

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

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

**Freisetzung von Placental Growth Factor (PIGF) nach koronarer
Stentimplantation**

Jan Heinrich Kaufmann

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 11.12.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 18.03.2009 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Koronare Herzerkrankung und akutes Koronarsyndrom	5
1.1.1 Akutes Koronarsyndrom und Entzündungsreaktion	7
1.1.2 Entzündungsreaktion und Angiogenese	8
1.1.3 Zytokine	8
1.1.3.1 Placental Growth Factor	8
1.1.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor	12
1.1.3.2.1 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 und -2	12
1.1.3.3 Interleukin-6	15
2. Zielsetzung	15
3. Patientengut und Methodik	16
3.1 Patienteneinschlusskriterien	16
3.2 Patientenausschlusskriterien	17
3.3 Studienprotokoll	18
3.3.1 Studiengruppe	18
3.3.2 Gesunde Probanden	19
3.4 Methoden	20
3.4.1 Zellkultur	20
3.4.1.1 Zellstimulation	20
3.4.2 Quantitative Sandwich Enzyme Immunoassay	22
3.4.2.1 Prinzip des Quantitative Sandwich Enzyme Immunoassay	22
3.4.3 RNA-Isolierung, reverse Transkription und Real-time PCR	24
3.4.3.1 RNA-Isolierung	24
3.4.3.2 Prinzip der reversen Transkription	24
3.4.3.3 Prinzip der Real-time PCR	25
3.4.3.4 Versuchsdurchführung	27
3.4.4 Kardiale Marker und Ejektionsfraktion	29
3.5 Statistik	29

4. Ergebnisse	30
4.1 Klinische Daten des Patientenkollektivs	30
4.2 Zytokine	32
4.2.1 Placental Growth Factor	32
4.2.1.1 PIGF bei Patienten mit perkutaner koronarer Intervention und Stentimplantation	32
4.2.1.2 PIGF bei Patienten mit diagnostischer Koronarangiographie	33
4.2.1.3 Auswirkungen von Heparin auf die Freisetzung von PIGF <i>in vivo</i>	34
4.2.2 VEGF bei Patienten mit perkutaner koronarer Intervention und Stentimplantation	35
4.2.3 IL-6 bei Patienten mit perkutaner koronarer Intervention und Stentimplantation	36
4.2.4 Korrelationen der Zytokine im akuten Koronarsyndrom	37
4.3 Multivariate Analyse	38
4.4 Zellkulturversuche	40
4.4.1 Wirkung von Kontrastmittel auf die Freisetzung von PIGF in Endothelzellen	40
4.4.2 Wirkung von Kontrastmittel auf die Freisetzung von VEGF in Endothelzellen	42
4.4.3 Zellmorphologie	44
4.4.4 Vergleich von Imeron [®] und Visipaque [®]	45
4.4.5 mRNA-Expression von PIGF, VEGF und IL-6 in Endothelzellen nach Stimulation mit Imeron [®]	48
5. Diskussion	49
5.1 PIGF im akuten Koronarsyndrom	49
5.2 PIGF im Zusammenhang mit Ischämie und Inflammation	50
5.3 Einfluss von Röntgenkontrastmittel auf die Freisetzung von PIGF	51
5.4 Verlauf von PIGF und VEGF	52
6. Studienbeschränkungen	52
7. Zusammenfassung	53

8. Abkürzungen	54
9. Verzeichnisse	56
9.1 Abbildungsverzeichnis	56
9.2 Tabellenverzeichnis	58
9.3 Literaturverzeichnis	59
10. Publikationen	74
11. Lebenslauf	75
12. Danksagungen	76

1. Einleitung

Von den im Jahr 2007 in der Bundesrepublik Deutschland verstorbenen Menschen sind rund 43% an Erkrankungen des Kreislaufsystems und davon rund 16% an einem akuten Myokardinfarkt verstorben (100). Damit zählt die koronare Herzkrankheit und ihre Folgen trotz einer breiten Aufklärung der Bevölkerung über die Risikofaktoren und einer stetigen Optimierung der medikamentösen und interventionellen Therapie immer noch zu den häufigsten Todesursachen.

Im akuten Koronarsyndrom (ACS) als Komplikation der koronaren Herzkrankheit ist das Ziel der Therapie eine schnelle Wiederherstellung des koronaren Blutflusses und damit der myokardialen Perfusion. Interventionelle Maßnahmen zur Revaskularisierung wie die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) und Stentimplantation sind wirkungsvoll und verbessern sowohl die Symptome als auch die Prognose der betroffenen Patienten. Jedoch sind nicht alle Menschen, wie zum Beispiel Patienten mit hoher Komorbidität oder ausgeprägter und schwerer Gefäßokklusion, geeignet für diese Therapieformen. Darüber hinaus ist bei vielen Betroffenen das langfristige Ergebnis interventioneller Therapien trotz ihrer optimalen Anwendung unbefriedigend.

In den letzten Jahren wurden deshalb zur Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten biologische Prozesse untersucht, mit denen der Organismus aus sich heraus Organischämien entgegenwirkt. Darüber hinaus wird vor dem Hintergrund des gezielteren Einsatzes therapeutischer Maßnahmen intensiv nach biologischen Markern zur Optimierung der Risikostratifizierung gesucht.

Ein wichtiger Ansatzpunkt ist die Entschlüsselung von Mechanismen der Neubildung von Gefäßen in ischämischen Organen. Als Reaktion auf Gewebeischämien bildet der Organismus vermehrt Wachstumsfaktoren und mobilisiert zelluläre Elemente, die zusammenwirkend die Ausbildung neuer Gefäße ermöglichen (29). Mehrere Wirkungsweisen dieser Wachstumsfaktoren, zu denen Zytokine wie der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gehören, konnten bereits experimentell entschlüsselt werden. Sie wirken auf Endothelzellen, stimulieren diese zur Proliferation und Migration und induzieren eine Mobilisation von endothelialen und inflammatorischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die an der Gefäßneubildung beteiligt sind. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass VEGF, Angiopoietin-1, Stromal cell derived factor-1 (SDF-1), Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) oder Granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) die Mobilisation

von endothelialen Vorläuferzellen (EPCs) in ischämisches Myokard fördern und dort zur Neubildung von Gefäßen beitragen (42, 78). Man geht davon aus, dass die in die periphere Blutbahn mobilisierten Zellen im ischämischen Organ in Gefäße eingebaut werden, die aus bereits existierenden Gefäßen aussprossenden (Angiogenese) oder sich an der Bildung neuer, vom Gefäßsystem unabhängiger Gefäße beteiligen (Vaskulogenese, siehe *Abb. 1*) (93).

Ein Mitglied der VEGF-Familie, das in jüngerer Zeit im Zusammenhang mit ischämischen Erkrankungen näher untersucht wurde, ist Placental Growth Factor (PlGF). PlGF scheint vor allem unter pathologischen Bedingungen wie der Myokardischämie Einfluss auf das Wachstum von Gefäßen zu haben (21, 50) und steigert nicht nur die Angiogenese sondern ist über seine Wirkung auf Entzündungszellen auch ein Mediator im Rahmen entzündlicher Reaktionen (69). Da entzündliche Prozesse sowohl bei der Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung als auch im Zusammenhang mit der Plaque-Destabilisierung im akuten Koronarsyndrom eine wesentliche Rolle spielen, könnten Biomarker der Entzündungsreaktion wie PlGF in Zukunft hilfreich sein, Patienten zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse haben. Darüber hinaus könnte ein besseres Verständnis der entzündlichen Prozesse neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der Atherosklerose liefern.

1.1 Koronare Herzerkrankung und akutes Koronarsyndrom

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist definiert als atherosklerotisch bedingte Verengung der Herzkranzgefäße, wobei durch die verminderte Durchblutung des Herzmuskels ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot im Myokard entsteht (Koronarinsuffizienz). Zu den Risikofaktoren für die Entstehung einer KHK zählen Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen und Diabetes mellitus. Neben dem akuten Koronarsyndrom sind als weitere Folgen der KHK pectanginöse Beschwerden, Herzrhythmusstörungen, ischämische Herzmuskelschädigungen mit konsekutiver Herzinsuffizienz sowie der plötzliche Herztod zu nennen.

Die KHK steht in engem Zusammenhang mit der vaskulären Inflammation. Initiale Lipideinlagerungen in die Gefäßwand stellen einen inflammatorischen Stimulus dar (65), in dessen Folge es nach Aktivierung der Endothelzellen zu einem Einwandern von Entzündungszellen in die Gefäßwand kommt. Durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommt es zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion mit gesteigerter Proliferation glatter Muskelzellen in der Gefäßwand. Die so gebildete atherosklerotische

Plaque kann ab einer bestimmten Größe den koronaren Blutfluss und damit die myokardiale Sauerstoffversorgung derart einschränken, dass es, hervorgerufen durch bestimmte Stimuli (zum Beispiel körperliche Belastung), zum Auftreten typischer pectanginöser Beschwerden kommen kann (stabile Angina pectoris, SAP).

Bei Voranschreiten der vaskulären Entzündung kann es schließlich zur Destabilisierung der atherosklerotischen Plaque mit folgender Plaqueruptur und Thrombusbildung durch das Freisetzen thrombogenen Materials kommen (65). Die Folge ist ein akutes Koronarsyndrom.

Unter dem Begriff des akuten Koronarsyndroms (ACS) werden der akute Myokardinfarkt (AMI) mit ST-Streckenhebung (Q-wave MI, STEMI), der akute Myokardinfarkt ohne ST-Streckenhebung (non-Q-wave MI, NSTEMI) und die instabile Angina pectoris (IAP) zusammengefasst (31, 40). Die instabile Angina pectoris ist als Vorstufe des akuten Myokardinfarktes anzusehen (Präinfarktsyndrom). Alle drei Erscheinungsformen stehen in Zusammenhang mit einer Instabilität der atherosklerotischen Gefäßwandläsion, Plaqueruptur und Thrombusbildung.

Als Anpassung an eine akute Myokardischämie reduziert das Myokard zunächst seinen Stoffwechsel zulasten der kontraktilen Funktion (sog. „hibernating“ Myokard). In diesem Stadium ist der Herzmuskel noch in der Lage, durch Reperfusion die kontraktile Funktion wieder aufzunehmen. Ist die Ischämie zu ausgeprägt oder zu lang anhaltend, wird das Myokard in seiner Struktur irreversibel verändert. Es degeneriert, wird nekrotisch und durch fibrotisches Narbengewebe ersetzt (68).

Die Diagnose des akuten Koronarsyndroms wird durch das Auftreten charakteristischer pectanginöser Beschwerden im Zusammenhang mit typischen EKG-Veränderungen, einem Anstieg kardialer biochemischer Marker wie der Creatinkinase (CK), der Muscle-Brain Fraktion der Creatinkinase (CK-MB) und des Troponin im Serum sowie einer koronarangiographisch gesicherten Stenose bzw. Verschluss gestellt.

Klinisch weisen die pectanginösen Beschwerden im akuten Koronarsyndrom differentialdiagnostisch zur stabilen Angina pectoris drei charakteristische Merkmale auf: sie halten länger als 20 Minuten in Ruhe an, sind neu aufgetreten und zwingen zur Einstellung der körperlichen Aktivität oder sie sind in ihrer Intensität ansteigend und dabei häufiger, länger anhaltend und aus geringerem Anlass heraus aufgetreten als vorangegangene pectanginöse Beschwerden (13).

Die Therapie besteht in einem rechtzeitigen Einsetzen von Reperfusionmaßnahmen entweder durch eine medikamentöse Thrombolyse oder interventionell durch die PTCA und Implantation einer Gefäßstütze (Stent).

1.1.1 Akutes Koronarsyndrom und Entzündungsreaktion

Das akute Koronarsyndrom geht mit einer systemischen Entzündungsreaktion einher (6) wobei die Entzündung zunächst vom Gebiet der atherosklerotischen Läsion im Koronargefäß ausgeht und einen Faktor bei der Destabilisierung und Ruptur des atherosklerotischen Plaques darstellt (15, 108). Zu den systemisch entzündlichen Veränderungen, wie sie im akuten Koronarsyndrom auftreten, zählen u. a. erhöhte Plasmakonzentrationen von C-reaktivem Protein und Interleukin-6 (44, 55, 89, 106). Eine klinische Relevanz dieser systemischen Entzündungsreaktion im akuten Koronarsyndrom wurde in Studien aufgezeigt, die einen Zusammenhang zwischen der Höhe des Interleukin-6-(IL-6)-Spiegels bzw. des C-reaktiven Proteins (CRP) und dem Auftreten akuter koronarer Ereignisse aufzeigten (39, 44, 89). Eine Myokardischämie, die in ihrer Dauer und Ausprägung in einem Infarkt mündet, ruft eine weitere Entzündungsreaktion hervor (33). Obwohl dadurch die ursprünglich durch die Gefäßverletzung erhöhten Entzündungsmarker verschleiert werden (6), konnte ein Zusammenhang zwischen der Höhe des C-reaktiven Proteins und der Infarktmortalität aufgezeigt werden (66).

Einerseits legen diese Korrelationen zwischen systemischen Entzündungsmarkern und Infarktmortalität die Vermutung nahe, dass die Entzündungsreaktion ausschließlich negative Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf hat. Andererseits hatten klinische Studien, in denen Patienten mit akutem Myokardinfarkt antiinflammatorisch behandelt wurden, katastrophale Ergebnisse (91). Darüber hinaus wird durch die Reperfusion des ischämischen Gewebes die Entzündungsreaktion beschleunigt und verstärkt (33) und es konnte in diesem Zusammenhang in experimentellen und klinischen Studien gezeigt werden, dass im Infarkt die Gewebereparatur durch die Rekanalisation des betroffenen Gefäßes unterstützt wird, auch wenn kein kontraktiles Herzgewebe mehr durch die Reperfusion gerettet werden konnte (52, 59, 88).

1.1.2 Entzündungsreaktion und Angiogenese

Im Rahmen der postnatalen Neubildung von Gefäßen spielt die Entzündungsreaktion eine wesentliche Rolle. Proangiogene und inflammatorische Faktoren wie VEGF, Basic fibroblast growth factor (bFGF) und Interleukin-8 (IL-8) werden unmittelbar nach Auftreten der Ischämie im Myokard freigesetzt (57, 61, 64) und können damit zu einer Gefäßneubildung im Infarktgebiet beitragen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Angiogenese auf einer komplexen Interaktion zwischen extrazellulärer Matrix und Endothelzellen als Antwort auf ein Ungleichgewicht zwischen angiogenen und angiostatischen Faktoren im betroffenen Gewebe beruht (20, 22, 26, 28, 95). Dabei ist eine Voraussetzung für die Bildung neuer Blutgefäße im Infarktareal und damit für die Versorgung der Wunde mit Sauerstoff und Nährstoffen das Einwandern von Entzündungszellen. In das Infarktgebiet eingewanderte Monozyten, die sich zu Makrophagen differenzieren, dienen als Quelle für weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren (110) und regulieren die Bildung von extrazellulärer Matrix durch die Freisetzung von Metalloproteinasen und deren Inhibitoren (32, 35).

1.1.3 Zytokine

Zytokine sind kleine, lösliche Proteine, die von Zellen produziert werden, um das Verhalten oder die Fähigkeiten der produzierenden Zelle selbst oder von anderen Zellen zu beeinflussen. Sie sind wichtige Mediatoren bei Immun- und Entzündungsreaktionen sowie Regulatoren der Hämatopoese. Darüber hinaus spielen Zytokine mit ihren stimulierenden oder hemmenden Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Funktion von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Zellen (56).

Sie werden nach ihrer Struktur in verschiedenen Gruppen eingeteilt: Interferone, Chemokine, Interleukine (IL), Die Gruppe der Tumor Nekrose Faktoren (TNF), und die Gruppe der Wachstumsfaktoren, zu denen PlGF und VEGF gehören.

1.1.3.1 Placental Growth Factor

Placental Growth Factor (PlGF) gehört wie VEGF zu den Wachstumsfaktoren und wurde erstmals 1991 von Persico et al. in menschlichem Plazentagewebe beschrieben (71). Darauf folgend wurden weitere Transskripte in verschiedenen Geweben nachgewiesen, z. B. in Herz-, Lungen-, Schilddrüsengewebe und im Skelettmuskel (85). PlGF tritt durch alternatives

Spleißen des PlGF-Gens in mehreren Isoformen auf, die sich in ihrer Größe und in ihren Bindungseigenschaften unterscheiden (19, 72): PlGF-1 (PlGF₁₃₁), PlGF-2 (PlGF₁₅₂) und PlGF-3 (PlGF₂₀₃). PlGF-2 kann, im Gegensatz zu PlGF-1 und der längsten Isoform PlGF-3, aufgrund des C-terminalen Einbaus von 21 Aminosäuren polyanionische Substanzen wie Heparin binden und hat eine Affinität zu den Korezeptoren Neuropilin-1 und Neuropilin-2 (36, 43, 75). Placental Growth Factor bindet (im Gegensatz zu VEGF-A) spezifisch am VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1, Fms-like tyrosine kinase, Flt-1 siehe 1.1.3.2.1) (82), wobei VEGFR-1 in seiner membrangebundenen Form von Endothelzellen (7), glatten Muskelzellen (14, 49, 109), Monozyten (8, 23, 76, 109) und auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert wird (4) (siehe *Abb. 2*). Während unter normalen Bedingungen nur wenig PlGF und VEGFR-1 vom Gefäßsystem gebildet wird, konnte gezeigt werden, dass deren Freisetzung unter pathologischen Bedingungen, wie sie zum Beispiel im postischämischen Myokard vorherrschen, stark erhöht ist (21, 69) und dass der Wachstumsfaktor und sein Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Gefäßneubildung in ischämischen Geweben, im Rahmen von Entzündungsreaktionen und in Tumorgeweben spielen (4).

Das Wachstum von Blutgefäßen unter pathologischen Bedingungen wird dabei durch verschiedene Mechanismen bestimmt (siehe *Abb. 1*):

1. Durch Angiogenese, d. h. durch Aussprossung von Gefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen (A)
2. Durch Arteriogenese, wobei neu gebildete Gefäßstrukturen, die zunächst nur aus Endothelzellen bestehen, durch eine Ummantelung mit glatten Muskelzellen stabilisiert werden (B) (22)
3. Durch postnatale Vaskulogenese, zum Beispiel durch Rekrutierung aus dem Knochenmark stammender endothelialer Vorläuferzellen (C) (21, 53, 54, 67, 102)
4. Durch „Remodeling“ von Kollateralen, d. h. durch Wachstum und Vermehrung von Kollateralgefäßen (D)

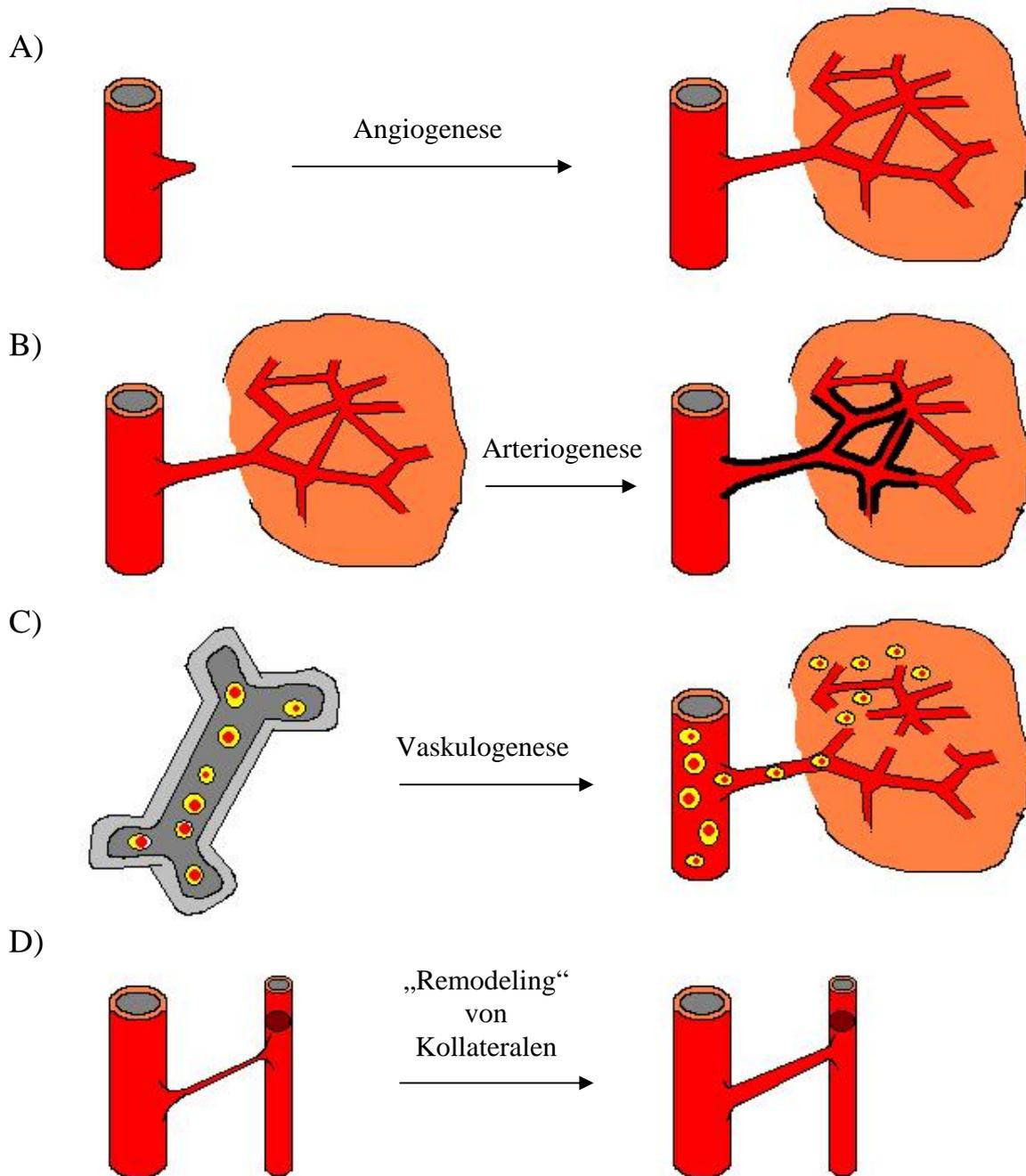


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Neubildung und des Wachstums von Blutgefäßen durch A) Angiogenese; B) Arteriogenese; C) Vaskulogenese; D) „Remodeling“ von Kollateralen.

In tierexperimentellen Studien und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass PlGF einen direkten Effekt auf das Wachstum, die Migration und das Überleben von Endothelzellen und auf das Kapillarwachstum hat (4). Er hat eine direkte Wirkung auf glatte Muskelzellen und Fibroblasten, die auf ihrer Oberfläche VEGFR-1 exprimieren (37, 49, 69) und einen indirekten Effekt auf die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen durch die Freisetzung von Zytokinen aus aktivierten Endothelzellen (69). Darüber hinaus stimuliert PlGF die Mobilisation VEGFR-1 positiver hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (21, 70) und, über eine vermehrte Expression und Bereitstellung von VEGF-A, die Rekrutierung VEGFR-2 positiver endothelialer Vorläuferzellen in ischämisches Gewebe (41, 69). Obwohl PlGF zur Familie der endothelialen Wachstumsfaktoren zählt, hat er seine pathophysiologische Bedeutung vor allem in der Vermittlung inflammatorischer Prozesse. Im Rahmen der Entzündungsreaktion hat PlGF eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten und Makrophagen die VEGFR-1 exprimieren (69, 94) kann diese aktivieren und die Monozyten ihrerseits zur Produktion von PlGF im Sinne eines positiven Feedbacks anregen (21).

Die durch die Entzündungsreaktion vermittelte Bildung extrazellulärer Matrix ist eine Voraussetzung für die Migration glatter Muskelzellen während des Kollateralwachstums (16) (siehe 1.1.2). Dabei ist die Stimulation von Entzündungszellen (Monozyten/Makrophagen), deren Einwanderung in die Umgebung des aktivierten Endothels der Kollateralgefäße und Produktion und Freisetzung von Proteinase, Zytokinen und Wachstumsfaktoren in der initialen Phase des „Remodelings“ von Kollateralen entscheidend, wohingegen in der späten Phase Fibroblasten in der Adventitia der Kollateralen für die Feinabstimmung sorgen (17). Im Gegensatz zu VEGF, das im Tierexperiment die Bildung unreifer und fragiler Gefäße induzierte, stimuliert PlGF die Bildung haltbarer, reifer und stabiler Gefäße (69).

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation zwischen PlGF und dem klinischen Verlauf besteht (50) und dass es eine Beziehung zwischen erhöhten Scherkräften in myokardialen Kollateralgefäßen und der Freisetzung von PlGF gibt (111). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass PlGF bei Patienten mit Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom die prognostische Information von traditionellen Entzündungsmarkern wie CRP erweitert (45). Die Mechanismen der Freisetzung bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung sind dabei weitgehend unklar.

1.1.3.2 Vascular Endothelial Growth Factor

Als zusätzlicher, mit PlGF verwandter Faktor wurde in der vorliegenden Studie VEGF untersucht. Im Jahre 1983 konnte erstmals ein von einem Tumor sezerniertes Protein isoliert werden, das zunächst als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bezeichnet wurde (97) und in der Lage war, spezifisch das Endothelzellwachstum zu stimulieren. Das heute unter der Bezeichnung Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) bekannte Zytokin ist ein dimeres Glykoprotein, das durch alternatives Spleißen in verschiedenen Isoformen mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz vorkommt (63, 107) und von nahezu allen Zellarten produziert wird (63). Die am besten untersuchte und in der vorliegenden Arbeit gemessene Isoform ist VEGF₁₆₅.

Aufgrund ihrer strukturellen Identität wurden weitere Zytokine der Familie der Wachstumsfaktoren zugeordnet: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und Placental Growth Factor (PlGF, siehe 1.1.3.1) (103). Die VEGF Isoformen vermitteln ihre biologische Wirkung über Tyrosinkinaserzeptoren, VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1, auch bekannt als Flt-1, siehe *Abb. 2*) und VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2, auch bekannt als KDR im menschlichen Organismus oder Flk-1 in der Maus) (105). VEGF-A hat eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit PlGF. Trotzdem haben Untersuchungen der dreidimensionalen Struktur von humanem PlGF gezeigt, dass die Aminosäuresequenz von PlGF nur zu 42 % mit der von VEGF-A übereinstimmt (51). Dies ist eine mögliche Erklärung für die teils unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften und Rezeptorspezifitäten der beiden Wachstumsfaktoren.

VEGF ist über verschiedene Mechanismen an der Neubildung von Gefäßen beteiligt: über die Migration von Endothelzellen aus bereits bestehenden, angrenzenden Gefäßen (10, 38, 47) und durch Rekrutierung im peripheren Blut zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen (70, 84, 87, 99).

Im Gegensatz zu PlGF hat VEGF als Mediator bei entzündlichen Prozessen eine untergeordnete Rolle, vielmehr hat VEGF Bedeutung als Mediator im Rahmen der Angio- und Vaskulogenese.

1.1.3.2.1 Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 und -2

Die VEGF-Rezeptoren gehören zur Familie der Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität und besitzen sieben extrazelluläre Domänen. Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-1 (VEGFR-1, Flt-1) wird auf Endothelzellen, Trophoblasten der Plazenta, Osteoblasten,

Monozyten/Makrophagen, renalen Mesangiumzellen, glatten Muskelzellen und auf einigen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (114). VEGFR-1 bindet VEGF-A, VEGF-B und PlGF mit hoher Affinität (siehe *Abb. 2*). VEGFR-1 vermittelt nur schwache mitogene Signale in Endothelzellen. Jedoch ist VEGFR-1 in der Lage, mit VEGFR-2 Heterodimere zu bilden, welche über stärkere Signaleigenschaften in Endothelzellen verfügen (48). Die Aktivierung von VEGFR-1 durch PlGF fördert die Angiogenese vermutlich über einen intrazellulären „Cross-talk“ mit VEGFR-2, indem die Aktivierung von VEGFR-1 eine intermolekulare Transphosphorylierung von VEGFR-2 induziert (5). VEGFR-1 ist darüber hinaus mit Monozyten-Chemotaxis und der Rekrutierung von Vorläuferzellen („Progenitor Cells“) aus dem Knochenmark assoziiert. Die Expression von VEGFR-1 wird im Rahmen der Angiogenese und unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert. Weiter existiert VEGFR-1 in löslicher Form (sVEGFR-1), bestehend aus der extrazellulären Domäne von VEGFR-1. sVEGFR-1 ist durch Bindung von VEGF in der Lage, die Wirkung von VEGF zu hemmen.

Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor-2 (VEGFR-2, KDR, Flk-1) bindet VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D. VEGFR-2 ist der wesentliche Rezeptor bei der Transduktion von Signalen, die durch Bindung von VEGF-A am VEGFR-2 ausgelöst werden (114), nämlich Vasodilatation, Migration von Endothelzellen und Proliferation (siehe *Abb. 2*). Außer auf Endothelzellen konnte VEGFR-2 auch auf endothelialen Vorläuferzellen nachgewiesen werden (27).

Während VEGFR-2 somit fast ausschließlich von Endothel- und endothelialen Vorläuferzellen gebildet wird, wird VEGFR-1 durch verschiedene Zellarten exprimiert, einschließlich Monozyten und glatten Muskelzellen. VEGFR-2 ist der entscheidende Rezeptor für die Transduktion zellulärer Signale zur Proliferation, Differenzierung und Migration von Endothelzellen (74, 80, 98), wohingegen VEGFR-1 wichtiger für das „Remodeling“ von Gefäßen zu sein scheint (siehe 1.1.3.1) (30) und im Rahmen inflammatorischer Prozesse eine Rolle spielt.

Die intrazellulären Signaltransduktionswege von VEGFR-1 und VEGFR-2 sind in *Abb. 2* dargestellt.

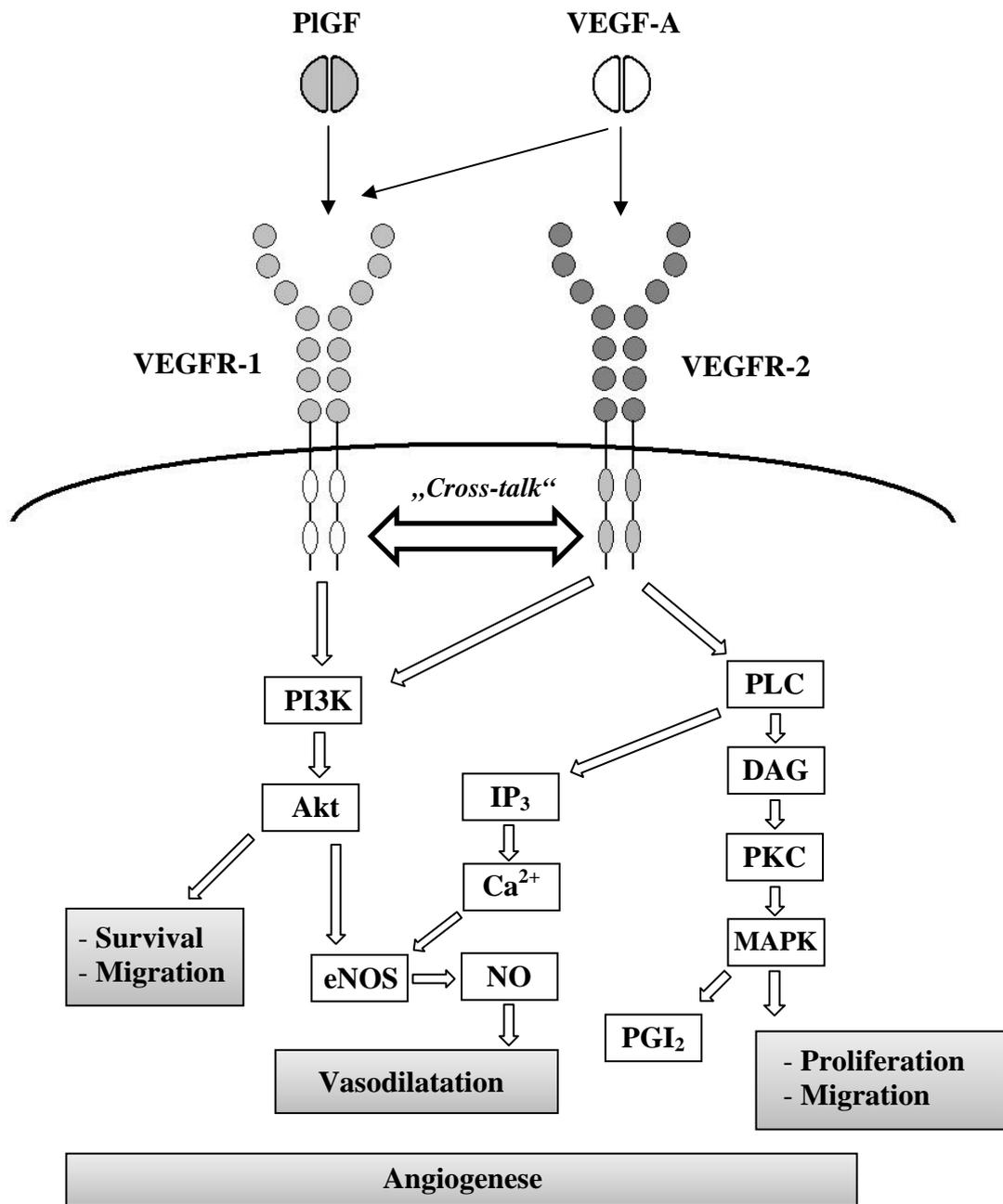


Abbildung 2: Signaltransduktion von VEGFR-1 und VEGFR-2.

(MAPK = mitogen aktivierte Proteinkinase; FAK = fokale Adhäsionskinase; PLC = Phospholipase C; PI3K = Phosphoinositol 3-Kinase; PKC = Proteinkinase C; IP₃ = Inositol 1,4,5,-Trisphosphat; Akt = anti-apoptotische Kinase; DAG = Diacylglycerol; eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase; NO = Stickstoffmonoxid; PGI₂ = Prostacyclin)

1.1.3.3 Interleukin-6

Interleukin-6 ist ein Mediator bei Entzündungs- und Immunreaktionen. Als multifunktionelles Protein wird IL-6 unter anderem von Monozyten bzw. Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert. Die Expression von IL-6 wird durch mitogene Faktoren und durch Antigene wie Lipopolysaccharide, Interleukin-1, TNF, Platelet-derived growth factor (PDGF) und Viren beeinflusst. Es stimuliert die Produktion von akute Phase Proteinen wie CRP in der Leber (9) und hat eine Kolonie-stimulierende Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen (60, 112). Im Tierexperiment konnte nachgewiesen werden, dass IL-6 eine wichtige Rolle bei Wundheilungsprozessen spielt (34).

IL-6 hat im akuten Koronarsyndrom als systemischer Marker Bedeutung erlangt. Es ist bei Patienten mit instabiler Angina pectoris erhöht (11) und bei initial gesunden Personen konnte eine Assoziation eines erhöhten IL-6-Spiegels mit vermehrter Mortalität (39) bzw. kardiovaskulären Ereignissen (90) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wird IL-6 als unspezifischer Marker der systemischen Entzündungsreaktion herangezogen.

2. Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, die bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung bislang noch wenig erforschte Freisetzung von PIGF im Zusammenhang mit der koronaren Stentimplantation und der systemischen Entzündungsreaktion zu untersuchen.

3. Patientengut und Methodik

3.1 Patienteneinschlusskriterien

In die Studie wurden insgesamt 62 Patienten mit koronarer Herzerkrankung aufgenommen, die zur invasiven kardialen Diagnostik in das Deutsche Herzzentrum München, Klinik der Technischen Universität München, eingeliefert wurden. Bei insgesamt 27 Patienten mit stabiler Angina pectoris wurde eine elektive Herzkatheteruntersuchung durchgeführt, wobei 14 Patienten interventionsbedürftige Stenosen aufwiesen (Patienten mit SAP). Bei den übrigen 13 Patienten wurde eine Angiographie mit Darstellung des linken Ventrikels und der Herzkranzgefäße ohne koronare Intervention durchgeführt (Patienten mit koronarer Herzerkrankung, sCAD). Keiner der Patienten mit stabiler Angina pectoris hatte drei Monate vor bzw. drei Monate nach Aufnahme in die Studie ein akutes Koronarsyndrom.

35 Patienten wurden mit einem akuten Koronarsyndrom zur intensivmedizinischen Betreuung in das Deutsche Herzzentrum eingeliefert. Entsprechend der klinischen Symptomatik, spezifischer oder unspezifischer EKG-Veränderungen sowie des Verlaufes der kardialen Marker konnte bei 13 Patienten eine instabile Angina pectoris (IAP), bei 7 Patienten ein akuter Myokardinfarkt (AMI) ohne ST-Streckenhebung (NSTEMI) und bei 15 Patienten ein akuter Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung (STEMI) diagnostiziert werden. Die Diagnose einer IAP basierte auf der anamnestischen Angabe typischer pectanginöser Schmerzen, laborchemisch erhöhter Troponin T (TnT)-Serumwerte sowie unspezifischer EKG-Veränderungen (ST-Streckensenkungen, T-Negativierungen). Patienten mit STEMI hatten bei Aufnahme über mehr als 20 Minuten persistierende pectanginöse Beschwerden, laborchemisch neben erhöhten TnT-Serumspiegeln im Verlauf einen Anstieg der Creatinkinase (CK) über das Zweifache des Ausgangswertes sowie im EKG ST-Streckenhebungen oder einen neu aufgetretenen Linksschenkelblock. Im Unterschied zu den Patienten mit STEMI hatten Patienten mit NSTEMI neben einem Anstieg der CK über das Zweifache des Ausgangswertes lediglich unspezifische EKG-Veränderungen (ST-Streckensenkungen, T-Negativierungen). Die Einschlusskriterien der Studienpopulation sind in *Tabelle 1* aufgeführt.

Studienpopulation				
sCAD (n=13)	SAP (n=14)	ACS (n=35)		
keine Intervention	PTCA/Stent	IAP (n=13)	NSTEMI (n=7)	STEMI (n=15)
<ul style="list-style-type: none"> • TnT < 0,03 ng/ml • kein signifikanter CK -Anstieg • typische pectanginöse Beschwerden • keine EKG-Veränderungen 		<ul style="list-style-type: none"> • TnT > 0,03 ng/ml • kein signifikanter CK-Anstieg • typische pectanginöse Beschwerden • unspezifische EKG-Veränderungen 	<ul style="list-style-type: none"> • TnT > 0,03 ng/ml • CK-Anstieg > 2-facher Wert bei Aufnahme • typische pectanginöse Beschwerden • unspezifische EKG-Veränderungen 	<ul style="list-style-type: none"> • TnT > 0,03 ng/ml • CK-Anstieg > 2-facher Wert bei Aufnahme • typische pectanginöse Beschwerden • signifikante ST-Streckenhebung <i>oder</i> • neu aufgetretener Linksschenkelblock

Tabelle 1: Einschlusskriterien der Studienpopulation

Die Genehmigung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission lag vor, alle Patienten waren eingehend aufgeklärt worden und hatten eine schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an der Studie gegeben.

3.2 Patientenausschlusskriterien

Aufgrund einer möglichen Beeinflussung der Studienergebnisse konnten Patienten mit interferierenden chronisch entzündlichen, malignen, infektiösen oder schweren systemischen Erkrankungen sowie Patienten mit vorangegangener antiinflammatorischer Medikation – mit Ausnahme von 100 mg Aspirin pro Tag – nicht an der Studie teilnehmen. Ein weiteres Ausschlusskriterium war die fehlende schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an der Studie.

3.3 Studienprotokoll

3.3.1 Studiengruppe

Alle Studienpatienten wurden entsprechend ihrer Diagnose einer notfallmäßigen, dringlichen oder elektiven koronarangiographischen Diagnostik unterzogen. Die Patienten mit ACS und 14 Patienten mit SAP zeigten koronarangiographisch interventionsbedürftige Stenosen und erhielten eine perkutane koronare Intervention mit Stentimplantation.

Die periinterventionelle Medikation dieser Patienten bestand aus 500 mg Aspirin und gewichtsadaptiert 5000 bis 10 000 Einheiten Heparin intravenös sowie 600 mg Clopidogrel oral.

Bei 13 Patienten mit stabiler Angina pectoris (sCAD) konnten interventionsbedürftige Stenosen koronarangiographisch ausgeschlossen werden. Diese Patienten erhielten 100 mg Aspirin und 600 mg Clopidogrel oral sowie 2500 Einheiten Heparin intravenös.

Zur Durchführung der Herzkatheteruntersuchung wurde allen Patienten in die rechte Femoralarterie eine Schleuse in „Seldinger“-Technik gelegt. Die Darstellung der Koronargefäße und der linken Herzkammer erfolgte unter Verwendung des Röntgenkontrastmittels Imeron[®] (Wirkstoff Iomeprol, Altana Pharma, Konstanz, siehe *Tabelle 4*). Iomeprol wird nicht metabolisiert und unverändert über die Nieren ausgeschieden. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 2 Stunden, nach 96 Stunden werden zwischen 87,1 % und 91,5 % ausgeschieden (92).

Die Stentimplantation war bei allen Patienten der Studiengruppe erfolgreich.

Das postinterventionelle Procedere war in allen Gruppen gleich. Innerhalb der ersten vier Stunden nach Stentimplantation wurde die arterielle Schleuse entfernt, sobald die aktivierte partielle Thromboplastinzeit unter 80 Sekunden fiel. 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.

Blutabnahmeschema

Vor der Intervention, 24 Stunden und 48 Stunden postinterventionell wurden in allen Gruppen peripher-venöse Blutproben im EDTA-Röhrchen entnommen. Die Abnahme unmittelbar nach PTCA erfolgte arteriell aus der Katheterschleuse. Die Blutproben wurden, auf Eis gekühlt, nach unten stehenden Protokollen verarbeitet.

3.3.2 Gesunde Probanden

Als Vergleichsgruppe für die Untersuchung der Heparinwirkung auf die PIGF-Freisetzung *in vivo* dienten 9 Mitarbeiter des Labors im Alter zwischen 25 und 35 Jahren, die an keiner bekannten immunologischen, entzündlichen, malignen oder kardiovaskulären Krankheit litten und mindestens 14 Tage vor Abnahme der Blutproben keine Medikamente eingenommen hatten. Unmittelbar vor, sowie 3 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten nach Gabe von 5000 Einheiten Heparin intravenös wurden peripher-venöse Blutproben im EDTA-Röhrchen entnommen (siehe *Tabelle 2*).

Gesunde Probanden, n=9, Gabe von 5000 IE Heparin i.v.			
Blutentnahmen:			
Vor Heparin-injektion	3 Min nach Heparininjektion	30 Min nach Heparininjektion	60 Min nach Heparininjektion

Tabelle 2: Blutabnahmeschema nach Gabe von 5000 IE Heparin intravenös, gesunde Probanden.

Die abgenommenen Blutproben wurden nach unten stehenden Protokollen verarbeitet.

3.4 Methoden

3.4.1 Zellkultur

Zur Untersuchung der Kontrastmitteleinwirkung auf Endothelzellen *in vitro* wurden Endothelzellen aus menschlicher Nabelschnur herangezüchtet. Die im Endothelial Cell Growth Medium, bestehend aus ECGS/H 0.4 %, foetalem Kälberserum (FCS) 2 %, Epidermal Growth Factor 0,1 ng/ml, Hydrocortison 1 µg/ml und basic Fibroblast Factor 1 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Germany), herangezüchteten Zellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC; PromoCell, Heidelberg, Germany), Zellkulturpassage 13, wurden mit 1 ml HEPES-BSS-Puffer (enthält 30 mM HEPES, D-Glucose, NaCl, KCl, NaPhosphat, Phenol; PromoCell, Heidelberg, Germany) gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin / EDTA Lösung (Trypsin 0,04% / EDTA 0,03%; PromoCell, Heidelberg, Germany) von der Zellkulturflasche abgelöst. Die Trypsin/EDTA Lösung wurde mit 5 ml Trypsin Neutralisationslösung (TNS aus Sojabohnen 0,05%; PromoCell, Heidelberg, Germany) neutralisiert und die gewonnene Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellsuspension 5 Minuten bei 1200 Upm. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 6 ml Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl pro ml ermittelt.

Die HUVEC-Zellen wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte zu je 8000 Zellen pro Well ausgelegt. Nach einem Tag wurden die Zellen mikroskopisch auf Konfluenz und mögliche Infektion untersucht. Sobald 90 % der Bodenfläche mit Zellen bedeckt war, wurde mit der Stimulation der Zellen begonnen.

3.4.1.1 Zellstimulation

Nach Absaugen des Endothelial Cell Growth Mediums wurden jeweils 150 µl FCS-freies Medium in jedes Well gegeben und die Zellen für 3 Stunden ausgehungert. Anschließend wurden die 150 µl FCS-freies Medium abgesaugt und die Wells mit Röntgenkontrastmittel (Imeron[®], Wirkstoff Iomeprol, Altana Pharma, Konstanz, siehe *Tabelle 4*) in ansteigender Konzentration nach dem in *Tabelle 3* gezeigten Pipettierschema in Dreifachbestimmung für die Messung von VEGF und Sechsfachbestimmung für die Messung von PlGF aufgefüllt.

Kontrolle (kein Kontrastmittel)	1% Kontrastmittel	10% Kontrastmittel	20% Kontrastmittel
(150 µl FCS-freies Medium)	(1,5µl Kontrastmittel auf 148,5 µl FCS-freies Medium)	(15 µl Kontrastmittel auf 135 µl FCS-freies Medium)	(30 µl Kontrastmittel auf 120 µl FCS-freies Medium)

Tabelle 3: Pipettierschema der HUVEC-Kontrastmittelstimulation

Für den Vergleich von hyperosmolarem mit isoosmolarem Kontrastmittel wurde ein Versuch nach oben stehendem Protokoll mit dem isoosmolaren Kontrastmittel Visipaque® (Wirkstoff Iodixanol, Amersham Health, Braunschweig, siehe *Tabelle 5*) in 10%iger Konzentration durchgeführt.

Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank bei 37° C und 5 %iger CO₂-Sättigung wurde das Medium bzw. das Medium-Kontrastmittelgemisch abpipettiert, zentrifugiert und jeweils ca. 130 µl Überstand bei –20° C zur späteren Zytokin-Bestimmung eingefroren. PlGF und VEGF wurden quantitativ mit einem Sandwich Enzyme Immunoassay gemessen (siehe unten). Bei einer Konzentration von 10 % Imeron wurde der Überstand zusätzlich bereits nach 5, 15 und 30 Minuten zur Bestimmung von PlGF und VEGF abpipettiert. Die HUVECs wurden mit Hilfe einer Trypsin / EDTA Lösung (Trypsin 0,04% / EDTA 0,03%; PromoCell, Heidelberg, Germany) von der Wachstumsfläche abgelöst und wie unten beschrieben für die RNA-Isolierung aufbereitet.

Handelsname	<i>Imeron</i>®	<i>Visipaque</i>®
Wirkstoff	Iomeprol	Iodixanol
Ionität	nicht-ionisch	nicht-ionisch
Iodgehalt	350 mg/ml	320 mg/ml
Osmolalität bei 37°C	618 mosmol/kg Wasser	290 mosmol/kg Wasser
Viskosität bei 37°C	7,5 mPa·s	11,4 mPa·s
sonstige Bestandteile	Trometamol Salzsäure Wasser für Injektionszwecke	Trometamol Salzsäure Calciumchlorid Natriumchlorid Natriumcalciumedetat Wasser für Injektionszwecke

Tabelle 4: Eigenschaften des hyperosmolaren (*Imeron*®) und des isoosmolaren Kontrastmittels (*Visipaque*®)

3.4.2 Quantitative Sandwich Enzyme Immunoassay

Für die quantitative Bestimmung von PIGF, VEGF und IL-6 im Patientenplasma wurde das nach oben beschriebenen Studienprotokoll im EDTA-Röhrchen abgenommene peripher-venöse Blut 10 Minuten bei 3000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren.

Die Messung von PIGF, VEGF und IL-6 im Plasma bzw. die Messung von PIGF und VEGF in den Zellkulturüberständen erfolgte mit einem Sandwich Enzyme Immunoassay (Quantikine[®], R&D Systems, Minneapolis, USA).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete humane PIGF Immunoassay diente der quantitativen Bestimmung der Isoform PIGF-1 und wies laut Hersteller eine 5%ige Kreuzreaktivität mit PIGF/VEGF Heterodimeren sowie eine 50%ige Kreuzreaktivität mit der Isoform PIGF-2 auf.

Das verwendete humane VEGF Immunoassay diente der quantitativen Bestimmung der VEGF-A Isoform VEGF₁₆₅. Laut Hersteller gab es keine Interferenzen oder Kreuzreaktivitäten mit verwandten Faktoren, insbesondere mit VEGF₁₆₅/PIGF-Heterodimeren.

3.4.2.1 Prinzip des Quantitative Sandwich Enzyme Immunoassay

Bei diesem Versuch wurde das zu untersuchende Patientenplasma, das Plasma der gesunden Probanden und die asservierten Zellkulturüberstände je nach gesuchtem Zytokin in eine mit einem monoklonalen Antikörper gegen PIGF, VEGF oder IL-6 beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert (Schritt 1, *Abb. 3*). Nachdem der am Plattenboden fixierte, spezifische Antikörper das im Plasma vorhandene PIGF, VEGF oder IL-6 gebunden hat, konnten ungebundene Moleküle mit Waschpuffer herausgewaschen werden (Schritt 2, *Abb. 3*). Anschließend erfolgte die Zugabe eines Meerrettichperoxidasekonjugierten, spezifischen polyklonalen Antikörpers gegen PIGF, VEGF oder IL-6 (Schritt 3, *Abb. 3*), das ungebundene Antikörper-Enzym Reagenz wurde herausgewaschen und als Substrat Hydrogenperoxid mit Tetramethylbenzidin hinzugegeben (Schritt 4 und 5, *Abb. 3*). Das Substrat reagiert, enzymatisch katalysiert durch die antikörpergebundene Meerrettichperoxidase, mit einem Farbumschlag (Schritt 6, *Abb. 3*), wobei der Farbumschlag nach einer bestimmten Zeit durch die Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und die Intensität der Farbe photometrisch bei 450

nm mit einem ELISA-Reader (Amersham Biotrak II Visible Plate Reader, GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, Großbritannien) bestimmt wurde (Schritt 7, *Abb. 3*).

Die Konzentration von PIGF, VEGF oder IL-6 im Plasma ist dabei proportional zum Ausmaß des Farbumschlages und konnte anhand einer Standardreihe bestimmt werden. Die Durchführung des Quantitative Sandwich Enzyme Immunoassay erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

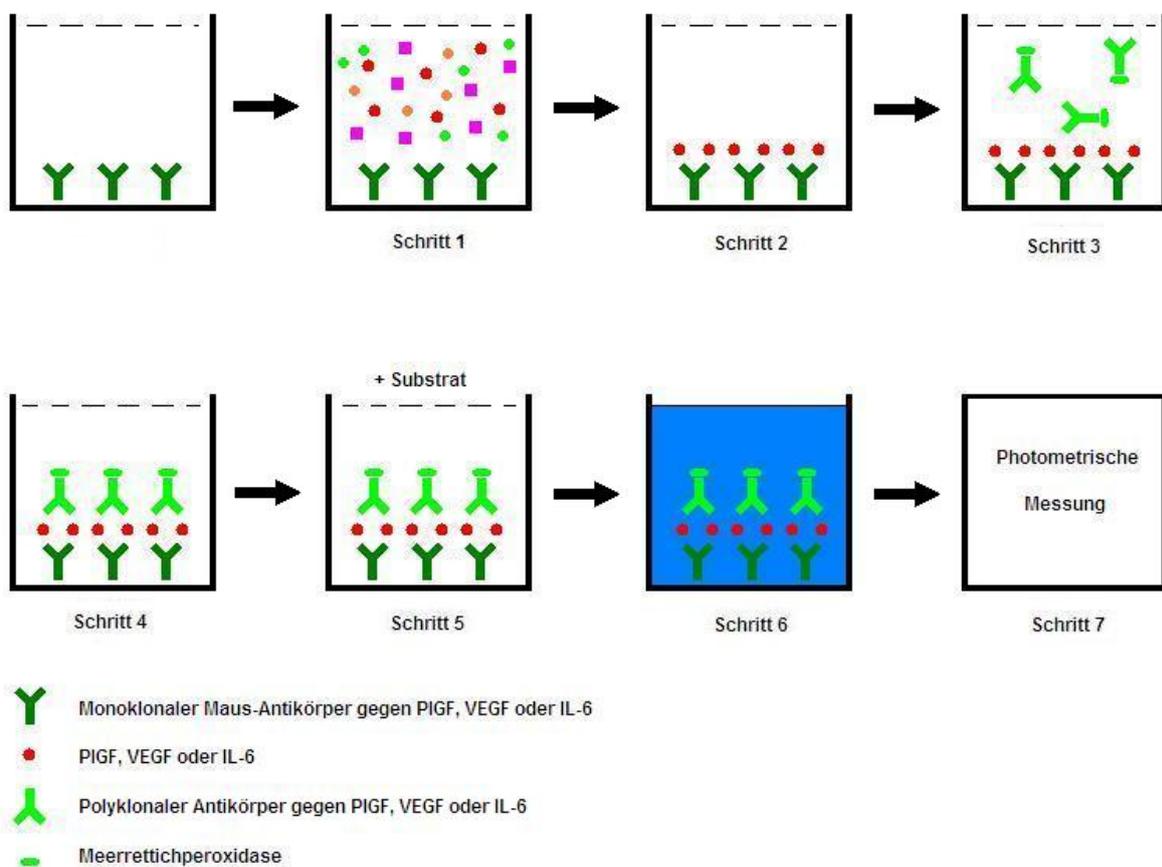


Abbildung 3: Prinzip des Quantitative Sandwich Enzyme Immunoassay

3.4.3 RNA-Isolierung, reverse Transkription und Real-time PCR

3.4.3.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den HUVECs erfolgte gemäß dem QIAamp RNeasy[®] Mini Protokoll für die Isolierung von RNA (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Hierzu wurden die Zellen nach Inkubation mit Kontrastmittel unter den oben beschriebenen Konditionen nach drei Stunden geerntet. Die Zellen wurden anschließend zunächst bei 2000 Upm zentrifugiert und das Zellpellet in 600 µl mit β-Mercaptoethanol versetzter Guanidin-Isothiocyanat-haltiger Pufferlösung (Buffer RLT, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) gelöst. Durch diesen Schritt wurden die Zellen vollständig lysiert, d. h. die Zellmembran und die Organellen wurden „aufgebrochen“, und das Lysat konnte bis zur protokollgemäßen Weiterverarbeitung bei -70°C eingefroren werden.

Nach dem Auftauen erfolgte die Homogenisierung der Zelllysate mit Hilfe von QIAshredder[®] (QIAGEN), wodurch die Viskosität der Zelllysate reduziert und die Ausbeute an RNA erhöht wurde. Nach Zugabe von 70%igem Ethanol zu dem homogenisierten Lysat wurde dieses auf die RNeasy spin column[®] (QIAGEN) pipettiert und bei 10 000 Upm zentrifugiert. Hierbei erfolgte die Bindung der RNA an eine Silica-Gel-Membran, verunreinigende Substanzen wurden herausgewaschen.

Zuletzt wurde nach dreimaligem Waschen der Membran mit verschiedenen Pufferlösungen (Buffer RW1, Buffer RPE, QIAGEN) gemäß Protokoll die isolierte RNA in RNase-freiem H₂O gelöst und die Konzentration spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt.

3.4.3.2 Prinzip der reversen Transkription

Um mit Real-time PCR RNA nachzuweisen, muss diese zunächst durch das Enzym reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben werden.

Reverse Transkriptase ist ein multifunktionales Enzym, das drei verschiedene enzymatische Aktivitäten aufweist:

1. RNA-abhängige DNA-Polymerase
2. RNA/DNA-Hybridabhängige Exoribonuklease (RNase H)
3. DNA-abhängige DNA-Polymerase

Bei der reversen Transkription *in vitro* werden die beiden zuerst genannten Aktivitäten ausgenutzt. Die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität transkribiert das RNA-Template in eine komplementäre DNA (cDNA), die dann für die PCR verwendet werden kann.

Die Exoribonuklease- oder RNase-H-Aktivität der reversen Transkriptase baut spezifisch nur RNA ab, die in RNA/DNA-Hybridmolekülen vorliegt wobei reine RNA durch diese Enzymaktivität nicht beeinträchtigt wird.

3.4.3.3 Prinzip der Real-time PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) dient der Vervielfältigung von DNA und ist ursprünglich eine Methode, geringste Mengen DNA nachzuweisen. Sie beruht prinzipiell auf drei sich wiederholenden Schritten:

1. Denaturierung der DNA: Durch Erhitzen trennen sich die beiden komplementären Stränge der zu untersuchenden DNA.
2. Hybridisierung (Annealing): durch Herabsetzen der Temperatur verbinden sich die sog. Primer mit einem ihnen komplementären DNA-Abschnitt. Der Primer ist ein Stück DNA mit definierter Sequenz, das als Ansatzstelle der DNA-Polymerasen dient.
3. Verlängerung (Extension): Durch erneutes Anheben der Temperatur auf ein für die Polymerasen optimales Betriebsniveau erfolgt der Anbau weiterer komplementärer Nukleotide durch die Polymerasen.

Durch ständige Wiederholung der Schritte verdoppelt sich die Anzahl an kopierten DNA-Molekülen bei jedem Zyklus.

Um nach diesem Prinzip RNA nachzuweisen, muss diese zunächst mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden (siehe 3.4.3.2). Damit ist es für den quantitativen Nachweis von RNA theoretisch möglich, aus der Menge der letztendlich amplifizierten DNA die ursprünglich vorhandene Menge an cDNA und damit die ursprüngliche Konzentration an RNA zu berechnen.

Da aber zu Beginn der PCR durch die geringe Menge an Matrizen (Templates) die DNA-Polymerasen nicht optimal arbeiten können und am Ende die Aktivität der Polymerasen durch die starken Temperaturschwankungen nachlässt, sind am Ende der PCR Rückschlüsse von der amplifizierten DNA auf die ursprünglich vorhandene Menge sehr ungenau.

Darüber hinaus verringert sich im Laufe der PCR die Menge an Nukleotiden und die neu gebildeten Matrizen verbinden sich vermehrt untereinander.

Bei der real-time PCR wird deshalb zum quantitativen Nachweis von RNA bereits nach jedem Zyklus die Anzahl der neu gebildeten DNA-Moleküle erfasst. Dabei wird zur Messung der Kopien die exponentielle Phase der PCR gewählt, in der sich die Menge der DNA-Matrizen bei jedem Durchgang annähernd verdoppelt.

Zum gezielten Nachweis der jeweiligen DNA-Kopie werden spezifische Sonden verwendet („probe“). Diese Sonden sind kurze DNA-Stücke, die mit einem mittleren Bereich der Matrizen-DNA hybridisieren. Sie tragen an ihrem einen Ende einen Reporterfarbstoff (R) und am anderen einen Quencher (Q). Quencher sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe unterdrücken. Die Polymerasen im PCR-Ansatz sind in der Lage, die Sonden bei der Verdopplung der DNA-Vorlage abzubauen. Dabei setzen sie zunächst den Reporterfarbstoff frei, der somit aus dem Einflussbereich des Quenchers gelangt. Auf diese Weise wird die Fluoreszenz des Farbstoffs nur dann messbar, wenn die Polymerase den gewünschten DNA-Strang kopiert hat (siehe *Abbildung 4*). Jedes freigesetzte Reporterfarbstoffmolekül steht für einen gebildeten DNA-Strang.

Bei Messung der Fluoreszenzstärke in jedem Zyklus zeigt sich typischerweise ein sigmoidaler Kurvenverlauf, da nach der exponentiellen Phase (Kettenreaktion) die zur Verfügung stehenden Substrate zunehmend verbraucht werden (Plateau-effekt).

Da die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der Amplifikation durchgeführt werden muss, wird nach Antragen der Kurve im logarithmischen Maßstab im Bereich des linearen Kurvenverlaufs ein Schwellenwert gesetzt. Die Zykluszahl, bei der die jeweilige Kurve diesen Schwellenwert kreuzt, wird als C_T -Wert bezeichnet (C für cycle, T für threshold). Je größer die Menge an eingesetzter RNA-komplementärer cDNA ist, desto kleiner ist der C_T -Wert.

Als interner Standard, auf den sich der C_T -Wert jedes Zielgens bezieht, wurde in der vorliegenden Arbeit als endogenes Kontrollgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

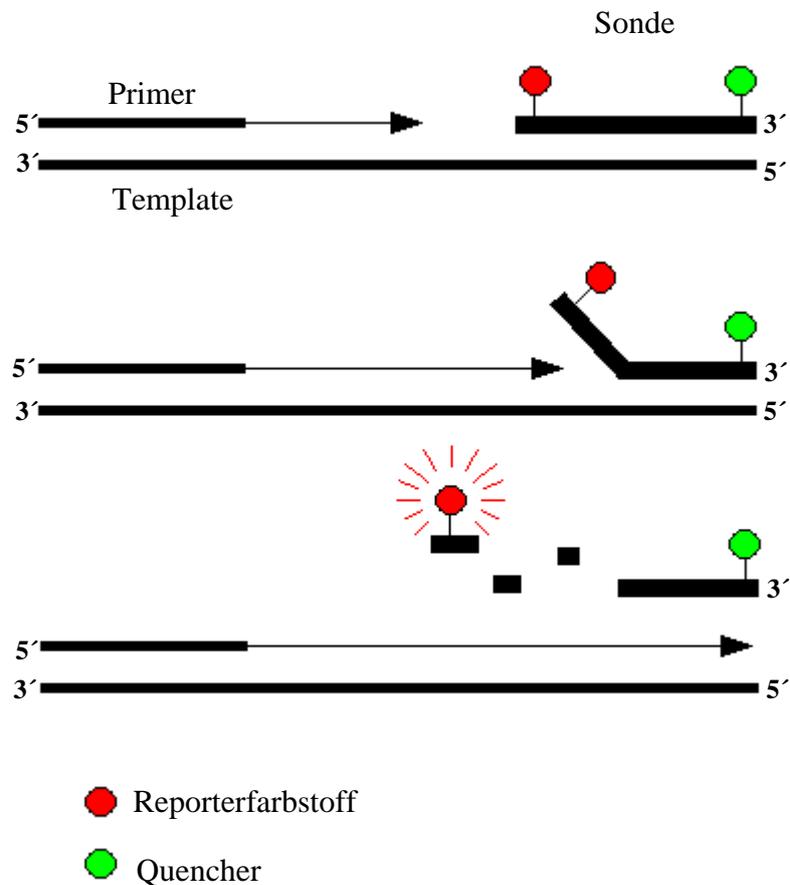


Abbildung 4: Prinzip der Real-time PCR mit Reporter- und Quencher markierter Sonde

3.4.3.4 Versuchsdurchführung

Reverse Transkription:

Die reverse Transkription wurde mit Omniscript™ RT Kit (QIAGEN), SUPERase•In™ (Ambion, Austin, USA) als RNase-Inhibitor und Random Primers (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt, wobei mit Hilfe einer DNA-Polymerase RNA-komplementäre cDNA entsteht. Die RNA wird im Anschluss daran durch das Enzym RNase H degradiert. Diese RNase ist spezifisch für RNA in RNA/DNA-Hybriden und greift reine RNA nicht an (siehe 3.4.3.2).

Real-time PCR:

Die PCR wurde am Thermocycler ABI Prism™ 7700 Sequence Detection System von Applied Biosystems (Darmstadt) durchgeführt. Die verwendeten Primer und 6-carboxy-fluorescein (FAM)- bzw. VIC™-markierte Sonden stammten als Assays-on-Demand® von Applied Biosystems (Darmstadt), der qPCR MasterMix inklusive HotGoldStar DNA Polymerase stammten von Eurogentec (Seraing, Belgien). Ansatz und Zyklusprogrammierung der PCR sind in den *Tabellen 5* und *6* angegeben. Als C_T-Wert jeder Probe wurde der arithmetische Mittelwert aus zwei Messungen genommen.

Reagenzien	Endkonzentration	Verwendetes Material
qPCR MasterMix	1x	
Forward Primer	900 nM	
Reverse Primer	900 nM	
Sonde	250 nM	
DNA		150 ng aus HUVECs

Tabelle 5: Ansatz der Polymerasekettenreaktion

Schritt	Zeit	Temperatur	
Uracil-N-Glykosylase(UNG)-Aktivierung	2 Minuten	50°C	
HotGoldStar-Polymerase-Aktivierung	10 Minuten	95°C	
Amplifikation:	Denaturierung	15 Sekunden	95°C
	Annealing	20 Sekunden	60°C
	Extension	40 Sekunden	72°C

Tabelle 6: PCR-Programmierung

Der erste Schritt dient zur Aktivierung des Enzyms Uracil-N-Glykosylase (UNG). Es baut kontaminierende Amplikons ab und vermeidet so “carry-over“-Kontaminationen.

3.4.4 Kardiale Marker und Ejektionsfraktion

Die Bestimmung von Laborwerten wie der Creatinkinase und des Troponins in der Studiengruppe erfolgte durch das Institut für klinische Chemie im Deutschen Herzzentrum München. Da die kardialen Marker erst mit zeitlicher Verzögerung nach Auftreten der Beschwerden ansteigen, wurden für die Studie jeweils der Maximalwert des Troponin T, der Creatinkinase und der MB-Fraktion der Creatinkinase nach Aufnahme der Patienten verwendet.

Die Bestimmung der Ejektionsfraktion erfolgte angiographisch im Rahmen der Herzkatheteruntersuchung.

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS für Microsoft Windows. Bei der Auswertung der Patientendaten wurden Unterschiede zwischen mehr als zwei verbundenen Stichproben mittels Wilcoxon's matched pairs signed-ranks Test untersucht. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Rangsummen Test berechnet. Eine mögliche Korrelation zwischen einzelnen Parametern wurde mit linearer Regressionsanalyse untersucht (Spearman-Rangkorrelationskoeffizient). Differenzen zwischen Mittelwerten der *in vitro*-Versuche wurden mit dem t-Test ermittelt. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt und p-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant gewertet. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler).

4. Ergebnisse

4.1 Klinische Daten des Patientenkollektivs

In die Studie wurden 62 Patienten mit koronarer Herzerkrankung aufgenommen, davon waren 49 Patienten männlich (79 %) und 13 weiblich (21 %). Die Patienten waren in einem Alter von 48 bis 89 Jahren. Von insgesamt 27 Patienten mit stabiler Angina pectoris erhielten 14 eine elektive Herzkatheteruntersuchung mit koronarer Intervention bei signifikanten Koronarstenosen, bei 13 Patienten mit stabiler Angina pectoris wurde eine Koronarangiographie ohne Intervention durchgeführt. 35 Patienten wurden mit einem akuten Koronarsyndrom in das Deutsche Herzzentrum eingeliefert, davon hatten 22 Patienten einen akuten Myokardinfarkt (15 Patienten mit STEMI, 7 Patienten mit NSTEMI) und 13 eine instabile Angina pectoris. Die Patienten hatten ihrer Diagnose entsprechende Verläufe der kardialen Marker. Alle Patienten, die eine Intervention erhielten, wiesen in der Koronarangiographie relevante Stenosen oder einen Verschluss einer oder mehrerer Herzkranzarterien auf, die mittels koronarer Intervention mit Stentimplantation erfolgreich behandelt werden konnten und nach der Intervention einen Fluss von TIMI Grad 3 (Thrombolysis In Myocardial Infarction Trial) erreichten.

Die Angabe der Medikamente entspricht dem Stand vor der Aufnahme der Patienten in das Deutsche Herzzentrum. Unter den Patienten mit stabiler Angina pectoris waren bei Aufnahme mehr Patienten mit Statinen, Betablockern, Clopidogrel oder ACE-Hemmern therapiert. Dies war bei Statinen ($p = 0,001$) und Clopidogrel ($p = 0,008$) signifikant. Die Prävalenz eines Diabetes mellitus war bei den Patienten mit stabiler Angina pectoris niedriger als bei den anderen Gruppen. Bezüglich der übrigen demographischen Daten (Alter, Geschlecht, verbleibende Risikofaktoren) und bezüglich der Anzahl der betroffenen Gefäße waren die Patienten aller untersuchten Gruppen vergleichbar.

Die klinischen Daten der Patienten- und der Kontrollgruppe sind in *Tabelle 7* zusammengefasst.

	sCAD	SAP	ACS
	n = 13	n = 14	n = 35
Alter (Jahre)	73,2±3,7	73,4±1,9	72,8±2,0
Geschlecht, m(w)	8 (5)	10 (4)	31 (4)
IAP, n (%)	0	0	13 (37,1%)
NSTEMI, n (%)	0	0	7 (20,0%)
STEMI, n (%)	0	0	15 (42,9%)
<i>Kardiale Anamnese:</i>			
akuter Myokardinfarkt, n (%)	2 (15,4%)	2 (14,3%)	7 (20,0%)
ACVB, n (%)	1 (7,7%)	2 (14,3%)	6 (17,1%)
<i>Kardiovaskuläre Risikofaktoren:</i>			
arterieller Hypertonus, n (%)	11 (84,6%)	13 (92,9%)	31 (88,6%)
Diabetes mellitus, n (%)	3 (23,1%)	2 (14,3%)	11 (31,4%)
Hypercholesterinämie, n (%)	11 (84,6%)	12 (85,7%)	27 (77,1%)
aktueller Nikotinabusus, n (%)	3 (23,1%)	3 (21,4%)	7 (20,0%)
<i>Medikamente bei Aufnahme:</i>			
Statine, n (%)	11 (84,6%)	11 (78,6%)	14 (40,0%)
ACE-Hemmer, n (%)	8 (61,5%)	8 (57,1%)	14 (40,0%)
Betablocker, n (%)	9 (69,2%)	9 (64,3%)	19 (54,3%)
Clopidogrel, n (%)	10 (76,9%)	12 (85,7%)	17 (48,6%)
<i>Kardiale Marker:</i>			
maximale CK [U/l]	38,7±3,7	90,6±12,9	1299,3±263,9
maximales Troponin T [ng/ml]	0,00±0,0	0,01±0,0	2,8±3,3
Kreatinin bei Aufnahme [mg/dl]	1,13±0,08	1,04±0,11	1,26±0,07
<i>Angiographische Daten:</i>			
Anzahl der betroffenen Gefäße			
Eingefäßerkrankung, n (%)	9 (69,2%)	3 (21,4%)	7 (20,0%)
Dreigefäßerkrankung, n (%)	3 (23,1%)	9 (64,3%)	22 (62,9%)
Intervention			
LAD, n (%)	keine	5 (35,7%)	13 (37,1)
RCA, n (%)	keine	5 (35,7%)	10 (28,6%)
LCx, n (%)	keine	4 (28,6%)	12 (34,3%)
LVEF, %	61,4±3,0	58,2±3,5	41,1±2,5
totale Stentlänge [mm]	0	37,1±8,0	36,9±4,4
Ballon-Spitzendruck [atü]	0	14,6±0,7	14,2±0,4
Menge des injizierten Röntgenkontrastmittels [ml]	176,2±15,3	297,9±36,1	346,9±20,3

Tabelle 7: Daten des Patientenkollektivs. Angaben als Mittelwert ± SEM oder Prozent; sCAD = stabile koronare Herzerkrankung; SAP = stabile Angina pectoris; ACS = akutes Koronarsyndrom, IAP = instabile Angina pectoris, SAP = stabile Angina pectoris; LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion, NSTEMI = Non-ST-elevation-myocardial-infarction, STEMI = ST-elevation-myocardial-infarction, ACVB = Aorto-Coronarer Venen-Bypass;

4.2 Zytokine

4.2.1 Placental Growth Factor

4.2.1.1 PIGF bei Patienten mit perkutaner koronarer Intervention und Stentimplantation

Unmittelbar nach koronarer Intervention mit Stentimplantation zeigte sich bei allen Patienten ein signifikanter Anstieg der PIGF-Konzentration im Plasma (ACS: $p < 0,001$; SAP: $p = 0,013$). Nach 24 Stunden und nach 48 Stunden erreichten die Plasmaspiegel von PIGF bei allen Patienten in etwa den Ausgangswert. Zu keinem Zeitpunkt ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den PIGF-Spiegeln der Gruppen (siehe *Abb. 5*).

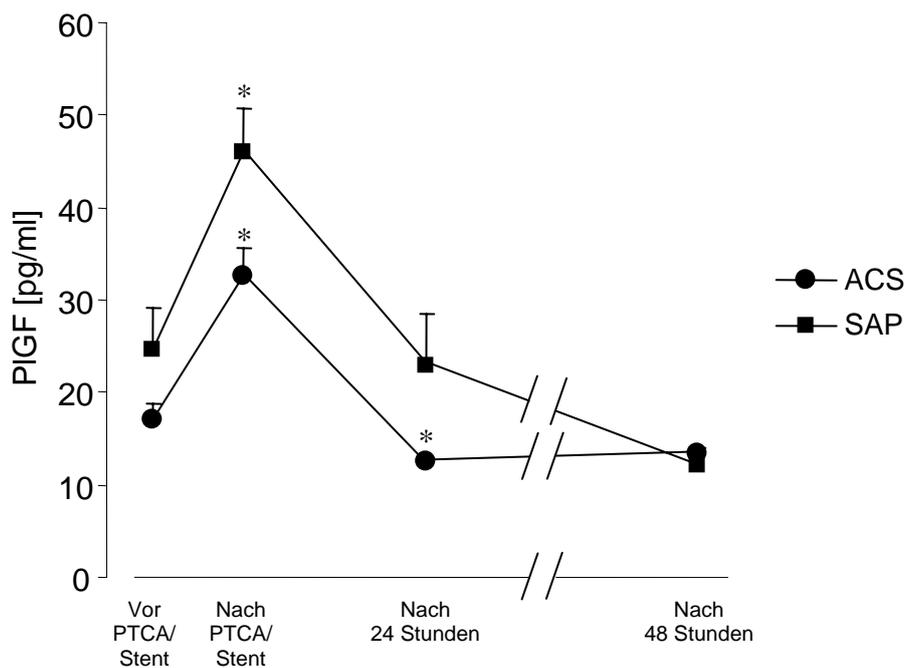


Abbildung 5: Plasmakonzentrationen von PIGF vor der Intervention („PTCA/Stent“), unmittelbar nach, 24 und 48 Stunden nach der Intervention. * = Signifikanz von $p < 0,05$ gegenüber „Vor PTCA/Stent“

4.2.1.2 PIGF bei Patienten mit diagnostischer Koronarangiographie

Bei der Messung der Plasma-PIGF-Spiegel von 13 Patienten, die eine Angiographie ohne Intervention (PTCA/Stent) erhielten, zeigten sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von PIGF durch die angiographische Darstellung der einzelnen Koronargefäße mit Imeron[®] verglichen mit der Plasmakonzentration ohne Kontrastmittelbelastung (siehe *Abb. 6*). Die Plasmakonzentrationen waren vergleichbar mit denen der Patienten mit koronarer Intervention und Stentimplantation.

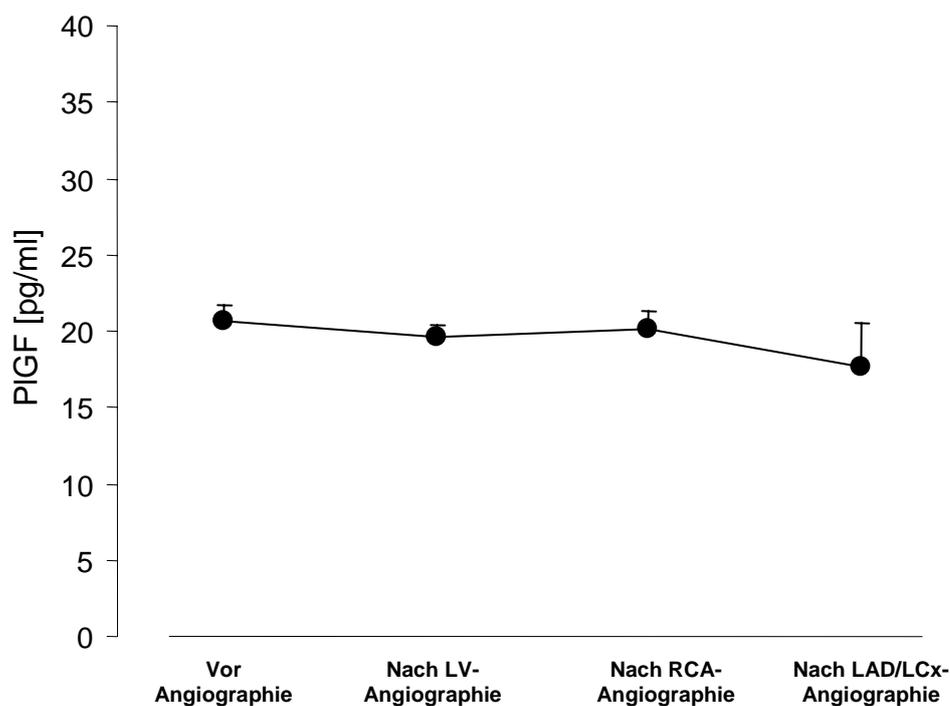


Abbildung 6: Freisetzung von PIGF durch die Koronarangiographie ohne Intervention, n = 13. Keine signifikanten Änderungen der Plasma-PIGF-Konzentration bei der Darstellung der einzelnen Gefäße. LV = linker Ventrikel, RCA = rechte Koronararterie, LAD = Ramus interventricularis anterior, LCx = Ramus circumflexus der linken Koronararterie.

4.2.1.3 Auswirkungen von Heparin auf die Freisetzung von PIGF *in vivo*

In vitro bestehen Hinweise, dass Heparin eine Freisetzung von PIGF induziert. Um einen möglichen Effekt von Heparin auf die Freisetzung von PIGF *in vivo* zu untersuchen, wurde 9 gesunden Probanden jeweils 5000 Einheiten Heparin intravenös injiziert. Innerhalb von 60 Minuten nach der Injektion kam es zu keinen signifikanten Änderungen der Plasma-PIGF-Konzentration verglichen mit dem PIGF-Spiegel vor Injektion des Heparins (siehe Abb. 7). Die Plasmakonzentrationen waren vergleichbar mit denen der Patienten mit SAP, sCAD und ACS.

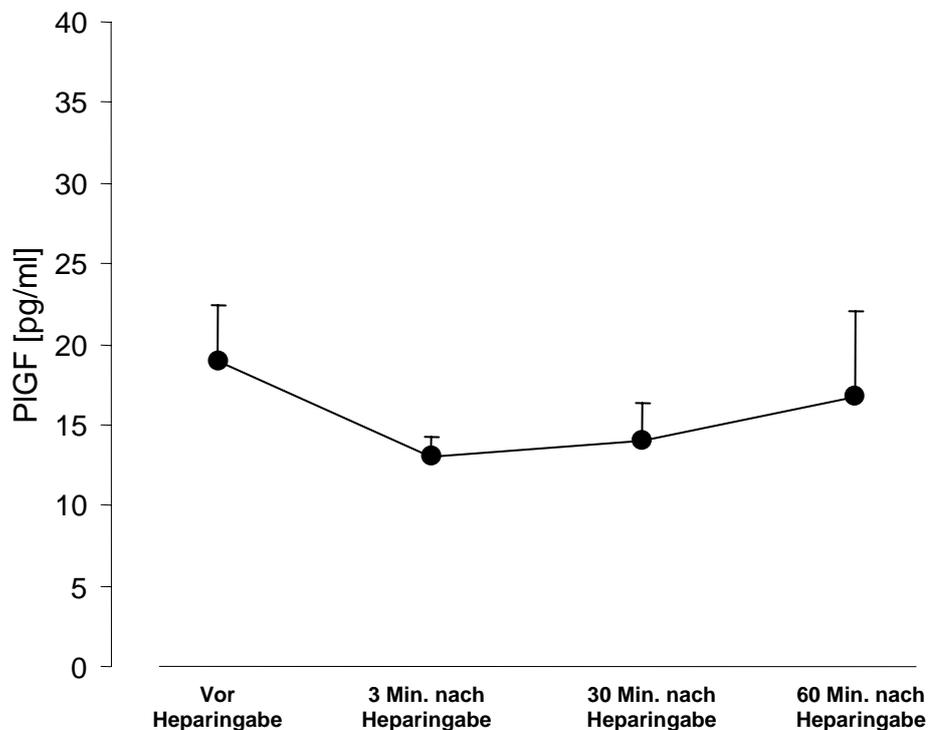


Abbildung 7: Freisetzung von PIGF nach intravenöser Injektion von 5000 IE Heparin, n = 9. Keine signifikanten Veränderungen des Plasma-PIGF nach 3 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten.

4.2.2 VEGF bei Patienten mit perkutaner koronarer Intervention und Stentimplantation

Als mit PIGF verwandter Faktor wurde VEGF untersucht. Ähnlich wie PIGF hat VEGF eine Bedeutung als Mediator im Rahmen der Angio- und Vaskulogenese, jedoch hat VEGF als Mediator bei entzündlichen Prozessen eine untergeordnete Rolle. Sowohl VEGF als auch PIGF binden an VEGFR-1 (siehe 1.1.3.2). Bei allen Patienten zeigte sich unmittelbar nach koronarer Intervention ein signifikanter Abfall der VEGF-Konzentration im Plasma (ACS: $p < 0,001$; SAP: $p = 0,018$). Nach 24 Stunden ergaben sich keine Unterschiede verglichen mit dem Wert vor der Intervention.

Zwischen den Gruppen (ACS und SAP) bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von VEGF im Plasma (siehe *Abb. 8*).

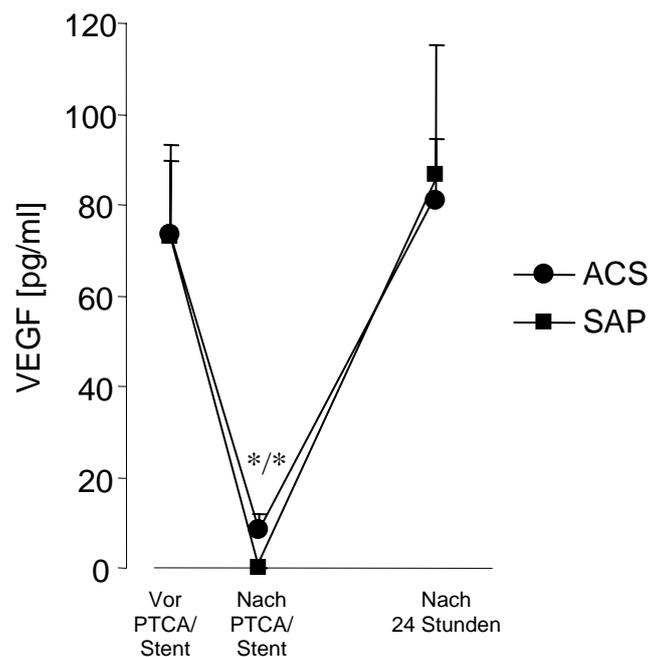


Abbildung 8: Plasmakonzentrationen von VEGF vor der Intervention („PTCA/Stent“), unmittelbar nach und 24 Stunden nach der Intervention. * = Signifikanz von $p < 0,05$ gegenüber „Vor PTCA/Stent“

4.2.3 IL-6 bei Patienten mit perkutaner koronarer Intervention und Stentimplantation

Um die Freisetzung von PIGF im Zusammenhang mit der systemischen Entzündungsreaktion zu beleuchten, wurde IL-6 als Indikator der Inflammation untersucht. Wie bereits in vorangegangenen Studie gezeigt werden konnte, waren die Plasma-IL-6-Spiegel bei Patienten mit ACS signifikant höher als bei Patienten mit SAP und zeigten einen signifikanten Anstieg nach der Intervention (81). Die IL-6-Konzentrationen bei den Patienten mit SAP blieben weitgehend unverändert nach Intervention (siehe *Abb. 9*).

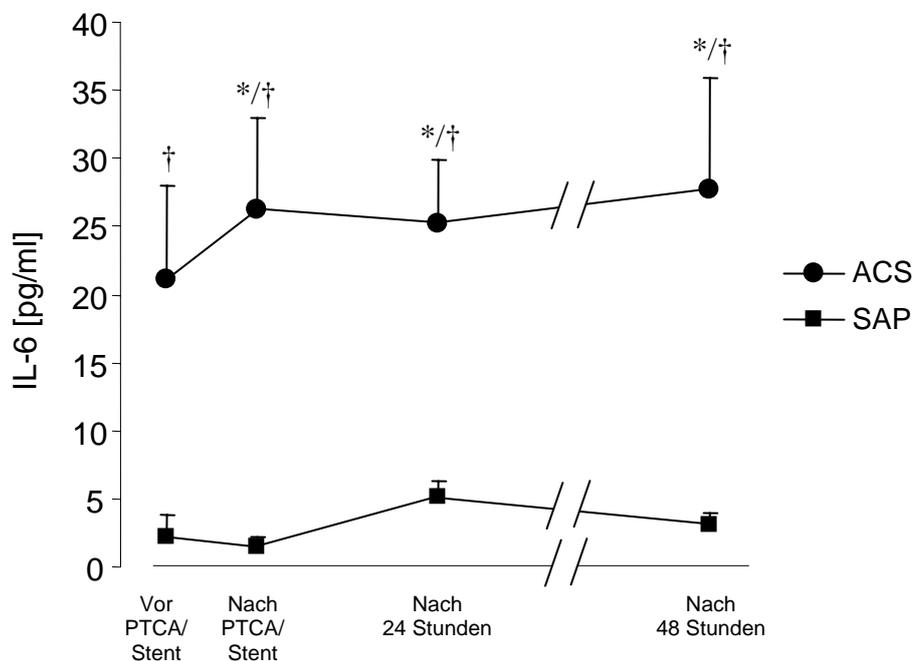


Abbildung 9: Plasmakonzentrationen von IL-6 vor der Intervention („PTCA/Stent“), unmittelbar nach, 24 und 48 Stunden nach der Intervention. * = Signifikanz von $p < 0,05$ gegenüber „Vor PTCA/Stent“; † = Signifikanz von $p < 0,05$ gegenüber SAP.

4.2.4 Korrelationen der Zytokine im akuten Koronarsyndrom

24 Stunden nach der Intervention zeigte sich bei den Patienten mit ACS eine positive Korrelation des VEGF-Wertes mit dem PIGF-Wert im Plasma. Darüber hinaus korrelierten die Zytokine (PIGF, VEGF und IL-6) zu keinem Zeitpunkt miteinander. Insbesondere konnte keine Assoziation von IL-6 mit PIGF aufgezeigt werden (siehe *Tabelle 8*).

	sCAD, n = 13	SAP, n = 14	ACS, n = 35
Korrelation			
PIGF mit VEGF	n. s.	n. s.	Zeitpunkt: 24 h nach PTCA/Stent r = 0,515 p = 0,003
PIGF mit IL-6	n. s.	n. s.	n. s.
VEGF mit IL-6	n. s.	n. s.	n. s.

Tabelle 8: Korrelationen der Zytokine untereinander. n. s. = nicht signifikant.

4.3 Multivariate Analyse

Um die Mechanismen der PIGF-Freisetzung *in vivo* weiter zu analysieren, wurden die Plasma-PIGF-Spiegel im Zusammenhang mit den klinischen Daten der Patienten in einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse ausgewertet (*Tabelle 9*). Es zeigte sich, dass die PIGF-Konzentrationen unmittelbar nach der koronaren Intervention weder mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion bei Aufnahme als Marker der ischämischen Kardiomyopathie noch mit dem Serum-Kreatinin als Marker der Nierenfunktion korrelierten. Gleichermäßen bestand keine Assoziation zwischen Indikatoren langer und komplizierter Interventionen wie der totalen Länge der implantierten Stents oder dem Ballondruck mit den PIGF-Spiegeln.

Obwohl die laborchemischen Marker der myokardialen Nekrose und der Inflammation wie TnT, CK und CRP nicht mit den PIGF-Spiegeln korrelierten, konnte ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Koronaratherosklerose mit den Plasma-PIGF-Spiegeln aufgezeigt werden ($r = 0,338$, $p = 0,008$). Dabei zeigte sich, dass die Dreigeßäßerkrankung als Indikator einer ausgeprägten Atherosklerose positiv mit dem Plasma-PIGF korreliert, wohingegen die Eingefäßerkrankung negativ mit der PIGF-Konzentration korreliert. Ischämie und Inflammation, die in Zusammenhang mit dem Ausmaß der Atherosklerose stehen, könnten somit zu einer Freisetzung von PIGF beigetragen haben.

	SEM	β	t	p
Injizierte Kontrastmittelmenge	0,017	0,258	2,050	0,045
NSTEMI	7,305	0,298	2,570	0,013
STEMI	5,697	-0,364	-2,780	0,007
IAP	5,695	-0,189	-1,524	0,133
Dreigeßäßerkrankung	4,380	0,285	2,453	0,017

Tabelle 9: Untersuchung unabhängiger Korrelate der Plasma-PIGF-Spiegel nach perkutaner koronarer Intervention oder diagnostischer Koronarangiographie bei Patienten mit ACS, SAP und sCAD mittels multivariater Cox-Regressionsanalyse.

Im Rahmen der Analyse der klinischen Daten zeigte sich weiter, dass die Menge des während der Koronarangiographie und der koronaren Intervention injizierten Röntgenkontrastmittels Imeron[®] mit den Plasma-PIGF-Spiegeln nach der Intervention assoziiert ist (siehe Abb. 10).

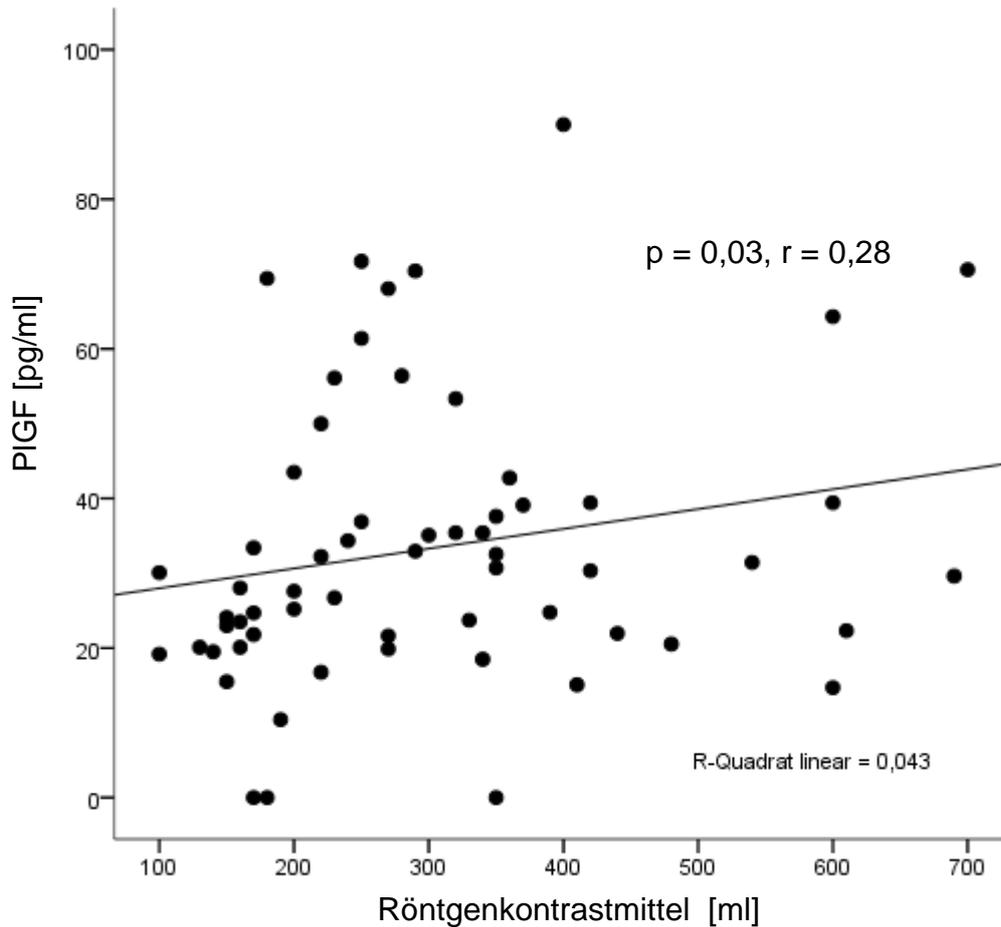


Abbildung 10: Assoziation zwischen PIGF-Spiegeln und der Menge des injizierten Röntgenkontrastmittels Imeron[®] bei Patienten mit ACS, SAP und sCAD.

4.4 Zellkulturversuche

4.4.1 Wirkung von Kontrastmittel auf die Freisetzung von PIGF in Endothelzellen

Während der Einfluss von Ischämie und Inflammation auf den PIGF-Metabolismus bereits beschrieben wurde, war die Assoziation zwischen Plasma-PIGF und Röntgenkontrastmitteln bislang unbekannt. Deshalb wurde der Einfluss von Kontrastmitteln auf Endothelzellen *in vitro* untersucht. Nach Stimulation der Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) mit dem Röntgenkontrastmittel Imeron[®] in aufsteigender Konzentration zeigte sich nach einer Stunde Inkubation im Überstand bei einer Kontrastmittelkonzentration von 10% ein signifikanter Anstieg des PIGF gefolgt von einem Abfall bei höheren Kontrastmittelkonzentrationen (siehe Abb. 11).

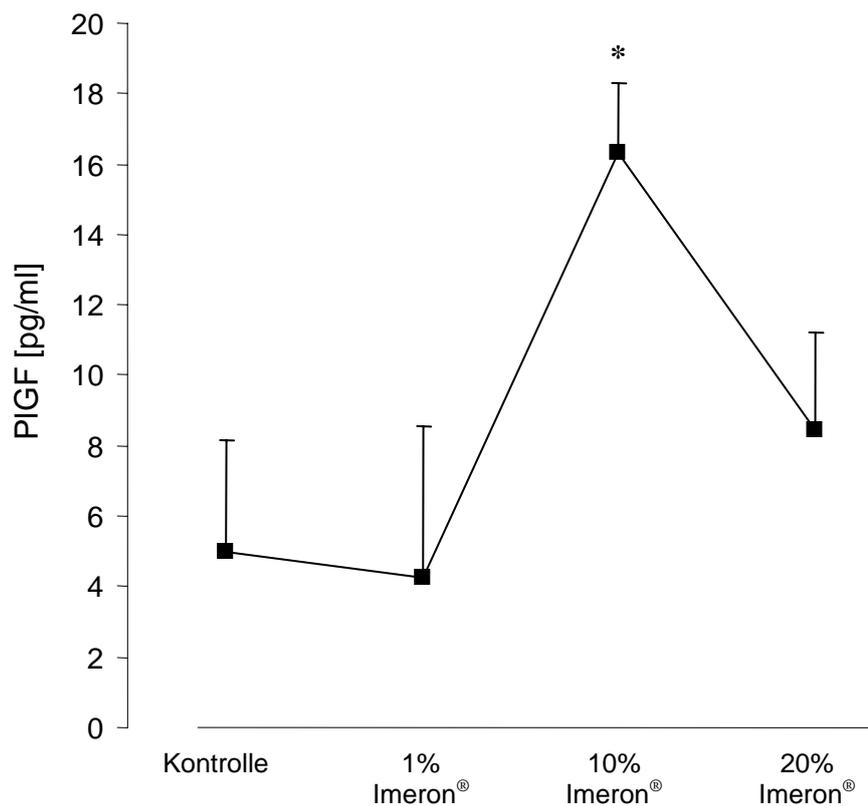


Abbildung 11: Konzentrationsabhängige Freisetzung von PIGF nach einstündiger Stimulation der HUVECs mit dem Kontrastmittel Imeron[®]. * = $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle (kein Kontrastmittel).

Bei Bestimmung der PlGF-Konzentration im Überstand nach 5, 15, 30 und 60 Minuten zeigte sich nach 60 Minuten Inkubation mit Imeron[®] in 10%iger Konzentration ein signifikanter Anstieg des PlGF gegenüber der fünfminütigen Inkubationszeit (siehe Abb. 12).

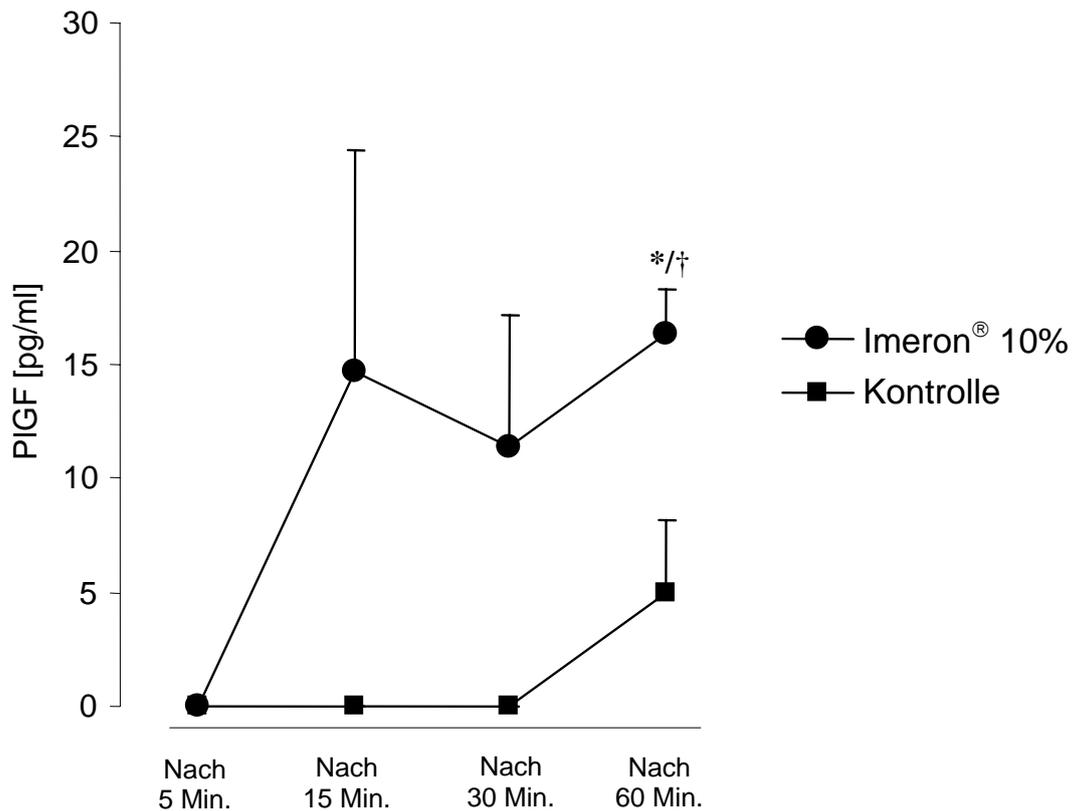


Abbildung 12: Messung von PlGF zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation der HUVECs mit 10% Imeron[®] (Iomeprol). * = $p < 0,05$ gegenüber 5 Minuten Stimulation, † = $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle (kein Kontrastmittel).

4.4.2 Wirkung von Kontrastmittel auf die Freisetzung von VEGF in Endothelzellen

Bei der Stimulation der HUVECs mit Imeron[®] zeigte sich nach einer Stunde Inkubation im Überstand bei ansteigender Kontrastmittelkonzentration ein kontinuierlicher Abfall der VEGF-Konzentration im Überstand (siehe *Abb. 13*).

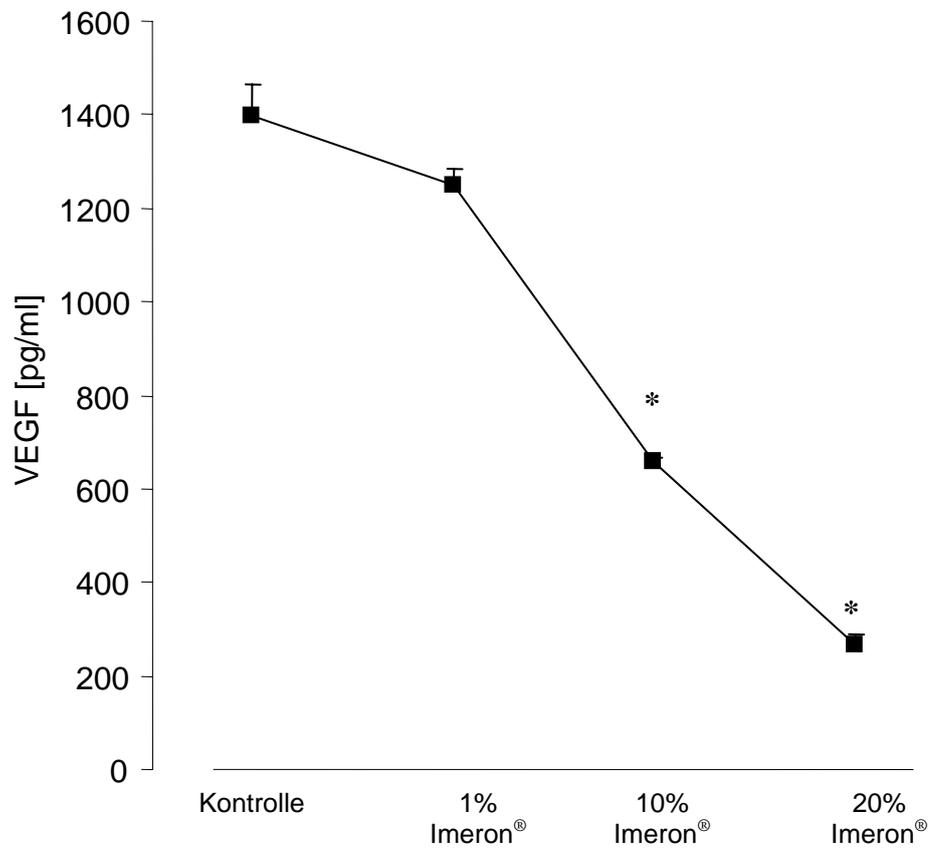


Abbildung 13: Konzentrationsabhängiger Abfall von VEGF nach einstündiger Stimulation der HUVECs mit dem Kontrastmittel Imeron[®]. * = $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle (kein Kontrastmittel).

Bei Bestimmung der VEGF-Konzentration im Überstand nach 5, 15, 30 und 60 Minuten zeigte sich im Verlauf nach Inkubation mit Imeron[®] in 10%iger Konzentration ein kontinuierlicher Abfall des VEGF. Zu allen Zeitpunkten war die Konzentration des VEGF nach Kontrastmittelstimulation signifikant niedriger gegenüber der Kontrolle (kein Kontrastmittel, siehe *Abb. 14*).

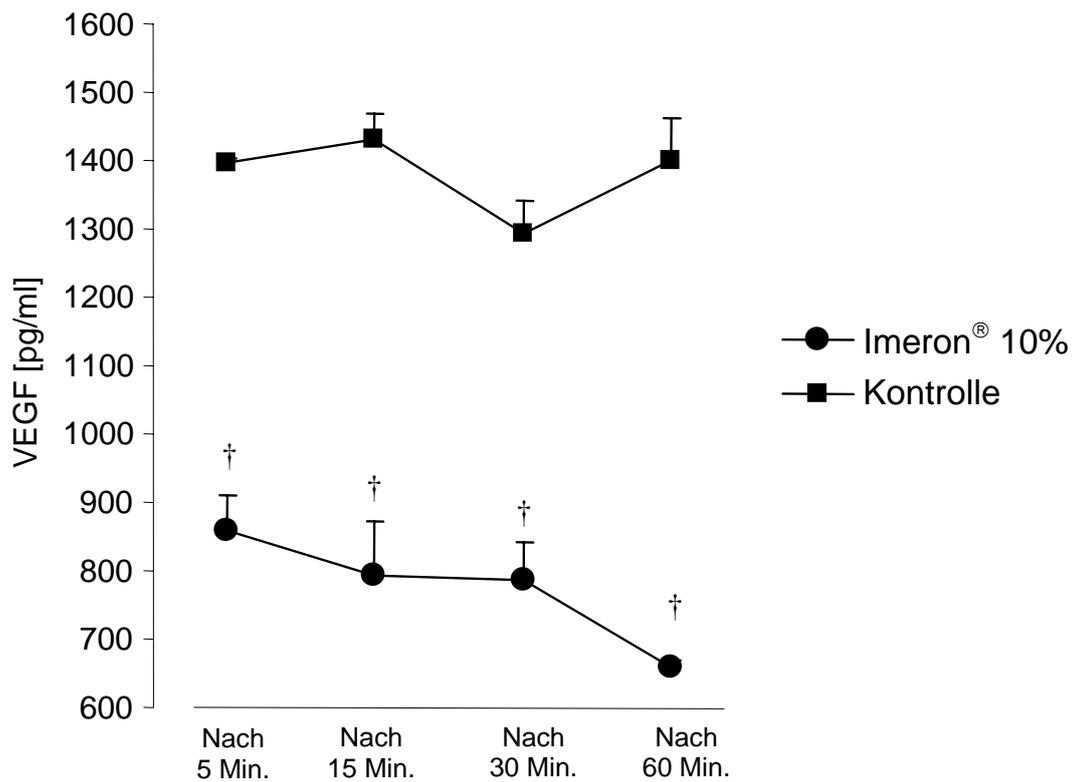


Abbildung 14: Messung von VEGF zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation der HUVECs mit 10% Imeron[®] (Iomeprol). † = $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle (kein Kontrastmittel) zum jeweiligen Zeitpunkt

4.4.3 Zellmorphologie

In der lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellkultur (*Abb. 15*) war nach einer Inkubationszeit von einer Stunde sowohl bei der Kontrolle als auch bei einer Konzentration von 1% und 10% Imeron[®] ein endothelzelltypisches, pflastersteinartiges, konfluentes Wachstumsmuster zu erkennen.

Bei einer Konzentration von 20% Imeron[®] waren Ablösungen von Zellen aus dem Zellverbund und ein spärlicheres Wachstumsmuster erkennbar. Der Zellrasen war nicht mehr konfluent und die Zellen erschienen kleiner (siehe *Abb. 15 D*).

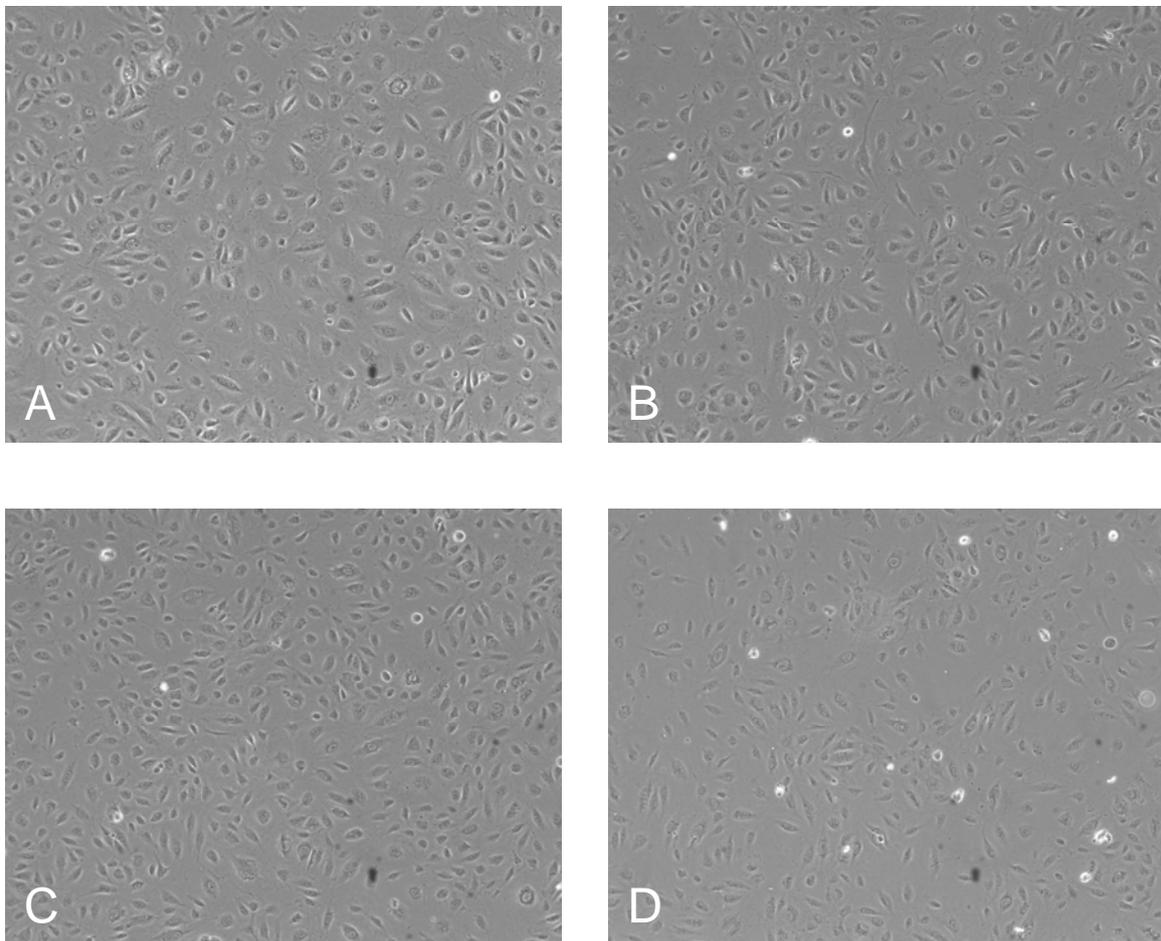


Abbildung 15: HUVECs Zellkulturpassage 13 nach einstündiger Inkubation mit Imeron[®] (Iomeprol) in aufsteigender Konzentration. A: Kontrolle (kein Kontrastmittel); B: 1% Imeron[®] ; C: 10% Imeron[®] ; D: 20% Imeron[®]

4.4.4 Vergleich von Imeron[®] und Visipaque[®]

Da bekannt ist, dass die Osmolarität ein wesentlicher Faktor bei der Zytotoxizität von Röntgenkontrastmitteln ist (96), wurden HUVECs zusätzlich mit dem isoosmolaren Kontrastmittel Visipaque[®] inkubiert. Beim Vergleich des Wachstumsmusters der HUVECs nach Stimulation mit dem hyperosmolaren Kontrastmittel Imeron[®] und dem isoosmolaren Kontrastmittel Visipaque[®] waren keine Unterschiede erkennbar (siehe *Abb. 16*).

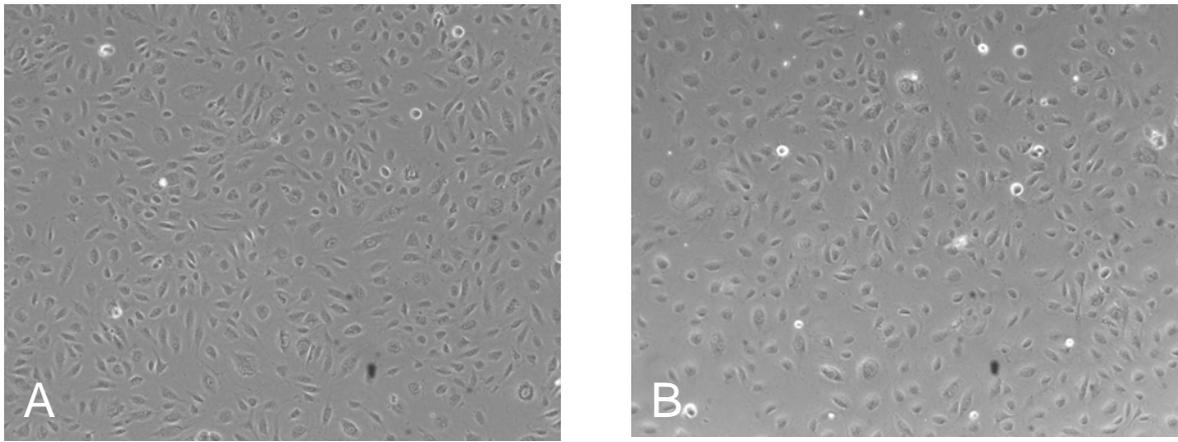


Abbildung 16: HUVECs Zellkulturpassage 13 nach einstündiger Inkubation mit 10% Imeron[®] (A) und 10% Visipaque[®] (B).

Beim Vergleich des Einflusses von iso- und hyperosmolarem Kontrastmittel auf die Freisetzung von PIGF aus den Endothelzellen zeigte sich bei einer Kontrastmittelkonzentration von 10% kein signifikanter Unterschied zwischen dem hyperosmolaren Kontrastmittel Imeron[®] und dem isoosmolaren Kontrastmittel Visipaque[®] (siehe *Abb. 17*). Gleiches galt für die Wirkung des Kontrastmittels auf die Freisetzung von VEGF aus den Endothelzellen (siehe *Abb. 18*).

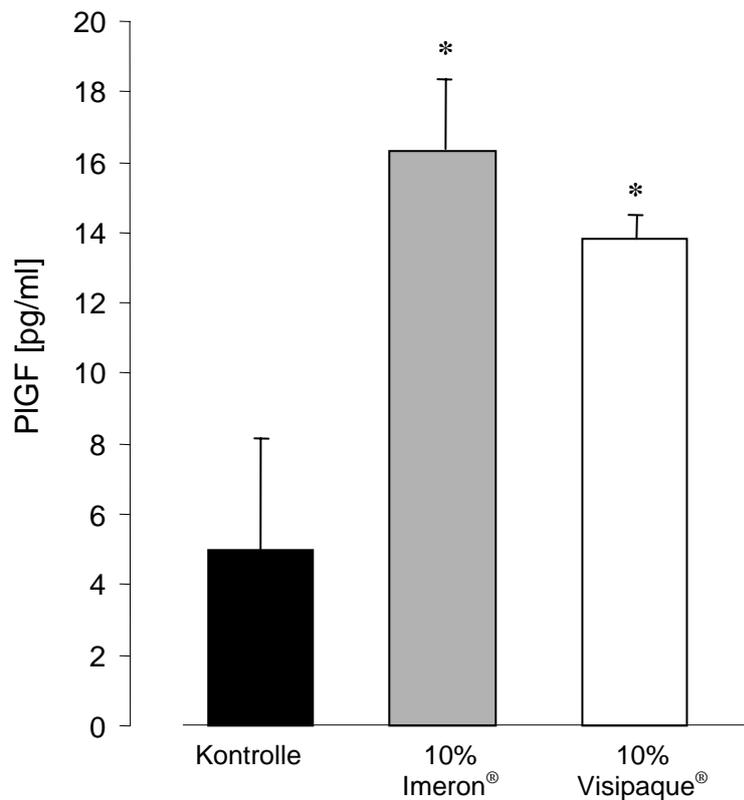


Abbildung 17: Wirkung von 10% Imeron[®] und 10% Visipaque[®] auf die Freisetzung von PIGF aus HUVECs nach einstündiger Inkubation. * = $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle (kein Kontrastmittel). Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrastmitteln.

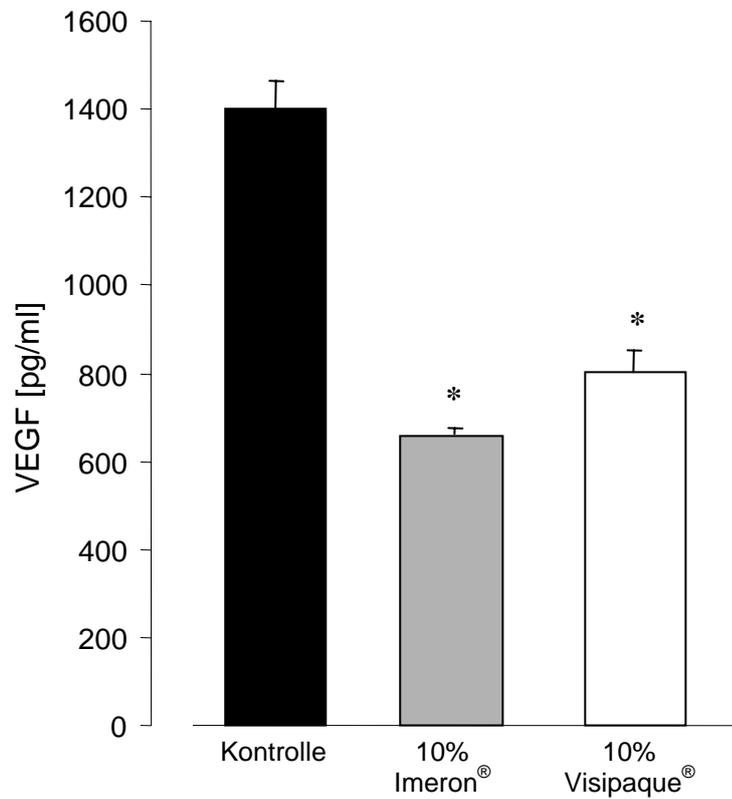


Abbildung 18: Wirkung von 10% Imeron® und 10% Visipaque® auf die Freisetzung von VEGF aus HUVECs nach einstündiger Inkubation. * = $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle (kein Kontrastmittel). Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrastmitteln

4.4.5 mRNA-Expression von PlGF, VEGF und IL-6 in Endothelzellen nach Stimulation mit Imeron®

Nach einstündiger Kontrastmittelstimulation in aufsteigender Konzentration war in den HUVECs keine Induktion von PlGF- und VEGF-mRNA durch die PCR nachweisbar. Imeron® induzierte bei einer Konzentration von 1% die Expression von IL-6-mRNA (siehe Abb. 19).

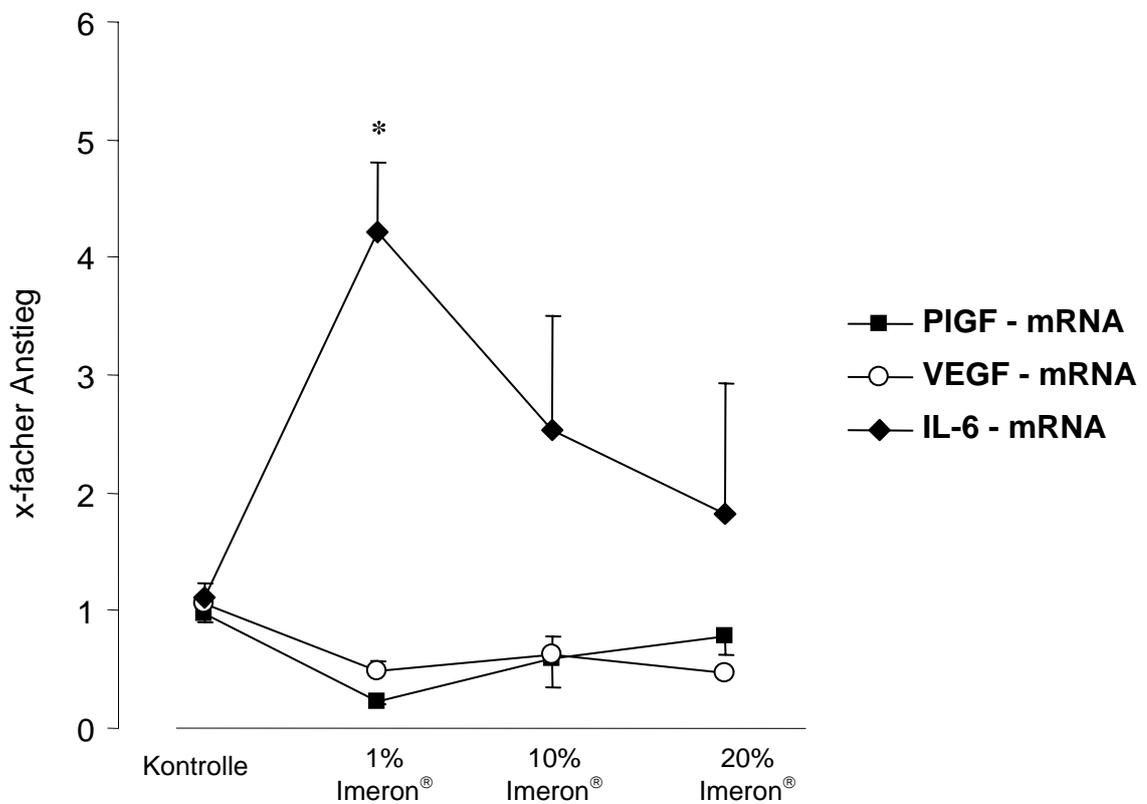


Abbildung 19: PlGF-, VEGF- und IL-6-mRNA-Induktion in Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) nach einstündiger Inkubation mit dem Kontrastmittel Imeron®. * = p < 0,05 gegenüber Kontrolle (kein Kontrastmittel).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die perkutane koronare Intervention mit Implantation eines Stents mit einem deutlichen Anstieg des Plasma-PlGF-Spiegels und einem Abfall des VEGF-Spiegels assoziiert ist. Diese Veränderungen von PlGF und VEGF waren unabhängig von der klinischen Diagnose der Patienten (akutes Koronarsyndrom oder stabile Angina pectoris), der Heparin-gabe oder der Koronarangiographie. Sie korrelierten jedoch mit dem Ausmaß der Atherosklerose und mit der Menge des injizierten Kontrastmittels. Darüber hinaus konnte nach *in vitro* Stimulation von Endothelzellen mit Kontrastmittel ein vergleichbarer Anstieg von PlGF und ein Abfall von VEGF im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden.

5.1 PlGF im akuten Koronarsyndrom

Die Frage nach einem Effekt der perkutanen koronaren Intervention auf den PlGF-Plasma-Spiegel ist relevant, da PlGF in letzter Zeit als Prädiktor der kardiovaskulären Mortalität und Morbidität bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom oder Diabetes mellitus Typ 1 Beachtung fand (45, 62, 104). Da diese Patienten oft mittels perkutaner koronarer Intervention behandelt werden, sind mögliche Einflussfaktoren auf den PlGF-Spiegel von Bedeutung. Heeschen et al. konnten aufzeigen, dass bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom die basalen Plasma-PlGF-Spiegel der vierten und fünften Quintile ein Indikator für eine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität sind. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit konnten in dieser Studie signifikant höhere PlGF-Spiegel bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom verglichen mit denen bei Patienten mit stabiler Angina pectoris gemessen werden (45). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch verschiedene Zeitfenster, innerhalb derer die Blutproben entnommen wurden, oder durch Unterschiede in der Prävalenz der Herzinsuffizienz bei den untersuchten Patienten erklärt werden. Dahingehend zeigten weitere Studien, dass die PlGF-Plasma-Spiegel im Zusammenhang mit der Ausprägung der Herzinsuffizienz bei ischämischer Kardiomyopathie erhöht sind (79) und dass sie bei akutem Myokardinfarkt zum Zeitpunkt der Aufnahme vergleichbar mit denen bei stabiler Angina pectoris sind. Ein Anstieg des PlGF wurde erst drei Tage nach dem akuten Ereignis nachgewiesen (50). Bemerkenswert ist, dass in der letztgenannten Studie der in der vorliegenden Arbeit beschriebene PlGF-Anstieg im peripheren Blut unmittelbar nach

Stentimplantation nicht aufgezeigt werden konnte, da periphere Blutproben nur bei Aufnahme, nach einem und nach drei Tagen nach der Intervention entnommen wurden.

Mögliche Faktoren, die Einfluss auf die PIGF-Freisetzung haben, könnten Medikamente sowie ein ischämischer Stimulus durch die Intervention und die Angiographie selbst sein. Allerdings konnte bei den Patienten mit stabiler Angina pectoris, die eine diagnostische Koronarangiographie ohne Intervention erhielten, kein PIGF-Anstieg beobachtet werden. Darüber hinaus erscheint ein Effekt auf die PIGF-Freisetzung durch die Injektion von Heparin unwahrscheinlich, da bei gesunden Probanden, die vergleichbare Dosen an Heparin erhielten, keine Veränderung des Plasma-PIGF eintrat.

5.2 PIGF im Zusammenhang mit Ischämie und Inflammation

Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass PIGF sehr schnell im ischämischen Myokard von Mäusen (50) und in unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Fibroblasten (37) exprimiert wird, konnte in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation des PIGF-Anstieges mit den CK- und Troponin T-Spiegeln nachgewiesen werden. Ebenso hatten Indikatoren einer komplexen und langwierigen Intervention, wie die totale Länge der implantierten Stents oder der Ballondruck, keinen Einfluss auf die PIGF-Freisetzung. Der PIGF-Anstieg im Plasma war bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ähnlich ausgeprägt wie bei Patienten mit stabiler Angina pectoris, die eine elektive Intervention mit Stentimplantation erhielten. Weiter ließ sich keine Korrelation von IL-6 mit PIGF nachweisen. Jedoch konnte durch Korrelationsanalysen gezeigt werden, dass die PIGF-Plasma-Spiegel nach perkutaner koronarer Intervention mit dem Ausmaß der koronaren Herzerkrankung assoziiert sind. Je ausgeprägter die koronare atherosklerotische Läsion ist, desto größer ist das Ausmaß der Ischämie und, damit einhergehend, der Inflammation. Beide Faktoren scheinen somit in die PIGF-Freisetzung nach perkutaner koronarer Intervention involviert zu sein.

5.3 Einfluss von Röntgenkontrastmittel auf die Freisetzung von PIGF

In der vorliegenden Arbeit korreliert die PIGF-Plasmakonzentration mit der Menge des während der Intervention injizierten Kontrastmittels. Diese Assoziation konnte durch *in vitro* Experimente untermauert werden, die zeigten, dass Röntgenkontrastmittel einen dosis- und zeitabhängigen Anstieg der PIGF- und einen Abfall der VEGF-Konzentration im Zellkulturüberstand der kultivierten Endothelzellen induziert. Dabei entsprach die zur Stimulation der Endothelzellen *in vitro* verwendete Kontrastmittelkonzentration von 10 % in etwa der durchschnittlichen Konzentration, die intravasal im Rahmen einer perkutanen koronaren Intervention vorherrscht. Die durchschnittliche Kontrastmittelkonzentration bei einer rein diagnostischen Koronarangiographie liegt unterhalb dieses Wertes.

Wenngleich es nicht durch die Induktion einer gesteigerten PIGF-Transkription zum schnellen PIGF-Anstieg kommt und dieser somit auf posttranslationaler Ebene stattfinden muss, bleibt der genaue Mechanismus unklar. Vorangegangene Studien lieferten bereits Hinweise, dass Röntgenkontrastmittel verschiedene Effekte auf zellulärer Ebene haben. Diese beinhalten oxidativen Stress, Störungen des Kalziumhaushaltes, Veränderungen der Zellpolarität, programmierten Zelltod, Dephosphorylierung von Akt und anderen Mediatoren der intrazellulären Signalkaskade, Blutplättchen- und Thrombinaktivierung, Fibrinbildung sowie die Freisetzung spezifischer Proteine wie Endothelin-1, von-Willebrand-Faktor oder Thrombomodulin (2, 3, 25, 46, 86, 101).

Nach den Daten der vorliegenden Arbeit scheint ein Kontrastmittelinduzierter Zelltod und Zellerfall eher unwahrscheinlich, da in der lichtmikroskopischen Betrachtung der Zellmorphologie die Kontrastmittelstimulierten Endothelzellen intakt zu sein schienen. Vielmehr wurden die Endothelzellen durch die Kontrastmittelstimulation aktiviert. Dies kommt durch die gesteigerte IL-6-mRNA-Produktion zum Ausdruck (73), welche wiederum nicht mit Apoptose oder Nekrose von Endothelzellen assoziiert ist. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Studien, die zeigten, dass Röntgenkontrastmittel das vaskuläre Endothelium schädigen. Dort konnte anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass Röntgenkontrastmittel über pinozytotische Vesikel in Endothelzellen aufgenommen werden und diese dadurch schädigen (83). In einer weiteren Arbeit wurde eine inflammatorische Reaktion der Gefäßwand nach Injektion von Röntgenkontrastmittel histologisch nachgewiesen (58). Zusammenfassend ist es daher naheliegend, dass der Anstieg von PIGF auf eine Stimulation des Endothels durch Röntgenkontrastmittel zurückzuführen ist.

5.4 Verlauf von PIGF und VEGF

Der genaue Mechanismus, über den Imeron[®], oder vielmehr die perkutane koronare Intervention, zu einem Anstieg von PIGF führt, ist unbekannt. Beispielsweise wurde in Untersuchungen des bronchialen Epithels eine durch die NO-Synthese getriggerte Expression von PIGF nachgewiesen (77). Ebenso ist der genaue Mechanismus des VEGF-Abfalls sowohl *in vivo* nach perkutaner koronarer Intervention als auch *in vitro* nach Stimulation mit Imeron[®] unklar. Ein gegensätzlicher Verlauf der Expression von PIGF- und VEGF-Proteinen wurde bereits beschrieben. So kommt es während der Schwangerschaft zu einem Anstieg des PIGF mit gleichzeitigem Abfall von VEGF (1). Weiterhin gibt es Hinweise, dass eine Heterodimerisierung von PIGF und VEGF für den Abfall von VEGF-Homodimeren verantwortlich ist. In ansteigender Konzentration ist PIGF in der Lage, mit VEGF Heterodimere zu bilden, damit einerseits VEGF-A-Homodimere zu depletieren und andererseits die VEGFR-2-vermittelte Signaltransduktion und Genexpression zu verändern, da die gebildeten Heterodimere nicht mehr in der Lage sind, den Rezeptor zu aktivieren (5, 12, 18, 24, 113). Folglich kommt es bei Tumoren, die PIGF überexprimieren, zu einer gesteigerten Freisetzung von PIGF-Homodimeren und PIGF/VEGF-Heterodimeren bei einem gleichzeitigen Abfall von VEGF-Homodimeren. Gesteigerte Konzentrationen von PIGF führen zu einer verminderten Bildung von VEGF-Homodimeren und steigern die Bildung von PIGF/VEGF-Heterodimeren infolge der posttranslationalen Regulation (24). Da die kontrastmittelinduzierte Freisetzung von PIGF aus Endothelzellen nicht mit einer gesteigerten mRNA-Expression einherging, ist es naheliegend, dass diesem Vorgang posttranslationale Mechanismen zugrunde liegen.

6. Studienbeschränkungen

Verschiedenen Einschränkungen der vorliegenden Studie sollte Beachtung geschenkt werden. Die Studienpopulation ist klein und in Bezug auf die medikamentöse Therapie vor Aufnahme in die Studie gibt es Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Eine genauere Entschlüsselung der Mechanismen der PIGF-Freisetzung bedarf weiterer Untersuchungen. Wenngleich es naheliegend ist, dass der in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte PIGF-Anstieg durch Röntgenkontrastmittel bedingt ist, konnte keine direkte Beziehung zwischen Ursache und Wirkung *in vivo* gezeigt werden.

7. Zusammenfassung

Bei Patienten, die eine perkutane koronare Intervention erhielten, konnte ein Anstieg des zirkulierenden PlGF beobachtet werden. Neben Ischämie und Inflammation könnten toxische Effekte des Röntgenkontrastmittels auf das Endothel diesen Anstieg bedingt haben. Wenngleich PlGF ein vielversprechender Marker für die Risikostratifizierung bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung bleibt, sollte bei der Bestimmung der PlGF-Plasma-Spiegel der Zeitpunkt der Blutentnahme unter Berücksichtigung der perkutanen koronaren Intervention oder einer möglichen Kontrastmittelexposition gesetzt werden. Zusätzlich zu seiner Rolle als Mediator bei inflammatorischen Prozessen und im Rahmen der Angiogenese zeigen die erhobenen Daten, dass PlGF ein sensibler Marker für die Aktivierung von Endothelzellen durch Röntgenkontrastmittel sein könnte.

8. Abkürzungen

ACS	akutes Koronarsyndrom
ACVB	Aorto-Coronarer-Venen-Bypass
Akt	anti-apoptotische Kinase
AMI	akuter Myokardinfarkt
CK	Creatinkinase
CK-MB	Muscle-Brain Fraktion der Creatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonucleic acid (= Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase
EPC	Endothelial progenitor cells
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	Fetal calf serum (= fetales Kälberserum)
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-monocyte colony stimulating factor
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IAP	instabile Angina pectoris
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol 1,4,5,-Trisphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
LAD	Left anterior descending (= Ramus interventricularis anterior)
LCx	Ramus circumflexus
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
mRNA	“messenger” Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Non-ST-elevation-myocardial-infarction (= Nicht-ST-Hebungsinfarkt)
PCR	Polymerase chain reaction (= Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGI ₂	Prostacyclin

PI3K	Phosphoinositol 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PIGF	Placental growth factor
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RCA	Right coronary artery (= rechte Koronararterie)
sCAD	stable coronary artery disease (= stabile koronare Herzerkrankung)
RNA	Ribonucleic acid (= Ribonukleinsäure)
SEM	Standard error of the mean (= Standardfehler)
SAP	stabile Angina pectoris
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
STEMI	ST-elevation-myocardial-infarction (= ST-Hebungsinfarkt)
TNF	Tumor necrosis factor
TnT	Troponin T
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

9. Verzeichnisse

9.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1:</i> Schematische Darstellung der Neubildung und des Wachstums von Blutgefäßen	S. 10
<i>Abbildung 2:</i> Signaltransduktion von VEGFR-1 und VEGFR-2	S. 14
<i>Abbildung 3:</i> Prinzip des Quantitative Sandwich Enzyme Immunoassay	S. 23
<i>Abbildung 4:</i> Prinzip der Real-time PCR mit Reporter- und Quencher markierter Sonde	S. 27
<i>Abbildung 5:</i> Plasmakonzentrationen von PIGF vor der Intervention („PTCA/Stent“), unmittelbar nach, 24 und 48 Stunden nach der Intervention	S. 32
<i>Abbildung 6:</i> Freisetzung von PIGF durch die Koronarangiographie ohne Intervention	S. 33
<i>Abbildung 7:</i> Freisetzung von PIGF durch die intravenöse Injektion von 5000 IE Heparin	S. 34
<i>Abbildung 8:</i> Plasmakonzentrationen von VEGF vor der Intervention („PTCA/Stent“), unmittelbar nach und 24 Stunden nach der Intervention	S. 35
<i>Abbildung 9:</i> Plasmakonzentrationen von IL-6 vor der Intervention („PTCA/Stent“), unmittelbar nach, 24 und 48 Stunden nach der Intervention	S. 36
<i>Abbildung 10:</i> Assoziation zwischen PIGF-Spiegeln und der Menge des injizierten Kontrastmittels Imeron®	S. 39
<i>Abbildung 11:</i> Konzentrationsabhängige Freisetzung von PIGF nach Stimulation der HUVECs mit dem Kontrastmittel Imeron®	S. 40
<i>Abbildung 12:</i> Messung von PIGF zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation der HUVECs mit 10% Imeron®	S. 41
<i>Abbildung 13:</i> Konzentrationsabhängiger Abfall von VEGF nach Stimulation der HUVECs mit dem Kontrastmittel Imeron®	S. 42
<i>Abbildung 14:</i> Messung von VEGF zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation der HUVECs mit 10% Imeron®	S. 43
<i>Abbildung 15:</i> HUVECs Zellkulturpassage 13 nach einstündiger Inkubation mit Imeron® in aufsteigender Konzentration	S. 44
<i>Abbildung 16:</i> HUVECs Zellkulturpassage 13 nach einstündiger Inkubation mit 10% Imeron® und 10% Visipaque®	S. 45

- Abbildung 17:* Wirkung von 10% Imeron[®] und 10% Visipaque[®] auf die Freisetzung von PIGF aus HUVECs nach einstündiger Inkubation S. 46
- Abbildung 18:* Wirkung von 10% Imeron[®] und 10% Visipaque[®] auf die Freisetzung von VEGF aus HUVECs nach einstündiger Inkubation S. 47
- Abbildung 19:* PIGF-, VEGF- und IL-6-mRNA-Induktion in Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) nach einstündiger Inkubation mit dem Kontrastmittel Imeron[®] S. 48

9.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1:</i>	Einschlusskriterien der Studienpopulation	S. 17
<i>Tabelle 2:</i>	Blutabnahmeschema nach Gabe von 5000 IE Heparin intravenös, gesunde Probanden	S. 19
<i>Tabelle 3:</i>	Pipettierschema der HUVEC-Kontrastmittelstimulation	S. 21
<i>Tabelle 4:</i>	Eigenschaften des hyperosmolaren (Imeron [®]) und des isoosmolaren Kontrastmittels (Visipaque [®])	S. 21
<i>Tabelle 5:</i>	Ansatz der Polymerasekettenreaktion	S. 28
<i>Tabelle 6:</i>	PCR-Programmierung	S. 28
<i>Tabelle 7:</i>	Daten des Patientenkollektivs	S. 31
<i>Tabelle 8:</i>	Korrelationen der Zytokine untereinander	S. 37
<i>Tabelle 9:</i>	Multivariate Cox-Regressionsanalyse	S. 38

9.3 Literaturverzeichnis

1. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen-
-a review. *Placenta* 21 (2000) S.16-24
2. Albanese JR, Venditto JA, Patel GC, Ambrose JA. Effects of ionic and nonionic contrast media on in vitro and in vivo platelet activation. *Am J Cardiol* Vol.76 (1995) S.1059-1063
3. Andreucci M, Fuiano G, Presta P, Esposito P, Faga T, Bisesti V, Procino A, Altieri V, Tozzo C, Memoli B, Michael A. Radiocontrast media cause dephosphorylation of Akt and downstream signaling targets in human renal proximal tubular cells. *Biochem Pharmacol* Vol.72 (2006) S.1334-1342
4. Autiero M, Lutun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost* Vol.1 (2003) S.1356-1370
5. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PIGF in the intra- and intermolecular crosstalk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* Vol.9 (2003) S.936-943
6. Azar RR, Waters DD. The inflammatory etiology of unstable angina. *Am Heart J* Vol.132 (1996) S.1101-1106
7. Barleon B, Hauser S, Schöllmann C, Weindel K, Marmé D, Yayon A, Weich HA. Differential expression of the two VEGF receptors flt and KDR in placenta and vascular endothelial cells. *J Cell Biochem* Vol.54 (1994) S.56-66

8. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* Vol.87 (1996) S.3336-3343
9. Baumann H, Jahreis GP, Sauder DN, Koj A. Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat, and mouse. *J Biol Chem* Vol.259 (1984) S.7331-7342
10. Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* Vol.284 (1999) S.808-812
11. 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* Vol.94 (1996) S.874-877
12. Bottomley MJ, Webb NJ, Watson CJ, Holt L, Bukhari M, Denton J, Freemont AJ, Brenchley PE. Placenta growth factor (PlGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin Exp Immunol* Vol.119 (2000) S.182-188
13. 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; American College of Cardiology; American Heart Association. Committee on the Management of Patients With Unstable Angina. et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction-summary article. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol* Vol.40 (2002) S.1366-1374
14. Brogi E, Schattman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, Isner JM. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest* Vol.97 (1996) S.469-476

15. Buja LM, Willerson JT. Role of inflammation in coronary plaque disruption. *Circulation* Vol.89 (1994) S.503-505
16. Cai W, Vosschulte R, Afsah-Hedjri A, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Schaper W, Schaper J. Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis. *J Mol Cell Cardiol* Vol.32 (2000) S.997-1011
17. Cai WJ, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Luo X, Schaper W, Schaper J. Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* Vol.284 (2003) S.31-40
18. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Tsang ML. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* Vol.271 (1996) S.3154-3162
19. Cao Y, Ji WR, Qi P, Rosin A, Cao Y. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* Vol.235 (1997) S.493-498
20. Carmeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am J Physiol* Vol.5 (1997) S.H2091-H2104
21. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* Vol.7 (2001) S.575-583

22. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* Vol.4 (2000) S.389-395
23. 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 placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* Vol.271 (1996) S.17629-17634
24. Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, Fleet C, Tritsarlis K, Dissing S, Leboulch P, Cao Y. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* Vol.1 (2002) S.99-108
25. Fauser C, Ullisch EV, Kübler W, Haller C. Differential effects of radiocontrast agents on human umbilical vein endothelial cells: cytotoxicity and modulators of thrombogenicity. *Eur J Med Res* Vol.6 (2001) S.465-472
26. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* Vol.12 (1999) S.1359-1364
27. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* Vol.9 (2003) S.669-676
28. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS* Vol.79 (1997) S.1-8
29. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* Vol.1 (1995) S.27-30
30. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitmann ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* Vol.376 (1995) S.66-70

31. Fox KA, Goodman SG, Klein W, Brieger D, Steg PG, Dabbous O, Avezum A. Management of acute coronary syndromes. Variations in practice and outcome; findings from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Eur Heart J* Vol.15 (2002) S.1177-1189
32. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol* Vol.165 (2000) S.2798-2808
33. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* Vol.53 (2002) S.31-47
34. Gallucci RM, Simeonova PP, Matheson JM, Kommineni C, Guriel JL, Sugawara T, Luster MI. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *FASEB J* Vol.14 (2000) S.2525-2531
35. Ganz T. Macrophage function. *New Horiz* Vol.1 (1993) S.23-27
36. Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, Neufeld G. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem* Vol.275 (2000) S.18040-18045
37. Green CJ, Lichtlen P, Huynh NT, Yanovsky M, Laderoute KR, Schaffner W, Murphy BJ. Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor-1. *Cancer Res* Vol.61 (2001) S.2696-2703
38. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* Vol.86 (1996) S.353-364
39. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH Jr, Heimovitz H, Cohen HJ, Wallace R. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med* Vol.106 (1999) S.506-512

40. Hasdai D, Behar S, Wallentin L, Danchin N, Gitt AK, Boersma E, Fioretti PM, Simoons ML, Battler A. A prospective survey of the characteristics, treatments and outcomes of patients with acute coronary syndromes in Europe and the Mediterranean basin; the Euro Heart Survey of Acute Coronary Syndromes (Euro Heart Survey ACS). *Eur Heart J* Vol.23 (2002) S.1190-1201
41. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* Vol.193 (2001) S.1005-1014
42. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitariano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* Vol.97 (2001) S.3354-3360
43. Hauser S, Weich HA. A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors* Vol.9 (1993) S.259-268
44. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* Vol.349 (1997) S.462-466
45. Heeschen C, Dimmeler S, Fichtlscherer S, Hamm CW, Berger J, Simoons ML, Zeiher AM; CAPTURE Investigators. Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain. *JAMA* Vol.291 (2004) S.435-441
46. Heinrich MC, Kuhlmann MK, Kohlbacher S, Scheer M, Grgic A, Heckmann MB, Uder M. Cytotoxicity of iodinated and gadolinium-based contrast agents in renal tubular cells at angiographic concentrations: in vitro study. *Radiology* Vol.242 (2007) S.425-434

47. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* Vol.284 (1999) S.1994-1998
48. Huang K, Andersson C, Roomans GM, Ito N, Claesson-Welsh L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and-2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol* Vol.33 (2001) S.315-324
49. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath ES. Expression of vascular endothelial growth factor receptor in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* Vol.188 (2001) S.359-368
50. Iwama H, Uemura S, Naya N, Imagawa K, Takemoto Y, Asai O, Onoue K, Okayama S, Somekawa S, Kida Y, Takeda Y, Nakatani K, Takaoka M, Kawata H, Horii M, Nakajima T, Doi N, Saito Y. Cardiac expression of placental growth factor predicts the Improvement of chronic phase left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* Vol.47 (2006) S.1559-1567
51. Iyer S, Leonidas DD, Swaminathan GJ, Maglione D, Battisti M, Tucci M, Persico MG, Acharya KR. The crystal structure of human placenta growth factor-1 (PlGF-1), an angiogenic protein, at 2.0 Å resolution. *J Biol Chem* Vol.276 (2001) S.12153-12161
52. Jugdutt BI. Effect of reperfusion on ventricular mass, topography, and function during healing of anterior infarction. *Am J Physiol* Vol.3 (1997) S.H1205-H1211
53. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res* Vol.86 (2000) S.1198-1202
54. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg* Vol.70 (2000) S.829-834

55. Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer HG, Löwel H, Döring A, Hutchinson WL, Pepys MB. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* Vol.99 (1999) S.237-242
56. Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Sci* Vol.108 (2005) S.205-213
57. Kukielka GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins HK, Michael LH, et al. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* Vol.95 (1995) S.89-103
58. Laerum F. Acute damage to human endothelial cells by brief exposure to contrast media *in vitro*. *Radiology* Vol.147 (1983) S.681-684
59. Late Assessment of Thrombolytic Efficacy (LATE) study with alteplase 6-24 hours after onset of acute myocardial infarction. *Lancet* Vol.342 (1993) S.759-766
60. Leary AG, Ikebuchi K, Hirai Y, Wong GG, Yang YC, Clark SC, Ogawa M. Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. *Blood* Vol.71 (1988) S.1759-1763
61. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* Vol. 343 (2000) S.626-633
62. Lenderink T, Heeschen C, Fichtlscherer S, Dimmeler S, Hamm CW, Zeiher AM, Simoons ML, Boersma E; CAPTURE Investigators. Elevated placental growth factor levels are associated with adverse outcomes at four-year follow-up in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* Vol.47 (2006) S.307-311

63. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* Vol.246 (1989) S.1306-1309
64. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* Vol.270 (1996) S.H1803-H1811
65. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* Vol.420 (2002) S.868-874
66. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* Vol.331 (1994) S.417-424
67. Lutun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med* Vol.12 (2002) S.88-96
68. Lutun 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* Vol.979 (2002) S.80-93
69. Lutun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt-1. *Nat Med* Vol.8 (2002) S.831-840
70. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* Vol.7 (2001) S.1194–1201

71. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol.88 (1991) S.9267-9271
72. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, Del Vecchio S, Lei KJ, Chou JY, Persico MG. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* Vol.8 (1993) S.925-931
73. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* Vol.6 (1992) S.2591-2599
74. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol.88 (1991) S.9026-9030
75. Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, Baumann H, Neufeld G. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* Vol.273 (1998) S.22272-22278
76. Mitola S, Sozzani S, Luini W, Primo L, Borsatti A, Weich H, Bussolino F. Tat-human immunodeficiency virus-1 induces human monocyte chemotaxis by activation of vascular endothelial growth factor receptor-1. *Blood* Vol.90 (1997) S.1365-1372
77. Mohammed KA, Nasreen N, Tepper RS, Antony VB. Cyclic stretch induces PlGF expression in bronchial airway epithelial cells via nitric oxide release. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* Vol.292 (2007) S.L559-566
78. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann NY Acad Sci* Vol.938 (2001) S.36-45

79. Nakamura T, Funayama H, Kubo N, Yasu T, Kawakami M, Momomura SI, Ishikawa SE. Elevation of plasma placental growth factor in patients with ischemic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2008 [Epub ahead of print]
80. Ortéga N, Jonca F, Vincent S, Favard C, Ruchoux MM, Plouët J. Systemic activation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/flk-1 selectively triggers endothelial cells with an angiogenic phenotype. *Am J Pathol* Vol.151 (1997) S.1215-1224
81. Ott I, Neumann FJ, Kenngott S, Gawaz M, Schömig A. Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* Vol.82 (1998) S.938-942
82. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vitro* and *in vivo*, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* Vol.269 (1994) S.25646-25654
83. Parvez Z, Khan T, Moncada R. Ultrastructural changes in rat aortic endothelium during contrast media infusion. *Invest Radiol* Vol.20 (1985) S.407-412
84. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* Vol.95 (2000) S.952-958
85. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure expression and receptor-binding properties of placental growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* Vol.237 (1999) S.31-40

86. Qureshi NR, den Heijer P, Crijns HJ. Percutaneous coronary angioscopic comparison of thrombus formation during percutaneous coronary angioplasty with ionic and nonionic low osmolality contrast media in unstable angina. *Am J Cardiol* Vol.80 (1997) S.700-704
87. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* Vol.105 (2000) S.17-19
88. Reimer KA, Vander Heide RS, Richard VJ. Reperfusion in acute myocardial infarction: effect of timing and modulating factors in experimental models. *Am J Cardiol* Vol.72 (1993) S.13G-21G
89. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* Vol.98 (1998) S.731-733
90. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* Vol.101 (2000) S.1767-1772
91. Roberts R, DeMello V, Sobel BE. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation* Vol.53 (1976) S.204-206
92. Rosati G. Clinical pharmacology of iomeprol. *Eur J Radiol* Vol.18 (1994) S.51-60
93. Rosenzweig A. Endothelial progenitor cells. *N Engl J Med* Vol.348 (2003) S.581-582
94. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* Vol.97 (2001) S.785-791
95. Schaper W. Angiogenesis in the adult heart. *Basic Res Cardiol* Vol.86 (1991) S.51-56

96. Schick CS, Haller C. Comparative cytotoxicity of ionic and non-ionic radiocontrast agents on MDCK cell monolayers in vitro. *Nephrol Dial Transplant* Vol.14 (1999) S.342-347
97. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* Vol.219 (1983) S.983-985
98. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* Vol.376 (1995) S.62-66
99. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* Vol.92 (1998) S.362-367
100. Statistisches Bundesamt Deutschland. Todesursachen in Deutschland 2007. (<http://www.destatis.de>) Stand: Dezember 2008
101. Sung JM, Shu GH, Tsai JC, Huang JJ. Radiocontrast media induced endothelin-1 mRNA expression and peptide release in porcine aortic endothelial cells. *J Formos Med Assoc* Vol.94 (1995) S.77-86
102. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* Vol.5 (1999) S.434-438
103. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* Vol.65 (2005) S.550-563
104. Tarnow L, Astrup AS, Parving HH. Elevated placental growth factor (PlGF) predicts cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* Vol.240 (2005) S.73-79

105. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* Vol.187 (1992) S.1579-1586
106. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* Vol.332 (1995) S.635-641
107. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA. Vascular endothelial growth factor: A new member of the platelet derived growth factor gene family. *Bioch Biophys Res Comm* Vol.165 (1989) S.1198-1206
108. 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* Vol.89 (1994) S.36-44
109. Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ Res* Vol.83 (1998) S.832-840
110. Weihrauch D, Arras M, Zimmermann R, Schaper J. Importance of monocytes/macrophages and fibroblasts for healing of micronecrosis in porcine myocardium. *Moll Cell Biochem* Vol.147 (1995) S.13-19
111. Werner GS, Jandt E, Krack A, Schwarz G, Mutschke O, Kuethe F, Ferrari M, Figulla HR. Growth factors in the collateral circulation of chronic total coronary occlusions: relation to duration of occlusion and collateral function. *Circulation* Vol.110 (2004) S.1940-1945

112. Wong GG, Witek-Giannotti JS, Temple PA, Kriz R, Ferenz C, Hewick RM, Clark SC, Ikebuchi K, Ogawa M. Stimulation of murine hemopoietic colony formation by human IL-6. *J Immunol* Vol.140 (1988) S.3040-3044
113. Xu L, Cochran DM, Tong RT, Winkler F, Kashiwagi S, Jain RK, Fukumura D. Placenta growth factor overexpression inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis by depleting vascular endothelial growth factor homodimers in orthotopic mouse models. *Cancer Res* Vol.66 (2006) S.3971-3977
114. Zachary I, Glick G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* Vol.49 (2001) S.568-581

10. Publikationen

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. *Eur Heart J* Vol.27 (2006) S.1032-1037

Steppich BA, **Kaufmann J**, Sepp D, Kunert K, Rutz T, Stratz C, Ott I. Increased circulating Placental growth factor during percutaneous coronary intervention is associated with applied radio contrast agent. *Coron Artery Dis* Vol.20 (2009) S.130-137

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jan Heinrich Kaufmann
Geburtsdatum: 1. August 1977
Geburtsort: München

Schulausbildung und Zivildienst

1984 bis 1998: Grundschule und Gymnasium
Juni 1998: Abitur am LSH Ising am Chiemsee
1998 bis 1999: Zivildienst in der Krankenpflege des Krankenhauses
Bethanien in Hamburg, Fachkrankenhaus für Geriatrie

Studium

Oktober 1999 bis
September 2002: Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
August 2001: Ärztliche Vorprüfung
August 2002: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ab Oktober 2002: Studium der Humanmedizin an der TU München
März 2005: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ab April 2005: Praktisches Jahr
Mai 2006: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als
Arzt

Praktisches Jahr

1. Tertial: Innere Medizin im Krankenhaus München Bogenhausen, 2.
Medizinische Abteilung, Gastroenterologie
2. Tertial: Chirurgie im Concord Repatriation General Hospital, University
of Sydney, Australien
3. Tertial: Wahlfach Anästhesie im Klinikum rechts der Isar, München

Beruflicher Werdegang

Seit November 2006: Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin/Kardiologie des
Deutschen Herzzentrums Berlin

12. Danksagungen

Ich möchte mich insbesondere bei Frau Prof. Dr. med. Ilka Ott für die Überlassung des spannenden Themas, die Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit und für die engagierte Betreuung bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen Annette Stobbe und Birgit Campbell, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Mitdoktoranden Dominik Sepp für die produktive Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung bedanken, durch die viele Schwierigkeiten bei der Fertigstellung dieser Arbeit überwunden werden konnten.