

Die therapeutischen Effekte endothelialer Progenitorzellen beim LPS-induzierten ARDS

Therapeutic effects of endothelial progenitor cells in LPS-induced ARDS

N. Rafat¹ · C. Dacho² · G. Kowanetz³ · J. Krebs⁴ · C. Tsagogiorgas⁴
V. Ghezel-Ahmadi⁶ · B. Yard⁵ · G. Beck⁶

Zusammenfassung

Hintergrund und Fragestellung: Das Endotoxin-induzierte Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) ist durch Funktionsstörungen in der mikrovaskulären Strombahn mit Permeabilitätsstörung und Ausbildung eines Lungenödems sowie Apoptose und Nekrose von Endothel- und Epithelzellen gekennzeichnet. Bei Sepsispatienten, von denen etwa die Hälfte eine Lungenbeteiligung aufwies, konnten vermehrt zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (cEPC) detektiert werden, deren Konzentration sich umgekehrt proportional zu Schwere und Mortalität verhielt und die im erkrankten Lungengewebe adhärten. Somit scheinen kurz nach der initialen Schädigung bereits reparative Prozesse der zellulären kapillären Strukturen initiiert zu werden. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, das Potential von EPC als Therapieoption beim ARDS zu untersuchen.

Methodik: In einem Modell des Lipopolysaccharide (LPS)-induzierten isolierten ARDS wurden Ratten allogene EPC aus dem Knochenmark (10^6 Zellen) intravenös appliziert. Als Kontrollgruppen dienten sowohl LPS-behandelte Ratten, die keine EPC injiziert bekamen, als auch Ratten, die nur NaCl erhielten.

Ergebnisse: Im Vergleich zu den Tieren, die nur LPS erhielten, konnten nach 24 Stunden in der LPS+EPC-Gruppe ein signifikant verbesserter Gasaustausch (PaO_2 : 87 vs 74%, $p < 0,01$), eine Inhibition der Synthese proinflammatorischer Zytokine (IL1 β : 28 vs 114pg/ml, $p < 0,03$), eine

verbesserte klinische Symptomatik und letztendlich eine verminderte Mortalität ($p < 0,024$) nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen: EPC scheinen somit eine mögliche Rolle in der Regeneration der entzündlich veränderten kapillären Strombahn einzunehmen. Eine Erhöhung der EPC-Konzentration könnte dementsprechend eine neue therapeutische Option in der Sepsistherapie darstellen.

Summary

Background: Endotoxin-induced ARDS is characterized by diffuse dysfunction of the microvasculature including increased permeability with edema formation and apoptosis or necrosis of endothelial and epithelial cells. Concomitantly, an increased concentration of circulating endothelial progenitor cells (EPC) was found in septic patients, of which more than half have pulmonary involvement. The number of circulating EPC correlated inversely to disease severity and mortality. Since these EPC were found homing to damaged lung tissue, a reparative process seems to be initiated right after the initiation of vessel damage or degeneration. In the present study we investigated the potential of EPC as a treatment strategy in ARDS.

Method: Bone marrow-derived EPC were administered systemically to rats suffering from LPS-induced isolated ARDS. LPS- or vehicle-treated rats served as controls.

Results: Rats treated with EPC showed significantly improved pulmonary gas exchange, an inhibition of pro-inflammatory

- 1 Klinik Kinderheilkunde I, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. Prof. h.c. G. F. Hofmann)
- 2 Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Alfred-Krupp-Krankenhaus Essen (Direktor: Prof. Dr. K. Waschke)
- 3 SLK Klinikum am Gesundbrunnen Heilbronn (Direktor: Prof. Dr. P. L. Pereira)
- 4 Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Universitätsmedizin Mannheim (Direktor: Prof. Dr. M. Thiel)
- 5 V. Medizinische Klinik (Nephrologie, Endokrinologie, Rheumatologie), Universitätsmedizin Mannheim (Direktor: Prof. Dr. B. Krämer)
- 6 Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Dr.-Horst-Schmidt-Kliniken Wiesbaden (Direktorin: Prof. Dr. G. Beck)

N. Rafat und C. Dacho sind gleichberechtigte Erstautoren.

Danksagung

Die Autoren danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Schlüsselwörter

Endotheliale Progenitorzellen – Sepsis – ARDS

Keywords

Endothelial Progenitor Cells – Sepsis – ARDS

cytokine synthesis, an improved clinical course and a reduced mortality ($p < 0.024$) compared to rats receiving LPS alone.

Conclusion: These findings suggest that the application of exogenous EPC can reduce the severity of septic organ damage. EPC treatment might therefore become a novel therapeutic option in the management of sepsis.

Einleitung

Das Acute respiratory distress syndrome (ARDS) ist charakterisiert durch eine Schädigung der alveolar-kapillären Membran mit gesteigerter vaskulärer Permeabilität, Ödembildung und Hypoxie. Begleitet wird dies durch die Anhäufung von Entzündungszellen am Ort einer massiven endothelialen und epithelialen Schädigung mit Schwellung und Deformierung bis zur Apoptose oder Nekrose der Zellen.

Aktuell gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass gleichzeitig mit dieser Schädigung auch reparative Prozesse induziert werden. In diesem Rahmen bewirken endotheliale Vorläuferzellen (EPC), welche durch eine Reihe von Mediatoren (z.B. Zytokine und Wachstumsfaktoren) vermehrt aus dem Knochenmark in die Zirkulation freigesetzt werden, eine Re-Endothelialisierung und führen durch die Stabilisierung der kapillären Strukturen zu signifikanten Verbesserungen der Perfusion, der Sauerstoffversorgung und damit der Organfunktion.

Im peripheren Blut von Gesunden entspricht die Anzahl an zirkulierenden EPC nur etwa 0,001-0,05% der mononukleären Zellfraktion [1]. Sie stammen aus dem Knochenmark (KM), welches u.a. hämatopoetische (HSC) und mesenchymale Stammzellen (MSC) beinhaltet. Diese wiederum können sich entsprechend den vorhandenen Wachstumsbedingungen in verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichem Phänotyp differenzieren. Zellen mit endotheliale Phänotyp differenzieren sich primär aus HSC. Gleichzeitig können aber auch SC der Myeloid-Reihe und der MSC-Reihe endotheliale Marker exprimieren und einen endothelialen Phä-

notyp annehmen [2]. Trotz anhaltender kontroverser Diskussionen ist etabliert, dass der Nachweis der Kombination des hämatopoetischen Stammzellmarkerproteins CD34, des Progenitormarkerproteins CD133 und des Endothelmarkerproteins CD31 oder VEGFR-2 eine Identifizierung endothelialer Stammzellen erlaubt [3].

Das regenerative oder reparative Potential dieser Zellen wurde in einer Reihe von Tiermodellen mit akuter Gefäßschädigung, peripherer und myokardialer Ischämie oder Ischämie/Reperfusionsschaden nach Organtransplantation durch die intravenöse oder lokale Applikation von EPC bereits bestätigt. In eigenen Voruntersuchungen an Sepsispatienten konnten wir im Vergleich zu nicht-septischen Patienten und Gesunden einen signifikanten Anstieg der Anzahl zirkulierender EPC (cEPC) im Vollblut zeigen [4]. Die cEPC-Konzentration war dabei umgekehrt proportional zu Schweregrad der Sepsis und Mortalität. Auch bestand eine positive Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen von an der EPC-Freisetzung beteiligten Mediatoren wie Vascular endothelial growth factor (VEGF), Granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) und Erythropoietin und der cEPC-Konzentration. Aus diesen Daten schlussfolgerten wir, dass die vermehrte Freisetzung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in der Frühphase der Sepsis bereits Reparaturmechanismen des geschädigten Endothels initiieren könnte. Eindrucksvoll wurde dies auch kürzlich in einer In-vitro-Studie bestätigt, in der die Zugabe von EPC zu einer geschädigten endothelialen Zellschicht deren gesteigerte Permeabilität signifikant reduzieren konnte [5].

Andere Forschungsgruppen bestätigen derzeit vorrangig im Tiermodell die erhöhte Konzentration von cEPC bei akuter Lungenerkrankung mit oder ohne zugrunde liegender Sepsis [6,7]. Sie beobachteten ebenfalls eine Assoziation von erhöhter EPC-Konzentration im peripheren Blut und günstigem klinischem Verlauf. Chen-Fu et al. [8], Gao et al. [9] und Mao et al. [10] zeigten, dass die intravenöse Transplantation von kultivierten EPC den Schweregrad eines ARDS reduziert.

Auch konnten sie nachweisen, dass die intravenös applizierten Zellen tatsächlich in das geschädigte Lungengewebe migrieren und dort auch adhären.

Die erhöhte Zahl von cEPC könnte somit nicht nur als ein diagnostischer oder prognostischer Parameter einer Lungenschädigung dienen, sondern durch die offensichtlich verbesserte Regenerationsfähigkeit der endothelialen Barriere eine neue Therapieoption bei Schrankenstörungen darstellen. In der vorliegenden Studie wurde am isolierten Endotoxin-induzierten ARDS im Rattenmodell untersucht, ob exogen applizierte EPC zu Verbesserungen der Lungenfunktion und des Überlebens führen können.

Methodik

Tierversuche

Die Versuche wurden beim Regierungspräsidium Karlsruhe angezeigt und genehmigt. Die „Principles of Laboratory Animal Care“ und das Tierschutzgesetz wurden in der jeweils aktuellen Fassung eingehalten.

Wistar-Ratten wurde unter Sedierung zunächst ein Polypropylen-Katheter in die A. femoralis zur mehrmaligen arteriellen Blutentnahme implantiert. Anschließend wurde ein Kathetersystem (AeroProbe, Trudell Medical International, Ontario, Canada) zur Verneblung von LPS oder Placebo in die Trachea eingebracht. Das Betriebssystem (LABneb, Trudell Medical International, Ontario, Canada) gibt an dieses einen Druck von 60 psi und einen Fluss von 1,4 l/min. Das Intervall wurde auf 60 ms festgesetzt, der daraus resultierende kurze Sprühstoß wurde atemsynchron appliziert. Nach Deposition der gewünschten LPS-Dosis wurde das Kathetersystem entfernt.

Im weiteren Versuchsablauf wurden die Tiere unter den Gesichtspunkten Aktivität, Augenrandverfärbung durch Sekret der Harderschen Drüsen, Fellpflege sowie Gewichtsveränderungen beobachtet und Blutentnahmen durchgeführt. Die Parameter wurden zu den Zeitpunkten 12, 24, 40 und 72 Stunden nach LPS oder LPS plus EPC-Applikation erfasst. Nach 72

Stunden wurden die Tiere im Finalversuch unter tiefer Narkose euthanasiert und die Lunge zur Entnahme freipräpariert. Der rechte Mittellappen wurde zur Quantifizierung des Lungenödems als Korrelat der Wet/dry-ratio direkt nach dem Finalversuch und nach 24 h im Trockenschrank gewogen. Weitere Lungenlappen und Organe wurden in Paraffin konserviert.

Bei den Langzeitversuchen über 10 Tage wurde auf die Anlage eines Femoraliskatheters verzichtet, die übrigen Schritte der LPS- und EPC-Applikation wurden wie beschrieben durchgeführt. Die Verlaufsparameter wurden täglich erfasst, der Finalversuch am 10. Tag nach LPS-Lungenschädigung in gleicher Form durchgeführt.

Knochenmark-Entnahme

Zur Gewinnung von Knochenmarkzellen (KM-PBMC) wurde das Knochenmark von Femuren ca. 8 Wochen alter Wistar-Ratten verwendet, die vorher mit Isoflurane narkotisiert und mittels zervikaler Dislokation euthanasiert worden waren. Der Zellzylinder wurde über ein 40 µm Sieb

gefiltert, und die mononukleären Zellen mittels Dichtezentrifugation gewonnen. Die Vitalitätsprüfung der Zellsuspension erfolgte mit Trypanblaufärbung.

Gewinnung endothelialer Progenitorzellen

EPCs wurden durch positive Selektion mittels CD133 Microbeads (Miltenyi Biotech) aus der KM-Zellsuspension selektiert. Es handelt sich bei den Beads um paramagnetische Mikromoleküle, verbunden mit monoklonalen anti-CD133-1-Antikörpern. Mit Hilfe dieser Beads findet eine selektive Bindung der CD133-positiven Progenitorzellen in einem Magnetfeld statt. Für die CD133-Microbead-Säule wurden 2×10^8 PBMC eingesetzt und die Magnetsäule nach Herstelleranleitung verwendet.

Injektion endothelialer Progenitorzellen

Die Tiere erhielten unmittelbar nach LPS-Injektion in Narkose entweder eine in 1ml NaCl 0,9% gelöste 1×10^6 EPC-Suspension oder 1ml NaCl 0,9% als Kontrollgruppe in die Schwanzvene injiziert.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Konzentrationen von TNF- α , IL-1 und IL-6 im Plasma wurden mittels ELISA entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt (R&D Systems Inc, Minneapolis). Die Sensitivität der Assays ist mit ca. 15 pg/ml angegeben.

Statistik

Die statistische Analyse wurde mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test, One-way-ANOVA oder Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Signifikanz wurde mit $p < 0.05$ definiert. Die nach Kaplan-Meier ermittelten Überlebensraten wurden mit dem LogRank-Test verglichen. Die Korrektur auf multiple Vergleiche erfolgte mit dem Holm-Sidak-Test.

Ergebnisse

Das Ergebnis einer umfangreichen Dosis-Wirkungsanalyse zeigte, dass mit 25 µg/kg KG LPS eine reproduzierbare Schädigung der Lungen und eine eindeutige klinische Symptomatik induziert werden

konnte. Neben dem Monitoring der klinischen Symptomatik wurde zur Etablierung des ARDS die TNF- α -Konzentration im Serum bestimmt. Die Anzahl der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen war: NaCl-Gruppe: n=9, LPS-Gruppe: n=17, davon 9 vorzeitig verstorben, LPS+EPC-Gruppe: n=17, davon 4 vorzeitig verstorben, LPS-Langzeit: n=6, LPS+EPC-Langzeit: n=6.

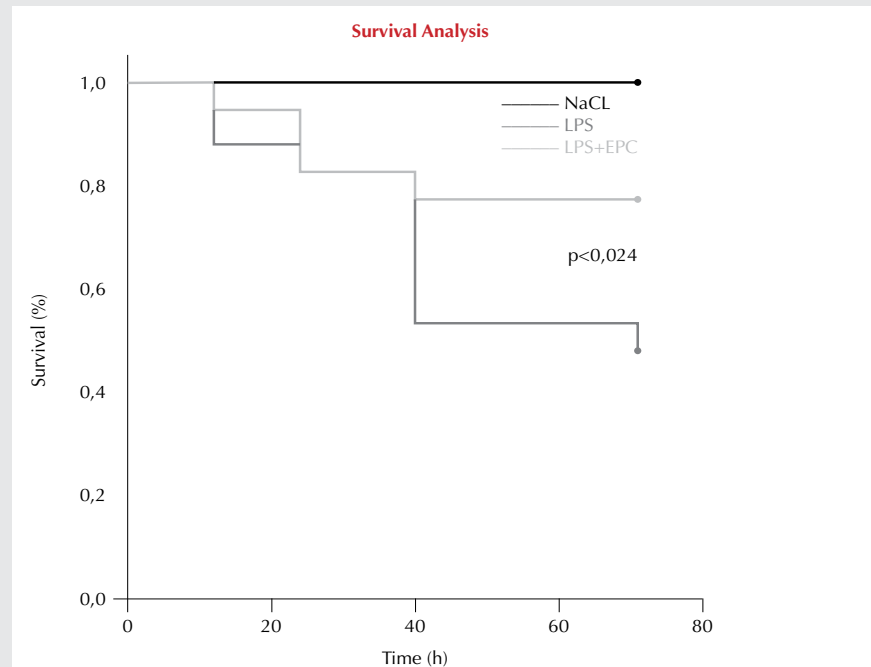
Mortalität

Eine der Hauptfragestellungen dieser Studie war, ob eine exogen induzierte cEPC-Erhöhung therapeutische Effekte hat und damit die Gesamtmortalität in diesem ARDS-Modell günstig beeinflusst werden kann. Dies konnte bestätigt werden, da die Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere in der LPS-Gruppe signifikant gegenüber der LPS+EPC-Gruppe reduziert war ($p<0,024$) (Abb. 1).

Makroskopische Veränderungen und klinische Symptome

Makroskopisch konnten 72 Stunden nach LPS- bzw. LPS+EPC-Applikation deutliche Unterschiede der Lungen in beiden Untersuchungsgruppen nachgewiesen werden. Die Lungen der Ratten

Abbildung 1

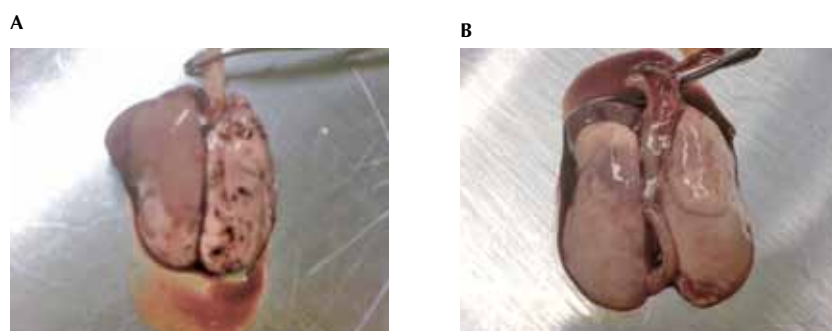


Mortalität der Tiere der LPS- (dunkelgrau) versus LPS+EPC-Gruppe (hellgrau) versus Kontrolle (schwarz).

nach LPS-Applikation waren großflächig oder disseminiert kleinfleckig infiltriert, teilweise waren livide Verfärbungen und Hämorrhagien sichtbar. Diese Symptome

waren bei den Lungen der Tiere, die zusätzlich EPC erhalten hatten, wesentlich weniger ausgeprägt (Abb. 2).

Abbildung 2



Makroskopische Veränderungen der Lunge nach LPS-Verneblung (A) und LPS-Verneblung plus EPC-Applikation (B).

Die vier klinischen Symptome rötlicher Tränenfluß, Fellbeschaffenheit, Aktivität und Nahrungsaufnahme wurden zur Evaluierung in unterschiedliche Schweregrade (1=sehr gut bis 4=sehr schlecht) über die Zeit von drei Tagen klassifiziert. Die Augensymptomatik mit Rötung und Ausfluss rötlichen Sekretes war bei allen Versuchstieren durch die LPS-Verneblung bereits 12 Stunden nach der Applikation sehr deutlich ausgeprägt und über die Zeit auch unverändert nachweisbar (Abb. 3A).

Eindrucksvolle Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen gab es aber bei den weiteren drei Symptomen: Ein ungepflegtes, mattes und struppiges Fell zeigte sich innerhalb der ersten zwei Tage nur in der LPS-Gruppe, die keine EPC-Applikation erhalten hatte (Abb. 3B). Diese Tiere wiesen deutlich mehr Krankheitssymptome und eine schlechtere Nahrungsaufnahme auf (Daten hier nicht abgebildet) und waren sichtlich inaktiver (Abb. 3C).

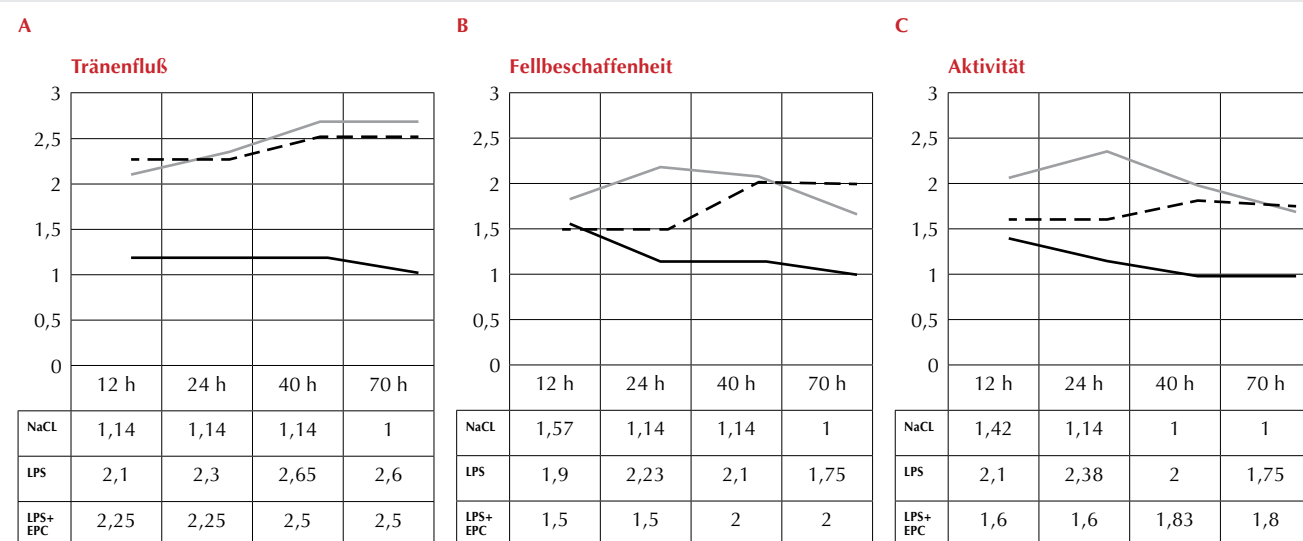
Blutgasanalysen

Arterielle Blutgasanalysen wurden zu allen Untersuchungszeitpunkten durchgeführt. Die Applikation von EPC führte zu einer signifikanten Verbesserung der Oxygenierung (Abb. 4). Der PaO_2 war bei den Tieren in der LPS+EPC-Gruppe über insgesamt 2 Tage signifikant gegenüber den Tieren in der LPS-Gruppe erhöht, wobei Werte nahe denen der Tiere in der NaCl-Gruppe erreicht wurden (Abb. 4A). Nach drei Tagen waren die PaO_2 -Werte immer noch besser, aber ohne statistische Signifikanz. Anhand der PaCO_2 -Werte zeigte sich eine diskrete Hyperventilation aller LPS-behandelten Tiere unabhängig von der EPC-Injektion. Die Sauerstoffsättigung hingegen war wiederum sowohl nach 24 als auch nach 40 Stunden durch die EPC-Injektion signifikant gegenüber der LPS-Gruppe verbessert (Abb. 4B).

Zytokinkonzentrationen

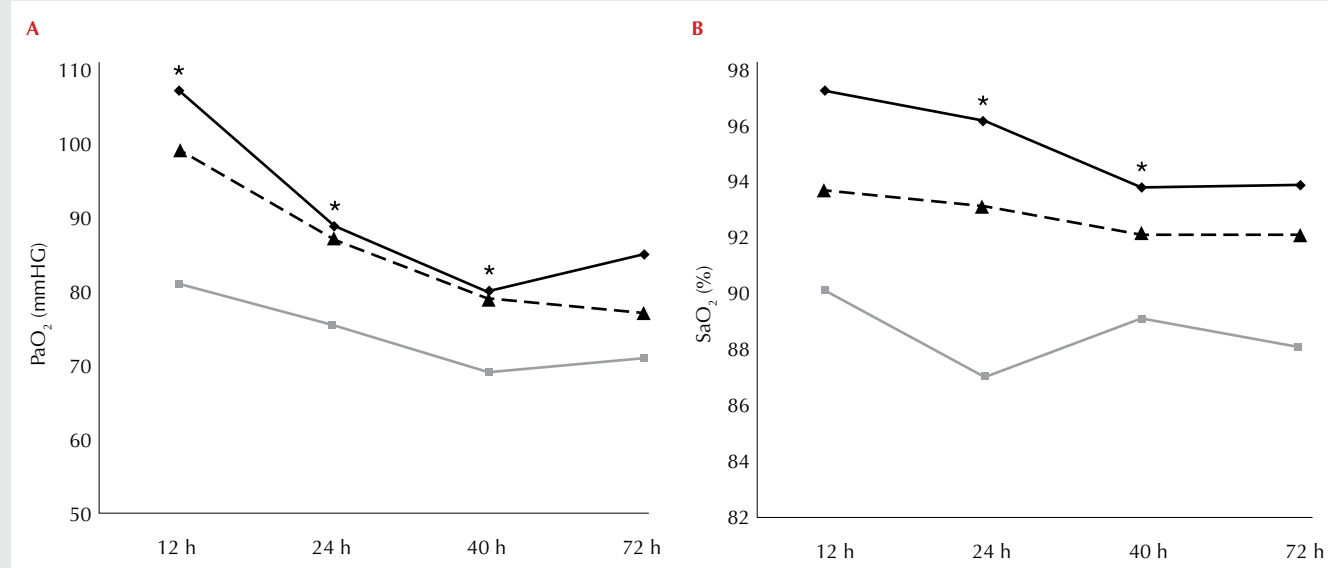
Zur Bestätigung der Initiierung einer pro-inflammatorischen Kaskade durch LPS wurde die Konzentration der Zytokine $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und IL-6 im Serum gemessen. $\text{TNF-}\alpha$ erreichte nach der ersten Stunde sein Punctum maximum; danach

Abbildung 3



Klinische Symptome der Tiere nach NaCl-Verneblung (schwarze Linie), LPS-Verneblung (graue Linie) und LPS-Verneblung plus EPC-Applikation (gestrichelte Linie). Die Punkte wurden wie folgt vergeben: Tränenfluß (1=normal bis 4=hochrot), Fellbeschaffenheit (1=normal bis 4=struppig, zerzaust, schmutzig) und Aktivität (1=normal bis 4=adynam).

Abbildung 4



PaO₂ (A) und SaO₂ (B) über 72 Stunden in der Blutgasanalyse von Ratten, die entweder NaCl (schwarze Linie), LPS (graue Linie) oder LPS+EPC (gestrichelte Linie) appliziert bekommen hatten; *p<0,05 LPS- vs. LPS+EPC-Gruppe.

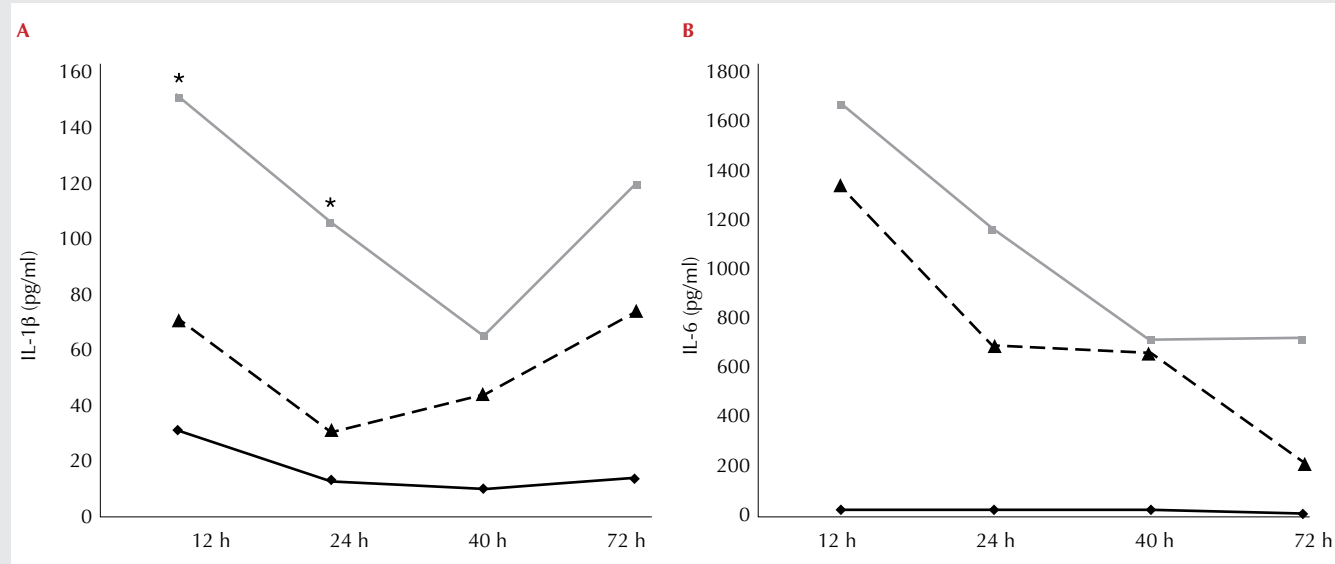
fiel die Konzentration kontinuierlich auf den Ausgangswert ab (Daten hier nicht aufgeführt). Der maximale Anstieg der IL-1-Serumkonzentration wurde 12 Stunden nach LPS-Verneblung gemessen. Bereits zu diesem Zeitpunkt waren signifikante Unterschiede zwischen den beiden Un-

tersuchungsgruppen messbar: In der LPS+EPC-Gruppe kam es zu einer deutlich geringeren IL-1-Synthese über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abb. 5A). Ein ähnliches Ergebnis wurde für die IL-6-Synthese nach LPS+EPC-Applikation gefunden (Abb. 5B).

Feucht-Trockengewicht

Die finale Bestimmung des Feucht-Trockengewichtes diente der Quantifizierung des Lungenödems. Im Vergleich der Gruppen zeigte sich zwar erwartungsgemäß ein deutlicher Unterschied im Feucht-Trockengewicht zur NaCl-Gruppe,

Abbildung 5



Serumkonzentration von IL-1 (A) und IL-6 (B) über 72 Stunden von Ratten, die entweder NaCl (schwarze Linie), LPS (graue Linie) oder LPS+EPC (gestrichelte Linie) appliziert bekommen hatten; *p<0,05 LPS- vs. LPS+EPC-Gruppe.

aber die beiden LPS-Gruppen unterschieden sich bezüglich des gemessenen Lungengewichtes und der wet/dry-Ratio nicht signifikant.

Langzeitergebnisse

In den klinischen Symptomen und dem Verlauf der Zytokinsynthese gab es nach dem üblichen Beobachtungszeitraum von 3 Tagen zwischen den Untersuchungsgruppen keine signifikanten Unterschiede mehr.

Diskussion

Es ist heute unumstritten, dass im Rahmen der Angiogenese und Vaskulogenese Vorläuferzellen aus dem Knochenmark rekrutiert werden und zum Ort der Revascularisierung wandern, dort parakrine Effekte entfalten oder sich direkt in ausgereifte endotheliale oder andere Zellen differenzieren. Diesen Vorläuferzellen wird jetzt auch eine zunehmende Bedeutung für die Endothelzellregeneration nach akuter und chronischer entzündungsbedingter Gewebeschädigung nachgewiesen [11]. Ausgehend von den Ergebnissen eigener Studien und den ermutigenden Erfahrungen anderer Forschungsgruppen, dass Progenitorzellen bei Sepsis, ARDS und anderen entzündlichen Lungenerkrankungen [12] vermehrt aus dem Knochenmark freigesetzt und in die Zirkulation abgegeben werden sowie deren Konzentration mit dem klinischen Outcome der erkrankten Patienten korreliert, war es Ziel dieser Studie zu untersuchen, ob die Applikation exogener EPC auch tatsächlich klinisch relevante Effekte auf die Lungenfunktion unter Sepsisbedingungen induzieren kann.

Es konnte am isolierten ARDS bei der Ratte gezeigt werden, dass nach LPS-Vernebelung durch die Injektion von EPC sowohl das makroskopische Bild der Lunge als auch der funktionelle Gasaustausch verbessert und die Synthese proinflammatorischer Zytokine inhibiert wurden; letztlich wurde dadurch auch die Mortalität signifikant reduziert. Insbesondere in der Frühphase des ARDS konnte der klinische Verlauf signifikant verbessert werden.

LPS wurde in diesem vulnerablen In-vivo-System nur einmal vernebelt und damit konnte unser Ziel einer Beobachtung der Akutphase des ARDS über 72 Stunden gut erfüllt werden. Für die Langzeitbeobachtungen müssen sicher Mehrfach- oder Dauerapplikationen von LPS erwogen und evaluiert werden, da die Tiere in dieser Versuchsreihe, die nur LPS erhalten und das Akutstadium nach 72 Stunden überstanden hatten, auch danach stabil und gesund blieben.

Wir konnten somit die ersten In-vivo-Ergebnisse, die an einem Kaninchen-Lungenmodell mit Ölsäure-induziertem ARDS im Jahre 2008 veröffentlicht worden waren [14], bestätigen. Durch eine autologe Transplantation von EPC konnten die Expression von iNOS in der Pulmonalarterie, die Leukozyteninfiltrationen sowie Hämorrhagien im Lungengewebe signifikant reduziert werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Studie konnte auch die Ödembildung in der Lunge signifikant reduziert werden. In Erweiterung dieser Untersuchungen wurde erst kürzlich am gleichen Modell gezeigt, dass auch die Oxygenierung und der Gasaustausch unter intravenöser EPC-Applikation signifikant verbessert werden kann [15].

In einer anderen 2011 publizierten Untersuchung wurde beim LPS-induziertem ARDS des Kaninchens durch eine systemische EPC-Applikation die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Synthese proinflammatorischer Zytokine (TNF- α oder IL-1- β) inhibiert sowie die Synthese antiinflammatorischer Zytokine (IL-10) signifikant gesteigert. Auch wir konnten eine signifikant reduzierte IL-1-Synthese zeigen und als zweites Akutphaseprotein ebenfalls eine reduzierte IL-6-Synthese nachweisen. Interessanterweise konnten die Autoren auch zeigen, dass durch die EPC-Applikation die entzündungsbedingte Apoptose endothelialer und epithelialer Zellen substantiell reduziert wird [9].

Progenitorzellen scheinen damit neben der Neovaskularisation auch die Gefäßregeneration oder -reparatur zu stimulieren und die lokale Inflammation zu

inhibieren [16,17]. Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Effekte durch EPC sind größtenteils noch unklar. Aufgrund eigener und anderer Untersuchungen können wir davon ausgehen, dass EPC zum Ort der Schädigung wandern und am geschädigten Endothel adhären, wenn auch wahrscheinlich nur kurzzeitig. Beeindruckend wurde dies nach intravenöser EPC-Applikation bei einem einseitig induzierten ARDS gezeigt [18]: Die EPC „homen“ nur auf der geschädigten und nicht auf der gesunden Seite und auch in keinem anderen gesunden Organ. Trotzdem konnte eine In-vivo-Differenzierung von EPC in mature Endothelzellen in experimentellen Modellen nicht bestätigt werden.

In Ischämie modellen wurde gezeigt, dass sich die cEPC dabei nicht in die Gefäßwand integrieren, sondern sich paravaskulär oder nur oberflächlich ansiedeln und ihre Effekte eher über parakrine Mechanismen induzieren. Es wurde nachgewiesen, dass sie verstärkt Wachstumsfaktoren wie VEGF, Insulin-like growth factor (IGF)-1, Stromal derived factor (SDF)-1 sowie Chemokine und Zytokine ins Blut sezernieren und so eine proangiogene Umgebung schaffen. Dadurch sollen sie die bereits angesiedelten Endothel- und andere Zellgruppen zur Proliferation anregen [19,20].

Ausgehend von Angiogenesestudien wurden kürzlich erste Ergebnisse über die mögliche Bedeutung der in die Adhäsion an der endothelialen Matrix involvierten EPC-Oberflächenmoleküle $\alpha 4$ - oder $\alpha 5$ -Integrine veröffentlicht. Am Modell der LPS-infizierten septischen Mäuse mit Lungenschädigung wurde gezeigt, dass 80-95% der injizierten EPC innerhalb von 20 min im geschädigten Lungengewebe zu finden waren, deren Konzentration über die nächsten 24 h aber bereits um 40% abnahm [21]. Dies könnte auch die Ergebnisse unserer Untersuchungen erklären, dass EPC bei einem isolierten ARDS durch eine einmalige LPS-Injektion nur in der akuten Phase bis 48 Stunden signifikante Effekte erzielten und die Studiengruppen sich danach nicht mehr voneinander unterschieden. In der oben genannten Arbeit von Warry et al. konnte

auch wieder gezeigt werden, dass durch Applikation exogener EPC die Gefäßschädigung, Ödembildung und Mortalität nach LPS-Inflammation reduziert werden und für die Vermittlung dieser Effekte die Adhäsion der EPC im Gewebe notwendig ist. Eine Blockade der Integrine und damit der Adhäsionsfähigkeit führte zur Aufhebung der therapeutischen Effekte der EPC.

Die Charakterisierung und Isolierung der EPC erfolgte über das Vorhandensein des transmembranen Glykoproteins CD133, das als Oberflächenantigen auf humanen endothelialen Progenitorzellen, jedoch auch auf humanen Hämangioblasten exprimiert wird [22,23,24]. Anders als der hämatopoetische Progenitormarker CD34 wird CD133 nicht auf muren Endothelzellen exprimiert und Subpopulationen von CD34⁺-Zellen, die auch CD133 exprimieren, haben eine hohe proliferative Kapazität und führen in der Zellkultur zur Bildung endothelialer Kolonien. Es wird aus Tiermodellstudien berichtet, dass zirkulierende CD133⁺ endotheliale Progenitorzellen an der Neoangiogenese nach Gewebischämie und an der Regeneration des geschädigten Organs beteiligt sind [25,26]. Die Funktion des CD133-Antigens ist wie die des CD34-Antigens nicht abschließend geklärt. Von der Molekülstruktur ausgehend könnte es sich um einen Wachstumsfaktorrezeptor handeln, ein Ligand wurde aber bisher noch nicht identifiziert. Durch die begrenzte Lokalisierung der CD133-Expression auf zytoplasmatischen Ausstülpungen wird auch eine Rolle in der Organisation der Membran und/oder interzellularen Interaktion postuliert [27,28].

Die Erhöhung der EPC-Konzentration als therapeutische Option bei schwerer Entzündung kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen: Die erste Möglichkeit ist die Steigerung der endogenen Mobilisation der EPC aus dem Knochenmark mit Hilfe von Wachstumsfaktoren wie VEGF oder GM-CSF. Auf diesem Weg konnte allerdings bisher nur bei einer kardiologischen Studie ein Effekt dokumentiert werden, und eine eigene Versuchsreihe in unserem LPS-induzierten isolierten ARDS-Rattenmodell ist ge-

rade in Bearbeitung. Die exogene Applikation der EPC als zweite und in dieser Studie durchgeführte Möglichkeit scheint signifikante Effekte im Inflammasmodell zu bewirken, hat aber den Nachteil der notwendigen vorherigen EPC-Gewinnung. Zusätzlich muss die Therapie lokaler Gefäßschäden mit direkter „Vor-Ort-Applikation“ von einer allgemeinen mikrovaskulären Schädigung mit peripherer EPC-Gabe unterschieden werden. Die etablierten Quellen der Zellgewinnung für die Therapie mit endothelialen Progenitorzellen sind heute das Knochenmark und das zirkulierende Blut.

Schlussfolgerung

EPC scheinen bei einer Endotoxin-induzierten pulmonal-endothelialen Barrieredysfunktion Reparaturmechanismen zu initiieren, die dazu führen, die gesteigerte Permeabilität und Ödembildung zu reduzieren, die Oxygenierung zu verbessern und damit die Mortalität zu senken. Weiterhin werden proinflammatorische Prozesse inhibiert und der Gasaustausch verbessert. Zukünftige Studien müssen zeigen, welche Mechanismen diesen reparativen Prozessen zugrunde liegen, damit EPC möglicherweise als innovative neue Therapieoption beim ARDS oder der Sepsis eine Rolle spielen können.

Literatur

1. Ashara T, Murohara T, Sullivan A, Vilver M, van der Zee R, Li T, et al: Isolation of putative progenitor cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-67
2. Kalka C, Iwaguro H, Masudo H: Generation of differentiated endothelial cells from mononuclear cells of umbilical cord blood. *Circulation* 1999;200:1-749
3. Ahn JB, Rha SY, Shin SJ, Jeung HC, Kim TS, Zhang X, et al: Circulating endothelial progenitor cells (EPC) for tumor vasculogenesis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2010;288:124-32.
4. Rafat N, Hanusch Ch, Brinkoetter P, et al: Increased circulating endothelial progenitor cells in septic patients: correlation with survival. *Crit Care Med* 2007;35:1677-84

Original Articles

Intensive Care Medicine

5. Zhao YD, Ohkawara H, Vogel SM, Malik AB, Zhao YY: Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Prevent Thrombin-Induced Increase in Lung Vascular Permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298:L36-L44.
6. Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi AA, Rojas M, Brigham KL, Moss M: Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:854-60
7. Huang H, Zhang Z, Qu Y: Change in number of circulating endothelial progenitor cells and its significance in septic rats. *Zhonggou Wei Zhong Bing Ji* 2011;23:72-76
8. Chen-Fu L, Jun-Neng R, Chou-Hwei L, et al: Transplantation of endothelial progenitor cells improves pulmonary endothelial function and gas exchange in rabbits with Endotoxin-induced acute lung injury. *Anesth Analg* 2011;112:620-27
9. Gao X, Chen W, Liang, et al: Autotransplantation of circulating endothelial progenitor cells protects against LPS-induced lung injury in rabbit. *Int Immunopharmacol* 2011;31:232-34
10. Mao M, Wang SN, LvXJ, et al: Intravenous delivery of bone-marrow-derived endothelial progenitor cells improve survival and attenuates LPS-induced lung injury in rats. *Shock* 2010;43:196-204
11. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al: Transplantation of Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cells for Therapeutic Neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3422-427
12. Sala E, Villena C, Balaguer C, Ríos A, Fernández-Palomeque C, Cosío BG, et al: Abnormal levels of circulating endothelial progenitor cells during exacerbations of COPD. *Lung* 2010;188:331-8
13. Takahashi T, Suzuki S, Kubo H, Yamaya M, Kurosawa S, Kato M: Impaired endothelial progenitor cell mobilization and colony-forming capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology* 2011;16:680-87.
14. Lam CF, Liu YC, Hsu JK, Yeh PA, Su TY, Huang CC, et al: Autologous transplantation of endothelial progenitor cells attenuates acute lung injury in rabbits. *Anesthesiology* 2008;108:392-401
15. Lam CF, Roan JN, Lee CH, Chang PJ, Huang CC, Liu YC, et al: Transplantation of Endothelial Progenitor Cells Improves Pulmonary Endothelial Function and Gas Exchange in Rabbits With Endotoxin-Induced Acute Lung Injury. *Anesth Analg* 2011;112(3):620-7
16. Rehmann J, Li J, Orschell CM, March KL: Peripheral blood „endothelial progenitor cells“ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circ* 2003;107:1164-69
17. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med* 2004;255: 538-61
18. Kähler CM, Wechselberger J, Hilbe W, Gschwendtner A, Colleselli D, Niederregger H, et al: Peripheral infusion of rat bone marrow derived endothelial progenitor cells leads to homing in acute lung injury. *Respir Res* 2007;8:50
19. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinkel R, Helisch A, Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into adult growing vasculature. *Circ Res* 2004;94:230-38
20. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, et al: Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:733-52
21. Warry KK, Vogel SM, Garrean S, Zhao YD, Malik AB: Requirement of alpha(4) beta(1) and alpha(5)beta(1) integrin expression in bone-marrow-derived progenitor cells in preventing endotoxin-induced lung vascular injury and edema in mice. *Stem Cells* 2009;27:3112-20
22. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al: Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95:952-58
23. Gehling UM, Willems M, Schlagner K, Benndorf RA, Dandri M, Petersen J, et al: Mobilization of hematopoietic progenitor cells in patients with liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology: WJG* 2010;16:217-24
24. Loges S, Fehse B, Brockmann MA, Lamszus K, Butzal M, Guckenbiehl M, et al: Identification of the adult human hemangioblast. *Stem Cells Development* 2004;13:229-42
25. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, et al: Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. (Full) *Circulation Research* 2001;88:167-74
26. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrowderived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Med* 2007;7:430-6
27. Corbeil D, Röper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB: Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2001;2:82-91
28. Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J: AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *J Biol Chem* 2002;277:20711-6.

**Korrespondenz-
adresse****Prof. Dr. med.
Grietje Beck**

Klinik für Anästhesiologie, Intensiv-
medizin und Schmerztherapie HSK,
Dr.-Horst-Schmidt-Kliniken GmbH
Klinikum der Landeshauptstadt
Wiesbaden

Ludwig-Erhard-Straße 100
65199 Wiesbaden, Deutschland

Tel.: 0611 432176

Fax: 0611 432521

E-Mail:

grietje.beck@hsk-wiesbaden.de