

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkte: Kardiologie und Kreislauferkrankungen)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

**Einfluss diabetogener Stoffwechselfaktoren auf den
Metabolismus von humanen CD34⁺-Progenitorzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Jörg Uwe Schmohl

aus

Nürtingen

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Balletshofer

**Die Neugier steht immer
an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.**

(Galileo Galilei)

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
----------------------------	----

I Einleitung.....1

1 Diabetes mellitus.....	2
1.1 Definition	2
1.2 Diabetes mellitus Typ 2.....	2
1.3 Diabetes und Stammzellen	3
2 Arteriosklerose	4
2.1 Definition	4
2.2 Atherogenese	4
3 CD34 ⁺ -Stammzellen	7
3.1 Definition	7
3.2 CD34-Rezeptor.....	7
3.3 CD34 ⁺ -hämatopoetische Zellen	7
4 Funktion atherogenetisch relevanter Zellen in diabetischem Milieu.....	8
4.1 Funktionsdefekt CD34 ⁺ -Progenitorzellen von Diabetikern	8
5 Ziele der Arbeit	9
5.1 Diabetogene Faktoren	9
5.2 Allgemeine Fragestellungen.....	9
5.3 Spezielle Fragestellungen.....	10

II Patienten, Materialien und Methoden.....12

1 Klinischer Teil.....	12
1.1 Patienten	12
1.1.1 Patientengruppen	12
1.1.2 Ausschlusskriterien	12
1.1.3 Einschlusskriterien	13
1.2 Chirurgische Stammzellgewinnung	13
1.2.1 Gewinnung des Probenmaterials	13
1.2.2 Zugangswege.....	14
2 Experimenteller Teil	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Allgemeines.....	14
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	14
2.1.3 Puffer und Lösungen	15
2.1.4 Zymografie	16
2.1.5 Geräte	16
2.1.6 Antikörper	17
2.1.7 Verbrauchsmaterial	17
2.1.8 Kits	18

2.1.9	Software	18
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	Zellisolierung	18
2.2.2	Zellkulturen	21
2.2.3	Durchflusszytometrie	22
2.2.4	Mikroskopie	23
2.2.5	Gelatine-Zymografie	24
2.2.6	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay	25
3	Statistik.....	26
III	Ergebnisse.....	27
1	Diabetisches Milieu <i>in vivo</i> und Schaumzellbildung.....	27
1.1	Mikroskopische Beurteilung der Schaumzellmorphologie	27
1.1.1	Zellbeurteilung im Differenzierungsverlauf.....	27
1.1.2	Zellbeurteilung enddifferenzierter Zellen	28
1.2	Zytokinetik	28
1.3	Sezernierende Eigenschaften.....	29
1.3.1	Matrix-Metalloproteinasen-Aktivitäten	29
1.3.2	Monozyten-Colony Stimulating Factor.....	29
1.4	Eigenschaften der Zellmembranoberfläche.....	29
1.4.1	Expression des Scavenger-Rezeptors CD68	29
2	Glukosekonzentration und Schaumzellbildung <i>in vitro</i>	29
2.1	Mikroskopische Beurteilung der Schaumzellmorphologie	30
2.1.1	Zellbeurteilung im Differenzierungsverlauf.....	30
2.1.2	Zellbeurteilung enddifferenzierter Zellen	30
2.2	Zytokinetik	31
2.3	Sezernierende Eigenschaften.....	32
2.3.1	Matrix-Metalloproteinasen Aktivitäten.....	32
3	Diabetische Thrombozyten und Schaumzellbildung <i>in vitro</i>	32
3.1	Mikroskopische Beurteilung der Schaumzellmorphologie	32
3.1.1	Zellbeurteilung im Differenzierungsverlauf.....	32
3.1.2	Zellbeurteilung enddifferenzierter Zellen	32
3.2	Zytokinetik	33
3.3	Eigenschaften der Zellmembranoberfläche.....	33
3.3.1	Expression des Scavenger-Rezeptors MSR-A	33
4	Insulinkonzentration und Schaumzellbildung <i>in vitro</i>	33
4.1	Mikroskopische Beurteilung der Schaumzellmorphologie	33
4.1.1	Zellbeurteilung im Differenzierungsverlauf.....	33
4.1.2	Zellbeurteilung enddifferenzierter Zellen	34
4.2	Zytokinetik	34
4.3	Eigenschaften der Zellmembranoberfläche.....	34
4.3.1	Expression des Scavenger-Rezeptors MSR-A	34

IV	Diskussion	35
1	Einflussgrößen der Schaumzellbildung	36
1.1	Einfluss diabetogener Herkunft der Zellen	36
1.2	Einfluss des Mediums	41
2	Einflussgrößen sezernierender Eigenschaften der Schaumzellen	44
2.1	Schaumzellen aus diabetischen CD34 ⁺ -Progenitorzellen	44
2.1.1	Matrix-Metalloproteinasen-Aktivität	44
2.2	Einfluss des Glukosegehaltes im Medium	48
2.2.1	Matrix-Metalloproteinasen-Aktivität	48
3	Ausblicke und Bedeutung für die Zukunft	49
4	Schlussfolgerung	51
V	Zusammenfassung	52
VI	Anhang	54
1	Abbildungen.....	54
2	Statistik.....	67
3	Tabellen.....	76
VII	Literaturverzeichnis	77
VIII	Danksagung	84
IX	Lebenslauf	85

Abkürzungsverzeichnis

ABC Transporter	ATP-binding cassette-transporter
ACD-Puffer	Acid-Citrat-Dextrose-Puffer
ADA	Amerikanische Diabetes Gesellschaft
AGE	Advanced Glycation Endproducts
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
EPC	Endothelial progenitor cells
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FcR	FcγRIIA Rezeptor
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gravity
h	Stunden
HbA1c	Hämoglobin A1c
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
ICAM-1	Inter Cellular Adhesion Molecule-1
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
kD	Kilo Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LOX-1	Lectin-like Oxidized Low Density Lipoprotein Receptor-1
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
mg	Milligramm
min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinasen

MSR-A	Macrophage-Scavenger-Receptor-A
OD	Optische Dichte
OxLDL	Oxidiertes Low Density Lipoprotein
PDGF	Platelet derived-Growth-Factor
PFA	Paraformaldehyd
PPAR- γ	Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor γ
PRP	Plättchenreiche Plasma
SDF-1	Stromal cell-Derived Factor-1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SR-A	Class A macrophage scavenger receptor
TGF-1 β	Transforming Growth Factor-1 β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Hydroxymethyl-aminomethane
V	Volt
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

I Einleitung

Weltweit stellt Diabetes mellitus ein zunehmendes Problem dar. Epidemiologischen Studien zufolge werden nicht nur die vom Fortschritt geprägten Industrieländer mit einem durch diese Krankheit verursachten Anstieg der Mortalität von 42 % zwischen den Jahren 1995 und 2025 zu kämpfen haben, auch die Entwicklungsländer werden mit einer Prävalenzsteigerung von 170 % in diesem Zeitraum betroffen sein¹.

Bevölkerungswachstum, demografischer Wandel der westlichen Welt, Adipositas sowie ein durch zunehmende körperliche Inaktivität gekennzeichneter Lebensstil führen zu einer stetig steigenden Zahl an Diabetikern.

Somit wird sich die Zahl der diabetischen Patienten vom Jahr 2000 bis zum Jahr 2030 voraussichtlich von 171 Millionen auf 366 Millionen weltweit erhöhen². Diese Tatsache lässt in der Zukunft sowohl ökonomische als auch klinische Komplikationen erwarten.

Um den klinischen Problemen dieser weit verbreiteten Erkrankung zu begegnen, liegt ein Schwerpunkt der heutigen Forschung auf der Untersuchung arteriosklerotischer Veränderungen der großen und kleinen Gefäße, für welche Diabetiker eine Prädisposition aufweisen^{3,4} und deren Pathogenese bis heute noch nicht vollständig geklärt werden konnte.

Die häufigste Todesursache in Deutschland ist die durch Arteriosklerose verursachte Koronare Herzkrankheit⁵. 58 Millionen Amerikaner sind von kardiovaskulären Erkrankungen betroffen, wovon die Mehrheit durch Arteriosklerose verschuldet ist⁶.

Wird die Inzidenz der arteriosklerotischen Komplikationen bei Diabetikern, wie beispielsweise die KHK, berücksichtigt, so ist ein um 2-3fach erhöhtes Auftreten dieses weit verbreiteten vaskulären Geschehens zu erkennen^{3,4}. Die große Zahl der betroffenen Patienten unterstreicht die Bedeutung dieses Forschungsbereiches.

1 Diabetes mellitus

1.1 Definition

Der Diabetes mellitus ist eine Gruppierung von metabolischen Erkrankungen, welche sich durch Hyperglykämie charakterisiert und ihren Ursprung im Defekt der Insulinsekretion, Insulinwirkung oder in beidem hat⁷. Das auf Insulin unzulänglich reagierende und somit insulinresistente Gewebe bei Diabetes mellitus Typ 2 beziehungsweise der absolute Insulinmangel bei Diabetes mellitus Typ 1 bringt in der Folge Dysbalancen im Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel mit sich.

Der chronisch erhöhte Plasmaglukosespiegel und auch die veränderten Triglyzerid- und Eiweißmetabolismen führen zu Langzeitschäden und Funktionsbeeinträchtigungen aller Organe, wobei die Nieren, Augen, Nerven und Blutgefäße besonders stark in Mitleidenschaft gezogen werden. Mengenmäßig ist der Diabetes mellitus Typ 2 die häufigste Stoffwechselstörung der großen Gruppe an Diabetikern. Somit ist die Pathogenese wie auch die Entwicklung der Langzeitschäden bei dieser Diabetesform von besonderer Bedeutung im Kampf gegen arteriosklerotische Komplikationen.

1.2 Diabetes mellitus Typ 2

Dieser Diabetes ist durch einen relativen Insulinmangel charakterisiert und tritt meist nach dem 40. Lebensjahr auf. Es kommt selten zu fulminanten Entgleisungen des Stoffwechsels. Die Folgeerkrankungen, wie Mikro- und Makroangiopathie, sind jedoch in ihrem klinischen Verlauf nicht zu vernachlässigen.

Meist wird die Diagnose als Zufallsbefund gestellt. Der Pathomechanismus des Typ 2 Diabetes beruht auf einer gestörten Insulinsekretion⁸, einer Insulinresistenz des peripheren Gewebes⁸⁻¹¹ und einer erhöhten Glukoseproduktion der Leber trotz bestehender Hyperglykämie¹².

Die periphere Insulinresistenz lässt sich auf Rezeptordefekte und/oder Defekte nachfolgender zellulärer Signaltransduktionswege zurückführen. Beide führen zu einer gestörten Glukoseverwertung der Zellen.

Die Studienlage zeigt bei positiver Familienanamnese eine Prädisposition für Diabetes Typ 2, welcher mit frühzeitigem Krankheitsbeginn, höheren nüchtern C-Peptid-Werten sowie einem erhöhten BMI vergesellschaftet ist¹³. Dies lässt auf eine genetische Achse des Typ 2 Diabetes schließen. Auch die Tatsache, dass über 90 %

eineiiger männlicher Zwillinge von Diabetikern Typ 2 an derselben Form des Diabetes erkranken¹⁴, spricht für diese Schlussfolgerung.

Neben der genetischen Veranlagung spielen jedoch auch Übergewicht¹⁵, die speziell bauchfettbetonte Stammfettsucht^{16,17}, mangelnde Bewegung und hohes Alter eine ausschlaggebende Rolle in der Entstehung des Typ 2. Aufgrund der nur langsam degenerierenden und somit noch lange die Funktion erhaltenden β -Zellen kann der hohe Glukosespiegel diätetisch beziehungsweise mit oralen Antidiabetika therapiert werden.

1.3 Diabetes und Stammzellen

Der Diabetes ist eine Erkrankung, die sich an multiplen Orten im Körper abspielt. Stammzellen werden vom Diabetes ebenso beeinflusst wie ausdifferenzierte Zellen. Dies führt je nach Aufgabe der Zellgruppen zu unterschiedlichen und bedeutsamen Veränderungen im menschlichen Organismus.

Ein bedeutsames und für pathologische Prozesse relevantes Organsystem, das vom Diabetes und dessen Stammzellalterationen negativ beeinflusst wird, ist das kardiovaskuläre System.

Dies zeigt sich bei den mesenchymalen Stammzellen des Myokards, die durch die diabetische Stoffwechsellage in ihrer Funktionalität und Lebensdauer deutlich beeinträchtigt werden und zu Einbußen bezüglich der Leistung und Regenerationsfähigkeit¹⁸ des Herzmuskels führen.

Vor allem führen vaskuläre Veränderungen zu pathologischen Entwicklungen im Gefäßsystem und speziell auch zu fortschreitender Minderperfusion des Herzmuskels aufgrund okkludierter Herzkranzgefäße.

Hierfür sind die diabetischen Einflüsse auf die Blutzellen und deren Progenitorzellen bis hin zu den Stammzellen verantwortlich. Als Stammzellen der hämatogenen Zellen gelten die CD34⁺-Zellen. Ergebnisse zytomorphologischer und funktioneller Untersuchungen zeigen deutliche Veränderung im Migrationsverhalten derselben¹⁹. Gleichzeitig zeigen sich auch deutliche Veränderungen im Zytoskelett¹⁹ dieser diabetischen CD34⁺-Zellen. Thum et al.²⁰ wiesen weitere diabetische Modifikationen im Enzymsystem von Progenitorzellen nach, wobei eine dysregulative Störung der *endothelial nitric oxide synthetase* bei den im Knochenmark befindlichen Zellen und mit Glukose behandelten Progenitorzellen von Bedeutung zu sein scheint. Eventuell

ist dies ein Grund für die Dysfunktion der Zellen und so im Hinblick auf die Gefäßregeneration von Relevanz.

Des Weiteren lässt sich bei Diabetikern eine deutlich verminderte Anzahl endothelialer Progenitorzellen im Blut nachweisen²¹. Die wenigen vorhandenen Zellen weisen außerdem im Vergleich zu gesunden Progenitorzellen ein vermindertes Adhäsionsverhalten und eine herabgesetzte Proliferationsfähigkeit auf²², was sich wiederum negativ auf die Gefäßregeneration auswirkt. Jedoch kann dies mit Hyperoxie und SDF-1 α angegangen werden²³.

2 Arteriosklerose

2.1 Definition

(WHO): „Arteriosklerose ist eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.“²⁴

Die Arteriosklerose kann als ein entzündlicher, multifaktorieller und degenerativer Prozess in der Gefäßwand verstanden werden, dessen Progredienz zu einer Obstruktion des Gefäßlumens führt. Häufig sind mehrere Gefäßprovinzen gleichzeitig betroffen, was den systemischen Charakter dieser Erkrankung verdeutlicht.

2.2 Atherogenese

Die frühe Phase der Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen ist die Läsion der Endothelschranke, die ihre Aufgabe als Barriere für zahlreiche Bestandteile des Blutes nur noch bedingt wahrnehmen kann. Dort wo der uniforme und laminäre Blutfluss gestört wird (unter anderem an Aufzweigungen der Gefäße²⁵) befinden sich Prädilektionsstellen, in denen die Barrierefunktion nur noch eingeschränkt gewährleistet ist. Lipoproteine (besonders LDL) und andere Plasmabestandteile gelangen dann in die subendotheliale Matrix des Gefäßes. Diese Low Density Lipoproteine unterliegen hier nun diversen Modifikationen durch enzymatische Oxidation, Lipolyse, Proteolyse und Aggregation. Dadurch wird die Entzündungsreaktion in dieser Gefäßprovinz unterhalten und die Aktivierung des darüber liegenden Endothels veranlasst, was dieses adhäsiver für Thrombozyten macht. Zurückzuführen ist dies auf die Expression von Oberflächenmolekülen seitens

der Endothelzellen, unter anderem von ICAM-1 und $\alpha_v\beta_3$ ^{26,27}. Des Weiteren sind auch Thrombozyten mit ihrem GPIIb/IIIa-Rezeptor an der Adhäsion beteiligt²⁷.

Der Adhäsionsvorgang bewirkt eine Aktivierung der Blutplättchen, woraufhin diese proinflammatorische Substanzen, wie PF-4- und CD40-Ligand²⁸, in ihre Umgebung absondern (siehe Anhang, Abbildung 1). Diese Freisetzung induziert im Endothel verstärkt chemotaktische, adhäsive und proteolytische Vorgänge und unterhält Interaktionen des aktivierten Endothels mit Monozyten^{29,30} durch die Sekretion des Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) seitens der Endothelien. MCP-1 ist in arteriosklerotischen Läsionen in besonders hoher Konzentration anzutreffen und somit bei Patienten mit arteriosklerotischen Erkrankungen erhöht³¹.

Die chemotaktisch stimulierten Monozyten migrieren in die Intima des inflammatorischen Gefäßbereiches, wo sie sich zu Makrophagen ausdifferenzieren. Sie nehmen oxidiertes LDL in ihre Vakuolen auf, ohne die Möglichkeit zu besitzen, dieses Cholesterin weiter zu verstoffwechseln. Die mit oxLDL gefüllten Vakuolen lagern sich im Zytoplasma ab und verleihen den Zellen ein schaumartiges Aussehen (siehe Anhang, Abbildung 2). An der Aufnahme des LDL und somit an der Schaumzellentstehung sind vor allem Scavenger-Rezeptoren wie CD68, MSR-A, LOX-1 und CD36 beteiligt^{6,25,32}, wobei auch Thrombozyten ein Beitrag in der oxLDL-induzierten Schaumzellentstehung zugesprochen wird³³. Begründet wird diese Annahme mit der Tatsache, dass Thrombozyten in Kokultur mit CD34⁺-Progenitorzellen in vitro eine morphologische Veränderung in den CD34⁺-Zellen induzieren, die die Phagozytose umgebener Plättchen durch die Progenitorzellen beinhaltet und in der Bildung der Schaumzellen endet^{34,35} (siehe Anhang, Abbildung 3).

Die Schaumzellansammlungen können auf morphologischem Niveau in der Gefäßwand sichtbar sein und werden als „fatty streaks“ bezeichnet.

Diese Entstehung der „fatty streaks“ ist abhängig von der Schaumzellgenese und unterliegt somit zumindest teilweise auch dem Einfluss des Monozyten-Colony Stimulating Factor (M-CSF). Dieser reguliert die Expression der Scavenger-Rezeptoren und somit auch die oxLDL-Aufnahme der Makrophagen^{36,37}. Bis zum Stadium der „fatty streaks“ ist die Möglichkeit der arteriosklerotischen Regression gegeben.

Die fortgeschrittene Phase der Läsion zeichnet sich durch die Persistenz von Risikofaktoren aus, wie Angiotensin II und Homocystein, die glatte Muskelzellen zur Migration und Proliferation anregen. Hierzu tragen auch die migrierten Makrophagen

und T-Lymphozyten bei, die durch Chemokine und Wachstumsfaktoren simultan die Wirkung der Risikofaktoren unterstützen und zusätzlich die Produktion extrazellulärer Matrix der glatten Muskelzellen unterhalten. Großteils wird die Produktion der extrazellulären Matrix auch von der weiteren Cholesterinaufnahme in die subendotheliale Matrix bestimmt, da diese in einer progredienten Endothelläsion mündet und so die Sezernierung von Platelet derived Growth Factor (PDGF) sowie weiteren Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Zytokinen induziert. Diese thrombozytären Wachstumsfaktoren führen zu einer verstärkten Kollagenproduktion glatter Gefäßmuskelzellen³⁸ und tragen zum Wachstum und zur Fibrosierung des entstandenen Plaques bei. Im Zentrum der Läsion bildet sich ein nekrotischer Kern, bestehend aus apoptotischen Zellen und akkumuliertem Cholesterin.

Die Phase der komplexen Läsion entsteht durch das Fortschreiten des arteriosklerotischen Prozesses, in dem sich die fibröse Kappe nun lumenseitig in den Strömungsbereich wölbt.

Die Stabilität des Plaques bestimmt den weiteren Verlauf der Erkrankung und ist abhängig von der Produktion und dem Abbau des fibrösen Materials. Auf- wie Abbau werden von den im Plaque präsenten Makrophagen und glatten Muskelzellen beeinflusst.

Enzyme, wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die extrazelluläre Matrix abbauen, führen zu einer Degradierung des fibrösen Geflechts des Plaques und vermindern dessen strukturelle Integrität. Sie erhöhen so die Wahrscheinlichkeit für thrombembolische Ereignisse aufgrund der Plaqueruptur³⁹. In erster Linie sind bei diesem enzymatischen Vorgang die ins Subendothel migrierten Makrophagen und die daraus entstehenden Schaumzellen von Bedeutung, da sie als Hauptproduzent dieser Proteinasen gelten^{40,41}.

Neben einer auch ohne Stimulus erfolgenden basalen MMP-Sekretion⁴¹ hängt die Sekretionsmenge der MMPs von inflammatorischen Mediatoren, wie zum Beispiel TNF- α und IL-1 β ⁴², ab.

Libby, P. beschreibt, dass T-Lymphozyten Chemokine, wie IL-10 und IL-4, produzieren können⁴⁰, die die MMP-Sekretion *in vitro* direkt inhibieren oder indirekt über die Sekretion gewebeeigener MMP-Enzymblocker antagonisieren⁴⁰.

3 CD34⁺-Stammzellen

3.1 Definition

Alle hämatopoetischen Zelltypen gehen aus gemeinsamen Stammzellen hervor. Diese sind pluripotent und somit in der Lage, identische Nachkommen zu generieren (Selbsterneuerung) und sich zytokinvermittelt in zahlreiche Reifungsstufen der Hämatopoese zu differenzieren.

Mit Hilfe der beschriebenen hämatopoetischen Kapazität lassen sich nach Metcalf⁴³ vier Stadien der Zellreihe unterscheiden: Stammzellen, Progenitorzellen, morphologisch-identifizierbare, proliferierende Zellen und letztendlich differenzierte Zellen.

3.2 CD34-Rezeptor

Mitte der 80er Jahre wurde ein Antikörper entdeckt, der im Knochenmark koloniebildende Vorläuferzellen identifizieren konnte und somit Grundlage eines neuen Anreicherungsverfahrens derselben darstellte^{44,45}.

Das Antigen der Zellen wurde später „CD34“ genannt und befindet sich auf etwa 1,5 % aller mononukleären Zellen des Knochenmarkes und somit ebenfalls auf den lymphohämatopoetischen Stammzellen und Progenitorzellen⁴⁶.

Der Rezeptor selbst (Masse 115 kD) ist ein stark glykosiliertes Typ I Transmembranprotein und gehört zur Familie der Sialoglykoproteine.

Die Funktion des Oberflächenrezeptors ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch stark von den Zellen abhängig, die ihn exprimieren. Die Kapillaren der meisten Gewebearten sowie das Endothel der Umbilikalarterien sind CD34-positiv^{47,48}. Es wird angenommen, dass der CD34-Rezeptor auf Endothelzellen eine Rolle im Leukozyten-Homingprozess bei der Entzündungsreaktion spielt. Dem CD34-Rezeptor der hämatopoetischen Stammzellen und Progenitorzellen wird ein wichtiger Beitrag hinsichtlich des Adhäsionsbestrebens im Knochenmark zugeschrieben⁴⁶.

3.3 CD34⁺-hämatopoetische Zellen

Hämatopoetische Stammzellen mit dem CD34-Rezeptor als Oberflächenmarker finden sich im Knochenmark, dem Nabelschnurblut, peripherem Blut und fetalem Gewebe⁴⁹.

Sie bilden die Basis für eine weitere Differenzierung in Richtung hämatopoetischer Progenitorzellen, wobei hier bereits zwischen lymphoiden und myeloiden Progenitorzellen unterschieden werden muss. Endprodukt des

Differenzierungsprozesses sind letztendlich Lymphozyten aus lymphoiden Progenitorzellen und unter anderem reife Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Monozyten aus den myeloiden Progenitorzellen⁵⁰ (siehe Anhang, Abbildung 4). Zugleich konnte an den sogenannten endothelialen Progenitorzellen (EPC) der CD34-Oberflächenrezeptor identifiziert werden. Von endothelialen Progenitorzellen werden arterioprotektive Vorgänge übernommen, die durch ihr breites Regenerationspotential hinsichtlich Herzmuskelzellen und Endothelien große Möglichkeiten in der Forschung erkennen lassen. Sie wirken den Thrombozyten, den Monozyten und den daraus differenzierenden Makrophagen entgegen, welche proarteriosklerotische Vorgänge unterhalten.

4 Funktion atherogenetisch relevanter Zellen in diabetischem Milieu

Bereits veröffentlichte Daten zeigen eine eingeschränkte Funktionsweise von diabetischen CD34⁺-Zellen. Gleiches ließ sich bei Zellreihen nachweisen, welche von diesen diabetischen Progenitorzellen abstammen^{19,51-55}. Daraus lässt sich schließen, dass die arteriosklerotische Problematik zu einem großen Teil zellulären Ursprungs ist und somit Blutzellen und deren Vorläufer eine Rolle in der arteriosklerotischen Pathogenese spielen.

4.1 Funktionsdefekt CD34⁺-Progenitorzellen von Diabetikern

Diabetischer Einfluss führt auch zu Veränderungen in Funktionalität und Morphologie CD34-positiver Progenitorzellen. Zum einen ist das Migrationsverhalten diabetischer Zellen bei chemotaktischen Reizen durch Mediatoren, wie beispielsweise SDF-1 oder VEGF, um bis zu 70 % vermindert. Dies lässt sich teilweise durch eine erhöhte Aktivität der CD26/dipeptidyl Peptidase IV erklären, da dieses Enzym bei Diabetikern erhöht vorliegt und in seiner Eigenschaft als Peptidase SDF-1 spaltet beziehungsweise inaktiviert.¹⁹

Weiterhin weist auch das Zytoskelett diabetischer CD34⁺-Progenitorzellen erhebliche Veränderungen auf. Die Zellen scheinen im Vergleich zu gesunden Zellen in sehr geringem Maße verformbar und steif zu sein^{19,51}. Grund hierfür könnte eventuell eine Konzentrationsveränderung intrazellulärer Proteine wie VASP sein, welches bedeutsam für die Verlängerung von Aktin Filamenten ist.

CD34⁺-Progenitorzellen sind in der Lage, vaskuloprotektive Vorgänge zu unterstützen, indem sie als endotheliale Progenitorzellen (EPC) fungieren. Hierfür ist die Migration in geschädigtes Endothel nötig. Es wurde gezeigt, dass dieser Migrationsvorgang durch glykosilierte Proteine, sogenannte „advanced glycation endproducts“ (AGEs), gestört wird. Die Entstehung solcher Proteine wird durch oxidativen Stress und hohe Blutglukose-Spiegel begünstigt und findet gehäuft im Stoffwechsel von Diabetikern statt. Außerdem sind die beschriebenen AGEs in der Lage, die an vaskuloprotektiven Vorgängen beteiligten endothelialen Progenitorzellen in die Apoptose zu führen⁵⁶.

Die Arteriosklerose wird durch eine verminderte Anzahl zirkulierender EPCs, wie sie bei Diabetikern auftritt, begünstigt. Somit können regenerative Gefäßprozesse nur vermindert ablaufen²¹. Gleiches bestätigen auch neueste Erkenntnisse, wonach eine reduzierte Menge an zirkulierenden EPCs ein Prädiktor für zukünftige arteriosklerotische Ereignisse sein kann⁵⁷.

5 Ziele der Arbeit

5.1 Diabetogene Faktoren

In dieser Promotionsarbeit wurde untersucht, ob folgende diabetogene Faktoren die Schaumzellbildung in Kokulturen aus CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten beeinflussen:

- a. Diabetische Herkunft der CD34⁺-Progenitorzellen,
- b. steigende Glukosekonzentration im Kulturmedium,
- c. diabetische Herkunft der Thrombozyten,
- d. steigende Insulinkonzentration im Kulturmedium.

5.2 Allgemeine Fragestellungen

Die Kokulturen mit CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten wurden den erwähnten diabetogenen Faktoren ausgesetzt. Die Fragestellungen, die es im Rahmen dieser Arbeit zu beantworten galt, bezogen sich auf die Klärung, ob durch die diabetogenen Einflüsse eine Alteration in Morphologie und Differenzierung der Schaumzellen besteht und ob sich die Zytokinetik des Entstehungsprozesses der Schaumzellen im Hinblick auf vorliegende diabetogene Einflüsse ändern würde.

5.3 Spezielle Fragestellungen

Hinsichtlich der Herkunft der CD34⁺-Progenitorzellen aus diabetischem Knochenmark stellte sich im ersten Teil dieser Arbeit die Frage, inwieweit diese auf die CD34⁺-Progenitorzellen einwirkende diabetische Komponente *in vivo* Einfluss auf die sekretorischen Eigenschaften der Schaumzellen hat. Untersucht wurde die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9, welche in ihrer Eigenschaft als Extrazellulärmatrix degradierende Enzyme einen wichtigen Einfluss auf die Plaquestabilität haben und so relevant für thrombembolische Ereignisse als Komplikation einer arteriosklerotisch veränderten Gefäßwand sind.

Weiterhin stellte sich in diesem Abschnitt die Frage, ob die Schaumzellen, welche aus diabetischen CD34⁺-Progenitorzellen entstanden sind, in verstärktem Maße den Mediator M-CSF sekretieren und so eine gesteigerte Proliferations- und Differenzierungsbereitschaft der Schaumzellen im diabetischen Plaque begründen könnten (siehe Absatz I.2.2).

Zur Klärung der Mechanismen der abweichenden Schaumzellentstehung gehörte zusätzlich, Unterschiede in der Scavenger-Rezeptor-Oberflächenexpression der Schaumzellen aufzudecken. Ein bedeutsamer Scavenger-Rezeptor repräsentiert der CD68 Rezeptor. Diese Arbeit versucht Unterschiede in der CD68-Oberflächenexpression der Schaumzellen zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern festzustellen. Auf diese Weise könnte ein Mechanismus der verstärkten Schaumzellgenese beim Diabetiker erklärt werden, welcher im verstärkten Influx von Cholesterin in die Schaumzelle durch eine erhöhte Expression des CD68-Oberflächenrezeptors seine Begründung findet.

Im zweiten Abschnitt galt es zu klären, ob die Glukosekonzentration im Kulturmedium ebenfalls die Sekretionseigenschaften der Schaumzellen zu beeinflussen vermag. Deshalb lag eine weitere Fragestellung dieser Arbeit darin, eine Korrelation im Aktivitätsniveau der Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 im Kulturüberstand der Kokulturen zur Glukosekonzentration im Kulturmedium nachzuweisen. Hierfür wurde das Verhalten gesunder CD34⁺-Progenitorzellen auf die verschiedenen Kulturbedingungen untersucht.

Der dritte Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob bei der Schaumzellentstehung durch Thrombozyten diabetischer Herkunft und gesunden CD34⁺-Progenitorzellen in Kokultur Veränderungen in der Oberflächenrezeptor-

Repräsentation der entstandenen Schaumzellen vorliegen, da Thrombozyten diabetischer Patienten Alterationen aufweisen. Diese lassen sich mit der diabetischen Stoffwechsellage begründen und vermögen so, eventuell nachweisbare diabetische Alterationen bei den Schaumzellen zu induzieren. Hierfür wurden die für die Schaumzellentstehung wichtigen Scavenger-Rezeptoren und speziell der Rezeptor MSR-A (siehe auch Absatz 1.2.2) untersucht und die Auswirkung der Thrombozyten diabetischer Herkunft eruiert.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Insulin auf die Schaumzellbildung untersucht. Da ein durch Insulin gut eingestellter Diabetes die arteriosklerotische Progredienz mindert, wäre denkbar dass dies zum Teil auch an einer reduzierten Schaumzellbildung liegt. Es liegt nahe, dass ein Grund für eine reduzierte Schaumzellbildung die insulininduzierte Verminderung der Oberflächenpräsentation der oxLDL aufnehmenden Scavenger-Rezeptoren auf der Schaumzelle darstellt. Zur Klärung dieser These wurde ein quantitativer Nachweis des Scavenger-Rezeptors MSR-A angestrebt und unter den Bedingungen der ansteigenden Insulinkonzentration und von absolutem Insulinmangel untersucht.

II Patienten, Materialien und Methoden

1 Klinischer Teil

1.1 Patienten

1.1.1 Patientengruppen

- **Patientengruppe A**

Die für diese Arbeit eingesetzten Knochenmarkproben stammen von Patienten der Herz-Thorax-Chirurgie des Universitätsklinikums Tübingen, bei welchen sich die klinische Indikation einer offenen Sternotomie ergab. Es erfolgte eine ärztlich durchgeführte mündliche und schriftliche Aufklärung .

Zu gruppenspezifischen Eigenschaften siehe Anhang, Tabelle 1.

- **Patientengruppe B**

Das für die Arbeit benötigte Diabetikerblut wurde von stationär aufgenommenen Patienten der kardiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen nach ärztlich durchgeführter mündlicher und schriftlicher Aufklärung abgenommen.

- **Patientengruppe C**

Das Nabelschnurblut stammt aus dem Kreissaal des Krankenhauses Herrenberg und der Frauenklinik Tübingen. Hier erfolgten ebenfalls ärztliche Aufklärung und schriftliche Genehmigung der Entnahme seitens der Patientinnen.

Das Studienkonzept wurde der Ethik-Kommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen zur Prüfung vorgelegt und genehmigt (Antragsnummer 76/2005 / Genehmigungsdatum 3.3.2005)

1.1.2 Ausschlusskriterien

- **Patientengruppe A**

Es galt Patienten der Gruppe A auszuschließen, die folgende Kennzeichen aufwiesen:

- Patienten mit chronischen oder metabolischen Erkrankungen, die sich auf die Qualität der Stammzellen auswirken, wie maligne Lymphome, Leukämien, chronisch myeloproliferative Erkrankungen.
- Neurologische Erkrankungen, Tumorerkrankungen, Sprachschwierigkeiten.
- Wundheilungsstörungen.

▪ Patientengruppe B und C

In den Gruppen B und C wurden Patienten mit folgenden Eigenschaften ausgeschlossen:

- Alle chronischen oder metabolischen Erkrankungen, die sich auf die Qualität der Stammzellen auswirken, wie maligne Lymphome, Leukämien, chronisch myeloproliferative Erkrankungen.
- Neurologische Erkrankungen, Tumorerkrankungen, Sprachschwierigkeiten.
- Bei Gruppe B die Einnahme von Acetylsalicylsäure innerhalb der letzten 10 Tage.

1.1.3 Einschlusskriterien

▪ Patientengruppe A und B

In die Gruppen A und B wurden Patienten eingeschlossen, die folgende Kriterien erfüllten:

- Alter \geq 18 Jahre, Einwilligungsfähigkeit vorhanden,
- Männer und Frauen,
- Diabetiker, die einen Nüchternblutglukosewert $>$ 126 mg/dl, einen HbA1c $>$ 6,5 % oder eine Medikation mit einem oralen Antidiabetikum oder Insulin aufweisen; = Zielgröße,
- Nichtdiabetiker, die oben genannte diabetische Merkmale nicht aufweisen; = Kontrollgruppe

▪ Patientengruppe C

Bei Gruppe C galt es Patienten mit folgenden Kriterien einzuschließen:

- Alter \geq 18 Jahre, Einwilligungsfähigkeit vorhanden.
- Normaler Schwangerschaftsverlauf.

1.2 Chirurgische Stammzellgewinnung

1.2.1 Gewinnung des Probenmaterials

CD34⁺-Progenitorzellen sind in hoher Konzentration im menschlichen Knochenmark zu finden. Daher bot sich die mediane Sternotomie als operativer Zugang für thorakale chirurgische Interventionen bei Bypassoperationen an.

1.2.2 Zugangswege

Die Hautinzision erfolgt vom Jugulum bis zum Xyphoid. Das Periost wird mit dem Kauter durchtrennt und folgend kranial am Oberrand des Manubriums sterni der retrosternale Raum präpariert. Das Sternum wird dann mit einer oszillierenden Säge in der Mittellinie durchtrennt. Letztendlich wird der Brustkorb mit einem „Sternumsperrer“ gespreizt und an einem der beiden Schnittränder des Sternums mit einem scharfen Löffel Knochenmark entnommen.

2 Experimenteller Teil

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeines

Die Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt, welches über eine Millipore-Anlage gefiltert wurde.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

- | | |
|---|-----------------------|
| • Ammoniumchlorid-Lösung | StemCell Technologies |
| • Bromphenolblau | Sigma-Aldrich |
| • BSA (≥ 96 %) | Sigma-Aldrich |
| • Citronensäure (99,5 %) | Sigma-Aldrich |
| • Coomassie [®] Brilliant Blue | BioRad |
| • Essigsäure (100 %) | Merck |
| • Ficoll (Bicoll separating solution, 1,077 g/ml) | Biochrom |
| • Fötale Kälberserum (FCS) (100 %) | PAA Laboratories |
| • Gelatine (2 % solution) | Sigma-Aldrich |
| • D-PBS | Invitrogen |
| • DMEM- Medium | Invitrogen |
| • D-(+)Glukose | Merk |
| • Glycin (> 99 %) | Fluka |
| • Glycerin (> 98 %) | Merck |
| • HBSS 10x | Invitrogen |
| • HEPES (1 M Pufferlösung) | Invitrogen |
| • HEPES PUFFERAN [®] ($\geq 99,5$ %) | Roth |

- IMDM-Medium+GlutaMAX™-I Invitrogen
- Insulin, human recombinant, expressed in yeast ($\geq 27,5$ U/mg) Sigma-Aldrich
- KCl Serva
- Methanol ($> 99,9$ %) Merck
- NaCl Merck
- NaH_2PO_4 (≥ 98 %) Roth
- NaHCO_3 (≥ 98 %) Merck
- NaOH (10 M) Universitätsapotheker
- Na_3Citrat (> 99 %) Merck
- Paraformaldehyd (≥ 95 %) AppliChem
- Phosphate Buffered Saline (PBS) Tabletten Invitrogen
- Penicillin/ Streptomycin 20x Invitrogen
- Salzsäure (37 %) AppliChem
- SDS (≥ 99 %) Roth
- SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard Invitrogen
- Tris (> 99 %), Base Roth
- Trypsin-EDTA 0,25 % Trypsin, EDTA 4Na 1x Invitrogen
- Hoechst 33342 Sigma
- Dil-AcLDL Bio Trend

2.1.3 Puffer und Lösungen

- Türklösung Merck
- Zymogram Renaturation-Buffer (1x) Invitrogen
- Zymogram Development-Buffer (1x) Invitrogen
- Gel-Dry™ Drying Solution Invitrogen
- Non-Reducing-Sample Buffer [2,18 ml 1 M Tris pH 6,8 ; 3,3 ml 20 % SDS; 3,3 ml Glycerin; 1,67 ml H_2O ; 1 Spatelspitze Bromphenolblau]
- Acid-Citrat-Dextrose-Puffer [12,5 g $\text{Na}_3\text{-Citrat}$; 6,82 g Citronensäure; 10 g Glukose; 500 ml aqua dest. ; mit NaOH auf pH 4,69]
- Thyrodes-HEPES-Puffer, pH 6,5 [NaCl 150 mmol/L, KCl 1 mmol/L, NaHCO_3 2,5 mmol/L, NaH_2PO_4 0,36 mmol/L, Glukose x mmol/L, BSA 1 mg/ml, mit HEPES PUFFERAN® auf pH 6,5]

- 1: Glukose x = 0 mmol/L
- 2: Glukose x = 5,5 mmol/L
- 3: Glukose x = 16,34 mmol/L
- 4: Glukose x = 24,96 mmol/L
- 5: Glukose x = 29,97 mmol/L
- Thyrodes-HEPES-Puffer, pH 7,4 [NaCl 150 mmol/L, KCl 1 mmol/L, NaHCO₃ 2,5 mmol/L, NaH₂PO₄ 0,36 mmol/L, Glukose x mmol/L, BSA 1 mg/ml, mit HEPES PUFFERAN® auf pH 6,5, dann mit HCl auf PH 7,4]
 - 1: Glukose x = 0 mmol/L
 - 2: Glukose x = 5,5 mmol/L
 - 3: Glukose x = 16,34 mmol/L
 - 4: Glukose x = 24,96 mmol/L
 - 5: Glukose x = 29,97 mmol/L
- 1 % Paraformaldehyd(PFA)-Lösung [0,5 g Paraformaldehyd; 45 ml PBS; 4 µl 10 N NaOH; 5 ml 10x PBS , pH 7,4]
- PBS-Puffer (1x) [1 PBS Tablette ; 500 ml H₂O, pH 7,5]
- Coomassie-Färbelösung [0,25 g Coomassie® Brilliant Blue; 45 ml H₂O; 45 ml Methanol; 10 ml Essigsäure]
- Mastermix 1 [MSR-A Antikörperlösung 250 µg/ml; IMDM-Medium; 1:124]
- Mastermix 2 [Polyclonal Rabbit AntiMouse IgG; IMDM-Medium; 1:100]
- HF-Puffer [100 ml HBSS (10x); 20 ml FCS (20 %); 10 ml HEPES (1 M); 10 ml Pen.Strep; mit Aqua dest. auf 1 L auffüllen]
- SDS-Kammerpuffer [3,02 g Tris; 18,8 g Glycin; 2 g SDS; 900 ml H₂O; mit HCl auf pH 8,3]

2.1.4 Zymografie

- | | |
|--|------------|
| • Zymogramm Gel | Invitrogen |
| • Cellophan | Invitrogen |
| • Gel-Trockenrahmen | Invitrogen |
| • Elektrophoresekammer XCell SureLock™ | Invitrogen |

2.1.5 Geräte

- | | |
|-----------------|-----------------|
| • Sysmex KX-21N | Sysmex Digitana |
|-----------------|-----------------|

- Zentrifugen (Multifuge 1s) Heraeus, Eppendorf
- Densitometer (Molecular Imager Gel Doc) Bio Rad
- Durchflußzytometer (FACS-Calibur) Bectin-Dickinson
- Mikroskop (Axiovert 200) Zeiss
- Begasungsbrutschränke (MCO-18AIC) Sanyo
- Magnet-Separationssystem (Vario-MACS) Miltenyi Biotech
- Pipettierhilfe(Accujet® pro) Brand
- Pipetten Eppendorf
- Sterilbänke (Hera safe) Thermo
- Vortex (Vortex-Genie 2) Scientific Industries
- ELISA-Reader (GENios Plus) TECAN

2.1.6 Antikörper

- Monoclonal mouse anti-human CD68/FITC DakoCytomation
- FITC mouse IgG₁ κ BD
- Anti human MSR-A Monoclonal Antibody Cosmo Bio
- Polyclonal rabbit anti-mouse Immunoglobulins/RPE DakoCytomation
- Rabbit anti-mouse γ RPE BD

2.1.7 Verbrauchsmaterial

- Parafilm Pechiney
- Zellsieb, 100 µm, Nylon BD Falcon
- FACS-Röhrchen BD
- Gewebeskulturplatte, 96 well, flat bottom Corning
- Neubauer-Zählkammer Assistant
- Rotator Saur
- Magnetseparationssäulen Miltenyi Biotec
- Einmalspritzen, steril, 1 ml, 10 ml, 20 ml B. Braun
- Pipetten, steril, 50 ml, 25 ml, 10 ml, 2 ml Costar
- Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml Eppendorf
- Steilfilter 0,22 µm, Millex Millipore

- Zentrifugationsröhrchen 15 ml, 50 ml Greiner
- Kanülen 20 G 1 ½ 0,9x40 mm BD

2.1.8 Kits

- Quantikine® Human M-CSF ELISA Kit R&D Systems
- CD34⁺Progenitor Cell Isolation Kit Miltenyi Biotec

2.1.9 Software

- CorelDraw 7.0 Corel Corporation
- JMP 7.0 SAS Software

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolierung

Für die Versuche galt es zwei Zellgruppen zu isolieren, CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten.

Grundlage für die Isolation der CD34⁺-Progenitorzellen war sternales Knochenmark beziehungsweise Nabelschnurblut.

Die Reinheit der CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut entsprach > 98 %.

Bei den Knochenmarksproben wurde das Protokoll hinsichtlich der festen Konsistenz des spongiösen Knochenanteils der Entnahmen und den in den Waben befindlichen Zellen modifiziert.

2.2.1.1 Isolierung der CD34⁺-Progenitorzellen

Zur Gewinnung der mononukleären Zellen aus Knochenmark wurde die Probe auf ein Zellsieb gegeben und mit 2 ml PBS-Lösung gespült. Anschließend wurden 15 ml Ficoll in einen 50 ml Falcon gegeben und die gesiebte Suspension darüber geschichtet. Dann wurde die Zentrifugation bei 900 g für 15 min, Bremse 0, und die Abnahme der Interphase mit den mononukleären Zellen durchgeführt. Nun wurden jeweils 2 abgenommene Interphasen in einen 50 ml Falcon gegeben, diese mit D-PBS aufgefüllt und abermals 10 min bei 410 g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 20 ml HF-Puffer resuspendiert.

Zur Gewinnung der mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut wurde die Probe 1:1 mit D-PBS versetzt, dann 20 ml des verdünnten Blutes auf 15 ml Ficoll geschichtet und bei 900 g für 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Es folgte die Abnahme der Interphase, ohne diese mit Erythrozyten zu kontaminieren.

Nun wurden zwei Interphasen in einen 50 ml Falcon pipettiert und mit D-PBS aufgefüllt. Es folgte erneut eine Zentrifugation bei 410 g, 10 min mit Bremse. Danach konnte der Überstand verworfen und 10 ml Ammoniumchlorid zugesetzt werden. Es folgte eine Inkubationszeit von 10 min bei 4 °C auf dem Rotator mit nachfolgender Zentrifugation bei 410 g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml HF- Puffer resuspendiert.

Die Zellkonzentration der jeweiligen Suspensionen wurde mit Hilfe der Neubauerkammer gezählt. Vitale Zellen wurden mit Türklösung von avitale Zellen unterschieden.

Die Zellsuspension, bestehend aus mononukleären Zellen, wurde bei 600 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen, das Pellet daraufhin mit 300 µl HF-Puffer pro $1 \cdot 10^8$ Zellen vorsichtig resuspendiert und 100 µl Blocking-Puffer sowie 100 µl CD34⁺ Beads pro $1 \cdot 10^8$ Zellen zugegeben (CD34⁺Progenitor Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec).

Es folgte eine 30 min Inkubationszeit bei 4 °C auf dem Rotator. Nun wurde 10 ml HF-Puffer zugesetzt und bei 410 g für 5 min abzentrifugiert.

Der Überstand konnte verworfen und das Zellpellet abermals mit 3 ml HF-Puffer resuspendiert werden. Nun wurde die MACS-Trennsäule mit 3 ml HF-Puffer gespült und die Zellsuspension auf die Säule aufgetragen. Nach vollständigem Durchlauf folgte eine dreimalige Spülung mit jeweils 1 ml HF-Puffer, um unmarkierte Zellen auszuschwemmen.

Nun wurde die MACS Säule aus dem Magnetfeld entfernt und weitere 5 ml HF-Puffer auf sie Säule gegeben. Zügig sollte die Flüssigkeit nun mit einem sterilen Stempel durch die Säule gepresst werden, um die angereicherten Zellen auszuspülen. Dieser Separationsvorgang mittels Säule wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Die gewonnene Zellsuspension wurde mit 301 g für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen.

- Versuchsansatz A und C: Das Zellpellet wurde in 500 µl IMDM-Medium resuspendiert.

- Versuchsansatz B: Das Zellpellet wurde in 500 µl DMEM-Medium mit Zusatz von 0 mmol/L; 5,5 mmol/L; 16,34 mmol/L; 24,96 mmol/L Glukose resuspendiert.

Mittels Neubauer-Zählkammer konnte die Zellzahl ermittelt und auf die Konzentration von $3,3 \cdot 10^5$ /ml eingestellt werden.

2.2.1.2 Isolierung der Thrombozyten

Es war darauf zu achten, dass je nach Versuchsansatz ein spezifischer Tyrodes-HEPES-Puffer verwendet wurde.

- Versuchsansatz A :
 - Tyrodes-HEPES-Puffer, pH 6,5 [+5,5 mmol/L Glukose]
 - Tyrodes-HEPES-Puffer, pH 7,4 [+5,5 mmol/L Glukose]
- Versuchsansatz B:
 - Tyrodes-HEPES-Puffer, pH 6,5 [+0 mmol/L; +5,5 mmol/L; +16,34 mmol/L; +24,96 mmol/L Glukose]
 - Tyrodes-HEPES-Puffer, pH 7,4 [+0 mmol/L; +5,5 mmol/L; +16,34 mmol/L; +24,96 mmol/L Glukose]
- Versuchsansatz C:
 - Tyrodes-HEPES-Puffer, pH, 6,5 [+29,97 mmol/L Glukose]
 - Tyrodes-HEPES-Puffer, pH, 7,4 [+29,97 mmol/L Glukose]

Das Blut, aus dem die Thrombozyten isoliert werden sollten, wurde dem Probanden unter geringer Stauung abgenommen. Verwendung fand dafür eine 20 ml Spritze, die bereits mit 4 ml Acid-Citrat-Dextrose (ACD)-Puffer vorbefüllt war. Das Blut wurde vorsichtig in einen Falcon gegeben, bei 210 g für 20 min zentrifugiert und das plättchenreiche Plasma (PRP) dekantiert. Dieses wurde je nach Ansatz mit Tyrodes-HEPES-Puffer, pH 6,5 auf 35 ml aufgefüllt und für 10 min bei 836 g zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen und das Pellet mit Tyrodes-HEPES-Puffer, pH 7,4, beziehungsweise Tyrodes-HEPES-Puffer, pH 6,5 zu gleichen Teilen mit jeweils 200 µl resuspendiert und die Zellkonzentration mit dem Sysmex Hämatologiegerät ermittelt werden. Letztlich wurde mit Tyrodes-HEPES-Puffer, pH 7,4 auf eine Zellkonzentration von $8 \cdot 10^8$ Thrombozyten/ml verdünnt.

2.2.2 Zellkulturen

2.2.2.1 Ausplattierung der CD34⁺-Zellen

Um die Zellen ausplattieren zu können, musste die 96-Wellplatte zuvor mit 0,2 % Gelatine beschichtet und für 10 min bei 37 °C inkubiert werden.

Danach wurden bei jedem der folgenden Ansätze 150 µl der entsprechenden Zellsuspension, also 50000 CD34⁺-Progenitorzellen pro Well, pipettiert.

2.2.2.2 Durchführung Versuchsansatz A

Ziel war die Untersuchung der Auswirkung diabetischer Herkunft der CD34⁺-Progenitorzellen auf die Genese, Zellmorphologie und Enzym- beziehungsweise Oberflächenrezeptor-Expression der entstandenen Schaumzellen. Der Aufbau erfolgte nach Daub et al.^{33,34}.

Der Versuchsansatz beinhaltete die aus Knochenmark separierten CD34⁺-Progenitorzellen von diabetischen Patienten als Zielgruppe und von gesunden Patienten als Kontrolle. Beiden Ansätzen wurden Thrombozyten aus Vollblut nichtdiabetischer Probanden zugesetzt.

Durchführung:

- Auf eine 96-Wellplatte wurden die CD34⁺-Progenitorzellen von Diabetikern beziehungsweise gesunden Probanden aufgebracht.
- 50 µl Thrombozytenlösung wurde nun in den jeweiligen Ansatz gegeben, um eine Endkonzentration von $2 \cdot 10^8$ Thrombozyten/ml zu erhalten.

2.2.2.3 Durchführung Versuchsansatz B

Ziel war die Untersuchung der Auswirkung verschiedener Glukosekonzentrationen auf die Genese, Zellmorphologie und Enzym- beziehungsweise Oberflächenrezeptor-Expression der entstandenen Schaumzellen. Zu diesem Zweck wurden in diesem Versuchsaufbau CD34⁺-Progenitorzellen aus Nabelschnurblut und Thrombozyten von gesunden Probanden kokultiviert. Variiert wurde die Glukosekonzentration im Nährmedium.

Durchführung:

- Auf einer 96-Wellplatte wurden die CD34⁺-Progenitorzellen in ihren verschiedenen glukosehaltigen Medien aufgebracht.

- 50 µl der Thrombozytenlösung wurden nun in den jeweiligen Kulturansatz gegeben, siehe Versuchsaufbau A.

Glukosekonzentrationen am Ende pro Kulturansatz im Medium: 0 g/l; 1 g/l; 2,97 g/l; 4,5 g/l.

2.2.2.4 Durchführung Versuchsansatz C

Ziel war die Untersuchung der Auswirkung diabetischer Thrombozyten sowie unterschiedliche Insulinkonzentrationen auf Genese, Zellmorphologie und Oberflächenrezeptor-Expression der entstandenen Schaumzellen.

Dazu wurde gesunden und an Diabetes erkrankten Probanden Blut entnommen, deren Thrombozyten isoliert und jeweils mit CD34⁺-Progenitorzellen aus Nabelschnurblut von gesunden Probanden kokultiviert. Bei zwei Ansätzen wurde zusätzlich noch Humaninsulin in der Konzentration von 0,1 µg/l und 10 µg/l nach Miyagawa et al.⁵⁸ ins Kulturmedium eingebracht.

Durchführung:

- Auf einer 96-Wellplatte wurden die CD34⁺-Progenitorzellen von nichtdiabetischen Probanden aufgebracht.
- 50 µl der Thrombozytenlösungen von Nichtdiabetikern beziehungsweise Diabetikern wurden nun in die entsprechende Kultur gegeben, siehe Versuchsaufbau A.
- Zwei Kulturen mit gesunden Stammzellen und nichtdiabetischen Thrombozyten wurden mit Humaninsulin versetzt, um eine Endkonzentration von 0,1 µg/l und 10 µg/l zu erhalten.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Mit der FACS-Analyse ist es möglich, zelluläre Oberflächenepitope mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern nachzuweisen.

2.2.3.1 Scavenger-Rezeptor CD68

Die Überstände der 96-Wellplatte wurden abgenommen, ohne die am Boden befindlichen Zellen zu beschädigen. Die noch adhärenen Zellen wurden vorsichtig mit PBS-Puffer gewaschen und dann mit Trypsin abgelöst. Daraufhin konnte die Zellsuspension in die mit jeweils 2 ml PBS vorbefüllten FACS-Röhrchen gegeben

werden. Nach der Zentrifugation bei 301 g für 5 min wurde der Überstand verworfen und auf das Zellpellet ein FITC-konjugierter *mouse anti-human* CD68 Antikörper gegeben. Als Isotypenkontrolle diente ein FITC *mouse IgG₁ κ*. Die Inkubationszeit betrug 30 min und erfolgte im Dunkeln. Danach wurde jedem Röhrchen 2,5 ml PBS zugesetzt und bei 301 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand konnte dann verworfen und das Zellpellet mit 0,5 % Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert werden. Bis zur FACS-Messung wurden die FACS-Röhrchen bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

2.2.3.2 Scavenger-Rezeptor MSR-A

Die Überstände der 96-Wellplatte wurden abgenommen, ohne die am Boden befindlichen Zellen abzulösen. Nun wurden die Zellen mit 50 µl des Mastermix 1 versehen, welcher eine Konzentration von 250 µg/ml des Primärantikörpers (*anti-human MSR-A Monoclonal Antibody*) gegen den Scavenger-Rezeptor MSR-A aufwies. Nach 30minütiger Inkubation in Dunkelheit wurde der Überstand verworfen und jeder Zellkultur, inklusive der Isotypenkontrolle, 50 µl des Mastermix 2 zugegeben. Nachdem der Isotypenkontrolle noch 4 µl pro Well *mouse γ PE* zusetzt wurde, folgte eine weitere Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln.

Die Überstände sowie die mit Trypsin abgelöste Zellsuspension wurden in die mit 2 ml IMDM-Medium vorbefüllten FACS-Röhrchen pipettiert.

Es folgte die Zentrifugation mit 301 g für 5 min. Die Überstände wurden verworfen und das Zellpellet mit 0,5 % PFA fixiert. Details zur Lagerung sind in II.2.2.3.1 aufgeführt.

2.2.4 Mikroskopie

2.2.4.1 Mikroskopisches Zählverfahren

Um die Schaumzellen zu zählen und um eine höhere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu erhalten, wurde die Methode nach Iscove et al.⁵⁹ modifiziert. Hierfür wurde die Kulturplatte 200fach vergrößert. Mittels eines Gitternetzes wurde die Kulturplatte an 8 festgelegten und vordefinierten Stellen aufgesucht und die Schaumzellmenge erhoben.

Definiert wurde eine gültige Schaumzelle nach folgenden morphologischen Kriterien:

- Hochgradig und dicht granuliert,
- runde bis ovale Form,
- mindestens 15 µm Durchmesser,
- unversehrte Zytomembran.

2.2.4.2 Fluoreszenzaufnahmen

- Färbung mit Dil-AcLDL

Hierfür wurden $1 \cdot 10^7/100$ μ l Thrombozyten (in Tyrodes pH 7,4) mit Dil-AcLDL (2 μ g/ml, rot) in einem sterilen FACS-Röhrchen für 4 h auf dem Rad eines Hybridisierungssofens (37 °C) inkubiert.

Nichtgebundenes Dil-AcLDL wurde anschließend durch einen Waschschrift mit Tyrodes pH 7,4 entfernt. Die LDL-positiven Thrombozyten konnten mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert werden.

- Hoechstfärbung

Das Protokoll für den Vitalfarbstoff Hoechst 33342 wurde zur Isolierung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark der Maus entworfen. Die Schaumzellkulturen wurden nach dem 10. Kulturtag mit Trypsin vom Boden der Kulturplatte abgelöst und in PBS gegeben. Dann wurden sie abzentrifugiert (301 g, 5 min) und in 37 °C warmer DMEM-Lösung in einem Falco n-Röhrchen resuspendiert. Hoechst 33342 Farbstoff wurde in einer Konzentration von 5 μ g/ml hinzugegeben und gut mit der Zellsuspension vermischt. Es folgte anschließend die 120minütige Inkubation in einem 37 °C warmen Wasserbad. Die Qualität des Färbeverhalten der Zellen hing in hohem Maß von einer gleichbleibenden Temperatur im Wasserbad ab. Während der Inkubationszeit wurden die Röhrchen häufig geschüttelt. Nach 120 min wurde die Lösung zentrifugiert (301 g, 5 min) und die Zellen in 4 °C kalter HBSS-Lösung resuspendiert. Die dauerhafte Abkühlung der gefärbten Zellen auf 4 °C war wichtig, um weitere Farbeeekte zu verhindern. Das Emissionsmaxima: Hoechst blue lag bei 450 nm (Standard). Das Fluoreszenzverhalten wurde mit einem 450/ 20 BP Filter (Hoechst Blue) gemessen.

2.2.5 Gelatine-Zymografie

Die Zymografie basiert auf einer Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), wobei die durch das Gel wandernden Proteine mit negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen, unabhängig der Eigenladung und ihrem Molekulargewicht entsprechend, aufgetrennt werden. Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-PAGE enthält das Zymografie-Gel zusätzlich Gelatine, so dass über Nacht inkubierte Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) enthaltende Proben das Substrat enzymatisch abbauen können. Wurde die Gelatine abgebaut, bildeten sich

in dem ansonsten blau gefärbten Gelatinegel helle Banden, die auf die Aktivität der Gelatinasen hinweisen und deren Transparenz später Hinweise auf deren Aktivitätsgrad geben können.

2.2.5.1 MMP-2- und MMP-9-Aktivität

Die Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) und 2 (MMP-2) in den Überständen der Zellkulturen wurde mit der Gelatine-Zymografie quantifiziert.

Dazu wurde SDS-Kammerpuffer (1x) über Nacht kaltgestellt und das Zymogramm-Gel mit dem gekühlten SDS-Puffer in die Elektrophoresekammer eingebracht. Vor dem Bestücken des Gels gab man den Proben Non-Reducing-Sample-Buffer im Verhältnis 5:1 zu und inkubierte diese bei Raumtemperatur für 10 min. Die Proben wurden zusammen mit SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard in die jeweiligen Geltaschen appliziert und für etwa 30 min mit 60 V angelegt. Es folgten 80 V Spannung für etwa 210 min, bis die Proben das Gel komplett durchlaufen haben. Das Gel wurde nach 2 Waschungen mit H₂O in einer Schale mit Renaturation-Buffer (1x) für 30 min bei Zimmertemperatur und schließlich für 12 h mit Development-Buffer bei konstanten 37 °C inkubiert. Comassie-Färbelösung wurde im folgenden für 7 min zu dem gewaschenen Gel gegeben und im Schüttler über das Gel geschwenkt. Das Gel wurde abermals gewaschen und für 60 Sekunden in Drying Solution inkubiert, bevor es zum Trocknen in Cellophan eingeschlagen und auf dem Trockenrahmen fixiert wurde. Der Trocknungsvorgang dauerte etwa 12 h. Es folgte das Pressen des getrockneten Gels für weitere 48 h. Die Auswertung der Bandendichte erfolgte densitometrisch.

2.2.6 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay

Der Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung. Ist eine solche Reaktion erfolgt, kann der entstandene Immunkomplex durch einen zweiten Antikörper, der spezifisch gegen den Fc-Teil des Nachweisantikörpers gerichtet ist, sichtbar gemacht werden. Die Farbreaktion wird mit einem an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzym durch Zugabe eines enzymspezifischen Substrates ausgelöst. Verschiedene Verstärkungsmechanismen sind möglich. Zur photometrischen Bestimmung der Extinktion diente ein ELISA-Reader der Firma TECAN.

2.2.6.1 Human Macrophage Colony Stimulating Factor

Dieser ELISA diente dem quantitativen Nachweis des „human macrophage colony stimulating factor“ (M-CSF).

Dazu wurden die Überstände der untersuchten Zellkulturen zuerst zweifach mit Calibrator Dilutend RD6F verdünnt. Nun konnten die Überstände sowie die Kontrolle in die entsprechend vorbereiteten Kulturansätze der Platte pipettiert und bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert werden. Es folgte eine dreimalige Spülung der Ansätze mit Waschpuffer. In die vom Waschpuffer vollständig befreiten Ansätze wurde jeweils 200 µl des Antikörpers, der spezifisch für M-CSF und mit einem Enzym konjugiert ist, zugegeben und 90 min inkubiert. Es folgte abermals eine dreimalige Spülung mit Waschpuffer. Nun wurde jeweils 200 µl einer für das konjugierte Enzym spezifischen Substratlösung zugegeben und 30 min inkubiert. Zuletzt wurde 50 µl einer „Stop Solution“ zugegeben, die die enzymatische Spaltung des Substrates inhibiert und somit beendet.

3 Statistik

Für die zytokinetische Betrachtung des Differenzierungsprozesses der Schaumzellen unter unterschiedlichen Bedingungen wurde ein Modell erstellt, das versucht, den wichtigsten Eckpunkten der Zytokinetik Rechnung zu tragen (siehe Anhang, Statistik 1). Alle anderen Ergebnisse, wenn nicht abweichend angegeben, wurden als Mittelwerte \pm 95 % Konfidenzintervall, ausgehend von mindestens 3 unabhängigen Experimenten, dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms JMP 7.0. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der t-Test herangezogen. Die Kulturzeiten wurden mit Hilfe von Survival-Analysen bestimmt. Zur Untersuchung der Varianz unterhalb der Gruppen wurde eine univariate Varianzanalyse angewandt. Das Wachstumsmodell folgte der Methode der kleinsten Quadrate.

III Ergebnisse

Neuere Daten zeigen, dass CD34⁺-Progenitorzellen^{19,60} wie auch Makrophagen⁶¹⁻⁶³ in diabetischem Milieu deutliche Unterschiede zu gesunden Zellen aufweisen. Zugleich scheint auch die Schaumzellbildung in gewissem Maße vom Glukosespiegel abhängig zu sein⁶². Weil Progenitorzellen und Makrophagen Vorstufen von Schaumzellen darstellen und die Studienlage eine erhöhte Schaumzellmenge bei hohen Glukosespiegeln aufzeigt, könnte allein die Herkunft der CD34⁺-Progenitorzellen aus einem diabetischen Organismus beziehungsweise diabetischem Kulturmilieu die Schaumzellbildung in proarteriosklerotische Richtung beeinflussen. Diese Arbeit versucht in klinisch-experimentellem Studiendesign die Fragestellung der diabetischen Beeinflussung der CD34⁺-Progenitorzellen in Richtung alterierter Schaumzellformation und somit proarteriosklerotischen Zellprozessen zu bearbeiten und zu beantworten.

1 Diabetisches Milieu *in vivo* und Schaumzellbildung

Grundlage dieser Versuchsreihe waren zwei Linien an Kokulturen, die im folgenden miteinander verglichen wurden. Der variable Faktor bestand in der Herkunft der CD34⁺-Progenitorzellen aus sternalem Knochenmark. Diese stammten in einer Kulturlinie von diabetischen, in der zweiten Linie von gesunden Patienten. Beide Kulturlinien wurden mit Thrombozyten gesunder Probanden und bis zur vollendeten Schaumzellentwicklung kokultiviert.

1.1 Mikroskopische Beurteilung der Schaumzellmorphologie

1.1.1 Zellbeurteilung im Differenzierungsverlauf

Der Differenzierungsverlauf der Kokulturen wurde an den Tagen zwei, fünf, acht, zehn und zwölf bildlich dokumentiert, um morphologische Unterschiede zwischen den beiden Kulturlinien nachzuweisen.

Es zeigten sich optisch keine Unterschiede im Wachstums- und Differenzierungsverlauf der Schaumzellen. Die Differenzierungsstadien waren zeitlich gesehen von gleicher Morphologie, der Größenzuwachs war konstant und gleichförmig in beiden Gruppen. Die Granulierung zeigte sich zeitgleich zunehmend,

die Phagozytosehöfe hatten hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes den gleichen Entstehungs- und Ausprägungszeitraum (siehe Anhang, Abbildung 5).

1.1.2 Zellbeurteilung enddifferenzierter Zellen

Die systematische Betrachtung der ausgereiften Schaumzellen nach einer Inkubationszeit von zehn Tagen zeigte bei zehnfacher Vergrößerung eine deutlich ausgedünnte Schaumzellpopulation in der nichtdiabetischen Gruppe, die sich statistisch jedoch nicht beweisen ließ. Die einzelnen Zellen befanden sich bei Diabetikern wie auch bei Nichtdiabetikern in konstantem und identischem Abstand zueinander. Beide Versuchsansätze zeigten einen gleich großen thrombozytenarmen Randsaum. Die weitere Beurteilung bei 44facher Vergrößerung ließ eine Zellgröße gleichsam beider Gruppen mit durchschnittlich etwa 25 μm im Durchmesser erkennen. In der Form und Dichte der Granulierung der Schaumzellen war optisch keine Differenz festzustellen. Die Zellgrenzen zeigten sich beidseits gleichmäßig und konstant (siehe Anhang, Abbildung 6).

1.2 Zytokinetik

Es wurden Wachstumskurven erstellt, deren kinetische Eigenschaften die Wachstumseigenschaften der Schaumzellen widerspiegeln und so die Grundlage weiterer Vergleiche zwischen den beiden Versuchskohorten ergaben (siehe Anhang, Statistik 1).

Verglichen wurden anhand dieser Kurven wichtige Eigenschaften in Differenzierungs- und Wachstumsprozessen (siehe Anhang, Statistik 2):

- Die erste positiv gemessene Schaumzellmenge (Z_0),
- die Wachstumsrate (ρ),
- die Schaumzellmenge an den verschiedenen Tagen,
- die Schaumzellmenge speziell an Tag 10,
- die Stärke des Abfalls (α),
- der Zeitpunkt des Wachstumsabfalles (T_{crit}).

Es ergab sich ein Unterschied im Zeitpunkt des Abfalls der Schaumzellzahl (T_{crit}). Dieser entspricht der Lebensdauer der Schaumzellen. Hierbei wurde eine deutliche Verlängerung der Wachstumszeit bis zum Abfall von 1,6 Tagen bei Diabetikern

deutlich (mean \pm 95 % Konfidenzintervall: 11,23; -10,31; +12,91 Diabetiker versus Nichtdiabetiker 9,64; -8,82; +11,27, Log-Rank = 0,0317) (siehe Anhang, Statistik 3). Die Auswertung der anderen erhobenen Parameter ergab keinen Unterschied auf 5 % Niveau zwischen den Versuchsgruppen.

1.3 Sezernierende Eigenschaften

1.3.1 Matrix-Metalloproteinase-Aktivität

Es ergab sich eine deutliche Differenz zwischen den beiden Vergleichsgruppen hinsichtlich der Matrix-Metalloproteinase 9 Aktivität. Diese wurde bei Diabetikern im Vergleich zu Nichtdiabetikern als deutlich höher identifiziert (mean \pm 95 % Konfidenzintervall: 1892,97, -1640,5, +2145,5 Diabetiker versus Nichtdiabetiker 1387,42, -1165,9, +1608,9, t-test = 0,0029), während MMP-2 keine statistisch nachweisbare Differenz zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern aufzeigte (siehe Anhang, Statistik 4).

1.3.2 Monozyten-Colony Stimulating Factor

Bei der Auswertung der mittleren Mengen pro Milliliter an M-CSF im Medium ließ sich keine Differenz zwischen Diabetikern und Nichtdiabetikern hinsichtlich der Sekretion dieses Mediators nachweisen (siehe Anhang, Statistik 5).

1.4 Eigenschaften der Zellmembranoberfläche

1.4.1 Expression des Scavenger-Rezeptors CD68

Die Auswertung dieses Scavenger-Rezeptors konnte keinen Unterschied zwischen den beiden Kohorten hinsichtlich der CD68-Rezeptorexpression nachweisen.

2 Glukosekonzentration und Schaumzellbildung *in vitro*

Hier wurden vier Kulturlinien erstellt. Jede Kokultur beinhaltete CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten gesunder Probanden. Der variable Faktor belief sich hier auf die Glukosekonzentration im Kulturmedium, welche je nach Kulturlinie 0 g/l, 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l betrug. Die Linien wurden bis zur vollendeten Schaumzellentwicklung kokultiviert.

2.1 Mikroskopische Beurteilung der Schaumzellmorphologie

2.1.1 Zellbeurteilung im Differenzierungsverlauf

Die Kulturlinien wurden am Tag zwei, fünf, acht, zehn und zwölf bildlich dokumentiert und auf morphologische Gesichtspunkte hin verglichen.

Bei der Beobachtung der Kokultur mit 0 g/l Glukose im Medium zeigte sich eine geringere Differenzierungsquote der CD34⁺-Progenitorzellen im Vergleich zu den Kulturen der anderen Glukosekonzentrationen. Zugleich ließ sich eine verlangsamte Größenzunahme pro Zeiteinheit nachweisen, die selbst bei vollständig differenzierten Schaumzellen noch zu erkennen war. Wurde der Verlauf der anderen Glukosemedien mit 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l betrachtet, so ließ sich kein Unterschied im Wachstumsverlauf oder in der Größenzunahme erkennen. Der Phagozytosehof zeigte sich bei 0 g/l hinsichtlich der Entstehung und Ausprägung etwas langsamer ausprägend und kleiner im Durchmesser. Bei den Medien des ansteigenden Glukosegehaltes zeigte sich kein Unterschied in den letztlich erwähnten Parametern (siehe Anhang, Abbildung 7).

2.1.2 Zellbeurteilung enddifferenzierter Zellen

Beginnend mit der Größenrelation zeigte sich bei den reifen Schaumzellen des Tages zehn nach Kulturbeginn bei den Zellkulturen mit 0 g/l Glukose eine deutliche Größendifferenz im Vergleich zu den identischen Versuchen mit der ansteigenden Glukosekonzentration im Medium. Während die Größe bei 0 g/l mit 15 µm beziffert werden konnte, zeigten sich bei 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l Schaumzellen mit etwa 25 µm großem Durchmesser.

Der Granulierungsgrad der Schaumzellen konnte bei 0 g/l als fein und dicht beschrieben werden. Bei den Schaumzellen der restlichen Medien erschien die Granulierung gröber und aufgelockerter. Der phagozytotische Randsaum ließ sich bei den Schaumzellen aller Medien mit Glukose in ähnlicher Ausprägung erkennen. Der Hof bei 0 g/l zeigte sich etwas kleiner. Die Außenbegrenzung der Zellen war unabhängig von der Glukosekonzentration im Kulturmedium oval bis rund (siehe Anhang, Abbildung 8).

2.2 Zytokinetik

Es wurden Wachstumskurven erstellt und daraus wichtige Eckpunkte der Zytokinetik erhoben (siehe Anhang, Statistik 1):

- Die erste positiv gemessene Schaumzellmenge (Z_0),
- die Wachstumsrate (ρ),
- die maximale Schaumzellmenge (Z_1),
- die Stärke des Abfalls (α).

Bei der Analyse des Parameters, welcher dem Wert der Schaumzellen beim ersten positiven Ereignis (Z_0) darstellte, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Kokulturen unterschiedlichen Glukosegehaltes. Die Schaumzellzahl war im Kulturmedium mit 0 g/l Glukose signifikant geringer als im Medium mit 1 g/l Glukose (mean \pm 95 % Konfidenzintervall: 128,45; -35,86; +221,04 0 g/l Glukose versus 1 g/l Glukose 244,25; -158,08; +330,41; Tukey $<$ 0,05) (siehe Anhang, Statistik 6).

Zwei weitere Parameter, deren hochsignifikante Ergebnisse Unterschiede zwischen einem spezifischen Medium im Vergleich zu allen restlichen Medien aufwiesen, waren die Wachstumsrate (ρ) und die maximale Schaumzellmenge (Z_1).

Die Wachstumsrate (ρ) zeigte ein deutlich erhöhtes Niveau beim Versuchsmedium mit 0 g/l Glukose zu den restlichen Medien; 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l (mean \pm 95 % Konfidenzintervall: 2,26; -1,7; +2,9 0 g/l Glukose versus 1 g/l Glukose 1,42; -1,1; +1,9 versus 2,97 g/l Glukose 1,28; -0,93; +1,7 versus 4,5 g/l Glukose 1,53; -1,14; +2; Tukey $<$ 0,05).

Hinsichtlich des maximal vorhergesagten Schaumzellwertes (Z_1) wies 0 g/l eine deutlich verminderte Schaumzellmenge zu den restlichen Medien auf. Gleichzeitig lagen die maximal vorhergesagten Schaumzellwerte der Medien mit 1 g/l und 2,97 g/l Glukose im Medium erwiesenermaßen deutlich höher als im „High-Glukose-Medium“ mit 4,5 g/l Glukose (mean \pm 95 % Konfidenzintervall: 340,97; -213,33; +491,46 0 g/l Glukose versus 1 g/l Glukose 904,37; -717,8; +1107,8 versus 2,97 g/l Glukose 781,78; -606,51; +974,4 versus 4,5 g/l Glukose 700,24; -533,08; +885,06; Tukey $<$ 0,05) (siehe Anhang, Statistik 7).

Die Abfallsgeschwindigkeit (α) der Schaumzellen zeigte keinen vom Glukosegehalt im Medium abhängigen Unterschied.

2.3 Sezernierende Eigenschaften

2.3.1 Matrix-Metalloproteinase-Aktivität

Die statistische Analyse der mittleren optischen Dichte (OD) der vier verschiedenen Kulturansätzen mit ansteigenden Glukosekonzentrationen 0 g/l, 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l konnte keinen Aktivitätsunterschied der MMP-9 und MMP-2 auf 5 % Signifikanzniveau zwischen den einzelnen Gruppen aufzeigen (siehe Anhang, Statistik 8).

3 Diabetische Thrombozyten und Schaumzellbildung *in vitro*

Es wurden zwei Kulturlinien erstellt. Beide Kulturen bestanden aus CD34⁺-Progenitorzellen gesunder Probanden und je nach Linie aus Thrombozyten diabetischer beziehungsweise gesunder Patienten. Kultiviert wurde bis zur vollständigen Schaumzellendifferenzierung.

3.1 Mikroskopische Beurteilung der Schaumzellmorphologie

3.1.1 Zellbeurteilung im Differenzierungsverlauf

Bildlich dokumentiert und verglichen wurden die beiden Kulturlinien am Tag zwei, fünf, acht und zehn. Mikroskopisch ließ sich im Größenzuwachs und im Differenzierungsgrad kein Unterschied zwischen der Kokultur mit diabetischen Thrombozyten beziehungsweise nichtdiabetischen Thrombozyten erkennen. Im Verlauf zeigte sich eine zeitlich etwa identisch einsetzende Granulierung beider Schaumzellgruppen. Hinsichtlich Form und Entwicklung des Phagozytosehofes war kein Unterschied festzustellen (siehe Anhang, Abbildung 9).

3.1.2 Zellbeurteilung enddifferenzierter Zellen

Bei 44facher Vergrößerung wurden die vollständig differenzierten Schaumzellen der beiden Kulturlinien miteinander verglichen. Die Beurteilung beider Schaumzellgruppen des zehnten Kulturtages ließ einen identischen Zelldurchmesser von etwa 25 µm erkennen. Der Phagozytosehof um die Schaumzellen zeigte gleiche Ausmaße. Ebenso wie der Grad der Granulierung hatte auch die Form und die Zellbegrenzung keine Auffälligkeiten, die für eine diabetische Alteration der Schaumzellen sprechen würde (siehe Anhang, Abbildung 10).

3.2 Zytokinetik

Untersucht wurde der Differenzierungsprozess der CD34⁺-Progenitorzellen zu Schaumzellen. Erhoben wurden folgende Parameter der Zytokinetik:

- Die erste positiv gemessene Schaumzellmenge (Z_0),
- die Wachstumsrate (ρ),
- die maximale Schaumzellmenge (Z_1),
- die Stärke des Abfalls (α).

Resultierend war keiner der dargestellten kinetischen Parameter zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich (siehe Anhang, Statistik 9).

3.3 Eigenschaften der Zellmembranoberfläche

3.3.1 Expression des Scavenger-Rezeptors MSR-A

Hinweise auf eine veränderte Repräsentation dieses Rezeptors auf der Oberfläche der Schaumzellen, die sich aus der Diabetiker-thrombozytenhaltigen Kokultur differenziert hatten, konnten im Vergleich zur Kontrolle nicht gefunden werden.

4 Insulinkonzentration und Schaumzellbildung *in vitro*

Drei Kulturlinien mit jeweils gesunden CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten wurden erstellt. Der variable Faktor bestand im Gehalt an Insulin im Kulturmedium, welcher 0 µg/ml, 0,1 µg/ml und 10 µg/ml entsprach. Kultiviert wurde bis zur vollständigen Schaumzellendifferenzierung.

4.1 Mikroskopische Beurteilung der Schaumzellmorphologie

4.1.1 Zellbeurteilung im Differenzierungsverlauf

Die Gruppen mit 0,1 und 10 µg/ml wurden an den Tagen zwei, fünf, acht und zehn bildlich dokumentiert und auf morphologische Gesichtspunkte hin verglichen.

Soweit lichtmikroskopisch beurteilbar, erschien die Größenzunahme der Schaumzellen wie auch die Zunahme der Granularisation im Zeitverlauf bei allen Gruppen gleich schnell zu erfolgen. Der Phagozytosehof bildete sich gleichmäßig schnell und in gleichem Ausmaß. Die Entwicklung der Granulierung erschien im

gleichen Zeitverlauf und in gleichem Ausprägungsgrad (siehe Anhang, Abbildung 11).

4.1.2 Zellbeurteilung enddifferenzierter Zellen

Bei 44facher Vergrößerung wurden die ausgereiften Schaumzellen aller drei Kulturlinien am Tag zehn miteinander verglichen.

Die Gegenüberstellung ließ keine Unterschiedlichkeit in der Morphologie erkennen. So waren hier Zellgröße, Zellform, Grad der Granularisation und Phagozytosehof der Schaumzellen vergleichbar. Die Zellgröße bezifferte sich in allen Kulturen auf etwa 25 μm und die Zellbegrenzung zeigte sich konstant homogen und oval bis rund (siehe Anhang, Abbildung 12).

4.2 Zytokinetik

Die Methode der Datenerhebung stützte sich auf die der vorigen Versuche (siehe Anhang, Statistik 1) und objektivierte folgende Wachstumsparameter:

- Die erste positiv gemessene Schaumzellmenge (Z_0),
- die Wachstumsrate (ρ),
- die maximale Schaumzellmenge (Z_1),
- die Stärke des Abfalls (α).

Es konnte kein Unterschied zwischen den oben genannten kinetischen Parametern auf Signifikanzniveau ermittelt werden (siehe Anhang, Statistik 10).

4.3 Eigenschaften der Zellmembranoberfläche

4.3.1 Expression des Scavenger-Rezeptors MSR-A

Die Ergebnisse der FACS-Analyse des Scavenger-Rezeptors MSR-A zeigten nach statistischer Auswertung keine Korrelation zwischen dem Expressionsgrad des Scavenger-Rezeptors auf der Schaumzelloberfläche, welche mit der Insulinkonzentration in Verbindung gebracht werden könnte.

IV Diskussion

Die Arteriosklerose ist eine gefürchtete Komplikation des Diabetes. In der heutigen Gesellschaft ist eine gehäufte Diabetesinzidenz anzutreffen und somit auch vermehrt mit arteriosklerotischen Komplikationen zu rechnen. Zwar kann durch die Reduktion von Risikofaktoren, wie zum Beispiel dem Hypertonus⁶⁴, der Adipositas⁶⁵ und der Hypercholesterinämie, auch das Arterioskleroserisiko verringert werden, jedoch bleibt der Diabetes mellitus ein eigenständiger Einflussfaktor, welcher zur verstärkten Arteriosklerosebildung führt.

Die Arteriosklerose lässt sich nach heutigem Kenntnisstand primär als ein Entzündungsprozess im Gefäßsystem beschreiben⁶⁶. Ausgedehnte Forschungen widmeten sich der Genese der Arteriosklerose beziehungsweise den zugrunde liegenden zellulären Interaktionen.

Schwerpunktmäßig begrenzt sich die Forschung hierbei jedoch auf stoffwechselgesunde Patientenkohorten. Zahlreiche Studien konnten im Arteriosklerosegeschehen dieser Patienten bereits Thrombozyten^{34,35,67,68}, Monozyten^{29,54}, Progenitorzellen^{34,35}, Schaumzellen^{34,35} und Endothelzellen^{34,69} als beteiligte Komponenten dieses Prozesses identifizieren.

Aufgrund einer diabetogenen Stoffwechsellage verläuft die Entstehung der Gefäßveränderungen im Vergleich zu Stoffwechselgesunden jedoch weitaus schneller und gravierender^{3,4}. Diabetesbedingte Alterationen, die diese ungünstigere, aggressivere Pathogenese zu bedingen vermögen, konnten bisher nur wenige nachgewiesen werden.

Da am arteriosklerotischen Umbau zahlreiche Zellgruppen an der Entstehung eines Gefäßplaques beteiligt sind, wird von einer multifaktoriellen Krankheitsgenese ausgegangen. Entsprechend dieser These konnten bereits diverse der diabetogenen Stoffwechsellage zugrunde liegenden Alterationen an Thrombozyten⁵²⁻⁵⁵, CD34⁺-Progenitorzellen¹⁹, Makrophagen⁷⁰⁻⁷² und Schaumzellen^{6,62,73} nachgewiesen werden.

Die Entstehung der arteriosklerotischen Veränderungen in der Gefäßwand ist jedoch kein statischer Prozess, welcher auf einzelne Zellen zurückzuführen ist. Vielmehr wird in der heutigen Forschung verstärkt der Fokus auf Zellinteraktionen gelegt, die die beschriebene Pathogenese beim Diabetiker übermäßig vorantreiben. Kürzlich veröffentlichte wissenschaftliche Arbeiten widmeten ihr Interesse einem spezifischen zellulären Interaktionsmechanismus im Arteriosklerosegeschehen, welcher sich

zwischen CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten abspielt und mit der Entstehung von Schaumzellen endet^{33,34}.

Anlässlich dieser erst kürzlich von stoffwechselgesunden Probanden erhobenen Daten von Daub et al.^{33,34}, ergab sich weiterführend die Fragestellung in der vorliegenden Promotionsarbeit, inwiefern sich diabetogene Einflussfaktoren, wie die chronisch diabetische Stoffwechsellage, auf die CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten *in vivo* und der Glukose- und Insulinspiegel *in vitro* auf die beschriebene Schaumzellbildung in Kokultur beider genannten Zellgruppen auswirken.

1 Einflussgrößen der Schaumzellbildung

1.1 Einfluss diabetogener Herkunft der Zellen

Als erste Studie, die sich mit der Fragestellung beschäftigt, ob die diabetische Herkunft CD34-positiver Progenitorzellen beziehungsweise Thrombozyten einen Einfluss auf die Schaumzellbildung hat, wurde der Differenzierungsprozess von CD34⁺-Zellen zu Schaumzellen unter Beteiligung von Thrombozyten in Kokultur aus Proben diabetischer und nichtdiabetischer Patienten untersucht und verglichen.

Es wurden CD34⁺-Progenitorzellen aus sternalem Knochenmark von Diabetikern und Nichtdiabetikern entsprechend Daub et al.^{33,34} in Kokultur mit gesunden Thrombozyten angezchtet, um den Differenzierungsprozess zur Schaumzellpopulation sowohl biochemisch, als auch kinetisch zu dokumentieren.

Der Prozess der Schaumzellentstehung ist ein wichtiger Forschungsschwerpunkt, jedoch wurden bisher ausschließlich diverse Teilaspekte des Prozesses isoliert von einander betrachtet, ohne eine direkte Beziehung zwischen dem Faktor Diabetes und der proatherogenen Schaumzellentstehung herzustellen. Es wurde festgestellt, dass Thrombozyten einen Differenzierungsreiz für CD34⁺-Progenitorzellen auszulösen vermögen, welcher mit der Schaumzellentstehung endet^{33,34}. Gleichzeitig erfassten Studien das Verhalten im diabetischen Organismus gereifter Makrophagen hinsichtlich der oxLDL-Aufnahme und beobachteten eine verstärkte Cholesterinaufnahme bei der Weiterdifferenzierung in die Schaumzellen⁶².

Die Studienlage hinsichtlich der diabetischen CD34⁺-Progenitorzellen zeigt, dass die Zellen Veränderungen in unterschiedlichen Bereichen, wie dem Migrationsverhalten und dem Zytoskelett, aufweisen¹⁹.

Makrophagen, die aus diabetischen Organismen isoliert wurden, zeigten ebenfalls diverse unterschiedliche Charakteristika im Differenzierungsverhalten im Vergleich zu Gesunden⁶¹.

Versuche am Mausmodell konnten zeigen, dass die Schaumzellmenge mit der Dauer der diabetischen Stoffwechsellage⁶² und mit dem Glukosespiegel⁶³ korreliert.

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Studien scheint die wissenschaftliche Aussage hinsichtlich der diabetischen Schaumzellentstehung tendenziell in die Richtung der Proatherogenität zu gehen. Um eine klare Aussage zu treffen, ob der diabetische Einfluss der CD34⁺-Progenitorzellen *in vivo* zu einer veränderten und eventuell verstärkten Schaumzellbildung führt, versucht die vorliegende Arbeit in klinisch-experimentellem Studiendesign die zahlreichen Indizien, die vorherige wissenschaftliche Arbeiten erbracht haben, in realitätsbezogener und klinisch-pathologischer Sichtweise zu belegen.

An den Ergebnissen dieser Studie ist zu erkennen, dass CD34⁺-Progenitorzellen *in vivo* durchaus Veränderungen aufgrund der diabetischen Stoffwechsellage erfahren, da nach äquivalenter Aufbereitung und Kultivierung der Zellen beider Versuchsgruppen *in vitro* unterschiedliche zytokinetische Eigenschaften bei der Schaumzellendifferenzierung nachgewiesen werden konnten. So konnte die Überlebenszeit der Schaumzellen bei Diabetikern mit 1,6 Tagen signifikant länger beobachtet werden (siehe Anhang, Statistik 3). Dies scheint bei exponentiellem Wachstum einen deutlich proarteriosklerotischen Effekt zu beweisen, da sich eine Akkumulation der Schaumzellen in der Gefäßwand bei diesem Wachstumsverlauf deutlich steigern würde. Weiterhin wies der diabetische Wachstumsverlauf zwar nicht signifikant beweisend, jedoch tendenziell höhere Schaumzellwerte auf.

Die um 1,6 Tage verlängerte Überlebenszeit ist mit der Studie von Halvorsen et al.⁶⁰ kompatibel. Der angeführte antiapoptotische Mechanismus des IL-10 bei Makrophagen von Akuten-Koronar-Patienten, welcher stark durch Diabetiker repräsentiert werden dürfte, könnte durchaus auch in den in dieser Studie aus Makrophagen entstandenen Schaumzellen zu einer Verlängerung der Überlebensrate führen. Voraussetzung für diese Hypothese wäre jedoch, dass die Wirkung von Interleukin 10, das nur begrenzte Zeit (bis zur Entnahme) auf die Progenitorzelle wirken kann, auf den Metabolismus der CD34⁺-Zelle bis zum Endstadium der Differenzierung anhält. Bei der kurzen Einwirkzeit des IL-10 ist zu unterstreichen, dass die Progenitorzellen noch im Stammzellstadium vom

diabetischen Organismus und somit vom diabetischen Milieu getrennt wurden. Die nachfolgenden Kulturbedingungen waren für beide Versuchsgruppen gleich. Somit bestand die einzige Möglichkeit der diabetischen Alteration hinsichtlich der Wirkung von IL-10 noch im Progenitorzellstadium im Organismus des diabetischen Probanden.

Hayek et al.⁶² untersuchten die Schaumzellentstehung von Diabetes induzierten Mäusen. Hierfür entnahmen sie peritoneale Makrophagen und untersuchten diese der Diabetesinduktion zeitentsprechend nach einem und drei Monaten. Es war zu erkennen, dass der oxLDL-Gehalt in den Makrophagen der diabetischen Gruppe um 45 % höher war als derjenige der Kontrollgruppe, was in diesem Fall ebenso für eine gesteigerte Schaumzellbildung spricht.

Dieselbe Studie unternahm weiterführende Versuche. Einer dieser stellte eine Versuchsreihe mit Makrophagen dar, die durch unterschiedlich glukosehaltige Kulturmedien eine unterschiedliche intrazelluläre Glukosekonzentration besaßen. Hier wurde die zelluläre Fähigkeit, oxLDL aufzunehmen, ermittelt. Es zeigte sich, dass ein steigendes intrazelluläres Glukoselevel in den Makrophagen mit einer gesteigerten oxLDL-Aufnahme korreliert. Dies ließ auf einen glukoseabhängigen Mechanismus schließen, welcher die Schaumzellbildung begünstigt. Dies wiederum würde die Annahme einer IL-10-Beeinflussung widerlegen und einen rein glukoseabhängigen Mechanismus implizieren, der jedoch beim Versuchsaufbau dieser Studie nur im Organismus *in vitro* auf die CD34⁺-Progenitorzellen hätte einwirken können.

Haidar et al.⁷⁴ stellten bei mit hochglukosehaltiger Kost ernährten Ratten ebenfalls ein gesteigertes Vorkommen an Schaumzellen fest. Die Theorie der glukoseabhängigen oxLDL-Aufnahme wird somit bestätigt.

Der Aufbau beider Tierversuche ließ allerdings nur sehr grobe Rückschlüsse über die Faktoren zu, die die Schaumzellbildung beeinflussen. Im diabetischen Tiermetabolismus herrschen viele nicht voneinander differenzierbare Komponenten, unter anderem ein hochglykosidisches Milieu und zusätzlich teils bekannte, teils noch unbekannt inflammatorische Einflüsse. Diese wirken auf die CD34⁺-Progenitorzellen und auch auf alle im folgenden differenzierten Zellen, wie Monozyten und Makrophagen.

So ist es zwar möglich, dass ein hochglykosidisches Milieu die Schaumzellentstehung fördert. Jedoch kann nicht rekonstruiert werden, welche Differenzierungsstufe der Zellen von CD34⁺-Progenitorzellen über Monozyten, Makrophagen bis zu den Schaumzellen bei diabetischem Glukoseniveau mit einem veränderten Metabolismus reagierten und letztendlich mit der veränderten Schaumzellbildung enden, da alle Differenzierungsstufen im Tiermodell dem diabetischen, hyperglykämischen Milieu ausgesetzt wurden. Zugleich zeigte sich mit diesem Versuchsaufbau nicht, ob das hyperglykämische Milieu den einzigen Faktor darstellt, welcher die Schaumzellentstehung und den Schaumzellmetabolismus zu ändern vermag.

Bezogen auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit müssten diese auf die CD34⁺-Progenitorzellen einwirkenden glukoseinduzierten Alterationen eine solch nachhaltige Veränderung in der Progenitorzelle mit sich bringen, dass nach der Entnahme und dem Differenzierungsprozess zum Makrophagen und schließlich zur Schaumzelle noch Unterschiede aus dieser „glykosidischen“ Veränderung in der Zytokinetik nachzuweisen sind. Hierbei ist vor allem die Überlebenszeit der Schaumzellen anzuführen.

Weiterhin muss bedacht werden, dass die beiden Tierversuche^{62,74} eine Diabetesinduktion von höchstens drei Monaten zu verzeichnen hatten. Im Vergleich zum Versuchsaufbau dieser Promotionsarbeit kann bei den Probanden dieser Studie eine weitaus längere diabetogene Zeitspanne angenommen werden. Als chronisch wird in der Regel eine Zeitspanne von mindesten sechs Monaten bezeichnet. Somit konnten die Tierversuche zwar eine dreimonatige Hyperglykämie simulieren, jedoch nicht eine konstant bestehende Stoffwechsellage eines chronischen Diabetes mellitus, wie dieser bei den Patienten der Diabetikergruppe dieser Studie besteht, Absatz II.1.1.3.

Ein weiterer Tierversuch an der Ratte von Sano et al.⁷⁵ konnte nicht bestätigen, dass die Schaumzellzahl bei diabetischem Milieu erhöht ist. Vergleichbar dem Vorgehen von Hayek et al.⁶² wurde der Diabetes der Tiere mit Streptozotocin induziert und für drei Monate aufrecht erhalten. Zur Evaluierung der entstandenen Schaumzellmenge wurden histologische Schnitte der Aorta ausgewertet und die Schaumzellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe mikroskopisch ausgezählt, woraufhin sich zwischen beiden Gruppen kein Unterschied ergab.

Es wäre denkbar, dass die *in vivo* Ergebnisse von Sano et al.⁷⁵ hinsichtlich der Gleichheit der Diabetiker- und Nichtdiabetikergruppe beim Auftreten der

Schaumzellmengen allerdings kritisch interpretiert werden müssen, da die hervorgebrachten Ergebnisse eventuell das Resultat einer für das Nachweisverfahren zu geringen Auswirkung im Differenzierungsverhalten zur Schaumzelle $n = 5$ sind. Äquivalent zu den Ergebnissen von Sano et al. zeigten sich auch weitere zytokinetische Parameter der vorliegenden Promotionsarbeit, welche für eine erhöhte Schaumzellinduktion bei Diabetikern sprechen (siehe Anhang, Statistik 2 A, B, C, D). Diese sind zwar statistisch nicht belegbar, tendenziell jedoch deutlich richtungsweisend für die These der Proatherogenität der diabetischen CD34⁺-Progenitorzellen dieser Studie. Weiterführend wäre durchaus denkbar, mit dem vorliegenden Versuchsaufbau zusätzliche signifikante Ergebnisse einer veränderten Zytokinetik mit erhöhter Schaumzellbildung zu erzielen. Hierfür wäre jedoch eine gesteigerte Patientenzahl von Nöten, um auch blandere diabetische Veränderung im Wachstumsverlauf der Schaumzellen statistisch deutlicher darstellen zu können, wie sie sich im Anhang, Statistik 2 A, vermuten lässt.

Der Kenntnisstand der aktuellen Studien, mit der vorliegenden Arbeit kombiniert, impliziert ein multifaktorielles Geschehen, welches die Schaumzellbildung beeinflusst. Es wäre möglich, dass ein hyperglykämisches Milieu, wie es in den Versuchen unserer Studie im Patienten vor der Progenitorzellentnahme herrscht, ausreicht, um eine diabetische Alteration in der Zytokinetik in den sich differenzierenden Folgezellen auf dem Weg zur Schaumzelle hervorzurufen. Gleichzeitig zeigten Hayek et al.⁶², dass auch in späterem Zelldifferenzierungsstadium als Makrophage zugefügte hyperglykämische Kulturbedingungen eine begünstigte Schaumzellbildung induzieren. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Sano et al.⁷⁵ wäre jedoch auch vorstellbar, dass andere diabetogenen Faktoren, welche *in vivo* zusätzlich zu hyperglykämischen Einflüssen vorhanden sind, die Progenitorzellen im Fall der vorliegenden Studie zu einer nachhaltigen zytokinetischen Alteration in der Schaumzellbildung führen.

Die Schlussfolgerung wäre, dass zum einen der hohe Glukosespiegel, zum anderen aber auch noch unbekannte diabetische Einflussfaktoren *in vivo* zu einer veränderten Schaumzellbildung beitragen. Als ausschließlicher Induktor verstärkter Schaumzellbildung wäre die zweite These nach dieser Arbeit von Richtigkeit, da die im folgenden diskutierten Ergebnisse einer nicht korrelierenden Schaumzellbildung mit der Glukosekonzentration im Medium Gegenstand dieser Studie waren. Dies galt es abzuwägen (siehe Anhang, Statistik 6 und 7).

Wie bei den Progenitorzellen diabetischer Probanden, so sind auch Veränderungen bei Thrombozyten diabetischer Patienten bekannt. Gezeigt werden konnten bisher Alterationen auf Rezeptorbasis^{52,53,55}, in der Zellaktivierung⁵⁴, der Membranfluidität⁷⁶ und der Funktionalität^{51,52,54}. Entsprechend stellt sich hier die Frage der Schaumzellentstehung unter dem Einfluss diabetogener Thrombozyten. Daub et al.^{33,34} konnten zeigen, dass durch eine Blockade bestimmter Rezeptoren auf Seiten der Schaumzellen die Thrombozytenaufnahme und somit die Schaumzellentstehung gehemmt wird, allerdings ist unbekannt ob diabetische Thrombozyten die Phagozytose aufgrund bereits erwähnter diabetischer Veränderungen zu beeinflussen vermögen. Zwar konnte den Ergebnissen dieser Arbeit eine tendenziell gesteigerte Schaumzellwachstumsrate (ρ) entnommen werden, jedoch zeigten die anderen Parameter (siehe Anhang, Statistik 9) keine Veränderung. Dies spräche für die These, dass diabetisch alterierte Thrombozyten nicht beweisend zu einem verstärkten Phagozytosevorgang führen. Entsprechende Ergebnisse lieferten auch weiterführende Versuche, welche die Scavenger-Rezeptor-Oberflächenexpression auf den Schaumzellen untersuchten, um weitere Einflüsse diabetischer Thrombozyten zu analysieren.

Trotz den Ergebnissen dieser Arbeit ergaben sich aus der Studienlage diverse Hinweise auf eine veränderte Scavenger-Rezeptor-Oberflächenexpression bei diabetogenen Reizen auf Seiten der Schaumzellen.

Hinsichtlich der Scavenger-Rezeptoren CD36 und SR-A wiesen Makrophagen eine verstärkte Oberflächenexpression auf^{77,78}, sofern eine diabetogene Stoffwechsellage vorlag. Der Scavenger-Rezeptor CD68 zeigte bei aktivierten Makrophagen ebenfalls eine verstärkte Oberflächenpräsenz⁷⁹. Einen Nachweis erhöhter Expression oben genannter Scavenger-Rezeptoren konnte diese Studie dennoch nicht führen. Entsprechend der publizierten Erkenntnisse liegen aktuell zu diesem Versuchsaufbau jedoch auch keine der vorliegenden Arbeit widersprechenden Daten vor.

1.2 Einfluss des Mediums

Haidar et al.⁷⁴ zeigten im Tierversuch, dass eine diabetische Stoffwechsellage zu einer erhöhten Schaumzellbildung führt. Sano et al.⁷⁵ konnten diese Tatsache in diabetischen Ratten nicht bestätigen. Grundsätzlich sind die Merkmale eines Diabetes nicht ausschließlich auf eine Hyperglykämie beschränkt. Um nun die tatsächlichen Auswirkungen eines erhöhten Glukosespiegels auf die Makrophagen-

Schaumzellbildung zu eruieren und andere diabetische Störfaktoren als Gründe für Alterationen in der Schaumzellbildung auszuschließen, wurden bei Hayek et al.⁶² eine Makroplagen-Zellkultur erstellt und in glukosereichem Medium (bis 11,16 g/l = 62 mM) kokultiviert. Nach sieben Tagen in Kultur wurde radiojodiertes ¹²⁵I-oxLDL ins Medium gegeben und danach der Gehalt des oxLDL ermittelt. Resultierend konnte eine positive Korrelation zwischen der Glukosekonzentration und der oxLDL-Aufnahme nachgewiesen werden, was einer erhöhten Fähigkeit, Schaumzellen zu bilden, entspricht.

Im Gegensatz zu J-774A-Makrophagen der Maus verwendete diese Studie CD34⁺-Progenitorzellen gesunder Probanden aus Nabelschnurblut in Kokultur mit Thrombozyten gesunder Probanden. Es wurden Kulturen mit 0 g/l, 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l erstellt und die Kokulturen über zwölf Tage kultiviert. Als oxLDL-Quelle dienten hingegen Thrombozyten. Die Ergebnisse hinsichtlich der Schaumzellbildung konnten Hayek et al.⁶² nicht bestätigen. Vielmehr weisen die Ergebnisse auf eine deutlich erhöhte Schaumzellbildung im Milieu von 1 und 2,97 g/l hin, im Vergleich zu 4,5 g/l und 0 g/l. Zusätzlich offenbart die verminderte Anzahl an Schaumzellen zum Beobachtungszeitraum (Z_0) bei 0 g/l, dass Glukose für den Differenzierungsprozess im zellulären Metabolismus wichtig zu sein scheint und die primäre Differenzierungsgeschwindigkeit durch Glukosemangel gemindert wird. Jedoch zeigt sich unerwarteter Weise beim Medium mit 0 g/l eine deutlich gesteigerte Wachstumsgeschwindigkeit (ρ).

Dies könnte sich dadurch erklären lassen, dass der Differenzierungsprozess empfindlich auf die vermehrte Bildung radikaler Sauerstoffspezies des hoch glukosehaltigen Kulturmilieus reagieren⁸⁰ und so ein niedriger Glukosespiegel im Kulturmedium die Differenzierungsgeschwindigkeit günstig beeinflusst. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte zugleich sein, dass der Wachstumsprozess eventuell besonders sensibel auf externe osmotische Einflüsse reagiert und entweder bei 0 g/l aufgrund mangelnder osmotischer Einflüsse gesteigert ist oder bei erhöhten Glukosemedien vermindert abläuft.

Sano et al.⁷⁵ konnte im Tierversuch *in vivo* mit einem Plasmaglukosegehalt der diabetischen Tiere von 4 bis 5,5 g/l Glukose korrespondierend zu unseren Ergebnissen keine erhöhte Schaumzellbildung feststellen. Die Versuche von Haidar et al.⁷⁴ arbeiteten bei den diabetischen Tieren *in vivo* mit einer mittleren Serumkonzentration von 2,81 g/l \pm 0,4 g/l, was annähernd dem Kulturmilieu des Versuchsaufbaus dieser Arbeit mit 2,97 g/l Glukose entspricht. Jedoch konnten im

Versuchsaufbau dieser Promotionsarbeit, die sich isoliert mit der Wirkung der Glukose auf die Schaumzellbildung beschäftigt, nicht belegt werden, dass Glukose die Schaumzellbildung in Richtung einer proarteriosklerotischen Tendenz verändert. Schlussfolgernd scheinen wohl bei diabetischen Organismen *in vivo* zusätzliche Einflüsse auf die Schaumzellbildung zu wirken und so zu erhöhten Schaumzellzahlen beizutragen. Isoliert betrachtet - die Glukosebeeinflussung und speziell hochglykosidische Bedingungen führen nach den Erkenntnissen dieser Arbeit nicht beziehungsweise nur in Kombination mit bisher unbekanntem Faktoren *in vivo* zu einer erhöhten Schaumzellbildung *in vitro* und so zu proarteriosklerotischen Entwicklungen.

Entsprechend der Studienlage zur Glukosekonzentration weist diese auch hinsichtlich der Insulinkonzentration im Kulturmedium auf eine erhöhte Schaumzellbildung hin. So hat Insulin antiapoptotische Wirkung auf Makrophagen⁸¹ und wirkt mit hohen Glukosespiegeln steigernd auf die oxLDL-Aufnahme⁸². Auch auf Progenitorzellen wirkt Insulin nach Aoki et al.⁸³ stimulierend. Den Ergebnissen der vorliegenden Studie zufolge ist diese Wirkung jedoch nicht nachweisbar. Nach Lida et al.⁸¹ wurde der Beweis jedoch auf molekularer Basis geführt. Dies impliziert noch keine zelluläre Auswirkung und/oder detektierbare Veränderungen in der Zytokinetik der Schaumzellentstehung. Somit ist es möglich, dass Insulin nach Aoki et al.⁸³ stimulierend auf die Progenitorzellen wirkt, jedoch keine Auswirkung auf die Schaumzellbildung hat. Nach Sashkin et al.⁸² lag eine vermehrte Schaumzellbildung ausschließlich bei kombiniertem hyperglykämischen, hyperinsulinämischen Milieu vor. Da die Ergebnisse dieser Arbeit den die Schaumzellbildung steigernden Effekt nicht nachweisen konnten, wäre die Vermutung gegeben, dass ausschließlich die Kombination aus hyperinsulinämischen und hyperglykämischen Bedingungen die Schaumzellbildung steigert. Dies würde der grundlegenden Vermutung dieser Studie, nämlich einer multifaktoriellen Schaumzellbeeinflussung, entsprechen.

2 Einflussgrößen sezernierender Eigenschaften der Schaumzellen

2.1 Schaumzellen aus diabetischen CD34⁺-Progenitorzellen

2.1.1 Matrix-Metalloproteinase-Aktivität

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit liegt auf dem quantitativen Nachweis der Matrix-Metalloproteinase 2 und 9 im Hinblick auf diabetische Alterationen. Diese Proteinase sind matrixdegradierende Enzyme und führen zu Plaquerupturen mit dem Resultat thrombembolischer Ereignisse. Schwerpunktmäßig dienen Elastin und Collagen Typ IV als Substrat der Enzyme. Pöllänen et al.⁸⁴ konnten in Autopsien eine Korrelation zwischen dem hochaktiven und somit stärker sezernierenden Genotyp für MMP-9 und komplizierten Gefäßläsionen feststellen. Ähnliche Daten an Plaques der Carotiden konnten ebenfalls eine signifikant höhere Konzentration, Produktion und Expression von MMP-9 belegen⁸⁵.

Grundsätzlich werden die MMP-2 und -9 durch reaktive Sauerstoffspezies moduliert⁸⁶ und von Schaumzellen gebildet. Diese reaktiven Sauerstoffspezies kommen gehäuft bei arteriosklerotischen Erkrankungen⁸⁷ und speziell im diabetischen Stoffwechsel⁸⁸ vor.

Daher lag die Vermutung nahe, dass die MMP-9 Produktion der Schaumzellen beim Diabetiker höher sein müsste.

Beide Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 wurden zymographisch isoliert und densitometrisch vermessen, um die Aktivität beider Enzyme zu quantifizieren. Dabei konnte die MMP-9-Aktivität bei diabetischen Kokulturen als statistisch eindeutig höher identifiziert werden. Die MMP-2-Aktivität lag bei Diabetikern höher, jedoch nicht auf 5 % Niveau (siehe Anhang, Statistik 4). Das Ergebnis dieser Studie hinsichtlich MMP-9 und der Tendenz von MMP-2 deckt sich mit weiteren Erkenntnissen von Shiau et al.⁸⁹ und Worley et al.⁹⁰, welche bei Diabetes Typ 1 und Typ 2 einen signifikant höheren MMP-2 und -9 Spiegel im Serum nachgewiesen haben. Des Weiteren konnten Harris et al.⁹¹ in der Gefäßwand cerebraler Arterien von Typ 2 Diabetikern einen erhöhten MMP-2-Level nachweisen. MMP-9 wird von Makrophagen der Studienlage zufolge bei hohen Glukosewerten signifikant stärker sekretiert⁹².

Deckend mit den vorliegenden Ergebnissen einer MMP-9-Aktivitätszunahme bei unauffälliger MMP-2-Aktivität, bezogen auf diabetische Glukosewerte, zeigt sich eine

Studie, welche endotheliale Zellen des Rindes auf deren MMP-Aktivität untersucht hat⁹³.

Belegen konnte diese Konstellation ebenfalls eine klinische Studie, die diabetische mit nichtdiabetischen Patienten mit Akutem-Koronar-Syndrom hinsichtlich der MMP-Aktivität im Serum der Patienten untersuchte und signifikant erhöhte MMP-9- Aktivität bei unauffälliger MMP-2 Aktivität nachwies⁹⁴.

Grundsätzlich kann bei Studien wie der vorliegenden, die sich mit den Diabetikern *in vivo* beschäftigen, vermutet werden, dass auch hier der hohe Glukosespiegel einen wesentlichen Beitrag zur Steigerung der MMP-Aktivität leistet. Zusätzlich wurde gezeigt, dass ein gesenkter Lipidspiegel im Blut die MMP-Aktivität ebenfalls zu senken vermag⁹⁵.

Dagegen legte eine Studie des Jahres 2002 dieser Hypothese komplett widersprechende Ergebnisse vor⁹⁶. Hierbei wurden Gefäßproben der Arteria Mammaria von 14 Diabetikern und 14 Nichtdiabetikern untersucht und die MMP-2- und -9-Aktivität zymographisch-densitometrisch im Präparat vermessen. Resultierend konnte hier eine statistisch signifikante Verminderung der MMP-2- und -9-Aktivität nachgewiesen werden. Erklärend soll im folgenden ein Mechanismus beschrieben werden, welcher diese Diskrepanz zwischen Portik-Dobos et al.⁹⁶, und unseren Ergebnissen, die der überwiegenden Literatur entsprechen, erörtert.

Schmidt et al.⁹⁷ konnte auf der Oberfläche von Thrombozyten einen neuen Oberflächenrezeptor identifizieren, welcher extrazelluläre Matrix-Metalloproteinasen induzieren kann, sogenanntes „extracellular matrix metalloproteinase inducer“ EMMPRIN (CD147). Dieser ist ebenfalls auf Monozyten zu finden und wird bei proarteriosklerotischen Reizen wie Chlamydieninfektionen⁹⁸ und LDL-Exposition⁹⁹ verstärkt exprimiert. Beide könnten auf diese Weise zur Plaqueruptur beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass Monozyten zu gewissen Zeitpunkten mit Thrombozyten Aggregate bilden und so miteinander interagieren¹⁰⁰. Der Versuchsaufbau dieser Arbeit erfolgte im Beisein von gesunden Nichtdiabetiker-Thrombozyten in einem Kulturmedium von 4,5 g/l.

Dieses hyperglycämische Medium könnte eine gewisse Aktivierung der Thrombozyten auslösen und somit eine verstärkte Expression des EMMPRIN zur Folge haben. Dies hat wiederum in der Kokultur dieses Studienaufbaus zur Folge, dass durch die Thrombozyten-Monozyteninteraktion eine vermehrte MMP-2- und -9-Aktivität resultiert. Die Proben der Studie von Portik-Dobos et al.⁹⁶ wurden von

Gefäßstücken entnommen, die für eine Revaskularisierung der Koronarien (Bypass) verwendet wurden. An diese Gefäße wird jedoch der Anspruch gestellt, möglichst geringe bis keine arteriosklerotischen Veränderungen in der Gefäßwand aufzuweisen. Deshalb sollten sich auch keine beziehungsweise nur geringe arteriosklerotische Zellinteraktionen nachweisen lassen, wie für arteriosklerotische Gewebe typische aktivierte Thrombozyten mit gesteigerter EMMPRIN-Expression. Demnach wäre es möglich, dass die Gewebeproben Gesunder, wie auch die der Diabetikergruppe, resultierend aus dem fehlenden EMMPRIN durch nicht beziehungsweise kaum vorhandener Thrombozyten geringere Aktivitäten der MMPs aufweisen. Gleichzeitig könnte auch der Regulationsmechanismus „peroxisome proliferator activated receptor“ (PPAR- γ) zu den Unterschieden zwischen den erzielten Ergebnissen hinsichtlich MMP zu Portik-Dobos et al.⁹⁶ führen.

PPAR- γ ist in Monozyten, glatten Muskelzellen und in aus Monozyten entstandenen Makrophagen zu finden¹⁰¹ und wird unter anderem auch durch Metabolite des Inflammationsstoffwechsels aktiviert. In beiden Versuchsaufbauten müsste ein gewisser Entzündungsgrad aufgrund der diabetischen Herkunft der CD34⁺-Progenitorzellen vorliegen.

Jedoch dürfte ein komplettes Gefäßwandpräparat mehr PPAR- γ aufweisen, da sich hier im Gegensatz zum Aufbau dieser Arbeit nicht nur Progenitorzellen/Monozyten/Makrophagen in Kultur befinden, sondern auch glatte Muskelzellen und Endothelzellen zur PPAR- γ -Produktion beitragen. Einerseits führt das direkt zu einer verminderten MMP-9-Produktion¹⁰², andererseits inhibiert PPAR- γ gleichzeitig EMMPRIN¹⁰³, was seinerseits ein Induktor für die MMP-Aktivität darstellt und somit zu einer Verminderung der MMP-9-Aktivität führen könnte.

In den Kokulturen der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich PPAR- γ aus Monozyten/Makrophagen hergestellt. Gleichzeitig führt ein hohes Angebot an EMMPRIN von zumindest teilweise aktivierten Thrombozyten⁹⁷ zu einem Reiz, der sich eher prosekretorisch auf die MMP-9-Produktion auswirkt.

Bei Portik-Dobos et al.⁹⁶ kann von einem höheren PPAR- γ -Spiegel ausgegangen werden. Im Zusammenspiel eines hohen PPAR- γ -Anteils (aus Endothel-, glatten Muskelzellen und Monozyten/Makrophagen) und verminderten EMMPRIN-Pegels (verminderter Thrombozytendichte) dürfte die MMP-9-Produktion, wie auch die Ergebnisse dieser Studie wiedergeben, eine stark verminderte MMP-9-Aktivität hervorbringen.

Die Ergebnisse über die MMP-2-Aktivität lassen sich mit diesem Mechanismus nicht begründen. Jedoch scheint auch hier der Inflammationsgrad eine gewisse Rolle zu spielen. Ries et al.¹⁰⁴ konnten zeigen, dass inflammatorische Zytokine, wie TGF-1 β , Il-1 β und TNF- α , die MMP-2-Produktion steigern. TGF-1 β und TNF α werden hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, TGF-1 β von Thrombozyten sekretiert. Nun kann wiederum davon ausgegangen werden, dass die gewebliche Inflammation in der soweit intakten Arteria mammaria nicht so groß gewesen sein könnte, wie der Entzündungsreiz in den hyperglycämischen Kokulturen dieser Arbeit. Resultierend verminderter Konzentration an genannten entzündungsspezifischen Mediatoren und Zytokinen wurde bei Portik-Dobos et al.⁹⁶ die Sekretion und somit MMP-2 Aktivität als geringer eingestuft.

Die Frage, warum nun die Diabetiker im Vergleich mit nichtdiabetischen Patienten bei der Studie von Portik-Dobos et al.⁹⁶ einen geringeren MMP-2- und -9-Spiegel hatten, lässt sich nicht abschließend klären.

Letztendlich sind Studien auf Zellkulturebene^{92,93} diejenigen, die sich mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit vergleichen lassen, sofern die gleichen Zellen in der Kultur untersucht werden. Death et al.⁹² untersuchte die MMP-2- und -9-Aktivität von Makrophagen, welche sich aus Monozyten differenziert haben und vom Leukozyten des peripher venösen Blutes isoliert wurden. Bei direktem Vergleich konnte so gezeigt werden, dass beide Studien^{92,93} die MMP-9-Sekretion als signifikant erhöht beurteilen. Zwar zeigten Uemura et al.⁹³ ein absolut identisches Resultat zu den Versuchen dieser Arbeit hinsichtlich signifikant erhöhter MMP-9-Aktivität und unauffälliger MMP-2-Aktivität, jedoch können bovine Endothelzellen nicht unmittelbar mit aus CD34⁺-Progenitorzellen entstehenden Makrophagen/Schaumzellen verglichen werden, wenngleich auch Endothelzellen aus CD34⁺-Zellen entstehen können.

Folgend stellte sich die Frage, ob der Wachstumsfaktor M-CSF erhöht im Zellkulturüberstand nachzuweisen ist, wenn die Schaumzellkokulturen aus diabetischen CD34⁺-Progenitorzellen entstanden sind (entsprechend Tojo et al.¹⁰⁵ soll die MMP-9-Sekretion von Schaumzellen durch diesen Faktor angeregt werden). Nach den bereits diskutierten Ergebnissen könnte eine erhöhte Konzentration bei Diabetikern erwartet werden. Nach dieser Studie (siehe Anhang, Statistik 5) sind die Werte der Diabetikergruppe jedoch tendenziell vermindert. Da die Studie von Tojo et al.¹⁰⁵ jedoch mit Monozyten des Hasen durchgeführt wurde, kann diese nicht als

unmittelbare Referenz zu den Resultaten dieser Promotionsarbeit gerechnet werden und somit die erhobenen Ergebnisse nur bedingt in Frage stellen.

2.2 Einfluss des Glukosegehaltes im Medium

2.2.1 Matrix-Metalloproteinase-Aktivität

Zahlreiche Hinweise lassen darauf schließen, dass das Glukosemilieu im Kulturmedium, wie auch *in vivo* im Blut, die MMP-Produktion der Schaumzellen beeinflusst. Ein Vorliegen des Diabetes mellitus begünstigt hohe Glukosewerte und diese wiederum die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies^{86,88}.

Erklärt wird die Radikalentstehung durch die vermehrte Verstoffwechslung der Glukose, wobei als Abbauprodukt in hohem Maße oxidative Radikale entstehen. Gleichzeitig erfolgt ein verstärktes Auftreten von advanced glycation end products (AGE) und die Aktivierung von polyolhaltigen Stoffwechselprozessen aufgrund hoher Glukosewerte⁸⁸.

Die Versuche hatten zum Ziel, im Prozess der Schaumzellendifferenzierung entsprechend erhöhte MMP-2- und -9-Aktivitäten abhängig vom Glukosegehalt (0 g/l, 1 g/l, 2,97 g/l, 4,5 g/l) nachzuweisen.

Die Ergebnisse legen dar, dass die MMP-Sekretion nicht wie vermutet entsprechend der Glukosekonzentrationen im Medium ansteigen. Vielmehr zeigte sich die MMP-Aktivität bei den Glukosekonzentrationen von 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l als nahezu konstant, während der Kulturansatz von 0 g/l ein tendenziell etwas erniedrigtes Niveau an MMP-Aktivität aufwies (siehe Anhang, Statistik 8).

Bei der Untersuchung von Makrophagen auf ihre MMP-9-Sekretion zeigen Death et al.⁹² eine signifikant gesteigerte Aktivität bei erhöhten Glukosespiegeln im Medium. Uemura et al.⁹³ konnten einen identischen Nachweis mit erhöhten MMP-9-Aktivitäten bei bovinen Endothelzellen erbringen.

Begründend für das Ergebnis dieser Promotionsarbeit, welches mit der gängigen Literatur im Widerspruch steht, könnten zwei Faktoren eine Rolle spielen. Es wäre denkbar, dass die Unterschiede, die aus den verschiedenen Glukosemedien resultieren, zum einen kleiner sind und diese mit n = 9 Probanden statistisch nicht nachgewiesen werden können. Zum anderen kultivieren Death et al.⁹² Monokulturen aus Makrophagen, während vorliegender Versuchsaufbau prinzipiell das Resultat aus den Einflüssen der spezifischen Glukosekonzentration und der verschiedenen

Differenzierungsstadien der CD34⁺-Progenitorzellen über Monozyten und Makrophagen zu Schaumzellen eruiert.

Pro Kokultur befinden sich in 50000 CD34⁺-Zellen im Ansatz dieser Studie. Davon differenziert 1/3 zu Schaumzellen³³ und produzieren MMP-2 und -9. Death et al.⁹² kultivierten $1 \cdot 10^5$ Makrophagen pro Kultur. Logisch erscheint, dass der MMP-Spiegel deutlich höher wie in den Versuchen dieser Arbeit sein muss und somit ist der nachgewiesene Effekt weitaus deutlicher ersichtlich. Ergebnisse dieser Studie zeigen eine erhöhte MMP-9-Aktivität bei der Schaumzellendifferenzierung aus diabetischen CD34⁺-Progenitorzellen. Jedoch ließ sich zeigen, dass zusätzlich weitere Faktoren außer dem Glukosereiz in der MMP-Sekretion und -Aktivität eine Rolle spielen. Begründung liefert hierbei die Tatsache, dass im bereits diskutierten Versuch Absatz IV.1.1 der Glukosespiegel im Medium bei der Diabetiker- wie auch bei der Kontrollgruppe auf konstant erhöhtem Glukoselevel gehalten wurde. Trotzdem waren hier deutliche Unterschiede in der Aktivität zwischen den beiden Gruppen darzustellen.

3 Ausblicke und Bedeutung für die Zukunft

Zahlreiche Studien zeigen, dass CD34⁺-Progenitorzellen wesentlich zur Entstehung von Arteriosklerose beitragen. Diese chronische Gefäßentzündung stellt eine Hauptkomplikation des Diabetes mellitus dar. Die von dieser Promotionsarbeit untersuchte Schaumzellgenese und die daraus resultierende Ansammlung in den Gefäßwänden ist ein wichtiger Faktor im Pathomechanismus der Arteriosklerose, dessen pharmakologische Alteration durchaus ein Gewinn in der Behandlung diabetischer Patienten sein könnte.

Die Tatsache, dass Thrombozyten bei CD34⁺-Progenitorzellen ein Differenzierungsbestreben zur Schaumzelle induzieren^{33,34}, scheint ein guter Ansatzpunkt zu sein, pharmakologisch der Schaumzellentstehung *in vivo* entgegenzutreten.

Die Erforschung dieses Differenzierungsprozesses steht im Bereich diabetischer Alterationen noch am Anfang. In weiten Teilen ist noch unklar, inwieweit ein Diabetes mellitus Einfluss auf diesen Prozess hat.

Belegt scheint dieser Studie zufolge zu sein, dass die diabetischen Veränderungen, die auf CD34⁺-Progenitorzellen wirken, Einfluss auf die Schaumzellentstehung im Sinne einer längeren Lebensdauer und in der Tendenz auf höhere Schaumzellzahlen

haben. Darüber hinaus ist die Sekretion der Matrix-Metalloproteinase 9 ebenfalls erhöht.

Um diese Tatsache genauer zu beleuchten, sollte eine Klärung der molekularen Mechanismen dieser Veränderungen erfolgen, die zu Unterschieden zwischen Gesunden und Diabetikern führen. Nur so wird die Medizin in der Lage sein, pharmakologisch veränderte Interaktionsmechanismen zu erfassen und zu beeinflussen. Ein guter Ansatz erzielten Daub et al.^{33,34}, welche zum einen bei gesunden CD34⁺-Zellen CD162 und CD62P als wichtige Rezeptoren im Interaktionsmechanismus mit Thrombozyten nachweisen konnten und zum anderen HMG CoA-Reduktasehemmer beziehungsweise PPAR- α - und PPAR- γ -Agonisten als Gegenspieler der Schaumzellbildung aufzeigten. Hierbei wiesen HMG-CoA-Reduktasehemmer zugleich einen reduzierenden Effekt auf die MMP-9-Sekretion auf.

Wichtig hinsichtlich der Resultate dieser Arbeit scheinen auch Versuche von Kaneider et al.¹⁰⁶, die eine apoptotische Wirkung des Statins Cerivastatin auf Monozyten nachweisen konnten. Angesichts der vorliegenden Ergebnisse einer deutlich längeren Überlebenszeit bis zur Apoptose der Schaumzellen beim Diabetiker und einer durch Studien nachgewiesenen Mortalitätssenkung von Diabetikern durch die Statinbehandlung¹⁰⁷ wäre es durchaus denkbar, dass die Verminderung der Lebenszeit der Schaumzellen durch die apoptotische Wirkung dieser Wirkstoffgruppe einen Beitrag zum Benefit der Statin Medikation bei diesem Krankheitsbild leistet.

Gleichzeitig wäre hinsichtlich der Vorarbeit von Daub et al.^{33,34} in Richtung pharmakologischem Ansatz zu ermitteln, inwiefern sich die Rezeptoreigenschaften bei Zellen von Diabetikern verändern und inwieweit die pharmakologische Wirksamkeit der genannten Stoffgruppen zwischen gesund und diabetisch differiert. So könnte zum einen eine Dosiserhöhung bei diabetischen Patienten und zum anderen ein weiterer Ansatz mittels selektiver Antikörpertherapie gegen CD162 und CD 62P von Erfolg gekrönt sein.

Weiterhin sind genetische Veränderungen an den CD34⁺-Progenitorzellen von Diabetikern auszuschließen, die unter Umständen eine verstärkte Schaumzellbildung bei diabetischer Stoffwechsellage bedingen. Hierbei wäre hinsichtlich der MMP-Aktivität eine verminderte Abwehr gegen reaktive Sauerstoffspezies als Grund für eine vermehrte Produktion dieser Enzyme^{86,93} und gleichzeitigem Ansatz einer

therapeutischen Möglichkeit mit Radikalfängern, wie hochdosiertem Vitamin C und E, gegeben.

Diese Studie zeigt für zukünftige wissenschaftliche Arbeiten einen neuen eventuell lohnenden Ansatz auf, um Diabetikern arteriosklerotische Komplikationen und somit deutliche Einbußen in ihrer Lebensqualität zu ersparen oder zu vermindern.

4 Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass die diabetische Stoffwechsellage die von Thrombozyten induzierte Differenzierung der CD34⁺-Progenitorzelle zur Schaumzelle proarteriosklerotisch beeinflusst.

Ergebnissen dieser Studie zufolge müssen bereits Veränderungen in den CD34⁺-Progenitorzellen im diabetischen Organismus stattfinden. Diese konnten in Form von zytokinetischen Veränderung im Differenzierungsgeschehen zur Schaumzelle, aber auch in den Sekretionseigenschaften der Matrix-Metalloproteinase 9, nachgewiesen werden. Möglicherweise sind CD34⁺-Progenitorzellen aufgrund ihres diabetischen Metabolismus hinsichtlich ihrer Signalkaskade verändert, was schließlich zu den festgestellten Alterationen in der MMP-9-Sekretion und 1,6tägigen Lebenszeitverlängerung führt. Gleichzeitig wäre auch eine genetische Prädisposition denkbar, die zwar höchstwahrscheinlich nicht zur Diabetesinduktion beiträgt, aber mit ihr assoziiert sein könnte.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die Schaumzellbildung auf Basis der CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten bei Diabetikern Veränderungen mit sich bringt, welche die aggressivere Progression der diabetischen Arteriosklerose begründen könnte.

V Zusammenfassung

In der vorliegenden, klinisch-experimentellen Promotionsarbeit wurden das Differenzierungsverhalten von CD34⁺-Progenitorzellen zu Schaumzellen auf Basis thrombozytärer Induktion hinsichtlich diabetischer Alterationen untersucht.

In Vorarbeiten zu diesem Projekt wurde festgestellt, dass Thrombozyten auf CD34⁺-Progenitorzellen eine Differenzierungsinduktion ausüben, die mit der Schaumzellbildung endet und somit zumindest ein Teilaspekt in der Pathogenese der Arteriosklerose darstellt. Unter der Arteriosklerose haben Diabetiker verstärkt zu leiden, da sie früher beginnt sowie aggressiver und fulminanter verläuft.

Ein Grund für die beschleunigte Pathogenese stellt die Interaktion der CD34⁺-Progenitorzellen mit den Thrombozyten dar, da hierbei diabetische Faktoren im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe deutlich proarteriosklerotische Veränderungen bedingen.

Daten aus Kokulturen mit diabetischen CD34⁺-Progenitorzellen und gesunden Thrombozyten konnten belegen, dass daraus resultierende Schaumzellen deutlich proarteriosklerotische Abweichungen zeigen, indem sie eine um 1,6 Tage verlängerte Überlebenszeit aufweisen.

Zusätzlich zeigte sich, dass die diabetische Schaumzellmenge im Trend höher zu sein scheint und die Matrix-Metalloproteinase-9-Aktivität der diabetischen Kohorte deutlich erhöht ist.

Die Expression des Scavenger-Rezeptors CD68 blieb trotz diabetischer Herkunft der CD34⁺-Progenitorzellen unverändert.

All diese Faktoren zeigen eine mögliche Ursache beziehungsweise einen Teilaspekt, der den deutlich aggressiveren Pathomechanismus der Arterioskleroseentstehung beim Diabetikern begründen könnte.

Weiterhin konnten andere Faktoren im Differenzierungsprozess der CD34⁺-Zellen zur Schaumzelle untersucht werden.

Die Glukosekonzentration im Kulturmedium stellte nach den Ergebnissen dieser Studie keinen Faktor dar, der die Zytokinetik der Schaumzellbildung beziehungsweise deren Sekretionseigenschaften der Matrix-Metalloproteinasen proatherogen beeinflusst.

Diabetische Thrombozyten wie auch die hohe und niedere Insulinkonzentration im Kulturmedium haben keinen Einfluss auf die Zytokinetik der Schaumzellbildung und der Expressionseigenschaften des bedeutsamen Scavenger-Rezeptors SR-A.

Es konnte mit dieser Arbeit bewiesen werden, dass der Mechanismus der Schaumzellbildung aus CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten diabetischen Veränderungen unterliegt, die den erkrankten Organismus deutlich für proarteriosklerotische Veränderungen im Sinne einer vermehrten Schaumzellbildung prädisponieren. Prognostisch könnte dieser ein vielversprechender Ansatz für ein pharmakologisches Ziel im Kampf gegen die Arteriosklerose beim Diabetiker sein. Es zeigt sich so, dass hinsichtlich dieser zellulären Interaktion weitere Studien von Nöten sind, die molekularen Unterschiede diabetischer Schaumzellbildung aufzuklären, um so dem größten Mortalitätsfaktor für Diabetiker, der Arteriosklerose, zu entgegnen.

VI Anhang

1 Abbildungen

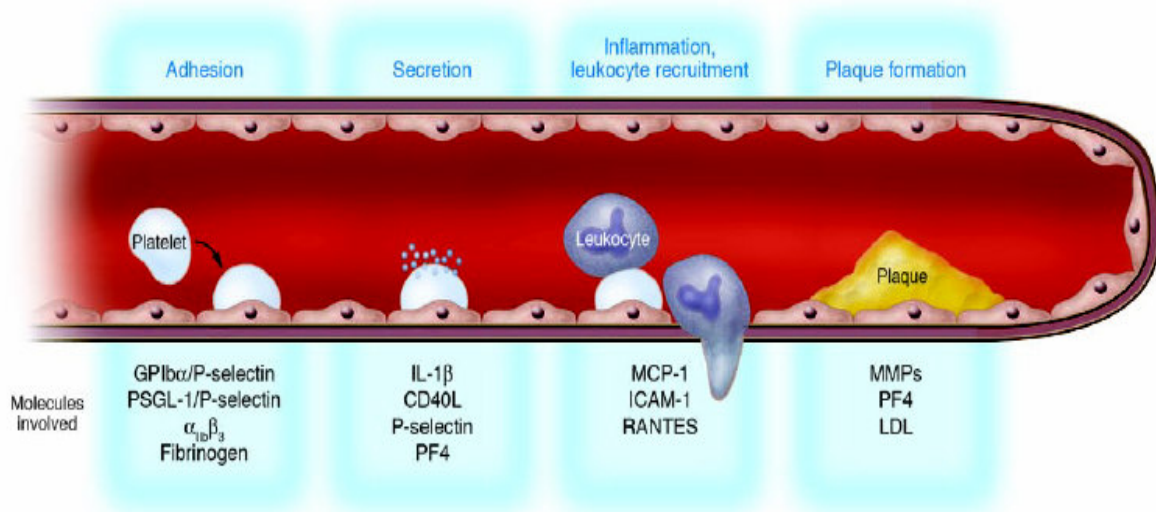


Abbildung 1: Modell der plättcheninduzierten Atherogenese. Thrombozyten wandern rezeptorvermittelt durch GPIIb/IIIa-P-Selektin und PSGL-1/P-Selektin entlang der endothelialen Gefäßauskleidung. Die Adhäsion der Thrombozyten erfolgt schließlich über $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine. Die Plättchen schütten nach diesem Adhäsionsvorgang proinflammatorische Substanzen wie PF-4 und CD40L aus. Die Endothelmonolayer wird so proatherogen stimuliert und steigert die Freisetzung von chemotaktischen Faktoren wie MCP-1 und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1). Letztendlich rekrutieren nun die Thrombozyten zirkulierende Monozyten an die Gefäßwände und fördern die Transmigration der Monozyten durch die endotheliale Schicht ins Gewebe, wo die Transformation der Monozyten zu Schaumzellzellen stattfindet. Dieser Mechanismus zeigt, dass Thrombozyten am Prozess der Arterioskleroseentstehung beteiligt sind. Nach Gawaz et al.¹⁰⁸.

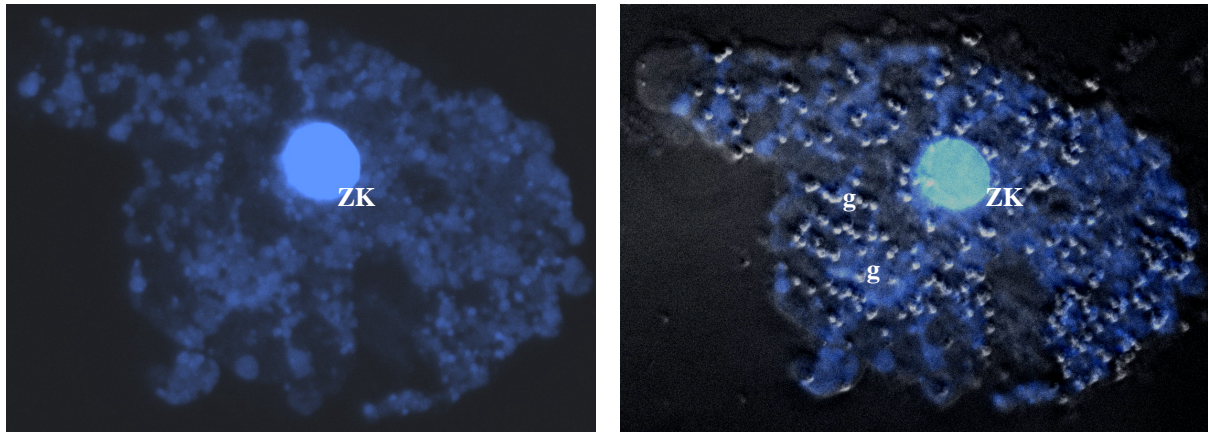


Abbildung 2: Höchst Färbung einer adulten Schaumzelle. Der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid diffundiert durch die Plasmamembran von gesunden Zellen und bindet an die kleine Furche der DNA. So lässt sich spezifisch der Zellkern einer enddifferenzierten Schaumzelle nach erfolgter Phagozytose der kokultivierten Thrombozyten darstellen. Zu sehen (links) ist das konfokale Bild der Schaumzelle mit fluoreszierendem Zellkern (ZK). Rechts wurde das konfokale Bild mit einer eindimensionalen Mikroskopiedarstellung übereinander projiziert. Zu erkennen sind die vielen Granula (g), welche der Schaumzelle ihren Namen geben und oxLDL enthalten.

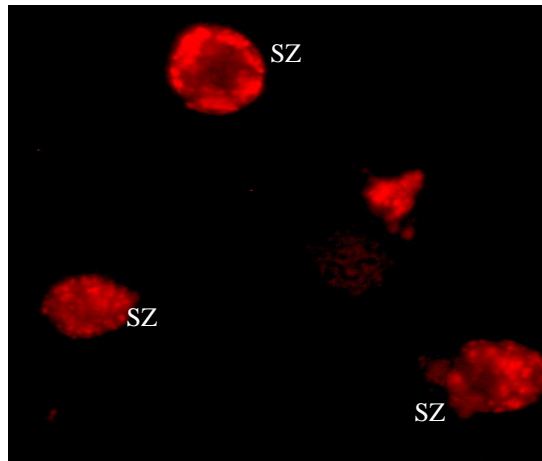


Abbildung 3: Dil-AcLDL-Aufnahme von phagozytierten Thrombozyten in Schaumzellen. Um die LDL-Bindung detektieren zu können, wurden frisch isolierte humane Thrombozyten mit Dil-AcLDL inkubiert. Die nun Dil-AcLDL beladenen Thrombozyten wurden nun in Kokultur mit Schaumzellen gegeben und mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskopes untersucht. Es konnte die Aufnahme einer beträchtlichen Menge von Dil-AcLDL gefärbten Thrombozyten in die Schaumzellen während des Zeitverlaufes beobachtet werden. Zu sehen sind nichtgefärbte Schaumzellen (SZ), welche die fluoreszierenden Thrombozyten phagozytiert haben (rot).

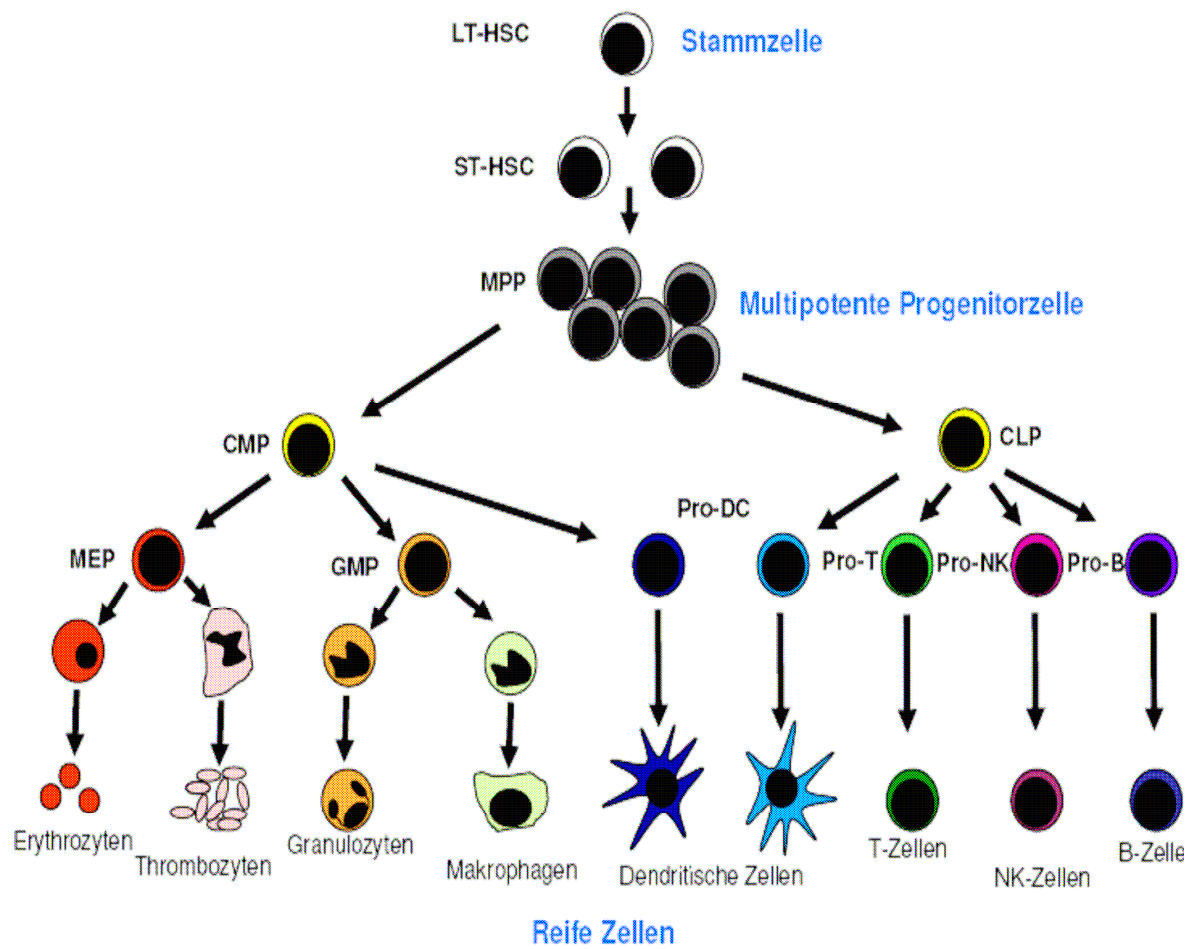
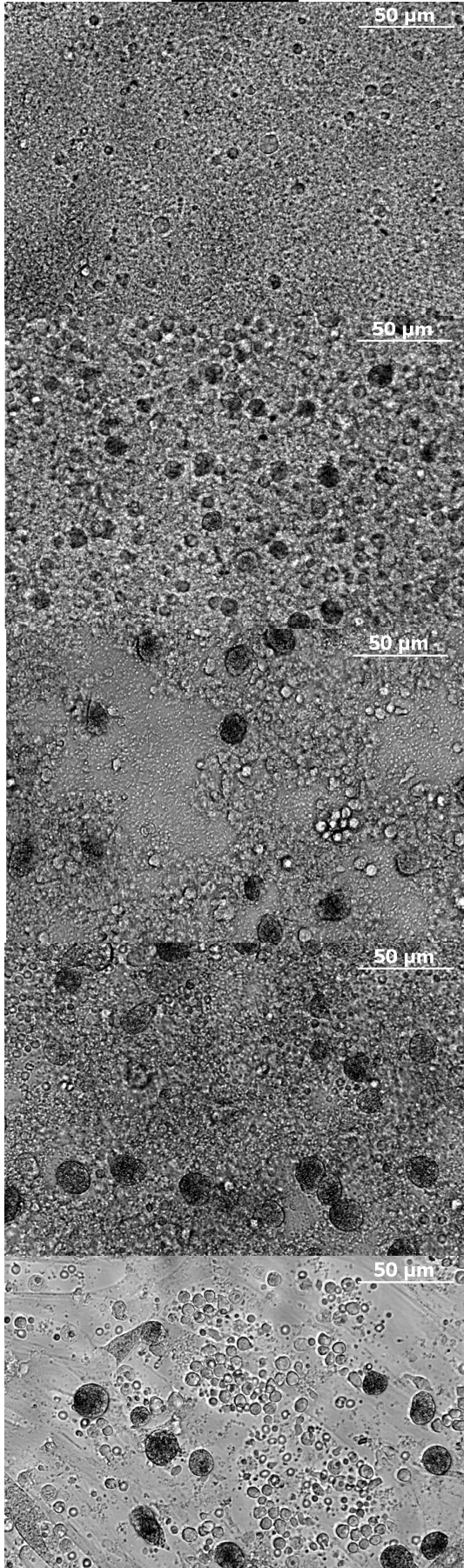
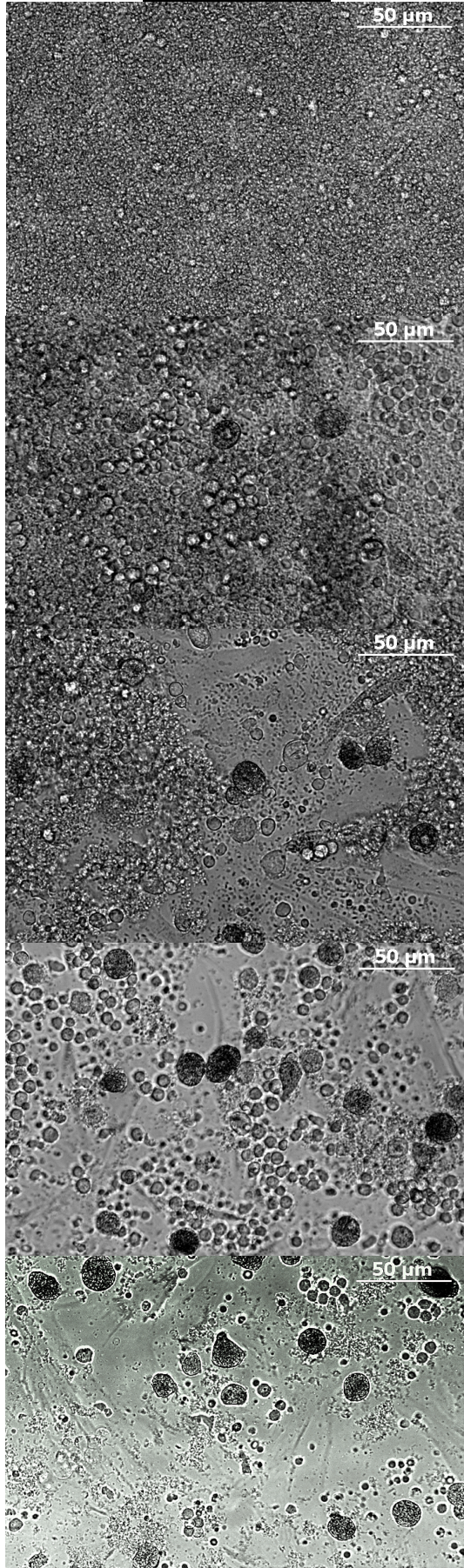


Abbildung 4: Hämatopoese und Progenitorzelllinien. Hämatopoetische Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC) lassen sich in LT-HSC (*long term*) Zellen unterteilen, die sich selbst erneuern können und die Hämatopoese ein Leben lang rekonstruieren, aber auch in ST-HSC (*short term*), die sich nur in einer begrenzten Zeit selbst erneuern. ST-HSC differenzieren sich in multipotente Progenitorzellen (MPP), die einen irreversiblen Differenzierungsschritt bis hin zu ausgereiften Zellen ausführen. Aus lymphatischen Progenitorzellen (CLP) gehen T- und B-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen hervor, während sich myeloische Progenitorzellen (CMP) in Myelomonocyten Progenitorzellen (GMP) mit Monozyten/Makrophagen und Granulozyten und in Megakaryozyten/Erythroiden Progenitorzellen (MEP) differenzieren. MEP produzieren dabei Thrombozyten und Erythrozyten. Sowohl CMPs, als auch CLPs bewirken eine Differenzierung in dendritische Zellen. Diese Stamm- und Progenitorzellpopulationen können als eigenständige Population mit Hilfe von Zelloberflächenmarkern bestimmt werden. Nach Passegué et al.⁵⁰ verändert.

Diabetiker



Nichtdiabetiker



Tag

2

5

8

10

12

Abbildung 5: Schaumzellen aus diabetischen CD34⁺-Progenitorzellen und gesunden Thrombozyten im Differenzierungsverlauf bei 32facher Vergrößerung. Es wurden Kokulturen mit diabetischen, beziehungsweise nichtdiabetischen CD34⁺-Progenitorzellen und gesunden Thrombozyten über zwölf Tage kokultiviert und mit dem Lichtmikroskop bei 32facher Vergrößerung am Tag zwei, fünf, acht, zehn und zwölf bildlich dokumentiert. Optisch zeigten sich keine Unterschiede im Wachstums- und Differenzierungsverlauf der Schaumzellen. Die Differenzierungsstadien waren zeitlich gesehen von gleicher Morphologie und der Größenzuwachs konstant und gleichförmig in beiden Gruppen. Die Granulierung zeigte sich zeitgleich zunehmend, die Phagozytosehöfe hatten hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes den gleichen Entstehungs- und Ausprägungszeitraum.

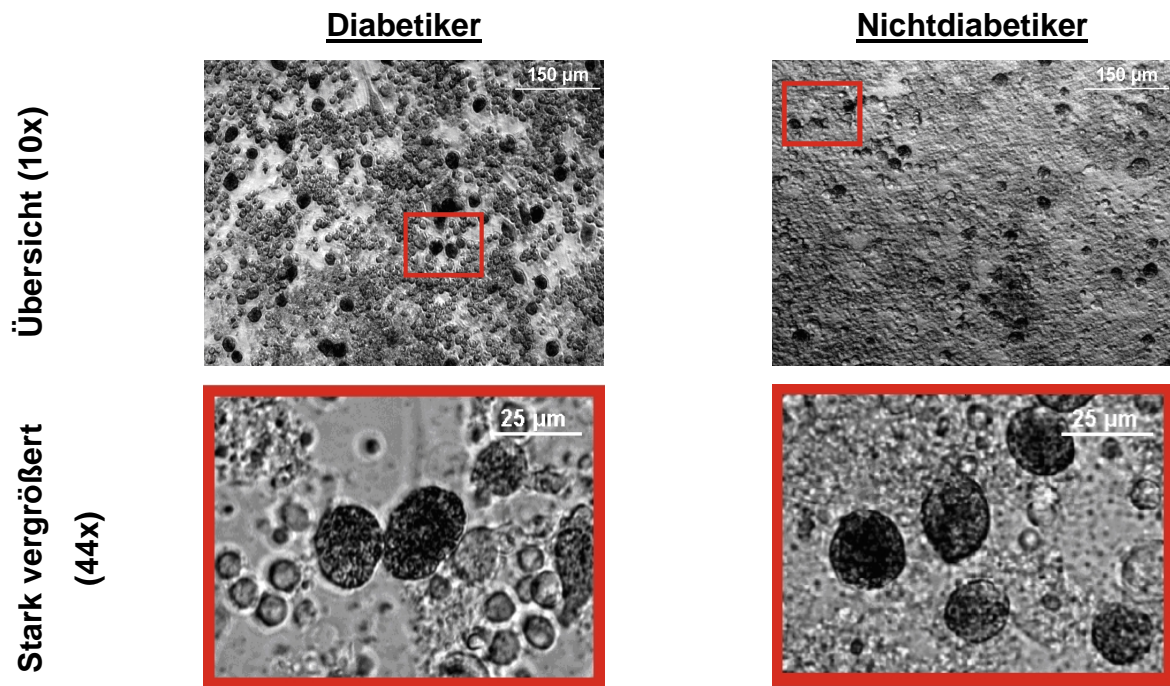


Abbildung 6: Schaumzellen aus CD34⁺-Progenitorzellen von Diabetikern und Nichtdiabetikern im Vergleich. CD34⁺-Zellen aus sternalem Knochenmark wurden mit gesunden humanen Thrombozyten in 96-Wellplatten für zehn Tage bis zu ihrer vollständigen Ausdifferenzierung koinkubiert. Die Schaumzellen der nichtdiabetischen Gruppe zeigten in der Übersichtsaufnahme ein im Vergleich zur diabetischen Kultur etwas ausgedünntes Verteilungsmuster auf der Kulturplatte, welches sich statistisch jedoch nicht beweisen ließ. Nichtdiabetiker wie Diabetiker zeigen einen gleich großen Phagozytoserand, gleiche Zelldurchmesser (25 µm), identische Granulierungseigenschaften, eine ovale bis runde Form und gleichsam homogene Zellgrenzen.

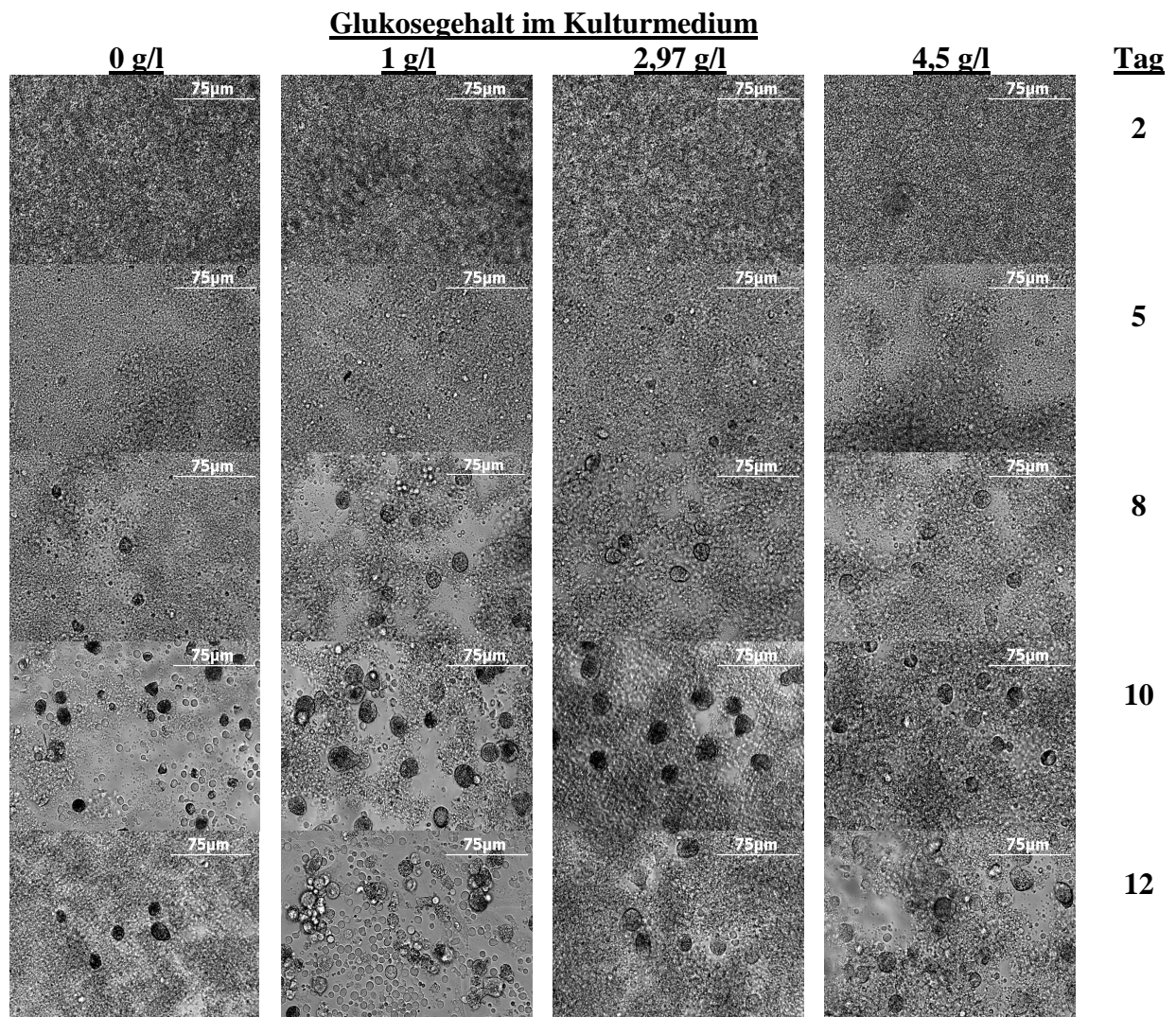


Abbildung 7: Schaumzellendifferenzierung aus CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten gesunder Spender im Differenzierungsverlauf bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen im Kulturmedium. Beobachtet wurden Kokulturen aus CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten gesunder Probanden bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen im Medium (0 g/l, 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l) im Differenzierungsverlauf. Bei der Beobachtung der Kokultur mit 0 g/l Glukose im Medium zeigte sich eine geringere Differenzierungsquote der CD34⁺-Progenitorzellen im Vergleich zu den Kulturen der anderen Glukosekonzentrationen. Zugleich ließ sich eine verlangsamte Größenzunahme pro Zeiteinheit nachweisen. Betrachtete man den Verlauf der anderen Glukosemedien mit 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l, so ließ sich kein Unterschied im Wachstumsverlauf oder in der Größenzunahme erkennen. Der Phagozytosehof zeigte sich bei 0 g/l hinsichtlich der Entstehung und Ausprägung etwas langsamer und kleiner. Bei den Medien des ansteigenden Glukosegehaltes zeigte sich kein Unterschied.

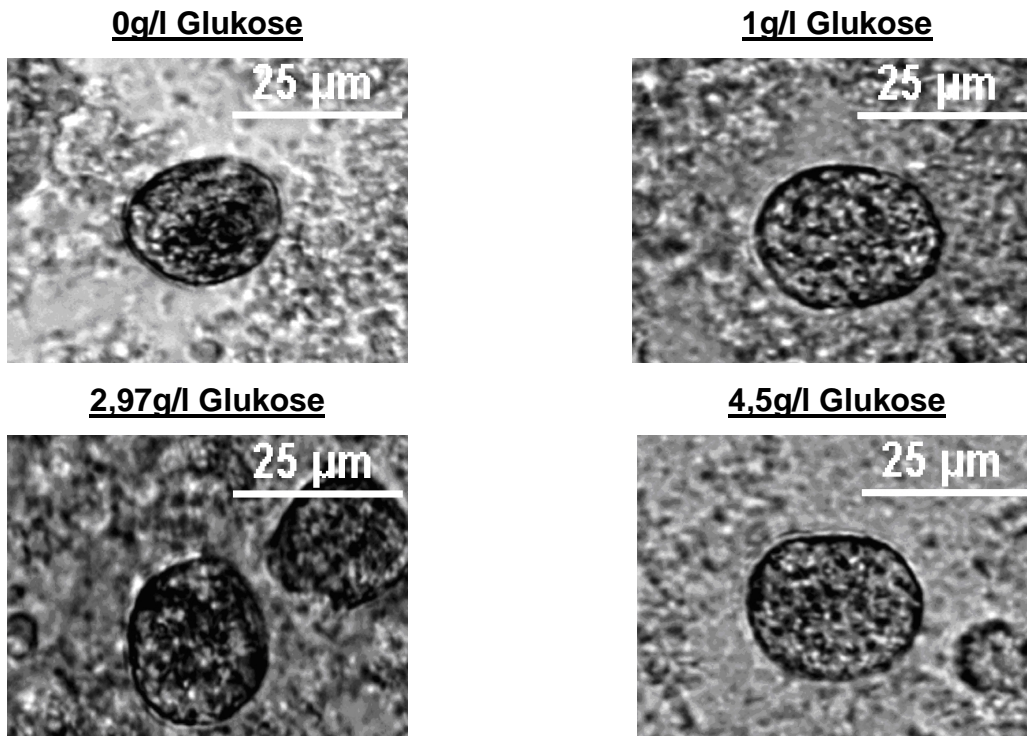


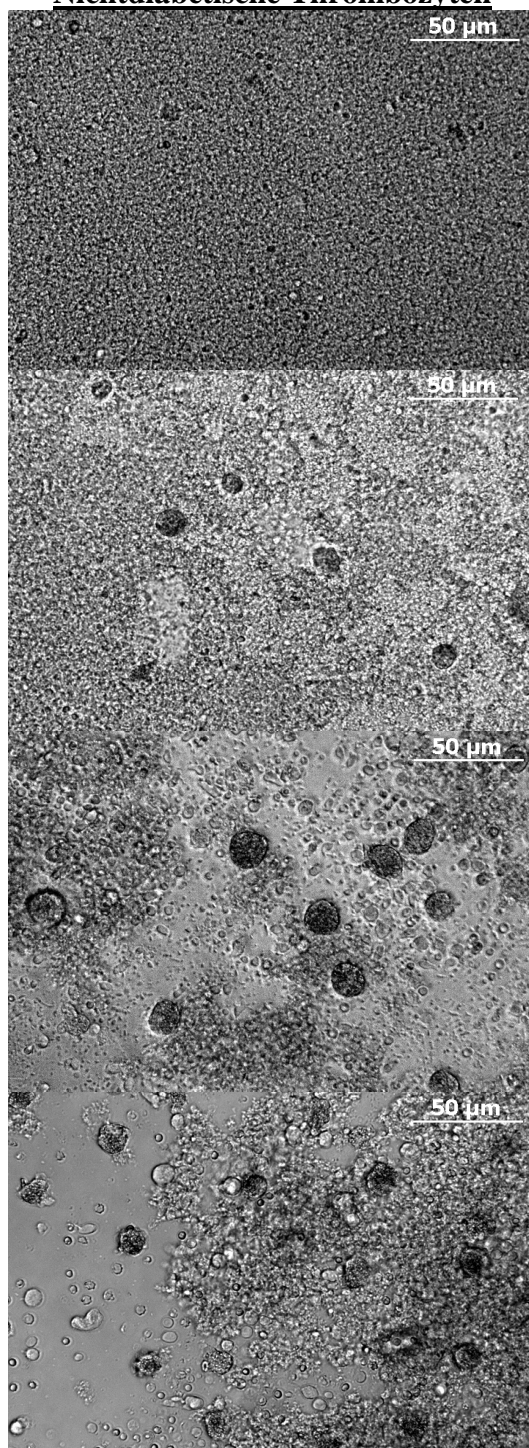
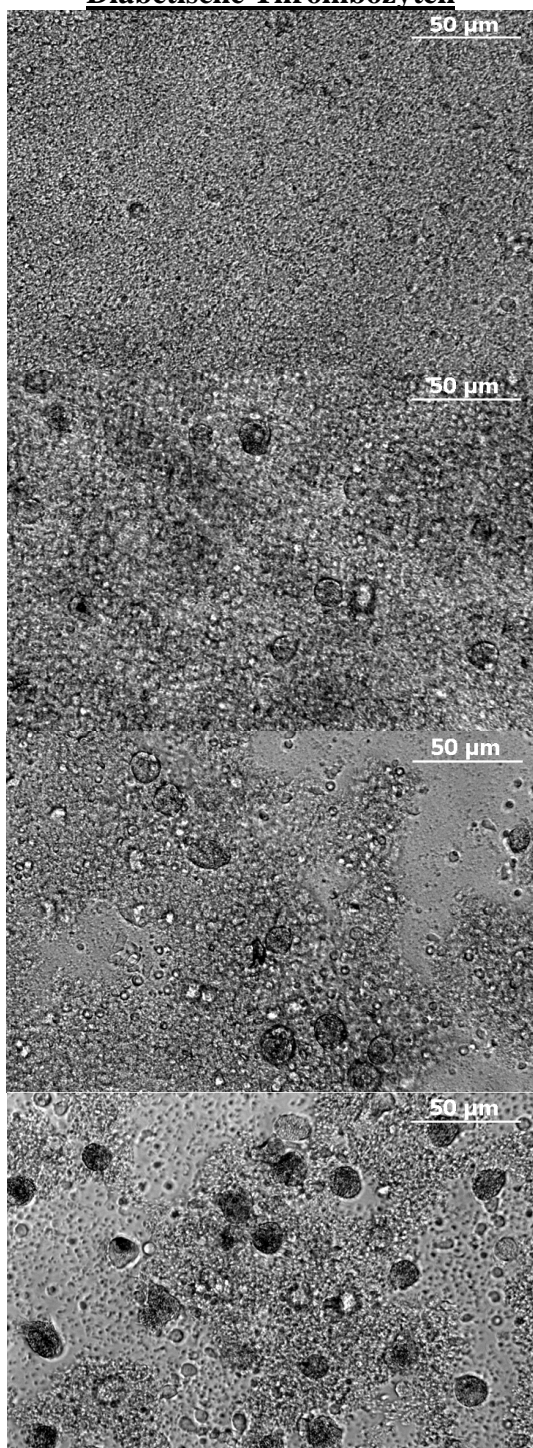
Abbildung 8: Ausgereifte Schaumzellen aus Kokulturen mit CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten gesunder Spender bei unterschiedlichem Glukosegehalt im Kulturmedium. Mit optischer Mikroskopie bei 88facher Vergrößerung wurde am zehnten Tag nach Kultivierungsbeginn der CD34⁺-Zell/Thrombozyten-Kokultur aus jeweils gesunden Probanden die morphologischen Unterschiede der resultierenden Schaumzellen der 4 Glukosemedien mit 0 g/l, 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l miteinander hinsichtlich Größenrelation, Granulierung, Form und Größe des phagozytotischen Randsaumes verglichen. Es zeigte sich, dass die Schaumzellen mit 0 g/l deutlich kleiner waren (15 µm), als diejenigen der restlichen Medien, welche identisch große Schaumzellen aufwiesen (25 µm). Ebenfalls differierte die Granulierung der Schaumzellen in der Feinheit: 0 g/l sehr fein und dicht versus Medien mit Glukosegehalt gröber, aufgelockert. Der phagozytotische Randsaum zeigte sich bei den Schaumzellen aller Medien identisch ausgeprägt. Die Form der Schaumzellen konnte unabhängig von der Glukosekonzentration im Medium als oval bis rund bezeichnet werden.

CD34⁺-Progenitorzellen

Diabetische Thrombozyten

Nichtdiabetische Thrombozyten

Tag



2

5

8

10

Abbildung 9: Schaumzellendifferenzierung bei Kokulturen aus CD34⁺-Progenitorzellen gesunder Probanden und Thrombozyten diabetischer beziehungsweise nichtdiabetischer Herkunft. Es wurden Kokulturen aus gesunden CD34⁺-Nabelschnurzellen und Thrombozyten diabetischer beziehungsweise nichtdiabetischer Probanden über zehn Tage kultiviert und am Tag zwei, fünf, acht und zehn bildlich mittels optischer Mikroskopie bei 32facher Vergrößerung dokumentiert. Es ließ sich im Größenzuwachs und im Differenzierungsgrad kein Unterschied zwischen der Kokultur mit Diabetiker-Thrombozyten beziehungsweise Nichtdiabetiker-Thrombozyten erkennen. Im Verlauf zeigte sich eine zeitlich etwa identisch einsetzende Granulierung beider Schaumzellgruppen. Hinsichtlich Form und Entwicklung des Phagozytosehofes ließen sich identische morphologische Eigenschaften erkennen.

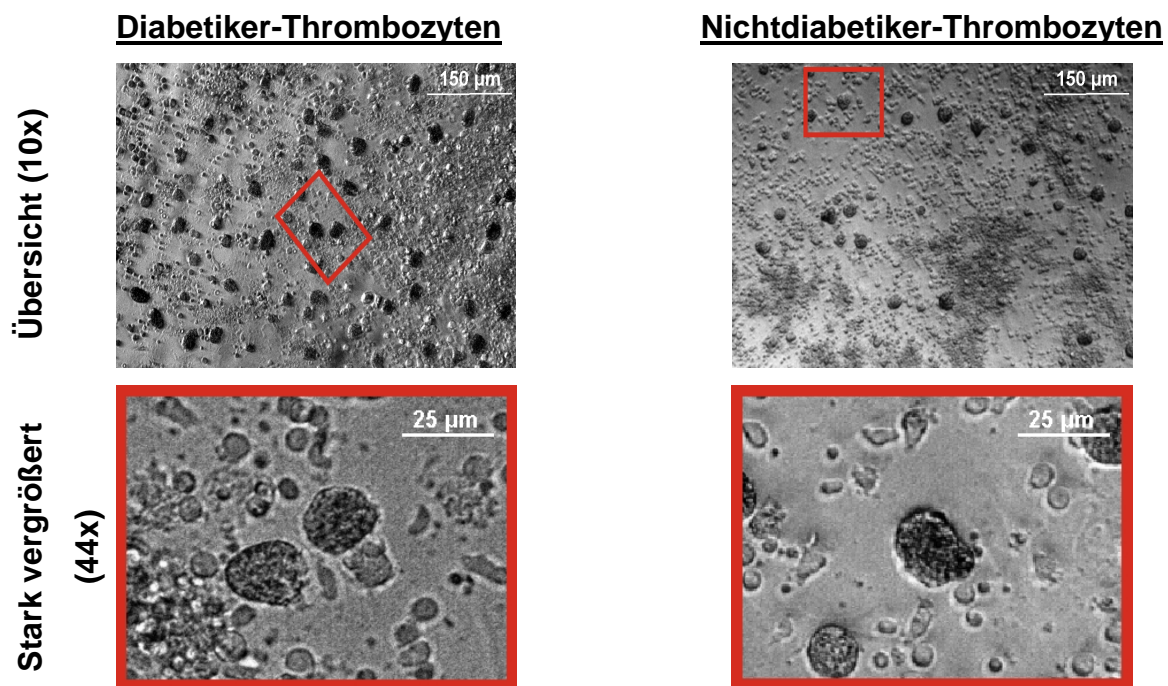


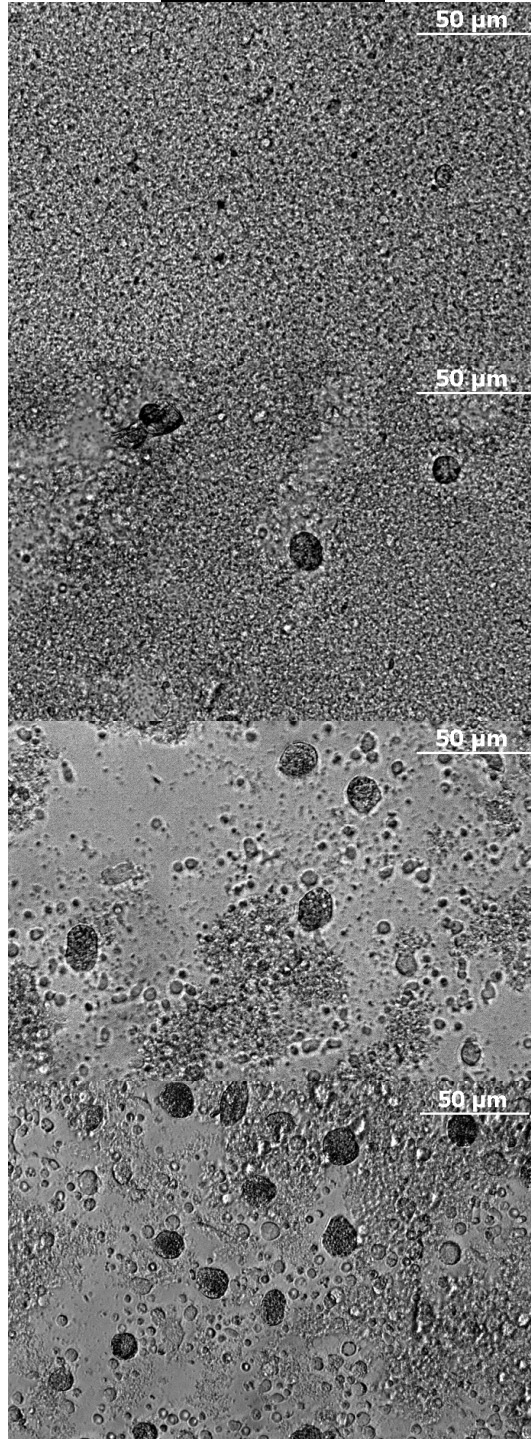
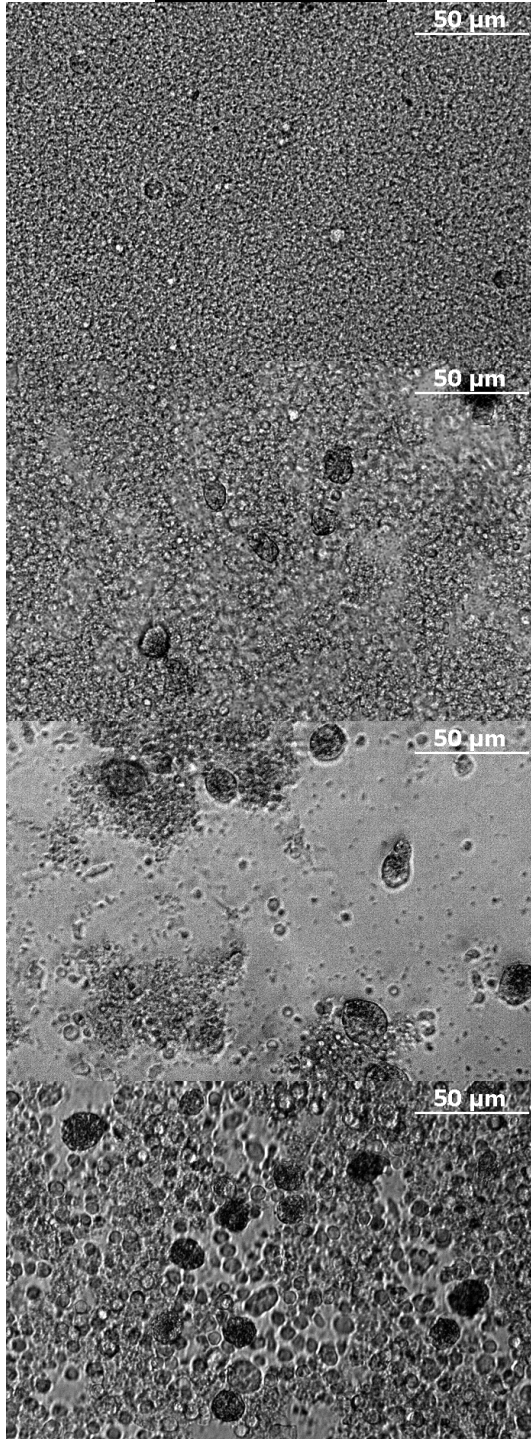
Abbildung 10: Schaumzellen aus Kokulturen gesunder CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten gesunder beziehungsweise diabetischer Probanden. In der Übersichtsaufnahme am zehnten Tag nach Kulturbeginn wies die Gruppe mit den diabetischen Thrombozyten ein dichteres Wachstum auf, was jedoch statistisch nicht belegt werden konnte. In 44facher Vergrößerung zeigten sich gleichsam in beiden Gruppen Zellen mit identischem Zelldurchmesser von etwa 25 µm. Der Phagozytosehof um die Schaumzellen zeigte gleiche Ausmaße. Ebenso wie der Grad und die Körnung der Granulierung, zeigte auch die Form und die Zellbegrenzung keine Auffälligkeiten, die für eine diabetische Alteration der Schaumzellen sprechen würde.

CD34⁺-Progenitorzellen
Nichtdiabetiker-Thrombozyten

Insulin 0.1 µg/ml

Insulin 10 µg/ml

Tag



2

5

8

10

Abbildung 11: Schaumzellendifferenzierung bei CD34⁺-Progenitorzellen/Thrombozyten Kokulturen gesunder Probanden bei verschiedenen Insulinkonzentrationen im Medium. Es wurden Zellkulturen aus gesunden CD34⁺-Nabelschnurzellen und Thrombozyten gesunder Probanden über zehn Tage bei einer Insulinkonzentration von 0,1 µg/ml beziehungsweise 10 µg/ml im Medium kultiviert und am Tag zwei, fünf, acht und zehn bildlich mittels optischer Mikroskopie bei 32facher Vergrößerung dokumentiert. Soweit lichtmikroskopisch beurteilbar, erscheint die Größenzunahme der Schaumzellen wie auch die Zunahme der Granulierung im Zeitverlauf bei beiden Gruppen gleich schnell zu erfolgen. Der Phagozytosehof bildet sich gleichmäßig schnell und in gleichem Ausmaß.

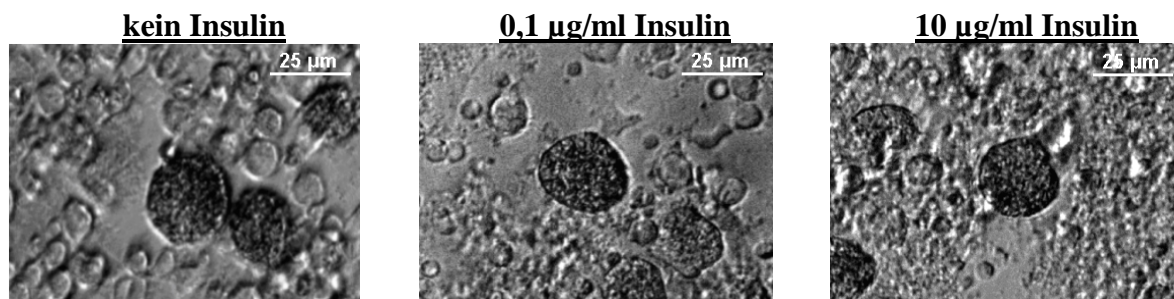
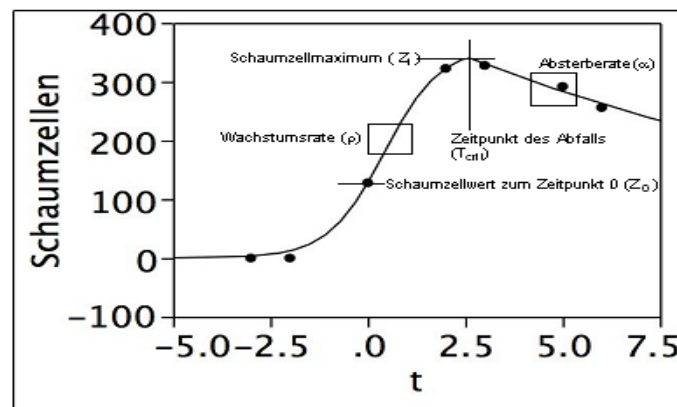


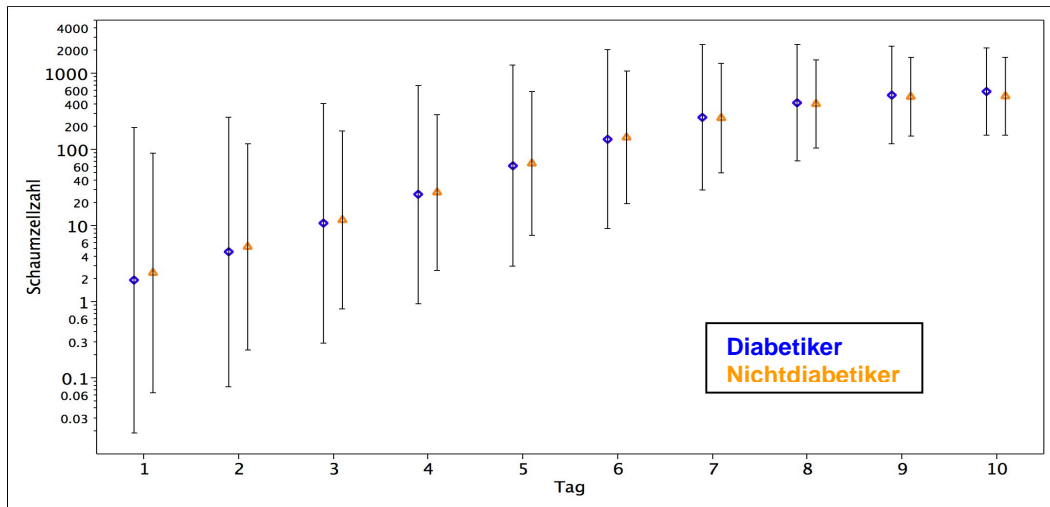
Abbildung 12: Schaumzellen aus CD34⁺-Progenitorzellen/Thrombozyten Kokulturen gesunder Probanden bei verschiedenen Insulinkonzentrationen. Die Aufnahmen entstanden zehn Tage nach Kulturbeginn. Zu sehen sind Schaumzellen aller Kulturansätze bei 44facher Vergrößerung. Die Gegenüberstellung der ausgereiften Schaumzellen lassen keine Unterschiedlichkeit in der Morphologie erkennen, welche auf die Einwirkung von Insulin zurückzuführen wäre. So sind hier Zellgröße, Zellform, Grad der Granularisation und Phagozytosehof der Schaumzellen vergleichbar. Die Zellgröße beziffert sich in allen Kulturen auf etwa 25 µm und die Zellbegrenzung zeigt sich konstant homogen und oval bis rund. Der Phagozytosehof zeigt sich konstant bei allen Kulturen.

2 Statistik

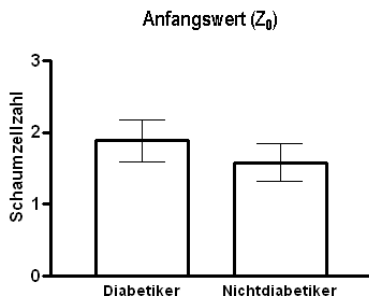


Statistik 1: Statistisches Modell, um die Zytokinetik der Schaumzellendifferenzierung zu erfassen. Aufgetragen wird auf der y-Achse die Schaumzellzahl, die gemessen wird. Die Skalierung erfolgt absolut. Auf der x-Achse (t) sind die Tage in der Kokultur aufgetragen. Die Skalierung beginnt bei 0, wenn das erste positive Schaumzellereignis registriert wurde. Folgende Landmarken wurden im Kurvenverlauf berücksichtigt; Z_0 : die Anzahl der Schaumzellen zum Zeitpunkt 0; Z_1 : die Zahl der Schaumzellen, die bei einem logistischen Wachstum nach langer Zeit erwartet würden; ρ : die initiale Wachstumsrate der Schaumzellen; T_{crit} : der Zeitpunkt, bei dem der Abfall der Schaumzellanzahl beginnt; α : die Rate, mit der die Schaumzellmenge exponentiell abfällt.

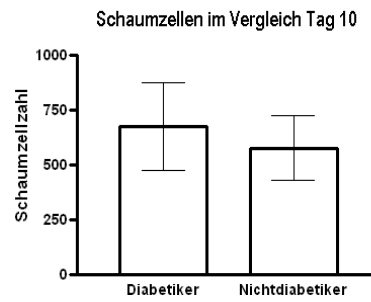
A



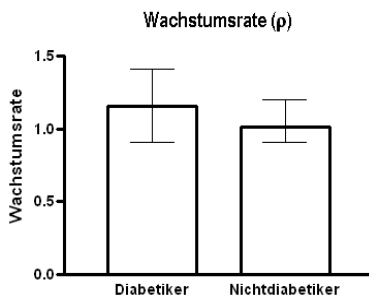
B



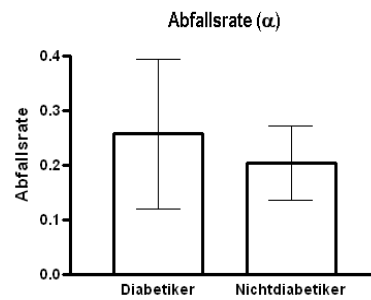
C



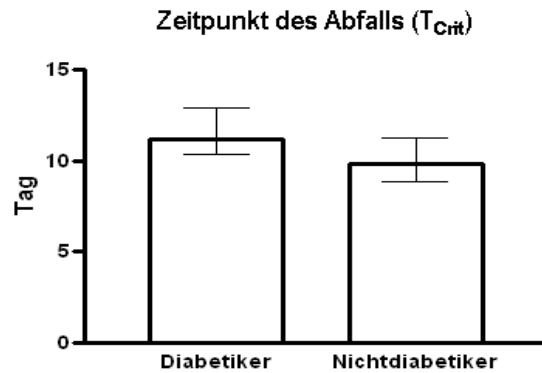
D



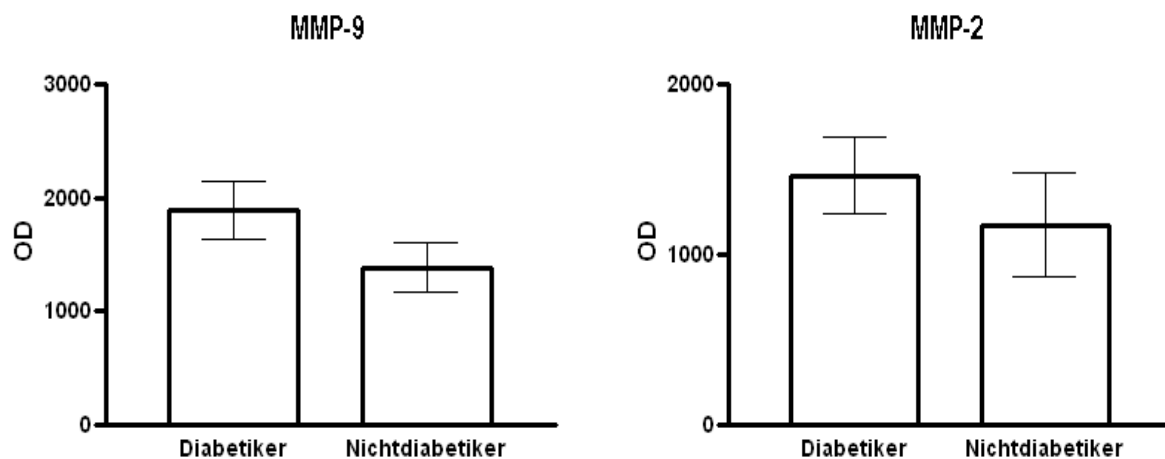
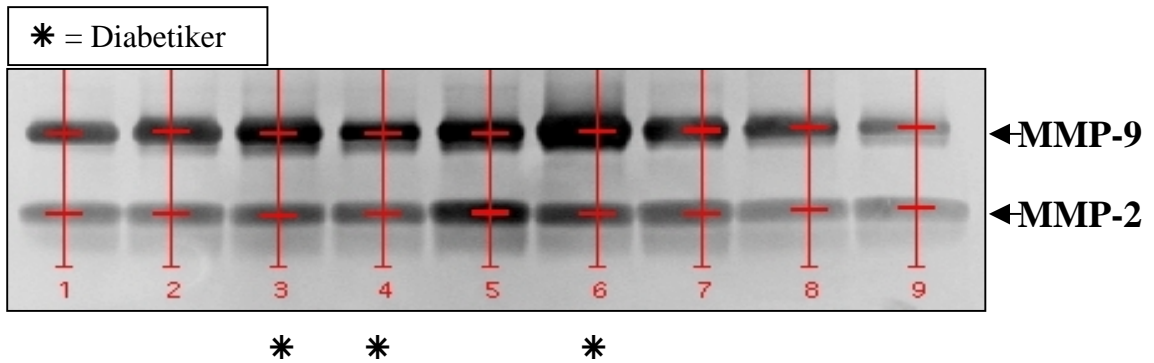
E



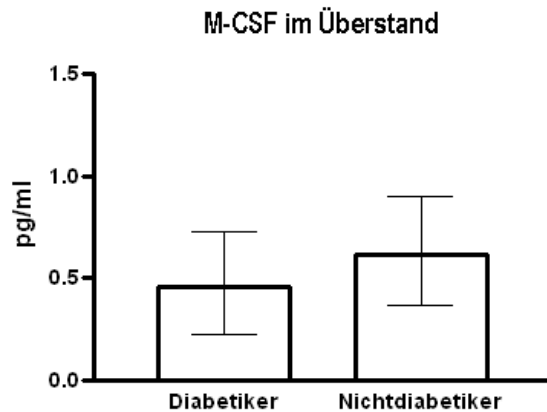
Statistik 2: Zytokinetische Parameter zur Charakterisierung des Differenzierungs- und Wachstumsprozesses zwischen den Kokulturen mit CD34⁺-Progenitorzellen von Diabetikern und Nichtdiabetikern. Die Schaumzellen wurden im Differenzierungs- und Wachstumsprozess quantitativ bestimmt und dadurch bestimmte kinetische Eigenschaften der beiden Vergleichsgruppen Diabetiker und Nichtdiabetiker verglichen. (A) beschreibt die Schaumzellmenge zwischen den Versuchsgruppen abhängig vom Tag; (B) beschreibt den ersten positiv gezählten Wert (Z_0); (C) zeigt die statistischen Schaumzellverhältnisse beider Gruppen am Tag 10 im Vergleich; (D) vergleicht die Wachstumsrate (p); (E) die Stärke des Abfalls (α). Dazu wurden jeweils die 95 % Konfidenzintervalle abgebildet



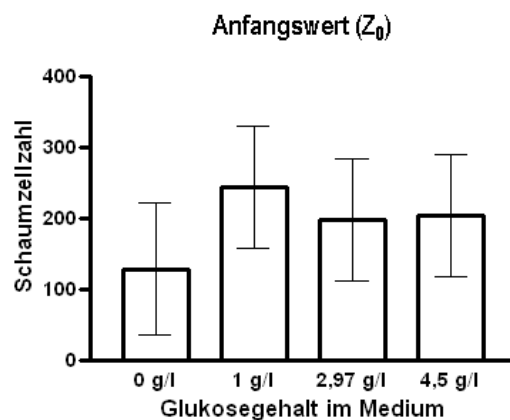
Statistik 3: Zeitpunkt des Wachstumsabfalls bei Schaumzellen aus der Kokultur mit diabetischen CD34⁺-Zellen und gesunden Thrombozyten. Die zwei Versuchsgruppen wurden auf Unterschiedlichkeit im Zeitpunkt, an welchem die Schaumzellzahl abnimmt, untersucht. Hierbei wurde diesem Parameter Diabetiker (n = 12), Nichtdiabetikern (n = 26) gegenübergestellt. Der Zeitpunkt des Wachstumsabfalls (T_{crit}) zwischen den Versuchsgruppen differiert signifikant um 1,6 Tage. Der Mittelwert und die 95 % Konfidenzintervalle: 11,23; -10,31; +12,91 Diabetiker versus Nichtdiabetiker 9,64; -8,82; +11,27, Log-Rank = 0,0317.



Statistik 4: Schaumzellen aus der Kokultur mit diabetischen CD34⁺-Progenitorzellen und gesunden Thrombozyten weisen gruppenspezifische MMP-Aktivitäten auf. Die Aktivität der beiden Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 im Kulturüberstand wurde durch eine Gelzymografie und folgender densitometrischer Auswertung der invertierten Banden auf Unterschiedlichkeit im Aktivitätsniveau gemessen. Dazu wurden Überstände der Diabetikerkohorte (n = 6) und der Nichtdiabetikerkohorte (n = 12) miteinander verglichen. Die Aktivität der MMP-2 zeigte keinen signifikanten Unterschied, während die MMP-9 Aktivität bei Diabetikern signifikant erhöht war. Der Mittelwert und die 95 % Konfidenzintervalle: 1892.97 OD; -1640,5; +2145,5 Diabetiker versus Nichtdiabetiker 1387,45 OD; -1165,9; +1608,9, t-test = 0,0029.

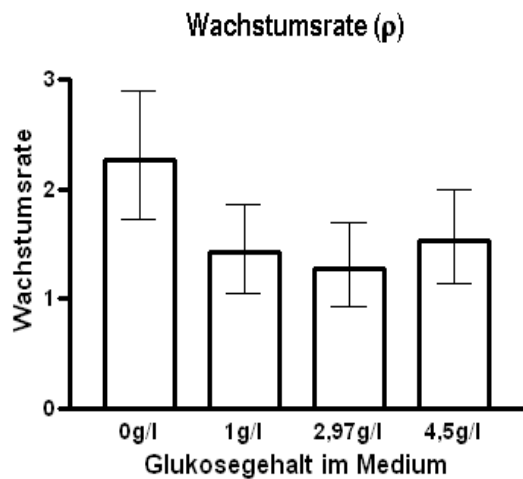


Statistik 5: Konzentration des M-CSF im Kulturüberstand aus Kokulturen mit CD34⁺-Progenitorzellen diabetischer und nichtdiabetischer Herkunft und gesunden Thrombozyten. Messungen mit dem ELISA zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, welche mit der diabetischen Herkunft der CD34⁺-Progenitorzellen begründet werden könnte. Zu erkennen ist jedoch die Tendenz einer verminderten Konzentration bei den Kulturen diabetischer CD34⁺-Progenitorzellen und gesunden Thrombozyten.

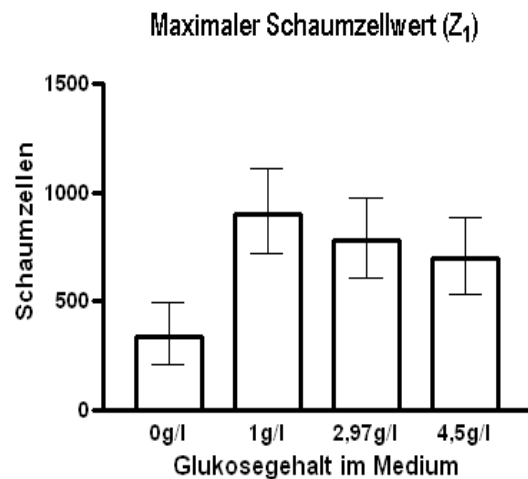


Statistik 6: Der erst gezählte Schaumzellwert in Abhängigkeit vom Glukosegehalt im Kulturmilieu. Der zytokinetische Parameter (Z_0), welcher den ersten positiven Wert der Auszählung angibt, wurde statistisch in den Kulturen mit 0 g/l (n = 10), 1 g/l (n = 14), 2,97 g/l (n = 14) und 4,5 g/l (n = 14) Glukose im Medium ausgewertet. Zwischen den Ansätzen mit Glukose konnte kein Unterschied auf 5 % Niveau ermittelt werden, während zwischen 0 g/l und 1 g/l Glukose im Medium ein signifikanter Unterschied mit einer Differenz von 92,58 Schaumzellen zu erkennen war (mean \pm 95 % Konfidenzintervall: 128,45; -35,86; +221,04 0 g/l Glukose versus 1 g/l Glukose 244,25; -158,08; +330,41; Tukey < 0,05).

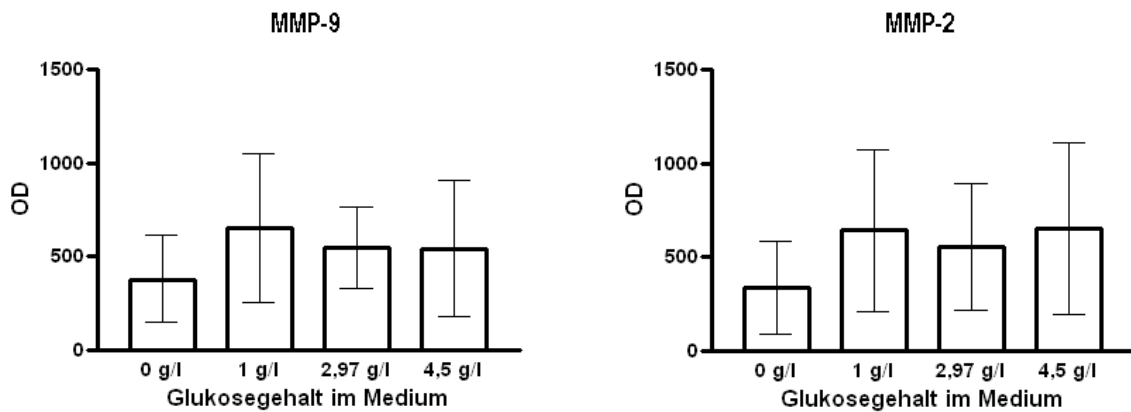
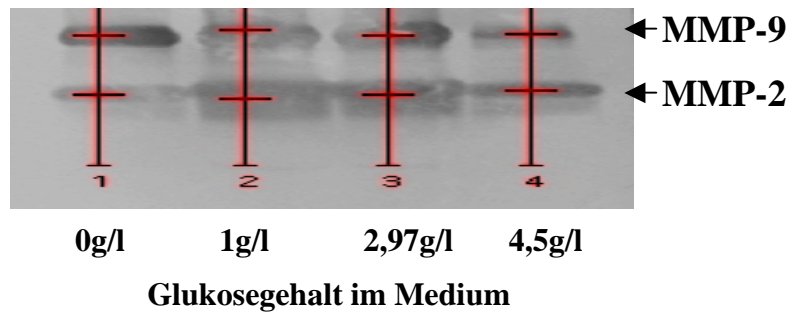
A



B

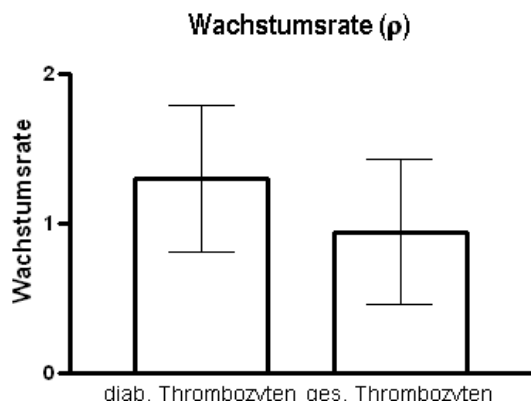


Statistik 7: Die Wachstumsrate (ρ) und die maximale Schaumzellzahl (Z_1) von Kokulturen gesunder CD34⁺-Progenitorzellen und gesunden Thrombozyten in Abhängigkeit vom Glukosegehalt im Kulturmedium. (A) Der Kulturansatz mit 0 g/l Glukose im Medium zeigt eine signifikant höhere Wachstumsrate der Schaumzellen im Vergleich zu den Kulturen mit 1 g/l, 2,97 g/l und 4,5 g/l Glukose. Gemessen wurde die Wachstumsrate der Kulturen mit 0 g/l (n = 10), 1 g/l (n = 14), 2,97 g/l (n = 14) und 4,5 g/l (n = 14) Glukose (mean \pm 95 % Konfidenzintervall: 2,26; -1,7; +2,9 0 g/l Glukose versus 1 g/l Glukose 1,42; -1,1; +1,9 versus 2,97 g/l Glukose 1,28; -0,93; +1,7 versus 4,5 g/l Glukose 1,53; -1,14; +2; Tukey < 0,05). (B) Die maximal erreichte Schaumzellzahl wurde hinsichtlich Unterschieden in den einzelnen Kulturen mit 0 g/l (n = 10), 1 g/l (n = 14), 2,97 g/l (n = 14) und 4,5 g/l (n = 14) Glukose im Medium verglichen. Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem Medium ohne und den Medien mit Glukose dargestellt werden. Gleichzeitig liegen die Schaumzellwerte der Medien mit 1 g/l und 2,97 g/l Glukose im Medium erwiesenermaßen deutlich höher als bei 0 g/l Glukose und dem „High-Glukose-Medium“ mit 4,5 g/l Glukose (mean \pm 95 % Konfidenzintervall: 340,97; -213,33; +491,46 0 g/l Glukose versus 1 g/l Glukose 904,37; -717,8; +1107,8 versus 2,97 g/l Glukose 781,78; -606,51; +974,4 versus 4,5 g/l Glukose 700,24; -533,08; +885,06; Tukey < 0,05).

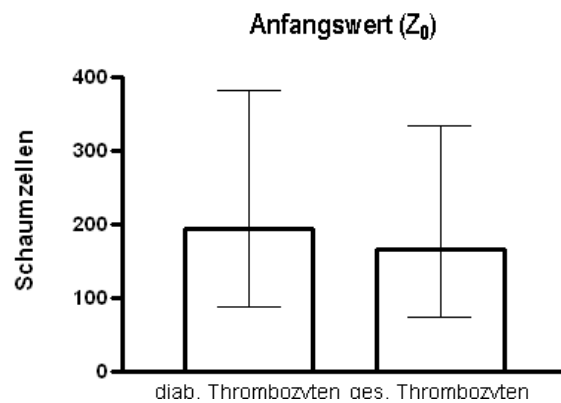


Statistik 8: Matrix-Metalloproteinase Aktivität der Schaumzellen in Abhängigkeit vom Glukosegehalt des Kulturmediums. Die Aktivität der Matrix-degradierenden Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 wurde auf Unterschiede in Abhängigkeit zum Glukosegehalt des Kulturmediums untersucht. Dafür wurde der gereinigte Überstand durch eine Gelatine-Zymografie getrennt und die Banden der MMP-2 und MMP-9 mit einem Marker bestimmt. Die darauf folgende densitometrische Auswertung der optischen Dichte (OD) der invertierten Banden zeigt einen quantitativen Vergleich der Aktivität der Gruppen mit dem unterschiedlichen Glukosegehalt im Kulturmedium; 0 g/l (n = 7), 1 g/l (n = 9), 2,97 g/l (n = 9) und 4,5 g/l (n = 9). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

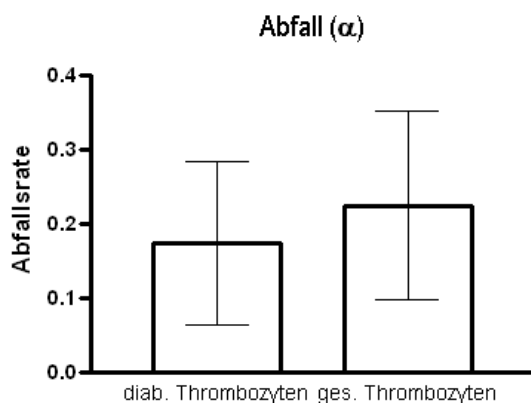
A



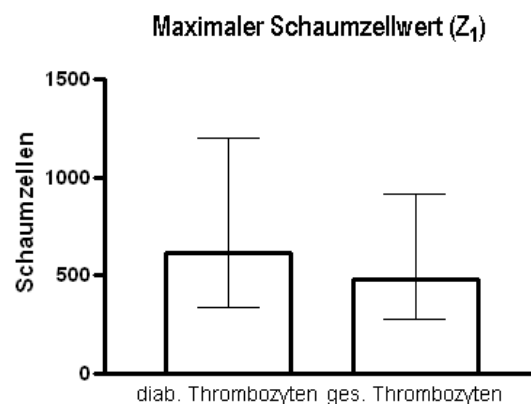
B



C

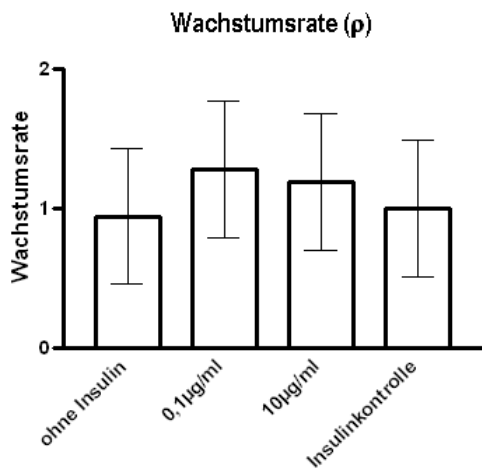


D

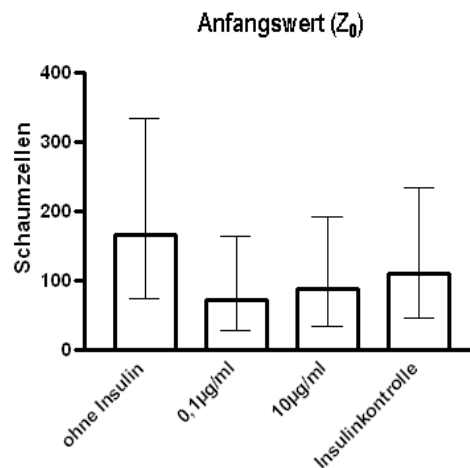


Statistik 9: Zytokinetische Parameter der Schaumzellentstehung aus gesunden CD34⁺-Progenitorzellen in Kokultur mit diabetischen beziehungsweise nichtdiabetischen Thrombozyten. Untersucht wurden Kokulturen mit gesunden CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten von Diabetikern ($n = 7$) beziehungsweise Thrombozyten gesunder Probanden ($n = 7$). (A) Die Wachstumsrate (ρ) weist keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. (B) Der erste positive Wert (Z_0) zeigt keine statistisch auffälligen Unterschiede. (C) Die Abfallsrate (α), welche den Abfall der Schaumzellen nach Erreichen des Maximums beschreibt, zeigt keinen Unterschied zwischen den Gruppen. (D) Die maximale Schaumzellzahl weist bei beiden Gruppen keinen Unterschied auf 5 % Niveau auf.

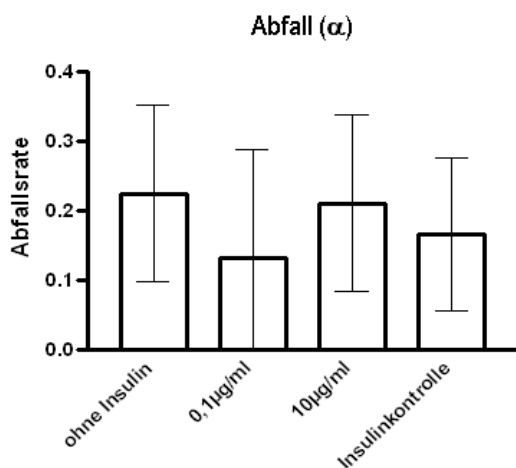
A



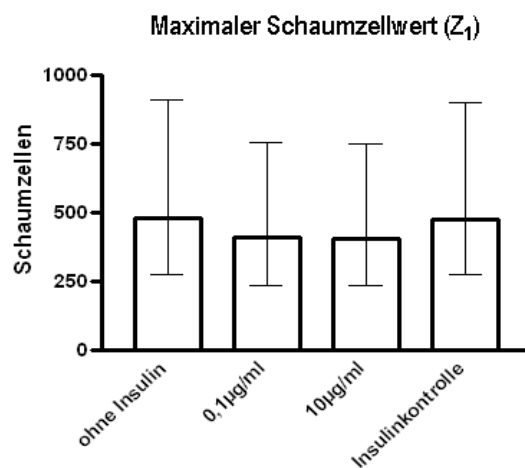
B



C



D



Statistik 10: Wichtige zytokinetische Parameter bei der Untersuchung der Insulinwirkung auf die Schaumzellbildung. Die Kokulturen mit gesunden CD34⁺-Progenitorzellen und Thrombozyten versetzt mit keinem Insulin (n = 7), 0,1 µg/ml Insulin (n = 7), 10 µg/ml Insulin (n = 7) und HCL als Kontrolle (n = 7) wurden hinsichtlich ihres zytokinetischen Wachstumsverhaltens untersucht. Die Wachstumsrate (ρ), siehe (A), zeigte keinen signifikanten Unterschied. Der erste positiv gezählte Schaumzellwert (Z_0), siehe (B), lässt auf keine Insulininduzierte Alteration im Wachstumsverhalten schließen. Der Abfall nach dem erreichten Höhepunkt (α), siehe (C), zeigt keinen insulininduzierten zytokinetischen Effekt. Der maximale Schaumzellwert (Z_1), siehe (D), zeigt keine kulturabhängigen Unterschiede.

3 Tabellen

Tabelle 1: Gruppenspezifische Eigenschaften der Patientengruppe A		
	Kontrollgruppe	Diabetiker
Alter	66 ± 10,1	68,8 ± 7,1
Geschlecht (w/m)	8/14	6/6
Blutglukose	99,2 ± 11,1	134,5 ± 18,5
Nikotinabusus in der Vergangenheit	10	5
Typ 1 / 2 Diabetes	-	0 / 12
Medikamente		
-Ca²⁺-Antagonisten	4	1
-ACE-Antagonisten	10	9
-β-Blocker	16	9
-Cholesterinsenker	11	7
-Antiagglutinierende Medikamente	8	4
-Vasodilatoren	5	1
-Orale Antidiabetika / Insulin	-	5 / 7

VII Literaturverzeichnis

1. King, H., Aubert, R.E. & Herman, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21, 1414-31 (1998).
2. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. & King, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047-53 (2004).
3. Barzilay, J.I. et al. Prevalence of clinical and isolated subclinical cardiovascular disease in older adults with glucose disorders: the Cardiovascular Health Study. *Diabetes Care* 24, 1233-9 (2001).
4. Eastman, R.C. et al. Model of complications of NIDDM. I. Model construction and assumptions. *Diabetes Care* 20, 725-34 (1997).
5. Bühling, K.J., Lepenies, J. & Witt, K. *Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie*, 523 S. (Elsevier, München, 2004).
6. Shashkin, P., Dragulev, B. & Ley, K. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des* 11, 3061-72 (2005).
7. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27 Suppl 1, S5-S10 (2004).
8. Polonsky, K.S., Sturis, J. & Bell, G.I. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 334, 777-83 (1996).
9. Zhang, Y. et al. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and beta 3-adrenergic-receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. UK Prospective Diabetes Study. *Diabetologia* 39, 1505-11 (1996).
10. Lillioja, S. et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 329, 1988-92 (1993).
11. Martin, B.C. et al. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340, 925-9 (1992).
12. Basu, R., Chandramouli, V., Dicke, B., Landau, B. & Rizza, R. Obesity and type 2 diabetes impair insulin-induced suppression of glycogenolysis as well as gluconeogenesis. *Diabetes* 54, 1942-8 (2005).
13. Li, H., Isomaa, B., Taskinen, M.R., Groop, L. & Tuomi, T. Consequences of a family history of type 1 and type 2 diabetes on the phenotype of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23, 589-94 (2000).
14. Newman, B. et al. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. in *Diabetologia* Vol. 30 763-8 (1987).
15. Carey, V.J. et al. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol* 145, 614-9 (1997).

16. Miyazaki, Y. et al. Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E1135-43 (2002).
17. Anjana, M. et al. Visceral and central abdominal fat and anthropometry in relation to diabetes in Asian Indians. *Diabetes Care* 27, 2948-53 (2004).
18. Rota, M. et al. Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene. *Circ Res* 99, 42-52 (2006).
19. Segal, M.S. et al. Nitric oxide cytoskeletal-induced alterations reverse the endothelial progenitor cell migratory defect associated with diabetes. *Diabetes* 55, 102-9 (2006).
20. Thum, T. et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes* 56, 666-74 (2007).
21. Fadini, G.P. et al. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 45, 1449-57 (2005).
22. Tepper, O.M. et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106, 2781-6 (2002).
23. Gallagher, K.A. et al. Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 alpha. *J Clin Invest* 117, 1249-59 (2007).
24. Grundmann, E., Roessner, A. & Dombrowski, F. *Allgemeine Pathologie 39 Tabellen ; [neuer GK ; GK 2 ; der digitale Präparatekasten]*, XIII, 386 S. (Urban & Fischer, Mnchen ; Jena, 2004).
25. Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-41 (2000).
26. Gawaz, M. et al. Vitronectin receptor (alpha(v)beta3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 96, 1809-18 (1997).
27. Bombeli, T., Schwartz, B.R. & Harlan, J.M. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. *J Exp Med* 187, 329-39 (1998).
28. Inwald, D.P., McDowall, A., Peters, M.J., Callard, R.E. & Klein, N.J. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* 92, 1041-8 (2003).
29. von Hundelshausen, P. et al. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 103, 1772-7 (2001).
30. Weyrich, A.S. et al. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest* 97, 1525-34 (1996).
31. Martinovic, I. et al. Elevated monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease. *Circ J* 69, 1484-9 (2005).

32. Yoshida, H., Kondratenko, N., Green, S., Steinberg, D. & Quehenberger, O. Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J* 334 (Pt 1), 9-13 (1998).
33. Daub, K. et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *Faseb J* 20, 2559-61 (2006).
34. Daub, K. et al. The evil in atherosclerosis: adherent platelets induce foam cell formation. *Semin Thromb Hemost* 33, 173-8 (2007).
35. Lindemann, S., Kramer, B., Daub, K., Stellos, K. & Gawaz, M. Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 18, 566-73 (2007).
36. de Villiers, W.J., Fraser, I.P., Hughes, D.A., Doyle, A.G. & Gordon, S. Macrophage-colony-stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function. *J Exp Med* 180, 705-9 (1994).
37. Ishibashi, S. et al. Monocyte colony-stimulating factor enhances uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins and cholesterol esterification in human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 265, 14109-17 (1990).
38. Libby, P., Sukhova, G., Lee, R.T. & Liao, J.K. Molecular biology of atherosclerosis. *Int J Cardiol* 62 Suppl 2, S23-9 (1997).
39. Gough, P.J., Gomez, I.G., Wille, P.T. & Raines, E.W. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 116, 59-69 (2006).
40. Libby, P. The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms. *Vasc Med* 3, 225-9 (1998).
41. Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Kranzhofer, R., Clark, S. & Libby, P. Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 402-6 (1995).
42. Saren, P., Welgus, H.G. & Kovanen, P.T. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* 157, 4159-65 (1996).
43. Metcalf, D. & Moore, M.A.S. *Haemopoietic cells*, xiii, 550 p. with illus. (North-Holland Pub. Co., Amsterdam,, 1971).
44. Andrews, R.G., Singer, J.W. & Bernstein, I.D. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood* 67, 842-5 (1986).
45. Civin, C.I. et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133, 157-65 (1984).
46. Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I. & May, W.S. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13 (1996).
47. Fina, L. et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-26 (1990).

48. Baumhueter, S., Dybdal, N., Kyle, C. & Lasky, L.A. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 84, 2554-65 (1994).
49. de Wynter, E. & Ploemacher, R.E. Assays for the assessment of human hematopoietic stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 15, 23-7 (2001).
50. Passegue, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E. & Weissman, I.L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11842-9 (2003).
51. Sagel, J., Colwell, J.A., Crook, L. & Laimins, M. Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 82, 733-8 (1975).
52. Calverley, D.C. et al. Increased platelet Fc receptor expression as a potential contributing cause of platelet hypersensitivity to collagen in diabetes mellitus. *Br J Haematol* 121, 139-42 (2003).
53. Cabeza, N. et al. Surface expression of collagen receptor Fc receptor-gamma/glycoprotein VI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of CD40 ligand and activation of endothelial cells. *Diabetes* 53, 2117-21 (2004).
54. Gawaz, M.P. *Blood platelets physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet drugs, coronary heart disease, stroke, peripheral arterial disease ; 47 tables*, VIII, 190 S. (Thieme, Stuttgart ; New York, 2001).
55. Tschoepe, D., Driesch, E., Schwippert, B., Nieuwenhuis, H.K. & Gries, F.A. Exposure of adhesion molecules on activated platelets in patients with newly diagnosed IDDM is not normalized by near-normoglycemia. *Diabetes* 44, 890-4 (1995).
56. Scheubel, R.J. et al. Depression of progenitor cell function by advanced glycation endproducts (AGEs): potential relevance for impaired angiogenesis in advanced age and diabetes. *Exp Gerontol* 41, 540-8 (2006).
57. Schmidt-Lucke, C. et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111, 2981-7 (2005).
58. Miyagawa, S., Kobayashi, M., Konishi, N., Sato, T. & Ueda, K. Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. *Br J Haematol* 109, 555-62 (2000).
59. Iscove, N.N., Sieber, F. & Winterhalter, K.H. Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin A. *J Cell Physiol* 83, 309-20 (1974).
60. Halvorsen, B. et al. Interleukin-10 enhances the oxidized LDL-induced foam cell formation of macrophages by antiapoptotic mechanisms. *J Lipid Res* 46, 211-9 (2005).
61. Ma, H. et al. Diabetes-induced alteration of F4/80(+) macrophages: a study in mice with streptozotocin-induced diabetes for a long term. *J Mol Med* (2008).

62. Hayek, T. et al. Macrophage foam-cell formation in streptozotocin-induced diabetic mice: stimulatory effect of glucose. *Atherosclerosis* 183, 25-33 (2005).
63. Kunjathoor, V.V., Wilson, D.L. & LeBoeuf, R.C. Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Clin Invest* 97, 1767-73 (1996).
64. Kempler, P. Learning from large cardiovascular clinical trials: classical cardiovascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract* 68 Suppl1, S43-7 (2005).
65. Cassidy, A.E. et al. Progression of subclinical coronary atherosclerosis: does obesity make a difference? *Circulation* 111, 1877-82 (2005).
66. Spagnoli, L.G., Bonanno, E., Sangiorgi, G. & Mauriello, A. Role of inflammation in atherosclerosis. *J Nucl Med* 48, 1800-15 (2007).
67. Gawaz, M. Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Dis* 36, 206-10 (2006).
68. Gawaz, M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 61, 498-511 (2004).
69. Giannotti, G. & Landmesser, U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz* 32, 568-72 (2007).
70. Li, L., Sawamura, T. & Renier, G. Glucose enhances human macrophage LOX-1 expression: role for LOX-1 in glucose-induced macrophage foam cell formation. *Circ Res* 94, 892-901 (2004).
71. Griffin, E. et al. A link between diabetes and atherosclerosis: Glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nat Med* 7, 840-6 (2001).
72. Fukuhara-Takaki, K., Sakai, M., Sakamoto, Y., Takeya, M. & Horiuchi, S. Expression of class A scavenger receptor is enhanced by high glucose in vitro and under diabetic conditions in vivo: one mechanism for an increased rate of atherosclerosis in diabetes. *J Biol Chem* 280, 3355-64 (2005).
73. Mauldin, J.P. et al. Reduction in ABCG1 in Type 2 diabetic mice increases macrophage foam cell formation. *J Biol Chem* 281, 21216-24 (2006).
74. Haidar & Soeatmadji, D.W. Effects of high-carbohydrate and high fat diet on formation of foam cells and expression of TNF-alpha in *Rattus norvegicus*. *Acta Med Indones* 39, 119-23 (2007).
75. Sano, J., Shirakura, S., Oda, S., Hara, T. & Ishihara, T. Foam cells generated by a combination of hyperglycemia and hyperlipemia in rats. *Pathol Int* 54, 904-13 (2004).
76. Winocour, P.D. et al. Reduced membrane fluidity in platelets from diabetic patients. *Diabetes* 39, 241-4 (1990).
77. Han, S. et al. Macrophage insulin receptor deficiency increases ER stress-induced apoptosis and necrotic core formation in advanced atherosclerotic lesions. *Cell Metab* 3, 257-66 (2006).
78. Liang, C.P. et al. Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages. *J Clin Invest* 113, 764-73 (2004).

79. Ramprasad, M.P., Terpstra, V., Kondratenko, N., Quehenberger, O. & Steinberg, D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14833-8 (1996).
80. Bonnefont-Rousselot, D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 561-8 (2002).
81. Iida, K.T. et al. Insulin inhibits apoptosis of macrophage cell line, THP-1 cells, via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 380-6 (2002).
82. Shashkin, P.N. et al. Insulin and glucose play a role in foam cell formation and function. *Cardiovasc Diabetol* 5, 13 (2006).
83. Aoki, I., Taniyama, M., Toyama, K., Homori, M. & Ishikawa, K. Stimulatory effect of human insulin on erythroid progenitors (CFU-E and BFU-E) in human CD34+ separated bone marrow cells and the relationship between insulin and erythropoietin. *Stem Cells* 12, 329-38 (1994).
84. Pollanen, P.J. et al. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 1446-50 (2001).
85. Loftus, I.M. et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. *Stroke* 31, 40-7 (2000).
86. Loftus, I.M., Naylor, A.R., Bell, P.R. & Thompson, M.M. Matrix metalloproteinases and atherosclerotic plaque instability. *Br J Surg* 89, 680-94 (2002).
87. Ohara, Y., Peterson, T.E. & Harrison, D.G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91, 2546-51 (1993).
88. Son, S.M. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 77 Suppl 1, S65-70 (2007).
89. Shiau, M.Y. et al. Increased circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Mt Sinai J Med* 73, 1024-8 (2006).
90. Worley, J.R., Hughes, D.A., Dozio, N., Gavrilovic, J. & Sampson, M.J. Low density lipoprotein from patients with Type 2 diabetes increases expression of monocyte matrix metalloproteinase and ADAM metalloproteinase genes. *Cardiovasc Diabetol* 6, 21 (2007).
91. Harris, A.K. et al. Type 2 diabetes causes remodeling of cerebrovasculature via differential regulation of matrix metalloproteinases and collagen synthesis: role of endothelin-1. *Diabetes* 54, 2638-44 (2005).
92. Death, A.K., Fisher, E.J., McGrath, K.C. & Yue, D.K. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* 168, 263-9 (2003).
93. Uemura, S. et al. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res* 88, 1291-8 (2001).
94. Derosa, G. et al. Metalloproteinase-2 and -9 in diabetic and nondiabetic subjects during acute coronary syndromes. *Endothelium* 14, 45-51 (2007).

95. Aikawa, M. et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. *Circulation* 97, 2433-44 (1998).
96. Portik-Dobos, V., Anstadt, M.P., Hutchinson, J., Bannan, M. & Ergul, A. Evidence for a matrix metalloproteinase induction/activation system in arterial vasculature and decreased synthesis and activity in diabetes. *Diabetes* 51, 3063-8 (2002).
97. Schmidt, R. et al. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (CD147) Is a Novel Receptor on Platelets, Activates Platelets, and Augments Nuclear Factor {kappa}B Dependent Inflammation in Monocytes. *Circ Res* (2007).
98. Schmidt, R. et al. EMMPRIN (CD 147) is a central activator of extracellular matrix degradation by Chlamydia pneumoniae-infected monocytes. Implications for plaque rupture. *Thromb Haemost* 95, 151-8 (2006).
99. May, A.E. et al. Plasminogen and matrix metalloproteinase activation by enzymatically modified low density lipoproteins in monocytes and smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 93, 710-5 (2005).
100. Furman, M.I. et al. Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 38, 1002-6 (2001).
101. Neve, B.P., Fruchart, J.C. & Staels, B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 60, 1245-50 (2000).
102. Marx, N., Sukhova, G., Murphy, C., Libby, P. & Plutzky, J. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol* 153, 17-23 (1998).
103. Zhang, J. et al. Inhibitory effect of PPAR on the expression of EMMPRIN in macrophages and foam cells. *Int J Cardiol* 117, 373-80 (2007).
104. Ries, C. et al. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 109, 4055-63 (2007).
105. Tojo, N., Asakura, E., Koyama, M., Tanabe, T. & Nakamura, N. Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on protease production from monocyte, macrophage and foam cell in vitro: a possible mechanism for anti-atherosclerotic effect of M-CSF. *Biochim Biophys Acta* 1452, 275-84 (1999).
106. Kaneider, N.C. et al. Induction of apoptosis and inhibition of migration of inflammatory and vascular wall cells by cerivastatin. *Atherosclerosis* 158, 23-33 (2001).
107. Zhang, Q. et al. Short-term statin exposure is associated with reduced all-cause mortality in persons with diabetes. *Med Care* 45, 308-14 (2007).
108. Gawaz, M., Langer, H. & May, A.E. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115, 3378-84 (2005).

VIII Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Professor Dr. Meinrad Gawaz danke ich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Herrn PD Dr. Stephan Lindemann danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft und kompetente Beratung in wissenschaftlichen Fragen.

Frau Dr. Karin Daub und Herrn Dr. Harald Langer danke ich für die anspruchsvolle und interessante Promotions-Thematik und ihre Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Hermann Ebert und allen anderen beteiligten Herz-Thorax-Chirurgen danke ich für die hervorragende Mitarbeit.

Ferner bedanke ich mich bei Frau PD Dr. Dorothea Siegel-Axel für die vielen hilfreichen Anregungen, die zum guten Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ein weiteres großes Dankeschön gebührt Jadwiga Kwiatkowska für ihre Hilfsbereitschaft in allen Phasen der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Klaus Dietz verdanke ich meine statistisch profunde Arbeit, auch ihm meinen besten Dank.

Nicht zuletzt danke ich von ganzem Herzen meinem Bruder Micha für seinen Beistand und die schöne gemeinsame Zeit in Tübingen, sowie meinen Eltern, welche mich auf dem Weg durch das ganze Studium begleitet haben und mir dasselbe erst ermöglichten.

Mein letzter Dank gilt Amely, die mir zur Seite stand, immer Verständnis hatte, wenn ich einmal nicht genug Zeit für sie aufbringen konnte und die trotzdem unbeirrt mit mir unseren gemeinsamen Weg gegangen ist.

IX Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jörg Uwe Schmohl
Geburtsdatum: 29.10.1983
Geburtsort: Nürtingen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer Werdegang

2000-2003 Gymnasium Nürtingen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Universitärer Werdegang

2003-2005 Vorklinischer Abschnitt der Humanmedizin
2005 Physikum (1. Staatsexamen)
2005-2009 Klinischer Abschnitt der Humanmedizin
2009 Voraussichtliches Studienende
24.11.2009 Ärztliche Prüfung (2. Staatsexamen)

Promotion

2005-2008 Promotionsarbeit in der Inneren Medizin für
Kardiologie und Kreislauferkrankungen
Universitätsklinikum Tübingen

Betreuer: PD Dr. Stephan Lindemann, Dr. Karin Daub,
Dr. Harald Langer

Thema: Einfluss diabetogener Stoffwechselfaktoren
auf den Metabolismus von humanen
CD34⁺-Progenitorzellen