

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**I. Medizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)**

**Endogene Stammzellmobilisation mittels G-CSF bei
Patienten mit akutem Myokardinfarkt**

Jasper von Wedel

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation.**

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

**Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott
2. Univ.-Prof. Dr. St. Massberg**

**Die Dissertation wurde am 17.12.2010 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für
Medizin am 28.09.2011 angenommen.**

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	5
2. Einleitung	7
2.1. Allgemeines	7
2.2. Ischämische Herzerkrankung	8
2.2.1. Entwicklung atherosklerotischer Plaques	8
2.2.2. Plaquedestabilisierung und Plaqueruptur	9
2.2.3. Akuter Myokardinfarkt und Rekanalisation	10
2.3. Stammzellen im akuten Myokardinfarkt	11
3. Zielsetzung der Arbeit	14
4. Material und Methoden	15
4.1. Materialien	15
4.1.1. Studienmedikation	15
4.1.2. Färbungen (Durchflußzytometrie/EPC-Kulturansatz)	15
4.2. Methoden und Protokolle	16
4.2.1. Studienablauf	16
4.2.2. Blutabnahmen	18
4.2.3. Präparation der Proben	19
4.2.3.1. Probenvorbereitung Durchflußzytometrie ..	19
4.2.3.2. Ficoll-Fällung und EPC-Kultur	19
4.2.4. Durchflußzytometrie	21
4.2.4.1. Grundlagen	21
4.2.4.2. Messung und Auswertung	22
4.2.5. Myokardszintigraphie	23
4.2.6. Magnet-Resonanz-Tomographie	23
4.2.7. Angiographie	24
4.3. Statistik	24
5. Ergebnisse	26
5.1. Patienten	26
5.2. Standardlabor und Durchflußzytometrie	27

5.3. EPC-Kultur	31
5.4. Infarktgröße (Szintigraphie)	34
5.5. Linksventrikuläre Funktion (MRT / Angiographie)	34
5.6. Re-Stenose (Angiographie)	35
6. Diskussion	37
7. Zusammenfassung	42
8. Literatur	44
9. Originalarbeit	54
10. Lebenslauf	55
11. Danksagung	57

1. Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
CD	Cluster of differentiation
DAPI	Diamidino-phenylindole dihydrochlorid
DIL	Diocetadecyl-tetramethylindo-carbocyanin perchlorat
EBM	Endothelial basal medium
EPC	Endothelial Progenitor Cell
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS®	“Fluorescence activated cell sorting“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	Granulozyten colony stimulating factor
ICD	International Classification of Diseases
JAK	Janus-Kinase
KHK	Koronare Herzerkrankung
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tc ^{99m}	Technetium-99m
VLA-4	Very late antigen-4

2. Einleitung

2.1. Allgemeines

Trotz eines scheinbar gesteigerten Bewusstseins in der Bevölkerung für Gesundheitsbelange und kardiovaskuläre Risikofaktoren, ist die koronare Herzerkrankung als eine Manifestationsform der systemischen Arteriosklerose immer noch die Haupttodesursache der westlichen Industrienationen⁵⁷. Volkswirtschaftlich betrachtet, verursacht keine andere Erkrankung mehr Kosten für die entwickelten Gesellschaften, als die KHK und ihre Folgeerkrankungen. Dabei reichen die klinischen Formen von der stummen KHK über die chronisch stabile und instabile Angina pectoris bis hin zum akuten Myokardinfarkt und plötzlichen Herztod, wobei die drei letztgenannten unter dem Begriff „Akutes Koronarsyndrom“ („Acute Coronary Syndrome“, ACS) zusammengefasst werden.

Große epidemiologische Studien, wie die Framingham Heart Study aus den USA in ihrer ersten Auflage von 1948²⁰, oder die PROCAM-Studie aus Münster von 1978⁷, haben bereits früh für die Identifizierung kardiovaskulärer Risikofaktoren gesorgt. Zu den als „nicht-beeinflussbar“ angesehenen Faktoren zählen neben Alter und Geschlecht, eine familiäre Vorbelastung bzw. genetische Disposition. Als beeinflussbar gelten Faktoren wie Rauchen, Adipositas, ein arterieller Hypertonus, Diabetes Mellitus und eine Hypercholesterinämie. Neuere Untersuchungen konnten zudem einen Zusammenhang von unspezifischen Entzündungsparametern wie C-reaktives Protein (CRP), Leukozytenzahl und Fibrinogen einerseits und spezifisch serologischen Markern viraler und bakterieller Entzündungen andererseits und koronarer Herzerkrankung zeigen.^{6, 17, 18, 40, 21, 51}

Vergleicht man die Todesursachenstatistiken von 2003 und 2007, so sind die Todesfälle aufgrund eines akuten Myokardinfarktes um fast 9% gesunken^{57, 58}. Der flächenhafte Ausbau medizinischer Zentren mit Herzkatheterlabor und damit der Möglichkeit zur akuten perkutanen Koronarintervention sind hierfür hauptverantwortlich. Auffällig beim

Betrachten dieser Zahlen ist jedoch, dass die Zahl der Todesfälle, bei denen eine „ischämische Herzerkrankung“ als Ursache angegeben wurde, sogar zunimmt.

Die sogenannte Frühmortalität nach akutem Myokardinfarkt konnte also innerhalb von 4 Jahren deutlich gesenkt werden, die Zahl derer, die an der häufig infarktbedingten Herzinsuffizienz versterben, erhöht sich im gleichen Zeitraum dagegen.

Ziel aller Reperfusionstrategien bei einem akuten Myokardinfarkt ist eine prompte und möglichst vollständige Wiederherstellung des koronaren Blutflusses, um ischämisches Myokard vor der Nekrose zu bewahren und damit die Pumpfunktion des Herzens zu erhalten¹³. Obwohl die rasche und erfolgreiche Revaskularisierung des verschlossenen Gefäßes die Frühmortalität bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt signifikant verbessern konnte (s.o.), stellt die ischämisch bedingte Herzinsuffizienz, oder auch ischämische Kardiomyopathie, als Folge des „ventricular remodeling“ auch klinisch weiterhin ein großes Problem dar⁵⁰.

2.2. Ischämische Herzerkrankung

2.2.1. Entwicklung atherosklerotischer Plaques

Bei der Bildung atherosklerotischer Plaques spielt die Modifikation von Lipoproteinen im Extrazellularraum der Gefäßintima eine große Rolle. Zunächst fördert eine lokale Hypercholesterinämie die Einlagerung von Low-Density-Lipoprotein Molekülen (LDL) in die Tunica Intima.³⁰ Von plasmatischen Antioxidantien abgespalten und durch Interaktion dieser Partikel mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix, kommt es nun zur oxidativen Modifizierung und – v. a. bei diabetischer Stoffwechsellage- zu nicht-enzymatischer Glycosierung der Lipoproteine. Durch lokale inflammatorische Prozesse kommt es über die Expression spezieller Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen dann zur vermehrten Rekrutierung von Makrophagen und anderen Leukozyten aus dem Blutstrom. Insbesondere an Verzweigungsstellen des Gefäßbaumes, an

denen aufgrund der Höhe des Druckgradienten hohe Scherkräfte und turbulente Blutströmungen auftreten, ist die Expression solcher Adhäsionsmoleküle erhöht.

Durch Phagozytose der modifizierten LDL-Moleküle durch die eingewanderten Monozyten, entstehen Anhäufungen subintimaler Schaumzellen („foam cells“), welche lichtmikroskopisch sichtbar sind und als sog. „fatty streaks“ das Stadium I der Atherosklerose markieren. Bereits im Kindesalter sind diese Veränderungen nachweisbar³.

Im Stadium II kommt es nun durch Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren von Leukozyten und Endothelzellen zur Proliferation und Migration glatter Muskelzellen aus der angrenzenden tunica media in die intima und subsequenter Produktion extrazellulärer, fibröser Matrix. Der programmierte Zelltod (Apoptose) lipidgefüllter Makrophagen führt über die Bildung kleiner extrazellulärer Fettinseln (Stadium III) zur Entstehung eines großen fettreichen Lipidkerns („lipid core“), der die glatten Muskelzellen auseinander drängt und zu einer Verdickung der Gefäßintima führt (Stadium IV). Eine kompensatorische Verbreiterung des Gefäßes nach außen führt dazu, dass der Innendurchmesser – und damit der Blutstrom- in diesem Stadium noch unbeeinträchtigt bleibt. Pectanginöse klinische Symptome, welche aus der bedarfsabhängigen Flußlimitierung resultieren, treten zu diesem Zeitpunkt noch nicht auf.

Das Stadium V ist schließlich gekennzeichnet durch die Ausbildung einer fibrinösen Bindegewebsschicht zwischen Lipidkern und Endothel, der sog. Faserkappe („fibrous cap“).

Die beschriebenen Stadien verlaufen keineswegs in einer zeitlich linearen Abhängigkeit, sondern können über viele Jahrzehnte in unterschiedlichem Tempo voranschreiten.^{19, 24, 30, 39, 52}

2.2.2. Plaquestabilisierung und Plaqueruptur

Die myokardiale Infarzierung aufgrund eines koronararteriellen Verschlusses stellt die wohl dramatischste klinische Form der Plaqueruptur dar.⁴ Pathologische Analysen haben gezeigt, dass insbesondere Plaques mit dünn ausgebildeter Faserkappe, relativ großem Lipidkern und einem hohen Anteil an Makrophagen zu Instabilität neigen.

Durch eine oberflächliche Erosion, eine Fissur, oder eine offene Ruptur, kommt es zum direkten Kontakt pro-koagulatorischer Faktoren des Blutes mit Kollagen und hoch-thrombogenem Gewebsthromboplastin („tissue factor“), welches von den Schaumzell-Makrophagen des Lipidkerns exprimiert wird. Durch Aktivierung der Gerinnungskaskade^{15, 41, 45, 62} kommt es zur Ausbildung eines Thrombus, der je nach Größe zu einem vollständigen Verschluss des Gefäßes führen kann.^{12, 35, 39, 52} Als Gegenspieler fungieren endogene antithrombotische und fibrinolytische Mechanismen der Arterienwand, die über Plasminogenaktivatoren, Proteoglykane und Prostacyclin der Ausbildung des Thrombus entgegenwirken.^{24, 39, 64}

2.2.3. Akuter Myokardinfarkt und Rekanalisation

Übersteigt das Wachstum des Thrombus das Ausmaß der endogenen thrombolytischen Faktoren, kommt es zum Verschluss des Gefäßes und - nach Überschreiten der Ischämietoleranz des Myokards von 20 bis 30 Minuten und bei nicht ausreichender Kollateralisierung- zur Nekrose des abhängigen Myokardareals, dem akuten Myokardinfarkt^{24, 27, 64}. Alle Therapie-Strategien zielen auf eine möglichst rasche Rekanalisation der verschlossenen Koronararterie und damit auf eine zügige Reperfusion des betroffenen Myokardareals ab.¹³ Dafür stehen die medikamentöse Auflösung des Thrombus (Thrombolyse) und die mechanische Aufdehnung des betroffenen Gefäßabschnitts mittels perkutaner transkoronarer Angioplastie (PTCA) und anschließende Implantation eines Stents zur Verfügung. Obwohl die rasche und erfolgreiche Revaskularisierung des verschlossenen Gefäßes die Frühmortalität bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt signifikant verbessern konnte^{57, 58}, stellt die ischämisch bedingte Herzinsuffizienz, oder auch ischämische Kardiomyopathie, als Folge des „ventricular remodeling“ auch klinisch weiterhin ein großes Problem dar.⁵⁰ Dabei hypertrophieren die zunächst noch vitalen Kardiomyozyten im Randbereich des Infarktareals, um die zugrunde gegangenen Myozyten zu ersetzen. Im weiteren Verlauf kommt es zur zunehmenden Apoptose dieser hypertrophierten Herzmuskelzellen und zum Ersatz durch nicht-kontraktilen Narbengewebe, was zur

fortschreitenden linksventrikulären Funktionseinschränkung führen kann⁵⁰.
 Das Ausmaß der Schädigung hängt von verschiedenen Faktoren ab:

- Größe des Versorgungsgebietes des betroffenen Gefäßes
- Vollständiger oder unvollständiger Verschluss
- Dauer des Verschlusses
- Ausmaß des ersetzenden Blutflusses durch Kollateralgefäße
- Sauerstoffbedarf des betroffenen Gewebes
- Adäquate Gewebepерfusion nach Rekanalisierung des Gefäßes

2.3. Stammzellen im akuten Myokardinfarkt

In verschiedenen Tierexperimenten gibt es Hinweise, dass durch Transplantation verschiedener Typen von Stamm- oder Vorläuferzellen nach akutem Myokardinfarkt eine signifikante Verbesserung der kardialen Funktion und eine Verringerung der Infarktgröße erreicht werden kann⁴⁸. Auch ist bereits bekannt, dass es bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt zu einem Anstieg der zirkulierenden CD34-positiven Vorläuferzellen im peripheren Blut kommt⁵⁶, was eine physiologische Bedeutung dieser Zellen im Infarkt denkbar macht. Zellen, mit dem Oberflächenmerkmal CD34 gehören zu den hämatopoetischen Stammzellen.

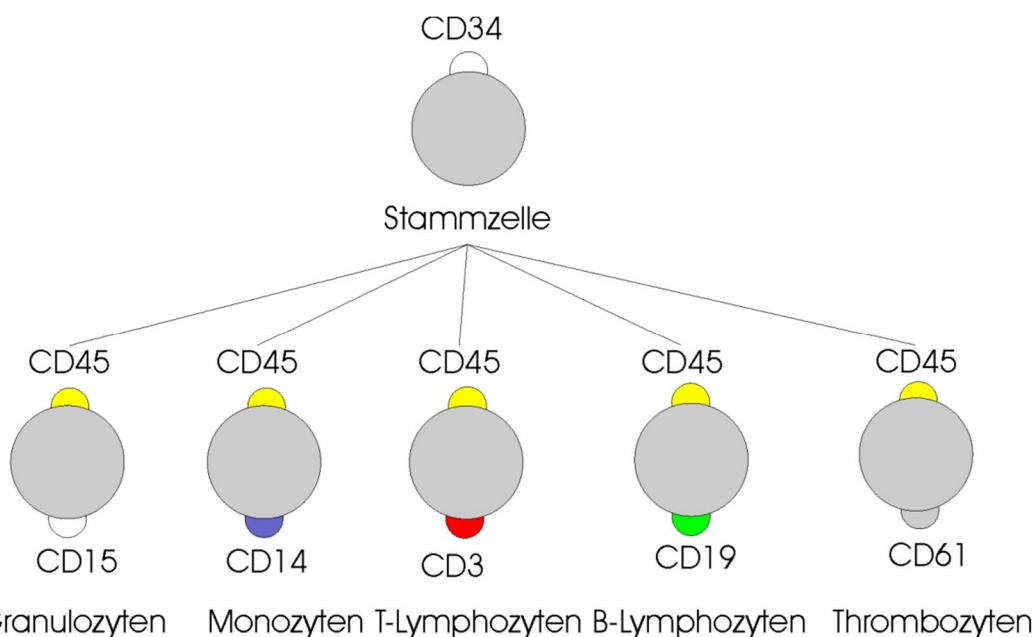


Abb. 1: Die CD34-positive Stammzelle als hämatopoetische Vorläuferzelle

Theoretisch lassen sich drei Möglichkeiten unterscheiden, wie hämatopoetische Vorläuferzellen des Remodelling beeinflussen können: Zum einen durch Ausdifferenzierung der Vorläuferzelle in funktionsfähige Kardiomyozyten. Es ist gezeigt worden, dass die peripheren CD34-positiven Zellen in vitro das Potential haben, zu Kardiomyozyten auszureifen und damit theoretisch die Möglichkeit besitzen, zugrunde gegangenes Myokardgewebe zu ersetzen⁹. Ob dies in vivo nach einem Infarkt geschieht und ob die Anzahl der so ausdifferenzierten Zellen groß genug ist, um einige 100 Millionen zugrunde gegangenen Myozyten zu ersetzen bleibt fraglich.

Als weitere Möglichkeit der Beeinflussung des Remodellings durch hämatopoetische Vorläuferzellen wäre eine Stimulierung der Neovaskularisierung im Bereich des Infarktareals denkbar. Durch eine Verbesserung der Perfusion des Gewebes um das Infarktareal könnte der weitere Untergang noch vitaler, aber hypertrophierter Herzmuskelzellen verhindert werden. Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass es nach einem akuten Infarkt zu einer vermehrten Rekrutierung von radioaktiv markierten endothelialen Vorläuferzellen im infarzierten Myokard kommt³.

Als dritte Möglichkeit wäre eine Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen im Myokard in kollagen-produzierende Fibroblasten möglich. Durch eine verstärkte Kollagenbildung entstünde eine festere Narbe, die weniger zu aneurysmatischer Aussackung neigen würde und der Reduktion der linksventrikulären Pumpfunktion entgegenwirken könnte.

Orlic et al. führten bei Mäusen mittels Gefäßligatur einen akuten Myokardinfarkt herbei und mobilisierten im Folgenden mittels G-CSF und Stammzellfaktor (SCF) einfache Knochenmarkstammzellen (BMC)⁴⁹. Vier Wochen später zeigte sich eine signifikante Reduktion in Mortalität (68%), Infarktgröße (40%) und Ventrikeldilatation (26%). Die Ausbildung neuer Myozyten mitsamt Kapillaren und Arteriolen konnte beobachtet werden. Eine ähnliche Arbeit an Kaninchen zeigte in der mit G-CSF behandelten Gruppe zudem eine Steigerung der Aktivität von Makrophagen und bestimmten Matrix Metalloproteinasen (MMP), was -im Vergleich zur

lediglich mit NaCl behandelten Gruppe- auf eine gesteigerte Absorption des nekrotischen Gewebes und reduzierte Narbenbildung hindeutete⁴⁴.

Beim Menschen zeigen erste Studien zur intrakoronaren Stammzelltransplantation nach akutem Myokardinfarkt, dass es nach Stammzelltransplantation zu keinen schwerwiegenden Nebenwirkungen kommt. Zudem deuten die Daten darauf hin, dass die linksventrikuläre Funktion und die Infarktgröße durch die intrakoronare Gabe von Progenitorzellen günstig beeinflusst werden^{8,14, 49, 60}. Eine intrakoronare Stammzelltransplantation setzt die Sammlung und Anreicherung der peripheren Stammzellen voraus, was mit hohem Aufwand verbunden ist und zu einer sehr kleinen Anzahl der später intrakoronar transplantierbaren Stammzellen führt. Um die Anzahl der Stammzellen zu erhöhen und die Zeit des möglichen „Homings“ zu verlängern, bietet sich die Methode der peripheren Stammzellmobilisierung mittels Granulozytenkolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) an. Hierbei werden, wie in der Hämatologie zur Stammzellgewinnung routinemäßig durchgeführt, die CD34-positiven Stammzellen im peripheren Blut durch 5-tägige G-CSF-Gabe auf ein Vielfaches der normalen Werte erhöht. Nach Eröffnung des Infarktgefäßes kann das Infarktareal so mit einem Vielfachen der bisher intrakoronar transplantierten Anzahl an Stammzellen über mehrere Tage hindurch perfundiert werden. Zu welchem Zeitpunkt und über welche Rezeptoren das „homing“ der Stammzellen nach Myokardinfarkt stattfindet, ist bisher nicht bekannt. Es gibt Hinweise, dass Zytokine, die für das „homing“ der Stammzellen eine Rolle spielen, im Infarkt vermehrt exprimiert werden.

3. Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen einer prospektiven, randomisierten, doppelblinden Studie sollte geprüft werden, ob bei Patienten mit Myokardinfarkt und erfolgreicher perkutaner Rekanalisation des Infarktgefäßes, die subkutane Gabe von G-CSF zu einer Verringerung der Infarktgröße im Myokard-SPECT und zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion im MRT sechs Monate nach Infarkt ereignis führt. Zudem sollten die zirkulierenden Progenitorzellen quantifiziert und die Expression von Homing-Rezeptoren analysiert werden.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Studienmedikation

Als Verum wurde der Granulozyten Koloniestimulierende Faktor (G-CSF) Filgastim (Neupogen®) der Firma Amgen GmbH, München, in einer Dosierung von 10µg/kg Körpergewicht pro Tag verwendet. G-CSF ist ein Glykoprotein, das die Entstehung funktionsfähiger neutrophiler Granulozyten und deren Freisetzung aus dem Knochenmark reguliert. Neupogen, das r-metHuG-CSF (Filgastim) enthält, führt innerhalb von 24 Stunden nach Anwendung zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut, begleitet von gering ausgeprägter Erhöhung der Anzahl von Monozyten ⁵. Als Placebo diente 0,9%iges Natriumchlorid.

4.1.2. Färbungen (Durchflußzytometrie / EPC-Kulturansatz)

Für die Durchflußzytometrie wurden folgende monoklonalen Antikörper (mAb) mit dem angegebenen Fluoreszenz-Farbstoff verwendet:

mAb	Farbstoff	Klon	Hersteller
anti-CD34	FITC	8G12	B&D Biosciences, San Jose, CA, USA
anti-CD45	APC	2D1	R&D, Minneapolis, MN, USA
anti-CD133	PE	AC133/2	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-CXCR4	FITC	12G5	R&D, Minneapolis, MN, USA

Zur Identifizierung avitaler Zellen im Rahmen der Durchflußzytometrie diente 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD) der Firma B&D Biosciences San Jose, CA, USA.

Für den Kulturansatz der endothelialen Vorläuferzellen (Endothelial Progenitor Cells, EPC) wurden folgende Färbungen verwendet:

- Acetyliertes LDL verbunden mit dem Farbstoff DIL der Firma Paesel + Lorei, Hanau.
- Lectin von *Ulex europaeus* konjugiert mit dem Farbstoff FITC der Firma Sigma, St. Louis, USA
- Diamidino-phenylindole dihydrochlorid (DAPI) der Firma Molecular Probes, Eugene, USA, zur Färbung von Nukleinsäuren.

4.2. Methoden und Protokolle

4.2.1. Studienablauf

Zwischen dem 24. Februar 2004 und dem 2. Februar 2005 wurden insgesamt 114 Patienten nach akutem transmuralen Myokardinfarkt (ST-Hebungsinfarkt) im Deutschen Herzzentrum und der 1. Medizinischen Klinik des Rechts der Isar in die Studie eingeschlossen. Die Diagnose wurde anhand der folgenden Kriterien erstellt:

- Retrosternaler Schmerz länger als 20 Minuten
- $\geq 0,1\text{mV}$ ST-Hebung in ≥ 2 Extremitätenableitungen oder $\geq 0,2\text{mV}$ in ≥ 2 nebeneinander liegenden Brustwandableitungen
- Neu aufgetretener Linksschenkelblock im Oberflächen-EKG

Alle Patienten mussten innerhalb von 12h nach Symptombeginn mittels perkutaner Koronarintervention nach lokalem Standard behandelt werden und im initialen Tc99m Sestamibi Myokardszintigramm (single photon emission computed tomography, gated SPECT) eine linksventrikuläre Infarktgröße von mindestens 5% aufweisen, um randomisiert zu werden. Allgemeine Einschlusskriterien beinhalteten ein Alter zwischen 18 und 80 Jahren und ein Körpergewicht von $\geq 50\text{kg}$. Als Ausschlusskriterien galten neben kardiogenem Schock und früheren Myokardinfarkten die in Tabelle 1 aufgeführten Zustände.

<u>Einschlusskriterien:</u>	<u>Ausschlusskriterien:</u>
<ul style="list-style-type: none"> - Alter zwischen 8 und 80 Jahren - ≥ 50kg Körpergewicht - Schriftliche Einwilligung des Patienten - Akuter Myokardinfarkt mit typischen Brustschmerzen ≥ 20min. Dauer - Im EKG ST-Hebungen $\geq 0,2$mV in zwei benachbarten Brustwandableitungen oder ST-Hebungen $\geq 0,1$mV in zwei Extremitätenableitungen - Aufnahme innerhalb der ersten 12h nach Symptombeginn - Erfolgreiche Rekanalisation des Infarktgefäßes mittels PTCA und Stenting - Sestamibi-Szintigraphie am Tag 5 nach Infarkt ereignis mit einem Perfusionsdefekt von mind. 5% des linken Ventrikels 	<ul style="list-style-type: none"> - kardiogener Schock - früherer Myokardinfarkt - Kardiomyopathie - Bestehende Schwangerschaft oder Stillzeit - Autoimmunerkrankungen - Erbliche Fruktoseintoleranz - Überempfindlichkeit gegen Filgastim oder einen der Hilfsstoffe - Malignome mit einer Lebenserwartung < 1 Jahr - Hämatologische Erkrankungen - Leukozytose $> 35000/\mu\text{l}$ - Thrombopenie $< 100/\mu\text{l}$ - Anämie mit Hb < 8mg/dl - Quick $< 70\%$ oder PTT > 80sec. - GPT über das 5-fache des oberen Normwertes - Eingeschränkte Nierenfunktion mit Kreatinin $> 2,5$mg/dl

Tab. 1: Ein- und Ausschlusskriterien

Als Abbruchkriterien wurden kardiale Instabilität, maligne Herzrhythmusstörungen, eine Leukozytose $> 70.000/\mu\text{l}$, allergische Reaktionen und eine Milzruptur definiert.

Alle Patienten wurden über die Bedeutung und Ziele sowie den Ablauf der Studie informiert. Eine schriftliche Einverständniserklärung musste unterschrieben werden. Erst dann erfolgte die Randomisierung zu einer der 2 Gruppen Verum (G-CSF) bzw. Placebo mittels versiegelter Umschläge. Diese enthielten eine computergenerierte zufällige

Buchstaben-Zahlen-Sequenz, die nur von Seiten der Krankenhausapotheken der entsprechenden Gruppe zugeordnet werden konnte. Hier erfolgte die Vorbereitung der individuellen Studienmedikation entweder als Verum (G-CSF) oder Placebo (NaCl 0,9%) in nicht unterscheidbaren Einmalspritzen.

Vom 6. bis 12. Tag nach Infarkt erhielten die Patienten die Studienmedikation (s.o.) einmal täglich als subkutane Injektion; dieses Schema ist identisch mit dem, welches zur Stammzellmobilisierung gesunder Knochenmarkspender in der Hämatologie angewandt wird. An Tag 1, 3 und 5 der G-CSF/Placebo-Verabreichung wurden 30ml peripher venöses Blut entnommen, um die Zahl der CD 34+ Zellen zu bestimmen und um den Einfluss von G-CSF auf inflammatorische, genregulatorische und prokoagulatorische Eigenschaften zu analysieren.

6 Monate nach Entlassung wurden alle Patienten zur Nachuntersuchung (Follow-up) einbestellt. Im Rahmen dieses stationären Aufenthaltes wurden Re-Koronarangiographie, Magnetresonanztomographie, SPECT und eine Blutentnahme im Rahmen des Studienprotokolls durchgeführt. Abbildung 2 skizziert den zeitlichen Studienablauf.

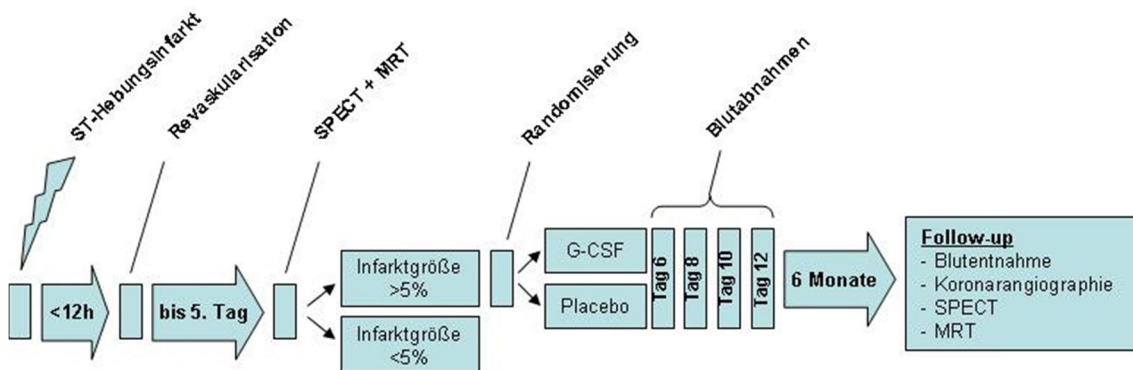


Abb. 2: Allgemeiner Studienablauf

4.2.2. Blutabnahmen

Die bei Aufnahme, an Tag 6, 8, 10, 12 nach Infarkt und im Rahmen der Follow-up Untersuchung peripher-venös entnommenen Blutproben, wurden in den Laboren der klinischen Chemie der beiden beteiligten Krankenhäuser auf Kreatinkinase (CK), sein herzspezifisches Isoenzym (CK-MB), alkalische Phosphatase (AP), C-reaktives Protein (CRP) und

Differentialblutbild analysiert. An den Tagen 6, 8, 10 und 12 wurde zusätzlich ein heparinisieretes Röhrchen (0,5ml) für die Durchflußzytometrie entnommen.

4.2.3. Präparation der Proben

4.2.3.1. Probenvorbereitung Durchflußzytometrie

Je 50µl des heparinisierten Vollblutes wurden mit 5µl des zu untersuchenden spezifischen Antikörpers (CD34, CXCR4, CD11a, CD49d) und einer Mischung aus 5µl AC133 PE, 2,5µl 7-AAD und 1,25µl CD45 APC für 20 Minuten auf Eis bei Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss wurden die Erythrozyten mit 500µl Lyse-Reagenz (Coulter Electronics, Krefeld) für 10 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit lysiert. Nach Zugabe von 2ml PBS („phosphate buffered saline“) wurden die Proben für 5 Minuten bei 1700U/min. zentrifugiert und anschließend der Überstand abgehoben. Bis zur Durchflußzytometriemessung wurde das Pellet nun mit 300µl 1%iger PFA-Lösung (Paraformaldehyd, Sigma Chemical Co.) versetzt und für maximal 24h bei 4°C und in Aluminiumfolie vor Licht geschützt aufbewahrt.

4.2.3.2. Ficollfällung und EPC-Kultur

Zur Extraktion mononukleärer Zellen aus der Vollblutprobe wurde eine Fällung mittels Ficoll-Plaques der Firma Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Unter sterilen Bedingungen wurden 10ml Ficoll-Lösung mit 5-6ml EDTA-Blut überschichtet und anschließend ohne Bremse für ca. 20 Minuten bei 1900U/min. zentrifugiert. Anschließend zeigte sich die in Abb. 3 dargestellte Schichtung.

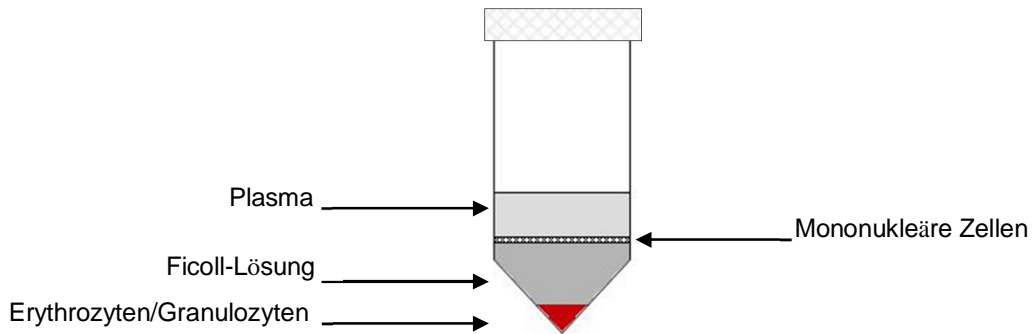


Abb. 3: Ficoll-Fällung nach dem ersten Zentrifugieren

Die Schicht zwischen Ficoll-Lösung und Plasma, welche die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) beinhaltet, wurde nun vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgesaugt und in ein neues Falcon-Tube überführt. Nach Auffüllung mit PBS wurde erneut zentrifugiert (10 Minuten bei 1700U/min. mit Bremse), der Überstand abgehoben, das Pellet aufgeschüttelt, noch einmal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde nach Abheben des Überstandes mit EBM-2-Medium aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und das entstandene Pellet mit 600-800µl Medium aufgewirbelt. Aus 50µl dieser Zellsuspension wurde nun die Zellzahl mittels eines automatisierten Zählgerätes der Firma Coulter ermittelt und anschließend hieraus die erforderliche Menge der Zellaufschwämmung pro Cover-Slide errechnet. Die benutzten Kulturkammern der Firma B&D (Falcon Biocoat Cultureslides) waren mit Kollagen Typ 1 beschichtet. Nach 3-5 Tagen im Brutschrank folgten die Färbungen für die Lichtmikroskopie. Das Medium wurde aus der Kulturkammer abgehoben und ein erster Färbeschritt mit 540µl EBM-2-Medium + 60µl Dil-ac-LDL durchgeführt. Nach 3h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium erneut abgehoben, vorsichtig 2x mit PBS gewaschen und mit 1% PFA fixiert. Im zweiten Färbeschritt wurden 980µl PBS + 20µl Ulex-Lectin in die Kammer gegeben und 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde für die Kernfärbung ca. 6 Sekunden mit 1:3000 verdünntem

Dapi gegengefärbt und der Objektträger anschließend an der Luft getrocknet. Nach Bedeckung mit Mouting-Medium wurden vier Ausschnitte des Objektträgers mittels Fluoreszenzmikroskop bei 40facher Vergrößerung aufgenommen und anschließend alle kernhaltigen Zellen, die Ulex-Lectin positiven, die dil-acLDL positiven sowie die doppelt-positiven (also ulexlectin+/dil-acLDL+) ausgezählt.

4.2.4. Durchflußzytometrie

4.2.4.1. Grundlagen

Die nach oben angegebenen Schema entnommenen und wie unter 4.2.3.1 beschrieben präparierten Blutproben wurden mittels Durchflußzytometrie analysiert. In diesem Verfahren (basierend auf direkter Immunfluoreszenz) wird ein mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierter, spezifischer Antikörper mit den Blutzellen inkubiert. Der Antikörper bindet an ein oberflächenständiges Zielmolekül (Antigen) der Zelle und kann dann nach Lyse der eigentlichen Zelle und nach mehreren Waschschrinen mittels Laserlicht detektiert werden. Die Verteilung des Farbstoffes lässt somit Rückschlüsse auf die Verteilung des zu untersuchenden Merkmals der ursprünglichen Zellsuspension zu.

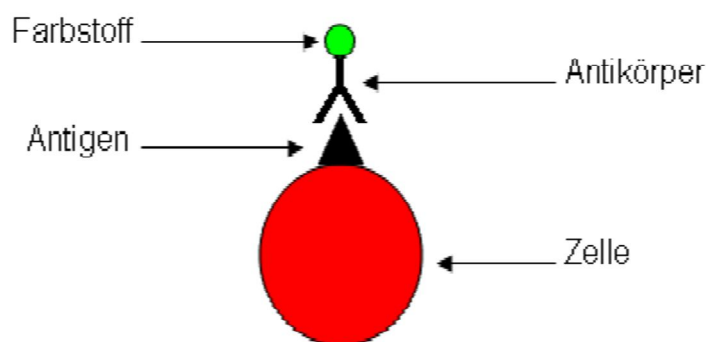


Abb. 4: Prinzip der direkten Immunfluoreszenz

Mit Farbstoff markierter Antikörper bindet an Oberflächenmolekül einer Zelle

Eine weitere Charakterisierungsmöglichkeit der Zellen bietet die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserlichtes (Forward-/Sideward-Scatter), die auf Größe und Dichte der Zellen schließen lässt.

Durch die Kombination dieser Informationen (Oberflächenbeschaffenheit & morphologische Eigenschaften) lassen sich die untersuchten Zellen typisieren und mithilfe einer elektronischen Datenverarbeitungssoftware entsprechend ordnen.

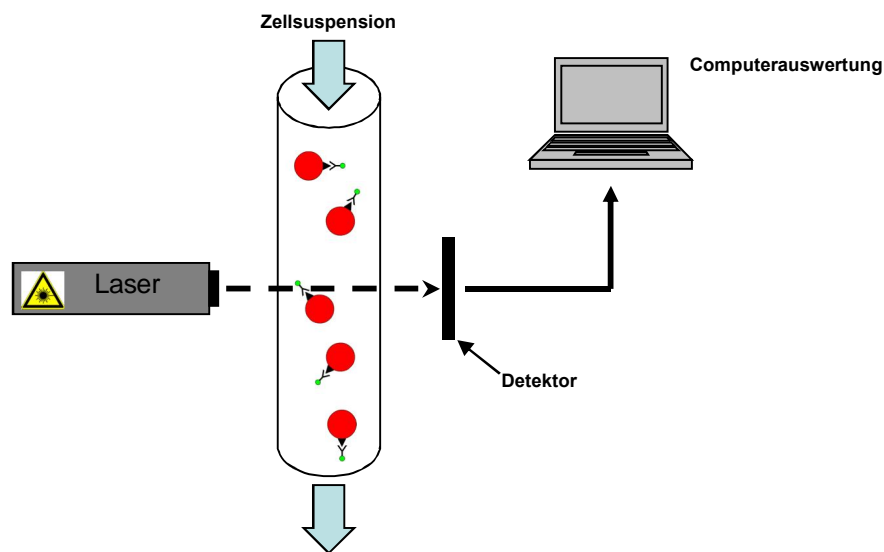


Abb. 5: Prinzip der Durchflußzytometrie.

Der Farbstoff in der Zellsuspension wird von einem Laser detektiert und dessen Verteilungsmuster mittels einer Software auf einem Computer dargestellt.

4.2.4.2. Messung und Auswertung

Für die Analyse der Proben wurden mindestens 100.000 Zellen mit einem 15mW 488nm Argon-Ionen-Laser in einem FACScalibur-Durchflußzytometer der Firma Becton & Dickinson (Mountain View, CA, USA) gemessen. Die Fluoreszenzen der FITC-, PE- und APC-markierten Antikörper wurden bei Wellenlängen von 520nm, 585nm bzw. 650nm auf einer logarithmischen Skala von 1 bis 1026 Kanälen gemessen. Zur Datenanalyse verwendeten wir die Software Cellquest (Becton & Dickinson) auf einem Macintosh-Computer.

Die Zellpopulation der hämatopoetischen Stammzellen wurde durch das Eingrenzen (Gating) auf die CD34/CD45-positiven Zellen und anhand des typischen Forward- und Sideward-Scatters (FSC und SSC) identifiziert. Die absolute Anzahl CD34-positiver Zellen pro Mikroliter Blut wurde anhand der absoluten Zahl CD45-positiver Zellen (unter Verwendung von TrueCount beads, ebenfalls B&D) und dem gemessenen prozentualen Anteil CD34-positiver Zellen errechnet.

4.2.5. Myokardszintigraphie

Zur Bestimmung der Infarktgröße diente eine unter Ruhebedingungen durchgeführte Technetium-99m Einzel-Photonen-Emissions-Tomographie (SPECT) vor Einschluss und im Rahmen des Follow-ups nach 4-6 Monaten. Eine detaillierte Beschreibung dieser Methode zur Messung der linksventrikulären Infarktgröße ist in der Literatur bereits hinlänglich erfolgt^{32, 53, 54} und soll hier nicht genauer dargelegt werden. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte zentral und ohne Kenntnis des Befunders bezüglich der Studienmedikation.

4.2.6. Magnet-Resonanz-Tomographie

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) wurde mittels einer Magnet-Resonanz-Tomographie bei Studieneinschluss und im Rahmen des Follow-ups mit einem 1,5 Tesla Gerät (Siemens Sonata, Erlangen), ausgerüstet mit einer Herz-Phasen gesteuerten Oberflächenspule, durchgeführt. Alle Aufnahmen erfolgten EKG-getriggert und in wiederholter Inspirationshaltung des Patienten. Zur Darstellung des gesamten linksventrikulären Pumpzyklus (Cine-Modus) wurden zusammenhängende Scheiben der kurzen Achse mit einer Schichtdicke von 8mm mittels graduierter Echo-MR-Sequenzen zusammengeführt. Die Bestimmung der LVEF erfolgte dann durch Umfahrung der linksventrikulären Wände in den einzelnen cine-Bildern der kurzen Achse durch den Untersucher. Die Differenz der Volumina zwischen Endsystole und Enddiastole, dividiert durch das enddiastolische Volumen, ergab die

Ejektionsfraktion. Die gesamte Auswertung erfolgte zentral und ohne Wissen des Untersuchers über die eingesetzte Studienmedikation.

4.2.7. Angiographie

Die Durchführung der Koronarangiographien und Ventrikulographien erfolgte mittels nicht-ionischem Kontrastmittel (Imeron[®]) der Firma Altana. Die Auswertungen der Kontrolluntersuchungen 4-6 Monate nach Studieneinschluss wurden zentral von Untersuchern bewertet, die über die Zuordnung des jeweiligen Patienten zur Placebo- oder Verum-Gruppe nicht informiert waren. Zur quantitativen Auswertung kam ein automatisiertes Edge-Detection System der Firma Medis zu Einsatz (CMS Version 6.0.10.0, Medis Medical Imaging Systems, Nuenen, Niederlande). Die Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion erfolgte mittels der Flächen-Längen-Methode. Mithilfe der sog. Centerline Methode, wobei die Anzahl hypokinetischer Stränge innerhalb des betrachteten linksventrikulären Wandbereichs errechnet wurden, konnten regionale Wandbewegungsstörungen quantifiziert werden.⁵⁵ Allen koronarangiographischen Auswertungen ging eine intrakoronare Nitroglycerin-Injektion voran. Die Analyse schloss einen Bereich 5mm proximal und distal des Stent-Endes, bzw. der Stent-Enden bei mehr als einem Stent, mit ein.

4.3. Statistik

Die Berechnung der Patientenzahl (Probengröße) basierte auf den folgenden Annahmen den primären Studienendpunkt betreffend: Reduktion der linksventrikulären Infarktgröße von mindestens 6% ($\pm 10\%$) unter G-CSF gegenüber 0% unter Placebo ($\alpha=0.05$, Power=80%). Demzufolge würden 90 Patienten mit zwei vollständigen „Szintigraphie-Paaren“ (Baseline + Follow-up) benötigt werden. Die Gesamtzahl der Patienten wurde auf 114 erweitert, um etwaig fehlenden Szintigraphien Rechnung zu tragen.

Alle Analysen wurden auf der Basis des Intention-To-Treat-Prinzips durchgeführt und sämtliche Patientendaten randomisiert. Kategorische

Daten werden als absolute Zahlen oder Proportionen (%) angegeben, kontinuierliche als Mittelwert \pm Standardabweichung. Zur Darstellung von Unterschieden zwischen beiden Gruppen wurde χ^2 oder Fischer's Test für die kategorischen Daten bzw. t-Test für kontinuierliche Daten. Ein zweiseitiger p-Wert von <0.05 wurde als Indikator für statistische Signifikanz herangezogen. Für die statistischen Analysen wurde S-Plus (Insightful Corp., Seattle, USA) Version 4.5 verwendet.

5. Ergebnisse

5.1. Patienten

Insgesamt wurden 114 Patienten (90 Männer und 24 Frauen), im Alter zwischen 32 und 82 Jahren nach akutem Myokardinfarkt und erfolgreicher perkutaner Koronarintervention in die Studie eingeschlossen. Die detaillierten Daten sind in Tabelle 2 zu finden. (Werte in Klammern sind in Prozent angegeben, die restlichen in Mittelwert \pm Standardabweichung.) Es zeigte sich bezüglich der Patientencharakteristika kein Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Merkmal	G-CSF-Gruppe N=56	Placebo-Gruppe N=58	p
Alter (Jahre)	59,4 \pm 12,0	59,8 \pm 10,3	0,85
Frauen	12 (21,4)	12 (20,7)	0,92
Body mass index (kg/m ²)	27,3 \pm 3,6	27,5 \pm 4,1	0,68
Arterieller Hypertonus	31 (55,4)	41 (70,7)	0,09
Diabetes mellitus	6 (10,7)	19 (17,2)	0,32
Raucher (aktuell)	25 (44,6)	27 (46,6)	0,96
Hypercholesterinämie	23 (41,1)	24 (41,4)	0,97
Mehrgefäß-KHK	31 (55,4)	38 (65,5)	0,28
Infarkt-Lokalisation			
Anterior	30 (53,6)	28 (48,3)	
Inferior	19 (33,9)	18 (31,0)	
Herzfrequenz (min ⁻¹)	68 \pm 9	68 \pm 10	0,78
Blutdruck (mmHg)			
Systolisch	110 \pm 15	109 \pm 15	0,82
Diastolisch	66 \pm 9	66 \pm 8	0,62
Begleittherapie bei Entlassung			
β -Blocker	56 (100)	57 (98,3)	0,98
ACE-Hemmer	55 (98,2)	57 (98,3)	1,0
Statine	55 (98,2)	56 (96,6)	0,97
Nitrate	0 (0)	2 (3,4)	0,51

Tab. 2: Patientencharakteristika

Unbeschichtete (bare metal) Stents erhielten 51 von 56 Patienten der G-CSF-Gruppe (91%) und 50 von 58 Patienten der Placebo-Gruppe (86%). Bei den übrigen wurden beschichtete (drug-eluting) Stents implantiert.

Von den 56 Patienten der G-CSF Gruppe klagten 15 (27%) über Nebenwirkungen: Leichte bis moderate Knochen- und Muskelschmerzen bei 7 Patienten, Müdigkeit bei 3 Patienten, subfebrile Temperaturen und Hautausschlag bei je 2 Patienten, sowie Übelkeit bei 1 Patienten. 6 der 58 Patienten der Placebo Gruppe (10%) gaben folgende Nebenwirkungen auf die Studienmedikation an: Leichter Muskelschmerz bei 1 Patient, Müdigkeit und Kopfschmerzen bei 2 Patienten, Hautausschlag und Übelkeit bei je 1 Patient.

Während des Nachbeobachtungs-Intervalls (5-6 Monate nach Myokardinfarkt und Studienmedikation) verstarb 1 Patient (1,8%) der G-CSF Gruppe im Rahmen von Kammerflimmern 12 Tage nach Einschluss in die Studie. Ein Patient der Placebo Gruppe (1,7%) erlitt einen erneuten Myokardinfarkt.

5.2. Standardlabor und Durchflußzytometrie

Die Resultate der laborchemischen- und durchflußzytometrischen Analysen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

		Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7
CD34+ [Zellen/μl]	G-CSF		12 \pm 17	44 \pm 167	72 \pm 153	59 \pm 148
	Placebo		9 \pm 22	6 \pm 11	5 \pm 6	7 \pm 13
Leukozyten [10^9/l]	G-CSF	8 \pm 2	26 \pm 8	42 \pm 14	48 \pm 15	19 \pm 7
	Placebo	8 \pm 2	9 \pm 6	9 \pm 10	8 \pm 6	8 \pm 2
Neutrophile [%]	G-CSF		82 \pm 7	77 \pm 7	68 \pm 12	68 \pm 12
	Placebo		64 \pm 9	62 \pm 8	61 \pm 9	61 \pm 7
Lymphozyten [%]	G-CSF		8 \pm 4	8 \pm 3	9 \pm 4	13 \pm 5
	Placebo		23 \pm 8	25 \pm 7	26 \pm 7	26 \pm 6
Monozyten [%]	G-CSF		6 \pm 2	5 \pm 2	6 \pm 3	6 \pm 3
	Placebo		8 \pm 3	8 \pm 3	8 \pm 3	8 \pm 3
Thrombozyten [10^9/l]	G-CSF	256 \pm 78	262 \pm 74	281 \pm 86	287 \pm 99	237 \pm 99
	Placebo	241 \pm 59	258 \pm 70	278 \pm 85	295 \pm 78	305 \pm 98
LDH [U/l]	G-CSF	465 \pm 201	435 \pm 206	467 \pm 173	604 \pm 245	406 \pm 162
	Placebo	475 \pm 194	368 \pm 121	311 \pm 91	284 \pm 75	260 \pm 57
Alk. Phosphatase [U/l]	G-CSF	90 \pm 25	85 \pm 25	146 \pm 34	235 \pm 62	188 \pm 43
	Placebo	97 \pm 54	84 \pm 36	90 \pm 42	95 \pm 48	93 \pm 43
CRP [mg/l]	G-CSF	4.3 \pm 0.5	2.7 \pm 0.4	2.0 \pm 0.3	1.8 \pm 0.4	1.5 \pm 0.3
	Placebo	3.4 \pm 0.5	2.7 \pm 0.4	2.7 \pm 0.5	2.4 \pm 0.4	2.3 \pm 0.5

Normalwerte: Leuk $4-9 \times 10^9$ /l, Neut 50-70%, Lym 25-40%, Mon 2-8%, Thr $130-370 \times 10^9$ /l, LDH 135-370U/l, AP 60-130U/l, CRP 0-5mg/l

Tab. 3: Laborwerte im Verlauf

Zur Erinnerung: Die subkutane Behandlung mit der Studienmedikation erfolgte von Tag 1 bis 6. Dies entspricht Tag 6 bis 12 nach Myokardinfarkt.

In der G-CSF Gruppe stiegen sowohl die Leukozyten (Tab. 3 / Abb. 6) als auch die Anzahl der CD34+ / CD133+ Zellen (Abb. 7) kontinuierlich bis Tag 5 der Therapie an. Die Phase der G-CSF-Gabe ist in den Graphen jeweils als grauer Balken dargestellt. Die Patienten der G-CSF Gruppe zeigten zudem einen Anstieg von Laktatdehydrogenase (LDH) und alkalischer Phosphatase (AP). Bei den zur Placebo-Gruppe gehörenden Patienten waren die soeben beschriebenen Anstiege von Leukozyten, LDH und AP nicht zu beobachten. Für das C-reaktive Protein (CRP) und die Thrombozyten ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

WBC [$10^9/L$]

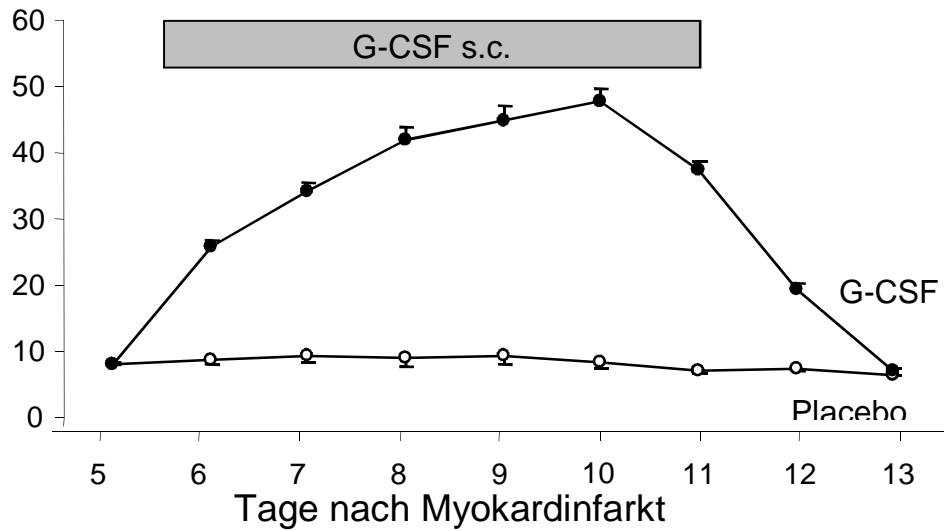


Abb. 6: Verlauf der Leukozyten in Abhängigkeit von der Zeit.

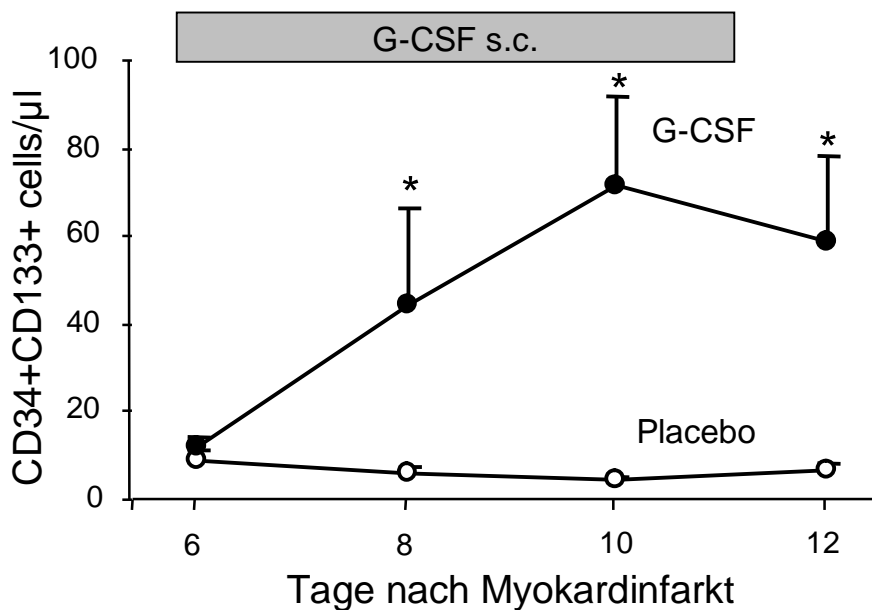


Abb. 7: Verlauf der CD34⁺/CD133⁺ Zellen/ μl

In der Durchflußzytometrie wurden neben CXCR-4 (Abb. 8) auch die Signalstärke zweier weiterer Adhäsionsmoleküle VLA-4 (Abb. 9) und LFA-1 (Abb. 10) gemessen. Alle drei Oberflächenmoleküle zeigten unter G-CSF eine signifikant geringere Signalstärke, als unter Placebo. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 8, 9 und 10 dargestellt.

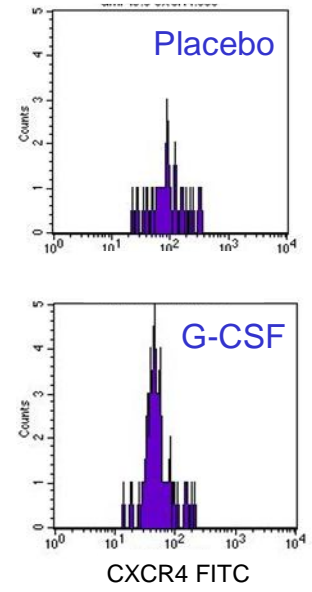
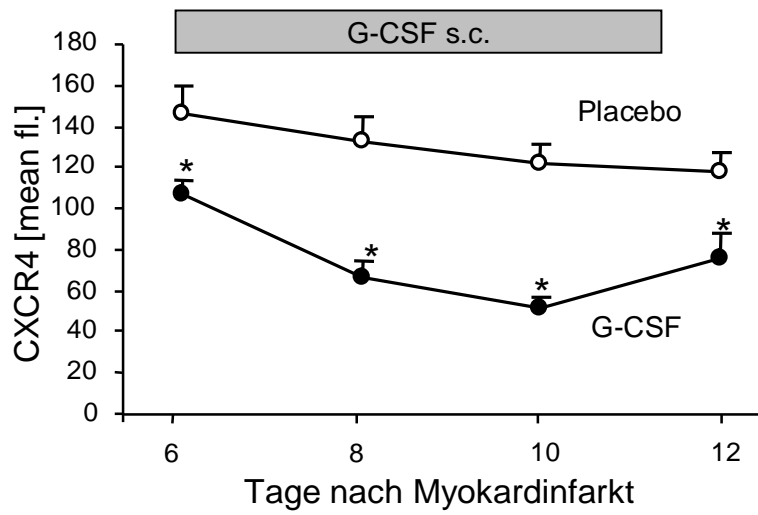


Abb. 8: Verlauf des CXCR4+ Signals

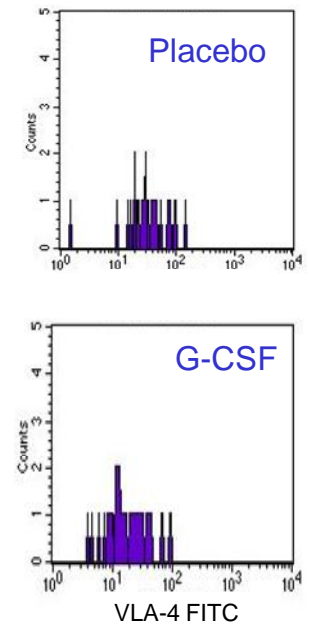
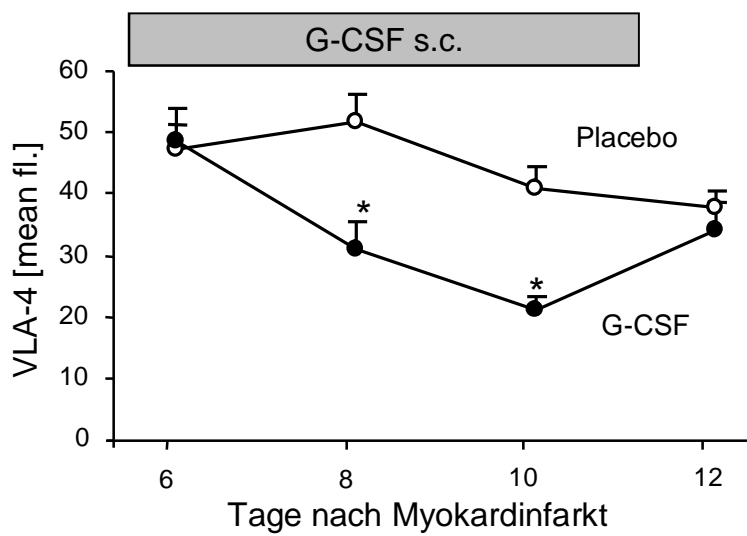


Abb. 9: Verlauf des VLA-4 Signals

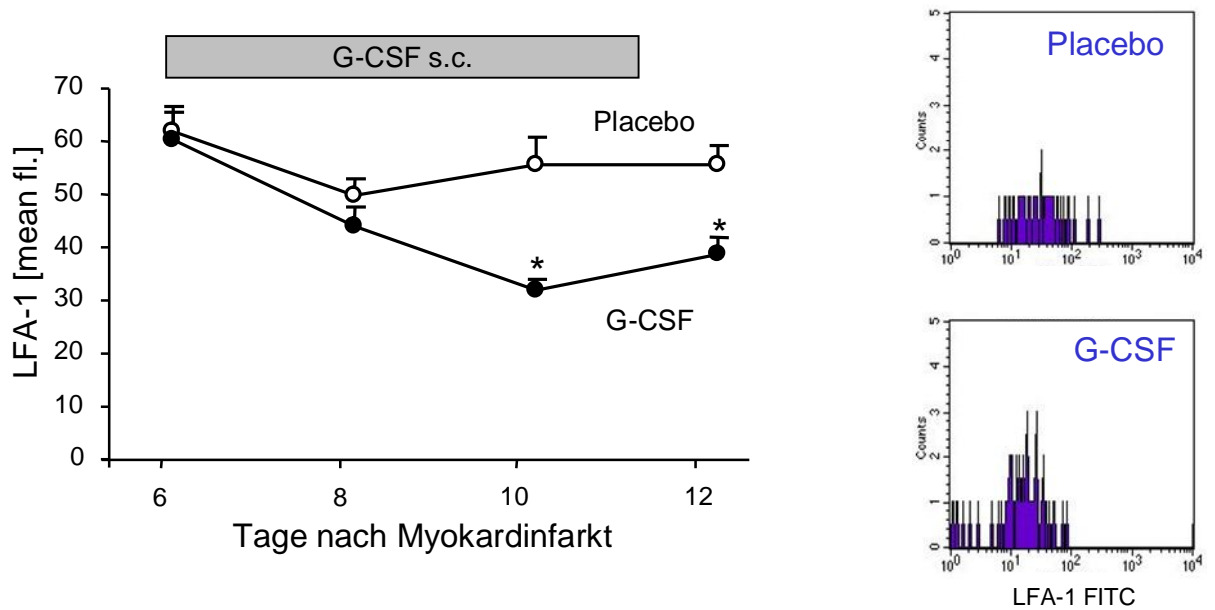


Abb. 10: Verlauf des LFA-1 Signals

5.3. EPC-Kultur

In den Abb. 11 – 13 ist beispielhaft ein Kultur-Ergebnis mit den beschriebenen Färbungen mit DAPI (blaue Kernfärbung), Ulex-Lektin (grün) und Dil-acLDL (rot) der endothelialen Vorläuferzellen dargestellt. Abb. 14 zeigt die anschließend elektronisch übereinander gelegten Färbungen. Doppelt positive Zellen erscheinen gelb.

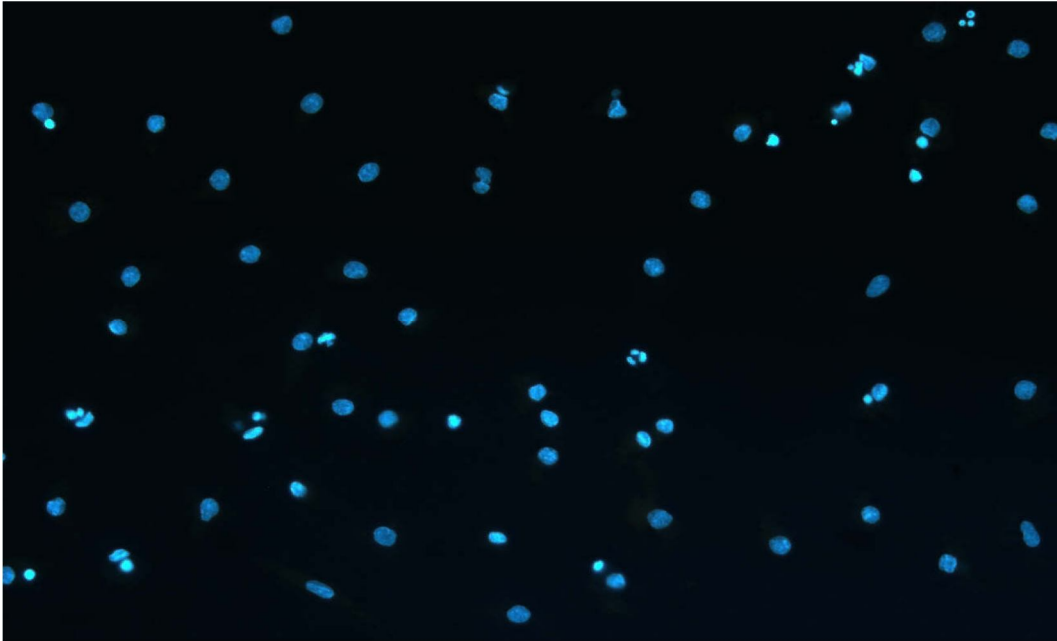


Abb. 11: Kernfärbung mit DAPI

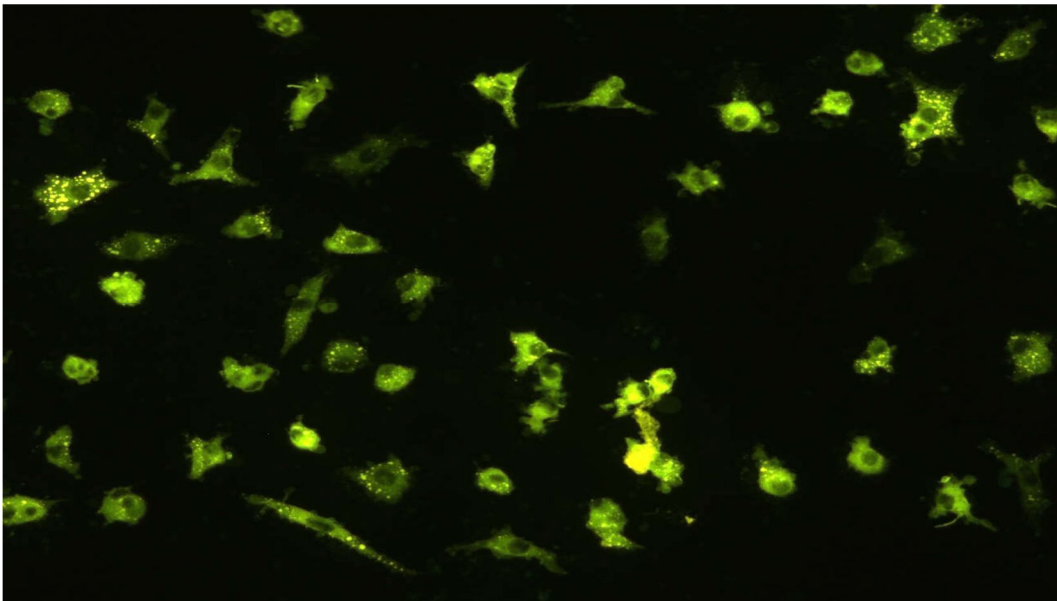


Abb. 12: Färbung mit Ulex-Lectin

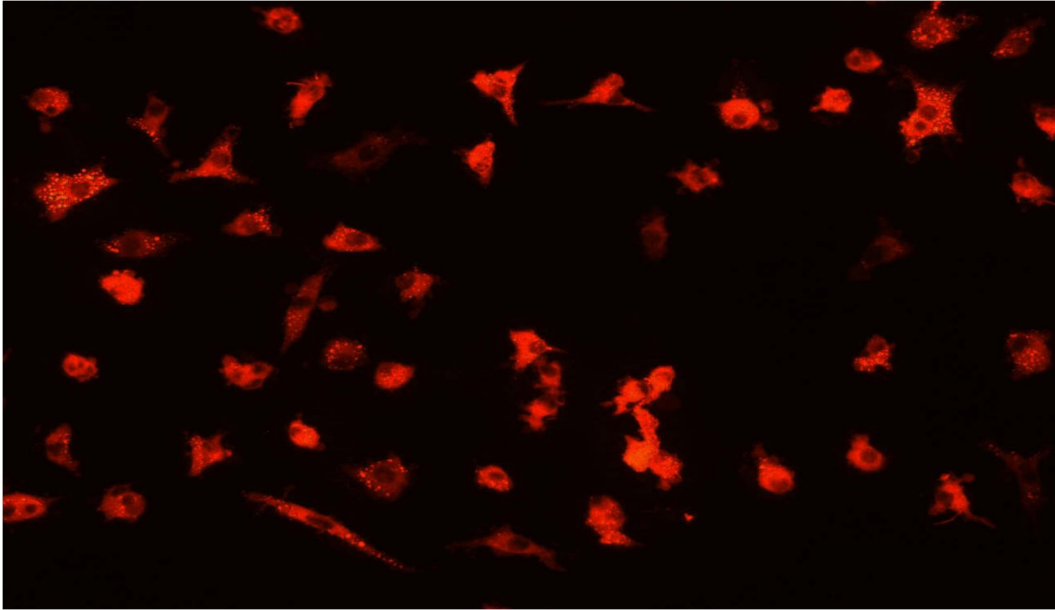


Abb. 13: Färbung mit Dil-acLDL

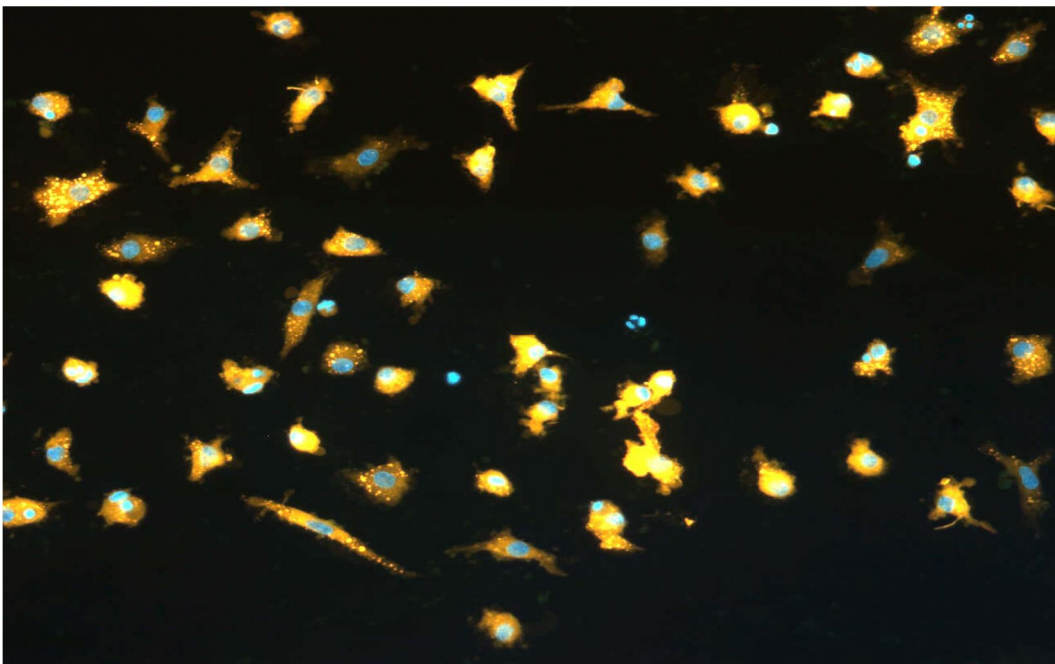


Abb. 14: Doppelt-positive Zellen (Abb 10-12, elektronisch übereinander gelegt)

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Zellzählungen, wobei die angegebenen Tage, die Zeit nach Myokardinfarkt darstellen.

	DAPI+		Lectin+		dil acLDL+		doppelt+		Anteil doppelt+ von DAPI+ [%]	
	TAG 6	TAG 10	TAG 6	TAG 10	TAG 6	TAG 10	TAG 6	TAG 10	TAG 6	TAG 10
G-CSF	71,44	69,35	46,36	37,00	44,46	38,04	44,57	37,08	69,70	65,58
Placebo	59,89	40,37	40,98	30,34	41,15	29,53	40,95	29,41	71,73	72,67

Tabelle 4: Ergebnis der Zellzählungen; Tag 6 bzw. 10 bezeichnen den Zeitpunkt nach Myokardinfarkt

Zwischen beiden Gruppen gab es bei dem Anteil doppelt positiver Zellen von allen kernhaltigen Zellen (DAPI +) keinen signifikanten Unterschied.

5.4. Infarktgröße (Szintigraphie)

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der T99m-Myokardszintigraphie bei Studieneinschluss und zum Zeitpunkt des Follow-ups. Die ermittelte Infarktgröße unterschied sich in beiden Gruppen nicht und verringerte sich in der GCSF Gruppe um $6,2 \pm 9,1\%$ und um $4,9 \pm 8,9\%$ in der Placebo Gruppe zwischen Einschluss und Follow-up ($p=0,45$).

5.5. Linksventrikuläre Funktion (MRT/Angiographie)

In Tabelle 4 sind zudem die Ergebnisse der MRT- und Angiographien bezüglich der linksventrikulären Volumina und Ejektionsfraktion bei Einschluss und Follow-up dargestellt. Paarige MR-Untersuchungen fehlten bei 7 Patienten der G-CSF-Gruppe (12,5%) und 11 Patienten der Placebo-Gruppe (19%). Dies war überwiegend auf klaustrophobische Ängste der Patienten in Bezug auf den beengenden Kernspintomographen zurückzuführen, die entweder eine Untersuchung abbrechen mussten, oder eine zweite nicht durchführen lassen wollten.

Im MR gab es zwischen beiden Gruppen keine Unterschiede bezüglich linksventrikulärer Volumina und EF. Die Verbesserung der EF zwischen Einschluss-Untersuchung und Follow-up betrug $2,8 \pm 3,7\%$ in der G-CSF-Gruppe und $2,8 \pm 3,5\%$ in der Placebo-Gruppe ($p=0,98$).

Bei 54 der 56 Patienten der G-CSF-Gruppe, sowie 55 der 58 Patienten der Placebo-Gruppe wurde eine Kontroll-Angiographie am Ende der Follow-up Periode durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede, sowohl in der regionalen als auch in der globalen linksventrikulären Funktion zwischen beiden Gruppen gezeigt werden.

5.6. Restenose

Angiographisch nachgewiesene Restenosen im Bereich des Infarktgefäßes wurden, wie in Tabelle 4 dargestellt, bei 35,2% der G-CSF-Gruppe und 30,9% der Placebo-Gruppe beobachtet ($p=0,64$). Wenn man die weitaus größere Subgruppe der Patienten, die mit unbeschichteten Stents behandelt wurden, heranzieht, ist der Unterschied noch geringer: 36,0% in der G-CSF-Gruppe versus 36,2% der Placebo-Gruppe ($p=0,99$). Eine Re-Intervention im Bereich des Infarktgefäßes war bei 16 Patienten der G-CSF-Gruppe (28,6%) und 18 Patienten der Placebo-Gruppe (31,0%) notwendig ($p=0,77$).

	G-CSF	Placebo	p
T-99m Szintigraphie, n	54	57	
LV-Infarktgröße, baseline [%]	19,1±15,3	19,1±17,6	0,99
LV-Infarktgröße, follow-up [%]	12,9±15,6	14,1±17,4	0,68
Kardio-MRT, n	49	47	
Baseline			
LV end-diastolischer Volumen-index [ml/m ²]	93,3±18,7	89,6±17,5	0,32
LV end-systolischer Volumen-index [ml/m ²]	47,6±17,1	46,9±16,1	0,84
LV-Ejektionsfraktion [%]	49,8±13,0	48,2±11,4	0,54
Follow-up			
LV end-diastolischer Volumen-index [ml/m ²]	92,5±20,5	87,7±21,9	0,28
LV end-systolischer Volumen-index [ml/m ²]	45,5±15,5	43,7±17,5	0,60
LV-Ejektionsfraktion [%]	51,8±7,7	51,2±9,0	0,74
(Koronar-)Angiographie Follow-up	54	55	
LV-Ejektionsfraktion [%]	56,6±9,6	56±11,3	0,77
Anzahl hypokinetischer Chords [n]	18,6±16,8	18,8±18,2	0,97
Restenose [n]	19(35,2)	17(30,9)	0,64

Tab. 5: Quantitative Auswertung von Szintigraphie, MRT und Angiographie. Die Daten sind als n(%) oder mean±Standardabweichung angegeben.

6. Diskussion

Die Tatsache, dass die Regeneration des Herzmuskelgewebes zunehmend als natürlicher Heilungsprozess angesehen wird, eröffnet neue Erfolgsaussichten für stammzellbasierte Therapiekonzepte.^{11, 22, 37, 42} Sowohl tierexperimentelle-, als auch früh-klinische Studien am Menschen deuten darauf hin, dass die Mobilisation von Stammzellen aus dem Knochenmark die Fähigkeit besitzen könnte, die kardiale Pumpfunktion nach akutem Myokardinfarkt zu verbessern.^{16, 66}

Klinisch wurden verschiedene Applikationsformen adulter Stammzellen untersucht. So wurde in diversen Studien eine intrakoronare Injektion CD34 positiver Zellen aus dem Blut oder Knochenmark in der Frühphase nach akutem Myokardinfarkt vorgenommen.^{8, 60, 67} Diese klein angelegten Studien, die primär als Durchführbarkeits- und Sicherheitsstudien konzipiert waren, deuteten darauf hin, dass eine CD34-Zell-basierte Therapie imstande ist, die ventrikuläre Funktion zu verbessern. Kürzlich konnte durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass eine akute Myokardnekrose eine *spontane* Mobilisation von verschiedenen CD34+ Zelltypen des Knochenmarks nach sich zieht^{38, 43, 65} und dass eine anhaltende bzw. verlängerte Mobilisation mit einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion im Verlauf einhergeht.³⁸

Unsere Erwartungen bezüglich des Effektes von G-CSF auf Infarktgröße und linksventrikuläre Funktion bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt nach erfolgreicher Revaskularisation basierte auf positiven Ergebnissen experimenteller Studien. Die G-CSF-getriggerte Mobilisation von Knochenmark-Stammzellen führte bei Mäusen mit akutem Myokardinfarkt zu einer Absenkung der infarktbezogenen Mortalität und funktionalen Erholung.^{2, 29, 33, 34, 44, 47, 49} Zusätzlich zur Fähigkeit, Knochenmark-Stammzellen zu mobilisieren, ist G-CSF in der Lage Proliferation zu induzieren und durch Aktivierung spezifischer G-CSF-Rezeptoren im Herzen die Überlebensrate zu erhöhen.²⁵ Andere experimentelle Studien konnten eine verminderte ventrikuläre Expansion in Assoziation mit

gesteigerter Expression von TGF- β und Kollagen nach Applikation von G-CSF in das infarzierte Areal zeigen.⁶¹

Die dieser Arbeit zugrunde liegende randomisierte, doppel-blinde und plazebo-kontrollierte Studie⁶⁸ beobachtete den Effekt, den durch G-CSF aus dem Knochenmark mobilisierte Stammzellen auf die myokardiale Regeneration bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt hatte. Alle Patienten mussten zuvor im Rahmen des Akutereignisses primär mittels perkutaner Koronarintervention erfolgreich behandelt worden sein. G-CSF wird heutzutage weitverbreitet in der Hämatologie/Onkologie nach Chemotherapie oder Knochenmarks-transplantation eingesetzt, um die vermehrte Ausschüttung neutrophiler Granulozyten zu induzieren. Wie auch in vorangegangenen Studien^{28, 63}, erfolgte die Kontrolle der Effektivität dieser Therapie durch die Messung signifikant erhöhter Spiegel zirkulierender Leukozyten und CD 34⁺ Zellen. Es ist zusammenzufassen, dass eine effektive Stammzell-Mobilisation nach einem akuten Herzinfarkt in dieser Studie weder zu einer verbesserten myokardialen Regeneration, noch zu einer Verringerung der Infarktgröße oder Verbesserung der linksventrikulären Funktion führte. Darüber hinaus konnte im Gegensatz zu einer anderen Studie³¹ kein erhöhtes Risiko koronarer Restenosen bei den mit G-CSF behandelten Patienten beobachtet werden. Die von ca. einem Drittel (27%) der mit G-CSF behandelten Patienten geschilderten Nebenwirkungen der Therapie deckten sich mit denen der Fachinformationen und waren von ihrem Schweregrad insgesamt als leicht einzustufen (s. S. 25). Leichte Muskel- und Knochenschmerzen, Müdigkeit, subfebrile Temperaturen und leichte Übelkeit wurden beobachtet. Bezüglich klinischer Nebenwirkungen und koronarangiographischer Kriterien konnte die Stammzellmobilisation mit G-CSF nach akutem Myokardinfarkt in dieser Studie als sicher angesehen werden.

Wie auch in vorangegangenen Studien, die den Effekt von Stammzell-Therapie auf Patienten mit akutem Myokardinfarkt untersucht haben,^{8, 31, 60, 63, 67, 63} fand die initiale Bestimmung der linksventrikulären Funktion in

der vorliegenden Studie 5 Tage nach dem Infarkt-Ereignis statt. Sowohl in der G-CSF-Gruppe, als auch in der Placebo-Gruppe konnte szintigraphisch 6 Monate nach Infarkt eine signifikant reduzierte Infarkt-Größe ermittelt werden. Gleichermaßen stieg die linksventrikuläre Auswurffraktion in beiden Gruppen an. Folglich, so zeigen diese Daten, findet die funktionale Regeneration des Herzens nach akutem Myokardinfarkt später als 5 Tage nach erfolgreicher Reperfusion und unabhängig von einer Therapie mit Stammzellen statt. Die Verbesserung der linksventrikulären Auswurffraktion lässt sich am ehesten mit der verbesserten systolischen Wandbewegung erklären, welche durch einen verringerten linksventrikulären endsystolischen Volumen-Index in beiden Gruppen herrührte. Der enddiastolische Volumen-Index des linken Ventrikels blieb jedoch unverändert. Vergleichbare Veränderungen in Ejektionsfraktion und linksventrikulärem endsystolischen Volumen wurden in früh-klinischen Studien, die den Effekt einer intrakoronaren Transplantation von G-CSF-mobilisierter Stammzellen³¹ oder direkt aus dem Knochenmark gewonnener Stammzellen^{8, 67} bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt beobachteten, nur in der Behandlungsgruppe und nicht in der Kontrollgruppe beschrieben. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, hatten Valgimigli und Kollegen eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion sowohl in der G-CSF-Gruppe, als auch in der Kontroll-Gruppe beschrieben.⁶³ Diese Verbesserung der systolischen linksventrikulären Funktion in beiden Gruppen könnte u. a. auf eine verbesserte Pharmakotherapie bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt zurückzuführen sein.

Die ausbleibende Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach Stammzell-Mobilisation könnte verschiedene Gründe haben. Es ist möglich, dass sich die Stammzellen nicht in ausreichendem Maße im infarzierten Myokard angereichert haben. Dieser, auch als „homing“ bezeichnete Prozess der Verankerung und des Anwachsens mobilisierter Stammzellen in der verletzten Region des Myokards, spiegelt einen entscheidenden Schritt in der stammzell-basierten Regeneration dieses Areals wieder.²² Eine diesbezüglich entscheidende Rolle spielt das

Chemokin Stromal-Cell-derived Factor 1 (SDF-1), obwohl es alleine nicht für die Rekrutierung von zirkulierenden Stammzellen in das Infarktareal ausreichend ist.¹ Daher scheint die gemeinschaftliche Expression verschiedener Gene die Voraussetzung für eine erfolgreiche Verankerung mobilisierter Stammzellen im Zielgewebe zu sein. SDF-1 vermittelt seine Wirkung u. a. über den Chemokin-Rezeptor CXCR-4. In der Durchflußzytometrie zeigte sich, dass die Expression dieses Rezeptors auf den CD133⁺ Stammzellen mit der Dauer der G-CSF Behandlung absank, was eine Ursache für das mutmaßlich unzureichende Homing der Stammzellen darstellen könnte. In einer Substudie der dieser Arbeit zugrunde liegenden REVIVAL-2 Studie konnte nicht nur die reduzierte Expression der Adhäsionsmoleküle LFA-1, VLA-4 und des Chemokinrezeptors CXCR-4 unter der Therapie mit G-CSF nachgewiesen werden; es zeigte sich zudem eine reduzierte Expression der CXCR-4 RNA, sowie eine verminderte mRNA-Expression des antiproliferativen Transducers of ERB (TOB), was auf ein gesteigertes proliferatives Potential der mobilisierten Vorläuferzellen schließen lässt.⁵⁹

Möglich ist auch, dass das Milieu des infarzierten Myokards zum Zeitpunkt der Stammzell-Mobilisation für eine signifikante Rekrutierung ungeeignet war. Jedoch wurde der gleiche Zeitraum -nämlich 4-6 Tage nach Infarkt- wie in jenen Studien gewählt, in denen ein positiver Effekt der Zell-basierten Therapie nachgewiesen werden konnte.⁴²

Es muss außerdem in Erwägung gezogen werden, dass die Behandlung mit G-CSF die falsche Art CD34-positiver Zellen mobilisiert hat. Die Expression des CD34-Oberflächenantigens findet sich sowohl auf hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPCs), endothelialen Vorläuferzellen (EPCs), als auch auf reifen endothelialen Zellen.³⁶ Es wird vermutet, dass hämatopoetische- und endotheliale Vorläuferzellen verschiedene Rollen bei der Gewebe-Reparatur spielen: Während EPCs Angiogenese induzieren, wird vermutet, dass HPCs die Fähigkeit besitzen, neue Kardiomyozyten auszubilden. Diese Transdifferenzierung von HPCs in Kardiomyozyten wird allerdings auch angezweifelt^{10, 46} und die Rolle der EPCs als Quelle

der für den positiven Stammzell-Effekt verantwortlichen Zytokine im infarzierten Myokard favorisiert.²⁶ G-CSF mobilisiert überwiegend HPCs.²⁸

Zusätzlich könnte die Funktionalität der durch G-CSF mobilisierten Stammzellen beeinträchtigt gewesen sein, da es sich überwiegend um unreife Zellen handelte. Diese Zellen könnten eine verminderte Fähigkeit zur Verankerung, Proliferation und Differentiation im Zielgewebe besessen haben. Im Rahmen von intrakoronarer Stammzell-Applikation konnte gezeigt werden, dass die Migrationsfähigkeit der transplantierten Zellen den entscheidenden Faktor darstellte.¹⁴

Ferner ist nicht auszuschließen, dass G-CSF an sich einen negativen Effekt auf die kardiale Regeneration nach akutem Myokardinfarkt hatte. Eine Behandlung mit G-CSF reduzierte bei Mäusen mit künstlich herbeigeführtem Myokardinfarkt allerdings die Apoptoserate über die Aktivierung des JAK/STAT Signalweges nachweislich und verbesserte so das Überleben der Kardiomyozyten.²⁵ Zudem hätte ein grundsätzlich negativer G-CSF-Effekt auf die kardiale Regeneration mit einem besseren Abschneiden der Placebo-Gruppe einhergehen müssen. Dies war jedoch nicht der Fall.

Somit ist die Frage zu stellen, ob die Rolle von Stammzellen für die Wiederherstellung ischämischen Myokards und die Erholung der linksventrikulären Funktion nach akutem Myokardinfarkt nicht überschätzt wurde. Gleiches gilt für die Auswirkung einer stammzell-basierten Therapie zur Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion nach Infarkt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Therapie mit G-CSF zur Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark keine Verbesserung der linksventrikulären Funktion bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt nach erfolgreicher mechanischer Reperfusion erbrachte.

7. Zusammenfassung

Hintergrund: Experimentelle und erste klinische Studien deuten auf eine regenerative Fähigkeit hämatopoetischer Stammzellen am Herzen nach akutem Myokardinfarkt hin. Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) induziert die Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark.

Methodik: Es wurden 114 Patienten mit akutem Myokardinfarkt nach erfolgreicher Reperfusion mittels perkutaner Koronarintervention in die Studie eingeschlossen. Die Zuweisung zu einer der beiden Gruppen Verum (10µg/kg G-CSF (Neupogen®), n=56) oder Placebo (NaCl 0.9%, n=58) geschah doppelblind. Die Studienmedikation wurde vom 6. bis 12. Tag nach Infarkt subkutan appliziert. Die Infarktgröße wurde mittels Technetium99m-sestamibi Szintigraphie bei Einschluss und nach 4-6 Monaten im Rahmen des Follow-ups bestimmt. Während der G-CSF Phase wurde mittels Durchflußzytometrie der Verlauf verschiedener Oberflächenmarker wie CD 34, CXCR4, VLA-4 und LFA-1 quantifiziert. Der primäre Endpunkt wurde als Reduktion der linksventrikulären Infarktgröße festgesetzt. Unter den sekundären Endpunkten waren die Verbesserung der linksventrikulären Auswurffraktion (LV-EF) im MRT und koronarangiographisch diagnostizierte Restenosen.

Ergebnisse: G-CSF mobilisierte eine signifikante Zahl von Stammzellen (CD34+). Zwischen Baseline und Follow-up reduzierte sich die linksventrikuläre Infarktgröße szintigraphisch um $6.2 \pm 9.1\%$ in der G-CSF-Gruppe und $4,9 \pm 8,9\%$ in der Placebo-Gruppe ($p=0.45$). Die linksventrikuläre Auswurffraktion verbesserte sich um $2.8 \pm 3.7\%$ in der G-CSF-Gruppe und um $2.8 \pm 3.5\%$ unter Placebo ($p=0.98$). Neben der signifikant erhöhten Anzahl CD34 positiver Stammzellen, zeigte sich in der G-CSF Gruppe durchflußzytometrisch eine signifikant geringere Expression des -für das Homing der Stammzellen im Myokard verantwortlichen- Chemokin-Rezeptors CXCR4 sowie der Adhäsionsmoleküle LFA-1 und VLA-4. Die Inzidenz angiographisch nachweisbarer Restenosen war mit 35.2% in der G-CSF-Gruppe und 30.9% in der Placebo-Gruppe ($p=0.64$) nicht signifikant unterschiedlich.

Schlussfolgerung: Die Mobilisierung von Stammzellen mit G-CSF bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und erfolgreicher mechanischer Reperfusion hatte keinen Einfluss auf die Infarktgröße, die linksventrikuläre Funktion und die Rate an Restenosen.

8. Literatur

- 1) ABBOTT JD, HUANG Y, LIU D, HICKEY R, KRAUSE DS, GIORDANO FJ. *Stromal cell-derived factor 1-alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury.* Circulation 2004; 110:3300-3305.
- 2) ADACHI Y, IMAGAWA J, SUZUKI Y, YOGO K, FUKAZAWA M, KUROMARU O, SAITO Y. *G-CSF treatment increases side population cell infiltration after myocardial infarction in mice.* J Mol Cell Cardiol 2004; 36:707-710.
- 3) AICHER A, BRENNER W, ZUHAYRA M, BADORFF C, MASSOUDI S, ASSMUS B, ECKEY T, HENZE E, ZEIHNER AM, DIMMELER S. *Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labelling.* Circulation 2003; 107(16):2134-2139.
- 4) AMBROSE JA, MARTINEZ EE. *A New Paradigm for Plaque Stabilization.* Circulation, 2002, Vol.105, S.2000-2004.
- 5) Amgen Europe B.V.; *Fachinformation Neupogen.* Stand 2008.
- 6) ANDERSON JL, CARLQUIST JF, MUHLESTEIN JB, HORNE BD, ELMER SP. *Evaluation of C-Reactive Protein, an Inflammatory Marker, and Infectious Serology as Risk Factors for Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction.* J Am Coll Cardiol, 1998, Vol.32, S.35-41.

- 7) ASSMANN G, OBERWITTLER W, SCHULTE H, SCHRIEWER H, FUNKE H, EPPING PH, HAUSS WH. *Prediction and early diagnosis of coronary disease. Prospective epidemiologic study of industrial workers in Westphalia.* Internist (Berl). 1980 Aug; 21(8):446-59
- 8) ASSMUS B, SCHACHINGER V, TEUPE C, BRITTEN M, LEHMANN R, DOBERT N, GRUNWALD F, AICHER A, URBICH C, MARTIN H, HOELZER D, DIMMELER S, ZEIHNER AM. *Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI).* Circulation 2002; 106(24):3009-3017.
- 9) BADORFF C, BRANDES RP, POPP R, RUPP S, URBICH C, AICHER A, Fleming I, BUSSE R, ZEIHNER AM, DIMMELER S. *Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes.* Circulation 2003; 107(7):1024-1032.
- 10) BALSAM LB, WAGERS AJ, CHRISTENSEN JL, KOFIDIS T, WEISSMAN IL, ROBBINS RC. *Hematopoietic stem cells adopt mature hematopoietic fates in ischemic myocardium.* Nature 2004; 428:668-673.
- 11) BELTRAMI AP, URBANEK K, KAJSTURA J, YAN SM, FINATO N, BUSSANI R, NADAL-GINARD B, SILVESTRI F, LERI A, BELTRAMI CA, ANVERSA P. *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction.* N Engl J Med 2001; 344:1750-1757.
- 12) BIASUCCI LM, LIUZZO G, ANGIOLILLO DJ, SPERTI G, MASERI A. *Inflammation and Acute Coronary Syndromes.* Herz, 2000, Vol.25, S.108-112.

- 13) BRAUNWALD E. *The open-artery Theory is alive and well again.* N Engl J Med 1993; 329(22):1650-1652.
- 14) BRITEN MB, ABOLMAALI ND, ASSMUS B, LEHMANN R, HONOLD J, SCHMITT J, VOGL TJ, MARTIN H, SCHACHINGER V, DIMMELER S, ZEIHNER AM. *Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging.* Circulation 2003; 108(18):2212-2218.
- 15) CAMERER E, KOLSTØ AB, PRYDZ H. *Cell Biology of Tissue Factor, the Principal Initiator of Blood Coagulation.* Thromb Res, 1996, Vol.81, S.1-41.
- 16) DIMMELER S, ZEIHNER AM, SCHNEIDER MD. *Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair.* J Clin Invest 2005; 115:572-583.
- 17) DANESH J, WHINCUP P, WALKER M, LENNON L, THOMSON A, APPLEBY P, GALLIMORE JR, PEPYS MB. *Low Grade Inflammation and Coronary Heart Disease: Prospective Study and Updated Meta-Analyses.* BMJ, 2000, Vol.321, S.199-204.
- 18) DANESH J, WHINCUP P, WALKER M, LENNON L, THOMSON A, APPLEBY P, WONG YK, BERNARDES-SILVA M, WARD M. *Chlamydia Pneumoniae IgG Titres and Coronary Heart Disease: Prospective Study and Meta-Analysis.* BMJ, 2000, Vol.321, S.208-213.
- 19) DAVIES MJ. *The Composition of Coronary Artery Plaques.* N Engl J Med, 1997, Vol.336, S.1312-1314.

- 20) DAWBER TR, MEADORS GF, MOORE FE Jr. *Epidemiological approaches to heart disease. The Framingham study.* Am J Public Health Nations Health. 1951 Mar;41(3):279-81.
- 21) ERNST E, HAMMERSCHMIDT DE, BAGGE U, MATRAI A, DORMANDY JA. *Leukocytes and the Risk of Ischemic Diseases.* JAMA, 1987, Vol.257, S.2318-2324.
- 22) FORRESTER JS, PRICE MJ, MAKKAR RR. *Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians.* Circulation 2003; 108:1139-1145.
- 23) FUSTER V, BADIMON JJ. *Tissue Factor Modulates the Thrombogenicity of Human Atherosclerotic Plaques.* Circulation, 1997, Vol.95, S.594-599.
- 24) GUTSTEIN DE, FUSTER V. *Pathophysiology and Clinical Significance of Atherosclerotic Plaque Rupture.* Cardiovasc Res, 1999, Vol.41, S.323-333.
- 25) HARADA M, QIN Y, TAKANO H, MINAMINO T, ZOU Y, TOKO H, OHTSUKA M, MATSUURA K, SANO M, NISHI J, IWANAGA K, AKAZAWA H, KUNIEDA T, ZHU W, HASEGAWA H, KUNISADA K, NAGAI T, NAKAYA H, YAMAUCHI-TAKIHARA K, KOMURO I. *G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the JAK-STAT pathway in cardiomyocytes.* Nat Med 2005; 11:305-311.
- 26) HEIL M, ZIEGELHOEFFER T, MEES B, SCHAPER W. *A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware.* Circ Res 2004; 94:573-574.

- 27) HOFFMEISTER HM, HELLER W, SEIPEL L. *Gerinnung und Fibrinolyse bei Arteriosklerose*. Z Kardiol, 1999, Vol.88, S.315-323.
- 28) HUBEL K, ENGERT A. *Clinical applications of granulocyte-colony stimulating factor: an update and summary*. Ann Hematol 2003; 82:207-213.
- 29) JACKSON KA, MAJKA SM, WANG H, POCIUS J, HARTLEY CJ, MAJESKY MW, ENTMAN ML, MICHAEL LH, HIRSCHI KK, GOODELL MA. *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells*. J Clin Invest 2001; 107:1395-1402.
- 30) KÁDÁR A, GLASZ T. *Development of Atherosclerosis and Plaque Biology*. Cardiovasc Surg, 2001, Vol.9, S.109-121.
- 31) KANG HJ, KIM HS, ZHANG SY, PARK KW, CHO HJ, KOO BK, KIM YJ, SOO LEE D, SOHN DW, HAN KS, OH BH, LEE MM, PARK YB. *Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial*. Lancet 2004; 363:751-756.
- 32) KASTRATI A, MEHILLU J, DIRSCHINGER J, SCHRICKE U, NEVERVE J, PACHE J, MARTINOFF S, NEUMANN FJ, NEKOLLA S, BLASINI R, SEYFARTH M, SCHWAIGER M, SCHÖMIG A. *Myocardial salvage after coronary stenting plus abciximab versus fibrinolysis plus abciximab in patients with acute myocardial infarction: a randomized trial*. Lancet 2002; 359:920-925.

- 33) KAWADA H, FUJITA J, KINJO K, MATSUZAKI Y, TSUMA M, MIYATAKE H, MUGURUMA Y, TSUBOI K, ITABASHI Y, IKEDA Y, OGAWA S, OKANO H, HOTTA T, ANDO K, FUKUDA K. *Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction.* Blood 2004; 104:3581-3587.
- 34) KOCHER AA, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ, TAKUMA S, BURKHOF D, WANG J, HOMMA S, EDWARDS NM, ITESCU S. *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function.* Nat Med 2001; 7:430-436.
- 35) KOJIMA S, NONOGI H, MIYAO Y, MIYAZAKI S, GOTO Y, ITOH A, DAIKOKU S, MATSUMOTO T, MORII I, YUTANI C. *Is Preinfarction Angina Related to the Presence or Absence of Coronary Plaque Rupture?* Heart, 2000, Vol.83, S.64-68.
- 36) KRAUSE DS, FACKLER MJ, CIVIN CI, MAY WS. *CD 34: structure, biology and clinical utility.* Blood 1996; 87:1-13.
- 37) LAUGWITZ KL, MORETTI A, LAM J, GRUBER P, CHEN Y, WOODARD S, LIN LZ, CAI CL, LU MM, RETH M, PLATOSHYN O, YUAN JX, EVANS S, CHIEN KR. *Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages.* Nature 2005; 433:647-653.
- 38) LEONE AM, RUTELLA S, BONANNO G, ABBATE A, REBUZZI AG, GIOVANNINI S, LOMBARDI M, GALIUTO L, LIUZZO G, ANDREOTTI F, LANZA GA, CONTEMI AM, LEONE G, CREA F. *Mobilization of bone-marrow derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function.* Eur Heart J 2005; 26:1196-1204.

- 39) LIBBY P. *Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes*. Circulation, 2001, Vol.104, S.365-372.
- 40) LIBBY P, EGAN D, SKARLATOS S. *Roles of Infectious Agents in Atherosclerosis and Restenosis*. Circulation, 1997, Vol.96, S.4095-4103.
- 41) LORENZET R, NAPOLEONE E, CELI A, PELLIGRINI G, DI SANTO A. *Cell-Cell Interaction and Tissue Factor Expression*. Blood Coag Fibrinol, 1998, Vol.9 (Suppl 1), S49-S59.
- 42) MATHUR A, MARTIN JF. *Stem cells and repair of the heart*. Lancet 2004; 364:183-192.
- 43) MASSA M, ROSTI V, FERRARIO M, CAMPANELLI R, RAMAJOLI I, ROSSO R, DE FERRARI GM, FERLINI M, GOFFREDO L, BERTOLETTI A, KLERSY C, PECCI A, MORATTI R, TAVAZZI L. *Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction*. Blood 2005; 105:199-206.
- 44) MINATOGUCHI S, TAKEMURA G, CHEN XH, WANG N, UNO Y, KODA M, ARAI M, MISAO Y, LU C, SUZUKI K, GOTO K, KOMADA A, TAKAHASHI T, KOSAI K, FUJIWARA T, FUJIWARA H. *Acceleration of healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment*. Circulation 2004; 109:2572-2580.

- 45) MORENO PR, BERNARDI VH, LOPEZ-CUELLAR J, MURCIA AM, PALACIOS IF, GOLD HK, MEHRAN R, SHARMA SK, NEMERSON Y, FUSTER V, FALLON JT. *Macrophages, Smooth Muscle Cells, and Tissue Factor in Unstable Angina – Implications for Cell-Mediated Thrombogenicity in Acute Coronary Syndromes*. *Circulation*, 1996, Vol.94, S.3090-3097.
- 46) MURRY CE, SOONPAA MH, REINECKE H. *Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. *Nature* 2004; 328:664-668.
- 47) OHTSUKA M, TAKANO H, ZOU Y, TOKO H, AKAZAWA H, QIN Y, SUZUKI M, HASEGAWA H, NAKAYA H, KOMURO I. *Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularisation*. *FASEB J* 2004; 18:851-853.
- 48) ORLIC D, HILL JM, ARAI AE. *Stem cells for myocardial regeneration*. *Circ Res* 2002;91(12):1092-1102
- 49) ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, LIMANA F, JAKONIUK I, QUAINI F, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(18): 10344-10349.
- 50) PFEFFER MA, BRAUNWALD E. *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. *Circulation* 1990; 81(4):1161-1172.
- 51) RIDKER PM, CUSHMAN M, STAMPFER MJ, TRACY RP, HENNEKENS CH. *Inflammation, Aspirin, and the Risk of Cardiovascular Disease in Apparently Healthy Men*. *N Engl J Med*, 1997, Vol.336, S.973-979.

- 52) ROSS R. *Atherosclerosis - An Inflammatory Disease*. N Engl J Med, 1999, Vol.340, S.115-126.
- 53) SCHÖMIG A, KASTRATI A, DIRSCHINGER J, MEHILLI J, SCHRICKE U, PACHE J, MARTINOFF S, NEUMANN FJ, SCHWAIGER M. *Coronary stenting plus platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus thrombolysis for occluded coronary arteries in Patients with acute myocardial infarction Study investigators*. N Engl J Med 2000; 343:385-391.
- 54) SCHÖMIG A, MEHILLI J, ANTONIUCCI D, NDREPEPA G, MARKWARDT C, DI PEDE F, NEKOLLA SG, SCHLOTTERBECK K, SCHÜHLEN H, PACHE J, SEYFARTH M, MARTINOFF S, BENZER W, SCHMITT C, DIRSCHINGER J, SCHWAIGER M, KASTRATI A. *Mechanical reperfusion in patients with acute myocardial infarction presenting more than twelve hours from symptom onset: a randomized controlled trial*. JAMA 2005; 293:2865-2872.
- 55) SHEEHAN FH, MATHEY DG, SCHOFER J, DODGE HT, BOLSON EL. *Factors that determine recovery of left ventricular function after thrombolysis in patients with acute myocardial infarction*. Circulation 1985; 71:1121-1128.
- 56) SHINTAI S, MUROHARA T, IKEDA H, UENO T, HONMA T, KATOH A, SASAKI K, SHIMADA T, OIKE Y, IMAIZUMI T. *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction*. Circulation 2001; 103(23):2776-2779.
- 57) STATISTISCHES BUNDESAMT WIESBADEN. *Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland 2007*. Artikelnummer 5232101077015, 10.09.2008.

- 58) STATISTISCHES BUNDESAMT WIESBADEN. *Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland 2003*. Artikelnummer 5232101037015, 30.03.2005.
- 59) STEIN A, ZOHLNHÖFER-MOMM D, POGASTA-MURRAY G, VON WEDEL J, STEPPICH BA, SCHÖMIG A, KASTRATI A, OTT I. *Expression of CXCR4, VLA-1, LFA-3 and Transducer of ERB in G-CSF-mobilized Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction*. *Thrombosis and Haemostasis* 2010 Mar 1;103(3):638-43
- 60) STRAUER BE, BREHM M, ZEUS T, KOSTERING M, HERNANDEZ A, SORG RV, KOGLER G, WERNET P. *Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans*. *Circulation* 2002; 106(15):1913-1918.
- 61) SUGANO Y, ANZAI T, YOSHIKAWA T, MAEKAWA Y, KOHNO T, MAHARA K, NAITO K, OGAWA S. *Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction*. *Cardiovasc Res* 2005; 65:446-456.
- 62) TOSCHI V, GALLO R, LETTINO M, FALLON JT, GERTZ SD, FERNANDEZ-ORTIZ A, CHESEBRO JH, BADIMON L, NEMERSON Y, FUSTER V, BADIMON JJ. *Tissue Factor Modulates the Thrombogenicity of Human Atherosclerotic Plaques*. *Circulation*, 1997, Vol.95, S.594-599.
- 63) VALGIMIGLI M, RIGOLIN GM, CITTANI C, MALAGUTTI P, CURELLO S, PERCOCO G, BUGLI AM, DELLA PORTA M, BRAGOTTI LZ, ANSANI L, MAURO E, LANFRANCHI A, GIGANTI M, FEGGI L, CASTOLDI G, FERRARI R. *Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile*. *Eur Heart J*. 2005; 26(18):1838-1845.

- 64) VAN DER WAL AC, BECKER AE. *Atherosclerotic Plaque Rupture - Pathologic Basis of Plaque Stability and Instability*. Cardiovasc Res, 1999, Vol.41, S.334-344.
- 65) WOJAKOWSKI W, TENDRA M, MICHALOWSKA A, MAJKA M, KUCIA M, MAŚLANKIEWICZ K, WYDERKA R, OCHAŁA A, RATAJCZAK MZ. *Mobilization of CD34+/CXCR4+, CD34+/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction*. Circulation 2004; 110:3213-3220.
- 66) WOLLERT KC, DREXLER H. *Mesenchymal stem cells for myocardial infarction: promises and pitfalls*. Circulation 2005; 112:151-153.
- 67) WOLLERT KC, MEYER GP, LOTZ J, RINGES-LICHTENBERG S, LIPPOLT P, BREIDENBACH C, FICHTNER S, KORTE T, HORNIG B, MESSINGER D, ARSENIJEV L, HERTENSTEIN B, GANSER A, DREXLER H. *Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial*. Lancet 2004; 364:141-148.
- 68) ZOHLNHÖFER D, OTT I, MEHILLI J, SCHÖMIG K, MICHALK F, IBRAHIM T, MEISETSCHLÄGER G, VON WEDEL J, BOLLWEIN H, SEYFARTH M, DIRSCHINGER J, SCHMITT C, SCHWAIGER M, KASTRATI A, SCHÖMIG A. *Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial*. JAMA 2006; 295(9):1003-1010

9. Originalarbeiten

Zohlnhöfer D, Ott I, Mehilli J, Schömig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schömig A

“A randomized Clinical Trial of Stem Cell Mobilization by Granulocyte-Colony Stimulating Factor in Patients with Acute Myocardial Infarction. (REVIVAL-2)” JAMA. 2006 Mar 1;295(9):1003-1010.

Stein A, Zohlnhöfer-Momm D, Pogatsa-Murray G, von Wedel J, Steppich B, Schömig A, Kastrati A, Ott I

„Expression of CXCR4, VLA-1, LFA-3 and Transducer of ERB in G-CSF-mobilized Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction” Thrombosis and Haemostasis 2010 Mar 1;103(3):638-43

10. Lebenslauf

Meinen Lebenslauf habe ich aus datenschutztechnischen Gründen aus der online publizierten Variante entfernt.

11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Schömig möchte ich für die Überlassung dieses hochaktuellen Themas danken. Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Ott, durch die ich lernen durfte, dass Passion für die Forschung auch im Spannungsfeld des harten klinischen Alltages möglich ist.

Für ihre Geduld und ihre Leidenschaft an ihrer Arbeit möchte ich zudem sehr Frau Anette Stobbe und Frau Birgit Campbell danken, die mir das Handwerk der Durchflußzytometrie und der Zellkultur beigebracht haben.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meiner Frau Gerrit, die mich von der ersten Blutabnahme bis zum letzten Punkt immer wieder motiviert hat und die durch ihre Fragen und Anregungen zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.