

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie  
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Der Effekt von CD16-positiven und  
CD16-negativen Monozyten auf die  
Arterio- und Angiogenese nach muriner  
Hinterlaufischämie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Markus Bernhardt

aus

Lutherstadt Wittenberg

Göttingen 2018

---

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer  
Referent/in: PD Dr. med. F. S. Czepluch  
Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 09. August 2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Effekt von CD16-positiven und CD16-negativen Monozyten auf die Arterio- und Angiogenese nach muriner Hinterlaufischämie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie .....	1
1.2 Kompensationsmechanismen ischämischer Erkrankungen .....	2
1.2.1 Arteriogenese .....	2
1.2.2 Angiogenese .....	3
1.3 Beschreibung der Monozyten und Monozytensubpopulationen und ihre Bedeutung für die Angio- und Arteriogenese.....	4
1.3.1 Funktionelle Beschreibung von Monozyten .....	4
1.3.2 Klassifikation humaner Monozyten .....	4
1.3.3 Beschreibung muriner Monozyten .....	5
1.4 Monozyten und ihre Bedeutung in der Gefäßneubildung.....	5
1.5 Leptin .....	7
1.5.1 Leptininteraktionen im Adipositasstoffwechsel .....	8
1.5.2 Fettstoffwechsel-unabhängige Leptinwirkungen.....	8
1.6 Zielsetzung .....	9
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1 Verwendete Materialien und Geräte.....	10
2.1.1 Reagenzien.....	10
2.1.2 Geräte und Programme.....	11
2.1.3 Materialien .....	12
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	13
2.1.5 Antikörper .....	14
2.2 Untersuchungen im Tiermodell .....	16
2.2.1 Versuchsablauf.....	16
2.2.2 Induktion der Hinterlaufischämie.....	18
2.2.3 Gewebeentnahme.....	19
2.2.4 Clodronat .....	19
2.2.5 Laser-Doppler-Perfusionsmessung .....	20
2.2.6 Auswertung der Laser-Doppler-Messungen .....	21
2.2.7 Genehmigung der Studie.....	22
2.3 Monozytenisolation.....	22
2.3.1 Beschreibung des Blutspendekollektives .....	22
2.3.2 MicroBeads®-assistierte Isolation humaner Monozyten .....	23
2.3.3 Durchflusszytometrische Qualitätskontrollen der Monozytenisolation.....	26

---

2.3.4	Genehmigung der Studie.....	29
2.4	Histologische Analysen der Muskelgewebe .....	29
2.4.1	Erstellen von Gefrierschnitten .....	29
2.4.2	Beschreibung der unterschiedlichen Antikörper .....	29
2.4.3	Allgemeines Protokoll der CD31- und SMA-Färbungen .....	29
2.4.4	Histologische Auswertungen.....	30
2.5	Statistische Auswertung.....	31
2.5.1	Statistische Auswertung der Dopplerergebnisse .....	32
2.5.2	Statistische Auswertung der histologischen Untersuchungen.....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
3.1	Beschreibung des Mauskollektivs .....	33
3.2	Vorversuche .....	33
3.2.1	Ergebnisse der Vorbehandlung mit Clodronat.....	33
3.2.2	Qualitätskontrolle der Monozytenisolation.....	33
3.3	Ergebnisse der Perfusionsmessungen nach Hinterlaufischämie.....	34
3.3.1	Reperfusion mit unstimulierten Monozyten behandelter Mäuse.....	34
3.3.2	Evaluation der Perfusionsergebnisse nach Behandlung durch Leptin-stimulierte Monozyten.....	35
3.3.3	Unterschiede der Reperfusion mit unstimulierten und mit Leptin-stimulierten Monozyten behandelte Tiere.....	36
3.4	Immunfluoreszenzanalysen .....	37
3.4.1	Ergebnisse der Untersuchungen zur Angiogenese .....	37
3.4.2	Untersuchungen zur Arteriogenese.....	41
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>47</b>
4.1	Monozyten und ihre Bedeutung in der Gefäßneubildung.....	47
4.2	Die Bedeutung der Gabe humaner Monozyten in der Reperfusion.....	48
4.3	Die Rolle von humanen Monozyten in der Arteriogenese.....	49
4.4	Humane Monozyten und ihre Auswirkung auf die Angiogenese.....	51
4.5	Limitationen der Arbeit.....	52
4.6	Ausblick.....	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biphaseische Monozytenantwort nach Myokardinfarkt in der Maus .....	6
Abbildung 2: Nacktmaus .....	17
Abbildung 3: Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Versuche .....	18
Abbildung 4: Schema der arteriellen Gefäßversorgung mit eingezeichneten Ligaturen .....	19
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des PeriScan PIM 3 .....	20
Abbildung 6: Versuchsaufbau der Laser-Doppler-Perfusionsmessung .....	21
Abbildung 7: Beispielhafte Perfusionsdarstellung der Laser-Doppler-Messung .....	22
Abbildung 8: "Ficoll-Paque"-Röhrchen .....	23
Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers .....	27
Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der histologischen Färbungen .....	31
Abbildung 11: Repräsentative Dot-Plot-Darstellungen der einzelnen durchflusszytometrischen Messungen .....	34
Abbildung 12: Darstellung der Laser-Doppler-Perfusionsmessung der Interventionsgruppen ohne Leptinstimulation .....	34
Abbildung 13: Darstellung der Laser-Doppler-Perfusionsmessung der Interventionsgruppen nach Leptinstimulation .....	35
Abbildung 14: Zusammenfassende Darstellung der Laser-Doppler-Perfusionsmessung aller Interventionsgruppen .....	36
Abbildung 15: Darstellung der Verhältnisse der Gesamtkapillaren der Gruppen ohne Leptinstimulation .....	37
Abbildung 16: Darstellung der Verhältnisse der Gesamtkapillaren der Gruppen nach Leptinstimulation .....	38
Abbildung 17: Gesamtübersicht der Verhältnisse der Vaskularisierung einzelner Myofibrillen aller Interventionsgruppen .....	39
Abbildung 18: Darstellung der Verhältnisse der kapillären Durchschnittsfläche der Gruppen ohne Leptinstimulation .....	40
Abbildung 19: Darstellung der Verhältnisse der kapillären Durchschnittsfläche der Gruppen mit Leptinstimulation .....	41
Abbildung 20: Darstellung der Verhältnisse der Arteriolenzahl der Gruppen nach Gabe unstimulierter Monozyten .....	42
Abbildung 21: Darstellung der Verhältnisse der Arteriolenzahl der Gruppen nach Gabe Leptin-stimulierter Monozyten .....	43
Abbildung 22: Gesamtübersicht der Verhältnisse der muskulären Gesamtquerschnittsfläche aller Interventionsgruppen .....	44
Abbildung 23: Darstellung der Verhältnisse der muskulären Querschnittsfläche pro Arteriole der Gruppen nach Gabe unstimulierter Monozyten .....	45
Abbildung 24: Darstellung der Verhältnisse der muskulären Querschnittsfläche pro Arteriole der Gruppen nach Gabe Leptin-stimulierter Monozyten .....	46

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien.....	10
Tabelle 2: Geräte und Programme.....	11
Tabelle 3: Verwendete Materialien für die Monozytenisolation .....	12
Tabelle 4: Verwendete Materialien für die Operation der Hinterlaufschämie.....	12
Tabelle 5: Puffer und Lösungen der Monozytenisolation.....	13
Tabelle 6: Puffer und Lösungen der Immunfluoreszenzfärbungen .....	13
Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen der Durchflusszytometrie .....	13
Tabelle 8: Bestandteile des Monocyte Isolation Kit II .....	14
Tabelle 9: Bestandteile des CD16 <sup>+</sup> Monocyte Isolation Kit.....	14
Tabelle 10: Zusammenstellung der Antikörper für die Isotypenkontrollen zur Reinheitskontrolle .....	14
Tabelle 11: Zusammenstellung der Färbeantikörper zur Reinheitskontrolle.....	15
Tabelle 12: Zusammenstellung der Isotypenkontrollantikörper zur ObR-Färbung.....	15
Tabelle 13: Zusammenstellung der Färbeantikörper der ObR-Färbung .....	15
Tabelle 14: Zusammensetzung der Primärantikörperlösung für die CD31-Färbung.....	16
Tabelle 15: Zusammensetzung der Sekundärantikörperlösung für die CD31-Färbung .....	16
Tabelle 16: Zusammensetzung der Sekundärantikörper für die SMA/CD31-Doppelfärbung .....	16
Tabelle 17: Zusammensetzung der Sekundärantikörperlösung für die SMA/CD31-Doppelfärbung..	16
Tabelle 18: Auflistung der Versuchsgruppen.....	17
Tabelle 19: Darstellung der Versuchsgruppen zum Clodronatversuch .....	20
Tabelle 20: Übersicht über die farblichen Eigenschaften und Wellenlängen der Fluorochrome.....	27

---

## Abkürzungsverzeichnis

A. fem.	Arteria femoralis
A. prof. fem.	Arteria profunda femoris
AB	<i>Antibody</i>
Ang2	Angiopoetin-2
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APC	Allophycocyanin
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAC	<i>circulating angiogenic cell</i>
CCL2	<i>Chemokine-(C-C motif)-Ligand 2</i>
CCL5	<i>Chemokine-(C-C motif)-Ligand 5</i>
CCR2	<i>Chemokine-(C-C motif)-Receptor 2</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD16 <sup>-</sup> -mo	CD16-negative Monozyten
CD16 <sup>-</sup> -mo (s)	stimulierte CD16-negative Monozyten
CD16 <sup>+</sup> -mo	CD16-positive Monozyten
CD16 <sup>+</sup> -mo (s)	stimulierte CD16-positive Monozyten
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cvRF	kardiovaskuläre Risikofaktoren
CX <sub>3</sub> CL1	<i>Chemokine-(C-X<sub>3</sub>-C motif)-Ligand 1</i>
CX <sub>3</sub> CR1	<i>Chemokine-(C-X<sub>3</sub>-C motif)-Receptor 1</i>
CXCR4	<i>Chemokine-(C-X-C motif)-Receptor 4</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EC	Endothelzelle
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS™	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>



---

FcR	<i>fragment crystallisable-Receptor</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FTTC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXN1	<i>Forkhead box protein N1</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Gramm
GM-CSF	<i>Granulocyte-Monocyte Colony-stimulating Factor</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible-factor <math>\alpha</math></i>
HUVECs	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
KHK	koronare Herzkrankheit
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg
Ly6-C <sup>high</sup>	stark-exprimiertes <i>lymphocyte antigen 6 complex, locus C1</i>
Ly6-C <sup>low</sup>	schwach-exprimiertes <i>lymphocyte antigen 6 complex, locus C1</i>
M-CSF	<i>Monocyte-Colony stimulating Factor</i>
MACS <sup>TM</sup>	<i>Magnetic activated cell-sorting<sup>TM</sup></i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
Mm.	<i>Musculi</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MNC	mononukleäre Zelle
MONICA	<i>Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
NO	Stickstoffmonoxid
ObR	Leptinrezeptor
OP	Operation

---

pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>Phosphated Buffere Saline</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>Platelet-Endothelial-Cell-Adhesion-molecule-1</i>
PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5	Peridinin-Chlorophyll-Komplex + Cyanin5.5
PFA	Paraformaldehyd
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
PZN	Pharmazentralnummer
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEM	<i>Standard-Error of Mean</i>
SMA	<i>Smooth-Muscle-Actin</i>
sObR	löslicher Leptinrezeptor
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT	<i>signal-transducer-and-activator-of-transcription</i>
TEMs	<i>Tie2-expressing monocytes</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
Tie2	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFAIP2	<i>TNF-<math>\alpha</math>-induced protein 2</i>
total-mo	Gesamtmonozyten
total-mo (s)	stimulierte Gesamtmonozyten
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR-1	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor 1</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Folgeerscheinungen sind weltweit die häufigste zugrundeliegende Ursache für Morbidität und Mortalität (Lim et al. 2013). Diese sind in den allermeisten Fällen bedingt durch Arteriosklerose, welche im Wesentlichen zu einer Sauerstoffunterversorgung und Minderfunktion eines jeweils nachgeschalteten Organs führt. Die häufigste Manifestation der Arteriosklerose stellt die koronare Herzkrankheit (KHK) dar, welche im akut-ischämischen Ereignis den Myokardinfarkt zur Folge hat und hier bei rezidivierenden Infarkten in der chronischen-ischämischen Herzerkrankung enden kann. Weitere Ausprägungen kardiovaskulärer Erkrankungen sind z. B. die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) oder der Schlaganfall.

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit 39,7% der Todesfälle im Jahr 2013 auch die Haupttodesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2014). Von diesen Todesfällen waren allein 20,6% auf eine chronisch-ischämische Herzerkrankung zurückzuführen.

Die Sterblichkeit von Patienten mit KHK nimmt in Deutschland kontinuierlich ab. Seit Mitte der 1990er Jahre ist dies auch zunehmend in der älteren Bevölkerung zu beobachten - hier vor allem in einer Steigerung der Prävalenz des überlebten Myokardinfarktes zu sehen (Gößwald et al. 2013). Dies ist insbesondere bei gleichbleibender Inzidenz des akuten Myokardinfarktes (Wiesner et al. 2002) auf eine bessere Akutbehandlung zurückzuführen (Kuch et al. 2008; Löwel et al. 2005) und zeigt sich vor allem in der stetig abnehmenden Zahl der Sterbefälle (Deutsche Herzstiftung e. V. [Hrsg.] 2015). Daten aus der kooperativen Gesundheitsforschung in der Region Augsburg (KORA) verglichen mit den Untersuchungen aus dem Projekt „*Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease*“ (MONICA) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) belegen diese Entwicklung (Löwel 2006). Auch wenn diese Daten lediglich die Jahre 1985-1987 mit 2001-2003 vergleichen, ist auffällig, dass die um 40 % reduzierte Reinfarktrate deutlich verbessert war. Dies ist zusätzlich darin begründet, dass in der Erforschung und Behandlung kardiovaskulärer Risikofaktoren (cvRF), wie z. B. arterielle Hypertonie und Fettstoffwechselstörungen innerhalb dieser Zeit deutliche Fortschritte erzielt werden

konnten und somit die Sekundärprophylaxe verbessert wurde (Robert-Koch-Institut [Hrsg.] 2014).

Den o. g. erfreulichen Entwicklungen bei Hypertonie und Hyperliproteinämie ist jedoch eine vermehrte Prävalenz von Adipositas und Diabetes mellitus gegenüberzustellen. Somit bleibt auch aufgrund der Veränderungen der demografischen Struktur in Deutschland mit einem immer größer werdenden Anteil der Älteren in der Gesellschaft die Prävalenz der Arteriosklerose und somit auch die Prävalenz der KHK gleich (Göbwald et al. 2013).

## **1.2 Kompensationsmechanismen ischämischer Erkrankungen**

Zur Kompensation der chronisch-ischämischen Gewebeschädigung stehen dem menschlichen Körper im Wesentlichen zwei unterschiedliche Kompensationsmechanismen zur Verfügung. Hierbei spielen die Arteriogenese sowie auch die Angiogenese eine zentrale Rolle.

### **1.2.1 Arteriogenese**

Die Arteriogenese beschreibt den Prozess der Entstehung von Arterien aus vorbestehenden kollateral verlaufenden Arteriolen. Hierbei werden durch eine Stenosierung des Ursprungsgefäßes und die dadurch erhöhte Flussgeschwindigkeit in den umliegenden Arteriolen die Scherkräfte erhöht (Galie et al. 2014). Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des Endothels. Nachfolgend erhöhen Endothelzellen (ECs) die Ausschüttung von Zytokinen wie *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) und steigern die Expression von Adhäsionsmolekülen (Shyy et al. 1994). Hierunter kommt es zu einer vermehrten Einwanderung und Aktivierung von Monozyten in diesem Gebiet (Capoccia et al. 2008; Cowan und Langille 1996; Epelman et al. 2015). Diese wiederum produzieren weitere Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine, unter anderem auch Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Als Folge hiervon verwandeln sich Arteriolen in Arterien. Dies geschieht durch Endothelproliferation, der sich die Proliferation und Expansion glatter Muskelzellen anschließt. Für diesen Prozess wird zunächst die *Lamina elastica interna* über aktivierte Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) enzymatisch gelockert. Im Weiteren erfolgt dann die Lyse des perivaskulären Gewebes, um dem wachsenden Gefäß den nötigen Raum zur Ausdehnung zu verschaffen (Schaper und Buschmann 1999).

## 1.2.2 Angiogenese

Der Vorgang der Angiogenese beschreibt die Entstehung neuer Kapillaren aus bereits existierenden Kapillaren. Hierbei werden prinzipiell zwei verschiedene Arten der Angiogenese unterschieden: das *Sprouting* und die Intussuszeption (Risau 1997).

### 1.2.2.1 Aussprossung (*Sprouting*)

*Sprouting* beschreibt das Aussprossen neuer Kapillaräste aus einer bereits vorhandenen Kapillare. Hierbei kommen Stimuli multifaktorieller Genese zum Tragen. Zum einen wird durch mechanische Reize (z. B. erhöhte Muskelkontraktion (Hudlicka et al. 1992)) eine Aktivierung des Endothels herbeigeführt, was zu einer Induktion der Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) führt. Durch diese vermehrte NO-Freisetzung folgt eine Vasodilatation. Durch chemische Elemente (z. B. Anämie (Metivier et al. 2000)) kommt es unter anderem durch Induktion des Transkriptionsfaktors *Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) zu einer vermehrten Expression von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Dies führt zur vermehrten Durchlässigkeit der vaskulären Wand, wodurch Plasmaproteine in den extravaskulären Raum gelangen. Diese nutzen die später hindurchtretenden Endothelzellen als Leitstrukturen (Ferrara 1995). Im Anschluss erfolgt die Angiopoetin-2-vermittelte (Ang-2)-Auflockerung des Zellverbandes sowie das Lösen desselbigen durch MMPs, sodass nun wiederum VEGF- und *Fibroblast Growth Factor* (FGF)-vermittelt die ECs zum Wachsen und Migrieren angeregt werden und so die Gefäßsprosse ausbilden (Hanahan 1997).

### 1.2.2.2 Intussuszeption

Im Gegensatz zur Aussprossung bleibt bei der Intussuszeption die Basalmembran des Gefäßes erhalten. Hierbei werden zunächst auf gegenüberliegenden Seiten feine Pili (Djonov und Makanya 2005) ausgebildet, die aufeinander zuwachsen bis sie intraendotheliale Zell-Zell-Kontakte ausbilden können. Anschließend werden die endothelialen Zellverbindungen neu organisiert und im Folgenden diese Basis der endothelialen Anlagerung perforiert. Hierauf folgt eine Invasion von interstitiellem Gewebe, Perizyten und Myofibroblasten. Des Weiteren kommt es zur Anlagerung von Kollagenfibrillen und somit zur schrittweisen Ausdehnung der interkapillären Gewebebrücke und endgültigen Ausbildung des perivaskulären Gewebes (Makanya et al. 2009; Risau 1997).

## 1.3 Beschreibung der Monozyten und Monozytensubpopulationen und ihre Bedeutung für die Angio- und Arteriogenese

### 1.3.1 Funktionelle Beschreibung von Monozyten

Monozyten sind Bestandteil der leukozytären Blutzellreihe und machen in dieser 2 - 10% der im Blut zirkulierenden Zellen aus. Sie werden im Knochenmark aus der hämatopetischen Stammzelle über den Monoblasten unter dem Einfluss von zunächst *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) und später *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) gebildet und gehören zum angeborenen Immunsystem. Sie haben einen Durchmesser von ca. 5 - 20  $\mu\text{m}$  und sind somit die größten Leukozyten. Monozyten sind Vorläuferzellen von Makrophagen und dendritischen Zellen und bilden zusammen mit ihnen das Mononukleäre Phagozytensystem. Auf ihrer Zelloberfläche befinden sich verschiedene Rezeptoren, die es ihnen erlauben, pathogene Strukturen zu erkennen, diese mithilfe von Phagozytose zu eliminieren und im Folgenden Antigene zu präsentieren. Des Weiteren erlauben Chemokinrezeptoren die Migration der Monozyten aus dem Blut in Gebiete unterschiedlicher Gewebe (z. B. Lunge, Leber) und auch Pathologien (z. B. Ischämie oder Inflammation (Serbina et al. 2008; Venneri et al. 2007)). Hier bilden sie sich dann zu gewebstypischen Makrophagen (z. B. Alveolarmakrophagen in der Lunge oder Kupfferzellen in der Leber) aus.

### 1.3.2 Klassifikation humaner Monozyten

Humane Monozyten können anhand ihrer Oberflächenmarker in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden. Hierzu wurde von Bernhard Passlick et al. 1989 neben der Expression des Lipopolysaccharidrezeptors (CD[*Cluster of Differentiation*]14) die differentielle Expression des Immunglobulin G (IgG) bindenden kristallisierbaren Fragment gamma-Rezeptor (FcR/CD16) herangezogen (Passlick 1989). Entsprechend wurden Monozyten ohne Nachweis von CD16 als Oberflächenmarker (CD16<sup>-</sup>-mo) als „klassische“ und CD16<sup>+</sup>-Monozyten (CD16<sup>+</sup>-mo) als „nicht-klassische“ Monozyten bezeichnet (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

Die CD16<sup>+</sup>-mo bilden ca. 10% der Gesamtmonozytenpopulation im peripheren Blut. Sie unterscheiden sich von den klassischen Monozyten nicht nur, wie oben erwähnt, in der Expression von CD16, sondern auch in der Funktion. Zum Beispiel ist die Migration gegenüber den Zytokinen VEGF und MCP-1 deutlich eingeschränkt (Czepluch et al. 2011). Zusätzlich zeigen die nicht-klassischen Monozyten eine höhere Expression des Interleukin-8 (IL-8) -Rezeptors und migrieren demzufolge IL-8-abhängig ins Gewebe (Ancuta et al.

2003). Auch Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) werden durch CD16<sup>+</sup>-mo produziert, vor allem nachdem sie am *Toll-like Receptor-4* durch Lipopolysaccharid stimuliert, oder aber nachdem sie durch Leptin am Leptinrezeptor (ObR) aktiviert wurden (Fernandez-Riejos et al. 2010; Mukherjee et al. 2015). Antiinflammatorische Zytokine, wie z. B. Interleukin-10 (IL-10), spielen bei der Aktivierung und auch Zytokinausschüttung dieser Monozytensubpopulationen eher eine untergeordnete Rolle (Belge et al. 2002).

CD16<sup>-</sup>-Monozyten (CD16<sup>-</sup>-mo; ca. 90% der Monozytenfraktion im Blut) zeigen mit der starken Expression des MCP-1-Rezeptors (*Chemokine[C-C motif]-Receptor 2* [CCR2] (Weber et al. 2000)) und der Sezernierung von Myeloperoxidase (Grage-Griebenow et al. 2001a) im Gegensatz zu den CD16<sup>+</sup>-mo eher inflammatorische Eigenschaften (Gordon und Taylor 2005).

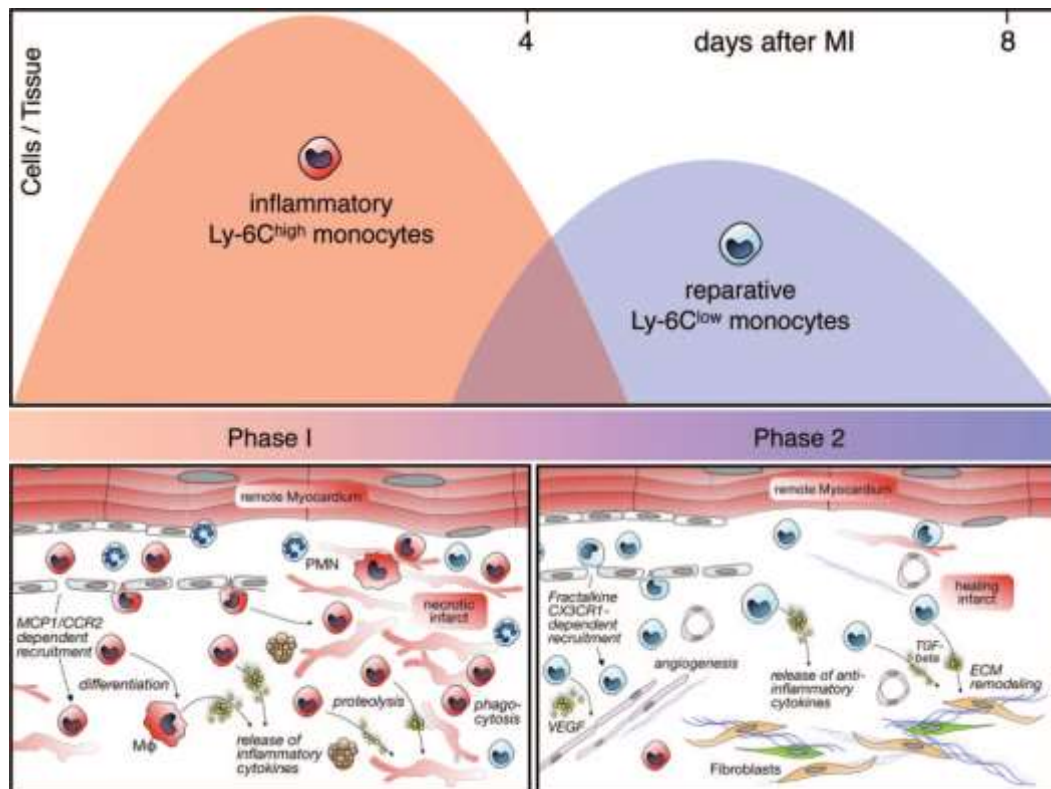
### 1.3.3 Beschreibung muriner Monozyten

Analog zu den humanen Monozyten und ihren Subpopulationen wurden 2001 bei Mäusen ebenfalls verschiedene Monozytenuntergruppen beschrieben (Palframan et al. 2001). 2003 gelang es hier, eine differenziertere Beschreibung dieser Subpopulationen zu etablieren, die neben anderen Oberflächenantigenen hauptsächlich anhand unterschiedlicher Expressionsprofile des Lymphozytenantigens *Lymphocyte Antigen 6 Complex, Locus C1* (Ly6-C) getätigt wurde (Geissmann et al. 2003). Entsprechend wurden hier die Ly6-C<sup>high</sup>-Monozyten im Mausmodell ebenfalls als „klassische“ Monozyten bezeichnet, obwohl zwischen humanen und murinen Monozyten deutliche Unterschiede in Anzahl und Funktion bestehen. Beispielhaft für solche Unterschiede sind z. B. die Einwanderung klassischer humaner Monozyten in ischämisches Gewebe mithilfe des MCP-1-Rezeptors CCR2 (Cochain et al. 2010) bzw. das unterschiedliche Migrationsverhalten der beiden Monozytenspezies gegenüber dem Fraktalkinrezeptor (Geissmann et al. 2003). Die Ly6-C<sup>low</sup>-Monozyten hingegen exprimieren wiederum eher den *Chemokine-(C-X<sub>3</sub>-C Motif) - Receptor 1* (CX<sub>3</sub>CR1) in höherer Konzentration und finden sich in nicht-entzündlichem Gewebe. Sie werden auch als „residente“ oder „reparative“ Monozyten bezeichnet und sind somit eher den humanen CD16<sup>+</sup>-mo zugeordnet (Cochain et al. 2010; Geissmann et al. 2003; Lim et al. 2013; Nahrendorf et al. 2007).

## 1.4 Monozyten und ihre Bedeutung in der Gefäßneubildung

Monozyten spielen eine bedeutende Rolle in der Gefäßneubildung, sowohl bei der Arterio- als auch in der Angiogenese. So ist z. B. beschrieben, dass die Anzahl entstandener Kollateralen nach muriner Hinterlaufischämie von der Menge im Blut zirkulierender Leukozyten abhängig ist (Bergmann et al. 2006). Schon 1998 konnten Arras et al. zeigen, dass sich Monozyten nach muriner Hinterlaufischämie vermehrt an das Endothel von

Kollateralen anlagern und auch vermehrt in der *Muscularis* von Ischämie ausgesetzten Arteriolen zu detektieren sind (Arras et al. 1998). Dies war in der Arteriogenese lediglich innerhalb der ersten beiden Tage nach Gefäßverschluss zu beobachten. Zusätzlich zeigte sich hier eine deutliche Zunahme an proliferativer Aktivität in der Gefäßmuskulatur. In der gleichen Untersuchung zeigte sich bei der Induktion der Angiogenese ebenfalls eine Adhärenz von Monozyten. Diese waren jedoch nicht vor dem siebten Tag nach Hinterlaufischämie zu detektieren. Histomorphologische Veränderungen im Sinne von Kapillarproliferation waren auch hier erst ab diesem Zeitpunkt zu sehen.



**Abbildung 1: Biphasische Monozytenantwort nach Myokardinfarkt in der Maus:** Gezeigt ist die Rekrutierung der Monozytensubpopulationen in Abhängigkeit der Zeit (in Tagen) nach Myokardinfarkt. Zusätzlich sind im unteren Abschnitt die wichtigsten Funktionen der verschiedenen Zellen beschrieben. PMN bedeutet polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten;  $M\Phi$ , Makrophagen; ECM, extrazelluläre Matrix (Nahrendorf et al. 2010), mit freundlicher Genehmigung von Lippincott Williams & Wilkins

Die zeitliche Abfolge der Monozyteninvasion und deren funktionelle Bedeutung im ischämischen Gewebe beschrieben auch Nahrendorf und Kollegen (Nahrendorf et al. 2010). Hierbei wurde in einem murinen Myokardinfarktmodell die unterschiedliche Invasion der funktionell verschiedenen Monozytensubpopulationen untersucht. Der zeitliche Verlauf ist auch in Abbildung 1 dargestellt (Nahrendorf et al. 2010; Nahrendorf et al. 2007). Innerhalb der ersten drei bis vier Tage nach ischämischem Ereignis wird in diesem Gewebe u. a. vermehrt MCP-1 freigesetzt, wodurch es zunächst zur Einwanderung von Ly6-C<sup>high</sup>-Monozyten kommt. Diese beseitigen nun im Wesentlichen durch Proteolyse und Phagozytose des nekrotischen Gewebes den Zelldetritus und zerstören durch



Sezernierung von MMPs und Cathepsinen die vorbestehende Kollagenstruktur, sodass das Einwandern neuer Zellen vereinfacht wird.

Die zweite Phase (Tag vier bis sieben) ist gekennzeichnet durch die vermehrte endotheliale Expression des CX<sub>3</sub>CR1. Hierdurch wird eine verstärkte Adhärenz und somit erhöhte Leukodiapedese der Ly6-C<sup>low</sup>-Monozyten induziert (Allen et al. 2007). Diese produzieren und sezernieren wiederum eher antientzündliche Zytokine wie IL-10, *Transforming Growth Factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und VEGF und sorgen somit für die Unterstützung der Gefäßneubildung (s. o.).

Proangiogene Effekte von Monozyten sind nicht nur bei Ischämie beschrieben, sondern sind auch in der Tumorgenese essentiell, sodass es naheliegt, dass Monozyten auch bei der Gefäßneubildung Tumor-versorgender Gefäße eine bedeutende Rolle spielen. Diesen Punkt beleuchteten Venneri et al. näher und zeigten hierbei für bestimmte Tumorentitäten eine vermehrte Ansammlung von Monozyten, welche eine vermehrte Expression des Angiopoetinrezeptors (Tie2) aufwiesen (Venneri et al. 2007). Diese waren weder vollständig den klassischen noch den nicht-klassischen Monozyten zuzuordnen.

## 1.5 Leptin

Das Proteohormon Leptin ist einer der wichtigsten vom Fettgewebe produzierten Faktoren (Zhang et al. 1994). Es kommt physiologischerweise in einer freien und einer gebundenen Form vor (Sinha et al. 1996). Die freie Form gilt als aktiv und nimmt so vordringlich im Hypothalamus Einfluss auf die Entstehung von Hungergefühl und das Verlangen zur Nahrungsaufnahme (Li 2011). So führt bei Normalgewicht der Aufbau von Fettgewebe zur Synthese von Leptin und somit zu hohen freien Leptinspiegeln. Hierauf stellt sich ein Sättigungsgefühl ein. Sind die nutritiven Reserven nach Nahrungsaufnahme verbraucht (z. B. bei längerem Fasten), beginnt der Körper mit dem Abbau von Fettgewebe und senkt dadurch den Spiegel des freien Leptins. Es kommt zum Hungergefühl und der Körper wird zur Nahrungsaufnahme angehalten (Sinha et al. 1996).

Die Wirkung von Leptin ist Rezeptor-vermittelt. Der ObR existiert beim Menschen in verschiedenen Isoformen (Tartaglia 1997), von denen drei Klassen unterschieden werden: die lang gebundene, die kurz gebundene und die freie Klasse (Myers 2004). Eine dieser Klassen bildet das Gegenstück des im Plasma gebunden Leptins, während hingegen die anderen beiden weitestgehend die Leptinwirkung vermitteln. Diese befinden sich auf der Zelloberfläche und sind homolog zu den Zytokinrezeptoren der Klasse I zu sehen (Tartaglia 1997; Tartaglia et al. 1995). Diese vermitteln neben anderen Signalwegen ihre hauptsächliche Wirkung über den Januskinase/*Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription*-(JAK/STAT)-Signalweg (Baumann et al. 1996; Myers 2004; Tartaglia 1997).

### 1.5.1 Leptininteraktionen im Adipositasstoffwechsel

Nach oben beschriebener Leptinwirkung ließe sich annehmen, dass die Serum-Leptin-Spiegel adipöser Menschen ausgesprochen niedrig seien. Dies konnten Sinha et al. 1996 widerlegen. Hierbei stellten sie fest, dass Menschen mit Adipositas stark erhöhte Spiegel freien Leptins aufweisen und somit vielmehr einer zentralen Leptin-Resistenz unterliegen (Myers 2004; Sinha et al. 1996). Des Weiteren wurde im Hungerversuch gezeigt, dass im Gegensatz zu normalgewichtigen Menschen die Blutkonzentration an gebundenem Leptin konstant bleibt und lediglich die Konzentration des freien Leptins sinkt. Im nicht-adipösen Stoffwechsel verändert sich eher die Konzentration des gebundenen Leptins und hält somit die Konzentration des freien Leptins annähernd gleich (jedoch weiterhin auf deutlich niedrigerem Niveau als im Adipositasstoffwechsel). Somit scheint eher das Verhältnis des freien zum gebundenen Leptin eine Rolle bei der Regulation des Hungergefühls eine Rolle zu spielen als die Absolutwerte beider Formen (Alshaker et al. 2015; Ge et al. 2002; Sinha et al. 1996).

### 1.5.2 Fettstoffwechsel-unabhängige Leptinwirkungen

Erste Erkenntnisse, dass Leptin nicht nur den Fettstoffwechsel beeinflusst, zeigten schon Sierra-Honigmann et al., die die Expression des ObR auch auf *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) und ECs untersuchten und nachfolgend das angiogene Potential von Leptin nachwiesen (Sierra-Honigmann et al. 1998). So wurde zusätzlich in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen gezeigt, dass Leptin *in vitro* auf o. g. Zellen ähnliche Effekte *in puncto* Zellproliferation und Zellwachstum aufweist wie VEGF (Bouloumie et al. 1998).

Weiterhin konnte im Tierexperiment nachgewiesen werden, dass durch Leptin eine Neovaskularisierung sowohl der Cornea (Sierra-Honigmann et al. 1998) als auch der Retina (Suganami et al. 2004) induziert wird.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde weiterführend der Einfluss von Leptin auf die Angiogenese untersucht. Hierbei wurden zirkulierende angiogenetische Zellen (*Circulating Angiogenic Cells* [CACs]) aus dem peripheren Blut von Menschen isoliert und mit Leptin stimuliert. Anschließend wurde deren angiogenes Potenzial gegenüber nicht-stimulierten CACs mit HUVECs untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass eine Leptinstimulation der CACs die Anzahl von Sprossen im Angiogenese-Experiment signifikant erhöht im Vergleich zu nicht stimulierten CACs (Heida et al. 2010). Interessanterweise zeigte sich diese Rekrutierung des angiogenen Potentials nur mit CACs aus dem Blut normalgewichtiger Menschen. Mit dem Blut adipöser Menschen war dies nicht möglich.

## 1.6 Zielsetzung

Wie die o. g. Ausführungen belegen sind bisherige Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Monozyten auf die Gefäßneubildung hauptsächlich an murinen Monozyten untersucht worden. Da jedoch zwischen murinen und humanen Monozyten ausgeprägte Unterschiede bestehen, ist die Bedeutung humaner Monozyten und ihrer Subpopulationen zur Neovaskularisierung nach Ischämie nicht direkt unkritisch zu übertragen. Des Weiteren ist noch nicht ausreichend herausgearbeitet, welche der Subpopulationsgruppe die proangiogenen Effekte am ehesten vermittelt und wodurch diese erzielt werden.

Daraus folgend ist es Ziel dieser Arbeit, die Unterschiede von CD16<sup>+</sup>-mo und CD16<sup>-</sup>-mo und ihr Zusammenspiel in der Arteriogenese und auch der Angiogenese zu untersuchen. Hierbei wird die Qualität der Entstehung neuer Gefäße über eine Messung der Reperfusion an verschiedenen Zeitpunkten nach Hinterlaufischämie untersucht. Die Quantität neu entstandener Gefäße wird histologisch ermittelt.

Frühere Arbeiten zur Neovaskularisierung zeigten, dass durch Leptin stimulierte CACs eine Verbesserung der Perfusion erzeugt werden konnte, sodass auch der Einfluss von Leptin auf Monozyten und ihre Subpopulationen im Rahmen der Angio- und Arteriogenese ebenfalls untersucht werden soll.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Reagenzien

Tabelle 1: Reagenzien

Artikel	Art.-Nummer	Firma
Aqua dest.		hausintern
Aceton	8222511000	Merck KGaA, Darmstadt, D
<i>Antibody (AB)-Diluent</i>	S3022	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Antikörper FACST <sup>™</sup>		<b>s. FACST<sup>™</sup>, Kap. 2.1.5.1</b>
Antikörper Immunfluoreszenz		<b>s. Immunfluoreszenz, Kap. 2.1.5.1</b>
Bepanthen <sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe	PZN-01578675	Bayer AG, Leverkusen, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	A7906	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CD 16 <sup>+</sup> Monocyte Isolation Kit	130-091-765	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D, <b>s. Kap. 2.1.5.1</b>
Clodronat-Liposomen		Vrije Universiteit, Faculty of Medicine, Amsterdam, NL
CM-DiI	V-22888	Molecular Probes <sup>®</sup> , Eugene, OR, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	D9542	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	1063461000	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dulbecco's Phosphated-Buffered Saline (DPBS)	1362487	Gibco <sup>®</sup> by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5 M	AM9260G	AMBION GmbH, Kaufungen, D
Ethanol	1009831000	Merck KGaA, Darmstadt, D
Heparin	PZN-3029843	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Histopaque <sup>®</sup>	10771	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isofluran	B506	Abbott, GmbH+Co KG, Wiesbaden, D
Kaliumchlorid	1.049.365.000	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	420A877573	Merck KGaA, Darmstadt, D
Leptin	398-LP	R & D Systems, Minneapolis, MN, USA
Methanol	106009	Merck KGaA, Darmstadt, D
Monocyte Isolation Kit II	130-091-153	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D, s. Kap. 2.1.5.1
Novaminsulfon-ratiopharm	PZN-07387829	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
Methylbutan	106056	Merck KGaA, Darmstadt, D

Nacktmausfutter	V1244-000	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D
NaCl 0,9%	387028 R	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Natriumchlorid	3957.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
PAP PEN Mini	LP0002	Zytomed Systems, Berlin, D
Phosphated-Buffered Saline (PBS), 10x	70011-036	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	P6148	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Stickstoff, flüssig		hausintern
RPMI Media 1640	11835-063	Gibco® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tissue Tec O.C.T. Compound	4583	Sakura Finetek Europe B.V.; Zoeterwoude, NL
Triton X-100	93426	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypan Blau	L6323	Merck KGaA, Darmstadt, D
VectaShield Mounting Medium	H-1000	Vector, Burlingame, CA, USA
Xylazin, 2%	12095	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D

## 2.1.2 Geräte und Programme

Tabelle 2: Geräte und Programme

Artikel	Firma
Axio Vision 3.0 (Graphikprogramm)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Beckmann Coulter AC T 5diff Hematology Analyzer	Beckman Coulter GmbH Deutschland, Krefeld, D
Beleuchtung KL 1500 LCD	Schott AG, Mainz D
Microsoft® Excel für Mac 2011	Microsoft Corp., Santa Rosa, CA, USA
FACSCanto™ II	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACSDiva™ Software, Version 6.1.3	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 200)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
GraphPad Prism (Statistikprogramm)	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Image Pro Plus (Graphikprogramm)	Media Cybernetics, Inc.; Bethesda, MD, USA
Kryostat (Frigocut 2800N)	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, D
Mini Vent Mouse Ventilator Typ 845	Hugo Sachs Elektronik GmbH, March-Hugstetten, D
Mikroskop (Olympus CK40-F200)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
Mikroskop (Olympus SZ40-PT)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, D
PeriScan PIM 3 System	PERIMED, Järfälla, S
PIMSoft	PERIMED, Järfälla, S
STATISTICA (Version 12.0)	Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA
Vortex Genie®2	Scientific Industries, Inc, Bohemia, N.Y., USA
Wärmeplatte	MEDAX GmbH & Co.KG
Microsoft® Word für Mac 2011	Microsoft Corp., Santa Rosa, CA, USA
Zentrifuge (5415 D)	Eppendorf AG, Hamburg, D

Zentrifuge (5702 R)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge (5810 R)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge (Rotanta/S)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, D

### 2.1.3 Materialien

#### 2.1.3.1 Monozytenisolation

Tabelle 3: Verwendete Materialien für die Monozytenisolation

Artikel	Art.-Nummer	Firma
Polystyrene-FACS-Röhrchen	352058	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Magnet (QuadroMACS™)	130-090-976	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS Separationssäule, LD	130-042-901	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS Separationssäule, LS	130-042-401	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Neubauer Zählkammer		Optik Labor Ltd., Lancing, E, UK
Präseparationsfilter, 30 µm	130-041-407	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Spritze, Omnican® 50	9151125	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Spritze, Omnifix® 40 Solo	9161309V	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Sterilfilter	10462200	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, D
Quadruple Pack OptiPure RC, Top & Bottom Blutbeutelssystem mit integriertem Erythrozytenfilter RC Soft. PL146/PL1240	NGR6428B	Fenwal, Inc., Lake Zurich, IL, USA

#### 2.1.3.2 Operation der Hinterlaufschämie

Tabelle 4: Verwendete Materialien für die Operation der Hinterlaufschämie

Artikel	Art.-Nummer	Firma
Cohan-Vannas Spring Schere-6mm Blades	15000-02	Fine Science Tools® GmbH, Heidelberg, D
Leukosilk®	0102100	BSN medical GmbH, Hamburg, D
Naht 6-0 Ethilon P1	ETH 697H	Ethicon, Johnson & Johnson medical GmbH, Norderstedt, D
Naht 6-0 PH-Seide	552-159682	Ethicon, Johnson & Johnson medical GmbH, Norderstedt, D
Nadelhalter Mayo-Hegar	0022915	Aesculap AG, Tuttlingen, D
Pinzetten, fein, Dumont #5/45	1125135	Fine Science Tools® GmbH, Heidelberg, D
Pinzette, gebogen, Extra Graede Forceps	115110	Fine Science Tools® GmbH, Heidelberg, D
Pinzette, gerade, Extra Graede Forceps	115010	Fine Science Tools® GmbH, Heidelberg, D
Wattestäbchen	PZN-6177225	Karl Beese (GmbH & Co.), Barsbüttel, D

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

### 2.1.4.1 Monozytenisolation

Tabelle 5: Puffer und Lösungen der Monozytenisolation

Lösung	Menge	eingesetzte Stoffe
<b>PBS/EDTA:</b>	0,744 g	EDTA
	100 ml	PBS 10%
	900 ml	Aqua dest.
<b>Assay-Puffer:</b>	130 ml	PBS/EDTA
	0,65 g	BSA

### 2.1.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen der Immunfluoreszenzfärbungen

Lösung	Menge	eingesetzte Stoffe
<b>Permeabilisierungslösung:</b>	0,5 ml	Triton X-100
	auf 1l	PBS
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung:</b>	160 g	Natriumchlorid
	4 g	Kaliumchlorid
	28,8 g	Dinatriumhydrogenphosphat
	4,8 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	auf 2000 ml	Aqua dest.

### 2.1.4.3 Durchflusszytometrie

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen der Durchflusszytometrie

Lösung	Menge	eingesetzte Stoffe
<b>FACSTM-Puffer:</b>	10 g	BSA
	auf 1 l	PBS (1x)
<b>Fixierungslösung</b>	1 g	Paraformaldehyd
	auf 100 ml	Aqua dest.
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung:</b>	160 g	Natriumchlorid
	4 g	Kaliumchlorid
	28,8 g	Dinatriumhydrogenphosphat
	4,8 g	Kaliumdihydrogenphosphat
	auf 2000 ml	Aqua dest.

## 2.1.5 Antikörper

### 2.1.5.1 Monozytenisolation

Tabelle 8: Bestandteile des Monocyte Isolation Kit II

Artikel	Mat.-Nummer	Mischungsverhältnis
<b>Anti-Biotin MicroBeads</b>	120-001-478	10 µl auf 10 <sup>7</sup> Zellen
<b>Monocyte Biotin-Antibody Cocktail</b>	120-001-467	5 µl auf 10 <sup>7</sup> Zellen
<b>FcR-Blocking Reagenz</b>	120-000-442	5 µl auf 10 <sup>7</sup> Zellen

Tabelle 9: Bestandteile des CD16<sup>+</sup> Monocyte Isolation Kit

Artikel	Mat.-Nummer	Mischungsverhältnis
<b>CD16 MicroBeads</b>	120-000-249	10 µl auf 10 <sup>7</sup> Zellen
<b>FcR-Blocking Reagenz</b>	120-000-442	5 µl auf 10 <sup>7</sup> Zellen
<b>Non-Monocyte Depletion Cocktail</b>	120-002-033	5 µl auf 10 <sup>7</sup> Zellen

### 2.1.5.2 Durchflusszytometrie

#### 2.1.5.2.1 Durchflusszytometrie der Monozyten

Tabelle 10: Zusammenstellung der Antikörper für die Isotypenkontrollen zur Reinheitskontrolle

Antikörper	Art.-Nummer	Mischungsverhältnis	Firma
<b>FITC Mouse IgG2b, κ Isotype Control</b>	555742	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>FITC Mouse IgG2b, κ Isotype Control</b>	555749	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>APC Mouse IgG2a, κ Isotype Control</b>	555576	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5 Mouse IgG2b, κ Isotype Control</b>	558304	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA



Tabelle 11: Zusammenstellung der Färbeantikörper zur Reinheitskontrolle

Antikörper	Art.-Nummer	Mischungsverhältnis	Firma
<b>FITC Mouse Anti-Human CD 14</b>	345784	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>PE Mouse Anti-Human CD16</b>	555407	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>APC Mouse Anti-Human CD195</b>	556903	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>PerCP-Cy<sup>TM</sup>5.5 Mouse Anti-Human CD44</b>	560531	1,25 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

## 2.1.5.2.2 Nachweis des Leptinrezeptors

Tabelle 12: Zusammenstellung der Isotypenkontrollantikörper zur ObR-Färbung

Antikörper	Art.-Nummer	Mischungsverhältnis	Firma
<b>FITC Mouse IgG2b, κ Isotype Control</b>	555742	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>PE Mouse IgG1, κ Isotype Control</b>	555749	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>APC-Mouse IgG2b, κ Isotype Control</b>	IC0041A	2,5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	R & D Systems, Minneapolis, MN, USA

Tabelle 13: Zusammenstellung der Färbeantikörper der ObR-Färbung

Antikörper	Art.-Nummer	Mischungsverhältnis	Firma
<b>FITC Mouse Anti-Human CD 14</b>	345784	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>PE Mouse Anti-Human CD16</b>	555407	5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>APC Mouse Anti-Human Leptin R</b>	FAB867A	2,5 µl auf 10 <sup>6</sup> Zellen	R & D Systems, Minneapolis, MN, USA

### 2.1.5.3 Immunfluoreszenz

Tabelle 14: Zusammensetzung der Primärantikörperlösung für die CD31-Färbung

	Antikörper	Art.-Nummer	Mischungsverhältnis	Firma
1. AK	<b>PECAM-1 (MEC 13.3)</b>	sc-18916	1 : 50	SantaCruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA

Tabelle 15: Zusammensetzung der Sekundärantikörperlösung für die CD31-Färbung

	Antikörper	Art.-Nummer	Mischungsverhältnis	Firma
2. AK	<b>goat anti-rat 555</b>	MFP-A2434	1 : 400	MoBiTec GmbH, Göttingen, D
<i>Nuclei</i>	<b>DAPI</b>	D9542	1 : 100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 16: Zusammensetzung der Sekundärantikörper für die SMA/CD31-Doppelfärbung

	Antikörper	Art.-Nummer	Mischungsverhältnis	Firma
1. AK	<b>PECAM-1 (MEC 13.3)</b>	sc-18916	1 : 50	SantaCruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA
1. AK	<b>mouse anti-mouse</b>	F-3777	1 : 3000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 17: Zusammensetzung der Sekundärantikörperlösung für die SMA/CD31-Doppelfärbung

	Antikörper	Art.-Nummer	Mischungsverhältnis	Firma
2. AK	<b>goat anti-rat 555</b>	MFP-A2434	1 : 400	MoBiTec GmbH, Göttingen, D
Kernfärbung	<b>DAPI</b>	D9542	1 : 100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 2.2 Untersuchungen im Tiermodell

### 2.2.1 Versuchsablauf

Die Versuchsgröße belief sich auf insgesamt 69 männliche Nacktmäuse mit einem homozygoten Knock-out des *FOXN-1*-Genes (NMRI-Foxn1<sup>nu/nu</sup>, s. Abbildung 2). Sie wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin

Göttingen (UMG) gehalten. Allen Tieren wurde während des gesamten Versuchsablaufes spezielles Nacktmausfutter (s. Tabelle 1) und Wasser *ad libitum* bereitgestellt.



**Abbildung 2: Nacktmaus**

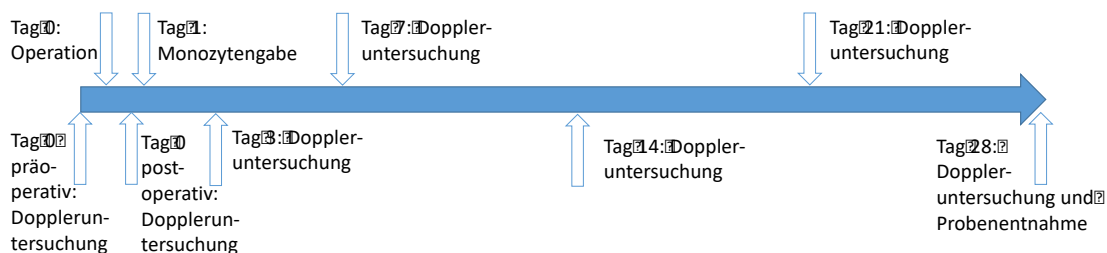
Nach präoperativer Ohrmarkierung zur eindeutigen Identifizierung wurde im Alter von 9 - 14 Wochen bei den Tieren die Operation der Hinterlaufischämie durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse mithilfe eines Laser-Dopplers untersucht und die Perfusion der Hinterläufe ermittelt. Dies geschah unmittelbar prä- und postoperativ, sowie erneut zur Verlaufsbeurteilung am 3., 7., 14., 21. und 28. postoperativen Tag.

Am ersten Tag nach Induktion der Hinterlaufischämie wurde den Tieren je nach Interventionsgruppe entweder Gesamtmonozyten (total-mo), CD16<sup>+</sup>-mo, CD16<sup>-</sup>-mo oder PBS intrakardial injiziert und folgend die Perfusionsänderung in Abhängigkeit der jeweiligen Monozytensubpopulation mittels Laser-Doppler-Perfusionsmessung an o. g. Zeitpunkten evaluiert. Um den Einfluss von Leptin auf Monozyten und deren Funktion weiter zu beleuchten, wurde die Versuchsreihe unter gleichem Versuchsaufbau noch einmal durchgeführt mit dem Unterschied, dass die Monozyten der unterschiedlichen Interventionsgruppen für 30 Minuten mit Leptin vorstimuliert wurden, sodass sich letztendlich folgende Untersuchungsgruppen ergaben:

Tabelle 18: Auflistung der Versuchsgruppen

Gruppe	stimuliert	Injektion	Anzahl der Tiere	Bezeichnung
1	nein	PBS	10	Kontrolle
2	nein	CD16 <sup>+</sup> -mo	10	CD16 <sup>+</sup> -mo
3	nein	CD16 <sup>-</sup> -mo	10	CD16 <sup>-</sup> -mo
4	nein	Gesamtmonozyten	10	total-mo
5	ja	CD16 <sup>+</sup> -mo	10	CD16 <sup>+</sup> -mo (s)
6	ja	CD16 <sup>-</sup> -mo	9	CD16 <sup>-</sup> -mo (s)
7	ja	Gesamtmonozyten	10	total-mo (s)

Nach der Laser-Doppler-Untersuchung am 28. postoperativen Tag wurden die Tiere finalisiert, die *Musculi (Mm.) semimembranosi, semitendinosi et gastrocnemii dextri et sinistri* entfernt und den unten aufgeführten histologischen Untersuchungen zugeführt. Hierbei wurden die *Mm. semimembranosi et semitendinosi* für die Untersuchung der Arteriogenese und die *Mm. gastrocnemii* für die Untersuchung der Angiogenese verwendet. Eine Übersicht über den gesamten Versuchsablauf zeigt Abbildung 3.



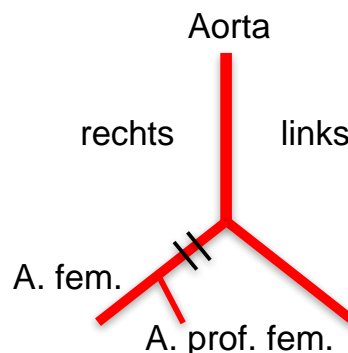
**Abbildung 3: Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Versuche**

## 2.2.2 Induktion der Hinterlaufischämie

Die Operation zur Hinterlaufischämie erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten der Arbeitsgruppe Limbourg aus Hannover (Limbourg et al. 2009). Die Tiere wurden gewogen und mit einer Peritonealanästhesie betäubt. Als Anästhetikum wurde ein NaCl-Ketamin-Xylazin-Gemisch gewichtsadaptiert (4,2 µl/g) im Verhältnis 2:1:1 eingesetzt. Nach Einsetzen einer adäquaten Narkose und Dokumentation einer guten Perfusion (s. u.) beider Hinterläufe, wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte (36 °C) positioniert, fixiert und in beiden Inguinalregionen mit 70%-iger Ethanollösung desinfiziert. Nun erfolgte mit einer Schere eine 8 mm lange Inzision der rechten sowie linken Leiste. Als erstes wurde die *sham*-Operation am linken Hinterlauf durchgeführt. Dies wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Effekte, welche gemessen wurden, auch auf die Ischämie und nicht auf eine ohnehin entstehende Entzündungsreaktion zurückzuführen sind. Hierzu wurde nach Einsetzen der Haken und der Präparation des subkutanen Fettgewebes die linke femorale Gefäß-Nerven-Straße dargestellt und proximal des Abgangs der *Arteria profunda femoris (A. prof. fem.)* aus ihrem Muskelbett präpariert. Auf die Separation der *Arteria femoralis (A. fem.)* von ihren Begleitstrukturen wurde bei der *sham*-Operation verzichtet. Nach Spülung der Operationswunde mit NaCl-Lösung (0,9%) wurde diese bis zum endgültigen Wundverschluss belassen.

Für die eigentliche Ischämieinduktion am rechten Hinterlauf wurde nun ebenfalls das subkutane Fettgewebe präpariert und gleichermaßen auch die rechte femorale Gefäß-Nerven-Straße dargestellt. Darauffolgend wurde diese proximal des Abganges der *A. prof. fem.* aus ihrem Muskelbett präpariert und dann die *A. fem.* von den begleitenden Strukturen (*Vena femoralis* und *Nervus femoralis*) separiert. Dabei entstandene venöse Blutungen wurden

durch Kompression mit einem Wattestäbchen gestillt. Nach nochmaliger Darstellung der *A. prof. fem.* und Sicherstellung, dass der Abgang dieser sich distal befindet (s. Abbildung 4), wurde nun die *A. fem.* mittels 6-0 Seidefaden doppelt ligiert und zwischen den beiden Ligaturknoten durchtrennt. Nach Dokumentation der suffizienten Ischämie erfolgte der Wundverschluss mit einem 6-0 Ethilonfaden. Zur postoperativen Nachsorge wurden die Tiere bis zum Wiedererlangen des vollständigen Bewusstseins in einem sauberen Käfig bei 36°C auf einer Wärmeplatte belassen. Zur Schmerztherapie wurde das Trinkwasser der Mäuse schon am Vortag mit Metamizol versetzt. Die Schmerzmedikation wurde bis einschließlich 7 Tage *post operationem* durchgeführt.



**Abbildung 4: Schema der arteriellen Gefäßversorgung mit eingezeichneten Ligaturen**

*A. fem.*, Arteria femoralis; *A. prof. fem.*, Arteria profunda femoris

### 2.2.3 Gewebeentnahme

Nach der letzten Dopplermessung wurden die Tiere in noch betäubtem Zustand mittels zervikaler Dislokation getötet, die *Mm. semimembranosi, semitendinosi et gastrocnemii dextri et sinistri* entfernt und in physiologischer NaCl-Lösung auf Eis gelagert. Danach erfolgte die Einbettung in Tissue tec<sup>®</sup>. Hierfür wurden die Proben auf einer vorbereiteten, beschrifteten Korkplatte befestigt, mit Tissue tec<sup>®</sup> in mit flüssigem Stickstoff gekühltes Methylbutan eingetaucht und bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.4 Clodronat

Da es zur *in-vivo*-Untersuchung humaner Monozyten im Mausmodell wünschenswert wäre, die Effekte der endogenen Monozyten weitestgehend zu minimieren, wurde versucht, diese mithilfe von Clodronat-Liposomen zu depletieren (Van Rooijen 1989; Van Rooijen und Sanders 1994). Hierzu wurde ein Vorversuch etabliert, bei dem 8 Tiere unter Isoflurannarkose (s. Kap. 2.2.5.2) mithilfe einer heparinisierten Glaskapillare ca. 50 - 100 µl Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen und in einen mit 10 µl 1,6%iger EDTA-Lösung befüllten Eppendorfröhrchen geleitet wurde. Anschließend erfolgte die Applikation von Clodronat-Liposomen. Zur Evaluation der Menge und Applikationsart der Clodronat-Liposomen erfolgte die Gabe zweier unterschiedlicher Mengen jeweils intrakardial und intraperitoneal (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: Darstellung der Versuchsgruppen zum Clodronatversuch

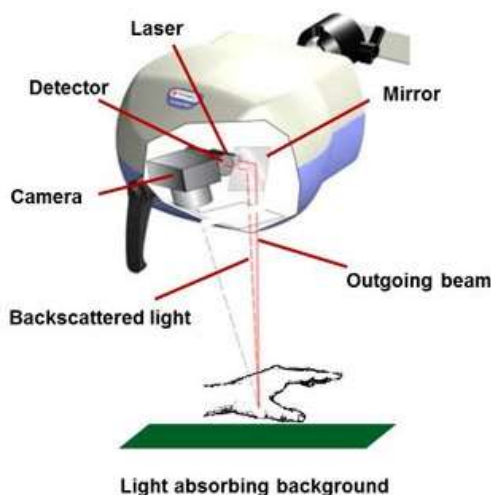
Gruppe	Injektionsort	Injektionsmenge	Anzahl der Tiere
1	Herz	150 $\mu$ l	2
2	Peritoneum	150 $\mu$ l	2
3	Herz	200 $\mu$ l	2
4	Peritoneum	200 $\mu$ l	2

Um die Wirkung der Clodronat-Liposomen auf das murine Monozyten-Makrophagen-System zu überprüfen, erfolgte die retrobulbäre Blutabnahme nach oben beschriebenem Schema nochmals am erstem und dritten Tag nach der Injektion. Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme gemischt und einer Blutbilduntersuchung am *Beckmann Coulter A<sup>c</sup>T 5diff Hematology Analyzer* zugeführt.

## 2.2.5 Laser-Doppler-Perfusionsmessung

### 2.2.5.1 Prinzip der Laser-Doppler-Perfusionsmessung

Die Technik der Laser-Doppler-Perfusionsmessung beruht auf der Emission eines Laserstrahls über eine faseroptische Sonde (<https://www.perimed-instruments.com/de/Laser-Doppler-Imaging> 2016). Hierbei wird die gesamte Durchblutung des abgetasteten Areals inklusive der Mikrozirkulation untersucht, indem ein Laserstrahl nacheinander einzelne, dicht nebeneinander liegende Messpunkte analysiert.



**Abbildung 5: Schematischer Aufbau des PeriScan PIM 3**

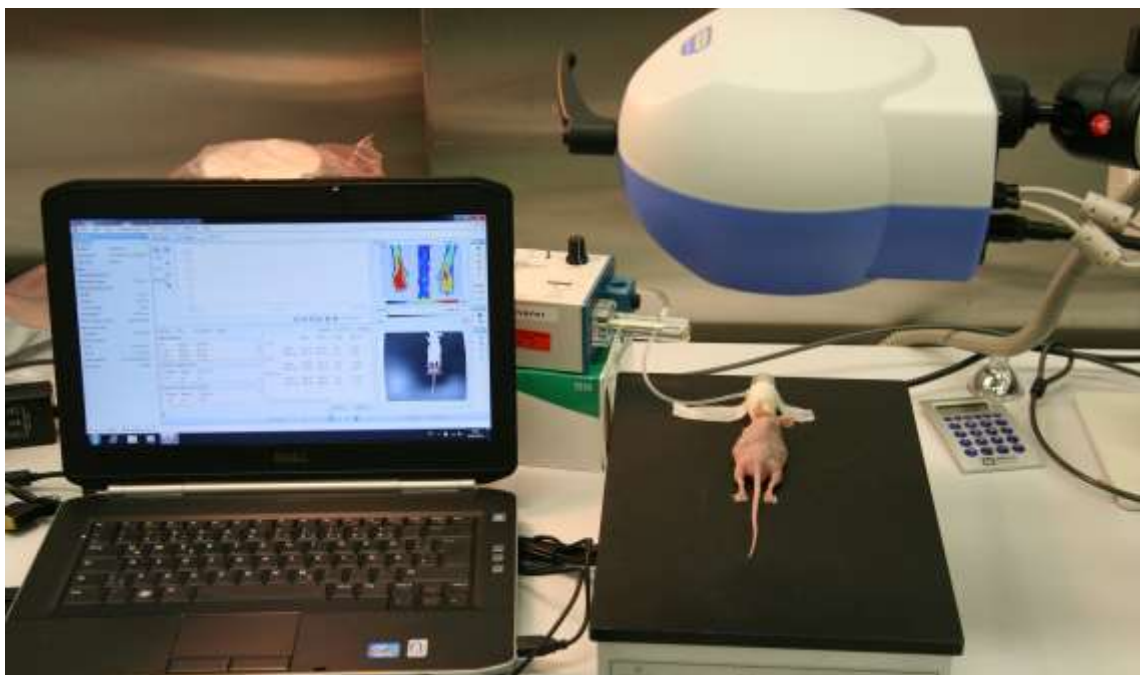
Mit freundlicher Genehmigung von Perimed AB

Trifft das Licht auf das zu untersuchende Gewebe, wird es verstreut und teilweise von diesem absorbiert. Wie bei akustischen Signalen, ändert sich auch bei Lichtwellen, die auf bewegte Teile treffen, die Wellenlänge. Lichtwellen, die dagegen auf unbewegtes Gewebe treffen, werden mit der gleichen Wellenlänge reflektiert (Prinzip der Dopplerverschiebung).

Dieses reflektierte Licht wird mithilfe eines integrierten Fotodetektors registriert (s. Abbildung 5) und somit der mikrozirkulatorische Blutfluss aus den unterschiedlichen Wellenlängen des reflektierten Lichtes errechnet.

#### 2.2.5.2 Durchführung der Perfusionsmessung

Die Tiere wurden an o. g. Zeitpunkten am PeriScan PIM 3 System einer Laser-Doppler-Messung unterzogen. Hierfür erfolgte die Narkoseeinleitung in einem mit Isofluran gefüllten, verschließbaren Glasgefäß. Nachdem die Mäuse betäubt waren, wurden sie auf einer Wärmeplatte platziert und mithilfe eines Beatmungsgeräts (*Mini Vent Mouse Ventilator Typ 845*) mit einem Isofluran-Luft-Gemisch weiterbeatmet und somit die Narkose aufrechterhalten (s. Abbildung 6). Bei der Fixierung wurde auf eine parallele und ausgestreckte Lagerung der Hinterläufe geachtet, um in der späteren Doppler-Perfusionsmessung keine Überlagerungen zu sehen. Nach dem korrekten Platzieren der Maus auf der Wärmeplatte konnte das Gebiet, welches der Laser abfahren sollte, eingegrenzt werden. Anschließend wurde die Messung gestartet. Nachdem die jeweiligen Messungen beendet waren, wurden die Tiere in einen separaten Käfig verbracht und dort bis zum vollständigen Erwachen aufbewahrt.

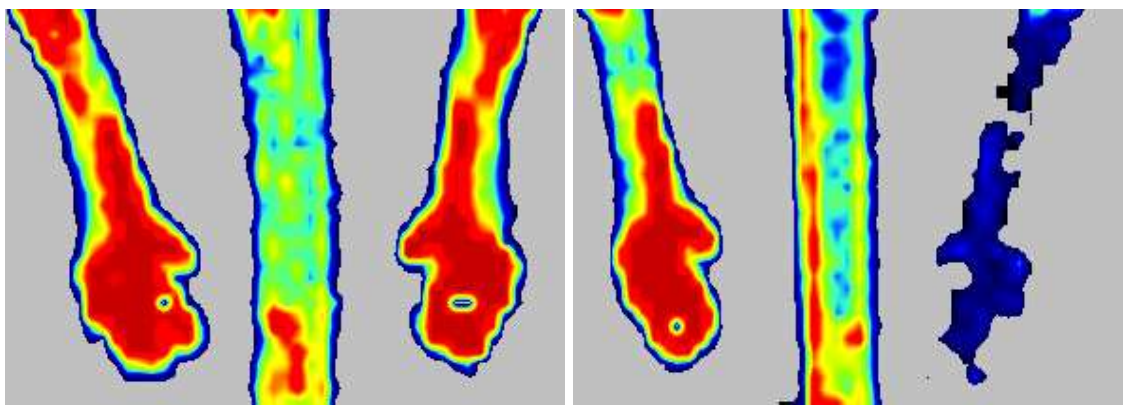


**Abbildung 6: Versuchsaufbau der Laser-Doppler-Perfusionsmessung**

#### 2.2.6 Auswertung der Laser-Doppler-Messungen

Zur Durchführung und Auswertung der Laser-Doppler-Untersuchungen wurde das Programm PIMSoft<sup>®</sup> benutzt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Areale markiert, wobei Areal 1 jeweils der *sham*-operierten Seite und Areal 2 der operierten Seite zugeteilt wurde. Um die Perfusion unabhängig von anderen Faktoren (Blutdruck etc.) beurteilen zu können, wurde nun jeweils der Quotient der mittleren Perfusionswerte von Areal 1 und Areal

2 (im Folgenden Ratio genannt) gebildet und die Mittelwerte dieser Ratios in Abhängigkeit vom jeweiligen Untersuchungstag aufgetragen. Abbildung 7 zeigt eine exemplarische Darstellung der Perfusion mittels Laser-Doppler.



**Abbildung 7: Beispielhafte Perfuisionsdarstellung der Laser-Doppler-Messung**

links: Dopplermessung vor der Operation; rechts: Dopplermessung unmittelbar nach der Operation

### 2.2.7 Genehmigung der Studie

Der tierexperimentelle Teil dieser Studie wurde nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt (Az.: 33.9-42502-04-10/0320). Haltung und Versuche erfolgten gemäß nationalen Bestimmungen.

## 2.3 Monozytenisolation

### 2.3.1 Beschreibung des Blutspendekollektives

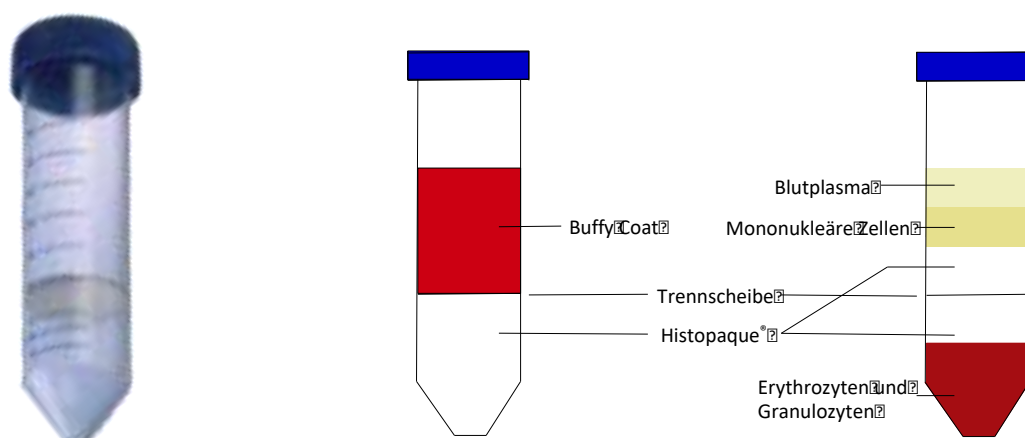
Die Monozyten und ihre Subpopulationen wurden aus *Buffy Coats* gewonnen, die in der Abteilung für Transfusionsmedizin der UMG (kommissarische Leitung: Priv.-Doz. Dr. J. Riggert) im Rahmen der täglichen Blutspende erstellt wurden. Die durchgeführten Versuche wurden ausschließlich an männlichen Tieren durchgeführt. Aus diesem Grund wurden für die Isolation der Monozyten ebenfalls ausschließlich männliche Probanden ausgewählt. Aus früheren Untersuchungen zur Monozytenfunktion geht hervor, dass z. B. isolierte Monozyten aus Patientenblut von Diabetikern ein schlechteres Migrationsvermögen aufweisen als Monozyten gesunder Probanden (Waltenberger et al. 2000). Zusätzlich zeigen auch Monozyten, isoliert aus Blut von Patienten mit Hypercholesterinämie, eine Migrationseinschränkung. Dies scheint verstärkt durch das gleichzeitige Vorhandensein einer KHK in diesen Patienten (Czepluch et al. 2007; Czepluch et al. 2011). Da diese Risikofaktoren für eine KHK weitestgehend in adipösen Menschen anzutreffen sind, wurden letztlich nur Blutspender in die Studie eingeschlossen, deren *Body Mass Index* (BMI) 18,5 - 30 kg/m<sup>2</sup> betrug. Spender mit den nachgewiesenen cvRF arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus sowie aktives Rauchen



wurden ebenfalls nicht berücksichtigt, da z. B. weiterführende Untersuchungen zur Monozytenfunktion belegen, dass Monozyten aus Blut rauchender Probanden ebenfalls Einschränkungen in der Migrationsfähigkeit aufzeigen (Stadler et al. 2007). Zusätzlich wurden Probanden nicht berücksichtigt, die andere Krankheiten aufwiesen, bei denen die aktuelle Zahl der Monozyten beeinflusst sein könnte, wie z. B. Autoimmun- oder Tumorerkrankungen, aktive Allergien oder Infektionen. Diese Ausschlusskriterien wurden anhand eines Fragebogens (s. Anhang) vor Durchführung der Blutspende erfasst, sodass keiner der entstandenen *Buffy Coats* unnötig für wissenschaftliche Zwecke verbraucht wurde.

### 2.3.2 MicroBeads®-assistierte Isolation humaner Monozyten

Die Isolation der humanen Monozyten wurde durchgeführt mithilfe einer MicroBeads®-assistierten magnetischen Selektion (Czepluch et al. 2011). Hierfür wurde zunächst nach Rekrutierung der Blutspender in der Abteilung für Transfusionsmedizin der UMG die Blutspende durchgeführt und die Blutkonserven im Anschluss für mindestens eine Stunde zum Ruhen aufbewahrt. Nach der anschließenden Zentrifugation und dem Abpressen der Erythrozyten zur weiteren Aufbereitung wurde der Buffy Coat ins Labor überführt und in Portionen von 20 ml in mit Histopaque® vorbereitete „Ficoll-Paque“-Röhrchen (s. Abbildung 8) verteilt und für 20 min einer Dichtegradientenzentrifugation bei 400 rcf, 20 °C ohne Bremse zugeführt, sodass die entstandenen Banden nicht durch Bremsen wieder zerstört wurden.



#### Abbildung 8: "Ficoll-Paque"-Röhrchen:

links: unbenutztes Röhrchen; Mitte: Schematische Darstellung vor Zentrifugation; rechts: schematische Darstellung nach Zentrifugation, mit freundlicher Genehmigung von Greiner Bio-One International GmbH

Nach der Zentrifugation wurde der Zellüberstand abgesaugt, die Bande der mononukleären Zellen (MNC)-Suspension in Falcon-Röhrchen überführt und nachfolgend mit

PBS/EDTA gewaschen (250 rcf, 10 min, 20 °C). Nach dem Resuspendieren wurde die Lösung im Verhältnis 1:5 aufgeteilt. Ein Teil wurde für die Isolation der total-mo und CD16<sup>-</sup>-mo, fünf Teile für die Herstellung der CD16<sup>+</sup>-mo verwendet. Nach nochmaligem Waschen und anschließender Kühlung der Zentrifuge (8 °C) wurden die Suspensionen über einen Präseparationsfilter gegeben und anschließend das genaue Volumen der Suspensionen, sowie deren Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Aus diesen Parametern wurde die letztendliche Menge der Zellen bestimmt, die für die magnetische Konjugation eingesetzt werden sollte. Nach erneuter Zentrifugation (1000 rcf, 5 min, 8 °C) und Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets mit jeweils 15 µl *Assay*-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert und für die weitere Inkubation vorbereitet. Die folgenden zwei Abschnitte erfolgten im Wesentlichen parallel.

### 2.3.2.1 Isolation von CD16<sup>-</sup>- und Gesamtmonozyten

Für die Isolation von CD16<sup>-</sup>- und total-mo wurde das Monocyte Isolation Kit II (s. Tabelle 8) verwendet. Hierbei wurden zunächst mittels der aus humanem Immunglobulin bestehenden FcR-Blocking-Reagenz unspezifische Antigen-Antikörperbindungen geblockt. Gleichzeitig erfolgte als erster Schritt der Monozytenisolation das Aussortieren von Nicht-Monozyten aus der MNC-Suspension. Hierfür wurde der Biotin-Antikörper Cocktail verwendet. Dieser enthält entsprechend verschiedene Biotin-konjugierte Antikörper (gegen CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und Glycophorin A). Entsprechend wurde den Zellen nach Resuspension zunächst die FcR-Blocking Reagenz und der Biotin-Antikörper-Cocktail hinzugegeben und die Suspension für 10 min im Kühlschrank inkubiert. Nach erneuter Zugabe von nochmals 15 µl *Assay*-Puffer auf 10<sup>7</sup> Zellen, wurden dann die Anti-Biotin MicroBeads hinzugefügt und die Suspension nochmals für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Für den anschließenden Waschschriff wurde dem Röhrchen nochmals 8 ml *Assay*-Puffer zugeführt und anschließend für 5 min zentrifugiert (1000 rcf, 8 °C). Während der Zentrifugation wurde die Separationssäule (LS-Säule) vorbereitet. Hierfür wurde diese in den Magneten eingespannt und mit 3 ml *Assay*-Puffer vorgefüllt. Nach Absaugen des Überstandes und der anschließenden Resuspension mit 3 ml *Assay*-Puffer wurde nun die Separationssäule mit der Zellsuspension befüllt und anschließend nochmals mit 6 ml *Assay* Puffer gespült. Die hieraus resultierende Zelllösung wurde nun mit *Assay*-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt, erneut die genaue Zellzahl bestimmt und 10<sup>7</sup> Zellen (nun total-mo) entnommen und auf Eis gelagert. Die restliche Zellsuspension wurde zur Isolation der CD16<sup>-</sup>-mo einer weiteren Zentrifugation zugeführt (1000 rcf, 5 min, 8 °C).

Nach erneutem Absaugen des Flüssigkeitsüberstandes wurden die Zellen erneut mit 40 µl *Assay*-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert und anschließend 10 µl an CD16 MicroBeads pro 10<sup>7</sup> Zellen MicroBeads zugeführt. Es erfolgte wiederum die Inkubation für 15 min im Kühlschrank. Nach nochmaligem Auffüllen mit 8 ml *Assay*-Puffer und anschließendem Zentrifugieren (1000 rcf, 5 min, 8 °C) erfolgte die nachfolgende Resuspension des Pellets

mit 50  $\mu\text{l}$  *Assay*-Puffer auf  $10^7$  Zellen der initialen Zellzählung. Für die nun folgende zweite magnetische Separation wurde erneut eine LS-Separationssäule ausgewählt, welche im Magneten eingespannt mit 3 ml *Assay*-Puffer vorgefüllt wurde. Nun erfolgte die erneute Hinzugabe der Zellsuspension. Nachfolgend wurden die Inkubationsröhrchen mit 3 x 3 ml *Assay*-Puffer ausgespült. Nach erneuter Zentrifugation (1000 rcf, 5 min, 8 °C) und dem Absaugen des Zellüberstandes wurden nun beide Zellpellets (inklusive den bis zu diesem Zeitpunkt auf Eis gelagerten total-mo) in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl nochmals mittels Trypanblau und Neubauer-Zählkammer ermittelt. Das entsprechende Volumen für  $10^6$  Zellen wurde abgenommen und bis auf 300  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

### 2.3.2.2 Isolation von CD16<sup>+</sup>-Monozyten

Die Isolation der CD16<sup>+</sup>-mo erfolgte unter der Verwendung des CD 16<sup>+</sup> Monocyte Isolation Kit (s. Tabelle 9). Hierbei wurde der Suspension zunächst die FcR-Blocking Reagenz (Funktion s. Kap 2.3.2.1) und der Non-Monocyte Depletion Cocktail (s. Kap. 2.1.5) hinzugefügt und diese im Anschluss für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Hiernach erfolgte ein Waschschrift. Hierfür wurde die Suspension mit 8 ml *Assay*-Puffer aufgefüllt und für 5 min zentrifugiert (1000 rcf, 8 °C). Während der Zentrifugation wurde die Separationssäule (LD-Säule) vorbereitet. Diese wurde hierfür in den Magneten eingespannt und bereits mit 2 ml *Assay*-Puffer vorgefüllt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet erneut resuspendiert. Hierfür wurden 500  $\mu\text{l}$  *Assay*-Puffer pro  $1,25 \times 10^8$  Zellen benötigt. Nun wurde die LD-Säule mit der Zellsuspension befüllt und nachfolgend zweifach mit 1 ml *Assay*-Puffer gespült. Anschließend wurde die Probe mit *Assay*-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt und einer weiteren Zentrifugation zugeführt (1000 rcf, 5 min, 8 °C).

Der Zellüberstand wurde erneut abgesaugt und das Zellpellet nochmals mit 20  $\mu\text{l}$  *Assay*-Puffer auf initial  $10^7$  Zellen resuspendiert, nachfolgend die entsprechende Menge an CD16 MicroBeads zugeführt (5  $\mu\text{l}$  MicroBeads auf initial  $10^7$  Zellen) und die Probe nochmals für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde nochmals gewaschen und die Suspension hierzu mit 8 ml *Assay*-Puffer aufgefüllt. Nach Zentrifugation (1000 rcf, 5 min, 8 °C) und Absaugen des Zellüberstandes erfolgte nun die Resuspension des Pellets mit 50  $\mu\text{l}$  *Assay*-Puffer auf  $10^7$  Zellen der initialen Zellzählung. Wiederum wurde während dieses Waschschriftes die Separationssäule (LS-Säule) für die zweite magnetische Separation vorbereitet und diese hierzu in den Magneten eingespannt und mit 3 ml *Assay*-Puffer vorgefüllt. Anschließend wurde die Zellsuspension hinzugegeben und das Inkubationsröhrchen mit 3 x 3 ml *Assay*-Puffer ausgespült. Da die isolierten CD16<sup>+</sup>-mo sich nun innerhalb der Separationssäule befanden, wurde diese aus dem Magneten entfernt und über einem neuen Röhrchen mit 5 ml *Assay*-Puffer vorsichtig herausgespült. Nach erneuter Zentrifugation (1000 rcf, 5 min, 8 °C) und dem Absaugen des Zellüberstandes wurde in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl nochmals mittels Trypanblau und

Neubauer-Zählkammer ermittelt. Auch hier wurde das  $10^6$  Zellen entsprechende Volumen abgenommen und bis auf 300  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

#### 2.3.2.3 Stimulation mit Leptin

Im Falle der weiteren Stimulation mit Leptin wurden die Zelllösungen nochmals zentrifugiert (1000 rcf, 5 min, 8 °C), der Zellüberstand abgesaugt und die Pellets nun in 990  $\mu\text{l}$  RPMI-Medium aufgenommen. Hiernach wurde 10  $\mu\text{l}$  Leptin ( $c = 1 \text{ pg/ml}$ ) hinzugefügt und die Suspension anschließend einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C unter 5%-iger Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ )-Begasung zugeführt. Nach Beenden der Inkubation wurden die Röhrchen unmittelbar mit PBS aufgefüllt, einer weiteren Zentrifugation zugeführt, und nach Absaugen des Zellüberstandes das Zellpellet anschließend in 300  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen.

#### 2.3.2.4 Applikation der Zellen

Im Anschluss an die Aufnahme der Zellsuspensionen in Insulinspritzen (Kanülengröße 30 G) wurden die Zellen den mit Isofluran (Anästhesie s. S. 20) betäubten Mäusen intrakardial injiziert. Dies wurde regelmäßig am ersten postoperativen Tag durchgeführt.

### 2.3.3 Durchflusszytometrische Qualitätskontrollen der Monozytenisolation

Qualitätskontrollen der bei der Monozytenisolation separierten Monozyten und ihrer Subpopulationen wurden durchflusszytometrisch anhand einzelner Stichproben der Isolationen durchgeführt. Zusätzlich wurde auch die Expression des ObR überprüft.

#### 2.3.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden mithilfe eines Laserstrahls unterschiedlichste Zellen und Partikel einer Probe untersucht und analysiert. Hierfür werden nach Aufnahme in das Durchflusszytometer die Zellen mithilfe eines starken Flüssigkeitsstroms dicht hintereinander aufgereiht und nacheinander an einem Messpunkt vorbeigeführt, an dem ein Laserstrahl jede Zelle des Materials einzeln erfasst. Hierbei können bei der Untersuchung bis zu 10000 Zellen pro Sekunde analysiert werden.

Nachdem der Laser eine Zelle getroffen hat, wird von dieser Vorwärtsstreulicht (engl. *Forward Scatter* [FSC]) und Seitwärtsstreulicht (engl. *Side Scatter* [SSC]) in zwei unterschiedliche Richtungen ausgesendet, welches von zwei unterschiedlichen Empfängern aufgefangen wird und dabei seine Wellenlänge nicht verändert (Leach et al. 2013; Macey 2007). Das Vorwärtsstreulicht klassifiziert hierbei die Zellgröße, wohingegen das SSC eher die Art und Beschaffenheit intrazellulärer Granula anzeigt. Abbildung 9 zeigt schematisch den prinzipiellen Aufbau eines Durchflusszytometers.

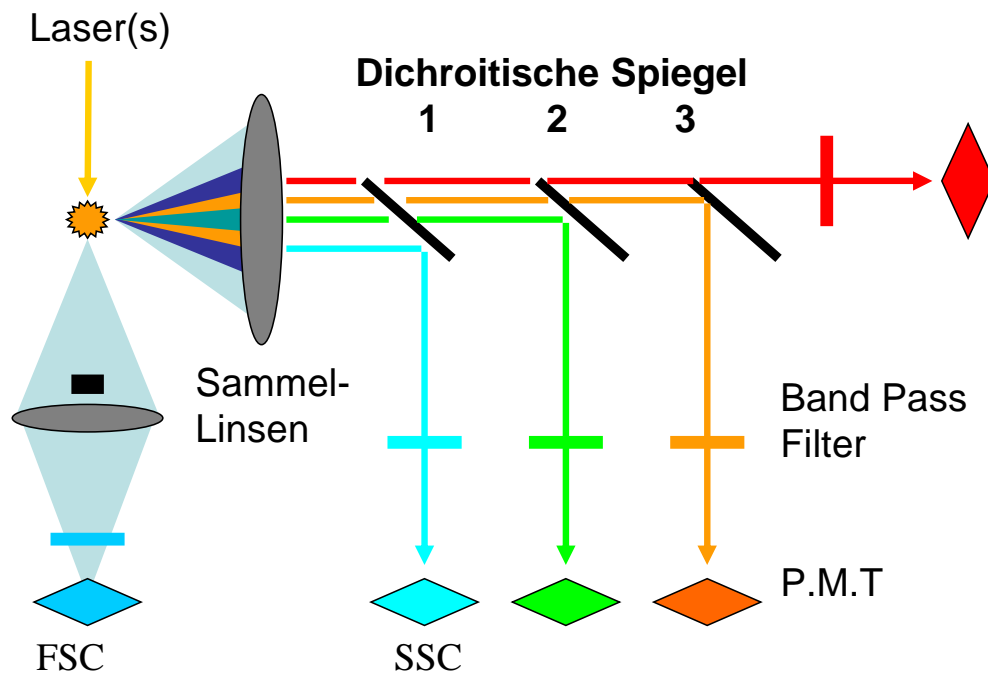


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers  
mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Böhmler, Beckmann Coulter

Über die vom Streulicht ausgehenden Aussagen hinaus können weitere Zelleigenschaften mittels eingesetzter Fluorochrome, welche nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge spezielle Emissionsspektren abgeben, ermittelt werden. Diese können einerseits Bestandteil der Zelle sein, jedoch auch *in vivo* eingebracht (z. B. DAPI) oder über Antikörper *in vitro* an Oberflächenproteine von Zellen konjugiert werden.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit benutzten Durchflusszytometer (BD FACSCanto™ II) wurden Fluorochrome benutzt, welche bei 488 nm bzw. 633 nm ihr Exzitationsmaximum besitzen. Entsprechend wurde auch lediglich der blaue und rote Laser genutzt. Nachfolgende Tabelle zeigt die Eigenschaften der verschiedenen verwendeten Fluorochrome und der jeweils eingesetzten Laser. Die benutzten Antikörper finden sich in den Tabellen 9 bis 13.

Tabelle 20: Übersicht über die farblichen Eigenschaften und Wellenlängen der Fluorochrome

Fluorochrom	Exzitationsmaximum	Emissionsmaximum	Farbe	Laser
FITC	488 nm	518 nm	grün	blau (488 nm)
PE	488 nm	578 nm	gelb	blau (488 nm)
APC	633 nm	660 nm	rot	rot (633 nm)
PerCP-Cy™5.5	488 nm	695 nm	tiefrot	blau (488 nm)

### 2.3.3.2 Aufbereitung der Monozyten zur FACS™-Färbung

Nach der Bestimmung der endgültigen Zellzahl wurden jeweils  $10^6$  Zellen aus den Probenröhrchen entnommen, in ein mit  $400\ \mu\text{l}$  1%iger PFA-Lösung befülltes Polystyrene-FACS™-Röhrchen überführt, mit einer großlumigen Pipette gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit Zugabe von zunächst 2 ml und anschließend 3 ml PBS(1x)/BSA(1%) pro FACS™-Röhrchen und folgender Zentrifugation (1000 rcf, 5 min,  $20\ ^\circ\text{C}$ ).

### 2.3.3.3 Kontrolle der Reinheit der Isolation

Die Reinheitskontrolle der total-mo und der Monozytensubpopulationsfraktionen wurde mithilfe von CD16- und CD14-Antikörpern geführt. Diesbezügliche folgte nach dem Absaugen des Zellüberstandes die vorsichtige Resuspension mit PBS(1x)/BSA(1%). Hierfür wurden für die verschiedenen Teile der Färbung unterschiedliche Volumina benutzt. Die Negativkontrolle wurde mit  $50\ \mu\text{l}$ , die Isotypenkontrolle mit  $30\ \mu\text{l}$  und die eigentliche Antikörperfärbung mit  $33,75\ \mu\text{l}$  resuspendiert. Hiernach wurden die jeweiligen Antikörperlösungen (s. Tabelle 10 und Tabelle 11) hinzupipettiert. Im Anschluss wurden die Lösungen für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 2 ml  $4\ ^\circ\text{C}$  kaltem PBS(1x)/BSA(1%), Mischen und anschließender Zentrifugation (5 min,  $4\ ^\circ\text{C}$ , 1000 rcf) wurden die Zellpellets in  $500\ \mu\text{l}$  1%igem PFA resuspendiert und bis zur Untersuchung am FACS™-Gerät bei  $4\ ^\circ\text{C}$  im Dunkeln gelagert.

### 2.3.3.4 Kontrolle der Expression des Leptinrezeptors

Für die Kontrolle der Expression des ObR erfolgte die Färbung ausgewählter Stichproben mit Fluorochromen gegen den ObR. Hierfür wurden den FACS™-Röhrchen nach Resuspension des Zellpellets in  $100\ \mu\text{l}$  PBS(1x)/BSA(1%) für die Negativkontrolle und in jeweils  $87,5\ \mu\text{l}$  für die Färbung sowie auch die Isotypenkontrolle,  $12,5\ \mu\text{l}$  der Antikörperlösungen (Verteilung s. Tabelle 12 und Tabelle 13) zugeführt und die Proben im Anschluss gründlich mit dem Vortex® vermischt. Die anschließende Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Inkubation wurde mit jeweils 2 ml  $4\ ^\circ\text{C}$  kaltem PBS(1x)/BSA(1%) unter gutem Vermischen gestoppt. Nach anschließender Zentrifugation (5 min,  $4\ ^\circ\text{C}$ , 1000 rcf) und Absaugen des Zellüberstandes folgte die Resuspension in  $500\ \mu\text{l}$  1%igem PFA und die Lösung wurde bis zur Untersuchung am FACS™-Gerät bei  $4\ ^\circ\text{C}$  im Dunkeln gelagert.

### 2.3.3.5 Durchführung der FACS™-Untersuchung

Die letztendliche durchflusszytometrische Untersuchung am FACSCanto™ II (BD Bioscience) sowie das *Gating* und die Auswertung wurden durch Herrn Dr. med. Hendrik Kuschicke, Doktorand in der Arbeitsgruppe (AG) „Vaskuläre Biologie und Arterioskleroseforschung“ der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie der UMG, durchgeführt.

### 2.3.3.6 Auswertung der FACS<sup>TM</sup>-Untersuchung

Zum Auswerten der durchflusszytometrischen Daten wurde das Programm FACSDiva<sup>TM</sup> benutzt. Hierbei wurden die aufgenommenen *Blots* zuerst anhand ihres FSC und SSC gegatet und somit, da es sich ausschließlich um Zellen nach o. g. Zellisolationen handelte, nochmals die Reinheit der Isolationen überprüft. Anschließend erfolgte die Auftragung anhand der Fluorochromeigenschaften und die Zuordnung zu CD16<sup>+</sup>-mo, CD 16<sup>-</sup>-mo und total-mo bzw. ObR<sup>+</sup> und ObR<sup>-</sup>. Die hieraus generierten Rohdaten wurden dann zur weiteren statistischen Berechnung und grafischen Darstellung in GraphPad Prism überführt. Auch diese Daten wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Kuschicke erstellt.

### 2.3.4 Genehmigung der Studie

Der humane Teil dieser experimentellen Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Georg-August-Universität Göttingen geprüft und unter der Antragsnummer 20/2/11 genehmigt.

## 2.4 Histologische Analysen der Muskelgewebe

### 2.4.1 Erstellen von Gefrierschnitten

Die eingefrorenen Muskelproben wurden in einem gekühlten Kryotom eingespannt und in 5 - 10 µm dicke Scheiben geschnitten. Es wurden jeweils 3 Serienschnitte auf einen Objektträger aufgenommen, kurz angetrocknet und anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

### 2.4.2 Beschreibung der unterschiedlichen Antikörper

Für die unterschiedlichen histologischen Färbungen wurden spezifische Antikörper eingesetzt. So wurde für die Markierung des Endothels ein Antikörper gegen *Platelet-Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule-1* (PECAM-1), oder auch CD31 genannt, eingesetzt. Zur Färbung der glatten Gefäßmuskelschicht wurde ein Antikörper gegen *Smooth-Muscle-Actin* (SMA) gewählt.

### 2.4.3 Allgemeines Protokoll der CD31- und SMA-Färbungen

Die eingefrorenen Muskelschnitte wurden nach dem Auftauen einem Wässerungsschritt mit PBS (5 min) unterzogen und hiernach für 10 min bei -20 °C in Aceton fixiert. Nach einer kurzen Trocknungsphase der Objektträger unter einem Abzug wurden die einzelnen Schnitte mit einem PAP PEN<sup>®</sup> mini umrandet, um ein Zerfließen der Antikörperlösungen bei der späteren Inkubation zu verhindern. Nach einem weiteren Wässerungsschritt mit PBS (5 min) erfolgte die Permeabilisierung (10 min bei 37 °C) in einer vorgewärmten

0,05%-igen Triton-X-Lösung, welcher sich eine mehrmalige Spülung mit PBS (3 x 5 min) anschloss. Zur anschließenden Inkubation des ersten Antikörpers wurden unten stehende Antikörperkombinationen verwendet (s. Tabellen 14 und 15). Die jeweilige Negativkontrolle (statt Primärantikörperinkubation nur *AB-Diluent*) erfolgte auf jedem Objektträger an dem Schnitt, welcher sich am weitesten rechts befand. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Objektträger während aller Inkubationen in einer Feuchtkammer gelagert. Im Falle der CD31-Färbung wurde der Primärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur, die Lösung der ersten Antikörper im SMA/CD31-Doppelfärbungsprotokoll jedoch für 60 min bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS (3 x 5 min) erfolgte die Inkubation der Sekundärantikörperlösung für 60 min im Dunkeln bei Raumtemperatur, welche wiederum durch eine weitere PBS-Waschung (3 x 5 min) entfernt wurde. Nach der anschließenden Kernfärbung mit DAPI für 15 min bei Raumtemperatur konnten die Objektträger nach einem letzten Waschgang mit PBS (wiederum 3 x 5 min) mit dem *Mounting Medium VectaShield*<sup>®</sup> blasenfrei eingedeckt werden.

#### 2.4.4 Histologische Auswertungen

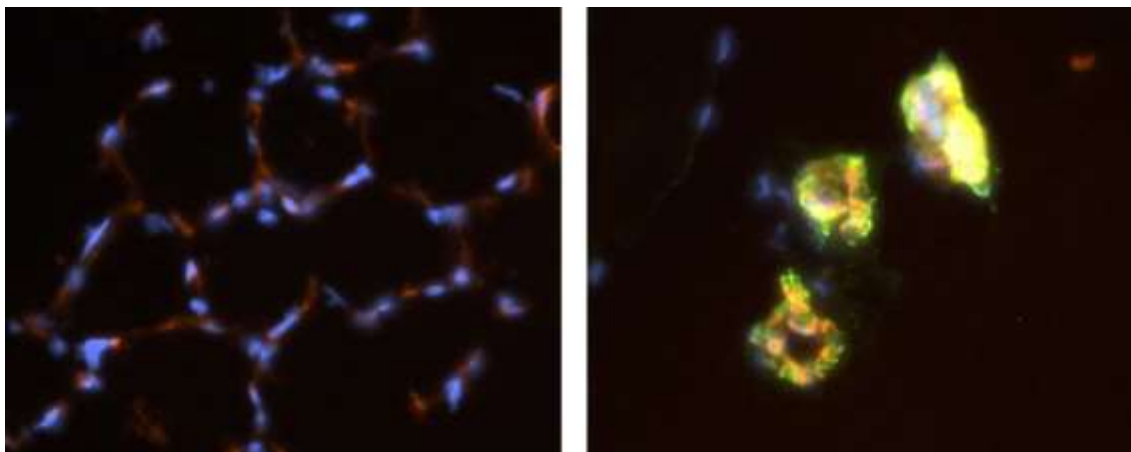
Die Betrachtung der Färbungen unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte innerhalb von 24 h, um einer Schwächung des Lichtsignals durch Lagerung entgegenzuwirken. Hierbei wurden alle Schnitte systematisch nach der visuell größten Dichte entsprechender Arteriolen (SMA/CD31-Doppelfärbung) bzw. Kapillaren (CD31-Färbung) durchsucht und jeweils fünf repräsentative Bilder (s. Abbildung 10) dieser Areale mithilfe des Programms *Axio Vision* in 200-facher Vergrößerung aufgenommen, wobei kontrolliert wurde, dass die Belichtungszeiten der jeweiligen Belichtungskanäle einer Färbung sich gleichen. Die entstandenen Bilder wurden mit dem Programm *Image Pro Plus*<sup>®</sup> ausgewertet. Um die Färbungen vor Austrocknung zu schützen, wurden die Deckgläschen mit Nagellack versiegelt, bevor die Lagerung bei 4 °C im Dunkeln erfolgte.

Im Einzelnen erfolgte bei der Untersuchung zur Angiogenese die Auszählung der mit CD31 positiv gefärbten Signale in Kolokalisation mit einem mit DAPI angefärbten Zellkern. Somit wurde sichergestellt, dass falsch-positiv gefärbte Signale in Rot (Farbe der CD31-Färbung) nicht versehentlich als Kapillare gewertet wurden. Um die verschiedenen Gruppen untereinander vergleichen zu können und interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren zu minimieren, erfolgte die weitere Auswertung nachfolgend als Ratio der operierten gegen die *sham*- operierte Seite.

Zusätzlich wurde mithilfe des Programms *Image Pro Plus*<sup>®</sup> die mit Sekundärantikörper gefärbte Gesamtfläche des Bildausschnittes gemessen und im Anschluss durch die ermittelte Gesamtzahl an Kapillaren in diesem Bild dividiert. Dies gibt eine Aussage über die durchschnittliche Fläche einer einzelnen Kapillare im jeweiligen Bildausschnitt. Auch



hier wurden analog zu den anderen Auswertungen das Verhältnis von operierter zu *sham*-operierter Seite ermittelt und diese Werte untereinander verglichen.



**Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der histologischen Färbungen**  
links: Immunfluoreszenzbild der CD31-Färbung; rechts: Immunfluoreszenzbild der SMA-Färbung, Vergrößerung x200

Des Weiteren erfolgte zusätzlich die Untersuchung der Vaskularisation der einzelnen Myofibrillen. Hierfür wurden in jedem aufgenommenen Areal fünf repräsentative Fibrillen ausgewählt und die Anzahl der die jeweilige Fibrille versorgenden Kapillaren ermittelt. Auch hier erfolgte die weitere Auswertung als Ratio der operierten zur *sham*-operierten Seite.

Die Färbung wurde anhand „doppelt positiv“-gefärbter Areale ausgewertet, d. h. es wurden lediglich Zellen und Zellkerne zur Auswertung herangezogen, die ein positives Signal des zweiten Antikörpers und an gleicher Stelle auch ein positives DAPI-Signal zeigten. So konnten falsch positive Signale aus der Auswertung eliminiert werden. Es erfolgte die Auszählung der Zellen. Im Anschluss wurde die Anzahl der Zellen (pro Gesichtsfeld) mit dem entsprechenden Faktor (6,7 für 200x) multipliziert, um die Anzahl der doppelt positiven Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu errechnen.

Weiterhin wurde bei der Analyse der Arteriogenese die Gesamtfläche der SMA-positiv gefärbten Areale pro Bild ermittelt, anschließend durch die Anzahl der auf dem Bild zu erkennenden Arteriolen dividiert und somit die durchschnittliche Fläche als indirektes Maß für die Dicke der Arteriolenwand bestimmt. Hiernach erfolgte wiederum die Bildung des Quotienten vom operierten und *sham*-operierten Hinterlauf, um somit die Unterschiede in Abhängigkeit von der mit Leptin stimulierten sowie auch unstimulierten Monozytensubpopulationen darstellen zu können.

## 2.5 Statistische Auswertung

Sowohl die statistische Auswertung als auch die grafische Aufarbeitung und Darstellung der Daten wurde mithilfe des Programms GraphPad Prism (Version 6.01) durchgeführt.

### 2.5.1 Statistische Auswertung der Dopplerergebnisse

Die statistische Analyse der Reperfusionsergebnisse nach Laser-Doppler-Untersuchung erfolgte jeweils zu den angegebenen Messzeitpunkten mittels *one-way*-Varianzanalyse (*ANOVA*)-Tests, gefolgt von dem *Bonferroni Multiple Comparison Test* (Bonferroni-Korrektur). Hierbei wurde auf statistische Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen zur Kontrollgruppe, den unstimulierten sowie Leptin-stimulierten Interventionsgruppen untereinander und auch den jeweils zueinander gehörigen Gruppen in Abhängigkeit von der Leptin-Stimulation (z. B. total-mo gegen total-mo [s]) getestet.

### 2.5.2 Statistische Auswertung der histologischen Untersuchungen

Bei der Berechnung der statistischen Unterschiede der histologischen Daten erfolgte zunächst der Test der Daten auf eine Gauß'sche Normalverteilung. Sofern diese gegeben war, erfolgte die weitere Untersuchung der einzelnen Gruppen mithilfe des *one-way ANOVA*-Tests, gefolgt vom *Bonferroni Multiple Comparison Test*. Signifikanzen ergaben sich ab einem Wahrscheinlichkeitswert von  $p < 0,05$ . Dargestellt sind hier jeweils der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM).

Bestätigte die initiale Testung keine Normalverteilung, erfolgte die weitere Berechnung mithilfe des nonparametrischen *Kruskal Wallis Tests*. Hier folgte daraufhin der *Dunn's multiple Comparison Test*. Auch hier waren Ergebnisse signifikant ab einem Wahrscheinlichkeitswert von  $p < 0,05$ . Bei nicht normalverteilten Daten erfolgte die Darstellung als Median; 25. Perzentile; 75. Perzentile.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Beschreibung des Mauskollektivs

Zum Zeitpunkt der Operation der Hinterlaufischämie waren die Mäuse im Alter von  $89 \pm 5$  Tagen und zeigten ein Gewicht von  $35,6 \pm 0,8$  g.

### 3.2 Vorversuche

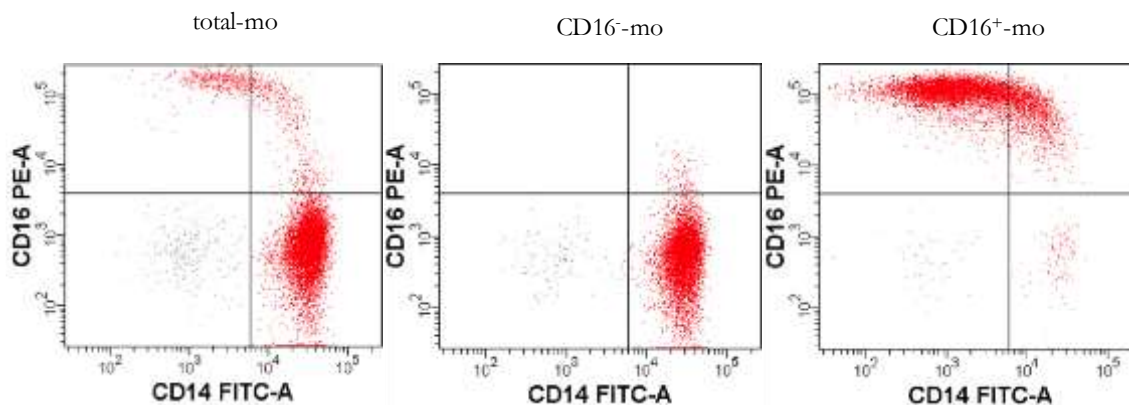
#### 3.2.1 Ergebnisse der Vorbehandlung mit Clodronat

Um die ursprüngliche Vorstellung, die endogenen Monozyten der Versuchstiere depletieren zu können, zu verifizieren, wurde in einem Vorversuch nach oben beschriebenem Schema die Blutbildreaktionen der Tiere nach Clodronatgabe untersucht. Hier zeigte sich nach intrakardialer Gabe der Liposomen ein deutlicher Anstieg des prozentualen Anteils der Monozyten an der leukozytären Blutzellreihe. Dies lässt vermuten, dass die Clodronatliposomen neben einer Depletion der endogenen Monozyten sekundär auch zu einer reaktiven Bildung von Monozyten führen könnten. Dementsprechend wurde von einer Verwendung der Clodronatliposomen abgesehen.

#### 3.2.2 Qualitätskontrolle der Monozytenisolation

Zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Proben der Monozytensubpopulationen sowie der Verteilung der Fraktionen in den total-mo nach Isolation wurden die einzelnen Subpopulationen anhand repräsentativer Proben ( $n=4$ ) durchflusszytometrisch analysiert. Hier zeigte sich eine durchschnittliche Reinheit für die CD16<sup>+</sup>-mo von 85,4 % und für die CD16<sup>-</sup>-mo von 94,9 %. Auch die Verteilung der CD16<sup>+</sup>-mo und CD16<sup>-</sup>-mo in der total-mo-Population (total-mo) entsprach der in der Literatur angegebenen Verteilung von 10% zu 90% (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Abbildung 11 zeigt repräsentative Dot-Plot-Darstellungen der Durchflusszytometrie (links: total-mo, Mitte: CD16<sup>-</sup>-mo, rechts: CD16<sup>+</sup>-mo).

Wie bereits zuvor beschrieben, wurden zusätzlich auch durchflusszytometrische Untersuchungen zum Nachweis des Vorhandenseins des Leptinrezeptors durchgeführt. Dies erfolgte mithilfe eines ObR-Antikörpers (s. Tabelle 13). Hier zeigten lediglich ca. 20% der CD16<sup>+</sup>-mo eine Expression von ObR. Die CD16<sup>-</sup>-mo und total-mo waren zu ca. 60% ObR<sup>+</sup>.

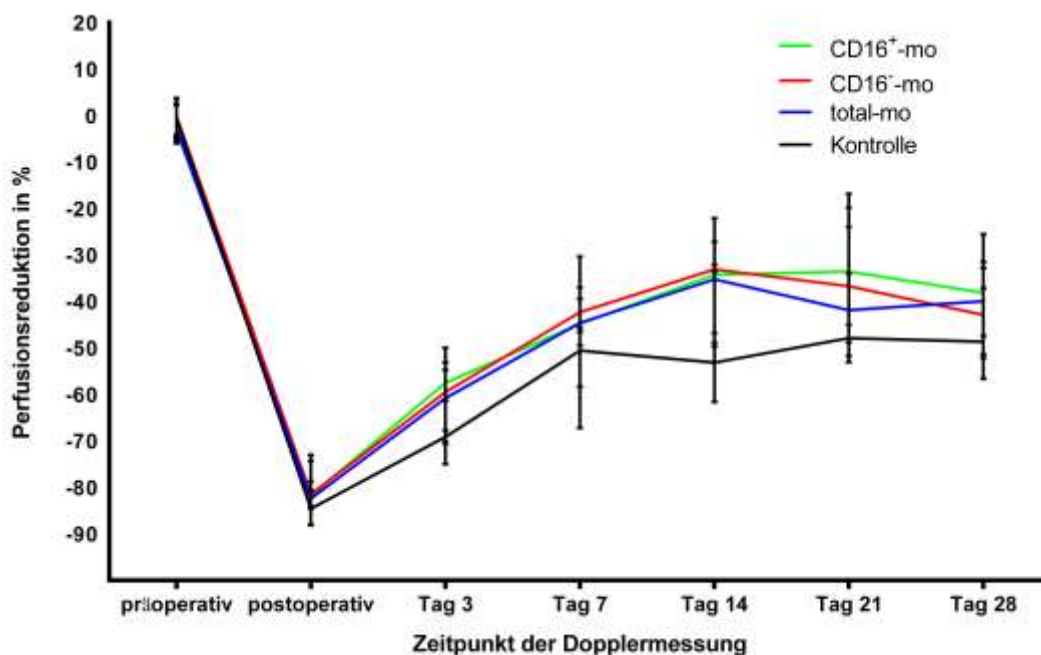


**Abbildung 11: Repräsentative Dot-Plot-Darstellungen der einzelnen durchflusszytometrischen Messungen**

CD16<sup>-</sup>-mo, CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo, CD16-positive Monozyten; total-mo, Gesamtmonozyten; PE-A, Phycoerythrin; FITC-A, Fluoresceinisothiocyanat

### 3.3 Ergebnisse der Perfusionsmessungen nach Hinterlaufischämie

#### 3.3.1 Reperfusion mit unstimulierten Monozyten behandelter Mäuse

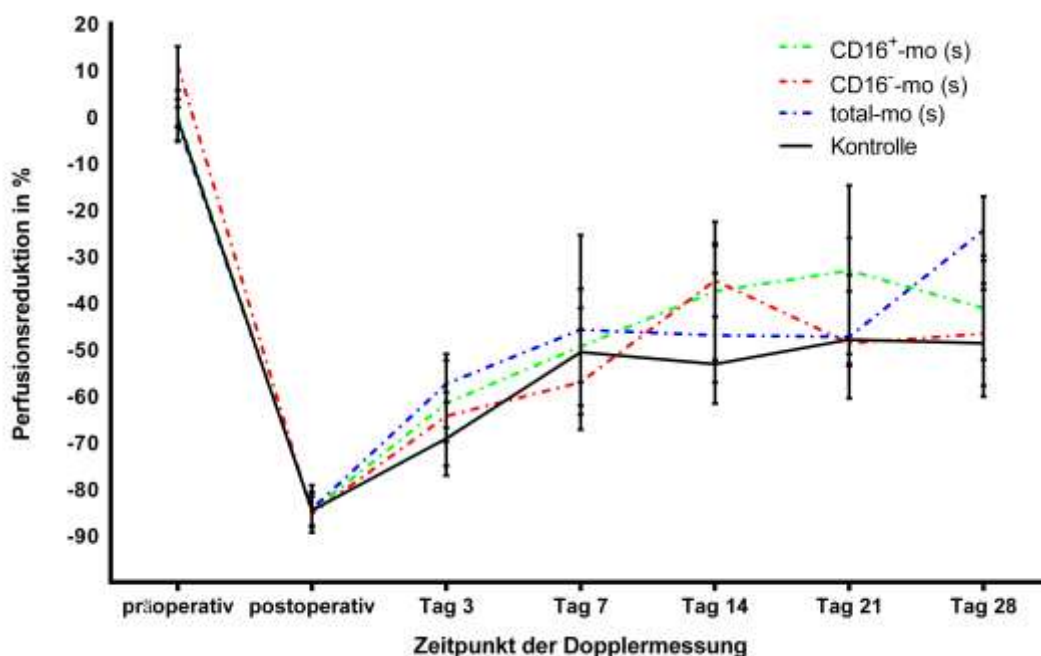


**Abbildung 12: Darstellung der Laser-Doppler-Perfusionsmessung der Interventionsgruppen ohne Leptinstimulation**

CD16<sup>-</sup>-mo, CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo, CD16-positive Monozyten; total-mo, Gesamtmonozyten

Wie vorher beschrieben, wurden zur Evaluation der Reperfusion die Hinterläufe der Tiere an unterschiedlichen postoperativen Tagen mittels Laser-Doppler untersucht und im Anschluss der Quotient aus operierter und *sham*-operierter Seite aufgetragen. Hier zeigte sich rein optisch in den Interventionsgruppen der unstimulierten Monozyten und ihren Subpopulationen eine moderate Verbesserung der Reperfusion im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe. Diese erreichte in den drei Interventionsgruppen nach Gabe unstimulierter Monozyten ihr Maximum am 14. postoperativen Tag und fiel zum Ende der Untersuchungsperiode wieder ab (s. Abbildung 12). Die nachfolgende statistische Analyse zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Interventionsgruppen.

### 3.3.2 Evaluation der Perfusionsergebnisse nach Behandlung durch Leptin-stimulierte Monozyten



**Abbildung 13: Darstellung der Laser-Doppler-Perfusionsmessung der Interventionsgruppen nach Leptinstimulation**

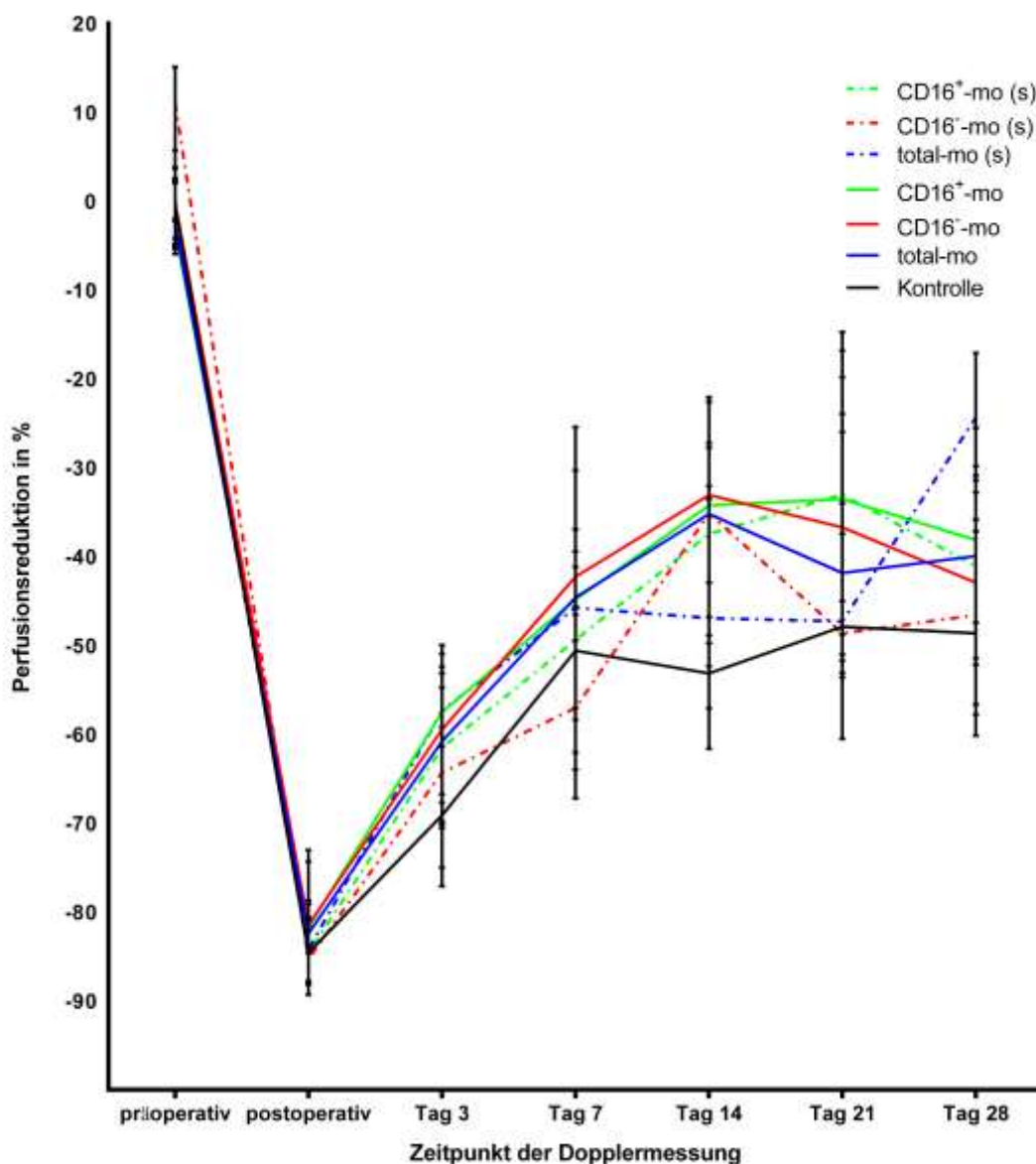
CD16<sup>-</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-positive Monozyten; total-mo (s), Leptin-stimulierte Gesamtmonozyten

Bei den Tieren, die mit Leptin-stimulierte Monozyten und -subpopulationen erhielten, stellte sich die Situation unübersichtlicher dar. Hier zeigte sich rein optisch die anfängliche Perfusionsverbesserung im Wesentlichen gleichverlaufend zur Kontrolle, allenfalls minimal verbessert. Ab dem 14. postoperativen Tag waren jedoch die Werte der Leptin-stimulierten Subpopulationen recht heterogen und teilweise rein optisch mit einer Verbesserung der Perfusion gegenüber der Kontrollgruppe vergesellschaftet, während dies jedoch bei den

total-mo (s) erst ab Tag 28 der Fall war (s. Abbildung 13). Die statistische Untersuchung zeigte aber auch hier keine signifikanten Unterschiede.

### 3.3.3 Unterschiede der Reperfusion mit unstimulierten und mit Leptin-stimulierten Monozyten behandelter Tiere

Die Reperfusionsergebnisse zeigen auch innerhalb einer Monozyten-(subpopulations)-gruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Monozyten mit und ohne Leptinstimulation. (s. Abbildung 14).



**Abbildung 14: Zusammenfassende Darstellung der Laser-Doppler-Perfusionsmessung aller Interventionsgruppen**

CD16<sup>-</sup>-mo, CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo, CD16-positive Monozyten; total-mo, Gesamtmonozyten; CD16<sup>-</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-positive Monozyten; total-mo (s), Leptin-stimulierte Gesamtmonozyten

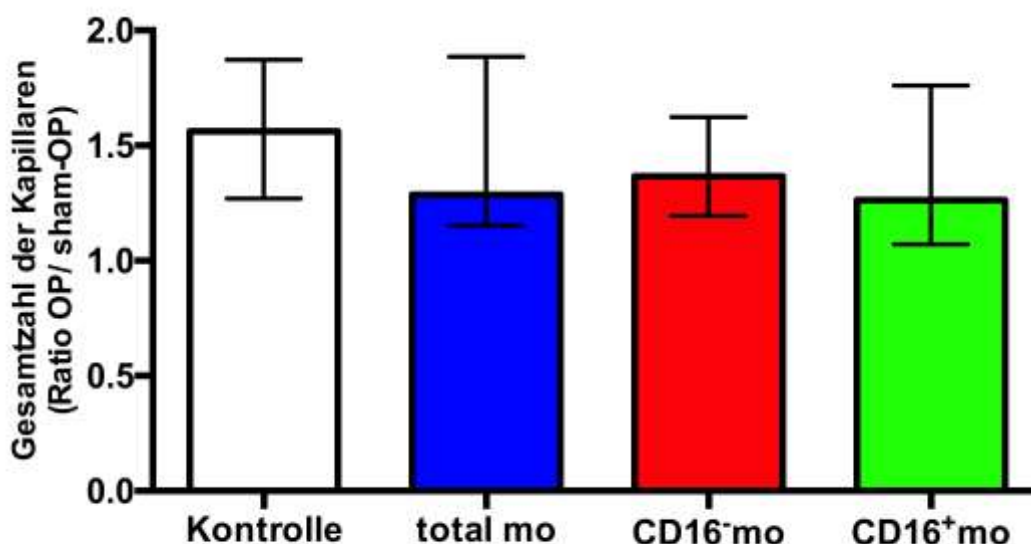
### 3.4 Immunfluoreszenzanalysen

#### 3.4.1 Ergebnisse der Untersuchungen zur Angiogenese

Die Angiogeneseuntersuchungen wurden an der Unterschenkelmuskulatur der Mäuse durchgeführt. Hier wurde einerseits die Kapillarzahl pro mm<sup>2</sup> bestimmt und zusätzlich noch die durchschnittliche Anzahl der Kapillaren pro Muskelfaser. Auch bei diesen Analysen wurde zur Minimierung der Störung durch endogene Effekte die Ratio der operierten Seite zur *sham*-operierten gebildet.

##### 3.4.1.1 Untersuchung der Gesamtkapillarzahl nach Monozytengabe

##### 3.4.1.1.1 Die Gesamtkapillarzahl in Abhängigkeit von der Gabe unstimulierter Monozyten



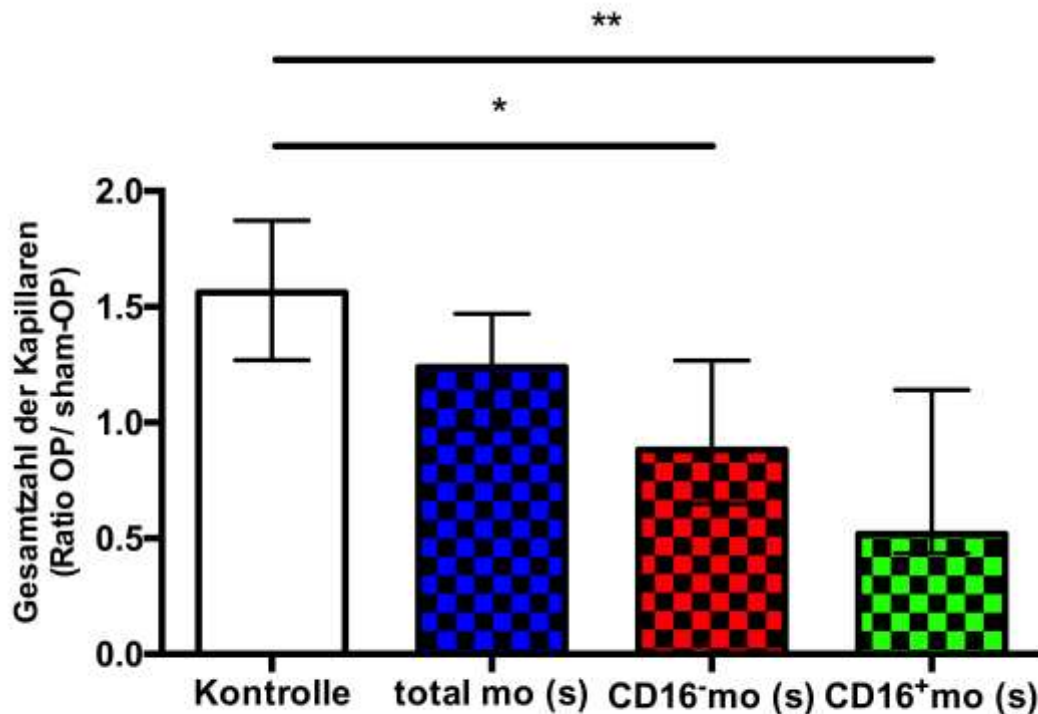
**Abbildung 15: Darstellung der Verhältnisse der Gesamtkapillaren der Gruppen ohne Leptinstimulation**

CD16<sup>-</sup>mo, CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>mo, CD16-positive Monozyten; total-mo, Gesamtmonozyten

Alle Interventionsgruppen, die mit unstimulierten Monozyten und -subpopulationen behandelt wurden, sowie auch die Kontrollgruppe hatten nach Auszählung der Gesamtkapillaren eine Ratio > 1 (s. Abbildung 15). Somit war in dem jeweils operierten Hinterlauf durchschnittlich eine größere Anzahl an Kapillaren als im *sham*-operierten und somit auch eine größere Angiogeneseinduktion. Diese war mit einem Median = 1,56 (1,27; 1,87) in der Kontrollgruppe am größten. Die Ratios der Interventionsgruppen zeigten wenig Abweichungen voneinander (CD16<sup>-</sup>mo: 1,37 [1,20; 1,62]; total-mo: 1,29 [1,15; 1,89]; CD16<sup>+</sup>mo: 1,26 [1,07; 1,76]) und waren nach entsprechender statistischer Analyse

untereinander sowie auch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich.

#### 3.4.1.1.2 Untersuchungen zur Kapillarzahl nach Gabe Leptin-stimulierter Monozyten



**Abbildung 16: Darstellung der Verhältnisse der Gesamtkapillaren der Gruppen nach Leptinstimulation**

(\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ); CD16<sup>-</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-positive Monozyten; total-mo (s), Leptin-stimulierte Gesamtmonozyten

Im Gegensatz zu den Interventionsgruppen unstimulierter Monozyten entwickelten die mit Leptin-stimulierten Monozyten therapierten Interventionsgruppen deutlich weniger Angiogenese im operierten Hinterlauf nach Induktion der Ischämie. Diese war mit einer Ratio  $< 1$  im operierten Bein teilweise sogar deutlich niedriger als im *sham*-operierten (CD16<sup>+</sup>-mo [s]: Median = 0,52 [0,43; 1,14]). Die Anzahl der neu gebildeten Kapillaren in der CD16<sup>-</sup>-mo (s)-Interventionsgruppe war nur leicht vermindert im Vergleich zur Gegenseite (Median = 0,88; [0,65; 1,27]). Nur die Gruppe der stimulierten total-mo wies bei einem Median von 1,24 (0,97; 1,47) im operierten Hinterlauf mehr Kapillaren als im *sham*-operierten auf, was sich in den statistischen Untersuchungen nicht als signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe herausstellte. Signifikante Unterschiede zeigten jedoch die Vergleiche der Gruppen der beiden stimulierten Subpopulationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies ist grafisch in Abbildung 16 veranschaulicht.

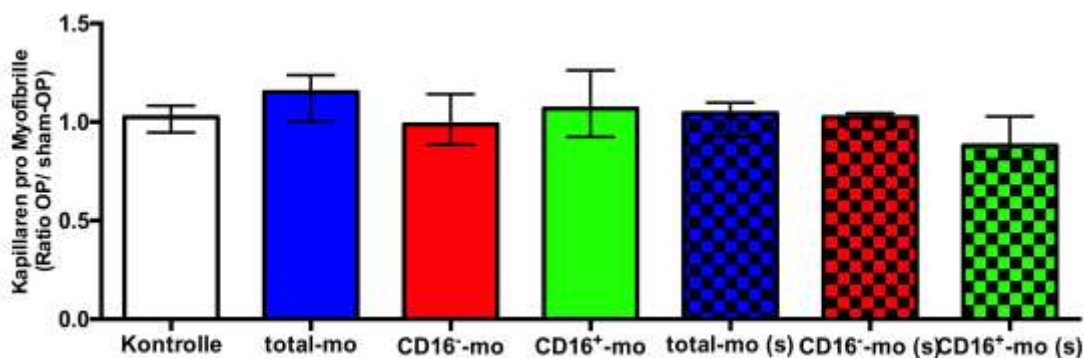


### 3.4.1.1.3 Unterschiede in Abhängigkeit der Leptin-Stimulation

Wie o. g. zeigten die Gruppen der mit Leptin-stimulierten Monozyten eine deutlich geringere Kapillarisation des operierten Hinterlaufes als die Interventionsgruppen der mit nicht-stimulierten Monozyten behandelten Tiere. Signifikante Unterschiede zwischen den Monozyten und ihren Untergruppen in Abhängigkeit von der Stimulation mit Leptin zeigten sich hier jedoch nicht.

### 3.4.1.2 Untersuchung der Vaskularisierung einzelner Myofibrillen

#### 3.4.1.2.1 Kapillardichte nach Gabe unstimulierter Monozyten



**Abbildung 17: Gesamtübersicht der Verhältnisse der Vaskularisierung einzelner Myofibrillen aller Interventionsgruppen**

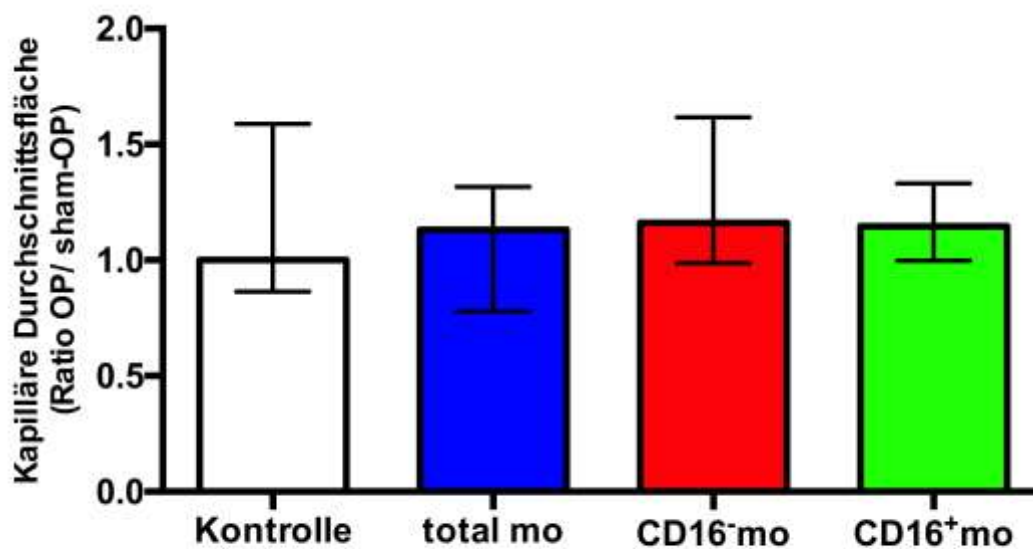
CD16<sup>-</sup>-mo, CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo, CD16-positive Monozyten; total-mo, Gesamtmonozyten; CD16<sup>-</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-positive Monozyten; total-mo (s), Leptin-stimulierte Gesamtmonozyten

Bezüglich der Bestimmung der Kapillardichte bezogen auf eine Muskelfaser zeigte sich in allen Interventionsgruppen kein signifikanter Seitenunterschied. Eine grafische Übersicht zeigt Abbildung 17.

### 3.4.1.3 Auswertungen der kapillären Durchschnittsfläche

#### 3.4.1.3.1 Auswirkung der Gabe unstimulierter Monozyten

Die kapilläre Durchschnittsfläche in der Kontrollgruppe zeigte sich im Wesentlichen gleich für die operierte sowie auch die *sham*-operierte Seite (Median = 1; [0,86; 1,59]). Die Tiere der nicht-stimulierten Interventionsgruppen, zeigten hier rein optisch eine leicht vergrößerte kapilläre Durchschnittsfläche der operierten Seite im Vergleich zur *sham*-operierten Seite (total-mo = 1,13 [0,78; 1,32]; CD16<sup>-</sup>-mo = 1,16 [0,99; 1,62]; CD16<sup>+</sup>-mo = 1,15 [1,00; 1,33]). Signifikante Unterschiede bestanden hier jedoch nicht (s. Abbildung 18).

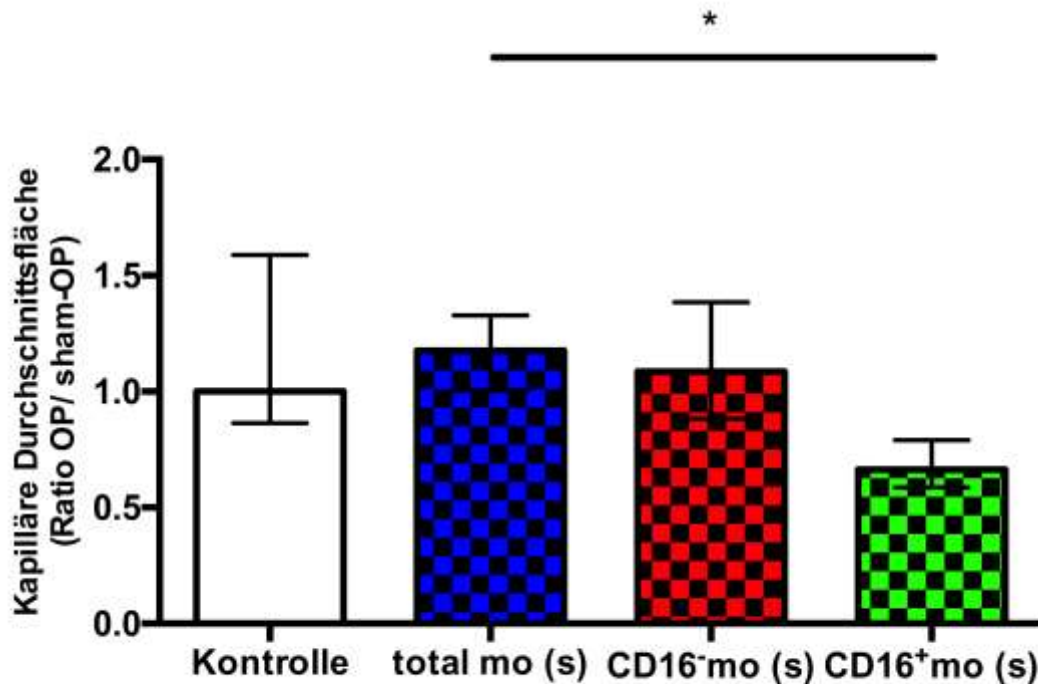


**Abbildung 18: Darstellung der Verhältnisse der kapillären Durchschnittsfläche der Gruppen ohne Leptinstimulation**

CD16<sup>-</sup>-mo, CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo, CD16-positive Monozyten; total-mo, Gesamtmonozyten

#### 3.4.1.3.2 Kapilläre Durchschnittsfläche nach Gabe stimulierter Monozyten

Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren bei der total-mo (s)-Gruppe (Median = 1,18 [1,01; 1,33]), sowie auch in den stimulierten Monozytensubpopulationsgruppen (CD16<sup>-</sup>-mo [s]; Median = 1,09 [0,88; 1,39] und CD16<sup>+</sup>-mo [s]; 0,66 [0,59; 0,79]) keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Die weitere Datenanalyse zeigte eine statistisch signifikante Verminderung ( $p < 0,05$ ; s. Abbildung 19) der kapillären Querschnittsfläche der operierten Seite nach Gabe von CD16<sup>+</sup>-mo (s) verglichen mit der kapillären Querschnittsfläche nach Gabe der total-mo (s).



**Abbildung 19: Darstellung der Verhältnisse der kapillären Durchschnittsfläche der Gruppen mit Leptinstimulation**

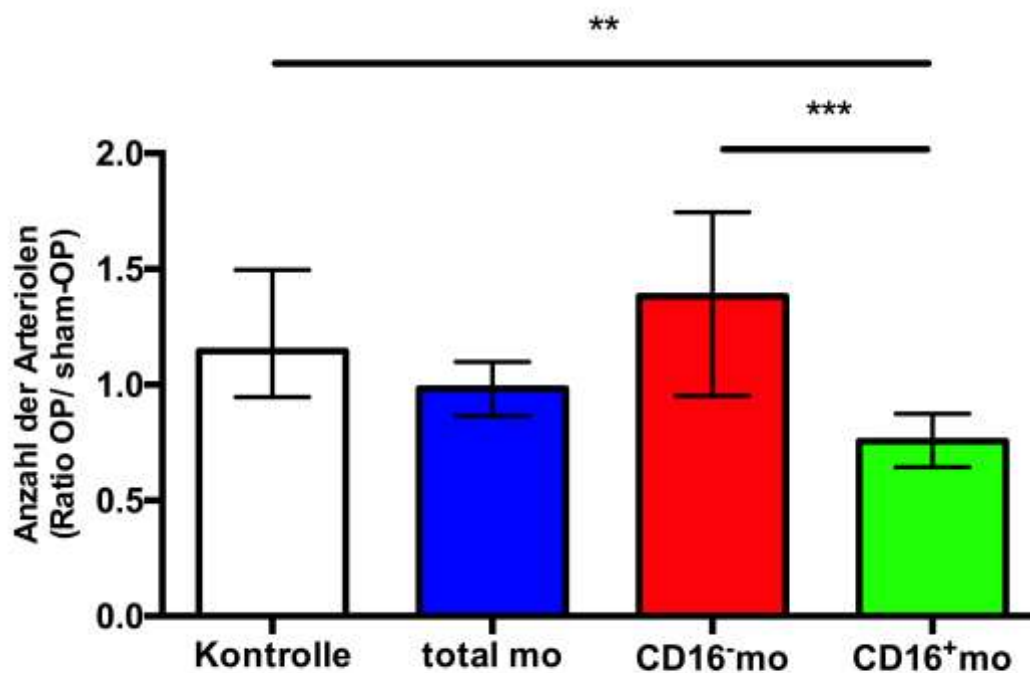
(\* =  $p < 0,05$ ); CD16<sup>-</sup>mo (s), Leptin-stimulierte CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>mo (s), Leptin-stimulierte CD16-positive Monozyten; total-mo (s), Leptin-stimulierte Gesamtmonozyten

### 3.4.2 Untersuchungen zur Arteriogenese

Auch in den Untersuchungen zur Arteriogenese wurden drei verschiedene Parameter in die Analyse einbezogen. Hierbei wurde zunächst die Gesamtzahl der Arteriolen pro Bildausschnitt untersucht und zusätzlich die Gesamtfläche der glatten Gefäßmuskulatur (SMA) bestimmt. Um die durchschnittliche Fläche pro Arteriolen zu ermitteln, wurde nun noch die Gesamtfläche des Bildausschnitts durch die Anzahl der Arteriolen im Bildausschnitt dividiert. Um auch hier endogene Effekte zu minimieren, wurde auch bei diesen Untersuchungen jeweils das Verhältnis (Ratio) zwischen operierter und *sham*-operierter Seite gebildet.

### 3.4.2.1 Veränderungen der Gesamtzahl der Arteriolen

#### 3.4.2.1.1 Die Arteriolenzahl nach Gabe unstimulierter Monozyten

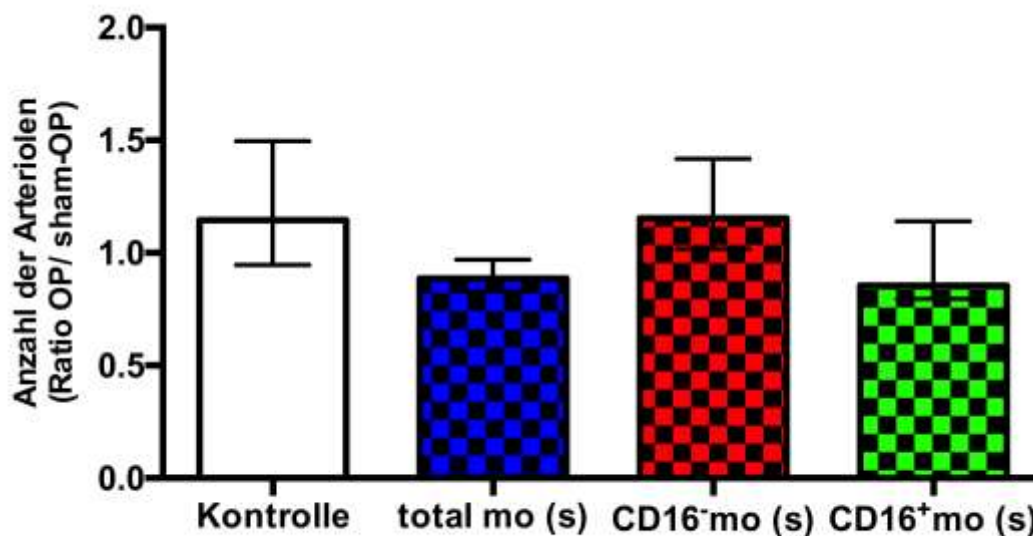


**Abbildung 20: Darstellung der Verhältnisse der Arteriolenzahl der Gruppen nach Gabe unstimulierter Monozyten**

(\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ); CD16<sup>-</sup>mo, CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>mo, CD16-positive Monozyten; total-mo, Gesamtmonozyten

Die Ratio der Gesamtzahl der Arteriolen der total-mo war mit einem Median von 0,98 (0,87; 1,10) im operierten Hinterlauf in etwa gleich zum *sham*-operierten Hinterlauf. Im Gegensatz hierzu war in der Gruppe mit CD16<sup>-</sup>mo (Median = 1,38 [0,95; 1,75]) behandelte Tiere die Anzahl der Arteriolen auf der operierten Seite deutlich erhöht, jedoch statistisch nicht signifikant unterschiedlich zur total-mo-Fraktion. Relevante und somit signifikante Unterschiede ergaben sich hier nur im Vergleich zur Gruppe der CD16<sup>+</sup>mo ( $p < 0,001$ ), die mit einer Ratio von 0,76 (0,64; 0,87) im Median auf der operierten Seite deutlich weniger Arteriolen zeigten als auf der *sham*-operierten Seite. Entsprechend war hier ebenfalls ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ) darzustellen, welche mit einem Median von 1,15 (0,95; 1,50), ähnlich der CD16<sup>-</sup>mo-Gruppe, im operierten Hinterlauf eine höhere Arteriolenzahl zeigt als im *sham*-operierten (s. Abbildung 20).

## 3.4.2.1.2 Anzahl der Arteriolen in Abhängigkeit der Gabe Leptin-stimulierter Monozyten



**Abbildung 21: Darstellung der Verhältnisse der Arteriolenzahl der Gruppen nach Gabe Leptin-stimulierter Monozyten**

CD16<sup>-</sup>mo (s), Leptin-stimulierte CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>mo (s), Leptin-stimulierte CD16-positive Monozyten; total-mo (s), Leptin-stimulierte Gesamtmonozyten

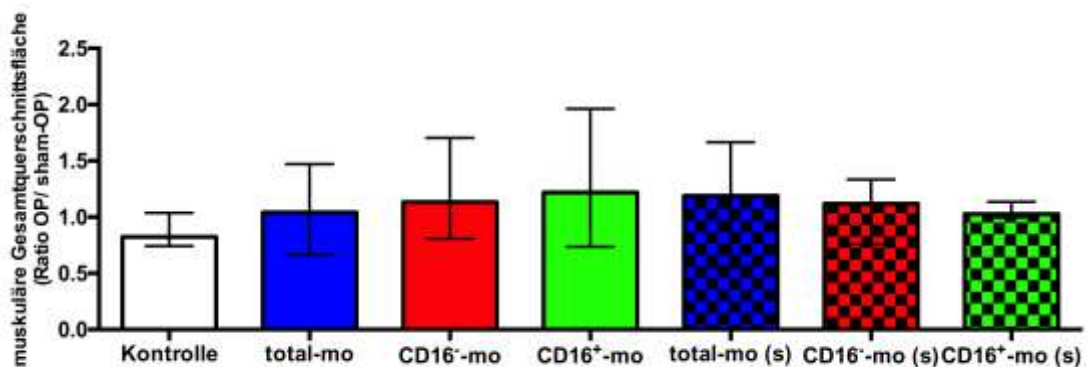
Nach Gabe Leptin-stimulierter Monozyten und ihrer Subpopulationen war das Verhältnis zwischen Anzahl der Arteriolen im operierten Hinterlauf verglichen mit dem *sham*-operierten Hinterlauf nicht signifikant unterschiedlich (s. Abbildung 21).

## 3.4.2.1.3 Leptin-abhängige Unterschiede

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Monozyten und ihren Untergruppen in Abhängigkeit von der Leptin-Stimulation zeigten sich bei der Untersuchung der Arteriolenanzahl nicht.

### 3.4.2.2 Bestimmung der Gesamtquerschnittsfläche der glatten Gefäßmuskulatur

#### 3.4.2.2.1 Die Fläche der Gefäßmuskulatur nach Gabe unstimulierter Monozyten



**Abbildung 22: Gesamtübersicht der Verhältnisse der muskulären Gesamtquerschnittsfläche aller Interventionsgruppen**

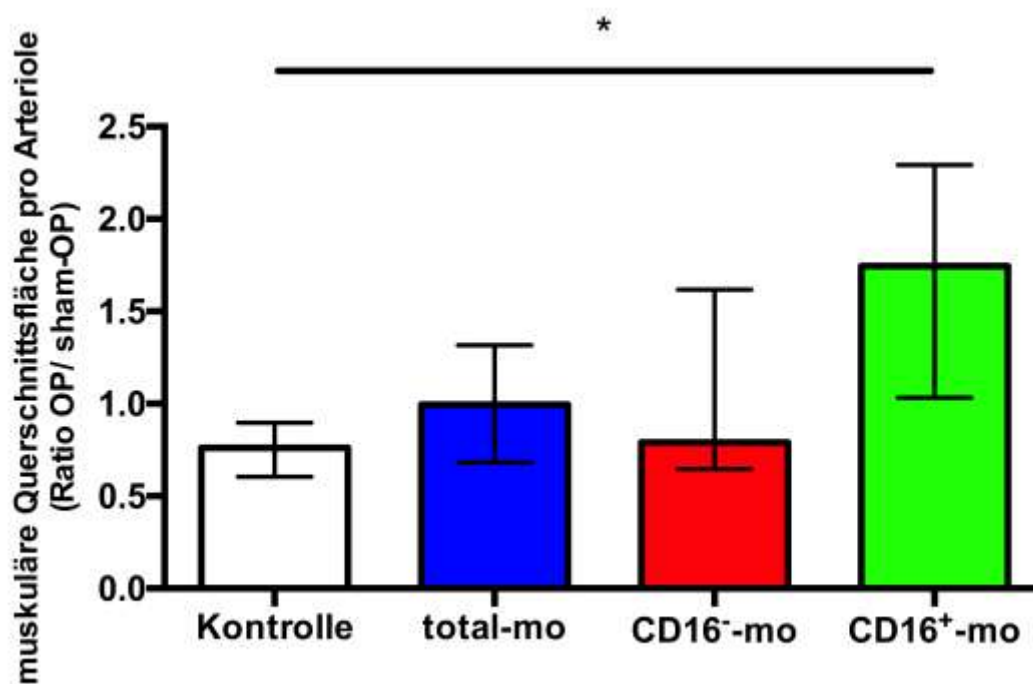
CD16<sup>-</sup>-mo, CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo, CD16-positive Monozyten; total-mo, Gesamtmonozyten; CD16<sup>-</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-positive Monozyten; total-mo (s), Leptin-stimulierte Gesamtmonozyten

Die Untersuchung der Fläche der glatten Gefäßmuskulatur zeigte im Wesentlichen nur in der Kontrollgruppe eine im operierten Hinterlauf verminderte Fläche im Vergleich zur *sham*-operierten Seite (Median = 0,82 [0,74; 1,08]). Alle anderen Interventionsgruppen zeigten entweder ein ausgeglichenes Verhältnis (total-mo, CD16<sup>+</sup>-mo [s]) oder hatten im operierten Hinterlauf eine höhere Querschnittsfläche aufzuzeigen, als auf der Gegenseite (CD16<sup>-</sup>-mo, total-mo [s], CD16<sup>-</sup>-mo [s]), dies teilweise bis zu mehr als 20% (CD16<sup>+</sup>-mo; Median = 1,22 [0,74; 2,00]). Allerdings war eine statistisch signifikante Differenz hier nicht zu messen (s. Abbildung 22).

#### 3.4.2.3 Ergebnisse der Querschnittsfläche der glatten Gefäßmuskulatur pro Arteriole

##### 3.4.2.3.1 Der Gefäßmuskulaturquerschnitt pro Arteriole nach Gabe unstimulierter Monozyten

Die histologische Untersuchung der Muskeln der Hinterläufe zeigte nach Gabe von CD16<sup>+</sup>-mo im operierten Hinterlauf eine im Median um 75% erhöhte muskuläre Querschnittsfläche pro Arteriole im Vergleich zum *sham*-operierten Hinterlauf (Ratio 1,75 [1,03; 2,30]). Dies war im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median = 0,76 [0,61; 0,90]) statistisch signifikant unterschiedlich ( $p < 0,05$ ). Die Interventionsgruppen der Tiere mit total-mo sowie der CD16<sup>-</sup>-mo wiesen keine statistisch signifikanten Ergebnisse auf (s. Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Darstellung der Verhältnisse der muskulären Querschnittsfläche pro Arteriole der Gruppen nach Gabe unstimulierter Monozyten

(\* =  $p < 0,05$ ); CD16<sup>-</sup>-mo, CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo, CD16-positive Monozyten; total-mo, Gesamtmonozyten

#### 3.4.2.3.2 Der Gefäßmuskulaturquerschnitt pro Arteriole in Abhängigkeit von mit Leptin-stimulierten Monozyten

Die größte Zunahme im Querschnitt der Gefäßmuskulatur auf der operierten Seite ließ sich in der Gruppe der stimulierten total-mo (Median = 1,41 [0,69; 1,79]) darstellen. Eine eher nur leicht erhöhte muskuläre Querschnittsfläche pro Arteriole (Median = 1,16 [0,90; 1,23]) war in der Gruppe der CD16<sup>+</sup>-mo (s) zu registrieren, wohingegen die Gruppe der CD16<sup>-</sup>-mo (s) einen minimal verminderten muskulären Querschnitt im Vergleich zur *sham*-operierten Seite (Median = 0,93 [0,63; 1,24]) zeigte (s. Abbildung 24). Signifikante Unterschiede waren hier in der statistischen Untersuchung nicht festzustellen.

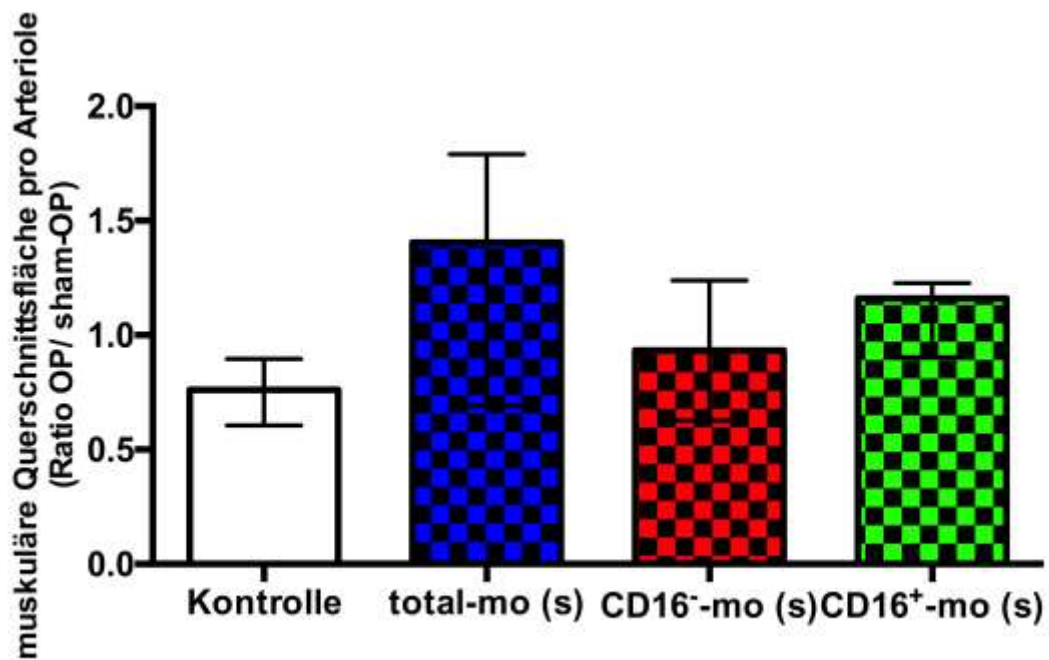


Abbildung 24: Darstellung der Verhältnisse der muskulären Querschnittsfläche pro Arteriole der Gruppen nach Gabe Leptin-stimulierter Monozyten

CD16<sup>-</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-negative Monozyten; CD16<sup>+</sup>-mo (s), Leptin-stimulierte CD16-positive Monozyten; total-mo (s), Leptin-stimulierte Gesamtmonozyten

#### 3.4.2.3.3 Unterschiede zwischen den Populationen in Abhängigkeit von der Leptin-Stimulation

Die Leptin-Stimulation führte statistisch zu keinen Unterschieden zwischen den Interventionsgruppen der jeweiligen Subpopulationen und der total-mo-Population.



## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang der Blutgefäßbildung unter ischämischen Bedingungen in Abhängigkeit von humanen Monozyten und ihren Subpopulationen in einem Mausmodell untersucht. Hierbei wurde zunächst in einer Doppleruntersuchung gezeigt, dass sich die Durchblutung über einen Zeitraum von 28 Tagen nach Zugabe von total-mo und ihren Untergruppen zunächst leicht, jedoch nicht signifikant verbessert. Nachfolgend wurden diese Tiere getötet und die entsprechenden Muskelgruppen für angiogenese- und arteriogenesetypische Areale nach drei unterschiedlichen histologischen Gesichtspunkten untersucht. Die Gabe von Monozyten und ihren Subpopulationen hatte keinen positiven Effekt auf die Angiogenese.

Statistisch signifikante Unterschiede in der Arteriogenese waren nach Gabe nicht-stimulierter Monozytensubpopulationen nachweisbar. Entsprechend war hier das Verhältnis der muskulären Querschnittsfläche nach Gabe von CD16<sup>+</sup>-mo signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Leptinstimulation der Monozyten und ihrer Untergruppen hatte keinen positiven Effekt auf die Angiogeneseuntersuchungen.

### 4.1 Monozyten und ihre Bedeutung in der Gefäßneubildung

Erste Untersuchungen zu Neovaskularisation und Reperfusion nach Ischämie haben u. a. Cochain et al. durchgeführt und konnten beispielsweise zeigen, dass es im murinen Hinterlaufischämiemodell nach Substitution von Ly6C<sup>high</sup>-Monozyten zu einem signifikant verbesserten Blutfluss kommt (Cochain et al. 2010). Das ischämische Gewebe zeigte hierbei in den ersten Tagen nach Ligatur der *A. fem.* deutlich erhöhte *messenger*-Ribonucleinsäurespiegel (mRNA) von Chemokinen, die sowohl die klassischen Ly6C<sup>high</sup>- als auch die Ly6C<sup>low</sup>-Monozyten rekrutieren. Dies war jedoch auf Proteinebene initial (1.-3. Tag) nur für *Chemokine-(C-C motif)-Ligand 2* (CCL2) erhöht. Diesem kommt als MCP-1 eine bedeutende Rolle in der Monozytenrekrutierung aus dem Knochenmark sowie bei der Monozyteneinwanderung in ischämisches Gewebe zu, da die Migration durch CCL2 stimuliert wird (Rhodes et al. 1997).

Ähnliche Berichte über eine verbesserte Reperfusion im Hinterlaufischämiemodell nach intravenöser Gabe zusätzlicher Mausmonozyten beschreiben auch Capoccia et al. bereits 2008 (Capoccia et al. 2008). Sie stellten fest, dass bei Applikation 24 h nach Ischämie die absolute Zahl eingewanderter Monozyten (also endogener und auch applizierter Monozyten) in das ischämische Gewebe bis zu 5-fach erhöht ist, obwohl die absolute Menge sich im Blut befindlicher Monozyten lediglich um ca. 10% gesteigert wird. Des Weiteren zeigten sie, dass die Menge der endogenen Monozyten im ischämischen Gewebe hundertfach höher war im Vergleich zu den extern zugeführten. Zusätzlich war auch die Reperfusion nach Hinterlaufischämie in diesen Tieren signifikant verbessert. Die daraufhin

gemessenen MCP-1-Konzentrationen in den ischämischen Hinterläufen der Tiere, welche mit exogenen Monozyten behandelt wurden, war hier ebenfalls signifikant erhöht, sodass geschlussfolgert wurde, dass es nach Gabe exogener Monozyten nach akuter Ischämie zu einer zügigen Einwanderung dieser Monozyten in ischämisches Gebiet kommt und diese durch Sekretion von MCP-1 die Migration endogener, inflammatorischer Monozyten begünstigt. Die direkte Einwanderung von Monozyten in den ischämischen Hinterlauf wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die eigene Immunantwort der verwendeten Mäuse (nu/nu) nicht mit der in Capoccias Untersuchungen verwendeten Tiere (C57 Black 6 [C57Bl6]) verglichen werden kann, denn dort wurden zum einen vollständig immunkompetente Tiere und zum anderen keine Monozyten unterschiedlicher Spezies verwendet. Dieser Punkt könnte hier als Erklärung für die fast fehlenden positiven Effekte nach Applikation humaner Monozyten herangezogen werden.

## 4.2 Die Bedeutung der Gabe humaner Monozyten in der Reperfusion

Wie anhand der Reperfusionsdaten (Kap. 3.3) gezeigt wurde, konnte durch die Gabe von Monozyten keine signifikante Verbesserung der Reperfusion erreicht werden. Auffällig war jedoch, dass alle Interventionsgruppen eine leichte, nicht-signifikante Perfusionsverbesserung gegenüber der Kontrollgruppe aufwiesen. Dies lässt sich möglicherweise mit einer Erweiterung der zuvor gefassten Monozytenklassifikation erklären, denn die von Passlick et al. beschriebenen CD16<sup>+</sup>- und CD16<sup>-</sup>-Subpopulationen (Passlick et al. 1989) wurden von Frederic Geissmann nach näherer Klassifikation der murinen Monozytenäquivalente (Geissmann et al. 2003) ebenfalls funktionell besser beschrieben (Geissmann et al. 2010). Entsprechend wurde auf Basis dieser Erkenntnisse eine neue Nomenklatur erarbeitet. Diese berücksichtigte u. a. verschiedenste Arbeiten über die Expression von Oberflächenmolekülen (Grage-Griebenow et al. 2001b) oder die Produktion von Zytokinen (Zawada et al. 2011) der Monozyten, sodass hieraus eine dritte Monozytensubpopulation (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) resultierte. Diese sogenannten intermediären Monozyten zeigten in diversen Arbeiten das höchste angiogene Potenzial (Zawada et al. 2011). Entsprechend konnte z. B. eine 1,5-fach erhöhte Expression des für *TNF- $\alpha$ -induced protein 2* (TNFAIP2)-codierenden Gens dargestellt werden, welche wiederum in Untersuchungen an Tumormaterial von nasopharyngealen Karzinomen mit der Überexpression des entsprechenden Proteins und somit in Zusammenhang vermehrter Angiogenese steht (Chen et al. 2011). Zusätzlich wurde diese Subpopulation bereits 2005 als *Tie2-expressing monocytes* (TEMs) beschrieben (De Palma et al. 2005) und 2007 gezeigt, dass sie in maligne entartetem Gewebe in signifikant erhöhter Zahl vorkommen (Venneri et al. 2007). In weiterführenden Untersuchungen zeigten sich TEMs jeweils in unmittelbarer Umgebung stark vaskularisierter Tumoreareale, sowie auch in nicht-malignen Hypervaskularisierungszonen, sodass diesbezüglich von einem *Recruitment* von TEMs in

Areale ausgegangen werden sollte, welche erhöhten Bedarf an Gefäßen haben und diese dort am ehesten parakrin die Angiogenese beeinflussen (Favre et al. 2013). Stimulus für die Monozyteneinwanderung war hier Ang2 (Barton et al. 2005; Felcht et al. 2012; Thurston 2003).

Nach Zusammentragen dieser Erkenntnisse zeigt nunmehr die als klassische Monozyten bezeichnete Subpopulation eine hohe Expression von CD14, jedoch keine CD16-Expression (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>). Intermediäre Monozyten exprimieren CD14 ebenfalls in hoher Dichte und zeigen eine schwache CD16-Expression (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>). Die nicht klassischen Monozyten verhalten sich in der CD14-Expression schwächer als die anderen beiden Subpopulationen, haben jedoch eine deutlich höhere Expression von CD16 (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Ziegler-Heitbrock und Hofer 2013). Aus technischen Gründen konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit innerhalb der CD16-Positivität nicht differenziert werden, sodass durch die durchgeführte Monozytenisolation die Gruppe der intermediären Monozyten nicht separat erfasst werden konnte. Hierdurch könnten die o. g. proangiogenen Effekte dieser Subpopulation mehr oder minder in jeder Interventionsgruppe vertreten sein und somit durch die entsprechend geringe Gesamtmenge an Zellen nivelliert werden. Die einzelnen Auswirkungen auf die Angio- und Arteriogenese werden in den folgenden Kapiteln separat diskutiert.

### 4.3 Die Rolle von humanen Monozyten in der Arteriogenese

Die Analyse der in dieser Arbeit erhobenen histologischen Ergebnisse zeigt zunächst, dass die Gabe nicht stimulierter Monozyten einen Einfluss auf die Gesamtarteriolenzahl sowie auch teilweise auf die Stärke der Arteriolenwand im ischämischen Hinterlauf besitzt. Interessanterweise sind hier nur Unterschiede bei den Monozytensubpopulationen darzustellen, wobei die CD16<sup>-</sup>-mo die Arteriolenanzahl im ischämischen Hinterlauf steigerten und die CD16<sup>+</sup>-mo diese verminderte (s. Kap. 3.4.2.1.1). Im Gegensatz zur signifikanten Verminderung der absoluten Arteriolenanzahl zeigte sich die durchschnittliche Dicke der Arteriolenwand nach Gabe von CD16<sup>+</sup>-mo deutlich erhöht im Vergleich zur Kontroll- und den anderen Interventionsgruppen. Dies erklärt sich möglicherweise durch die nähere funktionelle Betrachtung der Subpopulationen auf Rezeptor-/Zytokinebene, denn hier wurde bereits 2011 bei CD16<sup>+</sup>-mo ein schlechteres Migrationspotenzial gegenüber VEGF im Vergleich zu CD16<sup>-</sup>-mo nachgewiesen (Czepluch et al. 2011). Dies ist am ehesten bedingt durch die niedrigere Expression von VEGFR-1 in CD16<sup>+</sup>-mo gegenüber CD16<sup>-</sup>-mo (Czepluch et al. 2011; Czepluch und Waltenberger 2006). Eine zusätzliche Rolle spielt hier jedoch möglicherweise auch das unterschiedliche CD31-Expressionmuster der Monozytensubpopulationen. Dieses *Platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1* (PECAM-1/CD31) spielt eine wichtige Rolle in der Leukozytendiapedese und ist unabkömmlich für eine transendotheliale Migration von Monozyten (Muller et al. 1993). Besonders CD16<sup>+</sup>-mo exprimieren CD31 sehr stark auf ihrer Zelloberfläche und haben

somit die Möglichkeit, das Endothel zu durchwandern (Ancuta et al. 2009). Die nun im Vergleich zu CD16<sup>-</sup>-mo deutlich verringerte Expression von VEGFR-1 erschwert die folgende Migration der CD16<sup>+</sup>-mo durch die *Muscularis* in das umliegende Gewebe. Somit beschränkt sich die Wirkung der durch die CD16<sup>+</sup>-mo ausgeschütteten Zytokine eher auf die Arteriolenwand, sodass die eigentlichen extravaskulären Prozesse (TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ -Ausschüttung) nun intramural stattfinden und die entsprechende Hypertrophie dieser vielleicht am ehesten als funktionelle Reaktion auf die vermehrte intramuskuläre Zytokinausschüttung gesehen werden kann.

Interessanterweise sind die o. g. Effekte lediglich in den Versuchsgruppen der Subpopulationen zu verzeichnen und nicht nach Gabe der total-mo nachzuweisen. Obwohl in dieser Population die CD16<sup>-</sup>-mo überwiegen, sind auch hier keine Tendenzen der Effekte in Richtung dieser Untersuchungsgruppe nachweisbar, sodass unter Umständen davon ausgegangen werden könnte, dass diese jeweiligen Effekte der CD16<sup>+</sup>-mo und CD16<sup>-</sup>-mo sich gegenseitig aufheben. Der Anteil der CD16<sup>+</sup>-mo an der total-mo-Fraktion beträgt ca. 10% und ist somit in absoluten Zahlen (30.000 Zellen) deutlich geringer als in der CD16<sup>+</sup>-mo-Fraktion (300.000 Zellen). Entsprechend besteht hier die Möglichkeit, dass nach Gabe der total-mo die absolute Zellzahl der CD16<sup>+</sup>-mo ggf. für die o. g. Beobachtungen nicht ausreichend ist im Vergleich zur isolierten Gabe dieser Zellen. Dies müsste in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

Vergleicht man die histologischen Daten zur Arteriogenese der nicht-stimulierten Interventionsgruppen mit den histologischen Daten zur Arteriogenese der stimulierten Interventionsgruppen, zeigt sich hier für die total-mo und total-mo (s) und auch für die klassischen Monozyten (CD16<sup>-</sup>-mo und CD16<sup>-</sup>-mo [s]) ein ähnliches grafisches Bild mit dem Unterschied, dass die jeweils stimulierten Interventionsgruppen eine verminderte Ausprägung der Effekte zeigen (s. Kap. 3.4.2). Dies gilt vor allem für die Darstellung der Gesamtarteriolenzahl und die Arteriolenwanddicke. Beim Vergleich der Graphen in beiden histologischen Auswertungen der nicht-klassischen Monozyten (CD16<sup>+</sup>-mo und CD16<sup>+</sup>-mo [s]), ist dies nicht zu beobachten. Wie bereits oben dargestellt, zeigen vor allem CD16<sup>+</sup>-mo durch ihre CD31-Expression ein hohes Potenzial für die Leukodiapedese. Entsprechend würde man in Erwartung einer Aktivierung durch Leptin, analog zu CACs (Heida et al. 2010), eine vermehrte Diapedese und o. g. Deutung folgend, eine noch dickere Arteriolenwand erwarten. Entsprechend sollte dann auch die Arteriolenzahl weiter vermindert sein. Entgegen den Erwartungen zeigt sich dies in den vorliegenden Ergebnissen nicht. Entsprechend wirkt, dieser Interpretation weiter folgend, in o. g. histologischen Untersuchungen die Stimulation mit Leptin eher abschwächend auf die Funktion der CD16<sup>+</sup>-mo. Ein Grund hierfür ist aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht ersichtlich.

#### 4.4 Humane Monozyten und ihre Auswirkung auf die Angiogenese

Während sich die Applikation unstimulierter Monozytensubpopulationen nur auf die Arteriogenese auswirkte, waren nach Hinzugabe Leptin-stimulierter Monozytensubpopulationen lediglich Effekte bei der Angiogenese zu verzeichnen, ohne Einfluss auf die Arteriogenese zu nehmen. Sehr deutlich äußerte sich dies z. B. in der Verminderung der Gesamtkapillanzahl. Hierbei war der Unterschied zur Kontrollgruppe bei den CD16<sup>-</sup>-mo (s) sehr stark ausgeprägt, zeigte jedoch die ausgeprägteste Verminderung nach Gabe der CD16<sup>+</sup>-mo (s). Des Weiteren haben die Untersuchungen zur Querschnittsfläche pro Arteriole gezeigt, dass auch diese nach Gabe von CD16<sup>+</sup>-mo (s) signifikant verringert ist, vor allem in Gegenüberstellung zum Kollektiv der total-mo (s). Auch wenn hier keine direkten signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe bestehen, so lässt sich trotz allem die Vermutung äußern, dass die zusätzliche Gabe Leptin-stimulierter CD16<sup>+</sup>-mo entweder das weitere Vorhandensein einer größeren Anzahl von Kapillaren im Endstromgebiet nicht weiter nötig erscheinen lässt oder sogar in einem gewissen Maße zu einer Schädigung und nachfolgendem Untergang von Kapillaren führt, ohne die anderen umgebenden Strukturen histologisch oder weitestgehend funktionell zu beeinträchtigen. Ob sich dieser Effekt nur auf die Endstrombahn bezieht oder aber auch in durch Arteriolen vaskularisiertem Gebiet zu verzeichnen ist, wurde in vorliegender Arbeit nicht untersucht. Trotz allem ist hier unklar, warum bei annähernd gleicher Perfusion die Anzahl der Kapillaren stark abnimmt, obwohl die Anzahl, die muskuläre Querschnittsfläche und auch die Gesamtfläche der Arteriolen keine Unterschiede aufweisen. Hierzu gibt die nähere Betrachtung der Leptinwirkung möglicherweise Aufschluss.

Die Wirkung von Leptin ist rezeptorvermittelt. Dieser ObR bewirkt insbesondere in Monozyten die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  (Santos-Alvarez et al. 1999). Dem Zytokin TNF- $\alpha$  wiederum kommt eine große Bedeutung im humanen Immunsystem zu. Es wirkt z. B. in neutrophilen Granulozyten migrationsfördernd und erhöht die Phagozytoseaktivität in Makrophagen. Weiterhin ist es unabkömmlich bei der Reparatur nach Endothelverletzung (Krasinski et al. 2001). Zusätzlich zeigten schon mehrere Arbeiten, dass TNF- $\alpha$  auch in der Angiogenese eine gewichtige Rolle zu Teil wird und diese durch TNF- $\alpha$  sogar stimuliert werden kann (Fajardo et al. 1992; Leibovich et al. 1987). Interessanterweise zeigten Fajardo et al. eine Abhängigkeit der Angiogenese von der TNF- $\alpha$ -Konzentration, sodass diese bei niedriger TNF- $\alpha$ -Konzentration stimuliert und bei entsprechend hoher Konzentration wiederum inhibiert wurde. Weitere Arbeiten deuteten jedoch daraufhin, dass das Ausmaß der Arteriogenese zum einen von der Art des jeweilig stimulierten TNF- $\alpha$ -Rezeptors, zum anderen jedoch auch von dem Modus der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung abhängig ist (Sainson et al. 2008). Hier konnte z. B. gezeigt werden, dass die Proliferation von ECs durch eine pulsatile Ausschüttung von TNF- $\alpha$  angeregt wird und hierdurch Kapillaren im Angiogenese-*Assay* zur Aussprossung vorbereitet werden. Interessanterweise zeigte sich bei einer kontinuierlich hohen TNF- $\alpha$ -Konzentration eher ein gegenteiliger Effekt. Die

Konzentrationen des entstehenden TNF- $\alpha$  wurden in der vorliegenden Arbeit nicht gemessen, weshalb zu der Art der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung hier keine Stellung bezogen werden kann. Wie bereits in Kap. 1.3.2 beschrieben, sind CD16<sup>+</sup>-mo eher durch eine Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  gekennzeichnet. Die Bildung von TNF- $\alpha$  kann durch eine hohe Leptinkonzentration induziert und dies somit vermehrt ausgeschüttet werden, was auf Zytokin- und auch mRNA-Ebene belegt werden konnte (Zarkesh-Esfahani et al. 2001). Die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  ist hierbei jedoch linear abhängig von der Leptin-Konzentration und kann durch Hinzugabe von Lipopolysaccharid potenziert werden (Fernandez-Riejos et al. 2010; Sanchez-Margalet et al. 2003; Santos-Alvarez et al. 1999). Die Messungen in vorliegender Arbeit (verminderte Gesamtkapillarzahl nach Gabe Leptin-stimulierter Monozytensubpopulationen, s. Kap. 3.4.1.1.2) können in vorliegender Konstellation möglicherweise eine *in-vivo*-Bestätigung der Aussage von Sainson et. al. aus dem Jahr 2008 sein, auch wenn hier die einmalige TNF- $\alpha$ -Konzentrationserhöhung und somit die Funktionseinschränkung von ECs durch eine Erhöhung der Leptin-Konzentration hervorgerufen wurde.

Interessanterweise ist TNF- $\alpha$  nicht nur in der Angiogenese von großer Bedeutung, sondern spielt auch in der Arteriogenese eine wichtige Rolle (Hoefler et al. 2002). Hier waren ebenfalls in einem Hinterlaufschämiemodell bei TNF- $\alpha$ -defizienten-, sowie auch TNF- $\alpha$ -Rezeptor-defizienten-Mäusen eine verminderte Reperfusion und auch eine verminderte Ausbildung von Arteriolen im Vergleich zu Wildtyp- und Nackt-Mäusen detektiert worden. Folgt man an dieser Stelle der Aussage von Zawada et al., dass das angiogene Potenzial vor allem in den intermediären Monozyten beheimatet ist und dies hier vordringlich anhand der Überexpression von TNFAIP2 vermittelt wird (Zawada et al. 2011), so wäre bei isolierter Betrachtung der intermediären Monozyten eine vermehrte Reperfusion dieser Interventionsgruppe vor allem im distalen Hinterlauf zu erwarten. In entsprechenden histologischen Untersuchungen dieser Hinterläufe müsste jedoch in diesem Fall die absolute Kapillarzahl deutlich erhöht sein. Dies müsste jedoch in einer erneuten laborexperimentellen Untersuchung separat erforscht werden.

## 4.5 Limitationen der Arbeit

In vorliegender Arbeit wurde der Effekt humaner Monozyten und ihrer Subpopulationen auf die Gefäßneubildung in Mäusen untersucht. Eine entsprechende Immunantwort und somit Abstoßungsreaktion wurde durch die Verwendung von T-Zell-negativen Nacktmäusen verhindert. Dennoch ist die Annahme, dass humane Monozyten gegen murine Zytokine, die nach erfolgter Operation der Hinterlaufschämie ausgeschüttet wurden, ähnlich gut migrieren wie gegen humane Zytokine nicht eindeutig belegt. Verdeutlicht wird dies vor dem Hintergrund, dass ähnliche Experimente mit murinen Monozyten, welche in Mäuse transplantiert wurden, sehr eindeutige Ergebnisse bezüglich der Reperfusion und Angiogenese zeigten (Capoccia et al. 2008; Cochain et al. 2010).

In vorliegendem Experiment wurden  $1 \times 10^6$  Monozyten zusätzlich zu den endogenen Monozyten appliziert. Dies ist die Zahl an Monozyten, welche als Mindestmenge rekrutiert werden muss, um in einem ischämischen Gebiet Angiogenese zu induzieren (Capoccia et al. 2008; Capoccia et al. 2006). Viele vorhergehende Studien haben jedoch auch endogene Rekrutierungsorte (v. a. die Milz) für Monozyten beschrieben (Leuschner et al. 2012; Swirski et al. 2009), sodass hier bei einer Gesamtmenge von mindestens  $10^7$  endogenen Monozyten ein Verhältnis von humanen zu murinen Monozyten von  $<1:10$  besteht. Selbst unter der Voraussetzung, dass in unserem Modell humane und murine Monozyten ein gleiches Migrationsverhalten gegenüber den ausgeschütteten Zytokinen zeigen, sind die Aussagen zur Angio- und Arteriogenese in vorliegenden Experimenten nur deutlich eingeschränkt mit der direkten Wirkung humaner Monozyten in der Ischämie in Beziehung zu setzen.

Die Leptinwirkung *in vivo* ist abhängig vom Gesamtkörperfettanteil des Menschen. Dies wurde in verschiedenen Fastenversuchen mit adipösen und schlanken Probanden untersucht (Sinha et al. 1996). Hier wurde herausgefunden, dass vor allem bei schlanken Personen Leptin zu 98 % in gebundener Form an den löslichen Leptinrezeptor (sObR) vorliegt. Die Kopplung an den sObR verhindert z. B. ein Überschreiten von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke, sodass hier die zentralnervösen Wirkungen (z. B. Vermittlung von Hungergefühl) nicht vermittelt werden können. In der Folge wird aber auch mit steigendem Körperfettanteil die Leptinkonzentration zu Gunsten des freien Leptins verschoben. Somit haben Übergewichtige und Adipöse grundsätzlich eine höhere freie Leptinkonzentration im Blut als schlanke Personen. Entsprechend sind auch in so einem Fall Monozyten höheren freien Leptinkonzentrationen ausgesetzt. Da Übergewicht und Adipositas vor allem in unserer Gesellschaft immer weiter verbreitet ist (Mitchell et al. 2011), ist die Rekrutierung von Probanden mit einem BMI  $< 23 \text{ kg/m}^2$  sehr langwierig und aufgrund technischer und zeitlicher Zusammenhänge nicht immer möglich. Entsprechend wurde hier auf Probanden mit einem BMI von  $18,5 - 30 \text{ kg/m}^2$  zurückgegriffen (s. Kap. 2.3.1). Dies bedeutet natürlich gleichzeitig, dass die isolierten Zellen aus Probanden mit höherem BMI und somit auch höherem Körperfettanteil *in vivo* bereits einer erhöhten freien Leptinkonzentration ausgesetzt sind und hierdurch ggf. die physiologische Reaktion auf eine plötzlich erhöhte Leptinkonzentration verfälscht werden könnte.

Des Weiteren zeigten die hier vorliegenden durchflusszytometrischen Untersuchungen, dass die Expression des ObR auf den Monozytensubpopulationen sehr unterschiedlich ausgeprägt ist (CD16<sup>-</sup>-mo 60%; CD16<sup>+</sup>-mo 20%; s. Kap. 3.2.2). Entsprechend sind die Monozyten in den Interventionsgruppen nach Leptinstimulation eher als heterogene Gruppe anzusehen, da das verabreichte Leptin natürlich nur auf die Monozyten wirken kann, welche auch den jeweiligen Rezeptor besitzen. Diesbezüglich sind o. g. Ergebnisse vor allem der Interventionsgruppen nach Leptinstimulation (insbesondere die Gruppe der CD16<sup>+</sup>-mo [s]) bezüglich der Leptinwirkung entsprechend kritisch zu beurteilen. Gegebenenfalls können hier weitere Untersuchungen zur Expression und auch Funktion

des ObR auf Monozyten zu einer differenzierteren Betrachtung der Leptinwirkung auf Monozyten und das angiogene Potenzial von Leptin beitragen.

Aufgrund technischer Limitierungen konnten im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit die intermediären und nicht-klassischen Monozyten nicht separat voneinander untersucht werden. Hinsichtlich des angiogenen Potenzials vor allem der intermediären Monozyten (Zawada et al. 2011) sind die Ergebnisse zur angiogenen Potenz der in dieser Arbeit als CD16<sup>+</sup>-bezeichneten Monozyten (CD16<sup>+</sup>-mo) mit eingeschränkter Aussagekraft zu sehen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen vor allem in den Untersuchungen zur Laser-Doppler-Messung eine relativ große Schwankungsbreite. Eventuell hätte hier durch eine Vergrößerung der Interventionsgruppen (n>10) eine größere Datenmenge generiert werden und so eventuell eine Verringerung des Einflusses endogener Störfaktoren wie Blutdruck der Tiere oder Umgebungswärme erreicht werden können. In einer ähnlichen Arbeit wurden so vor allem in Laser-Doppler-Messungen bei n=14 signifikante Ergebnisse nach Hinterlaufischämie und Gabe muriner Zellen erzielt (Lopez-Holgado et al. 2009). Des Weiteren würde hierdurch ein eventueller Einfluss anatomischer Varianten einzelner Tiere ebenfalls deutlich minimiert.

## 4.6 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass speziell die Gabe von CD16<sup>+</sup>-mo die Arteriolenwand vergrößert, obwohl sich diese Untersuchungen nicht in einer Perfusionsverbesserung in der Laser-Doppler-Perfusionsmessung niederschlagen. Im Gegensatz hierzu weisen bereits durchgeführte *in-vitro*-Versuche darauf hin, dass vermutlich eher die Interaktion beider Monozytensubpopulation das maximale angiogenetische Potenzial entfalten. Dies zeigten u. a. auch außerhalb dieser Doktorarbeit durchgeführte, HUVECs-basierte Spheroid-Angiogenese-*Assays*, bei denen nach Hinzugabe eines mit total-mo, CD16<sup>-</sup>-mo und CD16<sup>+</sup>-mo konditionierten Mediums die Anzahl ausgebildeter endothelialer *Sprouts* ermittelt wurden (Czepluch et al. 2014). Ob nun tatsächlich das Zusammenspiel der unterschiedlichen Monozytensubpopulationen in der eingesetzten total-mo-Fraktion, oder doch die o. g. intermediäre Monozytensubpopulation für die genannten Effekte verantwortlich sind, bleibt Gegenstand fortwährender laborexperimenteller Untersuchungen. Zusätzlich sind natürlich die entsprechenden molekularbiologischen und biochemischen Mechanismen der Monozyten-induzierten Angio- und Arteriogenese aufzuschlüsseln.



## 5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Ereignisse sind die Haupttodesursache in der westlichen Welt. Monozyten und ihre Subpopulationen spielen dabei eine bedeutende Rolle für Regenerationsprozesse nach akuten ischämischen Ereignissen. In vorliegender Dissertationsschrift wurde der Zusammenhang humaner Monozyten und ihrer CD16<sup>+</sup>- und CD16<sup>-</sup>-Subpopulation auf die Entstehung neuer (Angiogenese) und Vergrößerung bereits vorhandener Blutgefäße (Arteriogenese) auf ischämische Zustände untersucht. Hierfür wurde ein bereits etabliertes murines Hinterlaufischämiemodell verwendet und den Mäusen am folgenden Tag zuvor isolierte humane Monozyten bzw. ihre Subpopulation intrakardial appliziert. Darauffolgend wurde die Reperfusion über 28 Tage beobachtet, nach der letzten Messung die Tiere getötet und ihre Hinterlaufmuskeln zur histologischen Untersuchung eingebettet. Hierbei wurden die Anzahl der Arteriolen und Kapillaren, die muskuläre und kapilläre Gesamtquerschnittsfläche, die Querschnittsfläche pro Arteriole sowie die Anzahl an Kapillaren pro Myofibrille mittels Immunfluoreszenz evaluiert. Da aus vorherigen Arbeiten bereits Daten vorliegen, dass das Proteohormon Leptin einen proangiogenen Effekt aufweist, wurde entsprechend die gleiche Versuchsreihe nochmals mit Monozyten durchgeführt, welche zuvor für 30 min mit Leptin stimuliert worden waren.

Die Reperfusionsanalysen mittels Laser-Dopplermessung ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Interventionsgruppen. Die Immunfluoreszenzanalysen zeigten in den Angiogeneseauswertungen überraschenderweise, dass die Gruppen der Leptin-stimulierten Subpopulationen einen negativen Effekt auf die Anzahl der Kapillaren haben ( $p < 0,05$  Kontrolle vs. CD16<sup>-</sup>-mo [s];  $p < 0,01$  Kontrolle vs. CD16<sup>+</sup>-mo [s]). Auch die kapilläre Gesamtdurchschnittsfläche war hierdurch beeinflusst ( $p < 0,05$  Kontrolle vs. CD16<sup>+</sup>-mo [s]). Die Arteriogeneseuntersuchungen hingegen zeigten nur einen Effekt bei unstimulierten Monozyten. Hier war vor allem die Anzahl der Arteriolen nach Gabe von CD16<sup>+</sup>-mo signifikant erniedrigt ( $p < 0,01$  vs. Kontrollgruppe;  $p < 0,001$  vs. CD16<sup>-</sup>-mo). Entgegengesetzt hierzu war die muskuläre Querschnittsfläche in dieser Gruppe (kompensatorisch) deutlich vergrößert ( $p < 0,05$  vs. Kontrollgruppe), sodass hiermit ggf. das numerische Defizit ausgeglichen werden kann.

Die in vorliegender Arbeit angeführten Beobachtungen sind größtenteils in Einklang zu bringen mit etablierten Daten zur Arterio- und Angiogenese. Hierbei scheint die Funktion der CD16<sup>+</sup>-mo eine positive Auswirkung auf die Arteriogenese zu haben, wobei dieser Effekt durch eine Leptinstimulation nicht verstärkt werden kann. Die anderen untersuchten Monozyten und -subpopulationen haben keinen Effekt auf die Verbesserung der Arterio- und Angiogenese. Die zellulären Mechanismen, vor allem auch im Bereich der Monozytensubpopulationen, sollten hierbei weiter untersucht und wissenschaftlichen Studien zugeführt werden.

## 6 Anhang

### **Abteilung Kardiologie und Pneumologie**

Direktor: Professor Dr. med. Gerd Hasenfuß

Kardiologie u. Pneumologie · Robert-Koch-Str. 40 · 37099 Göttingen

#### **Ansprechpartnerin:**

**Dr. med. Frauke Czepluch**

Tel: 0551/39-12575

Fax: 0551/39-14131

Email: f.czepluch@med.uni-goettingen.de

www.herzzentrum-goettingen.de

### **Aufklärungsbogen**

## **„Funktionelle Bedeutung humaner Monozytensubpopulation für das Gefäßwachstum“**

**(Untersuchung spezialisierter weißer Blutkörperchen, die am  
Gefäßwachstum maßgeblich beteiligt sind)**

Liebe Probandin, Lieber Proband,

wir möchten Sie einladen, freiwillig an einer wissenschaftlichen Studie der Abteilung Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen teilzunehmen.

Wir führen eine klinisch-experimentelle Studie durch, bei der wir spezialisierte weiße Blutkörperchen untersuchen möchten, die maßgeblich an Umbauprozessen am Herz und an den Gefäßen beteiligt sind. Insbesondere sind wir hier an einer Untergruppe der weißen Blutkörperchen (Monozyten) interessiert. Im Rahmen der Studie möchten wir die Fähigkeit dieser Zellen untersuchen, am Gefäßwachstum mitzuwirken. Hierzu sollen mit den Zellen verschiedene Experimente durchgeführt werden, in denen die direkte und indirekte Beteiligung der Zellen am Gefäßwachstum analysiert wird. In dem dargelegten Forschungsprojekt erhoffen wir uns neue Erkenntnisse über die unterschiedliche Bedeutung von Monozytenuntergruppen für das Gefäßwachstum. Diese Erkenntnisse sollen uns helfen, die genaue Rolle der einzelnen Monozytenuntergruppen im Herz-Kreislauf-System besser zu verstehen.

Die Durchführung der Studie ist mit einem minimalen Aufwand für Sie verbunden. Im Rahmen Ihrer heutigen Blutspende werden für die Erstellung von Blutkonserven (Erythrozytenkonzentraten) und Frischplasmaprodukten weiße Blutkörperchen aus dem Blut herausgefiltert. Dieser Zellrest („Buffy Coat“) macht nur einen geringen Anteil Ihrer Blutspende aus (ca. 10% des Gesamtvolumens), ist ein Nebenprodukt und wird normalerweise nicht weiter verwendet. Im Rahmen dieser Studie sollen die Monozyten weiter isoliert werden. Die Fähigkeit der Monozyten, am Gefäßwachstum mitzuwirken, soll im Anschluss analysiert werden. Darüber hinaus möchten wir Sie bitten, einen Fragebogen auszufüllen.

Bei einer Studienteilnahme entstehen für Sie keine zusätzlichen gesundheitlichen Risiken, da die Blutabnahme innerhalb der Blutspende erfolgt und nur die nicht benötigten Reste der Blutspende verwendet werden.

Sie haben das Recht, Ihre Teilnahme an der Studie jederzeit und ohne Angabe von Gründen zu widerrufen. Dies hat keine Auswirkungen auf Ihre jetzige und zukünftige Behandlung an der Universitätsmedizin Göttingen. Bei Widerruf der Studienteilnahme werden Ihre Blutproben vernichtet und Ihre Daten gelöscht werden.

Im Rahmen dieser Studie sollen Daten über Ihre Vorerkrankungen erhoben werden. Die erfassten Daten werden pseudonymisiert. Pseudonymisierung bedeutet Verschlüsselung von Daten/Proben ohne Namensnennung, d. h. nur mit Nummern codiert. Die Zuordnung der Daten oder Proben zu einer Person ist nur möglich, wenn hierfür der Schlüssel eingesetzt wird, mit dem die Daten pseudonymisiert wurden. Die personenbezogenen Daten/Proben werden unter besonderen Schutzvorkehrungen getrennt von den pseudonymisierten Daten aufbewahrt. Eine Entschlüsselung ist nur durch die verantwortlichen Studienärzte möglich. Dritte erhalten keinen Einblick in die Originalunterlagen. Die Speicherung der Daten erfolgt auf unbestimmte Zeit. Die Daten werden nicht an Dritte weitergegeben und Sie haben die Möglichkeit, die Löschung Ihrer Daten zu verlangen.

Die Behandlung und Diagnose vorliegender Erkrankungen wird durch die Teilnahme an der Studie **nicht** beeinflusst. Für die an der Studie teilnehmenden Probanden besteht kein Risiko und auch kein unmittelbarer Nutzen.

Mit herzlichem Dank.

Dr. Frauke Czepluch

Projektleiterin/Prüfärztin

**Abteilung Kardiologie und Pneumologie**

Direktor: Professor Dr. med. Gerd Hasenfuß

Kardiologie u. Pneumologie · Robert-Koch-Str. 40 · 37099 Göttingen

**Ansprechpartnerin:****Dr. med. Frauke Czepluch**

Tel: 0551/39-12575

Fax: 0551/39-14131

Email: f.czepluch@med.uni-goettingen.de

www.herzzentrum-goettingen.de

**Einwilligungserklärung****„Funktionelle Bedeutung humaner Monozytensubpopulation  
für das Gefäßwachstum“**

Ich, \_\_\_\_\_, wurde von meinem Arzt/Ärztin über Wesen, Bedeutung und Tragweite der Studie mit dem o.g. Titel aufgeklärt. Ich habe den Aufklärungstext gelesen und verstanden. Ich hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen, und habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie. Mir sind die Risiken, die mir durch Studienteilnahme entstehen, bewusst. Die Behandlung und Diagnose vorliegender Erkrankungen wird durch die Teilnahme an der Studie nicht beeinflusst.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zur Teilnahme an dieser Studie zu entscheiden und weiß, dass die Teilnahme an dieser Studie freiwillig ist. Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann, ohne dass sich dieser Entschluss nachteilig auf die spätere Behandlung durch meinen Arzt auswirken wird.

**Mir ist bekannt, dass meine persönlichen Daten in verschlüsselter Form (pseudonymisiert, mit Codenummer, die nicht der Person zuzuordnen ist) gespeichert werden. Mit meinem Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erkläre ich gleichzeitig, dass ich mit der im Rahmen dieser Studie erfolgenden Datenerhebung, pseudonymisierten Datennutzung und Speicherung einverstanden bin.**

Ich habe eine Kopie der Probandeninformation und dieser Einwilligungserklärung erhalten. Ich erkläre hiermit meine freiwillige Teilnahme an dieser Studie.

\_\_\_\_\_  
Ort und Datum\_\_\_\_\_  
Unterschrift des/r Proband/in\_\_\_\_\_  
Ort und Datum\_\_\_\_\_  
Unterschrift des/r aufklärenden Arztes/Ärztin

## Fragebogen

**Pseudonymierungscode:** \_\_\_\_\_ (wird vom Arzt ausgefüllt)

Bitte ankreuzen:

Rauchen Sie aktuell ?..... Ja  Nein

Leiden Sie aktuell an einer Erkältung/Infekt? ..... Ja  Nein

Leiden Sie an einer Allergie oder Autoimmunerkrankung? Ja  Nein

Wenn ja, welche ? \_\_\_\_\_

Leiden Sie an einer rheumatischen Erkrankung? Ja  Nein

Wenn ja, welche ? \_\_\_\_\_

Leiden Sie an einer Tumorerkrankung? Ja  Nein

Wenn ja, welche ? \_\_\_\_\_

Hatten Sie schon einmal einen Herzinfarkt/Schlaganfall .....Ja  Nein

Haben Sie hohen Blutdruck oder werden deshalb behandelt?.Ja  Nein

Leiden Sie an der Blutzuckerkrankheit (Diabetes mellitus)?...Ja  Nein

Welche Medikamente nehmen Sie regelmäßig ein (bitte auch Anti-Babypille und Kopfschmerztabletten angeben)?

---

---

---

---

## 7 Literaturverzeichnis

- Allen SJ, Crown SE, Handel TM (2007): "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." *Annu Rev Immunol* 25: 787-820.
- Alshaker H, Sacco K, Alfraidi A, Muhammad A, Winkler M, Pchejetski D (2015): "Leptin signalling, obesity and prostate cancer: molecular and clinical perspective on the old dilemma." *Oncotarget* 6(34): 35556-35563.
- Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D (2003): "Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes." *J Exp Med* 197(12): 1701-1707.
- Ancuta P, Liu KY, Misra V, Wacleche VS, Gosselin A, Zhou X, Gabuzda D (2009): "Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets." *BMC Genomics* 10: 403.
- Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W (1998): "Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb." *J Clin Invest* 101(1): 40-50.
- Barton WA, Tzvetkova D, Nikolov DB (2005): "Structure of the angiopoietin-2 receptor binding domain and identification of surfaces involved in Tie2 recognition." *Structure* 13(5): 825-832.
- Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA (1996): "The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16): 8374-8378.
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L (2002): "The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF." *J Immunol* 168(7): 3536-3542.
- Bergmann CE, Hoefler IE, Meder B, Roth H, van Royen N, Breit SM, Jost MM, Aharinejad S, Hartmann S, Buschmann IR (2006): "Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice." *J Leukoc Biol* 80(1): 59-65.
- Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R (1998): "Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis." *Circ Res* 83(10): 1059-1066.
- Capoccia BJ, Shepherd RM, Link DC (2006): "G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism." *Blood* 108(7): 2438-2445.
- Capoccia BJ, Gregory AD, Link DC (2008): "Recruitment of the inflammatory subset of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent fashion." *J Leukoc Biol* 84(3): 760-768.
- Chen LC, Chen CC, Liang Y, Tsang NM, Chang YS, Hsueh C (2011): "A novel role for TNFAIP2: its correlation with invasion and metastasis in nasopharyngeal carcinoma." *Mod Pathol* 24(2): 175-184.
- Cochain C, Rodero MP, Vilar J, Recalde A, Richart AL, Loinard C, Zouggari Y, Guerin C, Duriez M, Combadiere B, et al. (2010): "Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization." *Cardiovasc Res* 88(1): 186-195.

- Cowan DB Langille BL (1996): "Cellular and molecular biology of vascular remodeling." *Curr Opin Lipidol* 7(2): 94-100.
- Czepluch FS Waltenberger J (2006): "Monocyte responsiveness towards different arteriogenic stimuli: a functional comparison of various chemoattractants and their combinations." *Thromb Haemost* 96(6): 857-858.
- Czepluch FS, Bergler A Waltenberger J (2007): "Hypercholesterolaemia impairs monocyte function in CAD patients." *J Intern Med* 261(2): 201-204.
- Czepluch FS, Olieslagers S, van Hulten R, Voo SA Waltenberger J (2011): "VEGF-A-induced chemotaxis of CD16+ monocytes is decreased secondary to lower VEGFR-1 expression." *Atherosclerosis* 215(2): 331-338.
- Czepluch FS, Bernhardt M, Kuschicke H, Gogiraju R, Schroeter MR, Riggert J, Hasenfuss G Schäfer K (2014): "In vitro and in vivo effects of human monocytes and their subsets on new vessel formation." *Microcirculation* 21(2): 148-158.
- De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M Naldini L (2005): "Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors." *Cancer Cell* 8(3): 211-226.
- Deutsche Herzstiftung e. V. [Hrsg.] (2015). *Deutscher Herzbericht 2014*. Frankfurt am Main.
- Djonov V Makanya AN (2005). New insights into intussusceptive angiogenesis. *Exs*: 17-33.
- Epelman S, Liu PP Mann DL (2015): "Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair." *Nat Rev Immunol* 15(2): 117-129.
- Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD Allison AC (1992): "Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis." *Am J Pathol* 140(3): 539-544.
- Favre J, Terborg N Horrevoets AJ (2013): "The diverse identity of angiogenic monocytes." *Eur J Clin Invest* 43(1): 100-107.
- Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, Bartol A, Kienast Y, Vettel C, Loos EK, et al. (2012): "Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling." *J Clin Invest* 122(6): 1991-2005.
- Fernandez-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martin-Romero C, Perez-Perez A, Gonzalez-Yanes C Sanchez-Margalet V (2010): "Role of leptin in the activation of immune cells." *Mediators Inflamm* 2010: 568343.
- Ferrara N (1995): "The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis." *Breast Cancer Res Treat* 36(2): 127-137.
- Galie PA, Nguyen DH, Choi CK, Cohen DM, Janmey PA Chen CS (2014): "Fluid shear stress threshold regulates angiogenic sprouting." *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(22): 7968-7973.
- Ge H, Huang L, Pourbahrami T Li C (2002): "Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo." *J Biol Chem* 277(48): 45898-45903.
- Geissmann F, Jung S Littman DR (2003): "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." *Immunity* 19(1): 71-82.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M Ley K (2010): "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* 327(5966): 656-661.

- Gordon S Taylor PR (2005): "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nat Rev Immunol* 5(12): 953-964.
- Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E Busch MA (2013): "Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1)." *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 56(5-6): 650-655.
- Grage-Griebenow E, Flad HD Ernst M (2001a): "Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets." *J Leukoc Biol* 69(1): 11-20.
- Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H Ernst M (2001b): "Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes." *Eur J Immunol* 31(1): 48-56.
- Hanahan D (1997): "Signaling vascular morphogenesis and maintenance." *Science* 277(5322): 48-50.
- Heida NM, Leifheit-Nestler M, Schroeter MR, Müller JP, Cheng IF, Henkel S, Limbourg A, Limbourg FP, Alves F, Quigley JP, et al. (2010): "Leptin enhances the potency of circulating angiogenic cells via src kinase and integrin (alpha)vbeta5: implications for angiogenesis in human obesity." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(2): 200-206.
- Hoefler IE, van Royen N, Rectenwald JE, Bray EJ, Abouhamze Z, Moldawer LL, Voskuil M, Piek JJ, Buschmann IR Ozaki CK (2002): "Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis." *Circulation* 105(14): 1639-1641.
- <https://www.perimed-instruments.com/de/Laser-Doppler-Imaging> (2016).
- Hudlicka O, Brown M Egginton S (1992): "Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle." *Physiol Rev* 72(2): 369-417.
- Krasinski K, Spyridopoulos I, Kearney M Losordo DW (2001): "In vivo blockade of tumor necrosis factor-alpha accelerates functional endothelial recovery after balloon angioplasty." *Circulation* 104(15): 1754-1756.
- Kuch B, Heier M, von Scheidt W, Kling B, Hoermann A Meisinger C (2008): "20-year trends in clinical characteristics, therapy and short-term prognosis in acute myocardial infarction according to presenting electrocardiogram: the MONICA/KORA AMI Registry (1985-2004)." *J Intern Med* 264(3): 254-264.
- Leach M, Drummond M Doig A (2013). *Practical Flow Cytometry in Haematology Diagnosis*. Oxford, John Wiley & Sons.
- Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V Nuseir N (1987): "Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha." *Nature* 329(6140): 630-632.
- Leuschner F, Rauch PJ, Ueno T, Gorbato R, Marinelli B, Lee WW, Dutta P, Wei Y, Robbins C, Iwamoto Y, et al. (2012): "Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis." *J Exp Med* 209(1): 123-137.
- Li MD (2011): "Leptin and beyond: an odyssey to the central control of body weight." *Yale J Biol Med* 84(1): 1-7.
- Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, Amann M, Anderson HR, Andrews KG, Aryee M, et al. (2013): "A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21



- regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet* **380**(9859): 2224-2260.
- Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H Limbourg FP (2009): "Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia." *Nat Protoc* **4**(12): 1737-1746.
- Lopez-Holgado N, Alberca M, Sanchez-Guijo FM, Villaron EM, Rivas JV, Lopez-Novoa JM, Brinon JG, Arevalo MA, Oterino E, Santamaria C, et al. (2009): "Prospective comparative analysis of the angiogenic capacity of monocytes and CD133+ cells in a murine model of hind limb ischemia." *Cytotherapy* **11**(8): 1041-1051.
- Löwel H (2006): "koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt." *Gesundheitsberichterstattung des Bundes* (Heft 33).
- Löwel H, Meisinger C, Heier M, Hormann A (2005): "The population-based acute myocardial infarction (AMI) registry of the MONICA/KORA study region of Augsburg." *Gesundheitswesen* **67 Suppl 1**: S31-37.
- Macey MG (2007). *Flow cytometry. Principles and applications*. Totowa, Humana Press.
- Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG (2009): "Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling." *Angiogenesis* **12**(2): 113-123.
- Metivier F, Marchais SJ, Guerin AP, Pannier B, London GM (2000): "Pathophysiology of anaemia: focus on the heart and blood vessels." *Nephrol Dial Transplant* **15 Suppl 3**: 14-18.
- Mitchell NS, Catenacci VA, Wyatt HR, Hill JO (2011): "Obesity: overview of an epidemic." *Psychiatr Clin North Am* **34**(4): 717-732.
- Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B (2015): "Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus." *Sci Rep* **5**: 13886.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM (1993): "PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes." *J Exp Med* **178**(2): 449-460.
- Myers MG, Jr. (2004): "Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology." *Recent Prog Horm Res* **59**: 287-304.
- Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK (2010): "Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction." *Circulation* **121**(22): 2437-2445.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ (2007): "The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions." *J Exp Med* **204**(12): 3037-3047.
- Palframan RT, Jung S, Cheng G, Weninger W, Luo Y, Dorf M, Littman DR, Rollins BJ, Zweerink H, Rot A, et al. (2001): "Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues." *J Exp Med* **194**(9): 1361-1373.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW (1989): "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood." *Blood* **74**(7): 2527-2534.

- Rhodes NP, Hunt JA Williams DF (1997): "Macrophage subpopulation differentiation by stimulation with biomaterials." *J Biomed Mater Res* 37(4): 481-488.
- Risau W (1997): "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* 386(6626): 671-674.
- Robert-Koch-Institut [Hrsg.] (2014). Koronare Herzerkrankung. Faktenblatt zu GEDA 2012: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2012". Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin, Robert-Koch-Intitut. [zu sehen unter:  
[https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsF/Geda2012/koronare\\_herzerkrankung.pdf?\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsF/Geda2012/koronare_herzerkrankung.pdf?_blob=publicationFile)]: 1-4.
- Sainson RC, Johnston DA, Chu HC, Holderfield MT, Nakatsu MN, Crampton SP, Davis J, Conn E Hughes CC (2008): "TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype." *Blood* 111(10): 4997-5007.
- Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S Gonzalez-Yanes C (2003): "Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action." *Clin Exp Immunol* 133(1): 11-19.
- Santos-Alvarez J, Goberna R Sanchez-Margalet V (1999): "Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes." *Cell Immunol* 194(1): 6-11.
- Schaper W Buschmann I (1999): "Arteriogenesis, the good and bad of it." *Cardiovasc Res* 43(4): 835-837.
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM Pamer EG (2008): "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." *Annu Rev Immunol* 26: 421-452.
- Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S Chien S (1994): "Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 4678-4682.
- Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, et al. (1998): "Biological action of leptin as an angiogenic factor." *Science* 281(5383): 1683-1686.
- Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW Caro JF (1996): "Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting." *J Clin Invest* 98(6): 1277-1282.
- Stadler N, Eggermann J, Voo S, Kranz A Waltenberger J (2007): "Smoking-induced monocyte dysfunction is reversed by vitamin C supplementation in vivo." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(1): 120-126.
- Statistisches Bundesamt (2014). Todesursachen in Deutschland 2013. Fachserie 12, Reihe 4. Wiesbaden.
- Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Watanabe D, Ojima T, Suganami T, Fujio Y, et al. (2004): "Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells." *Diabetes* 53(9): 2443-2448.
- Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, et al. (2009): "Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites." *Science* 325(5940): 612-616.

- Tartaglia LA (1997): "The leptin receptor." *J Biol Chem* 272(10): 6093-6096.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, et al. (1995): "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." *Cell* 83(7): 1263-1271.
- Thurston G (2003): "Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis." *Cell Tissue Res* 314(1): 61-68.
- Van Rooijen N (1989): "The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique." *J Immunol Methods* 124(1): 1-6.
- Van Rooijen N Sanders A (1994): "Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications." *J Immunol Methods* 174(1-2): 83-93.
- Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, Pucci F, Scielzo C, Zonari E, Mazzieri R, Doglioni C Naldini L (2007): "Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer." *Blood* 109(12): 5276-5285.
- Waltenberger J, Lange J Kranz A (2000): "Vascular endothelial growth factor-A-induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes mellitus: A potential predictor for the individual capacity to develop collaterals." *Circulation* 102(2): 185-190.
- Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS Ziegler-Heitbrock HW (2000): "Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations." *J Leukoc Biol* 67(5): 699-704.
- Wiesner G, Grimm J Bittner E (2002): "Vorausberechnung des Herzinfarktgeschehens in Deutschland." *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 45(5): 438-445.
- Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, Weetman AP, Strasburger CJ Ross RJ (2001): "High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes." *J Immunol* 167(8): 4593-4599.
- Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D Heine GH (2011): "SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset." *Blood* 118(12): e50-61.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L Friedman JM (1994): "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372(6505): 425-432.
- Ziegler-Heitbrock L Hofer TP (2013): "Toward a refined definition of monocyte subsets." *Front Immunol* 4: 23.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, et al. (2010): "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." *Blood* 116(16): e74-80.

## Danksagung

Zuallererst geht mein Dank natürlich an Frau PD Dr. med. **Frauke S. Czepluch** für die Bereitstellung des Themas und das gemeinschaftliche Durchführen vieler Versuche. Sie hat in ihrer Funktion als Doktormutter die Grundlage für die Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen gelegt und mich durchgehend bis zur Fertigstellung der Dissertationsschrift unterstützt.

Nachfolgend gebührt ein besonderes Dankeschön Frau Prof. Dr. med. **Katrin Schäfer**, in deren Arbeitsgruppe ich meine ersten laborexperimentellen Schritte vollziehen durfte und die mir fachlich und methodisch, insbesondere beim Erlernen der OP-Methode jederzeit helfend zur Seite stand. Des Weiteren wurde mir durch sie erstmalig die Möglichkeit gegeben, einem internationalen wissenschaftlichen Kongress beizuwohnen.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Herrn Univ. - Prof. Dr. med. **Gerd Hasenfuß**, Direktor der Klinik für Kardiologie und Pneumologie der UMG sowie Vorsitzender des Herzforschungszentrums Göttingen, dass ich in seiner Klinik meine Dissertation anfertigen und die Hilfe der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter in Anspruch nehmen durfte.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch unseren beiden MTAs **Sarah Barke** und **Anika Hunold**, die auch nach der Einarbeitung in die Methodik und experimentelle Arbeit immer ein „wachsames Auge“ und vor allem sehr gute Anregungen, sowie so manchen Trick und Kniff bereitstellten, mit dem ein Versuch letztlich doch funktioniert hat.

Des Weiteren gilt mein Dank meinen Mitstreitern, Frau Dr. med. **Magdalena Beham**, Herrn Dr. med. **Hendrik Kuschicke** und Herrn Dr. med. **Sebastian Herzberg**, die dauerhaft für ein sehr gutes zwischenmenschliches Klima in unserem Labor gesorgt und damit so manch wissenschaftlichen Misserfolg aufgefangen haben.

Zuletzt sei auch all meinen Freunden, insbesondere ist hier Herr Dr. rer. pol. **Markus Plewa** zu nennen, der durch seine Hilfe im Rahmen der statistischen Auswertung wesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen hat.