

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinisch-Experimentelle Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Der PPAR- γ Agonist Pioglitazon steigert die Anzahl und Funktion
endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit
und normaler Glukosetoleranz**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2010

vorgelegt von
Christel Hermann Kamani
geboren am 13.04.1982
in Bafang, Kamerun

INHALTVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	7
2	EINLEITUNG	9
2.1	Endotheliale Dysfunktion, Endothelzellaktivierung und Atherosklerose	9
2.2	Die Atherosklerose als Folge von Endothelläsionen und vaskulärer Inflammation	10
2.3	Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Atherosklerose	10
2.4	EPC, kardiovaskuläre Risikofaktoren und Atherosklerose	11
2.5	Glitazone als neue therapeutische Option zur Beeinflussung von EPC	15
2.6	Fragestellung und Ziel der Arbeit	18
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Materialien	19
3.1.1	Verwendete Substanzen	19
3.1.2	Puffer und Lösungen	20
3.1.2.1	Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	20
3.1.2.2	Puffer für die FACS-Messung	21
3.1.2.3	Puffer für den NADPH-Oxidase-Assay	22
3.1.3	Antikörper	23
3.1.4	Geräte und Zubehör	23
3.1.5	Software	24
3.2	Methoden	24
3.2.1	Studiendesign	24
3.2.2	Isolation der mononukleären Zellfraktion	26
3.2.3	Quantifizierung von EPC-Subpopulationen durch FACS-Analyse	27
3.2.3.1	Grundprinzipien der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung	27
3.2.3.2	Quantifizierung von EPC-Subpopulationen mittels FACS-Analyse	28
3.2.4	EPC-Quantifizierung durch Di-ac-LDL / Lectin-Färbung	30
3.2.5	Bestimmung der EPC-Apoptose durch FACS-Analyse	31
3.2.6	EPC-Migrationsassay	32
3.2.7	Assay der koloniebildenden EPC (Colony forming units, CFU)	33

	3.2.8 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	34
	3.2.8.1 Gesamt-RNA-Isolation	34
	3.2.8.2 Reverse Transkription	34
	3.2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion	35
	3.2.9 NADPH-Oxidase-Aktivitätsmessung	36
	3.2.10 Statistische Analysen	37
4	ERGEBNISSE	39
	4.1 Pioglitazon führt zur Verminderung von Insulin-Serumkonzentration und HOMA-Index	39
	4.2 Pioglitazon erhöht die Adiponectin-Serumkonzentration	42
	4.3 Pioglitazon senkt die hs-CRP-Serumkonzentration	43
	4.4 Pioglitazontherapie führt zur Hochregulation von CD34+/KDR+ EPC	44
	4.5 Pioglitazontherapie führt zur Hochregulation der DiLDL+/ Lectin+ EPC	45
	4.6 Pioglitazontherapie fördert die EPC-Migration	47
	4.7 Pioglitazon erhöht die EPC-Proliferation	49
	4.8 Bestimmung der EPC-Apoptose durch FACS-Analyse	50
	4.9 Pioglitazon vermindert die NADPH-Oxidase-Aktivität in-vitro	51
	4.10 Regulierung der EPC-Anzahl und –Funktion durch PPAR-γ und Adiponectin in-vitro	52
5	DISKUSSION	55
	5.1 Adiponectin ist ein möglicher Mediator der Pioglitazoneffekte auf EPC	55
	5.2 Der anti-inflammatorische Effekt von Pioglitazon zeigt sich in einer Verminderung der hs-CRP-Serumkonzentration	56
	5.3 Der Einfluss des PPAR-γ-Agonisten Pioglitazon auf Anzahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen bei KHK-Patienten	57
	5.4 Diabetes mellitus, kardiovaskuläres Risiko und Glitazontherapie	59
	5.5 Limitationen der Studie und klinische Perspektive	61

6	LITERATURVERZEICHNIS	62
7	DANKSAGUNG UND PUBLIKATIONEN	77
8	LEBENS LAUF	79

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

°C	nnsdss
μ	mikro (10⁻⁶)
%	Prozent
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting enzyme
AGE	Advanced glycation endproduct
ANOVA	Analysis of variance
AT1-Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ I
BMI	Body mass index
CD	cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein (hsCRP = hochsensitives CRP)
d	dezi (10⁻¹)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBM	Endothelial Basal Medium
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
EPC	endotheliale Progenitorzelle(n)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HDL	High density lipoprotein
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HOMA	Homeostasis model assessment
k	Kilo
kb	Kilobasen
KDR	Kinase insert domain receptor
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LDL	Low densitiy lipoprotein
LW	Leerwert
m	Meter, milli (10⁻³)
M	Molar

min	Minute(n)
MNC	mononukleäre Zelle
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl & nano (10^{-9})
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NTP	Nukleotidtriphosphat
OGT	Oraler Glukosetoleranztest
oxLDL	Oxidiertes LDL
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H^+-Ionenkonzentration
PMA	Phorbolmyristatazetat
PPAR-γ	Peroxisomal Proliferator Receptor-Activator Gamma
PPRE	PPAR-γ-Response-Element
RLU	relative luciferase units
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
RXR	Retinsäurerezeptor
s	Sekunden
SDF-1	Stromal-derived factor 1
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Tab.	Tabelle
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TZD	Thiazolidindion
U	Units – Einheiten der Enzymaktivität
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
x	-fach

1 ZUSAMMENFASSUNG

Endotheliale Progenitorzellen sind aus dem Knochenmark stammende, zirkulierende Vorläuferzellen, welche die Gefäßfunktion, Gefäßreparatur und Neoangiogenese positiv beeinflussen. Für die Anzahl der CD34+/KDR+ EPC wurde eine prognostische Bedeutung bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung nachgewiesen. Der PPAR- γ -Agonist Pioglitazon wird als Insulinsensitizer in der Therapie des Typ II-Diabetes eingesetzt. Neuere Studien lassen vermuten, dass dieses Medikament positive Wirkungen im Gefäßsystem hat, die von den Effekten auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel unabhängig sind.

Die vorliegende randomisierte, placebokontrollierte Studie untersuchte den Effekt von Pioglitazon (45 mg tgl. für 30 Tage) auf die Anzahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen bei 36 Patienten mit stabiler KHK und normaler Glukosetoleranz. Die Pioglitazontherapie führte zu einer Verminderung der hochsensitiven CRP-Serumkonzentration und einer Steigerung der Adiponectin-Serumkonzentration. Ferner wurden der Nüchtern-Insulinspiegel und der HOMA-Index reduziert. Die Isolation der endothelialen Progenitorzellen erfolgte aus dem peripher-venösen Blut der Probanden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Quantifizierung der CD34+/KDR+ EPC mittels FACS und der Di-ac-LDL+/Lectin+ Zellen in der Zellkultur zeigte eine Erhöhung der EPC-Zahl nach der Pioglitazontherapie. Eine wesentliche Determinante der biologischen EPC-Wirkung ist die funktionelle Kapazität der Zellen. Die Untersuchung der Migrationsfähigkeit in der modifizierten Boyden-Kammer ergab eine Steigerung der EPC-Migration nach 30 Tagen Pioglitazontherapie. Darüber hinaus ließ sich bei den Patienten in der Verumgruppe eine Zunahme des klonogenen Potentials der EPC messen. Weitere, mechanistische Experimente in EPC von gesunden Probanden zeigten, dass EPC PPAR- γ exprimieren und dass eine Pioglitazonstimulation *in-vitro* die Aktivität der NADPH-Oxidase hemmt und die Migrationskapazität der EPC steigert. Diese Effekte waren durch den PPAR- γ -Antagonisten GW9662 hemmbar und durch Stimulation mit Adiponectin in physiologischer Konzentration imitierbar.

Zusammengefasst führt der PPAR- γ Agonist Pioglitazon zu einem Anstieg der Anzahl und einer Verbesserung der Funktion von endothelialen Progenitorzellen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Dieser erstmals beschriebene, vaskuläre Effekt von Pioglitazon stellt einen potentiellen Regenerationsmechanismus dar, der vom Glukosestoffwechsel unabhängig ist. Größere klinische Studien sind angezeigt, um zu erforschen, ob die beobachteten Effekte zu einer Verbesserung der Prognose bei Patienten mit Herz-Kreislaufkrankungen führen.

The PPAR- γ Agonist Pioglitazone Increases Number and Function of Endothelial Progenitor Cells in Patients with Coronary Artery Disease and Normal Glucose Tolerance

Endothelial progenitor cells are a heterogeneous group of bone marrow-derived stem cells, which have positive effects on vascular function, vascular repair and neoangiogenesis. The number of CD34⁺/KDR⁺ EPC has been shown to predict cardiovascular mortality in patients with coronary artery disease. PPAR- γ agonists (thiazolidinediones) such as pioglitazone are used as insulin sensitizers for the treatment of type II diabetes mellitus. Experimental studies suggest beneficial vascular effects of pioglitazone in addition to the effects on glucose and lipid metabolism.

The effect of pioglitazone therapy on EPC was examined in a prospective, randomized, double-blind study on patients with documented stable coronary artery disease and normal glucose tolerance. Out of 54 patients with normal fasting glucose levels, 18 showed impaired glucose tolerance and 36 patients with normal glucose tolerance were randomized to 30 day treatment with pioglitazone 45 mg or placebo in addition to optimal medical therapy.

All patients in the pioglitazone group showed an increase of adiponectin levels as indicator of compliance and a decrease of high-sensitivity CRP levels. Additionally, fasting insulin levels and HOMA index were reduced. EPC were isolated from the peripheral blood by density gradient centrifugation. Pioglitazone increased CD34⁺/KDR⁺ EPC as well as cultured Di-ac-LDL⁺/Lectin⁺ EPC. The functional capacity of EPC determines the biological activity and efficacy of these cells. Pioglitazone increased the SDF-1 induced migratory capacity in the modified Boyden chamber assay. Furthermore, the clonogenic potential of EPC was up-regulated in the pioglitazone group, increasing the number EPC colony forming units. Mechanistic experiments in cultured human EPC showed expression of PPAR- γ . Pioglitazone increased the number and migration of EPC *in-vitro* and reduced NADPH-oxidase mediated superoxide release. This effect was reversed by the PPAR- γ antagonist GW9662 and mimicked by treatment with adiponectin in physiological concentrations.

In summary, the PPAR- γ agonist pioglitazone increases the number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. The novel vascular effect of pioglitazone represents a potential regenerative mechanism and is observed in normoglycemic individuals with stable coronary artery disease. Larger clinical trials are indicated to elucidate whether these effects confer a prognostic benefit in patients with cardiovascular disease.

2 EINLEITUNG

2.1 Endotheliale Dysfunktion, Endothelzellaktivierung und Atherosklerose

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind in den Industrieländern die Hauptursache für Morbidität und Mortalität [1]. Die Atherosklerose spielt bei der Pathogenese dieser Erkrankungen eine zentrale Rolle. Epidemiologische Studien wie die Framingham-Studie [2] zeigten, dass die Atherogenese ein multifaktoriell bedingter Prozess ist. Die wichtigsten Risikofaktoren sind das Alter, Zigarettenrauchen, Diabetes mellitus, die Hyperlipidämie bzw. -cholesterinämie, die arterielle Hypertonie und genetische Faktoren. Neben diesen Hauptrisikofaktoren gibt es eine Reihe anderer Risikofaktoren, die teilweise durch den Lebensstil beeinflussbar sind. Dazu gehören männliches Geschlecht, körperliche Inaktivität und eine kalorien- bzw. fettreiche Ernährung. Dagegen hat eine mediterrane Ernährung günstige kardiovaskuläre Effekte [3].

Ursprünglich galt das Endothel als eine einfache Barriere zwischen dem intravasalen Lumen und dem Interstitium. Heute weiß man, dass das Endothel eine entscheidende Rolle in der Regulation der vaskulären Funktion spielt [4]. Neben der durch endotheliales Stickstoffmonoxid (NO[•]) vermittelten vasodilatatorischen Wirkung [5] hat das Endothel eine Vielzahl anti-atherosklerotischer und anti-entzündlicher Effekte [6-13].

Die Einwirkung kardiovaskulären Risikofaktoren führen zu einer endothelialen Dysfunktion. Diese ist mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert [14, 15]. Sie zeichnet sich durch geänderte physiologische Eigenschaften des Endothels im Sinne einer Reduktion der endothelabhängigen Vasorelaxation aus [4]. An der Pathogenese der Atherosklerose ist die endotheliale Aktivierung maßgeblich beteiligt. Endothelzellen werden z.B. durch Zytokine [13], Angiotensin II, oxidativen Stress [4, 16], oxidiertes LDL (oxLDL, [17-19] und infektiöse Agenzien aktiviert [20]. Folglich kommt es zur inflammatorischen Vorgängen mit der Ausbildung atherosklerotischer Plaques als Endstrecke [21-23].

2.2 Die Atherosklerose als Folge von Endothelläsionen und vaskulärer Inflammation

Nach dem *response-to-injury*-Modell beginnt der pathogenetische Prozess mit der endothelialen Dysfunktion. Durch die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (siehe Kap. 2.3) entsteht pro-atherogen wirkendes oxLDL [17-19]. Ferner kommt es zur endothelialen Aktivierung. Diese führt zur Adhäsion von Monozyten an das Endothel, Migration in die Gefäßwand und Differenzierung zu Makrophagen [22]. Ferner kommt es zur Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren wie CRP, IL-6, TNF- α und Wachstumsfaktoren, was wiederum die vaskuläre Inflammation verstärkt, weitere Monozyten rekrutiert und zu einem pathologischen Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen führt [17, 23-26]. Im weiteren Verlauf entsteht eine fortgeschrittene atherosklerotische Läsion durch Ausbildung von sich ins Gefäßlumen vorwölbenden Plaques, die unter einer fibrotischen Kappe einen lipidreichen Kern aus nekrotisch lipidbeladenen Makrophagen (Schaumzellen) enthalten [1]. Mit zunehmender Einengung des Lumens arterieller Gefäße bei gleichzeitiger Störung der Regulation des Gefäßtonus kommt es letztlich zur Mangeldurchblutung der durch diese Gefäße versorgten Gewebe. Bei einer Ruptur dieser Plaques kommt es infolge der Freisetzung stark prokoagulatorischer Faktoren aus dem Gewebe schnell zur Thrombozytenaggregation und Bildung eines Thrombus, was zum Herzinfarkt führt mit Folgen einer Myokardnekrose bzw. einer Herzinsuffizienz [22-24].

2.3 Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies für die Atherosklerose

Wie man heute weiß, spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei den beschriebenen Phasen der atherosklerotischen Plaqueformation [4, 16], und bekannte Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung, insbesondere Diabetes mellitus [27-29] und Nikotinabusus [30], gehen mit einem erhöhten oxidativen Stress in der Gefäßwand einher.

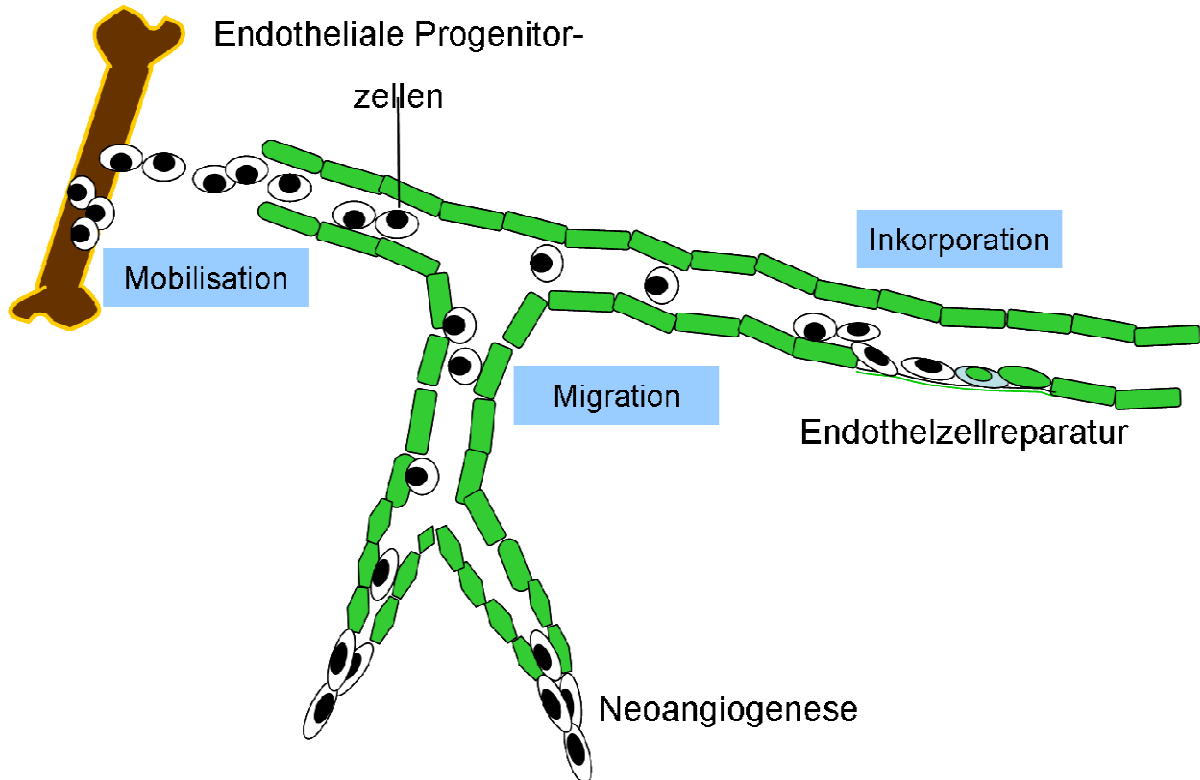
Sauerstoff und seine in allen aeroben Zellen produzierten Derivate bilden eine als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnete Molekülfamilie [4]. Von besonderer Bedeutung ist das Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$, welches zur Inaktivierung von Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) und Bildung von Peroxynitrit führt [31]. Ausserdem kommt es durch Interaktion mit Low density-Lipoprotein zur Bildung von oxLDL [17]. Diese Vorgänge begünstigen die Atherogenese [17, 18, 32]. Die wichtigste Quelle vaskulärer ROS-Bildung stellen NADPH-Oxidasen dar [33-35]. Andere vaskuläre Quellen von ROS sind die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette, die Xanthin-Oxidase, Cytochrom-P450-Monooxygenasen, Zyklooxygenasen und Lipoxygenasen [4, 16, 36-38].

Die für die normale Gefäßfunktion durch die Bildung von NO^{\cdot} essentielle eNOS kann durch erhöhte ROS-Spiegel „entkoppelt“ werden und produziert dann selbst vermehrt $O_2^{\cdot-}$ anstelle von NO^{\cdot} [4, 39]. Die eNOS hat auch eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen (EPCs). Bei einer Funktionsbeeinträchtigung der eNOS wird dieser günstige Effekt auf die EPCs aufgehoben. Folge ist eine Einschränkung der Gefäßendothel-Reparatur nach Läsionen, was wiederum die Bildung atherosklerotischer Plaques begünstigt [40].

2.4 EPC, kardiovaskuläre Risikofaktoren und Atherosklerose

Bis vor kurzem galt das Paradigma, dass die Re-Endothelialisation nach Gefäßverletzung und die Gefäßneubildung (Neoangiogenese) ausschließlich durch Proliferation und Migration gefäßständiger, differenzierter Endothelzellen erfolgen. Seit einigen Jahren weiß man aber, dass zirkulierende Zellen maßgeblich am Erhalt der Endothelfunktion, an der Gefäßneubildung nach ischämischem Verschluss und an der Gefäßreparatur nach Endothelläsionen beteiligt sind [41, 42]. Diese Zellen stammen von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab und werden als endotheliale Progenitorzellen (EPC) bezeichnet [41, 42]. Sie sind eine heterogene Population adulter Stammzellen und bestehen aus Zellen in unterschiedlichem Differenzierungszustand, reichend von “unreiferen” EPC

(charakterisiert z.B. durch die Expression der Oberflächenmarker CD133 und CD34) bis zu den “reifen” EPC (charakterisiert durch die Expression des Stammzellmarkers CD34 sowie des endothelspezifischen Oberflächenmarkers VEGF-Rezeptor 2 [=Kinase Insert Domain Rezeptor, KDR]) [41-45]. Abb. 2.1 zeigt schematisch die Funktionsweise der EPC (modifiziert nach Rosenzweig, 2003 [46]):



Es ist von zentraler Bedeutung, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren eine negative Wirkung auf die Anzahl und Funktion von EPC haben [47-49]. Die EPC-Zahl und –Funktion korreliert zum einen negativ mit dem Lebensalter. Dies erklärt sich durch eine abnehmende Vitalität aller Organe und Gewebe im Alter, einschließlich des Knochenmarks. Mit zunehmendem Lebensalter haben auch die wie im Folgenden erwähnten Risikofaktoren eine höhere Prävalenz, was die Anzahl und Funktion der EPC zusätzlich vermindert. Es zeigte sich zum anderen sowohl im tierexperimentellen als auch in klinischen Studien eine negative Korrelation zwischen Bluthochdruck und der EPC-Zahl [50]. Dabei ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) regulatorisch beteiligt. Sowohl *in-vitro* als auch *in-*

in vivo beeinträchtigt eine Angiotensin-II-Stimulation die Anzahl und Funktion von EPC durch die Induktion von oxidativem Stress. Dieser Effekt kann durch eine gleichzeitige Gabe von ACE-Hemmern bzw. Angiotensin-II-Rezeptor-Blockern gehemmt werden [51]. EPC sind gegenüber oxidativem Stress besonders empfindlich. Der Nikotinabusus ist mit zahlreichen toxischen Inhaltsstoffen im Zigarettenrauch eine potente Noxe für EPC und ein Auslöser der vaskulären Inflammation und Dysfunktion [30]. Studien zeigten z.B einen schnelleren Abbau zirkulierender EPC bei Rauchern. Andere Studien zeigten zusätzlich eine globale funktionelle Beeinträchtigung der EPC hinsichtlich der Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migration bei Rauchern im Vergleich zu Nicht-Rauchern [52]. Nach Beendigung des Rauchens kann teilweise eine Wiederherstellung des EPC-Pools beobachtet werden [53]. Das LDL-Cholesterin ist ein weiterer essentieller kardiovaskulärer Risikofaktor [17, 22-26]. Hohe Spiegel von LDL und oxLDL [32] sind unabhängig von anderen Risikofaktoren mit der EPC-Dysfunktion assoziiert. Diese negativen Effekte konnten durch eine optimale Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statinen) vermindert werden [54, 55]. Weitere Studien zeigten im Gegensatz günstige Wirkungen von HDL-Cholesterin auf EPCs. Eine exogene Hinzugabe von HDL auf kultivierte EPCs gesunder Probanden führte zum Rückgang der Apoptose, zur Erhöhung der eNOS-Expression [56] und zur Förderung der endothelialen Zellreparatur *in-vivo* [57].

Es ist besonders gut untersucht, dass ein Diabetes mellitus zu einer Verminderung der EPC-Zahl und -funktion führt [58]. Die Hyperglykämie und der daraus resultierende oxidative Stress spielen dabei eine zentrale Rolle [59]. Die Verminderung von EPC ist stärker bei Patienten mit chronisch erhöhten Glukosespiegeln [60], und eine hohe Konzentration an advanced glycation endproducts (AGEs) sowie eine häufig vorliegende Niereninsuffizienz beeinträchtigt die EPC-Funktion und das Knochenmark und die Zielgewebe [61]. Diabetiker haben durch die mikro- und makroangiopathischen Folgen ihrer Grunderkrankung unter anderem insgesamt ein stark erhöhtes Risiko für Atherosklerose, myokardiale, zerebrale und

andere ischämische Ereignisse. Als Ursachen kommen z.B. eine beeinträchtigte Endothelialreparatur und eine verminderte Neoangiogenese in Frage, beides möglicherweise Folge der Schädigung von EPC [62, 63]. Eine Erhöhung der Anzahl bzw. Verbesserung der Funktion von EPC bei Diabetikern konnte nach Optimierung der anti-diabetischen Therapie beobachtet werden [64, 65].

Körperliche Inaktivität, meist verbunden mit exzessiver Kalorienaufnahme, wirkt sich negativ auf das kardiovaskuläre Risikoprofil aus bzw. fördert die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen [66]. Körperliches Training wirkt diesen negativen Auswirkungen entgegen und verbessert die vaskuläre Homöostase. Ferner stimuliert körperliche Aktivität die Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark ins periphere Blut bei Mäusen [67], gesunden Probanden [68] und Patienten mit koronarer Herzerkrankung [69, 70]. Das männliche Geschlecht ist mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen verbunden, und Männer entwickeln durchschnittlich 10 Jahre vor Frauen atherosklerotische Läsionen [2]. Eine der möglichen Ursachen dafür ist z.B. der positive Einfluss von Östrogen auf EPC. Es wurde beobachtet, dass Östrogen zu einer gesteigerten EPC-Mobilisierung aus dem Knochenmark in die Peripherie führt, was einerseits zum Rückgang der endothelialen Dysfunktion und andererseits zur verbesserten Gefäßneubildung nach ischämischen Ereignissen führt [69, 71].

Zusammenfassend stellen die zirkulierenden EPC einen biologischen Marker für die vaskuläre Funktion, Reparaturfähigkeit und das kardiovaskuläre Risiko dar [47, 72, 73]. Sie sind invers mit der Anzahl koronarer Risikofaktoren und dem Schweregrad einer koronaren Herzerkrankung korreliert. Die EPC-Konzentration hat prognostischen Wert bei KHK-Patienten [47, 74]. Zum anderen haben in Anbetracht der genannten Erkenntnisse Therapiekonzepte, die eine Verbesserung der Anzahl und Funktion zirkulierender EPC einschließen, eine potentielle Bedeutung in der Therapie der Atherosklerose und ihrer Folgekrankheiten. EPC-basierte Therapien bei ischämischen kardiovaskulären Erkrankungen,

die über den Einfluss nicht-medikamentöser Therapieformen (z.B. Sport, Gewichtsreduktion, Nikotinkarenz, Verbesserung der Ernährung) und der medikamentösen Therapie (z.B. Statine, Antihypertensiva und Antidiabetika) hinausgehen, sind Gegenstand intensiver Forschung [75-77].

2.5 Glitazone als neue therapeutische Option zur Beeinflussung von EPC

Glitazone werden in die Substanzklasse der Thiazolidindione eingeordnet, und Pioglitazon bzw. Rosiglitazon werden klinisch in der Therapie von Patienten mit Typ II-Diabetes eingesetzt [78]. Der Wirkmechanismus beruht im Wesentlichen auf einer Steigerung der Insulinempfindlichkeit peripherer Gewebe (v.a. Muskel- und Fettgewebe), weswegen die Glitazone auch als „Insulin-Sensitizer“ bezeichnet werden [79]. Die molekulare Wirkung beruht auf der Aktivierung des Peroxisome proliferator-activated receptor- γ [80]. PPAR- γ -Rezeptoren werden in hoher Zahl in Adipozyten und Muskelzellen exprimiert, aber auch in Entzündungszellen, Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten [81]. PPAR- γ lässt sich daher auch in atherosklerotischen Läsionen nachweisen und scheint dort eine wichtige Rolle zu spielen [82]. Abb 2.2. zeigt schematisch den PPAR- γ -Regulationsweg und den Angriffspunkt von Pioglitazon. Die PPAR- γ -Aktivierung induziert ferner eine erhöhte Triglyzeridaufnahme im Fettgewebe. Daraus folgt eine verminderte systemische Verfügbarkeit der Triglyzeride und somit eine verminderte Aufnahme durch andere Gewebe. Glitazone führen außerdem zur erhöhten Freisetzung von HDL-Cholesterin [83]. Durch die Glitazon-induzierte Freisetzung von spezifischen Fettzellhormonen, den Adipozytokinen, kann eine weitere Sensibilisierung peripherer insulinempfindlicher Organe erreicht werden [84]. Eines der am besten untersuchten Adipozytokine ist Adiponectin.

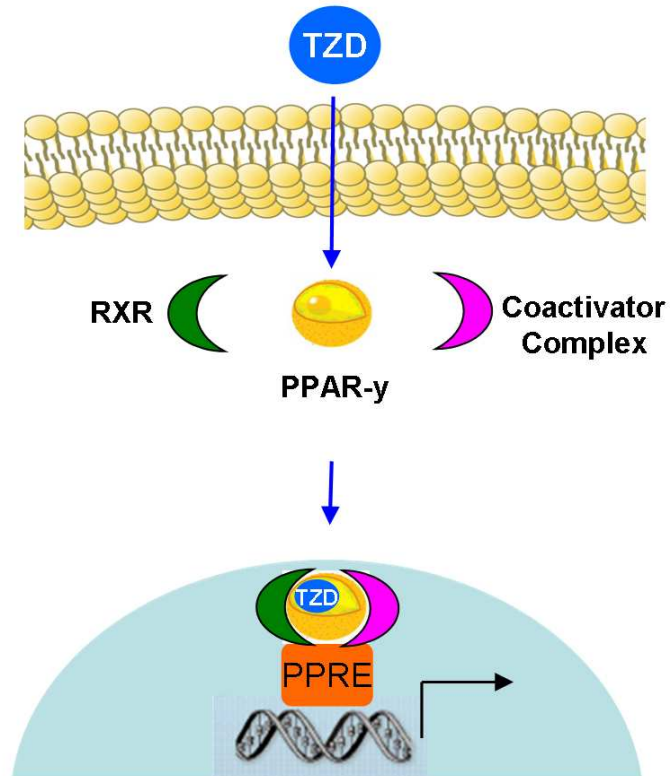


Abb. 2.2: Schematischer Überblick PPAR- γ -abhängige Signaltransduktion. Nach Aktivierung des PPAR- γ -Rezeptors durch Thiazolidindione (TZD) erfolgt die Bindung an den Retinsäure-Rezeptor (RXR) und von Co-Aktivatoren. Dieser Komplex bindet an das PPAR- γ -Response-Element (PPRE) und initiiert die Expression o. Repression PPAR- γ -abhängiger Gene wie Adiponectin.

Thiazolidindione induzieren eine gesteigerte Adiponectin-Genexpression und erhöhen den Adiponectin-Plasmaspiegel [85]. Der Adiponectinspiegel ist positiv mit der Insulinempfindlichkeit [86, 87] und invers mit der Fettmasse [87] des Körpers korreliert. In Monozyten bzw. Makrophagen hemmt eine PPAR- γ -Aktivierung die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, von Matrix-Metalloproteinasen sowie von Scavenger-Rezeptoren [88]. In aktivierten Endothelzellen bewirkt sie eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekulan wie VCAM-1 sowie chemotaktischen Faktoren, was die Rekrutierung und Adhäsion von Monozyten und von T-Lymphozyten hemmt [89, 90]. Es zeigte sich auch eine Verminderung der CRP- [91] sowie TNF- α -Konzentration [92] nach Glitazonbehandlung, unabhängig vom Glukose-Metabolismus [93]. Es gibt experimentelle Hinweise auf eine erhöhte Freisetzung von vasodilatorischem NO^{*} aus Endothelzellen nach

Stimulation des PPAR- γ -Rezeptors [94]. In Gefäßmuskelzellen zeigen sich nach PPAR- γ -Aktivierung eine Proliferations- und Migrationshemmung sowie eine verminderte Expression des Angiotensin II-Rezeptor Typ1 [95] mit der Konsequenz einer verminderten Bildung atherosklerotischer Plaques im Tiermodell [96].

Aus diesen beobachteten Effekten ergibt sich das Konzept, dass Pioglitazone vaskuloprotektive Effekte auslöst, die über die direkten Effekte der Insulinsensibilisierung hinausgehen. Zusätzlich zu der anti-entzündlichen Wirkung ergab sich aus kleineren Studien ein positiver Einfluss von Glitazonen auf die EPC-Anzahl und –Funktion bei Diabetikern. Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit Rosiglitazon neben einer Besserung der endothelialen Dysfunktion zur Besserung der EPC-Biologie hinsichtlich Differenzierung, Proliferation und Migration führt [78, 97, 98]. Ferner zeigten Wang *et al.* einen Anstieg der Zahl bzw. Verbesserung der Funktion von EPCs nach Behandlung mit Pioglitazon bei Patienten mit Diabetes mellitus [64].

Marx *et al.* untersuchten in einer randomisierten, placebo-kontrollierten, doppelblinden Studie den Effekt einer Behandlung mit einem Thiazolidindion auf das Neointima-Volumen nach koronarer Stentimplantation bei KHK-Patienten. Dafür wurden insgesamt 50 Patienten mit Pioglitazon (30mg/d) oder Placebo behandelt. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Pioglitazon zu einer Verminderung des Neointima-Volumens im Verlauf nach der Koronarintervention führte, d.h. die Restenose-Rate war vermindert [99]. Diese Beobachtung war im Einklang mit Vorarbeiten bei diabetischen Patienten [100]. Da die Studie von Marx *et al.* an Patienten ohne Diabetes mellitus durchgeführt wurde und Glukose-Serumkonzentration, Insulin- und HbA1c-Wert während der Behandlung unverändert blieben, ergab sich die Hypothese, dass Pioglitazon eine direkte, von den metabolischen Effekten unabhängige, Wirkung auf die Neointima-Bildung ausübt [99].

In einer Vorstudie unserer Arbeitsgruppe wurden gesunde, normoglykämische Mäuse mit Pioglitazone (20 mg pro kg Körpergewicht pro Tag) oder Placebo für 10 Tage

behandelt[101]. Es zeigte sich, dass eine Behandlung mit dem PPAR- γ -Agonist Pioglitazon zu einem Anstieg der Anzahl zirkulierender EPC sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark führt. Dieser Effekt hielt für mindestens 20 Tage an. Neben dem Anstieg der EPC-Zahl wurde die Migrationsfähigkeit, ein etablierter Parameter für die EPC-Funktion, verbessert. Außerdem führte die Behandlung mit dem Thiazolidindion zu einer Verbesserung der Neoangiogenese. Nach Isolierung der EPC aus den mit Pioglitazon behandelten Mäusen zeigten diese Zellen eine Verminderung der Apoptoserate. Die Behandlung mit Pioglitazon hatte keinen Einfluss auf die Glukose- und Lipid-Serumkonzentration bei den Mäusen, was vermuten liess, dass diese günstigen Effekte von Pioglitazon von den metabolischen Effekten unabhängig sind [101]. Diese Daten werden durch weitere experimentelle Studien unterstützt, die eine direkte Modulation von Adhäsionsmolekülen, pro-koagulatorischen Faktoren und Matrixmetalloproteinasen in vaskulären Zellen gezeigt haben (Review in [102]).

2.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Auf Grund der genannten Beobachtungen stellte sich die Frage, ob die Behandlung mit Pioglitazon zu einer vermehrten Freisetzung und verbesserten Funktion endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung OHNE Diabetes mellitus führt. Diese Frage wurde in einer prospektiven, randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten, klinischen Studie an Patienten mit angiographisch nachgewiesener stabiler koronarer Erkrankung sowie einer normalen Glukosetoleranz durchgeführt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Substanzen

1,19–dioctadecyl–3,3,39,39–tetramethylindo-carbocyanine–markiertes acetyliertes low-density lipoprotein (Di-ac-LDL), Cell Systems, St. Katharinen
2,4,2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure (HEPES), Merck, Darmstadt
Adiponectin (human, rekombinant, Alexis Biochemicals via Axxora, Lörrach
Apoprotin (bovine lung), 1,4 mg Protein/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biocoll Dichtegradientenlösung, Biochrom AG, Berlin
Bovines Serum Albumin (BSA), SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Cell Wash, BD Pharmingen, Heidelberg
DC Protein-Assay Reagent A, Bio-Rad Laboratories, München
DC Protein-Assay Reagent B, Bio-Rad Laboratories, München
Dexamethason (Fortecortin), 4 mg, Merck, Darmstadt
Dextro O.G.T Saft, 300 ml, Roche, Mannheim
Eisessig, Merck, Darmstadt
Ethanol 99%, Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FACS Clean, BD Pharmingen, Heidelberg
FACS Rinse, BD Pharmingen, Heidelberg
Fibronektin (aus humanem Plasma), Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FITC-markiertes *Ulex europaeus Lectin* (10µg/ml), Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fluorescent Mounting Medium, DAKO, Hamburg
Foetales Kälberserum (FKS), Invitrogen, Karlsruhe
GW9662 (PPAR-γ-Antagonist), Alexis Biochemicals via Axxora, Lörrach
Kaliumchlorid (KCL), Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄), Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH), Roth, Karlsruhe
Mini Complete Tabletten (Proteaseinhibitoren), Roche, Mannheim
Natriumchlorid (NaCl), Merck, Darmstadt

di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), Merck, Darmstadt

Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

N,N-Dimethyl-9,9'-biacridiniumdinitrate (Lucigenin), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Paraformaldehyd (PFA), Merck, Darmstadt

Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Pioglitazon (45mg Tabletten), Takeda Pharma GmbH, Aachen

Propidiumiod (50µg/ml), Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Streptavidin (Phycoerythrin-markiert), DAKO, Hamburg

Stromal-Derived Factor 1 (SDF-1) 10 µg, R&D Systems, Wiesbaden

Sucrose, Merck, Darmstadt

Trypsin, Promocell, Heidelberg

Türks-Lösung, Merck, Darmstadt

Universalagarose, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Vectashield Eindeckmedium mit DAPI, Linaris, Wertheim

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30%, Merck, Darmstadt

3.1.2 Puffer und Lösungen

3.1.2.1 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

10 x Phosphate-buffered Saline (10xPBS):

Substanz	Menge / Endvolumen
NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
KCl	2 g
	ad 1000 ml (mit Aqua dest), pH 7.4

50 x TAE-Puffer:

Substanz	Menge / Endvolumen
NaCl	484 g
EDTA	37,2 g
Eisessig	116 ml
	ad 2000 ml (mit Aqua dest), pH 8.4

1mM EDTA-Lösung

Substanz	Menge / Endvolumen
EDTA	372,24 g
	ad 1000 ml (mit Ampuwa), pH 8.0

1M KH₂PO₄-Lösung

Substanz	Menge / Endvolumen
KH ₂ PO ₄	5,24 g
	ad 38,5 ml (Ampuwa)

1M K₂HPO₄-Lösung

Substanz	Menge / Endvolumen
K ₂ HPO ₄	12,19 g
	ad 70 ml (Ampuwa)

3.1.2.2 Puffer für die FACS-Messung

FACS-Puffer

Substanz	Menge / Endvolumen
Aprotinin	1 ml (Aktivität 15 U/l)
Bovines Serumalbumin	0,5 g
	ad 500 ml (mit sterilem 1x PBS)

10 x Binding Buffer

Substanz	Menge
HEPES	23,9 g
NaCl	81,2 g
CaCl ₂	2,75g
	ad 1000 ml (Ampuwa), pH 7.4

3.1.2.3 Puffer für den NADPH-Oxidase-Assay

Kalium-Phosphat-Puffer (Puffer A)

Substanz / Lösung	Menge / Endvolumen
1M KH ₂ PO ₄	38,5 ml
1M K ₂ HPO ₄	61,5 ml
	ad 900 ml (Ampuwa) = Puffer A ₀ (0.1M)
	500ml ad 1000 ml Ampuwa = Puffer A ₀ (50mM)
51,3 g Sucrose	ad 1000ml mit Puffer A ₀ (50mM)

Lucigenin-Puffer (Puffer B)

Substanz	Menge / Endvolumen
Lucigenin	2,5 mg
	ad 500 ml mit Puffer A; Anmerkung: Nach Sterilfiltration b. 4°C aufbewahrt

NADPH-Puffer (Puffer C)

Substanz / Lösung	Menge / Endvolumen
NADPH	50 mg
1M NaOH	83,3µl (= Lösung E)
	+ 5ml Puffer A; Anmerkung: Aufbewahrung bei -80°C

Homogenisierungs-Puffer (Puffer D)

Substanz / Lösung	Menge
Puffer A	50 ml
Complete	1 Tablette; Aufbewahrung b. 4°C

3.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-IgG _κ – Fluoresceinisothiocyanat (-FITC)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-IgG _κ – Phycoerythrin (-PE)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD34 – Fluoresceinisothiocyanat (-FITC)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD133 – Phycoerythrin (-PE)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-VEGFR-2 (-KDR)	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Annexin V- FITC	BD Pharmingen, Heidelberg

3.1.4 Geräte und Zubehör

Autoklav, Biomedics Laborservice GmbH, Giessen

Blutzuckermessgerät, Accu-Check

Brutschränke, Heraeus Hera Cell bzw. Sanyo MCO 17 AIC

FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg

Fluoreszenzmikroskop, Nikon Eclipse E600

Geldokumentationssystem, Gene Genius Bio Imaging System, Syngene

Gelelektrophoresekammer, Biorad, Bio-Rad Laboratories, München

Kühlzentrifuge, Napco 2019R, Napco Deutschland

Lichtmikroskop, Olympus CK2, Olympus, Deutschland

Luminometer, Berthold Lumat LB 9501, Berthold, Deutschland

PH-Meter, WTW 527, Deutschland

Photometer, Beckman Coulter DU 730, Beckman, Deutschland

Sterilbank, Heraeus Hera Safe

Stromquelle, Biorad Power-Pac 300, Bio-Rad Laboratories, München

Thermocycler, Px2, Thermo Electron Corporation

Thermomixer, Eppendorf Thermomixer Comfort

Tischzentrifuge, Heraeus Biofuge Pico, Heraeus, Deutschland

Vortexer VF2, Janke und Kunkel, Deutschland

Waage, Acculab, Sartorius, Deutschland

Wasserbad, Memmert, Deutschland

Zentrifugen, Heraeus Laborfuge 400R und Megafuge 1.0

3.1.5 Software

BD Cellquest Software™ Pro Version 4.0.2 , Becton Dickinson, Heidelberg

Microsoft Office Paket 2003

Syngene GeneSnap 6.07

Lucia 4.6, Nikon, UK

GraphPad Prism, Version 3.02

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

Das Design der Studie war prospektiv, randomisiert, placebokontrolliert und doppelblind. Die Randomisierung erfolgte computerbasiert durch die Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg. Patienten und Studienbetreuer wurden erst vor der statistischen Datenauswertung über die Gruppenzugehörigkeit der Patienten informiert. Die Haupteinschlusskriterien waren eine angiographisch nachgewiesene stabile koronare Herzerkrankung und ein Alter zwischen 18 und 80 Jahren. Zu den Ausschlusskriterien gehörten das Vorliegen einer pathologischen Glukosetoleranz bzw. eines Diabetes mellitus, ein akutes Koronarsyndrom, höhergradige Klappenvitien, eine symptomatische Herzinsuffizienz (New York Heart Association Klasse III oder IV), eine hochgradige, systolische, linksventrikuläre Funktionsstörung (definiert als eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion kleiner 40%), eine stark eingeschränkte Leberfunktion (definiert als Transaminasen größer als das Zweifache des Normbereichs) oder schwere Nierenfunktionseinschränkung (definiert als Serumkreatininwert über 2,5 mg/dl oder Kreatinin-Clearance-Wert unter 30 ml/Min). Wenn Begleiterkrankungen oder klinische Konstellationen vorlagen, die eine Änderung der Medikation während der Studiendauer notwendig gemacht hätten (z.B. geplante Operationen), wurde auf den Einschluss dieser Patienten ebenfalls verzichtet. Weitere Ausschlusskriterien galten für suchtkranke Patienten

(ohne Nikotinabusus), psychisch kranke Patienten, schwangere Frauen bzw. Frauen in gebärfähigen Alter sowie Patienten mit dauerhafter Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika. Die Erhebung der Ein- und Ausschlusskriterien erfolgte mittels Durchsicht des Herzkatheterbefundes, des klinisch-chemischen Routinelabors vor der Koronarangiographie und durch Anamnese der Patienten.

Insgesamt wurden 54 Patienten ohne bekannten Diabetes mellitus anhand ihrer klinischen Charakteristika für die Durchführung des oralen Glukosetoleranztestes ausgewählt. Dieser Test erfolgte nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Diabetesgesellschaft [103] unter Verwendung des Dextro O.G-T. (Roche) nach 10-stündiger Nüchternphase.

Ein Blutzuckerwert 2 Stunden nach dem Test $> 140\text{mg/dl}$ wurde als pathologische Glukosetoleranz und ein Wert $> 200\text{mg/dl}$ als Diabetes mellitus klassifiziert und diese Diagnose entsprechend im Arztbrief vermerkt.

Die Patienten mit normaler Glukosetoleranz erhielten 45mg Pioglitazon oder Placebo für 30 Tage zusätzlich zu ihrer leitliniengerechten kardialen Medikation, die während der Studie nicht verändert wurde. Vor Beginn der Medikation und nach 30 Tagen erfolgte eine peripher-venöse Blutentnahme von je 120ml Blut (100ml Citratblut, 10ml Serum, 10ml EDTA-Blut) bei den nüchternen Patienten. Aus den gefrorenen Patientenseren erfolgte eine Insulin- und Glukosebestimmung zur Berechnung des HOMA-Index (Homeostasis Model Assessment, [104] in unserem klinisch-chemischen Zentrallabor. Darüber hinaus wurden in unserem Auftrag im ifke Laboratory (Mainz) ebenfalls das hochsensitive C-reaktive Protein (Reagenz: CRP Dynamik, Biomed) und die Adiponectinkonzentration (Human adiponectin radio-immuno assay, Linco) bestimmt.

Die Teilnahme an der Studie erfolgte nach ausführlicher Aufklärung mit schriftlichem Einverständnis der Probanden. Die Durchführung erfolgte mit Zustimmung der

Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Ethikvotum Nr. 130/05) und des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM, Geschäftszeichen 61-3910-4030855) nach den Richtlinien der der Good Clinical Practice (GCP) und auf den Grundlagen der Deklaration von Helsinki (1964).

3.2.2 Isolation der mononukleären Zellfraktion

Die in dieser Studie untersuchten endothelialen Progenitorzellen sind eine Subgruppe der einkernigen zirkulierenden Leukozyten (mononukleäre Zellen, siehe Kap. 2.2). Sie lassen sich durch bestimmte Färbeeigenschaften in Kultur bzw. Oberflächenmarker in der FACS-Analyse (siehe 3.2.4) quantifizieren. Für alle Experimente dieser Studie wurden zunächst die mononukleären Zellen aus dem peripher-venösen Blut der Studienprobanden gewonnen. Das Blut wurde dazu mittels einer Flügelkanüle aus der Vena cubitalis oder basilica entnommen und innerhalb von 60 Minuten verarbeitet.

Die Isolation der mononukleären Zellfraktion erfolgte nach dem Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation. Dabei wurden zunächst 20 ml Citratblut mit sterilem 1 x PBS verdünnt. Anschließend erfolgte die vorsichtige Überschichtung von 15 ml der Biocolllösung (Biochrom AG). Die Proben wurden für 20 min bei 2400 rpm (ohne Bremse) zentrifugiert. Durch die chemischen Eigenschaften der Biocolllösung (Viskosität, Dichte und Osmolalität) kam es im Rahmen der Zentrifugation zu einer Auftrennung der korpuskulären Blutanteile und zur Ausbildung von drei Schichten (Gelbe Oberschicht: Plasma; weiße mittlere Schicht: mononukleäre Zellen; rote Unterschicht: Erythrozyten und Granulozyten). Nach sorgfältiger Überführung der mittleren Schicht in ein neues Gefäß erfolgten zwei Waschschrte in Form von Auffüllung auf 50 ml mit 1 x PBS, Zentrifugation für 10 min bei 2400 rpm (mit Bremse), Resuspendieren und Verwerfen des Überstandes. Diese Waschschrte dienten dazu, die mononukleären Zellen von Plättchen, Biocollresten und Plasma zu reinigen. Nach dem Waschen erfolgte schlussendlich die gründliche Resuspension

des Pellets in 5 mL EBM Medium + Supplements (s.u.). Anschließend erfolgte die Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 μ l der Zellschlösung mit 90 μ l 1 x PBS verdünnt und dazu 100 μ l Türkislösung gegeben. 10 μ l dieser Lösung wurden in eine Neubauerzählkammer pipettiert und die Zellen in den vier großen Eckquadraten lichtmikroskopisch bei hundertfacher Vergrößerung an einem Olympus CK2-Mikroskop ausgezählt. Die so gewonnene Zellzahl wurde mit dem Verdünnungsfaktor 50.000 multipliziert, um die Zellzahl in 1ml zu erhalten.

Die mononukleären Zellen wurden in Endothelzell-Basalmedium (EBM, Lonza, Wuppertal) mit vom Hersteller vorgegebenen Zusätzen (20% foetales Kälberserum, 50 μ g/mL Amphotericin B, 3 μ g/mL boviner Gehirnextrakt, 30 μ g/mL Gentamicinsulfat, 1 μ g/mL Hydrocortison, 10 μ g/mL Humaner epidermaler Wachstumsfaktor, jeweils Lonza, Wuppertal) kultiviert oder direkt der FACS-Analyse zugeführt.

3.2.3 Quantifizierung von EPC-Subpopulationen durch FACS-Analyse

3.2.3.1 Grundprinzipien der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung

Die fluoreszenzaktivierte Zellsortieranalyse (FACS) beruht auf der Messung von an korpuskulären Bestandteilen gebeugtem, gebrochenem oder gestreutem Laserlicht und an der Emission von Fluoreszenzlicht bestimmter Wellenlänge nach vorheriger Anregung. Dabei werden die in einer Trägerlösung befindlichen Zellen von einem Laser mit Licht spezifischer Wellenlänge bestrahlt. Die Zellen emittieren daraufhin ein Streulicht. Das Vorwärtsstreulicht wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße (FSC - *Forward Scatter*). Das Seitwärtsstreulicht (SSC - *Sideward Scatter*) dagegen wird durch die Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität bzw. Körnung der Zellen. Neben dieser groben Charakterisierung werden die Zellen zumeist vor der Messung mit fluoreszierenden Farbstoffen inkubiert. Diese Farbstoffe sind entweder an Antikörper gebunden, so dass eine spezifische Bindung an Epitope an der Zelloberfläche oder (nach

Zellpermeabilisierung) in der Zelle erfolgt, oder reagieren direkt mit zellulären Bestandteilen (z.B. Propidiumiodid). Bei Bestrahlung mit Laserlicht spezifischer Wellenlänge werden Fluoreszenzimpulse von den Zellen emittiert. Das von Zellen emittierte Streulicht bzw. die Fluoreszenzimpulse werden von wellenlängenspezifischen Filtern absorbiert und in elektrische Signale umgewandelt. Diese Daten werden durch einen Computer verrechnet und durch ein Punkteschema (Scattergramm) auf dem Bildschirm sichtbar gemacht. Somit lassen sich - den Fluoreszenzimpulsen entsprechend - anhand des Punkteschemas unterschiedliche Zellpopulationen sortieren und quantifizieren.

3.2.3.2 Quantifizierung von EPC-Subpopulationen mittels FACS-Analyse

In der vorgelegten Arbeit wurde die CD34 / Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2, KDR) -positive EPC-Subpopulation mittels FACS-Analyse quantifiziert, weil bekannt ist, dass diese Zellen bei KHK-Patienten prognostisch bedeutsam sind ([72], vgl. Kap. 2.4).

Dazu wurden aus 20ml des bei den Patienten entnommenen Citratbluts vor und nach Pioglitazon- oder Placebo-Behandlung mittels Dichtegradientenzentrifugation die einkernigen Leukozyten isoliert. Das Pellet wurde in 1ml EBM mit Zusätzen resuspendiert, und jeweils 100µl dieser Zellsuspension bildeten die Grundlage der folgenden FACS-Ansätze (jeweils als Doppelbestimmung):

1 – Isotypenkontrolle (IgGκ-FITC, IgGκ-PE , Quantifizierung unspezifischer Antikörperbindungen)

2 – CD34-FITC / VEGFR-2 (Endotheliale Progenitorzellen)

Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Phycoerythrin (PE, rot) und Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, grün) verwendet. Das genaue Pipettierschema ist Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Zeitachse (MINUTEN)	Dauer	Beschreibung	Isotypen-Kontrolle	CD34/CD133	CD34/VEGFR-2	Beschreibung	Dauer
0	0						
5	5	5 min	FICOLL	100µl	100µl	FICOLL	5 min
25	*	20min, EIS, dunkel	Antikörper 1	10µl IgGκ-FITC	10µl CD34-FITC		
45	*	20min, EIS, dunkel	Antikörper 2	10µl IgGκ-PE	10µl CD133-PE	20µl hum.SERUM	BLOCKING
50	40		Auffüllen	+2ml Cell Wash	+2ml Cell Wash	+2ml FACSpuffer	Auffüllen
60	50	10min	Zentrifugation	1300 rpm, S1	1300 rpm, S1	1300 rpm, S1	Zentrifugation
65	55		Absaugen				Absaugen
75			Auffüllen	+200µl Cell Wash	+200µl Cell Wash	10µl antiVEGFR2	Antikörper 2
70			Fixieren	+200µl PFA 4%	+200µl PFA 4%	50µl Streptavidin- PE-Verdünnung	(45µl PBS + 5µl Streptavidin-PE)
85	105	15min	Messung	FACS	FACS	10µl CD34-FITC	Antikörper 1
125						+1ml FACSpuffer	Auffüllen
130						<i>*FACS-Einschaltroutine</i>	
140						1300 rpm, S1	Zentrifugation
							Absaugen
						+200µl Cell Wash	Auffüllen
150						+200µl PFA 4%	Fixieren
160						FACS	Messung
180						<i>FACS-Auswertung</i>	
200						<i>FACS-Ausschaltroutine</i>	

Abb. 3.1: Pipettierschema für das EPC-FACS. Anmerkungen: Die Zugabe von Paraformaldehyd (PFA) diente der Fixierung der Antikörperbindungen. Humanes Serum wurde in Ansatz 3 zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen eingesetzt. In Ansatz 3 wurde der VEGFR-2 über einen aus in Ziegen generierten Antikörper (goat anti-human VEGFR-2) indirekt über anti-goat Streptavidin-PE nachgewiesen. Die FACS-Einschaltroutine bestand aus ausgiebigem Spülen der Leitungen und mehrfachem Primen bzw. Laden der entsprechenden Software und Geräteeinstellungen. Die FACS-Ausschaltroutine bestand aus ausgiebigem Spülen mit FACS Clean und FACS Rinse für jeweils 10 Minuten.

Alle FACS-Analysen wurden mit einem FACSCalibur der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) durchgeführt. Der so gewonnene Datensatz wurde mittels Cellquest Pro Software™ aufgearbeitet. Mit Hilfe des Forward und Sideward Scatter konnten die mononukleären Zellen in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten differenziert werden. Von Größe und Granularität her sind EPC im Lymphozytengate zu finden. Daher wurden bei jeder einzelnen Messung insgesamt 250.000 Zellen im Lymphozytengate gezählt.

3.2.4 EPC-Quantifizierung durch Di-ac-LDL / Lectin-Färbung

Endotheliale Progenitorzellen zeichnen sich durch ihre Anfärbbarkeit mit *Ulex europaeus* Lectin und durch die Fähigkeit, Di-Acetyliertes Low Density Lipoprotein (Di-ac-LDL) zu phagozytieren, aus [41]. Zur Durchführung der Di-ac-LDL / FITC-Lectin-Färbung wurden 4×10^6 mononukleäre Zellen aus der Ficoll-Isolation auf mit Fibronectin (10 $\mu\text{g/ml}$) beschichteten 24-Well Kulturplatten in EBM mit Zusätzen über 4 Tage kultiviert. Zur Fibronectin-Beschichtung wurde die Stammlösung (1mg/ml) 1:100 mit 1 x PBS verdünnt, 30 Minuten auf den Kulturplatten inkubiert und dann abgesaugt. Nach 4 Tagen Kultur erfolgte das Absaugen des Mediums, Waschen mit sterilem 1 x PBS, und die Inkubation bei 37°C mit 2,4 $\mu\text{g/ml}$ Di-ac-LDL (Cell-Systems, Deutschland) in EBM für 1 Stunde im Dunkeln. Danach wurde die Färbung mittels 2% Paraformaldehyd für 10 Minuten bei 37°C fixiert und daraufhin mit 10 $\mu\text{g/ml}$ FITC-markiertem *Ulex europaeus* Lectin (Sigma, Deutschland) bei 37°C für 3 Stunden im Dunkeln der zweite Färbeschritt durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mittels 1 x PBS wurden die Cover Slips auf einen Objektträger aufgebracht und mit Eindeckmedium (Fluorescent Mounting Medium, Dako, Deutschland), Eindeckmedium mit DAPI (zur Kerngegenfärbung, Linaris, Deutschland) und Deckglas versehen. Dieser Assay erfolgte für alle Studienpatienten als Dreifachbestimmung. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit der 100 x Vergrößerung an einem Nikon Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskop. Dabei wurden pro Cover Slip drei repräsentative Gesichtsfelder mittels der Lucia G/F Software™ aufgenommen und ausgezählt. Zellen, die kernhaltig waren (blau leuchtend), und die Di-ac-LDL (rot leuchtend) phagozytiert und sich mit FITC-Lectin (grün leuchtend) angefärbt hatten, wurden als EPC gezählt.

Der beschriebene Assay zur EPC-Quantifizierung wurde ebenfalls in Zellkulturexperimenten an endothelialen Progenitorzellen freiwilliger Probanden benutzt, bei denen die Zellen für 24 Stunden mit 10 $\mu\text{M/l}$ Pioglitazon, 10 $\mu\text{M/l}$ Pioglitazon + 1 $\mu\text{M/l}$ PPAR- γ -Antagonist (GW9662), 20 $\mu\text{g/ml}$ Adiponectin oder Lösungsmittel (1 x PBS) stimuliert waren.

3.2.5 Bestimmung der EPC-Apoptose durch FACS-Analyse

Die Messung der EPC-Apoptoserate mittels FACS basiert auf der hohen Affinität von Annexin V zu Membranphosphatidylserinen. Diese sind bei intakter Zellmembran an der Membraninnenseite lokalisiert. Bereits in frühen Phasen der Zellapoptose werden Phosphatidylserine nach außen transloziert, und somit kann die Rate der apoptotischen Zellen mittels Annexin V-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt werden. Da es bei der Zellnekrose ebenfalls zu einem Verlust der Membranintegrität kommt, und die Membran permeabel wird, kann Annexin V in die Zellen diffundieren und an Phosphatidylserin auf der Membraninnenseite binden. Daher können bei alleiniger Färbung von Zellen mit FITC-gelabeltem Annexin V apoptotische von nekrotischen Zellen nicht unterschieden werden. Zur Diskriminierung wurde als zweiter Farbstoff Propidiumiodid (PI, Sigma) hinzugegeben. Dieser DNA-Farbstoff kann nur permeabilisierte Zellmembranen passieren, färbt also nur nekrotische Zellen. Der FACSCalibur (Beckton Dickinson) wurde so eingestellt, dass lebende Zellen (Annexin V negativ, PI negativ) mit ausreichender Sicherheit von apoptotischen Zellen (Annexin V positiv, PI negativ) und nekrotischen Zellen (Annexin V positiv, PI positiv) unterschieden werden konnten.

In dieser Arbeit wurde die EPC-Apoptoserate der Patienten vor und nach Therapie mit 45mg Pioglitazon oder Placebo für 30 Tage wie oben beschrieben gemessen. Dabei wurde die basale Apoptose mit der Apoptoserate unter oxidativem Stress (ausgelöst durch H₂O₂, 300µM, 24 Stunden) verglichen. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung. Nach Isolation der mononukleären Zellfraktion folgten die Aussaat von 1x10⁶ MNC auf 6-well Platten und die Zellkultur über 24 Stunden. Daraufhin wurde der Apoptoseinduktor zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte das Absaugen des EBM und die Ablösung der Zellen mittels einer 1:1 verdünnten Trypsin / EDTA-Lösung für 5 min Inkubation im Brutschrank. Zum Blockieren der schädigenden Wirkung von Trypsin wurde vor dem Überführen der abgelösten EPCs in ein Eppendorfgefäß jeweils 1 mL EBM mit Zusätzen in

die Schalen gegeben. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm (Heraeus Biofuge pico) pelletiert und in jeweils 100 µL 1 x Binding Buffer resuspendiert. Danach erfolgte der Transfer in die FACS Tubes und die Zugabe von 5 µL Annexin V-FITC und 5 µL Propidiumiodid. Nach 10 min Inkubation im Dunkeln auf Eis wurden nochmals 100 µL 1 x Binding Buffer zugegeben und die FACS-Ansätze gründlich gevortext.

Direkt im Anschluss erfolgten die Messung am FACSCalibur (Becton Dickinson) und die Auswertung mit Hilfe der Cellquest Pro Software™ aufgearbeitet. Dabei wurden die Annexin V-positiven und PI-negativen Zellen im Lymphozytengate als nicht- oder frühapoptotische und die die Annexin V-FITC-positiven und PI-negativen Zellen mit geringer Größe und Granularität (beides $<10^1$, aber oberhalb des für Zelldebris gesetzten Thresholds) als spätapoptotische EPCs gezählt.

3.2.6 EPC-Migrationsassay

Die Migrationsfähigkeit ist ein wesentlicher Parameter der Funktion endothelialer Progenitorzellen und befähigt diese zur Extravasation aus dem Blutfluss in die Gefäßwand. Die EPC-Migration kann durch Stimuli wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1) ausgelöst werden [74]. Für den Migrationsassay wurden zunächst 4×10^6 mononukleäre Zellen über 4 Tage auf 6-well Platten kultiviert. Nach diesem Zeitraum erfolgte nach Waschen mit sterilem 1 x PBS das Ablösen der EPCs mittels Trypsin / EDTA-Gemisch (1:1, jeweils 500 µl Trypsin und 500µl 1 mM EDTA (pH 8.0), Inkubation bei 37°C für 5 Minuten) und eine Zentrifugation über 5 Minuten mit 2000 rpm (Heraeus Biofuge pico). Das Pellet wurde in 300 µl EBM ohne Zusätze resuspendiert. Nach Zellzählung wie oben beschrieben erfolgte die erneute Aussaat von 1×10^5 Zellen in einem Gesamtvolumen von 500µl EBM ohne Zusätze in den oberen Teil einer modifizierten Boyden-Kammer (HTS Fluoroblock, 8 µM Porendurchmesser, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Diese Kammer wurde in ein 24-Well mit 750µl EBM ohne Zusätze und

100ng/ml SDF-1 (Rekombinanter Stromal-Derived Factor-1a / CXCL12, R&D Systems, Deutschland) gestellt. Nach einem Tag in Kultur erfolgten die Färbung mittels Di-ac-LDL wie oben beschrieben und anschließend die mikroskopische Auswertung der migrierten und Di-ac-LDL-positiven EPC an der der Unterseite des Filters mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wurde der Filter mit Hilfe eines Skalpell von der Chamber entfernt und auf einem Objektträger eingebettet. Die Auszählung des gesamten Filters erfolgte mäanderförmig an einem Nikon Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der 400 x Vergrößerung. Pro Patient wurden drei Migrationsassays durchgeführt.

Die EPC-Migration wurde auf diese Weise ebenfalls in den in Kap. 3.2.4 beschriebenen Zellkulturexperimenten bestimmt, um den Einfluss von Pioglitazon, GW9662 und Adiponectin auf die Funktion der Progenitorzellen zu überprüfen.

3.2.7 Assay der koloniebildenden EPC (Colony forming units, CFU)

Die Fähigkeit endothelialer Progenitorzellen zur klonalen Expansion und Proliferation in Kultur kann mit dem so genannten Hill-Assay [47] quantifiziert werden. Dazu wurden nach der Ficoll-Isolation je 5×10^6 mononukleäre Zellen unter Zugabe in 1 mL EBM mit Zusätzen auf drei mit Fibronectin (10 $\mu\text{g/ml}$) beschichtete 6-Well Platten ausgesät. Nach zwei Tagen in Kultur wurden von jedem Well die nicht-adhärenen Zellen im Kulturmedium durch Abpipettieren und Zentrifugieren (10min, 3000 rpm, Heraeus Biofuge pico) gewonnen. Nach Resuspension im EBM erfolgten die Zellzählung wie oben beschrieben und die Neuaussaat von je 1×10^6 Zellen in zwei 24-Wells, so dass pro Patient insgesamt 6 Assays durchgeführt wurden. Nach 6-7 weiteren Tagen in Kultur erfolgte die lichtmikroskopische Auszählung des gesamten Wells mit der 100 x und 200 x Vergrößerung. Kolonien wurden dabei als adhärenente Zellaggregate von mehr als 15 Zellen definiert.

3.2.8 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) diente in der vorliegenden Arbeit dazu, die Expression des PPAR- γ in EPCs nachzuweisen. Dazu wurden MNC freiwilliger Probanden für 4 Tage in Selektionsmedium kultiviert. Aus diesen Zellen erfolgten eine Isolation der Gesamt-RNA, eine Reverse Transkription (RT) und schlussendlich die PPAR- γ -PCR.

3.2.8.1 Gesamt-RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das Medium abgesaugt, die Kulturschale mit 1 x PBS gewaschen und 1ml RNA-Pure (Pepqab, Deutschland) zur Zellyse hinzugegeben. Das Zelllysate wurde mit einem Zellschaber gründlich abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Proteine wurden durch Zugabe von 300 μ l Chloroform entfernt. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 4°C für 15 min mit 14000 rpm bildeten sich 3 Phasen aus, von denen die wässrige Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Nach der Zugabe von 400 μ l eisgekühltem Isopropanol wurde die Probe für mindestens 1 Stunde auf -20°C gekühlt und anschließend für 30 min bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 300 μ l eisgekühlten Ethanol (70 % in RNase-freiem Wasser) gewaschen. Eine letzte Zentrifugation bei 4°C für 15 min mit 14000 rpm pelletierte die gewaschene RNA erneut. Nach gründlichem Absaugen des Überstandes erfolgte das Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur für mindestens 30 min. Schließlich wurde die isolierte Gesamt-RNA in 20 μ l RNase-freiem Wasser gründlich resuspendiert und am UV-Photometer (Beckman Coulter DU 730) quantifiziert.

3.2.8.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription diente dazu, aus der Gesamt-RNA von EPCs copy-DNA herzustellen. Der Ansatz für diese Reaktion sah wie folgt aus: 2 μ g Gesamt-RNA (verdünnt ad 12 μ l mit RNase-freiem Wasser) wurden mit 2 μ l 10 x RT-Puffer (Qiagen), 2 μ l dNTP

(5mM, Qiagen), 2µl Random Primer (zufällige Hexamere, Roche), 1µl RNAsin (RNase-Inhibitor, Promega) und 1µl Omniscript RT-Enzym (Qiagen) versehen und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 5 Minuten bei 95°C terminiert und die Proben bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.2.8.3 Polymerase-Kettenreaktion

Neben dem PPAR-γ wurde die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als nicht reguliertes Housekeeping-Gen [105] zur Kontrolle ebenfalls aus jeder RT amplifiziert. Standardmäßig kamen zu 2 µl RT-Produkt jeweils 48 µl des folgenden Mastermixes.

Name der Lösung	Menge	Hersteller
PCR-Mastermix	1 µl Forward Primer	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
	1 µl Reverse Primer	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
	1 µl dNTP (10mM)	Peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland
	5 µl 10 x PCR-Puffer	Peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland
	0,2 µl Taq-Polymerase	Peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland
	39,8 µl Ampuwa	

Ein typischer PCR-Lauf bestand aus der initialen Denaturierungsschritt für 5 min bei 95°C, mehreren PCR-Zyklen (60 sec bei Primer-Annealing-Temperatur, 90 sec bei 72°C und 60 sec bei 95°C) und einer abschließenden Amplifikation (10 min bei 72°C).

Für die GAPDH-PCR wurden 27 Zyklen bei 60°C Primeranlagerungstemperatur verwendet, für PPAR-1 40 Zyklen bei 58°C bzw. 40 Zyklen bei 54°C für PPAR-2. Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die PCRs verwendet:

- 1- PPAR-1 (PCR-Fragment 205 bp, Referenz: [106]):
 PPAR-1 sense: 5'-CTG GCC TCC TTG ATG AAT AA-3'
 PPAR-γ antisense: 5'-GGC GGT CTC CAC TGA GAA TA-3'

2- PPAR-2 (PCR-Fragment 74 bp, Referenz: [107]):

PPAR-2 sense: 5'-AGG GCG ATC TTG ACA GGA AAG-3'

PPAR-2 antisense: 5'-CCC ATC ATT AAG GAA TTC ATG TCA-3'

3- GAPDH-PCR (PCR-Fragment 220 bp, [105])

GAPDH sense: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'

GAPDH antisense: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

Zur Beurteilung der PCR-Ergebnisse erfolgte eine DNA-Gelelektrophorese mit dem PCR-Produkt auf einem 1,2%igen Agarose-Gel (1,2 g Universalagarose, 100ml 1 x TAE-Puffer, 5 µl Ethidiumbromid) in 1 x TAE als Laufpuffer bei 75 V für 30 Minuten. Als DNA-Längenstandard dienten dabei jeweils 5µl 1kbPlus DNA-Ladder (Invitrogen). Abschließend erfolgte die Gelfotografie mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Gene Genius Bio Imaging System, Syngene).

3.2.9 NADPH-Oxidase-Aktivitätsmessung

Zur Untersuchung des Effekts von Pioglitazon auf die NADPH-Oxidase-Aktivität endothelialer Progenitorzellen wurden aus dem Blut freiwilliger Probanden wie oben beschrieben endotheliale Progenitorzellen gewonnen und auf mehrere 6-Well-Platten ausgesät. Nach 4 Tagen wurden zum Kulturmedium entweder 10µl 1 x PBS oder Pioglitazon 10 µM/l gegeben. Nach 24 Stunden erfolgte das Absaugen des Mediums und nach dem Waschen mit 1 x PBS die Ernte der Zellen in 1ml Puffer D (siehe Kap. 3.1.2.3). Nach gleichmäßiger Verteilung dieser Lösung auf drei Eppendorfgefäße wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung für 1 Minute weiter aufgelöst und dann auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte auf 50µl der Probe eine Proteinbestimmung nach LOWRY mit den DC Protein-Assay Reagenz A und Reagenz B (Bio-Rad Laboratories, München) am Beckman Coulter DU 730 Photometer. Zeitgleich zu dieser Messung wurden Puffer B und C auf 37°C aufgewärmt und Puffer A bei Raumtemperatur mit den Proteinaseinhibitoren (Complete, Roche) versetzt. Im

Anschluss erfolgte die Leerwertbestimmung in zwei Schritten am Luminometer (Berthold Lumat).

Leerwert 1: 100µl Puffer A + 500µl Puffer B, Messung für 5 min

Leerwert 2: 100 µl Puffer A + 500µl Puffer B + 100µl Puffer C, Messung für 5 min

Daraufhin erfolgte die Messung der Proben:

Probenleerwert: 250µl Probe + 100µl Puffer A + 500µl Puffer B, Messung für 5 min

Basale NADPH-Oxidase-Aktivität: 250µl Probe + 100µl Puffer A + 500µl Puffer B + 100µl Puffer C, Messung für 10 min

Stimulierte NADPH-Oxidase-Aktivität: Zugabe von 2,5µl Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) zu 250µl Probe, Inkubation für 10 min bei 37°C. Danach Zugabe von 100µl Puffer A + 500µl Puffer B + 100µl Puffer C, Messung für 10 min.

Die Berechnung der NADPH-Oxidase-Aktivität erfolgte dann nach folgender Formel:

$$\text{Quotient} = \frac{\text{Relative Luciferase Units (RLU/s)}}{\text{Proteinkonzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{Volumen im Test (250}\mu\text{l)}}$$

3.2.10 Statistische Analysen

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistische Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Software Graph Pad Prism (Version 3.02, Graph Pad Software Incorporated, San Diego, USA). Dabei wurden p-Werte mit <0.05 als statistisch signifikant bewertet. Je nach Anzahl der analysierten Gruppen wurde ein einfaktorieller, zweiseitiger ANOVA oder ein Student t-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Post-hoc Vergleiche erfolgten mit Hilfe des Bonferroni-Testes, um den Einfluss des multiple testing zu minimieren. Der Intraassay-Variationskoeffizient bei der Quantifizierung der EPC war zwischen den beiden Patientengruppen (Placebo- und Pioglitazon-Gruppe) sowie zwischen beiden Untersuchungsmethoden (CD34⁺/KDR⁺ FACS-Analyse, Di-ac-LDL/Lectin-Färbung)

vergleichbar. Bei der FACS-Analyse betrug er in der Placebo- bzw. der Pioglitazon-Gruppe 28% bzw. 29%. Bei der Di-ac-LDL / Lectin-Färbung betrug er in der Placebo- bzw. der Pioglitazon-Gruppe 29% bzw. 30%. Der direkte Vergleich zwischen der FACS-Analyse und der Di-ac-LDL/Lectin-Färbung erbrachte einen Korrelationskoeffizienten von $R^2=0.54$.

4 ERGEBNISSE

4.1 Pioglitazon führt zur Verminderung von Insulin-Serumkonzentration und HOMA-Index

Die Teilnahme an der Studie erfolgte nach Überprüfung der Einschluss- und Ausschlusskriterien (siehe Kap. 3.2.1). Gescreent wurden ca. 100 konsekutive KHK-Patienten, die auf Grund des Herzkatheterbefundes für die Studie passend waren. Bei ca. einem Drittel der anhand sonstiger klinischer Kriterien für die Studie in Frage kommender KHK-Patienten lag ein bekannter Diabetes mellitus vor, so dass ein Einschluss nicht erfolgen konnte. Abzüglich der Patienten, die eine Studienteilnahme von vorneherein ablehnten, erfolgte insgesamt bei 54 KHK-Patienten ohne einen bekannten Diabetes mellitus ein oraler Glukosetoleranztestes. Dabei zeigte sich bei 18 Patienten eine gestörte Glukosetoleranz, so dass sie von der Studienteilnahme ausgeschlossen wurden. Insgesamt lag also bei einem weiteren Drittel der gescreenten Patienten ein bekannter Diabetes mellitus vor, und bei einem weiteren Drittel wurde eine bisher unbekannte pathologische Glukosetoleranz durch den oralen Glukosetoleranztest aufgedeckt. Schließlich wurden 36 Patienten (25 Männer und 11 Frauen) mit normaler Glukosetoleranz in die Studie eingeschlossen. Sie erhielten zusätzlich zur ihrer optimalen kardialen Medikation (Thrombozytenaggregationshemmer, Betablocker, ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptorblocker, Statin) 45mg Pioglitazon oder Placebo für 30 Tage. Vor dem Beginn der Medikation mit Pioglitazon sowie nach 30 Tagen erfolgte eine venöse Entnahme von 120 ml Blut und direkt im Anschluss die Isolation der mononukleären Zellfraktion. Untersucht wurde die Anzahl und die Funktion von CD34⁺/KDR⁺ endothelialen Progenitorzellen (EPC, Vgl. Kap. 2.4.). Die morphologischen und funktionellen Daten von Patienten der Pioglitazon- und der Placebo-Gruppe sind in der Tabelle 4.1 zu entnehmen. Bezüglich der Patientenmerkmale zeigten sich bei Beginn der Studie keine Unterschiede zwischen der Placebo- und der Pioglitazongruppe. So bestand kein Unterschied in der

Medikation der beiden Gruppen, und diese wurde während der Studiendauer nicht verändert. Bezüglich der Serum-Glukosekonzentration sowie der Lipidkonzentration zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Außerdem hatte die Therapie mit Pioglitazon keinen Einfluss auf deren Spiegel. Rauchende Patienten haben während der Untersuchung ihr Rauchenverhalten nicht verändert.

Bei insgesamt 19 Patienten wurden entweder eine koronare Angioplastie oder eine koronare Stentimplantation durchgeführt (9 davon stammten aus der Pioglitazon-Gruppe und die restlichen 10 aus der Placebo-Gruppe). Es zeigte sich kein Unterschied in der Wirkung von Pioglitazon zwischen Patienten mit und ohne koronare Intervention.

10 Patienten erfüllten die Kriterien der „International Diabetes Federation“ für die Definition des metabolischen Syndroms [103]. 6 davon stammten aus der Placebo-Gruppe und 4 aus der Pioglitazon-Gruppe.

Die Behandlung mit Pioglitazon führte zu einer Beeinflussung des Glukosemetabolismus. So zeigte sich, wie Tab. 4.1 darstellt, dass es in der Pioglitazon-Gruppe nach Behandlung zu einer Verminderung des Serum-Insulinspiegels kam ($p < 0.05$). Auch der „Homeostasis Model Assessment“ (HOMA)-Index wurde durch die Behandlung mit Pioglitazon reduziert.

	Placebo		Pioglitazon		P-Wert
Anzahl der Patienten	17		18		
Geschlecht (männlich / weiblich)	13/4		12/6		n.s.
Alter (Jahre)	63±2.48		55±2.14		n.s.
BMI (kg/m ²)	27±0.94		27±0.77		n.s.
Bluthochdruck	100		78		n.s.
Zigarettenrauchen (aktiv)	24		39		n.s.
Hyperlipidämie	88		88		n.s.
Positive Familienanamnese	35		61		n.s.
Aspirin	100		100		n.s.
B-Blocker	88		89		n.s.
ACE-Hemmer/AT ₁ -Rezeptorantagonisten	94		83		n.s.
Statine	94		94		n.s.
Nitrate	12		11		n.s.
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	P-Wert
Systolischer Blutdruck (mmHg)	141±5.4	135±5.1	136±4.8	134±3.9	n.s.
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	73±2.5	74±3.1	74±2.5	75±2.4	n.s.
Herzfrequenz (min ⁻¹)	64±2.9	63±2.3	63±2.0	63±2.1	n.s.
Nüchtern-Glukose (mg/dl)	100±3.4	103±6.2	97±1.7	90±5.2	n.s.
Serum Insulin (µIU/ml)	10.7±2.1	11.6±2.9	9.6±1.7	5.8±1.3	<0.05
HOMA Index	2.3±0.56	2.4±0.54	2.4±0.39	1.2±0.27	<0.05
Cholesterol (mg/dl)	191±10.2	183±7.5	199±6.8	179±6.7	n.s.
HDL-Cholesterol (mg/dl)	51±3.5	43±2.3	57±3.4	47±3.0	n.s.
LDL-Cholesterol (mg/dl)	116±9.4	109±6.7	119±8.8	116±5.9	n.s.
Triglyceride (mg/dl)	142±12.8	162±20.2	146±16.4	133±10.3	n.s.

Tab. 4.1: Morphologische und funktionelle Daten von Patienten der Pioglitazon- und der Placebo-Gruppe. Anmerkungen: n.s. = nicht significant; BMI = Body mass index; ACE-Hemmer = Angiotensin-converting Enzyme-Hemmstoffe; HOMA = homeostasis model assessment. AT1 = Angiotensin II Rezeptor Typ 1

4.2 Pioglitazon erhöht die Adiponectin-Serumkonzentration

Eine Behandlung mit Glitazonen führt zur Freisetzung bestimmter Fettzellhormone, die zur Gruppe der Adipocytokine gehören [84, 85]. Ein gut untersuchter Vertreter dieser Adipocytokine ist Adiponectin.

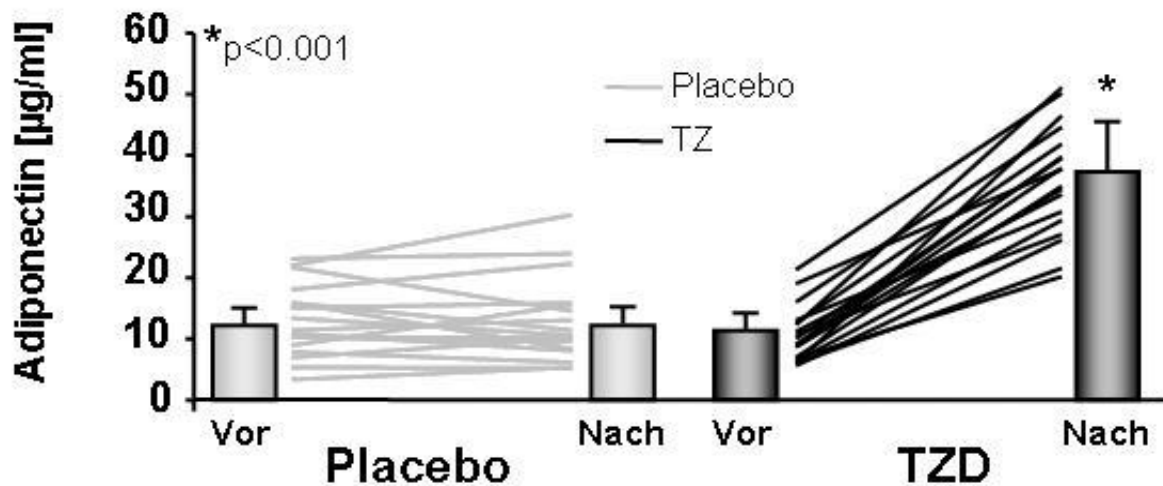


Abb.4.1 Wirkung von Pioglitazon-Behandlung auf den Serumspiegel von Adiponectin nach 30 Tagen Behandlung. Mittelwerte \pm SEM der Adiponectin-Serumkonzentration in der Placebo- und in der Pioglitazon-Gruppe vor und nach 30 Tagen.

Adipocytokine führen zu einer systemischen Sensibilisierung der Organe auf Insulin durch Förderung der Translokation von Glukosetransportern (GLUT4) vom Zytoplasma in die Zellmembran, wodurch die Glukoseaufnahme erleichtert wird. Folge ist eine Verminderung der Insulinresistenz [84]. Der Adiponectinspiegel in der Placebo-Gruppe betrug 12.2 ± 1.2 $\mu\text{g/ml}$ vor und 12.2 ± 1.4 $\mu\text{g/ml}$ nach der Untersuchung (Abb.4.1). In Gegensatz dazu zeigte sich in der Pioglitazon-Gruppe eine Erhöhung von 322% nach 4 Wochen Behandlung (von 11.4 ± 1.1 auf 36.8 ± 2.1 $\mu\text{g/ml}$; $p < 0.001$). Interessanterweise zeigte sich bei jedem Patienten in der Pioglitazon-Gruppe mindestens eine Verdopplung der Adiponectin-Serumkonzentration, jedoch bei keinem Patienten der Placebo-Gruppe. Damit kann angenommen werden, dass die Einnahmetreue der Patienten in der Verumgruppe 100% betrug.

4.3 Pioglitazon senkt die hs-CRP-Serumkonzentration

Das hochsensitive C-Reaktive Protein (hs-CRP) ist ein Marker für vaskuläre Inflammation [108-113]. Veröffentlichungen konnten zeigen, dass hs-CRP einen der stärksten, unabhängigen Prädiktoren für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse darstellt [108]. Außerdem zeigte sich, dass hs-CRP zu einer direkten Beeinträchtigung der EPC-Biologie hinsichtlich der Differenzierung, der Funktion und des Überlebens [112, 113] führt; dies stellt einen potentiellen Mechanismus zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Es ergab sich, dass eine 30-tägige Behandlung mit Pioglitazon zu einer Verminderung der hs-CRP-Serumkonzentration führt (von 3.9 ± 0.7 mg/l zu 1.69 ± 0.3 mg/l; $p < 0.05$, Abb. 4.2). Dagegen war nach einer 30-tägigen Behandlung mit Placebo keine Veränderung der hs-CRP-Serumkonzentration zu beobachten (von 3.8 ± 0.7 mg/l zu 2.9 ± 0.7 mg/l; $p > 0.05$).

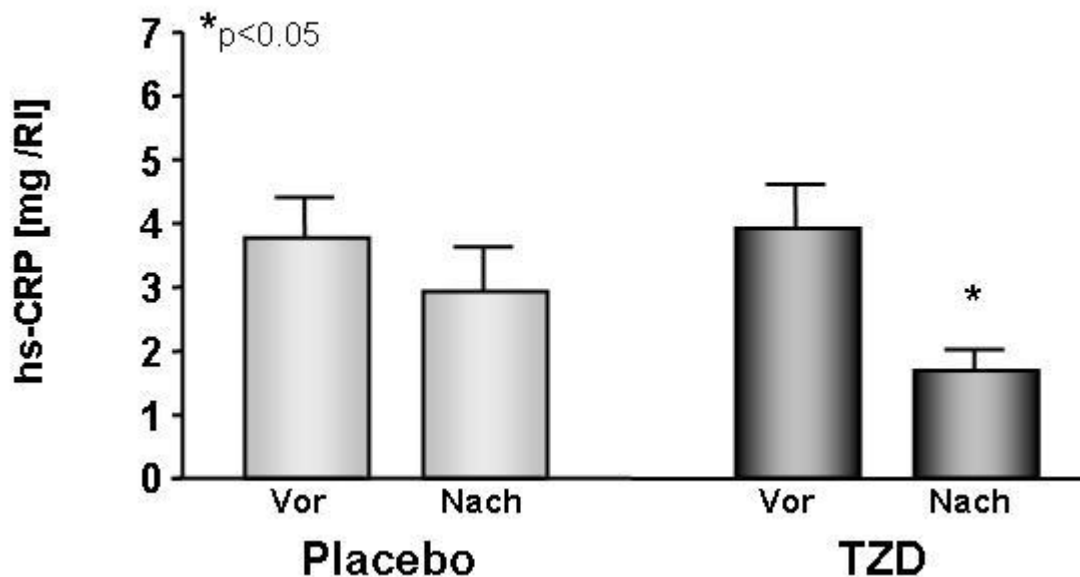


Abb.4.2. Wirkung der Pioglitazon-Behandlung auf die Serumkonzentration von hs-CRP nach 30 Tagen Behandlung. Mittelwerte \pm SEM der hs-CRP-Serumkonzentration in der Placebo- und in der Pioglitazon-Gruppe vor und nach 30 Tagen.

4.4 Pioglitazontherapie führt zur Hochregulation von CD34⁺/KDR⁺ EPC

Die Anzahl und Funktion zirkulierender CD34⁺/KDR⁺ EPCs sind biologische Marker für die vaskuläre Funktion und das kumulative kardiovaskuläre Risiko [47, 72, 73]. Bei KHK-Patienten findet sich eine inverse Korrelation mit der Anzahl koronarer Risikofaktoren und dem Schweregrad der koronaren Herzerkrankung [47, 74]. Eine Behandlung mit Pioglitazon über 30 Tage führte, wie Abb. 4.3. darstellt, zu einer Erhöhung der Anzahl der CD34⁺/KDR⁺ EPCs auf 142% (von 55±5 auf 78±6 / 10⁵ Zellen; p<0.01). Dagegen zeigte sich in der Placebo-Gruppe keine Veränderung. Abb. 4.4 stellt eine repräsentative FACS-Analyse für CD34-FITC⁺/KDR⁺-EPCs im peripheren Blut eines Patienten vor und nach Pioglitazonbehandlung dar.

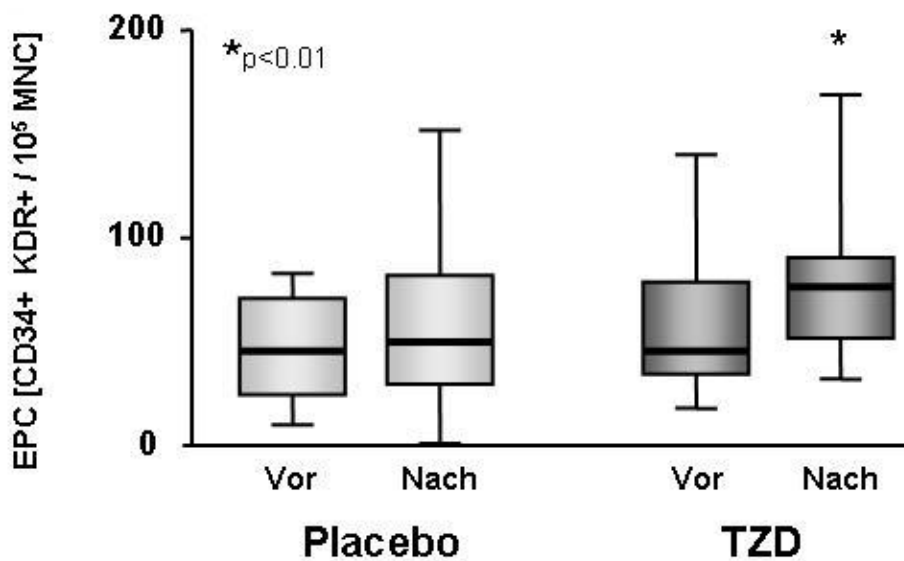


Abb.4.3 Quantifizierung der CD34⁺/KDR⁺ EPCs vor und nach Therapie. Die Box-&-Whisker-Plots zeigen den Median, die Grenzen der 25% und 75%-Quantilen sowie das Maximum und Minimum. *p<0.01 in der Pioglitazon-Gruppe. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmung.

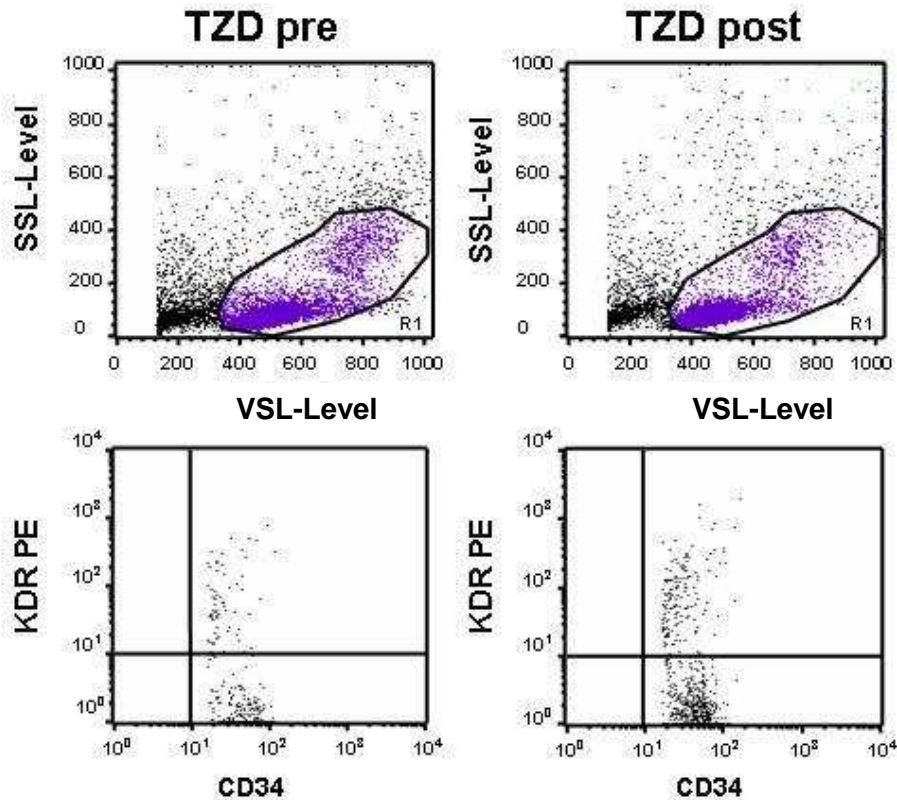


Abb.4.4 Repräsentative Darstellung einer FACS-Analyse mit Scattergramm (obere Reihe) und Analysegate (untere Reihe) von einem Patienten der Pioglitazon-Gruppe: links $CD34^+/KDR^+$ EPC vor Beginn der Behandlung und rechts nach 30 Tagen Behandlung mit Pioglitazon. VSL = Vorwärtsstreulicht; SSL = Seitwärtsstreulicht

4.5 Pioglitazontherapie führt zur Hochregulation der DiLDL+/ Lectin+ EPC

Als zweite etablierte Methode zur Untersuchung der Anzahl und zugleich der Funktion endothelialer Progenitorzellen wurde eine Fluoreszenz-Färbung durchgeführt. Asahara et al. zeigten, dass EPCs durch die Anfärbbarkeit mit *Ulex europaeus Lectin* und durch die Fähigkeit, Di-Acetyliertes Low Density Lipoprotein (Di-ac-LDL) zu phagozytieren, charakterisiert sind [41].

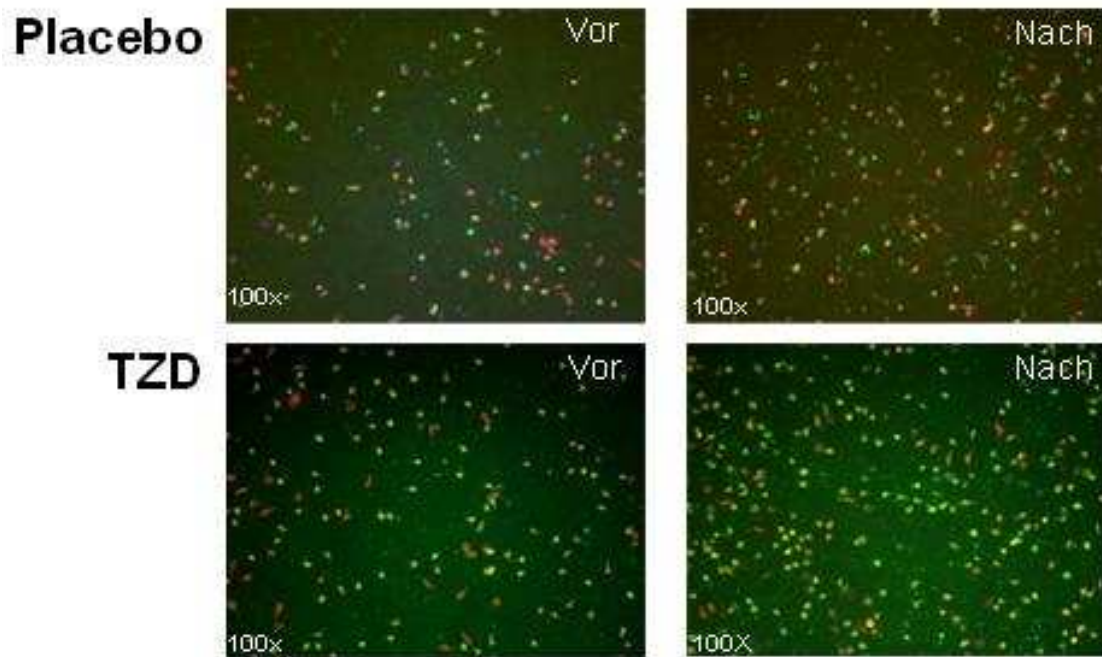


Abb.4.5 Repräsentative fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen Di-ac-LDL⁺/Lectin⁺ EPC eines Patienten der Placebo- bzw. der Pioglitazon-Gruppe (100-fache Vergrößerung) Farben: grün – FITC-Lectin, rot – Di-ac-LDL. Gelb-orange: Doppelt-positive Zellen.

Eine Behandlung mit Pioglitazon bewirkte eine Erhöhung der Di-ac-LDL⁺/Lectin⁺ doppelt-positiven EPC von 86 ± 4 auf 154 ± 5 pro Gesichtsfeld ($p < 0.05$, Abb. 4.5 und 4.6). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Behandlung mit Placebo über 30 Tage keine Veränderung der Anzahl der Di-ac-LDL⁺/Lectin⁺ EPC (Vor der Behandlung 122 ± 5 /Gesichtsfeld; nach der Behandlung 103 ± 4 /Gesichtsfeld; $p > 0.05$).

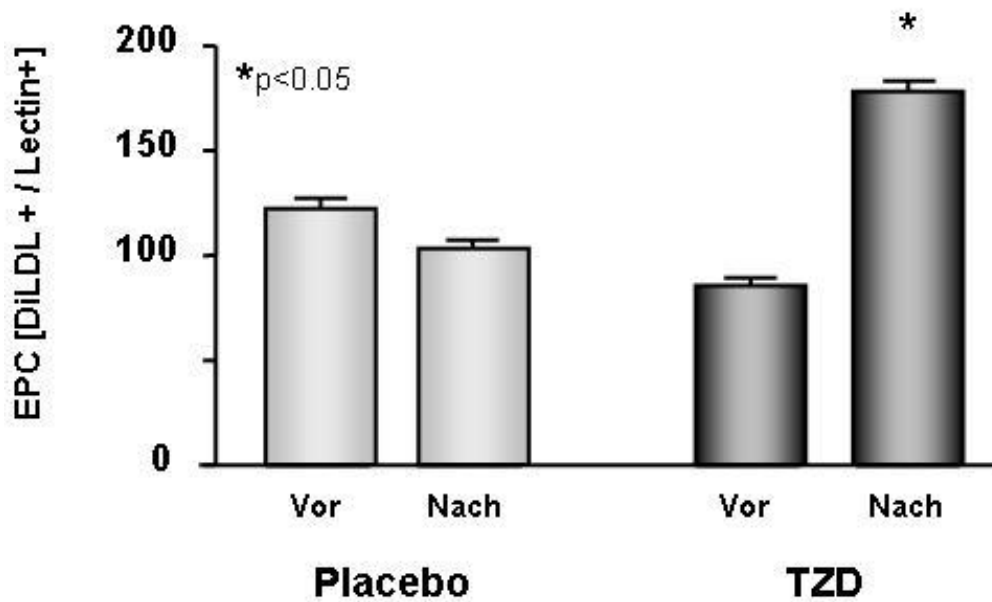


Abb.4.6 Quantifizierung der DiLDL⁺/Lectin⁺ EPCs vor und nach der Therapie. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung. Pro Cover Slip wurden drei repräsentative Gesichtsfelder mittels Lucia G/F Software™ aufgenommen und ausgezählt. Di-ac-LDL = 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-labeled LDL; Lectin = *Ulex europaeus Lectin*. *p<0.05

4.6 Pioglitazontherapie fördert die EPC-Migration

Die Migrationsfähigkeit ist eine zentrale funktionelle Eigenschaft endothelialer Progenitorzellen. Sie ermöglicht diesen eine Extravasation aus dem Blut über die Gefäßwand ins Gewebe. Diese Migrationsfähigkeit kann unabhängig von der Anzahl der endothelialen Progenitorzellen reguliert werden [74]. Stimuli wie Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1) oder Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) triggern die EPC-Migration [74].

Nach 30 Tagen Behandlung mit Placebo zeigte sich keine Veränderung der EPC-Migration ($p>0.05$), während es nach 30 Tagen Behandlung mit Pioglitazon zu einer Verbesserung der EPC-Migration auf $146 \pm 9\%$ des Ausgangswertes kam ($p<0.05$; Abb.4.7 und 4.8.).

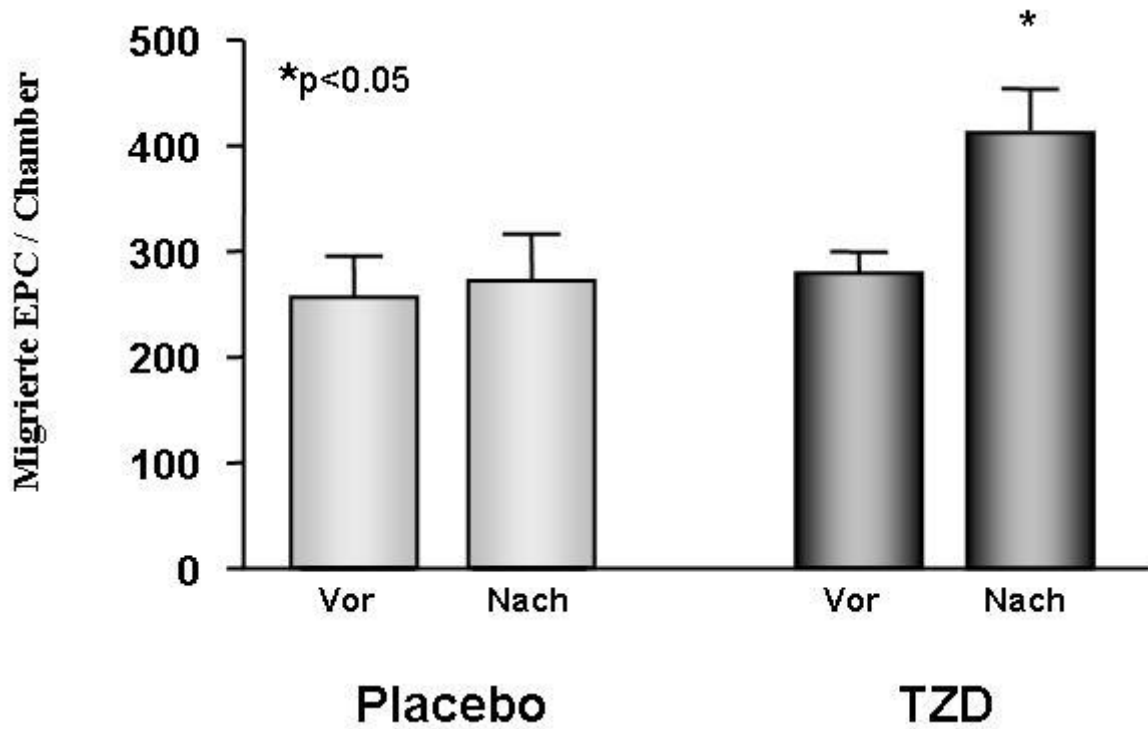


Abb.4.7. Quantitative Darstellung des Effektes von Pioglitazon und Placebo auf die Migrationsfähigkeit der EPC (400fache Vergrößerung) nach Stimulation mit 100 ng/ml SDF-1 in einer modifizierten Boyden-Kammer. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung

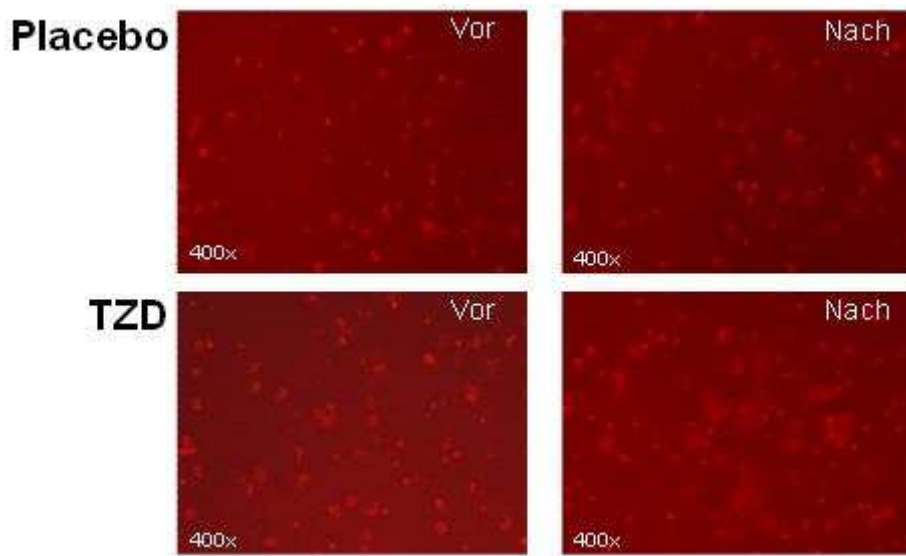


Abb.4.8. Qualitative Darstellung des Effektes von Pioglitazon und Placebo auf die Migrationsfähigkeit der EPC (400fache Vergrößerung) nach Stimulation mit 100 ng/ml SDF-1 in einer modifizierten Boyden-Kammer. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung

4.7 Pioglitazon erhöht die EPC-Proliferation

Die Fähigkeit zur Koloniebildung bzw. zur klonalen Expansion in einem endothel-spezifischen Kulturmedium ist eines der Hauptmerkmale von EPCs. Diese wird durch Auszählen der Kolonien in so genannten HILL-Assay bestimmt [47]. Es zeigte sich keine Veränderung in der Fähigkeit zur Koloniebildung in der Placebo-Gruppe (99 ± 9 CFU vor Behandlung vs 119 ± 8 nach 30 Tagen Behandlung, $p > 0.05$). Jedoch war in der Pioglitazon-Gruppe nach Behandlung eine Steigerung der koloniebildenden Einheiten zu sehen (99 ± 9 CFU vor Behandlung vs $172 \pm 12\%$ nach 30 Tagen Behandlung, $p < 0.001$; Abb.4.9).

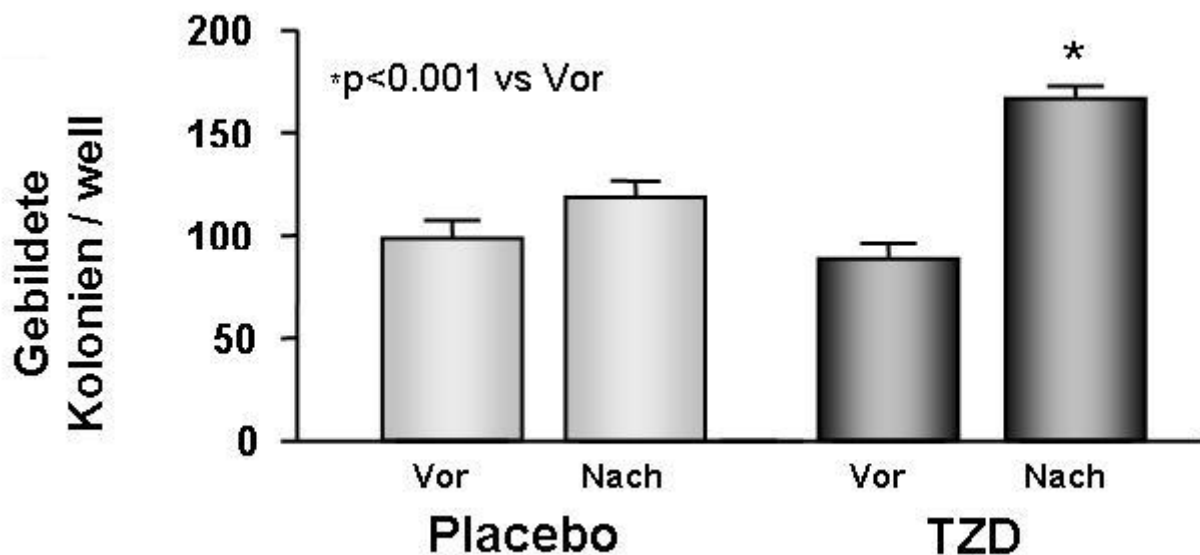


Abb.4.9. Quantitative Darstellung der Wirkung von Pioglitazon bzw. Placebo auf die Fähigkeit der EPCs zur Koloniebildung. Alle Messungen erfolgten als Sechsfachbestimmung.

4.8 Bestimmung der EPC-Apoptose durch FACS-Analyse

Des Weiteren wurde die EPC-Apoptoserate in den Patientenproben untersucht. Im Einzelnen wurden die basale Apoptoserate und die durch oxidativen Stress ausgelöste Apoptoserate mit der in Kap. 3.2.5 beschriebenen Methode des Annexin V-Propidiumiodid-FACS gemessen. Neben unstimulierten EPCs erfolgte die Auslösung von oxidativem Stress durch Hinzugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , $300\mu M$), einem bekannten Induktor der ROS-medierte Zellapoptose. Es zeigte sich in der Pioglitazon-Gruppe eine Reduktion der EPC-Apoptoserate auf im Mittel 81% des Werts vor der Behandlung (Abb. 4.10). Unter *in-vitro* Stimulation mit H_2O_2 war ein Rückgang der Apoptoserate im Mittel auf einen Wert von 69% der Apoptoserate vor der Behandlung mit Pioglitazon zu beobachten. Bei der statistischen Analyse (ANOVA) fand sich aufgrund der starken inter-individuellen Schwankungen kein Unterschied ($p > 0.05$). Dies galt auch für die Messungen der Nekrose mittels Propidiumiodid-FACS.

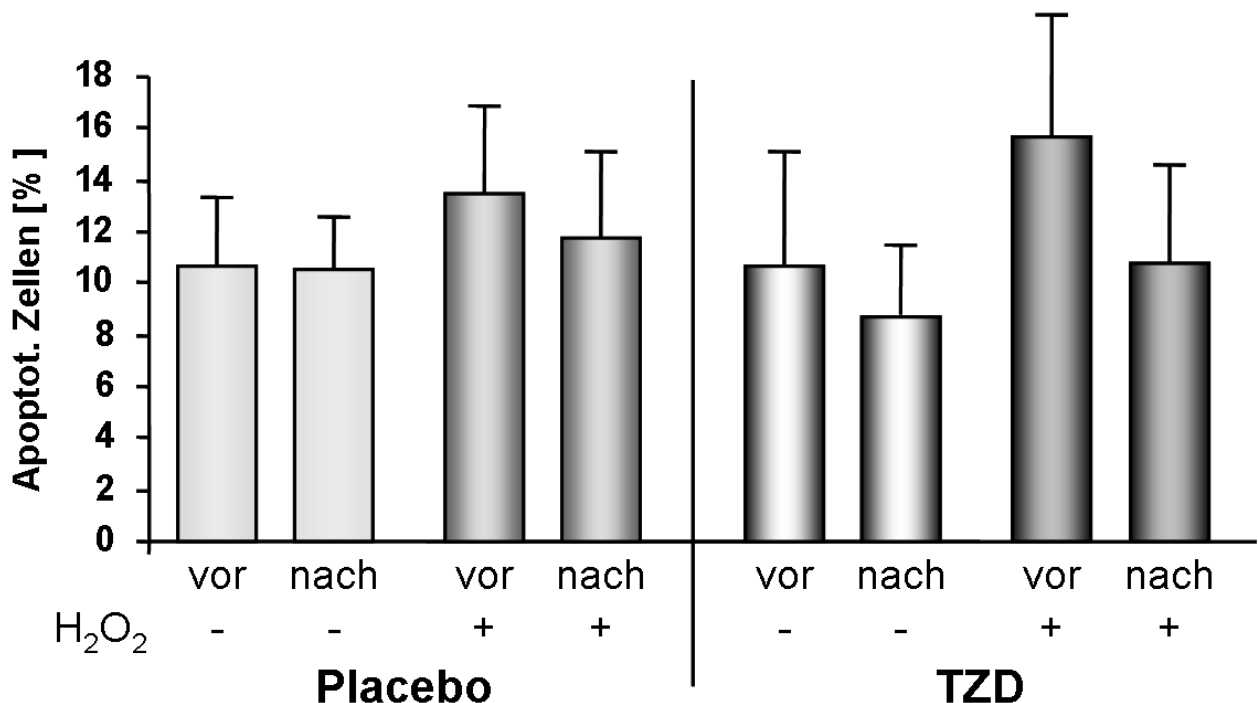


Abb.4.10. Effekt von Placebo bzw. Pioglitazon auf die Apoptoserate von EPC in Zellkultur unter unstimulierten Bedingungen und bei Stimulation mit H_2O_2 für 24 Stunden

4.9 Pioglitazon vermindert die NADPH-Oxidase-Aktivität in-vitro

Unter reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) versteht man Atome, Moleküle oder Substanzen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in ihrer äußersten Hülle aufweisen und sich vom molekularen Sauerstoff ableiten [31]. Viele Quellen können zur Bildung von ROS führen. Die wichtigste Quelle endothelialer ROS-Bildung stellt die vaskuläre NADPH-Oxidase dar [33]. Erhöhte Konzentrationen von ROS führen zu einer Beeinträchtigung der Funktion von EPCs [32, 40]. Zur Untersuchung des Effektes von Pioglitazon auf die NADPH-Oxidase-Aktivität wurden kultivierte EPCs von freiwilligen, gesunden Probanden (n=4) mit Pioglitazon (10 $\mu\text{mol/l}$) über 24 Stunden behandelt. Es zeigte sich eine Verminderung der basalen NADPH-Oxidase-Aktivität von 40 ± 3.29 auf 16 ± 8.34 RLU/ μg . Außerdem konnte Pioglitazon die PMA (Phorbolmyristatazetat) -stimulierte Erhöhung der NADPH-Oxidase-Aktivität vermindern (von 72 ± 5.14 zu 44 ± 5.45 RLU/ μg ; Abb.4.11).

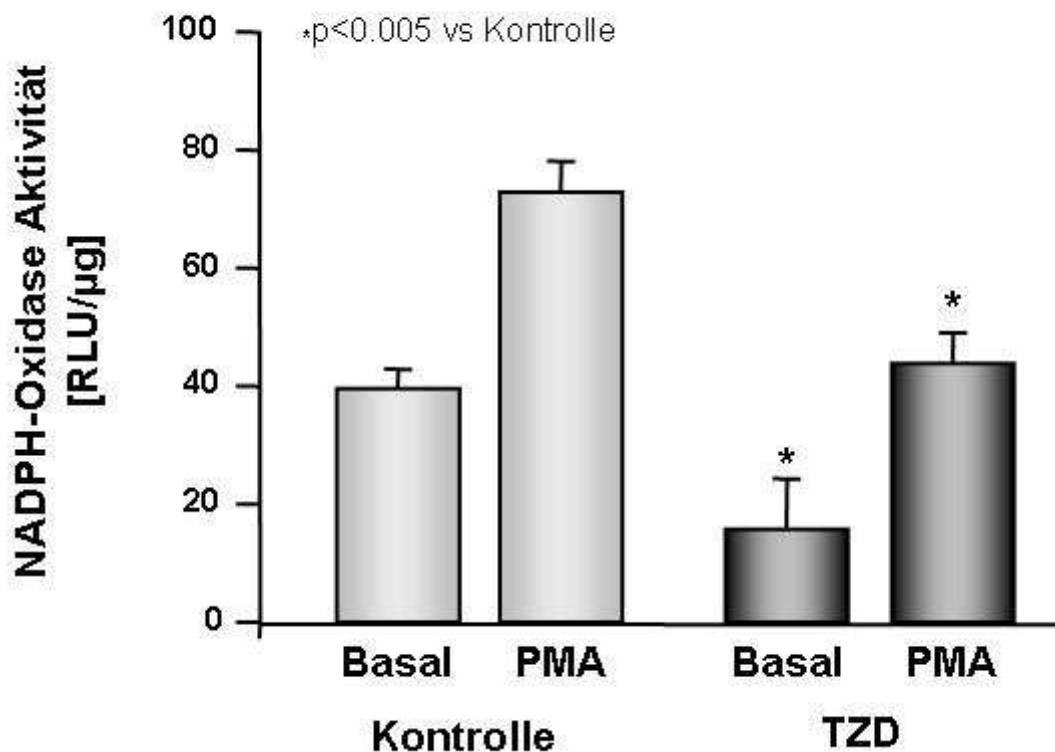


Abb.4.11. Die NADPH-Oxidase Aktivität wurde nach Behandlung von kultivierten EPCs mit Pioglitazon (10 $\mu\text{M/l}$) mittels eines Lucigenin-verstärkten Chemilumineszenz-Assays gemessen. Die basale NADPH-Oxidase Aktivität wurde mit der durch Phorbolmyristatazetat (PMA)-stimulierten NADPH-Oxidase Aktivität verglichen. (n=4, *p<0.05).

4.10 Regulierung der EPC-Anzahl und –Funktion durch PPAR- γ und Adiponectin in-vitro

Untersucht wurde in der Zellkultur, ob die Erhöhung der EPC-Anzahl bzw. die Verbesserung der EPC-Funktion kausal durch den PPAR- γ Agonisten Pioglitazon hervorgerufen werden.

Dazu wurde zunächst mittels einer reversen Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht, ob PPAR- γ in humanen EPCs überhaupt exprimiert wird. Bei der Reaktion wurden zwei verschiedene Primerpaare zum Nachweis eingesetzt (Vgl. 3.2.8.3.). Dabei ließ sich PPAR- γ zweifelsfrei in EPCs nachweisen.

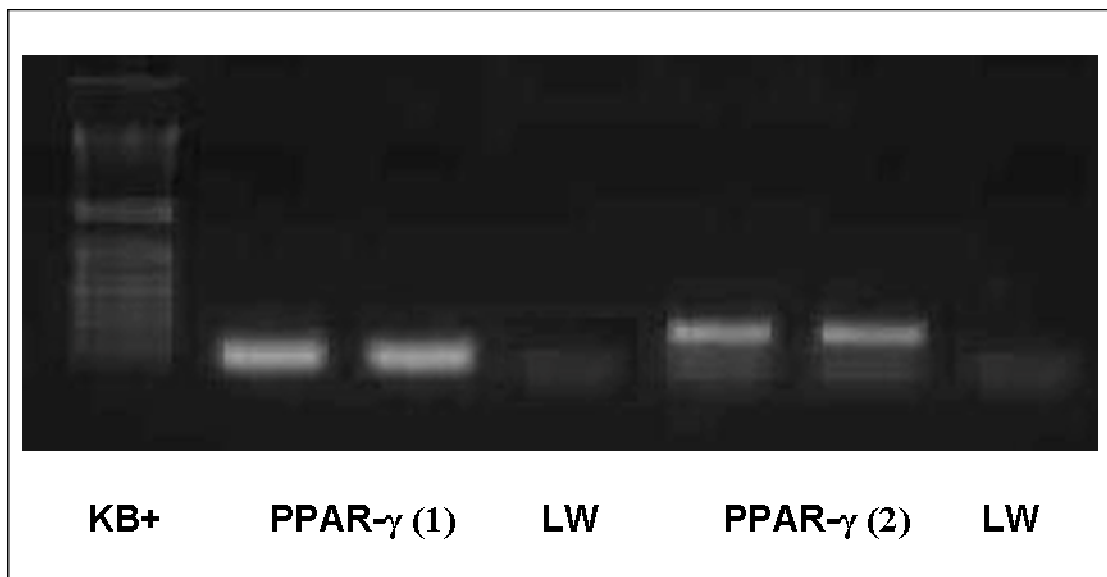


Abb.4.12. Gelelektrophorese der PCR-Proben zum Nachweis der PPAR- γ -Expression in EPCs. KB+ = DNA-Längenstandard. LW=Kontrollprobe mit Mastermix ohne DNA. PPAR- γ (1) bzw (2) = Amplifizierte Fragmente.

In einem zweiten Schritt wurden kultivierte EPCs von gesunden Probanden (n=4) mit Pioglitazon (10 $\mu\text{mol/l}$) allein oder zusätzlich mit dem PPAR- γ -Antagonisten GW9662 (1 $\mu\text{mol/l}$) über 24 Stunden behandelt. Wie Abb.4.13. darstellt, kam es nach alleiniger Behandlung mit Pioglitazon zu einer Erhöhung der EPC-Anzahl auf $189 \pm 15\%$ ($p < 0.05$). Die von Pioglitazon vermittelte Erhöhung der EPC-Anzahl wird vollständig durch den PPAR- γ Antagonist GW9662 gehemmt ($p < 0.05$). Bei einer *in-vitro*-Behandlung von kultivierten EPCs

mit Adiponectin (20µg/ml, 24h) in ähnlichen Konzentrationen wie den in den Patienten gemessenen Konzentrationen nach 30 Tagen Behandlung mit Pioglitazon zeigte sich ein vergleichbarer Anstieg der EPC-Anzahl wie bei der Behandlung mit Pioglitazon *in-vivo*.

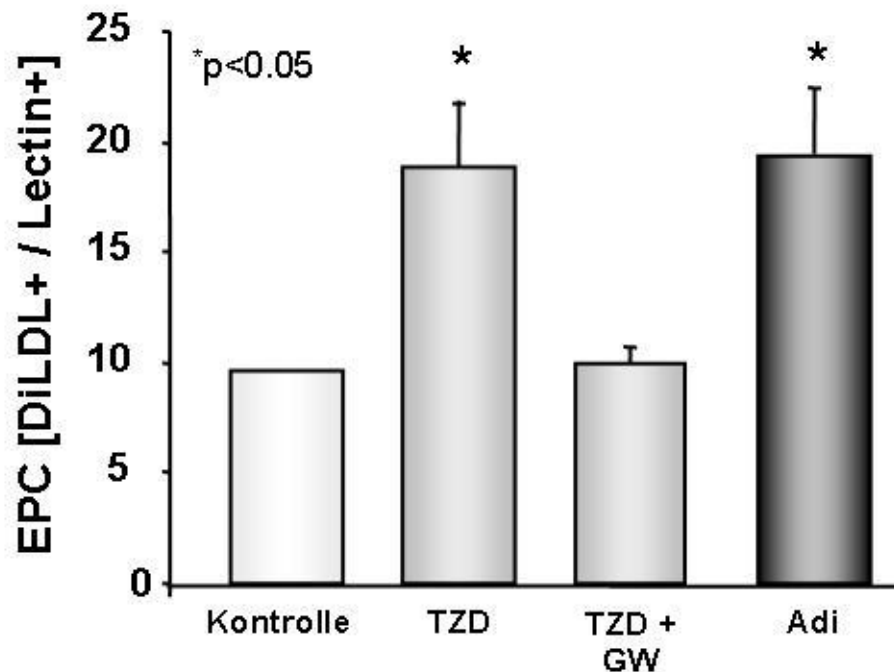


Abb.4.13. Effekte einer 24-stündigen Behandlung von kultivierten EPCs mit Pioglitazon (TZD, 10µM/l), mit dem PPAR γ -Antagonist GW9662 (GW, 1µM/l) und mit Adiponectin (Adi, 20µg/ml); (n=4, *p<0.05). Quantifizierung von DiLDL⁺/Lectin⁺ EPC. DiLDL = 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-labeled LDL; Lectin = *Ulex europaeus lectin*.

Im nächsten Schritt ergab sich, wie Abb.4.14. darstellt, dass die *in-vitro*-Behandlung von kultivierten EPCs mit Pioglitazon (10 µmol/l, 24h) die Migrationsfähigkeit pro Anzahl von EPCs verbessert (158 ±10%, p<0.05). Diese Verbesserung blieb bei einer Co-Stimulation mit dem PPAR- γ Antagonisten GW9662 (1µM/l, 24h) komplett aus. Adiponectin (20 µg/ml) hatte wiederum eine vergleichbare Wirkung auf die EPC-Migration wie Pioglitazon

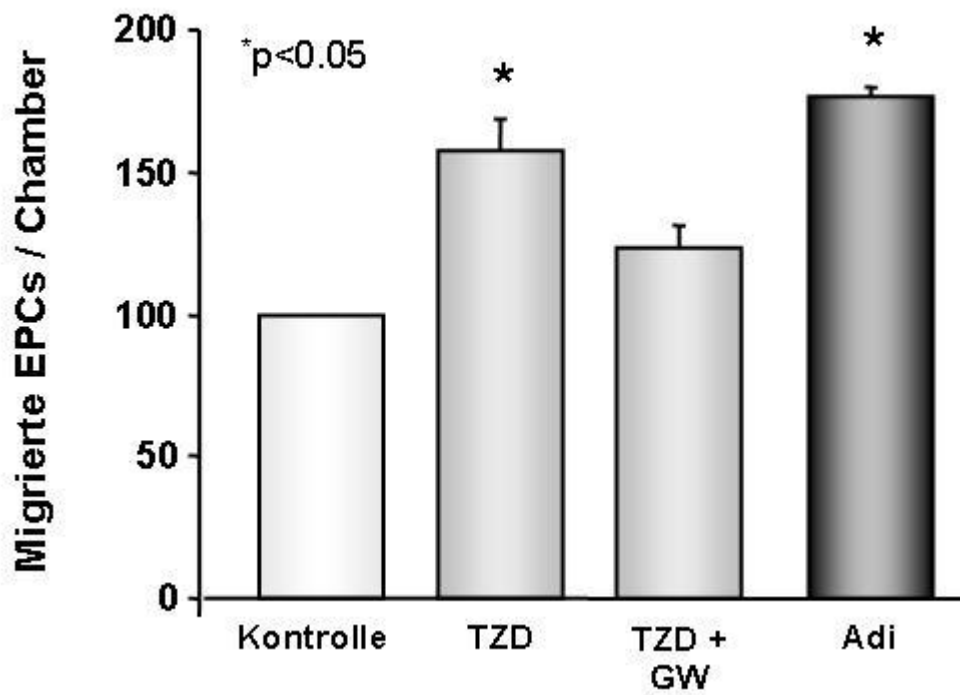


Abb.4.14. Effekte einer 24-stündigen Behandlung kultivierter EPCs mit Pioglitazon (TZD, 10 μ M/l), +/- PPAR γ -Antagonist GW9662 (GW, 1 μ M/l) und mit Adiponectin (Adi, 20 μ g/ml); (n=4, *p<0.05). Die Quantifizierung der migrierten EPCs erfolgte in einer modifizierten Boyden-Kammer nach Stimulation mit 100 ng/ml SDF-1.

5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte klinische Studie an Patienten mit angiographisch nachgewiesener, stabiler koronarer Erkrankung sowie einer normalen Glukosetoleranz durchzuführen, um vom Glukosestoffwechsel unabhängige Effekte des Thiazolidindions Pioglitazon zu untersuchen. Bei allen Patienten erfolgte vor Einschluss in die Studie ein oraler Glukosetoleranztest zum Ausschluss eines Diabetes mellitus. Das zentrale Ergebnis der Arbeit ist, dass die Behandlung mit Pioglitazon zu einer Erhöhung der Anzahl und Verbesserung der Funktion von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen führt. Dieser bislang unbekannte Effekt von Pioglitazon war bei gleichzeitiger optimaler medikamentöser Therapie der KHK, bestehend aus Thrombozytenaggregationshemmern, Betablockern, Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statinen) zu beobachten. Eine weitere Charakterisierung der Effekte in EPC von jungen, gesunden Probanden *in-vitro* ergab, dass Pioglitazon die Aktivität der NADPH-Oxidase reduziert und dass die TZD-induzierten Effekte durch einen PPAR- γ -Antagonisten gehemmt werden.

5.1 Adiponectin ist ein möglicher Mediator der Pioglitazoneffekte auf EPC

Die Bestimmung der Plasma-Adiponectinkonzentration diente primär der Untersuchung der Einnahmetreue, da sich eine gesteigerte Adiponectin-Genexpression und erhöhte Plasma-Adiponectinkonzentration nach Behandlung mit Thiazolidindionen messen lässt [110]. Wir beobachteten bei jedem Patienten der Pioglitazon-Gruppe, jedoch bei keinem Patient der Placebo-Gruppe, mindestens eine Verdopplung der Adiponectinkonzentration. Dieses Ergebnis spricht für eine sehr gute Compliance der Probanden.

Die vaskuloprotektiven Effekte von Adiponectin beruhen wahrscheinlich im Wesentlichen auf der anti-inflammatorischen Wirkung. Es besteht eine inverse Korrelation zwischen

Adiponectin-Plasmakonzentration und C-Reaktivem Protein [114]. Außerdem bewirkt Adiponectin eine verminderte Expression des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α im Fettgewebe und in der Gefäßwand [115]. Ferner zeigt sich in Makrophagen nach Adiponectinstimulation eine verminderte Freisetzung von Interleukin-6 und TNF- α und gleichzeitig eine vermehrte Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-10 [116]. Adiponectin führt auch zu einer verminderten Rekrutierung von T-Lymphozyten in atherosklerotischen Plaques [117]. Die Beteiligung von Adiponectin an der Regulation der Wirkung von Pioglitazon auf die EPC wird bei Betrachtung der Ergebnisse der *in-vitro* Studie in den gesunden Probanden ersichtlich. Diese EPC wurden mit Adiponectin in ähnlicher Konzentration, wie sie in den Patientenserien gemessen worden war, stimuliert. Es zeigte sich ein vergleichbarer Anstieg der EPC-Zahl bzw. -Migrationsfähigkeit wie nach der Pioglitazonbehandlung. Dies spricht für eine kausale regulatorische Rolle von Adiponektin bei den Effekten von Thiazolidindionen auf EPC. Um diese Rolle definitiv von den rein PPAR- γ -abhängigen Effekten abzugrenzen, müsste überprüft werden, ob eine Adiponectinstimulation z.B. auch in PPAR- γ -Knockout-Mäusen einen günstigen Effekt auf EPC hat, oder ob die *in-vitro*-Effekte von Adiponectin durch Ko-Stimulation mit GW9662 blockiert werden können.

5.2 Der anti-inflammatorische Effekt von Pioglitazon zeigt sich in einer Verminderung der hs-CRP-Serumkonzentration

Die Atherosklerose ist nach heutigem Verständnis ein wesentlich durch Inflammationsvorgänge geprägter Prozess [22-26]. Zahlreiche prospektive Studien zeigten, dass das hochsensitive C-Reaktive Protein (hs-CRP) ein unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse bei Individuen ohne bisherige Herzerkrankung ist [108]. Die hs-CRP-Serumkonzentration sagt im Vergleich zum LDL-Plasmaspiegel das Auftreten des ersten kardiovaskulären Ereignisses präziser voraus [109]. Weiterhin ergänzt die hs-CRP-

Plasmakonzentration die prognostische Information des Framingham Scores, der das 10-Jahres-Risiko koronarer Ereignisse mithilfe der LDL-Plasmakonzentration ermittelt [109]. Die „Physicians’ Health Study“ fand eine Korrelation zwischen hohen hs-CRP-Plasmakonzentrationen und einem hohen relativen Risiko für einen Myokardinfarkt bei verschiedenen Plasmakonzentrationen von Gesamt- und HDL-Cholesterin in bislang gesunden Individuen. Aktuelle Untersuchungen konnten hs-CRP direkt in atherosklerotischen Plaques nachweisen [110, 111]. Außerdem zeigte sich eine Beeinträchtigung der Differenzierung, Funktion und des Überlebens von EPCs durch hs-CRP [112, 113], was zusammen mit der endothelialen Dysfunktion einen möglichen Mechanismus der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen darstellt. Unsere Untersuchungen zeigten eine Verminderung des hs-CRP bei normoglykämischen Patienten mit koronarer Herzerkrankungen nach 30 Tagen Behandlung mit Pioglitazon. Interessanterweise ist eine Hemmung der negativen Wirkungen von hs-CRP auf die EPC-Biologie durch den PPAR- γ -Agonist Rosiglitazon bekannt [112, 113]. Da sich in den Patienten der Pioglitazon-Gruppe eine Reduktion der hs-CRP-Serumkonzentration nachweisen ließ, liegt ein vaskulärer anti-inflammatorischer Effekt vor, der potentiell die beobachtete Regulation der EPC beeinflussen könnte. Die Rosiglitazon-vermittelten Wirkungen wurden jedoch bei einer hs-CRP-Konzentration von 15mg/l beobachtet. Diese ist aber höher als der durchschnittliche hs-CRP-Wert unserer Studienpatienten (≤ 5 mg/l), so dass ein entscheidender Effekt der hs-CRP-Senkung auf die EPC-Regulation der Probanden in der Verumgruppe in dieser Studie nicht wahrscheinlich ist.

5.3 Der Einfluss des PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon auf Anzahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen bei KHK-Patienten

Zur Untersuchung der Zahl endothelialer Progenitorzellen werden unterschiedliche Messverfahren eingesetzt. Zum einen erfolgt die Quantifizierung von Oberflächenmarkern der

Zellen mit fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS). Hier wurden gezielt die Marker CD34+ / KDR+ ausgewählt, weil bekannt ist, dass die Zahl dieser EPC-Subpopulation kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung voraussagt. Die Endothelial Progenitor Cells in Coronary Artery Disease (EPCAD)-Studie zeigte eine Korrelation zwischen der Zahl CD34+/KDR+ EPC und kardiovaskulärer Mortalität, und zwar unabhängig vom Schweregrad der KHK, den kardiovaskulären Risikofaktoren und der kardialen Medikation [72]. Darüber hinaus war der Schweregrad der KHK invers mit der EPC-Zahl korreliert. Als zweite Methode zur Quantifizierung von EPCs erfolgte die Di-ac-LDL-Lectin-Färbung[41]. In einer dritten, etablierten Methode wurde die Anzahl der koloniebildenden EPC in Kultur mit dem so genannten Hill-Assay [47] quantifiziert. In den drei voneinander unabhängigen Messmethoden zur Quantifizierung von EPC zeigte sich ein robuster Anstieg der EPC-Zahl nach 30 Tagen Pioglitazonbehandlung.

Neben der EPC-Zahl hat die EPC-Funktion einen entscheidenden Einfluss auf die Gefäßfunktion und kardiovaskuläre Ereignisse [47, 72]. Die Beeinträchtigung der EPC-Funktion bei kardiovaskulären Erkrankungen ist teilweise unabhängig von der direkten EPC-Zahl [64]. In Mäusen und kultivierten humanen EPC führt eine Behandlung mit Pioglitazon zur Senkung der EPC-Apoptoserate [101]. Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid oder Superoxidanionen führen zur Beeinträchtigung der Funktion von reifen und unreifen EPCs beispielsweise durch Förderung der EPC-Apoptose [40]. Von den vaskulären ROS-Quellen stellt die NADPH-Oxidase die wichtigste Quelle endothelialer ROS-Produktion dar [33]. Unsere *in-vitro*-Untersuchungen an EPC gesunder Spender zeigten eine Pioglitazon-induzierte Verminderung sowohl der basalen als auch den PMA-induzierten Steigerung der NADPH-Oxidase-Aktivität in EPCs *in-vitro*. Da EPC empfindlich auf oxidativen Stress reagieren, ist dies ein möglicher Mechanismus des Anstiegs der EPC-Anzahl unter der TZD-Behandlung in den KHK-Patienten, da bei diesen infolge der vaskulären Inflammation erhöhte ROS-Spiegel vorliegen können. Zwei wichtige funktionelle

Charakteristika von EPCs sind ihre Migrationsfähigkeit sowie ihre Fähigkeit zur Bildung proliferierender Klone bzw. klonalen Expansion. Diese beiden Charakteristika haben eine nachgewiesene Rolle in der Regulation der endothelialen Funktion bzw. der Neoangiogenese sowie in der Hemmung der Atherosklerose [42]. Die vorliegende Arbeit zeigt eine Verbesserung sowohl der Migrationsfähigkeit als auch der Fähigkeit zur Bildung von Kolonien bei KHK-Patienten mit normaler Glukosetoleranz. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass die Wirkung von Pioglitazon auf die EPC-Biologie weit über den Anstieg der EPC-Zahl allein hinaus reicht. Sowohl der Anstieg der EPC-Zahl als auch die verbesserte EPC-Migration werden kausal durch PPAR- γ vermittelt, weil diese Effekte durch den PPAR- γ -Antagonisten GW9662 blockiert werden können.

5.4 Diabetes mellitus, kardiovaskuläres Risiko und Glitazontherapie

Kardiovaskuläre Komplikationen machen etwa 70% der Mortalität bei Patienten mit Diabetes mellitus aus, und prospektive Studien zeigen ein deutlich erhöhtes relatives Risiko für kardiovaskuläre Mortalität bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern (2-3-fach erhöht bei Männern, 3-4-Fach erhöht bei Frauen). Eine gute Stoffwechseleinstellung bewirkt eine Reduktion der kardiovaskulären Ereignisse bei Diabetikern. Zahlreiche Studien erbrachten, dass eine darüber hinausgehende optimale Einstellung des arteriellen Blutdrucks und des LDL-Spiegels <100 mg/dl zu einer weiteren Verminderung des kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit Diabetes mellitus führt [103, 104]. Jedoch bleibt das residuale Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern selbst bei optimaler Kontrolle aller kardiovaskulären Risikofaktoren signifikant erhöht [103, 104]. Ein großes Problem ist die hohe Dunkelziffer des Typ II-Diabetes. Dieses bekannte Phänomen wurde auch in der vorliegenden Studie widerspiegelt, da von allen gescreenten Patienten ca. ein Drittel einen bekannten Diabetes mellitus hatte und bei einem weiteren

Drittel (18 von 54 Patienten) eine pathologische Glukosetoleranz im Rahmen des vor der Studie durchgeführten oralen Glukosetoleranztests diagnostiziert wurde.

Die günstige Wirkungen von Glitazonen sind nicht nur auf die Insulinsensibilisierung der peripheren Gewebe beschränkt, sondern betreffen infolge der großen Zahl der durch den PPAR- γ -Rezeptor regulierten Gene auch den Lipidstoffwechsel und den vaskulären Inflammationsprozess sowie die kardiovaskuläre Funktion. Dies wurde experimentell und in Studien bei gesunden Probanden mit normaler Glukose-Toleranz gezeigt [78, 99, 118]. Die PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events (PROACTIVE) Studie ist die bislang größte randomisierte, kontrollierte klinische Endpunktstudie, die die Effekte von Pioglitazon bei 5.238 (2.633 Placebo, 2.605 Pioglitazon) Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und diabetischer Makroangiopathie untersuchte [119]. In der Studie zeigte sich, dass eine Behandlung mit Pioglitazon zu einer signifikanten Verminderung von Myokardinfarkten und Schlaganfällen führt. Patienten in der Pioglitazon-Gruppe zeigten neben einem verbesserten metabolischen Profil (bezüglich Glukosespiegel, HDL-Cholesterin und Triglyzeride) auch ein verbessertes Blutdruck-Profil am Ende der Untersuchung.

Diabetes führt unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren zu einer EPC-Funktionseinschränkung [58, 74]. Ausgehend von unserer Studie könnte man postulieren, dass KHK-Patienten mit und ohne Diabetes mellitus durch eine Behandlung mit dem PPAR- γ -Agonisten Pioglitazon neben dem Anstieg der Insulinsensibilität einen prognostischen Gewinn durch die günstige Wirkung auf die EPC-Biologie haben könnten. Größere randomisierte kontrollierte klinische Studien mit harten klinischen Endpunkten wie Freiheit von Revaskularisation und kardiovaskuläre Mortalität sind notwendig, um diese Hypothese zu verifizieren.

5.5 Limitationen der Studie und klinische Perspektive

Die Studie erlaubt aufgrund der kurzen Studiendauer keine Aussage darüber, ob eine Pioglitazonbehandlung von normoglykämischen Patienten mit KHK langfristig zur Verminderung kardiovaskulärer Ereignisse führt. Außerdem bleiben auf Grund der gewählten Zeitpunkte die Kinetik der beobachteten Effekte und die langfristigen Auswirkungen einer Pioglitazontherapie auf die EPC ungewiss. Schließlich ist die Aufklärung der intrazellulären Signalprozesse, die die Wirkung von Thiazolidindionen auf EPC vermitteln, noch unvollständig. Diese offenen Punkte sollten Inhalt weiterer Studien werden.

Die Nüchtern-Glukosekonzentration und das Lipidprofil blieben von der 30-tägigen Pioglitazontherapie in diesem nicht-diabetischen Patientenkollektiv zwar unbeeinflusst, aber die TZD-Behandlung verminderte die Nüchtern-Insulinkonzentration und den HOMA-Index. Dies zeigt, dass Pioglitazon auch den Stoffwechsel von normoglykämischen Patienten günstig beeinflusst, so dass nicht auszuschließen ist, dass die beobachtete EPC-Regulation teilweise von metabolischen Phänomenen mitbestimmt wurde.

In Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie unter Berücksichtigung früherer Studien stellt sich die Frage, ob PPAR- γ -Agonisten auch für die Behandlung von Patienten mit vaskulären Erkrankungen und normaler Glukosetoleranz geeignet wären, etwa bei normoglykämischen Patienten mit stabiler koronaren Herzerkrankung. Insofern könnte die vorliegende Studie eine Basis für weiterführende Untersuchungen darstellen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):233-41.
2. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J, 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1961 Jul;55:33-50.
3. Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Salas-Salvado J, Ruiz-Gutierrez V, Covas MI, Fiol M, Gomez-Gracia E, Lopez-Sabater MC, Vinyoles E, Aros F, Conde M, Lahoz C, Lapetra J, Saez G, Ros E. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2006 Jul 4;145(1):1-11.
4. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000 Nov 10;87(10):840-4.
5. Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation*. 1997 Jul 15;96(2):379-82.
6. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998 Mar 31;97(12):1129-35.
7. Karter Y, Aydin S, Curgunlu A, Uzun H, Erturk N, Vehid S, Kutlu A, Simsek G, Yucel R, Arat A, Ozturk E, Erdine S. Endothelium and angiogenesis in white coat hypertension. *J Hum Hypertens*. 2004 Nov;18(11):809-14.
8. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med*. 2000 Mar;247(3):349-58.
9. Orford JL, Selwyn AP, Ganz P, Popma JJ, Rogers C. The comparative pathobiology of atherosclerosis and restenosis. *Am J Cardiol*. 2000 Aug 24;86(4B):6H-11H.
10. Gimbrone MA, Jr., Resnick N, Nagel T, Khachigian LM, Collins T, Topper JN. Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Apr 15;811:1-10; discussion -1.

11. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000 Feb;190(3):244-54.
12. Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res.* 2001 May 11;88(9):877-87.
13. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao, JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995 Jul;96(1):60-8.
14. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001 Nov 27;104(22):2673-8.
15. Schächinger V, Zeiher AM. Prognostic implications of endothelial dysfunction: does it mean anything? *Coron Artery Dis.* 2001 Sep;12(6):435-43.
16. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004 Nov;287(5):R1014-30.
17. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem.* 1997 Aug 22;272(34):20963-6.
18. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001 Apr 17;103(15):1955-60.
19. Mehta JL. Oxidized or native low-density lipoprotein cholesterol: which is more important in atherogenesis? *J Am Coll Cardiol.* 2006 Sep 5;48(5):980-2.

20. Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem.* 1995 Jun 9;270(23):14214-9.
21. Tsao PS, Wang B, Buitrago R, Shyy JY, Cooke JP. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation.* 1997 Aug 5;96(3):934-40.
22. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):868-74.
23. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115-26.
24. Plutzky J. The vascular biology of atherosclerosis. *Am J Med.* 2003 Dec 8;115 Suppl 8A:55S-61S.
25. Schwartz SM. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest.* 1997 Jun 15;99(12):2814-6.
26. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001 Jul 17;104(3):365-72.
27. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000 Nov;49(11):1939-45.
28. Kashiwagi A, Shinozaki K, Nishio Y, Maegawa H, Maeno Y, Kanazawa A, Kojima H, Haneda M, Hidaka H, Yasuda H, Kikkawa R. Endothelium-specific activation of NAD(P)H oxidase in aortas of exogenously hyperinsulinemic rats. *Am J Physiol.* 1999 Dec;277(6 Pt 1):E976-83.
29. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 May;280(5):E685-94.

30. Peluffo G, Calcerrada P, Piacenza L, Pizzano N, Radi R. Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Jun;296(6):H1781-92.
31. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(32):47-95.
32. Wang X, Chen J, Tao Q, Zhu J, Shang Y. Effects of ox-LDL on number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *Drug Chem Toxicol*. 2004 Aug;27(3):243-55.
33. Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)*. 2005 Sep;109(3):217-26.
34. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Aug;285(2):R277-97.
35. Griending KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994 Jun;74(6):1141-8.
36. Fleming I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis. *Circ Res*. 2001 Oct 26;89(9):753-62.
37. Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation*. 2002 Jul;9(3):161-75.
38. Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. *J Physiol Pharmacol*. 2002 Dec;53(4 Pt 1):515-24.

39. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003 Apr;111(8):1201-9.
40. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003 Nov;9(11):1370-6.
41. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
42. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med.* 2004 Nov;14(8):318-22.
43. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med.* 2004 Oct-Dec;8(4):498-508.
44. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999 Aug 6;85(3):221-8.
45. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood.* 2000 May 15;95(10):3106-12.
46. Rosenzweig A. Endothelial progenitor cells. *N Engl J Med.* 2003 Feb 13;348(7):581-2.
47. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003 Feb 13;348(7):593-600.

48. Zhu S, Liu X, Li Y, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C. Aging in the atherosclerosis milieu may accelerate the consumption of bone marrow endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jan;27(1):113-9.
49. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2005 May 3;45(9):1441-8.
50. Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 2005 Oct;23(10):1831-7.
51. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens.* 2005 Jan;23(1):97-104.
52. Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis.* 2006 Aug;187(2):423-32.
53. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Aug;24(8):1442-7.
54. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. 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 Oct 1;22(10):1567-72.
55. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest.* 2001 Aug;108(3):391-7.

56. Noor R, Shuaib U, Wang CX, Todd K, Ghani U, Schwindt B, Shuaib A. High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis. *Atherosclerosis*. 2007 May;192(1):92-9.
57. Tso C, Martinic G, Fan WH, Rogers C, Rye KA, Barter PJ. High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 May;26(5):1144-9.
58. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002 Nov 26;106(22):2781-6.
59. Krankel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Apr;25(4):698-703.
60. Fadini GP, Miorin M, Facco M, Bonamico S, Baesso I, Grego F, Menegolo M, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May 3;45(9):1449-57.
61. Scheubel RJ, Kahrstedt S, Weber H, Holtz J, Friedrich I, Borgermann J, Silber RE, Simm A. Depression of progenitor cell function by advanced glycation endproducts (AGEs): potential relevance for impaired angiogenesis in advanced age and diabetes. *Exp Gerontol*. 2006 May;41(5):540-8.
62. Waltenberger J. Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. *Cardiovasc Res*. 2001 Feb 16;49(3):554-60.
63. Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, Grego F, de Kreutzenberg SV, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Sep;26(9):2140-6.

64. Wang CH, Ting MK, Verma S, Kuo LT, Yang NI, Hsieh IC, Wang SY, Hung A, Cherng WJ. Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus. *Am Heart J.* 2006 Dec;152(6):1051 e1-8.
65. Kusuyama T, Omura T, Nishiya D, Enomoto S, Matsumoto R, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. Effects of treatment for diabetes mellitus on circulating vascular progenitor cells. *J Pharmacol Sci.* 2006 Sep;102(1):96-102.
66. Fadini GP, de Kreutzenberg SV, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A. Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2006 Sep;27(18):2247-55.
67. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 2004 Jan 20;109(2):220-6.
68. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, Böhm M, Kindermann W, Nickenig G. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005 Aug;12(4):407-14.
69. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation.* 2003 Jun 24;107(24):3059-65.
70. Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2005 Aug;181(2):305-10.
71. Hamada H, Kim MK, Iwakura A, Ii M, Thorne T, Qin G, Asai J, Tsutsumi Y, Sekiguchi H, Silver M, Wecker A, Bord E, Zhu Y, Kishore R, Losordo DW. Estrogen

receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction. *Circulation*. 2006 Nov 21;114(21):2261-70.

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

73. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*. 2005 Jun 7;111(22):2981-7.

74. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001 Jul 6;89(1):E1-7.

75. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):702-12.

76. Schächinger V, Assmus B, Honold J, Lehmann R, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin Res Cardiol*. 2006 Jan;95(1):13-22.

77. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*. 2003 Jul 25;93(2):e17-24.

78. Pistrosch F, Passauer J, Fischer S, Fuecker K, Hanefeld M, Gross P. In type 2 diabetes, rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction independent of glucose control. *Diabetes Care*. 2004 Feb;27(2):484-90.

79. Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem.* 1995 Aug 18;270(33):19269-76.
80. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):12953-6.
81. Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol.* 2000 Mar;129(5):823-34.
82. Marx N. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and atherosclerosis. *Curr Hypertens Rep.* 2002 Feb;4(1):71-7.
83. Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga J, Gotoda T, Kitamine T, Tamura Y, Okazaki H, Yahagi N, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Shimano H, Nagai R. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Mar;21(3):372-7.
84. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):581-9.
85. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes.* 2001 Sep;50(9):2094-9.
86. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 May;86(5):1930-5.

87. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1779-85.
88. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):79-82.
89. Jackson SM, Parhami F, Xi XP, Berliner JA, Hsueh WA, Law RE, Derner LL. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Sep;19(9):2094-104.
90. Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grub M, Koenig W, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res*. 2002 Apr 5;90(6):703-10.
91. Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2002 Aug 6;106(6):679-84.
92. Marx N, Froehlich J, Siam L, Ittner J, Wierse G, Schmidt A, Scharnagl H, Hombach V, König W. Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb 1;23(2):283-8.
93. Pfutzner A, Marx N, Lubben G, Langenfeld M, Walcher D, Konrad T, Forst T. Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from glycemic control: results from the pioneer study. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Jun 21;45(12):1925-31.
94. Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jan 1;23(1):52-7.

95. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2000 Oct 10;102(15):1834-9.
96. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000 Aug;106(4):523-31.
97. Wang CH, Ciliberti N, Li SH, Szmitko PE, Weisel RD, Fedak PW, Al-Omran M, Cherng WJ, Li RK, Stanford WL, Verma S. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy. *Circulation*. 2004 Mar 23;109(11):1392-400.
98. Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, Richter S, Passauer J, Fischer S, Gross P. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2005 Nov;183(1):163-7.
99. Marx N, Wohrle J, Nusser T, Walcher D, Rinker A, Hombach V, König W, Hoher M. Pioglitazone reduces neointima volume after coronary stent implantation: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial in nondiabetic patients. *Circulation*. 2005 Nov 1;112(18):2792-8.
100. Takagi T, Yamamuro A, Tamita K, Yamabe K, Katayama M, Mizoguchi S, Ibuki M, Tani T, Tanabe K, Nagai K, Shiratori K, Morioka S, Yoshikawa J. Pioglitazone reduces neointimal tissue proliferation after coronary stent implantation in patients with type 2 diabetes mellitus: an intravascular ultrasound scanning study. *Am Heart J*. 2003 Aug;146(2):E5.
101. Gensch C, Clever YP, Werner C, Hanhoun M, Böhm M, Laufs U. The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis*. 2007 May;192(1):67-74.
102. Kalaitzidis RG, Sarafidis PA, Bakris GL. Effects of thiazolidinediones beyond glycaemic control. *Curr Pharm Des*. 2009;15(5):529-36.

103. Kerner W, Brückel J, Böhm B. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Evidenzbasierte Leitlinie DDG. 2004.
104. Olufadi R, Byrne CD. Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome. *J Clin Pathol*. 2008 Jun;61(6):697-706.
105. Solch JP, Arnold GJ. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction combined with temperature gradient gel electrophoresis as a tool for the normalized quantitation of intrinsic factor mRNA. *Electrophoresis*. 1996 Jan;17(1):30-9.
106. Emery MN, Leontiou C, Bonner SE, Merulli C, Nanzer AM, Musat M, Galloway M, Powell M, Nikookam K, Korbonits M, Grossman AB. PPAR-gamma expression in pituitary tumours and the functional activity of the glitazones: evidence that any anti-proliferative effect of the glitazones is independent of the PPAR-gamma receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Sep;65(3):389-95.
107. She QM, Zhao J, Wang XL, Zhou CM, Shi XZ. Effect of dexamethasone on peroxisome proliferator activated receptor-gamma mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes with the human recombinant adiponectin. *Chin Med J (Engl)*. 2007 Jan 20;120(2):155-8.
108. König W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, Hutchinson WL, Pepys MB. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation*. 1999 Jan 19;99(2):237-42.
109. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2002 Nov 14;347(20):1557-65.
110. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, König W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Sep;20(9):2094-9.

111. Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher AM. Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2000 Aug 29;102(9):1000-6.
112. Fujii H, Li SH, Szmitko PE, Fedak PW, Verma S. C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Nov;26(11):2476-82.
113. Verma S, Kuliszewski MA, Li SH, Szmitko PE, Zucco L, Wang CH, Badiwala MV, Mickle DA, Weisel RD, Fedak PW, Stewart DJ, Kutryk MJ. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function: further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2058-67.
114. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, Okamoto Y, Ohashi K, Nagaretani H, Kishida K, Nishizawa H, Maeda N, Kobayashi H, Hiraoka H, Matsuzawa Y. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation*. 2003 Feb 11;107(5):671-4.
115. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N, Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002 Nov 26;106(22):2767-70.
116. Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2046-9.
117. Okamoto Y, Folco EJ, Minami M, Wara AK, Feinberg MW, Sukhova GK, Colvin RA, Kihara S, Funahashi T, Luster AD, Libby P. Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. *Circ Res*. 2008 Feb 1;102(2):218-25.

118. Horio T, Suzuki M, Takamisawa I, Suzuki K, Hiuge A, Yoshimasa Y, Kawano Y. Pioglitazone-induced insulin sensitization improves vascular endothelial function in nondiabetic patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2005 Dec;18(12 Pt 1):1626-30.

119. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefebvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Koranyi L, Laakso M, Mokan M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Schernthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2005 Oct 8;366(9493):1279-89.

7 DANKSAGUNG UND PUBLIKATIONEN

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Laufs für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas und seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung in allen Abschnitten der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Christian Werner. Jederzeit gewährte er mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Seine wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen. Dankbar anerkennen will ich auch seine immer freundliche, uneingeschränkte und geduldige Hilfsbereitschaft

Herrn Prof. Dr. med. Michael Böhm danke ich für die Möglichkeit, die vorliegenden Experimente in dem Labor der Klinik III für Innere Medizin der Universität des Saarlandes durchführen zu können.

Ebenso bin ich Frau Simone Jäger, Frau Ellen Becker und Frau Bianca Werner für die unermüdliche, freundliche und professionelle Einarbeitung in die notwendige Methodik äußerst dankbar.

Für das sehr angenehme und gute Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Doktoranten, Ärzten und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors ganz herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine liebe Familie, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen. Ganz besonderen Dank an meine lieben Eltern dafür, dass Sie immer das Beste für meine Geschwister und mich tun und alles Erdenkliche bereit sind, dafür zu geben.

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit ist folgende Originalpublikation entstanden:

Werner C, Kamani CH, Gensch C, Böhm M, Laufs U. The PPAR-gamma Agonist Pioglitazone Increases Number and Function of Endothelial Progenitor Cells in Patients with Coronary Artery Disease and Normal Glucose Tolerance. *Diabetes* 2007;56:2609-2615.

Folgende Abstracts wurden auf nationalen / internationalen Kongressen präsentiert:

1) Werner C, Kamani CH, Böhm M, Laufs U (2007) Der PPAR- γ Agonist Pioglitazon steigert Anzahl und Funktion von endothelialen Progenitorzellen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und normaler Glukosetoleranz. *Clin Res Cardiol* 96: Suppl 1, 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, V63

2) Werner C, Kamani CH, Gensch C, Clever Y, Böhm M, Laufs U (2007) The PPAR-Agonist Pioglitazone Increases Number and Function of Endothelial Progenitor Cells in Patients with Coronary Artery Disease and normal Glucose Tolerance. Scientific Sessions, American Heart Association, Abstract 2046.

3) Werner C, Kamani CH, Böhm M, Laufs U (2008) Der PPAR γ -Agonist Pioglitazon steigert Anzahl und Funktion von endothelialen Progenitorzellen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und normaler Glukosetoleranz. 52. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft, Poster 25.

8 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name, Vorname	Kamani, Christel Hermann
Geburtsdatum	13.04.1982
Geburtsort	Bafang in Kamerun
Familienstand	ledig
Konfession	römisch-katholisch
Eltern	Herr Ignace Kamani (Biologielehrer) Frau Colette Kamani, geb. Ngandjui (Lehrerin für soziale Familienwirtschaft)

Schulbildung

1987 – 1992	Grundschule in Yagoua und Garoua, Kamerun
1992 – 1999	„Lycée classique et moderne de Bafang“ (Gymnasium) in Kamerun
1999	Abitur der Sekundarstufe II, Serie C (Mathematik u. Naturwissenschaften)

Studium

10/2000 – 03/2001	Universität von Potsdam, Erlernen der deutschen Sprache
10/2001 – 06/2008	Medizinstudium an der Universität des Saarlandes
08/2003	Physikum
08/2006 – 07/2007	Praktisches Jahr (Wahlfach: Neurologie)
04/2008 – 06/2008	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2004 – 06/2008	Stipendiat des „Katholischen Akademischen AusländerDienst“

Berufserfahrung

07/2008 – 09/2009	Assistenzarzt an der Caritasklinik Saarbrücken in der Abteilung Allgemeine Innere Medizin
Seit 10/2009	Assistenzarzt an der „Hôpitaux Universitaires de Genève“ in der Abteilung Allgemeine Innere Medizin