Aus der Medizinischen Universitätsklinik und

Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III

(Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

Interaktion zwischen Thrombozyten und CD34-positiven Zellen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Florian Franz Pfaff

aus

Aschaffenburg

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz
2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schlensak

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis 4

II. Abkürzungsverzeichnis 6

1. Einleitung 8
1.1.1 Bedeutung der Thrombozyten bei kardiovaskulären Erkrankungen 9
1.1.2 Bedeutung der Thrombozyten bei der Regeneration von Gewebe 12
1.2 Expression von CD34-Antigen auf Zelloberflächen 13
1.2.1 Zirkulierende Progenitorzellen 13
1.2.2 Mobilisation und Differenzierung von Progenitorzellen 15
1.2.2.1 Einfluss von Thrombozyten auf zirkulierende Progenitorzellen .. 16
1.2.2.2 Einfluss von Faktoren auf die Zahl der zirkulierenden Progenitorzellen 17
1.3 Krankheitsbilder 19
1.3.1 Stabile Angina pectoris (stable effort angina, SEA, SA, SAP) 19
1.3.2 Akutes Koronarsyndrom (Acute coronary syndrome, ACS, AKS) 20
1.4 Zielsetzung 22

2 Material und Methoden 24
2.1 Studienablauf 24
2.2 Koronarangiographie 25
2.3 Blutentnahme 26
2.4 Aufbereitung der Blutproben 26
2.5 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) 29
2.5.1 Theoretische Grundlage 29
2.5.2 Praktische Durchführung 31
2.6 Datenauswertung 32

3 Ergebnisse 34
3.1 Daten der Patientenkohorte 34
3.2 CD34-positive und CD34/CD42b-positive Zellen bei Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) und akutem Koronarsyndrom (ACS)..... 39
3.3 CD34/CD42b-positive Zellen, Laborparameter und kardiovaskuläre Risikofaktoren bei Patienten mit SAP und ACS 41

4 Diskussion 47
4.1 Anzahl der CD34-positive Zellen bei Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) und akutem Koronarsyndrom (ACS) 47
4.2 Nachweis von CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen..... 47
4.3 Anzahl der CD34/CD42b-positiven Zellenaggregationen bei Patienten mit ACS und SAP 48
4.4 CD34/CD42b-positive Zelleaggregationen, kardiovaskuläre Risikofaktoren und Medikation 49
4.5 Reparaturmechanismus oder Arteriosklerose 53

5 Zusammenfassung 54

6 Literaturverzeichnis 56

7 Danksagung 69

8 Appendix 70
8.1 Tabellen und Abbildungen..... 70
8.2 Publikationen..... 72
8.3 Lebenslauf..... 74

II. Abkürzungsverzeichnis

ACC = American college of cardiology
ACS = Akutes Koronarsyndrom (acute coronary syndrom)
ADP = Adenosindiphosphat
AHA = American heart association
CD40L = CD40-Ligand
CD62P = P-Selectin
CPC = Zirkulierende Progenitorzelle (circulating progenitor cell)
CHPC = Zirkulierende hämatopoetische Progenitorzelle
(circulating haematopoietic progenitor cell)
CHSC = Zirkulierende hämatopoetische Stammzelle
(circulating haematopoietic stem cell)
Col = Kollagen (Collagen)
CXCL12 = SDF-1 = stromal-derived factor-1
CRP = C-reaktives Protein
EPC = Endotheliale Progenitorzelle (endothelial progenitor cell)
FACS = Durchflusszytometrie
(flourescence-activated cell sorter = flow cytometer)
Fg = Fibrinogen
Flk-1 = VEGFR2 = vascular endothelial growth factor receptor 2
HPC = Hämatopoetische Progenitorzelle (haematopoietic progenitor cell)
HSC = Hämatopoetische Stammzelle (haematopoietic stem cell)
IAP = Instabile Angina pectoris = UA = UAP
ICAM-1 = Intercellular adhesion molecule-1
IGF = Insulinähnliche Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor)
IL-1β = Interleukin-1β
G-CSF = Granulozytenkolonie stimulierender Faktor
(granulocyte-colony-stimulating factor)
GPIbα = Glycoprotein Ibα
GPIIA-IIIB = Glycoprotein IIA-IIIB
KDR = Menschliches VEGFR2 (human VEGFR2)

LDL = Low density lipoprotein
LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MCP-1 = Monocyte chemoattractant protein-1
MFI = mittlere Fluoreszenzintensität
MMP = Matrix metalloproteinase
NSTEMI = Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt
(non-ST-elevating myocardial infarction)
NT-proBNP = N-terminales pro brain natriuretic peptide
P-Selectin = CD62P
PBS = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCI = Perkutane Koronarangiographie (percutane coronary angiography)
PDGF = Platelet-derived growth factor
PF4 = Thrombozytäre Faktor 4 (Platelet factor 4)
PFA = Paraformaldehyd
PSGL-1 = P-selectin glycoprotein ligand-1
RANTES = “Regulated on activation, normal T expressed and secreted”
Rpm = Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SA = Stable angina = SAP
SAP = Stabile Angina pectoris = SA
SD = Standarddifferenz = Standardabweichung
SDF-1 = Stromal-derived factor-1
STEMI = ST-Streckenhebungsinfarkt (ST-elevating myocardial infarction)
TIMI = Thrombolysis in myocardial Infarction
TropI = Troponin I
TropT = Troponin T
UA = Unstable angina = IAP = UAP
UAP = Unstabl angina pectoris = UA = IAP
VEGF = Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR2 = Vascular endothelial growth factor receptor 2 = Flk-1
vWF = Von Willebrand-Faktor

1 Einleitung

Weltweit sind kardiovaskuläre Erkrankungen, trotz aller Fortschritte im Bereich der Diagnostik und Therapie, in Bezug auf ihre Morbidität und Mortalität führend [WHO-Bericht 2012]. Dies gilt im Besonderen für die westlichen Industriestaaten, zeigt aber auch in anderen Teilen der Welt eine rasche Zunahme [WHO 2012].
In Deutschland ist das akute Koronarsyndrom mit 150.000 Toten im Jahr 2008 die häufigste Todesursache [Allender 2008], wobei die prähospitale Mortalität des akuten Myokardinfarkts trotz des sehr guten öffentlichen Rettungsdienstsystems in Deutschland bereits bei 37 % liegt [Schiff 2005].
Vielen kardiovaskulären Erkrankungen liegt die Arteriosklerose zu Grunde [Hamm 2011, Classen 2005]. Die weiterführende Erforschung neuer Therapieansätze bei einem akuten Koronarsyndrom, als auch die Prävention der Arteriosklerose und infolgedessen des akuten Koronarsyndroms, ist somit imminent. Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine chronisch inflammatorische und systemische Gefäßerkrankung, die einer endothelialen Dysfunktion und Schädigung gleichzusetzen ist [Hamm 2011, George 2004]. Frühere Forschungen sind davon ausgegangen, dass als alleiniger Reparaturmechanismus des geschädigten Endothels eine Proliferation der ansässigen Endothelzellen verantwortlich ist, jedoch ist dies bisher nur unvollständig geklärt [Pelchev 2000].

Die in dieser Arbeit behandelten Krankheitsbilder, die stabile Angina pectoris (SAP), sowie das akute Koronarsyndrom (ACS) werden in Kapitel 1.3 genauer betrachtet.

1.1.1 Bedeutung der Thrombozyten bei kardiovaskulären Erkrankungen

Thrombozyten stellen eine wichtige Schnittstelle zwischen Entzündung, Thrombenbildung und Atherogenese dar, folglich eine Grundlage zum Verständnis des Pathomechanismus der kardiovaskulären Erkrankungen [Gawaz 2005].

Die Bindung von Thrombozyten an Schäden des vaskulären Endothels ist als erster Schritt der Blutgerinnung und somit der Bildung eines Thrombus zu sehen [Bigalke 2012, Gawaz 2005, 1999]. Der Pathomechanismus, sowie die vaskulären und zellulären Folgen sollen im Weiteren dargestellt werden.

Eine Bindung von Thrombozyten findet bei unversehrtem Endothel und regulärem Blutfluss normalerweise nicht statt (Abbildung 1.1 A) [Gawaz 2005]. Eine Schädigung des Endothels führt jedoch zu einer Offenlegung des Subendothels und somit zur Expression von Kollagen (Col) und des von Willebrand-Faktors (vWF) in den Intravasalraum [Massberg 2003]. Hierdurch können Thrombozyten über die Kollagenrezeptoren Glycoprotein Ib und VI (GPIb, GPVI) an vWF und Kollagen binden (Abbildung 1.1 B+C) [Gawaz 1999]. Dies führt zu einer Aktivierung der Thrombozyten und zur Freisetzung von thrombozytären Faktoren, wodurch eine Rekrutierung und Bindung weiterer Thrombozyten stattfindet (Abbildung 1.1 D, E) [Stakos 2012]. Die Bindung der Thrombozyten erfolgt über Glycoprotein IIA-IIIB (GPII-IIIA) [Gawaz 2005, 1999]. Die weitere Gerinnungskaskade erfolgt über die Aktivierung von Prothrombin über Thrombin zum langkettigen Endprodukt Fibrin (Abbildung 1.1 F) [Gawaz 2004, 1999].

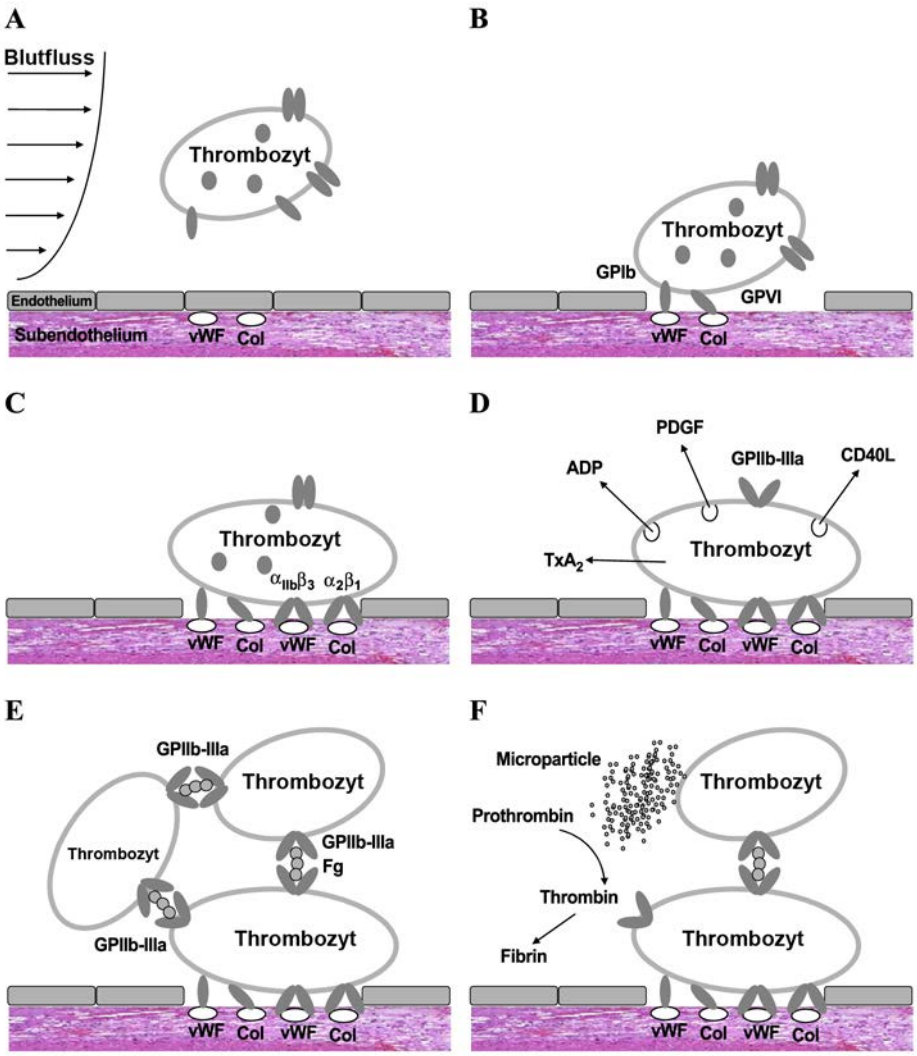


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion an Endothelschädigungen (modifiziert nach Gawaz 1999); vWF: von Willebrand-Faktor; GPIb, GPVI, GPII-IIIA: jeweils Glycoprotein Ib, VI, IIA-IIIB; Col: Kollagen

Der beschriebene primäre Gerinnungsmechanismus ist auch für die Atherogenese und Inflammation von Bedeutung [Sopova 2012, Boring 1998]. Die adherenten Thrombozyten sezernieren thrombozytengebundenes SDF-1 [Jin 2006, Langer 2006, de Boer 2006, Stellos 2008], P-Selectin [de Boer 2006, Massberg 2006, Langer 2006] und CD40L [Gawaz 2005]. Diese proinflammatorischen und mitogenischen Mediatoren lösen eine chemotaktische Mobilisation [Rafii 2008, Stein 2008] und Steuerung der

Leukozyten, hierunter auch Monozyten, in Richtung geschädigten Endothels aus [Dernbach 2008] (Abbildung 1.2).

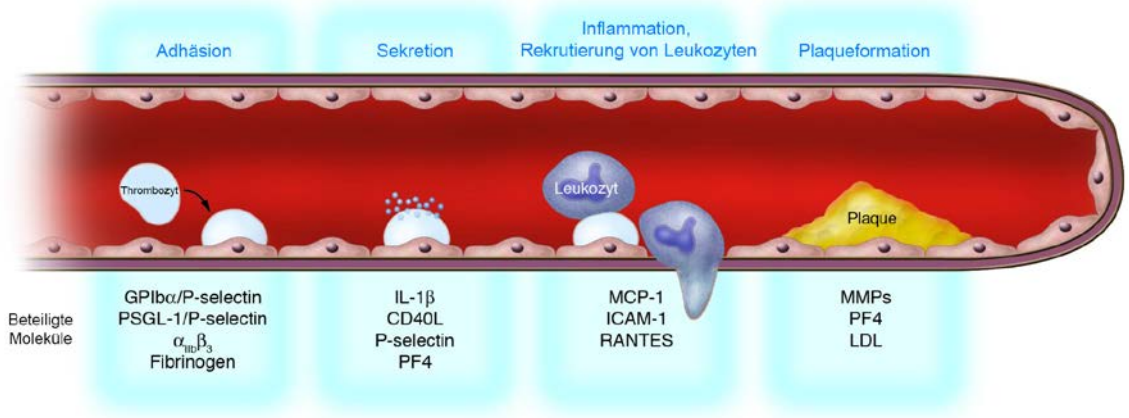


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Atherogenese (modifiziert nach Gawaz 2005); GPIbα: Glycoprotein Ibα, PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1, IL-1β: Interleukin-1β, PF4: Platelet factor 4, MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1, ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1, RANTES: acronym (Regulated on activation, normal T expressed and secreted), MMPs: Matrix metalloproteinase, LDL: Low density lipoprotein

Es wird vermutet, dass weitere Leukozyten durch thrombozyteneigene Faktoren zur Anlagerung und Entzündungsreaktion veranlasst werden [Henn 1998]. Diese Leukozyten beginnnen durch die Gefäßwand zu migrieren und die Bildung von Schaumzellen anzuregen [Seizer 2010, Daub 2007, Gawaz 2005]. Die Einlagerung von Lipiden, Makrophagen, T-Zellen und Lymphozyten in diesem Entzündungsbereich führt schließlich zur Bildung von atherosklerotischen Plaques [George 2004, Rogers 1996, Classen 2005], die das Gefäßlumen verengen, den Blutfluss behindern und schließlich rupturieren können.

1.1.2 Bedeutung der Thrombozyten bei der Regeneration von Gewebe

Auch im Rahmen der Geweberegeneration sind Thrombozyten von entscheidender Bedeutung. Zirkulierende Thrombozyten schütten neben den in Kapitel 1.1.1 genannten Mediatoren auch Faktoren der Angiogenese aus, hierbei sind SDF-1, der thrombozytäre Faktor 4 (Platelet factor 4), der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), sowie der insulinähnliche Wachstumsfaktor (IGF) zu nennen [Stellos 2008, Oike 2003]. Diese beeinflussen die Reparatur des Gewebes [Gawaz 2005, Spencer 1993].

Lesurtel et al. [2006] wies nach, dass Thrombozyten über Serotonin bei normothermer Ischämie des Lebergewebes bei Mäusen zu einer Regeneration beitragen und dass Tiere mit reduzierter Thrombozytenzahl eine signifikant niedrigere Regeneration aufweisen.

Zusätzlich zu den freigesetzten Faktoren von Thrombozyten ist bekannt, dass diese über thrombozytenabhängige Mediatoren, wie die Lysophosphatide, eine entscheidende Rolle in der Angiogenese mittels Freisetzung, Mobilisierung und Chemotaktion von endothelialen Zellen spielen und die Umwandlung dieser in kapillarähnliche Strukturen beeinflussen [Dimmeler 2005]

Darüber hinaus interagieren Thrombozyten in vitro mit Progenitorzellen [Daub 2006, Langer 2006, Massberg 2006].

Diese Interaktion ist von Bedeutung, da Forschungsarbeiten der letzten Jahre zeigten, dass im peripheren Blut zirkulierende CD34-positive Progenitorzellen, die eine Subpopulation der Leukozyten darstellen, einen entscheidenden Beitrag zur Wiederherstellung geschädigten Endothels leisten können [Stellos 2008, Belonje 2008, Turan 2007]. Darüber hinaus tragen zirkulierenden Progenitorzellen bei der Reparatur der Gefäße, sowie der Neovaskularisation bei [Asahara T 1997, Takahashi 1999, Turan 2007].

1.2 Expression von CD34-Antigen auf Zelloberflächen

In der postnatalen Lebensphase werden durch das Knochenmark weiterhin Stammzellen gebildet [Pelchev 2000], wobei nicht alle Stammzellen das Oberflächenantigen CD34 ausbilden [Smart 2008]. Boilson et al [2008] gehen davon aus, dass sich CD34-positive Knochenmarksstammzellen zu Hämangioplasten entwickeln und diese sich schließlich in Progenitorzellen differenzieren. Die Ausbildung dieses Oberflächenantigens charakterisiert eine heterogene Population von Stamm- bzw. Vorläuferzellen (Progenitorzellen) [Massa 2005]. Ein kleiner Teil dieser Zellen zirkuliert im peripheren Blut [Massa 2005, Pelchev 2000]. Grundmann et al. [2007] geben an, dass etwa 0,03% der Leukozyten für CD34 positiv sein sollen und somit 0,002% der mononuklären Zellen ausmachen.

1.2.1 Zirkulierende Progenitorzellen

Zirkulierende Progenitorzellen können nach den ISHAGE-Kriterien eingeteilt werden, indem sowohl die Größe der einzelnen Zellen, ihre Granulation, sowie die Präsentation von CD34 und CD45 Antigenen auf der Zelloberfläche klassifiziert werden [Grundmann 2007]. Nach Numaguchi et al. [2006] und Leone et al. [2006] befindet sich der Ursprung der zirkulierenden Progenitorzellen im Knochenmark.

Die messbaren Zellpopulationen, die für das CD34 Antigen positiv sind, enthalten sowohl endotheliale als auch hämatopoetische Progenitorzellen [Boilson 2008, Pelchev 2000, Leone 2006]. Darüber hinaus werden weitere Unterscheidungen der Zell(sub-)populationen, sowie deren Expression von Antigenen beschrieben [Charwat 2008, Stein 2008], wobei nicht alle bekannten Oberflächenantigene in dieser vorliegenden Studie berücksichtigt wurden. Zudem erfolgen teils gegensätzliche Angaben durch verschiedene Autoren in der aktuellen Literatur. Im Folgenden werden die wichtigsten Zellpopulationen beschrieben.

Endotheliale Progenitorzellen exprimieren im undifferenzierten Stadium die Antigene CD34, CD45, CD133, VEGFR2, c-kit, CD144, Sca-1 [Smart 2008, Grundmann 2007, Boislon 2008, Stellos 2008]. Nach Turan et al. [2007] und Massa et al. [2005] verlieren sie im Rahmen ihrer Differenzierung die Antigenexpression des CD133. Generell weisen endotheliale Progenitorzellen (EPCs) die Fähigkeit auf nichthämatopoetisches Gewebe wiederherstellen zu können [Lee 2006, Ince 2005, Stellos 2008]. Endotheliale Progenitorzellen regenerieren vaskuläres Endothel während des gesamten Lebens [Asahara 1997, Endtmann 2011, Keyman 2008, Werner 2005, de Boer 2006], jedoch besonders nach stattgehabter Schädigung, wie es durch Asahara et al. [1997] im Mausmodel und durch Ince et al. [2005] nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren beschrieb Asahara et al. [1997] hierbei, dass die CD34-positive Zellen während der Differenzierung CD45 als Antigen verlieren können.

Hämatopoetische Progenitorzellen (HPCs) exprimieren im undifferenzierten Stadium die Antigene CD34 und im geringen Maße CD45 sowie CD133 [Smart 2008, Rafii 2008, Turan 2007]. Entsprechend der EPCs, verlieren sie im Rahmen ihrer Differenzierung die Expression des Antigens CD133 [Pelchev 2000, Yamada 2007].
Hämatopoetische Progenitorzellen tragen zur Regeneration von Gefäßen und zur Neovaskularisation bei [Langer 2010, Rafii 2008, Roccio 2008]. Dies gilt sowohl im postnatalen Leben, als auch für die Revaskularisation nach einem stattgehabten akuten Myokardinfarkt [Urbich 2004, Werner 2005]. Darüber hinaus beschreiben Roccio et al. [2008] und Yamada et al. [2007], dass sich diese Zellpopulation, in vitro, auch zu Kardiomyozyten differenzieren kann. Auch eine Beteiligung an der Ausbildung von Tumoren ist auf Grund der Neovaskularisation als sehr wahrscheinlich anzunehmen [Rafii 2008].
Eine vollständige Klärung der möglichen Fähigkeiten der hämatopoetischen Progenitorzellen ist aktuell noch nicht erbracht. Bisher konnte in vitro, als auch durch in vivo Studien, die Hypothese gestellt werden, dass diese zirkulierenden Progenitorzellen zu den Bereichen vaskulärer Läsionen rekrutiert werden und

dort zu endotheliale Zellen differenzieren können [Dernbach 2008, Langer, 2007, Pelchev 2000].
Leone et al. [2006], Numaguchi et al. [2006] und Yeh et al. [2003] postulieren, dass zirkulierende Progenitorzellen an einer vaskulären Regeneration, auch der Koronararterien, beteiligt sind. Unterstützt wird diese These durch Studien, die nachweisen konnten, dass zirkulierende Progenitorzellen einen Einfluss auf den klinischen Verlauf von Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) haben [Werner 2005, Urbich 2004]. Zirkulierende Progenitorzellen sind hierbei bei Patienten nach einem akuten Myokardinfarkt (AMI) gegenüber Patientem mit stabiler Angina pectoris (SAP) erhöht [Grundmann 2007, Massa 2005]. Darüberhinaus war ein erhöhter Spiegel an CD34-positiven Zellen bei Patienten mit AMI mit einem erniedrigten Risiko an kardiovaskulären Ereignissen zu versterben, assoziiert [Werner 2005]. Es zeigte sich weiterhin, dass eine hohe Anzahl von CD34-positiven Zelle im peripheren Blut nach einem stattgehabten Myokardinfarkt zu einem verbesserten Wiederaufbau und einer Verminderung des Remodellings führen [Leone 2006, Wojkowski 2006, Belonje 2008, Werner 2005]. Dies führt auch zu einer Reduktion der residuellen Infarktgröße mit einer verminderten Bildung von Narbengewebe [Stellos 2008, Charwat 2008].
Des Weiteren tragen Progenitorzellen zur Neovaskularisation und Vaskulogenese im postnatalen Lebensabschnitt bei [Stein 2008, Massa 2005, Werner 2005, Daub 2006].

1.2.2 Mobilisation und Differenzierung von Progenitorzellen

Progenitorzellen werden aus dem Knochenmark zu ischämischen Bereichen mobilisiert [Pelchev 2000, Werner 2005, Stein 2008]. Ince et al. [2005] postulieren, dass im Tierversuch 23% der CD34-positiven Progenitorzellen innerhalb von 24 Stunden zum ischämischen Bereich des Herzens wandern.
Bisher wurden mehrere Faktoren identifiziert, die die Mobilisierung und Rekrutierung von Progenitorzellen beeinflussen [Stellos 2008, Jin 2006]. Diese werden nachfolgend beschrieben.

1.2.2.1 Einfluss von Thrombozyten auf zirkulierende Progenitorzellen

In den letzten Jahren wurde zunehmend die Rolle der Thrombozyten bei der endothelialen und vaskulären Regeneration sowie bei der Entstehung der Ateriosklerose diskutiert [Stellos 2008, Gawaz 2008, Daub 2006]. Urbich et al. [2004] konnten nachweisen, dass Thrombozyten eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung, Adhäsion und der Differenzierung von zirkulierenden Progenitorzellen spielen. Die genauen Mechanismen sind jedoch nur unvollständig verstanden.

In vitro zeigte sich, dass Thrombozyten durch ihre Mediatoren zu einer Veränderung des Adhärenz- und chemotaktischen Verhaltens von Progenitorzellen führen können [Stellos 2013, Jin 2006, Dernbach 2008, da Costa 2006]. Für P-Selectin konnte in vitro gezeigt werden, dass aktivierte Thrombozyten zu einer verbesserten Adhäsion von Progenitorzellen führen [Langer 2006]. Daub et al. [2006] und Stellos et al. [2010] konnten außerdem zeigen, dass diese Differenzierung der CD34-positiven Progenitorzellen jedoch auch zu Makrophagen und in Verbindung mit Lipiden zu Schaumzellen führen kann [Stellos 2008]. Zusätzlich erhöhen aktivierte Thrombozyten in vitro das Überleben von endothelialen Progenitorzellen [Stellos 2008, de Boer 2006].

Auch das thrombozyten-gebundene SDF-1 zeigte in vitro eine Verbesserung der Adhäsion der CD34-positiven Zellen [Stellos 2008, Stellos 2007]. Weiterhin bildet SDF-1 einen wichtigen Faktor der enzymatisch gesteuerten Differenzierung von CD34-positiven Zellen in Endothelzellen [Stellos 2008].

In vivo konnte bereits eine Interaktion zwischen Thrombozyten und Progenitorzellen nachgewiesen werden [Langer 2006, Stellos 2008, Daub 2006]. Eine Veränderung der Mobilisierung der Progenitorzellen des Knochenmarks konnte durch eine Erhöhung der im peripheren Blut zirkulierenden Progenitorzellen vor allem für SDF-1 beschrieben werden [Stellos 2009, Wurster 2011, Wurster 2012]. Dieses Ergebnis könnte eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit und somit einen Reparaturmechanismus darstellen, jedoch ist dies bisher nicht vollständig geklärt [Stellos 2009]

1.2.2.2 Einfluss von Faktoren auf die Zahl der zirkulierenden Progenitorzellen

Die Anzahl der CD34-positiven Progenitorzellen, die im peripheren Blut zirkulieren, wird durch Risikofaktoren, Alter, chronische und akute Erkrankungen sowie weiterer Faktoren beeinflusst, wie es im Folgenden beschrieben wird.

Eine Erhöhung der CD34-positiven Zellen ist bei einer Sichelzellanämie mit akuter Krise [Martin 2008, Pelchev 2000], einem akuten Koronarsyndrom mit kardialer Dekompensation [Leone 2006], primärer und sekundärer pulmonalarterieller Hypertonie und systemischer Arteriosklerose nachweisbar [Martin 2008].

Wie schon zuvor beschrieben werden Progenitorzellen nach einem akuten Myokardinfarkt (AMI) mobilisiert [Turan 2007, Wojkowski 2006, Shintani 2001, George 2004]. Hierbei konnte beobachtet werden, dass Patienten, die zuvor als gesund galten im Durchschnitt einen höheren Anstieg an Progenitorzellen hatten, als Patienten mit einer bekannten koronaren Herzerkrankung (KHK) [Grundmann 2007]. Der Spitzenwert der CD34-positiven Progenitorzellen nach AMI konnte zwischen dem fünften [Leone 2005] und dem siebten Tag [Massa 2005, Shintani 2001] ermittelt werden und normalisierte sich innerhalb von zwei Monaten [Massa 2005]. Turan et al. [2007] beschrieben eine Korrelation zwischen der Größe des myokardialen Infarkts und dem Anstieg der CD34-positiven Zellen im Blut.

Eine Erniedrigung der CD34-positiven Zellen konnte bei KHK und deren Risikofaktoren nachgewiesen werden [Boilson 2008, Martin 2008, Langer 2007]. Vor allem für den Nikotinkonsum, die arterielle Hypertonie und die Hyperlipidämie ergaben sich eindeutige Ergebnisse [Massa 2005, George 2004]. Auch ein fortgeschrittenes Alter senkte die Anzahl der Progenitorzellen im Blut [Turan 2007]. Endtmann et al. Veröffentlichte, dass, dass Angiotensin-II-Antagonisten einen negativen Einfluss auf die Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen haben [Endtmann 2011].

Diabetes mellitus und ein chronischer Nikotinkonsum haben auch einen negativen Einfluss auf die Adhäsion und Differenzierung der zirkulierenden Progenitorzellen (CPCs) [Numaguchi 2006, George 2004, Stellos 2008].

Stromal-derived factor-1 (SDF-1) ist sowohl dafür verantwortlich, dass sich im Knochenmark befindliche Stammzellen zu CPCs differenzieren [Stellos 2008], als auch, dass diese differenzierten Progenitorzellen zu den Bereichen der endothelialen Schädigung, bzw. des ischämischen Areals wandern [Stellos 2008, Dernbach 2008, Langer 2007]. Nach Massa et al. [2005] und Leone et al. [2006] erhöht lokal injiziertes SDF-1 die Migration von CD34-positiven Progenitorzellen zur Injektionsstelle. Desweiteren beschreibt Stellos et al. [2008], dass nach einem AMI eine Hochregulierung des SDF-1 im Blut stattfindet.

Als weiterer Faktor konnte nachgewiesen werden, dass CD34-positive Zellen direkt mit dem Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte-colony-stimulating-factor, G-CSF) korrelierten [Ince 2005, Deng 2006]. Ein Therapieversuch mit zusätzlicher Gabe von G-CSF, beschrieben durch Ripa et al. [2008], zeigte bei Patienten mit AMI jedoch nicht den gewünschten Therapieerfolg. Bruno et al. [2006] setzten den Tag der maximalen Stimulation durch G-CSF auf Tag drei bis Tag fünf nach dem ischämischen Ereignis fest. Als weitere positiv korrelierende Faktoren konnten Vascular endothelial growth factor 2 (VEGF2) [Shintani 2001, George 2004], SCF [Leone 2006] und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion [Wojkowski 2006] beschrieben werden.

Eine negative Korrelation der CD34-positiven Zellanzahl konnte für N-terminales pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP)- und den TroponinT-Plasmaspiegel nachgewiesen werden [Wojkowski 2006].

Jedoch zeigte sich keine Korrelation für die CK- [Shintani 2001, Leone 2005] oder CK/CK-MB-Plasmaspiegel [Wojkowski 2006].

1.3 Krankheitsbilder

Die in Kapitel 1.1 beschriebenen Veränderungen der Gefäßwand verursachen eine geringere Elastizität der Gefäße und führen besonders bei größerer Ausdehnung des Plaques zu einer Flusshinderung und Flussveränderung des Blutes sowie zu prokoagulatorischen Prozessen [Laufs 2005, Libby 2001, Ross 1999]. Diese pathologischen Gefäßveränderungen finden sich bei kardiologischen Patienten im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung wieder.
Innerhalb dieser Arbeit werden Patientendaten mit definierten Krankheitsbildern verglichen. Im Folgenden wird eine kurze Zusammenfassung der Hauptkrankheitsbilder (die stabile Angina pectoris, SAP) und das akute Koronarsyndrom, ACS)) und deren genaueren Einteilungen (die instabile Angina pectoris, IAP), ST-segment elevating myocardial infarction (ST-Streckenhebungsinfarkt, STEMI) und non-ST-segment elevating myocardial infarktion (nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt, NSTEMI) gegeben.
Als Literatur dienen die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie [DGK 2011] und die European society of cardiology [Hamm 2011], sowie die Deutsche Gesellschaft für Kardiologie und Herz- und Kreislaufforschung e.V.

1.3.1 Stabile Angina pectoris (stable effort angina, SEA, SA, SAP)

Nach der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK 2011) und Hamm et al. [2011] stellt die stabile Angina pectoris eine Symptomklassifikation und einen Symptomkomplex dar, der das klinische Erscheinungsbild von Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung (KHK) und somit atheriosklerotischen Plaques in den Koronararterien beschreibt. Das Hauptsymptom ist die namesgebende „Brustenge“, die oft auch als Brustschmerz beschrieben wird. Ausstrahlungen des Schmerzes in beide Arme, zwischen die Schulterblätter und in das Epigastrium sind möglich, weshalb die Missdeutung der Symptomatik als gastroösophageale Refluxbeschwerden oder Rückenschmerzen nicht auszuschließen ist.

Ein asymptomatischer Verlauf der KHK kann selbst bei einer 90% Stenose einer Koronararterie vorliegen, weshalb die Diagnosestellung der KHK oftmals ein Zufallsbefund sein kann und der Verlauf über Jahrzehnte erfolgt [Hahn 2003].

Die Stadieneinteilung erfolgt modifiziert nach der CCS-Klassifikation (Canadian Cardiovascular Society) und beruht auf der Arbeit von Campeau [1976]:

Grad 0: Stumme Ischämie (keine Beschwerden), keine Beeinträchtigung des Alltagslebens

Grad 1: Pectanginöse Beschwerden nur bei schwerer körperlicher Anstrengung, keine Beeinträchtigung des Alltagslebens

Grad 2: Pectanginöse Beschwerden bei mittlerer körperlicher Anstrengung (Treppensteigen, psychischer Stress), geringe Beeinträchtigung des Alltagslebens bei normaler körperlicher Belastung

Grad 3: Pectanginöse Beschwerden bei leichter körperlicher Anstrengung, starke Beeinträchtigung des Alltagslebens bei normaler körperlicher Belastung

Grad 4: Pectanginöse Beschwerden bei minimaler körperlicher Anstrengung oder in Ruhe, kein beschwerdefreies Alltagslebens möglich

1.3.2 Akutes Koronarsyndrom (Acute coronary syndrome, ACS, AKS)

Das akute Koronarsyndrom stellt eine akute Myokardischämie dar, der pathophysiologisch eine Ruptur oder oberflächliche Erosion eines atheriosklerotischen Plaque zu Grunde liegt [Hamm 2011, Herold 2011, Classen 2005]. Analog zur stabilen Angina pectoris entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Herzens. Im Gegensatz zur stabilen Angina pectoris ist die Symptomatik nicht ausschließlich belastungsabhängig und es finden sich zusätzlich EKG-Veränderungen im Sinne deszendierender ST-Segmente oder präterminaler T-Negativierungen (instabile Angina pectoris). Bei ST-Streckenhebungsinfarkten zeigt sich die namensgebende ST-Streckenveränderung [Hamm 2011, Hamm 2004, Braunwald 1989].

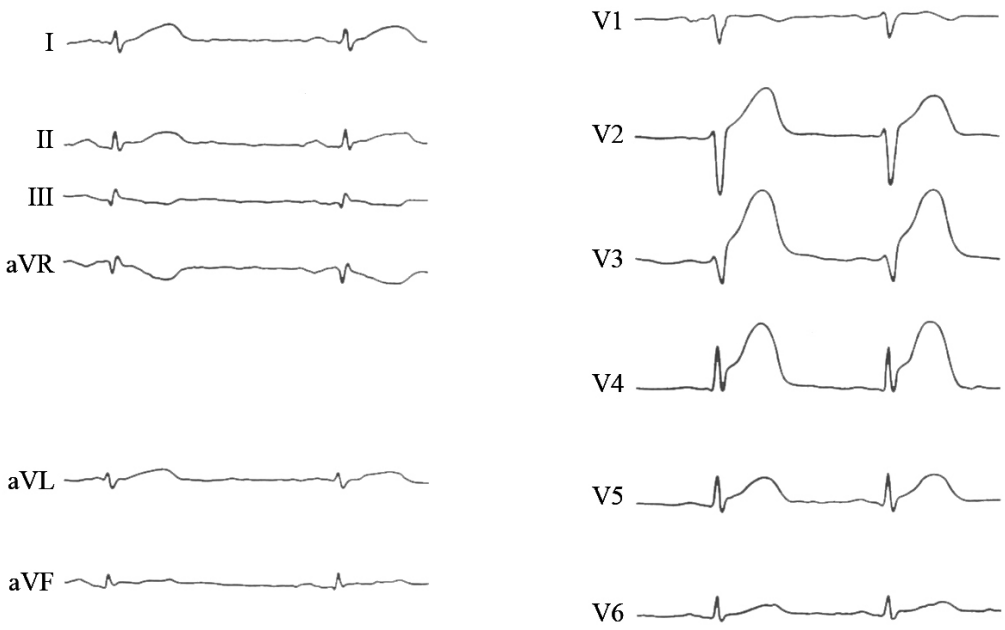


Abbildung 1.2: Beispiel eines ST-Streckenhebungsinfarkts (Vorderwand) aus Classen et al. [2005]

Die klinische Symptomatik schwankt hierbei stark zwischen stummer Myokardischämie und der typischen Angina pectoris Symptomatik mit Ausstrahlungen, starker psychischer Erregung bis zur Todesangst, sowie akuter kardiolen Dekompensation mit kardialem Schock [Herold 2011, Classen 2005].
Die Einteilung des akuten Koronarsyndroms erfolgt nach Symptomatik, Laborparameter (Herzenzyme) und EKG-Diagnostik wie es in Abbildung 1.3 durch die Einteilung nach Hamm et al. [2011, 2004] dargestellt wird. Der wichtigste Laborparameter bleibt, zusammen mit CK/CK-MB, das Troponin (I und T), welches einen spezifischen Marker für Myokardnekrosen darstellt [Hamm 2011, Herold 2011]. In der innerklinischen Medizin ist die Koronarangiographie weiterhin der Goldstandard zur Sicherung endgültiger Diagnosen sowie der minimalinvasiven Intervention bei ACS [Bates 2012].

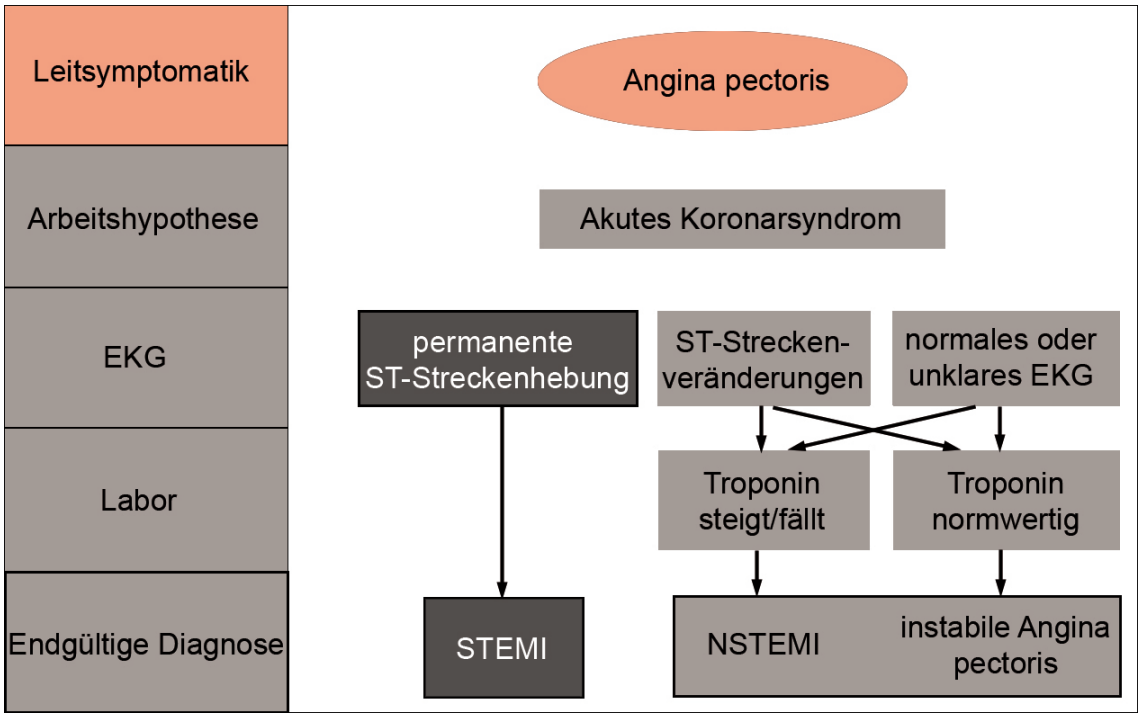


Abbildung 1.3: Einteilung des akuten Koronarsyndroms (modifiziert nach Hamm et al. [Hamm 2011])

Als Risikofaktoren für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen sind sowohl beeinflussbare Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Adipositas, arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum und psychische Belastung bekannt, darüber hinaus sind nicht veränderliche Risikofaktoren vorhanden wie Alter, Geschlecht und eine erbliche Veranlagung [Libby 2001, Classen 2005, Greenland 2002].

1.4 Zielsetzung

Zirkulierende Progenitorzellen tragen zur Reparatur des geschädigten Endothels bei [Urbich 2004, Yeh 2003]. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Zellpopulation nach einem akuten Ereignis, wie einem akuten Myokardinfarkt, erhöht ist [Leone 2006, Grundmann 2007].

In vitro konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten zu einer verbesserten Adhäsion von CD34-positiven Progenitorzellen an endothelialem Gewebe führen, als dies für solitäre Progenitorzellen der Fall ist [Stellos 2013, 2008]. Darüber hinaus haben Thrombozyten einen Einfluss auf die Mobilisierung und Differenzierung von zirkulierenden Progenitorzellen [Stellos 2010, Daub 2006].
Ziel dieser Arbeit ist der erstmalige Nachweis von Zellaggregationen zwischen zirkulierenden Progenitorzellen und Thrombozyten bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Eine durch Thrombozyten vermittelte Interaktion mit CD34-positiven Progenitorzellen konnte bisher nur in vitro nachgewiesen werden [Stellos 2008]. Entsprechend den Untersuchungen zu CD34-positiven Zellen soll weiterhin geklärt werden, ob das Krankheitsbild der stabilen Angina pectoris oder des akuten Koronarsyndroms einen Einfluss auf die Anzahl dieser Zellaggregationen hat. Auch sollen Korrelationen zwischen Risikofaktoren und der Anzahl dieser Zellaggregationen ermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Studienablauf

Es wurden Blutproben von insgesamt 278 Patienten gesammelt und innerhalb der ersten Stunde nach dem Protokoll der in 2.4 beschriebenen Immunfloureszenzfärbung behandelt und ausgewertet.
Insgesamt nahmen 116 Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP), sowie 162 Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom (ACS) an der Studie teil. Innerhalb der Patientengruppe mit ACS waren 28 Patienten mit einer instabilen Angina pectoris (IAP, UAP), 90 Patienten mit einem Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI) und 44 Patienten mit einem ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI). Die Patienten mit SAP zeigten die typischen Symptome, beziehungsweise zeigten einen pathologischen Belastungstest und es konnte laborchemisch keine Erhöhung der Marker für eine kardiale Ischämie (Troponin, CK/CK-MB) nachgewiesen werden. Die Studiengruppe, bestehend aus 162 Patienten, mit einem akuten Koronarsyndrom (ACS) wurde über die Notaufnahme umgehend der perkutanen Koronarangiographie (PCI) zugewiesen. Die PCI erfolgte innerhalb von sechs Stunden nach Einlieferung in die Klinik.
Als Ausschlusskriterien galten ein Alter unter 18 Jahren, sowie eine Ablehnung der Teilnahme an der Studie. Patientenbezogene Daten inklusive aktueller Medikation, Vorerkrankungen und kardiovaskuläre Risikofaktoren wurden gesammelt, ausgewertet und sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.
Die vollständige Auswertungstabelle befindet sich im Ergebnisteil. Eine tabellarische Aufstellung des verwendeten Materials und der Hersteller befindet sich in Tabelle 8.1 im Appendix. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt und alle Studienteilnehmer haben ihre schriftliche Einverständniserklärung erteilt.

2.2 Koronarangiographie

Alle Patienten unterzogen sich einer Koronarangiographie. Je nach Krankheitsbild und Krankheitsverlauf wurde die Koronarangiographie elektiv oder als Notfall durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Leitlinien der ACC/AHA für perkutane Koronarangiographien [Scanlon 1999].

Während der Koronarangiographie wurde nach der „Thrombolysis-in-myocardial-Infarction-Classifikation“ (TIMI Fluss-Klassifikation, TIMI grade flow), die unter anderem von Anderson et al. [1993] und Yoshida et al. [1993] beschrieben wurde, der Perfusionsgrad der Koronararterie bestimmt. Die TIMI-Klassifikation stellt eine Einteilung des Kontrastmittelflusses in der dargestellten Koronararterie nach einem Punktesystem von null bis drei dar. Die Einteilung ist tabellarisch in Tabelle 2.1 dargestellt.

Weiterhin erfolgte die Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion mittels Lävokardiographie nach Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, beschrieben nach Hamm et al. [2008].

Tabelle 2.1: TIMI-Fluss-Klassifikation (TIMI grade flow), modifiziert nach Antmann [2000]

TIMI-Fluss-Klassifikation (TIMI grade flow)	
TIMI 0	distal der Stenose kein Kontrastmittelfluss nachweisbar
TIMI 1	unvollständige Füllung des poststenotisches Koronargefäßes mit partiellem Kontrastmittelfluss
TIMI 2	vollständige Füllung des poststenotisches Koronargefäßes mit verzögertem An- und Abstrom des Kontrastmittels
TIMI 3	normaler Fluss des Kontrastmittels mit unauffällig Koronararterienfüllung

2.3 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen erfolgte aus dem zur Koronarangiographie gelegten Arteria femoralis – Katheter (Schleuse), direkt nach Anlage. Bei 278 Patienten erfolgte eine Entnahme von zwei 10 ml Citrat-S-Monovetten® (1:10) (Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland). Bei einer Subpopulation von 170 Patienten erfolgte zusätzlich die Entnahme einer 8,5 ml CPDA-S-Monovetten (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland).

2.4 Aufbereitung der Blutproben

Die Aufbereitung der Blutproben zur Bestimmung der CD34-positiven, sowie CD42b-positiven Zellen, wurde nach Werner et al. [2005] und BD Bioscience [2007] modifiziert.

Jeweils 10 ml des gewonnenen Citratblutes wurden langsam aus der jeweiligen S-Monovetten in einen 50 ml konischen Zentrifugationsbehälter, BD Falcon (Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA), mittels steriler Einmalpipette (Cole-Parmer, Illinois, USA) überführt. Anschließend wurden 20 ml sterile Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) zugegeben und das Citratblut darin gelöst. In zwei neue 50 ml Falcons wurden zur Trennung der unterschiedlichen Zellschichten jeweils 20 ml Ficoll-Paque-Plus-Lösung (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England) gegeben. Jeweils 30 ml des in PBS gelösten Vollblutes wurden mit Hilfe einer sterilen Pipette auf die Ficoll-Schicht im 50 ml Falcon aufgegeben. Um ein optimales Zentrifugationsergebnis zu erzielen, mußte darauf geachtet werden, dass es zu keiner Vermischung der Schichten kam. Die beiden Falcons wurden anschließend mit 2100 rpm für 20 Minuten ohne Bremsen zentrifugiert. Hierfür stand eine Zentrifuge, Multifuge 1s (Haereus, DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, England) zur Verfügung. Nach der Zentrifugation entstand die in Abbildung 2.1 schematisch dargestellte Schichtung, in der mononukläre Zellen

und damit auch die gesuchten CD34-positive Zellen als gräuliche Bande zu finden waren.

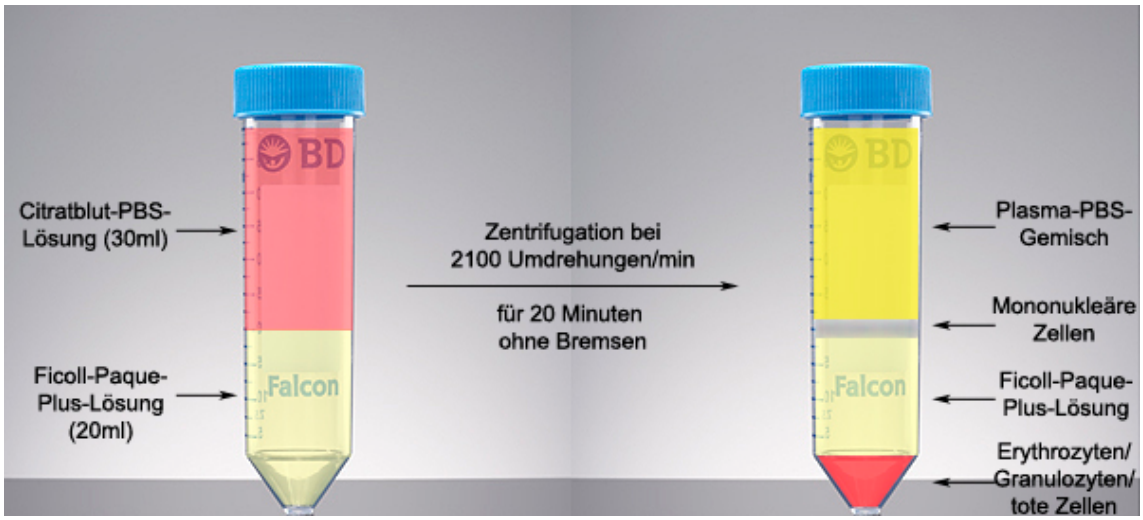


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Zellschichtseparation auf Grund der Dichtegradienten im Ficoll-Paque-Plus-Lösungs-Ansatz

Die mononukleäre Zellschicht wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 50 ml Ficoll-Behältnis überführt. Nun folgten zwei Waschschritte mit PBS. Hierzu wurde die abpipettierte Zellschicht mit PBS auf 50ml aufgefüllt und mit 1600 rpm für 10 Minuten, mit Bremsen, zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, das Pallett mit 50 ml PBS gelöst und der oben genannte Waschschritt mit Lösung und Zentrifugation wiederholt. Nach dem zweiten Waschschritt und dem Abschütten des Überstandes, wurde die gereinigte mononukleäre Zellschicht in 1 ml PBS gelöst. 20 µl der Lösung wurden in ein Eppendorf-Cup pipettiert und mit 180 µl PBS auf ein Gesamtvolumen von 200 µl verdünnt, wodurch eine genauere Messung der Zellzahl erreicht werden konnte. Dieses Gemisch wurde dem Zellzähler SYSMEX KX-21N (Sysmex Corporation, Hyogo, Japan) zugeführt, wodurch die Zellzahl pro Mikroliter bestimmt wurde. Für die nachfolgende FACS-Analyse wurden pro Ansatz eine Million mononukleäre Zellen benötigt und mittels Dreisatz errechnet.

Nach der Ermittlung des notwendigen Volumens der ursprünglichen Lösung wurden pro Patient insgesamt vier FACS-Röhrchen mit jeweils 5 ml Volumen (Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA) zur Analyse vorbereitet. In jedes FACS-Röhrchen wurde mittels einer Eppendorf-Pipettierhilfe (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) die errechnete Menge an Zelllösung gegeben. Dieses Volumen wurde jeweils auf 100 µl mit PBS aufgefüllt. Alle FACS-Röhrchen wurden mit der Patientennummer und den verwendeten Antikörpern beschriftet. Nun wurden in das erste und zweite Röhrchen laut Herstellerangaben [BD Bioscience 2007] 12 µl CD34+-FITC-Mouse-Anti-Human-Antikörper (Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA; Klon 8G12) pipettiert, sowie 12 µl CD42b+-PE-Mouse-Anti-Human-Antikörper (Immunotech, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA; Klon SZ2). In Röhrchen drei und vier wurden entsprechend der Isotypkontrollen Mouse-IgG1-FITC (Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA; Klon MOPC-21) sowie Mouse-IgG1-PE Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA; Klon X40) zugegeben. Ein doppelter Versuchsansatz wurde gewählt, um bei geringer Zellpopulation Durchschnittswerte für die genauere Ergebnissermittlung zu bestimmen (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Versuchsansatz Antikörper

FACS-Röhrchen	Zellen	Antikörper 1	Antikörper 2
Nr 1	10^6 Zellen in 100µl	CD34-FITC	CD42b-PE
Nr 2	10^6 Zellen in 100µl	CD34-FITC	CD42b-PE
Nr 3	10^6 Zellen in 100µl	IgG1-FITC	IgG1-PE
Nr 4	10^6 Zellen in 100µl	IgG1-FITC	IgG1-PE

Anschließend wurden die FACS-Röhrchen laut Herstellerangaben für 30 Minuten im Dunklen inkubiert, so dass kein Verlust der Leuchtfähigkeit der verschiedenen Antikörper eintreten konnte. Nach der Inkubationszeit wurde 1ml

PBS zugegeben, die Lösung gevortext, anschließend mit 1200 rpm für 5 Minuten mit Bremsen zentrifugiert und der Überstand schließlich abgeschüttet, um die nicht gebundenen Antikörper möglichst aus der Zelllösung zu entfernen. Markierte Zellen wurden bis zur FACS-Analyse durch die Zugabe von 300 µl Paraformaldehyde (PFA) 0,5% (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und abgedeckt im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die FACS-Analyse erfolgte für alle Proben einmal am Tag.

Die Aufbereitung der Proben der Subpopulation zur Bestimmung der mittleren Fluoreszenzaktivität von CD62p erfolgte durch Gabe von 10 µl Vollblut aus der CPDA-Monovette in 490 µl PBS in einem Eppendorf-Cup. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung. Hierzu wurde, analog zur CD34/CD42b-Färbung, ein FACS-Röhrchen mit der Patientennummer beschriftet und jeweils 35 µl der Vollblutsuspension und 5 µl PBS in ein FACS-Röhrchen pipettiert. In das FACS-Röhrchen wurden nun 5 µl des oben genannten CD42b-PE zur Thrombozytenmarkierung und zusätzlich 5 µl P-Selectin-FITC (CD62P-FITC, Immunotech, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA; Klon CLB-Thromb/6) pipettiert. Nach erfolgter Resuspension erfolgte die Fixierung und Aufbewahrung analog zu CD34/CD42b-Färbung.

2.5 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

2.5.1 Theoretische Grundlage

Die Durchflusszytometrie (flow-cytometry, FACS-Analyse = fluorescence activated cell sorter) ist eine effektive Methode zur Identifizierung von einzelnen Zellen innerhalb einer Zellpopulation [Janeway 2001]. Erstmals wurde diese Methode von Fulwyler im Jahre 1965 beschrieben [Fulwyler 1965].
Die Grundlage zur Identifizierung einzelner Zellen bildet bei der Durchflusszytometrie (FACS) die Zuführung der Zellsuspension über eine Messküvette, in welcher die Zellen in einem Einzelzellfluss durch einen oder

mehrere Laser unterschiedlicher Wellenlänge geführt werden [Janeway 2001]. Verschiedene Lichtdetektoren (Photomultiplier tubes) nehmen hierbei Signale auf und leiten elektrische Impulse an den Auswertungscomputer weiter [Luttmann 2006, Janeway 2001]. Die Detektoren lassen sich in Fluoreszenz- und Nichtfluoreszenzsdetektoren unterscheiden. Der Forward light scatter (FSC, x-Achse) ist mit Hilfe eines Nichtfluoreszenzdetektors in direkter Linie des Laserstrahl angebracht und misst die Größe der jeweiligen Einzelzelle, während der Sideward light scatter (SSC, y-Achse), im rechten Winkel zum Laser platziert ist und ein Maß der Laserstrahlablenkung und somit der Granulation der jeweiligen Einzelzelle darstellt [Janeway 2001, BD Bioscience 2009]. Durch diese beiden Detektoren und die zweidimensionale Auswertung ist es möglich Zellpopulationen zu ermitteln. In dieser Arbeit wurde das Vollblut des Menschen untersucht und es konnten drei Zellpopulationen unterschieden werden: Monozyten, Granulozyten und „Zellschrott“ (siehe Abbildung 8.1 im Appendix).
Innerhalb dieser Populationen kann nun, mittels eines Gates, also eines definierten Bereiches und somit einer definierten Zellpopulation, die weitere immunphänotypische Auswertung erfolgen. Nach [Asahara 1997] ist das Groß der zirkulierenden Progenitorzellen (CD34-positiv) innerhalb der Population der Granulozyten zu detektieren. Hierzu dienen die Fluoreszenzdetektoren, die analog zum FSC und SSC, ein elektrisches Signal an den Auswertungscomputer weiterleiten, sobald diese einen Lichtimpuls einer definierten Wellenlänge aufnehmen [Janeway 2001, BD Bioscience 2009], (siehe Abbildung 2.2). Die Lichtemmisionen erfolgen durch die Antikörperbindung der verwendeten Farbstoffe an den Antigenen der Zelloberflächen [Luttmann 2006]. Eine einzelne Zelle oder ein Zellkonglumerat kann mehrere Antikörper unterschiedlicher Farbmarkierung binden [Luttmann 2006, Janeway 2001]. Verschiedene Farbstoffe stehen zur Verfügung. Diese können jeweils an einen Antikörper konjugiert werden, sodass sich insgesamt eine sehr große Anzahl an möglichen Immunfluoreszenzfärbungskombinationen ergibt. In dieser Arbeit wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC; Emissionsmaximum bei 520 nm) und Phycoerythin (PE; Emissionsmaximum bei 680 nm) verwendet. Darüber hinaus

sind weitere Detektoren mittels Allophycocyanin (APC, Emissionsmaximum bei 660 nm) und Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP, Emissionsmaximum bei 680 nm) möglich.

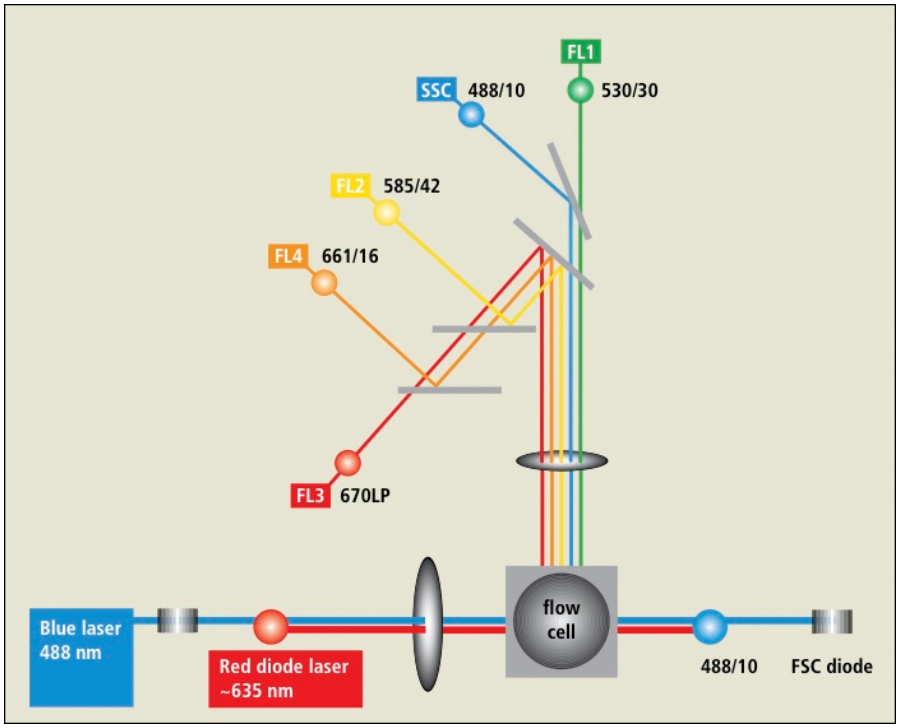


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie [BD Bioscience 2009]

2.5.2 Praktische Durchführung

Das Protokoll der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) erfolgte nach einer Modifizierung der aktuellen Literatur [Asahara 1997, Werner 2005, BD Bioscience 2007].

Gemessen wurde an einem FACSCalibur Baujahr 1995 (Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA) mit einem Powermac G4 (Apple, Cupertino, USA). Die Messsoftware war die zum FACSCalibur gehörende Cellquest pro Version 5.2.1 (Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA).

Vor Beginn jeder Messreihe wurde das FACSCalibur entsprechend den Anforderungen einer Doppelfärbung mit einer Isotypenkontrolle kalibriert. Dies geschah nach Angaben des Herstellers [BD Bioscience 2009]. Die Kalibrierung wurde mit einfach gefärbten Antikörperansätzen, deren Negativkontrollen (IgG1) sowie Doppelfärbungen durchgeführt. Anschließend wurde eine Kompensation nach Herstellerangaben durchgeführt, so dass eine Überlappung der Signale der PE und FITC Antikörper minimiert werden konnte. Die dadurch gewonnenen Einstellungen wurden gespeichert und vor jeder Messung als Voreinstellungen geladen. Somit galten für alle Proben die gleichen Voraussetzungen.
Um eine möglichst homogene Zelllösung zu erhalten, wurden die FACS-Röhrchen vor der Messung kurz gevortext. Bei jeder Probe wurden 250 000 Ereignisse aufgezeichnet, die innerhalb des voreingestellten Fensters oder Gates lagen. Die Daten jeder einzelnen Probe wurden bis zur Auswertung gespeichert.
Analog zur CD34/CD42b-Messung erfolgte die CD62P/CD42b-Messung. Es wurden hierbei 10.000 Ereignisse aufgezeichnet. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) wurden auf einem logarithmischen Histogramm dargestellt.

2.6 Datenauswertung

Die Datenauswertung erfolgte an einem Powermac G4 und G5 (jeweils Apple, Cupertino, USA) mittels der Auswertungssoftware Cellquest pro Version 5.2.1 (Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA).
Die ausgewerteten Daten wurden auf einem PC Pentium 4 (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) mit Windows XP, sowie Microsoft Excel Version 2002 (Microsoft, Redmond, USA) weiterverarbeitet. Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS Version 16.0 (SPSS Inc., Illinois, USA). Stetige Variablen wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung untersucht.

Unterschiede zwischen Mittelwerten von kontinuierlichen Variablen mit Normalverteilung wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben untersucht, während der Mann-Whitney-U-Test der Beurteilung signifikanter Unterschiede diente, wenn keine Normalverteilung vorlag.

Der Vergleich von kategorialen Variablen wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Korrelationen wurden an Hand des Spearman Korrelationskoeffizienten bewertet.

Alle statistischen Tests waren zweiseitig und alle P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Daten der Patientenkohorte

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde konsekutiv bei 278 Patienten die Anzahl der CD34-positiven Progenitorzellen, sowie die Anzahl der Progenitor-Thrombozyten-Zellaggregationen (CD34/CD42b-positiv) untersucht. Des Weiteren wurde der resultierende, prozentuale Anteil der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen an der Gesamtzahl der CD34-positiven Zellpopulation berechnet. Es wurden Patientendaten aufgenommen, die Alter und Geschlecht, kardiovaskuläre Risikofaktoren, sowie die Medikation bei Aufnahme umfassen.

Alle Patienten unterzogen sich einer Koronarangiographie, im Rahmen ihres Krankheitsbildes elektiv oder als Notfall. Hierbei wurde die Diagnose der stabilen Angina pectoris (SAP), bzw. des akuten Koronarsyndroms (ACS) gestellt oder verifiziert und zusätzlich die linksventrikuläre Pumpfunktion (LVEF) mittels Lävokardiographie, sowie die Perfusion der Koronararterien (TIMI-Fluss-Klassifikation) bestimmt. Weiterhin wurden laborchemisch Troponin-I, Creatinkinase (CK) und C-reaktives Protein (CRP) gemessen.

Die Zusammenfassung der Patientendaten findet sich in Tabelle 3.1 wieder. In Abbildung 3.1 bis 3.5 sind die Patientendaten in ihrer Verteilung grafisch dargestellt.

Tabelle 3.1, Teil 1: Patientendaten unterteilt in Grunddaten, Schwere der KHK, linksventrikuläre Pumpfunktion und kardiovaskuläre Risikofaktoren

Patientenkohorte					
	Gesamt	SAP	ACS		
			UAP	NSTEMI	STEMI
Grunddaten					
Anzahl der Patienten (n)	278	116	28	90	44
Alter (Durchschnitt ± Standardabweichung (SD))	66,5 ± 11,8	66,9 ± 8,9	69,3 ± 8,7	66,6 ± 14,2	63,6 ± 14,4
Männer (%)	217 (78,1)	99 (85,3)	20 (71,4)	65 (72,2)	33 (75)
Frauen (%)	61 (21,9)	17(14,7)	8 (28,6)	25 (27,8)	11 (25)
Koronare Angiographie, n (%)					
TIMI Flow score 0	8 (2,9)	2(1,7)	1 (3,6)	3 (3,3)	2 (4,5)
TIMI Flow score 1	49 (17,6)	25 (21,6)	5 (21,4)	10 (11,1)	9 (20,5)
TIMI Flow score 2	110 (39,6)	42 (36,2)	12 (42,9)	40 (44,4)	16 (36,4)
TIMI Flow score 3	111 (39,9)	47 (40,5)	10 (35,7)	37 (41,1)	17 (38,6)
Kalzium score (Durchschnitt ± SD)	13,4 ± 6	13,9 ± 5,8	14,6 ± 6,8	13,4 ± 6,1	11,3 ± 6
LVEF (Laevokardiographie) (Durchschnitt ± SD)	51,9 ± 11,9	53,3 ± 12,1	54,1 ± 9,9	51,2 ± 12,3	48 ± 11,1
Kardiovaskuläre Risikofaktoren, n (%)					
Arterielle Hypertonie	228 (82)	101 (87,1)	24 (85,7)	74 (82,2)	29 (65,9)
Diabetes mellitus (Typ 2)	97 (34,9)	46 (39,7)	7 (25)	33 (36,7)	11 (25)
Adipositas (BMI ± SD)	28 ± 4,2	28,6 ± 4,3	27,9 ± 4	27,5 ± 3,9	27,1 ± 4,7
Hyperlipidämie	195 (70,1)	95 (81,9)	18 (64,3)	56 (62,2)	26 (59,1)
Rauchen	116 (41,7)	50 (43,1)	11 (39,3)	35 (38,9)	20 (45,5)
Positive Familienanamnese (KHK)	62 (22,3)	28 (24,1)	10 (35,7)	15 (16,7)	9 (20,5)

Tabelle 3.1, Teil 2: Patientendaten unterteilt in Medikation und Thrombozytenaktivierung

Patientenkohorte					
	Gesamt	SAP	ACS		
			UAP	NSTEMI	STEMI
Medikation, n (%)					
Aspirin	171 (61,5)	90 (77,6)	21 (75)	41 (45,6)	19 (43,2)
Clopidogrel	87 (31,3)	47 (40,5)	10 (35,7)	20 (22,2)	10 (22,7)
Vitamin-K-Antagonisten	17 (6,1)	7 (6)	2 (7,1)	7 (7,8)	1 (2,3)
GP IIb/IIIa Antagonisten	42 (15,1)	8 (6,9)	4 (14,3)	14 (15,6)	16 (36,4)
β-Blocker	177 (63,7)	91 (78,4)	18 (64,3)	45 (50)	23 (52,3)
ACE-Hemmer	136 (48,9)	70 (60,3)	15 (53,6)	36 (40)	15 (34,1)
AT_1-Rezeptor-Antagonisten	38 (13,7)	19 (16,4)	4 (14,3)	9 (10)	6 (13,6)
Diuretika	97 (34,9)	39 (33,6)	9 (32,1)	36 (40)	13 (29,5)
Aldosteronantagonisten	7 (2,5)	4 (3,4)	0 (0)	3 (3,3)	0 (0)
Statine	135 (48,6)	74 (63,8)	14 (50)	31 (34,4)	16 (36,4)
Thrombozytenaktivierung (n=170, Durchschnitt ± Standardabweichung)					
CD62P Expression (MFI)	15,4 ± 9,7	12,5 ± 7,9	13,3 ± 5,9	17,1 ± 9,9	18,5 ± 11,9
SDF-1/CXCL12 (MFI)	67,2 ± 89	43,8 ± 69,9	49,1 ± 53,7	83,8 ± 114	88,5 ± 66

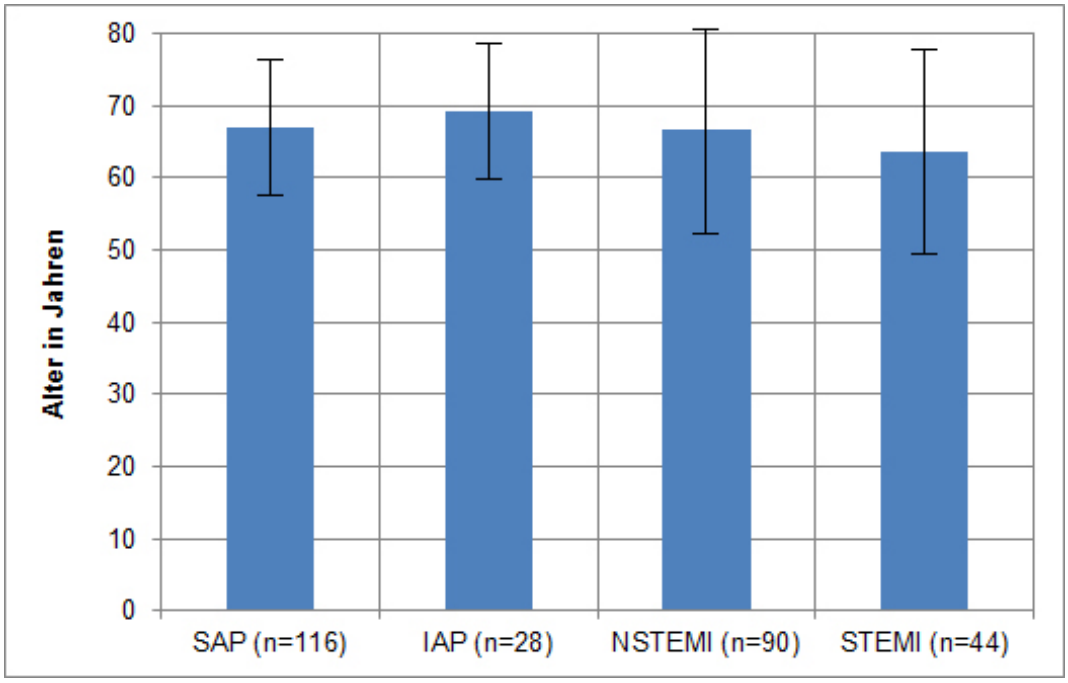


Abbildung 3.1: Durchschnittsalter der untersuchten Patienten in Jahren (± Standarddifferenz (SD))

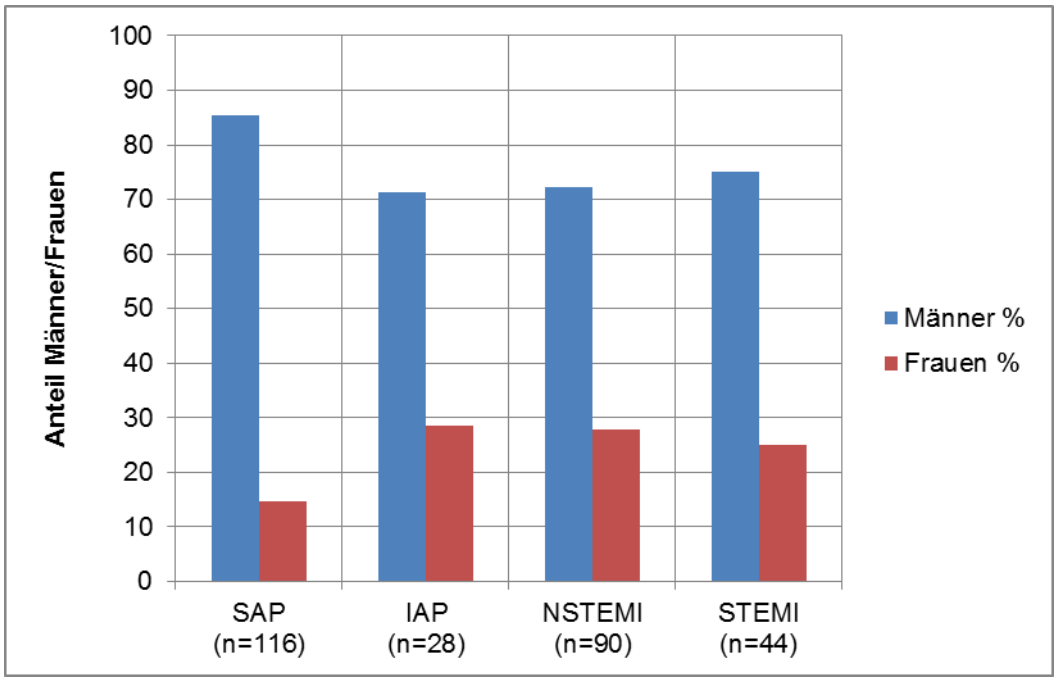


Abbildung 3.2: Prozentuale Geschlechterverteilung der untersuchten Patienten getrennt nach Geschlecht

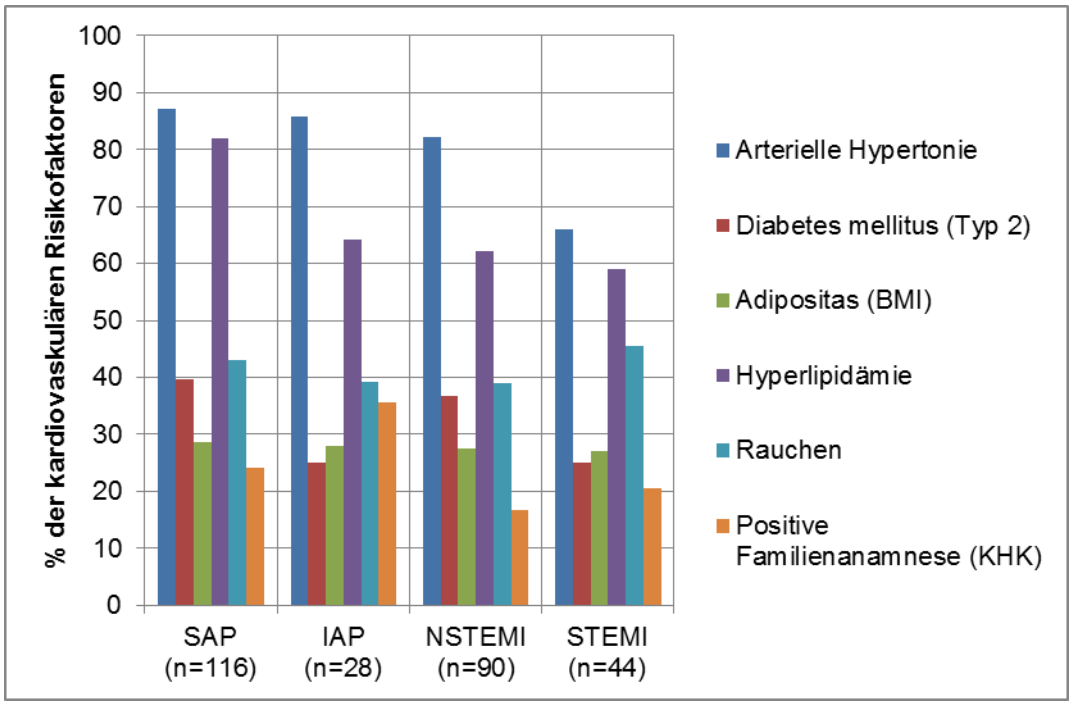


Abbildung 3.3: Kardiovaskuläre Risikofaktoren der untersuchten Patienten in prozentualer Verteilung

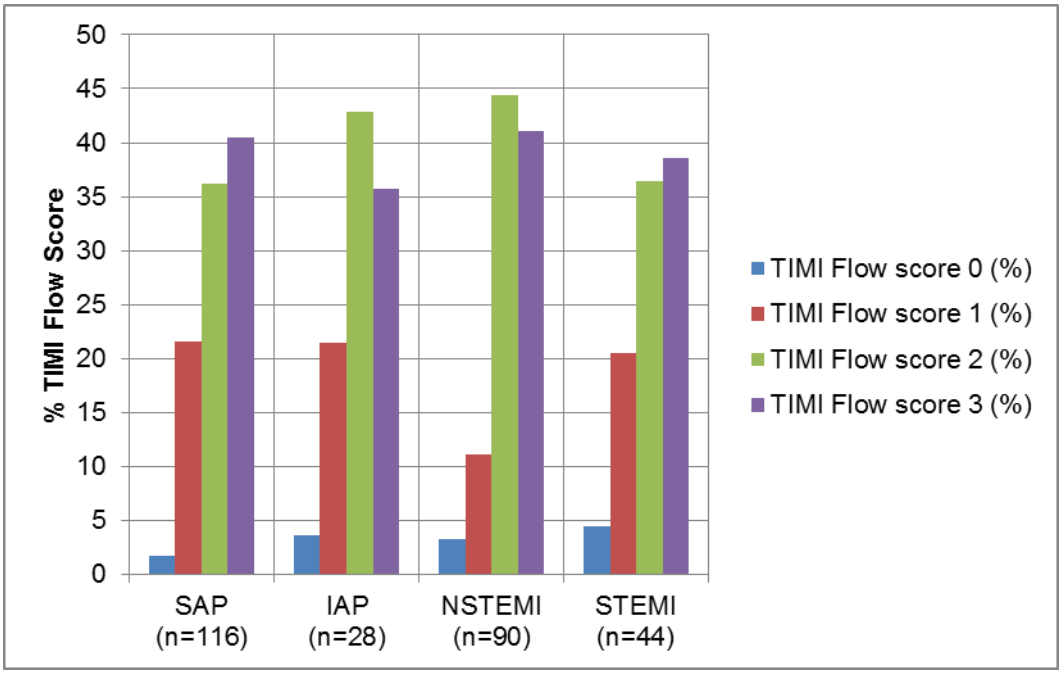


Abbildung 3.4: TIMI-Fluss-Klassifikation (TIMI grade flow) in prozentualer Verteilung

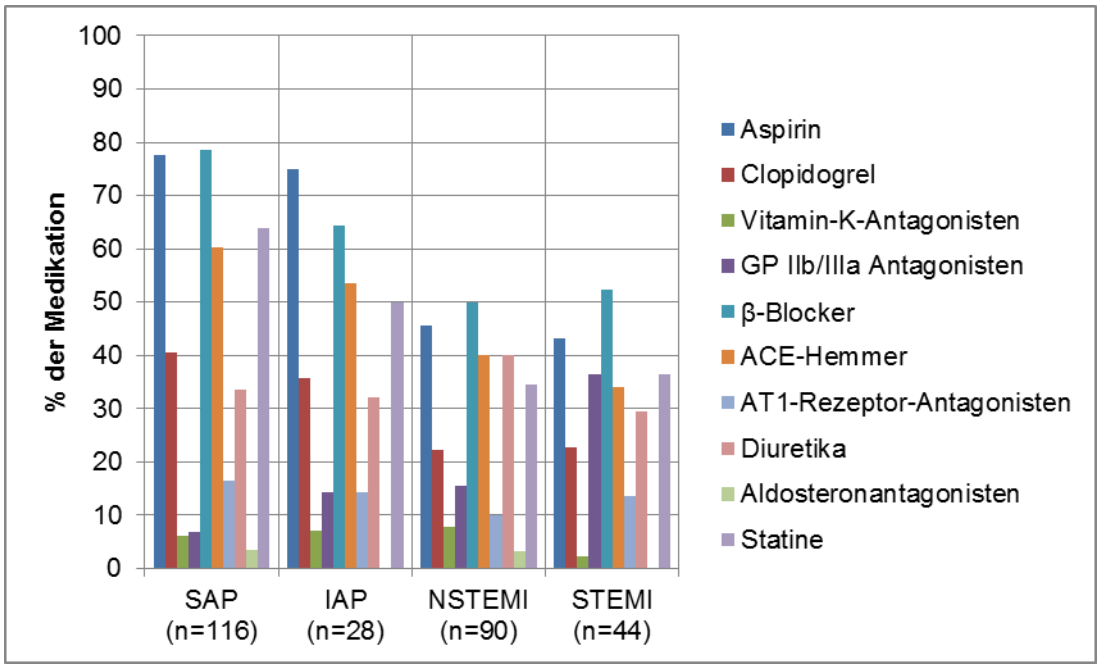


Abbildung 3.5: Medikation bei Aufnahme der untersuchten Patienten in prozentualer Verteilung

3.2 CD34-positive und CD34/CD42b-positive Zellen bei Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) und akutem Koronarsyndrom (ACS)

Über die monoklonalen Antikörper CD34-FITC (Klon 8G12) und CD42b-PE (Klon SZ2) konnte mittels der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) die Anzahl der solitären CD34-positiven, sowie der Zellen, die sowohl für CD34- und CD42b-positiv sind, im peripheren Blut von Patienten mit SAP (n=116) und ACS (n=162), unterteilt in IAP (n=28), NSTEMI (n=90) und STEMI (n=44), bestimmt werden.

Es zeigte sich, dass CD34-positive Zellen bei Patienten mit ACS (P=0,011), besonders bei Patienten mit STEMI (P=0,005), im Vergleich zu Patienten mit SAP signifikant erhöht sind, unabhängig von den kardiovaskulären Risikofaktoren und der bestehenden Medikation (Daten nicht dargestellt). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass im peripheren Blut von

Patienten dieser Studie Zellen zu bestimmen sind, die sowohl CD34- als auch CD42b-positiv sind. Der prozentuale Anteil der CD34/CD42b-positiven Zellen an der Gesamtpopulation der CD34-positiven Zellen konnte bei allen Krankheitsbildern nachgewiesen werden (%CD34/CD42b-positiv: Median (Interquartilsabstand, IQR): SAP: 7,42 (8,19); IAP: 16,45 (14,3); NSTEMI: 16,28 (15,23); STEMI: 25,43 (28,2); P<0,001; Kruskal-Wallis Test, Abbildung 3.6).
Eine Unterteilung der Patienten mit ACS in Subpopulationen mit ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI), Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI) und instabiler Angina pectoris (IAP), zeigte keine signifikanten Unterschiede der CD34-positiven Zellen oder der CD34/CD42b-positiven Zellen untereinander. Jedoch zeigte jede Subpopulation eine Erhöhung der Zellzahlen gegenüber Patienten mit SAP (Daten nicht dargestellt).

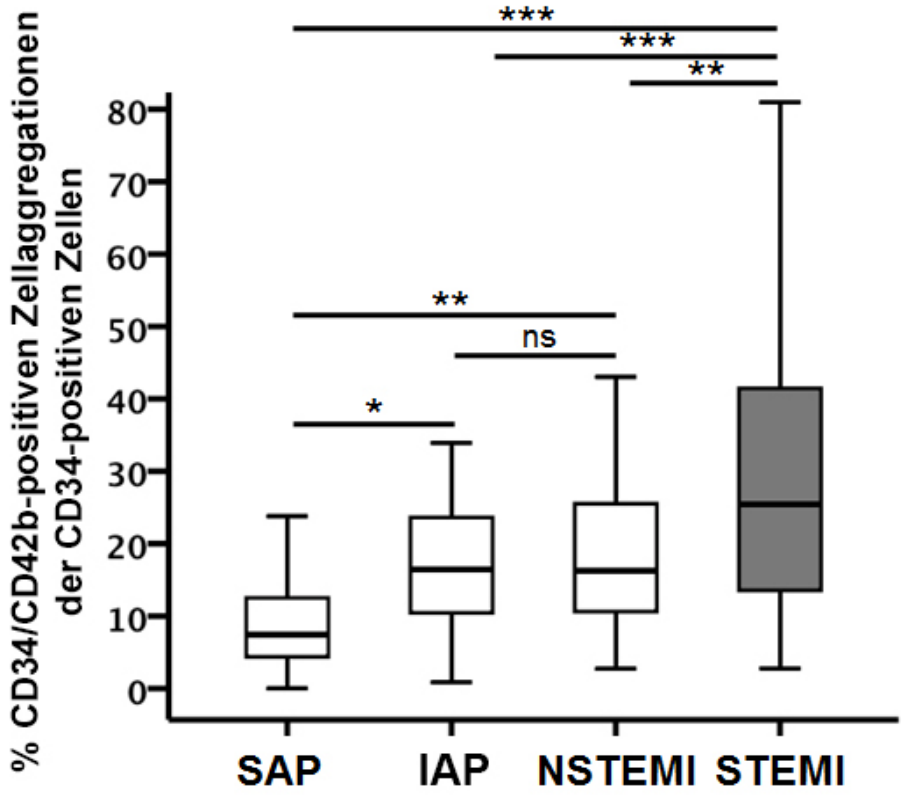


Abbildung 3.6: Prozentualer Anteil der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen der CD34-positiven Zellen bei Patienten mit SAP, IAP, NSTEMI oder STEMI

3.3 CD34/CD42b-positive Zellen, Laborparameter und kardiovaskuläre Risikofaktoren bei Patienten mit SAP und ACS

Bei der statistischen Auswertung wurden die Daten der Patienten ihres Alters, Geschlechts, kardiovaskulären Risikofaktoren, Schwere der koronaren Herzerkrankung (KHK), Laborparameter, sowie ihrer Medikation entsprechend ausgewertet, siehe Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2: Spearman's Rangkorrelationskoeffizient und Kovarianzanalyse der Grunddaten der Patienten mit Krankheitsbild prozentualem Anteil der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen der CD34-positiven Zellen

	Spearman's Korrelation		ANCOVA	
Parameter	**rho**	**P-Wert**	**Effektstärke**	**P-Wert**
Kardiovaskuläre Risikofaktoren				
Weibliches Geschlecht	0,157	0,008	0,110	0,738
Diabetes mellitus Typ 2	-0,138	0,022	2,930	0,088
Positive Familienanamnese (KHK)	-0,189	0,002	0,380	0,539
Laborparameter				
Creatinkinase initial (CK)	0,157	0,016	0,500	0,479
Creatinkinase maximal (CK-max)	0,293	<0,001	0,003	0,954
Troponin-I initial (Tn)	0,309	<0,001	1,750	0,188
Troponin-I maximal (Tn-max)	0,326	<0,001	0,560	0,456
C-reaktives-Protein (CRP)	0,200	0,002	0,010	0,909
Medikation				
Antithrombozytäre Therapie	-0,165	0,007	0,014	0,907
β-Blocker	-0,197	0,001	0,220	0,641
ACE-Hemmer	-0,127	0,038	0,170	0,677
FACS-Parameter				
P-Selektin (CD62p)	0,283	<0,001	0,085	0,770
SDF-1 (CXCL12)	0,357	<0,001	1,060	0,305
Zirkulierende CD34+ Zellanzahl	-0,024	0,698	0,053	0,818
Krankheitsbild (SAP vs. IAP vs. NSTEMI vs. STEMI)	0,523	<0,001	32,520	<0,001

Eine gleichgerichtete Korrelation zeigte sich zwischen dem maximalen Wert der Creatinkinase (CK-max) und des Troponin-I (Tn-max) im Rahmen des

stationären Krankenhausaufenthalts und des prozentualen Anteils der CD34/CD42b-positiven Zellaggregate in der Gesamtpopulation der CD34-positiven Zellen bei Patienten mit KHK (%CD34/CD42b-positiv: n=278; CK-max: r=0,293, P<0,001; Tn-max: r=0,326, P<0,001; Abbildung 3.7 und 3.8). Das initiale Troponin-I (Tn), weniger das initiale CK (CK), korrelierten gleichgerichtet mit dem prozentualen Anteil der CD34/CD42b-positiven Zellaggregate in der Gesamtpopulation der CD34-positiven Zellen (Tn: r=0,309, P<0,001; CK: r=0,157, P=0,016).

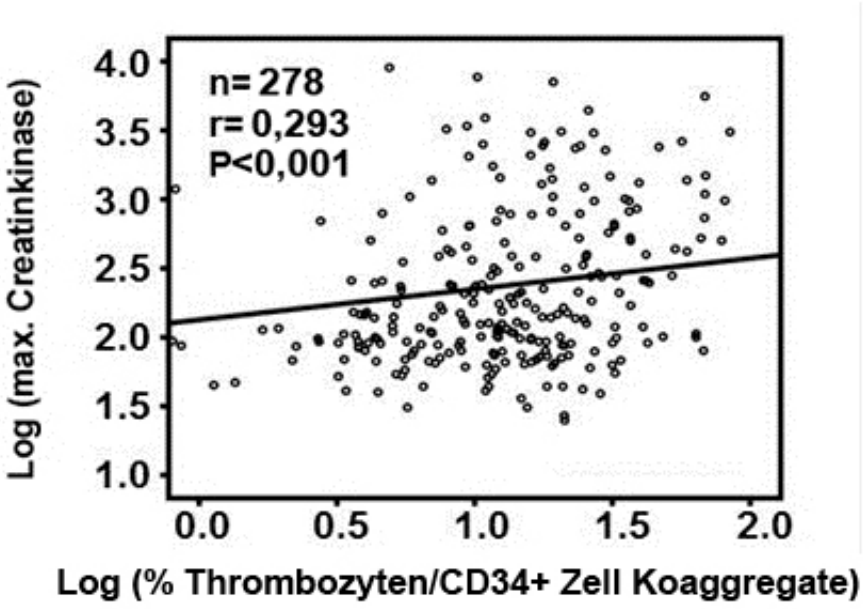


Abbildung 3.7: Korrelationsdarstellung zwischen maximal gemessener Creatinkinase und Koaggregationen mit Thrombozyten und endothelialen Progenitorzellen

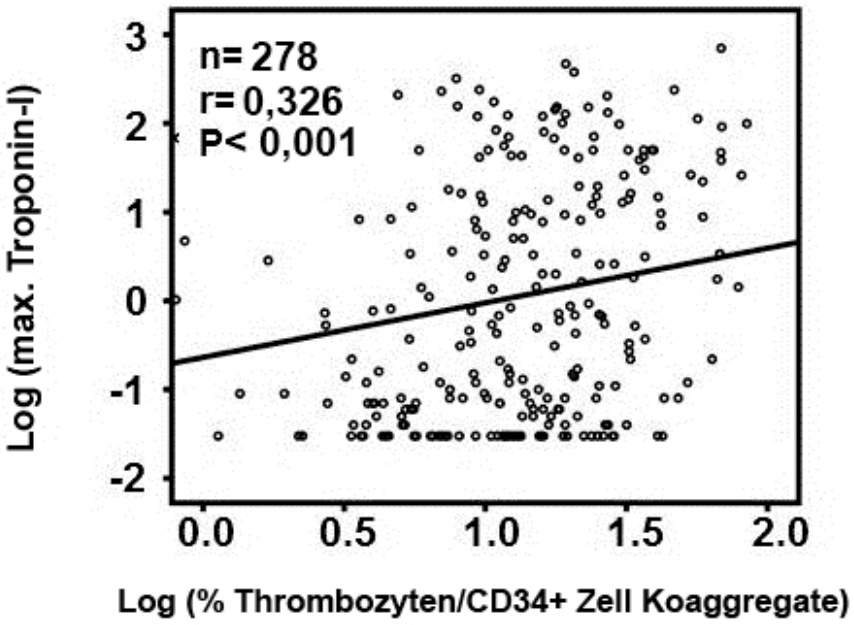


Abbildung 3.8: Korrelationsdarstellung zwischen maximal gemessenem Troponin und Koaggregationen mit Thrombozyten und endothelialen Progenitorzellen

Weiterhin wurde die gleichgerichtete Korrelation zwischen dem Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) und dem prozentualem Anteil der CD34/CD42b-positiven Zellaggregaten innerhalb der CD34-positiven Zellzahl berechnet. Hierbei zeigte sich eine Korrelation in der Patientenkohorte (n=278; CRP: r=0,200, P=0,002, Abbildung 3.9).

Mittels P-Selectin und SDF-1 wurde die Korrelation zwischen der Thrombozytenaktivierung und der Formierung von CD34/CD42b-positiven Zellen ermittelt. Hierbei zeigte sich eine gleichgerichtete Korrelation in der Patientenkohorte (n=170; P-Selectin: r=0,283, P<0,001; SDF-1: r=0,357, P<0,001, Abbildungen 3.10 und 3.11)

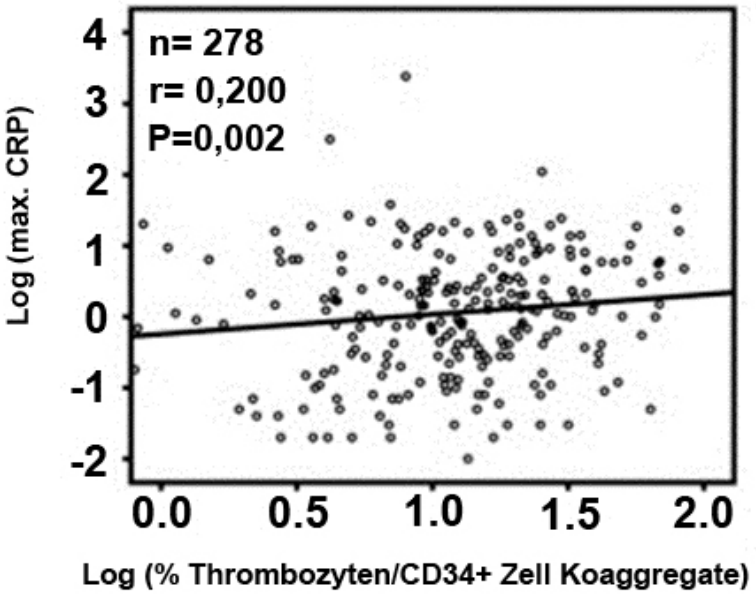


Abbildung 3.9: Korrelationsdarstellung zwischen maximal gemessenem C-reaktivem Protein und Koaggregationen mit Thrombozyten und endothelialen Progenitorzellen

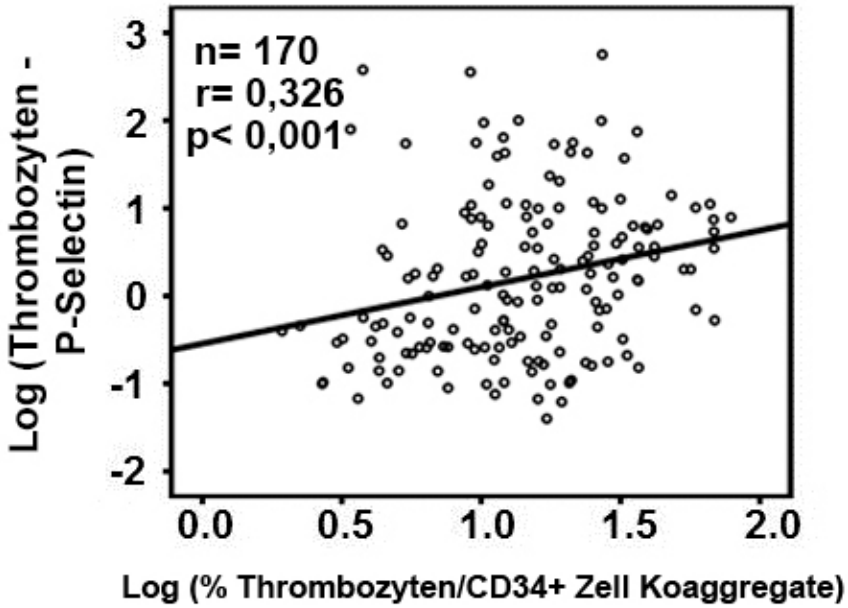


Abbildung 3.10: Korrelationsdarstellung zwischen P-Selectin und Koaggregationen mit Thrombozyten und endothelialen Progenitorzellen

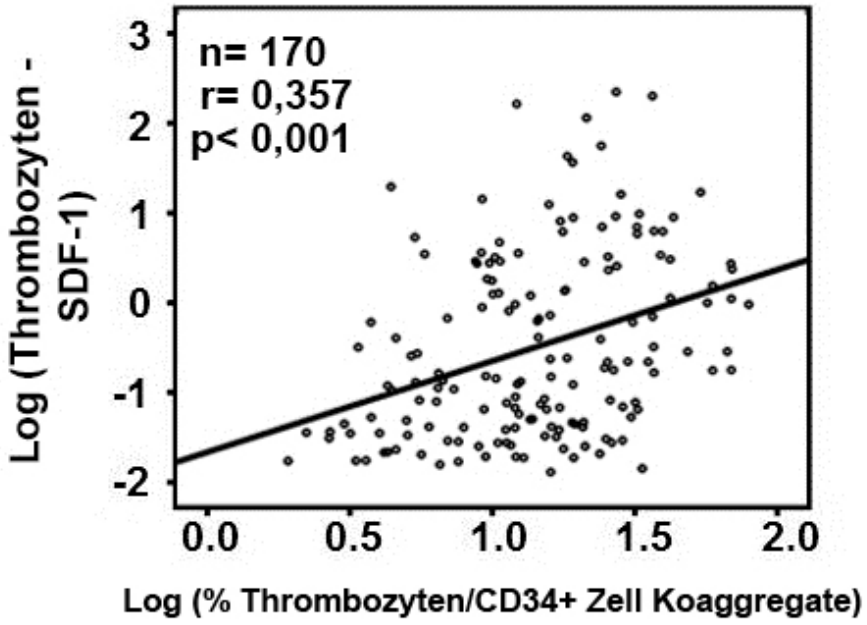


Abbildung 3.11: Korrelationsdarstellung zwischen SDF-1 und Koaggregationen mit Thrombozyten und endothelialen Progenitorzellen

Eine entgegengerichtete Korrelation zeigte sich bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (DM II) und KHK (DM II: r=-0,138, P=0,022; KHK: r=-0,189, P=0,002). Weiterhin zeigte sich dies bei der Medikation mit β-Blocker und ACE-Hemmer (β-Blocker: r=-0,197, P=0,001; ACE: r=-0,127, P=0,038). Die weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren hatten keinen signifikanten Einfluss auf den prozentualen Anteil der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen.

Von besonderem Interesse war die Auswirkung der entgegengerichteten Korrelation der antithrombozytären Therapie (r=-0,165, P=0,007) und der gleichgerichteten Korrelation der Thrombozytenaktivierung (P-Selectin: r=0,283, P<0,001; SDF-1: r=0,357, P<0,001). Patienten unter Monotherapie mit Aspirin oder dualer antithrombozytärer Therapie mit Aspirin und Clopidogrel zeigten eine signifikant erniedrigte Anzahl von CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen (keine antithrombozytäre Therapie vs. Monotherapie vs. duale antithrombozytäre Therapie: Median (IQR): 16,14 (17,42) vs. 11,74 (12,98) vs. 10,72 (15,79); Kruskal-Wallis P=0,016; Mann-Whitney U test:

P=0,015 für Monotherapie und duale antithrombozytäre Therapie vs. keine antithrombozytäre Therapie; P=0,543 für Monotherapie vs. duale antithrombozytäre Therapie, Abbildung 3.12).

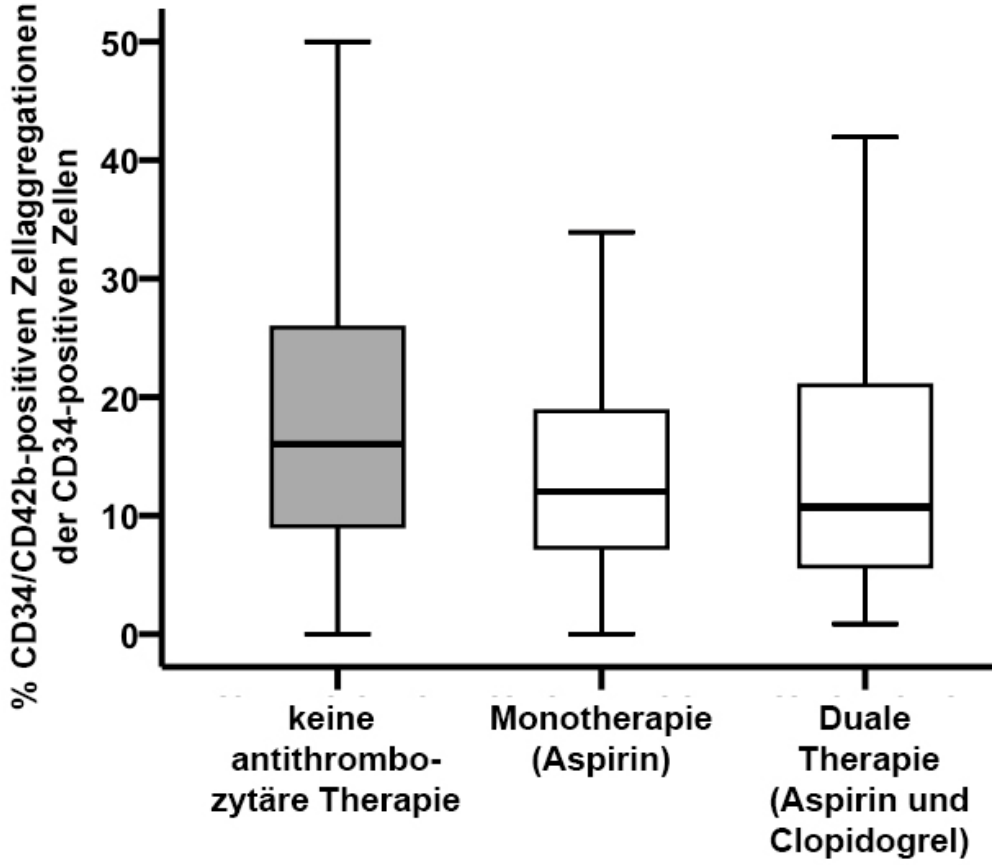


Abbildung 3.12: Korrelationen prozentualer Anteil der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen in der Gesamtpopulation der CD34-positiven Zellen ohne eine antithrombozytäre Therapie vs. Monotherapie (Aspirin) vs. duale antithrombozytäre Therapie (Aspirin und Clopidogrel)

Ungeachtet dessen zeigt die ANCOVA-Analyse (Tabelle 3.2) der Grunddaten der Patienten, dass die signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen bei Patienten mit ACS gegenüber Patienten mit SAP unabhängig aller patientenabhängigen Faktoren, wie KHK, Medikation, kardiovaskulären Risikofaktoren und bestehender Medikation ist.

4 Diskussion

4.1 Anzahl der CD34-positive Zellen bei Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) und akutem Koronarsyndrom (ACS)

Die Anzahl der CD34-positiven zirkulierenden Progenitorzellen ist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS), im Besonderen bei Patienten mit STEMI, gegenüber Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP) im peripheren Blut signifikant erhöht. Die vorliegende Arbeit bestätigt somit die Ergebnisse der aktuellen Literatur [Turan 2007, Wojkowski 2006, Shintani 2001, George 2004]. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Mobilisierung der Progenitorzellen aus dem Knochenmark als ein Reparaturmechanismus des Endothels wie auch des Myokards zu verstehen ist [Grundmann 2007, Turan 2007, Stellos 2008/2010, Massa 2005, Rafii 2008]. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass eine verbesserte Regeneration der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) sowie ein besseres Outcome bei Patienten mit einer erhöhten CD34-positiven Zellzahl im peripheren Blut nachgewiesen werden konnte [Werner 2005, Charwat 2008, Numaguchi 2006, Wojkowski 2006]. Geisler et al. [2012] zeigten darüber hinaus mittels Kardio-MRT, dass eine erhöhte CD34-positive Zellpopulation und ein erhöhter SDF-1-Plasmaspiegel auch in der kurzfristigen Verlaufsbeobachtung mit einer verbesserten LVEF assoziiert ist.

4.2 Nachweis von CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen

CD34 stellt ein Marker für hämatopoetische Progenitorzellen und Stammzellen dar [Smart 2008, Boilson 2008, Peichev 2000, Hristov 2003], wohingegen CD42b spezifisch Thrombozyten markiert [Clemetson 2007, Du 1987]. Bei beiden Patientengruppen konnten durch eine Antikörpermarkierung des aufbereiteten peripheren Blutes, mit CD34-FITC und CD42b-PE, Zellpopulationen nachgewiesen werden, an denen positive Markierungen für

beide Antikörper zu finden waren. Hierbei muß es sich um Zellaggregationen handeln, da sowohl die Expression von CD34 als auch von CD42b spezifisch für jeweils eine definierte Zellpopulationen ist. Eine Koexpression auf einzelnen Zellen wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Eine unspezifische Bindung der markierten Antikörper an der Zelloberfläche als Erklärung für diese Zellaggregation kann jedoch ausgeschlossen werden, da bei jedem Versuchsansatz eine Negativkontrolle (Isotypenkontrolle) durchgeführt und bei der Ergebnisberechnung berücksichtigt wurde, wie in Kapitel 2.4 beschrieben.
Der Nachweis dieser Zellaggregate erfolgte in dieser Studie erstmals ex vivo bei Patienten sowohl mit SAP als auch mit ACS.
Eine Interaktion zwischen Thrombozyten und zirkulierenden Progenitorzellen wurde zuvor durch Stellos et al. [2008] und Daub et al. [2006] in vitro beschrieben. Hierbei konnten in vitro Zellagreggationen zwischen Thrombozyten und zirkulierenden Progenitorzellen beschrieben werden.

4.3 Anzahl der CD34/CD42b-positiven Zellenaggregationen bei Patienten mit ACS und SAP

Eine Aktivierung von Thrombozyten erfolgt bei Patienten mit einem akuten Koronarsydroms (ACS) [Stellos 2008, Massberg 2003]. Im Rahmen dieser Studie zeigte sich erstmals, dass die Anzahl der gemessenen CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen bei Patienten mit ACS, speziell bei Patienten mit STEMI, im Vergleich zu Patienten mit SAP signifikant erhöht ist und mit der Erhöhung der Gesamtanzahl der CD34-positiven Zellen im peripheren Blut korreliert. Von besonderer Bedeutung erscheint der prozentuale Anteil der Zellaggregationen an der Gesamtanzahl der CD34-positiven Zellen im peripheren Blut zu sein. Dieser ist signifikant bei Patienten mit ACS, speziell bei STEMI, gegenüber Patienten mit SAP erhöht. Dies spricht, nach der Mobilisierung der CD34-positiven Zellen aus dem Knochenmark, für eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit zur Bildung von CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen. Ein Zusammenspiel der Mobilisierung der CD34-positiven

Zellen und eine Aktivierung der Thrombozyten könnte somit die prozentuale Erhöhung der Zellaggregate bei ACS im Vergleich zu SAP erklären. Als Marker für die Aktivierung von Thrombozyten dienen CD62p, SDF-1, GPVI sowie P-Selectin [Bernal-Mizrachi 2003, Stellos 2008, Massberg 2003, Tan 2005, da Costa 2006]. Eine größere Studie sollte diesen Zusammenhang weiter untersuchen.

Bei der Anzahl der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen und deren prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation der CD34-positiven Zellen, konnte keine signifikante Unterteilung der Patienten mit einem ACS in NSTEMI, STEMI und IAP erfolgen. Jede Untergruppe des ACS zeigte allerdings signifikante Zellzahlerhöhungen im Vergleich zu Patienten mit SAP.

4.4 CD34/CD42b-positive Zelleaggregationen, kardiovaskuläre Risikofaktoren und Medikation

Bei den Patienten der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang der kardiovaskulären Risikofaktoren und der Medikation mit der Zellzahlerhöhung bei einem akuten Koronarsyndrom (ACS) im Vergleich zur stabilen Angina pectoris (SAP) festgestellt werden. Weder bei einer isolierten Untersuchung der CD34-positiven Zellen, noch bei CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen oder deren prozentualem Anteil innerhalb der CD34-positiven Zellpopulation, konnten signifikante Abhängigkeiten nachgewiesen werden. Dies spricht somit für eine rasche Mobilisierung der Zellen aus dem Knochenmark nach einer akuten Schädigung des Endothels, bzw. bei akut aufgetretener Ischämie des Myokards. Hierbei scheint es keine signifikanten Unterschiede der Zellmobilisierung zwischen den unterschiedlichen Patientengruppen mit einem ACS zu geben (NSTEMI, STEMI, IAP).

Studien mit einem größeren Patientenkollektiv wären gegebenenfalls in der Lage eine Unterscheidung oder eine eventuell bestehende Abhängigkeit aufzuzeigen.

In der statistischen Auswertung der vorliegenden Daten wurden Korrelationen zwischen den Zellpopulationen und den angegebenen Faktoren bestimmt.
Hierbei zeigte sich eine entgegengerichtete Korrelationen bestehend zwischen der Komorbidität von Diabetes mellitus Typ 2 und der Anzahl der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen. Eine Aktivierung der Thrombozyten und damit die Bindungsfähigkeit der aktivierten Thrombozyten an CD34-positiven Zellen könnte bei dieser Komorbidität gehemmt werden. Eine Erklärung bieten hierfür Numaguchi et al. [2006] und George et al. [2004], die einen negativen Einfluss auf die Adhäsion und Differenzierung der zirkulierenden Progenitorzellen bei Patienten mit Diabetes mellitus und auch chronischem Nikotinkonsum beschreiben.
Weiterhin beschreiben Churdchomjan et al. [2010] und Krankel et al. [2005] eine negative Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer diabetischen Erkrankung, speziell des Diabetes mellitus Typ 2, der durchschnittlichen Blutzuckerkonzentration, sowie, als Langzeitparameter der diabetischen Einstellung des bestehenden HbA1c und der Gesamtanzahl der CD34-positiven Zellen im peripheren Blut bei Menschen und bei Versuchen mit Mäusen. Krankel et al. [2005] diskutiert verschiedene Mechanismen, vor allem die frühere Apoptose der bestimmten Zellen oder die verminderte Mobilisation aus dem Knochenmark. In Versuchsreihen mit Mäusen konnte die Beteiligung der endothelialen Nitritoxidsynthase (eNOS) als verminderter Faktor bei der Zellmobilisierung identifiziert werden [Churdchomjan 2010, Krankel 2005, Liao 2010]. Bei den genannten Studien wurde jedoch nicht auf die Interaktion der CD34-positiven Zellen mit Thrombozyten eingegangen, sodass keine Rückschlüsse auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie erfolgen können.
Ferreiro et al. [2011] beschreiben eine chronisch gesteigerte Aktivierung der Thrombozyten bei Patienten mit bekanntem Diabetes mellitus Typ 2, sowie eine Funktionsstörung der Thrombozytenreaktivität mit der Folge einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines kardiovaskulären Erstereignisses oder eines erneuten kardiovaskulären Ereignisses bei bestehender KHK.
Insgesamt kann somit angenommen werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer Kombination aus Funktionsstörung der

zirkulierenden Progenitorzellen, sowie einer chronischen Aktivierung der Thrombozyten bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 auf ein ischämisches Ereignis zu erklären sind.

Eine weitere entgegengerichtete Korrelation besteht bei Patienten unter antithrombozytärer Medikation. In dieser Arbeit wurde auch der Unterschied zwischen Patienten mit Monotherapie (Aspirin) und dualer antithrombozytärer Therapie (Aspirin und Copidogrel) untersucht. Die Einnahme von Aspirin ist im Sinne einer leitliniengerechten Prävention von kardiovaskulären Ereignissen einer ACS als Standardtherapie etabliert [DGK 2007]. Die Wirkungsweise des Aspirins (Acetylsalicylsäure) wurde 1971 von Vane et al. [1971] beschrieben. Eine irreversible Hemmung der Cyclooxigenasen COX-1 und COX-2, zusammen mit weiteren Enzymen rufen eine Inaktivierung der Bindungsfähigkeit von Thrombozyten hervor. Nach Geiger et al. [1999] beruht die Wirkung von Clopidogrel jedoch auf einem anderen Wirkmechanismus. Der pharmakologisch aktive Metabolit des Clopidogrels blockiert die Bindung von Adenosindiphosphat (ADP) an seinem Thrombozytenrezeptor (P2Y12-Rezeptor), wodurch eine Thrombozytenaktivierung über den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorkomplex unterbunden wird. Sowohl für die Monotherapie, als auch für die duale antithrombozytäre Therapie konnte gegenüber einer fehlenden antithrombozytären Therapie ein signifikanter Einfluss auf die Bildung von CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen nachgewiesen werden. Jedoch konnte keine signifikante Unterscheidung zwischen Monotherapie und dualer Therapie erzielt werden. Es muss offen bleiben, ob die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der beiden Thrombozytenaggregationshemmer und die in dieser Studie beschriebenen Auswirkungen auf die Entstehung von CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen einen Einfluss auf den endothelialen Reparaturmechanismus darstellen und ob hiermit auch eine klinische Bedeutung, im Sinne einer Veränderung des klinischen Outcomes der Patienten mit ACS, besteht. Mit den vorliegenden Daten ist eine Aussage hierfür jedoch nicht möglich.

Die gleichgerichtete Korrelation zwischen der gemessenen Kreatinkinase des gemessenen Troponin-I mit den bestimmten Zellpopulationen spricht für die

postulierte Mobilisierung der zirkulierenden Progenitorzellen, sowie der Entstehung der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen im Rahmen eines akuten kardiovaskulären Geschehens. Da die Kreatinkinase und das Troponin-I für einen myokardialen Zelluntergang im Rahmen eines ACS durch eine akute Ischämie, sowie für eine akute endotheliale Dysfunktion sprechen, werden verschiedene Transmitter freigesetzt, unter anderem P-Selectin, SDF-1 und NO [Ferreiro 2011, Stellos 2008, Dernbach 2008, Langer 2007, Stein 2008]. Dies wird in der Literatur für CD34-positive Zellen beschrieben. Für CD34/CD42b-positive Zellaggregationen lag bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Beschreibung vor. Eine bestehende Korrelation zwischen den Maximalwerten der Creatinkinase und des Troponin-I und den Zellaggregationen könnte somit als quantitativer Marker angesehen werden.

Die Rolle des C-reaktiven Proteins (CRP) im Rahmen eines akuten kardiovaskulären Geschehens ist in der Literatur umstritten. Während Liuzzi et al. [1994] und Quinn et al. [1987] keine Abhängigkeit von einer Myokardnekrose oder einer Endothelschädigung zu der Erhöhung des C-reaktiven Proteins sehen, beschreiben neuere Studien von Cesari et al. [2009] und Turan et al. [2007] sogar eine negative Korrelation zwischen CRP und der Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen. Hingegen beschreiben Andrie et al. [2009] eine positive Korrelation zwischen CRP und der Mobilisation von zirkulierenden Progenitorzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine gleichgerichtete Korrelation zwischen CD34/CD42b-Zellaggregationen zu dem im Serum gemessenen C-reaktiven Proteins bestimmt werden.

Als weitere Marker der Thrombozytenaktivierung zeigten sowohl thrombozytengebundenes P-Selectin, als auch thrombozytengebundenes SDF-1 eine gleichgerichtete Korrelation mit der Anzahl der zirkulierenden CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen.

4.5 Reparaturmechanismus oder Arteriosklerose

Die Aufgabe der CD34-positiven zirkulierenden Progenitorzellen ist nicht eindeutig geklärt [Stellos 2008]. Einerseits zeigen sich positive Effekte auf die Regeneration des Endothels und der Vaskularisation bei Patienten mit ACS [Grundmann 2007, Werner 2004], andererseits ist auch die Entwicklung von Mastzellen und Schaumzellen und somit die Mitwirkung bei der Entstehung der Arteriosklerose und damit der koronarer Herzerkrankung beschrieben [Stellos 2010, Rafii 2008, Daub 2010, 2006].
Ein wichtiger Mechanismus zur Regulation, Adhäsion und Differenzierung stellen hierbei die Thrombozyten dar [Rafii 2008, de Boer 2006, Daub 2006], die unter anderem für die primäre Homöostase verantwortlich sind [Gawaz 2004, Stellos 2008].
Es kann möglicherweise davon ausgegangen werden, dass die Fähigkeit der CD34-positiven zirkulierenden Progenitorzellen, im Sinne pluripotenter Stammzellen, beide Eigenschaften verbinden [Stellos 2007]. Einerseits in der Akutphase eines kardiovaskulären Ereignisses als Reparaturmechanismus, anderseits die Bildung von arteriosklerotischen Plaques bei einem chronischen Geschehen. Ob dies ein fehlgeleiteter Reparaturmechanismus des chronisch geschädigten und entzündeten Endothels ist, muss offen bleiben.

Ein vollständiges Verständnis der Mobilisierung, Adhäsion und Differenzierung von zirkulierenden Progenitorzellen des Blutes, sowie deren Interaktion mit Thrombozyten, in Bereichen von chronischen Gefäßschädigungen oder ischämischem Geweben, könnte neue Möglichkeiten und Therapiekonzepte bei der Behandlung von Patienten mit einem stattgehabten Myokardinfarkt, beziehungsweise der klinischen Sekundärprävention dieser Patienten aufzeigen.

5 Zusammenfassung

Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Blutgerinnung, Entzündungsreaktion und Geweberegeneration. Es konnte zuvor *in vitro* gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen zirkulierenden Progenitorzellen (CD34-positive Zellen) und Thrombozyten stattfindet. Dies führt zur Veränderung der Mobilisierung, Rekrutierung und Funktion der Progenitorzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei 278 Patienten, die entweder mit stabiler Angina pectoris (SAP) oder akutem Koronarsyndrom (ACS) diagnostiziert wurden, die Anzahl der zirkulierenden Progenitorzellen, sowie deren direkte Interaktion mit Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) untersucht. Schließlich erfolgte die Auswertung der gemessenen Ergebnisse mit den Patientendaten.

Es zeigte sich, dass die Anzahl der CD34-positiven zirkulierenden Progenitorzellen bei Patienten mit ACS im Vergleich zu Patienten mit SAP signifikant erhöht sind. Es konnten erstmals bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung Zellen nachgewiesen werden, die sowohl für das progenitorzellspezifische CD34-Antigen als auch für das thrombozyten-spezifische CD42b-Antigen positiv sind. Hierbei kann es sich nur um Zellaggregationen der zirkulierenden Progenitorzellen und der zirkulierenden Thrombozyten handeln. Die Gesamtanzahl und der prozentuale Anteil der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen in der Gesamtpopulation der CD34-positiven Zellen ist bei Patienten mit ACS im Vergleich zu Patienten mit SAP signifikant erhöht (%CD34/CD42b-positiv: Median (Interquartilsabstand, IQR): SAP: 7,42 (8,19); IAP: 16,45 (14,3); NSTEMI: 16,28 (15,23); STEMI: 25,43 (28,2); $P<0,001$). Die Erhöhung der Gesamtzellzahl zwischen beiden Patientengruppen ist von dem Vorhandensein kardiovaskulärer Risikofaktoren unabhängig. Der prozentuale Anteil der CD34/CD42b-positiven Zellaggregationen korrelierte mit der Größe des Myokardinfarkts (Troponin-I max; $r=0,326$ $P<0,001$), Inflammation (C-reaktives Protein; $r=0,200$ $P=0,002$)

und der Thrombozytenaktivierung (Expression von thrombozytärem P-Selectin und SDF-1; P-Selectin: r=0,283 P<0,001; SDF-1: r=0,357 P<0,001).
Insgesamt lässt sich hieraus schließen, dass Thrombozyten und zirkulierende Progenitorzellen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung interagieren und Zellagreggationen bilden können. Die Frage ob dies als Reparaturmechanismus zu interpretieren ist, muss in weiterführenden *in vitro* und *in vivo* Studien beantwortet werden.

6 Literaturverzeichnis

Abbas, AK, Lichtman, AH, Pober, JS. Immunologie, 1996, Hans Huber Verlag, Bern.

Allender S, Scarborough P, Peto V, Rayner M. European cardiovascular disease statistics. 2008. www.heartstats.org

Anderson JL, Karagounis LA, Becker LC, Sorensen SG, Menlove RL. TIMI perfusion grade 3 but not grade 2 results in improved outcome after thrombolysis for myocardial infarction. Ventriculographic, enzymatic, and electrocardiographic evidence from the TEAM-3 Study. Circulation. 1993 Jun;87(6):1829-39.

Ando M, Iwata A, Ozeki Y, Tsuchiya K, Akiba T, Nihei H. Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients. Kidney Int. 2002 Nov;62(5):1757-63.

Andrié RP, Bauriedel G, Braun P, Höpp HW, Nickenig G, Skowasch D. Increased expression of C-reactive protein and tissue factor in acute coronary syndrome lesions: Correlation with serum C-reactive protein, angioscopic findings, and modification by statins. Atherosclerosis. 2009 Jan;202(1):135-43.

Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT: Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Thromb Haemost. 2004 Jan;91(1):4-15.

Antman EM, Cohen M, Bernink PJ, McCabe CH, Horacek T, Papuchis G, Mautner B, Corbalan R, Radley D, Braunwald E.
The TIMI risk score for unstable angina/non-ST elevation MI: A method for prognostication and therapeutic decision making.
JAMA. 2000 Aug 16;284(7):835-42.

Archer J. Diagnostic laboratory tests and reference intervals. J Small Anim Pract. 2010 Sep;51(9):459-60.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. 1997 Feb 14;275(5302):964-7.

Bates ER, Menees DS. Acute ST-elevation myocardial infarction. Curr Opin Crit Care. 2012 Oct;18(5):417-23.

Becton Dickinson Bioscience, FACSCalibur Datasheet, Instruction, Handbook, 2009.

Becton Dickinson Bioscience, Mononuclear Antibodies Datasheet, Instruction, Handbook, 2009.

Belonje AM, Voors AA, van Gilst WH, Anker SD, Slart RH, Tio RA, Zijlstra F, van Veldhuisen DJ; HEBE III investigators. Effects of erythropoietin after an acute myocardial infarction: rationale and study design of a prospective, randomized, clinical trial (HEBE III). Am Heart J. 2008 May;155(5):817-22.

Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstmann LL, de Marchena E, Ahn YS. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. Am Heart J 2003 Jun;145(6):962-70.

Bigalke B, Schreitmöller B, Sopova K, Paul A, Stransky E, Gawaz M, Stellos K, Laske C. Adipocytokines and CD34 progenitor cells in Alzheimer's disease. PLoS One. 2011;6(5):e20286.

Bigalke B, Schuster A, Sopova K, Wurster T, Stellos K. Platelets in atherothrombosis - diagnostic and prognostic value of platelet activation in patients with atherosclerotic diseases. Curr Vasc Pharmacol. 2012 Sep;10(5):589-96.

Blocklet D, Toungouz M, Berkenboom G, Lambertmont M, Unger P, Preumont N, Stoupel E, Egrise D, Degaute JP, Goldman M, Goldman S. Myocardial homing of nonmobilized peripherial-blood CD34+ cells after intracoronary injection. Stem Cells. 2006 Feb;24(2):333-6.

Boilson BA, Kiernan TJ, Harbuzariu A, Nelson RE, Lerman A, Simari RD. Circulating CD34+ cell subsets in patients with coronary endothelial dysfunction. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2008 Aug;5(8):489-96.

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. Nature. 1998 Aug 27;394(6696):894-7.

Braunwald E. Unstable angina. A classification. Circulation. 1989 Aug;80(2):410-4.

Brogan PA, Shah V, Brachet C, Harnden A, Mant D, Klein N, Dillon MJ. Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young. Arthritis Rheum 2004 Mar;50(3):927-36.

Bruno S, Bussolati B, Scacciatella P, Marra S, Sanavio F, Tarella C, Camussi G. Combined administration of G-CSF and GM-CSF stimulates monocyte-derived pro-angiogenic cells in patients with acute myocardial infarction. Cytokine 2006;34(1-2):56-65.

Campeau L., Letter: Grading of angina pectoris. Circulation. 1976 Sep;54(3):522-3.

Cesari F, Sofi F, Caporale R, Capalbo A, Marcucci R, Macchi C, Lova RM, Cellai T, Vannucci M, Gensini GF, Abbate R, Gori AM. Relationship between exercise capacity, endothelial progenitor cells and cytochemokines in patients undergoing cardiac rehabilitation. Thromb Haemost. 2009 Mar;101(3):521-6.

Charwat S, Gyöngyösi M, Lang I, Graf S, Beran G, Hemetsberger R, Nyolczas N, Sochor H, Glogar D. Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art. Exp Hematol. 2008 Jun;36(6):672-80.

Chen Y, Davis-Gorman G, Watson RR, McDonagh PF. Platelet CD62p expression and microparticle in murine aquired immune deficiency syndrome and ethanol consumption. Alcohol Alcohol 2003 Jan-Feb;38(1):25-30.

Churdchomjan W, Kheolamai P, Manochantr S, Tapanadechopone P, Tantrawatpan C, U-Pratya Y, Issaragrisil S. Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control. BMC Endocr Disord. 2010 Apr 7;10:5.

da Costa Martins PA, van Gils JM, Mol A, Hordijk PL, Zwaginga JJ. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. J Leukoc Biol. 2006 Mar;79(3):499-507.

Classen M., Diehl V., Kochsiek K., Schmiegel W. (2004): Innere Medizin- Urban & Fischer, München, 5. Auflage

Daub K, Seizer P, Stellos K, Krämer BF, Bigalke B, Schaller M, Fateh-Moghadam S, Gawaz M, Lindemann S. Oxidized LDL-activated platelets induce vascular inflammation. Semin Thromb Hemost. 2010 Mar;36(2):146-56.

Daub K, Lindemann S, Langer H, Seizer P, Stellos K, Siegel-Axel D, Gawaz M. The evil in atherosclerosis: adherent platelets induce foam cell formation. Semin Thromb Hemost. 2007 Mar;33(2):173-8.

Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, Bigalke B, Schönberger T, Geisler T, Siegel-Axel D, Oostendorp RA, Lindemann S, Gawaz M. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. FASEB J. 2006 Dec;20(14):2559-61.

de Boer HC, Verseyden C, Ulfman LH, Zwaginga JJ, Bot I, Biessen EA, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Jul;26(7):1653-9.

Deng Z, Yang C, Deng H, Yang A, Geng T, Chen X, Ma A, Liu Z. Effects of GM-CSF on the stem cells mobilization and plasma C-reactive protein levels in patients with acute myocardial infarction. Int J Cardiol 2006 Oct 26;113(1):92-6.

Dernbach E, Randriamboavonjy V, Fleming I, Zeiher AM, Dimmeler S, Urbich C. Impaired interaction of platelets with endothelial progenitor cells in patients with cardivascular risk factors. Basic Res Cardiol. 2008 Nov;103(6):572-81.

Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD: Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. J Clin Invest. 2005, 115, 572–583.

Endtmann C, Ebrahimian T, Czech T, Arfa O, Laufs U, Fritz M, Wassmann K, Werner N, Petoumenos V, Nickenig G, Wassmann S. Angiotensin II impairs endothelial progenitor cell number and function in vitro and in vivo: implications for vascular regeneration. Hypertension. 2011 Sep;58(3):394-403.

Esposito K, Ciotola M, Schisano B, Gualdiero R, Sardelli L, Misso L, Giannetti G, Giugliano D. Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. J Clin Endocrinol Metab 2006 Sep;91(9):3676-9.

Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Diabetes and Antiplatelet Therapy in Acute Coronary Syndrome. Circulation 2011;123:798-813.

Forlow SB, McEver RP, Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. Blood 2000 Feb 15;95(4):1317-23.

Fulwyler MJ. Electronic Separation of Biological Cells by Volume. Science. 1965 Nov 12;150(3698):910-1.

Gawaz M, Stellos K, Langer HF. Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. J Thromb Haemost. 2008 Feb;6(2):235-42.

Gawaz, M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. Cardiovasc Res. 2004 Feb 15;61(3):498-511.

Gawaz, M, Langer, H, May, AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest. 2005 Dec;115(12):3378-84.

Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. Circulation. 1999 Jan 5;99(1):E1-E11.

Geiger J, Brich J, Hönig-Liedl P, Eigenthaler M, Schanzenbächer P, Herbert JM, Walter U. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999 Aug;19(8):2007-11.

Geisler T, Fekecs L, Wurster T, Chiribiri A, Schuster A, Nagel E, Miller S, Gawaz M, Stellos K, Bigalke B. Association of platelet-SDF-1 with hemodynamic function and infarct size using cardiac MR in patients with AMI.Eur J Radiol. 2012 Apr;81(4):e486-90.

George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, Herz I, Miller H, Keren G. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. Eur Heart J 2004; 25:1003-8.

Greenland P, Gidding SS, Tracy RP. Commentary: lifelong prevention of atherosclerosis: the critical importance of major risk factor exposures. Int J Epidemiol. 2002 Dec;31(6):1129-34.

Grundmann F, Scheid C, Braun D, Zobel C, Reuter H, Schwinger RH, Müller-Ehmsen J. Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction. Clin Res Cardiol. 2007 Sep;96(9):621-7.

Hahn JM. (2003): Checkliste Innere Medizin, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage.

Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, Caso P, Dudek D, Gielen S, Huber K, Ohman M, Petrie MC, Sonntag F, Uva MS, Storey RF, Wijns W, Zahger D; ESC Committee for Practice Guidelines, Bax JJ, Auricchio A, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Poldermans D, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S; Document Reviewers, Windecker S, Achenbach S, Badimon L, Bertrand M, Bøtker HE, Collet JP, Crea F, Danchin N, Falk E, Goudevenos J, Gulba D, Hambrecht R, Herrmann J, Kastrati A, Kjeldsen K, Kristensen SD, Lancellotti P, Mehilli J, Merkely B, Montalescot G, Neumann FJ, Neyses L, Perk J, Roffi M, Romeo F, Ruda M, Swahn E, Valgimigli M, Vrints CJ, Widimsky P. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2011 Dec;32(23):2999-3054.

Hamm CW, Albrecht A, Bonzel T, Kelm M, Lange H, Schächinger V, Terres W, Voelker W. [Diagnostic heart catheterization]. Clin Res Cardiol. 2008 Aug;97(8):475-512.

Hamm CW; Deutsche Gesellschaft fur Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung. [Guidelines: acute coronary syndrome (ACS). 1: ACS without persistent ST segment elevations]. Z Kardiol. 2004 Jan;93(1):72-90.

Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczek RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature. 1998 Feb 5;391(6667):591-4.

Herold, G. Innere Medizin 2011, Verlag Dr. Gerd Herold, Köln, Auflage 2011.

Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. Trends Cardiovasc Med. 2003 Jul.13(5):201-6.

Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Schmidt H, Rehders T, Korber T, Schumichen C, Freund M, Nienaber CA. Preservation from left ventricular remodelling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI). Circulation 2005 Nov 15;112(20):3097-106.

Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D, Kische S, Freund M, Nienaber CA. Prevention of left ventricular remodelling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. Circulation 2005 Aug 30; 112(9 Suppl):173-80.

Janeway, CA, Travers, P, Walport, M, Shlomchik, M. Immunobiology, 2001, Garland Publishing, New York.

Janeway K, Walkley CR. Modeling human osteosarcoma in the mouse: From bedside to bench. Bone. 2010 Nov;47(5):859-65.

Jin DK, Shido K, Kopp HG, Petit I, Shmelkov SV, Young LM, Hooper AT, Amano H, Avecilla ST, Heissig B, Hattori K, Zhang F, Hicklin DJ, Wu Y, Zhu Z, Dunn A, Salari H, Werb Z, Hackett NR, Crystal RG, Lyden D, Rafii S. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. Nat Med. 2006 May;12(5):557-67.

Jy W, Mao WW, Horstman L, Tao J, Ahn YS. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. Blood Cells Mol Dis 1995;21(3):217-31.

Keymel S, Kalka C, Rassaf T, Yeghiazarians Y, Kelm M, Heiss C. Impaired endothelial progenitor cell function predicts age-dependent carotid intimal thickening. Basic Res Cardiol. 2008 Nov;103(6):582-6.

Kim HK, Song KS, Lee ES, Lee YJ, Park YS, Lee KR, Lee SN. Optimized flow cytometric assay for the measurement of platelet microparticles in plasma: pre-analytic and analytic considerations. Blood Coagul Fibrinolysis 2002 Jul;13(5):393-7.

Kirk JT, McNally AK, Anderson JM. Polymorphonuclear leukocyte inhibition of monocytes/macrophages in the foreign body reaction. J Biomed Mater Res A. 2010 Sep 1;94(3):683-7.

Koehler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.

Knijff-Dutmer EA, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar MA. Elevated levels of platelet microparticles are associated with diseases activity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2002 Jun;46(6):1498-503.

Kränkel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. Arterioscler. Thromb VascBiol 2005, 25(4):698-703.

Langer HF, von der Ruhr JW, Daub K, Schoenberger T, Stellos K, May AE, Schnell H, Gauss A, Hafner R, Lang P, Schumm M, Böhring HJ, Klingel K, Conrad S, Schaller M, van Zandvoort M, Jung G, Dimmeler S, Skutella T, Gawaz M. Capture of endothelial progenitor cells by a bispecific protein/monoclonal antibody molecule induces reendothelialization of vascular lesions. J Mol Med (Berl). 2010 Jul;88(7):687-99.

Langer HF, May AE, Vestweber D, De Boer HC, Hatzopoulos AK, Gawaz M. Platelet-induced differentiation of endothelial progenitor cells. Semin Thromb Hemost. 2007 Mar;33(2):136-43.

Langer H, May AE, Daub K, Heinzmann U, Lang P, Schumm M, Vestweber D, Massberg S, Schönberger T, Pfisterer I, Hatzopoulos AK, Gawaz M. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. Circ Res. 2006 Feb 3;98(2):e2-10.

Laufs U, Wassmann S, Czech T, Münzel T, Eisenhauer M, Böhm M, Nickenig G. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Apr;25(4):809-14.

Lee RJ, Fang Q, Davol PA, Gu Y, Sievers RE, Grabert RC, Gall JM, Tsang E, Yee MS, Fok H, Huang NF, Padbury JF, Larrick JW, Lum LG. Antibody targeting of stem cells to infarcted myocardium. Stem Cells. 2007 Mar;25(3):712-7.

Leitlinie Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung e.V., http://leitlinien.dgk.org/leitlinien/

Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Abbate A, Rebuzi AG, Giovannini S, Lombardi M, Galiuto L, Liuzzo G, Andreotti F, Lanza GA, Contemi AM, Leone G, Crea F. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. Eur Heart J 2005 Jun; 26(12):1192-204.

Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Contemi AM, de Ritis DG, Giannico MB, Rebuzzi AG, Leone G, Crea F. Endogenous G-CSF and CD34+ cell mobilization after acute myocardial infarction. Int J Cardiol. 2006 Aug 10; 111(2):202-8.

Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. Science. 2006 Apr 7;312(5770):104-7.

Liao YF, Chen LL, Zeng TS, Li YM, Yu F, Hu LJ, Yue L. Number of circulating endothelial progenitor cells as a marker of vascular endothelial function for type 2 diabetes. Vasc Med. 2010 Aug;15(4):279-85.

Lindemann S, Krämer B, Daub K, Stellos K, Gawaz M. Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis. Curr Opin Lipidol. 2007 Oct;18(5):566-73.

Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation. 2001 Jul 17;104(3):365-72.

Liu B, Chen JS, Cao M, Gu SL, Liao C, Li DZ, Zhong HZ. Platelet chracteristic antigens of CD34+ cells in cryopressed cord blood: a study of platelet-derived microparticles on transplant processing. Vox Sang 2004 Aug;87(2):96-104.

Liuzzo, G., Biasucci, L.M., Gallimore, J.R., Grillo, R.L., Rebuzzi, A.G., Pepys, M.B., Maseri, A. The Prognostic Value of C-Reactive Protein and Serum Amyloid A Protein in Servere Unstable Angina. N Engl J Med. 1994, 331, 417-24.

Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D. (2006) Der Experimentator ‘Immunologie’, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2. Auflage.

Martin K, Stanchina M, Kouttab N, Harrington EO, Rounds S. Circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in obstructive sleep apnea. Lung. 2008 May-Jun;186(3):145-50.

Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertoletti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. Blood 2005 Jan 1; 105(1): 199-206.

Massberg S, Konrad I, Schürzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. J Exp Med. 2006 May 15;203(5):1221-33.

Mause SF, von Hundelshausen P, Zernecke A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005 Jul;25(7):1512-8.

Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, Ishii M, Morita Y, Kubota R, Yokouchi K, Imai H, Harada M, Osanai H, Kondo T, Murohara T. The impact of the capability of circulating progenitor cells to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. Circulation 2006 Jul 4; 114(1 Suppl):I114-9.

Oike Y, Yasunaga K, Ito Y, Matsumoto S, Maekawa H, Morisada T, Arai F, Nakagata N, Takeya M, Masuho Y, Suda T. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 5;100(16):9494-9.

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. 2000 Feb 1;95(3):952-8.

Pezzutto A., Ulrichs T., Burmester GR. Taschenbuch der Immunologie, 2007, Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage

Picard JL. Syndrome of tremors, with or without megaloblastic anemia, observed in early childhood. Union Med Can. 1966 Jul;95(7):834-8.

Pike C, Ramezan-Arab N, Cotman CW. Beta-amyloid neurotoxicity in vitro: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants. J Neurochem. 1997 Oct;69(4):1601-11.

Qiao X, Loudovaris M, Unverzagt K, Walker DE, Smith SL, Martinson J, Schilling M, Lee W, Williams SF, Van Epps DE, Cohen I, Bender JG. Immunocytochemistry and flow cytometry evaluation of human megakaryocytes in fresh samples and cultures of CD34+ cells. Cytometry 1996;23:250-259.

Quinn, M.T., Parthasarathy, S., Fong, L.G., Steinberg, D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84, 2995-98.

Rafii DC, Psaila B, Butler J, Jin DK, Lyden D. Regulation of vasculogenesis by platelet-mediated recruitment of bone marrow-derived cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Feb;28(2):217-22.

Ripa RS, Kastrup J. G-CSF therapy with mobilization of bone marrow stem cells for myocardial recovery after acute myocardial infarction--a relevant treatment? Exp Hematol. 2008 Jun;36(6):681-6.

Roccio M, Goumans MJ, Sluijter JP, Doevendans PA. Stem cell sources for cardiac regeneration. Panminerva Med. 2008 Mar;50(1):19-30.

Rogers C, Parikh S, Seifert P, Edelmann ER. Endogenous cell seeding. Remnant endothelium after stenting enhances vascular repair. Circulation. 1996;94:2909-2914.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26.

Scanlon PJ, Faxon DP, Audet AM, Carabello B, Dehmer GJ, Eagle KA, Legako RD, Leon DF, Murray JA, Nissen SE, Pepine CJ, Watson RM, Ritchie JL, Gibbons RJ, Cheitlin MD, Gardner TJ, Garson A Jr, Russell RO Jr, Ryan TJ, Smith SC Jr. ACC/AHA guidelines for coronary angiography: executive summary and recommendations. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Coronary Angiography) developed in collaboration with the Society for Cardiac Angiography and Interventions. Circulation. 1999 May 4;99(17):2345-57.

Schiff JH, Arntz HR, Boettinger BW. Das akute Koronarsyndrom in der Prähospitalphase, Der Anaesthesist 2005; 54 (10): 957-974.

Schmidt RF, Lang F, Thews G (2005): Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, Springer Medizin Verlaug, Heidelberg, 29. Auflage, Kapitel 27, Seite 596-602.

Seizer P, Schiemann S, Merz T, Daub K, Bigalke B, Stellos K, M√ºller I, StöckleC, Müller K, Gawaz M, May AE. CD36 and macrophage scavenger receptor a modulate foam cell formation via inhibition of lipid-laden platelet phagocytosis. Semin Thromb Hemost. 2010 Mar;36(2):157-62.

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. Circulation 2001 Jun 12; 103(23):2776-9.

Sisko BL, Spaeth K, Kumar Y, Valdivia RH. Multifunctional analysis of Chlamydia-specific genes in a yeast expression system. Mol Microbiol. 2006 Apr;60(1):51-66.

Smart N, Riley PR. The stem cell movement. Circ Res. 2008 May 23;102(10):1155-68.

Spencer E, Tokunaga A, Hunt TK. Insuline-like growth factor binding protein-3 is present in the alpha-granules of platelets. Endocrinology. 1993 Mar;132(3):996-1001.

Sopova K, Tatsidou P, Stellos K. Platelets and platelet interaction with progenitor cells in vascular homeostasis and inflammation. Curr Vasc Pharmacol. 2012 Sep;10(5):555-62.

Stakos DA, Tziakas DN, Stellos K. Mechanisms of platelet activation in acute coronary syndromes. Curr Vasc Pharmacol. 2012 Sep;10(5):578-88.

Stein A, Montens HP, Steppich B, Busch G, Brandl R, Ott I. Circulating endothelial progenitor cells decrease in patients after endarterectomy. J Vasc Surg. 2008 Nov;48(5):1217-22.

Stellos K, Bigalke B, Borst O, Pfaff F, Elskamp A, Sachsenmaier S, Zachmann R, Stamatelopoulos K, Schönberger T, Geisler T, Langer H, Gawaz M. Circulating platelet-progenitor cell coaggregate formation is increased in patients with acute coronary syndromes and augments recruitment of CD34+ cells in the ischaemic microcirculation. Eur Heart J. 2013 Apr 17.

Stellos K, Panagiota V, Gnerlich S, Borst O, Bigalke B, Gawaz M. Expression of junctional adhesion molecule-C on the surface of platelets supports adhesion, but not differentiation, of human CD34 cells in vitro. Cell Physiol Biochem. 2012;29(1-2):153-62.

Stellos K, Langer H, Gnerlich S, Panagiota V, Paul A, Schönberger T, Ninci E, Menzel D, Mueller I, Bigalke B, Geisler T, Bültmann A, Lindemann S, Gawaz M. Junctional adhesion molecule A expressed on human CD34+ cells promotes adhesion on vascular wall and differentiation into endothelial progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Jun;30(6):1127-36.

Stellos K, Panagiota V, Sachsenmaier S, Trunk T, Straten G, Leyhe T, Seizer P, Geisler T, Gawaz M, Laske C. Increased circulating progenitor cells in Alzheimer's disease patients with moderate to severe dementia: evidence for vascular repair and tissue regeneration? J Alzheimers Dis. 2010;19(2):591-600.

Stellos K, Seizer P, Bigalke B, Daub K, Geisler T, Gawaz M. Platelet aggregates-induced human CD34+ progenitor cell proliferation and differentiation to macrophages and foam cells is mediated by stromal cell derived factor 1 in vitro. Semin Thromb Hemost. 2010 Mar;36(2):139-45.

Stellos K, Kopf S, Paul A, Marquardt JU, Gawaz M, Huard J, Langer HF. Platelets in regeneration. Semin Thromb Hemost. 2010 Mar;36(2):175-84.

Stellos K, Bigalke B, Stakos D, Henkelmann N, Gawaz M. Platelet-bound P-selectin expression in patients with coronary artery disease: impact on clinical presentation and myocardial necrosis, and effect of diabetes mellitus and anti-platelet medication. J Thromb Haemost. 2010 Jan;8(1):205-7.

Stellos K, Bigalke B, Langer H, Geisler T, Schad A, Kögel A, Pfaff F, Stakos D, Seizer P, Müller I, Htun P, Lindemann S, Gawaz M. Expression of stromal-cell-

derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. Eur Heart J. 2009 Mar;30(5):584-93.

Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, Bigalke B, Mueller I, Schumm M, Schaefer I, Seizer P, Kraemer BF, Siegel-Axel D, May AE, Lindemann S, Gawaz M. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. Circulation. 2008 Jan 15;117(2):206-15.

Stellos K, Gnerlich S, Kraemer B, Lindemann S, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry? Pharmacol Rep. 2008 Jan-Feb;60(1):101-8.

Stellos K, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine. Thromb Haemost. 2007 Nov;98(5):922-9

Stellos K, Gawaz M. Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment. Semin Thromb Hemost. 2007 Mar;33(2):159-64.

Takano K, Asazuma N, Satoh K, Yatomi Y, Ozaki Y. Collagen-induced generation of platelet-derived microparticles in whole blood is dependent on ADP released from red blood cells and calcium ions. Platelets 2004 Jun;15(4):223-9.

Tan KT, Tayebjee MH, Macfadyen RJ, Lip GY, Blann AD. Elevated platelet microparticles in stable coronary artery disease are unrelated to disease severity or to indices of inflammation. Platelets 2005 Sep;16(6):368-71.

Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 1999, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 5. Auflage.

Turan RG, Brehm M, Koestering M, Tobias Z, Bartsch T, Steiner S, Picard F, Ebner P, Schannwell CM, Strauer BE. Factors influencing spontaneous mobilization of CD34+ and CD133+ progenitor cells after myocardial infarction. Eur J Clin Invest. 2007 Nov;37(11):842-51.

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. Circ Res. 2004 Aug 20;95(4):343-53.

Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. Nat New Biol. 1971 Jun 23;231(25):232-5.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. N Engl J Med. 2005 Sep 8;353(10):999-1007.

Westenbrink BD, Oeseburg H, Kleijn L, van der Harst P, Belonje AM, Voors AA, Schoemaker RG, de Boer RA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. Erythropoietin stimulates normal endothelial progenitor cell-mediated endothelial turnover, but attributes to neovascularization only in the presence of local ischemia. Cardiovasc Drugs Ther. 2008 Aug;22(4):265-74.

World Health Statistics Report, World Health Organisation, WHO Press, 2012, http://www.who.int/en/

Wojkowski W, Tendera M, Zebzda A, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, Wyderka R, Krol M, Ochala A, Kozakiewicz K, Ratajczak MZ. Mobilization of CD34(+), CXCR4(+), c-met(+) stem cells is correlated with left ventricular ejection fraction and plasma NT-pro BNP levels in patients with acute myocardial infarction. Eur Heart J. 2006 Feb;27(3):283-9.

Wurster T, Stellos K, Geisler T, Seizer P, Andia ME, Schuster A, May AE, Melms A, Gawaz M, Bigalke B. Expression of stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1): a predictor of ischaemic stroke? Eur J Neurol. 2012 Mar;19(3):395-401.

Wurster T, Stellos K, Haap M, Seizer P, Geisler T, Otton J, Indermuehle A, Ishida M, Schuster A, Nagel E, Gawaz M, Bigalke B. Platelet expression of stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1): An indicator for ACS? Int J Cardiol. 2011 Jul 5.

Yamada Y, Yokoyama S, Wang XD, Fukuda N, Takakura N. Cardiac stem cells in brown adipose tissue express CD133 and induce bone marrow nonhematopoietic cells to differentiate into cardiomyocytes. Stem Cells. 2007 May;25(5):1326-33.

Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Körbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. Circulation. 2003 Oct 28;108(17):2070-3.

Yoshida N, Fujita M, Yamanishi K, Miwa K. Relation between collateral channel filling and flow grade in recipient coronary arteries in patients with stable effort angina. J Am Coll Cardiol. 1993 Aug;22(2):426-30.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Gawaz, der sich der Betreuung dieser Studie angenommen hat und als Ansprechpartner immer den richtigen Weg wußte.

Ebenfalls möchte ich Dr. Konstantinos Stellos danken, der mich in allen Phasen der Dissertation unterstützte und zur Ausarbeitung und Korrektur maßgeblich beitrug.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Labormitarbeitern, im besonderen Maße Iris Schäfer, für all die unersetzliche Unterstützung.

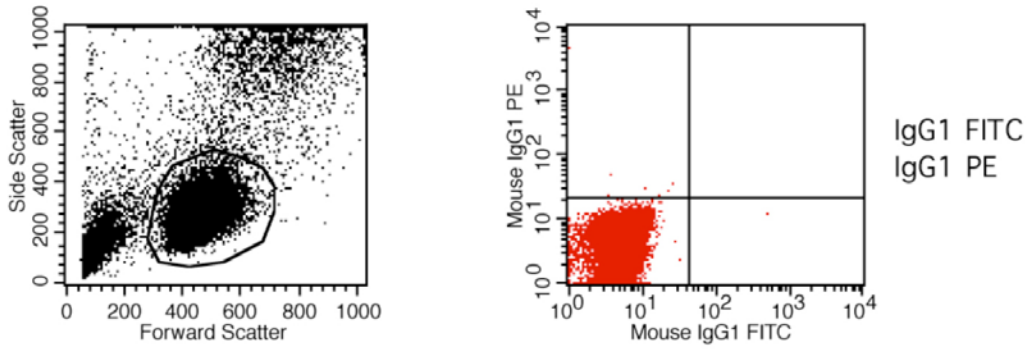
Mein freundschaftlicher Dank gilt Micha, Hanna, Bianca, Paavo und Christoph für die vielen Gespräche, Aufmunterungen, Unterstützungen, Sitzungen und auch für das Dasein an sich.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und immer währende Bereitschaft zu helfen.

Mein besonderer Dank gilt jedoch Cathrin ohne die ich nicht halb das wäre, was ich bin. Danke, dass Du immer an meiner Seite bist und mich bei allem unterstützt.

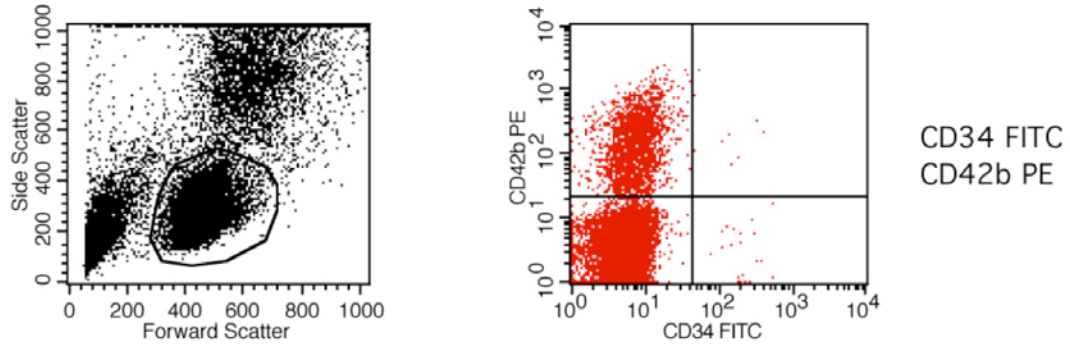
8 Appendix

8.1 Tabellen und Abbildungen



Quadrant Statistics

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	171	0.07	0.04	11.09	8.59	118.70	36.74
UR	6	0.00	0.00	110.09	84.16	315.12	106.50
LL	260574	99.92	59.46	5.40	4.94	5.03	4.14
LR	30	0.01	0.01	95.10	75.44	7.98	6.53



Quadrant Statistics

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	49074	18.78	10.43	8.28	7.25	229.24	147.02
UR	187	0.07	0.04	142.67	102.52	514.65	276.13
LL	211691	81.00	44.99	5.76	5.15	4.35	3.39
LR	402	0.15	0.09	239.04	206.21	3.75	2.65

Abbildung 8.1: Auswertungsbeispiel einer FACS-Analyse mit verwendeten Antikörpern IgG1-FITC/IgG1-PE/CD34-FITC/CD42b-PE

Tabelle 8.1: Materialliste, tabellarisch

Material	Hersteller
Cellquest pro Version 5.2.1	Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
Einmal-Pipettenspitzen für Eppendorf-Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipettierhilfe Research verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Cup weiß 2,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Excel 2002	Microsoft, Redmond, USA
FACS-Röhrchen 5ml	Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
FACSCalibur Baujahr 1995	Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
Falcon 50ml, konischer Zentrifugationsbehälter	Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
Ficoll-Paque-Plus-Lösung	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England
Mac OS 9.2.1	Apple, Cupertino, USA
Mac OS X 10.4.2	Apple, Cupertino, USA
Monoklonaler Antikörper Mouse-Anti-Human CD34-FITC, Klon 8G12	Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
Monoklonaler Antikörper Mouse-Anti-Human CD42b-PE, Klon SZ2	Immunotech, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA
Monoklonaler Antikörper Mouse-Anti-Human IgG1-FITC, Klon MOPC-21	Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
Monoklonaler Antikörper Mouse-Anti-Human IgG1-PE, Klon X40	Becton-Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
Multifuge 1s	Haereus, DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, England
Paraformaldehyde 0,5% (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Personal-Computer Pentium 4	Hewlett-Packard, Palo Alto, USA
Phosphate Buffered Saline Dulbecco (PBS)	Firma Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Powermac G4 733 Mhz	Apple, Cupertino, USA
Powermac G5 2,0 Ghz	Apple, Cupertino, USA
S-Monovette 10ml Citrat (1:10)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
SPSS Version 16 für Windows	SPSS Inc., Illinois, USA
Sterile Einmalpipetten für Accu-jet pro	Cole-Parmer, Illinois, USA
Windows XP	Microsoft, Redmond, USA
Zellzähler Sysmex KX-21N	Sysmex Corporation, Hyogo, Japan

8.2 Publikationen

Originalarbeiten:

Stellos K, Bigalke B, Borst O, **Pfaff F**, Elskamp A, Sachsenmaier S, Zachmann R, Stamatelopoulos K, Schönberger T, Geisler T, Langer H, Gawaz M. **(Eur Heart J. 2013 Apr 17, doi:10.1093/eurheartj/eht131)**. Circulating platelet–progenitor cell coaggregate formation is increased in patients with acute coronary syndromes and augments recruitment of CD34+ cells in the ischaemic microcirculation.

Stellos K, Bigalke B, Langer H, Geisler T, Schad A, Kögel A, **Pfaff F,** Stakos D, Seizer P, Müller I, Htun P, Lindemann S, Gawaz M. Expression of stromal-cell-derived factor-1 on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndrome and correlates with the number of CD34+ progenitor cells **(Eur Heart J. 2009 Mar;30(5):584-93)**

Kongressbeiträge

Stellos K, **Pfaff F,** Bigalke B, Langer H, Petrakis G, Borst O, Seizer P, Lindemann S, May AE, Gawaz M. Circulating platelet - progenitor cell co-aggregates in patients with coronary artery disease. ESC Congress 2008, Munich, Germany. European Heart Journal (2008) 29, (Abstract Supplement) 398-399

Stellos K, Bigalke B, Geisler T, Langer H, Schad A, **Pfaff F**, Stakos D, Seizer P, Htun P, Gawaz M. Role of platelet-bound SDF-1 in mobilization and recruitment of progenitor cells in patients with acute coronary syndromes. ESC Congress 2008, Munich, Germany. European Heart Journal (2008) 29, (Abstract Supplement) 752.

Stellos K, Langer H, Petrakis G, Bigalke B, **Pfaff F,** Borst O, Geisler T, Seizer P, Htun P, Lindemann S, May A, Gawaz M. Circulating Platelet - Stem Cell Aggregates in patients with coronary artery disease: Bridging Thrombosis with Myocardial Regeneration. 74th Annual meeting of the German Cardiac Society, Mannheim, Germany, March. Clin Res Cardiol 2008; 97- Suppl 1

Stellos K, Bigalke B, Geisler T, Langer H, Schad A, **Pfaff F**, Schäfer I, Stakos D, Seizer P, Htun P, Lindemann S, Gawaz M. Expression of the chemokine SDF-1 is increased on circulating platelets in patients with acute coronary syndromes and correlates with the number of CD34+ progenitor cells. 52nd Annual meeting of the German Society of Thrombosis and Haemostasis Research 2008, Dresden, Germany,. Hämostaseologie 2008, Suppl 1-2

Stellos K, Bigalke B, Schad A, Grimm J, Mozes V, **Pfaff F**, Panagiota V, Gnerlich S, Gawaz M. Thrombozytäres SDF-1 ist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erhöht und korreliert mit der Anzahl der zirkulierenden CD34+ Progenitorzellen. Heinle H, Schulte H, Schäfer J. Neue Aspekte der Arteriosklerosеforschung: Beiträge zur 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arteriosklerosеforschung 2008, p. 65-75

8.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name	Florian Franz Pfaff
Geburtstag	01.11.1981
Geburtsort	Aschaffenburg

Ausbildungsweg:

Seit 02/2013	Assistenzarzt Landesklinikum Tulln
2012 - 2013	Assistenzarzt Klinikum Bad Pirawarth
2011 - 2012	Ausbildung Fachkunde Arzt im Rettungsdienst
2009 - 2012	Assistenzarzt Gemeinschaftskrankenhaus Bonn
16.06.2009	**Abschluss Staatsexamen, Universität Tübingen**
2008 - 2009	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Tübingen Abteilungen Innere Medizin, Chirurgie und Anästhesiologie
2003 - 2009	Medizinstudium an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Famulaturen:	Kreisklinikum Tuttlingen, Universitätsklinik Tübingen, Abteilungen Innere Medizin, chirurgische Endoskopie, Psychiatrie

Zivildienst

2001-2002	Zivildienst Kreisklinikum Tuttlingen