

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des Wachstumsfaktors PDGF sowie der koloniestimulierenden Faktoren MCSF und GMCSF auf die Migrationsaktivität von unbeladenen und mit modifizierten Lipoproteinen beladenen Makrophagen und glatten Muskelzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Mausperitonealmakrophagen und glatte Muskelzellen vom Rind und vom Schwein für 24 h mit acLDL und oxLDL beladen. Für die Migrations-Assays wurden *in vitro* modifizierte 48-Well Boydenkammern eingesetzt. Darin wurden die unbeladenen und beladenen Zellen mit den chemoaktiven Faktoren inkubiert. Nach einer definierten Zeit wurden die durch einen Polykarbonatfilter migrierten Zellen fixiert, gefärbt und mit einem Netzmikrometer lichtmikroskopisch ausgezählt.

Die Migrationsstudien in der Boydenkammer ergaben eine ähnliche Migrationsaktivität der Schaumzellen im Vergleich zu den unbeladenen Kontrollzellen. Dieses Ergebnis wurde ohne einen eingesetzten chemoattraktiven Stoff in den Kontrollversuchen erzielt.

Durch Checkerboard-Analysen wurde ermittelt, ob die eingesetzten Faktoren rein chemotaktisch oder auch chemokinetisch auf die Zellen wirken.

Der Wachstumsfaktor PDGF erzeugte nur eine chemotaktische Wirkung auf glatte Muskelzellen und Makrophagen. Mit steigender PDGF-Konzentration nahm auch die Anzahl der migrierten glatten Muskelzellen zu. Dabei ließ sich die Migrationsaktivität glatter Muskelzellen vom Rind und vom Schwein vergleichen. Die beladenen glatten Muskelzellen migrierten nach PDGF-Einsatz signifikant stärker als die unbeladenen Vergleichszellen. PDGF zeigte eine deutlich stärkere Wirkung auf die Migrationsaktivität von glatten Muskelzellen als auf die von Makrophagen. Während die Anzahl der migrierten Makrophagen durch PDGF um 50 % erhöht wurde, konnte die Migration der glatten Muskelzellen auf über 200 % gesteigert werden.

GMCSF löst bei glatten Muskelzellen eine reine Chemotaxis aus. In den Chemotaxis-Assays erzielte GMCSF in einem engen Konzentrationsbereich von 0,05-0,1 ng/ml eine Erhöhung der Migrationsaktivität von glatten Muskelzellen. Höhere GMCSF-Konzentrationen zeigten keinen Effekt. Bei den glatten Muskelzellen migrierten gleichfalls mehr beladene Zellen als un-

beladene. Nur auf mit oxLDL beladene Zellen vom Schwein hatte GMCSF keinen chemoattraktiven Einfluß. GMCSF bewirkte bei Makrophagen einen nur schwachen chemotaktischen und chemokinetischen Einfluß.

Der Faktor MCSF löste bei glatten Muskelzellen und Makrophagen eine reine Chemotaxis aus. Bei allen durchgeführten Migrationsstudien zeigte die Migrationsaktivität der Zellen den Verlauf einer Sättigungskurve. Die maximale Anzahl der migrierten Zellen wurde bei einer MCSF-Konzentration von 0,255 ng/ml erzielt. In diesem Fall migrierten die beladenen glatten Muskelzellen in einer signifikant größeren Anzahl als die unbeladenen. Auf die Migration von Makrophagen zeigte MCSF nur einen geringen Einfluß.

Auf der Grundlage der Diskussion der erzielten Ergebnisse läßt sich abschließend feststellen, daß zur genauen Klärung der Zusammenhänge der Einflüsse chemoattraktiver Stoffe auf die Migrationsaktivität beladener und unbeladener Zellen im Rahmen der Atherosklerose weiterführende Untersuchungen erforderlich sind.

6. Summary

Dorothee Gabriel

Induction of macrophage and smooth muscle cell migration by growth factors

In this study the effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and platelet-derived growth factor (PDGF) on the migration of normal and lipid-laden mouse peritoneal macrophages and of bovine and porcine smooth muscle cells were tested. After induction with PDGF for 24 h, smooth muscle cells and macrophages were incubated with acetylated low density lipoprotein (acLDL) and oxidized low density lipoprotein (oxLDL) for 24 h. Migration of cells was measured *in vitro* using a 48-well modified Boyden chamber. Cells were incubated in the chamber with different concentrations of the cytokines in the medium. After a defined time migrated cells at the lower surface of the polycarbonate membrane were fixed and stained. The number of migrated cells was evaluated by light microscopy.

In the Boyden chamber lipid-laden cells migrated to a similar extent than unloaded cells. This result was obtained in the absence of any chemoattractive factors in control experiments.

In order to clarify whether migration of macrophages and smooth muscle cells into filters could be influenced by the presence of a gradient of the chemoattractive factors between the lower and upper compartments of the chamber, a series of checkerboard experiments was performed.

PDGF exerted pure chemotaxis in smooth muscle cells and macrophages. Maximal induction of migration occurred in the presence of a positive concentration gradient between the two compartments of the chamber. With increasing PDGF concentration the number of migrating smooth muscle cells increased. The ability of bovine smooth muscle cells to migrate was compared with that of porcine smooth muscle cells. After incubation with PDGF, lipid-laden cells migrated significantly more than unloaded cells. Furthermore PDGF exerted a clearly higher influence on the migratory ability of smooth muscle cells than of macrophages;

whereas PDGF increased the number of migrated macrophages by 50 %, migration of smooth muscle cell migration was augmented by more than 200 %.

GMCSF provoked chemotactic migration of smooth muscle cells and additional chemokinesis of macrophages. Incubation with GMCSF induced a concentration dependent increase in the migratory activity of cells with a maximum response at 0,1 ng/ml. GMCSF showed no chemotactic effect on porcine smooth muscle cells loaded with oxLDL. Moreover GMCSF stimulated migratory activity in macrophages, but the increase was weaker than in smooth muscle cells.

MCSF elicited pure chemotaxis in smooth muscle cells and macrophages. Decreasing MCSF concentrations led to increased migration of smooth muscle cells and macrophages. The lipid-laden smooth muscle cells migrated to a higher extent after MCSF incubation than unloaded cells.

The significance of these results is discussed. Further studies must be carried out to clarify the exact connection between the effects of chemoattractive factors and migratory activity of lipid-laden and unloaded cells during atherosclerosis.