



Technische Universität München

1. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar,
Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen des Deutschen Herzzentrums München

Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig

Die Wirkung von Erythropoietin auf die Thrombozytenfunktion im akuten Myokardinfarkt

Magdalena Lydia Laux

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott

2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 09.04.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.02.2014 angenommen.

if you can walk you can dance, if you can talk you can sing (afrikanisch)

Meiner Familie

Gliederung

1 Einleitung	6
1.1 Myokardinfarkt	6
1.1.1 Epidemiologie, Morbidität und Mortalität	6
1.1.2 Risikofaktoren	7
1.1.3 Pathophysiologie	7
1.1.4 Typische klinische Symptomatik und Diagnose des Myokardinfarkts	12
1.1.5 Therapie des akuten Myokardinfarktes	13
1.1.5.1 Akute Therapie	13
1.1.5.2 Therapie nach perkutaner Koronarangioplastie	15
1.2 Thrombozyten	16
1.2.1 Physiologie	16
1.2.2 Funktion	18
1.2.3 Rolle der Thrombozyten im akuten Myokardinfarkt	21
1.2.4 Thrombozytenaggregationshemmer	22
1.3 Erythropoietin	23
1.3.1 Struktur, physiologische Herkunft und Metabolisierung	23
1.3.2 Wirkung	25
1.3.3 EPO im akuten Myokardinfarkt	27
1.3.4 Hinweise auf Akzeleration thrombembolischer Ereignisse	29
2 Zielsetzung	31
3 Material und Methoden	32
3.1 Versuchsserie in vitro	32
3.1.1 Versuchsaufbau	32
3.1.2 Thrombozytenaggregation	32
3.2 Studiendesign der REVIVAL-3-Studie	36

3.2.1 Studienpopulation	37
3.2.2 Einverständnis der Patienten	37
3.2.3 Interventionsmaßnahme: PCI und EPO oder Placebo	38
3.3 Substudie	40
3.3.1 Deskriptive Parameter	40
3.3.2 Thrombozytenaggregation	40
3.3.3 Weitere analytische Parameter	40
3.4 Statistische Analyse	40
4 Ergebnisse	42
4.1 Thrombozytenaggregation unter Einfluss von EPO in vitro	42
4.2 Ergebnisse der REVIVAL-3 Substudie	48
4.2.1 Patientenkollektiv	48
4.2.2 Thrombozytenaggregation	63
5 Diskussion	68
5.1 Diskussion der Methoden	68
5.1.1 Versuchsserie in vitro	69
5.1.2 Studienform von REVIVAL-3	69
5.2 Diskussion der Ergebnisse	70
5.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	70
5.2.2 Versuchsserie in vitro	70
5.2.3 Substudie von REVIVAL-3	72
5.3 Relevanz der Ergebnisse	72
6 Zusammenfassung	75
6.1 Deutsche Zusammenfassung	75
6.2 English Summary	76
7 Verzeichnisse	77

7.1 Abkürzungen	77
7.2 Abbildungen	81
7.3 Tabellen	82
7.4 Bibliografie	83
8 Danksagung	97
9 Anhang	98
Patienteninformation zur Studie und Einverständniserklärungen	98

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Epidemiologie, Morbidität und Mortalität

Der akute Herzinfarkt zählt zu den häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. In Deutschland sterben jährlich mehr als 55.000 der ca. 280.000 Menschen, die einen akuten Myokardinfarkt erleiden. 2010 starben in der Bundesrepublik Deutschland insgesamt 858.768 Menschen, 352.689 davon an Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Den zweitgrößten Anteil hiervon trug der akute Myokardinfarkt mit 6,5% der Sterbefälle nach der chronisch ischämischen Herzkrankheit mit 8,5% bei (Bundesamt für Statistik 2010). Häufige Komplikationen des Herzinfarktes sind Rhythmusstörungen, wobei unter diesen das Kammerflimmern die häufigste Todesursache darstellt, gefolgt von ventrikulären Tachykardien und Asystolie. Weiter treten akute Linksherzinsuffizienz eventuell in Kombination mit Lungenödem oder kardiogenem Schock ebenso auf, wie Herzwandruptur oder Papillarmuskelabriss, der zu Klappeninsuffizienz führt. Später im Verlauf kommen zur Geltung: Perikarditits, Herzwandaneurysmata, ventrikuläre Tachykardien, plötzlicher Herztod, zunehmende Herzinsuffizienz und arterielle Embolien.

Für die Prävention, Behandlung, Rehabilitation und Pflege von Erkrankungen und Unfällen ergaben sich 2008 in Deutschland Krankheitskosten von insgesamt 254,3 Milliarden Euro, umgerechnet rund 3.100 Euro pro Kopf. Die höchsten Kosten hierbei waren auf die Krankheitsgruppe der Herz-Kreislauf-Leiden zurückzuführen, die mit 37 Milliarden Euro etwa 14,5% der Ausgaben des deutschen Gesundheitswesens verursachen (Bundesamt für Statistik 2008). Somit stellt der akute Myokardinfarkt auch wirtschaftlich eine folgenschwere Erkrankung dar.

Diese Zahlen lassen deutlich erkennen, wie wichtig die umfassende Prävention zur Verbesserung der Prognose ischämischer Herzerkrankungen sowohl aus wirtschaftlicher Sicht, als auch für den einzelnen Patienten ist. Hierfür ist ein besseres Verständnis der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit genauso wie das Erkennen von Risikogruppen und die Optimierung der Therapie von Nöten.

1.1.2 Risikofaktoren

Schon lange werden die Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen erforscht. 1998 veröffentlichte die World Health Organisation (WHO) die Ergebnisse der groß angelegten MONICA-Studie. Zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen (Kannel et al. 1961; Keil, U. und Kuulasmaa 1989; Keil, U. et al. 1998):

- Nikotinkonsum: Risikoerhöhung um den Faktor 1,8 - 2,7
- Hypertonie: Risikoerhöhung um den Faktor 2,0
- Hypercholesterinämie: Risikoerhöhung um den Faktor 2,9

Bei Vorhandensein mehrerer kardiovaskulärer Risikofaktoren (CVRF) ergab sich ein weiter gesteigertes Gesamtrisiko, z.B. bei der Kombination Raucher mit Hypercholesterinämie ein 8,3-fach erhöhtes Risiko, oder bei Vorliegen aller drei Risikofaktoren ein Faktor von 11,1 (Keil, U. et al. 1998).

Weitere Studien wie HEARTSCORE (Conroy et al. 2003) führten zu SCORE-Deutschland-Risikotabellen, die aufgrund von Geschlecht, Alter und Risikofaktoren ein 10-Jahres-Risiko für tödliche Herz-Kreislauf-Erkrankungen einer Person berechnen können (Keil, Ulrich et al. 2005; Hense et al. 2008). Auch fanden sich weitere wichtige Risikofaktoren z.B. durch die EUROASPIRE-Studien I und II (EUROASPIRE-Study-Group 1997; EUROASPIRE-II-Study-Group 2001):

- Adipositas
- Familiäre Prädisposition
- Diabetes mellitus
- Hyperlipidämie
- Hyperhomocysteinämie
- Nicht beeinflussbare Risikofaktoren wie Geschlecht, Alter, Rasse

1.1.3 Pathophysiologie

Die Erforschung der Risikofaktoren und weitere experimentelle Studien lassen vermuten, wie die Entstehung des Myokardinfarkts pathophysiologisch abläuft:

Als Ursprung und Grund der Gefäßwandveränderungen gelten dysfunktionales Endothel sowie Inflammation (Corti et al. 2003). So konnte nachgewiesen werden, dass einige klassische Risikofaktoren die Kontraktilität der Koronargefäße herabsetzen. Dies geschieht einerseits durch verminderte Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) in den Endothelzellen, andererseits durch Stimulation der inflammato-

rischen Signalwege (Ruschitzka et al. 2000; Badimon et al. 2009). Diese Prozesse spielen auch im weiteren Verlauf der Plaquergrößerung eine wichtige Rolle und führen dadurch zur Eskalation der Inflammation in der Gefäßwand.

Arterothrombotische Plaques bestehen hauptsächlich aus Bindegewebsmatrix (inkl. Kollagen, Proteoglykanen, Fibronectin und elastischen Fasern), Lipiden (inkl. kristallinem Cholesterin, Cholesterylester, Phospholipiden), inflammatorischen Zellen (inkl. monozytären Makrophagen, T-Lymphozyten), glatten Muskelzellen und Kalziumablagerungen (Stary 1992; Davies 1996). Die Plaques entstehen durch Ablagerungen von Lipiden, zellulären und fibrösen Elementen in der Intima der koronaren Gefäßwände (Skalen et al. 2002). Die initialen Gefäßwandverdickungen werden auch als „fatty streaks“ bezeichnet. Bereits früh interagieren Thrombozyten mit dem leicht vorgeschädigten Endothel und aktivieren über NFκ-B-Signalwege die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 („Intercellular Adhesionmolecule“), VCAM-1 („Vascular Celladhesion Molecule-1“) und MCP-1 („Monocyte-chemoattractant Protein-1“) (Brand et al. 1996; Gawaz et al. 1998; Gawaz et al. 2000; Collins und Cybulsky 2001; Massberg et al. 2002).

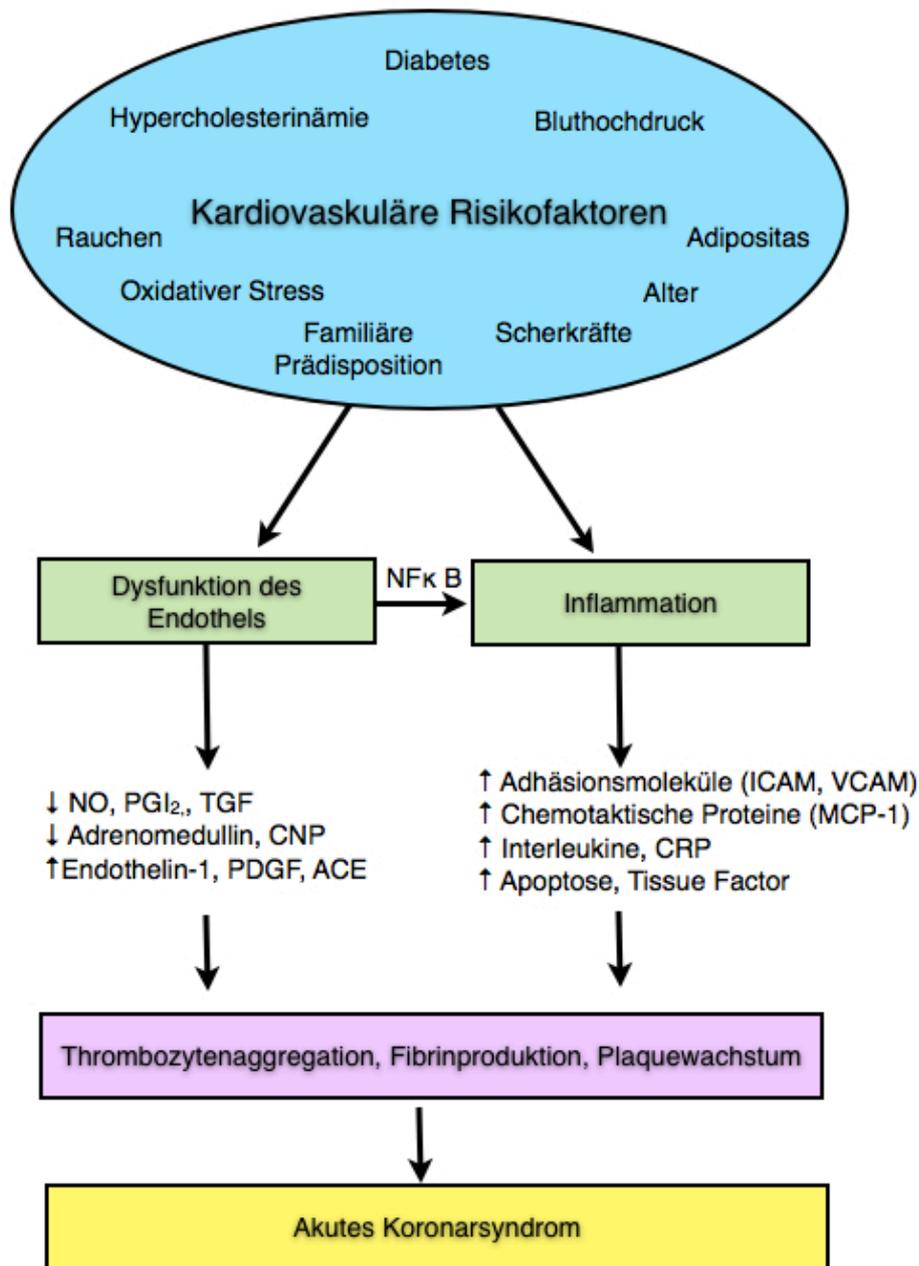


Abbildung 1. Zusammenhang zwischen CVRF, Endotheldysfunktion und Inflammation.

Viele kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Bluthochdruck und andere, können endotheliale Dysfunktion und eine Entzündungsreaktion verursachen. Durch verringerte Produktion von NO fehlt endothel-abhängige Vasorelaxation. In Folge produzieren die Endothelzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle wie ICAM oder VCAM, die erst die Adhäsion von Thrombozyten und Monozyten an die Gefäßwand ermöglichen. Die Immigration inflammatorischer Zellen führt zur Freisetzung von Tissue Factor, der wiederum die Gerinnungskaskade triggert und somit zum Akuten Koronarsyndrom (ACS) führen kann. ACE: Angiotensin-converting Enzym; CNP: C-Typ natriuretisches Peptid; CRP: C-Reaktives Protein; ICAM: „Intercellular Adhesionmolecule“; MCP-1: „Monocyte-chemoattractant Protein-1“; NF-kB: Nukleärer Factor κB; NO: Stickstoffmonoxid; PDGF: „Platelet-derived Growth Factor“; PGI₂: Prostaglandin 2; TGF: „Transforming growth factor“; VCAM: „Vascular Celladhesion Molecule“. Frei nach (Corti et al. 2003)

Diese und andere proinflammatorische Zytokine induzieren die Immigration von Lymphozyten und Monozyten, welche als Makrophagen Lipide und andere Substanzen resorbieren und dadurch zu Schaumzellen transformieren. Beim Untergang dieser Schaumzellen werden wiederum Lipide extrazellulär freigesetzt, was über Zytokinproduktion zu verstärkter Inflammation, Migration von Makrophagen und Proliferation von glatten Myozyten und Fibroblasten führt. Es bildet sich ein fibroatheromatöser Plaque an der Gefäßwand. Dabei werden zusätzlich glatte Muskelzellen der Media über Zytokine und Wachstumsfaktoren, die von aktivierten Makrophagen freigesetzt werden, stimuliert. Sie dedifferenzieren, proliferieren und sezernieren extrazelluläre Matrix (Kollagen, Glykoproteine) und führen so zur Bildung einer bindegewebsartigen Kappe, welche Blut und lipidreichen Kern voneinander trennt. Verschiedene CVRF wie Homocysteinämie und Hypertension tragen zu diesem Prozess bei, der auch Neointimabildung genannt wird. (Ross 1999; Lusis 2000)

In fortgeschrittenen Stadien verringern Kalzium-Einlagerungen und Kalzifizierung von glatten Muskelzellen die Elastizität der Gefäßwand, so dass es zu Plaqueerosionen, -rupturen, -fissuren oder -einblutungen kommen kann, was wiederum Thrombozyten und das Gerinnungssystem aktiviert (Proudfoot et al. 1998; de Boer et al. 1999; Burke et al. 2001).

Wenn der Plaque spontan rupturiert, werden Oberflächenproteine frei, welche die Thrombozyten und die Gerinnungskaskade aktivieren (Viles-Gonzalez et al. 2004; Gawaz et al. 2005). Ein Thrombus formiert sich. Das Gefäß stenosiert bis hin zum vollständigen Verschluss. Dadurch dass der Blutzufluss reduziert ist, wird ein Areal von Herzmuskelzellen minderversorgt. Ab einer gewissen Ischämiezeit gehen Myozyten zu Grunde. Dieser Mechanismus ist für bis zu 70% der Myokardinfarkte und des plötzlichen Herztods verantwortlich (Naghavi et al. 2003). Thrombozyten-aktivierende Substanzen aus atherosklerotischen Plaques sind vor allem heterogene kollagene Strukturen, aber auch von Willebrand-Faktor (vWF), Fibronektin, Laminin, Thrombin, Fibrin/Fibrinogen, oxidiertes LDL („low density lipoprotein“) und Lysophosphatidsäure (De Meyer et al. 1999; Siess et al. 1999; Rother et al. 2003; Penz et al. 2005). Tissue Faktor, zellgebunden oder extrazellulär in atherosklerotischen Plaques, aktiviert das extrinsische Blutgerinnungssystem und führt über die Bildung von Thrombin sowohl zur Gerinnselbildung als auch zur Thrombozytenaktivierung (Ott et al. 1998).

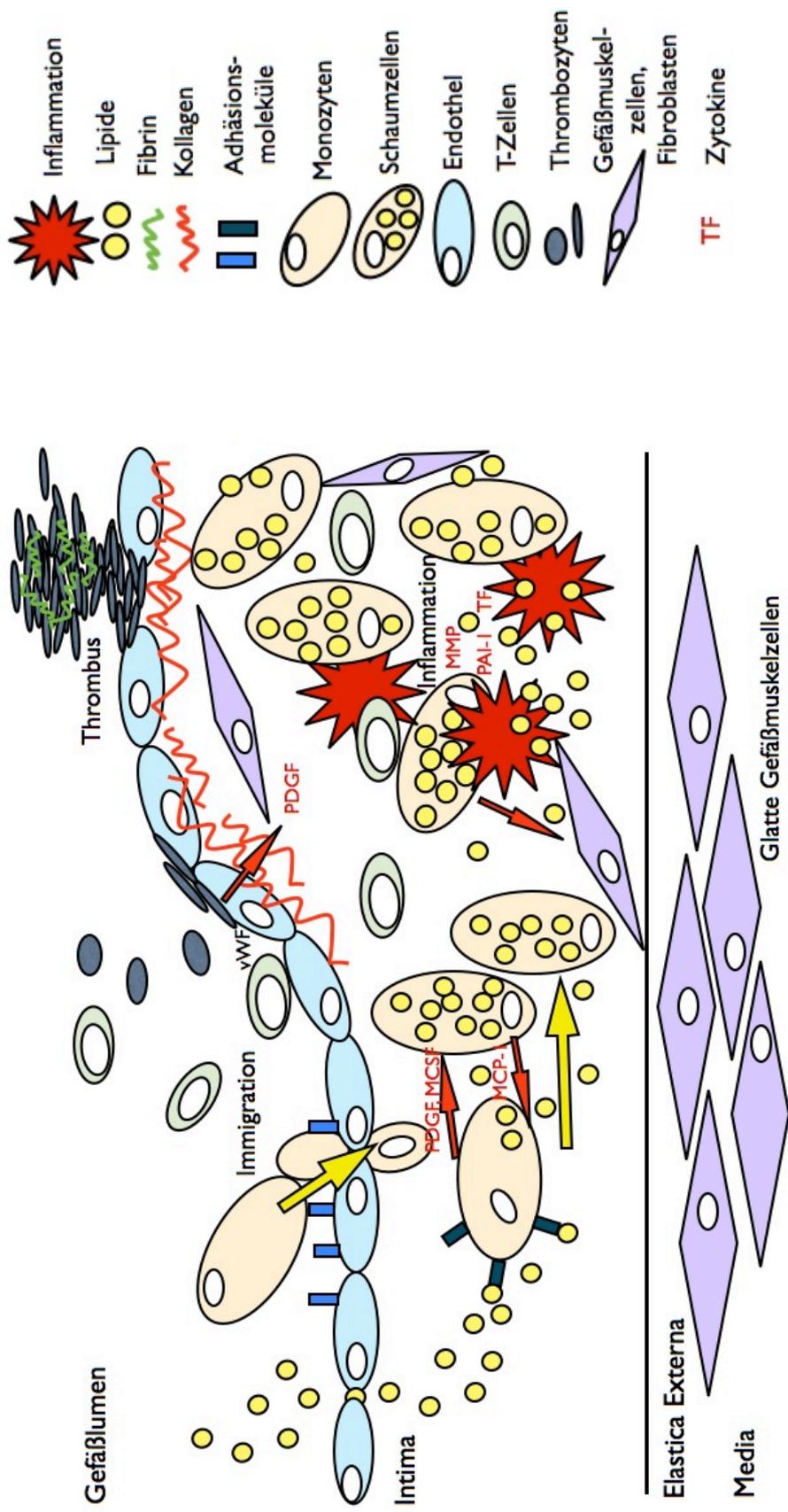


Abbildung 2. Die Entstehung Artherosklerotischer Plaques.

Von links nach rechts ist der Zeitverlauf der Entstehung artherosklerotischer Plaques dargestellt. Zu Beginn existieren kardiovaskuläre Risikofaktoren, hier beispielhaft Hyperlipidämie, welche die Dystfunktion des Endothels verursachen. Durch Expression von Adhäsionsmolekülen können Monozyten und T-Zellen immigrieren und Thrombozyten per GPIIb/IIIa adhären und aggregieren. Sie bilden gemeinsam mit der Gerinnungskaskade einen Thrombus an der Gefäßwand, während sich die Monozyten durch Phagozytose von Lipiden zu Schaumzellen entwickeln und zu Grunde gehen, was wiederum die inflammatorische Reaktion verstärkt. Eingewanderte Fibrozyten haben ihren Ursprung in der Tunica Elastica Externa. MCSF („Macrophage Colony-stimulating Factor“; MCP: Monocyte-chemoattractant Protein; MMP: Matrixmetalloprotease; PAI: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor; PDGF: Platelet-derived Growth Factor; TF: Tissue Faktor. Frei nach (Badimon et al. 2009)

Der schwächste Punkt der Plaques befindet sich an den Rändern der Läsion, der „Plaque-Schulter“, wo diese häufig rupturieren, da hier die fibröse Kappe meist am dünnsten und die Inflammation im Sinne einer Infiltration durch Schaumzellen, Makrophagen und kolokalisierten Matrixmetalloproteasen (MMPs) am größten ist (Michel 2001).

Verschiedene physikalische Kräfte an der Läsion, insbesondere Störungen der rheologischen Bedingungen im Sinne von Rezirkulationszonen und die verminderte Elastizität der Gefäßwand, beeinflussen die Plaque-Ruptur. Die Dehnung der Gefäßwand, z.B. durch arterielle Hypertonie oder erhöhte Sympatikusaktivität führen zur vermehrten mechanischen Belastung der Koronargefäße, wodurch ebenfalls die Wahrscheinlichkeit einer Plaque-Ruptur erhöht wird (Corti et al. 2003).

Bei ca 30% des akuten Koronarsyndroms (ACS) findet sich eine oberflächliche Erosion des Endothels vor allem fibrotischer und stenotischer Plaques, möglicherweise durch inflammatorische oder apoptotische Vorgänge bedingt (Mallat et al. 1999; Virmani et al. 2000). Eine Erhöhung der systemischen Thrombose-Neigung durch die kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Rauchen, Diabetes mellitus oder Hyperlipidämie begünstigen möglicherweise die arterielle Thrombusbildung bei Plaque-Erosion (Corti et al. 2002).

1.1.4 Typische klinische Symptomatik und Diagnose des Myokardinfarkts

Typischerweise berichten Patienten mit akutem Myokardinfarkt über plötzlich eintretende, retrosternale, seltener epigastrische oder interskapuläre Vernichtungsschmerzen in Ruhe. Sie strahlen in Unterkiefer, Nacken, Hals oder Arme aus. Oft bestehen Dyspnoe, Übelkeit, Hypotension, Tachkardie, Bradykardie, Rhythmusstörungen oder als Zeichen der Aktivierung des autonomen Nervensystems Blässe oder Kältschweißigkeit. Um die Diagnose stellen zu können, sollte die Symptomatik länger als 20 Minuten bestehen und nicht vollständig reversibel auf Nitroglyzerin sein (Van de Werf et al. 2008).

Bei älteren Patienten (>75 Jahre), Diabetikern und Frauen kann die Symptomatik häufig atypisch oder maskiert sein (Hamm 2004).

Der Myokardinfarkt wird im allgemeinen anhand der Kriterien der MONICA-Studie (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease) definiert (Mathers et

al. 2004). Zur Diagnosestellung werden folgende Kriterien verwendet (Tuomilehto und Kuulasmaa 1989):

- Veränderungen im 12-Kanal-Elektrokardiogramm (EKG) nach dem Minnesota-Code (Kottke et al. 1998) wie Q-Zacken Veränderungen in hintereinander folgenden Ableitungen
- Typische oder atypische Symptomatik mit Enzymveränderungen, egal ob mit oder ohne EKG-Veränderungen
- Fatale Fälle mit Blickdiagnose oder eindeutigen Befunden bei Obduktion *post mortem*.

Den diagnostisch und prognostisch größten Stellenwert haben ST-Strecken Hebungen von >0.1 mV in mehr als zwei Extremitätenableitungen oder >0.2 mV in mehr als zwei Brustwandableitungen. Auch ein Linksschenkelblock mit infarkttypischer Symptomatik wird zur Diagnose herangezogen. Weiterhin sollte auf T-Wellenveränderungen geachtet werden. Bei eindeutigem EKG und Symptomatik dürfen die Ergebnisse der biochemischen Marker nicht abgewartet werden. Dennoch können im Verlauf oder bei noch unklarer Diagnose Kreatinkinase (CK), herzmuskelspezifische Kreatinkinase (CK-MB) Troponin T und I oder Myoglobin hilfreich sein. Mithilfe der CK und CK-MB kann die Infarktgröße abgeschätzt werden. Auch die Echokardiographie kann hilfreich sein, um Wandbewegungsstörungen zu detektieren, die weit vor der Nekrose beginnen, jedoch unspezifisch sind (Van de Werf et al. 2008).

1.1.5 Therapie des akuten Myokardinfarktes

1.1.5.1 Akute Therapie

Patienten mit akutem Myokardinfarkt können sowohl mit PCI (perkutane Koronarintervention) und eventuell anschließendem Stenting als auch mit Thrombolyse erfolgreich behandelt werden. Steht beides zur Wahl, wird man der PCI den Vorrang geben, da für die meisten Patienten nach Thrombolyse eine PCI empfohlen wird (Silber et al. 2005). Das Flussdiagramm in Abbildung 3 soll als Entscheidungshilfe über den Ablauf der Therapie dienen. Es sollte jedoch keine Zeit bis zum Beginn der Therapie verloren werden, da dies einen starken Einfluss auf die Prognose der Patienten hat (Moore et al. 2005).

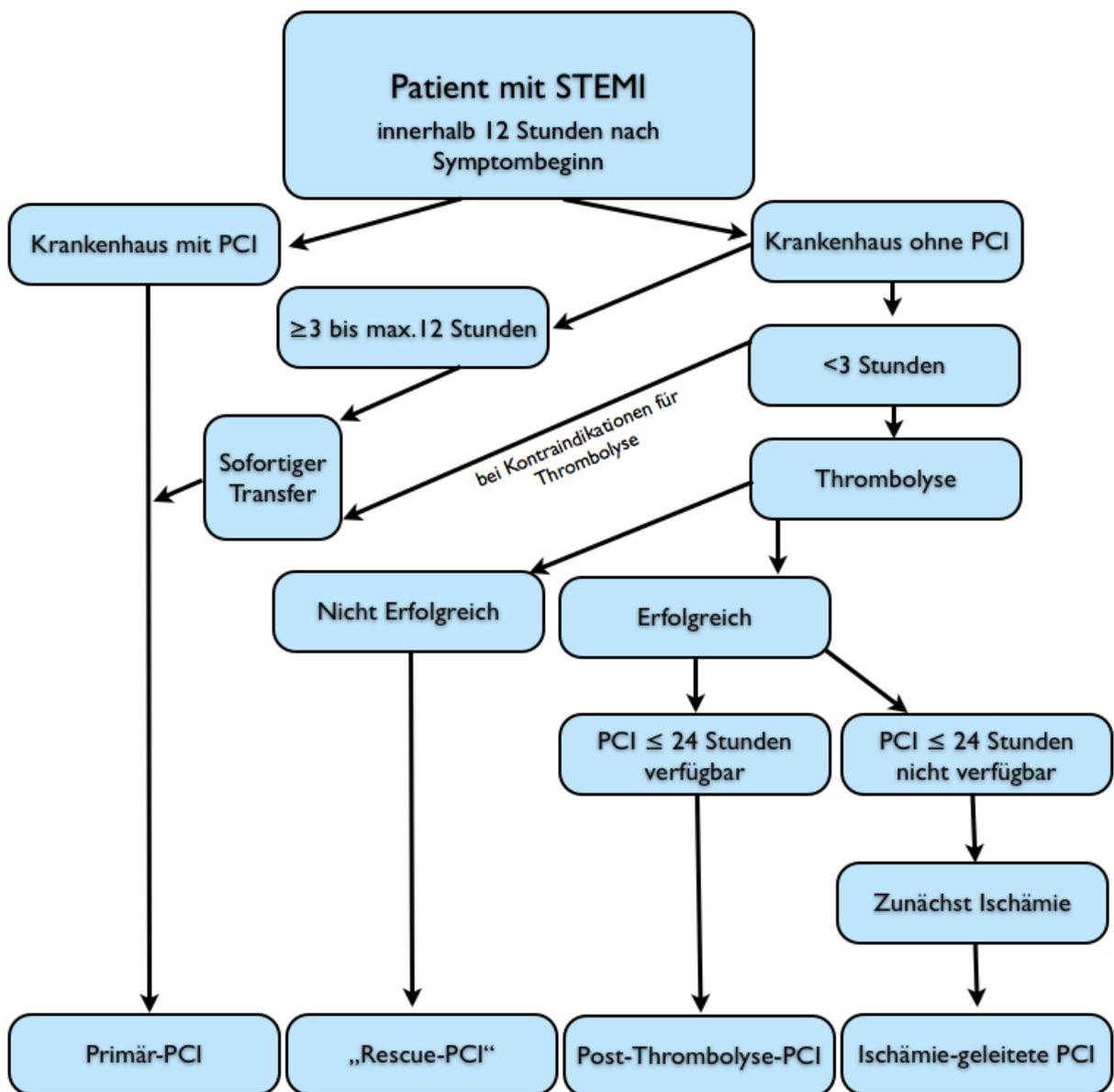


Abbildung 3. Flow-Chart zur Therapieentscheidung bei ACS.

Die Leitlinien empfehlen einen Patienten mit STEMI je nach Versorgungssituation zu behandeln. Ist ein Herzkatheterplatz vorhanden oder kann der Patient innerhalb von 12 Stunden zu einem Krankenhaus mit dieser Ausstattung transferiert werden, sollte der Patient primär eine PCI erhalten. Anderenfalls steht die Thrombolysetherapie im Vordergrund. Auch bei Bevorzugung der Thrombolyse und deren Erfolg sollte sie nicht die endgültige Behandlung sein und eine PCI zu späterem Zeitpunkt in Erwägung gezogen werden. STEMI: ST-Hebungsinfarkt; PCI: Perkutane Koronarintervention. Frei nach (Silber et al. 2005)

Bei erfolgloser PCI oder schweren Komplikationen kann eine operative Therapie erwogen werden (Antman et al. 2004; Hamm 2004; George, J. C. und Dangas 2010). Zu den Erstmaßnahmen zählen die Sauerstoffzufuhr sowie die Aufrechterhaltung und das Monitoring des Kreislaufs. Dazu wird eine Lagerung mit 30° erhöhtem Oberkörper empfohlen. Es wird generell angenommen, dass auch die Therapie der Schmerzen z.B. mit Opioiden, eventuell in Kombination mit antiemetischen Substanzen essentiell ist. Auch Tranquilizer können bei besonders exzitierten Patienten zum Einsatz kommen und durch Stressreduktion mit konsekutiv geringerer Sympathikusaktivität der Verengung koronarer Gefäße entgegenwirken (Van de Werf et al. 2008). Zusätzlich werden verschiedene Medikamente verabreicht. Dazu gehören sowohl die wiederholte Gabe von Glycerolnitrat als auch Aspirin, Heparin und Clopidogrel (Beginn mit loading dose (Sabatine et al. 2005; Sabatine 2009)). Bei Bedarf kommen Atropin, Betablocker und Antiemetika zum Einsatz (Antman et al. 2004; Hamm 2004; George, J. C. und Dangas 2010).

1.1.5.2 Therapie nach perkutaner Koronarangioplastie

Anschließend an eine PCI wird den Patienten im Sinne einer Sekundärprävention bzw. Begleittherapie dringend empfohlen täglich 100 mg Acetylsalicylsäure lebenslang sowie einen weiteren Thrombozytenaggregationshemmer wie z.B. Clopidogrel 75 mg je nach Stent über mindestens sechs Monate einzunehmen. Die Vitalparameter der Patienten sollten über mindestens 48 Stunden kontinuierlich z.B. per Monitor überwacht werden. 24 Stunden Bettruhe und schrittweise Mobilisation werden empfohlen.

Weiterhin günstig wirken sich die Verordnung von Statinen, ACE-Hemmern, und Betablockern auf die Plaquestabilisation, thrombotische Aktivität und inflammatorische Prozesse aus. Adäquate Einstellung von Blutdruck, Diabetes, Rhythmusstörungen, Cholesterin- und Triglyzeridwerten tragen erheblich zur Sekundärprävention bei. Grundsätzlich sollte aus diesem Grund ebenfalls eine Umstellung des Lebensstils und der Ernährungsgewohnheiten angeraten werden. Wichtig ist hierbei Rauchverzicht und physische Aktivität sowie der Abbau von Stressbelastung in Zusammenarbeit mit der Modifizierung der beeinflussbaren Risikofaktoren, um die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität zu reduzieren (Kolenda 1998; 2001; Van de Werf et al. 2008).

1.2 Thrombozyten

1.2.1 Physiologie

Thrombozyten, die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes, sind anukleäre, diskoide Scheiben mit einem Durchmesser von 2-4 μm und einer Dicke von 0,75 μm . Sie entstehen durch Abschnürung von Fragmenten aus Megakaryozyten im Knochenmark. Sie sind kernlos und zirkulieren 7-10 Tage im Gefäßsystem, wo sich etwa 150.000-400.000/ μl finden. Etwa ein Drittel der gesamten Thrombozyten findet sich als Reservepool in den Milzsinus. Letztendlich werden sie im retikulären System von Leber und Milz abgebaut (McNicol und Israels 2003).

Man kann morphologisch vier Zonen des Thrombozyten unterteilen (White und Clawson 1980; White 1987; George, J. N. 2000):

- **Peripher** befindet sich eine trilaminäre Membran, die eine extramembranöse Glykokalix trägt. An deren zytoplasmatischen Seite sind verschiedene Enzyme lokalisiert wie Phospholipase, Adenylatcyclase und Kalzium-ATPase, die über Rezeptoren aktiviert werden können. In der Phospholipiddoppelschichtmembran existieren Ionenkanäle und Rezeptoren, die sehr wichtig für die Konformationsänderung der Thrombozyten bei Aktivierung sind.
- Das **Membransystem** lässt sich untergliedern in ein offenes, kanalikuläres System, das die Oberflächenvergrößerung bei Aktivierung ermöglicht und auch als Transportsystem fungiert, sowie ein dichtes, tubuläres System, worin Kalzium gespeichert ist und der Arachidonsäuremetabolismus stattfindet.
- Die **submembranöse** strukturelle Zone im Zytoplasma beinhaltet das kontraktile Proteinsystem aus Aktin-, Myosinfilamenten und Mikrotubuli für das Zytoskelett. Es ist in der Membran verankert und ermöglicht sowohl die diskoide Form als auch die Konformationsänderung bei Aktivierung mit der Ausbildung von Pseudopodien (Canizares et al. 1994; Flaumenhaft et al. 2005).
- Die **Organellzone** enthält Mitochondrien, Peroxisomen, Glykogenspeicher und Granula. Es lassen sich drei Typen von Granula unterscheiden: **Lysosomen** mit typischen hydrolytischen Enzymen, „**Dense Granula**“ mit Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Kalziumionen, Phosphat, Tissue Faktor, P-Selektin und Serotonin und **α -Granula** mit Zytokinen, Enzymen, vWF, Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)-Rezeptormoleküle, Adhäsionsproteinen wie Fibrinogen und Wachstums- und Koagulationsfaktoren. Bei Aktivierung verschmelzen die Granula

mit der Zellmembran und setzen ihren Inhalt frei (Holmsen et al. 1972; Rendu und Brohard-Bohn 2001).

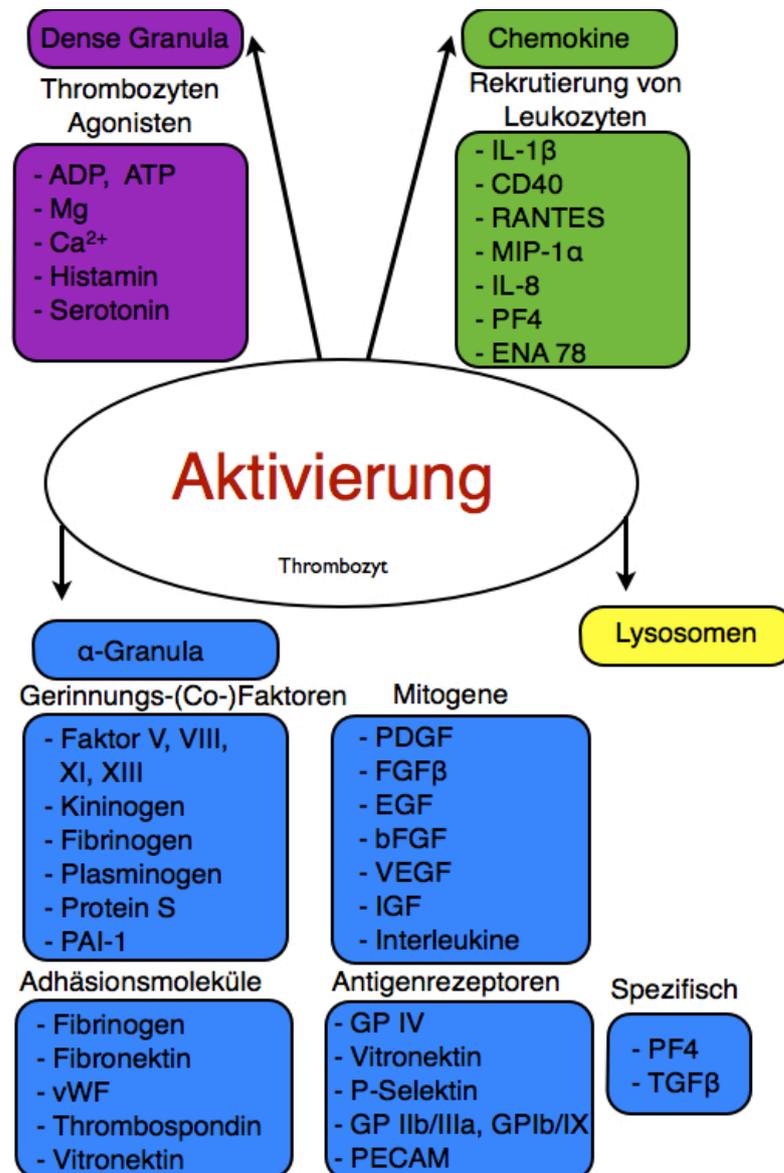


Abbildung 4. Inhaltsstoffe der Thrombozyten.

Bei Aktivierung setzen Thrombozyten die Inhaltsstoffe ihrer Granula und Chemokine zur Rekrutierung von Leukozyten frei. In Dense Granula befinden sich vor allem Stoffe, die weitere Thrombozyten aktivieren, in α -Granula sind Mitogene, Gerinnungsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, Antigenrezeptoren und thrombozytenspezifische Stoffe wie PF4 und TGF β . ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriphosphat; bFGF: „Basic Fibroblast Growth Faktor“; Ca²⁺: Kalzium; CD40: „Cluster of Differentiation 40“; ENA: Epitheliales, Neutrophile-aktivierendes Peptid; EGF: „Epidermal Growth Faktor“; FGF β : „Fibroblast Growth Faktor β “; GP: Glykoprotein; IGF: „Insulin-like Growth Faktor“; IL-1 β : Interleukin-1 β ; IL-8: Interleukin-8; Mg²⁺: Magnesium; MIP-1 α : „Macrophage Inflammatory Protein-1 α “; PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor; PECAM: „Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule“; PF4: „Platelet Faktor 4“; PDGF: „Platelet-derived Growth Faktor“; RANTES: „Regulated and Normal T-cell Expressed and Secreted“; TGF β : „Transforming growth factor“; VEGF: „Vascular Endothelial Growth Faktor“; vWF: von-Willebrand-Faktor. Frei nach (Badimon et al. 2009)

1.2.2 Funktion

Die Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Blutstillung. Wenn ein Gefäß verletzt wird, läuft die Gerinnungskaskade ab und aus einem primären, weißen Thrombus formt sich in der Sekundärphase ein roter Thrombus. Der Ablauf der Bildung eines hämostatischen oder eben auch thrombotischen Plättchenaggregats ist komplex und setzt sich aus drei eng verknüpften Phasen der Thrombozytenaggregation zusammen, die neben der Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade abläuft (George, J. N. 2000; Ruggeri 2002):

• Adhäsion

Thrombozyten kommen in Kontakt mit Matrixproteinen wie Kollagen, Fibronectin, P-Selektin, oder Laminin und beginnen das „**Tethering**“ und „**Rolling**“ sowie die stabilere Adhäsion (siehe Abbildung 5). Durch diese Vorgänge haften Thrombozyten an das subendotheliale Gewebe (Bolhuis et al. 1979; Jackson et al. 2003; Green 2006). Bei geringer Einwirkung von Scherkräften wird der Kontakt vor allem über Fibrinogen, vWF, Fibronectin und durch das GPIIb/IIIa hergestellt. Bei stärkerer Strömung gewinnen vWF und Fibronectin an Bedeutung, in dem sie das Glykoprotein Ib-V-IX binden (Kulkarni et al. 2000). Eine Bindung kann aber auch über Fibronectin und GP IIb/IIIa oder Fibrinogen und Thrombospondin hergestellt werden (Jackson et al. 2003; Jackson 2007).

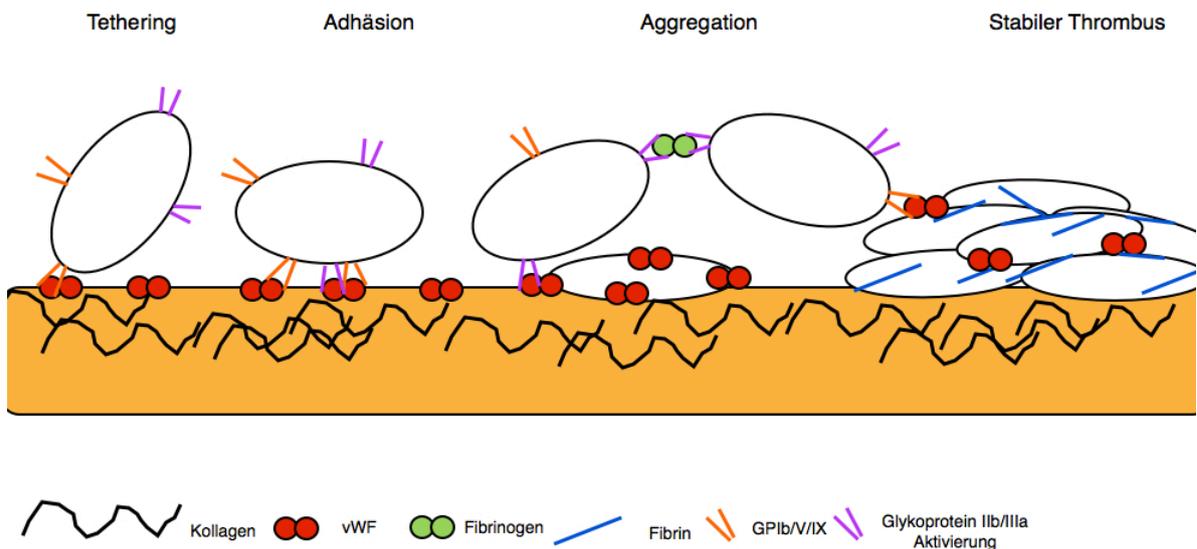


Abbildung 5. Vom Tethering zum Thrombus.

Bei Endothelverletzung werden Thrombozyten schnell aus dem fließenden Blut via „Tethering“ rekrutiert. Sie adhären mit Integrinen, wichtigste sind GPIb/V/IX und GPIIb/IIIa, und aggregieren, wobei sie ihre Granula freisetzen. Sie formen in Verbindung mit der Gerinnungskaskade, vor allem mit Fibrin, einen stabilen Thrombus.

vWF: von-Willebrand-Faktor, GP: Glykoprotein. Frei nach (Kaplan und Jackson 2011)

• **Aktivierung**

Bei Aktivierung der Thrombozyten durch G-Protein gekoppelte Signaltransduktion und intrazelluläre Kalziumerhöhung, führen diese einen sogenannten „**shape change**“ in Echinosphärozyten mit Pseudopodien und Filopodien durch („**spreading**“) (Offermanns 2006). Gleichzeitig werden ihre Granula freigesetzt und durch die parakrinen Effekte können auch die benachbarten Thrombozyten bessere Glykoprotein IIb/IIIa-Komplexe bilden, Fibrinogen binden und so zur Quervernetzung der Thrombozyten und damit zur Stabilität des Thrombus beitragen (Brass et al. 2005). Zudem bewirken die freigesetzten Granula Vasokonstriktion, locken Entzündungszellen an und wirken mitogen (siehe Abbildung 4) auf das umliegende Gewebe.

Mit Oberflächenexposition anionischer Phospholipide, vor allem Phosphatidylserin, werden Bindestellen für Kofaktoren der Gerinnungskaskade (Faktoren Va, VIIa, IXa, Xa) bereitgestellt (Savage et al. 1998; Gawaz et al. 2000). Durch Aktivierung der Thrombozyten werden deren α -Granula aber auch „Dense Granula“ frei. Die **Degranulation** führt zur autokrinen und parakrinen Verstärkung des Aktivierungsprozesses und damit zur irreversiblen Aggregation. (Ruggeri 2002; Jackson 2007)

Eine Vielzahl weiterer Substanzen kann die Aktivierung der Thrombozyten auslösen. Einen besonderen Stellenwert nimmt hier ADP ein, das sowohl von geschädigtem Gefäßwandgewebe wie auch von Endothelzellen und Erythrozyten freigesetzt wird und ebenso über membranständige Rezeptoren der Thrombozyten wirkt.

• **Aggregation**

Als Aggregation bezeichnet man die stabile Kohäsion von 2 oder mehr Thrombozyten untereinander. Die Aktivierung des GP IIb/IIIa stellt die Voraussetzung sowohl zur Adhäsion als auch zur Aggregation dar (Wagner et al. 1996). Adhäsionsmoleküle wie vor allem Fibrinogen, aber auch vWF und Fibronektin aus dem Plasma binden an speziellen Bindungsstellen, die erst durch Thrombozytenaktivierung freigelegt werden, an das GPIIa/IIIb (Kulkarni et al. 2000). Inhaltsstoffe der Thrombozytengranula festigen die Bindung irreversibel (Ruggeri 2002; Offermanns 2006; Jackson 2007).

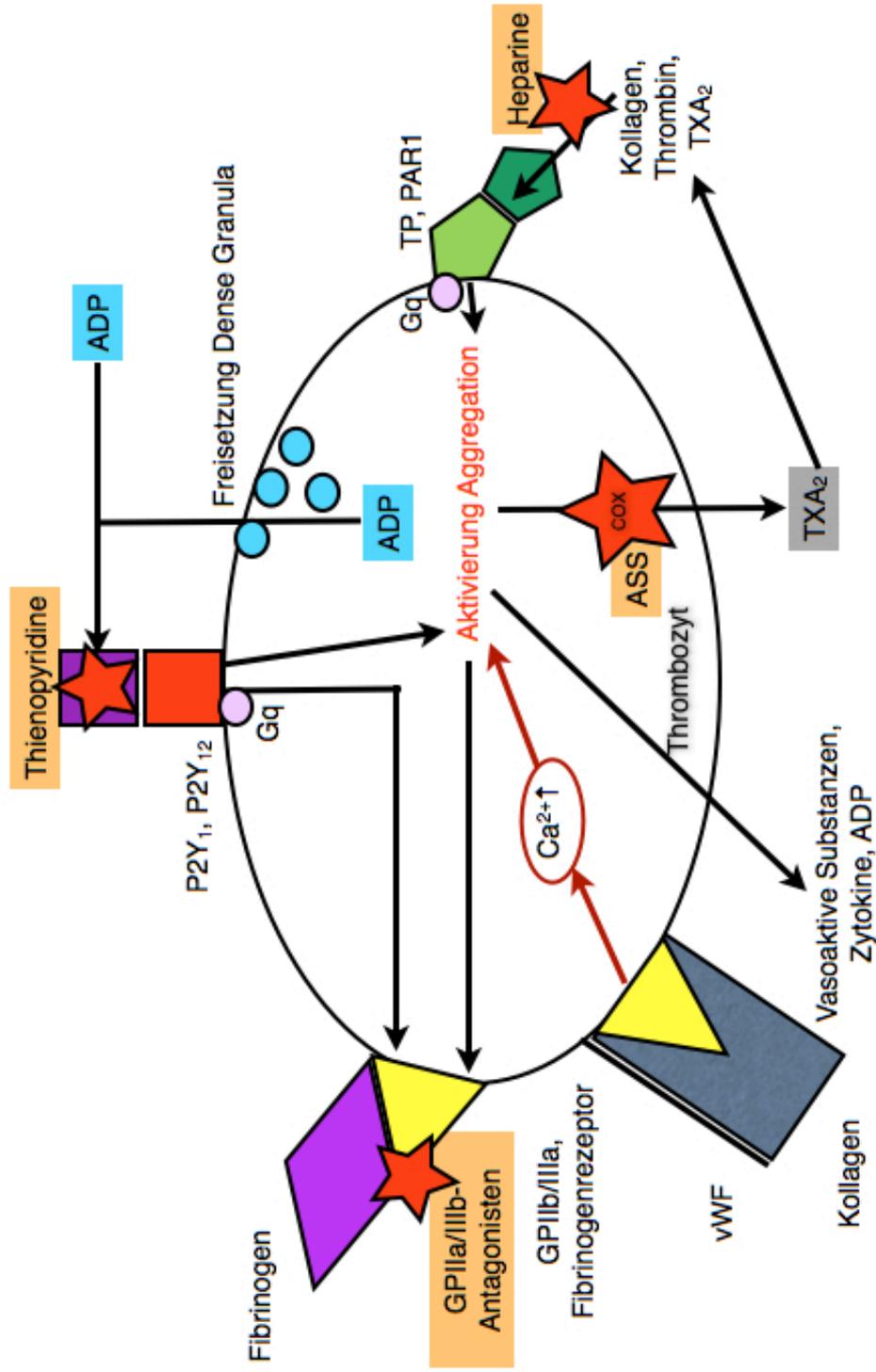


Abbildung 6. Aktivierung des Thrombozyt.

Thrombozyten können über verschiedene Mechanismen aktiviert werden. Dort setzen auch verschiedene antikoagulatorische Medikamente an (orange markiert).

ADP: Adenosindiphosphat; Ca²⁺: Kalzium; COX: Cyclooxygenase; ASS: Acetylsalicylsäure; Gq: G-Protein; GP: Glykoprotein; TP: Thromboxanrezeptor; PAR1: Thrombozytenproteinase-aktivierter Rezeptor1; P2Y: Purinergischer Rezeptor; TXA₂: Thromboxan A₂; vWF: von-Willebrand-Faktor. Frei nach (Grumann et al. 2007; Badimon et al. 2009; Kaplan und Jackson 2011).

• Inhibition

Der Thrombozytenaggregation entgegengesetzt wirken verschiedene Mechanismen, um die Größe des Thrombus zu begrenzen und im physiologischen Zustand keine Gerinnung des Blutes zuzulassen.

Über Stickstoffmonoxid-Freisetzung verhindern Endothelzellen am Rande der Läsion die Konformationsänderung des GP IIb/IIIa über eine Erhöhung der cGMP-Spiegel und folgend eine Senkung des Kalziumspiegels. Über die Freisetzung von Prostaglandin aus Endothelzellen wird dem Gefäßspasmus entgegengewirkt (Offermanns 2006; Davi und Patrono 2007).

1.2.3 Rolle der Thrombozyten im akuten Myokardinfarkt

Die Rolle der Thrombozyten im Myokardinfarkt geht weit über die Formation des Thrombus hinaus. Thrombozyten interagieren in verschiedenen Stadien mit artherosklerotischen Läsionen. So sind sie sowohl an der Formation des Plaque beteiligt, wie auch an der Plaqueruptur. Schon mit Beginn der Dysfunktion des Endothels in initialen Stadien der Plaquebildung, z.B. aufgrund erhöhten Blutdruckes oder anderer Erhöhung der Scherkräfte, können sie über P-Selektin adhärieren (Kulkarni et al. 2000; Merten et al. 2000; Davi und Patrono 2007). Die aktivierten Thrombozyten sezernieren chemotaktische Stoffe wie Interleukin 1- β , prokoagulatorische, adhäsions- und inflammationsbegünstigende Stoffe. Dadurch wird die Immigration von Leukozyten erleichtert und die Entzündungsreaktion verstärkt. Über NF κ B werden die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, MCP-1 und andere proinflammatorische Zytokine exprimiert, was wiederum die Adhäsion und Aktivierung weiterer Thrombozyten begünstigt und Lymphozyten und Monozyten rekrutiert. Es entsteht ein sich selbst verstärkender Prozess (Brand et al. 1996; Gawaz et al. 1998; Collins und Cybulsky 2001; Faraday et al. 2001; Massberg et al. 2002; Gawaz et al. 2005; Davi und Patrono 2007).

Mitogene Stoffe aus den Thrombozyten bewirken ein Fortschreiten des Wachstums der Leukozyten und Fibroblasten. Mit Querschnittszunahme des Plaque stenosierte das Gefäß wobei eine Größenzunahme auch mit erhöhter Instabilität einhergeht. Eine systemische Aktivierung und Degranulation von zirkulierenden Thrombozyten kann über verschiedene Mechanismen zum Beginn und zur Verstärkung der Artherosklerose führen (Gawaz et al. 1999). Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder Nikotinabusus beispielsweise bewirken einen Anstieg der Fibrinogen-Bindung an aktivierte Blutplättchen und vermehrte Freisetzung des P-Se-

lektins (Pawlowska et al. 1993; Andrioli et al. 1996; Gawaz et al. 1999). Auch die Anwesenheit von oxidiertem LDL ermöglicht über eine Unterdrückung der NO-Produktion eine lokale Aktivierung von Thrombozyten (Lusis 2000).

Im akuten Myokardinfarkt scheint die Aktivität von Fibrinogenrezeptoren, anderen Adhäsionsrezeptoren und die Expression von P-Selektin sogar noch erhöht zu sein (Gawaz et al. 1999).

1.2.4 Thrombozytenaggregationshemmer

Eine der wichtigsten Therapie-Strategien zur Prophylaxe und Behandlung von thrombembolischen Komplikationen ist die Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Patienten mit kardio- und cerebrovaskulären Erkrankungen. Am häufigsten eingesetzt wird Acetylsalicylsäure, ein Cyclooxygenase (COX) - Inhibitor, zusätzlich oft mit Substanzen ergänzt, die über weitere Mechanismen wirken: ADP-Rezeptor-Antagonisten (Thienopyridine) und GPIIb/IIIa Rezeptorantagonisten (Krotz et al. 2008).

Acetylsalicylsäure hemmt im Thrombozyten selektiv und irreversibel die COX-1 durch Acetylierung der Hydroxylgruppe eines Serinrestes (Roth und Majerus 1975; Loll et al. 1995). Dadurch wird vor allem die Aggregation aufgrund von Arachidonsäure gehemmt. Obwohl es bereits nach einmaliger Einnahme zu signifikanter Verlängerung der Blutungszeit kommen kann, ist Acetylsalicylsäure ein relativ schwacher Wirkstoff: Bei Aktivierung durch hohe Konzentrationen von Thrombin, TRAP-6 (Thrombin-Rezeptor-Aktivierendes Peptid-6), ADP oder Kollagen wird die Aggregation der Thrombozyten nur wenig beeinflusst (Rinder et al. 1993; Kariyazono et al. 2004; Toth et al. 2006). Zahlreiche klinische Studien weisen den Nutzen der Acetylsalicylsäure-Therapie nach (Madsen et al. 1989; Baigent et al. 1998; Lievre und Cucherat 2010). Allerdings wurden auch sehr viele interindividuelle Unterschiede der Wirkstärke von Acetylsalicylsäure gefunden und es gibt dosisabhängige Nebenwirkungen wie gastrointestinale Blutungen (Patrono 1994; Hankey und Eikelboom 2004; Jolly et al. 2009).

Thienopyridine wie Clopidogrel oder Prasugrel wirken über die irreversible Inaktivierung von P2Y₁₂-Rezeptoren und sind damit ähnlich effektiv wie Acetylsalicylsäure, zeigen aber weniger Nebenwirkungen (1996; Sabatine et al. 2005; Wiviott et al. 2007). Großangelegte Studien konnten zeigen, dass die Kombination von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel noch effektiver ist als die Gabe einer Einzelsubstanz (Harker et al. 1999; Steinhubl et al. 2002; Eshaghian et al. 2007). Aber auch bei Thienopyridinen gibt es Resistenzen und Nebenwirkungen (Wiviott et al. 2007).

GP1Ib/IIIa-Rezeptor-Antagonisten hemmen die Fibrinogenbindung des GP1Ib/IIIa-Rezeptors auf der Oberfläche von Thrombozyten. Eingesetzt werden monoklonale Antikörper (Abciximab), zyklische Peptide (Eptifibatid) und synthetische Peptidomimetika (Tirofibran) (Krotz et al. 2008). Hier wurden noch keine Resistenzen beschrieben, jedoch vermehrt Blutungskomplikationen.

1.3 Erythropoietin

1.3.1 Struktur, physiologische Herkunft und Metabolisierung

Erythropoietin (EPO) wird auf Chromosom 7 codiert. Es ist ein Hormon, das aus 165 Aminosäuren besteht (Imai et al. 1990). EPO wiegt 30,4 kDa und besitzt vier glykosylierte Seitenketten, die paarig verbunden sind (Davis et al. 1987; Kawasaki et al. 2001). Da nach Reduktion von Disulfidbrücken zwischen je zwei Cystinresten an Position 7 und 160, sowie 19 und 33 ein Aktivitätsverlust nachgewiesen wird, geht man davon aus, dass dort die biologische Aktivität lokalisiert (Wang et al. 1985). Erythropoietin-Mengen werden meist in „Units“ (U) angegeben, wobei 1 U EPO die selbe Wirkung in Versuchstieren hervorruft wie 5 μmol Chlor-Kobalt. Die spezifische Aktivität von reinem, rekombinantem, humanem EPO ist 130,000 U/mg des vollständig glykosylierten Proteins (Jelkmann 2004).

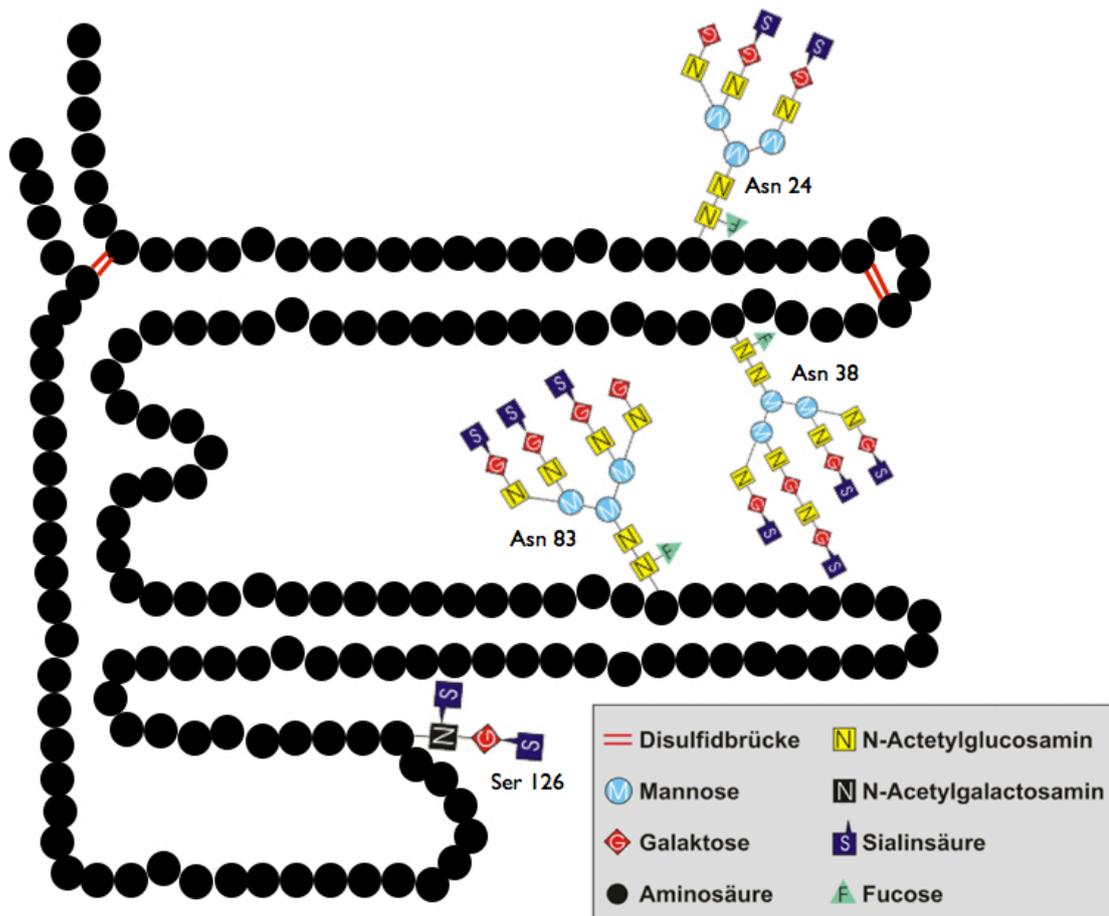


Abbildung 7. Aufbau des Erythropoietins.

EPO besteht aus 165 Aminosäuren, die vier glykosylierte Seitenketten tragen. (Jelkmann 1992; Lappin 2003; Jamiri 2007)

EPO wird von Erwachsenen hauptsächlich in peritubulären, Fibroblasten-ähnlichen Nierenparenchymzellen produziert (Bachmann et al. 1993). Die Produktion von EPO wurde aber auch in Zellen von Leber, Milz, Lunge, Uterus, Hoden oder sogar dem Gehirn nachgewiesen; dort als etwas kleineres Molekül (Masuda et al. 1994; Jelkmann 2004). Der Hauptstimulus dazu wird durch Gewebehypoxie ausgelöst, d.h. bei Menschen mit intakter Nierenfunktion steigt die Plasmakonzentration von EPO mit sinkender Hämoglobinkonzentration, sinkendem Blutfluss, aber auch mit sinkendem Sauerstoffpartialdruck (z.B. Höhengedächtnis) (Jelkmann 1992). Normale Serumspiegel von EPO liegen in der Regel zwischen 10 und 25 U/l (Foley 2008).

Die Mechanismen der Elimination sind noch nicht vollständig erforscht. Es könnte Eliminationsmechanismen in Niere und Leber geben, zudem gibt es Hinweise auf eine Aufnahme v.a. in Zellen des Knochenmarks über den EPO-Rezeptor.

EPO muss an einen spezifischen Rezeptor binden, um seine biologische Wirksamkeit zu entfalten. Die EPO-Rezeptoren bestehen aus drei Domänen, einer extrazellu-

lären, einer transmembranären und einer intrazellulären (Lappin 2003). Ein Molekül EPO bindet an zwei Rezeptormoleküle an der Zellaußenseite. Durch diese Dimerisierung ändert sich die Konformation des Rezeptors. Dadurch wird eine Janus Kinase 2, eine Tyrosinkinase, aktiviert (Livnah et al. 1999; Remy et al. 1999), die verschiedene Signaltransduktionswege anschaltet. Die Signalkaskaden bewirken die Transkription spezifischer Gene im Zellkern oder öffnen Ionenkanäle in der Zellwand. Hauptakteure der beteiligten Signalwege sind die folgenden Genprodukte, Enzyme und Transaktivatoren:

- Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase und AKT (Proteinkinase B)
- MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und STAT 5 („Signal Transducer and Activator of Transkription“)
- Proteinkinase C
- Phospholipase C
- NF- κ B (Nukleärer Faktor κ B)

1.3.2 Wirkung

Über die oben erwähnten verschiedenen Signaltransduktionswege entfaltet EPO seine Wirkung durch:

- Blockierung der Apoptose
- Vasodilatation
- Reduktion von Sauerstoffradikalen
- Öffnen von Kaliumkanälen
- Öffnen von Kalziumkanälen
- Anti-Inflammatorische Effekte

Erstmals von Miyake et al isoliert (Miyake et al. 1977) erkannte man zunächst nur den Einfluss von EPO auf Produktion, Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Erythrozyten im Knochenmark und damit auf den Hämatokrit (Eschbach et al. 1987). Mittlerweile wurden noch viele weitere Zellen mit EPO-Rezeptoren gefunden. Einige davon sind in folgender Tabelle angeführt:

Tabelle 1. Wirkungsorte von EPO.

Gewebe	Zellart	Wirkung
Verschiedene Areale des Gehirns	Neuronen, Astrozyten, Mikroglia	↓ Nekrose/Apoptose/Inflammation/Hirnödem ↓ Infarktgrösse nach Ischämie
Bewegungsapparat	Skelettmuskelzellen	unbekannt
Gefäßsystem	Endothel, glatte Muskelzellen	↑ Proliferation, Migration
Herz	Myozyten (Epicard, Pericard)	evtl. ↓ Nekrose/Apoptose nach Ischämie
Niere	Peritubuläre Zellen, Mesangium, Epithel	↓ Nekrose/Apoptose nach Ischämie
Knochenmark	Erythroide Vorläuferzellen, myeloide Zellen, Megakariozyten	↑ Zellproliferation und -differenzierung
Reproduktionsorgane	Prostata, Plazenta, Uterus	↑ Testosteronproduktion, Gefäßneubildung
Brustkrebs, Zervixkarzinome, hepatische und renale Karzinome	Zelllinien: MCF-7, BT549 (<i>in vitro</i>)	↑ Zellproliferation (fraglich)

Die Tabelle zeigt einige Wirkungsorte von EPO, auf welche Zellart es welche Wirkung ausübt. Die Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. ↑:Steigerung; ↓Minderung. Frei nach (Anagnostou et al. 1994; Ammarguella et al. 2001; Ehrenreich et al. 2002; Jelkmann 2004; Wright et al. 2004; Depping et al. 2005; Burger et al. 2009).

Auf der Oberfläche von „colony-forming-units-erythroid“ und Pronormoblasten findet man die größte Anzahl an EPO-Rezeptoren (Sawada et al. 1990). Während der Zelldifferenzierung ändert sich die Dichte der Rezeptoren pro Zelle, so dass letztendlich Retikulozyten und reife Erythrozyten keine EPO-Rezeptoren mehr aufweisen (Wickrema et al. 1992).

1.3.3 EPO im akuten Myokardinfarkt

In verschiedenen Studien, zunächst *in vitro*, später aber auch im Tiermodell und in klinischen Studien konnte eine protektive, anti-apoptotische Wirkung von EPO auf Kardiomyozyten bei Ischämie und Reperfusion gezeigt werden (Calvillo et al. 2003; Tramontano et al. 2003; Cai und Semenza 2004; Shi et al. 2004; van der Meer et al. 2004; Bullard et al. 2005; Hanlon et al. 2005; Lipsic et al. 2008). Infarktareale waren kleiner und weniger Zellen gingen zu Grunde.

Es wird vermutet, dass EPO die Ischämie-induzierte Neubildung von Gefäßen unterstützt, in dem es eventuell die Endothelzellen direkt stimuliert, deren Proliferation und sogar Migration fördert, die Gefäßintegrität durch Festigung von Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakten stabilisiert und damit den Blutfluss und die Sauerstoffzufuhr erhält (Anagnostou et al. 1990; van der Meer et al. 2004; Prunier et al. 2007; Mastromarino et al. 2011). Indem es CD34+/CD45+ Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisiert, könnte es ebenso zur Reparatur von ischämischen Gefäßschäden oder auch zur Vaskuloneogenese beitragen (Heeschen et al. 2003; van der Meer et al. 2005; Ferrario et al. 2011; Kawachi et al. 2012). In den ersten Tagen nach akutem Myokardinfarkt verbessern intrakoronar verabreichte Progenitorzellen die kardiale Funktion nach vier Monaten ebenso wie nach einem Jahr. Dieser Effekt war aber bei der BOOST Studie nach zwei und fünf Jahren nicht mehr nachweisbar (Meyer et al. 2006; Schachinger et al. 2006; Meyer et al. 2009). Auch die Ergebnisse der REPAIR-AMI Studie werden kontrovers diskutiert. So fanden Lunde et al. keine Unterschiede zwischen Patienten mit akutem Myokardinfarkt, denen Progenitorzellen zugeführt wurden oder nicht (Lunde et al. 2006). Westenbrink et al. versuchten zu klären, welche Mechanismen hier konkret zur möglichen Verbesserung der Herzfunktion beitragen. Sie fanden die Progenitormobilisierung und die „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF)-Expression (Westenbrink et al. 2007), da VEGF zur Proliferation von Endothelzellen und Chemotaxis von endothelialen Vorläuferzellen führte.

Auch an der embryonalen Angiogenese ist EPO beteiligt, was nahelegt, dass EPO auch im Erwachsenenalter weiter Einfluss auf die Angiogenese haben könnte. Lipsic et al. fanden heraus, dass EPO die Vasculogenese induziert (Lipsic et al. 2008) und Moon et al. zeigten eine Verbesserung der Herzfunktion, sogar wenn die EPO-Therapie erst drei Wochen nach Myokardinfarkt begonnen wurde. Weil sowohl die Kapillardichte wie auch das Verhältnis von Kapillaren pro Myozten sich besserte, vermutet man auch hier Neovaskularisation als Grund für die Verbesserung der Herzfunktion (van der Meer et al. 2005).

Aber auch Kardiomyozyten, sowohl im Ventrikel als auch im Vorhof, haben selbst EPO-Rezeptoren und es gibt Hinweise, dass EPO über diese direkt auf die Kardiomyozyten oder Fibroblasten wirken könnte (Parsa et al. 2003; Depping et al. 2005). Calvillo et al. und auch Tramontano et al. zeigten an Rattenkardiomyozyten *in vitro* die anti-apoptotische Wirkung von EPO (Calvillo et al. 2003; Tramontano et al. 2003). Parsa et al. ergänzten, dass EPO *in vitro* auch die Apoptose aufgrund von oxidativem Stress oder Noxen minderte (Parsa et al. 2003). Dann wurde *in vivo* im Reperusionsmodell an Tieren (Ratten, Kaninchen) die Umsetzung dieser Daten gezeigt (Cai et al. 2003; Parsa et al. 2003; Tramontano et al. 2003). Vermutlich wurde hier die Wirkung über den EPO-Rezeptor, den Phosphatidylinositol-3-kinase und den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg vermittelt (Cai und Semenza 2004; Bullard et al. 2005; Hanlon et al. 2005). Shi et al. ergänzten, dass bei der Signaltransduktion Kalium-Kanäle eine wichtige Rolle spielen (Shi et al. 2004). Sterin-Borda et al. fanden auch eine Wirkung von EPO auf die Kontraktilität von Mäusekardiomyozyten (Sterin-Borda et al. 2003).

In ersten klinischen Studien wurde auch die Verträglichkeit von EPO im akuten MI und Schlaganfall geprüft und bestätigt (Ehrenreich et al. 2002; Ozawa et al. 2010). Deutlich wurde hier auch die reduzierte Aktivität des Caspase-3 Signalwegs festgestellt, sodass deutlich weniger Kardiomyozyten apoptotisch wurden (van der Meer et al. 2004). Vor allem die EPO-Behandlung vor Ischämie reduzierte deutlich die Größe des Infarktareals um bis zu 50% (Calvillo et al. 2003; Parsa et al. 2003). Auch demonstrierten Parsa et al. die antiapoptotischen Effekte bei Gabe von EPO sowohl vor, während und nach der Ischämiephase (Parsa et al. 2004).

Von Latini et al konnte gezeigt werden, dass EPO eine anti-inflammatorische Wirkung ausübt, was ebenso zur Minderung des ischämischen Schadens beitragen könnte, wie es das Fortschreiten des chronischen Herzversagens mindert (Latini et al. 2008). Ischämie induziert eine Entzündungsreaktion, indem es den NF- κ B und den AP-1 (Aktivator-Protein-1) Signalweg aktiviert. Dadurch wird TNF α hochreguliert, was wiederum die Zytokin-Kaskade triggert und zur Akkumulation von Neutrophilen führt, die auch das Gewebe zusätzlich schädigen können. Der kardioprotektive Effekt könnte also mitbedingt sein durch die Hemmung der Entzündungsreaktion bei Ischämie (Liu et al. 2006). Doch ließ sich in einer kleinen Studie keine Reduktion der inflammatorischen Zytokine aufgrund von perioperativer EPO-Gabe bei Bypasschirurgie nachweisen (Poulsen et al. 2009).

In einer ersten Metaanalyse verschiedener klinischer Studien fanden Li et al. eine leichte, aber statistisch signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektions-

fraktion (LVEF) nach EPO im akuten Infarkt und sogar einen Langzeiteffekt in einer Subgruppenanalyse (Li et al. 2012). Sie befürworten die möglichst hoch dosierte, möglichst frühzeitige Administration von EPO. Moon et al. etablierten 150 U/kg Körpergewicht als kleinstmögliche noch effektive Dosis, um Apoptose und entsprechend auch die Größe des Infarktareals zu reduzieren, wenn diese direkt nach Einsetzen der Ischämie gegeben wurde. Nach acht Stunden ging diese Wirkung bereits verloren. Viel höhere Dosen (bei Moon et al 3000 U/kg Körpergewicht) wurden jetzt noch bis 12 Stunden nach Ischämie wirksam, allerdings konnte keine Wirkung mehr nach 24 Stunden nachgewiesen werden (Moon et al. 2005).

1.3.4 Hinweise auf Akzeleration thrombembolischer Ereignisse

Dennoch zeigten sich in Oleas Studie mit Schafen, Kristensens Versuch mit Schweinen, sowie in grösser angelegten klinischen Studien keine Unterschiede in der Herzfunktion oder der Infarktgrösse (Kristensen et al. 2005; Olea et al. 2006; Ott et al. 2010; Taniguchi et al. 2010; Voors et al. 2010; Najjar et al. 2011; Suh et al. 2011). Stattdessen nahmen die thrombembolischen Ereignisse tendenziell sogar zu: Bei der REVEAL Studie ebenso, wie bei unserer REVIVAL-3 Studie (Ott et al. 2010; Najjar et al. 2011). Unklar sind ihre Ursachen. Es gibt verschiedene Ansatzpunkte zur Erklärung dieser Beobachtungen:

EPO induzierte die Mobilisation von Retikulozyten und ließ, über einen längeren Zeitraum angewandt, auch die Gesamterthrozytenmasse im peripheren Blut steigen, wodurch sich rheologische Eigenschaften des Bluts auf ungünstige Weise änderten (Eschbach et al. 1987; Corti et al. 2003).

Zudem wirkte EPO auf Megakaryozyten im Knochenmark, erhöhte die Thrombozytenanzahl im peripheren Blut und änderte möglicherweise aggregatorische Eigenschaften (Tsukada et al. 1990; Wolf et al. 1997). Dies schien jedoch stark von der Eisenzufuhr der Individuen abhängig zu sein (Loo und Beguin 1999). Tang et al. postulierten, dass die Gabe von EPO bis zu Dosen von 200 U/kg keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregationshemmung mit Aspirin oder Clopidogrel hat. 400 U/kg jedoch schwächte die Wirkung dieser Substanzen ab (Tang et al. 2007).

Bisher ungeklärt ist der Einfluss von EPO auf die Thrombozytenfunktion. Im Mausmodell zeigt sich vermehrte Thrombozythenadhäsion unter EPO-Behandlung bei Extremitätenischämie (Kato et al. 2010). Wolf et al. beobachteten, dass die aufgrund von EPO-Therapie neu gebildeten Thrombozyten zunächst hyperreaktiv waren (Wolf et al. 1997). Stohlawetz et al. fanden bei der Untersuchung der Thrombozytenfunktio-

on gesunder Probanden mit TRAP auch vermehrt reaktive Thrombozyten nach EPO-Gabe (Stohlawetz et al. 2000). Ähnliche Ergebnisse gab es bei Patienten, die aufgrund anderer Erkrankungen mit EPO behandelt wurden (Taylor et al. 1992; Tassies et al. 1998; Homoncik et al. 2004).

Auch deuteten die *in vitro* Untersuchungen von Fuste et al. darauf hin, dass die Stimulation der Endothelzellen, von EPO initiiert, ebenso eine erhöhte Thrombogenität verursachte (Fuste et al. 2002). Heinisch et al. fanden bei der Behandlung von Gesunden mit EPO reaktivere Thrombozyten und Endothelzellen (Heinisch et al. 2012). Als Nebenwirkungen der Gabe hoher Dosen EPO bei akutem Myokardinfarkt könnten Bluthochdruck oder Bluthochdruckphasen und Gefäßthrombosen auftreten, die in Einzelfällen zum Tod führten (Fishbane und Besarab 2007; Liem et al. 2009; Pfeffer et al. 2009).

2 Zielsetzung

Viele *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigten, dass EPO außer der lang bekannten Stimulation der Erythropoese noch eine Vielzahl weiterer Eigenschaften besitzt. EPO-Rezeptoren finden sich zudem auf weiteren Zellarten. Seine protektive Wirkung auf Infarktgröße und Zelluntergang im Ischämie- und Reperusionsmodell wird kontrovers diskutiert (Calvillo et al. 2003; Shi et al. 2004; Wright et al. 2004; Bullard et al. 2005; Hanlon et al. 2005; Namiuchi et al. 2005; Najjar et al. 2011; Suh et al. 2011).

Die hohen Erwartungen wurden dennoch von EPO nicht erfüllt, da in großen, klinischen Studien keine Unterschiede gefunden werden konnten. Im Gegenteil, es zeigte sich in zwei dieser Studien eine Erhöhung der Nebenwirkungen, wie Restenoseraten und thrombembolischen Ereignissen (Ott et al. 2010; Najjar et al. 2011). In der Langzeitbehandlung mit EPO (Singh et al. 2006; Pfeffer et al. 2009) ist dies bereits bekannt und auch unter Kurzzeittherapie konnte im Tiermodell (Berridge et al. 1988; Tsukada et al. 1990; Wolf et al. 1997; Loo und Beguin 1999) ebenso wie in gesunden Probanden (Stohlawetz et al. 2000) eine Erhöhung der Thrombozytenzahlen nachgewiesen werden. Diese erhöhten Thrombozytenzahlen oder auch eine gesteigerte Thrombozytenfunktion könnten Hintergrund für diese thrombembolischen Nebenwirkungen sein. Bisher gibt es wenig Erkenntnisse dazu. Dies wären jedoch wichtige Informationen, um nicht weitere Patienten dem erhöhten Risiko thrombembolischer Ereignisse und somit auch einem erhöhten Mortalitätsrisiko aufgrund einer Therapie mit EPO auszusetzen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkungen von EPO auf die Thrombozytenfunktion und -aggregation genauer zu erforschen und hierfür nachzuweisen,

- ob sich die Thrombozytenreaktivität auf verschiedene Testreagenzien bei Inkubation mit EPO *in vitro* verändert?
- ob die Zahl der Thrombozyten bei EPO-Gabe auch im ST-Hebungsinfarkt (STEMI) ansteigt?
- ob die Thrombozytenfunktion sich bei EPO-Gabe verändert?
- wie sich die Reaktivität der Thrombozyten auf verschiedene Testreagenzien bei EPO-Gabe verhält?

Hierfür wurde zunächst ein *in-vitro*-Versuch mit 10 gesunden Probanden durchgeführt und dann ein prospektives, doppelblindes, randomisiertes, Placebo-kontrolliertes Studienmodell gewählt und im Rahmen der REVIVAL - 3 - Studie (= **Regeneration of Vital Myocardium in ST-Segment Elevation Myocardial** Infarction by Erythropoietin) (Ott et al. 2010) mit einer experimentelle Substudie ausgewertet.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsserie *in vitro*

3.1.1 Versuchsaufbau

Um die Auswirkung von EPO auf die Thrombozyten bei gesunden Probanden *in vitro* zu untersuchen, wurde eine Versuchsreihe mit zehn Probanden durchgeführt. Die Probanden waren zwischen 21 und 26 Jahren alt, ohne vorbekannte hämatologische Erkrankungen, und hatten mindestens eine Woche zuvor keine Thrombozytenaggregationshemmer eingenommen. Ihnen wurde venös in mit Hirudin vorgefüllte Röhrchen Blut abgenommen. Zusätzlich wurde eine mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gefüllte Monovette mit Blut befüllt. Aus dem EDTA-Blutgemisch wurde mittels Durchflusszytometrie (Sysmex, Hamburg, Deutschland) das Blutbild inklusive Thrombozytenanzahl zweimalig bestimmt. Diese Werte wurden gemittelt.

Eine Verdünnungsreihe des Medikaments EPO (NeoRecormon®; Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) wurde erstellt, um die Dosierungen 250 IU/ml, 2500 IU/ml und 5000 IU/ml zu erhalten. Je 1536 μ l Blutgemisch wurden mit 64 μ l EPO aus der Verdünnungsreihe gemischt, um EPO-Dosierungen von 10 IU/ml, 100 IU/ml und 200 IU/ml zu erhalten. Nach 30 Min. und erneut nach zwei Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurde die Thrombozytenaggregation per „Multiple Electrodes Aggregation“ (MEA), (Multiplate Analyzer®, Dynabyte, München) wie publiziert gemessen (Toth et al. 2006; Seyfert et al. 2007; Sibbing et al. 2008; Sibbing et al. 2008). Je zwei Proben wurden jeweils ohne EPO mit entsprechender Menge NaCl-Gemisch verdünnt und ebenso über 30 Min oder zwei Stunden inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine Stunde nach Blutentnahme mit dem bei Raumtemperatur gelagerten Hirudin-Blutgemisch erneut zwei Blutproben mit 100 IU/ml EPO bei 37°C inkubiert und nach weiteren 30 Min. oder zwei Stunden erneut gemessen.

3.1.2 Thrombozytenaggregation

Die Messung der Thrombozytenaggregation per MEA (Multiplate Analyzer®, Dynabyte, München) lief wie folgt ab: Eine Probe Vollblut, wurde im Verhältnis 1:2 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt und für 180 Sekunden in der Testzelle bei 37°C gerührt. Anschließend werden je 20 μ l der verschiedenen Stimulanzen zugegeben und die Aggregation kontinuierlich über fünf Minuten gemessen. Eine Testzelle des Ge-

räts beinhaltet zwei unabhängige Sensor-Einheiten, die mit Silber-beschichteten Kupferdrähten an das Gerät angeschlossen sind. Die Impedanzänderung entsteht durch Anlagerung der Thrombozyten an die einzelnen Elektroden, wodurch sich der elektrische Widerstand erhöht (siehe Abbildung 8).

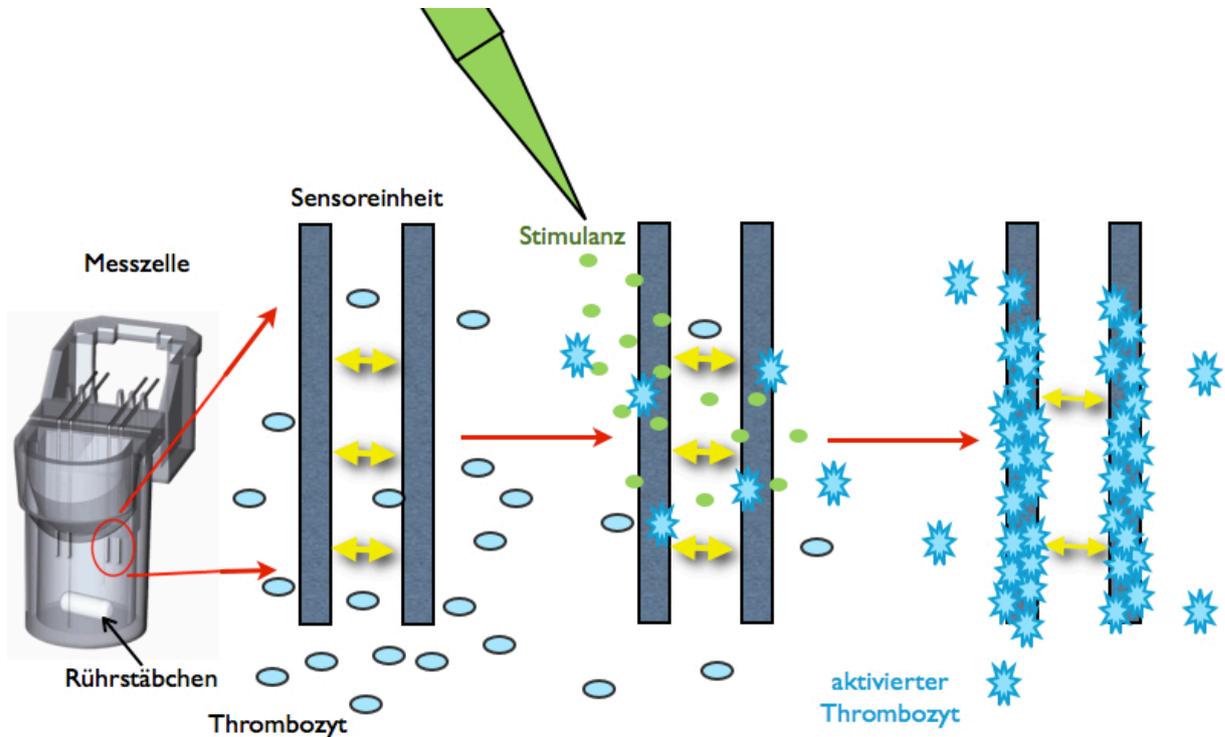


Abbildung 8. Prinzip der Aggrgationsmessung über Impedanzänderung.

In der Messzelle werden Vollblut und 0,9%ige NaCl-Lösung gemischt. Wenn das Stimulanz zugegeben wird, führen die Thrombozyten eine Konformationsänderung durch und lagern sich an die Elektroden an. Somit ändert sich der elektrische Widerstand zwischen den beiden Elektroden, was über fünf Minuten gemessen wird und als Fläche unter der Kurve (AUC) wiedergegeben wird. Modifiziert nach (Dynabyte Informationssysteme GmbH).

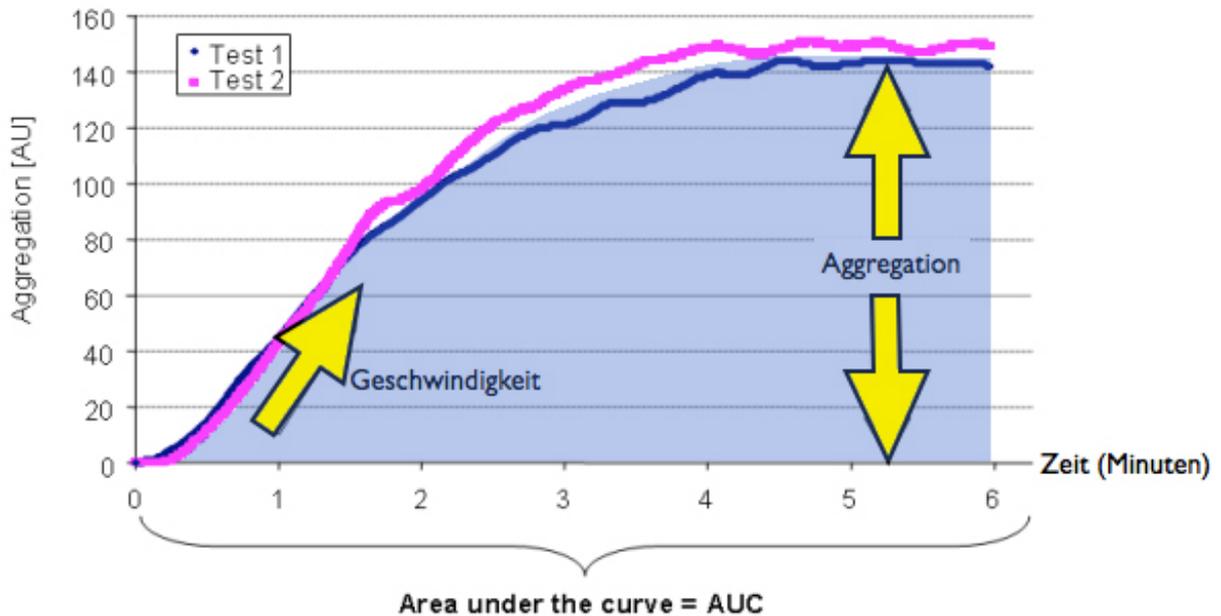


Abbildung 9. Aggregationskurve.

Die gemessenen AU werden gegen die Zeit aufgetragen, so dass eine Kurve entsteht, aus der die AUC abzulesen ist. AU: Aggregation Units, AUC: Area under the Curve. Modifiziert nach (Dynabyte Informationssysteme GmbH).

Diese Messung wird in Aggregation Units (AU) gegen die Zeit aufgetragen. 8 AU entsprechen etwa einem Ohm. Die Fläche unter der Kurve (AUC) errechnet sich aus der Höhe der Aggregationskurve sowie deren zeitlichen Verlauf und ist ein Maß für die Aggregation (siehe Abbildung 9). Es ist bekannt, dass die mit MEA gemessenen Werte und die Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozytenfunktion gut korrelieren (Sibbing et al. 2008).

Wir verwendeten vier verschiedene Stimulantien zur Messung der Thrombozytenaggregation: ADPtest-, ASPtest-, COLtest- und TRAPtest-Reagenz (siehe Abbildung 10) (Toth et al. 2006). Zudem führten wir zum Vergleich eine Messung ohne Stimulanz durch. Hier wurde stattdessen 20 μ l 0,9%ige NaCl-Lösung zugegeben.

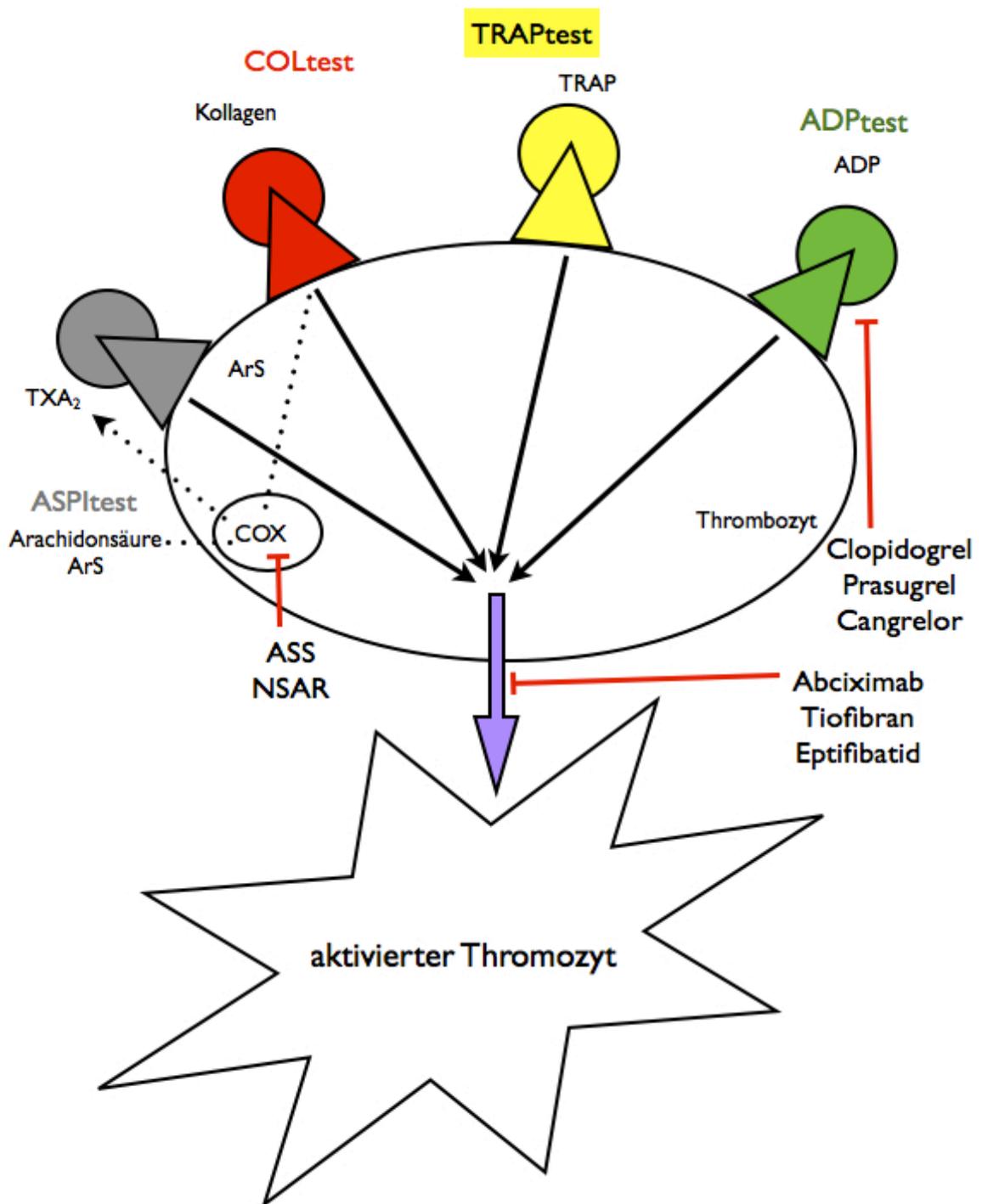


Abbildung 10. Funktionsweise der verschiedenen Testreagenzien; Einfluss der Aggregationshemmung.

TRAP, ADP und Kollagen binden direkt an Rezeptoren und bewirken die Aktivierung der Thrombozyten. Arachidonsäure wird zunächst von COX in TXA₂ umgewandelt, was dann an den spezifischen Rezeptor bindet und die Aktivierung der Thrombozyten auslöst. Thienopyridine wie Clopidogrel hemmen die Aktivierung über den ADP-Rezeptor, ASS hemmt die COX. ADP: Adenosindiphosphat; ArS: Arachidonsäure; COX: Cyclooxygenase; NSAR: Nicht-Steroidale-Antirheumatika; TRAP: Thrombinrezeptor-aktivierendes-Peptid; TXA₂: Thromboxan A₂. Frei nach (Dynabyte Informationssysteme GmbH).

ADPtest-Reagenz enthält Adenosindiphosphat, das die Thrombozyten direkt über verschiedene ADP-Rezeptoren aktiviert (Hollopeter et al. 2001; Gachet 2006; Murugappa und Kunapuli 2006). Als wichtigster wird der Rezeptor P2Y₁₂ angesehen (Bodor et al. 2003; Offermanns 2006; Davi und Patrono 2007). Dieser wird durch Thienopyridine wie Clopidogrel sowie durch direkte ADP-Rezeptor-Antagonisten blockiert (Savi und Herbert 2005). Somit führt die Einnahme dieser Medikamente zu einer verminderten Aggregation. Die Endkonzentration im Test (Multiplate Analyzer®, Dynabyte, München) war 6.5 µM ADP.

ASPItest-Reagenz enthält Arachidonsäure, was durch die Cyclooxygenase in Thromboxan A₂ umgewandelt wird, welches wiederum eine Aktivierung der Thrombozyten verursacht (Offermanns et al. 1994; Djellas et al. 1999). Bei Einnahme Cyclooxygenase-hemmender Medikamente wie Acetylsalicylsäure ergibt sich eine verminderte Aggregation. Die Endkonzentration der Arachidonsäure betrug 0.5 mM.

COLtest-Reagenz enthält Kollagen, welches an Kollagenrezeptoren bindet und dadurch zur Freisetzung von Arachidonsäure führt (Siljander und Lassila 1999). Auch hier ergibt sich also eine verminderte Aggregation bei Einnahme Cyclooxygenase-hemmender Medikamente. Die Endkonzentration von Kollagen betrug 3.2 µg/ml.

TRAPtest-Reagenz enthält Thrombinrezeptor-aktivierendes-Peptid-6 (TRAP-6), welches die Thrombozyten via Thrombinrezeptor aktiviert (Offermanns et al. 1994; De Candia et al. 2001). Dieser Vorgang wird nicht von Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel gehemmt. In der Meßzelle betrug die Endkonzentration an TRAP-6 32 µM.

3.2 Studiendesign der REVIVAL-3-Studie

Diese wissenschaftliche Dissertation bezieht sich hauptsächlich auf eine experimentelle Substudie der klinischen REVIVAL - 3 - Studie („**R**egeneration of **V**ital Myocardium in ST-Segment **E**levation Myocardial Infarction by Erythropoietin“) (Ott et al. 2010) am Medizinischen Klinikum der Technischen Universität München Rechts der Isar und dem Deutschen Herzzentrum München. Die Studie ist prospektiv, randomisiert, doppelblind und Placebo-kontrolliert.

Hierbei wurden Patienten mit akutem Myokardinfarkt im Deutschen Herzzentrum oder im Klinikum Rechts der Isar randomisiert und erhielten dreimalig Erythropoetin oder Placebo zusätzlich zur Standardmedikation.

3.2.1 Studienpopulation

Um die Effekte von EPO-Gabe im akuten Myokardinfarkt zu untersuchen, wurden Patienten mit dem ersten STEMI und einer LVEF von unter 50% ausgewählt, die innerhalb von 24 Stunden seit Symptombeginn eine erfolgreiche PCI erhielten. An der klinischen Hauptstudie nahmen 138 Patienten teil, wovon 68 EPO erhielten und 70 Placebo.

Diagnosekriterien waren:

- Mehr als 30 Minuten dauernder Brustschmerz
- Signifikante ST-Streckenhebungen (mindestens 1 mm in mindestens 2 aufeinanderfolgenden Ableitungen)
- Das Enzym Creatinkinase (CK) wurde im Verlauf beobachtet und musste auf über das Dreifache der Norm ansteigen.

Hauptausschlusskriterien:

- Alter \leq 18 Jahre oder $>$ 80 Jahre
- vorangegangene Thrombolyse zur Therapie dieses Infarkts
- Kardiogener Schock
- Kontraindikationen für Magnetresonanzuntersuchungen (MRT)
- unkontrollierter, nicht auf Therapie ansprechender Bluthochdruck von $>160/100$ mmHg
- Kontraindikationen für EPO sowie bekannte Allergie auf das Studienmedikament
- Komorbiditäten (wie Perikarditis, schwere Leber- oder Nierenfunktionsstörung, maligne Erkrankungen, Epilepsie, akute Blutung oder Blutungsneigung)
- Schwangerschaft

3.2.2 Einverständnis der Patienten

Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Patienten nahmen freiwillig an der Studie teil und konnten ihre Einverständniserklärung jederzeit widerrufen. Sie waren zum Zeitpunkt der Aufklärung voll entscheidungsfähig und wurden mündlich und schriftlich über den Ablauf, die möglichen Risiken und den Nutzen der Studie informiert (siehe Patienteninformation und Einverständniserklärung im Anhang).

Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigte die Studie.

Bei der Planung, Durchführung und der Auswertung der Studie wurden die Richtlinien der Deklaration von Helsinki wie in Südafrika (1996) und der International Conference on Harmonisation „Good Clinical Practices“ eingehalten.

3.2.3 Interventionsmaßnahme: PCI und EPO oder Placebo

Vor der PCI erhielten alle Patienten eine orale loading-dose Clopidogrel von 600 mg, 500 mg Aspirin i.v., 5000 IU unfraktioniertes Heparin i.v. .

Das Studienmedikament EPO wurde dreimal gegeben, direkt im Anschluss an die Intervention, sowie 24 und 48 Stunden danach (siehe Abbildung 12). Die Patienten erhielten zufällig intravenös über 30 Minuten 3.33×10^4 IU Erythropoietin beta (Neo-Recormon®; Hoffmann- La Roche, Basel, Schweiz) oder Placebo. Blutproben wurden vor, sowie 24, 48, 60 und 120 Stunden nach PCI abgenommen.

Das postinterventionelle antithrombotische Therapieregime beinhaltete zweimal tägliche Gabe von Clopidogrel 75 mg oral über drei Tage, danach nur einmal tägliche Gabe über drei bis sechs Monate. Aspirin 100 mg wurde zweimal täglich lebenslang verordnet. Zusätzlich erhielten die Patienten gängige Medikamente nach Verordnung des betreuenden Arztes, wie z.B. Nitrate, Betablocker, ACE-Hemmer oder Statine.

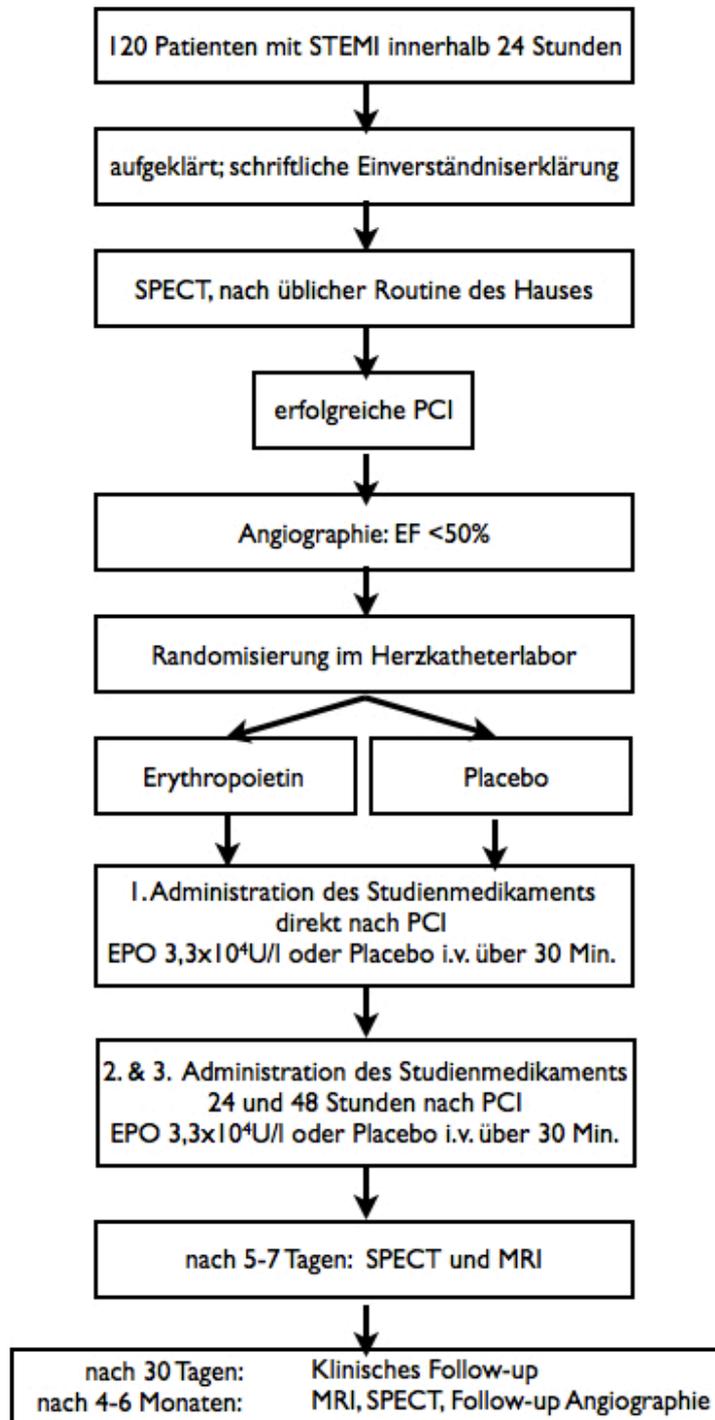


Abbildung 11. Study-Flow-Chart der REVIVAL-3 Studie.

In obiger Abbildung wird der Ablauf der REVIVAL-3 Studie verdeutlicht. Unter Beachtung der Ein- und Ausschlusskriterien erhielten eingeschlossene Patienten direkt nach erfolgreicher PCI die erste Dosis, $3,3 \times 10^4$ IU/l EPO oder Placebo. Die zweite und dritte Administration des Studienmedikaments erfolgte ebenso doppelblind nach 24 und 48 Stunden. Nach fünf bis sieben Tagen wurden SPECT und MRT durchgeführt und nach vier bis sechs Monaten inklusive Angiographie zur Nachuntersuchung wiederholt. Auch wurde eine klinische Nachuntersuchung nach 30 Tagen erhoben. EF: Ejektionsfraktion; MRI: Magnetresonanztomographie; SPECT: Single-Photon-Emissions Computertomographie; STEMI: ST-Hebungsinfarkt; PCI: Perkutane Koronarintervention.

3.3 Substudie

3.3.1 Deskriptive Parameter

Persönliche, klinische Daten wie Alter oder CVRF wurden bei Aufnahme anamnestisch erhoben. Die LVEF wurde angiographisch im Herzkatheterlabor sowie per MRT bestimmt.

3.3.2 Thrombozytenaggregation

Für die Thrombozytenaggregation wurde den Patienten fünf Mal venös Blut nach festem Zeitschema vor PCI, 12, 48, 60 und 120 Stunden danach entnommen. Dazu wurden die venösen Blutproben in mit dem Antikoagulans Hirudin vorbefüllte Blutentnahmeröhrchen eingefüllt, bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschliessend innerhalb von maximal sechs Stunden wie oben beschrieben per MEA (Multiplate Analyzer®, Dynabyte, München) von unserem Doktorandenteam gemessen, das per Bereitschaftstelefon 24Stunden/Tag erreichbar war und innerhalb von zwei Stunden das Klinikum erreicht haben musste. Die Blutproben wurden dann ohne Verzögerung ins Labor transportiert. Dort wurden die vier verschiedenen Tests mit den Stimulanzen ADP, COL, TRAP und ASPI parallel in den verschiedenen Testzellen gemessen.

3.3.3 Weitere analytische Parameter

Die Thrombozytenzahlen wurden mittels Durchflusszytometrie (Sysmex®, Hamburg, Deutschland) aus mit EDTA-antikoagulierte Vollblut ermittelt. Weiteres Blutbild, C-Reaktives Protein (CRP), CK, CK-MB, Prothrombinfragment, Retikulozyten und Hämoglobin-Wert wurden im Klinikfachlabor bestimmt.

3.4 Statistische Analyse

Es wurde eine Power von 90% gewählt, um einen 10%igen Unterschied in der Aggregation der Thrombozyten zwischen den mit EPO oder Placebo behandelten Gruppen zu sehen.

Wir errechneten (nQuery advisor, version 5.0), dass eine Mindestanzahl von 23 Patienten pro Gruppe benötigt wird. Der Kolmogorov-Smirnov Test wurde zur Überprüfung der Normalverteilung der Variablen durchgeführt, sowie auch optisch per Histogramm überprüft. Zur Suche von Unterschieden zwischen Gruppen verwendeten wir

den Mann-Whitney-U-Test bei unverbundenen Stichproben, sowie den Wilcoxon-Test bei verbundenen Stichproben, da zwar die Angaben annähernd normalverteilt und sicher T-verteilt waren, jedoch die Stichprobenanzahl weniger als 30 umfasst.

Das Signifikanzniveau α wurde auf 5% festgelegt, was also definiert, dass ein p-Wert < 0.05 z.B. im zweiseitigen T-Test als signifikant gilt. Ergebnisse berichten wir als Mittelwert \pm Standardabweichung. Grafiken wurden per SPSS (Version 19.0) und Numbers (Version 2.1) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Thrombozytenaggregation unter Einfluss von EPO *in vitro*

Bei der Untersuchung *in vitro* nahmen 10 gesunde Probanden teil, Frauen und Männer. Die Thrombozytenzahl betrug im Mittel $254 \pm 50 \times 10^9/l$.

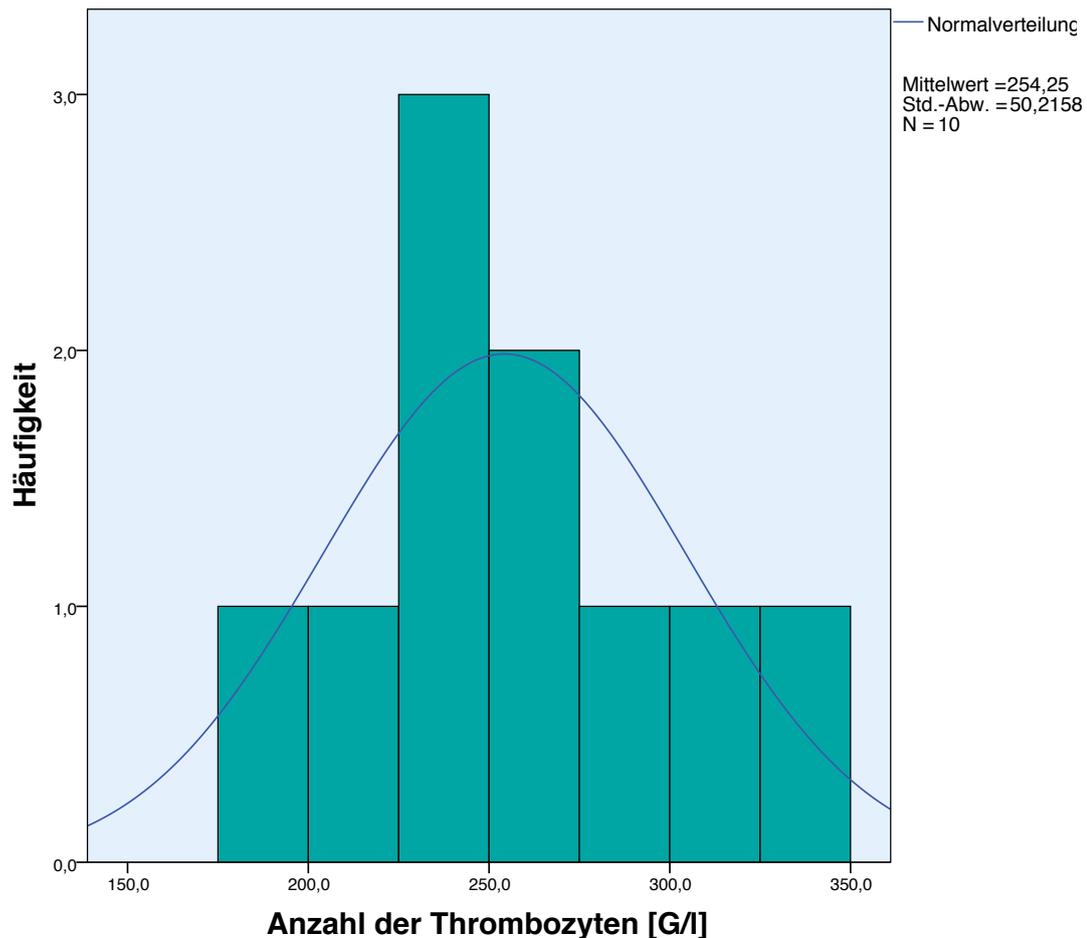


Abbildung 12. Histogramm zur Verteilung der Thrombozytenzahlen.

Angegeben ist die kumulative Anzahl der Thrombozytenzahlenwerte. Dunkelblau im Hintergrund ist die Normalverteilungskurve eingezeichnet. N: Anzahl; Std.-Abw.: Standardabweichung.

Nach Inkubation über 30 Minuten ließen sich vereinzelt kleine Unterschiede zwischen den Proben, die mit EPO inkubiert wurden zu denen, welchen kein EPO zugegeben wurde, finden. Im ADP-Test (siehe Tabelle 2, Abschnitt A) ergaben die Erhöhung der EPO Konzentration auf 10 und 100 IU EPO keine signifikanten Unterschiede. Bei der Wiederholung der 100 IU- Messung (100 IU EPO Kontrolle) fand sich ei-

ne Minderung der Aggregation mit $p = 0,037$ und bei Erhöhung auf 200 IU EPO eine weitere Minderung der Aggregation auf einen Mittelwert von 543 AU/min (p -Wert = 0,007). Im COL-Test konnte man einen Unterschied der Aggregation der mit 10 IU versetzten Probe zur Messung ohne EPO erkennen, sowie der mit 200 IU inkubierten Blutprobe (p -Wert bei beiden = 0,011). Auch hier bezog sich der Unterschied auf eine Minderung der Aggregation (siehe Tabelle 2, Abschnitt B). Bei den Messungen des TRAP-Tests ließen sich keinerlei signifikante Änderungen der Mittelwerte zwischen den einzelnen Gruppen der verschiedenen EPO-Dosierungen feststellen (siehe Tabelle 2, Abschnitt C). Eine Tendenz zu mehr Aggregation fand sich beim Vergleich der ASPI-Messungen mit 10 IU EPO und ohne EPO feststellen. Der Wilcoxon-Test ergab hier einen p -Wert von 0,05. Bei allen weiteren Dosierungen wurden auch hier keine signifikanten Unterschiede beobachtet (siehe Tabelle 2, Abschnitt D).

Tabelle 2. Messung der Thrombozytenaggregation nach 30 Minuten Inkubation.

A)

ADP-Test nach 30 Minuten Inkubation	MW [AU/min]	SD	SEM	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	647	197,08	62,32	
10 IU EPO	605,6	194,22	61,42	0,169
100 IU EPO	600,3	107,76	34,08	0,241
100 IU EPO Kontrolle	585,6	187,27	59,22	0,037
200 IU EPO	534	172,49	54,55	0,007

B)

COL-Test nach 30 Minuten Inkubation	MW [AU/min]	SD	SEM	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	817,3	123,46	39,04	
10 IU EPO	850,1	209,42	66,22	0,508
100 IU EPO	711,2	116,54	36,85	0,011
100 IU EPO Kontrolle	773,9	118,21	37,38	0,221
200 IU EPO	732,9	95,01	30,04	0,011

C)

TRAP-Test nach 30 Minuten Inkubation	MW [AU/min]	SD	SEM	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	986,6	110,42	34,92	
10 IU EPO	958,1	115,33	36,47	0,386
100 IU EPO	914,9	135,01	42,69	0,074
100 IU EPO Kontrolle	1019,8	127,17	40,21	0,285
200 IU EPO	956,7	120,62	38,14	0,221

D)

ASPI-Test nach 30 Minuten Inkubation	MW [AU/min]	SD	SEM	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	748,6	107,95	34,14	
10 IU EPO	891,2	191,17	60,45	0,005
100 IU EPO	730,8	111,67	35,31	0,241
100 IU EPO Kontrolle	789,9	148,71	47,03	0,139
200 IU EPO	722,3	128,87	40,75	0,386

Diese Tabellenserie zeigt die nach dreißig Minuten gemessenen Mittelwerte (MW) der Thrombozytenaggregation, mit Standardabweichung (SD), Standard Error of the Mean (SEM) und P-Werte nach Zugabe von verschiedenen Dosierungen von EPO im Vergleich zu Messungen ohne EPO.

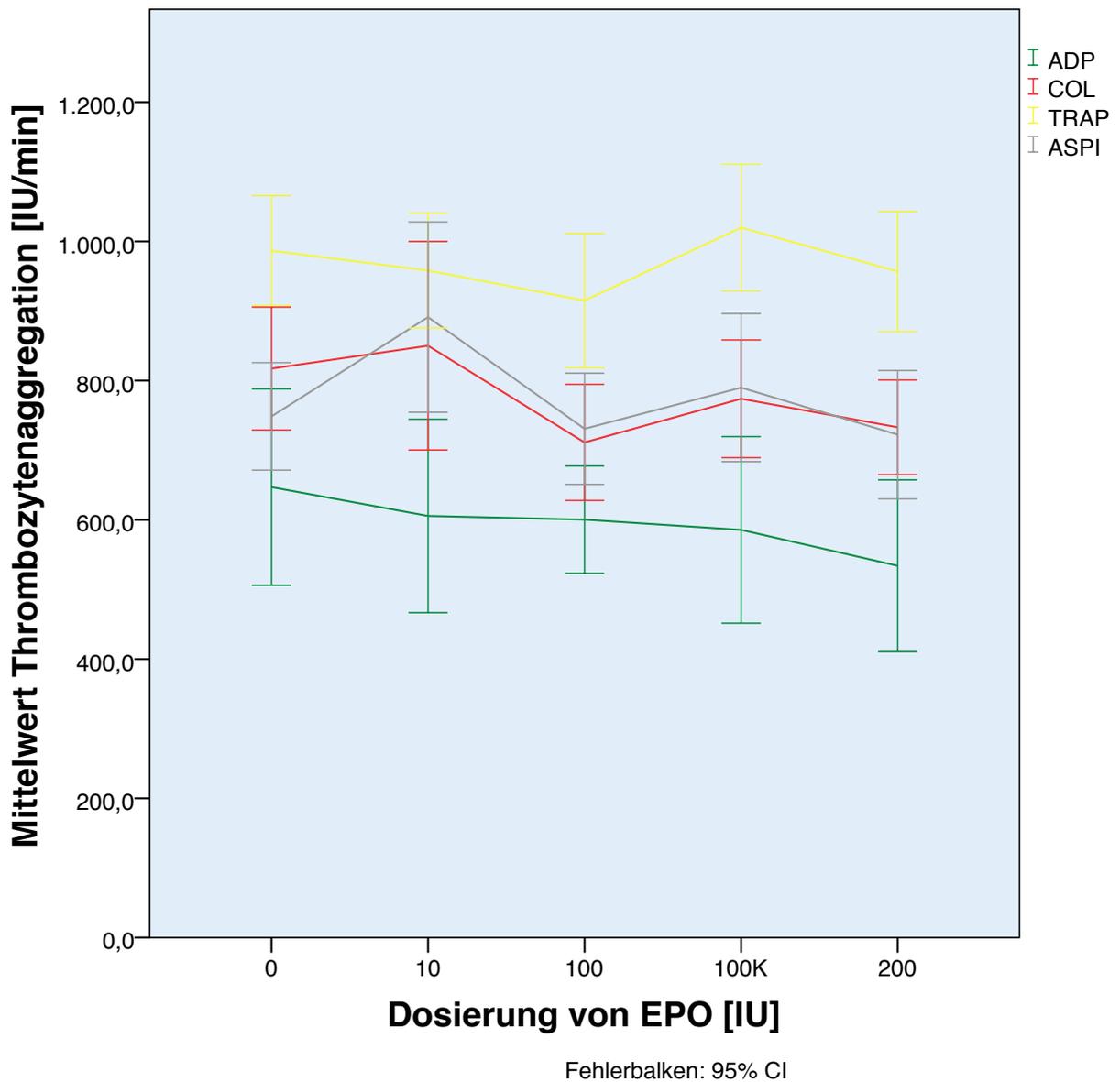


Abbildung 13. Änderung der Thrombozytenaggregation nach 30 Minuten.

Diese Graphik ergibt sich aus den Mittelwerten der Thrombozytenaggregation im jeweiligen Test. Die Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall (CI). 100K: Wiederholung der 100 IU-Messung.

Auch nach Inkubation der verschiedenen Dosierungen von EPO über zwei Stunden ließen sich keine großen Unterschiede zu den getesteten Blutproben ohne EPO-Zugabe feststellen. Im ADP-Test fand sich beim Vergleich der Werte der Proben mit 100 IU und 200 IU EPO eine leichte Steigerung der Aggregation (p -Wert = 0,037 / 0,047), was sich allerdings in der Kontrollwiederholung der 100 IU Messung nicht bestätigte (vgl. Tabelle 3, Abschnitt A). Nach Inkubation mit 200 IU EPO über zwei Stunden zeigte sich im COL-Test ebenso eine vermehrte Aggregation mit einem P -Wert von 0,013. Der Vergleich von 10 und 100 IU EPO gegenüber 0 IU EPO ergab keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 3, Abschnitt B). Im TRAP-Test ergaben sich auch nach zwei Stunden keine Unterschiede in der Trombozytenaggregation bei den verschiedenen Dosierungen (vgl. Tabelle 3, Abschnitt C). Im ASPI-Test fand sich dagegen erneut mehr Aggregation nach Inkubation mit nur 10 IU EPO (p = 0,011), nicht jedoch bei den anderen Dosierungen (vgl. Tabelle 3, Abschnitt D).

Tabelle 3. Messung der Thrombozytenaggregation nach 2 Stunden Inkubation.

A)

ADP-Test nach 2 Stunden Inkubation	MW [AU/min]	SD	SEM	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	520,3	126,71	40,07	
10 IU EPO	477,2	196,07	62,00	0,260
100 IU EPO	561,9	124,65	39,42	0,037
100 IU EPO Kontrolle	518,6	149,39	47,24	0,767
200 IU EPO	570,2	127,66	40,37	0,047

B)

COL-Test nach 2 Stunden Inkubation	MW [AU/min]	SD	SEM	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	664,8	109,55	34,64	
10 IU EPO	700,4	155,10	49,05	0,139
100 IU EPO	681,3	203,02	64,20	0,445
100 IU EPO Kontrolle	692,1	122,64	38,78	0,126
200 IU EPO	761,4	119,96	37,94	0,013

C)

TRAP-Test nach 2 Stunden Inkubation	MW [AU/min]	SD	SEM	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	863,4	151,88	48,03	
10 IU EPO	885,2	211,27	66,81	0,214
100 IU EPO	937,8	127,71	40,38	0,083
100 IU EPO Kontrolle	903,2	136,11	43,04	0,153
200 IU EPO	913,9	121,89	38,54	0,114

D)

ASPI-Test nach 2 Stunden Inkubation	MW [AU/min]	SD	SEM	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	741,3	108,35	34,26	
10 IU EPO	832,4	156,77	49,58	0,011
100 IU EPO	711,0	138,20	43,70	0,074
100 IU EPO Kontrolle	1353,6	1833,24	579,72	0,114
200 IU EPO	752,8	121,10	38,29	0,610

Obige Tabellenserie gibt die nach zwei Stunden gemessenen Mittelwerte (MW) der Thrombozytenaggregation mit Standardabweichung (SD), Standard Error of the Mean (SEM) und P-Werten des Wilcoxon-Tests im Vergleich zu Messungen ohne EPO wieder.

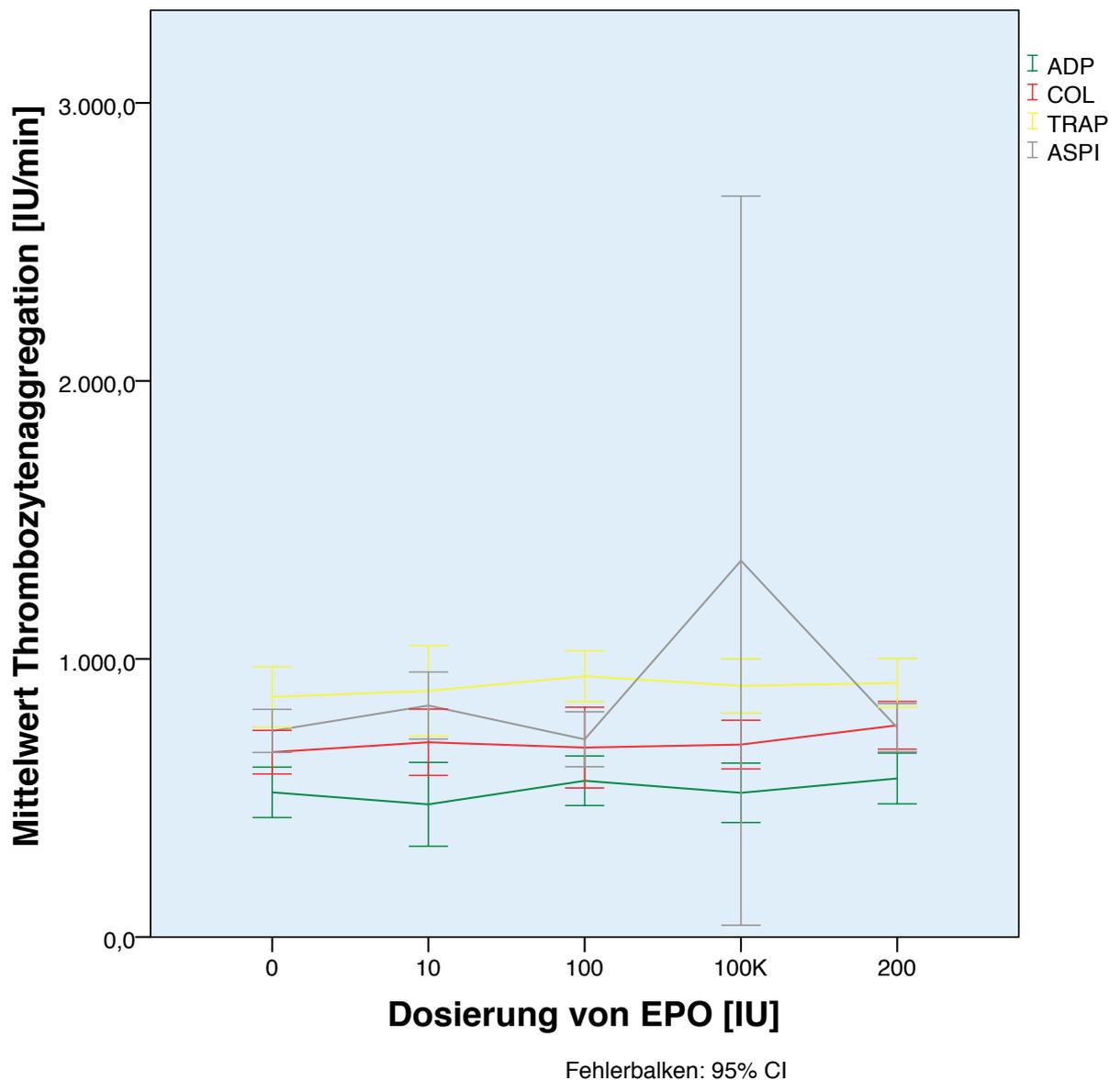


Abbildung 14. Änderung der Thrombozytenaggregation nach zwei Stunden.

Obige Graphik zeigt die Änderung der Mittelwerte der Thrombozytenaggregation im jeweiligen Test auf. Die Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall (CI). 100K: Wiederholung der 100 IU-Messung.

Der Vergleich der Gruppen nach 30 Minuten oder zwei Stunden ergab bei 0 IU EPO bereits signifikante Unterschiede in ADP-, COL und TRAP-Test. Auch bei den Dosierungen von 10 IU EPO im ADP-Test und bei der Wiederholungsmessung mit 100 IU EPO im COL- und TRAP- Test fanden sich deutliche Unterschiede. Bei 200 IU EPO liessen sich in keinem Test signifikante Unterschiede nachweisen (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4. Vergleich der Thrombozytenaggregation zu verschiedenen Zeitpunkten.

A)

ADP-Test	30 Min MW [AU/min]	30 Min SD	2h MW [AU/min]	2h SD	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	647	197,08	520,3	126,71	0,009
10 IU EPO	605,6	194,22	477,2	196,07	0,021
100 IU EPO	600,3	107,76	561,9	124,65	0,093
100 IU EPO Kontrolle	585,6	187,27	518,6	149,39	0,074
200 IU EPO	534	172,49	570,2	127,66	0,359

B)

COL-Test	30 Min MW [AU/min]	30 Min SD	2h MW [AU/min]	2h SD	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	817,3	123,46	664,8	109,55	0,007
10 IU EPO	850,1	209,42	700,4	155,10	0,051
100 IU EPO	711,2	116,54	681,3	203,02	0,878
100 IU EPO Kontrolle	773,9	118,21	692,1	122,64	0,017
200 IU EPO	732,9	95,01	761,4	119,96	0,721

C)

TRAP-Test	30 Min MW [AU/min]	30 Min SD	2h MW [AU/min]	2h SD	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	986,6	110,42	863,4	151,88	0,013
10 IU EPO	958,1	115,33	885,2	211,27	0,214
100 IU EPO	914,9	135,01	937,8	127,71	0,386
100 IU EPO Kontrolle	1019,8	127,17	903,2	136,11	0,022
200 IU EPO	956,7	120,62	913,9	121,89	0,241

D)

ASPI-Test	30 Min MW [AU/min]	30 Min SD	2h MW [AU/min]	2h SD	P-Wert Wilcoxon-Test
0 IU EPO	748,6	107,95	741,3	108,35	0,445
10 IU EPO	891,2	191,17	832,4	156,77	0,155
100 IU EPO	730,8	111,67	711,0	138,20	0,333
100 IU EPO Kontrolle	789,9	148,71	1353,6	1833,24	0,919
200 IU EPO	722,3	128,87	752,8	121,10	0,314

Obige Tabellenserie gibt die nach 30 Minuten und zwei Stunden gemessenen Mittelwerte (MW) der Thrombozytenaggregation mit Standardabweichung (SD) an. Die P-Werte des Wilcoxon-Tests vergleichen diese.

4.2 Ergebnisse der REVIVAL-3 Substudie

4.2.1 Patientenkollektiv

45 Patienten wurden in die Substudie eingeschlossen, 13 Frauen und 32 Männer. 23 erhielten EPO, 22 Placebo. Bezüglich der allgemeinen, klinischen Eigenschaften der Patienten wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten, die EPO erhalten hatten und denen, mit Placebo (vgl. Tabelle 5) festgestellt. Der Gesamterstdurchschnitt betrug 61,6 Jahre, bei einem Minimum von 30 und einem Maximum von 83 Jahren (siehe Abbildung 15). Der Mittelwert der maximalen Serum-Kreatinkinasewerte ergab 2197 U/l.

Tabelle 5. Allgemeine, klinische Charakteristika der Patienten.

Allgemeine Charakteristika der Patienten	EPO (n=23)	Placebo (n=22)	p-Wert	p-Wert im Wilcoxon-Test	Gesamt
Alter (Jahre)	61,9 ± 11,8	61,3 ± 13,9	0,86	0,98	61,6 ± 12,7
Frauen	6 (26)	7 (32)	0,68	0,68	13 (29)
Männer	17 (74)	15 (68)	0,68	0,68	32 (71)
Diabetes	4 (17)	3 (14)	0,48	0,71	9 (20)
Aktuell Raucher	7 (30)	11 (50)	0,22	0,22	18 (40)
Ehemaliger Raucher	7 (30)	0 (0)	0,005	0,004	7 (16)
Bluthochdruck	14 (61)	13 (59)	0,85	0,76	27 (60)
Hypercholesterinämie	11 (48)	13 (59)	0,76	0,76	27 (60)
Fam. Prädisposition	10 (43)	4 (18)	0,05	0,06	14 (31)
Ein-Gefäß-Erkrankung	10 (43)	6 (27)		0,26	16 (36)
Zwei-Gefäß-Erkrankung	5 (22)	5 (23)		1,00	10 (22)
Mehr-Gefäß-Erkrankung (≥3)	8 (35)	11 (50)		0,31	19 (42)
Betroffene Koronararterie					
RCA	11 (49)	14 (64)		0,37	25 (56)
LAD	10 (43)	7 (32)		0,54	17 (38)
LCX	2 (9)	2 (9)		1,00	4 (9)
Angiographische LVEF, %	44,9 ± 14,2	46,4 ± 11,7	0,71	0,96	45,6 ± 12,9
CK max	2334,6 ± 2317,6	2059,7 ± 844,0	0,59	0,50	2197,2 ± 1729
CK-MB max	332,7 ± 398,6	256,6 ± 142,8	0,4	0,93	294,7 ± 306,6

Die Daten sind angegeben als n (%) oder Mittelwert ± Standardabweichung.

RCA: Rechte Koronararterie; LAD: Linksanteriore Koronararterie; LCX: Linker Ramus Zirkumflexus; CK: Kreatinkinase; CK-MB: Herzmuskelspezifische Kreatinkinase.

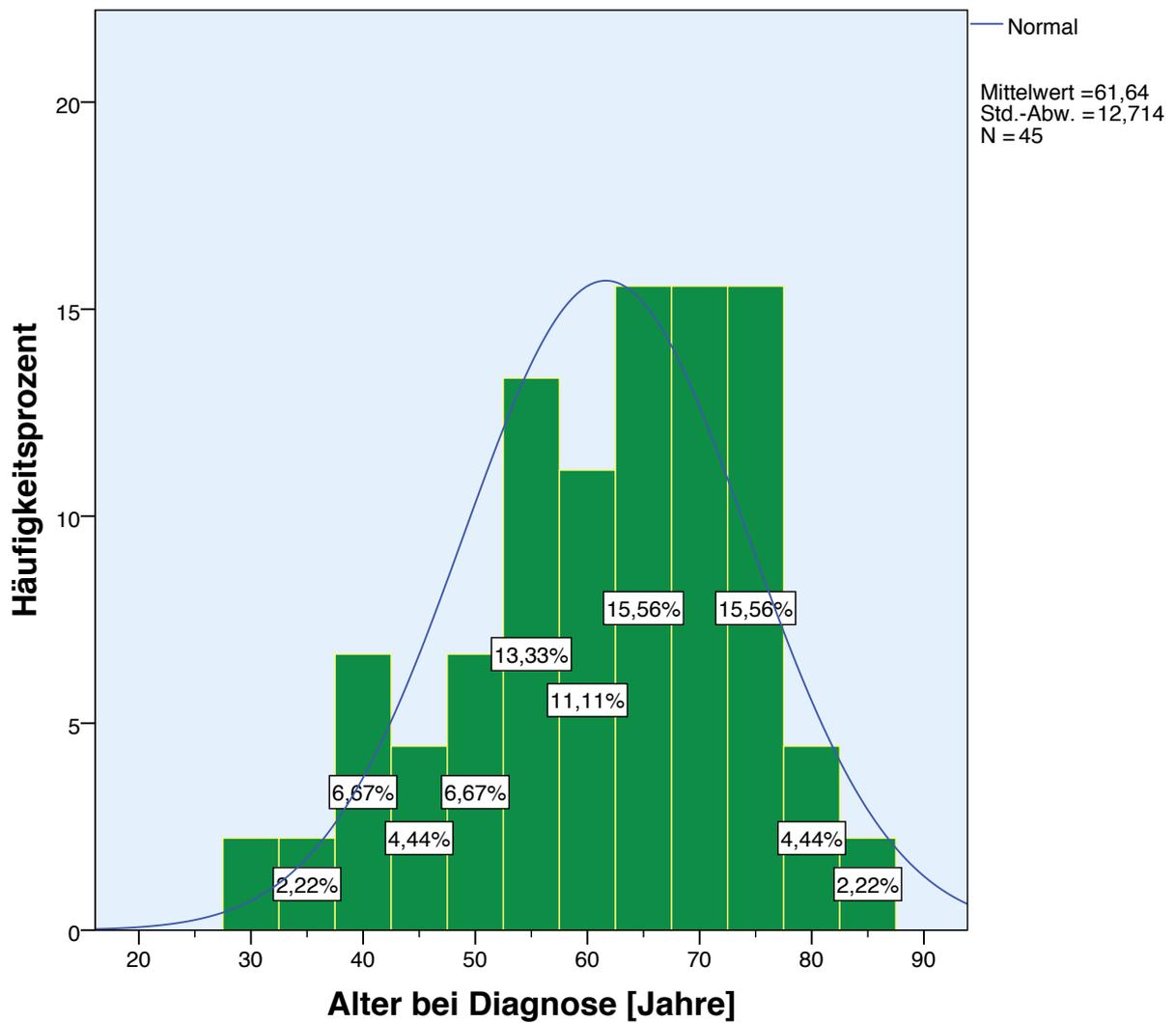


Abbildung 15. Histogramm zur Altersverteilung.

In diesem Histogramm ist das Alter bei Diagnosestellung aufgetragen und die Prozentwerte zur Häufigkeit der verschiedenen Altersgruppen angegeben. Dunkelblau im Hintergrund ist die Normalverteilungskurve eingezeichnet N: Anzahl; Std.-Abw.: Standardabweichung.

Die Patienten gaben an, im Schnitt an 2,3 kardiovaskuläre Risikofaktoren zu leiden. Am häufigsten bestand Bluthochdruck und Hypercholesterinämie mit je 60% der Patienten (siehe Abbildung 16). Danach folgte mit 40% (18 Patienten) Nikotinabusus und 31% mit familiärer Prädisposition.

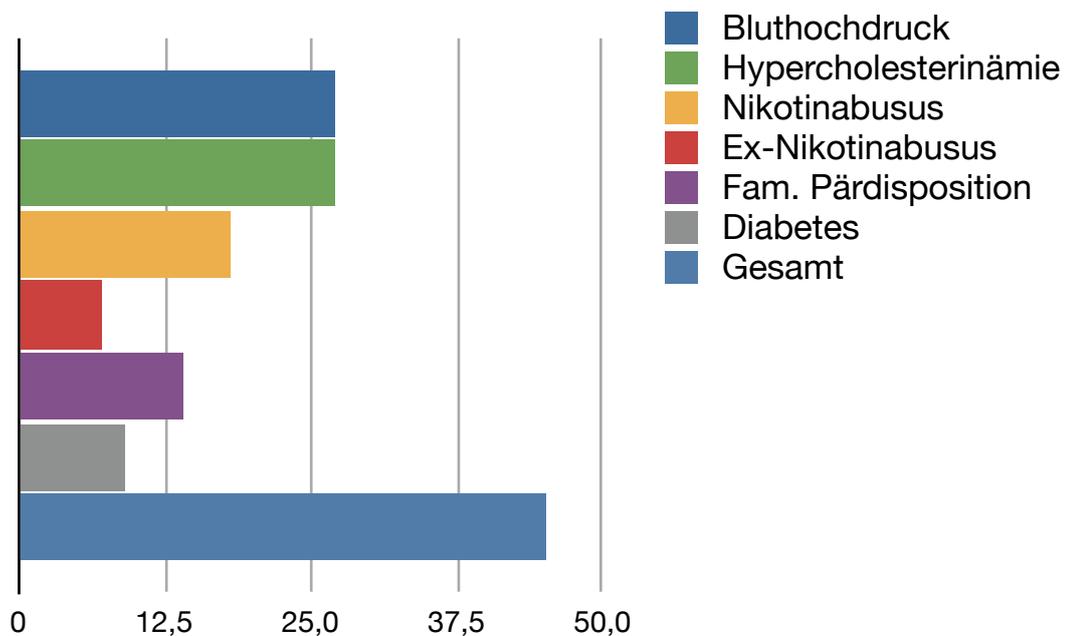


Abbildung 16. Kardiovaskuläre Risikofaktoren.

Hier soll verdeutlicht werden, wie die verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren des Patientenkollektivs verteilt waren. Von 45 Patienten hatten je 27 (60%) Bluthochdruck und Hypercholesterinämie. Nur 9 (20%) hatten Diabetes mellitus.

Nimmt man die Gesamtangaben an CVRF zusammen, so dass Mehrfachnennungen möglich werden, so erhält man 103 positive Angaben. Hierbei waren Bluthochdruck und Hypercholesterinämie die beiden größten Gruppen, beide je 27 mal genannt, und ergaben 26% an der Menge aller Nennungen. Bei dieser Aufteilung zeigte sich, dass Diabetes mit 2% diätätisch, mit 1% mit Insulin eingestellt war, aber zu 6% mit oralen Antidiabetika therapiert wurde (siehe Abbildung 17).

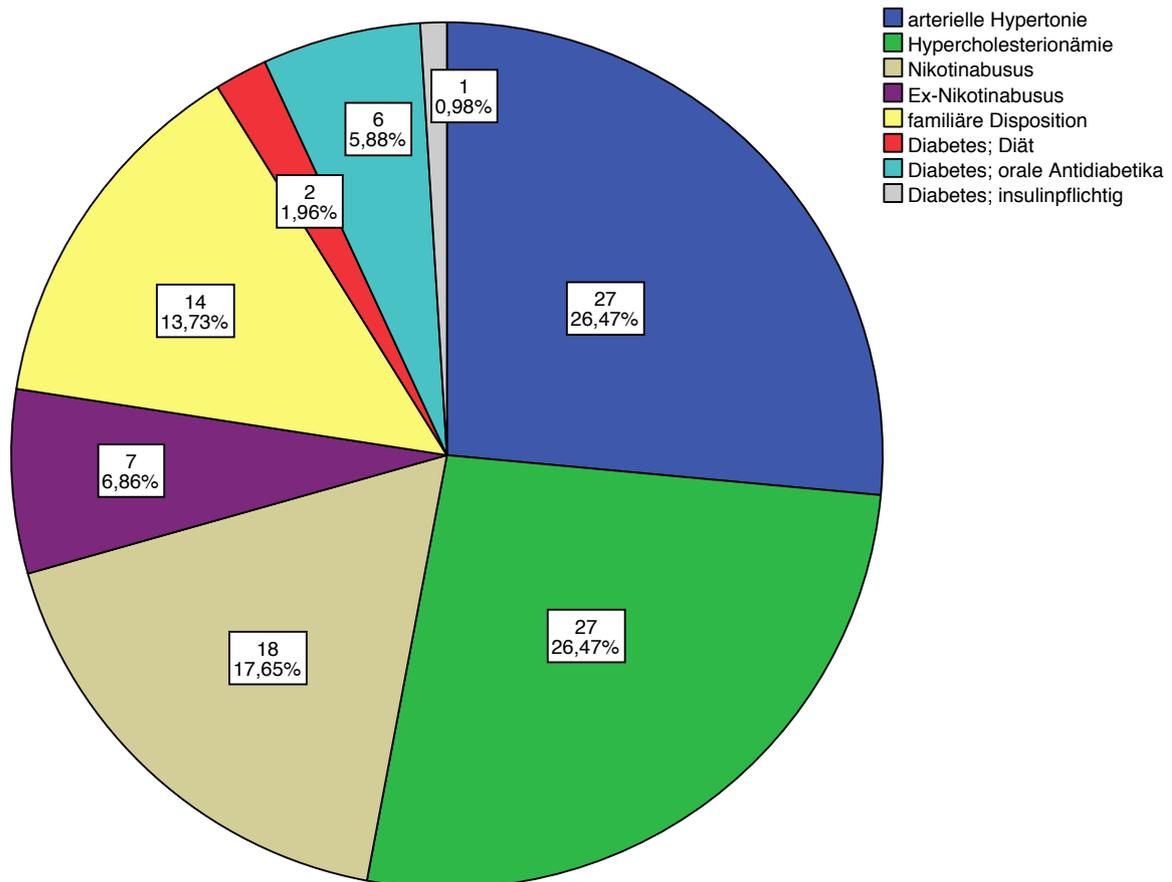


Abbildung 17. Verteilung der Risikofaktoren.

In diesem Kreisdiagramm ist die Verteilung der Risikofaktoren angegeben, die Prozentwerte beziehen sich auf die Gesamtheit aller Nennungen.

Um einen Zusammenhang zwischen steigendem Patientenalter und Erhöhung der Anzahl von Risikofaktoren, herauszufinden trugen wir diese in einer Kreuztabelle (siehe Tabelle 6) mitsamt der jeweiligen Prozentzahlen auf. Es bestand keine direkte Korrelation. Insgesamt nannten die Jüngeren weniger bestehende Risikofaktoren (siehe Abbildung 18). Am meisten Risikofaktoren fanden sich in der Gruppe der 50 bis 69-jährigen Patienten. Innerhalb der Geschlechter ließen sich keine bedeutenden Unterschiede feststellen. Bei den Frauen fanden sich in 33% der Frauen 2 CVRF, während nur jeweils 8% 0 oder 4 CVRF hatten. Bei den Männern war die Anzahl gleichmässiger verteilt, doch es fanden sich keine Männer ohne Risikofaktoren (siehe Tabelle 6 und zugehörige Abbildung 20).

Tabelle 6. Kreuztabelle zu Alter und CVRF.

			Anzahl der CVRF					Gesamt
			0	1	2	3	4	
Alter in 3 Gruppen	Bis 50 Jahre	Anzahl	0	3	2	1	2	8
		% innerhalb der Altersgruppe	0,0%	37,5%	25,0%	12,5%	25,0%	100,0%
		% innerhalb der CVRF	0,0%	25,0%	16,7%	10,0%	22,2%	18,2%
		% der Gesamtzahl	0,0%	6,8%	4,5%	2,3%	4,5%	18,2%
	50 bis 69 Jahre	Anzahl	1	6	5	5	6	23
		% innerhalb der Altersgruppe	4,3%	26,1%	21,7%	21,7%	26,1%	100,0%
		% innerhalb der CVRF	100,0%	50,0%	41,7%	50,0%	66,7%	52,3%
		% der Gesamtzahl	2,3%	13,6%	11,4%	11,4%	13,6%	52,3%
	Ab 70 Jahre	Anzahl	0	3	5	4	1	13
		% innerhalb der Altersgruppe	0,0%	23,1%	38,5%	30,8%	7,7%	100,0%
		% innerhalb der CVRF	0,0%	25,0%	41,7%	40,0%	11,1%	29,5%
		% der Gesamtzahl	0,0%	6,8%	11,4%	9,1%	2,3%	29,5%
Gesamt	Anzahl	1	12	12	10	9	44	
	% innerhalb der Altersgruppe	2,3%	27,3%	27,3%	22,7%	20,5%	100,0%	
	% innerhalb der CVRF	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% der Gesamtzahl	2,3%	27,3%	27,3%	22,7%	20,5%	100,0%	

In der Tabelle wurde die Anzahl der CVRF gegen das Alter aufgetragen, welches hier in drei Gruppen der unter 49-jährigen, der 50-69-jährigen und der über 70-jährigen eingeteilt wurde. Am meisten Risikofaktoren ließen sich in der Gruppe der 50 bis 69-jährigen Patienten finden.

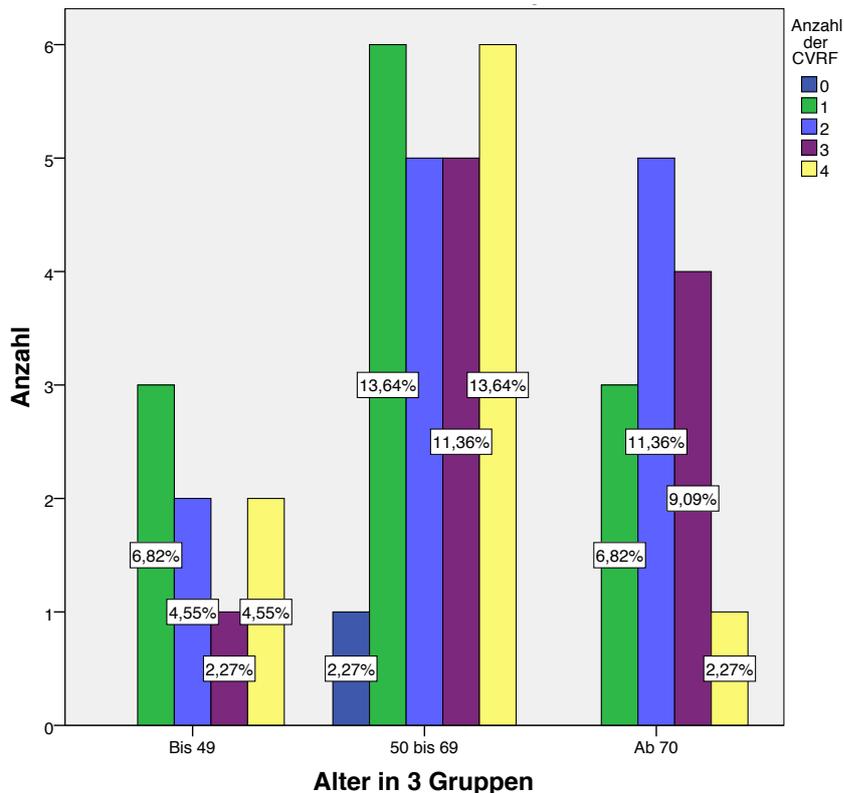


Abbildung 18. Anzahl der CVRF pro Altersgruppe.

Im Balkendiagramm ist die Anzahl der CVRF gegen die drei Altersgruppen (unter 49-jährige, der 50-69-jährige und der über 70-jährige) aufgetragen.

Tabelle 7. Kreuztabelle zu Geschlecht und CVRF.

			Anzahl der CVRF					Gesamt
			0	1	2	3	4	
Geschlecht	Weiblich	Anzahl	1	3	4	3	1	12
		% innerhalb des Geschlechts	8,3%	25,0%	33,3%	25,0%	8,3%	100,0%
		% innerhalb der CVRF	100,0%	25,0%	33,3%	30,0%	11,1%	27,3%
		% der Gesamtzahl	2,3%	6,8%	9,1%	6,8%	2,3%	27,3%
Männlich	Anzahl	Anzahl	0	9	8	7	8	32
		% innerhalb des Geschlechts	0,0%	28,1%	25,0%	21,9%	25,0%	100,0%
		% innerhalb der CVRF	0,0%	75,0%	66,7%	70,0%	88,9%	72,7%
		% der Gesamtzahl	0,0%	20,5%	18,2%	15,9%	18,2%	72,7%
Gesamt	Anzahl	Anzahl	1	12	12	10	9	44
		% innerhalb des Geschlechts	2,3%	27,3%	27,3%	22,7%	20,5%	100,0%
		% innerhalb der CVRF	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
		% der Gesamtzahl	2,3%	27,3%	27,3%	22,7%	20,5%	100,0%

In der Tabelle wurde die Anzahl der CVRF gegen das Geschlecht aufgetragen. Bei den Frauen fanden sich in 33% der Frauen 2 CVRF, während nur jeweils 8% 0 oder 4 CVRF hatten. Bei den Männern war die Anzahl gleichmässiger verteilt, doch es fanden sich keine Männer ohne Risikofaktoren.

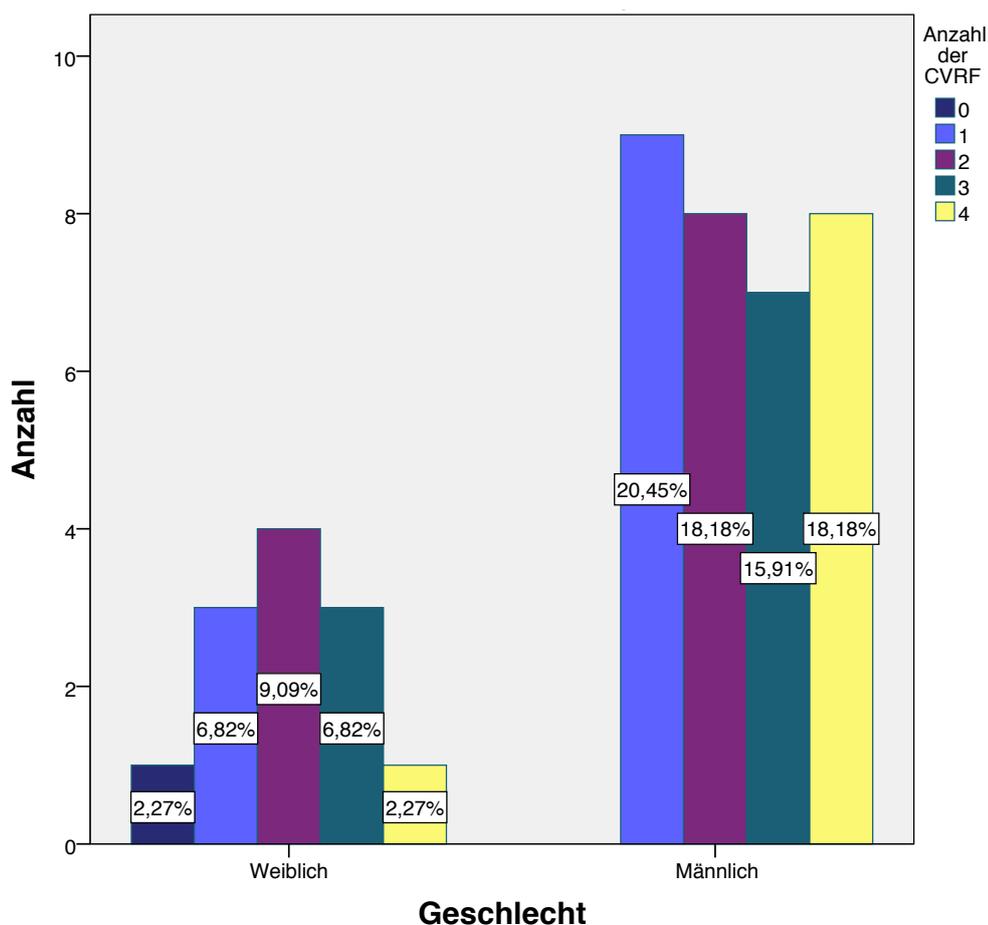


Abbildung 19. Anzahl der CVRF bei Männern und Frauen.

Im obigen Diagramm ist die Verteilung der Anzahl der CVRF unter dem Geschlecht angegeben.

In der angiographischen Darstellung der Koronararterien ließ sich in der Mehrzahl der Patienten, in 42% eine Dreifäßerkrankung feststellen, gefolgt von den 36% der Patienten, bei denen nur ein Gefäß betroffen war. Die Zweifäßerkrankung betraf lediglich 22% der Patienten (siehe Abbildung 20).

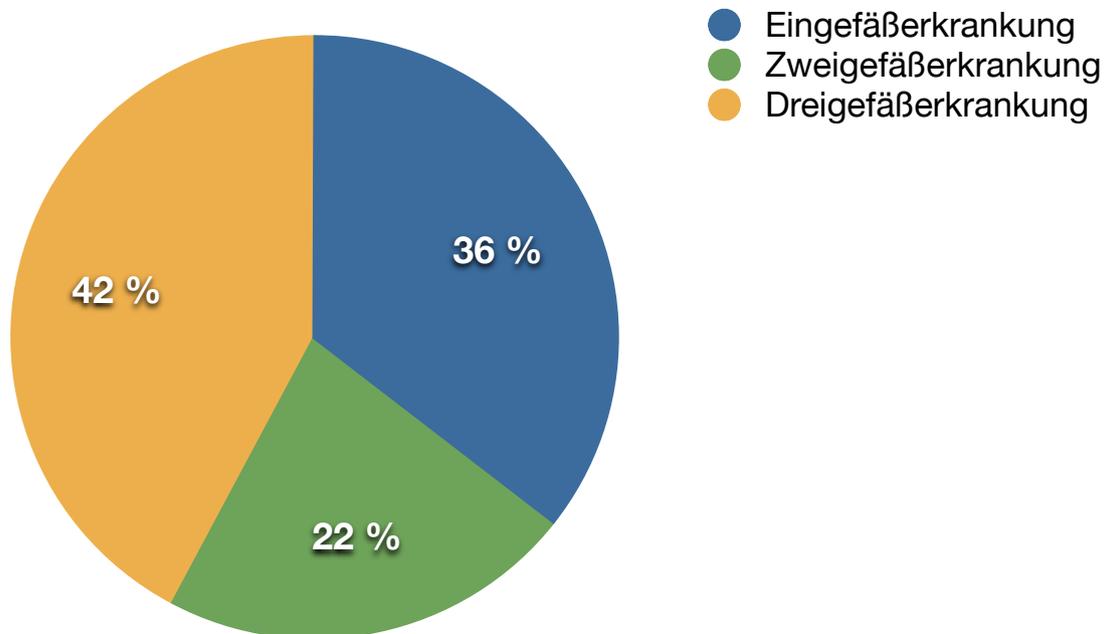


Abbildung 20. Schweregrad der koronaren Herzkrankheit.

Das Kreisdiagramm verbildlicht die Verteilung der Schweregrade der koronaren Herzkrankheit. Mit 42% (19 Patienten) stellten die Dreifäß-erkrankten die größte Gruppe. Die Zweifäßerkrankungen erreichten lediglich 22%, die Eingefäßerkrankungen 36%.

Innerhalb der Dreifäßerkrankungen hatten viele Patienten drei oder vier CVRF, wohingegen die Gruppe der Patienten mit einer Eingefäßerkrankung mit einer Häufigkeit von 40% nur einen CVRF aufwies (siehe Tabelle 8 und Abbildung 21).

Tabelle 8. Kreuztabelle zu betroffenen Gefäßen und CVRF.

			Anzahl der CVRF					Gesamt
			0	1	2	3	4	
Gefäßkrkr.	1	Anzahl	1	6	4	2	2	15
		% innerhalb der Gefäßkrankung	6,7%	40,0%	26,7%	13,3%	13,3%	100,0%
		% innerhalb der CVRF	100,0%	50,0%	33,3%	20,0%	22,2%	34,1%
		% der Gesamtzahl	2,3%	13,6%	9,1%	4,5%	4,5%	34,1%
	2	Anzahl	0	3	4	1	2	10
		% innerhalb der Gefäßkrankung	0,0%	30,0%	40,0%	10,0%	20,0%	100,0%
		% innerhalb der CVRF	0,0%	25,0%	33,3%	10,0%	22,2%	22,7%
		% der Gesamtzahl	0,0%	6,8%	9,1%	2,3%	4,5%	22,7%
	3	Anzahl	0	3	4	7	5	19
		% innerhalb der Gefäßkrankung	0,0%	15,8%	21,1%	36,8%	26,3%	100,0%
		% innerhalb der CVRF	0,0%	25,0%	33,3%	70,0%	55,6%	43,2%
		% der Gesamtzahl	0,0%	6,8%	9,1%	15,9%	11,4%	43,2%
Gesamt	Anzahl	1	12	12	10	9	44	
	% innerhalb der Gefäßkrankung	2,3%	27,3%	27,3%	22,7%	20,5%	100,0%	
	% innerhalb der CVRF	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% der Gesamtzahl	2,3%	27,3%	27,3%	22,7%	20,5%	100,0%	

In der Tabelle sind CVRF gegen die Anzahl der betroffenen Gefäße aufgetragen. Innerhalb der Dreigeäßkrankungen hatten viele Patienten drei oder vier CVRF, und in der Gruppe der Patienten mit einer Eingefäßkrankung hatte die Mehrzahl mit 40% nur einen CVRF.

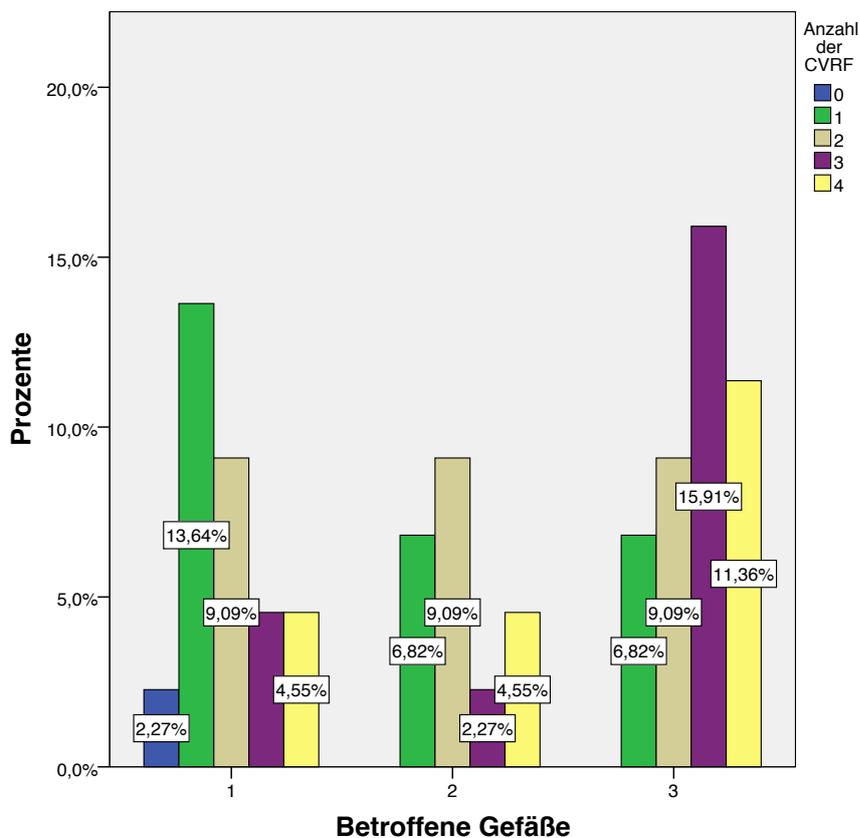


Abbildung 21. Anzahl der CVRF je Anzahl der betroffenen Gefäße.

In der Tabelle sind CVRF gegen die Anzahl der betroffenen Gefäße aufgetragen. Prozentwerte sind Anteile aller.

Innerhalb der Messungen über fünf Tage war die Thrombozytenzahl in der EPO-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe nicht signifikant verschieden. Aber bei der Blutabnahme nach 12 Stunden waren die Trombozytenzahlen der EPO-Gruppe tendenziell höher, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Die größte Differenz bestand am fünften Tag (Epo: $150 \pm 57 \times 10^9/l$, Placebo: $156 \pm 73 \times 10^9/l$, $p = 0.111$, Abbildung 22 und 23). Im Verlauf stiegen die Thrombozyten sowohl bei Patienten mit als auch ohne EPO tendenziell an, von $142,6 \times 10^9/l$ auf $1156,1 \times 10^9/l$ in der Placebogruppe und von $129,7 \times 10^9/l$ auf $150,4$ in der EPO-Gruppe (siehe Abbildung 22). Tendenzuell hatten Frauen, die EPO erhielten eine geringere Thrombozytenanzahl, wohingegen es sich bei Männern umgekehrt verhielt. Es liessen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede feststellen (siehe Abbildung 24)

Tabelle 9. Mittelwerte und Standardabweichung der Thrombozytenzahlen.

Thrombozytenzahl ($10^9/l$)	EPO-Gruppe	SD EPO-Gruppe	Placebo-Gruppe	SD Placebo-Gruppe	P-Wert Whitney-Mann-U-Test
vor PCI	129,7	53,90	142,6	50,10	0,565
12 h nach PCI	155,6	30,70	142,6	60,20	0,461
48 h nach PCI	138,9	36,50	136,8	55,20	0,474
60 h nach PCI	141,7	39,40	126,8	58,60	0,111
120 h nach PCI	150,4	57,10	156,1	73,40	0,890
ca 6 Monate nach PCI	184,7	48,60	169,4	50,90	0,674

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der Thrombozytenzahlen, die Standardabweichung und die P-Werte im Whitney-Mann-U-Test zu den Unterschieden der EPO- und Placebo-Gruppe im Vergleich an den verschiedenen Zeitpunkten der Messungen.

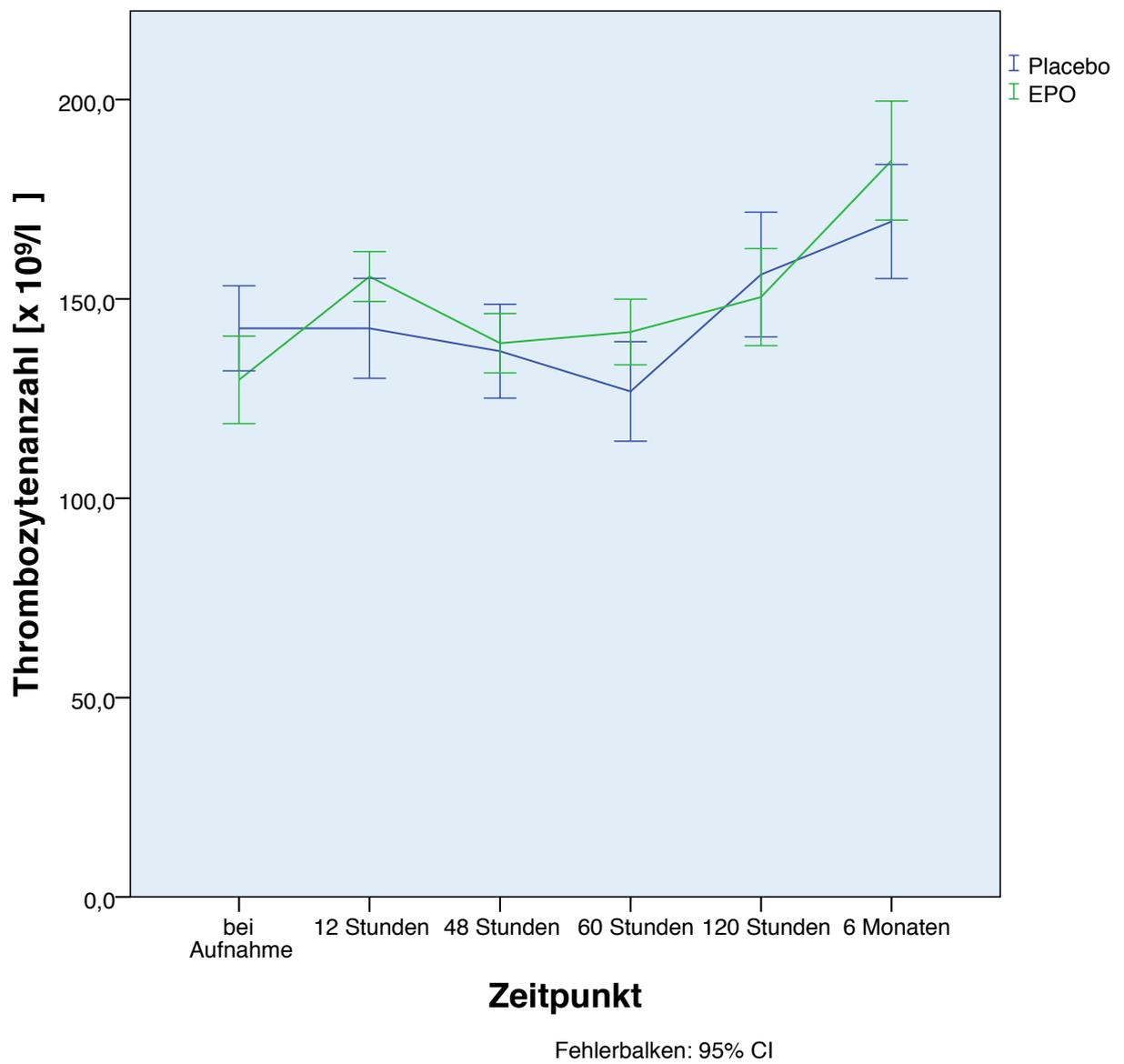


Abbildung 22. Verlauf der Thrombozytenzahlen.

Hier wird der Anstieg der Thrombozyten im Verlauf graphisch dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte, die Fehlerbalken markieren das 95% Konfidenzintervall.

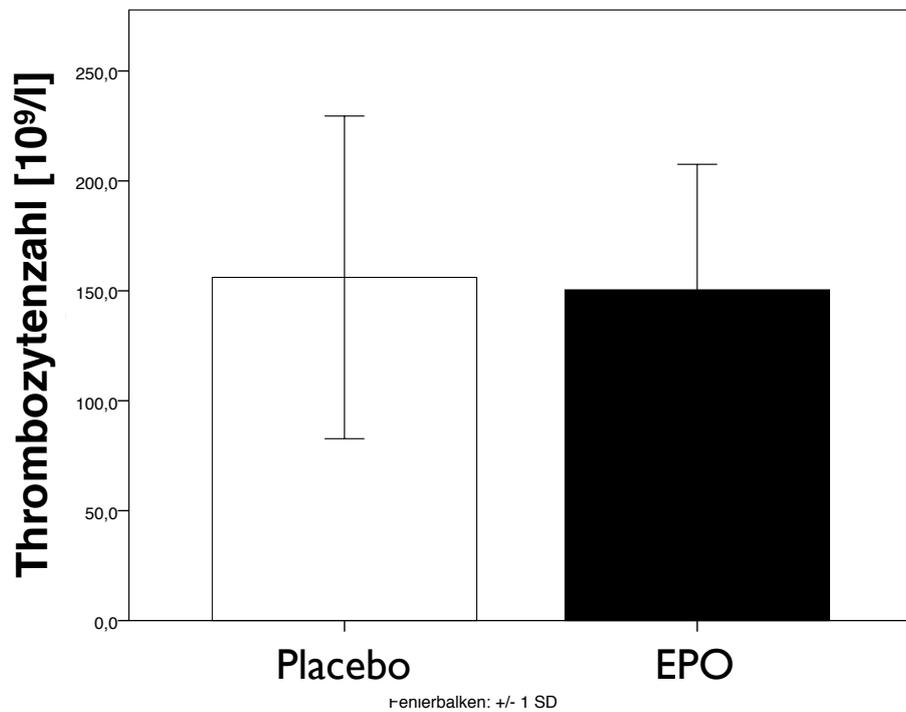


Abbildung 23. Thrombozytenzahlen 60 Stunden nach PCI

Die Thrombozytenanzahl zeigte keinen Anstieg in der EPO-Gruppe. (EPO-Gruppe $141,7 \pm 39,4 \times 10^9/l$, Placebo-Gruppe $126,8 \pm 58,6 \times 10^9/l$, $p = 0.011$)

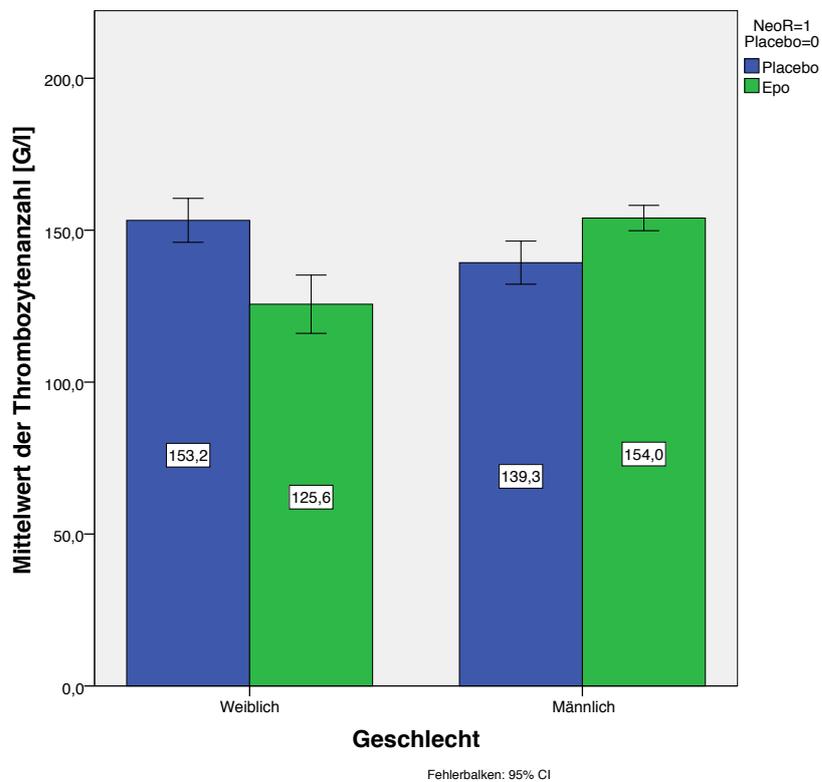


Abbildung 24. Thrombozytenzahl nach Geschlechtern und EPO oder Placebogruppe.

Aufgetragen sind die Mittelwerte der Thrombozytenzahlen, getrennt nach Geschlecht und ob die Patienten EPO oder Placebo erhielten.

Trotz der hohen Dosierung des EPO waren auch die Hämoglobinlevel nach 120 Stunden in beiden Gruppen nicht messbar unterschiedlich (EPO 14.8 ± 1.6 versus Placebo 15 ± 1.3 mg/dl, $p = 0.593$, siehe Abbildung 25 und 26).

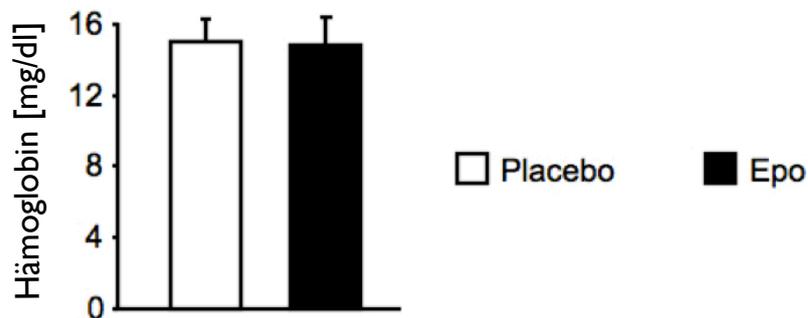


Abbildung 25. Hämoglobinwerte 120 Stunden nach PCI.

Zwischen EPO und Placebogruppe fand sich kein Unterschied der Hämoglobinwerte .

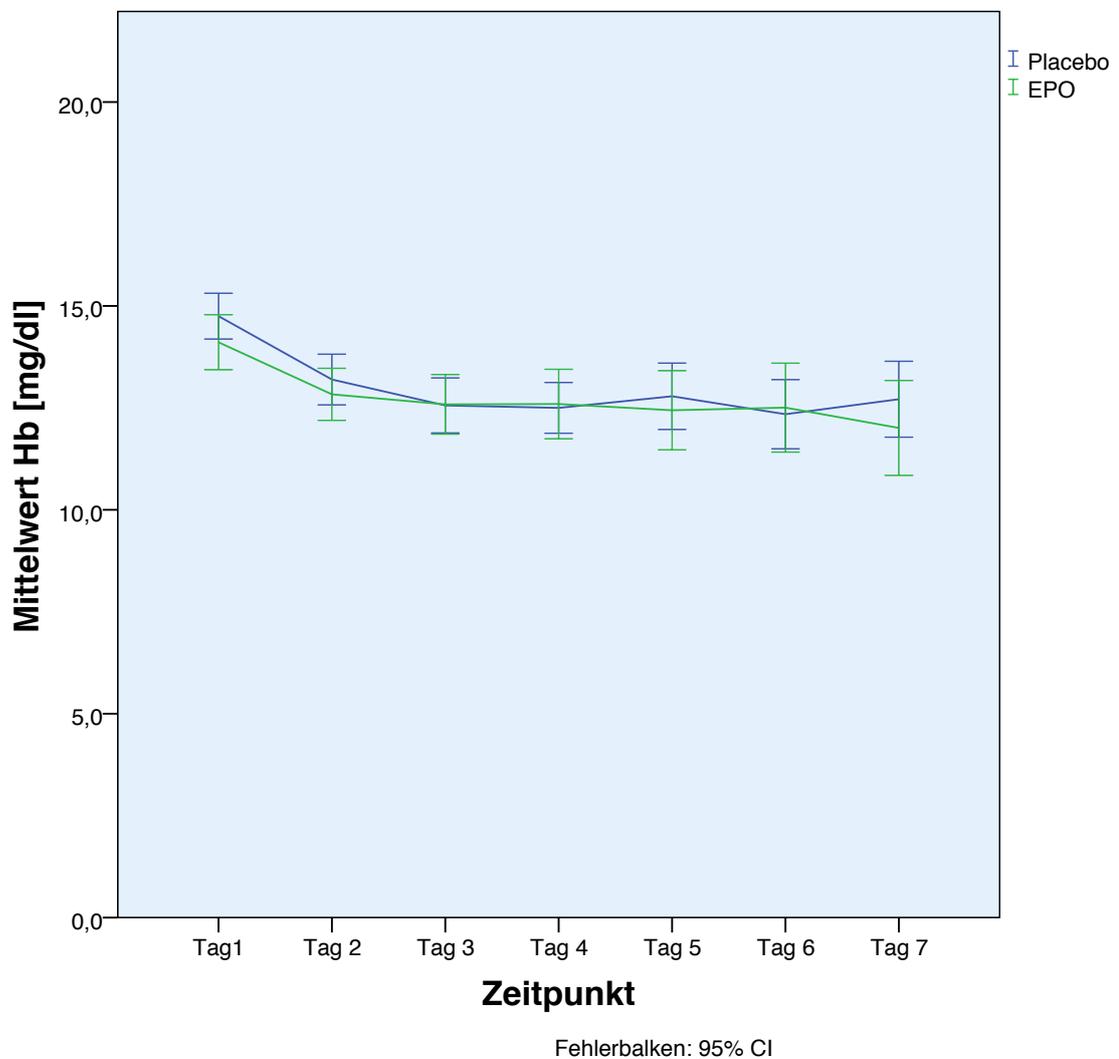


Abbildung 26. Verlauf des Hb-Werts.

Der Graph zeigt den Verlauf der gemessenen Hb-Werte. EPO und Placebogruppe unterschieden sich nicht.

Prothrombin Fragment F1+2

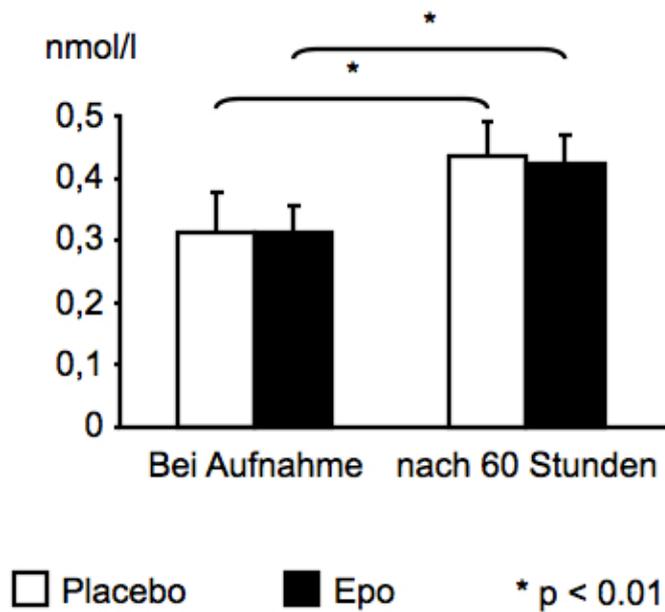


Abbildung 27. Prothrombinfragment.

Prothrombinfragmente im Blut der Patienten stiegen nach 60 Stunden signifikant an, jedoch ohne Unterschiede zwischen der EPO- und Placebo-Gruppe.

Die Thrombingeneration *in vivo* stieg nach 60 Stunden signifikant an. Gemessen wurde dies mit den Konzentrationen der Prothrombinfragmente F1 und F2 ($p < 0,01$, siehe Abbildung 27). Dieser Effekt konnte sowohl in der EPO- als auch in der Placebo-Gruppe und ohne signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen gemessen werden.

Auch die Retikulozytenanzahl wurde bei beiden Gruppen bestimmt. Im Mittel war sie etwa $10/\mu\text{l}$ bei Aufnahme. In der Placebogruppe stieg sie auf ein Maximum von $17,4/\mu\text{l}$, in der EPO-Gruppe auf einen Maximalwert von $36,9/\mu\text{l}$, der über einen Zeitraum von sieben Tagen erreicht wurde (P-Wert des T-Tests hier $<0,001$). Ab dem vierten bis einschliesslich dem neunten Tag lag der Mittelwert der Retikulozytenzahl signifikant über dem der Placebogruppe, mit dem Mittelwert von $19,8/\mu\text{l}$ in der EPO-Gruppe, von $14,1/\mu\text{l}$ in der Placebogruppe und einem P-Wert von $0,003$, danach $<0,001$. Nach dem neunten Tag fand sich kein signifikanter Unterschied mehr (siehe Abbildung 28).

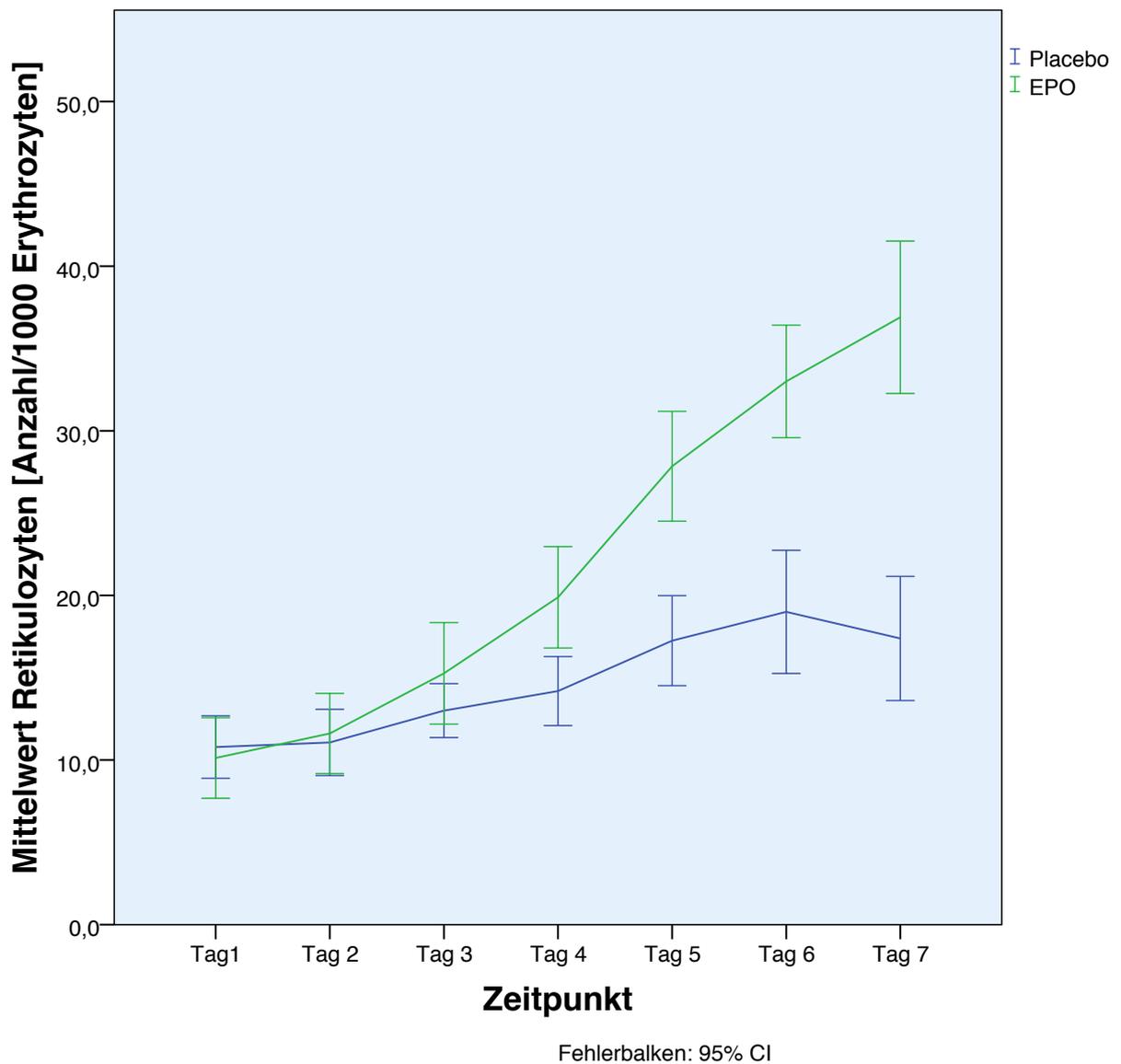


Abbildung 28. Verlauf der Retikulozytenwerte.

Eingezeichnet ist der Anstieg der Retikulozytenzahl in EPO- und Placebogruppe. Bei der EPO Gruppe wurde ein deutlich grösserer Anstieg beobachtet.

Der CRP-Wert betrug im Mittel 7,23 mg/dl bei Aufnahme und stieg auf einen Maximalwert von 45,1 mg/dl an Tag 3, hier wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der EPO und der Placebogruppe beobachtet. Von Tag vier bis sechs fand sich eine Tendenz zu höheren CRP-Werten in der EPO Gruppe (p -Wert = 0,06). Bei den Leukozyten verhielt es sich ähnlich. Bei Aufnahme betragen sie im Mittel 12 G/l, sanken dann stetig leicht ab. Zwischen den beiden Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu finden (siehe Abbildung 29 und 30).

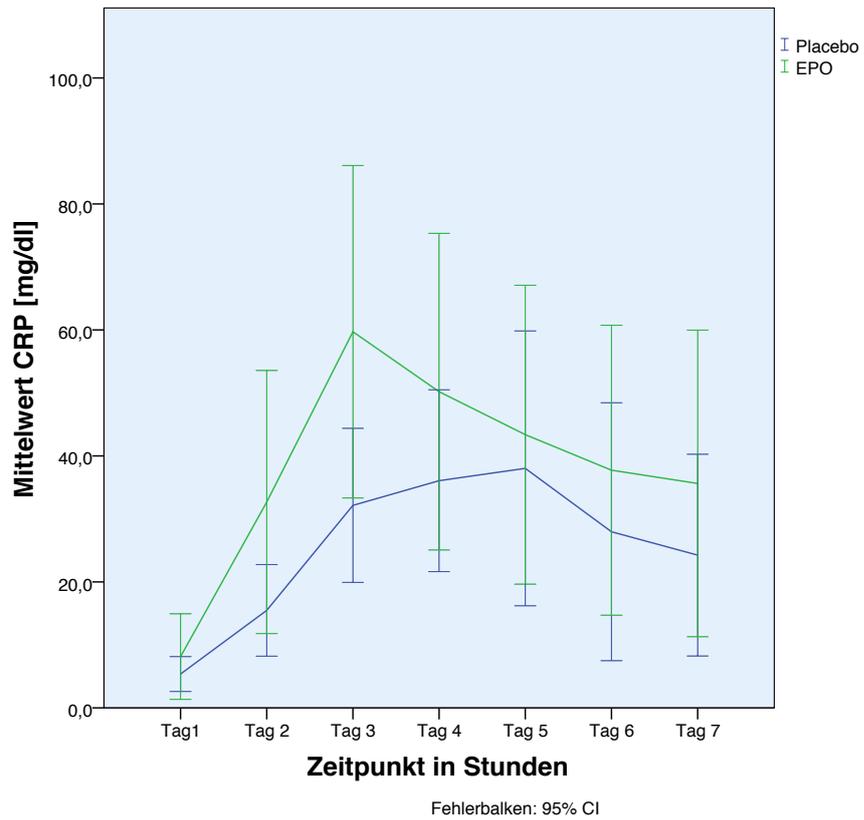


Abbildung 29. CRP-Werte im Verlauf.

Eingezeichnet und miteinander verbunden sind die Mittelwerte der CPR-Messungen.

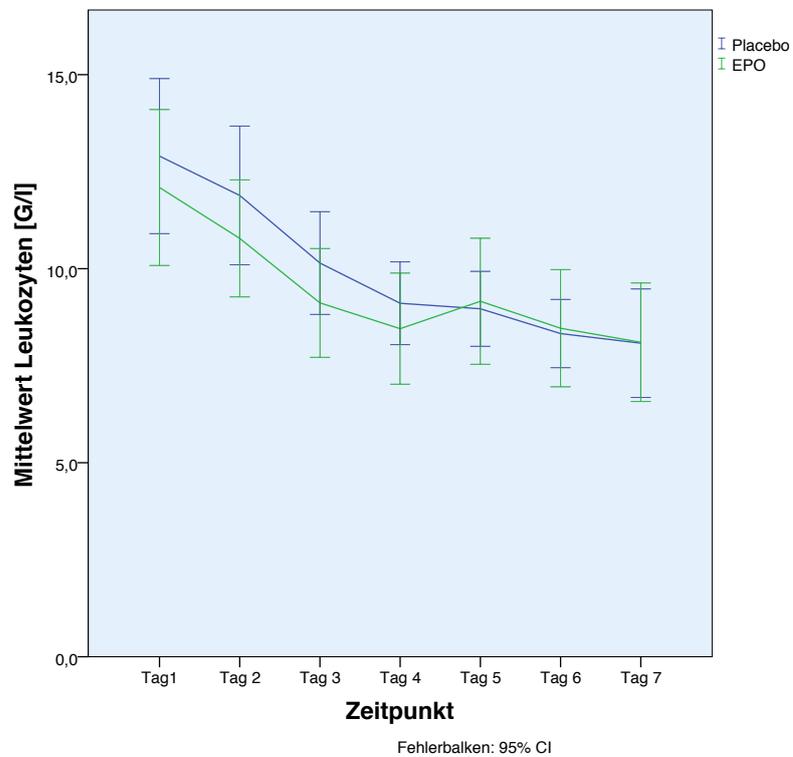


Abbildung 30. Verlauf der Leukozytenanzahl.

Hier wurden die im Labor bestimmten Leukozytenwerte im Verlauf eingezeichnet.

Alle Patienten erhielten bei Entlassung Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, einen Beta-blocker und ein Statin. Ein Patient erhielt einen Angiotensin-Rezeptorblocker, alle anderen einen ACE-Hemmer. 28 Patienten erhielten ein Diuretikum.

Während des Klinikaufenthaltes und der Nachsorge kam es bei keinem der Patienten zum Tod. Bei zwei Patienten der EPO-Gruppe und einem Patienten der Placebo-Gruppe kam es im Verlauf zum erneuten Infarkt, einmal innerhalb von drei Tagen, einmal nach 31 Tagen und einmal nach etwa drei Monaten. Bei der Intervention konnte allen Patienten erfolgreich ein Stent implantiert werden. Bei einem Patienten kam es nach drei Tagen zur Stentthrombose. Bei drei Patienten wurde von vornherein eine Reintervention geplant, bei zwei Patienten musste beim sechs-Monats-Follow-Up erneut ein Stent eingesetzt werden.

Vergleiche nach Gruppen des Geschlechts, der Anzahl von Risikofaktoren oder Gefäßerkrankungen oder Altersgruppen (bis 50, 50-70, über 70) ergab keine signifikanten Unterschiede.

4.2.2 Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation nahm nach PCI deutlich ab, was als Reaktion auf die periinterventionelle Therapie mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel erwartet war (siehe Abbildung 31, A-E). Dieser Effekt war am deutlichsten nach 12 Stunden bei Stimulation mit TRAP und Kollagen (Abbildung 31,C und E) und nach 48 Stunden bei Stimulation mit ADP und ASPI oder ohne Stimulation (Abbildung 31, A, B und D). Es ergeben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der EPO- und der Placebogruppe. Nach 60 bis 120 Stunden erreichte die Aggregation allmählich wieder höhere Werte, die jedoch ausser bei TRAP-Stimulation unter den Ausgangswerten lagen.

Die Thrombozytenaggregation in den einzelnen Tests, zu den verschiedenen Messzeitpunkten korrelierte nicht mit der Anzahl der Thrombozyten.

Man konnte keine signifikante Korrelation der Thrombozytenaggregation mit dem Alter feststellen. In einzelnen Altersgruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 32).

Auch zwischen Männern und Frauen fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Thrombozytenaggregation (siehe Abbildung 33).

Ebenfalls konnten wir statistisch keine Unterschiede zwischen der Thrombozytenaggregation bei Patientengruppen nach Anzahl der CVRF aufgeteilt, herausfinden (siehe Abbildung 34).

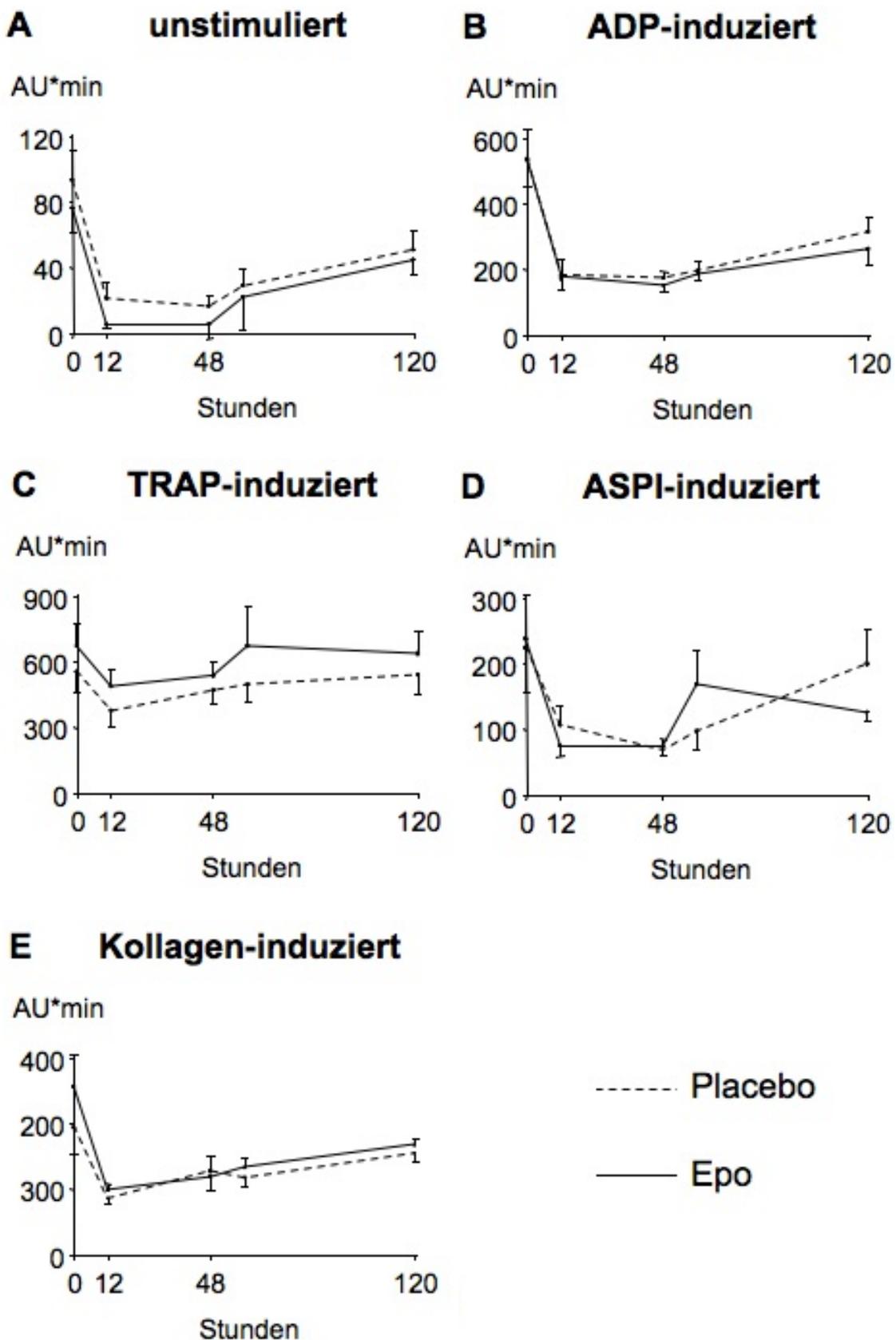


Abbildung 31. Thrombozytenaggregation.

Die Thrombozytenaggregation, gemessen mit verschiedenen Stimulanzen per Impedanzaggregometrie ergab ein deutliche Reduktion nach PCI, bei Patientengruppen mit und ohne EPO fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

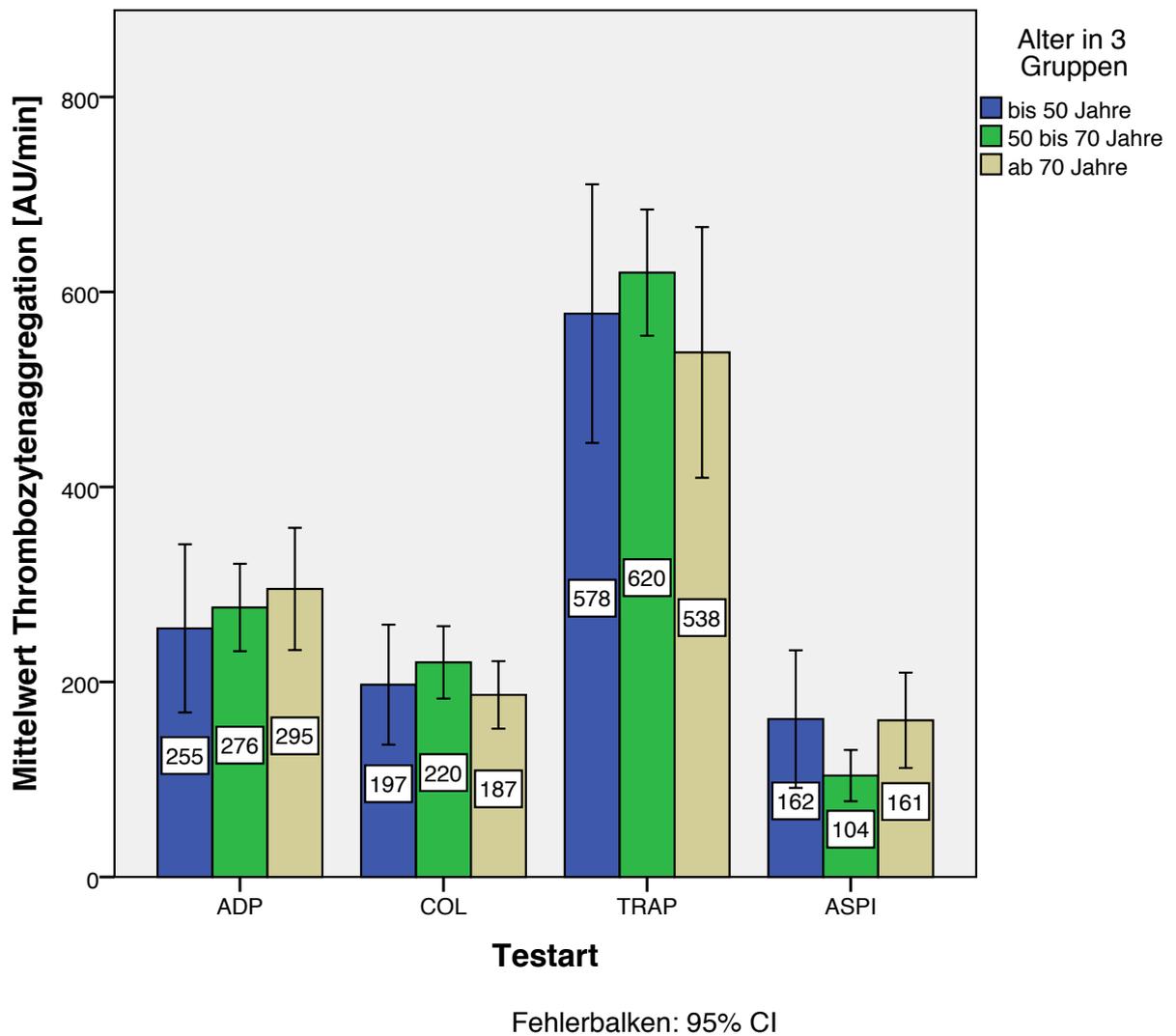
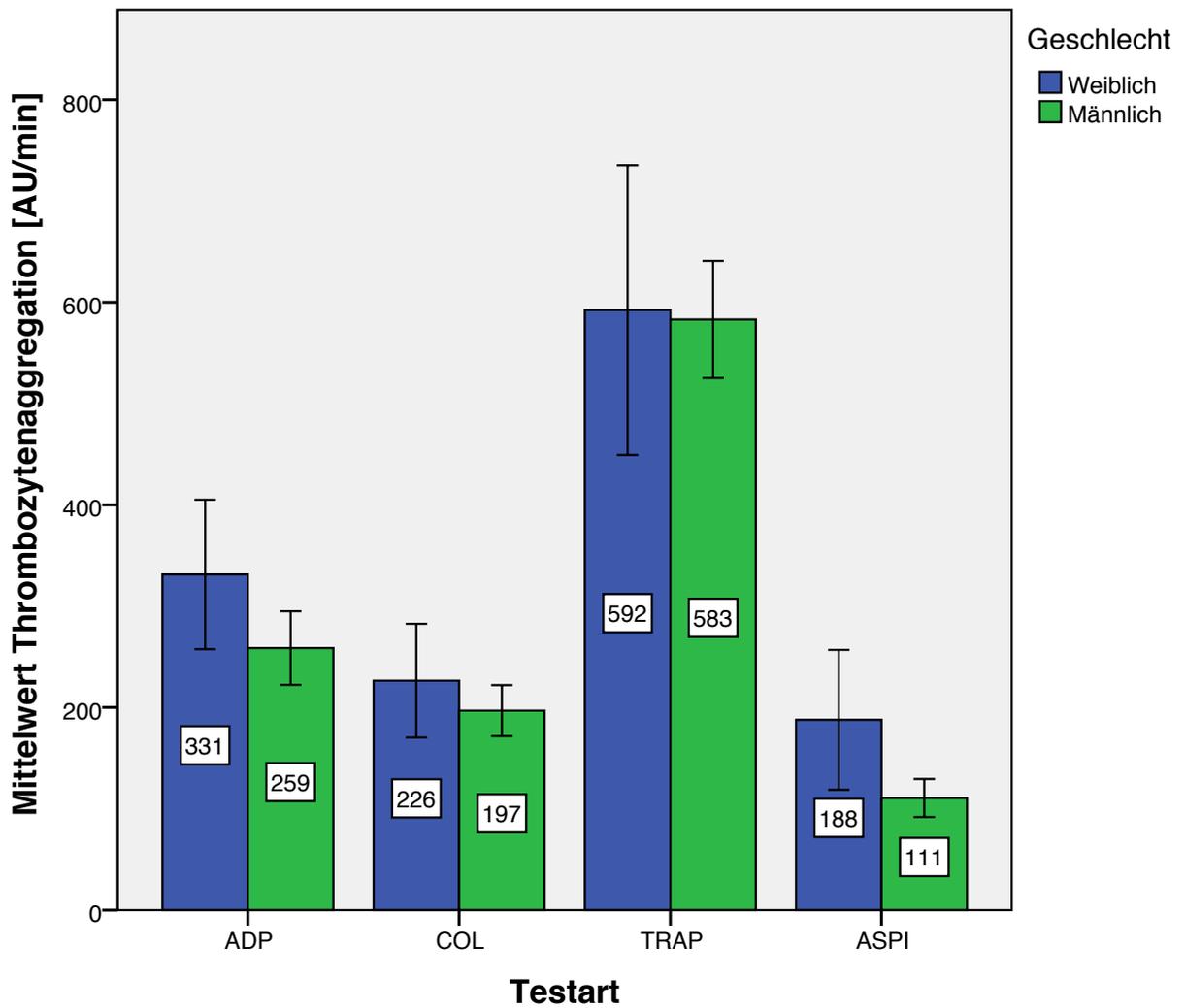


Abbildung 32. Thrombozytenaggregation je Test und Altersgruppe.

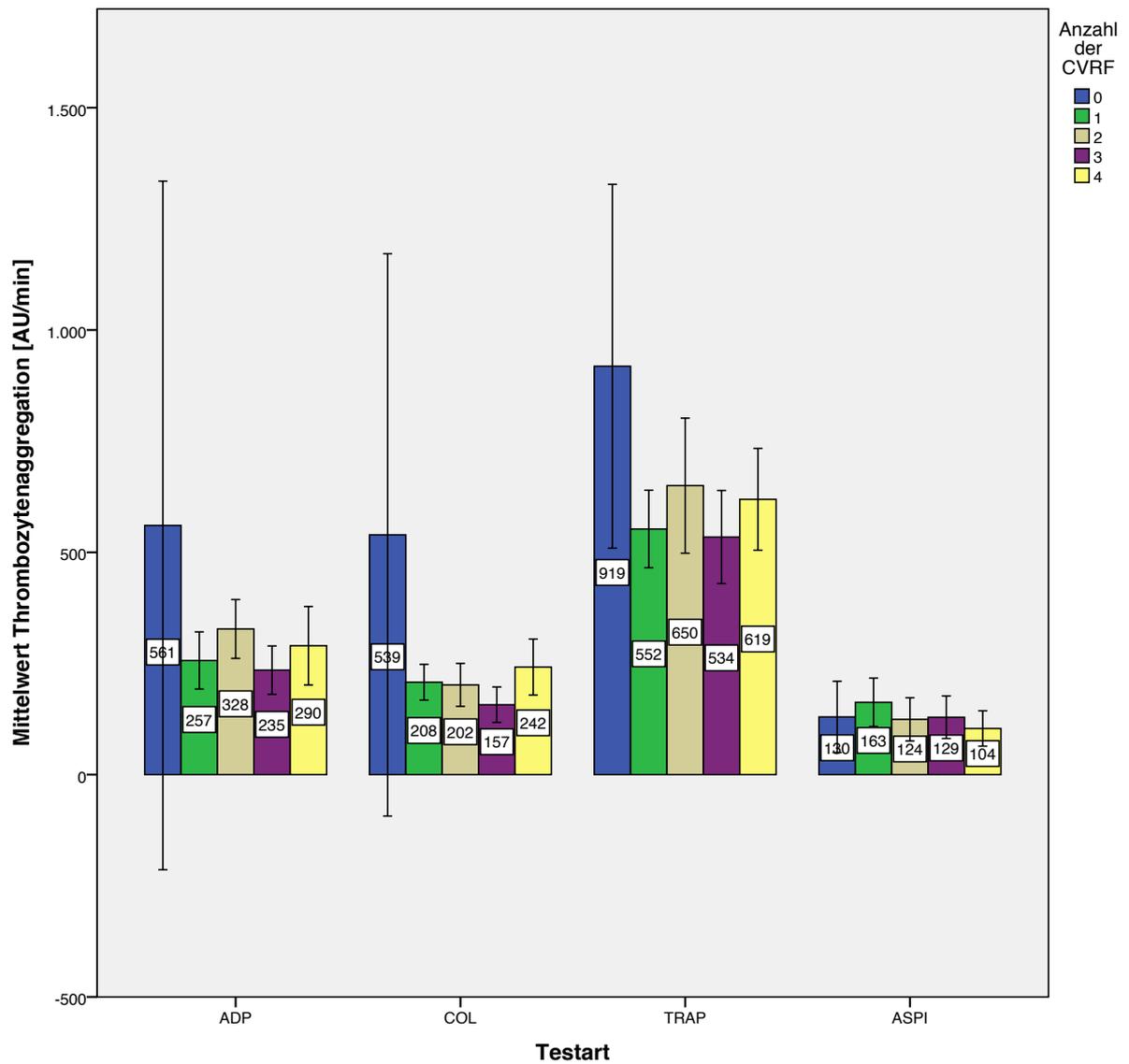
In der Abbildung sind die Mittelwerte der Thrombozytenaggregation in drei Altersgruppen aufgetragen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen (unter 49-jährige, der 50-69-jährige und der über 70-jährige).



Fehlerbalken: 95% CI

Abbildung 33. Thrombozytenaggregation bei Männern und Frauen.

Es sind die Mittelwerte der Thrombozytenaggregation nach Geschlechtern getrennt aufgetragen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.



Fehlerbalken: 95% CI

Abbildung 34. Thrombozytenaggregation je Anzahl der CVRF.

Es sind die Mittelwerte der Thrombozytenaggregation in Gruppen der Anzahl der CVRF aufgetragen. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Multiplate® ist ein relativ neues Verfahren, das erst seit 2006 häufiger zur Messung der Thrombozytenaggregation angewandt wird. Es ist ein Verfahren zur Vollblutaggregometrie, das per Impedanzmessung so realitätsgenau wie möglich die Aggregation im Vollblut des Patienten misst. Bei der Messung sind Erythrozyten, Leukozyten und auch weitere lösliche Blutbestandteile anwesend, während bei den bestehenden, alternativen Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion in einem zeit- und arbeitsaufwändigen Verfahren zunächst Platelet-Rich-Plasma gewonnen werden muss. Diese Methoden werden als „Light Transmission Aggregometry“ (LTA) und „turbidimetric aggregometry“ bezeichnet. Es wird noch diskutiert, welche dieser Methoden unter welchen Aspekten mehr Aussagekraft haben. Konsens ist allerdings momentan, dass diese verschiedenen Messsysteme, kaum vergleichbare Messergebnisse liefern (Mueller et al. 2007; Seyfert et al. 2007), obwohl die medikamentöse Hemmung der Thrombozytenaggregation, z.B. mit Clopidogrel gleich zuverlässig durch die verschiedenen Messsysteme nachgewiesen werden können (Sibbing et al. 2008). Somit könnte diese Studie durch weitere Thrombozytenfunktionstests ergänzt werden. MEA wurde jedoch als Methode gewählt, da die Aggregation wie *in vivo* an verletzten Gefäßoberflächen abläuft und nicht im flüssigen Medium, wie beispielsweise bei LTA.

MEA könnte störanfällig durch vielfältige Veränderungen im Blut sein, beziehungsweise seine Behandlung. Allerdings zeigen verschiedene Publikationen, dass MEA auch unter verschiedenen getesteten Bedingungen valide Messergebnisse liefern (Toth et al. 2006; Seyfert et al. 2007; Sibbing et al. 2008).

Erwähnenswert ist auch ein Mehrgewinn an Informationen, da MEA-Messungen als Kurve mit zeitlichem Verlauf dargestellt werden und sowohl die maximale Höhe, als auch die Fläche unter der Kurve angegeben wird.

Von Vorteil ist auch die gute Prozesswiederholbarkeit durch Automatisierung und geringere Fehlerquellen im Ablauf, da das Gerät intuitiv bedient werden kann und z.B. mit einer automatischen Pipette ausgestattet ist. Es kann an 5 Messzellen gleichzeitig (je 2 Messungen) genutzt werden und auch hierdurch ergibt sich ein Zeitersparnis im Vergleich zu anderen Verfahren.

Da die Testzellen Einmalartikel sind, werden Fehler, z.B. durch Änderung der Oberflächenstruktur der Messelektroden, unvollständige Entfernung der zuvor aggregier-

ten Thrombozyten bei der Aufbereitung der Materialien oder auch durch Abnutzung, minimiert.

Durch die verschiedenen Methoden der Stimulation kann differenziert zwischen Teilaspekten der Thrombozytenaggregation unterschieden werden. Somit kann man untersuchen, inwiefern die Aggregation verändert ist, oder was einzelne zu testende Wirksubstanzen mit den Thrombozyten machen. Allerdings gibt es auch hier Überschneidungen bei durchgeführten Tests, Inhibitoren der Aggregation und Stimulanzen.

5.1.1 Versuchsserie *in vitro*

Ein *in-vitro*-Versuch kann nie 100% die Gegebenheiten *in vivo* wiedergeben. Dennoch kann man, ohne die Patienten gravierend zu gefährden, bereits mit wenig Zeit- und Arbeitsaufwand versuchen, mehr Hinweise zu erhalten. Zudem lassen sich die Bedingungen besser standardisieren und somit kann man mit kleineren Fallzahlen arbeiten und dennoch aussagekräftige Ergebnisse erzielen. Es sollte somit der erste Schritt wissenschaftlicher Forschung sein, der allerdings vor Umsetzung noch weitere Tier- und klinische Studien durchlaufen muss.

Auch Testreihen mit gesunden Probanden sind risikoarm, können aber nicht unbedingt exakte Informationen über die Verhältnisse und Auswirkungen bei Erkrankten geben.

5.1.2 Studienform von REVIVAL-3

Die REVIVAL-3 Studie ist prospektiv, randomisiert, doppelblind und Placebo-kontrolliert. Dies ist eines der aussagekräftigsten Studienmodelle. Allerdings könnten größer-angelegte, multizentrische Studien sowie Metaanalysen hier detailgenauere Informationen bringen und statistisch besser abgesicherte Ergebnisse liefern und geringere Unterschiede detektieren, als eine Gruppe von nur 45 Patienten.

Da nur 22% des Studienkollektivs Frauen waren, kann keine repräsentative Aussage für die Gesamtbevölkerung getroffen werden. Es waren sowohl Frauen, als auch Männer aller Altersstufen inkludiert, so dass der Altersdurchschnitt relativ gut der für die Erkrankung am akuten Myokardinfarkt typischen Altersspanne entspricht. Weitere klinische Charakteristika waren relativ ausgewogen in EPO- und Placebogruppe verteilt.

Relativ grosse Infarktareale (CK-Mittelwert von 2197 U/l) und 34% der Patienten mit \geq Dreifäßerkrankung, sowie 2,3 CVRF durchschnittlich sprechen für einen Ausschnitt einer Risikogruppe: Patienten dieser Gruppe könnten eventuell am meisten und frühesten von Verbesserungen und Ergänzungen der bisherigen Standardtherapie profitieren.

Meines Wissens ist dies eine der am höchsten dosierten EPO-Studien mit maximaler kumulativer Dosis von 99 000 IU von EPO über einen kurzen Zeitraum von 48 Stunden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- *In vitro* konnten 10, 100 und 200 IU EPO innerhalb von 30 Minuten bis zwei Stunden kaum messbare Änderung der Thrombozytenaggregation auslösen.
- Die Thrombozytenanzahl im akuten Myokardinfarkt mit und ohne EPO nach erfolgreicher PCI und Standard-Therapie unterschied sich nach 120 Stunden nicht.
- Bei der gemessenen Thrombozytenaggregation ließen sich auch mit verschiedenen Tests keine Unterschiede zwischen der EPO-Gruppe und der Placebo-Gruppe nachweisen.
- Auch die Thrombingeneration unterschied sich nicht in beiden Gruppen.

5.2.2 Versuchsserie *in vitro*

Mit Hilfe von *in vitro* Versuchen mit Blut von zehn gesunden Probanden sollte der Einfluss von EPO auf die Thrombozytenaggregation kurzzeitig nach EPO-Gabe untersucht werden. Die Messungen zeigten nach 30 Minuten im ADP- und COL-Test leichte Minderungen der Aggregation nach Inkubation mit 200 IU EPO. Nach zwei Stunden fanden sich in beiden Tests bei 200 IU EPO eine Erhöhung der Aggregation. Dies könnte anzeigen, dass die thrombembolische Wirkung von EPO sich erst nach

längerer Einwirkzeit entfaltet. Die Ergebnisse der eingeschränkten Versuchsreihe müssten durch Versuche mit verlängerten Inkubationszeiten untermauert werden.

Im ASPI-Test war bei den mit 10 IU versetzten Proben sowohl nach 30 Minuten wie auch nach zwei Stunden eine Steigerung der Thrombozytenaggregation zuerkennen. Es könnte sein, dass EPO über verschiedene Wege auf die Thrombozytenaggregation Einfluss nehmen kann und über Thromboxan A2 bereits früher Auswirkungen zeigt, als über ADP- und Kollagenrezeptoren. Auch ist es möglich, dass geringere Dosen EPO, wie in diesem Versuch (10IU EPO) ebensoviel oder sogar mehr Effekte haben könnten. Die Studie von Taniguchi et al. findet auch bei geringeren EPO Dosen einen Effekt auf die LVEF (Taniguchi et al. 2010).

Um dies zu bestätigen sollten Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Probanden und mit erweiterten EPO-Dosierungen durchgeführt werden.

Im TRAP-Test zeigten sich keinerlei Unterschiede nach verschiedenen EPO-Gaben im Vergleich zu unbehandelten Proben.

Im Vergleich der über 30 Minuten inkubierten Proben mit den über zwei Stunden inkubierten Proben fanden sich kaum signifikante Unterschiede, bei 10 IU EPO im ADP-, TRAP und ASPI-Test, bei 100 IU EPO im COL- und TRAP-Test, bei 200 IU EPO nur noch im TRAP- Test. Hier liess sich weder 100%-ig feststellen, ob eine Wirkung von EPO von der Zeit abhängt, noch liess sich dieses ausschliessen.

Die Blutproben ohne jegliche Mischung mit EPO unterschieden sich signifikant nach 30 Minuten und zwei Stunden in den ADP-, COL- und TRAP-Tests. Dies könnte darauf hinweisen, dass hier noch weitere Größen, wie die Zeit Einfluss auf die Thrombozytenaggregation nehmen. Somit sind die Änderungen der Aggregation nicht zu 100% auf die Inkubation mit EPO zurückzuführen. Lediglich der ASPI-Test schien hiervon nicht beeinflusst. Die Ergebnisse der eingeschränkten Versuchsreihe könnten durch die Erhöhung der Anzahl an Probanden und durch eine Erweiterung der Konzentrationsstärke der EPO-Dosierungen sowie verlängerter Inkubationszeiten validiert werden. Eine Bestätigung der Ergebnisse wäre insofern von Bedeutung, da eine erhöhte Reaktivität der Thrombozyten zur Aggregation vermutlich gefährliche Nebenwirkungen verursachen könnte. In zwei groß angelegten klinischen Studien zur Wirkung von EPO im akuten Myokardinfarkt wurde ein Anstieg der thromboembolischen Ereignisse beschrieben (Ott et al. 2010; Najjar et al. 2011). Allerdings waren auch dabei die Fallzahlen zu gering, um Erhöhungen der Mortalität feststellen zu können.

5.2.3 Substudie von REVIVAL-3

In dem klinischen Rahmen des akuten Myokardinfarkts, was meist mit einem akuten, thrombotischen oder thrombembolischen Verschluss eines Gefäßes einhergeht und somit eine eventuelle Reaktivitätsänderung der Thrombozyten eintritt, konnten wir keine Auswirkungen des EPOs auf die Thrombozytenaggregation oder -anzahl feststellen. Die Mittelwerte der Thrombozytenanzahl lagen vergleichsweise niedrig. Wir vermuten als Ursache einen Verdünnungseffekt durch Infusionen.

Auch war kein Einfluss des Alters, der CVRF oder des Geschlechts auf die Thrombozytenaggregation festzustellen. Wir fanden jedoch die Thrombozytenaggregation vermutlich aufgrund der dualen Plättchenhemmung mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel deutlich gehemmt. Da sich hier die EPO- und die Placebogruppe nicht signifikant unterschieden, vermuten wir, dass EPO die Wirkung der Aggregationshemmer nicht mindert.

5.3 Relevanz der Ergebnisse

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Hämostase, vor allem bei der Erkennung der Verletzung, dem Rekrutieren weiterer Thrombozyten durch interzelluläre Kommunikation, dem Adhärenieren untereinander und der Interaktion mit der Gerinnungskaskade, um die betroffene Gefäßläsion abzudichten. Das akute Koronarsyndrom ist mit inadäquater Thrombozytenaktivierung verbunden, einem zentralen Punkt der Pathogenese thrombotischer Komplikationen nach Koronarintervention (Davi und Patrono 2007).

Die residuale Thrombozytenreaktivität nach PCI ist ein unabhängiger Prädiktor für die Schädigung des Herzens im akuten Myokardinfarkt (Marcucci et al. 2007).

Lange bekannt ist, dass in einem weniger akuten Setting, in dem Patienten eine Langzeitbehandlung mit EPO erhielten, ein erhöhter Hämatokrit mit einer erhöhten Rate an thrombembolischen Ereignissen assoziiert war (Besarab et al. 1998; Singh et al. 2006; Pfeffer et al. 2009). Mögliche Mechanismen dafür könnten die Steigerung der Thrombozytenbildung und -freisetzung sowie deren erhöhte Reaktivität gewesen sein. Andererseits könnten nicht-hämatopoetische Mechanismen des EPO ebenfalls begünstigend zu einem akuten Myokardinfarkt beigetragen haben. Es wurden nämlich EPO-Rezeptoren im kardiovaskulären System sogar an Endothelzellen, und Kardiomyozyten nachgewiesen (Anagnostou et al. 1994; Wright et al. 2004). Einige *in vitro* und *in vivo* Studien zeigten eine protektive Wirkung von EPO während

Ischämie- und Reperfusionenmodellen, die mit einer Reduktion der Infarktgröße und Apoptose einherging (Calvillo et al. 2003; Tramontano et al. 2003; Cai und Semenza 2004; Shi et al. 2004; van der Meer et al. 2004; Bullard et al. 2005; Hanlon et al. 2005; Lipsic et al. 2008). Erste klinische Studien bestätigten die Verträglichkeit von EPO in akuten Myokardinfarkt und Schlaganfall (Ehrenreich et al. 2002; Ozawa et al. 2010).

Trotz dieser vielversprechenden Daten konnte in weiteren klinischen Studien kein Benefit einer EPO-Gabe im akuten Myokardinfarkt gefunden werden (Ott et al. 2010; Taniguchi et al. 2010; Voors et al. 2010; Najjar et al. 2011; Suh et al. 2011). Im Gegenteil, die REVEAL-Studie zeigte ebenso wie unsere REVIVAL-3 Studie sogar eine Tendenz zu mehr Komplikationen (Ott et al. 2010; Najjar et al. 2011). Die Ursachen dafür sind unklar. Es gibt jedoch Hinweise, dass EPO sowohl die Thrombozytenanzahl als auch deren Reaktivität beeinflusst (Berridge et al. 1988; Tsukada et al. 1990; Wolf et al. 1997; Stohlawetz et al. 2000; Tang et al. 2007). Da die Thrombozytenfunktion in Bezug auf Komplikationen des akuten Myokardinfarkts extrem wichtig ist, muss die Wirkung von EPO auf die Thrombozyten berücksichtigt werden. Die Behandlung mit EPO über einen kurzen Zeitraum ist mit einem Anstieg der Thrombozytenzahlen in Tiermodellen und bei gesunden Probanden vergesellschaftet. In unserer Studie fanden wir keine erhöhten Thrombozytenzahlen bei Patienten, die hochdosiertes EPO über einen kurzen Zeitraum im akuten Myokardinfarkt erhielten.

Bisher gab es wenig Studien in diesem Setting zu möglichen Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion. Im Mausmodell zeigte sich eine vermehrte Thrombozythenadhäsion unter EPO-Behandlung bei Extremitätenischämie (Kato et al. 2010). Wolf et al. erklärten, die aufgrund von EPO-Therapie neu gebildeten Thrombozyten seien zunächst hyperreaktiv (Wolf et al. 1997). Stohlawetz et al. fanden bei der Untersuchung der Thrombozytenfunktion gesunder Probanden ebenfalls vermehrt reaktive Thrombozyten nach EPO-Gabe bei der Untersuchung mit TRAP (Stohlawetz et al. 2000). Ähnliche Ergebnisse gab es bei Patienten, die aufgrund anderer Erkrankungen mit EPO behandelt wurden (Taylor et al. 1992; Tassies et al. 1998; Homoncik et al. 2004).

Wir beobachteten in unserer Studie keine erhöhte Thrombozytenreaktivität in den mit EPO behandelten Patienten. Um dies genauer zu examinieren, analysierten wir die Thrombozytenaggregation mit vier verschiedenen Stimulantien. Alle Tests mit verschiedenen Stimulantien zeigten ähnliche Zeitverläufe wie die unstimulierten Tests. Wir vermuten, dass dies auf die periinterventionelle antithrombotische Therapie mit ASS und Clopidogrel zurückzuführen war, da die Thrombozytenaggregation in den

ersten 48 Stunden nach PCI signifikant absank. Dennoch könnten mögliche signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen unerkannt geblieben sein. Dies könnte mit einer größer angelegten Studie abgeklärt werden.

Auch könnten Prozesse am Endothel für die erhöhte Rate an thrombembolischen Komplikationen verantwortlich sein. Die Untersuchungen von Fuste et al. z.B deuten darauf hin, dass EPO Endothelzellen stimuliert, was zu einer erhöhten Thrombogenität führte (Fuste et al. 2002). Weitere Nachforschungen wären auch hier von großem Nutzen, um die vermehrten thrombembolischen Ereignisse bei EPO-Therapie zu erklären.

Die Thrombinbildung stieg nach dem akuten Infarkt und der PCI, wie zuvor beschrieben, was eine allgemeine Hyperkoagulabilität ebenso wie Entzündungsprozesse reflektiert. Allerdings beobachteten wir dazu keine Unterschiede zwischen der EPO- und der Placebogruppe (Busch et al. 2005).

Auch wenn Studien mit Ratten Dosen von 350 bis 5000 IU/kg nutzten (Ye et al. 2006), was bis zu 350 000 IU im Menschen entspricht, war die kumulierte Dosis von 100 000 IU dieser Studie unter den höchsten, in klinischen Studien getesteten, Dosen EPO.

Zusammenfassend bewirkte in der Studie „akuter Myokardinfarkt mit Standardtherapie bestehend aus Acetylsalicylsäure und Clopidogrel“ kurzzeitige EPO-Gabe weder eine Erhöhung der Thrombozytenzahlen, noch eine Änderung der Aggregation.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsche Zusammenfassung

Hintergrund: In experimentellen Studien wurde bereits gezeigt, dass EPO im akuten Myokardinfarkt die Herzfunktion verbessert. Allerdings zeigte sich auch eine Steigerung von thrombembolischen Ereignissen, weswegen diese Arbeit die Wirkung von EPO auf die Thrombozytenaggregation weiter erforschen sollte.

Material und Methoden: Der erste Teil der Arbeit umfasst eine *in vitro*-Testserie, bei der Blut gesunder Patienten mit verschiedenen Dosierungen EPO gemischt wurde. Anschliessend wurde nach Stimulation mit ADP, COL, TRAP und ASPI die Thrombozytenaggregation per Vollblut-Impedanzaggregometrie bestimmt.

Der zweite Teil wertete die Ergebnisse der Substudie der REVIVAL-3 Studie aus, bei der Patienten mit akutem Myokardinfarkt und erfolgreicher PCI hochdosiert EPO oder Placebo erhielten. Die Thrombozytenaggregation wurde 5 Mal im Verlauf mit den selben vier verschiedenen Stimulanzen gemessen.

Ergebnisse: *In vitro* ergab sich im ADP- und COL-Test eine Minderung der Aggregation bei 200 IU EPO, sowohl nach 30 Minuten Inkubationszeit, als auch nach zwei Stunden. Bei ASPI zeigte sich eine Erhöhung der Aggregation bei Behandlung mit 10 IU EPO nach Inkubation über 30 Minuten und über zwei Stunden.

Bei der Thrombozytenaggregation der Patienten der REVIVAL-3 Studie fanden sich keine Unterschiede zwischen der EPO- und der Placebo-Gruppe. Es zeigte sich eine deutliche Minderung der Aggregation bereits 12 Stunden nach PCI, was vermutlich auf die duale Plättchenhemmung mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel zurückzuführen ist. Die Anzahl der Thrombozyten stieg in der EPO-Gruppe nicht auf signifikant höhere Werte als in der Placebo-Gruppe.

Schlussfolgerung: Die Thrombozytenzahl stieg nicht durch EPO-Gabe im akuten Myokardinfarkt an. Es konnte ebenfalls keine Änderung der Thrombozytenaggregation im Vergleich zu den Patienten, die Placebo erhielten nachgewiesen werden.

6.2 English Summary

Background: It has been shown in several studies that erythropoietin improves cardiac function within the setting of acute myocardial infarction. However, a rise in thromboembolic events was also observed. Therefore this dissertation is meant to explore further effects of EPO on the aggregation of platelets.

Materials and Methods: The first part contains a series of *in vitro* experiments with blood samples of healthy individuals, which were treated with several different dosages of EPO. Subsequently, the aggregation of the platelets was tested after stimulation with ADP, COL, TRAP and ASPI in whole-blood-aggregation.

The second part harbours the results of a substudy of the REVIVAL-3 study, in which patients received high-dose EPO or Placebo shortly after myocardial infarction and stenting. The aggregation of platelets was measured five times with the same four stimulants.

Results: *In vitro* experiments resulted in an decrease of aggregation after incubating blood samples with 200 IU EPO during 30 minutes and two hours, tested with ADP and COL. If tested with ASPI, an increase was found after incubation over 30 minutes or two hours with 10 IU EPO.

Within the REVIVAL-3 study no differences between EPO and Placebo group were observed concerning aggregation. A significant diminution of aggregation was shown 12 hours after coronary intervention, which we attribute to dual platelet inhibition with acetylsalicylic acid and clopidogrel. Platelet count in the EPO group did not rise to significantly higher levels as in the placebo group.

Conclusion: Platelet count did not rise significantly due to EPO administration during acute myocardial infarction in contrast to the placebo-treated group. No significant changes in platelet aggregation were observed between both groups.

7 Verzeichnisse

7.1 Abkürzungen

	Abkürzung	Bedeutung
A	ACS	Akutes Koronarsyndrom
	ACE	„Angiotensin-converting-Enzym“
	ADP	Adenosindiphosphat
	ATP	Adenosintriphosphat
	ASPI	Testreagenz, das Arachidonsäure zur Induktion der Thrombozytenaggregation enthält
	ASS	Acetylsalicylsäure
	AU	Aggregationseinheiten „Aggregation Units“
	AUC	Fläche unter der Kurve „Area under the Curve“
	AP-1	Aktivator- Protein-1
	ArS	Arachidonsäure
C	Ca ²⁺	Kalzium
	CD40	„Cluster of Differentiation 40“
	CK	Kreatinkinase
	CK-MB	Herzmuskelspezifische Kreatinkinase
	CNP	C-typ natriuretisches Peptid
	COL	Testreagenz, das Kollagen zur Induktion der Thrombozytenaggregation enthält
	COX	Cyclooxygenase
	CRP	C-Reaktives Protein
	CVRF	Kardiovaskuläre-Risikofaktoren
E	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	EF	Ejektionsfraktion

	Abkürzung	Bedeutung
	EGF	„Epidermal Growth Factor“
	EKG	Elektrokardiogramm
	ENA	Epitheliales, Neutrophile-aktivierendes Peptid
	EPO	Erythropoietin (rekombinantes humanes Erythropoietin beta; NeoRecormon®)
F	FGF	„Fibroblast Growth Faktor“
G	GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa, auch Integrin α IIb β 3
	GP IV	Glykoprotein IV
	Gq	G-Protein
H	Hb	Hämoglobin
I	ICAM	„Intercellular Adhesionmolecule“
	IGF	„Insulin-like Growth Factor“
	IL	Interleukin
L	LAD	„Left Anterior Artery“
	LCX	„Circumflex Branch of Left Artery“
	LDL	„Low Density Lipoprotein“
	LVEF	Linksvenrikuläre Ejektionsfraktion
	LTA	„Light Transmission Aggregometry“
M	MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
	MCP	„Monocyte-chemoattractant Protein“
	MCSF	„Macrophage Colony-stimulating Factor“
	MI	Myokardinfarkt
	Min.	Minuten
	MIP	„Macrophage Inflammatory Protein“
	MMP	Matrixmetalloprotease
	MRT	Magnetresonanztomographie
	MEA	„Multiple Electrodes Aggregation“

	Abkürzung	Bedeutung
	Mg ²⁺	Magnesium
N	NO	Stickstoffmonoxid
	NF-κB	Nukleärer Faktor κB
	NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
P	P2Y	Purinergischer Rezeptor
	PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
	PAR	Thrombozytenproteinase-aktivierender Rezeptor, auch „Platelet Proteinase-activated Receptor“
	PCI	Perkutane Koronarintervention
	PDGF	„Platelet-derived Growth Factor“
	PECAM	„Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule“
	PF4	„Platelet Factor 4“
	PGI	Prostaglandin
R	RANTES	„Regulated and Normal T-cell Expressed and Secreted“, auch CCL5, d.h. Chemokinligand 5
	RCA	„Right Coronary Artery“
S	SD	Standardabweichung „Standard Deviation“
	STEMI	ST-Strecken-Hebungsinfarkt
	STAT 5	„Signal Transducer and Activator of Transkription“
	SEM	Standardfehler „Standard Error of the Mean“
	SPECT	Single-Photon-Emissions Computertomographie
T	TF	„Tissue Factor“
	TGF	„Transforming growth factor“
	TNFα	„Tumornekrose Faktor“
	TRAP	Thrombinrezeptor-aktivierendes-Peptid
	TP	Thromboxanrezeptor
	TXA ₂	Thromboxan A ₂

	Abkürzung	Bedeutung
V	VCAM	„Vascular Celladhesion Molecule“
	VEGF	„Vascular Endothelial Growth Factor“
	vgl.	vergleiche
	vWF	von-Willebrand-Faktor
W	WHO	World Health Organisation
Z	z.B.	Zum Beispiel

Die Einheiten entsprechen der SI-Norm.

Zur besseren Lesbarkeit des Textes wurde auf die jeweilige weibliche Form verzichtet. Natürlich sind diese ebenso angesprochen.

7.2 Abbildungen

Abbildung 1.	Zusammenhang zwischen CVRF, Endotheldysfunktion und Inflammation beim ACS.	9
Abbildung 2.	Die Entstehung Artherosklerotischer Plaques.	11
Abbildung 3.	Flow-Chart zur Therapieentscheidung bei ACS.	14
Abbildung 4.	Inhaltsstoffe der Thrombozyten.	17
Abbildung 5.	Vom Tethering zum Thrombus.	18
Abbildung 6.	Aktivierung des Thrombozyt.	20
Abbildung 7.	Aufbau des Erythropoietins.	24
Abbildung 8.	Prinzip der Aggrgationsmessung über Impedanzänderung.	33
Abbildung 9.	Aggregationskurve.	34
Abbildung 10.	Funktionsweise der verschiedenen Testreagenzien; Einfluss der Aggregationshemmung.	35
Abbildung 11.	Study-Flow-Chart der REVIVAL-3-Studie.	39
Abbildung 12.	Histogramm zur Verteilung der Thrombozytenzahlen.	42
Abbildung 13.	Änderung der Thrombozytenaggregation nach 30 Minuten.	44
Abbildung 14.	Änderung der Thrombozytenaggregation nach zwei Stunden.	46
Abbildung 15.	Histogramm zur Altersverteilung.	49
Abbildung 16.	Kardiovaskuläre Risikofaktoren.	50
Abbildung 17.	Verteilung der Risikofaktoren.	51
Abbildung 18.	Anzahl der CVRF pro Altersgruppe.	52
Abbildung 19.	Anzahl der CVRF bei Männern und Frauen.	53
Abbildung 20.	Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit.	54
Abbildung 21.	Anzahl der CVRF je Anzahl der betroffenen Gefäße.	55
Abbildung 22.	Verlauf der Thrombozytenzahlen.	57
Abbildung 23.	Thrombozytenzahlen 60 Stunden nach PCI	58
Abbildung 24.	Thrombozytenzahl nach Geschlechtern und EPO oder Placebogruppe.	58

Abbildung 25.	Hämoglobinwerte 120 Stunden nach PCI.	59
Abbildung 26.	Verlauf des Hb-Werts.	59
Abbildung 27.	Prothrombinfragment.	60
Abbildung 28.	Verlauf der Retikulozytenwerte.	61
Abbildung 29.	CRP-Werte im Verlauf.	62
Abbildung 30.	Verlauf der Leukozytenanzahl.	62
Abbildung 31.	Thrombozytenaggregation.	64
Abbildung 32.	Thrombozytenaggregation je Test und Altersgruppe.	65
Abbildung 33.	Thrombozytenaggregation bei Männern und Frauen.	66
Abbildung 34.	Thrombozytenaggregation je Anzahl der CVRF.	67

7.3 Tabellen

Tabelle 1.	Wirkungsorte von EPO.	26
Tabelle 2.	Messung der Thrombozytenaggregation nach 30 Minuten Inkubation.	43
Tabelle 3.	Messung der Thrombozytenaggregation nach 2 Stunden Inkubation.	45
Tabelle 4.	Vergleich der Thrombozytenaggregation zu verschiedenen Zeitpunkten.	47
Tabelle 5.	Allgemeine, klinische Charakteristika der Patienten.	48
Tabelle 6.	Kreuztabelle zu Alter und CVRF.	52
Tabelle 7.	Kreuztabelle zu Geschlecht und CVRF.	53
Tabelle 8.	Kreuztabelle zu betroffenen Gefäßen und CVRF.	55
Tabelle 9.	Mittelwerte und Standardabweichung der Thrombozytenzahlen.	56

7.4 Bibliografie

- (1996). "A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee." *Lancet* **348**(9038): 1329-1339.
- (2001). "Lifestyle and risk factor management and use of drug therapies in coronary patients from 15 countries; principal results from EUROASPIRE II Euro Heart Survey Programme." *Eur Heart J* **22**(7): 554-572.
- Ammarguella, F., M. Llovera, P. A. Kelly und V. Goffin (2001). "Low doses of EPO activate MAP kinases but not JAK2-STAT5 in rat vascular smooth muscle cells." *Biochem Biophys Res Commun* **284**(4): 1031-1038.
- Anagnostou, A., E. S. Lee, N. Kessimian, R. Levinson und M. Steiner (1990). "Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(15): 5978-5982.
- Anagnostou, A., Z. Liu, M. Steiner, K. Chin, E. S. Lee, N. Kessimian und C. T. Noguchi (1994). "Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(9): 3974-3978.
- Andrioli, G., R. Ortolani, L. Fontana, S. Gaino, P. Bellavite, C. Lechi, P. Minuz, F. Manzato, G. Tridente und A. Lechi (1996). "Study of platelet adhesion in patients with uncomplicated hypertension." *J Hypertens* **14**(10): 1215-1221.
- Antman, E. M., D. T. Anbe, P. W. Armstrong, E. R. Bates, L. A. Green, M. Hand, J. S. Hochman, H. M. Krumholz, F. G. Kushner, G. A. Lamas, C. J. Mullany, J. P. Ornato, D. L. Pearle, M. A. Sloan, S. C. Smith, Jr., J. S. Alpert, J. L. Anderson, D. P. Faxon, V. Fuster, R. J. Gibbons, G. Gregoratos, J. L. Halperin, L. F. Hiratzka, S. A. Hunt und A. K. Jacobs (2004). "ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction--executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 1999 Guidelines for the Management of Patients With Acute Myocardial Infarction)." *Circulation* **110**(5): 588-636.
- Bachmann, S., M. Le Hir und K. U. Eckardt (1993). "Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin." *J Histochem Cytochem* **41**(3): 335-341.
- Badimon, L., G. Vilahur und T. Padro (2009). "Lipoproteins, platelets and atherothrombosis." *Rev Esp Cardiol* **62**(10): 1161-1178.
- Baigent, C., R. Collins, P. Appleby, S. Parish, P. Sleight und R. Peto (1998). "ISIS-2: 10 year survival among patients with suspected acute myocardial infarction in randomised comparison of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither. The ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group." *BMJ* **316**(7141): 1337-1343.
- Berridge, M. V., J. K. Fraser, J. M. Carter und F. K. Lin (1988). "Effects of recombinant human erythropoietin on megakaryocytes and on platelet production in the rat." *Blood* **72**(3): 970-977.
- Besarab, A., W. K. Bolton, J. K. Browne, J. C. Egrie, A. R. Nissenson, D. M. Okamoto, S. J. Schwab und D. A. Goodkin (1998). "The effects of normal as

- compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin." *N Engl J Med* **339**(9): 584-590.
- Bodor, E. T., G. L. Waldo, S. B. Hooks, J. Corbitt, J. L. Boyer und T. K. Harden (2003). "Purification and functional reconstitution of the human P2Y₁₂ receptor." *Mol Pharmacol* **64**(5): 1210-1216.
- Bolhuis, P. A., K. S. Sakariassen und J. J. Sixma (1979). "Adhesion of blood platelets to human arterial subendothelium: role of factor VIII-Von Willebrand factor." *Haemostasis* **8**(3-5): 312-323.
- Brand, K., S. Page, G. Rogler, A. Bartsch, R. Brandl, R. Knuechel, M. Page, C. Kaltschmidt, P. A. Baeuerle und D. Neumeier (1996). "Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion." *J Clin Invest* **97**(7): 1715-1722.
- Brass, L. F., L. Zhu und T. J. Stalker (2005). "Minding the gaps to promote thrombus growth and stability." *J Clin Invest* **115**(12): 3385-3392.
- Bullard, A. J., P. Govewalla und D. M. Yellon (2005). "Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo." *Basic Res Cardiol* **100**(5): 397-403.
- Bundesamt für Statistik, D. (2008). Todesursachenstatistik. Bonn, Z.
- Bundesamt für Statistik, D. (2010). Todesursachenstatistik. Bonn, Z.
- Burger, D., A. Xenocostas und Q. P. Feng (2009). "Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin." *Curr Mol Pharmacol* **2**(1): 56-69.
- Burke, A. P., F. D. Kolodgie, A. Farb, D. K. Weber, G. T. Malcom, J. Smialek und R. Virmani (2001). "Healed plaque ruptures and sudden coronary death: evidence that subclinical rupture has a role in plaque progression." *Circulation* **103**(7): 934-940.
- Busch, G., I. Seitz, B. Steppich, S. Hess, R. Eckl, A. Schomig und I. Ott (2005). "Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes: implications in acute myocardial infarction." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(2): 461-466.
- Cai, Z., D. J. Manalo, G. Wei, E. R. Rodriguez, K. Fox-Talbot, H. Lu, J. L. Zweier und G. L. Semenza (2003). "Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury." *Circulation* **108**(1): 79-85.
- Cai, Z. und G. L. Semenza (2004). "Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury." *Circulation* **109**(17): 2050-2053.
- Calvillo, L., R. Latini, J. Kajstura, A. Leri, P. Anversa, P. Ghezzi, M. Salio, A. Cerami und M. Brines (2003). "Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4802-4806.
- Canizares, C., N. Vivar und M. Herdoiza (1994). "Role of the microtubular system in platelet aggregation." *Braz J Med Biol Res* **27**(7): 1533-1551.
- Collins, T. und M. I. Cybulsky (2001). "NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?" *J Clin Invest* **107**(3): 255-264.
- Conroy, R. M., K. Pyorala, A. P. Fitzgerald, S. Sans, A. Menotti, G. De Backer, D. De Bacquer, P. Ducimetiere, P. Jousilahti, U. Keil, I. Njolstad, R. G. Oganov, T. Thomsen, H. Tunstall-Pedoe, A. Tverdal, H. Wedel, P. Whincup, L. Wilhelmsen und I. M. Graham (2003). "Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project." *Eur Heart J* **24**(11): 987-1003.

- Corti, R., M. E. Farkouh und J. J. Badimon (2002). "The vulnerable plaque and acute coronary syndromes." Am J Med **113**(8): 668-680.
- Corti, R., V. Fuster und J. J. Badimon (2003). "Pathogenetic concepts of acute coronary syndromes." J Am Coll Cardiol **41**(4 Suppl S): 7S-14S.
- Davi, G. und C. Patrono (2007). "Platelet activation and atherothrombosis." N Engl J Med **357**(24): 2482-2494.
- Davies, M. J. (1996). "Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995." Circulation **94**(8): 2013-2020.
- Davis, J. M., T. Arakawa, T. W. Strickland und D. A. Yphantis (1987). "Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells." Biochemistry **26**(9): 2633-2638.
- de Boer, O. J., A. C. van der Wal, P. Teeling und A. E. Becker (1999). "Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization?" Cardiovasc Res **41**(2): 443-449.
- De Candia, E., S. W. Hall, S. Rutella, R. Landolfi, R. K. Andrews und R. De Cristofaro (2001). "Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets." J Biol Chem **276**(7): 4692-4698.
- De Meyer, G. R., M. F. Hoylaerts, M. M. Kockx, H. Yamamoto, A. G. Herman und H. Bult (1999). "Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(10): 2524-2534.
- Depping, R., K. Kawakami, H. Ocker, J. M. Wagner, M. Heringlake, A. Noetzold, H. H. Sievers und K. F. Wagner (2005). "Expression of the erythropoietin receptor in human heart." J Thorac Cardiovasc Surg **130**(3): 877-878.
- Djellas, Y., J. M. Manganello, K. Antonakis und G. C. Le Breton (1999). "Identification of Galpha13 as one of the G-proteins that couple to human platelet thromboxane A2 receptors." J Biol Chem **274**(20): 14325-14330.
- Dynabyte Informationssysteme GmbH, h. "Multiplate." Retrieved 05.10.2012, 2012, from www.multiplate.net.
- Ehrenreich, H., M. Hasselblatt, C. Dembowski, L. Cepek, P. Lewczuk, M. Stiefel, H. H. Rustenbeck, N. Breiter, S. Jacob, F. Knerlich, M. Bohn, W. Poser, E. Ruther, M. Kochen, O. Gefeller, C. Gleiter, T. C. Wessel, M. De Ryck, L. Itri, H. Prange, A. Cerami, M. Brines und A. L. Siren (2002). "Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial." Mol Med **8**(8): 495-505.
- Eschbach, J. W., J. C. Egrie, M. R. Downing, J. K. Browne und J. W. Adamson (1987). "Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial." N Engl J Med **316**(2): 73-78.
- Eshaghian, S., S. Kaul, S. Amin, P. K. Shah und G. A. Diamond (2007). "Role of clopidogrel in managing atherothrombotic cardiovascular disease." Ann Intern Med **146**(6): 434-441.
- EUROASPIRE-II-Study-Group (2001). "Lifestyle and risk factor management and use of drug therapies in coronary patients from 15 countries; principal results from EUROASPIRE II Euro Heart Survey Programme." Eur Heart J **22**(7): 554-572.
- EUROASPIRE-Study-Group (1997). "EUROASPIRE. A European Society of Cardiology survey of secondary prevention of coronary heart disease: principal results. EUROASPIRE Study Group. European Action on Secondary Prevention through Intervention to Reduce Events." Eur Heart J **18**(10): 1569-1582.
- Faraday, N., R. B. Scharpf, J. M. Dodd-o, E. A. Martinez, B. A. Rosenfeld und T. Dorman (2001). "Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and

- thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin." *Anesthesiology* **94**(1): 145-151.
- Ferrario, M., E. Arbustini, M. Massa, V. Rosti, N. Marziliano, C. Raineri, R. Campanelli, A. Bertoletti, G. M. De Ferrari, C. Klersy, L. Angoli, E. Bramucci, B. Marinoni, M. Ferlini, E. Moretti, A. Raisaro, A. Repetto, P. J. Schwartz und L. Tavazzi (2011). "High-dose erythropoietin in patients with acute myocardial infarction: a pilot, randomised, placebo-controlled study." *Int J Cardiol* **147**(1): 124-131.
- Fishbane, S. und A. Besarab (2007). "Mechanism of increased mortality risk with erythropoietin treatment to higher hemoglobin targets." *Clin J Am Soc Nephrol* **2**(6): 1274-1282.
- Flaumenhaft, R., J. R. Dilks, N. Rozenvayn, R. A. Monahan-Earley, D. Feng und A. M. Dvorak (2005). "The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion." *Blood* **105**(10): 3879-3887.
- Foley, R. N. (2008). "Erythropoietin: physiology and molecular mechanisms." *Heart Fail Rev* **13**(4): 405-414.
- Fuste, B., M. Serradell, G. Escolar, A. Cases, R. Mazzara, R. Castillo, A. Ordinas und M. Diaz-Ricart (2002). "Erythropoietin triggers a signaling pathway in endothelial cells and increases the thrombogenicity of their extracellular matrices in vitro." *Thromb Haemost* **88**(4): 678-685.
- Gachet, C. (2006). "Regulation of platelet functions by P2 receptors." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 277-300.
- Gawaz, M., K. Brand, T. Dickfeld, G. Pogatsa-Murray, S. Page, C. Bogner, W. Koch, A. Schomig und F. Neumann (2000). "Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis." *Atherosclerosis* **148**(1): 75-85.
- Gawaz, M., H. Langer und A. E. May (2005). "Platelets in inflammation and atherogenesis." *J Clin Invest* **115**(12): 3378-3384.
- Gawaz, M., F. J. Neumann, T. Dickfeld, W. Koch, K. L. Laugwitz, H. Adelsberger, K. Langenbrink, S. Page, D. Neumeier, A. Schomig und K. Brand (1998). "Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells." *Circulation* **98**(12): 1164-1171.
- Gawaz, M., F. J. Neumann und A. Schomig (1999). "Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy." *Circulation* **99**(1): E1-E11.
- Gawaz, M., A. Ruf, G. Pogatsa-Murray, T. Dickfeld, S. Rudiger, W. Taubitz, J. Fischer, I. Muller, D. Meier, H. Patscheke und A. Schomig (2000). "Incomplete inhibition of platelet aggregation and glycoprotein IIb-IIIa receptor blockade by abciximab: importance of internal pool of glycoprotein IIb-IIIa receptors." *Thromb Haemost* **83**(6): 915-922.
- George, J. C. und G. D. Dangas (2010). "2009 Focused updates to guidelines in ST-elevation myocardial infarction and percutaneous coronary intervention: application to interventional cardiology." *JACC Cardiovasc Interv* **3**(2): 256-258.
- George, J. N. (2000). "Platelets." *Lancet* **355**(9214): 1531-1539.
- Green, D. (2006). "Coagulation cascade." *Hemodial Int* **10** Suppl 2: S2-4.

- Grumann, T., P. Diehl, C. Bode und M. Moser (2007). "[Is stent thrombosis the new Achilles heel of interventional cardiology? State of the Art clinical trials, causes and approaches for prevention]." *Hamostaseologie* **27**(5): 344-350.
- Hamm, C. W. (2004). "[Guidelines: acute coronary syndrome (ACS). 1: ACS without persistent ST segment elevations]." *Z Kardiol* **93**(1): 72-90.
- Hamm, C. W. (2004). "[Guidelines: Acute coronary syndrome (ACS). II: Acute coronary syndrome with ST-elevation]." *Z Kardiol* **93**(4): 324-341.
- Hankey, G. J. und J. W. Eikelboom (2004). "Aspirin resistance." *BMJ* **328**(7438): 477-479.
- Hanlon, P. R., P. Fu, G. L. Wright, C. Steenbergen, M. O. Arcasoy und E. Murphy (2005). "Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling." *FASEB J* **19**(10): 1323-1325.
- Harker, L. A., J. P. Boissel, A. J. Pilgrim und M. Gent (1999). "Comparative safety and tolerability of clopidogrel and aspirin: results from CAPRIE. CAPRIE Steering Committee and Investigators. Clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events." *Drug Saf* **21**(4): 325-335.
- Heeschen, C., A. Aicher, R. Lehmann, S. Fichtlscherer, M. Vasa, C. Urbich, C. Mildner-Rihm, H. Martin, A. M. Zeiher und S. Dimmeler (2003). "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization." *Blood* **102**(4): 1340-1346.
- Heinisch, B. B., B. Vcelar, S. Kapiotis, A. Blann, M. Wolzt, J. M. Siller-Matula und B. Jilma (2012). "The effect of erythropoietin on platelet and endothelial activation markers: A prospective trial in healthy volunteers." *Platelets* **23**(5): 352-358.
- Hense, H. W., E. Koesters, J. Wellmann, C. Meisinger, H. Volzke und U. Keil (2008). "Evaluation of a recalibrated Systematic Coronary Risk Evaluation cardiovascular risk chart: results from Systematic Coronary Risk Evaluation Germany." *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **15**(4): 409-415.
- Hollopeter, G., H. M. Jantzen, D. Vincent, G. Li, L. England, V. Ramakrishnan, R. B. Yang, P. Nurden, A. Nurden, D. Julius und P. B. Conley (2001). "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." *Nature* **409** (6817): 202-207.
- Holmsen, H., H. J. Day und C. A. Setkowsky (1972). "Secretory mechanisms. Behaviour of adenine nucleotides during the platelet release reaction induced by adenosine diphosphate and adrenaline." *Biochem J* **129**(1): 67-82.
- Homoncik, M., P. Jilma-Stohlavetz, M. Schmid, A. Ferlitsch und M. Peck-Radosavljevic (2004). "Erythropoietin increases platelet reactivity and platelet counts in patients with alcoholic liver cirrhosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study." *Aliment Pharmacol Ther* **20**(4): 437-443.
- Imai, N., A. Kawamura, M. Higuchi, M. Oh-eda, T. Orita, T. Kawaguchi und N. Ochi (1990). "Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin." *J Biochem* **107**(3): 352-359.
- Jackson, S. P. (2007). "The growing complexity of platelet aggregation." *Blood* **109** (12): 5087-5095.
- Jackson, S. P., W. S. Nesbitt und S. Kulkarni (2003). "Signaling events underlying thrombus formation." *J Thromb Haemost* **1**(7): 1602-1612.
- Jamiri. (2007). "EPO.png." Retrieved 14.10.2012, 2012, from <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:EPO.png&filetimestamp=20070219163357>.
- Jelkmann, W. (1992). "Erythropoietin: structure, control of production, and function." *Physiol Rev* **72**(2): 449-489.

- Jelkmann, W. (2004). "Molecular biology of erythropoietin." *Intern Med* **43**(8): 649-659.
- Jolly, S. S., J. Pogue, K. Haladyn, R. J. Peters, K. A. Fox, A. Avezum, B. J. Gersh, H. J. Rupprecht, S. Yusuf und S. R. Mehta (2009). "Effects of aspirin dose on ischaemic events and bleeding after percutaneous coronary intervention: insights from the PCI-CURE study." *Eur Heart J* **30**(8): 900-907.
- Kannel, W. B., T. R. Dawber, A. Kagan, N. Revotskie und J. Stokes, 3rd (1961). "Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study." *Ann Intern Med* **55**: 33-50.
- Kaplan, Z. S. und S. P. Jackson (2011). "The role of platelets in atherothrombosis." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2011**: 51-61.
- Kariyazono, H., K. Nakamura, J. Arima, O. Ayukawa, S. Onimaru, H. Masuda, Y. Iguro, H. J. Majima, R. Sakata und K. Yamada (2004). "Evaluation of anti-platelet aggregatory effects of aspirin, cilostazol and ramatroban on platelet-rich plasma and whole blood." *Blood Coagul Fibrinolysis* **15**(2): 157-167.
- Kato, S., H. Amano, Y. Ito, K. Eshima, N. Aoyama, H. Tamaki, H. Sakagami, Y. Satoh, T. Izumi und M. Majima (2010). "Effect of erythropoietin on angiogenesis with the increased adhesion of platelets to the microvessels in the hind-limb ischemia model in mice." *J Pharmacol Sci* **112**(2): 167-175.
- Kawachi, K., Y. Iso, T. Sato, K. Wakabayashi, Y. Kobayashi, Y. Takeyama und H. Suzuki (2012). "Effects of erythropoietin on angiogenesis after myocardial infarction in porcine." *Heart Vessels* **27**(1): 79-88.
- Kawasaki, N., Y. Haishima, M. Ohta, S. Itoh, M. Hyuga, S. Hyuga und T. Hayakawa (2001). "Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin." *Glycobiology* **11**(12): 1043-1049.
- Keil, U., A. P. Fitzgerald, H. Gohlke, J. r. Wellmann und H.-W. Hense (2005). "Risikoabschaetzung toedlicher Herz-Kreislauf-Erkrankungen: Die neuen SCORE-Deutschland-Tabellen fuer die Primaerpraevention." *Dtsch Arztebl International* **102**(25): 1808-.
- Keil, U. und K. Kuulasmaa (1989). "WHO MONICA Project: risk factors." *Int J Epidemiol* **18**(3 Suppl 1): S46-55.
- Keil, U., A. D. Liese, H. W. Hense, B. Filipiak, A. Doring, J. Stieber und H. Lowel (1998). "Classical risk factors and their impact on incident non-fatal and fatal myocardial infarction and all-cause mortality in southern Germany. Results from the MONICA Augsburg cohort study 1984-1992. Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases." *Eur Heart J* **19**(8): 1197-1207.
- Kolenda, K. D. (1998). "[Social medicine evaluation and advice for patients with coronary heart disease]." *Dtsch Med Wochenschr* **123**(23): 741-747.
- Kottke, T. E., H. Daida, K. R. Bailey, S. C. Hammill und R. S. Crow (1998). "Agreement and coding reliability of the Minnesota and Mayo electrocardiographic coding systems." *J Electrocardiol* **31**(4): 303-312.
- Kristensen, J., M. Maeng, M. Rehling, J. S. Berg, U. M. Mortensen, S. S. Nielsen und T. T. Nielsen (2005). "Lack of acute cardioprotective effect from preischemic erythropoietin administration in a porcine coronary occlusion model." *Clin Physiol Funct Imaging* **25**(5): 305-310.
- Krotz, F., H. Y. Sohn und V. Krauss (2008). "Antiplatelet drugs in cardiological practice: established strategies and new developments." *Vasc Health Risk Manag* **4**(3): 637-645.

- Kulkarni, S., S. M. Dopheide, C. L. Yap, C. Ravanat, M. Freund, P. Mangin, K. A. Heel, A. Street, I. S. Harper, F. Lanza und S. P. Jackson (2000). "A revised model of platelet aggregation." *J Clin Invest* **105**(6): 783-791.
- Lappin, T. (2003). "The cellular biology of erythropoietin receptors." *Oncologist* **8 Suppl 1**: 15-18.
- Latini, R., M. Brines und F. Fiordaliso (2008). "Do non-hemopoietic effects of erythropoietin play a beneficial role in heart failure?" *Heart Fail Rev* **13**(4): 415-423.
- Li, J., H. Xu, Q. Gao und Y. Wen (2012). "Effect of erythropoiesis-stimulating agents in acute ST-segment elevation myocardial infarction: a systematic review." *Eur J Clin Pharmacol* **68**(5): 469-477.
- Liem, A., A. P. van de Woestijne, E. Bruijns, H. W. Roeters van Lennep, J. A. de Boo, H. K. van Halteren, T. P. van Es, J. W. Jukema, A. van der Laarse, A. H. Zwinderman und D. J. van Veldhuisen (2009). "Effect of EPO administration on myocardial infarct size in patients with non-STE acute coronary syndromes; results from a pilot study." *Int J Cardiol* **131**(2): 285-287.
- Lievre, M. und M. Cucherat (2010). "Aspirin in the secondary prevention of cardiovascular disease: an update of the APTC meta-analysis." *Fundam Clin Pharmacol* **24**(3): 385-391.
- Lipsic, E., B. D. Westenbrink, P. van der Meer, P. van der Harst, A. A. Voors, D. J. van Veldhuisen, R. G. Schoemaker und W. H. van Gilst (2008). "Low-dose erythropoietin improves cardiac function in experimental heart failure without increasing haematocrit." *Eur J Heart Fail* **10**(1): 22-29.
- Liu, X., W. Xie, P. Liu, M. Duan, Z. Jia, W. Li und J. Xu (2006). "Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion." *Life Sci* **78**(19): 2255-2264.
- Livnah, O., E. A. Stura, S. A. Middleton, D. L. Johnson, L. K. Jolliffe und I. A. Wilson (1999). "Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation." *Science* **283**(5404): 987-990.
- Loll, P. J., D. Picot und R. M. Garavito (1995). "The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase." *Nat Struct Biol* **2**(8): 637-643.
- Loo, M. und Y. Beguin (1999). "The effect of recombinant human erythropoietin on platelet counts is strongly modulated by the adequacy of iron supply." *Blood* **93**(10): 3286-3293.
- Lunde, K., S. Solheim, S. Aakhus, H. Arnesen, M. Abdelnoor, T. Egeland, K. Endresen, A. Ilebekk, A. Mangschau, J. G. Fjeld, H. J. Smith, E. Taraldsrud, H. K. Groggaard, R. Bjornerheim, M. Brekke, C. Muller, E. Hopp, A. Ragnarsson, J. E. Brinchmann und K. Forfang (2006). "Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction." *N Engl J Med* **355**(12): 1199-1209.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." *Nature* **407**(6801): 233-241.
- Madsen, J. K., F. Pedersen, A. Amtoft, A. Deding, P. Grande, J. N. Hansen, M. Hilden, I. Hornum, T. Jensen, J. Lindskov und et al. (1989). "[Reduction of mortality in acute myocardial infarction with streptokinase and aspirin therapy. Results of ISIS-2]." *Ugeskr Laeger* **151**(40): 2565-2569.
- Mallat, Z., B. Hugel, J. Ohan, G. Leseche, J. M. Freyssinet und A. Tedgui (1999). "Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity." *Circulation* **99**(3): 348-353.

- Marcucci, R., R. Paniccia, E. Antonucci, S. Poli, A. M. Gori, S. Valente, C. Giglioli, C. Lazzeri, D. Prisco, R. Abbate und G. F. Gensini (2007). "Residual platelet reactivity is an independent predictor of myocardial injury in acute myocardial infarction patients on antiaggregant therapy." Thromb Haemost **98**(4): 844-851.
- Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt und M. Gawaz (2002). "A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation." J Exp Med **196**(7): 887-896.
- Mastromarino, V., M. Volpe, M. B. Musumeci, C. Autore und E. Conti (2011). "Erythropoietin and the heart: facts and perspectives." Clin Sci (Lond) **120**(2): 51-63.
- Masuda, S., M. Okano, K. Yamagishi, M. Nagao, M. Ueda und R. Sasaki (1994). "A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes." J Biol Chem **269**(30): 19488-19493.
- Mathers, C., T. Truelsen, S. Begg und T. Satoh (2004) "Global burden of ischaemic heart disease in the year 2000." Global burden of disease 2000 working paper.
- McNicol, A. und S. J. Israels (2003). "Platelets and anti-platelet therapy." J Pharmacol Sci **93**(4): 381-396.
- Merten, M., T. Chow, J. D. Hellums und P. Thiagarajan (2000). "A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation." Circulation **102**(17): 2045-2050.
- Meyer, G. P., K. C. Wollert, J. Lotz, J. Pirr, U. Rager, P. Lippolt, A. Hahn, S. Fichtner, A. Schaefer, L. Arseniev, A. Ganser und H. Drexler (2009). "Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial." Eur Heart J **30**(24): 2978-2984.
- Meyer, G. P., K. C. Wollert, J. Lotz, J. Steffens, P. Lippolt, S. Fichtner, H. Hecker, A. Schaefer, L. Arseniev, B. Hertenstein, A. Ganser und H. Drexler (2006). "Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial." Circulation **113**(10): 1287-1294.
- Michel, J. B. (2001). "Contrasting outcomes of atheroma evolution: intimal accumulation versus medial destruction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(9): 1389-1392.
- Miyake, T., C. K. Kung und E. Goldwasser (1977). "Purification of human erythropoietin." J Biol Chem **252**(15): 5558-5564.
- Moon, C., M. Krawczyk, D. Paik, E. G. Lakatta und M. I. Talan (2005). "Cardioprotection by recombinant human erythropoietin following acute experimental myocardial infarction: dose response and therapeutic window." Cardiovasc Drugs Ther **19**(4): 243-250.
- Moore, W., F. Kee, A. E. Evans, E. E. McCrum-Gardner, C. Morrison und H. Tunstall-Pedoe (2005). "Pre-hospital coronary care and coronary fatality in the Belfast and Glasgow MONICA populations." Int J Epidemiol **34**(2): 422-430.
- Mueller, T., B. Dieplinger, W. Poelz, A. Calatzis und M. Haltmayer (2007). "Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate analyzer--comparison with two flow cytometric methods." Thromb Res **121**(2): 249-258.
- Murugappa, S. und S. P. Kunapuli (2006). "The role of ADP receptors in platelet function." Front Biosci **11**: 1977-1986.

- Naghavi, M., P. Libby, E. Falk, S. W. Casscells, S. Litovsky, J. Rumberger, J. J. Badimon, C. Stefanadis, P. Moreno, G. Pasterkamp, Z. Fayad, P. H. Stone, S. Waxman, P. Raggi, M. Madjid, A. Zarrabi, A. Burke, C. Yuan, P. J. Fitzgerald, D. S. Siscovick, C. L. de Korte, M. Aikawa, K. E. Airaksinen, G. Assmann, C. R. Becker, J. H. Chesebro, A. Farb, Z. S. Galis, C. Jackson, I. K. Jang, W. Koenig, R. A. Lodder, K. March, J. Demirovic, M. Navab, S. G. Priori, M. D. Rekhter, R. Bahr, S. M. Grundy, R. Mehran, A. Colombo, E. Boerwinkle, C. Ballantyne, W. Insull, Jr., R. S. Schwartz, R. Vogel, P. W. Serruys, G. K. Hansson, D. P. Faxon, S. Kaul, H. Drexler, P. Greenland, J. E. Muller, R. Virmani, P. M. Ridker, D. P. Zipes, P. K. Shah and J. T. Willerson (2003). "From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II." *Circulation* **108**(15): 1772-1778.
- Najjar, S. S., S. V. Rao, C. Melloni, S. V. Raman, T. J. Povsic, L. Melton, G. W. Barsness, K. Prather, J. F. Heitner, R. Kilaru, L. Gruberg, V. Hasselblad, A. B. Greenbaum, M. Patel, R. J. Kim, M. Talan, L. Ferrucci, D. L. Longo, E. G. Lakatta und R. A. Harrington (2011). "Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial." *JAMA* **305**(18): 1863-1872.
- Namiuchi, S., Y. Kagaya, J. Ohta, N. Shiba, M. Sugi, M. Oikawa, H. Kunii, H. Yamao, N. Komatsu, M. Yui, H. Tada, M. Sakuma, J. Watanabe, T. Ichihara und K. Shirato (2005). "High serum erythropoietin level is associated with smaller infarct size in patients with acute myocardial infarction who undergo successful primary percutaneous coronary intervention." *J Am Coll Cardiol* **45** (9): 1406-1412.
- Offermanns, S. (2006). "Activation of platelet function through G protein-coupled receptors." *Circ Res* **99**(12): 1293-1304.
- Offermanns, S., K. L. Laugwitz, K. Spicher und G. Schultz (1994). "G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(2): 504-508.
- Olea, F. D., G. Vera Janavel, A. De Lorenzi, L. Cuniberti, G. Yannarelli, P. Cabeza Meckert, M. Cearras, R. Laguens und A. Crottogini (2006). "High-dose erythropoietin has no long-term protective effects in sheep with reperfused myocardial infarction." *J Cardiovasc Pharmacol* **47**(6): 736-741.
- Ott, I., E. G. Fischer, Y. Miyagi, B. M. Mueller und W. Ruf (1998). "A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280." *J Cell Biol* **140**(5): 1241-1253.
- Ott, I., S. Schulz, J. Mehilli, S. Fichtner, M. Hadamitzky, K. Hoppe, T. Ibrahim, S. Martinoff, S. Massberg, K. L. Laugwitz, J. Dirschinger, M. Schwaiger, A. Kastrati und A. Schmig (2010). "Erythropoietin in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized, double-blind trial." *Circ Cardiovasc Interv* **3**(5): 408-413.
- Ozawa, T., K. Toba, H. Suzuki, K. Kato, Y. Iso, Y. Akutsu, Y. Kobayashi, Y. Takeyama, N. Kobayashi, N. Yoshimura, K. Akazawa und Y. Aizawa (2010). "Single-dose intravenous administration of recombinant human erythropoietin is a promising treatment for patients with acute myocardial infarction - randomized controlled pilot trial of EPO/AMI-1 study." *Circ J* **74**(7): 1415-1423.
- Parsa, C. J., J. Kim, R. U. Riel, L. S. Pascal, R. B. Thompson, J. A. Petrofski, A. Matsumoto, J. S. Stamler und W. J. Koch (2004). "Cardioprotective effects of

- erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts." J Biol Chem **279**(20): 20655-20662.
- Parsa, C. J., A. Matsumoto, J. Kim, R. U. Riel, L. S. Pascal, G. B. Walton, R. B. Thompson, J. A. Petrofski, B. H. Annex, J. S. Stamler und W. J. Koch (2003). "A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart." J Clin Invest **112**(7): 999-1007.
- Patrono, C. (1994). "Aspirin as an antiplatelet drug." N Engl J Med **330**(18): 1287-1294.
- Pawlowska, Z., M. Swiatkowska, J. Krzeslowska, L. Pawlicki und C. S. Cierniewski (1993). "Increased platelet-fibrinogen interaction in patients with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia." Atherosclerosis **103**(1): 13-20.
- Penz, S., A. J. Reininger, R. Brandl, P. Goyal, T. Rabie, I. Bernlochner, E. Rother, C. Goetz, B. Engelmann, P. A. Smethurst, W. H. Ouweland, R. Farndale, B. Nieswandt und W. Siess (2005). "Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI." FASEB J **19**(8): 898-909.
- Pfeffer, M. A., E. A. Burdman, C. Y. Chen, M. E. Cooper, D. de Zeeuw, K. U. Eckardt, J. M. Feyzi, P. Ivanovich, R. Kewalramani, A. S. Levey, E. F. Lewis, J. B. McGill, J. J. McMurray, P. Parfrey, H. H. Parving, G. Remuzzi, A. K. Singh, S. D. Solomon und R. Toto (2009). "A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease." N Engl J Med **361**(21): 2019-2032.
- Poulsen, T. D., L. W. Andersen, D. Steinbruchel, J. P. Gotze, O. S. Jorgensen und N. V. Olsen (2009). "Two large preoperative doses of erythropoietin do not reduce the systemic inflammatory response to cardiac surgery." J Cardiothorac Vasc Anesth **23**(3): 316-323.
- Proudfoot, D., J. N. Skepper, C. M. Shanahan und P. L. Weissberg (1998). "Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix Gla protein and low levels of osteopontin expression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(3): 379-388.
- Prunier, F., O. Pfister, L. Hadri, L. Liang, F. Del Monte, R. Liao und R. J. Hajjar (2007). "Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(1): H522-529.
- Remy, I., I. A. Wilson und S. W. Michnick (1999). "Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change." Science **283**(5404): 990-993.
- Rendu, F. und B. Brohard-Bohn (2001). "The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions." Platelets **12**(5): 261-273.
- Rinder, C. S., L. A. Student, J. L. Bonan, H. M. Rinder und B. R. Smith (1993). "Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet alpha-granule release." Blood **82**(2): 505-512.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.
- Roth, G. J. und P. W. Majerus (1975). "The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein." J Clin Invest **56**(3): 624-632.
- Rother, E., R. Brandl, D. L. Baker, P. Goyal, H. Gebhard, G. Tigyi und W. Siess (2003). "Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques." Circulation **108**(6): 741-747.

- Ruggeri, Z. M. (2002). "Platelets in atherothrombosis." *Nat Med* **8**(11): 1227-1234.
- Ruschitzka, F., U. Moehrlen, T. Quaschnig, M. Lachat, G. Noll, S. Shaw, Z. Yang, D. Teupser, T. Subkowski, M. I. Turina und T. F. Luscher (2000). "Tissue endothelin-converting enzyme activity correlates with cardiovascular risk factors in coronary artery disease." *Circulation* **102**(10): 1086-1092.
- Sabatine, M. S. (2009). "Novel antiplatelet strategies in acute coronary syndromes." *Cleve Clin J Med* **76 Suppl 1**: S8-15.
- Sabatine, M. S., C. P. Cannon, C. M. Gibson, J. L. Lopez-Sendon, G. Montalescot, P. Theroux, M. J. Claeys, F. Cools, K. A. Hill, A. M. Skene, C. H. McCabe und E. Braunwald (2005). "Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation." *N Engl J Med* **352**(12): 1179-1189.
- Sabatine, M. S., C. P. Cannon, C. M. Gibson, J. L. Lopez-Sendon, G. Montalescot, P. Theroux, B. S. Lewis, S. A. Murphy, C. H. McCabe und E. Braunwald (2005). "Effect of clopidogrel pretreatment before percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with fibrinolytics: the PCI-CLARITY study." *JAMA* **294**(10): 1224-1232.
- Savage, B., F. Almus-Jacobs und Z. M. Ruggeri (1998). "Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow." *Cell* **94**(5): 657-666.
- Savi, P. und J. M. Herbert (2005). "Clopidogrel and ticlopidine: P2Y₁₂ adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis." *Semin Thromb Hemost* **31**(2): 174-183.
- Sawada, K., S. B. Krantz, C. H. Dai, S. T. Koury, S. T. Horn, A. D. Glick und C. I. Civin (1990). "Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors." *J Cell Physiol* **142**(2): 219-230.
- Schachinger, V., S. Erbs, A. Elsasser, W. Haberbosch, R. Hambrecht, H. Holschermann, J. Yu, R. Corti, D. G. Mathey, C. W. Hamm, T. Suselbeck, N. Werner, J. Haase, J. Neuzner, A. Germing, B. Mark, B. Assmus, T. Tonn, S. Dimmeler und A. M. Zeiher (2006). "Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial." *Eur Heart J* **27**(23): 2775-2783.
- Seyfert, U. T., H. Haubelt, A. Vogt und P. Hellstern (2007). "Variables influencing Multiplate(TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals." *Platelets* **18**(3): 199-206.
- Shi, Y., P. Rafiee, J. Su, K. A. Pritchard, Jr., J. S. Tweddell und J. E. Baker (2004). "Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels." *Basic Res Cardiol* **99**(3): 173-182.
- Sibbing, D., S. Braun, S. Jawansky, W. Vogt, J. Mehilli, A. Schomig, A. Kastrati und N. von Beckerath (2008). "Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment." *Thromb Haemost* **99**(1): 121-126.
- Sibbing, D., G. Busch, S. Braun, S. Jawansky, A. Schomig, A. Kastrati, I. Ott und N. von Beckerath (2008). "Impact of bivalirudin or unfractionated heparin on

- platelet aggregation in patients pretreated with 600 mg clopidogrel undergoing elective percutaneous coronary intervention." *Eur Heart J* **29**(12): 1504-1509.
- Siess, W., K. J. Zangl, M. Essler, M. Bauer, R. Brandl, C. Corrinth, R. Bittman, G. Tigyi und M. Aepfelbacher (1999). "Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6931-6936.
- Silber, S., P. Albertsson, F. F. Aviles, P. G. Camici, A. Colombo, C. Hamm, E. Jorgensen, J. Marco, J. E. Nordrehaug, W. Ruzyllo, P. Urban, G. W. Stone und W. Wijns (2005). "Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology." *Eur Heart J* **26**(8): 804-847.
- Siljander, P. und R. Lassila (1999). "Studies of adhesion-dependent platelet activation: distinct roles for different participating receptors can be dissociated by proteolysis of collagen." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(12): 3033-3043.
- Singh, A. K., L. Szczech, K. L. Tang, H. Barnhart, S. Sapp, M. Wolfson und D. Reddan (2006). "Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease." *N Engl J Med* **355**(20): 2085-2098.
- Skalen, K., M. Gustafsson, E. K. Rydberg, L. M. Hulten, O. Wiklund, T. L. Innerarity und J. Boren (2002). "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis." *Nature* **417**(6890): 750-754.
- Stary, H. C. (1992). "Composition and classification of human atherosclerotic lesions." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **421**(4): 277-290.
- Steinhubl, S. R., P. B. Berger, J. T. Mann, 3rd, E. T. Fry, A. DeLago, C. Wilmer und E. J. Topol (2002). "Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial." *JAMA* **288**(19): 2411-2420.
- Sterin-Borda, L., A. C. Barcelo und C. E. Bozzini (2003). "Erythropoietin improves cardiac contractility in post-hypoxic mice." *Br J Haematol* **121**(1): 180-186.
- Stohlawetz, P. J., L. Dzirlo, N. Hergovich, E. Lackner, C. Mensik, H. G. Eichler, E. Kabrna, K. Geissler und B. Jilma (2000). "Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans." *Blood* **95**(9): 2983-2989.
- Suh, J. W., W. Y. Chung, Y. S. Kim, K. I. Kim, E. J. Jeon, Y. S. Cho, T. J. Youn, I. H. Chae, C. H. Kim und D. J. Choi (2011). "The effect of intravenous administration of erythropoietin on the infarct size in primary percutaneous coronary intervention." *Int J Cardiol* **149**(2): 216-220.
- Tang, Y. D., H. M. Rinder und S. D. Katz (2007). "Effects of recombinant human erythropoietin on antiplatelet action of aspirin and clopidogrel in healthy subjects: results of a double-blind, placebo-controlled randomized trial." *Am Heart J* **154**(3): 494 e491-497.
- Taniguchi, N., T. Nakamura, T. Sawada, K. Matsubara, K. Furukawa, M. Hadase, Y. Nakahara und H. Matsubara (2010). "Erythropoietin prevention trial of coronary restenosis and cardiac remodeling after ST-elevated acute myocardial infarction (EPOC-AMI): a pilot, randomized, placebo-controlled study." *Circ J* **74**(11): 2365-2371.
- Tassies, D., J. C. Reverter, A. Cases, J. Calls, G. Escolar und A. Ordinas (1998). "Effect of recombinant human erythropoietin treatment on circulating reticulated platelets in uremic patients: association with early improvement in platelet function." *Am J Hematol* **59**(2): 105-109.

- Taylor, J. E., I. S. Henderson, W. K. Stewart und J. J. Belch (1992). "Platelet aggregation in erythropoietin treated dialysis patients." *Platelets* **3**(1): 47-52.
- Toth, O., A. Calatzis, S. Penz, H. Losonczy und W. Siess (2006). "Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood." *Thromb Haemost* **96**(6): 781-788.
- Tramontano, A. F., R. Muniyappa, A. D. Black, M. C. Blendea, I. Cohen, L. Deng, J. R. Sowers, M. V. Cutaia und N. El-Sherif (2003). "Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **308**(4): 990-994.
- Tsukada, J., M. Misago, M. Kikuchi, T. Sato, R. Ogawa, S. Oda, S. Chiba und S. Eto (1990). "The effect of high doses of recombinant human erythropoietin on megakaryocytopoiesis and platelet production in splenectomized mice." *Br J Haematol* **76**(2): 260-268.
- Tuomilehto, J. und K. Kuulasmaa (1989). "WHO MONICA Project: assessing CHD mortality and morbidity." *Int J Epidemiol* **18**(3 Suppl 1): S38-45.
- Van de Werf, F., J. Bax, A. Betriu, C. Blomstrom-Lundqvist, F. Crea, V. Falk, G. Filippatos, K. Fox, K. Huber, A. Kastrati, A. Rosengren, P. G. Steg, M. Tubaro, F. Verheugt, F. Weidinger und M. Weis (2008). "Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology." *Eur Heart J* **29**(23): 2909-2945.
- van der Meer, P., E. Lipsic, R. H. Henning, K. Boddeus, J. van der Velden, A. A. Voors, D. J. van Veldhuisen, W. H. van Gilst und R. G. Schoemaker (2005). "Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction." *J Am Coll Cardiol* **46**(1): 125-133.
- van der Meer, P., E. Lipsic, R. H. Henning, R. A. de Boer, A. J. Suurmeijer, D. J. van Veldhuisen und W. H. van Gilst (2004). "Erythropoietin improves left ventricular function and coronary flow in an experimental model of ischemia-reperfusion injury." *Eur J Heart Fail* **6**(7): 853-859.
- Viles-Gonzalez, J. F., S. X. Anand, C. Valdiviezo, M. U. Zafar, R. Hutter, J. Sanz, T. Rius, M. Poon, V. Fuster und J. J. Badimon (2004). "Update in atherothrombotic disease." *Mt Sinai J Med* **71**(3): 197-208.
- Virmani, R., F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. Farb und S. M. Schwartz (2000). "Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(5): 1262-1275.
- Voors, A. A., A. M. Belonje, F. Zijlstra, H. L. Hillege, S. D. Anker, R. H. Slart, R. A. Tio, A. van 't Hof, J. W. Jukema, H. O. Peels, J. P. Henriques, J. M. Ten Berg, J. Vos, W. H. van Gilst und D. J. van Veldhuisen (2010). "A single dose of erythropoietin in ST-elevation myocardial infarction." *Eur Heart J* **31**(21): 2593-2600.
- Wagner, C. L., M. A. Mascelli, D. S. Neblock, H. F. Weisman, B. S. Coller und R. E. Jordan (1996). "Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets." *Blood* **88**(3): 907-914.
- Wang, F. F., C. K. Kung und E. Goldwasser (1985). "Some chemical properties of human erythropoietin." *Endocrinology* **116**(6): 2286-2292.
- Westenbrink, B. D., E. Lipsic, P. van der Meer, P. van der Harst, H. Oeseburg, G. J. Du Marchie Sarvaas, J. Koster, A. A. Voors, D. J. van Veldhuisen, W. H. van

- Gilst und R. G. Schoemaker (2007). "Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization." Eur Heart J **28**(16): 2018-2027.
- White, J. G. (1987). "An overview of platelet structural physiology." Scanning Microsc **1**(4): 1677-1700.
- White, J. G. und C. C. Clawson (1980). "Overview article: biostructure of blood platelets." Ultrastruct Pathol **1**(4): 533-558.
- Wickrema, A., S. B. Krantz, J. C. Winkelmann und M. C. Bondurant (1992). "Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells." Blood **80**(8): 1940-1949.
- Wiviott, S. D., E. Braunwald, C. H. McCabe, G. Montalescot, W. Ruzyllo, S. Gottlieb, F. J. Neumann, D. Ardissino, S. De Servi, S. A. Murphy, J. Riesmeyer, G. Weerakkody, C. M. Gibson und E. M. Antman (2007). "Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes." N Engl J Med **357**(20): 2001-2015.
- Wolf, R. F., J. Peng, P. Friese, L. S. Gilmore, S. A. Burstein und G. L. Dale (1997). "Erythropoietin administration increases production and reactivity of platelets in dogs." Thromb Haemost **78**(6): 1505-1509.
- Wright, G. L., P. Hanlon, K. Amin, C. Steenbergen, E. Murphy und M. O. Arcasoy (2004). "Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury." FASEB J **18**(9): 1031-1033.
- Ye, L., X. L. Du, J. H. Xia, P. Jiang, J. T. Wang, H. M. Fan und Z. M. Liu (2006). "[An experimental study of recombinant human erythropoietin on the treatment of acute myocardial infarction in rats]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **86**(39): 2776-2780.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. med. Ilka Ott danke ich für die Vergabe dieses interessanten Themas, die freundliche Aufnahme am Institut, für die engagierte Hilfe bei der Durchführung der Arbeit und für die herausragende Betreuung, sowie die Geduld bei der Korrektur dieser Arbeit.

Frau Annette Stobbe, Frau Birgit Campbell, und Christina Bauer danke ich für die Beratung bei allen chemisch-analytischen Fragen und für die Koordination der chemischen Diagnostik, sowie für die Laborbestimmungen.

Allen **Ärzten und Ärztinnen** der kardiologischen Intensivstationen des Medizinischen Klinikums Recht der Isar sowie des Deutschen Herzzentrums und der Chest Pain Unit des Deutschen Herzzentrums danke ich für die tatkräftige Unterstützung und freundliche Zusammenarbeit.

Allen **Probanden** danke ich herzlich für die Kooperationsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei meinen Mitdoktoranden **Barbara Lorenz, Steffanie Thieme** und **Felix Mohr** für die Einführung in die Methoden, die gute Zusammenarbeit und die gemeinsam im Labor verbrachten Stunden.

Mein größter Dank gilt meiner **Familie** und meinen **Freunden** für die liebevolle und geduldige Unterstützung während des Studiums und der Dissertation.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen, die mich bei Durchführung und Ausarbeitung der Studie unterstützt haben und hier nicht genannt wurden.

9 Anhang

Patienteninformation zur Studie und Einverständniserklärungen

Patienteninformation zur Studie

Schützende Wirkung von Erythropoietin bei Patienten mit Herzinfarkt und perkutaner Koronarintervention: eine prospektive, randomisierte, doppel-blinde, placebo-kontrollierte Untersuchung (REVIVAL-3)

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie wurden soeben darüber aufgeklärt, dass Sie einen Herzinfarkt erlitten haben. Ursache hierfür ist der Verschluss eines Herzkranzgefäßes durch ein Blutgerinnsel. Dadurch besteht eine akute Durchblutungsstörung des Herzmuskels. Wichtigstes Behandlungsziel ist zu verhindern, dass wesentliche Teile des Herzmuskels absterben und die Pumpleistung des Herzens abnimmt. Die effektivste Behandlungsform stellt die so genannte Koronarintervention (Ballondilatation und Einsetzen einer Gefäßstütze) dar.

Gibt es zusätzliche Behandlungsmöglichkeiten?

Obwohl die rasche und erfolgreiche Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes die Prognose der Infarktpatienten deutlich verbessert, ist meist zum Zeitpunkt der Wiedereröffnung bereits ein Teil der Herzmuskelzellen tot oder geschädigt. Ziel von neuen Therapieprinzipien ist es daher, Möglichkeiten zu finden, wie man trotz der abgestorbenen Muskelzellen eine deutliche Schwächung des Herzmuskels verhindern oder möglichst gering halten kann. Erythropoietin ist ein Botenstoff, der für die Bildung roter Blutkörperchen von entscheidender Bedeutung ist. Erythropoietin besitzt zusätzlich einen schützenden Effekt bei Durchblutungsstörungen, indem es den Zelluntergang verringert, Gefäßneubildung fördert und Stammzellen aus dem Knochenmark freisetzt. Erste Studien bei Patienten mit Schlaganfall deuten darauf hin, dass die Gabe von Erythropoietin die Größe des Hirninfarktes verringert. Es bestehen Hinweise, dass Erythropoietin auch im Herzinfarkt zu einer Verbesserung der Herzfunktion und zu einer Verkleinerung der Infarktgröße führt.

Welche Behandlungsmöglichkeiten schlagen wir Ihnen vor?

Um zu klären, ob Erythropoietin zu einer Verbesserung der Herzfunktion und einer Verkleinerung der Infarktgröße führt, führen wir eine Untersuchung durch, bei der Sie entweder

Erythropoietin (NeoRecormon®) an 3 Tagen einmal täglich als intravenöse Infusion
oder

ein Placebo (d.h. eine Substanz ohne Wirkung) in der gleichen Darreichungsform und -dauer erhalten.

Mit der Therapie wird unmittelbar nach Wiedereröffnung des Infarktgefäßes begonnen. Um die Therapieeffekte objektiv erfassen zu können, werden Sie nach einem bereits festgelegten Verteilungsmuster einem der beiden Therapieverfahren zugeteilt. Da die Medikamentenverpackungen anonymisiert werden, weiß weder der sie betreuende Stationsarzt, noch der Katheterarzt, welches Medikament sie bekommen. Dadurch wird eine größtmögliche wissenschaftliche Aussagekraft gewährleistet.

Wie gestaltet sich der Behandlungs- und Untersuchungsablauf?

Als Infarktpatient werden Sie nach der Aufdehnung des Herzgefäßes im Herzkatheterlabor für einige Tage auf der Intensivstation überwacht und behandelt. Unabhängig von der Teilnahme an dieser Studie raten wir Ihnen, 6 Monate nach dem Infarktereignis nochmals eine Kontroll-Herzkatheteruntersuchung durchführen zu lassen. Bei Teilnahme an dieser Studie wird an Tag 5-7 und nach 6 Monaten zusätzlich eine Kernspintomographie mit und ohne Kontrastmittel durchgeführt. Unmittelbar nach der Herzkatheteruntersuchung sowie an den folgenden 2 Tagen erhalten sie jeweils einmal täglich Erythropoietin oder ein Placebo als intravenöse Infusion.

Hat die Festlegung der Therapie Nachteile für mich?

Nein. Bei Teilnahme an dieser Studie erhalten sie entweder Erythropoietin oder ein Placebo, d.h. eine Substanz ohne Wirkung. Erythropoietin wird seit mehreren Jahren in der Anämiebehandlung eingesetzt und gut vertragen. Unter der Therapie mit Erythropoietin kann es zu Kopf- und Gelenkschmerzen kommen, die gut mit einem schwachen handelsüblichen Schmerzmittel behandelbar sind. Weiterhin wurden Blutdruckerhöhungen und Übelkeit beobachtet. Eine vorübergehende, leichte Erhöhung einiger Laborwerte (rote Blutkörperchen, Blutplättchen) ist möglich. Eine sehr seltene Nebenwirkung sind schwere allergische Reaktionen. Insgesamt ist die medikamentöse Begleittherapie als gut verträglich und nebenwirkungsarm einzustufen. Werden Sie in der Gruppe mit Placebo behandelt, entspricht die medikamentöse Therapie der Standardtherapie der Klinik. Durch die Teilnahme an dieser Studie entsteht für Sie keine zusätzliche Strahlenbelastung.

Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig und setzt eine Einwilligung zur Weitergabe Ihrer Daten an die klinische Forschungsabteilung des Deutschen Herzzentrum Münchens (ISAR Zentrum) voraus. Sie können Ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie jederzeit widerrufen. Die Ablehnung der Teilnahme an dieser Studie hat für Sie keinerlei Nachteile.

Bei dieser klinischen Prüfung werden personenbezogene Daten erhoben, gespeichert und ausgewertet. Die Verwendung der Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen. Nur wenn Sie die beiliegende Datenschutzerklärung unterschreiben, können sie an der klinischen Prüfung teilnehmen.

Versicherungsbestimmungen:

Wir gehen davon aus, dass Sie durch Ihre Teilnahme an dieser Studie keine gesundheitlichen Schäden erleiden werden. Sollten Sie aufgrund der Therapie dieser Studie nachweislich einen unerwarteten Gesundheitsschaden erleiden, besteht eine Patientenversicherung, die die Kosten einer eventuellen Behandlung übernimmt (Gerling-Konzern, Allgemeine Versicherungs-AG, Vertrieb Deutschland, Ganghoferstraße 39, 80339 München, Tel.: +49/892107-451, Fax: +49/892107-594, Police-Nr. 70-005799238-6).

Die Versicherungsbedingungen werden Ihnen im Falle einer Teilnahme an der Studie auf Anfrage ausgehändigt. Falls Sie an der Studie teilnehmen, erhalten Sie eine unterschriebene Kopie dieser Informations- und Einverständniserklärung und können sich im Verlauf der Studie an Frau PD Dr. med. Ilka Ott Tel: 089-1218-4024 wenden.

Einverständniserklärung

Schützende Wirkung von Erythropoetin bei Patienten mit Herzinfarkt und perkutaner Koronarintervention: eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, placebo-kontrollierte Untersuchung (REVIVAL-3)

Ich habe das vorstehende Merkblatt gelesen und verstanden. Ich hatte die Gelegenheit und ausreichend Zeit, Fragen zu stellen. Meine Fragen sind zufrieden stellend beantwortet worden. Ich habe keine weiteren Fragen. Mir ist bekannt, dass mir bei Ablehnung der Teilnahme an der Studie keinerlei Nachteile in der Behandlung entstehen und dass ich auch zu einem späteren Zeitpunkt meine Teilnahme jederzeit widerrufen kann.

Einwilligungserklärung zum Datenschutz (gemäß Arzneimittelgesetz)

Mir ist bekannt, dass bei dieser klinischen Prüfung personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der klinischen Prüfung eine freiwillig abgegebene

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, an der Untersuchung über die Effektivität von Erythropoetin im Herzinfarkt nach erfolgreicher Revaskularisierung teilzunehmen.

München, den _____

Unterschrift des Patienten

Unterschrift des aufklärenden Arztes

Einwilligung zur Aufzeichnung persönlicher Daten

Bei klinischen Prüfungen werden persönliche Daten und medizinische Befunde über Sie erhoben.

Die Erhebung, Weitergabe, Speicherung und Auswertung dieser Angaben über Ihre Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor Teilnahme an der klinischen Prüfung folgende freiwillige Einwilligung voraus:

1) Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser klinischen Prüfung erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, in Papierform und auf elektronischen Datenträgern im Deutschen Herzzentrum München, im folgenden DHM genannt, aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden:

a) an den Sponsor (DHM) oder eine von diesem beauftragte Stelle zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung.

b) im Falle eines Antrags auf Zulassung: an den Antragsteller und die für die Zulassung zuständige Behörde, das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM).

c) im Falle unerwünschter Ereignisse: an den Sponsor (DHM), an die jeweils zuständige Ethik-Kommission und die zuständige Bundesoberbehörde (BfArM), sowie von dieser an die Europäische Datenbank.

2) Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte des Sponsors (DHM) sowie die zuständigen inländischen und ausländischen Überwachungsbehörden in meine beim Prüfarzt vorhandenen personenbezogenen Daten, insbesondere meine Gesundheitsdaten, Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfarzt von der ärztlichen Schweigepflicht.

3) Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist unwiderruflich. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der klinischen Prüfung beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten ohne Namensnennung weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um

a) Wirkungen des zu prüfenden Arzneimittels festzustellen

b) sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden

c) der Pflicht zur Vorlage vollständiger Zulassungsunterlagen zu genügen.

4) Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Prüfung mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden, wie es die Vorschriften über die klinische Prüfung von Arzneimitteln bestimmen. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

5) Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen, die meine personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten für die in Nr. 3 a) bis c) genannten Zwecke noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.

_____ Datum

_____ Name

_____ Unterschrift

Patienteninformation

**„Untersuchungen zur Mobilisierung von Vorläuferzellen und zu Veränderungen von Entzündungs- und Gerinnungsmarkern im Blut von Patienten mit Herzinfarkt und perkutaner Koronarintervention, bei denen die schützende Wirkung von Erythropoetin untersucht wird“
(Unterstudie der REVIVAL-3 Studie)**

Als Teilnehmer/-in der REVIVAL-3 Studie nehmen Sie an der Untersuchung über die schützende Wirkung von Erythropoetin im Herzinfarkt teil. Neuere Daten haben gezeigt, dass Erythropoetin Vorläuferzellen freisetzen können, denen eine wichtige Rolle bei der Gefäßneubildung zugeschrieben wird. Diese im Blut zirkulierenden Zellen sollen bei Ihnen untersucht werden. Außerdem sollen Entzündungs- und Gerinnungsparameter analysiert werden, denen eine Bedeutung für den weiteren Krankheitsverlauf nach Herzinfarkt zugeschrieben wird.

Dazu werden Ihnen mit dem normalen Routinelabor zu 8 verschiedenen Zeitpunkten (direkt vor, direkt nach, sowie 8 Stunden jeweils nach der 1. und 3. Infusion von Erythropoetin oder Placebo, an Tag 4 nach der Herzkatheteruntersuchung und bei der empfohlenen Kontrolluntersuchung nach 6 Monaten) jeweils 15ml Blut entnommen. Die Gesamtmenge an zusätzlich entnommenem Blut beträgt 120ml.

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgt in pseudonymisierter Form entsprechend den Datenschutzvorschriften. Die Gewinnung der Daten erfolgt ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig und kann jederzeit zurückgezogen werden.

Einverständniserklärung

zur Aufbewahrung und Analyse von entnommenen Blutproben zum Zwecke der Wissenschaft

Ich erkläre mich ausdrücklich damit einverstanden, dass Blutproben, die bei mir entnommen und einer diagnostischen Untersuchung zugeführt werden, aufbewahrt und für spätere wissenschaftliche Untersuchungen verwendet werden dürfen. Es ist möglich, dass mit diesem Blut auch künftige Untersuchungsverfahren, die neue Erkenntnisse bringen, durchgeführt werden können.

Ich willige mit meiner Unterschrift ein, dass auf die erhobenen Daten zu wissenschaftlichen und statistischen Analysen zurückgegriffen werden kann.

Datum

Name

Unterschrift