

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. E. Strauer

**Endotheliale Progenitorzellen und endotheliale Dysfunktion  
im Alter**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Stefanie Keymel

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt  
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab  
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. M. Kelm

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. J. Schrader

## **Für meine Eltern**

Der Mensch hat drei Weg, klug zu handeln.  
Erstens durch Nachdenken: das ist der edelste.  
Zweitens durch Nachahmung: das ist der leichteste.  
Drittens durch Erfahrung: das ist der bitterste.

(Konfuzius)

## Liste der Abkürzungen

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ADA	American Diabetes Association
azLDL	Azetyliertes Low Density Lipoprotein
BMI	Body mass index (Körpergewichtsindex)
BSA	Bovine serum albumine (Bovines Serumalbumin)
CD	Cluster of Differentiation
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
EBM-2	Endothelial cell basal medium-2 (basales Endothelzellmedium)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGM-2	Endothelial cell growth medium-2 (endotheliales Wachstumsmedium)
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
EPC	Endothelial progenitor cells (Endotheliale Progenitorzellen)
FBS	Fetal bovine serum (Fetales Rinderserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMD	Flow-mediated dilation (Fluss-vermittelte Dilatation)
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GTN	Glyzeroltrinitrat
h	Stunde(n)
HDL	High Density Lipoprotein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells (menschliche Endothelzellen aus der Nabelschnurvene)
Ig	Immunglobulin
IMT	Intima-Media Thickness (Intima-Media-Dicke)
JNC	Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure
KDR	Kinase-insert domain containing receptor (VEGF-Rezeptor 2)
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
L-NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin

M	Molarität [mol/l]
Min.	Minute(n)
MNC	Mononuclear cells (Mononukleäre Zellen)
MW	Mittelwert
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phycoerythrin
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PW-Doppler	Pulsed Wave (gepulster) Doppler
SE	Standardfehler
SPECT	Single-Photon-Emissionstomographie
Tab.	Tabelle
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor-alpha
UEA-I	Ulex Europaeus-I Agglutinin
VEGF	Vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1	Vaskulogenese.....	10
1.1.1	Gefäßneubildung.....	10
1.1.2	Bedeutung endothelialer Progenitorzellen.....	10
1.1.3	Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen.....	12
1.1.4	Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen.....	13
1.2	Arteriosklerose und endotheliale Dysfunktion.....	15
1.2.1	Pathogenese der Arteriosklerose.....	15
1.2.2	Diagnostik der endothelialen Dysfunktion.....	16
1.3	Fortgeschrittenes Alter als kardiovaskulärer Risikofaktor.....	17
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1	Studienkollektiv.....	19
2.2	Studienprotokoll.....	20
2.3	Bestimmung der Anzahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen.....	21
2.3.1	Blutentnahme.....	21
2.3.2	Isolierung der mononukleären Zellen.....	21
2.3.3	Zellkultur.....	22
2.3.4	Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen.....	23
2.3.5	Bestimmung der Überlebensfähigkeit endothelialer Progenitorzellen.....	25
2.3.6	Bestimmung der Migration endothelialer Progenitorzellen.....	25
2.3.7	Bestimmung der Proliferation endothelialer Progenitorzellen.....	27
2.3.8	Bestimmung von Adhäsionseigenschaften endothelialer Progenitorzellen.....	27
2.4	Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis.....	30

2.4.1	Untersuchungsprotokoll.....	31
2.4.2	Prinzip der sonographischen Quantifizierung des arteriellen Durchmessers.....	31
2.4.3	Dopplersonographische Untersuchung des Blutvolumenflusses in der Arteria brachialis.....	33
2.5	Sonographische Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis.....	33
2.5.1	Untersuchungsprotokoll.....	33
2.5.2	Prinzip der sonographischen Quantifizierung der Intima-Media- Dicke.....	34
2.6	Statistik.....	35
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
3.1	Charakterisierung der Studienpopulation.....	36
3.2	Bestimmung der Anzahl der endothelialen Progenitorzellen.....	37
3.3	Bestimmung der Funktion der endothelialen Progenitorzellen.....	39
3.4	Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis.....	42
3.5	Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis.....	44
3.6	Korrelationen zwischen Endothelfunktion und endothelialen Progenitorzellen.....	44
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
4.1	Einfluss des Alters auf endotheliale Progenitorzellen.....	48
4.1.1	Quantitative Unterschiede.....	48
4.1.2	Qualitative Unterschiede.....	49
4.2	Einfluss des Alters auf die Endothelfunktion.....	51
4.2.1	Fluss-vermittelte Dilatation der Arteria brachialis.....	51
4.2.2	Intima-Media-Dicke der Arteria carotis.....	55
4.3	Korrelation zwischen der Endothelfunktion und der Funktion endothelialer Progenitorzellen.....	56
4.4	Klinische Bedeutung und Ausblick.....	57

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>75</b>



## 1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes starben im Jahr 2003 396.622 Menschen an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung. Darunter erlagen 92.673 Menschen einem akuten Herzinfarkt und 39.286 Menschen einem Schlaganfall. Die chronische ischämische Herzkrankheit war 2003 sowohl bei Männern als auch bei Frauen die häufigste Todesursache.

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere ein Herzinfarkt oder ein Hirninfarkt, entstehen häufig auf dem Boden arteriosklerotisch veränderter Gefäße. Man geht davon aus, dass einer manifesten Arteriosklerose funktionelle Störungen des Endothels durch gefäßschädigende Einflüsse vorausgehen<sup>114</sup>.

Im fortgeschrittenen Alter konnte eine Einschränkung der Endothelfunktion in Abwesenheit weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren beobachtet werden<sup>22,50</sup>. Eine mögliche Erklärung der im fortgeschrittenen Alter auftretenden endothelialen Dysfunktion könnte eine verminderte Regeneration des Endothels einschließen. An der Regeneration des Endothels sind neben ortsständigen, ausdifferenzierten Endothelzellen auch aus dem Knochenmark stammende endotheliale Progenitorzellen (EPC) beteiligt<sup>10,87</sup>. Unklar ist, ob das Alter mit quantitativen oder qualitativen Veränderungen der EPC einhergeht.

## **1.1 Vaskulogenese**

### **1.1.1 Gefäßneubildung**

Nach heutigem Kenntnisstand sind zwei unterschiedliche Mechanismen an der Gefäßneubildung bzw. Endothelregeneration beteiligt: die Angiogenese und die Vaskulogenese. Der Begriff Angiogenese beschreibt die Bildung und Ausweitung eines Gefäßnetzes durch differenzierte Endothelzellen. Dies kann durch Aussprossen von Kapillaren aus bestehenden Gefäßen oder durch Einstülpung von Gefäßen erfolgen<sup>19,110</sup>. Im Gegensatz dazu ist die Vaskulogenese definiert als die Neubildung von Gefäßen aus sich *in situ* differenzierenden Angioblasten<sup>110,111</sup>.

In der Embryonalentwicklung hat die Vaskulogenese ihren Ursprung in der Ausbildung von Blutinseln aus dem Mesoderm des Dottersacks. Die Zellen im Zentrum der Blutinseln differenzieren zu hämatopoetischen Stammzellen, während die Zellen in der Peripherie endotheliale Stammzellen, Angioblasten, bilden<sup>111</sup>. Angioblasten haben die Fähigkeit zu migrieren, zu proliferieren und in reife Endothelzellen zu differenzieren<sup>86,111</sup>.

Bis vor wenigen Jahren nahm man an, dass die Vaskulogenese auf den embryonalen Organismus beschränkt ist. Durch den Nachweis von EPC im peripheren Blut Erwachsener<sup>9,120</sup> wurde diese Annahme in Frage gestellt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Vaskulogenese nicht nur an der embryonalen, sondern auch an der postnatalen Gefäßneubildung beteiligt ist<sup>10,34,70</sup>.

### **1.1.2 Bedeutung endothelialer Progenitorzellen**

In verschiedenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass EPC sowohl an der physiologischen als auch an der pathologischen Gefäßneubildung (Vaskulogenese) beteiligt sind.

Die Beteiligung endothelialer Progenitorzellen an der Regeneration des Gefäßendothels verschiedener Organe konnte von Asahara et al. gezeigt

werden<sup>10</sup>. Nach Transplantation von Knochenmarkszellen transgener Mäuse konnten EPC im Knochenmark, im peripheren Blut, in der Milz sowie im Gefäßnetz bzw. im Stroma von Lunge, Leber, Darm, Haut, Skelettmuskulatur, Ovar und Uterus der Maus detektiert werden<sup>10</sup>.

Das regenerative Potential der EPC im Rahmen ischämischer Erkrankungen konnte in verschiedenen tierexperimentellen Modellen gezeigt werden. In einem Hinterlaufischämiemodell wurden Mäusen mit einseitiger Ischämie des Hinterlaufs humane EPC transplantiert. Durch die Transplantation der EPC ließ sich im Vergleich zu den Kontrolltieren (Transplantation ausdifferenzierter humaner mikrovaskulärer Endothelzellen bzw. Nährmedium) die Rate an Nekrosen des Hinterlaufs und Autoamputationen vermindern. Dies ging mit einer signifikanten Erhöhung der Kapillardichte und des Blutflusses einher. Zu bemerken ist, dass transplantierte EPC nahezu ausschließlich in der ischämischen Region des Hinterlaufs nachweisbar waren<sup>70</sup>. Nach fokalen zerebralen Ischämien sind EPC insbesondere im Randbereich des ischämischen Areals nachweisbar und tragen zur Gefäßneubildung bei<sup>154</sup>. In Herzinfarktmodellen der Ratte zeigte sich nach der Transplantation von EPC eine erhöhte Kapillardichte und ein vermindertes Remodeling (bindegewebiger Umbau) im Infarktareal sowie eine deutlich bessere linksventrikuläre Herzfunktion im Vergleich zu Kontrolltieren<sup>73,78</sup>. Diese Ergebnisse führten zur Initiierung klinischer Studien, die den Einsatz endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt prüfen<sup>12,125</sup>.

Eine häufige Ursache einer Gewebeischämie stellt die Verlegung des Gefäßsystems durch einen Thrombus dar. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass EPC an der Rekanalisierung eines formierten Thrombus beteiligt sind<sup>90</sup>. Hierbei kommt es zunächst durch die proteolytische Aktivität von Monozyten und Makrophagen zur Ausbildung tunnelartiger Räume im Inneren des Thrombus, die durch zirkulierende EPC bedeckt werden. Durch weitere Umbau- und Reifungsprozesse ist die Blutzirkulation durch den rekanalisierten Thrombus und die Reperfusion des ischämischen Gewebes möglich.

Neben der Beteiligung an der Gefäßneubildung sind EPC an der Wiederherstellung einer intakten Endothelschicht, der Reendothelialisierung,

beteiligt. Nach Induktion einer Endothelschädigung tragen EPC zur Regeneration des geschädigten Areals bei<sup>143,146,147</sup>. Durch Transfusion aus der Milz gewonnener EPC konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass im Vergleich zu Kontrolltieren eine deutlich beschleunigte Reendothelialisierung des verletzten Areals und eine damit verbundene reduzierte Neointima-Bildung erreicht werden<sup>147</sup>.

Des Weiteren kolonisieren EPC die Oberfläche implantierter Gefäßprothesen<sup>120</sup> und Linksherzunterstützungssysteme<sup>101</sup>, wodurch die Adhäsion von Leukozyten sowie die Thrombusbildung verhindert wird.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass EPC als vaskulogenetische Komponente an der physiologischen und pathologischen Gefäßneubildung (Vaskulogenese) im Rahmen der Wundheilung<sup>10</sup>, bei ischämischen Prozessen<sup>10,70,73,78,154</sup>, der Endothelialisierung von Gefäßprothesen<sup>101,120</sup> oder geschädigten Gefäßarealen<sup>147</sup> und beim Tumorwachstum<sup>10</sup> beteiligt sind. Des Weiteren beteiligen sich EPC an der zerebralen<sup>154</sup>, retinalen<sup>54</sup> und lymphoiden<sup>116</sup> Gefäßneubildung.

### **1.1.3 Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen**

Nicht nur im embryonalen Organismus, sondern auch bei erwachsenen Menschen sind Stammzellen nachweisbar. Neben mesenchymalen<sup>8,106</sup> und neuronalen Stammzellen<sup>8</sup> konnten postnatal Hämangioblasten nachgewiesen werden<sup>102,118</sup>. Hämangioblasten können *in vitro* abhängig von den Kulturbedingungen zu hämatopoetischen oder endothelialen Zellen differenzieren<sup>102</sup>. Zur Identifizierung und Isolation von Stammzellen wird das Vorliegen bzw. das Fehlen von Oberflächenmolekülen genutzt<sup>144</sup>.

Typische Oberflächenmarker von EPC sind die Antigene CD34, CD133 und KDR (VEGF-Rezeptor 2), wobei CD34 und KDR auch von Subpopulationen hämatopoetischer Stammzellen sowie von reifen Endothelzellen exprimiert werden<sup>43,44,79,88,155</sup>. Zur Abgrenzung der EPC von reifen Endothelzellen kann die Expression von CD133 verwendet werden<sup>152</sup>. CD133 ist auf einer relativ undifferenzierten Subpopulation der EPC nachweisbar, während reife

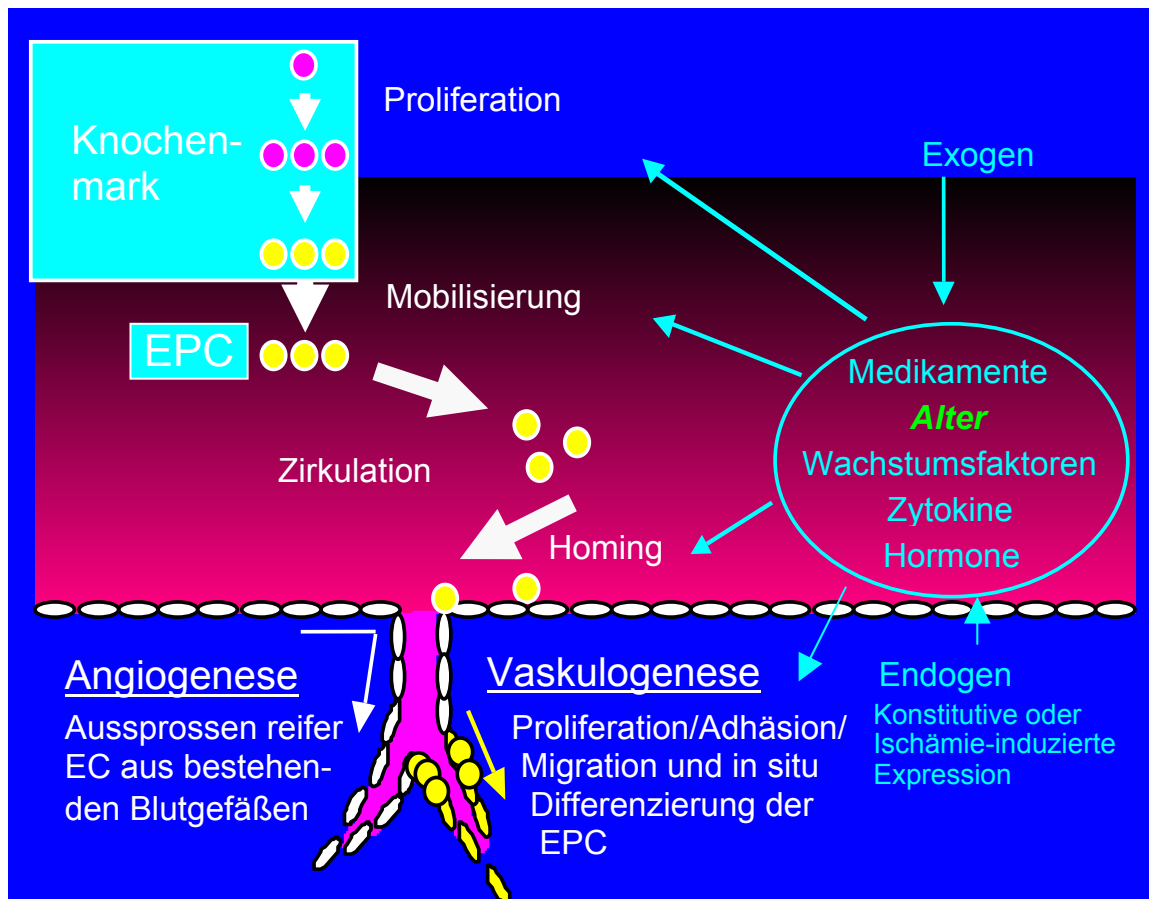
Endothelzellen diesen Marker nicht mehr exprimieren<sup>101</sup>. Peichev et al. haben zur Charakterisierung der EPC die Dreifachexpression von KDR, CD34 und CD133 eingesetzt<sup>101</sup>. In den meisten Untersuchungen werden jedoch häufig nur zwei Marker zur Isolation und Quantifizierung der EPC herangezogen: KDR/CD34<sup>9,128,139,140</sup> oder KDR/CD133<sup>52</sup>. Bei gesunden erwachsenen Personen liegt der Anteil der EPC an der Gesamtzahl mononukleärer Zellen (MNC) im peripheren Blut unter 0,1%<sup>101,139,140,142</sup>.

Unter spezifischen Kulturbedingungen gelingt *ex vivo* eine ca. 70%ige Anreicherung der EPC<sup>70</sup>. Hierzu werden entweder unselektierte oder nach Stammzellmarkern selektierte mononukleäre Zellen in endothelzellspezifischem Medium auf Fibronektin kultiviert. Nach 7- bis 10-tägiger Kultur zeigen die kultivierten Zellen endothelzellspezifische Charakteristika wie die typische spindelzellohnliche Morphologie, die Bindung des endothelzellspezifischen Lektins Ulex Europaeus-I Agglutinin sowie die Phagozytose von azetyliertem LDL<sup>9,70</sup>. Daneben zeigen sie die Expression von typischen Endothelzellmarkern wie CD31<sup>9,70</sup>, KDR<sup>9,70</sup>, VE-Cadherin<sup>70</sup>, endotheliale NO-Synthase<sup>9</sup> und von-Willebrand-Faktor<sup>101,139</sup>.

#### **1.1.4 Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen**

Während die exakten Mechanismen der Freisetzung der EPC aus dem Knochenmark noch nicht vollständig geklärt sind, sind verschiedene endogene oder exogene Faktoren bekannt, die die Anzahl der EPC im peripheren Blut erhöhen<sup>4</sup> (Abb. 1).

Einen besonderen Einfluss auf die Mobilisierung der EPC hat eine Gewebeischämie<sup>100,121,133</sup>. So zeigte sich nach Unterbindung der Gefäßversorgung des Hinterlaufs der Maus<sup>133</sup> sowie nach einem akuten Myokardinfarkt<sup>121</sup> eine erhöhte Anzahl der EPC im peripheren Blut.



**Abbildung 1**

Schematische Darstellung der Angiogenese und der Vaskulogenese. Der Einfluss verschiedener exogener und endogener Faktoren führt zu einer Mobilisierung der EPC aus dem Knochenmark in das periphere Blut. Von der Freisetzung aus dem Knochenmark bis zur Inkorporierung in ein neu gebildetes Gefäßnetz durchlaufen die EPC verschiedene wichtige Prozesse wie die Adhäsion, Migration, Proliferation und *in situ* Differenzierung<sup>66,136</sup>.

Es ist davon auszugehen, dass die Ischämie-bedingte Mobilisierung der EPC durch Zytokine gesteuert wird. So konnte ein Anstieg der Plasmakonzentration des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt nachgewiesen werden<sup>121</sup>. Auch nach einem Verbrennungstrauma oder nach Anlage eines Koronararterienbypasses wurde parallel zur einer endogenen Erhöhung des VEGF-Plasmaspiegels eine Mobilisierung der EPC beobachtet<sup>52</sup>. Neben der endogenen Erhöhung kann durch exogene Zufuhr verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, eine Mobilisierung der EPC erreicht werden<sup>11</sup>. So konnte im Mausmodell eine erhöhte Anzahl zirkulierender sowie kultivierbarer EPC nach intraperitonealer Gabe von rekombinantem VEGF nachgewiesen werden<sup>11</sup>. In klinischen Studien mit Patienten, die an einer schweren peripheren arteriellen Verschlusskrankheit<sup>71</sup> oder

chronischer Myokardischämie<sup>69</sup> litten, wurde eine Mobilisierung der EPC nach VEGF-Gentransfer beobachtet. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass sich nach der Gabe von VEGF nicht nur die Zellzahl erhöhte, sondern auch die Funktion der EPC verbessert hat. Beschrieben sind eine erhöhte Proliferationsrate, eine verstärkte Migration sowie eine vermehrte Inkorporation in ischämische Areale<sup>11,65</sup>.

Darüber hinaus bewirken Zytokine wie G-CSF<sup>101,104</sup> und GM-CSF<sup>133</sup>, Stromal Cell-Derived Factor-1<sup>91,150</sup>, Angiopoietin<sup>57</sup>, Erythropoietin<sup>14,58</sup>, Östrogene<sup>128</sup> und HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine)<sup>38,82,139</sup> sowie körperliches Training<sup>80</sup> eine Mobilisierung bzw. Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen.

## **1.2 Arteriosklerose und endotheliale Dysfunktion**

### **1.2.1 Pathogenese der Arteriosklerose**

Die physiologischen Funktionen des Endothels umfassen v.a. die Modulation (I) des Gefäßtonus, (II) der antithrombotischen und (III) antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand, (IV) der Architektur der Gefäßwand sowie (V) der Gefäßpermeabilität<sup>29,35</sup>.

Störungen der wesentlichen Endothelfunktionen und damit der Integrität der Gefäßwand werden als initiales Ereignis in der Entwicklung der Arteriosklerose angesehen<sup>114</sup> und unter dem Oberbegriff der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst<sup>76</sup>. In der Folge kommt es zu einer entzündlichen Infiltration der Gefäßintima mit Makrophagen und Lymphozyten<sup>115</sup> sowie intrazellulären Fettablagerungen in diesen frühen Läsionen<sup>126</sup>. Durch zusätzliche extrazelluläre Fettakkumulation, Migration und Proliferation glatter Muskelzellen sowie im Verlauf auftretende regressive Veränderungen mit bindegewebigem Umbau und Verkalkungen entstehen fortgeschrittene Läsionen oder Atherome. Diese können zu einer progressiven hämodynamisch relevanten Stenosierung führen oder durch Thrombusbildung auf dem Boden eines rupturierten Plaques einen akuten Gefäßverschluss hervorrufen<sup>127</sup>.

Zur Klärung der Ätiologie der Arteriosklerose hat die Framinghamstudie entscheidend beigetragen. Auf der Grundlage dieser Studie wurde das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren etabliert<sup>72</sup>. Anhand empirisch erhobener Daten wurden Rauchen, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Glukoseintoleranz sowie fortgeschrittenes Alter als bedeutende Ursachen in der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit identifiziert<sup>72,148</sup>. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren über die Induktion einer endothelialen Dysfunktion die Entstehung und Progression der Arteriosklerose begünstigen können<sup>35,46,47,115</sup>.

### **1.2.2 Diagnostik der endothelialen Dysfunktion**

Die endotheliale Dysfunktion kann funktionell durch die Einschränkung der endothelabhängigen Vasorelaxation bereits frühzeitig bei beschwerdefreien Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren nachgewiesen werden<sup>21,24</sup>. Die Bestimmung der Endothel-abhängigen Vasodilatation stellt somit die zentrale Säule in der Diagnostik der endothelialen Dysfunktion dar<sup>76</sup>. Als Goldstandardmethode gilt die durch intraarterielle Gabe von Acetylcholin induzierte Vasodilatation<sup>85,117,130,151</sup>. Ein etabliertes nicht-invasives Verfahren in der Diagnostik der endothelialen Dysfunktion stellt die Quantifizierung der Flussvermittelten Dilatation (FMD = Flow mediated dilation) peripherer Arterien (Arteria brachialis, Arteria femoralis) mit Hilfe hochauflösenden Ultraschalls dar<sup>20,21</sup>.

Als morphologischer Parameter einer endothelialen Dysfunktion kann die Intima-Media-Dicke der Arteria carotis nicht-invasiv mittels hochauflösendem Ultraschall gemessen werden, so dass strukturelle Gefäßwandveränderungen schon im Frühstadium der Arteriosklerose quantifiziert werden können<sup>62,76,103</sup>. Die Intima-Media-Dicke der Arteria carotis gilt als Indikator einer generalisierten Arteriosklerose<sup>55</sup>.



### 1.3 Fortgeschrittenes Alter als kardiovaskulärer Risikofaktor

Das Alter stellt einen wesentlichen Risikofaktor für kardiovaskuläre<sup>53,107</sup> sowie zerebrovaskuläre Erkrankungen<sup>122</sup> dar. Das fortschreitende Ausmaß arteriosklerotischer Gefäßläsionen mit zunehmendem Alter<sup>77,129</sup> kann durch Einschränkung der Endothelfunktion und Veränderungen der Gefäßwandarchitektur erfasst werden.

Bezüglich der eingeschränkten Endothelfunktion konnte koronarangiographisch gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter die Acetylcholin-induzierte Vasodilatation, auch bei angiographisch unauffälligem Koronarsystem, reduziert ist<sup>40,151,153</sup>. Auch im peripheren Gefäßsystem konnte eine endotheliale Dysfunktion im Alter nachgewiesen werden: sowohl der nach intraarterieller Gabe von Acetylcholin gemessene Unterarmblutfluss<sup>50,132</sup> als auch die nicht-invasiv messbare Fluss-vermittelte Dilatation der Arteria brachialis<sup>22,67</sup> zeigten bei Patienten ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren eine Einschränkung mit zunehmendem Alter.

Altersbedingte Veränderungen der Gefäßwandstruktur lassen sich mit Hilfe der Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis erfassen, die eine stetige Verbreiterung mit zunehmendem Alter zeigt<sup>17,61,62,99</sup>.

Vor dem Hintergrund, dass die Entwicklung der Arteriosklerose auf einer funktionellen oder morphologischen Endothelschädigung basiert<sup>114</sup>, ist der Erhalt bzw. die Wiederherstellung einer intakten Endothelschicht von entscheidender Bedeutung. So konnte bereits eine Beeinträchtigung der Angiogenese im fortgeschrittenen Alter nachgewiesen werden<sup>49,113</sup>. Nach Induktion einer Hinterlaufischämie wiesen ältere Kaninchen eine höhere Nekroserate, eine geringere Anzahl angiographisch und histologisch nachweisbarer Gefäße sowie eine niedrigere Acetylcholin-induzierte Vasodilatation im Vergleich zu jungen Tieren auf<sup>113</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Reendothelialisierung in älteren Kaninchen deutlich reduziert war<sup>49</sup>.

Wie unter Abschnitt 1.1.2 ausgeführt sind an den Prozessen Neovaskularisation und Reendothelialisierung neben den ortsständigen Endothelzellen auch zirkulierende EPC beteiligt<sup>63,64,87,136</sup>. Der Einfluss des Alters auf endotheliale Progenitorzellen bei gesunden Menschen ist nur unzureichend bekannt. In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, ob das Alter in Abwesenheit weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren einen Einfluss auf die Anzahl und/oder die Funktion endothelialer Progenitorzellen hat. Des Weiteren soll die Frage geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen einer im Alter verminderten Endothelfunktion und möglichen altersabhängigen Veränderungen in der Anzahl oder Funktion der EPC besteht. Vor dem Hintergrund, dass Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit eine reduzierte Anzahl und Funktion zirkulierender EPC aufweisen<sup>140</sup>, wurde daher folgende Hypothese aufgestellt:

Eine Reduktion der Anzahl und/oder Funktion endothelialer Progenitorzellen im Alter trägt zu einer endothelialen Dysfunktion bei.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde bei jungen gegenüber alten Probanden zum einen die Anzahl sowie die Funktion endothelialer Progenitorzellen im peripheren Blut bestimmt, zum anderen die Endothelfunktion (FMD) sowie die Gefäßwandarchitektur (IMT) nicht-invasiv mittels hochauflösendem Ultraschall beurteilt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen klären:

- (1.) Ist die Anzahl und/oder die Funktion zirkulierender endothelialer Progenitorzellen im Alter reduziert?
- (2.) Besteht eine Korrelation zwischen der Endothelfunktion (FMD, IMT) und der Anzahl und/oder Funktion zirkulierender EPC?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studienkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden zum einen junge, zum anderen ältere gesunde Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren untersucht. Das Kollektiv der jungen Probanden setzte sich aus 20 Personen zusammen (10 Männer, 10 Frauen). Das mittlere Lebensalter betrug  $25 \pm 0,6$  Jahre. Das Kollektiv der älteren Probanden setzte sich ebenfalls aus 20 Personen zusammen (7 Männer, 13 Frauen), die durchschnittlich  $61 \pm 1,5$  Jahre alt waren.

Als Ausschlusskriterien galten kardiovaskuläre Risikofaktoren erster Ordnung: arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Rauchen. Eine arterielle Hypertonie wurde anhand der JNC-Kriterien (JNC VI<sup>1</sup>) diagnostiziert, wenn arterielle Blutdrücke  $\geq 140/\geq 90$  mmHg bei drei Messungen an drei separaten Tagen gemessen wurden oder bereits eine antihypertensive Therapie bestand. Ein Diabetes mellitus wurde nach den Richtlinien der ADA<sup>2</sup> diagnostiziert, wenn bei Messungen an zwei unterschiedlichen Tagen Plasmaglukosespiegel nüchtern  $\geq 126$  mg/dl gemessen wurden, ein oraler Glukosetoleranztest mit 2 Stunden-Werten  $\geq 200$  mg/dl oder zu einem beliebigen Zeitpunkt eine Diabetessymptomatik in Kombination mit Plasmaglukosewerten  $\geq 200$  mg/dl bestanden. Ebenfalls wurden Personen, die bereits mit oralen Antidiabetika oder Insulin behandelt wurden, als Diabetiker ausgeschlossen. In Anlehnung an die Richtlinien des NHLBI wurde eine Hypercholesterinämie definiert als das Vorliegen eines Gesamtcholesterins  $\geq 240$  mg/dl, eines LDL- Cholesterins  $\geq 160$ mg/dl, eines HDL- Cholesterins  $< 40$  mg/dl (NCEP ATPIII<sup>3</sup>) oder einer bestehenden cholesterinsenkenenden Therapie. Als Raucher wurden diejenigen betrachtet, die jemals täglich mindestens  $> 20$  Zigaretten über ein Jahr (1 Packungsjahr) geraucht hatten<sup>23</sup>. Zum Ausschluss der oben definierten Risikofaktoren wurden sowohl anamnestische Angaben als auch die klinische Untersuchung und laborchemische Parameter herangezogen. Bei jedem Probanden wurde daher nach der Anamneseerhebung eine internistische Untersuchung sowie eine Kontrolle des Routinelabors (Blutbild, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin,

Triglyzeride, Glukose, CRP) und drei nicht-invasive Blutdruckmessungen an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

Personen, die an einer akut oder chronisch entzündlichen Erkrankung, an einer Tumorerkrankung oder einer Herzinsuffizienz Stadium NYHA III-IV litten, wurden von der Studie ausgeschlossen. Alle Probanden hatten eine leere Eigenanamnese in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Patienten nahmen keine Medikamente ein.

## **2.2 Studienprotokoll**

Das Studienprotokoll der vorliegenden Untersuchung setzt sich aus folgenden Teilen zusammen:

- (I) Patientenrekrutierung
- (II) Blutentnahme
- (III) Ultraschalluntersuchung.

Die Genehmigung des Studienprotokolls erfolgte durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Zunächst wurden die Probanden im Rahmen eines Aufklärungsgesprächs um ihre Einwilligung in die Untersuchung gebeten. Darauf folgten die Erhebung der Anamnese und eine klinische Untersuchung. Am Morgen des Untersuchungstages wurde zunächst Blut zur Bestimmung des Routinelabors sowie zur Kultivierung der endothelialen Progenitorzellen abgenommen. Unmittelbar nach der Blutentnahme erfolgten die Ultraschalluntersuchungen, die die Quantifizierung der Endothel-abhängigen und Endothel-unabhängigen Dilatation der Arteria brachialis sowie der Intima-Media-Dicke der A. carotis umfassten. Die Probanden waren während des gesamten Untersuchungszeitraums nüchtern.

## **2.3 Bestimmung der Anzahl und der Funktion endothelialer Progenitorzellen**

### **2.3.1 Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte beim nüchternen Probanden morgens zwischen 8.00 und 9.00 Uhr nach fünfminütiger Ruhe im Liegen aus einer Kubitalvene. Die Punktion wurde mit Einwegkanülen (B. Braun, Melsungen) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Abnahme von Blutproben in Vakuümröhrchen (BD Vakutainer Systems, Plymouth, Großbritannien) zur Bestimmung des Routinelabors (Blutbild, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyzeride, Blutzucker, CRP). Anschließend wurden mit Einwegspritzen (B. Braun, Melsungen) 40 ml Blut zur Isolation der EPC entnommen. Das entnommene Blut wurde in ein vorbereitetes Röhrchen (Greiner bio-one, Solingen) gefüllt. Zur Antikoagulation wurde EDTA (1mM; Ambion, Huntingdon, Großbritannien) verwendet. Der Zeitraum bis zur Verarbeitung der Probe betrug maximal 30 Minuten (Min.).

### **2.3.2 Isolierung der mononukleären Zellen**

Die Isolierung der MNC und die Kultivierung der Zellen (2.3.3) erfolgten nach dem Protokoll von Kalka et al.<sup>70</sup>.

Die MNC wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Bei Raumtemperatur wurde jeweils 15 ml Histopaque-1077 (Sigma, Taufkirchen) mit 25 ml Blut überschichtet. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 25°C und 500xg. Durch die Zentrifugation des Blutes erfolgt eine Trennung der verschiedenen Blutbestandteile. Erythrozyten und Granulozyten aggregieren mit der Polysaccharose des Histopaque und sedimentieren rasch. Mononukleäre Zellen verbleiben in der sogenannten Plasma-Histopaque-1077-Interphase zwischen dem darüber liegendem Blutplasma und dem darunter liegenden Histopaque. Ab diesem Arbeitsschritt wurde unter sterilen Bedingungen und bei 4°C gearbeitet. Die Plasma-Histopaque-1077-Interphase wurde mit Hilfe einer Einwegspritze und einer Einwegkanüle entnommen und 10 Min. bei 5°C und

500xg zentrifugiert. Um die MNC von Verunreinigungen durch Thrombozyten zu befreien, wurde der Überstand nach Zentrifugation abgesaugt, die Zellen in EDTA/PBS-Lösung (5 mmol/l EDTA in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Kalzium und Magnesium, Cambrex, Verviers, Belgien) resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 Min., 5°C, 200xg). Nach Wiederholung dieses Reinigungsschritts wurden die Zellen in EDTA/PBS-Lösung aufgenommen und zur Lyse der Erythrozyten mit Ammoniumchlorid-Lösung (1:4 (V/V); Apotheke, Universitätskliniken Düsseldorf) 8 Min. auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (5 Min., 5°C, 300xg). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10%iger FBS/PBS-Lösung (Fetales Rinderserum (FBS), Serum Supreme, Cambrex, Verviers, Belgien, in PBS) resuspendiert. Die Anzahl der isolierten MNC wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Superior, Marienfeld) mikroskopisch (Olympus IMT-2, Hamburg) gezählt. Zur Identifizierung toter Zellen wurde die Probe mit Trypan Blue (Gibco, Karlsruhe) angefärbt.

### **2.3.3 Zellkultur**

Die isolierten MNC wurden auf 6-well Platten ( $7,5 \cdot 10^6$  Zellen/Well) in Endothelzellmedium kultiviert. Als Endothelzellmedium wurde Endothelial cell basal medium-2 (EBM-2, Cambrex, Verviers, Belgien) mit EGM-2 MV Singlequots (Cambrex, Verviers, Belgien) eingesetzt. Die EGM-2 MV Singlequots enthielten fetales Rinderserum, humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-B, vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor, Ascorbinsäure, humanen epidermalen Wachstumsfaktor sowie Gentamycin und Amphotericin-B.

Nach vier Tagen erfolgte eine Passage der Primärkulturen. Der Zellüberstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Zum Lösen der adhären Zellen erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit EDTA/PBS-Lösung (1mM). Danach wurde die Zellsuspension in Endothelzellmedium überführt, wobei das EDTA durch das im Medium enthaltene Serum inaktiviert wurde. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 300xg folgte die Kultivierung auf 6-well Platten ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/Well). Jeden zweiten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Für die Funktionstests am Tag 8 (2.3.5–2.3.8) wurden die adhärenenten Zellen wie bei der oben beschriebenen Passage von den Kulturplatten abgelöst, in Medium aufgenommen und gezählt.

Die Isolierung und Kultivierung humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene erfolgten nach folgendem Protokoll: die Endothelzellen wurden enzymatisch mit Kollagenase A (0,1%, Roche, Grenzach-Whylen) aus der Vene von Nabelschnüren gesunder Spender isoliert. Die Zellen wurden in Zellflaschen (BD Falcon, Heidelberg) überführt und in Endothelzellmedium (C-22010, Promocell, Heidelberg) kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (Promocell, Heidelberg) vom Boden der Zellflasche gelöst und wieder in eine Zellflasche überführt bzw. als Positivkontrolle zur Untersuchung der EPC-Funktion (2.3.6–2.3.8) eingesetzt.

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank (Clean Air Technik, Woerden, Niederlande) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator (Juan, Unterhaching) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Einwegartikel für die Zellkultur wurden, sofern nicht anders bezeichnet, von der Firma Greiner bio-one (Solingen) verwendet. Alle Kulturplatten wurden vor Gebrauch mit Fibronectin (100 µg/ml; Chemicon, Hofheim) beschichtet.

#### **2.3.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Anzahl der EPC durch gleichzeitige Messung von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen auf Einzelzellebene bestimmt werden. Die endothelialen Progenitorzellen wurden in der lymphozytären Fraktion analysiert. Die Lymphozyten wurden aufgrund ihrer typischen Lichtstreuung, die durch die Zellgröße und intrazelluläre Granularität beeinflusst wird, innerhalb der mononukleären Zellen definiert. Die Expression von Oberflächenproteinen wurde durch die Messung der Fluoreszenz monoklonaler, Fluorochrom-konjugierter Antikörper ermittelt. Zur Identifizierung der EPC wurde die

Zweifarbenafluoreszenzanalyse eingesetzt, um die Koexpression von KDR und CD34 bzw. KDR und CD133 zu erfassen (1.1.3). Als Farbstoffe wurden das grün fluoreszierende Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und das orange fluoreszierende Phycoerythrin (PE) kombiniert. Zur Bestimmung unspezifischer Antikörperbindungen wurden Isotypenkontrollen mitgeführt. Dazu erfolgte eine Inkubation mit isotypischen Fluorochrom-konjugierten Immunglobulinen.

Die Quantifizierung der EPC erfolgte unmittelbar nach der Isolierung der MNC. Zur Analyse der Koexpression von KDR und CD34 wurden  $1 \cdot 10^6$  MNC mit unkonjugiertem KDR-Antikörper (1:100; Maus anti-human IgG<sub>1</sub>, Sigma, Taufkirchen), FITC-konjugiertem sekundärem Antikörper (1:100; Ratte anti-Maus IgG<sub>1</sub>, BD PharMingen, Heidelberg) und zuletzt mit PE-konjugiertem CD34-Antikörper (1:6; Maus anti-human IgG<sub>1</sub>, BD PharMingen, Heidelberg) inkubiert. Entsprechend wurden zur Markierung von KDR und CD133 unkonjugierter KDR-Antikörper (1:100; Maus anti-human IgG<sub>1</sub>, Sigma, Taufkirchen), FITC-konjugierter sekundärer Antikörper (1:100; Ratte anti-Maus IgG<sub>1</sub>, BD PharMingen, Heidelberg) und PE-konjugierter CD133-Antikörper (1:6; Epitop 1, Maus anti-human IgG<sub>1</sub>, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) eingesetzt. Entsprechende Isotypen- (Beckman Coulter, Krefeld) und Positivkontrollen (CD45; Beckman Coulter; Krefeld) wurden eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 25 Min. bei 4°C. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Probenröhrchen mit 10%iger FBS/PBS-Lösung aufgefüllt, zentrifugiert (5 Min., 5°C, 300xg) und der Überstand abgenommen. Zum Schluss wurden die Zellen 10 Min. mit 1%iger PFA-Lösung (Paraformaldehyd (PFA), Sigma, Taufkirchen) fixiert, zentrifugiert und in 10%iger FBS/PBS-Lösung aufgenommen.

Die Messung wurde an einem Durchflusszytometer (Coulter® Epics® XL™, Beckman Coulter) durchgeführt. Zur Bearbeitung wurde die System II Software 3.0 (Beckman Coulter) verwendet. Nach der Messung der Isotypenkontrollen wurde die Positivkontrolle zur Einstellung der Kompensation sowie zur Diskriminierung der Lymphozyten aufgrund ihrer Streulichteigenschaften analysiert. Danach konnte der Anteil der KDR/CD34 bzw. KDR/CD133 positiven Zellen in der Population der Lymphozyten quantifiziert werden. Bei jeder Messung wurden mindestens 50.000 Zellen analysiert.



Aus der Anzahl der MNC, dem prozentualen Anteil der Lymphozyten und der KDR/CD34 bzw. KDR/CD133 positiven Zellen wurde die absolute Zahl der KDR/CD34 bzw. der KDR/CD133 positiven Zellen im Blut rechnerisch ermittelt. Dafür wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Anzahl der doppelt positiven Zellen [pro ml Blut]} = \text{MNC [pro ml]} * \text{Lymphozyten [\%]} * \text{doppelt positive Zellen [\%]} / 10000$$

### **2.3.5 Bestimmung der Überlebensfähigkeit endothelialer Progenitorzellen**

Die Überlebensfähigkeit der EPC wurde mit Hilfe des EPC-Kultur-Assay erfasst. Der EPC-Kultur-Assay wurde in modifizierter Form nach dem Protokoll von Kalka et al. durchgeführt<sup>70</sup>.

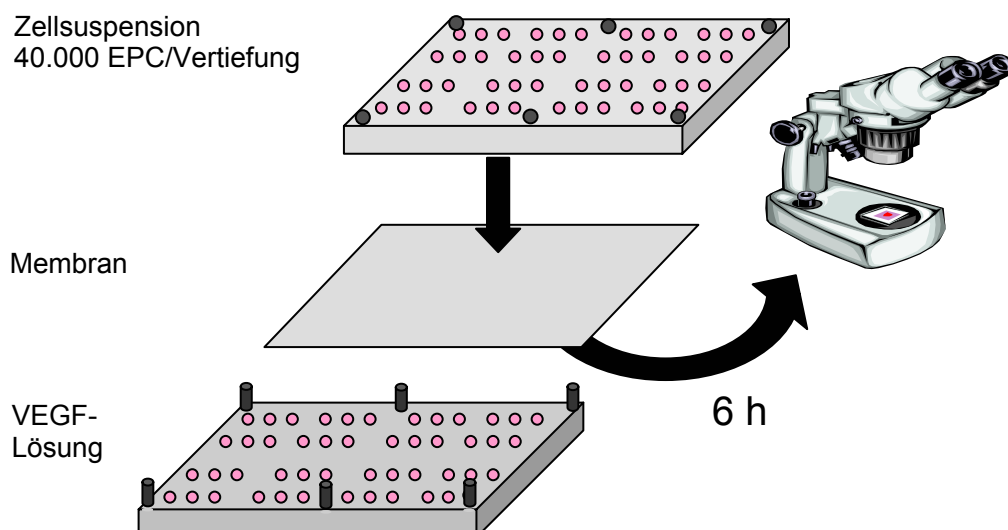
In einem Vierkammersystem (BD Falcon, Heidelberg) wurde eine definierte Anzahl mononukleärer Zellen ( $1 \cdot 10^6$  MNC in Endothelzellmedium) vier Tage in Kultur gehalten und im Anschluss die Anzahl der EPC bestimmt. Zur Identifizierung der EPC wurden die adhärennten Zellen zunächst mit humanem 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-konjugiertem azetyliertem Low Density Lipoprotein (2 µg/ml; Dil azLDL, CellSystems, St. Katharinen) versetzt. Nach dreistündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit 1%iger PFA-Lösung fixiert und es folgte eine einstündige Färbung mit FITC-konjugiertem Ulex Europaeus-I Agglutinin (23 µg/ml; UEA-I, Sigma, Taufkirchen) bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Anzahl der doppelt gefärbten EPC mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Nikon Eclipse TE2000-U, Badhoevedorp, Niederlande) gezählt.

### **2.3.6 Bestimmung der Migration endothelialer Progenitorzellen**

Die Migrationsfähigkeit der EPC wurde mit Hilfe eines Chemotaxis-Assays bestimmt, in dem die durch eine chemotaktisch aktive Substanz bewirkte

Zellmigration beurteilt wurde. Für diesen Test wurde eine 48-well Mikrochemotaxiskammer (Neuro Probe, Gaithersburg, USA) verwendet<sup>42</sup> (Abb. 2).

Die Vertiefungen des unteren Kompartiments der Mikrochemotaxiskammer wurden mit 27  $\mu$ l VEGF-Lösung (50 ng/ml; Chemicon, Hofheim in 0,1% BSA/EBM-2) gefüllt. In die Vertiefungen des oberen Kompartiments wurde die Zellsuspension (40.000 EPC in 0,1% BSA/EBM-2) pipettiert (Dreifachbestimmung). Zur Trennung der beiden Platten wurde eine Polyvinylpyrrolidon-freie Polykarbonatmembran mit 8  $\mu$ m Porengröße (Neuro Probe, Gaithersburg, USA) eingesetzt. Die Membran wurde vor der Verwendung auf der Unterseite mit einer Lösung, die Fibronectin (50  $\mu$ g/ml; Chemicon, Hofheim), Vitronectin (2,5  $\mu$ g/ml; Sigma, Taufkirchen) und Gelatine (1 mg/ml; Sigma, Taufkirchen) in PBS enthielt, beschichtet. Nach sechsstündiger Inkubation der Mikrochemotaxiskammer im Brutschrank wurde die Membran entnommen und sedimentierte Zellen auf der oberen Seite wurden abgewischt. Die durch die Poren der Membran gewanderten und auf der Unterseite der Membran adhären Zellen wurden mit dem Diff-Quick-Färbeset (Dade Behring Diagnostika, Schwalbach) fixiert und gefärbt. Die Anzahl der gefärbten Zellen pro  $\text{mm}^2$  wurde mikroskopisch (Olympus IMT-2, Hamburg) gezählt.



**Abbildung 2: Prinzip des Chemotaxis-Assays**

Die EPC wandern vom oberen Kompartiment durch die Membran in Richtung des unteren Kompartiments, dessen Vertiefungen mit einer VEGF-Lösung gefüllt sind. Hierbei wirkt die VEGF-Lösung als chemoaktive Substanz. Nach sechsstündiger Inkubation werden die Zellen auf der Unterseite der Membran mikroskopisch ausgezählt.

### **2.3.7 Bestimmung der Proliferation endothelialer Progenitorzellen**

Die Proliferation der EPC wurde mit Hilfe eines quantitativen kolorimetrischen Tests erfasst<sup>92,123</sup>. Das Prinzip des verwendeten WST-Tests basiert auf der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST-1 durch mitochondriale Succinat-Tetrazolium Reduktasen in ein farbiges Formazan. Durch diesen Test werden nur vitale Zellen erfasst, wobei die in der mitochondrialen Atmungskette vorkommenden Dehydrogenasen eine deutlich erhöhte Aktivität in proliferierenden Zellen zeigen. Die Menge des gebildeten dunkelroten Formazans wird über seine Absorption (Absorptionsmaximum 438 nm) bestimmt.

Zur Messung der Proliferation wurde eine definierte Zellsuspension ( $1 \cdot 10^4$  Zellen in Endothelzellmedium) in die Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte pipettiert (Dreifachbestimmung). Zur Erfassung der basalen Proliferationsrate erfolgte nach 24 h ein Mediumwechsel (0,1%iges BSA/EBM-2). Nach 72 h wurde die WST-1 Lösung (1:11; PreMix WST-1 Cell Proliferation Assay System, TaKaRa Biomedicals, Cambrex, Verviers, Belgien) zugegeben. Nach vierstündiger Inkubation wurde die Absorption des entstandenen Formazans bei 440 nm mit Hilfe eines Plattenphotometers (Labsystems iEMS Reader MF, Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finnland) gemessen. Als Positivkontrolle dienten HUVEC, als Leerwert wurde EBM-2 mitgeführt. Die Absorption wurde aus der Differenz des Probenmesswerts und dem Leerwert bestimmt.

### **2.3.8 Bestimmung von Adhäsionseigenschaften endothelialer Progenitorzellen**

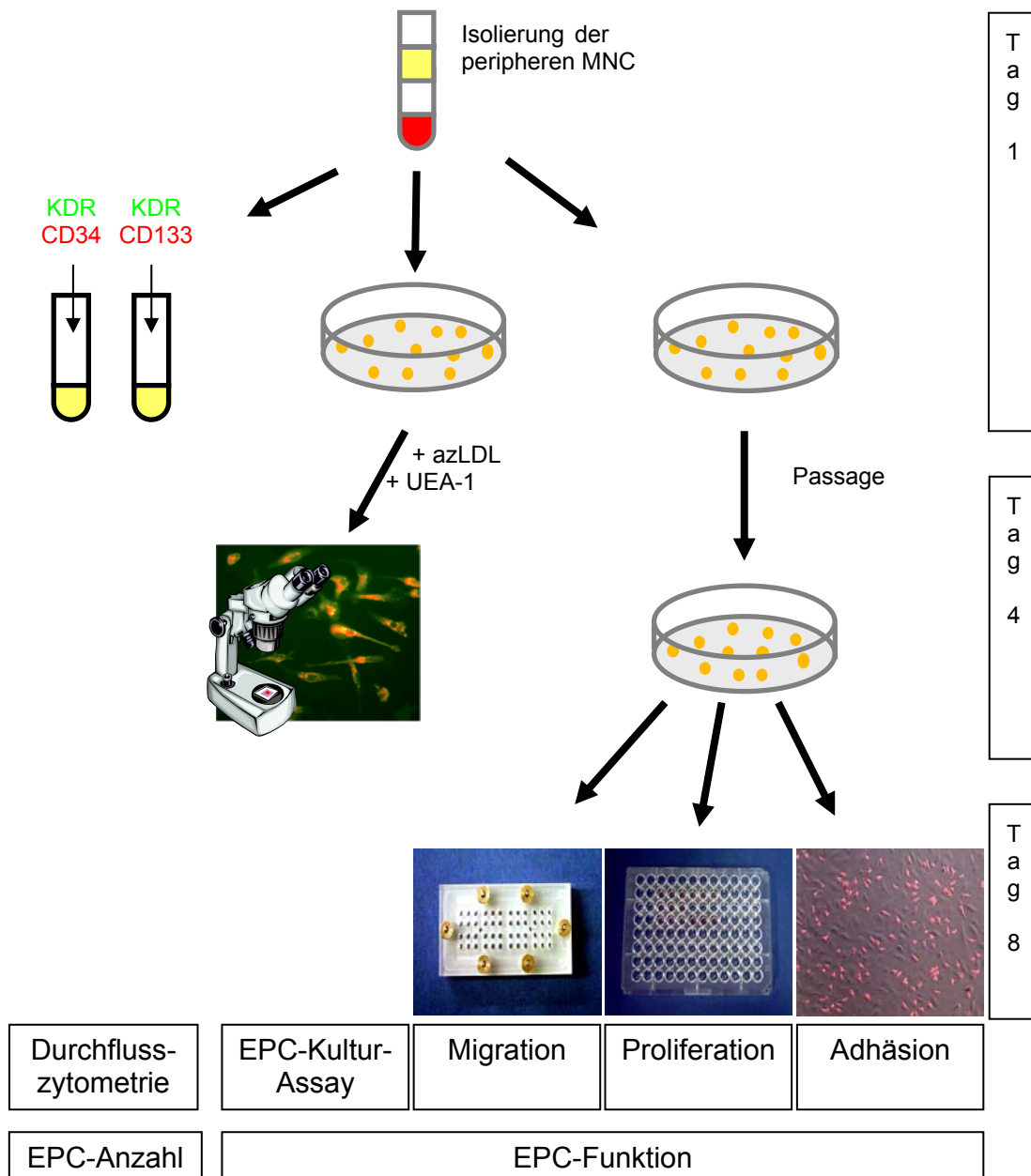
Zur Bestimmung von Adhäsionseigenschaften der EPC wurde zum einen ein funktioneller Adhäsions-Test durchgeführt, zum anderen durchflusszytometrisch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der EPC geprüft.

Mit dem Adhäsions-Test wurde die Anzahl der EPC ermittelt, die unter definierten Bedingungen an einer aus HUVEC bestehenden konfluenten Zellschicht adhären. Der Adhäsions-Test wurde in Anlehnung an das Protokoll von Tepper

et al. durchgeführt<sup>134</sup>. Um eine konfluente HUVEC-Schicht herzustellen, wurde zwei Tage vor dem geplanten Adhäsions-Test eine Zellsuspension (80.000 HUVEC in Endothelzellmedium) in einem Vierkammersystem gleichmäßig verteilt. Zur Aktivierung der HUVEC wurden die Zellen 12 h vor Beginn des Adhäsionstests mit Tumornekrosefaktor-alpha (1 ng/ml; TNF- $\alpha$ , Chemicon, Hofheim) stimuliert. Die EPC wurden mit einem rot fluoreszierenden Farbstoff (5  $\mu$ g/ml; CellTracker<sup>TM</sup>CM-Dil, Molecular Probes, Göttingen) markiert. Danach wurden 10.000 markierte EPC auf die HUVEC-Schicht gegeben, gleichmäßig verteilt und 3 h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1%iger PFA-Lösung fixiert und die Zellkerne mit DAPI (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, USA) gefärbt. Die Anzahl der DAPI positiven, rot markierten EPC pro mm<sup>2</sup> wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Nikon Eclipse TE2000-U, Badhoevedorp, Niederlande) gezählt.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde nach dem oben beschriebenen Prinzip (2.3.4) die Expression des Fibronectin-Rezeptors  $\alpha_5\beta_1$  sowie des Integrins  $\alpha_v\beta_5$  in einer Doppelfärbung mit CD31 quantifiziert. In jedem Ansatz wurden 150.000 EPC eingesetzt. Für die CD31/ $\alpha_5\beta_1$ -Doppelfärbung wurden unkonjugierter  $\alpha_5\beta_1$ -Antikörper (1:10; Chemicon, Hofheim), PE-konjugierter sekundärer Antikörper (1:100; BD PharMingen, Heidelberg) und FITC-konjugierter CD31-Antikörper (1:4; Beckman Coulter, Krefeld) eingesetzt. Für die CD31/ $\alpha_v\beta_5$ -Färbung wurden die EPC mit FITC-konjugierten  $\alpha_v\beta_5$ -Antikörper (1:10; Chemicon, Hofheim) und PE-konjugierten CD31-Antikörper (1:4; Beckman Coulter, Krefeld) inkubiert. Isotypenkontrollen (Beckman Coulter) sowie Positivkontrollen (CD31, Beckman Coulter) wurden mitgeführt. Der prozentuale Anteil der doppelt positiven EPC in der Probe wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers (Coulter<sup>®</sup> Epics<sup>®</sup> XL<sup>TM</sup>; Beckman Coulter) ermittelt. Bei jeder Messung wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert.

Eine Übersicht über die beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Anzahl und der Funktion der EPC gibt Abbildung 3.



**Abbildung 3: Übersicht über die Methoden der Zellkultur**

Unmittelbar nach der Isolierung der MNC erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl der EPC. Der EPC-Kultur-Assay begann am Tag der Isolierung (Tag 1), am Tag 4 erfolgte die Färbung der EPC. Zur weiteren Bestimmung der Funktion der EPC wurden am Tag 8 die Migration, Proliferation und die Adhäsion der kultivierten EPC geprüft.

## **2.4 Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis**

Die Endothelfunktion wurde mit Hilfe der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis mittels hochauflösenden Ultraschalls quantifiziert. Das Prinzip dieses nicht-invasiven Untersuchungsverfahrens ist die Bestimmung der Zunahme des Durchmessers der Arteria brachialis nach einer physiologischen Stimulation der endothelialen NO-Synthese durch Steigerung der Fließgeschwindigkeit (Fluss-vermittelte Dilatation; FMD)<sup>16,31,32,75,81,124</sup>.

Hierzu wurde der Durchmesser der Arteria brachialis im Bereich der Ellenbeuge sowohl unter Ruhebedingungen als auch im Anschluss an eine reaktive Hyperämie des distalen Versorgungsgebiets der Arteria brachialis bestimmt. Die reaktive Hyperämie wurde durch fünfminütige Insufflation einer am proximalen Unterarm angelegten Blutdruckmanschette auf suprasystolische Werte induziert. Nach Lösen der Blutdruckmanschette kommt es aufgrund einer ischämischen Vasodilatation der Widerstandsgefäße im Endstromgebiet zu einer Steigerung der Fließgeschwindigkeit im Bereich der Leitungsarterie, der Arteria brachialis. Die Steigerung der Fließgeschwindigkeit ist mit einer Steigerung der Schubspannung verbunden, welche über eine vermehrte Freisetzung endothelialen Stickstoffmonoxids zu einer Dilatation der Arteria brachialis führt<sup>33,37,68,93</sup>. Die Fluss-vermittelte Vasodilatation erreicht etwa 60 Sekunden nach Beendigung der Ischämie ihr Maximum<sup>32</sup>.

Prinzipiell kann einer verminderten FMD neben einer reduzierten NO-Synthese des Endothels auch ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf NO oder ein vermehrter NO-Abbau zu Grunde liegen. Deshalb wurde in einem zweiten Schritt die Endothel-unabhängige Dilatation der Arteria brachialis nach sublingualer Gabe von 400 µg Glyzeroltrinitrat (GTN; Nitrolingual<sup>®</sup>, Pohl, Hohenlockstedt) erfasst. Die maximale Dilatation wurde nach 4 Min. bestimmt<sup>32</sup>. Sowohl die Endothel-abhängige als auch die Endothel-unabhängige Vasodilatation wurden als prozentuale Zunahme des Durchmessers in Relation zum Ruhedurchmesser angegeben.

### **2.4.1 Untersuchungsprotokoll**

Alle Untersuchungen wurden in einem klimatisierten Raum bei 23°C zwischen 8:00 und 9:00 Uhr morgens durchgeführt. Zuerst wurde die Arteria brachialis duplexsonographisch aufgesucht, dann im B-Mode längs eingestellt. Die Eindringtiefe des Ultraschalls wurde auf 3 cm festgelegt. Der Durchmesser wurde dadurch identifiziert, dass man sowohl die anteriore als auch die posteriore Arterienwand deutlich vom Lumen abgrenzen konnte. Anschließend wurde der Bereich unmittelbar um das Gefäß mit der Zoomfunktion vergrößert. Der Kontrast zwischen Arterienlumen und Arterienwand wurde durch Veränderung der Verstärkungs- und Kompressionseinstellungen optimiert. Nach Markierung der Schallkopfposition am Arm wurden weder der Schallkopf noch die Geräteeinstellungen während der gesamten Untersuchung verändert.

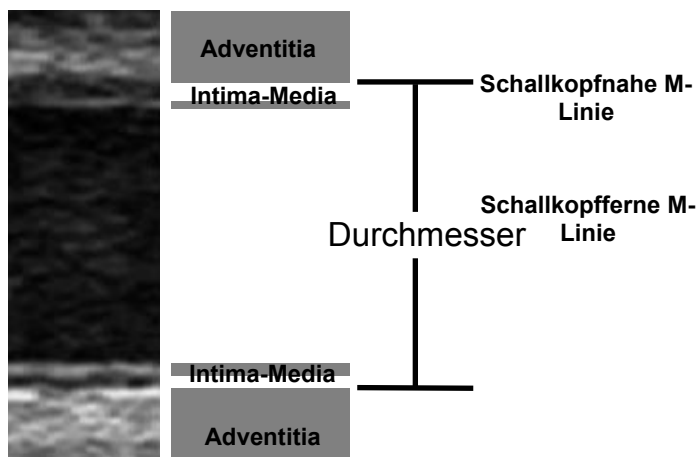
Nach einer zehnminütigen Ruhephase in liegender Position erfolgte die Messung des arteriellen Blutdrucks nicht-invasiv nach Riva-Rocci sowie des Ruhedurchmessers der Arteria brachialis. Parallel dazu wurde mittels PW (Pulsed Wave)-Doppler die Fließgeschwindigkeit unter Ruhebedingungen gemessen.

Anschließend wurde eine am proximalen Unterarm platzierte Blutdruckmanschette für 5 Min. auf suprasystolische Werte insuffliert. Unmittelbar nach Lösung des Staus wurden dopplersonographisch der Durchmesser und die Fließgeschwindigkeit während der reaktiven Hyperämie gemessen. Nach 60 Sekunden wurde der Durchmesser zur Bestimmung der FMD bestimmt. Anschließend erfolgte eine weitere Registrierung der Fließgeschwindigkeit. Nach 10 Min. wurden 400 µg Glyzeroltrinitrat (Nitrolingual, Pohl, Hohenlockstedt) als Zerbeisskapsel sublingual verabreicht. Vier Min. später erfolgte die Quantifizierung des Durchmessers und der Fließgeschwindigkeit.

### **2.4.2 Prinzip der sonographischen Quantifizierung des arteriellen Durchmessers**

Die Bestimmung des Durchmessers der Arteria brachialis im Bereich der Ellenbeuge erfolgte anhand von Längsschnitten. Diese wurden mit Hilfe eines

hochauflösenden 15 MHz Linear Array Schallkopfes (Sonos 5500, Philips, Hamburg) aufgezeichnet. Die Vermessungen des Arterien­durchmessers erfolgten EKG-gesteuert am Ende der Diastole. Als Begrenzung des arteriellen Lumens diente die M-Linie, die den Übergang zwischen der Media und der Adventitia der Gefäßwand darstellt. Hierzu wurde die Distanz zwischen der schallkopfnahen M-Linie und der schallkopffernen M-Linie im rechten Winkel zur Gefäßachse bestimmt<sup>20,24,32</sup>.



**Abbildung 4**

Schematischer Vergleich des sonographischen Bildes der Arteria brachialis und des anatomischen Korrelates. Zur Bestimmung des Durchmessers wurde die Strecke von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie gemessen.

Zur Ermittlung des Arterien­durchmessers wurde eine PC-gestützte Methode eingesetzt<sup>105</sup>. Bei dieser Methode wurde jeweils eine Bildschleife aufgenommen und digital gespeichert. Jede Bildschleife setzte sich aus ca. 60 Einzelbildern zusammen und umfasste dadurch 3-4 Herzzyklen. Das kontinuierlich mitlaufende EKG wurde parallel aufgezeichnet, um eine EKG-gesteuerte Vermessung des Arterien­durchmessers zu ermöglichen.

Nach Transfer des Bildmaterials vom Ultraschallgerät auf den Computer wurden die Bilder am PC mit einer speziell dafür entwickelten Software in ein Standard-Bildformat (TIF-Format) konvertiert (Brachial Converter, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA) und nachfolgend in die zur Diametermessung verwendete Software (Brachial Analyse, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA) importiert. Zur Ermittlung des Durchmessers wurde der zu vermessende Gefäßabschnitt manuell markiert. Nach Kalibrierung anhand von gespeicherten Eichmarken wurden die Gefäßwände automatisch detektiert und farbig angezeigt. Die farbig markierten Begrenzungen der Gefäßwand wurden auf Übereinstimmung mit dem Ultraschallbild überprüft. Die Bestimmung des



Durchmessers erfolgte R-Zacken synchron durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen Messpunkten im definierten Messabschnitt.

### **2.4.3 Dopplersonographische Untersuchung des Blutvolumenflusses in der Arteria brachialis**

Die Messung der Fließgeschwindigkeit erfolgte im PW-Doppler Mode. Das Messvolumen wurde hierzu in die Gefäßmitte der Arteria brachialis gelegt. In die Berechnung der Fließgeschwindigkeit mit Hilfe der Doppler-Gleichung geht der Kosinus des Einstrahlungswinkels im Nenner ein. Mit steigendem Winkel von 0° auf 90° wächst deshalb der Messfehler und macht die Messung bei 90° unmöglich ( $\cos 90^\circ=0$ ). Grundsätzlich erfolgten alle Messungen bei einem Doppler-Winkel von  $< 60^\circ$ , da dies als äußerste Grenze für quantitative Flussmessungen erachtet wird.

Aus der gemessenen Fließgeschwindigkeit und Durchmesser wurde der Volumenfluss nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Volumenfluss [ml/min]} = \pi * (\text{Durchmesser [mm]} / 2)^2 * \text{Fließgeschwindigkeit [cm/sec]} * 0,6$$

## **2.5 Sonographische Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis**

Frühe morphologische Veränderungen der Gefäßwand können anhand der Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis mittels hochauflösenden Ultraschalls erfasst werden<sup>15,48,103</sup>.

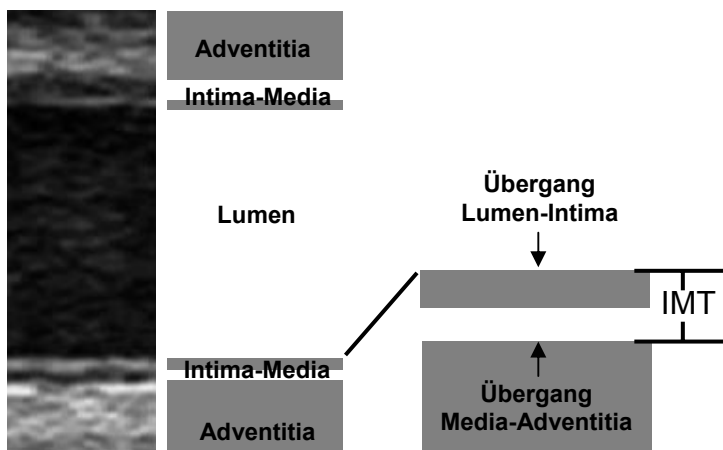
### **2.5.1 Untersuchungsprotokoll**

Bei leicht zur Seite geneigtem Kopf wurde die Arteria carotis communis duplexsonographisch aufgesucht und dann im B-Mode längs eingestellt, so dass sowohl die schallkopfnaher als auch die schallkopferne Gefäßwand deutlich vom

Lumen abgrenzbar war. Anschließend wurde der Bereich unmittelbar um das Gefäß mit der Zoomfunktion vergrößert. Für die folgende automatische Quantifizierung der IMT wurde das Bildmaterial gespeichert.

## 2.5.2 Prinzip der sonographischen Quantifizierung der Intima-Media-Dicke

Die Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis erfolgte anhand von Längsschnitten 1,5 cm proximal des Bulbus caroticus. Als Eckpunkte der Vermessungen diente der Übergang vom Lumen der Arteria carotis zur Intima und der Übergang der Media zur Adventitia an der schallkopffernen Wand<sup>145</sup>. Zur Bestimmung der IMT wurde die Distanz zwischen den beiden genannten Übergängen gemessen.



**Abbildung 5**

Schematischer Vergleich der sonographischen und anatomischen Korrelate des Intima-Media-Komplexes.

Nach Übertragung der gespeicherten Bilddaten vom Ultraschallgerät auf den Computer erfolgte die Konvertierung in ein Standard Bildformat (TIF-Format) und die verschlüsselte Speicherung in einem speziellen Auswertungs- und Archivierungsprogramm (Artery Measurement System, AMS, Wallenberg Laboratory for Cardiovascular Research, Göteborg, Schweden). Nach Kalibrierung mittels gespeicherter Eichpunkte wurde der auszuwertende Gefäßwandabschnitt manuell markiert. Durch das Programm wurde an der distalen Gefäßwand der Übergang vom Lumen zur Intima und der Übergang der Media zur Adventitia detektiert und farblich markiert. Die Markierungen wurden auf Übereinstimmung mit dem Ultraschallbild geprüft. Die Bestimmung der IMT erfolgte R-Zacken

synchron durch Mittelung von ca. 100-200 Einzelmessungen im definierten Messabschnitt.

## **2.6 Statistik**

Die statistische Datenverarbeitung wurde mit Hilfe des SPSS-Paketes (Statistical package for analysis in social sciences, Version 11, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Deskriptive statistische Daten wurden, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert $\pm$ Standardfehler (MW $\pm$ SE) angegeben. Gruppenmittelwerte wurden mit Hilfe des Student's t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Lineare Korrelationen wurden zweiseitig nach Pearson berechnet. Für multivariate Korrelationen wurde eine multiple lineare Regression durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei  $p \leq 0,05$  angenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Das mittlere Lebensalter der jungen Probanden betrug  $25 \pm 0,6$  Jahre, das der älteren Probanden  $61 \pm 1,5$  Jahre. Bezüglich der Triglyzerid-, HDL- und LDL-Cholesterinkonzentrationen sowie der Glukosekonzentration im Plasma sowie des Body mass index (BMI) waren die beiden untersuchten Gruppen vergleichbar. Auch das C-reaktive Protein (CRP) und die Leukozyten zeigten keine signifikanten Unterschiede. In der Population der älteren Probanden zeigten sich im Vergleich zu den jungen Probanden jedoch signifikant höhere Werte in Bezug auf das Gesamtcholesterin ( $p < 0,001$ ) und den arterieller Mitteldruck ( $p < 0,05$ ), während der systolische sowie diastolische Blutdruck zwischen den beiden Gruppen vergleichbar waren (Tab.1).

**Tabelle 1**

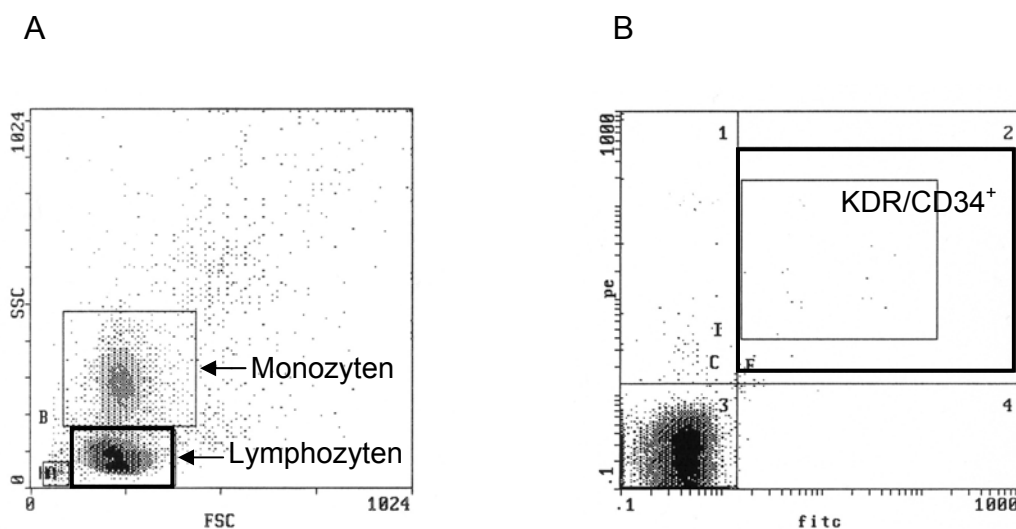
Epidemiologische Daten der jungen und älteren Probanden. (MW $\pm$ SE; \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ )

Parameter	Einheit	Jung	Alt	
n		20	20	
Alter	[Jahre]	$25,3 \pm 0,6$	$61 \pm 1,5$	***
Geschlecht	[m/w]	10/10	7/13	
Body mass index	[kg/m <sup>2</sup> ]	$22 \pm 0,5$	$24 \pm 0,5$	
Systolischer Blutdruck	[mmHg]	$117 \pm 1,5$	$122 \pm 2,7$	
Diastolischer Blutdruck	[mmHg]	$77 \pm 1,5$	$81 \pm 1,5$	
Arterieller Mitteldruck	[mmHg]	$90 \pm 1,3$	$96 \pm 2,1$	*
Gesamtcholesterin	[mg/dl]	$190 \pm 5,6$	$218 \pm 5,0$	***
LDL- Cholesterin	[mg/dl]	$133 \pm 5,2$	$142 \pm 6,0$	
HDL- Cholesterin	[mg/dl]	$70 \pm 3,7$	$72 \pm 3,6$	
Triglyzeride	[mg/dl]	$87 \pm 9,7$	$97 \pm 8,3$	
Plasmaglukose	[mg/dl]	$88 \pm 1,6$	$91 \pm 2,3$	
CRP	[mg/dl]	$0,05 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,08$	
Leukozyten	[pro $\mu$ l]	$5465 \pm 173$	$5290 \pm 221$	

### 3.2 Bestimmung der Anzahl der endothelialen Progenitorzellen

Die Anzahl der MNC im peripheren Blut betrug im Kollektiv der jungen Studienteilnehmer durchschnittlich  $1,9 \pm 0,1 \cdot 10^6$  Zellen/ml Blut, im Kollektiv der älteren Probanden durchschnittlich  $1,5 \pm 0,1 \cdot 10^6$  Zellen/ml Blut ( $p < 0,01$ ).

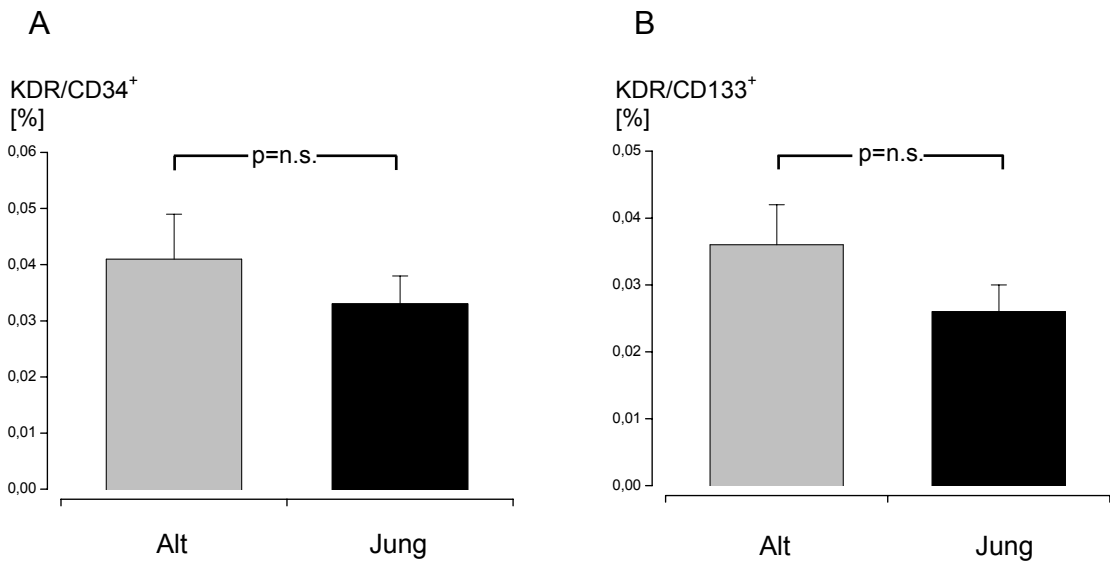
Unmittelbar im Anschluss an die Isolierung der MNC wurde die Anzahl der zirkulierenden EPC durch die durchflusszytometrische Quantifizierung der KDR/CD34 bzw. der KDR/CD133 doppelt positiven Zellen ermittelt (Abb. 6).



**Abbildung 6: Durchflusszytometrie**

(A) Originalabbildung der Diskriminierung der Lymphozyten innerhalb der mononukleären Zellen;  
(B) Originalabbildung der Bestimmung der KDR/CD34 doppelt positiven Zellen

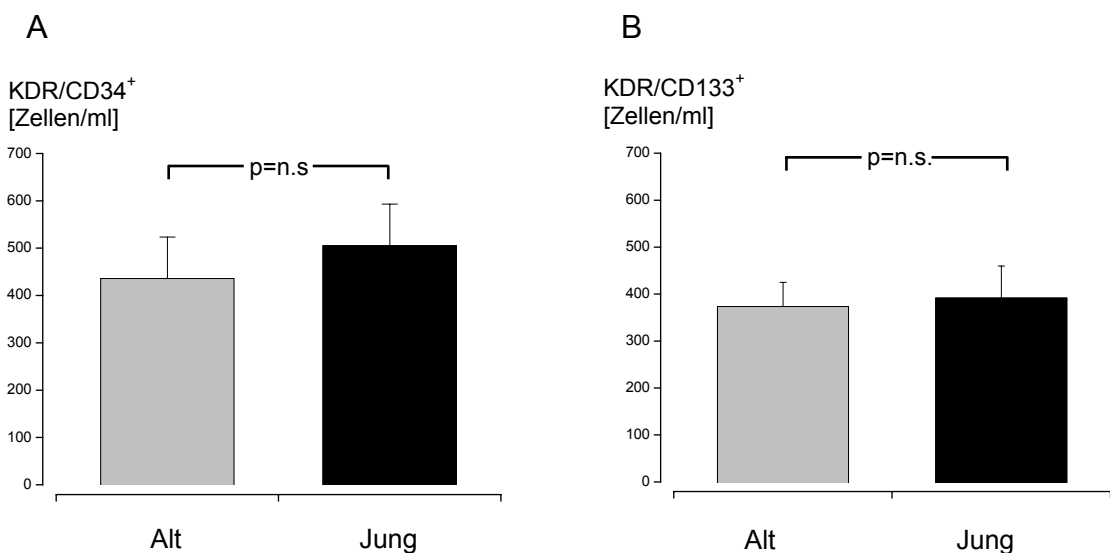
Der prozentuale Anteil der KDR/CD34 positiven Zellen betrug bei den jungen Studienteilnehmern  $0,033 \pm 0,005\%$ , bei den älteren Studienteilnehmern  $0,041 \pm 0,008\%$  ( $p = n.s.$ ; Abb. 7 A). Der Anteil der KDR/CD133 positiven Zellen belief sich im jungen Studienkollektiv auf  $0,026 \pm 0,004\%$ . In der Population der älteren Probanden zeigte sich mit  $0,036 \pm 0,006$  ein vergleichbarer Anteil ( $p = n.s.$ ; Abb. 7 B).



**Abbildung 7: Prozentualer Anteil der EPC**

Vergleich des prozentualen Anteils der KDR/CD34 (A) und KDR/CD133 positiven Zellen (B) zwischen jungen und älteren Probanden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Anzahl der KDR/CD34 doppelt positiven Zellen betrug in der Population der jungen Probanden 505±88 Zellen/ml Blut, in der Population der älteren Studienteilnehmer 436±88 Zellen/ml Blut (p=n.s.; Abb. 8 A). Auch die Anzahl der KDR/CD133 positiven Zellen zeigte mit 392±68 versus 373±52 Zellen/ml Blut zwischen jungen und älteren Probanden keine Unterschiede (p=n.s.; Abb. 8 B).



**Abbildung 8: Anzahl der EPC**

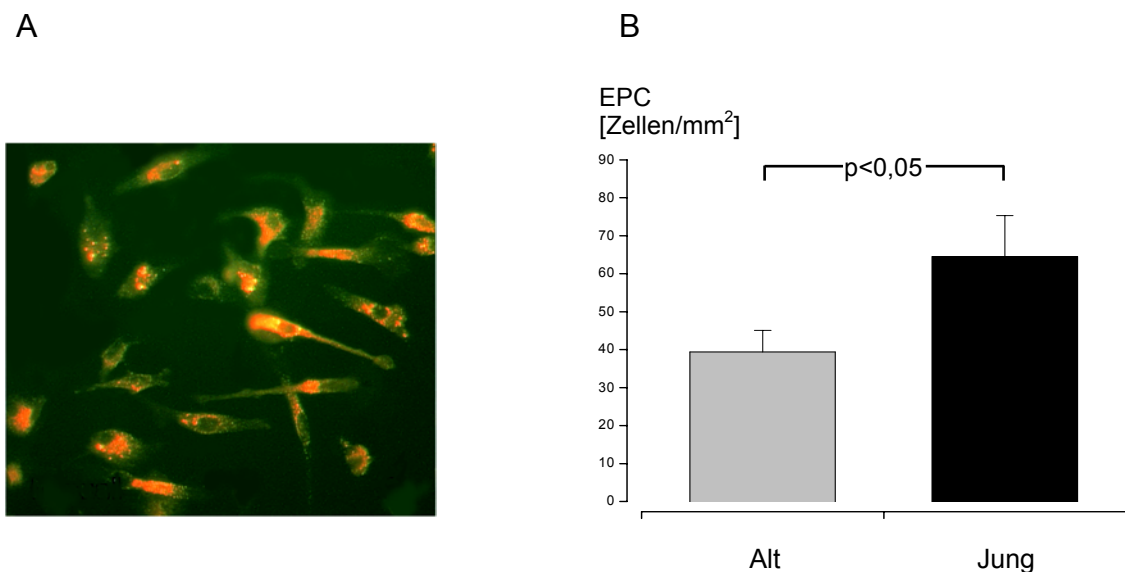
Vergleich der Anzahl der KDR/CD34 (A) und KDR/CD133 doppelt positiven Zellen (B) zwischen jungen und älteren Probanden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.3 Bestimmung der Funktion der endothelialen Progenitorzellen

Die Funktion der endothelialen Progenitorzellen wurde anhand folgender Parameter quantifiziert:

- (I) Überlebensfähigkeit im EPC-Kultur-Assay
- (II) Migration im Chemotaxis-Assay
- (III) Proliferatorische Kapazität
- (IV) Adhäsion an einer Endothelschicht sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der EPC.

Im EPC-Kultur-Assay betrug die Anzahl der azLDL/UEA-I doppelt positiven Zellen in der jungen Studienpopulation  $65 \pm 11$  Zellen/ $\text{mm}^2$ , während die Anzahl im Kollektiv der älteren Studienteilnehmer auf  $39 \pm 6$  Zellen/ $\text{mm}^2$  reduziert war ( $p < 0,05$ ; Abb. 9).

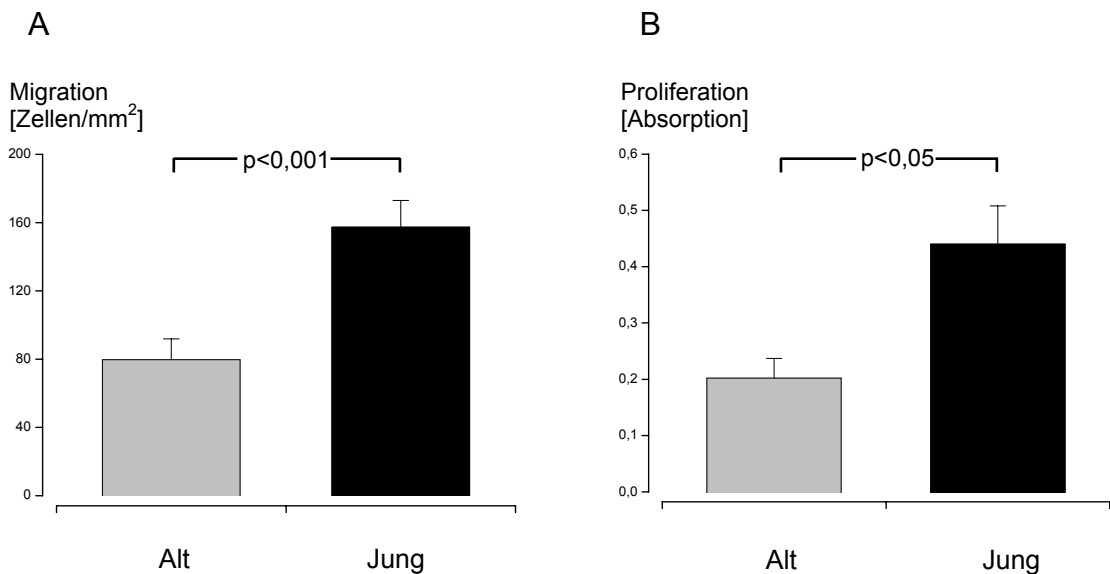


**Abbildung 9: EPC-Kultur-Assay**

(A) Identifizierung der EPC durch Färbung mit azLDL (rot) und UEA-I (grün); (B) Der Vergleich der EPC-Überlebensfähigkeit zwischen jungen und älteren Probanden zeigte einen signifikanten Unterschied.

Im Chemotaxis-Assay zeigte sich, dass die Migrationsfähigkeit der EPC der älteren Probanden mit  $80 \pm 12$  migrierten EPC/ $\text{mm}^2$  signifikant vermindert war gegenüber den jungen Probanden mit  $157 \pm 16$  EPC/ $\text{mm}^2$  ( $p < 0,001$ , Abb. 10 A).

Im Proliferations-Test betrug die Absorption der Zellsuspension im jungen Studienkollektiv  $0,44 \pm 0,07$ , während sie im Kollektiv der älteren Probanden auf durchschnittlich  $0,20 \pm 0,04$  ( $p < 0,05$ , Abb. 10 B) reduziert war. Die EPC älterer Probanden zeigten somit eine verminderte Proliferation gegenüber den EPC junger Probanden.



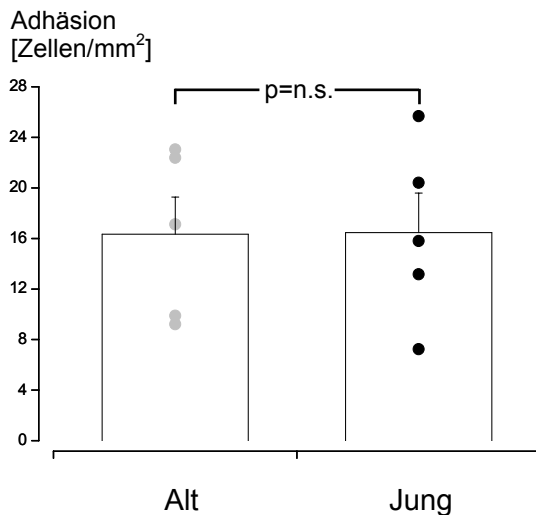
**Abbildung 10: Migration und Proliferation der EPC**

Vergleich der Migration (A) und Proliferation (B) endothelialer Progenitorzellen zwischen jungen und älteren Probanden. Diese beiden funktionellen Marker zeigten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven.

Die Anzahl der doppelt positiven Zellen im EPC-Kultur-Assay zeigte eine schwache univariate Korrelation mit dem Alter ( $n=33$ ;  $r=-0,405$ ;  $p < 0,05$ ) und dem Gesamtcholesterin ( $n=33$ ;  $r=-0,345$ ;  $p < 0,05$ ). Migrations- und Proliferationsassay zeigten ebenfalls eine signifikante Korrelation mit dem Probandenalter ( $n=29$ ;  $r=-0,543$ ;  $p < 0,01$  bzw.  $n=28$ ;  $r=-0,462$ ;  $p < 0,05$ ).

Die Adhäsionseigenschaften der EPC wurden an einer Subpopulation von je fünf jungen und älteren Probanden geprüft. Im Adhäsionstest zeigte die Anzahl der an der konfluenten HUVEC-Schicht adhärenen EPC keine signifikanten Unterschiede zwischen den jungen und den älteren Probanden ( $16 \pm 3$  vs.  $16 \pm 3$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p = n.s.$ ; Abb. 11).

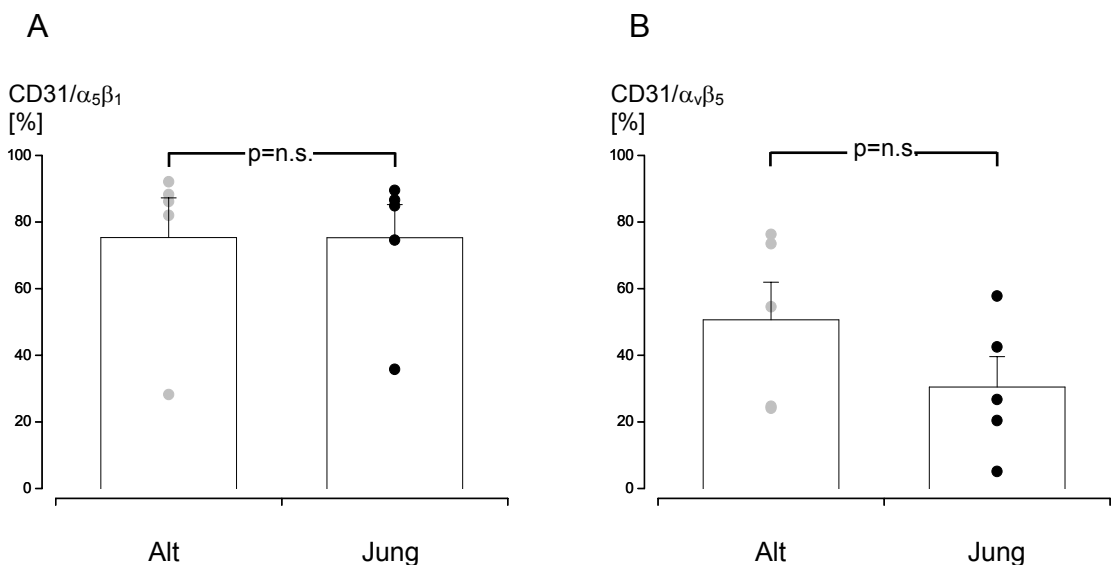




**Abbildung 11: Adhäsions-Test**

Vergleich der EPC-Adhäsion zwischen jungen und älteren Probanden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Auch in der Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Kollektiven. In der Population der der jungen Probanden betrug der prozentuale Anteil der CD31/ $\alpha_5\beta_1$  positiven Zellen  $74 \pm 10\%$ , in der Population der älteren Probanden  $75 \pm 12\%$  ( $p=n.s.$ ; Abb. 12 A). Der Anteil der CD31/ $\alpha_v\beta_5$  positiven Zellen belief sich bei den jungen Probanden auf durchschnittlich  $31 \pm 9\%$ , bei den älteren Probanden auf  $51 \pm 11\%$  ( $p=n.s.$ ; Abb. 12 B)



**Abbildung 12: Expression von Adhäsionsmolekülen**

Vergleich der Expression von CD31/ $\alpha_5\beta_1$  (A) und CD31/ $\alpha_v\beta_5$  (B) auf der Oberfläche der EPC zwischen jungen und älteren Probanden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

### **3.4 Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis**

Die Endothel-abhängige Dilatation der Arteria brachialis wurde als Fluss-vermittelte Vasodilatation mittels hochauflösenden Ultraschalls erfasst.

Der Durchmesser der Arteria brachialis im jungen Studienkollektiv wurde mit durchschnittlich  $3,7 \pm 0,2$  mm bestimmt. Im Kollektiv der älteren Studienteilnehmer betrug der Durchmesser  $4,1 \pm 0,1$  mm ( $p < 0,05$ ).

In der Population der älteren Probanden zeigte sich mit  $5,2 \pm 0,5$   $\Delta\%$  eine signifikante Reduktion der Endothel-abhängigen Vasodilatation gegenüber den jungen Probanden ( $7,1 \pm 0,6$   $\Delta\%$ ;  $p < 0,05$ ; Abb. 13 A).

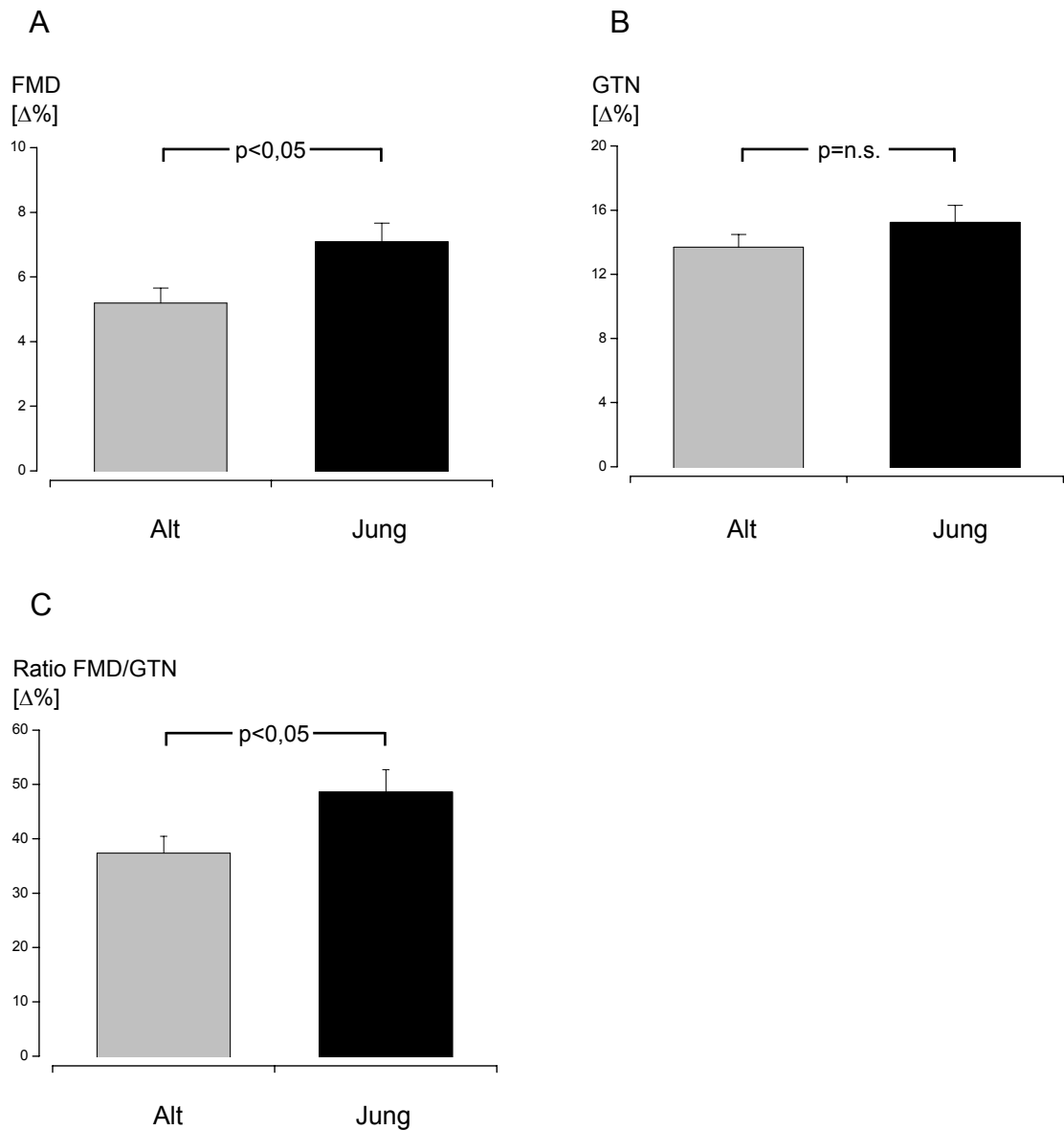
Die Endothel-unabhängige Dilatation der Arteria brachialis nach Gabe von GTN zeigte hingegen im fortgeschrittenen Alter keine signifikanten Unterschiede ( $15,2 \pm 1,1$   $\Delta\%$  vs.  $13,7 \pm 0,8$   $\Delta\%$ ;  $p = n.s.$ ; Abb. 13 B).

Das Verhältnis der Endothel-abhängigen Dilatation zu der Endothel-unabhängigen Dilatation der Arteria brachialis zeigte eine signifikante Reduktion in der Population der älteren Probanden ( $48,6 \pm 4,1$  % vs.  $37,4 \pm 3,1$  %;  $p < 0,05$ ; Abb. 13 C).

Der Blutvolumenfluss zeigte keine Unterschiede zwischen den jungen und den älteren Probanden: er betrug unter Ruhebedingungen  $133 \pm 20$  ml/min im Kollektiv der jungen Probanden und  $108 \pm 16$  ml/min in der Population der älteren Probanden ( $p = n.s.$ ). Während der reaktiven Hyperämie belief sich der Blutvolumenfluss bei den jungen Probanden auf  $637 \pm 40$  ml/min, bei den älteren Probanden auf  $708 \pm 66$  ml/min ( $p = n.s.$ ).

Es zeigten sich inverse univariate Korrelationen zwischen der FMD und dem Probandenalter ( $n=36$ ;  $r=-0,417$ ;  $p < 0,05$ ), dem Ruhedurchmesser ( $n=36$ ;  $r=-0,52$ ;  $p < 0,01$ ), dem Gesamtcholesterin ( $n=36$ ;  $r=-0,362$ ;  $p < 0,05$ ) sowie der Plasmaglukosekonzentration ( $n=36$ ;  $r=-0,36$ ;  $p < 0,05$ ). Es bestand eine Korrelation

zwischen der Endothel-abhängigen und der Endothel-unabhängigen Dilatation (n=35; r=0,394; p<0,05).



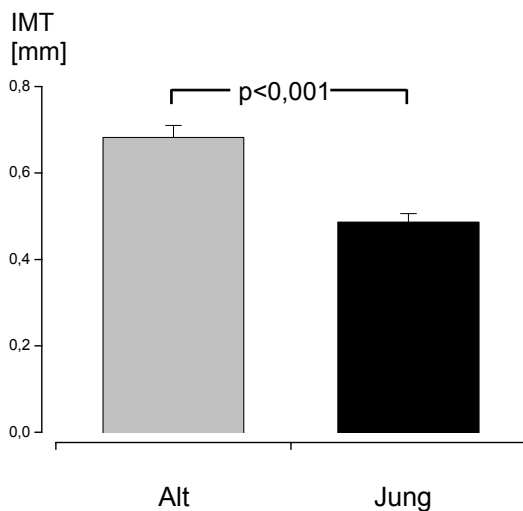
**Abbildung 13: Endothelfunktion**

Vergleich der Endothel-abhängigen (FMD; A) und der Endothel-unabhängigen Dilatation (GTN; B) der Arteria brachialis sowie der Ratio FMD/GTN (C) zwischen jungen und älteren Probanden. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der FMD und der Ratio FMD/GTN bei den älteren Probanden. Die Endothel-unabhängige Dilatation der Arteria brachialis war zwischen den beiden untersuchten Populationen vergleichbar.

### 3.5 Bestimmung der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis

Zur Erfassung früher morphologischer Gefäßwandveränderungen wurde die Intima-Media-Dicke der Arteria carotis bestimmt.

Die IMT der Arteria carotis communis betrug in der Gruppe der jungen Probanden im Durchschnitt  $0,49 \pm 0,02$  mm. Im Kollektiv der älteren Probanden war sie signifikant verbreitert ( $0,68 \pm 0,03$  mm;  $p < 0,001$ ; Abb. 14).



**Abbildung 14: Intima-Media-Dicke**

Vergleich der Intima-Media-Dicke (IMT) der Arteria carotis communis zwischen jungen und älteren Probanden. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der IMT im Kollektiv der älteren Probanden.

Es zeigten sich univariante Korrelationen zwischen der IMT und dem Alter ( $n=33$ ;  $r=0,768$ ;  $p < 0,001$ ), dem Gesamtcholesterin ( $n=33$ ;  $r=0,348$ ;  $p < 0,05$ ) und dem mittleren arteriellen Blutdruck ( $n=33$ ;  $r=0,42$ ;  $p < 0,05$ ).

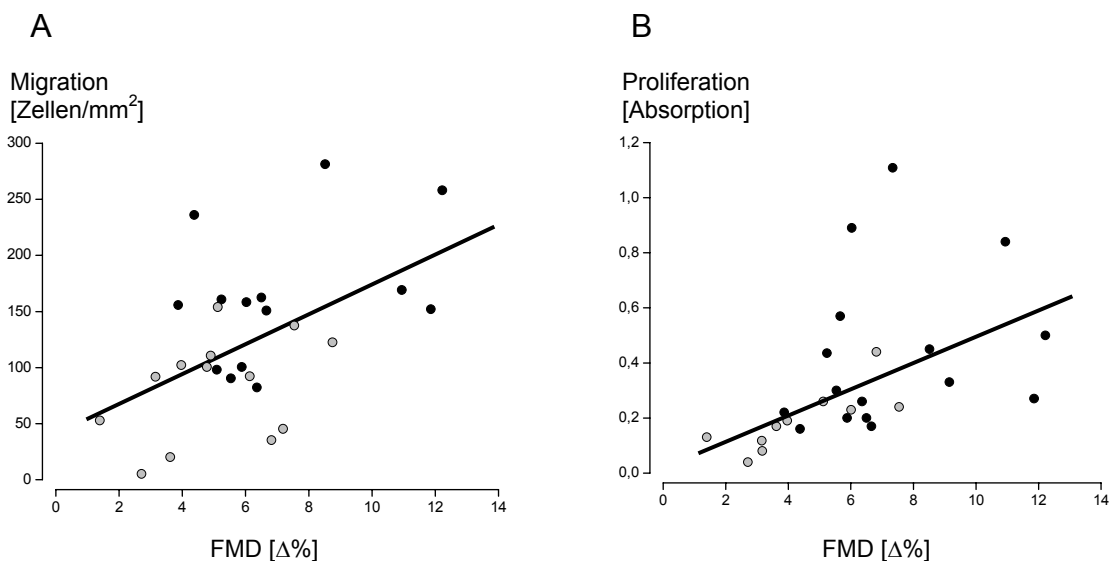
### 3.6 Korrelationen zwischen Endothelfunktion und endothelialen Progenitorzellen

Auf der Grundlage der von Hill et al. gezeigten Korrelation zwischen der FMD und der Anzahl der EPC<sup>59</sup> wurde geprüft, ob in der vorliegenden Untersuchung die Anzahl der EPC mit den gemessenen Parametern der Endothelfunktion korreliert.

Die Anzahl der KDR/CD34 positiven Zellen bzw. die Anzahl der KDR/CD133 positiven Zellen zeigte weder mit der FMD der Arteria brachialis noch mit der IMT der Arteria carotis eine signifikante Korrelation.

Da sowohl die Funktion der endothelialen Progenitorzellen als auch die Endothel-abhängige Dilatation der Arteria brachialis in fortgeschrittenem Alter eingeschränkt waren, wurden beide auf Korrelation überprüft. Dabei korrelierten sowohl die Migration (n=27; r=0,52; p<0,01; Abb. 15 A) als auch die Proliferation der EPC (n=26; r=0,49; p<0,05; Abb. 15 B) mit der FMD. Im Gegensatz hierzu bestand keine Korrelation mit dem EPC-Kultur-Assay (p=n.s.).

Es fanden sich keine Korrelationen zwischen der Migration, Proliferation bzw. dem EPC-Kultur-Assay und der Endothel-unabhängigen Dilatation.



**Abbildung 15: Korrelation zwischen der Endothelfunktion und der EPC-Funktion**

Korrelation zwischen der Endothel-abhängigen Dilatation (FMD) der Arteria brachialis und der EPC-Migration (A; r=0,52; p<0,01) bzw. der EPC-Proliferation (B; r=0,49; p<0,05) (schwarz: junge Probanden; grau: ältere Probanden)

Um zu prüfen, ob die Funktion der EPC einen wesentlichen Einflussfaktor der FMD darstellt, wurde eine multiple, lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Diese multivariate Analyse schloss als unabhängige Faktoren das Alter, das Geschlecht, das Gesamtcholesterin, die Plasmaglukose sowie die Überlebensfähigkeit, Migration und Proliferation der EPC ein. Nur die Migration

und die Proliferation erreichten das Signifikanzniveau (Tab. 2). Das korrigierte  $R^2$  betrug in diesem Modell 0,383, d.h. die Migration und die Proliferation erklärten 38,3 % der Gesamtvarianz der FMD.

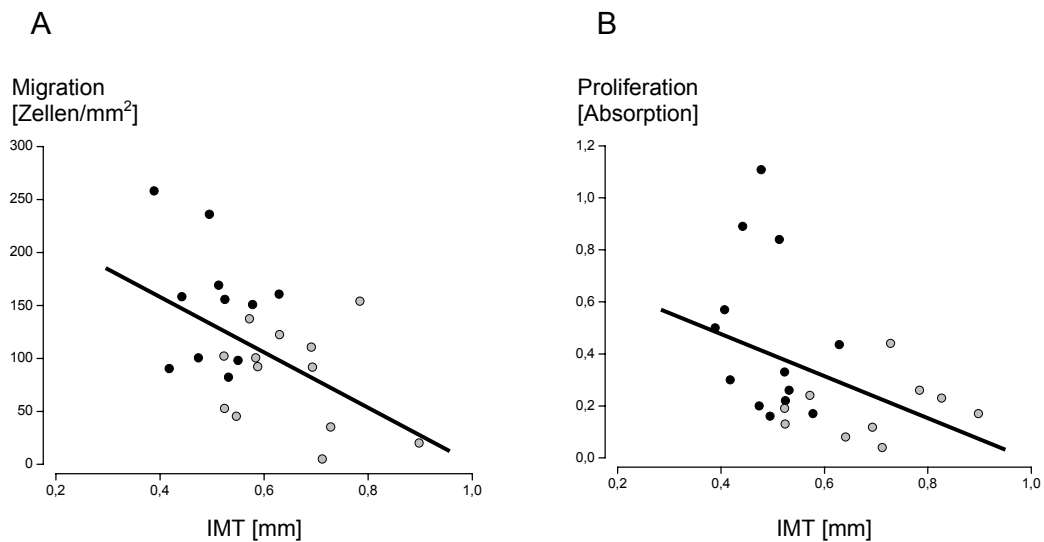
**Tabelle 2**

Multiple lineare Regressionsanalyse der FMD

Parameter	Standardisierter Koeffizient	P
Alter	0,054	0,770
Geschlecht	0,222	0,142
Gesamtcholesterin	-0,188	0,250
Plasmaglukose	-0,128	0,366
Arterieller Mitteldruck	-0,155	0,320
Überlebensfähigkeit der EPC	-0,067	0,652
Migration der EPC	0,442	<b>0,009</b>
Proliferation der EPC	0,321	<b>0,030</b>
Korrigiertes $R^2$	0,383	
Signifikanz (ANOVA)		0,002

Entsprechend der gezeigten Korrelation zwischen der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis und der EPC-Funktion wurde überprüft, ob auch die Intima-Media-Dicke der Arteria carotis eine Korrelation mit der EPC-Funktion zeigt. Hierbei zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Intima-Media-Dicke und der Migration (n=24; r=-0,501; p<0,05; Abb. 16 A) sowie der Proliferation (n=23; r=-0,413; p=0,05; Abb. 16 B) der EPC. Die Korrelation zwischen der Intima-Media-Dicke und dem EPC-Kultur-Assay erreichte keine statistische Signifikanz (n=26; r=-0,377; p=0,058).

In der multivariaten Analyse der IMT, die als unabhängige Parameter das Alter, das Geschlecht, das Gesamtcholesterin, die Plasmaglukose sowie die Überlebensfähigkeit, Migration und Proliferation der EPC einschloss, erreichte nur das Probandenalter das Signifikanzniveau (Tab. 3). Das korrigierte  $R^2$  betrug in diesem Modell 0,393, d.h. das Alter erklärte 39,3 % der Gesamtvarianz der IMT.



**Abbildung 16: Korrelation zwischen der IMT und der EPC-Funktion**

Korrelation zwischen der IMT der A. carotis und der EPC-Migration (A;  $r=-0,501$ ;  $p<0,05$ ) bzw. der EPC-Proliferation (B;  $r=-0,413$ ;  $p=0,05$ ) (schwarz: junge Probanden; grau: ältere Probanden)

**Tabelle 3**

Multiple lineare Regressionsanalyse der IMT

Parameter	Standardisierter Koeffizient	P
Alter	0,579	<b>0,003</b>
Geschlecht	-0,113	0,446
Gesamtcholesterin	-0,125	0,439
Plasmaglukose	-0,126	0,371
Arterieller Mitteldruck	0,237	0,129
Überlebensfähigkeit der EPC	-0,119	0,422
Migration der EPC	-0,087	0,581
Proliferation der EPC	-0,064	0,661
Korrigiertes R <sup>2</sup>	0,393	
Signifikanz (ANOVA)		0,002

## **4. Diskussion**

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (I) Im fortgeschrittenen Alter bestand eine funktionelle Beeinträchtigung der endothelialen Progenitorzellen. Im Gegensatz dazu waren keine wesentlichen quantitativen Veränderungen nachweisbar.
- (II) Die untersuchten Parameter der Endothelfunktion zeigten eine univariate Korrelation mit der migratorischen und proliferatorischen Kapazität der EPC.
- (III) Die Migration und die Proliferation der endothelialen Progenitorzellen stellten unabhängige Prädiktoren der FMD dar.

Im folgenden Abschnitt soll zunächst der Einfluss des Alters auf die endothelialen Progenitorzellen (4.1) und die Endothelfunktion (4.2) diskutiert werden. Anschließend soll auf die Korrelation zwischen der Endothelfunktion und der Funktion endothelialer Progenitorzellen (4.3) und die klinische Bedeutung eingegangen werden (4.4).

### **4.1 Einfluss des Alters auf endotheliale Progenitorzellen**

#### **4.1.1 Quantitative Unterschiede**

Die Anzahl der EPC wurde mit Hilfe der durchflusszytometrischen Bestimmung der Expression von KDR, CD34 und CD133 auf der Oberfläche der EPC unmittelbar nach der Isolierung der MNC ermittelt (2.3.4).

Eine Korrelation zwischen der Anzahl zirkulierender EPC und kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. einer bestehenden koronaren Herzkrankheit konnte bereits gezeigt werden<sup>27,59,139,140</sup>. Erhöhte Cholesterinspiegel im Serum<sup>27,59</sup>, arterielle Hypertension<sup>59</sup>, Diabetes mellitus<sup>59</sup>, Rauchen<sup>140</sup>, eine bestehende KHK<sup>104,140</sup> und eine positive Familienanamnese für eine KHK<sup>140</sup> waren mit einer reduzierten Anzahl der EPC assoziiert. Es konnte eine inverse Korrelation zwischen der EPC-Anzahl und dem Probandenalter<sup>140</sup>, dem Gesamtcholesterin<sup>27</sup>, dem LDL-



Cholesterin<sup>27,140</sup>, dem HbA<sub>1c</sub>-Wert<sup>83</sup> und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren<sup>140</sup> bzw. dem Framingham risk score<sup>59</sup> gezeigt werden.

Im Gegensatz zu einer Verminderung hämatopoetischer Stammzellen im Alter<sup>13</sup> konnte in der vorliegenden Arbeit keine reduzierte Anzahl der EPC im fortgeschrittenen Alter nachgewiesen werden (3.2). Der bei den älteren Probanden höhere prozentuale Anteil der EPC (ohne statistische Signifikanz) könnte vielmehr als Ausdruck einer vermehrten Bedarfsmobilisierung der EPC in das periphere Blut gewertet werden.

Das Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren wie eine arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Rauchen war in der vorliegenden Studie ausgeschlossen.

Da sowohl Männer als auch Frauen untersucht worden sind, sind geschlechtsspezifische Unterschiede zu beachten. Es ist bekannt, dass Östrogen die Anzahl der EPC im peripheren Blut erhöhen kann<sup>128</sup>. In der vorliegenden Untersuchung war jedoch die Anzahl der EPC sowohl zwischen jungen Frauen und Männern als auch zwischen den älteren Frauen und Männern vergleichbar. Der ermittelte prozentuale Anteil der EPC im Kollektiv der älteren Probanden liegt geringfügig über dem von Vasa et al. ermittelten Wert eines altersentsprechenden Kollektivs<sup>139</sup>.

#### **4.1.2 Qualitative Unterschiede**

Zur Evaluation der funktionellen Eigenschaften der EPC wurden die Überlebensfähigkeit, die Migration, die Proliferation und die Adhäsion der EPC geprüft (2.3.5-2.3.8), die wichtige Prozesse im Rahmen der Vaskulogenese darstellen (1.1.4, Abb. 1).

Eine Einschränkung der Funktion der EPC konnte bei Patienten mit einer KHK<sup>140</sup>, mit einem Diabetes mellitus<sup>134</sup> oder mit einer Hypercholesterinämie<sup>27</sup> nachgewiesen werden. Patienten mit einer angiographisch nachgewiesenen KHK

zeigten eine signifikant verminderte migratorische Kapazität im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden im gleichen Alter<sup>140</sup>. Außerdem war das Vorliegen einer arteriellen Hypertonie mit einer reduzierten Migration assoziiert. Es zeigte sich eine inverse Korrelation der Anzahl migrierter EPC mit dem Probandenalter und dem LDL-Cholesterin. Unter Einschluss potentieller Risikofaktoren wie ein Alter >40 Jahre, ein männliches Geschlecht, eine arterielle Hypertonie, ein Diabetes mellitus, ein Nikotinabusus, eine positive Familienanamnese für eine KHK, eine Hypercholesterinämie in eine multivariate Analyse war jedoch nur die arterielle Hypertonie mit einer signifikanten Reduktion der EPC-Migration assoziiert<sup>140</sup>. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zeigte sich im Vergleich zu Kontrollprobanden ohne Diabetes mellitus eine funktionelle Einschränkung der EPC in einer verminderten proliferatorischen Kapazität sowie in einer eingeschränkten Fähigkeit, an einer aus HUVEC bestehenden Zellschicht zu adhären<sup>134</sup>. Auch bei Vorliegen einer Hypercholesterinämie konnte eine eingeschränkte Funktion der EPC nachgewiesen werden<sup>27</sup>. EPC von Patienten mit einer Hypercholesterinämie zeigten im Vergleich zu Kontrollprobanden eine signifikant reduzierte proliferative und migratorische Kapazität sowie eine verminderte Adhäsion an Fibronektin-beschichteten Kulturplatten. Die drei genannten funktionellen Parameter zeigten eine inverse Korrelation mit dem Gesamtcholesterin und dem LDL-Cholesterin.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Ursachen für eine Funktionseinschränkung der EPC konnte gezeigt werden, dass die Anzahl und die Funktion der EPC durch HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine) verbessert werden können<sup>139</sup>. Aus diesem Grund wurde eine Einnahme von Statinen bei den Probanden der vorliegenden Studie ausgeschlossen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass fortgeschrittenes Alter als alleiniger kardiovaskulärer Risikofaktor mit einer Einschränkung der Funktion endothelialer Progenitorzellen einhergeht (3.3). Diese spiegelte sich in einer Beeinträchtigung der Überlebensfähigkeit sowie der migratorischen und proliferatorischen Kapazität der EPC älterer Probanden wider.

Im Gegensatz zu der gezeigten Einschränkung der Adhäsion endothelialer Progenitorzellen bei Diabetes mellitus<sup>134</sup> konnten zwischen der untersuchten Subpopulation junger und älterer Probanden keine Unterschiede in den geprüften Parametern der Adhäsion gefunden werden. Daraus kann abgeleitet werden, dass die adhäsiven Eigenschaften der EPC durch den Alterungsprozess nicht im gleichen Maße beeinflusst werden.

In Übereinstimmung mit der in der vorliegenden Arbeit gezeigten funktionellen Einschränkungen der EPC im Alter liegen tierexperimentelle und klinische Ergebnisse vor, die auf eine im Alter eingeschränkte Vaskulogenese hinweisen<sup>7,66,94,112</sup>. Nach Transplantation von Knochenmarkszellen älterer Mäuse zeigte sich im Vergleich zu jungen Tieren eine geringere Vaskularisierung der Kornea nach Implantation eines kornealen VEGF-Depots sowie einer Ischämie des Hinterlaufs<sup>112</sup>. Mit Hilfe des murinen Hinterlaufischämie-modells konnte auch eine Einschränkung des therapeutischen Potentials humaner EPC älterer Probanden belegt werden. Mäuse mit einer unilateralen Hinterlaufischämie zeigten nach Applikation endothelialer Progenitorzellen älterer Probanden vermehrt Nekrosen und Autoamputationen sowie einen verminderten Blutfluss in dem ischämischen Hinterlauf im Vergleich zur Applikation der gleichen Anzahl an EPC junger Probanden<sup>94</sup>. Zusätzlich konnte mit Hilfe eines murinen Allotransplantatmodells des Herzens der Maus eine funktionelle Beeinträchtigung alternder EPC in Form einer defizitären Induktion von PDGF-B (Platelet-derived Growth Factor-B) gezeigt werden<sup>39</sup>.

## **4.2 Einfluss des Alters auf die Endothelfunktion**

### **4.2.1 Fluss-vermittelte Dilatation der Arteria brachialis**

Die Erfassung der Fluss-vermittelten, Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis mit Hilfe des hochauflösenden Ultraschalls (2.4) stellt ein etabliertes, nicht-invasives Verfahren zur Diagnostik der endothelialen Dysfunktion dar<sup>20,21</sup>.

Celermajer et al. gelang erstmals der Nachweis einer reduzierten Fluss-vermittelten Dilatation der Arteria femoralis bzw. Arteria brachialis bei Kindern und Erwachsenen mit kardiovaskulären Risikofaktoren. Hier zeigte sich bei Kindern mit familiärer Hypercholesterinämie bereits im Alter von 8-16 Jahren eine deutlich verminderte FMD im Vergleich zu gesunden Kindern<sup>24</sup>. Eine Einschränkung der FMD wurde bei Anwesenheit verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren gefunden: Hypercholesterinämie<sup>21,97</sup>, arterielle Hypertonie<sup>21</sup>, Diabetes mellitus<sup>53</sup>, Rauchen<sup>21</sup>, männliches Geschlecht<sup>21,67</sup>, eine positive Familienanamnese<sup>30</sup> sowie fortgeschrittenes Alter<sup>22</sup> können zu einer Reduktion der FMD führen. Auf der Grundlage der von Anderson et al. gezeigten Korrelation zwischen der koronaren Endothelfunktion und der Fluss-vermittelten Dilatation der Arteria brachialis<sup>6</sup>, wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass die FMD einen unabhängigen Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse darstellt<sup>53,96</sup>.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in Übereinstimmung mit der Literatur<sup>21,22,67</sup> bei gesunden Probanden mit fortgeschrittenem Alter eine Einschränkung der FMD (3.4).

Das Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren wie der Hypercholesterinämie, der arteriellen Hypertonie, des Diabetes mellitus und des Nikotinabusus wurden anamnestisch und laborchemisch sowie durch die klinische Untersuchung ausgeschlossen. Statistisch zeigten sich inverse univariate Korrelationen der FMD mit der Plasmaglukose und dem Gesamtcholesterin. Diese beiden Parameter erreichten in der durchgeführten multivariaten Analyse der FMD jedoch nicht das Signifikanzniveau, so dass sie in der vorliegenden Untersuchung keine wesentlichen Einflussfaktoren darstellen. Dem Einflussfaktor männliches Geschlecht wurde Rechnung getragen, indem eine inhomogene Geschlechterverteilung in der Studienpopulation ausgeschlossen wurde. Die Gruppe der jungen Probanden setzt sich aus 10 Männern und 10 Frauen zusammen, in der Gruppe der älteren Probanden überwogen die Frauen (13 Frauen, 7 Männer).

Neben den genannten kardiovaskulären Risikofaktoren sind weitere Parameter bekannt, die die Höhe der FMD beeinflussen können. Es besteht eine negative

Korrelation zwischen dem Ruhedurchmesser der Arteria brachialis und der FMD<sup>24</sup>. Es sind tageszeitliche Schwankungen der FMD mit einem Maximum am Nachmittag<sup>41</sup> sowie eine Reduktion nach Nahrungsaufnahme<sup>74,141</sup> und bei psychischem Stress<sup>51</sup> bekannt. Die FMD variiert in Abhängigkeit von der Konzentration der weiblichen Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron im Menstruationszyklus<sup>56</sup>.

Um den Einfluss der genannten Faktoren möglichst gering bzw. konstant zu halten, wurden die Probanden immer morgens zwischen 8.00 und 9.00 Uhr nüchtern untersucht. Außerdem erfolgten alle Untersuchungen in einem vollklimatisierten, ruhigen Raum in entspannter Körperhaltung nach einer mindestens 10-minütigen Ruhephase. Es ist jedoch kritisch anzumerken, dass keine Zyklusanamnese erhoben wurde. Doch sowohl in Bezug auf die Endothel-abhängige als auch Endothel-unabhängige Vasodilatation zeigten die Frauen vergleichbare Werte mit dem Männern ihrer Altersgruppe. Daneben zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied in der FMD zwischen jungen und älteren Probanden, wenn nur männliche Probanden berücksichtigt wurden.

Vor dem Hintergrund, dass die Fluss-vermittelte Dilatation im Wesentlichen durch NO vermittelt wird<sup>68,93</sup>, ist eine verminderte FMD im fortgeschrittenen Alter durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit im Alter zu diskutieren. Grundsätzlich können einer verminderten Bioverfügbarkeit Veränderungen (I) des Substrats der eNOS, (II) der eNOS-Expression oder -Aktivität sowie (III) ein vermehrter Abbau des NO beitragen. Tierexperimentell wurden sowohl verminderte<sup>135,138</sup> als auch erhöhte NO-Konzentrationen<sup>25</sup> bei älteren im Vergleich zu jungen Tieren nachgewiesen. (I) Alternde Ratten wiesen reduzierte L-Arginin-Spiegel im Serum auf<sup>109</sup>. Neben einem Substratmangel kann auch der endogene Inhibitor der NO-Synthase, das asymmetrische Dimethylarginin, dessen Plasmakonzentration eine signifikante Korrelation mit dem Alter zeigt<sup>89</sup>, zu der verminderten NO-Bioverfügbarkeit im Alter beitragen. (II) Anhand der Untersuchung der Aorta älterer Ratten wurde eine signifikant verminderte Expression<sup>26</sup> sowie eine geringere Aktivität der eNOS<sup>28</sup> gefunden. Cernadas et al. fanden bei einer im Alter reduzierten Endothel-abhängigen Vasodilatation, die auf einer reduzierten eNOS-Aktivität beruhte, eine gesteigerte eNOS-Expression und erhöhte NO-

Plasmaspiegel. Diese paradoxe Situation wurde durch den Nachweis der induzierbaren NO-Synthase in der Aorta älterer Ratten geklärt. Auf der Grundlage dieses Ergebnisses wurde vermutet, dass das von der induzierbaren NO-Synthase produzierte NO die Aktivität der eNOS verringert<sup>25</sup>. (III) Einen wichtigen Gesichtspunkt stellt die Reduktion des bioverfügbaren NO durch oxidativen Stress dar. Taddei et al. konnten zeigen, dass bei älteren Probanden (> 60 Jahre) der Acetylcholin-induzierte Unterarmblutfluss durch intraarterielle Gabe von Vitamin C erheblich gesteigert werden konnte, während dieser Effekt bei jüngeren Probanden geringer ausgeprägt war<sup>131</sup>. Das Ergebnis dieser Untersuchung deutet auf vermehrten oxidativen Stress im Alter hin. Entsprechend konnten van der Loo et al. eine im Alter vermehrte Produktion von Superoxid-Anionen nachweisen<sup>138</sup>. Trotz erhöhter eNOS-Expression und eNOS-Aktivität wiesen ältere Ratten eine geringere NO-Konzentration an der endothelialen Oberfläche der Aorta sowie eine reduzierte Endothel-abhängige Vasodilatation auf. Als Ursache konnte eine vermehrte endotheliale Produktion von Superoxid-Anionen gefunden werden. Die Superoxid-Anionen reagieren in äquimolaren Mengen mit NO zu Peroxynitrit und führen so zu einer Reduktion des bioverfügbaren NO<sup>138</sup>.

Neben der reduzierten NO-Bioverfügbarkeit kommt auch eine verminderte Wirkung des NO an den glatten Muskelzellen als Ursache für die beobachtete Einschränkung der FMD im Alter in Betracht. Aus diesem Grund wurde neben der FMD auch die Endothel-unabhängige Dilatation der Arteria brachialis nach oraler Gabe von Glyzeroltrinitrat untersucht. Die vasodilatatorische Antwort nach der Gabe von GTN unterschied sich zwischen den beiden untersuchten Kollektiven nicht (3.4). Das Verhältnis zwischen der Endothel-abhängigen und der Endothel-unabhängigen Vasodilatation war im Kollektiv der älteren Probanden jedoch signifikant geringer als im Kollektiv der jungen Probanden (3.4). Dies deutet in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen<sup>21,22</sup> darauf hin, dass bei den älteren Probanden eine selektive Einschränkung der Endothelfunktion bei erhaltener Relaxation der glatten Muskelzellen nach Applikation exogener NO-Donatoren vorliegt.

#### 4.2.2 Intima-Media-Dicke der Arteria carotis

Als Marker früher struktureller Gefäßwandveränderungen im Rahmen einer Arteriosklerose ist die Dicke der IMT mit der Entwicklung arteriosklerotischer Plaques<sup>156</sup> und dem Auftreten zerebrovaskulärer sowie kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert<sup>17,60,98</sup>.

Unter physiologischen Bedingungen zeigt die IMT alters-<sup>61,62,99</sup> und geschlechtsspezifische<sup>61,99</sup> Unterschiede. Bei Probanden mit einem geringen arteriosklerotischen Risikoprofil wird ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen dem Probandenalter und der IMT angenommen. Die mittlere Zunahme der IMT wird mit 0,005-0,01mm/Jahr<sup>61,62,119</sup> angegeben. Neben dem Alter und dem männlichen Geschlecht<sup>61,99</sup> sind zahlreiche pathologische Einflussfaktoren, die zu einer Zunahme der IMT führen können, bekannt. Dazu zählen Hypercholesterinämie<sup>17,99</sup>, arterielle Hypertonie<sup>17,99</sup>, Diabetes mellitus<sup>17,99</sup>, Rauchen<sup>99</sup>, erhöhter BMI<sup>17</sup>, eine bestehende koronare Herzkrankheit<sup>95</sup> sowie ein Myokardinfarkt oder ein Schlaganfall in der Vorgeschichte<sup>17</sup>.

Parallel zu der Beeinträchtigung der Fluss-vermittelten Dilatation der Arteria brachialis konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant breitere Intima-Media-Dicke der Arteria carotis im Kollektiv der älteren Probanden in Vergleich zu jungen Probanden nachgewiesen werden (3.5).

Wie bereits oben diskutiert (4.2.1) waren eine arterielle Hypertonie, eine Hypercholesterinämie, ein Diabetes mellitus und Rauchen ausgeschlossen. Es zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. In der univariaten Analyse zeigten sich Korrelationen zwischen der IMT und dem Gesamtcholesterin sowie dem arteriellen Mitteldruck, die in der multivariaten Analyse der IMT allerdings keine Signifikanz zeigten.

### **4.3 Korrelation zwischen der Endothelfunktion und der Funktion endothelialer Progenitorzellen**

Vor dem Hintergrund, dass EPC am Erhalt bzw. der Regeneration des Endothels beteiligt sind<sup>10,87,147</sup>, wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Endothelfunktion und der Funktion der EPC besteht. Die FMD zeigte neben inversen univariaten Korrelationen mit dem Alter, dem Gesamtcholesterin und der Plasmaglukose eine signifikante Korrelation mit der Migration und mit der Proliferation der EPC (3.4, 3.6). Entsprechend zeigte die IMT neben einer Korrelation mit dem Alter, dem Gesamtcholesterin und dem mittleren arteriellen Blutdruck eine inverse Korrelation mit der Migration und Proliferation der EPC (3.5-3.6). In der multiplen linearen Regressionsanalyse der FMD stellten nur die Migration und die Proliferation der EPC wesentliche Einflussfaktoren der FMD dar, wobei sie 38,3% der Gesamtvarianz der FMD erklärten. In der multivariaten Analyse der IMT dagegen erreichte nur das Probandenalter das Signifikanzniveau. Das Probandenalter erklärte in dieser Studie 39,3% der Gesamtvarianz der IMT.

Während für die IMT das Alter den entscheidenden Einflussfaktor darstellt, können die Migration und Proliferation der EPC als unabhängige Prädiktoren der FMD angesehen werden.

Eine Assoziation zwischen EPC und der FMD konnte erstmals von Hill et al. dargestellt werden<sup>59</sup>. In dieser Studie zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der EPC und der FMD der Arteria brachialis, die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gefunden wurde<sup>59</sup>.

Erste Hinweise für die Bedeutung der EPC in der Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen konnten durch tierexperimentelle Untersuchungen geliefert werden. Im Knochenmark älterer Apo<sup>-/-</sup> Mäuse mit einer beschleunigten Arteriosklerose zeigte sich eine verminderte Anzahl vaskulärer Progenitorzellen<sup>108</sup>. Nach Administration aus dem Knochenmark gewonnener Progenitorzellen junger Mäuse ohne Arteriosklerose wiesen die Empfängermäuse eine deutlich geringere arteriosklerotische Belastung der Aorta auf als nach Administration der Progenitorzellen alter Mäuse mit schwerer Arteriosklerose<sup>108</sup>. Xu et al. konnten als



Ursache einer vermehrten Arteriosklerose bei Apo<sup>-/-</sup> Mäusen eine verminderte endotheliale Regeneration durch endotheliale Progenitorzellen nachweisen. Die verminderte endotheliale Regeneration beruhte auf einer verminderten Anzahl endothelialer Vorläuferzellen im peripheren Blut sowie auf einer erhöhten Empfindlichkeit der Zellen gegenüber apoptotischen Reizen<sup>149</sup>.

#### **4.4 Klinische Bedeutung und Ausblick**

Die Bedeutung endothelialer Progenitorzellen für die Regeneration des Endothels konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden<sup>10,147</sup>. Der therapeutische Einsatz von EPC wurde zunächst in tierexperimentellen Untersuchungen geprüft. Nachdem durch die Transplantation von EPC bei Vorliegen einer Gewebeischämie positive Resultate erzielt werden konnten<sup>70,73,78</sup>, wurden erste klinische Studien initiiert<sup>12,84,125</sup>.

Stamm et al. prüften die Durchführbarkeit und Sicherheit der autologen Transplantation knochenmarkständiger Stammzellen zur Regeneration ischämischen Herzmuskelgewebes. Sechs Patienten, die einen Myokardinfarkt erlitten hatten, wurden unmittelbar im Anschluss an eine koronare Bypassoperation aus dem Knochenmark gewonnene AC133-positive Stammzellen intramyokardial injiziert. Nach zwei Wochen zeigte sich eine deutliche Verbesserung der linksventrikulären Auswurfraction und der diastolischen linksventrikulären Funktion. Durch eine SPECT-Untersuchung konnte eine erhöhte Perfusion des vorher nicht perfundierten bzw. minderperfundierten Infarktgebietes nachgewiesen werden<sup>125</sup>.

In der TOPCARE-AMI Studie wurde der therapeutische Einsatz von im Blut zirkulierenden Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt untersucht. Vier Monate nach der intrakoronaren Gabe der Progenitorzellen zeigten sich angiographisch und echokardiographisch eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und eine gesteigerte Wandbewegung im Bereich des Infarktgebietes<sup>12</sup>. Interessanterweise ergaben weitere Auswertungen dieser Pilotstudie, dass die migratorische Kapazität der transplantierten EPC einen

wesentlichen Einflussfaktor auf das Remodeling des Infarktgebiets darstellte<sup>18</sup>. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ein erfolgreicher Einsatz der EPC für die Geweberegeneration von der funktionellen Kapazität der Progenitorzellen abhängt. Daher gewinnt die Beeinflussung der altersbedingten Funktionseinschränkung der EPC, die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, eine wichtige Bedeutung. Um einen erfolgreichen therapeutischen Einsatz der EPC bei Patienten in fortgeschrittenem Alter zu erreichen, sollte vor einer Zelltransplantation die Funktion der EPC verbessert werden. Vorstellbar ist z.B. eine medikamentöse Beeinflussung durch Statine. In verschiedenen Studien ist nachgewiesen worden, dass Statine die EPC-Funktion verbessern können<sup>82,137,139</sup>. In vitro erhöhten Statine bereits in niedriger Konzentration die migratorische und proliferatorische Kapazität der EPC<sup>82,137</sup> und reduzierten die Anzahl apoptotischer Zellen<sup>82</sup>. In einer klinischen Studie konnte nach dreiwöchiger Gabe von Atorvastatin neben einer Erhöhung der Anzahl zirkulierender EPC eine Verbesserung der EPC-Funktion nachgewiesen werden<sup>139</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung der Statine auf die EPC-Funktion durch die Aktivierung der Serin/Threonin Kinase Akt vermittelt wird, die wiederum zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der eNOS führt<sup>37,45</sup>. Die Bedeutung dieses Stoffwechselweges für die EPC-Funktion konnte dadurch belegt werden, dass die Statin-induzierte Funktionsverbesserung durch Inhibition der NO-Synthese verhindert wurde<sup>137</sup>.

Eine weitere mögliche Strategie, die Funktion der EPC vor einer Zelltransplantation zu verbessern, könnte eine zusätzliche Gentherapie darstellen<sup>65,66,84</sup>. Iwaguro et al. konnten zeigen, dass humane EPC nach einem ex vivo VEGF-Gentransfer eine signifikante Funktionsverbesserung im Vergleich zu nicht modifizierten EPCs zeigten<sup>65</sup>. Dies wurde anhand einer erhöhten proliferativen Aktivität und einer gesteigerten Adhäsion quantifiziert. Im Hinterlaufischämiemodell der Maus konnte zusätzlich eine vermehrte Inkorporation der transplantierten genmodifizierten EPC in das Gefäßnetz des ischämischen Hinterlaufs demonstriert werden. Inwieweit diese Strategie bei Menschen einsetzbar ist, muss jedoch noch in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

Ein zweiter Aspekt der in der vorliegenden Untersuchung gezeigten altersbedingten Funktionseinschränkung der EPC stellt eine mögliche Beteiligung der EPC in der Atherogenese dar. Es ist vorstellbar, dass ein progredienter Funktionsverlust der EPC über eine nicht ausreichende Endothelregeneration zur Entwicklung der Arteriosklerose beitragen kann. Diese Vorstellung wird unterstrichen durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Hier konnten die Migration und die Proliferation der EPC als unabhängige Prädiktoren der FMD erarbeitet werden. Der Einfluss dieser funktionellen Parameter der EPC auf die FMD, als Parameter der Endothelfunktion, war deutlich stärker als der Einfluss des Alters oder weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren. Vor dem Hintergrund, dass auch Patienten mit einer bestehenden KHK eine Einschränkung der Funktion der EPC zeigen<sup>140</sup>, sollten in weiteren Untersuchungen die pathophysiologischen Mechanismen der Beteiligung der EPC an der Atherogenese erarbeitet werden<sup>36</sup>.

Ein mögliches Bindeglied zwischen der altersbedingten eingeschränkten EPC-Funktion und der beeinträchtigten Endothelfunktion könnte das endotheliale NO darstellen. Es ist bekannt, dass die im Alter reduzierte Endothel-abhängige Vasodilatation mit einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit einhergeht (4.2.1). Daher scheint es interessant, die Bedeutung von NO für die Anzahl und die Funktion der EPC zu klären, insbesondere nach der von Aicher et al. sowie Laufs et al. gezeigten eingeschränkten Mobilisation von EPC in eNOS-Knockout-Mäusen<sup>5,80</sup>.

## 5. Zusammenfassung

Das Alter stellt einen wesentlichen Einflussfaktor für die Entstehung und das Fortschreiten der Arteriosklerose dar. Vor dem Hintergrund, dass eine funktionelle Störung des Gefäßendothels durch schädigende Einflüsse eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Arteriosklerose spielt, konnte im fortgeschrittenen Alter bereits eine Einschränkung der Endothelfunktion mit Hilfe etablierter diagnostischer Verfahren detektiert werden.

Es ist denkbar, dass eine Ursache der im fortgeschrittenen Alter zunehmenden endothelialen Dysfunktion eine nicht ausreichende Regeneration des Endothels, an der u.a. aus dem Knochenmark stammende EPC (Endotheliale Progenitorzellen) beteiligt sind, darstellt. Vor diesem Hintergrund ergab sich die Hypothese, dass eine Reduktion der Anzahl und/oder Funktion endothelialer Progenitorzellen im Alter zu einer endothelialen Dysfunktion beitragen kann. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden zum einen Anzahl und Funktion der EPC im peripheren Blut bestimmt, zum anderen die FMD (Fluss-vermittelte Dilatation) der Arteria brachialis und die IMT (Intima-Media Dicke) der Arteria carotis als Parameter der Endothelfunktion bei jungen Probanden und Probanden fortgeschrittenen Alters untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (I) Endotheliale Progenitorzellen zeigten eine funktionelle Beeinträchtigung im Alter.
- (II) Die Funktion endothelialer Progenitorzellen zeigt eine signifikante Korrelation mit den Parametern der Endothelfunktion.
- (III) Die Migration und die Proliferation der endothelialen Progenitorzellen stellen unabhängige Prädiktoren der FMD dar.

Hieraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass eine im Alter reduzierte Funktion endothelialer Progenitorzellen zu einer endothelialen Dysfunktion beitragen kann. In weiteren Untersuchungen ist zu prüfen, ob eine Dysfunktion der EPC einen möglichen pathophysiologischen Mechanismus in der Entwicklung der Arteriosklerose darstellt. Bei einem therapeutischen Einsatz endothelialer Progenitorzellen ist die im Alter beeinträchtigte EPC-Funktion als möglicher, den Therapieerfolg beeinflussender Faktor zu beachten.

## 6. Literaturverzeichnis

1. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med.* 1997;157:2413-2446.
2. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2000;23 Suppl 1:S4-19.
3. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285:2486-2497.
4. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension.* 2005;45:321-325.
5. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;11:1370-1376.
6. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26:1235-1241.
7. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C572-579.
8. Asahara T, Kalka C, Isner JM. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther.* 2000;7:451-457.
9. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-967.
10. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-228.
11. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999;18:3964-3972.
12. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002;106:3009-3017.
13. Bagnara GP, Bonsi L, Strippoli P, et al. Hemopoiesis in healthy old people and centenarians: well-maintained responsiveness of CD34+ cells to hemopoietic growth factors and remodeling of cytokine network. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2000;55:B61-66; discussion B67-70.

14. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004;103:921-926.
15. Baldassarre D, Tremoli E, Amato M, et al. Reproducibility validation study comparing analog and digital imaging technologies for the measurement of intima-media thickness. *Stroke*. 2000;31:1104-1110.
16. Balletshofer BM, Rittig K, Stock J, et al. [Indicators of incipient atherosclerosis: demonstration of endothelial dysfunction with high-resolution ultrasound]. *Ultraschall Med*. 2003;24:153-161.
17. Bots ML, Hoes AW, Koudstaal PJ, et al. Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation*. 1997;96:1432-1437.
18. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, et al. Infarct Remodeling After Intracoronary Progenitor Cell Treatment in Patients With Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). Mechanistic Insights From Serial Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Circulation*. 2003;107:2212-2218.
19. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000;6:389-395.
20. Celermajer DS. Testing endothelial function using ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32 Suppl 3:S29-32.
21. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, et al. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:1468-1474.
22. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, et al. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:471-476.
23. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88:2149-2155.
24. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340:1111-1115.
25. Cernadas MR, Sanchez de Miguel L, Garcia-Duran M, et al. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res*. 1998;83:279-286.
26. Challah M, Nadaud S, Philippe M, et al. Circulating and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats. *Am J Physiol*. 1997;273:H1941-1948.

27. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, et al. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)*. 2004;107:273-280.
28. Chou TC, Yen MH, Li CY, et al. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*. 1998;31:643-648.
29. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91:3527.
30. Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, et al. Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease. *Circulation*. 1997;96:3378-3383.
31. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol*. 1995;268:H1397-1404.
32. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:257-265.
33. Corson MA, James NL, Latta SE, et al. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res*. 1996;79:984-991.
34. Crosby JR, Kaminski WE, Schattman G, et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res*. 2000;87:728-730.
35. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109:III27-32.
36. Dimmeler S, Zeiher AM. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J Mol Med*. 2004;82:671-677.
37. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399:601-605.
38. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001;108:391-397.
39. Edelberg JM, Tang L, Hattori K, et al. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res*. 2002;90:E89-93.

40. Egashira K, Inou T, Hirooka Y, et al. Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation*. 1993;88:77-81.
41. Etsuda H, Takase B, Uehata A, et al. Morning attenuation of endothelium-dependent, flow-mediated dilation in healthy young men: possible connection to morning peak of cardiac events? *Clin Cardiol*. 1999;22:417-421.
42. Falk W, Goodwin RH, Leonard EJ. A 48 well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Methods*. 1980;33:239-247.
43. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9:669-676.
44. Fina J, Molgard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 1990;75:2417-2426.
45. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase akt. *Nature*. 1999;399:597-601.
46. Fuster V, Badimon L, Badimon J, et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndrome (2). *N Engl J Med*. 1992;326:310-318.
47. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*. 1992;326:242-250.
48. Gamble G, Beaumont B, Smith H, et al. B-mode ultrasound images of the carotid artery wall: correlation of ultrasound with histological measurements. *Atherosclerosis*. 1993;102:163-173.
49. Gennaro G, Menard C, Michaud SE, et al. Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor. *Circulation*. 2003;107:230-233.
50. Gerhard M, Roddy M-A, Creager SJ, et al. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension*. 1996;27:849-853.
51. Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, et al. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 2000;102:2473-2478.
52. Gill M, Dias S, Hattori K, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88:167-174.
53. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, et al. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation*. 2002;105:1567-1572.



54. Grant MB, May WS, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. 2002;8:607-612.
55. Grobbee DE, Bots ML. Carotid artery intima-media thickness as an indicator of generalized atherosclerosis. *J Intern Med*. 1994;236:567-573.
56. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, et al. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation*. 1995;92:3431-3435.
57. Hattori K, Dias S, Heissig B, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001;193:1005-1014.
58. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003;102:1340-1346.
59. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600.
60. Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, et al. The role of carotid arterial intima-media thickness in predicting clinical coronary events. *Ann Intern Med*. 1998;128:262-269.
61. Homma S, Hirose N, Ishida H, et al. Carotid plaque and intima-media thickness assessed by B-mode ultrasonography in subjects ranging from young adults to centenarians. *Stroke*. 2001;32:830-835.
62. Howard G, Sharrett AR, Heiss G, et al. Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. ARIC Investigators. *Stroke*. 1993;24:1297-1304.
63. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. 2004;8:498-508.
64. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial Progenitor Cells. Mobilization, Differentiation, and Homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;24:24.
65. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*. 2002;105:732-738.
66. Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med*. 2004;8:488-497.
67. Jensen-Urstad K, Rosfors S. A methodological study of arterial wall function using ultrasound technique. *Clin Physiol*. 1997;17:557-567.

68. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-1319.
69. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*. 2000;70:829-834.
70. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2000;97:3422-3427.
71. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*. 2000;86:1198-1202.
72. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, et al. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1961;55:33-50.
73. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103:634-637.
74. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:146-154.
75. Kelm M. Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H1-5.
76. Kelm M, Strauer BE. [Endothelial dysfunction. Therapeutic and prognostic issues]. *Internist (Berl)*. 1999;40:1300-1307.
77. Kiechl S, Willeit J. The natural course of atherosclerosis. Part I: incidence and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1484-1490.
78. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7:430-436.
79. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, et al. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87:1-13.
80. Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004;109:220-226.
81. Leeson P, Thorne S, Donald A, et al. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart*. 1997;78:22-27.

82. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone-marrow derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2001;108:399-405.
83. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:195-199.
84. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*. 2004;109:2692-2697.
85. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-1051.
86. Lutun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:88-96.
87. Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res*. 2003;58:390-398.
88. Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnurch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest *Flk-1* as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993;72:835-846.
89. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99:1141-1146.
90. Moldovan NI, Asahara T. Role of blood mononuclear cells in recanalization and vascularization of thrombi: past, present, and future. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:265-269.
91. Moore MA, Hattori K, Heissig B, et al. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;938:36-45; discussion 45-37.
92. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
93. Mullen MJ, Kharbanda RK, Cross J, et al. Heterogenous nature of flow-mediated dilatation in human conduit arteries in vivo: relevance to endothelial dysfunction in hypercholesterolemia. *Circ Res*. 2001;88:145-151.
94. Murayama T, Kalka C, Silver M, et al. Aging impairs therapeutic contribution of human endothelial progenitor cells to postnatal neovascularization. *Circulation*. 2001;104:1168.

95. Nagai Y, Metter EJ, Earley CJ, et al. Increased carotid artery intimal-medial thickness in asymptomatic older subjects with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation*. 1998;98:1504-1509.
96. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, et al. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol*. 2000;86:207-210.
97. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, et al. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1997;129:111-118.
98. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*. 1999;340:14-22.
99. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, et al. Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group. *Stroke*. 1992;23:1752-1760.
100. Park S, Tepper OM, Galiano RD, et al. Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plast Reconstr Surg*. 2004;113:284-293.
101. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952-958.
102. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, et al. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*. 2002;100:3203-3208.
103. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, et al. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation*. 1986;74:1399-1406.
104. Powell TM, Paul JD, Hill JM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:296-301.
105. Preik M, Lauer T, Heiss C, et al. Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function. *Ultraschall Med*. 2000;21:195-198.
106. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276:71-74.
107. Psaty BM, Furberg CD, Kuller LH, et al. Traditional risk factors and subclinical disease measures as predictors of first myocardial infarction in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med*. 1999;159:1339-1347.

108. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, et al. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*. 2003;108:457-463.
109. Reckelhoff JF, Kellum JA, Blanchard EJ, et al. Changes in nitric oxide precursor, L-arginine, and metabolites, nitrate and nitrite, with aging. *Life Sci*. 1994;55:1895-1902.
110. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-674.
111. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73-91.
112. Rivard A, Asahara T, Takahashi T, et al. Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (vasculogenesis) is impaired with aging. *Circulation*. 1998;98:1-39.
113. Rivard A, Fabre J-E, Silver M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999;99:111-120.
114. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*. 1986;314:488-500.
115. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
116. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, et al. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*. 2003;101:168-172.
117. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899-1906.
118. Schatteman GC, Awad O. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004;276:13-21.
119. Schmidt-Trucksass A, Grathwohl D, Schmid A, et al. Structural, functional, and hemodynamic changes of the common carotid artery with age in male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1091-1097.
120. Shi Q, Rafii S, Wu MH-D, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92:362-367.
121. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:2776-2779.
122. Simons LA, McCallum J, Friedlander Y, et al. Risk factors for ischemic stroke: Dubbo Study of the elderly. *Stroke*. 1998;29:1341-1346.

123. Slater TF, Sawyer B, Straeuli U. Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. III. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta*. 1963;77:383-393.
124. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*. 1995;74:247-253.
125. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003;361:45-46.
126. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994;89:2462-2478.
127. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355-1374.
128. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, et al. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003;107:3059-3065.
129. Strong JP, Restrepo C, Guzman M. Coronary and aortic atherosclerosis in New Orleans. II. Comparison of lesions by age, sex, and race. *Lab Invest*. 1978;39:364-369.
130. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, et al. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000;101:948-954.
131. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension*. 2001;38:274-279.
132. Taddei S, Virdis A, Mattei P, et al. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation*. 1995;91:1981-1987.
133. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-438.
134. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002;106:2781-2786.
135. Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, et al. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest*. 1996;98:899-905.

136. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-353.
137. Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM, et al. Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res*. 2002;90:737-744.
138. van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000;192:1731-1744.
139. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*. 2001;103:2885-2890.
140. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001;89:E1-7.
141. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol*. 1997;79:350-354.
142. Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz*. 2002;27:579-588.
143. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, et al. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002;105:3017-3024.
144. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287:1442-1446.
145. Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M, et al. Ultrasound measurement of wall thickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol*. 1991;11:565-577.
146. Werner N, Priller J, Laufs U, et al. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1567-1572.
147. Werner N, Junk S, Laufs U, et al. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*. 2003;93:e17-24.
148. Wilson PW, Castelli WP, Kannel WB. Coronary risk prediction in adults (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol*. 1987;59:91G-94G.
149. Xu Q, Zhang Z, Davison F, et al. Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in ApoE-deficient mice. *Circ Res*. 2003;93:e76-86.

150. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*. 2003;107:1322-1328.
151. Yasue H, Matsuyama K, Okumura K, et al. Responses of angiographically normal human coronary arteries to intracoronary injection of acetylcholine by age and segment. Possible role of early coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1990;81:482-490.
152. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90:5002-5012.
153. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, et al. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest*. 1993;92:652-662.
154. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res*. 2002;90:284-288.
155. Ziegler BL, Valtieri G, Porada A, et al. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science*. 1999;285:1553-1558.
156. Zureik M, Ducimetiere P, Touboul PJ, et al. Common carotid intima-media thickness predicts occurrence of carotid atherosclerotic plaques: longitudinal results from the Aging Vascular Study (EVA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1622-1629.



## **7. Veröffentlichungen**

1. Keymel S, Heiss C, Kalka C, Kelm M. Effect of age on endothelial progenitor cells and vascular function. 1<sup>st</sup> Joint French-German NO Meeting 2003; Abstract
2. Kalka C, Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Strauer BE, Kelm M. Die Endotheliale Dysfunktion im Alter korreliert mit funktionellen Veränderungen von endothelialen Progenitorzellen. Zeitschrift für Kardiologie. 2004; 93 Suppl 3: 241
3. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. Journal of the American College of Cardiology. 2005; 45: 1441-8

## **8. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe das wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen.

Herrn PD Dr. med. A.-A. Weber (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie) danke ich für die Bereitstellung des FACS-Geräts und die bereitwillige Beantwortung meiner zahlreichen Fragen.

Herrn Dr. med. C. Kalka danke ich für seine Betreuung meiner Doktorarbeit, für seine fachlichen Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente sowie seine Hilfe bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. med. C. Heiß, Frau Dr. rer. nat. P. Kleinbongard, Herrn Dr. med. T. Lauer, Frau BTA S. Matern, Frau Dipl. Biol. U. Niesler und Herrn Dr. med. B. Özüyaman danke ich herzlich für ihre zahlreichen Anregungen und Tipps sowie ihre Hilfe und konstruktive Kritik bei der Durchführung und der Verfassung meiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau BTA J. Ziemann, die über ihre tatkräftige Hilfe bei den experimentellen Arbeiten hinaus mir jederzeit mit Rat und Tat zu Seite stand.

Den größten Dank bin ich meiner Familie schuldig. Ich möchte meiner Mutter V. Keymel-Trierweiler, meinem Vater M. Keymel, meiner Schwester K. Keymel und H.-J. Trierweiler für ihre unschätzbare und unvergessliche Unterstützung während meines gesamten Studiums von ganzem Herzen danken.

## 9. Lebenslauf

Stefanie Keymel  
Kaarster Str. 48  
41462 Neuss  
Deutschland

01.07.1978 geboren in Neuss

### Schulbildung

1984 – 1988 Karl-Kreiner-Grundschule in Neuss  
1988 – 1997 Marie-Curie-Gymnasium in Neuss  
1997 Abitur

### Ausbildung zur Chemisch-technischen Assistentin

1994 – 1997 Doppelqualifikation am Marie-Curie Gymnasium in Neuss  
1997 – 1998 Städtische Schule für Metalltechnik und Chemie Düsseldorf  
1998 Berufsabschluss Staatlich-geprüfte Chemisch-technische Assistentin

### Hochschulausbildung

1998 – 2005 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
08/2000 Ärztliche Vorprüfung  
08/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
06/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Beruflicher Werdegang

seit 09/2005 Wissenschaftliche Angestellte; Institut für Kardiovaskuläre Molekularbiologie, Uniklinikum Aachen