezifische Funktionen: VEGF und sein Rezeptor VEGFR2 bewirken embryonale, neonatale und pathologische Angiogenese und sind therapeutische Angriffsorte (45).

Nach der Bildung eines initialen endothelialen Plexus kommt es im weiteren Verlauf zur Stabilisierung durch glatte Muskelzellen und Perizyten. Dieser Schritt wird u.a. durch PDGF-B (platelet derived growth factor) und Angiopoietin (Ang-1) gesteuert. PDGF wirkt dabei als „chemoattractant“ für glatte Muskelzellen. VEGF stimuliert die Proliferation und Migration von Endothelzellen und fördert somit den Aufbau eines vaskulären Netzwerkes, Angiopoietin stabilisiert dieses durch Stimulation der Interaktion von endothelialen und periendothelialen Zellen. Zeitlich gesehen spielt Angiopoietin somit erst zu einem späteren Zeitpunkt eine bedeutende Rolle als VEGF. Die neugebildeten Kapillaren können durch Remodelingprozesse in größere Gefäße umgewandelt werden. Das Remodeling umfasst die Fusion und Regression

von Blutgefäßen, Änderungen im Lumendurchmesser und der Gefäßwanddicke, sowie die Ablagerung von extrazellulären Matrixkomponenten wie Elastin, Kollagen und Fibrillin (23).

Bei der Angiogenese handelt es sich somit um einen sehr komplexen Prozess, bei dem die zur Bildung der Gefäßwände notwendigen Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen u.a. durch den Wachstumsfaktor VEGF aktiviert werden. Hierbei wird das die Kapillare umgebende Bindegewebe verdaut und es erfolgt die Wanderung kleiner Zellausläufer in das Gewebe. Neue Kapillaren werden durch Migration und Proliferation von vorbestehenden Endothelzellen gebildet. Die wesentlichen Schritte in der Angiogenese beinhalten somit:

1. Proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix
2. Direkte Migration und Proliferation von Endothelzellen
3. Bildung neuer extrazellulärer Matrix
4. Formation der Gefäßstränge und Anastomose von neu gebildeten Gefäßen

Die Bildung von Blutgefäßen erfolgt überwiegend während der Embryonalentwicklung. Im adulten Organismus findet die Bildung von Blutgefäßen zyklisch in den Gefäßen des Reproduktionstrakts und während der Wundheilung statt. Unter pathologischen Bedingungen wie der Tumorprogression, der Inflammation und der Gewebischämie kommt es ebenfalls zur Neubildung von Blutgefäßen. Die überschießende oder fehlende Entwicklung von Blutgefäßen während derartiger pathologischer Prozesse kann zu Erkrankungen mit hohem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko führen (37).

Ein Beispiel für eine pathologisch vermehrte Neubildung von Blutgefäßen ist die Vaskularisierung solider Tumoren. Man geht davon aus, dass das Wachstum eines Tumors durch seine Blutversorgung limitiert wird. Wenn ein Tumor nicht in der Lage ist, die Bildung neuer Blutgefäße zu initiieren, um sich besser mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen, ist sein Wachstum limitiert. Viele Tumorzellen sind deshalb in der Lage, das Wachstum von Blutgefäßen über die Produktion und Freisetzung von Angiogenesefaktoren zu induzieren. Durch den Anschluß an das Gefäßsystem können sie in andere Bereiche des Organismus vordringen und Metastasen bilden. Die Hemmung der Neovaskularisierung von Tumoren stellt aus diesem Grund ein attraktives therapeutisches Ziel dar, um das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren zu verhindern (39).

Anders verhält es sich mit der Induktion der Angiogenese im minderperfundierten Gewebe. Fortschreitende Verschlüsse der Blutgefäße durch arteriosklerotische Veränderungen führen zu regionalen Ischämien. Ischämien sind in der Lage, einen adaptiven Mechanismus zu

induzieren, der als „kompensatorische Angiogenese“ bezeichnet wird und die funktionelle Vitalität des betroffenen Gebietes verbessern kann (30). Diese kompensatorischen Mechanismen verlaufen jedoch sehr langsam und können bei einem akuten Gefäßverschuß die betroffenen Gebiete nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgen. Ziel einer therapeutischen Beeinflussung ist in diesen Fällen die Induktion der Blutgefäßbildung unter der Verwendung angiogener Wachstumsfaktoren (38).

Arteriogenese ist das Wachstum präformierter Kollateralen in funktionell bedeutsame Kollateralen, wobei diese Arterien durch aktive Prozesse wie der Proliferation und des Gefäßumbaus aus kleinen Arteriolen entstehen. Hauptstimulus nach Gefäßverschuß ist der erhöhte Shearstress, der nachfolgend eine Reihe von Prozessen initiieren kann, darunter die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie die nachfolgende Invasion von Monozyten, deren Reifung zu Makrophagen und Freisetzung von Mediatoren. Diesen Vorgängen folgt dann die aktive Phase der Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Am Ende dieser Umbauprozesse resultiert eine funktionell relevante Kollaterale bzw. Arterie (137). Die Bildung von Kollateralen als Folge eines Gefäßverschlusses stellt die effizienteste Möglichkeit dar, um die Perfusion eines ischämischen Gebietes funktionell zu kompensieren, da nur Kollateralen, jedoch nicht Kapillaren in der Lage sind, ausreichende Mengen an Blut zu transportieren. Die therapeutische Bildung von Kollateralen mittels Wachstumsfaktoren sollte deshalb das Ziel zukünftiger Bemühungen sein, um eine adäquate Kompensation nach Gewebsischämie zu erzielen (74).

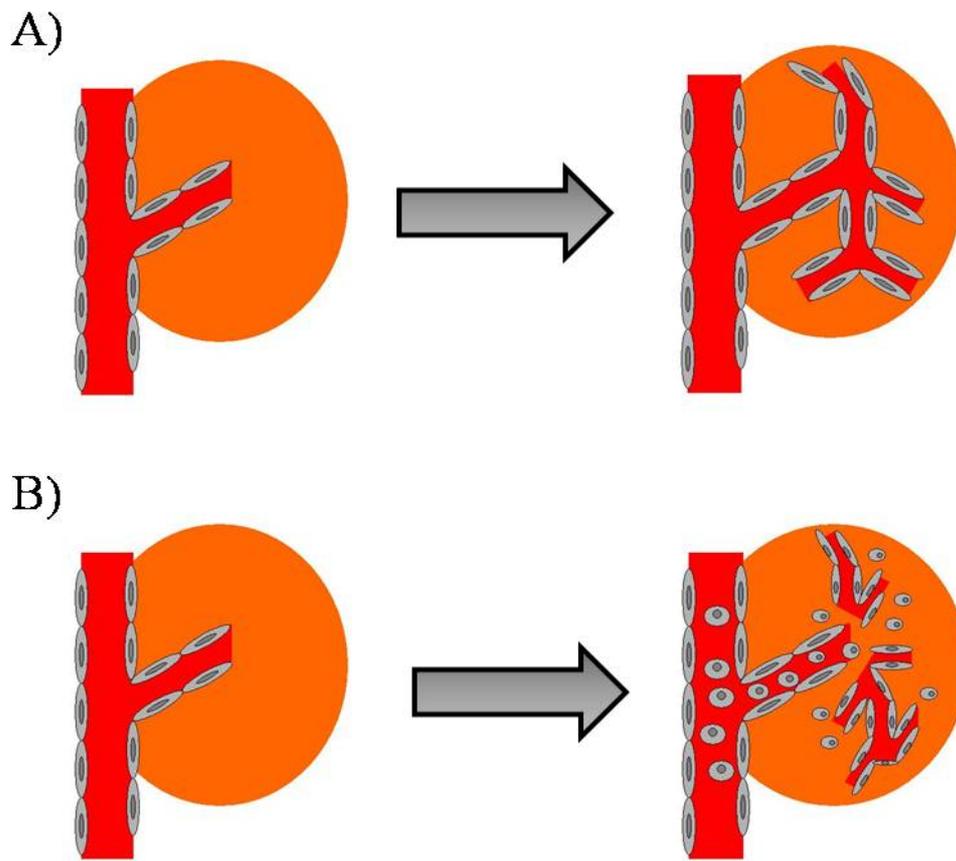


Abbildung 1:

A) Angiogenese: Bildung von Blutgefäßen durch Aussprossen aus vorbestehenden Gefäßen.

B) Vasculogenese: Endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wandern ins Gewebe ein und lagern sich in einem Netzwerk zusammen.

1.7.1 Migration

Die Migration von Zellen ist ein unter physiologischen und pathologischen Bedingungen stattfindender Prozeß. Er spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, bei Immunreaktionen, bei der Wundheilung, bei Entzündungsreaktionen, bei der Tumorentstehung einschließlich Metastasenbildung, sowie bei der Angiogenese.

Die Migration beginnt mit einer Protrusion oder Extension der Basalmembran am vorderen Teil der Zelle. Die Zellen ziehen sich über ein Netz an zytoskelettalen Aktinfilamenten vorwärts. Der adhäsive Komplex stabilisiert dabei diese Bewegung. Wenn die Zellen wandern, wachsen kleine Adhäsionskomplexe und strecken sich in längere, besser organisierte Komplexe. Schließlich wandert die Zelle indem sich die Adhäsion am hinteren Teil der Zelle löst (61). Auf diese Weise entsteht ein gewisser Rhythmus, am Ende der Zelle müssen die Befestigungen stetig gelöst werden, am vorderen Teil müssen neue Komplexe gebildet werden. Die Bedeutung der fokalen Adhäsionskomponenten wurde in Studien genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass ein Mangel an Scr-Kinase (75), „focal adhesion kinase“ (142) und calpain (64) (Adhäsionskomponenten) zu Migrationsdefiziten führt. Die Protrusion, die Bildung neuer Adhäsionen und das Stabilisieren von existierenden Adhäsionen wird über Mitglieder der Rho-Familie, besonders über die GTPasen Cdc42 und Rac reguliert (50). Extrazelluläre Matrixproteine sind ein wichtiger Stimulus für die Bewegung der glatten Muskelzellen, stärker noch als PDGF.

Prinzipiell unterscheidet man vier verschiedene Mechanismen der Migration. Die Chemokinese bezeichnet eine ungerichtete Migration ohne chemischen Stimulus, wohingegen Chemotaxis eine ungerichtete Migration in Richtung (positive Chemotaxis) oder weg (negative Chemotaxis) von löslichen chemischen Substanzen beschreibt. Unter Haptotaxis versteht man eine gerichtete Migration entlang eines substratgebundenen Konzentrationsgradienten oder eines Gradienten an extrazellulären Matrixproteinen.

Die Haptotaxis hat den größten Effekt auf die glatten Muskelzellen (106). Schließlich gibt es auch eine ziellose ungerichtete und spontane Zellmigration.

Die Matrixproteine (Laminin, Fibronectin, Kollagen I und IV) steuern die Zellmigration, indem sie zahlreiche intrazelluläre Signale aktivieren. Dieser Mechanismus ist wenig erforscht, es gibt jedoch viele Hinweise darauf, dass GTP-bindende Proteine (G-Proteine) eine wichtige Rolle spielen (163). Die Migration wird reguliert durch Kontraktion von Aktin und Myosin, Mikrotubulidynamik, G-Protein-Kaskade und Wechsel von Adhäsion und Protrusion.

1.7.2 Proliferation

Die Vermehrung von Zellen durch Zellteilungen ist eine Grundvoraussetzung für die Aufrechterhaltung des Lebens. Zellteilungen müssen streng kontrolliert werden, um aus einer Eizelle den komplexen Organismus zu bilden und ihn aufrecht zu erhalten. Dazu werden auch beim Erwachsenen kontinuierlich geschädigte oder abgestoßene Zellen durch Zellteilungen ersetzt. Eine fehlerhafte Regulation der Zellteilung führt beim Menschen zu verschiedenen hyper- oder hypoproliferativen Erkrankungen, die für das Entstehen von lebensbedrohlichen Erkrankungen verantwortlich sein können.

Bevor es zu einer Zellteilung kommt, werden mitogene und antiproliferative Signale gegeneinander abgewogen. Nur wenn die mitogene Stimulation überwiegt, führt dies zur Aktivierung der Zellzyklus-Maschinerie, die im Kern aus Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) besteht. Verschiedene mitogene oder antiproliferative Signale laufen auf Ebene der Regulation von CDK-inhibitorischen Proteinen zusammen. Diese Proteine binden und regulieren CDKs. Prinzipiell unterscheidet man schnell und langsam proliferierende Zellen. Das Proliferationspotential von Zellen wird dabei auch durch die Art des Stimulus der Proliferation beeinflusst und über Wachstumsfaktoren vermittelt.

Betrachtet man Endothelzellen so spielt die Proliferation eine wichtige Rolle bei der Angiogenese. Hierbei handelt es sich um einen komplexen Prozess, bei dem die zur Bildung der Gefäßwände notwendigen Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen vor allem durch den Wachstumsfaktor VEGF zur Proliferation aktiviert werden. Neue Kapillaren werden durch Migration und Proliferation von vorbestehenden Endothelzellen gebildet. Ischämie ist für die Angiogenese ein Hauptstimulus.

Für jede Teilung müssen Zellen ihre genetische Information vollständig verdoppeln und auf die Tochterzellen verteilen. Um die Präzision dieser beiden zentralen Prozesse sicherzustellen, läuft der Zellzyklus in eukaryotischen Zellen nach einem festgelegten Schema ab, das in vier aufeinanderfolgende Phasen gegliedert werden kann. Die Verdopplung der DNA in der Synthese oder S-Phase erfolgt zeitlich getrennt von der Verteilung auf die beiden Tochterzellen, die in der Mitose während der M-Phase stattfindet. Diese beiden Zellzyklus-Phasen werden durch Zwischenphasen oder so genannte Gap-Phasen getrennt. Die Gap-Phasen G1 und G2 ermöglichen die Kontrolle, ob eine vorhergehende Zellzyklus-Phase korrekt abgeschlossen wurde und keine Schädigung der genetischen Information vorliegt. In der ersten Gap-Phase G1 entscheidet die Zelle auch über den Beginn einer weiteren Zellteilung. Diese Entscheidung hängt von der Anwesenheit stimulierender (mitogener) Signale ab und kann

durch hemmende (antiproliferative) Signale verhindert werden. Beim Überwiegen antiproliferativer Signale kann die Zelle den Zellzyklus verlassen und in einen Ruhezustand, die G0-Phase eintreten. Bei mitogener Stimulation kann eine ruhende Zelle wieder in den Zellzyklus eintreten. Antiproliferative Signale können Zellen auch zur Differenzierung veranlassen und dazu führen, dass sie als hoch spezialisierte Zellen ihre Teilungen einstellen. Der Entschluss zu einer neuen Zellteilung ist eine unwiderrufliche Entscheidung zum Durchlaufen eines kompletten Zellzyklus und wird durch einen Abschnitt in der G1-Phase markiert, der Restriktionspunkt genannt wird. Kurz nach dieser Entscheidung beginnt die Zelle mit der Herstellung einer identischen Kopie ihrer Erbinformation und tritt damit in die zweite Zellzyklus-Phase, die S-Phase ein.

2. Zielsetzung

In dieser experimentellen Studie sollte die Wirkung von im Plasma befindlichen Mediatoren bei verschiedenen Ausprägungen der koronaren Herzerkrankung auf die Endothelzellfunktionen Migration, Proliferation und Angiogenese untersucht werden. Dazu wurden bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt (positives Troponin T und erhöhte Creatinkinase), instabiler Angina (positives Troponin T, keine Creatinkinaseerhöhung) und stabiler Angina (keine Troponin T und Creatinkinaseerhöhung) venöse Blutabnahmen vor perkutaner Koronarintervention (PCI) und 72-96 Stunden danach durchgeführt. Das Plasma wurde zur Stimulation von humanen Koronar-Endothelzellen (HCAEC) in funktionellen Assays verwendet.

Um Mediatoren zu identifizieren, die für Angiogenese, Proliferation oder Migration von Bedeutung sind, bestimmten wir mittels eines Immunoassays die Plasmakonzentration der Zytokine und Chemokine CXCL10, MCP-1, CXCL9, IL8, TNF, VEGF und bFGF.

Inwieweit die Effekte der Plasmaproben auf Endothelzellen mit klinischen Parametern korrelierten, untersuchten wir mittels Regressionsanalyse.

Unser Ziel war es somit, krankheitsspezifische Unterschiede im Plasma durch verschiedene Bioassays zu identifizieren. Inwieweit diese funktionellen Effekte der Plasmaproben auf die Endothelzellaktivierung für den klinischen Verlauf von Bedeutung sind, muß in einem größeren Patientenkollektiv untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

- TC-Platte 6 well, steril
Cellstar , greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
- 96- well-Platte, steril
Cellstar , greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
- Pipetten: Eppendorf Reference 100-1000µl
Multipipette
Eppendorf-Netheler, Hinz GmbH (Hamburg, Deutschland)
Falcon -Pipette 5, 10, 25 ml
Becton Dickinson Labware (New York)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße
Eppendorf-Netheler, Hinz GmbH (Hamburg, Deutschland)
- 10 ml, 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen
greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
- Cell Proliferation ELISA , BrdU (colorimetric)
Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Deutschland)
- In Vitro Angiogenesis Assay Kit
Chemicon International (California, USA)
- Cytometric Bead Array (CBA) Human Angiogenesis Kit
BD Biosciences Pharmingen (California, USA)
- Neubauerkammer und geschliffenes Deckglas
Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Stift: Lumocolor permanent NO.318 F
Staedtler (Chatsworth, USA)
- Geodreieck: 20cm
Rumold (Hannover, Deutschland)
- Zellkulturflaschen:
Sarstedt (Newton, USA)
- Monovette
- Zellscraper
- Software:
Word 2000, Exel 2000, Power Point 2000, SPSS (Microsoft Inc. (USA))

Axiovision und Sigma Scan Pro 5
Zeiss (Oberkochen, Deutschland)

3.1.1 Geräte

- Brutschrank: CO2-Auto-Zero
Heraeus GmbH (Hanau, Deutschland)
- Mikroskop: Akiover 100
Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
- Axiocam
Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
- Okular: E-PI 10x/20
Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
- Hoot: Hera Safe, Kendro Laboratory Products
Heraeus (Hanau, Deutschland)
- Megafuge 10R Kendro
Heraeus (Hanau, Deutschland)
- Zellzähler: Casey 1
Schärfe system (Reutlingen, Deutschland)
- Photometer
Bio Trak (Del Mar, USA)
- Durchflußzytometer "FacScan"
Becton-Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

3.1.2 Substanzen

- Isotone Kochsalzlösung
Pharmacia GmbH (Erlangen, Deutschland)
- Dubecco's phosphate buffered saline
Sigma (St.Louis, USA)
- Endothelial Cell Growth Medium / Low Serum
Promocell (Heidelberg, Deutschland)
- Endothelial Cell Growth Medium MV for microvascular endothelial cells

- Promocell (Heidelberg, Deutschland)
- Supplement Mix C-39215
- Promocell (Heidelberg, Deutschland)
- inaktiviertes, steril filtriertes FCS 50ml, Invitrogen
- Reagent Pack:

Hepes buffered saline solution	100 ml CC-5034
Trypsin / EDTA	100 ml CC-5012
Trypsin neutralizing solution	100 ml CC-5002
- Bio Whittaker / Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien)
- recombinant human VEGF (Positivkontrolle Angiogenese, Migration)
- 293-VE, R&D Systems (Wiesbaden-Nordenedstadt, Deutschland)
- recombinant human PDGF (Positivkontrolle Proliferation)
- C-PF010, Oncogene Research Products (San Diego, USA)
- Zellkulturen:
 - HUVEC : PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
 - HCAEC : PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
- CPDA Plasma
- Citrat Plasma
- EDTA Plasma
- Heparin

3.2.1 Studienprotokoll

Patienteneinschlußkriterien

In die Studie wurden 84 Patienten (81% männlich) im Alter von 32 bis 88 Jahren (Median 64 Jahre) aufgenommen, die mit Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom zur intensivmedizinischen Betreuung in das Deutsche Herzzentrum München (DHZ) eingeliefert wurden. Die Diagnose eines akuten Koronarsyndroms basierte auf der klinischen Symptomatik und erhöhten kardialen Markern, wobei ein positives Troponin T ($> 0,03$ ng/ml) und eine um das zweifache des maximalen Referenzwertes erhöhte Creatinkinase (CK) im Serum als akuter Myokardinfarkt (AMI) definiert wurde, darunter liegende Werte der Serum-CK wurden als instabile Angina Pectoris (IAP) definiert. Des Weiteren wurden 20 Patienten mit stabiler Angina pectoris aufgenommen, die zur elektiven PTCA mit Stentimplantation in das Deutsche Herzzentrum München aufgenommen wurden. Bei jedem Patienten erfolgte nach Einlieferung

in das DHZ eine koronarangiographische Diagnostik mit perkutaner transluminaler Koronarintervention (PCI).

Alle Referenzpatienten und alle Infarktpatienten erhielten periinterventionell die gleiche antithrombotische Medikation, bestehend aus 500 mg Aspirin intravenös, 5000 Einheiten Heparin intravenös und 600 mg Clopidogrel oral. Alle Patienten wurden über die Ziele, die wissenschaftliche Bedeutung und den Ablauf der Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Akuter Myokardinfarkt (AMI) n=43	Instabile Angina (IAP) n=21	Stabile Angina (SAP) n=20
Troponin T > 0,03 CK > mind. 2-facher maximaler Referenzwert <u>EKG</u> : ST-Hebungen von mind. 0,1 mV in zwei Extremitätenableitungen , oder mind. 0,2 mV in zwei Brustwandableitungen.	Troponin T > 0,03 CK < mind. 2-facher maximaler Referenzwert <u>EKG</u> : unspezifische Veränderungen (ST-Senkungen, negative T-Wellen)	Troponin T < 0,03 CK < 2-facher maximaler Referenzwert

Table 3 : Einschlusskriterien der Studienpopulation

Patientenausschlusskriterien

Als Ausschlußkriterien für die Beteiligung an der Studie der Patientengruppe galten:

1. kardiogener Schock (Links- oder Rechtsherzversagen),
2. Malignom,
3. weniger als 3 Monate zurückliegende Operationen oder Trauma,
4. zerebraler Insult innerhalb der letzten 3 Monate,
5. Einnahme entzündungshemmender Medikamente (Cortison, nichtsteroidale Antiphlogistika, Ausnahme Aspirin 100 mg/d)
6. akute oder chronische Infektionen
7. fehlende schriftliche Einwilligung in die Studie

3.2.2 Studiengruppe

Alle Patienten der Studiengruppen erhielten eine koronarangiographische Diagnostik und eine primärmechanische Rekanalisation durch perkutane transluminale Koronarintervention (PCI) mit Zugang über die Femoralarterie. Zwischen dem Auftreten der Symptome und der Intervention lagen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und instabiler Angina 2-8 Stunden. Jeder Patient der Studiengruppe erhielt vor Studienbeginn 500 mg Aspirin intravenös, 5000 Einheiten Heparin intravenös, 1-3 mg Metoprolol und 600 mg Clopidogrel sowie, in Abhängigkeit von der individuellen Antwort, 1 bis 2 mal 5 mg Morphin intravenös. Vom Zeitpunkt der Aufnahme im Deutschen Herzzentrum bis zur PCI erhielten die Patienten über einen Perfusor intravenös Nitroglycerin 0,24 – 2,4 mg pro Stunde, um einen systolischen Druck zwischen 100 und 120 mm Hg aufrecht zu erhalten. Zur Durchführung der Herzkatheteruntersuchung wurde in der rechten Femoralarterie eine Schleuse in „Seldinger“-Technik angelegt. Während der Herzkatheteruntersuchung erhielten die Patienten 10 000 Einheiten Heparin, zur Darstellung der Koronargefäße und der linken Herzkammer wurde das Röntgenkontrastmittel Imeron verwendet. Die Stentimplantation war bei allen Patienten der Studiengruppen erfolgreich, das postinterventionelle Procedere war in allen Studiengruppen gleich. Sobald die aktivierte partielle Thromboplastinzeit unter 80 Sekunden fiel wurde die arterielle Schleuse entfernt. Es erfolgte eine sorgfältige manuelle Kompression am Ort der Einstichstelle für mindestens 20 Minuten zur lokalen Blutstillung mit anschließendem zirkulärem Kompressionsverband, sowie eine engmaschige Kontrolle der Gerinnungsparameter. 24 Stunden nach der Stentimplantation wurde der Druckverband entfernt.

3.2.3 Blutentnahmen

Vor der Intervention und 72-96 Stunden postinterventionell wurden peripher-venöse Blutproben entnommen, die Abnahme unmittelbar vor PCI erfolgte arteriell aus der Katheterschleuse. Die Proben wurden auf Eis gekühlt, möglichst schnell nach unten beschriebenem Protokoll verarbeitet. Insgesamt wurden den Patienten 2 Monovetten CPDA-Blut je 9 ml, sowie je eine Monovette Citrat, EDTA und Serum abgenommen.

Die Proben wurden zunächst bei 3000 Umdrehungen/min für 10 Minuten zentrifugiert, bevor das Plasma unter sterilen Arbeitsbedingungen unter der Sterilbank in Reaktionsgefäße

aliquotiert wurde. Anschließend wurden die Proben bei -20°C kryokonserviert. Zur Stimulation der Endothelzellen in funktionellen Assays wurde das CPDA-Plasma verwendet.

3.2.4 Zellkultur

Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC)

Die humanen Koronar-Endothelzellen (Human Coronary Artery Endothelial Cells - HCAEC) stammten aus gesundem menschlichen Gewebe, das bei chirurgischen Eingriffen gewonnen wurde und über die Firma Promocell bezogen wurde. Wir verwendeten das für HCAEC empfohlene Medium „Endothelial Cell Growth Medium MV“ inklusive „Supplement Mix“ und 10% sterilem FCS (fetales Kälberserum) der Firma Invitrogen. Die Zellkulturflaschen wurden bei 37°C in einem CO_2 -Brutschrank inkubiert. Sobald der Zellrasen konfluent war, wurden die Zellen geerntet, gezählt und auf die entsprechende Endkonzentration verdünnt. Für die Versuche wurden die Zell-Passagen 4-9 herangezogen.

3.2.5 Angiogeneseassay

Bei dem „In vitro Angiogenesis Assay Kit“ der Firma Chemicon international handelt es sich um ein einfaches Angiogenese Modell, in welchem die Bildung und die Inhibierung von Tubuli (Röhrenstrukturen) durch exogene Signale in einem Zeitraum von 5-18h beobachtet werden kann. Um angiogeneseinhibierende bzw. aktivierende Prozesse zu beobachten, werden die Inhibitoren bzw. Stimulantien mit der Endothelzellsuspension vermischt und auf die wells aufgetragen.

Am ersten Versuchstag wurde das „Matrigel“ hergestellt. Die beiden Komponenten wurden über Nacht im Kühlschrank bei ca. 4°C auf Eis gelagert langsam aufgetaut. Dann wurden die Komponenten des Angiogenesekits „ECMatrix“ und „Diluent Buffer“ im Verhältnis 1:10 mit einer sterilen Pipettenspitze in ein gekühltes Reaktionsgefäß pipettiert und gemischt. Anschließend wurde in jedes well einer eisgekühlten 96 well Platte $50\mu\text{l}$ Matrigel pipettiert. Die 96 well Platte musste dann für mindestens 1 Stunde bei 37°C inkubiert werden, damit sich das Gel verfestigen konnte. Anschließend wurden die Zellen der jeweiligen Zelllinie geerntet: Als erstes nahm man das Medium ab, spülte einmal mit „Hepes buffer“, gab 5ml Trypsin/EDTA für 2 min auf die Zellen und neutralisierte dann mit 5ml „Trypsin Neutralisation Solution“. Alle drei für das Ernten der Zellen notwendige Substanzen wurden von der Firma Bio Whittaker/Cambrex Bio Science als Reagent Pack erworben. Danach wurden die Zellen

mit der Neubauerkammer gezählt, der Mittelwert bestimmt und die Menge an Medium berechnet, um 10 000 Zellen in 100µl Medium (Endothelial Cell Growth Media) aufzunehmen. Um auf eine Endkonzentration von 10 000 Zellen pro 100µl Medium zu kommen, gab man die errechnete Menge an Medium dem gewonnenen Zellpellett hinzu. Auf jedes well pipettierten wir 100µl Zelllösung. Als nächstes wurden die Verdünnungen der Stimulantien hergestellt. Hierzu verwendeten wir CPDA-Plasma von Patienten mit akutem Myokardinfarkt, instabiler Angina oder stabiler Angina pectoris in Konzentrationen von 10% und 50% in jeweils 100µl Lösung. Die 96-well Platte mit „Matrigel“, Endothelzellen, Medium und CPDA-Serum wurde nun für 12h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die wells mittels einer Mikroskopkamera (4er + 10er Objektiv) photographiert (Abb.2). Die Länge sowie die Anzahl der Verzweigungen der neugebildeten Tubuli (Röhrenstruktur) pro Gesichtsfeld wurde mit dem Computerprogramm Sigma Pro Scan 5 ausgemessen und in Pixel angegeben.

Versuchsordnung:

Versuch:	Zusätze pro well:
Negativkontrolle	10 000 Zellen / 100µl Medium + 99µl Medium + 1µl Heparin
Positivkontrolle	10 000 Zellen / 100µl Medium + 97µl Medium + 2µl VEGF (=1/100) + 1µl Heparin (=1/200)
CPDA-Serum (AMI / IAP / SAP / gesund) in :	
10%	10 000 Zellen / 100µl Medium + 79µl Medium + 20µl Plasma + 1µl Heparin (=1/200)
50%	10 000 Zellen / 99µl Medium + 100µl Plasma + 1µl Heparin (=1/200)

Tabelle 4: Versuchsordnung Angiogenese-Versuch: pro Patient, Blutabnahme und unterschiedlicher Plasmakonzentration wurden je zwei wells verwendet.

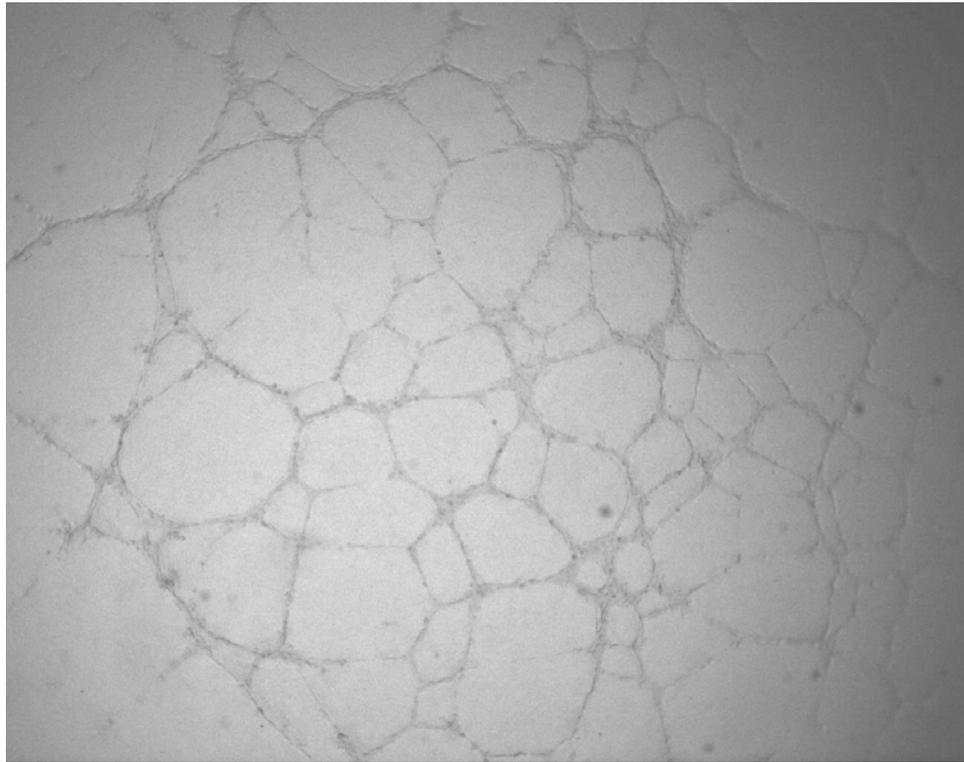


Abbildung 2: HCAEC Zellen auf ECMatrix, nach Stimulation mit Patientenplasma und 12h Inkubation bei 37°C. Vergrößerung 4-fach.

3.2.6 Migrationsassay (“Scratching- Versuch”)

Prinzip:

Die Versuchsanordnung lehnt sich an den Versuch der Wissenschaftler an der Universität von Toronto aus dem Jahre 2002 (Verma et al 2002) an. Dieser Versuch beruht auf dem einfachen Prinzip, die Zellen, nachdem sie auf der Platte angewachsen sind, anhand einer konkreten Grenze bei der Migration zu beobachten. Die quantitative Analyse besteht aus dem Auszählen gewanderter Zellen über diese gezogene Zellgrenze, sowie der fotografischen Erfassung der Migration.

Methodik:

Zuerst wurden auf einer 6-well-TC-Platte der Firma Cellstar Greiner Bio-one mit einem wasserfesten, dünnen Stift (Staedtler^R) zwei Linien von außen auf den Boden jedes wells im Abstand von 1,7 cm gezogen.

Dann wurden die Zellen der jeweiligen Zelllinie mit dem Reagent Pack geerntet und gezählt. Als erstes nahm man das Medium ab, spülte dann mit 5ml „Hepes buffer“, gab 5ml Trypsin/EDTA für 2 min auf den Zellrasen und neutralisierte dann mit 5ml „Trypsin Neutralisation Solution“. Alle drei für das Ernten der Zellen notwendigen Substanzen waren von der Firma Bio Whittaker/Cambrex Bio Science als Reagent Pack erhältlich.

Danach wurden 10 μ l Zellsuspension in die Neubauerkammer gegeben, vier Quadrate ausgezählt, der Mittelwert bestimmt und die Menge an Medium berechnet, um 200 000 Zellen in 2ml Medium zu lösen. Währenddessen zentrifugierten wir die geernteten Zellen in einem 50ml Falcon bei 1200 Umdrehungen pro Minute ab.

Um auf eine Endkonzentration von 200 000 Zellen pro 2ml Medium zu kommen, gab man die errechnete Menge an Medium dem gewonnenen Zellpellett hinzu. Auf jedes well pipettierten wir 2ml Suspensionslösung. Die Platte wurde dann 24h Stunden in einem CO2 Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 24h wurde die Fläche zwischen den beiden Linien auf dem Boden des wells mit einem „cellscraper“ entfernt (Abb. 3).

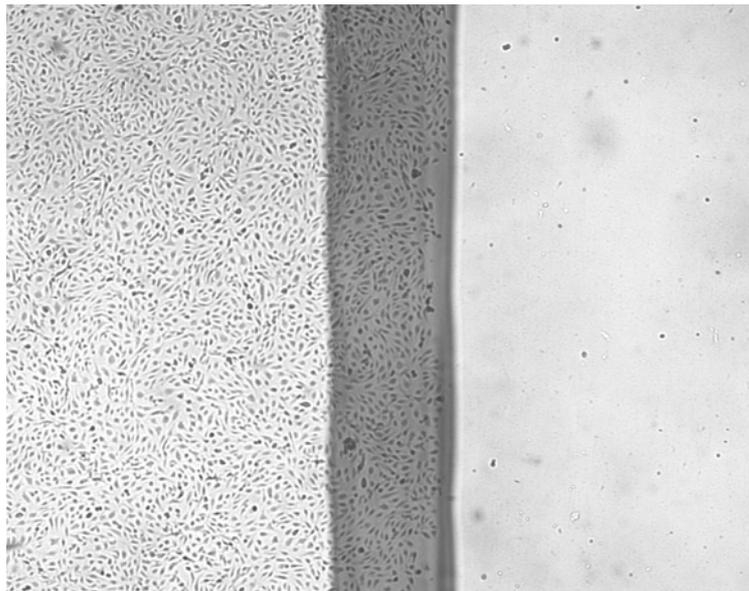


Abbildung 3: Foto eines well-Abschnitts nach „Scratching“, die Endothelzellen auf der rechten Seite der Markierung wurden mit Hilfe eines Zellschabers entfernt.

Die Kontrolle erfolgte unter dem Mikroskop. Die abgelösten Zellen wurden zwei mal mittels „Dubecco’s Phosphate Buffered Saline“ von Sigma gewaschen. Daraufhin konnten die Zellen mit den jeweiligen Stimulantien versehen werden. Zur Stimulation wurden nur noch 1,5ml Gesamtlösung pro well verwendet. Zusätzlich fotografierten wir die wells mittels einer Mikroskopkamera an markierten Stellen und inkubierten die Platte für weitere 24h im Brutschrank bei 37°C. Nach 24h wurden die wells an den markierten Stellen der gezogenen

Linien erneut photographiert. Die gewanderten Zellen wurden dann auf den übereinandergelegten Fotos ausgezählt.

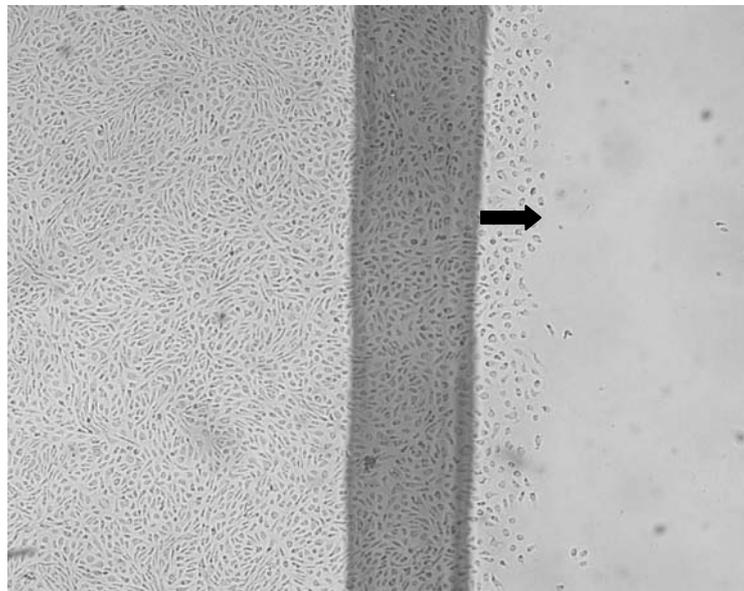


Abbildung 4: Foto nach „Scratching“, Stimulation mit Patientenplasma und 24h Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Die Endothelzellen sind von links nach rechts migriert. Der Pfeil zeigt die gewanderte Distanz an.

Versuch:	Zusätze pro well:
Negativkontrolle	200 000 Zellen / 1000µl Medium + 497µl Medium + 3µl Heparin (1/500)
Positivkontrolle	200 000 Zellen / 1000µl Medium + 482µl Medium + 15 µl VEGF (=1/100) 3µl Heparin (1/500)
CPDA-Serum (AMI / IAP / SAP) in 25%:	200 000 Zellen / 1000 µl Medium + 122µl Medium + 375µl CPDA Plasma + 3µl Heparin (=1/500)

Tabelle 5: Versuchsanordnung „Scratching“-Versuch: pro Patient, Blutabnahme und Plasmakonzentration wurden je zwei wells verwendet.

3.2.7 Proliferationsassay

Prinzip:

Der „Cell Proliferate ELISA, BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine)“ der Firma Roche Diagnostics GmbH basiert auf der Replikation der DNA bei der Proliferation der Zellen. Diese Replikation wird mittels Antikörper photometrisch erfasst (siehe Abb. 5, S.52).

Methodik:

Am ersten Versuchstag wurden die Zellen nach dem gleichen Prinzip wie zum Migrations- bzw. Angiogeneseassay geerntet und in einer Konzentration von 3000 Zellen in 200µl Medium pro well auf die 96-well Platte aufgetragen.

Nach 24 Stunden im Inkubationsschrank gab man die Stimulantien auf die Zellen. Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank gab man jeweils 10µl BrdU-Medium-Lösung im Verhältnis 1:100, d.h. 10µl BrdU + 990µl Medium, auf die Zellen, BrdU wurde nun als Pyrimidin-Analogon anstelle von Thymidin bei der DNA-Replikation eingebaut.

Die erneute Inkubation dauerte 24 Stunden, daran schloß sich das Absaugen des Mediums und das Fixieren mittels je 200µl FixDenat an. Dadurch wurde die DNA denaturiert, um die Bindung des Antikörpers zu ermöglichen. Die Platte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und die Anti-BrdU-Lösung vorbereitet, indem man das „Anti-BrdU-Pod“ in 1ml destilliertem Wasser 10 Minuten aufgelöst und gemischt wurde. Von dieser Lösung nahmen wir 100µl ab und verdünnten sie mit 10 ml Antikörperlösung. Nachdem das „FixDenat“ abgesaugt worden war, ließen wir 100µl pro well der so entstandenen Lösung für 90 Minuten auf die Zellen einwirken. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Waschlösung (10ml „Washing Buffer Concentrate“ + 90ml destilliertes Wasser) drei Mal mit jeweils 200-300µl Lösung pro well gewaschen. Nach dem Abklopfen der Platte wurde 100µl der Substratlösung in jedes well gegeben. Das Ergebnis des Versuchs konnte nach 5 Minuten photometrisch mittels ELISA reader bei einer Wellenlänge von 405 nm bzw. 492 nm erfasst werden, als Mass für die Proliferation.

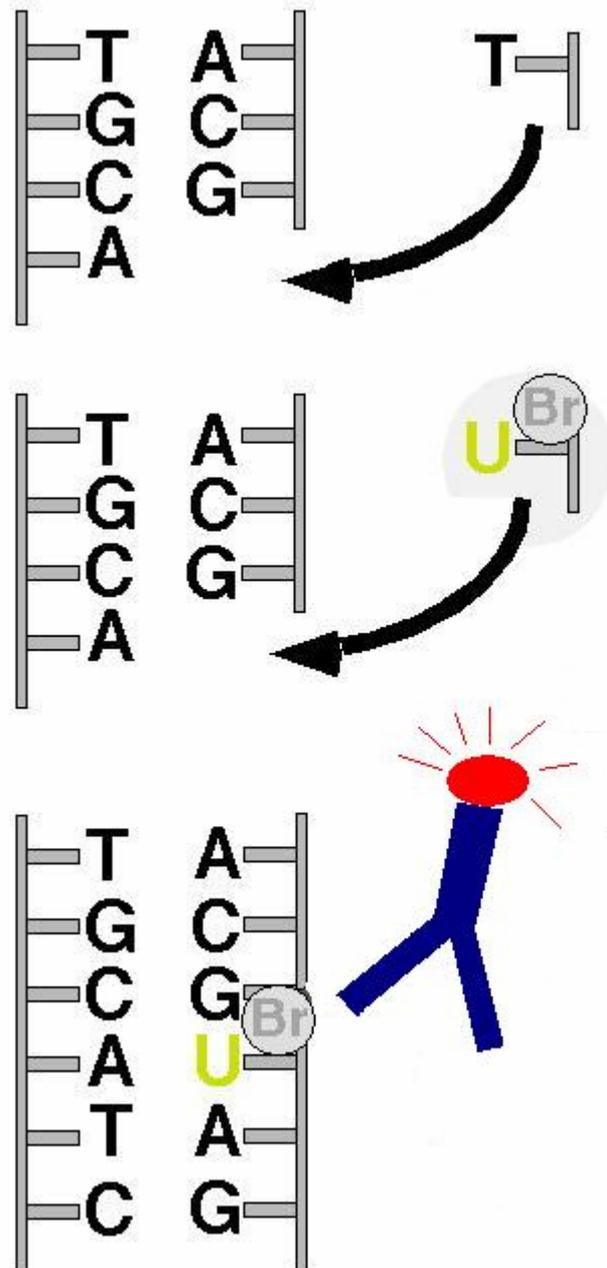


Abbildung 5: *Prinzip des BrdU*

- *Normale S-Phase*
- *S-Phase in Anwesenheit von BrdU*
- *Immunfluoreszenz durch einen gegen BrdU gerichteten Antikörper*

Versuchsanordnung:

Versuch:	Zusätze pro well:
Negativkontrolle	3 000 Zellen / well + 100µl Medium
Positivkontrolle	3 000 Zellen / well + 99µl Medium + 1µl PDGF (=1/100)
CPDA-Serum (AMI / IAP / SAP) in :	
10%	3 000 Zellen / well + 90µl Medium + 10µl Plasma
25%	3 000 Zellen / well + 75µl Medium + 25µl Plasma
50%	3 000 Zellen / well + 50µl Medium + 50µl Plasma

Tabelle 6: Versuchsanordnung BrdU Inkorporationsassay: pro Patient, Blutabnahme und unterschiedlicher Plasmakonzentration wurden je vier wells verwendet

3.2.8 Immunoassay

Ein "Cytometric Bead Array" ist ein Detektions-System um lösliche Produkte, wie z.B. Zytokine im Zellkulturüberstand oder aus dem Serum quantitativ zu bestimmen. Vom Prinzip her handelt es sich dabei um einen Sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay), bei dem der Capture-Antikörper jedoch nicht an eine Microtiterplatte, sondern an Polymerkügelchen (=Bead) gekoppelt ist; diese Beads wiederum tragen Fluoreszenzmoleküle in sich, die sie in einem Durchflußzytometer eindeutig identifizierbar machen. Für jedes zu bestimmende Zytokin existiert eine Population an spezifischen Capture Beads, die sich in ihrer Fluoreszenzeigenschaft (Farbe und Intensität) und/oder ihrer Größe unterscheiden. In einem zweiten Schritt bindet der spezifische Detektionsantikörper, der in einer anderen Fluoreszenz (FL-2) eingesetzt wird, an den Komplex aus Capture-Bead und Zytokin. Die Messung erfolgt am Durchflußzytometer.

Die Plasmakonzentrationen von TNF, VEGF, bFGF, IL8, MCP-1, CXCL9 und CXCL10 wurden mittels eines Cytometric Bead Array (CBA) der Firma Becton Dickinson bestimmt. Das Assay wurde gemäß der Anleitung durchgeführt. Die Nachweisbarkeitsgrenze lag für TNF bei 1,2 pg/ml, VEGF 3,4 pg/ml, bFGF 2,9 pg/ml und IL8 0,8 pg/ml.

3.2.9 Myokardszintigraphie

Bei der Szintigraphie des Herzmuskels handelt es sich um ein nuklearmedizinisches Verfahren, das die Darstellung und Beurteilung vital perfundierten Myokardgewebes, nekrotisch infarzierten Myokardgewebes, der Ventrikelfunktionsverhältnisse und der Stoffwechselaktivität des Herzmuskels in Ruhe und unter Belastung ermöglicht.

Die Indikation ergibt sich zur der Darstellung der Perfusionsverhältnisse, der Infarktgröße und Lokalisation des nekrotischen Myokards und wird routinemäßig am Deutschen Herzzentrum München durchgeführt. Dem Patienten wird nach Belastung (z.B. Fahrradergometrie) das Radionuklid ^{99m}Technetium-Isonitrit injiziert und die Aktivität im Myokard gemessen. Nach 3-4 Stunden wird ein Ruhezintigramm durchgeführt. Thallium bzw. Technetium wird als Kalium-Analogum über das Na⁺-K⁺-ATPase-System des Myokards aufgenommen. Regelrecht perfundierte Areale werden markiert, nekrotische Areale kommen nicht zur Darstellung.

3.2.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS für Microsoft Windows. Unterschiede zwischen mehr als zwei verbundenen Stichproben wurden mittels Wilcoxon's matched pairs signed-ranks Test überprüft. Der Gruppenvergleich wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Eine mögliche Korrelation zwischen einzelnen Parametern wurde mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizient untersucht. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt und p-Werte < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Darstellung der Daten als Mittelwert± SEM (Standardfehler).

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Daten des Patientenkollektivs

In die Studie wurden 84 Patienten mit akutem Myokardinfarkt, instabiler und stabiler Angina pectoris aufgenommen, davon waren 68 Patienten männlich (81%) und 16 weiblich (19%). Die Patienten waren in einem Alter von 32 bis 88 Jahren (Durchschnittsalter 64,2 Jahre). 43 Patienten hatten einen akuten Myokardinfarkt, 21 Patienten wurden mit einer instabilen Angina, 20 Patienten mit einer stabilen Angina pectoris ins Deutsche Herzzentrum München eingeliefert. Alle Patienten hatten ihrer Diagnose entsprechende Verläufe der kardialen Marker, wobei sich bei Patienten mit instabiler Angina pectoris im Vergleich zu den Patienten der mit stabiler Angina pectoris ein signifikanter Unterschied bei der Plasmaenzymaktivität der CK, der CK-MB und bei der Konzentration des Troponin T zeigte. Alle Patienten wiesen in der Angiographie eine hochgradige Stenose oder einen Verschluss einer oder mehrerer Herzkranzarterien auf, die mittels PCI und Stentimplantation erfolgreich rekanalisiert werden konnten.

Die Gruppe der Patienten mit stabiler Angina setzte sich aus 20 Patienten zusammen (Durchschnittsalter 63,6 Jahre), 15 Männer (75%) und 5 Frauen (15%), mit einer stabilen, belastungsabhängigen Angina pectoris und angiographisch gesicherter koronarer Herzkrankheit, die eine elektive PTCA und Stentimplantation der betroffenen Koronararterie erhielten.

Die Patienten aller untersuchten Studiengruppen waren bezüglich ihrer demographischen Daten (Alter, Geschlecht, Risikofaktoren) und bezüglich der Anzahl der betroffenen Gefäße vergleichbar.

Die klinischen Daten der Patientengruppe sind in *Tabelle 7* zusammengefasst.

	AMI (n=43)	IAP (n=21)	SAP (n=20)	AMI vs. SAP	IAP vs. SAP
Alter	60,7±2,1	71,2±2,9	63,6±2,5	n.s.	p=0,005
Geschlecht m (w)	36 (7)	17 (4)	15 (5)	n.s.	n.s.
Risikofaktoren (%)					
Nikotin	50±7,8	28,6±10,1	45±11,4	n.s.	n.s.
Hypertonie	50±7,8	95,2±4,8	75±9,9	n.s.	p<0,001
Hypercholesterinämie	47,6±7,8	75±9,7	55,7±3,2	n.s.	p=0,044
Diabetes mellitus	31±7,2	9,5±6,9	40±11,2	n.s.	n.s.
EF (%)	43,1±1,9	45,1±3,5	55,7±3,2	p<0,001	n.s.
max. CK (U/l)	2031,9±303,3	190,1±27,9	100±9,1	p<0,001	p<0,001
max. CK-MB (U/l)	275±40	35,9±5,8	17,2±1,2	p<0,001	p<0,001
max. TnT	3,3±0,5	0,6±0,2	0,05±0,015	p<0,001	p<0,001
Anzahl GefäÙe					
1-GE	69%	43%	58%	p<0,001	p=0,04
2-GE	24%	43%	37%	p<0,001	p=0,04
3-GE	7%	14%	5%	p<0,001	p=0,04
CRP	22,48±9,53	10,4±3,68	3,15±0,56	n.s.	n.s.
Leukozyten	11,68±0,56	8,03±0,51	6,35±0,33	p<0,001	p<0,001

Tabelle 7: Charakteristika des Patientenkollektivs. Angaben in Mittelwert oder Prozent \pm SEM; n.s. = nicht signifikant; ACS = akutes Koronarsyndrom, AMI = akuter Myokardinfarkt, IAP = instabile Angina pectoris, SAP = stabile Angina pectoris; EF = Ejektionsfraktion; GE = GefäÙerkrankung.

4.2 Die Wirkung der Plasmaproben auf Angiogenese, Proliferation und Migration von Endothelzellen

Um die Wirkung von im Plasma befindlichen Mediatoren bei verschiedenen Ausprägungen der koronaren Herzerkrankung auf Endothelzellfunktionen zu untersuchen wurden bei Patienten mit stabiler Angina pectoris, instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt vor koronarer Stentimplantation und 4-5 Tage danach venöse Blutabnahmen durchgeführt, CPDA Plasma abzentrifugiert und in funktionellen Assays untersucht. Die Migration wurde in einem „scratching assay“ bestimmt, die Angiogenese in einem Matrigelassay und die Proliferation mittels BrDU Inkorporationsassay.

Es zeigte sich, dass im Verlauf nach koronarer Stentimplantation nur die Proliferationsrate signifikant vermindert war (*Abb. 6a*), während die Effekte des Plasmas auf die Migration (*Abb. 6b*) und Angiogenese (*Abb. 6c*) sowohl vor Stentimplantation, als auch nach Stentimplantation in allen Gruppen unverändert waren.

Im Vergleich zu Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris war das angiogenetische Potential der Plasmaproben im akuten Myokardinfarkt signifikant erhöht (*Abb. 7a*), während die Migrations- und die Proliferationsrate im akuten Myokardinfarkt verringert waren.

Bei Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris war die Migrationsrate signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit akutem Myokardinfarkt (*Abb. 7b*). Das migratorische Potential des Plasmas von Patienten mit IAP und SAP war vergleichbar.

Bei Patienten mit stabiler Angina pectoris war das proliferative Potential der Plasmaproben signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit akutem Myokardinfarkt (*Abb. 7c*).

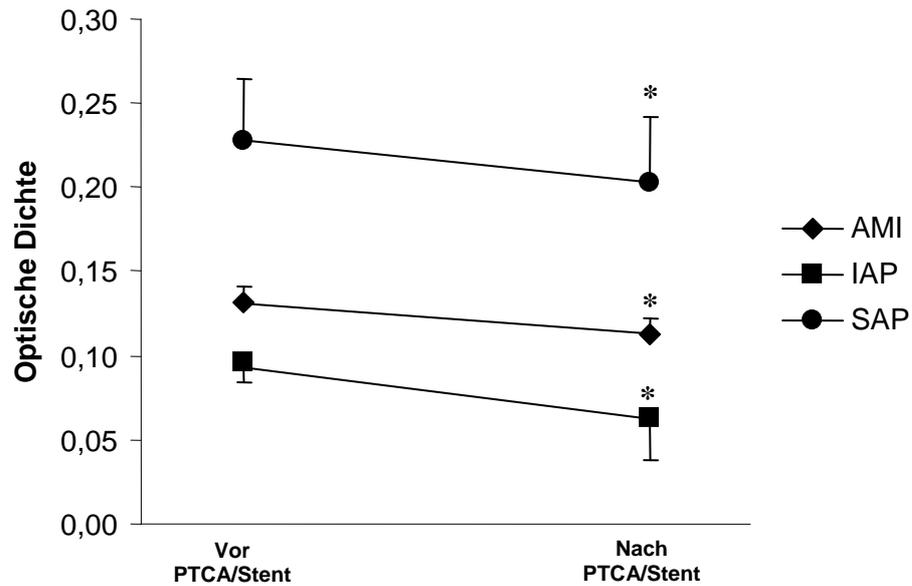


Abb.6a: Signifikanter Abfall des proliferativen Potentials von Endothelzellen (HCAEC) nach PTCA/Stent. Akuter AMI = Myokardinfarkt, IAP = Instabile Angina pectoris, SAP = Stabile Angina pectoris. * = $p < 0,05$ vs. „Vor PTCA/Stent“

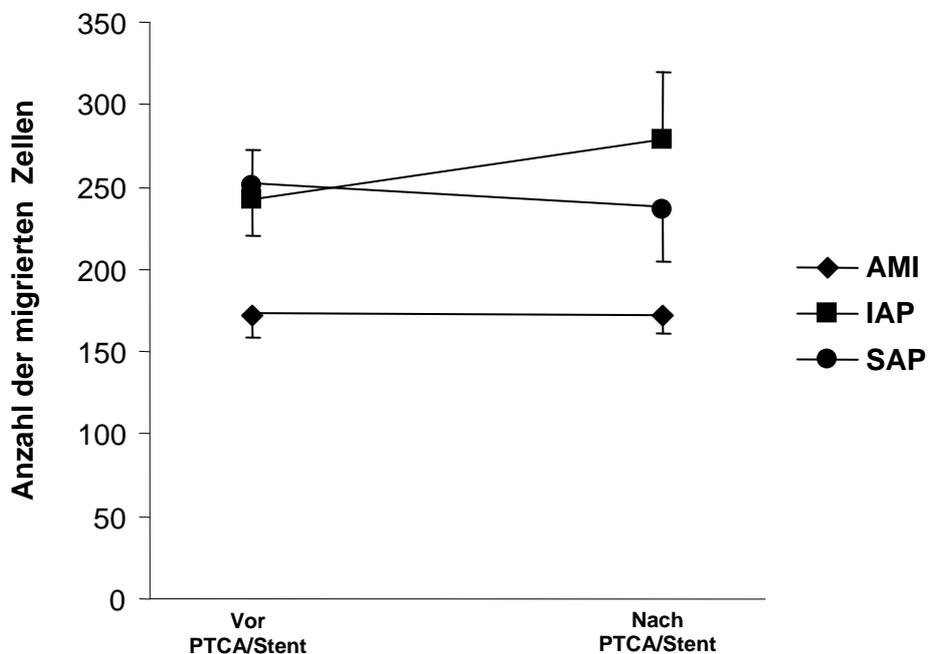


Abb. 6b: keine signifikanten Unterschiede im migratorischen Potential von Endothelzellen (HCAEC) vor- und nach PTCA/Stent. Akuter AMI = Myokardinfarkt, IAP = Instabile Angina pectoris, SAP = Stabile Angina pectoris.

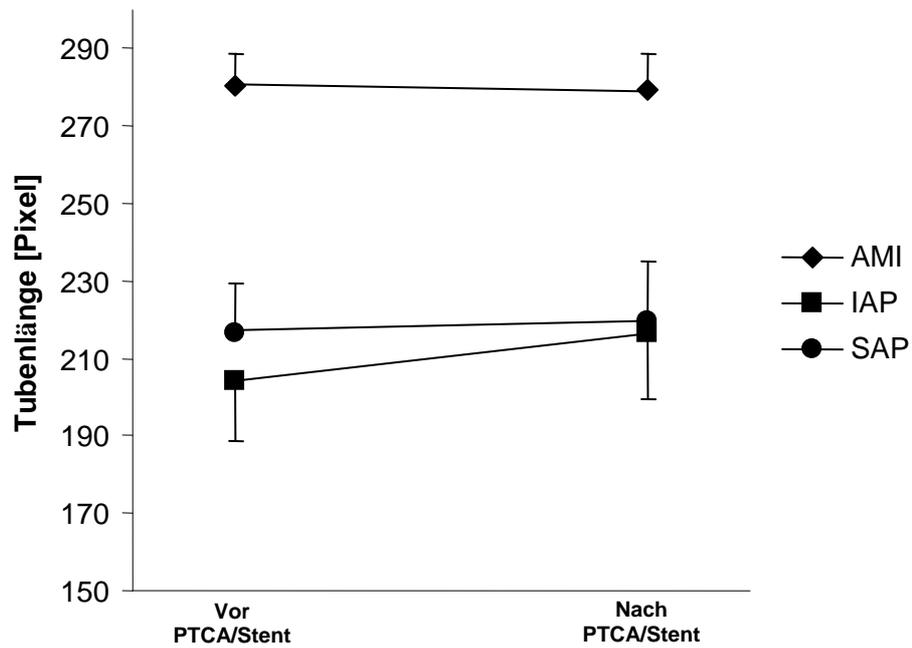


Abb. 6c: keine signifikanten Unterschiede im angiogenetischen Potential von Endothelzellen (HCAEC) vor- und nach PTCA/Stent. Akuter AMI = Myokardinfarkt, IAP = Instabile Angina pectoris, SAP = Stabile Angina pectoris.

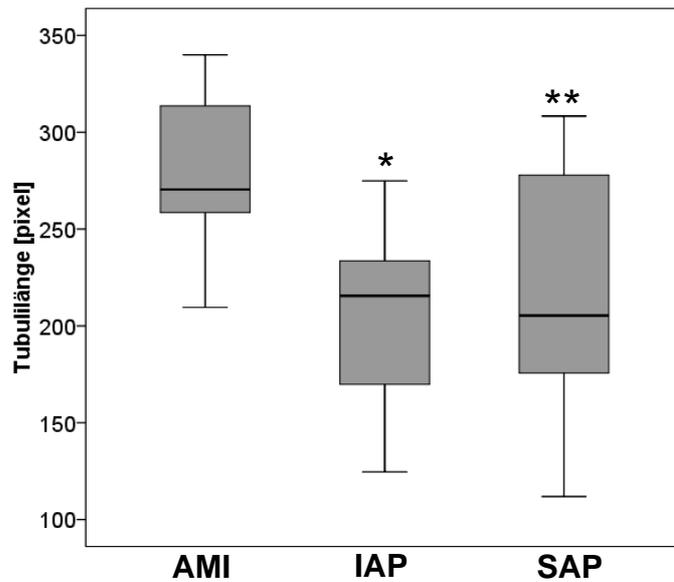


Abb. 7a: Signifikante Erhöhung des angiogenetischen Potentials bei akutem Myokardinfarkt (AMI) im Vergleich zur instabilen Angina pectoris (IAP) und stabilen Angina pectoris (SAP). Die Endothelzellen wurden mit 10% Patientenplasma stimuliert, das vor PTCA/Stent abgenommen wurde. * $p < 0,001$ vs AMI, ** $p = 0,002$.

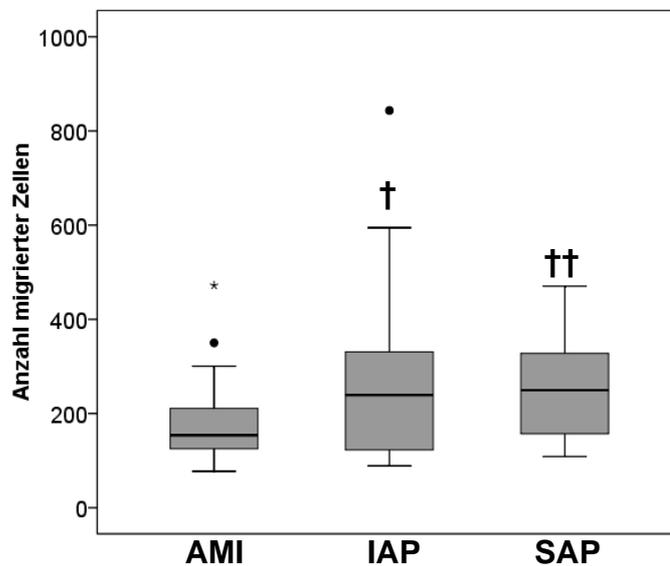


Abb 7b: Signifikante Erhöhung des migratorischen Potentials bei stabiler und instabiler Angina pectoris im Vergleich zum akuten Myokardinfarkt. Die Endothelzellen wurden mit 25% Patientenplasma stimuliert, das vor PTCA/Stent abgenommen wurde. † $p = 0,025$ vs. AMI, †† $p = 0,038$ vs. AMI.

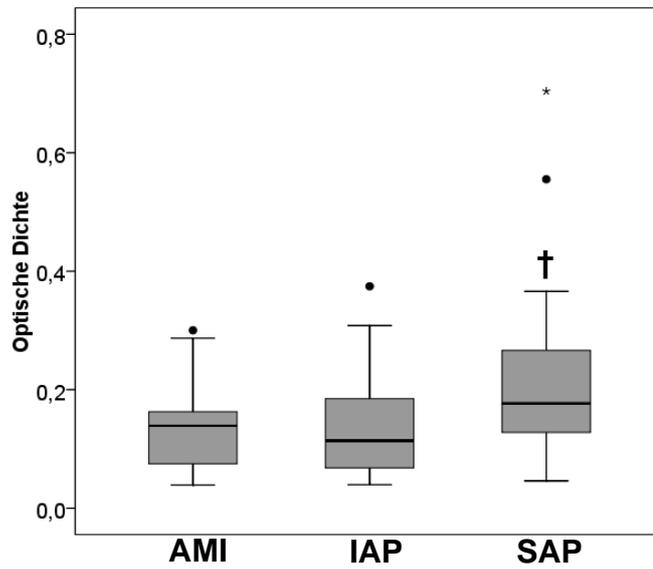


Abb.7c: Signifikante Erhöhung des proliferativen Potentials bei stabiler Angina pectoris (SAP) im Vergleich zum akuten Myokardinfarkt. Die Endothelzellen wurden mit 10% Patientenplasma stimuliert, das vor PTCA/Stent abgenommen wurde. † $p = 0,034$ vs. AMI.

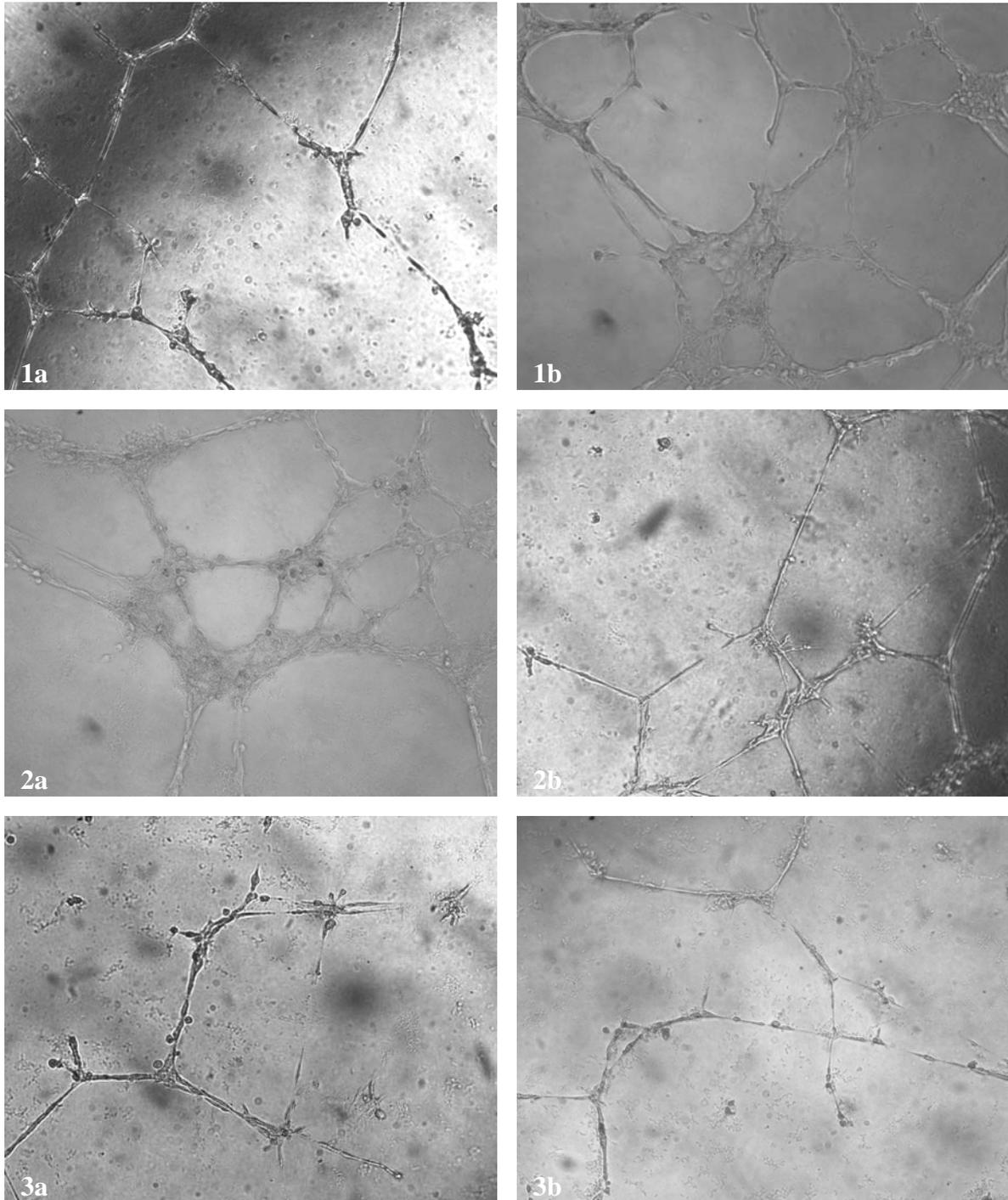


Abbildung 8: Die Effekte des Plasmas auf die Angiogenese waren sowohl vor PTCA/Stent (a), als auch nach PTCA/Stent (b) in allen Gruppen (AMI=1, IAP=2, SAP=3) vergleichbar. Gezeigt sind Repräsentative Beispiele, Endothelzellen wurden mit CPDA-Serum stimuliert, für 12h bei 37°C inkubiert und anschließend fotografiert.

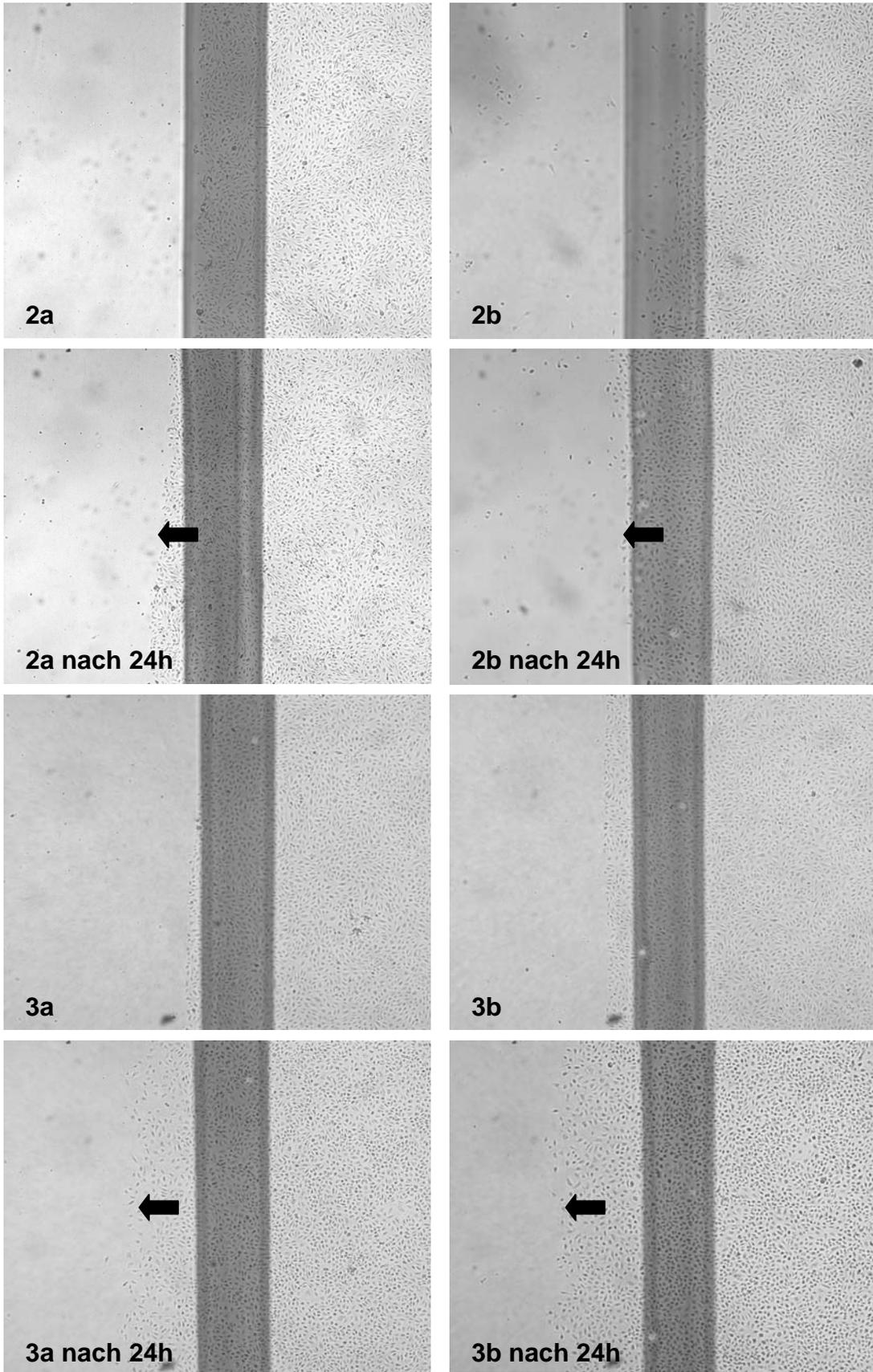


Abbildung 9 (S.63): Die Effekte des Plasmas auf die Migration waren sowohl vor PTCA/Stent (a), als auch nach PTCA/Stent (b) in allen Gruppen (IAP=2, SAP=3) vergleichbar. Gezeigt sind repräsentative Beispiele, Endothelzellen wurden mit CPDA-Serum stimuliert, für 24h bei 37°C inkubiert und anschließend fotografiert. Der Pfeil zeigt die gewanderte Distanz an.

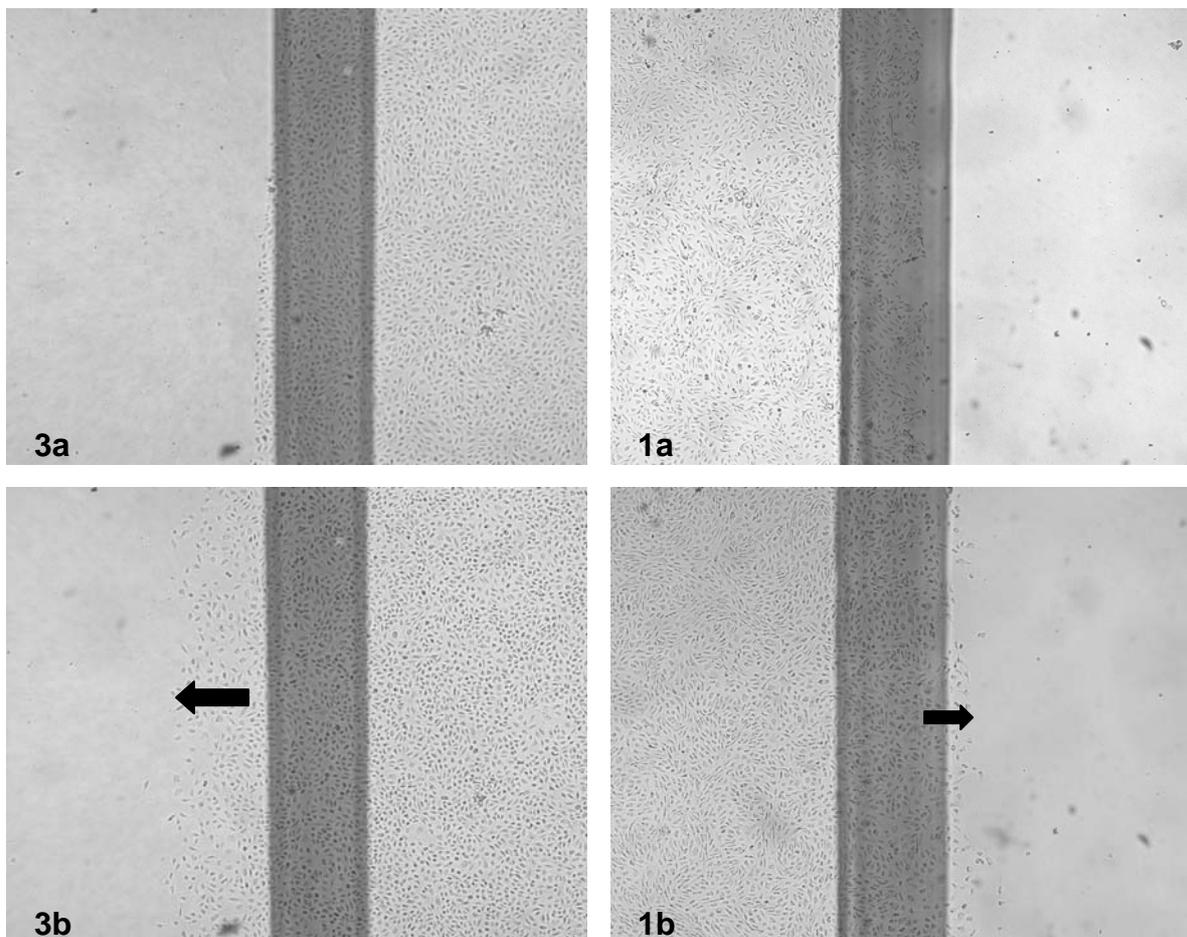


Abbildung 10: Geringeres migratorisches Potential im akuten Myokardinfarkt (AMI=1) im Vergleich zur stabilen Angina pectoris (SAP=3). Gezeigt sind repräsentative Beispiele, Endothelzellen wurden mit CPDA-Serum stimuliert (a), für 24h bei 37°C inkubiert (b) und anschließend fotografiert. Der Pfeil zeigt die gewanderte Distanz an.

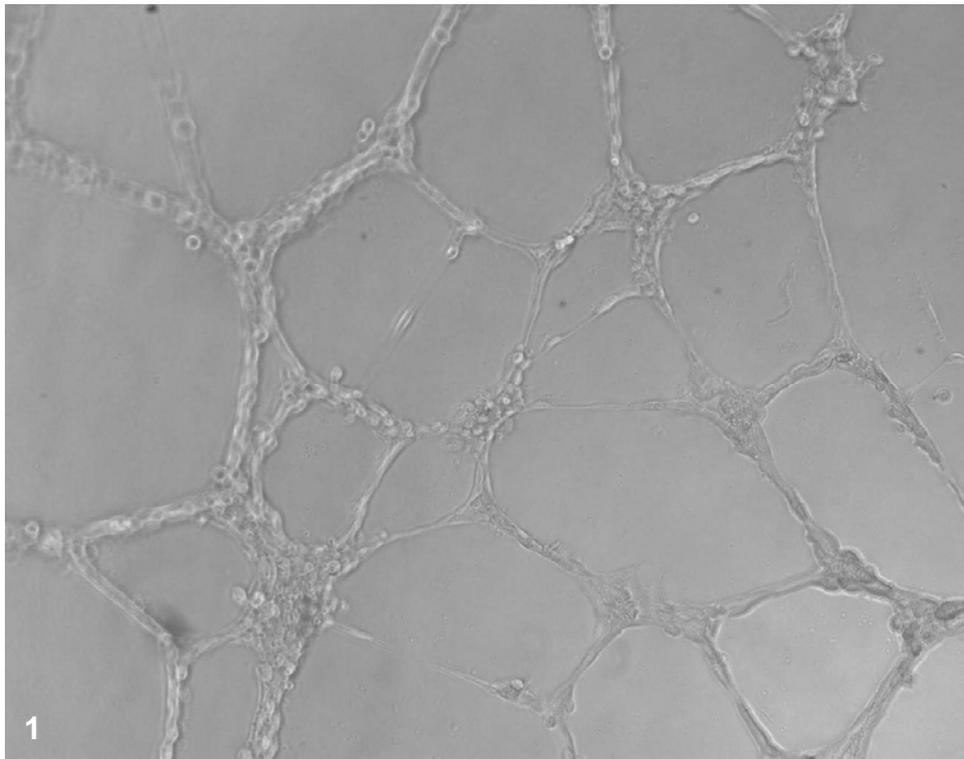
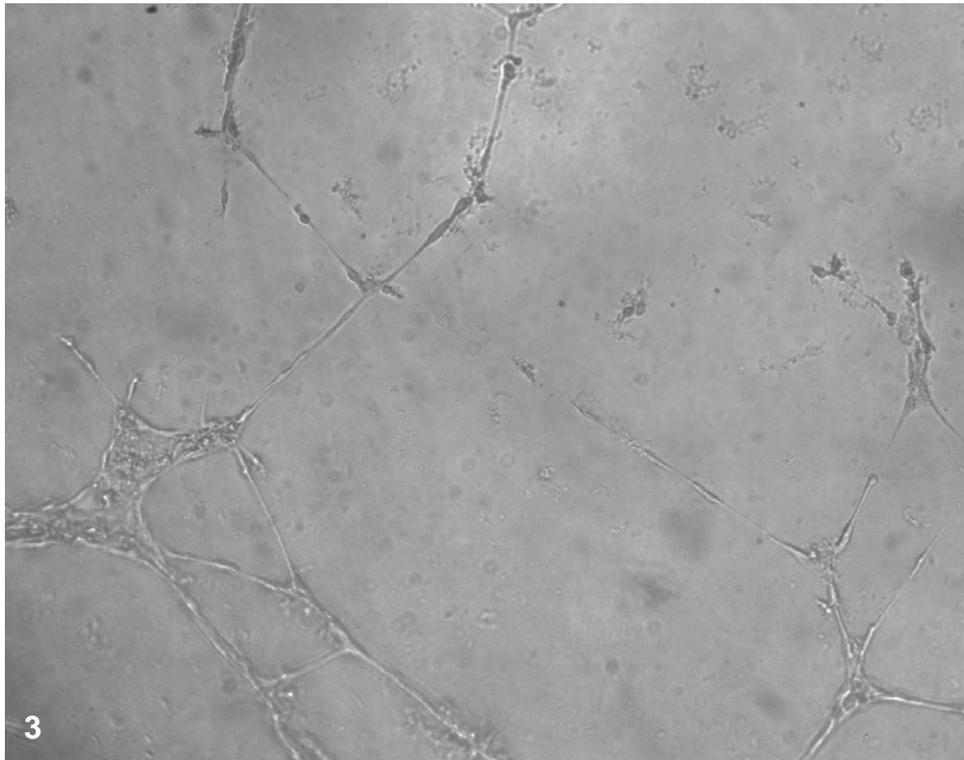


Abbildung 11: Erhöhtes angiogenetisches Potential im akuten Myokardinfarkt (AMI=1) im Vergleich zur stabilen Angina pectoris (SAP=3).

Gezeigt sind repräsentative Beispiele, Endothelzellen wurden mit CPDA-Serum stimuliert, für 12h bei 37°C inkubiert und anschließend fotografiert.

4.3 Die Konzentration von Chemokinen und Zytokinen im Plasma und Assoziation mit Endothelzellfunktionen

Um Mediatoren zu identifizieren, die für Angiogenese, Proliferation oder Migration von Bedeutung sind bestimmten wir die Plasmakonzentration der Zytokine und Chemokine IL-8, CCL2/MCP-1, CXCL9, CXCL10, Tumor-Nekrose Faktor-alpha, VEGF und bFGF.

Bei der univariaten Regressionsanalyse zeigte sich eine Korrelation des Chemokins CXCL10 mit dem angiogenetischen Potential von Plasmaproben bei Patienten mit stabiler Angina pectoris ($p=0,008$) und eine Korrelation von CCL2/MCP-1 mit dem proliferativen bzw. migratorischen Potential bei Patienten mit stabiler ($p=0,015$) und instabiler Angina pectoris ($p=0,007$). Des weiteren zeigte sich eine Korrelation des Chemokins CXCL9 mit dem angiogenetischen Potential bei Patienten mit stabiler Angina pectoris ($p=0,018$). Bei Patienten mit stabiler Angina pectoris zeigte sich eine Assoziation der Migrationsrate mit den VEGF-Plasmakonzentrationen ($p=0,007$), bei Patienten mit instabiler Angina pectoris eine Assoziation der Angiogeneserate mit den VEGF-Plasmakonzentrationen ($p=0,017$) (*Tabelle 8*).

		[pg/ml]	Migration	Angiogenese	Proliferation
CXCL10	AMI	870,2± 181,5	n.s.	n.s.	n.s.
	IAP	807,5±198,1	n.s.	n.s.	n.s.
	SAP	505,8± 86,9	n.s.	0,008	n.s.
MCP-1	AMI	179,3± 35,8	n.s.	n.s.	n.s.
	IAP	142,4± 28,9	n.s.	n.s.	0,007
	SAP	163± 47,9	0,031	n.s.	0,015
CXCL9	AMI	454,1± 71,5	n.s.	n.s.	n.s.
	IAP	351,5± 83,6	n.s.	n.s.	n.s.
	SAP	360,8± 105,4	n.s.	0,018	n.s.
CXCL8	AMI	41,5±6	n.s.	n.s.	n.s.
	IAP	28,6±5,4	n.s.	n.s.	n.s.
	SAP	25,6±4,2	n.s.	n.s.	n.s.
VEGF	AMI	357,2±55,3	n.s.	n.s.	n.s.
	IAP	340,7±117,7	n.s.	0,017	n.s.
	SAP	127,5±30,6	0,007	n.s.	n.s.
bFGF	AMI	36,8± 11,8	n.s.	n.s.	n.s.
	IAP	43,8± 14,8	n.s.	n.s.	n.s.
	SAP	24,6± 2,1	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 8: Assoziation zirkulierender Chemokine und Zytokine mit dem angiogenetischen, proliferativen und migratorischem Potential der Plasmaproben auf Endothelzellen. Gezeigt sind die p-Werte nach univariater Regressionsanalyse, *signifikant.

Im Gruppenvergleich ergab sich ein signifikanter Unterschied in der VEGF Konzentration zwischen Akutem Myokardinfarkt und Stabiler Angina pectoris ($p=0,003$).

4.4 Die Assoziation der szintigraphischen Infarktgröße mit Endothelzellfunktionen

Inwieweit die Effekte der Plasmaproben auf Endothelzellen mit klinischen Parametern korrelierten untersuchten wir mittels Regressionsanalyse. Dabei ergab sich, dass die szintigraphische Infarktgröße negativ mit dem angiogenetischen Potential von Plasmaproben bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt korrelierte ($r = 0,299$).

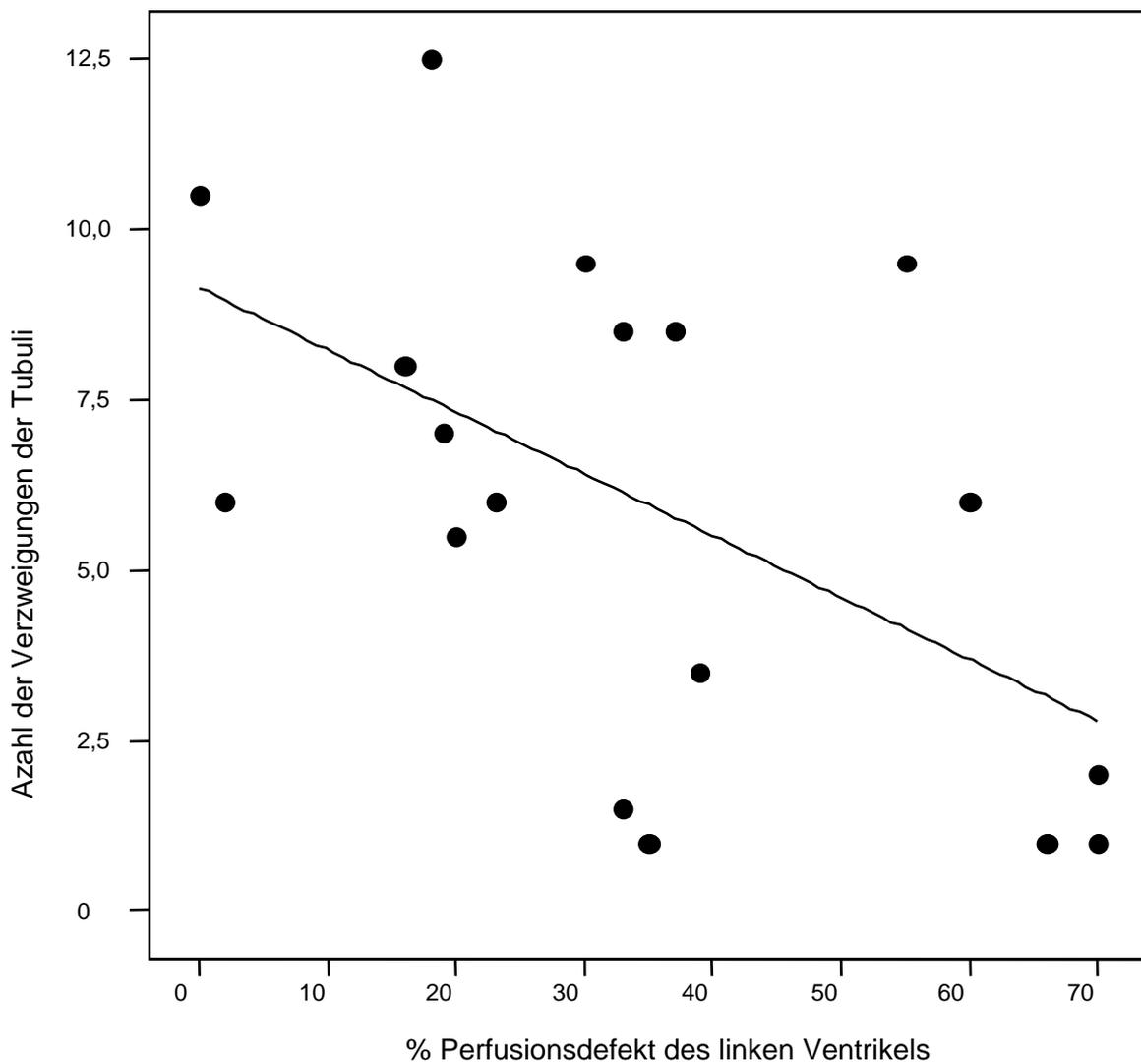


Abbildung 12: Die szintigraphische Infarktgröße direkt nach PTCA/Stent korreliert negativ mit dem angiogenetischen Potential von Plasmaproben bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt.

4.5 Die Assoziation von kardiovaskulären Risikofaktoren mit Endothelzellfunktionen

Bei der univariante Analyse zum Einfluss von Risikofaktoren auf die Effekte der Plasmaproben ergaben sich bei Patienten mit stabiler Angina pectoris Korrelationen von Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie mit dem angiogenetischem Potential ($p = 0,01$; $p = 0,04$) sowie von Hypercholesterinämie mit dem Proliferationspotential ($p = 0,01$). Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris korrelierte Diabetes mellitus mit der Proliferationsrate ($p = 0,02$), sowie Hypercholesterinämie mit dem angiogenetischen Potential ($p = 0,04$), während im akuten Myokardinfarkt kein Einfluss des Risikofaktorprofils auf die Endothelzellfunktion bestand.

		Migration	Angiogenese	Proliferation
arterielle Hypertonie	AMI	n.s.	n.s.	n.s.
	IAP	n.s.	n.s.	n.s.
	SAP	n.s.	0,04*	n.s.
Diabetes mellitus	AMI	n.s.	n.s.	n.s.
	IAP	n.s.	n.s.	0,02*
	SAP	n.s.	0,01*	n.s.
Hypercholesterinämie	AMI	n.s.	n.s.	n.s.
	IAP	n.s.	0,04*	n.s.
	SAP	n.s.	n.s.	0,01*
Nikotin	AMI	n.s.	n.s.	n.s.
	IAP	n.s.	n.s.	n.s.
	SAP	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 9: Assoziation von Risikofaktoren mit dem angiogenetischen, proliferativen und migratorischen Potential der Plasmaproben auf Endothelzellen. Gezeigt sind p-Werte nach multivariater Analyse. n.s. = nicht signifikant, * = signifikant.

5. Diskussion

5.1 Die Wirkung von Chemokinen und Zytokinen auf das angiogenetische, proliferative und migratorische Potential von Endothelzellen

Chemokine, eine große Familie inflammatorischer Zytokine spielen während verschiedener pathophysiologischer Prozesse, dem Wachstum von Tumoren, Wundheilung und Ischämie eine wichtige Rolle in der Regulierung der Angiogenese, einschließlich Proliferation und Migration von Endothelzellen.

Dabei können Chemokine und Zytokine ihre regulierende Funktion auf die Angiogenese direkt ausüben, oder indirekt, als Folge einer Leukozyteninfiltration und Expression von Wachstumsfaktoren.

5.1.1 Assoziation von CCL2/MCP-1 mit dem angiogenetischen Potential von Plasmaproben bei stabiler und instabiler Angina pectoris

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) zählt zu der Familie der CC-Chemokine und spielt eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Progression der Inflammation im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms durch Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen in das Entzündungsgebiet. Durch die Bindung an seinen spezifischen Chemokinrezeptor (CCR2), induziert MCP-1 die Chemotaxis von Monozyten, die proinflammatorische Signale vermitteln. CCR2 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der auf endothelialen Zellen der arteriellen Gefäße exprimiert wird. Eine durch MCP-1 induzierte Aktivierung des CCR2 auf endothelialen Zellen führt zu vermehrter Angiogenese und Bildung von Kollateralen. Angiogenese besteht aus einer Abfolge streng kontrollierter Vorgänge, einschließlich Degradation der existierenden Basalmembran, Chemotaxis, Proliferation und Migration von Endothelzellen und der Bildung von Kapillaren (126). Diese Prozesse sind auch für eine Größenzunahme von atheromatösen Plaques entscheidend, jedoch sind die genauen molekularen Mechanismen über die CCL2 die Angiogenese reguliert, noch nicht vollständig bekannt.

Wir wissen heute, dass CCL2 einerseits direkt durch Bindung an seinen Rezeptor auf Endothelzellen angiogenesefördernde Wirkungen ausübt und andererseits indirekt über seine Anziehungskraft auf Monozyten und Makrophagen stimulierend auf die Angiogenese wirkt, indem diese angiogenesefördernde Faktoren sezernieren (49).

Auch in unserer Arbeit konnten wir eine Assoziation von CCL2 mit dem angiogenetischen Potential von Endothelzellen bei stabiler und instabiler Angina pectoris zeigen. Im akuten Koronarsyndrom kommt es folglich zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren mit proangiogenetischer Wirkung, was im Sinne eines körpereigenen Reparaturmechanismus zur Bildung neuer Gefäße führt.

Studien weisen darauf hin, dass eine MCP-1 induzierte Angiogenese über die Aktivierung des RhoA G-Proteins und den Wachstumsfaktor VEGF vermittelt wird. RhoA G-Proteine sind monomere, GTP-bindende Proteine, die an der Regulation der Genexpression und des Zytoskeletts beteiligt sind.

In einem in vitro Assay konnte an einem Rattenaortenring gezeigt werden, dass eine Stimulation mit MCP-1 zu einem signifikanten Anstieg der Kapillarbildung führte. Diese MCP-1 stimulierte Kapillarbildung konnte durch den Rho-Inhibitor Clostridium difficile Toxin und C3 Transferase komplett inhibiert werden (60). Weiter konnte gezeigt werden, dass MCP-1 in humanen aortalen Endothelzellen (HAECs) die Genexpression des „hypoxia-inducible factor 1 α “ (HIF-1 α) induziert, was wiederum zur Induktion der VEGF Expression führt. Im Vordergrund steht hier die vermehrte Genexpression der Isoform VEGF-A₁₆₅. Da Endothelzellen auch in der Lage sind, nach VEGF Stimulation MCP-1 zu sezernieren ergibt sich folglich ein positiver Feedback-Mechanismus, der zur Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion und zur verstärkten Angiogenese führen kann.

Schon frühere Studien haben gezeigt, dass durch die Stimulation vaskulärer Endothelzellen mit VEGF das Rho-Protein aktiviert wird. Das Rho-Protein vermittelt die VEGF induzierte Migration und Proliferation endothelialer Zellen (154) und führt nach Aktivierung des VEGF Rezeptor-2 zur Tyrosinphosphorylierung mehrerer Signalproteine. Es wird jedoch angenommen, dass auch VEGF-unabhängige Mechanismen Bestandteil der MCP-1 induzierten Angiogenese sein könnten, wie die MCP-1 vermittelte Migration vaskulärer Endothelzellen und die Rho-Protein vermittelte endotheliale Organisation.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden die molekularen Mechanismen der CCL2-induzierten Angiogenese an cerebralen Endothelzellen untersucht und dabei herausgefunden, dass CCL2 direkt die Expression verschiedener angiogenesefördernder Faktoren induziert. Unter dem Einfluß von CCL2 kam es zu einer deutlichen Hochregulierung des Ets-1 Transkriptionsfaktors (144). CCL2 induzierte einen signifikanten Anstieg der Ets-1 mRNA und Proteinexpression, sowie der Ets-1 DNA Bindungsaktivität. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ets-1 wird die Expression Angiogenese fördernder Faktoren, wie Integrin- β 3 reguliert.

Die Heilung eines Myokardinfarktes ist ein dynamischer, biologischer Prozeß, der durch eine akute Entzündung eingeleitet wird, gefolgt von der Bildung von Granulationsgewebe und der Ablagerung extrazellulärer Matrix (40). Die Expression von Chemokinen ist ein bekanntes Merkmal dieser Entzündung und spielt eine bedeutende Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten (41). Es kommt zur Hochregulation von CCL2 und somit zur Ansammlung von mononukleären Zellen im verletzten Bereich des Myokards. Randständige Leukozyten tragen durch die Freisetzung von proteolytischen Enzymen bei, das abgestorbene Gewebe zu entfernen. Makrophagen und Mastzellen produzieren fibrogene und angiogenetische Mediatoren, was die proliferative Phase der Heilung und die Neovaskularisation einleitet und somit für eine effektive Reparatur und Narbenbildung des Myokards sorgt. Chemokine haben somit auch bedeutende Wirkungen auf nicht-hämatopoetische Zellen, wie Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen und steuern neben der Angiogenese die Beseitigung von fibrösem Gewebe im Infarktareal (47).

Durch eine effektivere Reparatur des Gewebes, könnte es möglich sein, ein negatives Remodeling zu minimieren, das in vielen Fällen zur Herzinsuffizienz und zum Tode führt.

Nach wie vor wird kontrovers diskutiert, ob Marker der endothelialen Aktivierung, wie z.B. CCL2, als Risikofaktoren der Atherosklerose und der Entwicklung eines akuten Koronarsyndroms angesehen werden können. Basierend auf dem Beweis experimenteller und klinischer Studien könnten endotheliale Zellen, die durch einen entzündlichen Prozeß aktiviert wurden, eine Quelle für MCP-1 bei Patienten mit KHK darstellen. Bislang gab es jedoch keine große klinische Studie, die die Rolle des MCP-1 Serumspiegels als Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit bei Patienten untersucht hat.

5.1.2 Assoziation von CXCL9 mit dem angiogenetischen Potential von Endothelzellen bei stabiler Angina pectoris

CXCL9 zählt neben CXCL4, CXCL10, CXCL11 und CXCL13 zur Gruppe der Angiogenese hemmenden Zytokine. Zunächst wurde angenommen, dass ihre angiostatische Eigenschaft hauptsächlich durch ihre molekulare Struktur bedingt sei. Demnach werden CXC Chemokine je nach Vorhandensein des ELR-Motivs, das die Abfolge der Aminosäuren Glutaminsäure (Glu), Leucin (Leu) und Arginin (Arg) unmittelbar vor dem Zysteinrest beschreibt, in Angiogenese fördernde und –hemmende Chemokine unterteilt. Zusätzlich fand man heraus, dass die Expression von Chemokinen mit positivem ELR-Motiv von Inhibitoren der Angiogenese wie z.B. Interferon $-\alpha/-\beta/-\gamma$ herunterreguliert wird, während Interferone die

Expression ELR-negativer, angiostatischer Chemokine hochregulieren (146). Inzwischen ist die Gruppe der Angiogenese kontrollierenden Chemokine gewachsen und es konnte gezeigt werden, dass auch CC und CX3C Chemokine, die kein ELR-Motiv besitzen, die Angiogenese beeinflussen.

Endothelzellen exprimieren funktionelle Chemokinrezeptoren mit unterschiedlichen Eigenschaften. CXCR3 fungiert dabei als angiostatischer Rezeptor, während über CXCR2 und CXCR4 Angiogenese fördernde Wirkungen vermittelt werden (3). Des Weiteren konnte im Experiment mit Mäusen gezeigt werden, dass SLC/CCL7, ein Ligand des CXCR3 Rezeptors die Angiogenese inhibieren kann, während menschliches CCL7, das nicht an CXCR3 binden kann, keine angiostatische Wirkung hat. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass eher die Aktivierung unterschiedlicher Chemokinrezeptoren, als das Vorhandensein einer ELR Sequenz für die Angiogenese modulierende Wirkung verantwortlich ist (10).

Mehrere Studien haben sich mit den genauen molekularen Mechanismen der angiostatischen Wirkung von Chemokinen beschäftigt. So konnte z.B. gezeigt werden, dass angiostatisch wirkende Chemokine die Bindung von FGF-2 und VEGF an ihre Rezeptoren behindern, indem sie die Wachstumsfaktoren in ihrer Fähigkeit beeinträchtigen Homodimere zu bilden, oder mit Heparansulfatproteoglykanen der Zelloberfläche zu konkurrieren (44). Obwohl es viele Hinweise dafür gibt, dass Chemokinrezeptoren die Aktivierung anderer Rezeptoren durch Desensibilisierung (120) inhibieren, stellt dieser Mechanismus nicht die Grundlage der Wirkung angiostatischer Chemokine dar.

Es konnte gezeigt werden, dass neutralisierende Anti-CXCR3 Antikörper in der Lage sind, die antiproliferative Aktivität CXCR3 Liganden auf endothelialen Zellen zu blockieren (133). Die Bindung an Heparansulfat und an bislang unbekannte Chemokinrezeptoren könnte erklären, weshalb Liganden des CXCR3 ihre inhibitorische Wirkung auf endotheliale Zellfunktionen beibehalten, auch wenn ihre Fähigkeit an CXCR3 zu binden durch Entfernung ihres NH₂-Endes beeinträchtigt ist (116).

Veränderungen in der Expression der Angiogenese hemmenden Chemokine CXCL9 und CXCL10 haben große Bedeutung im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes. Das in Regeneration befindliche Myokard weist eine hohe proliferative, metabolische Aktivität auf, insbesondere durch die Infiltration von Myofibroblasten in das ischämische Gewebe und die Abgabe von Komponenten der extrazellulären Matrix. Die Bildung neuer Gefäße ist entscheidend, um das infarzierte, narbige Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen und somit den Kreislauf aufrecht zu erhalten.

Angiogenese ist dabei von einem komplexen Zusammenspiel von Degradation und Neubildung extrazellulärer Matrix, Migration und Proliferation von Endothelzellen und Perizyten abhängig und letztendlich von einem Ungleichgewicht zwischen angiogenesehemmenden und -fördernden Faktoren. Die am besten beschriebenen angiogenesefördernden Faktoren sind VEGF und bFGF. Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Muskelzellen und Endothelzellen sind unter pathologischen Bedingungen, wie der Myokardischämie und der Arteriosklerose in der Lage, VEGF-A und seine Rezeptoren in großer Zahl zu exprimieren, vorübergehend wird dann aber auch die Expression angiogenesehemmender Zytokine wie CXCL9 und CXCL10 erhöht. Die Expression der mRNA angiostatischer Chemokine wird 24 Stunden nach Reperfusion in Endothelzellen inhibiert, wohingegen die Expression der mRNA angiogenesefördernder Chemokine erhöht bleibt. Es bleibt zu vermuten, dass die Unterdrückung der Expression angiostatischer Chemokine ein wichtiger Mechanismus in der Steuerung der Angiogenese ist, indem das biologische Gleichgewicht hin zum Überwiegen der Angiogenese fördernden Faktoren wie bFGF, IL-8 und VEGF verschoben wird. Die vorübergehende frühe Induktion von z.B. CXCL9 und CXCL10 im ischämischen Myokard, könnte dazu dienen, die Stimulation der Angiogenese zu verzögern, bis das verletzte Myokard durch Infiltration von Phagozyten von abgestorbenen Zellen befreit ist und eine fibrinreiche Matrix gebildet ist, um das Einsproießen von neuen Blutgefäßen zu ermöglichen.

In unserer Arbeit konnten wir eine positive Korrelation von CXCL9 bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit dem angiogenetischen Potential feststellen, was sich durch den frühen Zeitpunkt der Blutentnahme noch vor einer Intervention (PTCA) erklären könnte und somit die frühe Induktion von CXCL9 im ischämischen Myokard widerspiegeln könnte.

5.1.3 Assoziation von VEGF mit dem angiogenetischen Potential von Endothelzellen bei stabiler und instabiler Angina pectoris

Im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms wird über eine VEGF vermittelte, mikrovaskuläre Hyperpermeabilität und die Einführung einer vorläufigen Matrix, die Teilung von endothelialen Zellen und die Bildung neuer Blutgefäße einleitet und ein Milieu geschaffen, das die Migration von Fibroblasten und Endothelzellen begünstigt. Auch in unserer Arbeit zeigte sich eine positive Korrelation von VEGF und der Migration von Endothelzellen bei Patienten mit stabiler Angina. VEGF spielt eine bedeutende Rolle bei der Gefäßneubildung in ischämischen Organen, hat jedoch schon im Vorfeld im Rahmen einer Koronaren Herzerkrankung und der damit verbundenen chronischen Ischämie eine Bedeutung in der Stimulation der Ausbildung von Kollateralen.

Dabei kann VEGF über Bindung an die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen KDR und Flt-1, die fast ausschließlich an der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert werden die Proliferation, Migration und die Stickstoffmonoxid-Freisetzung aktivieren. Die aktivierten Rezeptoren KDR und Flt-1 können in der Endothelzelle zahlreiche Proteine durch Kaskaden von Phosphorylierungsreaktionen aktivieren und so spezifische Signalwege im Endothel anschalten. In Form eines Regelkreises kann VEGF Monozyten chemotaktisch aktivieren, die Träger sind großer Mengen an Wachstumsfaktoren. Monozyten können somit durch MCP-1 und VEGF angelockt werden und über die Produktion von Wachstumsfaktoren die Migration und Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen induzieren (24), was zur Ausbildung von lebenswichtigen Kollateralgefäßen führt, und das Ziel hat, eine suffiziente Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Hauptstimulus der Kollateralenbildung nach Gefäßverschluß bzw. bei Lumeneinengung ist der erhöhte Shearstress, der nachfolgend eine Reihe von Prozessen initiiert, darunter die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren sowie die nachfolgende Invasion von Monozyten, deren Reifung zu Makrophagen und Freisetzung von Mediatoren wie VEGF. Am Ende dieser Umbauprozesse resultiert eine funktionell relevante Kollaterale bzw. Arterie (137). Die Bildung von Kollateralen als Folge einer Stenose stellt die effizienteste Möglichkeit dar, um die Perfusion eines ischämischen Gebietes funktionell zu kompensieren, da nur Kollateralen, jedoch nicht Kapillaren in der Lage sind, ausreichende Mengen an Blut zu transportieren. Die therapeutische Bildung von Kollateralen mittels Wachstumsfaktoren könnte deshalb das Ziel sein, eine adäquate Kompensation nach Gewebsischämie zu erzielen.

Neben diesen positiven Funktionen von VEGF-A für das Endothel und das Gefäßwachstum wurde jedoch auch in den letzten Jahren diskutiert, dass VEGF-A eine Rolle bei der Plaqueangiogenese spielen könnte (109). Die Bildung von Plaques in den Gefäßen kann zur Induktion von VEGF-A und damit zur Angiogenese führen, da auf dem Boden von arteriosklerotischen Plaques hypoxische Areale entstehen können. Dies wiederum induziert die Bildung von Kapillaren mit dem Resultat der Destabilisierung der Plaques bis hin zur Plaqueuptur mit dem nachfolgenden Ergebnis einer akuten Gewebsischämie.

5.2 Die Assoziation von klinischen Parametern mit Endothelzellfunktionen bei Patienten mit KHK

5.2.1 Zusammenhang von szintigraphischer Infarktgröße und angiogenetischem Potential von Endothelzellen

Es ist bekannt, dass eine myokardiale Nekrose und Reperfusion mit der Aktivierung einer Zytokinkaskade verbunden ist (113). Die Heilung eines Myokardinfarktes, einschließlich die Bildung neuer Blutgefäße ist ein dynamischer, biologischer Prozeß, der durch eine akute Entzündungsreaktion eingeleitet wird, gefolgt von der Bildung von Granulationsgewebe und der Ablagerung von extrazellulärer Matrix (64). Einem Myokardinfarkt folgt die frühe Freisetzung von Angiogenese fördernden Faktoren, wie z.B. VEGF, IL-8 und bFGF. Je größer das Infarktareal jedoch ist, desto mehr nekrotische, funktionslose Myozyten sind vorhanden, die keinen Beitrag mehr im Rahmen der Entzündungsreaktion leisten können.

In unserer Arbeit zeigte sich, dass die szintigraphische Infarktgröße negativ mit dem angiogenetischen Potential von Plasmaproben bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt korrelierte. In diesem Fall wurden Plasmaproben für das Angiogeneseassay verwendet, die direkt nach Stentimplantation gewonnen wurden. Die Quantität der Angiogenese wurde durch die Anzahl der Tubuli Verzweigungen bestimmt.

Das heißt, mit zunehmender Größe der myokardialen Nekrose könnten einerseits vermehrt Mediatoren freigesetzt werden, die antiangiogenetisch wirken und andererseits die Freisetzung von proangiogenetisch wirkenden Mediatoren reduziert sein. Eine enorme Myokardschädigung könnte somit dazu führen, dass das Regenerationspotential im Sinne der Bildung neuer Gefäße, ab einem bestimmten Schädigungsgrad erschöpft ist.

5.3 Die Assoziation von kardiovaskulären Risikofaktoren mit Endothelzellfunktionen bei Patienten mit KHK

Klassische Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, inhalatives Zigarettenrauchen und Diabetes mellitus gehen mit einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6, TNF- α) einher, die zu einer konsekutiven Erhöhung des Akute-Phase-Proteins CRP führen (4).

Aus dem langfristigen Einwirken eines Risikofaktors auf den Organismus kann eine systemische Entzündungsreaktion resultieren, die Einfluß nimmt auf die Endothelzellfunktion.

5.3.1 Assoziation von arterieller Hypertonie und angiogenetischem Potential von Endothelzellen

Die arterielle Hypertonie stellt einen wichtigen Risikofaktor dar, eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln. Die Ursache des Bluthochdrucks ist meist multifaktoriell bedingt und kann in einer Aktivierung von (Druck-) Rezeptoren, einem erhöhten extrazellulären Volumen oder einer verminderten Elastizität der Gefäße liegen.

In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv bestand bei 75% der Patienten mit stabiler Angina zugleich auch eine arterielle Hypertonie. Verschiedene Studien haben sich damit befasst, den Zusammenhang von arterieller Hypertonie und vermehrter Angiogenese aufzuklären. Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht dabei der Zusammenhang zwischen einer Sympathikusaktivierung und dem angiogenetischen Potential von Endothelzellen.

Das Endothel kontrolliert die verschiedenen Gefäßfunktionen, einschließlich Tonus, Permeabilität, Thrombose, Hämostase und Angiogenese (139) über die Aktivierung von Rezeptoren. Die Freisetzung von Stickstoffmonoxid zur Regulierung des Gefäßtonus führt zur Aktivierung von β_2 -Adrenozeptoren. β_2 -Adrenozeptoren sind G-Protein gesteuerte Rezeptoren, die durch Katecholamine aktiviert werden und über eine intrazelluläre Signaltransduktion spezifische Zellreaktionen wie z.B. Angiogenese hervorrufen (51). Beim Erwachsenen findet Angiogenese nur unter bestimmten Bedingungen statt, während der Wundheilung, der Entstehung von Tumoren, Hypoxie und chronischer Ischämie (21).

In einem Rattenmodell konnte nun gezeigt werden, dass es unter einer chronischen Ischämie zur Hochregulation von β_2 -Adrenozeptoren kommt und die Aktivierung dieser Rezeptoren einen Stimulus für die Angiogenese darstellt. Weitere Studien zeigen, dass die Proliferation von Endothelzellen, sowie Apoptose fördernde und –hemmende Effekte über β_2 -Adrenozeptoren kontrolliert werden. β_2 -Adrenozeptoren wirken über verschiedene Mechanismen positiv auf die

Aktivierung bestimmter Enzyme von Endothelzellen (ERK - extracellular receptor-activated kinase, MAPK - mitogen activated protein kinase). Die Aktivierung dieser Enzyme kann direkt über endotheliale β_2 -Adrenozeptoren erfolgen, oder über die Freisetzung von VEGF. Im Gegenzug verhindert die Inhibierung von ERK/MAPK die Proliferation von Endothelzellen vollständig. Das sympathische Nervensystem könnte somit auch beim Menschen über seine Botenstoffe Katecholamine und Neuropeptide an der Regulierung des in vivo Wachstums neuer Blutgefäße beteiligt sein.

Bei 75% der untersuchten Patienten mit stabiler Angina bestand gleichzeitig auch eine arterielle Hypertonie. Geht man nun von einer chronischen Ischämie auf dem Boden von relevanten Koronarstenosen aus, so ist eine vermehrte VEGF-induzierte Aktivierung von Endothelzellen denkbar, die in einer gesteigerten Angiogenese im Sinne einer Kollateralbildung resultieren könnte.

5.3.2 Assoziation von Diabetes mellitus mit dem proliferativen und angiogenetischen Potential von Endothelzellen

Die koronare Herzkrankheit ist eine der häufigsten Komplikationen eines Diabetes mellitus und steht in Zusammenhang mit einer hohen Morbidität und Mortalität. Diabetiker erleiden mit erhöhter Inzidenz und Schwere einen Myokardinfarkt und entwickeln sehr viel häufiger in der Folge eine Herzinsuffizienz, als Nichtdiabetiker (2). Die diabetesspezifischen Veränderungen beinhalten Mikro- und Makroangiopathien, vornehmlich der Retina, der renalen Glomeruli und der Koronararterien. Die Mikroangiopathie, die sich infolge eines Diabetes mellitus entwickelt, ist durch eine Verdickung der Basalmembran gekennzeichnet (96). Diese Verdickung findet sich an der Basalmembran vaskulärer und nichtvaskulärer Gewebe und resultiert hauptsächlich aus einer direkten oder enzymatischen hyperglykämieinduzierten Kreuzverbindung von Matrixproteinen. Die Pathologie der diabetischen Makroangiopathie, die sich z.B. in Form von atherosklerotischen Läsionen manifestiert, ist der bei Patienten ohne Diabetes mellitus ähnlich, die diabetische atherosklerotische Plaque weist jedoch einige Besonderheiten auf, wie eine höhere Makrophagendichte, die zur vermehrten Instabilität und Rupturneigung führt.

In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv bestand bei ca. 25% der Patienten mit stabiler bzw. instabiler Angina zugleich auch ein Diabetes mellitus. Die endotheliale Dysfunktion dieser Patienten resultiert letztlich in einer erhöhten Adhäsion von Makrophagen und Thrombozyten, die hohe Konzentrationen von Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) sezernieren können und somit Einfluß nehmen auf die Proliferation und Migration von glatten

Muskelzellen und Endothelzellen, was schließlich zu vermehrter Angiogenese führen kann, auch im Bereich der Plaque.

Proinflammatorische Proteine wie CRP, Il-6 und Plasminogenaktivator-Inhibitor-(PAI-1) sind bei Insulinresistenz und Hyperglykämie vermehrt nachweisbar (35). Auch prädiabetische Patienten, die im Verlauf einen manifesten Diabetes mellitus entwickeln, weisen bereits erhöhte Marker der Inflammation auf. Besonders bei dieser Gruppe von Hochrisikopatienten für ein akutes Koronarsyndrom könnte zukünftig ein zuverlässiger Marker der Inflammation, der zugleich die Stabilität einer Plaque widerspiegelt, eine Prognoseverbesserung bedeuten.

5.3.3 Assoziation von Hypercholesterinämie mit dem proliferativen und angiogenetischen Potential von Endothelzellen

Bereits die frühen Stadien atherosklerotischer Läsionen sind durch eine lokale subendotheliale Ablagerung von Cholesterin gekennzeichnet. Diese Fetteinlagerungen induzieren eine Gegenreaktion, die durch die Adhäsion von Monozyten und Lymphozyten an das Endothel und deren nachfolgende Einwanderung in die Gefäßwand gekennzeichnet ist und zum Ziel hat, die lokale Hämöostase in der Gefäßwand wiederherzustellen (131). Oxidativ modifizierte Low-density-Lipoproteine (ox-LDL) induzieren eine Dysfunktion des Endothels und eine chronische Entzündung, die durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α und Wachstumsfaktoren vermittelt wird. Eine weitere charakteristische Wirkung der oxidierten Lipoproteine ist eine Verschiebung der koagulatorischen Homöostase in Richtung einer vermehrten Koagulation, die sich in einer erhöhten Aktivität des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors-1 (PAI-1) widerspiegelt (152). Infolge einer Kombination von ox-LDL Anreicherung, Zytokinaktivierung und einer sich entwickelnden Hypoxie auf dem Boden von relevanten Koronarstenosen kommt es in Endothelzellen zur verstärkten Expression von VEGF und somit zu vermehrter Proliferation und Angiogenese. In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv wiesen ca. 65% der Patienten mit stabiler bzw. instabiler Angina eine Hypercholesterinämie auf.

Verschiedene Studien haben bereits einen engen Zusammenhang zwischen Lipoprotein- und VEGF Serumspiegeln im Blut nachgewiesen. So konnte einerseits unter der Therapie mit Statinen, die gegenwärtig zur Standardtherapie bei Koronarer Herzerkrankung zählt, parallel zur Abnahme des LDL- und Triglyceridwertes eine Reduktion des VEGF und CRP-Spiegels beobachtet werden. Betrachtet man weitere Untersuchungen, muß es sich hierbei jedoch um biphasische und dosisabhängige Effekte handeln. In einer Studie an Yucatan-Schweinen verbesserte die Therapie mit Atorvastatin die hypercholesterinämieinduzierte endotheliale

Dysfunktion, ohne Beeinträchtigung der kollateralabhängigen Perfusion im Sinne einer verstärkten proangiogenetischen Antwort (101). Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF-2 üben ihre Wirkung hauptsächlich durch Aktivierung von Tyrosinkinase gekoppelten Rezeptoren aus, was schließlich zur Freisetzung von NO führt (150). Da die Koronare Herzerkrankung durch eine endotheliale Dysfunktion mit verminderter NO-Bioverfügbarkeit gekennzeichnet ist, könnte an diesem Punkt eine Limitierung des Benefits in der Gabe von Wachstumsfaktoren im Sinne einer therapeutischen Angiogenese bestehen.

5.4 Mögliche klinische Relevanz und therapeutische Anwendung

Entzündliche Prozesse spielen eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der koronaren Herzkrankheit (KHK) und des akuten Koronarsyndroms (ACS). Bei Patienten mit ACS könnten uns zukünftig neue Biomarker in Kombination mit Troponin helfen, Patienten zu identifizieren, die ein hohes Risiko für vaskuläre Ereignisse aufweisen. Insbesondere die Patienten mit biochemischer Evidenz für ein anhaltendes inflammatorisches Geschehen, sowie instabile und vulnerable Plaques könnten von einer medikamentösen, antiinflammatorischen und frühen invasiven Therapie profitieren.

Mit der Zielsetzung langfristig einen Beitrag zu der Idee zu leisten, ein Screening Verfahren für Risikopatienten mit KHK zu entwickeln, untersuchten wir die Assoziation bestimmter Chemokine und Zytokine mit der Endothelzellfunktion. Im Rahmen dieser Untersuchungen etablierten wir funktionelle Assays, um die Wirkungen des Plasmas von Patienten mit koronarer Herzkrankung auf das angiogenetische, migratorische und proliferative Potential von Endothelzellen zu untersuchen und ein krankheitsspezifisches Profil zu erstellen.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom zu Veränderungen im Plasmaspiegel von Biomarkern kommt, die mit der Inflammation, der Plättchenaktivierung, der Gerinnung, der Nekrose der Myozyten und der Plaqueruptur verbunden sind (111). Bislang konnten nur einzelne Proteine im Plasma von Patienten mit KHK analysiert werden, seit kurzem gibt es jedoch mit Proteomics eine neue Technik, die es ermöglicht, eine Übersicht aller Proteine, die im Gewebe, auf Zellen und im Plasma exprimiert werden zu erstellen. Proteomics besteht aus einer Kombination von Techniken, einschließlich zweidimensionaler Gelelektrophorese, Image Analyse und Massenspektrometrie.

Im Zeitalter von Proteomics könnte es langfristig in der Kardiologie das Ziel sein, spezifische und prognostisch aussagekräftige Proteinkombinationen im Plasma von Patienten mit KHK zu

identifizieren, wie dies bereits in der Onkologie im Sinne von Tumormarkern zur Risikostratifizierung bei Krebspatienten möglich ist.

Zukünftig könnten durch Bioassays in Kombination mit z.B. Proteomics klinisch relevante Biomarker identifiziert werden. In ersten Untersuchungen gelang bereits durch Flüssigkeitschromatographie gekoppelte Tandem-Massenspektrometrie die Identifizierung verschiedener Polypeptide der indikativen Muster aus Urin als Fragmente von Kollagen I und III. Diese beiden Kollagentypen sind Bestandteile der extrazellulären Matrix, die in verdickten Bereichen der Intima arteriosklerotischer Läsionen gefunden werden. In gesunden Arterien geht die Neusynthese und Degradation der extrazellulären Matrix verhältnismäßig langsam vonstatten. Eine pathologische Veränderung führt jedoch zu einer beschleunigten Synthese der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen Typ I und III, Elastin und verschiedenen Proteoglykanen (83). Jedes der identifizierten Kollagenfragmente konnte im Vergleich zu gesunden Kontrollen in erhöhten Mengen im Urin von KHK-Patienten gefunden werden. Diese Fragmente entstehen vermutlich durch den Einfluß der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9), die bei arteriosklerotischen Veränderungen verstärkt exprimiert wird (71). Auch gibt es Hinweise dafür, dass zirkulierende MMP-9 ein rapides Schrumpfen des Lumendurchmessers und eine erhöhte kardiovaskuläre Sterblichkeit anzeigt. Eine erhöhte MMP-9-Aktivität wurde vor allem in instabilen Plaques gefunden, MMP-9 spielt somit auch eine Rolle bei der Plaqueruptur.

Die klinische Relevanz unserer Untersuchungen ist in der Risikostratifizierung von Patienten mit KHK zu sehen. Die heterogene Gruppe der Patienten mit ACS ohne EKG-Veränderungen stellt im klinischen Alltag ein häufiges Problem dar. Die klassischen Nekrosemarker Kreatinkinase (CK-MB), kardiales Troponin T (TnT) und Troponin I (TnI) sind in der klinischen Routine etablierte Marker und entscheidend für die Therapiestrategie. Allerdings finden sich lediglich bei 22-50% der Patienten mit einem ACS erhöhte Konzentrationen von Troponin im Serum (6). Darüber hinaus haben troponinnegative Patienten ein Risiko von 8,4% für Tod oder nichttödlichen Myokardinfarkt innerhalb von 6 Monaten nach einem akuten Koronarsyndrom (148). Auch für diese diagnostische Lücke ergibt sich die Notwendigkeit zur Etablierung zusätzlicher Marker.

Bereits jetzt ist bekannt, dass sämtliche in der Primär- und Sekundärprävention der Atherosklerose zum Einsatz kommende Medikamente, wie Statine, ACE-Hemmer, Thrombozytenaggregationshemmer und Glitazone bei Patienten mit KHK antiinflammatorische Effekte ausüben.

Die Identifizierung zirkulierender inflammatorischer Mediatoren, könnte die Entwicklung neuer, gezielt eingreifender, vaskulär antiinflammatorischer Substanzen nach sich ziehen. Dadurch besteht die begründete Hoffnung, aus der verbesserten Einsicht in die Pathophysiologie des ACS und in die Wirkung inflammatorischer Mediatoren auf Endothelzellen, therapeutische Konsequenzen für den individuellen Patienten abzuleiten.

6. Zusammenfassung

Bei der Etablierung funktioneller Assays um die Wirkungen des Patientenplasmas auf die Endothelzellfunktion zu untersuchen und ein krankheitsspezifisches Profil aufzuweisen zeigte sich, dass im Verlauf nach koronarer Stentimplantation nur das proliferative Potential von Plasmaproben signifikant vermindert war, während die Effekte des Plasmas auf die Migration und Angiogenese sowohl vor Stentimplantation, als auch danach in allen Gruppen unverändert waren. Im Vergleich zu Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris war das angiogenetische Potential der Plasmaproben im akuten Myokardinfarkt signifikant erhöht, während die Migrations- und die Proliferationsrate im akuten Myokardinfarkt signifikant verringert waren.

Die Analyse von Zytokinen und Chemokinen und ihre Assoziation mit einzelnen Endothelzellfunktionen ergab einen Hinweis auf ihre spezifische Rolle im Rahmen der Inflammation. Zukünftig könnte die Verwendung von Bioassays in Kombination mit z.B. Proteomics eine Identifizierung von klinisch relevanten Biomarkern erlauben. Weitere Untersuchungen mit einem größeren Patientenkollektiv könnten die klinische Relevanz aufdecken.

7. Abkürzungen

ACS	Acute coronary syndrome
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CCS Klassifikation	Canadian Cardiovascular Society
CK	Kreatinkinase
CK-MB	Isoenzym der Kreatinkinase Myocard/Brain
CPDA Plasma	Citrate Phosphate Dextrose Anticoagulant
CRP	C-reaktives Protein
FAK	focal adhesion kinase
FCS	Fetal calf serum
FGF-2	Fibroblast growth factor
GA	Gentamicin und Amphotericin
GCSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GTP	Guanosin Triphosphat
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IL1	Interleukin 1
IL2	Interleukin 2
IL8	Interleukin 8
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoprotein
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MCSF	Macrophage colony-stimulating factor
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Non ST - elevated myocardial infarction
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
SEM	Standardabweichung in Bezug auf die Anzahl der Versuche
STEMI	ST - elevated myocardial infarction
TGF- β	Transforming growth factor β
TGF- β	Transforming growth factor- β

TNF- α	Tumornekrosefaktor α
t-PA	Tissue plasminogen activator
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VWF	von-Willebrand-Faktor

8. Verzeichnisse

8.1	Abbildungsverzeichnis	Seite
Abbildung 1:	Mechanismen der Neubildung von Gefäßen	37
Abbildung 2:	HCAEC Zellen auf ECMatrix nach Stimulation mit Patientenplasma und 12h Inkubation bei 37°C.	48
Abbildung 3:	Foto eines well-Abschnitts nach „Scratching“-Entfernung Der Zellen rechts der Markierung mit Hilfe eines Zellschabers	49
Abbildung 4:	Foto eines well-Abschnitts nach „Scratching“, Stimulation mit Patientenplasma und 24h Inkubation bei 37°C.	50
Abbildung 5:	Prinzip des BrdU	52
Abbildung 6a:	signifikante Unterschiede bei der Proliferation im Verlauf	58
Abbildung 6b:	Unterschiede bei der Migration im Verlauf	58
Abbildung 6c:	Unterschiede bei der Angiogenese im Verlauf	59
Abbildung 7a:	Gruppenvergleich Angiogenese	60
Abbildung 7b:	Gruppenvergleich Migration	60
Abbildung 7c:	Gruppenvergleich Proliferation	61
Abbildung 8:	Repräsentative Beispiele Angiogenese	62
Abbildung 9:	Repräsentative Beispiele Migration	63
Abbildung 10:	Migration AMI versus SAP	64
Abbildung 11:	Angiogenese AMI versus SAP	65
Abbildung 12:	Zusammenhang von szintigraphischer Infarktgröße und angiogenetischem Potential	68

8.2 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: CXC-Chemokine und ihre Rezeptoren	29
Tabelle 2: CC-Chemokine und ihre Rezeptoren	30
Tabelle 3: Einschlußkriterien der Studienpopulation	44
Tabelle 4: Versuchsanordnung Angiogenese-Versuch	47
Tabelle 5: Versuchsanordnung Migration mittels „Scratching“-Versuch	50
Tabelle 6: Versuchsanordnung Proliferation mittels BrDU-Versuch	53
Tabelle 7: Klinische Daten des Patientenkollektivs	56
Tabelle 8: Assoziation zirkulierender Chemokine und Zytokine mit der Endothelzellfunktion	67
Tabelle 9: Assoziation von Risikofaktoren mit der Endothelzellfunktion	69

8.3 Literaturverzeichnis

1. Abbate A, Bonanno E, Mauriello A, Bussani R, Biondi-Zoccai GG, Liuzzo G, Leone AM, Silvestri F, Dobrina A, Baldi F, Pandolfi F, Biasucci LM, Baldi A, Spagnoli LG, Crea F. Widespread myocardial inflammation and infarct related artery patency. *Circulation* 2004;110:46-50.
2. Abbud ZA, Shindler DM, Wilson AC, Kostis JB. Effect of diabetes mellitus on short- and long-term mortality rates of patients with acute myocardial infarction: a statewide study. Myocardial Infarction Data Acquisition System Study Group. *Am Heart J* 130(1):51-58.
3. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, Buechi L, Walz A, Richmond A, Strieter RM. The CXC chemokine receptor CXCR2 is the putative receptor for ELR⁺ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J. Immunol.* 2000;165:5269-5277.
4. Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. Plasma concentration of C-reactive protein and the calculated Framingham Coronary Heart Disease Risk Score. *Circulation* 2003;108:161-5.
5. Anderson JL, Carlquist JF, Muhlestein JB, Horne BD, Elmer SP. Evaluation of C-Reactive Protein, an Inflammatory Marker and Infectious Serology as Risk Factors for Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:35-41.
6. Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schacman M, Mc Cabe CH, Cannon CP, Fischer GA, Fung AY, Thompson C, Wybenga D, Braunwald E. Cardiac-specific troponin-I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1996;335:1342-9.
7. Anzai T, Yoshikawa T, Shiraki H, Asakura Y, Akaishi M, Mitamura H, Ogawa S. C-Reactive Protein as a Predictor of Infarct Expansion and Cardiac Rupture After a First Q-Wave Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 1997 ;96 :778-784.
8. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with CX3C motif. *Nature.* 1997;385(6617):640-644.
9. Benaglio M, Azzurri A, Ciervo A, Amedei A, Tamburini C, Ferrari M, Telford JL, Baldari CT, Romagnani S, Cassone A, D'Elis MM, Del Prete G. T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6658-63.
10. Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche M, Santoni A, Capogrossi MC, Napolitano M. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *Journal of Immunological Methods* 2003;273:83-101.
11. Bernd C. Simon, Bernd Noll, Bernhard Maisch. *Herz* 1999.24;62-71.

12. Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA, Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, De Feyter PJ, Specchia G, Ruzyllo W. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2002;23:1809–1840.
13. Biasucci LM, Liuzzo G, Angiolillo DJ, Sperti G, Maseri A. Inflammation and Acute Coronary Syndromes, *Herz* 2000;25:108-112.
14. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuffi AG, Ciliberto G, Maseri A. Elevated levels of Interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996; 94:874-7.
15. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894-897.
16. Brady HR. Leukocyte adhesion molecules and kidney disease. *Kidney Int.* 1994 45(5):1285-1300.
17. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, Jones RH, Kereiakes D, Kupersmith J, Levin TN, Pepine CJ, Schaeffer JW, Smith EE 3rd, Stewart DE, Theroux P, Gibbons RJ, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gregoratos G, Hiratzka LF, Jacobs AK, Smith SC Jr. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non- ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation* 2000;102:1193–1209.
18. Braunwald E. Unstable angina. A classification. *Circulation* 1989;80:410–414.
19. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A Widespread coronary inflammation in unstable angina . *N Engl J Med* 2002;347:5-12.
20. Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc* 1996;33:181 194.
21. Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci.* 1997;22:251-256.
22. Caligiuri G, Paulson G, Nicoletti A, Maseri A, Hansson GK. Evidence for antigen-driven T cell response in unstable angina. *Circulation* 2000;102:1114-9.
23. Carmeliet P, Collen D. Molecular analyses of blood vessel formation and disease. *Amer J Physiol* 1997;42:2091-2104.
24. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Röckl W, Waltenberger J, Risau W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities - Implications for a functional role of PLGF in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 1996;271;17629 17634.
25. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-91.

26. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB. Low Grade Inflammation and Coronary Heart Disease: Prospective Study and Updated Meta-Analyses. *BMJ* 2000;321, 199-204.
27. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A. Chlamydia Pneumoniae IgG Titres and Coronary Heart Disease: Prospective Study and Meta-Analysis, *BMJ* 2000;321:208-213.
28. Davies MJ, The Composition of Coronary Artery Plaques. *N Engl J Med.* 1997;336:1312-1314.
29. De Sutter J, De Buyzere M, Gheeraert P, Van de Wiele C, Voet J, De Pauw M, Dierckx R, De Backer G, Taeymans Y. Fibrinogen and C-Reactive Protein on Admission as Markers of Final Infarct Size After Primary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction. *Atherosclerosis* 2001;157:189-196.
30. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-605.
31. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and anti-inflammatory cytokines and autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 2002;966:233-90.
32. Erdmann klinische Kardiologie; Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße, 5. Auflage, 245, 316-317.
33. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leukocytes and the Risk of Ischemic Diseases *JAMA* 1987;257:2318-2324.
34. Ferrara N. VEGF: Basis science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 2004;25.
35. Festa A, Hanley AJ, Tracy RP, D'Agostino R Jr, Haffner SM. Inflammation in the prediabetic state is related to increased insulin resistance rather than decreased insulin secretion. *Circulation* 2003;108:1822-30.
36. Fichtlscherer S, Zeiher AM. Endothelial dysfunction in acute coronary syndromes: association with elevated C-reactive protein levels. *Ann Med* 2000;32:515-8.
37. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995;1:27-31.
38. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation* 1998;97:1108-1110.
39. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186.
40. Frangiogiannis NG, Smith CW, Entman ML, The Inflammatory Response in Myocardial Infarction. *Cardiovasc Res.*, 2002;53:31-47.

41. Frangogiannis NG. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res.* 2004; 53:585-595.
42. Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products from five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15:197-204.
43. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98:1164-1167.
44. Gengrinovitch S, Greenberg SM, Cohen T, Gitay-Goren H, Rockwell P, Maione TE, Levi BZ, Neufeld G. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF 121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1995;270;15059-15065.
45. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999;126:1149-1159.
46. Gerhardt W, Katus H, Ravkilde J, Hamm CW, Jørgensen PJ, Peheim E, Ljungdahl L, Löfdahl P. Troponin T in suspected ischemic myocardial injury compared with mass and catalytic concentrations of Creatine kinase isoenzyme MB. *Clin Chem* 1991;37/8:1405–1411.
47. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001;69: 513-521.
48. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ: Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316(22):1371-1375.
49. Goede V, Brogelli L, Ziche M, Augustin HM. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int. J. Cancer* 1999;82:765-770.
50. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509.
51. Hall RA, Lefkowitz RJ. Regulation of G-protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins. *Circ Res.* 2002;91:672-680.
52. Hamm C.W. Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
53. Hamm CW, Braunwald E. A classification of unstable angina revisited. *Circulation* 2000 ;102:118–122.
54. Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of Activated T Lymphocytes in the Human Atherosclerotic Plaque. *Am J Pathol* 1989;135:169-175.

55. Hansson GK, Libby P, Schönbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;105:570-5.
56. Heeschen C, Hamm CW, Bruemmer J, Simoons ML. Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE Investigators. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1535-42.
57. Heeschen C, Hamm CW, Goldmann B, Deu A, Lamgenbrink L, White HD. Troponin concentrations for risk stratification of patients with acute coronary syndromes in relation to therapeutic efficiency of tirofiban. PRISM Study Investigators. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management. *Lancet* 1999;354: 1757–1762.
58. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999;79:1283-1316.
59. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. VEGF and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56:549-580.
60. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1- induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Chemokines, Blood*. 2005;105,4.
61. Horwitz AR, Parsons JT. Cell migration-Moving on. *Science* 1999;286(5442):1102.
62. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*. 199; 254(5028):99-102.
63. Hunzelmann N, Eming S, Rosenkranz S. Wachstumsfaktoren. *Z Rheumatol* 2007;66:290-296.
64. Huttenlocher A, Palecek SP, Lu Q, Zhang W, Mellgren RL, Lauffenburger DA, Ginsberg MH, Horwitz AF. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem* 1997;272:32719.
65. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, Doi K, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Chun TH, Masatsugu K, Becker AE, Nakao K. VEGF expression in human coronary atherosclerotic lesions: Possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998;98:2108-2116.
66. Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, Katus H. It's time for a change to troponin standard. *Circulation* 2000;102:1216-1220.
67. Jaffee EM, Pardoll DM. Considerations for the clinical development of cytokine genetransduced tumor cell vaccines. *Methods* 1997;12:143-153.
68. James SK, Lindahl B, Siegbahn A, Stridsberg M, Venge P, Armstrong P, Barnathan ES, Califf R, Topol EJ, Simoons ML, Wallentin L. N-terminal pro-brain natriuretic peptide and other risk markers for the separate prediction of mortality and subsequent myocardial infarction in patients with unstable coronary artery disease. *Circulation* 2003;108:275-81.

69. Kadar A, Glasz T. Development of Atherosclerosis and Plaque Biology, *Cardiovasc Surg* 2001;9:109-121.
70. Kahn ML. Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:419-25.
71. Kalea A, Koivu TA, Sisto T, Kanervisto J, Höyhty M, Sillanaukee P, Lehtimäki T, Nikkari ST. Serum matrix metalloproteinase-9 concentration in angiographically assessed coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2002;62(5):337-342.
72. Kalka C, Asahara T, Krone W, Isner JM. Angiogenesis und Vaskulogenese. *Herz* 2000; 25:611-622.
73. Kim SH, Kann YJ, Kim WJ, Woo DK, Lee Y, Kim DI, Park YB, Kwon BS, Park JE, Lee WH. TWEAK can induce pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ J* 2004;68:396-399.
74. Klier CM, Nelson PJ. Chemokine-induced extravasation of MonoMac 6 cells: chemotaxis and MMP activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;878:575-577.
75. Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J* 1999;18:2459.
76. Klootwijk KP, Hamm CW. Acute coronary syndromes: Diagnosis. *Lancet* 2000;353 :10–15.
77. Kroll J, Waltenberger J. Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch VEGF-A. *Kardiol* 2000;89:206-218.
78. Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;252:743-746.
79. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. VEGF induces EDRF-dependant relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol* 1993;265:586-592.
80. Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000;97:5456-5461.
81. Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1995; 2304-2310.
82. Laitinen M, Zachary I, Breier G, Pakkanen T, Häkkinen T, Luoma J, Abedi H, Risau W, Soma M, Laakso M. VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum Gene Ther* 1997;8:1737-1744.
83. Lee RT, Libby P: The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(10): 1859-1867.

84. Libby P, Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes, *Circulation*. 2001;104:365-372.
85. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of Infectious Agents in Atherosclerosis and Restenosis. *Circulation* 1997 ;96 :4095- 4103.
86. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-74.
87. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:2844-50.
88. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC study group. Fragmin during instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2000;343:1139-47.
89. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndrome. *Circulation* 2000;102:2883-8.
90. Loppnow H. Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen. *Internist* 2001;42:581-611.:13-27.
91. Lutton A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1). Novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann NY Acad Sci* 2002;979:80-93.
92. MacGowan GA, Mann DL, Kormos RL, Feldman AM Murali S. Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *Am J Cardiol* 1997;79:1128-1131.
93. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55-60.
94. Martinovic I, Abegunewardene N, Seul M, Vosseler M, Horstick G, Buerke M, Darius H, Lindemann S. Elevated MCP-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease. *Circ J* 2005;69:1484-9.
95. Marumo T, Schini-Kerth V, Busse R. VEGF activates nuclear factor-kappa B and induce monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes* 1999;48:1131-1137.
96. Mogensen CE, Osterby R, Gundersen HJG. Early functional and morphologic vascular renal consequences of the diabetic state. *Diabetologia* 1979;17:71-76.
97. Moreno PR, Bernardi VH, López-Cuellar J, Murcia AM, Palacios IF, Gold HK, Mehran R, Sharma SK, Nemerson Y, Fuster V, Fallon JT. Macrophages, Smooth Muscle Cells and Tissue Factor in Unstable Angina – Implications for Cell-Mediated Thrombogenicity in Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 1996;94:3090-3097.

98. Mossmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994; 122.
99. Müller-Werdan U, Engelmann H, Werdan K. Cardiodepression by tumor necrosis factor alpha. *Eur Cytokine Netw.* 1998;9:689-691.
100. Müller-Werdan U, Jacoby J, Loppnow H, Werdan K. Noradrenaline stimulates cardiomyocytes to produce Interleukin-6, indicative of a proinflammatory action, which is suppressed by carvedilol. *Eur Heart J* 1999;20:1721.
101. Munir B. High-dose Atorvastatin improves hypercholesteremic coronary endothelial dysfunction without improving the angiogenic response. *Circulation* 2006;114:402-408.
102. Munro JM, van der Walt JD, Munro CS, Chalmers JAC, Cox EC: An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Human Pathol* 1987;18:375.
103. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998;101:2567-2578.
104. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1436-42.
105. Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, et al. T cell mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation* 2002;105:570-5.
106. Nelson PR, Yamamura S, Mureebe L, Hiroyuki I, Kent KC. Extracellular matrix proteins are potent agonists of human smooth muscle cell migration. *J Vasc Surg* 1996;24:25-33.
107. Neri Serneri GG, Boddi M, Modesti PA, Cecioni I, Coppo M, Papa ML, Toscano T, Marullo A, Chiavarelli M. Immunomediated and ischemia-independent inflammation of coronary microvessels in unstable angina. *Circ Res* 2003;92:1359-66.
108. Nikolaos G. Frangogiannis, Mark L. Entman. Chemokines in Myocardial Ischemia. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:163-169.
109. O'Brian ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1994;145:883-894.
110. O'Brian ER, Garvin MR, Dev R. Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1994;145:883-894.
111. Oldgren J, Wallentin L, Grip L, Linder R, Norgaard BL, Siegbahn A. Myocardial damage, inflammation and thrombin inhibition in unstable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2003;24:86-93.
112. Olsson A, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev* 2006;7:359-371.

113. Ott I, Andrassy M, Zieglgangersberger D, Geith S, Schömig A, Neumann FJ. Regulation of monocyte procoagulant activity in acute myocardial infarction; role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 2001;97:3721-6.
114. Ponikowski P, Anker SD, Chua TP, Francis D, Banasiak W, Poole-Wilson PA, Coats AJ, Piepoli M. Oscillatory breathing patterns during wakefulness in patients with chronic heart failure: clinical implications and role of augmented peripheral chemosensitivity. *Circulation* 1999;100:2418-2424.
115. Pope JH, Aufderheide TP, Ruthazer R, Woolard RH, Feldman JA, Beshansky JR, Griffith JL, Selker HP. Missed diagnoses of acute cardiac ischemia in the emergency department. *N Engl J Med* 2000;342:1163–1170.
116. Proost P, Schutyser E, Menten P. Amino-terminal truncation of CXCR3 agonists impairs receptor signaling and lymphocyte chemotaxis while preserving antiangiogenic properties. *Blood* 1998;98:3554-3561.
117. Pruijt J, Willemze R, Fibbe W. Mechanisms underlying haematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8. *Curr Opin Haematol* 1999;6:152-6158.
118. Reithmann C, Werdan K, . Tumor necrosis factor-alpha decreases inositol phosphat formation and phosphatidylinositol-biphosphate (PIP2) synthesis in rat cardiomyocytes. *Arch Pharmacol* 1994;349:175-182.
119. Ren G, Dewald O, Frangogianis NG. Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003;2:242-256.
120. Richardson RM, Pridgen BC, Haribabu B, Ali H, Snyderman R. Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time dependent signal generation. *J Biol. Chem.* 1998;273:23830-23836.
121. Ridker P. C-Reactive Protein and the Prediction of Cardiovascular Events Among those at Intermediate Risk. *J Am Coll Cardiology* 2007;49:21.
122. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha as an increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000;101:2149-53.
123. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction in apparently healthy Men. *Circulation* 2000;101:1767-72.
124. Riemann D, Kehlen A, Langner J. Stimulation of the expression and the enzyme activity of aminopeptidase N/CD13 and DPPIV/CD26 in human renal-cell carcinoma-cells and renal tubular epithelial cells bei T-cell-derived cytokines, such as IL-4 and IL-13. *Clin Exp Immunol* 1995;100:277-283.
125. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
126. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.

127. Rollins BJ, Pober JS. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138:1315-1319.
128. Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 1990;136:1229-1233.
129. Rosenkranz S, Kazlauskas A. Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes. *Growth factors* 1999;16:201-216.
130. Ross R. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease, *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
131. Ross R. Atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.
132. Rubanyl GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.*1993;22:1-14.
133. Salcedo R, Young HA, Ponce ML, Ward JM, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. CCL11 induces in vivo angiogenic responses by human CCR3⁺ endothelial cells. *J Immunol.* 2001;166:7571-7578.
134. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998;19:568-74.
135. Santana M, Rosenstein Y. What it takes to become an effector T-cell: the process, the cells involved and the mechanisms. *J Cell Physiol* 2003;195:392-401.
136. Savonitto S, Granger CB, Ardissino D, Gardner L, Cavallini C, Galvani M, Ottani F, White HD, Armstrong PW, Ohman EM, Pieper KS, Califf RM, Topol EJ. The prognostic value of creatine kinase elevations extends across the whole spectrum of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:22-29.
137. Schaper W, Buschmann I. Collateral circulation and diabetes. *Circulation* 1999;99:2224-2226.
138. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 1996;79:911-919.
139. Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell.* 1994;78:919-925.
140. Schömig K, Busch G, Steppich B, Sepp D, Kaufmann J, Stein A, Schömig A, Ott I. Interleukin-8 is associated with circulating CD 133⁺ progenitor cells in acute myocardial infarction. *European Heart Journal* 2006;27,1032-1037.
141. Schooltink H, Rose-John S. Cytokines as therapeutic drugs. *J Interferon Cytokine Res* 2002 22;505-516.

142. Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci* 1999;112:2677.
143. Spagnoli LG, Bonanno E, Mauriello A, Palmieri G, Partenzi A, Sangiorgi G, Crea F. Multicentric inflammation in epicardial coronary arteries of patients dying of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1579-88.
144. Stamatovic SM, Keep RF, Mostarica-Stojkovic M, Andjelkovic AV. CCL2 regulates Angiogenesis via Activation of Ets-1 Transcription Factor. *The Journal of Immunology* 2006;177:2651-2661.
145. Steppich B, Neumann FJ, Schömig A, Ott I. Cytokine profiles and T-cell function in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis* 2007 Feb;190(2):443-51.
146. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *J. Biol Chem.* 2005;4:155-160.
147. Sullivan GW, Sarembock IJ, Linden J, The Role of Inflammation in Vascular Diseases, *J Leukoc Biol.* 2000;67:591-602.
148. The capture investigators. Randomized placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the Capture Study. *Lancet* 1997;349:1429-35.
149. The CAPTURE investigators. Randomized placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE study. *Lancet* 1997;349:1429-35.
150. Tofukuji M, Metais C, Li J, Franklin A, Simons M, Sellke FW. Myocardial VEGF expression after cardiopulmonary bypass and cardioplegia. *Circulation* 1998;98:242-248.
151. Toss H, Lindahl B, Siegbahn A, Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein in unstable coronary artery disease. *Circulation* 1997;96:4204-10.
152. Tremoli E, Camera M, Maderna P, Sironi L, Prati L, Colli S, Piovella F, Bernini F, Corsini A, Mussoni L. Increased synthesis of plasminogen activator inhibitor-1 by cultured human endothelial cells exposed to native and modified LDLs. *Arterioscler Thromb* 1993;13:338-346.
153. Van der Wal AC, Becker AE, Van der Loos CM, Das PK. Site of Intimal Rupture or Erosion of Thrombosed Coronary Atherosclerotic Plaques Is Characterized by an Inflammatory Process Irrespective of the Dominant Plaque Morphology. *Circulation* 1994 ;89 :36-44.
154. Van Nieuw Amerongen GP, Koolwijk P, Versteilen A, van Hinsbergh VW. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:211-217.

155. Vantler M, Caglayan E, Zimmermann WH, Bäumer AT, Rosenkranz S. Systematic evaluation of anti-apoptotic growth factor signaling in vascular smooth muscle cells: Only Phosphatidylinositol 3'-kinase is important. *J Biol Chem* 2005;280:14168-14176.
156. Vermeiren GL, Claeys MJ, Van Bockstaele D, Grobber B, Slegers H, Bossaert L, Jorens PG. Reperfusion Injury After Focal Myocardial Ischemia: Polymorphonuclear Leukocyte Activation and its Clinical Implications. *Resuscitation*, 2000;45:35-61.
157. Vestweber D. Endothelzellen: Barriere zwischen Blut und Gewebe. Max-Planck-Institut Münster 2005.
158. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for VEGF. *J Biol Chem* 1994;269:26988-26995.
159. Waltenberger J. Modulation of growth factor action: Implications for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulation* 1997;96:4083-4094.
160. Weissberg PL. Atherogenesis:current understanding of the causes of atheroma. *Heart* 2000;83:247-52.
161. Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5252-5256.
162. Youker KA, Beirne J, Lee J, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Time-Dependent Loss of Mac-1 from Infiltrating Neutrophils in the Reperfused Myocardium. *J Immunol*, 2000;164:2752-2758.
163. Zell R, Geck P, Werdan K, Boekstegers P. TNF- α and IL-1 α inhibit both pyruvate dehydrogenase activity and mitochondrial function in cardiomyocytes; evidence for primary impairment of mitochondrial function. *Mol Cell Biochem* 1997;177:61-67.
164. Zetter BR, Brightman SE. Cell motility and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2:850-856.

9. Publikation

Steppich B, Kaufmann J, Sepp D, **Kunert K**, Rutz T, Stratz C, Ott I. Increased circulating placental growth factor (PLGF) during percutaneous intervention is associated with applied radio contrast agent. *Coron Artery Dis.* 2009 Mar;20(2):130-7.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Katharina Elisabeth Kunert
Geburtsdatum 17.März 1980
Geburtsort München

Schulausbildung

1986-1990 Grundschule Freiburg
1990-1999 Droste-Hülshoff Gymnasium Freiburg
1996/1997 Richard Huish College Taunton, England
1999 Allgemeine Hochschulreife

Studium

1999-2003 Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs
Universität Freiburg
2001 Ärztliche Vorprüfung
2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003-2006 Studium der Humanmedizin an der Technischen
Universität München
2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Approbation 9. Mai 2006 Regierung von Oberbayern, München

Praktisches Jahr 2005/2006

1. Tertial Innere Medizin I. Medizinische Abteilung
Krankenhaus München-Bogenhausen
2. Tertial Department of Surgery, Musgrove Park Hospital,
Taunton, England
Department of Surgery, Concord Repatriation Hospital,
Sydney, Australien
3. Tertial Anästhesie, Rotkreuzkrankenhaus München

Beruflicher Werdegang

Seit Januar 2007

Assistenzärztin in der Klinik für Kardiologie und
Angiologie Universitätsmedizin Charité Berlin, Campus
Mitte.

11. Danksagungen

Frau Prof. Dr. med. Ilka Ott danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit und die gute Betreuung.

Ich möchte mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Birgit Campbell und Annette Stobbe für die gute Zusammenarbeit und ihre Geduld bedanken.

Zusätzlich gilt mein besonderer Dank meinem Freund und Mitdoktorand Jan Kaufmann für die dauerhafte Unterstützung in vielerlei Hinsicht.