

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen
Deutsches Herzzentrum München des Freistaates Bayern
I. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar

Durch G-CSF mobilisierte CD34+-Progenitorzellen
im akuten Myokardinfarkt zeigen
eine verminderte Expression von LFA-1, VLA-4 und CXCR4

Mirjam Hilda Christina Cetindis

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. H. Schunkert

Die Dissertation wurde am 26.04.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 11.12.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
I	Einführung	7
1	Allgemeines	7
2	“Regenerate Vital Myocardium by Vigorous Activation of Bone Marrow Stem Cells”-Studie (REVIVAL2-Studie)	7
3	Mobilisation von Progenitorzellen im akuten Myokardinfarkt	8
4	Adhäsionsmoleküle auf zirkulierenden Progenitorzellen	11
5	Zytokine und Progenitorzellmobilisierung	12
6	Transducer of ERB (TOB)	14
II	Zielsetzung der Arbeit	15
III	Material und Methoden	16
1	Studienprotokoll	16
2	Patientenauswahl	18
3	Studienmedikation	19
4	Studienablauf	20
4.1	Blutabnahmen	20
5	Durchflusszytometrie	21
5.1	Aufbau eines Zytometers	21
5.2	Funktionsprinzip	22
6	Messung und Auswertung	23
6.1	Probenaufbereitung	23
6.2	Quantifizierung der Zellen	24
6.3	Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen	25
6.4	Isolation mononukleärer Zellen	25
6.5	RNA Präparation	26
6.6	Quantitative PCR (TaqMan)	26
7	Statistik	28
IV	Ergebnisse	29
1	Patienten	29
1.1	Patientenauswahl	29
1.2	Nebenwirkungen und Komplikationen	31
2	Standardlabor und Durchflusszytometrie	31
2.1	Mobilisation der Progenitorzellen (CD34+-Zellen)	33

2.1.1	Studiengruppe mit G-CSF-Gabe	33
2.1.2	Studiengruppe mit Placebo-Gabe	33
3	Zelloberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle	34
3.1	Oberflächenexpression von LFA-1	34
3.2	Oberflächenexpression von VLA-4	35
3.3	Oberflächenexpression von CXCR4	36
4	mRNA-Expression von CXCR4 und TOB	38
4.1	mRNA-Expression von CXCR4	38
4.2	mRNA-Expression von TOB	38
5	Ergebnisse der REVIVAL2-Studie	42
V	Diskussion	43
VI	Zusammenfassung	49
	Literaturverzeichnis	50
	Originalarbeit	56
	Lebenslauf	57
	Danksagung	58

Abkürzungsverzeichnis

AAD	Amino-Actinomycin-D
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
BFU-E	Burst Forming Unit- Erythroid
C	Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CFU-GM	Colony Forming Unit- Granulozyten Monozyten
CK	Kreatinkinase
CrP	C-reaktives Protein
CXCL	C-X-C-Chemokin Ligand
CXCR	C-X-C-Chemokin Rezeptor
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBM	Endothelial basal medium
EKG	Elektrokardiogramm
EPC	Endothelial Progenitor Cell
EPO	Erythropoetin
FACS®	“Fluorescence activated cell sorting”
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	Granulozytenkolonie stimulierender Faktor
Gfi	Growth factor independence
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HPC	Hematopoietic Progenitor Cell
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
l	Liter
LFA	Lymphocyte function-associated Antigen
mAB	monoklonaler Antikörper
Mac	Macrophage Antigen
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
mV	Millivolt
MW	Mittelwert

mW	Milliwatt
n	Anzahl (absolut)
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
PTT	partielle Thromboplastinzeit
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDF	Stromal cell-derived Factor
sec	Sekunde
SPECT	Single-photon Emissions Computertomographie
STEMI	ST elevated myocardial infarction
TC	Technetium
TOB	Transducer of ERB
U	Unit
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VLA	Very Late Antigen
WHO	World Health Organization

I Einführung

1 Allgemeines

Nach Daten der WHO sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen weltweit die häufigste Todesursache. Jedes Jahr sterben mehr Menschen an den Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen als an jeglichen anderen Ursachen.⁵⁴

Im Jahre 2008 sind circa 17,3 Millionen Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen gestorben, dies sind 30 % aller Todesfälle weltweit. Von diesen Todesfällen waren ungefähr 7,3 Millionen auf eine koronare Herzkrankheit, 6,2 Millionen auf einen Schlaganfall zurückzuführen.⁵⁴

Es wird geschätzt, dass im Jahre 2030 an die 23,6 Millionen Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen sterben werden, vor allem an koronarer Herzkrankheit und Schlaganfall.⁵⁴

So werden diese weiterhin die häufigsten Todesursachen bleiben.⁵⁴

Auf diesem Hintergrund ergibt sich die dringende Notwendigkeit, neue Therapiemöglichkeiten in der Behandlung des akuten Myokardinfarkts zu erforschen und zu entwickeln.

Ein Ansatzpunkt hierbei konzentriert sich auf die Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark während des akuten Myokardinfarkts.

2 “Regenerate Vital Myocardium by Vigorous Activation of Bone Marrow Stem Cells”-Studie (REVIVAL2-Studie)

In der REVIVAL2-Studie, einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie mit 114 Patienten wurde vom 24. Februar 2004 bis zum 2. Februar 2005 untersucht, ob nach akutem Myokardinfarkt und erfolgreicher perkutaner Rekanalisation des Infarktgefäßes die durch subkutane G-CSF-Gabe induzierte Mobilisierung von Progenitorzellen zur Verbesserung des klinischen Ergebnisses führt, insbesondere zur Verringerung der Infarktgröße im Myokard-SPECT und zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion im MRT sechs Monate nach Infarkt ereignis.⁵³

In der REVIVAL2-Studie konnten im Gegensatz zu früheren Studien keine positiven Effekte bei der Behandlung mit G-CSF im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts festgestellt werden.

Diese Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf durch eine Metaanalyse gestützt, in der zehn prospektive Studien eingeschlossen wurden, in denen die Stammzellmobilisierung durch G-CSF-Gabe bei insgesamt 445 Patienten untersucht wurden.⁵²

3 Mobilisation von Progenitorzellen im akuten Myokardinfarkt

Es ist bereits bekannt, dass aus dem Knochenmark stammende CD34+-Progenitorbeziehungsweise Vorläuferzellen während eines akuten Myokardinfarkts mobilisiert werden.⁴⁵ Zellen mit dem Oberflächenmerkmal CD34 gehören zu den hämatopoetischen Progenitorzellen.

Leone et al. konnten zeigen, dass einem akuten Myokardinfarkt eine erhöhte Spontanmobilisation von Knochenmark-Stammzellen folgt. Der Gehalt an CD34+-Zellen war bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt höher als bei Patienten mit chronisch-stabiler Angina pectoris oder der gesunden Kontrollgruppe. Zusätzlich wiesen über 95% der CD34+-Zellen auch das CD45+ Antigen auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Zellen aus dem Knochenmark stammten und keine zirkulierenden Endothelzellen waren.²⁸

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Massa et al. sowie Wojakowski et al., indem sie eine gesteigerte Anzahl von zirkulierenden hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen in der Frühphase des akuten Myokardinfarkts beziehungsweise eine deutliche Mobilisation von CD34/CXCR4+ sowie CD34/CD117+ und c-met+-Stammzellen im Rahmen eines STEMI nachwiesen.^{31,51} Auch Schömig et al. zeigten, dass ein akuter Myokardinfarkt die Mobilisation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut induziert. Außerdem beobachteten sie eine Korrelation zwischen Interleukin 8 und zirkulierenden Progenitorzellen im Falle eines akuten Myokardinfarkts.⁴²

Aufgrund der Tatsache, dass es zu einer erhöhten Stammzellmobilisierung im Infarkt kommt, macht dies eine physiologische Bedeutung dieser Zellen im Infarkt denkbar.

Verschiedene Tierexperimente lassen annehmen, dass eine signifikante Verbesserung der kardialen Funktion und eine Verringerung der Infarktgröße durch die Transplantation verschiedener Typen von Stamm- oder Vorläuferzellen nach akutem Myokardinfarkt erreicht werden kann.³⁶

Man hat bereits herausgefunden, dass Stammzellen, nachdem sie ins ischämische Myokard rekrutiert wurden, sehr wahrscheinlich bei der Regeneration des ischämischen Gewebes mitwirken, einerseits durch Induktion der Neovaskularisierung, andererseits durch parakrine Effekte.⁴

Generell sind mehrere Möglichkeiten vorstellbar, wie hämatopoetische Vorläuferzellen das Remodelling beeinflussen könnten:

Zum einen durch Stimulierung eben der Neovaskularisierung im Bereich des Infarktareals. Wenn die Perfusion des Gewebes um das Infarktareal herum verbessert wird, könnte dies das weitere Absterben von noch vitalen, jedoch hypertrophen Herzmuskelzellen verhindern. Aicher et al. zeigten bereits, dass radioaktiv markierte endotheliale Vorläuferzellen nach einem akuten Myokardinfarkt vermehrt ins infarzierte Myokard rekrutiert wurden.² Ein Tierexperiment konnte nachweisen, dass Zellen, die aus CD34+ Vorläuferzellen herangezüchtet wurden, in vitro zu so einer großen Anzahl vermehrt werden konnten, dass sie in vivo proliferierten, Gefäßstrukturen bildeten und die linksventrikuläre Funktion nach einem künstlich provozierten Myokardinfarkt verbesserten.³⁸

Eine weitere Überlegung ist, dass die Vorläuferzellen im Myokard in kollagen-produzierende Fibroblasten ausdifferenzieren könnten. Rein theoretisch könnte durch verstärkte Kollagenbildung eine festere Narbe entstehen, die aneurysmatischen Aussackungen besser Stand halten könnte und damit eine Reduktion der linksventrikulären Pumpfunktion mitunter verhindert. Im Rahmen eines Tierexperiments wurden beispielsweise durch G-CSF und Stammzellfaktor Knochenmarkstammzellen nach künstlich provoziertem, akutem Myokardinfarkt mobilisiert. Im Folgenden beobachtete man eine signifikante Reduktion der Mortalität, der Infarktgröße und der Ventrikeldilatation. Außerdem zeigte sich die Ausbildung neuer Myozyten mitsamt Kapillaren und Arteriolen.³⁷ Zu ähnlichen Ergebnissen kam man in einer Studie, in der man nach G-CSF-Gabe bei Tieren im Vergleich zur Placebo-Gabe eine gesteigerte Aktivität von Makrophagen und bestimmten Matrix Metalloproteinasen (MMP) beobachtete, was wiederum eine gesteigerte Absorption des nekrotischen Gewebes und eine reduzierte Narbenbildung zur Folge hatte.³⁴

Eine weitere Möglichkeit, wie hämatopoetische Vorläuferzellen das Remodelling beeinflussen könnten, ist, dass sich die Vorläuferzellen in funktionsfähige Kardiomyozyten ausdifferenzieren. In vitro konnte bereits das Potential peripher zirkulierender CD34+-Zellen beobachtet werden, zu Kardiomyozyten auszureifen. In Folge dessen haben sie dann die

Fähigkeit, zugrunde gegangenes Myokard zu ersetzen.⁷ Fraglich dabei ist jedoch, ob dies auch in vivo möglich ist, ob also nach Infarktgeschehen genügend Vorläuferzellen so ausdifferenzieren, dass sie die große Zahl an abgestorbenen Myozyten ersetzen können.

Schwerwiegende Nebenwirkungen ließen sich bei Pilotstudien zur intrakoronaren Stammzelltransplantation nach akutem Myokardinfarkt beim Menschen nicht beobachten.

Mehrere Studien zeigen, dass durch die intrakoronare Gabe von Progenitorzellen die linksventrikuläre Funktion und die Infarktgröße günstig beeinflusst werden könnten.^{6,9,37,47} Insbesondere die randomisierte Studie von Assmus et al. zeigte anhand von 20 Patienten mit akutem Myokardinfarkt, dass die intrakoronare Anwendung von Progenitorzellen sicher und durchführbar ist sowie dass die Regenerationsprozesse nach Infarktgeschehen von dieser Anwendung profitieren könnten.⁶ Die Sammlung und Anreicherung dieser Progenitorzellen – Voraussetzung für die intrakoronare Stammzelltransplantation - bedeutet jedoch hohen Aufwand und resultiert meist in einer sehr kleinen Anzahl an transplantierbaren Zellen.

Es gilt also, Möglichkeiten zu finden, die Stammzellzahl zu erhöhen und die Zeit für ein mögliches „homing“ zu verlängern. Unter „homing“ versteht man die Mobilisierung und zielgerichtete Wanderung von Stammzellen in ihre Speicher- oder ihre Verwendungsorte.

Ein Ansatzpunkt hierbei konzentriert sich auf die Gabe von Zytokinen, wie zum Beispiel den Granulozytenkolonie stimulierenden Faktor (G-CSF), wodurch es zu einer vermehrten peripheren Stammzellmobilisierung kommt. Das Verfahren stammt aus dem Bereich der Hämatologie, wo es routinemäßig Anwendung zur Stammzellgewinnung findet: durch 5-tägige G-CSF-Gabe kann die Zahl der CD34+-Vorläuferzellen auf ein Vielfaches erhöht werden. Somit könnte das Infarktareal nach erfolgreicher Reperfusion mit einem Vielfachen der bisher intrakoronar transplantierten Anzahl an Stammzellen über mehrere Tage hindurch perfundiert werden.

Bisher noch unbekannte Faktoren bei der Stammzellmobilisierung sind solche wie Zeitpunkt der Mobilisierung oder auch, über welche Rezeptoren das „homing“ der Stammzellen nach Myokardinfarkt stattfindet. In diesem Zusammenhang gibt es bereits Hinweise, dass Zytokine beziehungsweise Adhäsionsmoleküle, die beim „homing“ der Stammzellen eine Rolle spielen, im Falle eines Infarktgeschehens vermehrt exprimiert werden.

4 Adhäsionsmoleküle auf zirkulierenden Progenitorzellen

Die Mobilisierung von Stammzellen ist ein komplexer Prozess, der in vielen Einzelschritten abläuft.

Es ist bereits bekannt, dass es bestimmte Adhäsionsmoleküle gibt, die die Stammzellen in der Mikroumgebung des Knochenmarks festhalten. Dazu gehören das “lymphocyte function-associated antigen-1” (LFA-1), das “very late antigen-4” (VLA-4), der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4), des Weiteren c-kit, CD44 und Mac-1.

Das Festhalten der Stammzellen im Knochenmark funktioniert über die jeweiligen Liganden, an die die Adhäsionsmoleküle binden: im Falle des LFA-1 handelt es sich um das „intercellular adhesion molecule“ (ICAM-1), beim VLA-4 um das „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1), CXCR4 bindet über den „Stroma-Cell-derived Factor 1“ (SDF-1) - auch CXCL-12 genannt.^{13, 22, 39}

Der Ansatzpunkt bei der Stammzellmobilisation besteht nun darin, genau diese Interaktionen zwischen diesen Adhäsionsmolekülen und ihren Liganden durch Proteasen und Zytokine zu unterbrechen, damit die Progenitorzellen ins periphere, zirkulierende Blut mobilisiert werden können. In einer Studie wurden beispielsweise unterschiedliche Effekte des G-CSF auf hämatopoetische Zellen, die entweder aus dem Knochenmark oder aus dem Blut stammten, und auf Immunzell-Populationen beobachtet.⁴⁴

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass im Tierexperiment die Kombination aus einer Behandlung mit anti-VLA-4 und Zytokingabe, wie beispielsweise G-CSF-Gabe, zu einer signifikant höheren Mobilisierung von Stammzellen führt als die Mobilisierung allein durch Zytokingabe oder allein durch anti-VLA-4-Behandlung, und zwar zu einer fünf- bis achtfach höheren Mobilisierung.¹³

Seit Kurzem wird diskutiert, ob auch Osteoklasten eine weitere Rolle bei der Stammzellmobilisation spielen könnten. So wurde in einer Studie nachgewiesen, dass aktivierte Osteoklasten bei der Stammzellmobilisierung involviert sind, indem sie proteolytische Enzyme sekretieren, wie zum Beispiel die Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 und das Kathepsin K.²⁴

5 Zytokine und Progenitorzellmobilisierung

Eine der führenden Hypothesen, den Mechanismus der Zytokin-induzierten Stammzellmobilisierung zu erklären, ist die, dass Zytokine, direkt oder indirekt, die zytoadhäsiven Interaktionen zwischen Stammzellen und Knochenmark unterbrechen.¹³

Man weiß von verschiedenen Zytokinen, dass sie zur Mobilisierung der Progenitorzellen beitragen. Dazu gehören unter anderem der Granulozytenkolonie stimulierende Faktor (G-CSF), der Granulozyten-/ Makrophagenkolonie stimulierende Faktor (GM-CSF), Erythropoetin, Interleukin-8 (IL-8) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF). Einige Beispiele sind im Folgenden aufgeführt:

- Bekannt ist, dass VEGF die Neovaskularisierung sowohl im Tierexperiment als auch beim Menschen fördert. Nachdem man annahm, dass VEGF nur auf ausgereifte Endothelzellen wirkt, wurde in einem Tierexperiment nach VEGF-Gabe jedoch auch ein Anstieg der endothelialen Vorläuferzellen in vivo beobachtet. Außerdem resultierte die VEGF-induzierte Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in einer erhöhten Anzahl von differenzierten endothelialen Vorläuferzellen in vitro und in einer vermehrten kornealen Neovaskularisierung in vivo.⁵
- Ähnliche Fähigkeiten werden auch Erythropoetin zugesprochen: in einer Studie wurde Patienten nach malignem Tumorrezidiv rekombinantes humanes Erythropoetin gegeben. Bei allen Patienten konnten Mobilisierungseffekte beobachtet werden in Form einer gesteigerten Anzahl an CFU-GM und BFU-E.²¹
- Auch IL-8 werden Fähigkeiten zur Stammzellmobilisierung zugesprochen: so konnte bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt eine Assoziation zwischen IL-8 und zirkulierenden Progenitorzellen beobachtet werden.⁴²

Wenn es um Stammzellmobilisation geht, ist die Gabe von G-CSF in der Klinik, insbesondere in der Hämatologie, Routine.^{16, 18, 26, 27, 48}

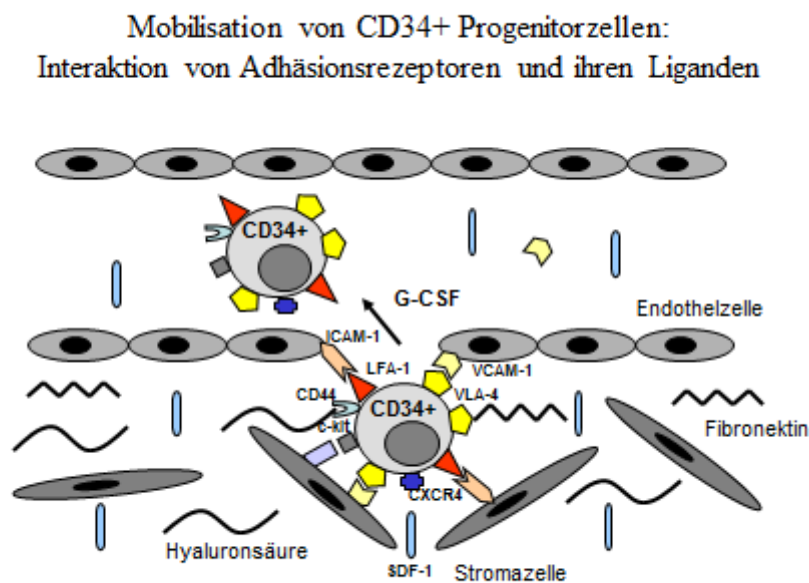
Neuere Studien zeigen, dass in Abhängigkeit vom Faktor, der verwendet wird, die mobilisierten Progenitorzellen sich hinsichtlich Quantität, Qualität und ihrer funktionellen Fähigkeiten unterscheiden. Die Gabe von AMD3100 und CD26 moduliert beispielsweise mittels Eingreifen in die Bindung zwischen CXCR4 und SDF-1 beziehungsweise CXCL-12 die Mobilisierung, das Anwachsen und das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen.¹⁰

AMD3100, auch Plerixafor genannt, wirkt als Antagonist auf den Chemokinrezeptor CXCR4.

Eine andere Studie zeigte, dass die gleichzeitige Gabe von AMD3100 und G-CSF erfolgreich CD34⁺-Zellen bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen, Morbus Hodgkin und multiplen Myelomen mobilisieren kann, bei denen zuvor die Chemotherapie und/oder Behandlung mit Zytokinen keinen Erfolg hatte.¹²

In der folgenden Abbildung ist nochmals die Interaktion von Adhäsionsrezeptoren und ihren Liganden bei der Mobilisation von CD34⁺-Progenitorzellen durch G-CSF-Gabe veranschaulicht (Abbildung 1).

Abbildung 1



6 Transducer of ERB (TOB)

Transducer of Erb2 (TOB) ist ein antiproliferatives Protein, das die Fähigkeit besitzt, das Zellwachstum zu regulieren.³³ Es agiert als transkriptionaler Korepressor und als Supressor der Zyklin D1 Promoter-Aktivität. Ein Korepressor hemmt die Expression von Genen nicht durch direkte Interaktion mit dem Promotor, sondern indirekt durch Interaktion mit Proteinen, die sich ihrerseits an den Promotor binden. Sobald es exogen exprimiert wird, unterdrückt dieses Protein das Zellwachstum in Gewebekulturen.⁴⁰

II Zielsetzung der Arbeit

In dieser Substudie der REVIVAL2-Studie wurden zirkulierende Progenitorzellen untersucht, die im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts durch die Gabe von G-CSF mobilisiert wurden.

Insbesondere wurde analysiert, ob diese Progenitorzellen im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts im Vergleich zu Progenitorzellen, die zwar auch im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts, jedoch ohne G-CSF-Gabe (stattdessen erhielten die Patienten eine Placebo-Gabe) mobilisiert wurden, Unterschiede hinsichtlich der Expression von Adhäsionsrezeptoren und Genexpression zeigen.

Ziel war es, eine mögliche Hypothese aufzustellen, warum die G-CSF-Gabe im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts keine klinische Verbesserung brachte.

III Material und Methoden

1 Studienprotokoll

Die Blutproben für die hier abgehandelte Studie wurden im Rahmen der REVIVAL2-Studie generiert.

In die REVIVAL2-Studie, eine randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie wurden 114 Patienten mit akutem Myokardinfarkt eingeschlossen.

Die Daten wurden zwischen dem 24. Februar 2004 und dem 2. Februar 2005 am Deutschen Herzzentrum München und in der 1. Medizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München erhoben.

Jeder Studienteilnehmer wurde vor Beginn ausführlich über die geplante Studie und die EDV-technische Aufnahme seiner Daten sowie Risiken und Nebenwirkungen aufgeklärt, erteilte schriftlich sein Einverständnis und wurde über die ärztliche Schweigepflicht in Kenntnis gesetzt.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethik-Kommission der Technischen Universität München genehmigt. Alle Vorgaben wurden diesbezüglich eingehalten.

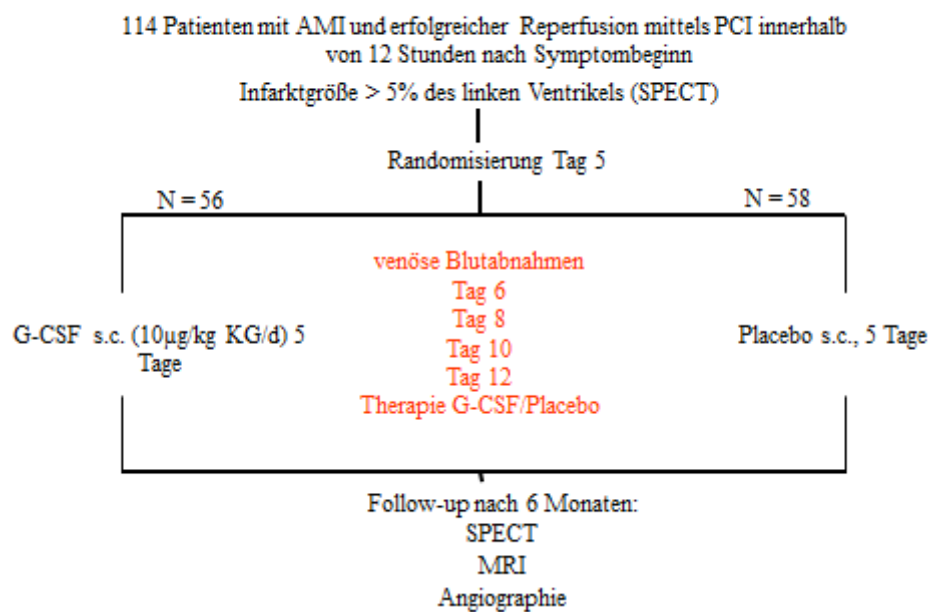
Auf mögliche Risiken, Kontraindikationen sowie Nebenwirkungen der G-CSF-beziehungsweise Placebogabe wurde geachtet.

Die Randomisierung zu einer der zwei Gruppen Verum (G-CSF) beziehungsweise Placebo erfolgte 5 Tage nach akutem Myokardinfarkt mittels versiegelter Umschläge. Diese enthielten eine computergenerierte zufällige Buchstaben-Zahlen-Sequenz, die nur von Seiten der Krankenhausapotheken der entsprechenden Gruppe zugeordnet werden konnte. Hier erfolgte die Vorbereitung der individuellen Studienmedikation entweder als Verum (G-CSF) oder Placebo (NaCl 0,9%) in nicht unterscheidbaren Einmalspritzen, um einen möglichst optimalen Doppelblind-Charakter für die Studie zu erzielen.

Die folgende Abbildung 2 soll das Studiendesign veranschaulichen.

Abbildung 2

Studiendesign



2 Patientenauswahl

Die Diagnose akuter Myokardinfarkt wurde gestellt bei Patienten mit

- prolongierten ($t > 20\text{min}$) Thoraxschmerzen
- persistierenden signifikanten ST-Strecken-Hebungen ($> 0,1\text{ mV}$ in zwei oder mehr Extremitätenableitungen oder $> 0,2\text{ mV}$ in zwei oder mehr Brustwandableitungen) oder
- neu aufgetretenem Linksschenkelblock im Oberflächen-EKG.

In die Studie eingeschlossen wurden nur Patienten 5 Tage nach akutem Myokardinfarkt und nach erfolgreicher Reperfusion durch perkutane koronare Intervention nach lokalem Standard spätestens 12 Stunden nach Auftreten der Symptome sowie einer Infarktgröße von mindestens 5% des linken Ventrikels gemessen im initialen TC99m Sestamibi Myokardszintigramm (single photon emission computed tomography, gated SPECT) noch vor der Randomisierung.

Allgemeine Einschlusskriterien beinhalteten ein Alter zwischen 18 und 80 Jahren und ein Körpergewicht von $\geq 50\text{kg}$. Als Ausschlusskriterien galten neben kardiogenem Schock und früheren Myokardinfarkten die in Tabelle 1 aufgeführten Zustände.

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

Tabelle 1, Ein- und Ausschlusskriterien

<u>Einschlusskriterien:</u>	<u>Ausschlusskriterien:</u>
- Alter zwischen 18 und 80 Jahren - ≥ 50kg Körpergewicht - Schriftliche Einwilligung des Patienten - Akuter Myokardinfarkt mit typischen Thoraxschmerzen ≥ 20 min Dauer - Im EKG ST-Hebungen $\geq 0,2$mV in zwei benachbarten Brustwandableitungen oder ST-Hebungen $\geq 0,1$mV in zwei Extremitätenableitungen - Aufnahme innerhalb der ersten 12h nach Symptombeginn - Erfolgreiche Rekanalisation des Infarktgefäßes mittels PTCA und Stenting - Sestamibi-Szintigraphie am Tag 5 nach Infarktereignis mit einem Perfusionsdefekt von mind. 5% des linken Ventrikels	- Kardiogener Schock - Myokardinfarkt in der Anamnese - Kardiomyopathie - Bestehende Schwangerschaft und Stillzeit - Autoimmunerkrankungen - Erbliche Fruktoseintoleranz - Überempfindlichkeit gegen Filgastim oder einen der Hilfsstoffe - Malignome mit einer Lebenserwartung < 1 Jahr - Hämatologische Erkrankungen - Leukozytose $> 35000/\mu\text{l}$ - Thrombopenie $< 100/\mu\text{l}$ - Anämie mit einem Hb < 8mg/dl - Quick $< 70\%$ oder PTT > 80sec - GPT über das 5-fache des oberen Normwertes - Eingeschränkte Nierenfunktion mit einem Kreatininwert $> 2,5$mg/dl

3 Studienmedikation

Als Verum wurde der Granulozyten Koloniestimulierende Faktor (G-CSF) Filgrastim (Neupogen®) der Firma Amgen GmbH, München, in einer Dosierung von $10\mu\text{g/kg}$ Körpergewicht pro Tag verwendet. G-CSF ist ein Glykoprotein, das die Entstehung funktionsfähiger neutrophiler Granulozyten und deren Freisetzung aus dem Knochenmark reguliert.

Neupogen, das r-metHuG-CSF (Filgrastim) enthält, führt innerhalb von 24 Stunden nach Anwendung zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut, begleitet von einer gering ausgeprägten Erhöhung der Anzahl von Monozyten.³ Als Placebo diente 0,9%iges Natriumchlorid.

4 Studienablauf

Vom 6. bis 12. Tag nach Infarkt erhielten die Patienten die Studienmedikation einmal täglich als subkutane Injektion; dieses Schema ist identisch mit dem, welches zur Stammzellmobilisierung gesunder Knochenmarkspender in der Hämatologie angewandt wird.

Im Rahmen der REVIVAL2-Studie wurden die peripher-venös entnommenen Blutproben bei Aufnahme, an Tag 6, 8, 10 und 12 nach Infarktgeschehen sowie im Rahmen der Follow-up Untersuchung in den Laboren der klinischen Chemie der beiden beteiligten Krankenhäuser auf Kreatinkinase (CK), sein herzspezifisches Isoenzym (CK-MB), alkalische Phosphatase (AP), C-reaktives Protein (CRP) und Differentialblutbild analysiert.

Zu erwähnen ist noch, dass im Rahmen der REVIVAL2-Studie alle Patienten 6 Monate nach Entlassung zur Nachuntersuchung (Follow-Up) einbestellt wurden. Im Rahmen dieses stationären Aufenthaltes wurden eine Re-Koronarangiographie, eine Magnetresonanztomographie, eine SPECT und eine Blutentnahme im Rahmen des Studienprotokolls durchgeführt (siehe Abbildung 2).⁵³

4.1 Blutabnahmen

An den Tagen 6, 8, 10 und 12 nach Infarktgeschehen beziehungsweise 1, 3, 5 und 7 der G-CSF/Placebo-Verabreichung wurde zusätzlich ein Röhrchen Vollblut (0,5ml) für die hier abgehandelte Studie entnommen (siehe Abbildung 2). Das Probenmaterial wurde mit Natrium – Heparin (Liquemin – Natrium) im Verhältnis 1 : 9 antikoaguliert und, auf Eis gekühlt, ins Labor transportiert, wo sofort im Anschluss die Oberflächenfärbung der Zellen und die durchflusszytometrische Messung erfolgten.

Die Blutabnahmezeitpunkte waren also wie folgt festgelegt auf

- 1.: 6 Tage nach Infarktereignis beziehungsweise am Tag 1 der G-CSF/Placebogabe
- 2.: 8 Tage nach Infarktereignis beziehungsweise am Tag 3 der G-CSF/Placebogabe
- 3.: 10 Tage nach Infarktereignis beziehungsweise am Tag 5 der G-CSF/Placebogabe
- 4.: 12 Tage nach Infarktereignis beziehungsweise am Tag 7 der G-CSF/Placebogabe.

5 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden die unterschiedlichen physikalischen und biochemischen Zellparameter zur Charakterisierung und Quantifizierung von Zellen genutzt.

Drei Faktoren sind in diesem Zusammenhang entscheidend: die Größe der Zelle, ihre Granularität und die Expression von Zielmolekülen, die durch monoklonale und fluoreszierende Antikörper markiert werden können. Des Weiteren geht es prinzipiell um die Detektion von Licht, das einerseits eben durch die Größe und die Granularität der Zelle gestreut wird und andererseits von fluoreszierenden Antikörpern emittiert wird. Die Zellen schwimmen in einer Probenflüssigkeit und passieren dabei einen Laserstrahl, dessen Licht durch die Zelleigenschaften wie oben beschrieben verändert wird und dadurch in verschiedene dahinter befindliche Messkanäle gelenkt und gemessen werden kann.

5.1 Aufbau eines Zytometers

Ein Durchflusszytometer hat, vereinfacht dargestellt, drei Komponenten: das Flüssigkeitssystem, die Optik und die Elektronik.

Das Flüssigkeitssystem dient der Zufuhr und Fokussierung der Zellen im Messpunkt. Dieser Messpunkt befindet sich im Inneren der Messkuvette, durch die sich die Zellen in einer laminaren Strömung bewegen. Kurz vor der Kuvette wird der Probenfluss so stark gebündelt, dass jeder Tropfen, der die Messkuvette passiert, nur eine geringe Zellzahl enthält.

Das optische System wird in zwei Komponenten unterteilt: eine dem Messpunkt vorgeschaltete Optik der Anregung und eine hinter dem Messpunkt liegende Sammeloptik. Ein luftgekühlter Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm wird mit Hilfe von optischen Linsen so geformt und fokussiert, dass er genau durch den Messpunkt verläuft.

Dahinter befinden sich weitere Linsen sowie ein System von optischen Spiegeln und Filtern, die die spezifischen Wellenlängen der emittierten Lichtsignale zu den entsprechenden optischen Detektoren leiten.

Das elektronische System wandelt die optischen Signale zunächst in sogenannte relative Spannungsimpulse um, die zunächst analog vorliegen. Diese Spannungsimpulse werden dann von einem Datenprozessor in digitale Signale umgewandelt und auf dem Rechner grafisch dargestellt.

5.2 Funktionsprinzip

Der auf eine Zelle treffende Laserstrahl wird durch die physikalischen Eigenschaften der Zelle gestreut. Dabei entstehen zwei Arten von Streulicht, die von unterschiedlichen Zellparametern abhängen, auch als Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserlichtes (Forward-/ Sideward-Scatter) bezeichnet. Darüber hinaus sind fluoreszierende Antikörper, die selbst Licht emittieren, an die interessierenden Zellen gekoppelt. Die an die Antikörper gebundenen Fluorochrome absorbieren die Energie des einfallenden Laserstrahls und geben diese auf zwei Arten wieder frei:

1. Durch Vibration und dabei frei werdende Wärme
2. Durch Emission eines Photons einer höheren Wellenlänge.

Die Wellenlänge des emittierten Photons ist für das jeweilige Fluorochrom spezifisch, sodass man auf einer Zelle verschiedene Antigene gleichzeitig markieren kann, deren Emissionslicht in unterschiedlichen Detektionskanälen registriert wird. Somit lassen sich Subpopulationen mit einem bestimmten Expressionsmuster genau charakterisieren und quantifizieren. Außerdem ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Anzahl der auf einer Zelle gebundenen Antikörper.

Tabelle 2 fasst nochmals die durchflusszytometrischen Messparameter zusammen.

Messparameter	Abhängig von:
Vorwärtsstreulicht	Zellgrösse
Seitwärtsstreulicht	Granularität des Zellinneren
Emittiertes Licht	Markierung von membrangebundenen Molekülen

Tabelle 2: Durchflusszytometrische Messparameter

Die optische Darstellung der digitalen Messimpulse erfolgt durch zweiachsige Punktdiagramme im Softwareprogramm (CellQuest Research software, Becton Dickinson, San Jose, USA), in denen ein Punkt genau einer Zelle entspricht.

Hierdurch wird eine zweidimensionale optische Aufgliederung der untersuchten Probe den Licht brechenden beziehungsweise emittierenden Eigenschaften der Zellen entsprechend möglich. Durch Einlegen sogenannter Analysefenster und die freie Wählbarkeit der Achsen kann die interessierende Zellpopulation fokussiert und in Bezug auf die Gesamtprobe oder in Bezug auf andere Populationen rechnerisch analysiert werden.

6 Messung und Auswertung

6.1 Probenaufbereitung

Für die Oberflächenfärbung wurde heparinisiertes Vollblut verwendet, von dem zunächst je 50µl in auf Eis befindliche FACS Messröhrchen pipettiert wurde. Danach wurde zu jeder der Proben eine bestimmte Menge verschiedener Antikörper zugegeben.

Als Antikörper zur Stammzellfärbung und damit Quantifizierung der interessierenden Stammzellen wurde eine Mischung aus TrueCount beads, 5µl PE-anti-CD133, 2,5µl FITC-anti-CD34, 2,5µl 7-AAD und 1,25µl APC-anti-CD45 hinzugegeben.

Im Folgenden sind die verwendeten Färbungen aufgeführt:

mAb	Fluoreszenz-Farbstoff	Hersteller
anti-CD34	Fluoreszeinisothiozyanid (FITC)	B&D Biosciences, San Jose, CA, USA
anti-CD45	Allophycocyanin (APC)	R&D, Minneapolis, MN, USA
anti-CD133	Phycoerythrin (PE)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

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

Außerdem wurden noch je 5µl des zu untersuchenden spezifischen Antikörpers (CD34, CXCR4, CD11a und CD49d) hinzugefügt.

Es folgt eine Übersicht über die verwendeten monoklonalen Antikörper (mAb) mit dem angegebenen Fluoreszenz-Farbstoff:

mAb	Fluoreszenz-Farbstoff	Hersteller
Anti-CXCR4	Fluoreszeinisothiozyanid (FITC)	R&D, Minneapolis, MN, USA
Anti-CD11a	Fluoreszeinisothiozyanid (FITC)	Beckmann Coulter, Krefeld
Anti-CD49d	Fluoreszeinisothiozyanid (FITC)	Beckmann Coulter, Krefeld

Nun wurden die mit den jeweiligen Antikörpern versehenen Proben für 20 Minuten auf Eis bei Dunkelheit inkubiert. Die Erythrozyten wurden durch Zusatz von 500µl Lyse-Reagenz (Coulter Electronics, Krefeld) für 10 Minuten bei Zimmertemperatur und Dunkelheit lysiert. Es folgte nach Zugabe von 2ml PBS („phosphate buffered saline“) die Zentrifugierung der Proben für 5 Minuten bei 1700U/min. Der Überstand wurde anschließend abgehoben. Bis zur Durchflusszytometriemessung wurde das Pellet nun mit 300µl 1%iger PFA-Lösung (Paraformaldehyd, Sigma Chemical Co.) versetzt und für maximal 24h bei 4°C und in Aluminiumfolie vor Licht geschützt aufbewahrt.

6.2 Quantifizierung der Zellen

Für die Analyse der Proben wurden mindestens 200.000 Zellen mit einem 15mW, 488nm Argon-Ionen-Laser in einem FACSCalibur-Durchflusszytometer der Firma Becton & Dickinson (Mountain View, CA, USA) gemessen.

Die Zellpopulation der hämatopoetischen Stammzellen wurde durch das Eingrenzen (Gating) auf die CD34/CD45-positiven Zellen und anhand des typischen Forward- und Sideward-Scatters (FSC und SSC) identifiziert.

Hierfür wurden zunächst sämtliche Messereignisse einer Probe in einem Punktdiagramm dargestellt, um die interessierende Fraktion der mononukleären Blutbestandteile einzugrenzen. Dazu wählt man ein Diagramm, das auf der x-Achse die Zellen im Vorwärtstreulicht darstellt und auf der y-Achse die CD45 APC - Fluoreszenz der Zellen anzeigt. Da CD45 ein spezifisches Oberflächenantigen mononukleärer Blutzellen ist, wurde durch Einlegen eines die CD45+ Zellgruppe eingrenzenden Analysefensters G1 eine erste Kategorisierung erzielt.⁴¹

Die absolute Anzahl CD34-positiver Zellen pro Mikroliter Blut wurde anhand der absoluten Zahl CD45-positiver Zellen (unter Verwendung von bereits oben erwähnten TrueCount beads, ebenfalls B&D) und dem gemessenen prozentualen Anteil CD34-positiver Zellen errechnet.

Dazu wurden im nächsten Punktdiagramm die CD45+ Zellen aus dem ersten Analysefenster (G1) auf den Anteil von CD34+ Zellen hin untersucht, indem diese Fluoreszenz auf der x-Achse aufgetragen war und nun mit Hilfe des Analysefensters G2 quantifiziert werden konnte.

6.3 Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen

Die Fluoreszenzen der FITC-, PE- und APC-markierten Antikörper wurden bei Wellenlängen von 520nm, 585nm und 650nm auf einer logarithmischen Skala von 1 bis 1026 Kanälen gemessen. Zur Datenanalyse wurde die Software CellQuest (Becton & Dickinson) auf einem Macintosh-Computer verwendet.

6.4 Isolation mononukleärer Zellen

Bei 20 Blutproben wurden zusätzlich CD34-positive Zellen isoliert und eine genspezifische RT-PCR durchgeführt.

Zur Extraktion mononukleärer Zellen aus der Vollblutprobe wurde eine Fällung mittels Ficoll-Hypaque der Firma Seromed (Berlin, Deutschland) durchgeführt:

Unter sterilen Bedingungen wurden 10ml Ficoll-Lösung mit 5-6ml EDTA-Blut überschichtet und anschließend für ca. 20 Minuten bei 1900U/min ohne Bremse zentrifugiert. Dabei ergab sich die für die Ficollfällung typische Schichtung: Die oberste Schicht stellt das Plasma dar, darunter bildet sich die interessierende Schicht mit den mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten), dann folgt die Ficoll-Lösung. Am Boden der Probe sammeln sich Erythrozyten und Granulozyten.

Die Schicht zwischen Ficoll-Lösung und Plasma, eben welche die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten) beinhaltet, wurde vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgesaugt und in ein neues Falcon-Tube gegeben. Nach Auffüllung mit PBS wurde erneut zentrifugiert (10 Minuten bei 1700U/min. mit Bremse), der Überstand abgehoben, das Pellet aufgeschüttelt, noch einmal mit PBS gewaschen und zentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurde nach Abheben des Überstandes mit EBM-2-Medium aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut entfernt und das entstandene Pellet mit 600-800µl Medium aufgewirbelt. Aus 50µl dieser Zellsuspension wurde nun die Zellzahl der CD34+-Zellen mittels eines automatisierten Zählgerätes (immunomagnetic beads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) ermittelt und anschließend hieraus die erforderliche Menge der Zellaufschwämmung pro Cover-Slide errechnet.

6.5 RNA Präparation

Bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) geht es darum, bestimmte Genexpressionen auf RNA-Ebene nachzuweisen. Hierzu wird die Patienten-RNA zunächst von einer reversen Transkriptase zu DNA transkribiert. Diese DNA wird nun in vitro durch eine DNA-Polymerase vermehrt: Nachdem die DNA-Doppelstränge durch Erwärmen getrennt wurden, gibt man zwei synthetische Oligonukleotide zu, die zu den beiden Enden des gesuchten Genomabschnitts komplementär sind und entsprechend damit hybridisieren können. Die jeweils davor (in Richtung 5'-Ende) liegende DNA wird nun durch eine zugegebene Polymerase kopiert, wobei die Oligonukleotide als Primer wirken. Die neuen und alten Stränge werden wieder getrennt und die Reaktion von vorne begonnen. Durch mehrere solche Zyklen lässt sich eine vieltausendfache Amplifikation eines RNA-Abschnitts erreichen. Die neu synthetisierten DNA-Stränge weisen von der zweiten Generation an eine einheitliche, definierte Länge auf und lassen sich daher durch Gelelektrophorese nachweisen (Kayser, Bienz, Eckert, Zinkernagel. Medizinische Mikrobiologie, 9. Auflage).

6.6 Quantitative PCR (TaqMan)

Eine quantitative Aussage über die Expression eines Gens wird dadurch erschwert, dass nach einer Phase der exponentiellen DNA-Amplifikation ein Schwellenwert erreicht wird, bei dem die Produktionsgeschwindigkeit aufgrund des schwindenden Substratangebotes der Probe abnimmt und eine Plateauphase erreicht wird.

Deswegen kann eine quantitative Aussage über die zu untersuchende Gensequenz nur durch Auswerten der exponentiellen Reaktionsphase getroffen werden, welche in Vorversuchen festgelegt werden muss.

Dazu wird im Bereich des linearen Kurvenverlaufs ein Schwellenwert gesetzt und die Zyklusanzahl, bei der die jeweilige Kurve diesen Schwellenwert kreuzt als CT-Wert bezeichnet (C für Zyklus / cycle; T für Schwellenwert / threshold). Bei einer großen Ausgangsmenge von DNA wird die Schwelle nach einer geringeren Zykluszahl überschritten als bei einer geringen Ausgangsmenge, weshalb der CT-Wert dann niedriger liegt.

Um Unterschiede in der Amplifikationseffizienz und der RNA-Präparation zu minimieren erfolgt eine Relation zu einem laborinternen Standardkontrollgen, das in dieser Studie die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase war.

Zur Untersuchung der CXCR4-Expression auf RNA-Ebene wurde die RNA der kernhaltigen Blutzellen aus EDTA-Plasma mit Hilfe eines RNA-Extraktionsassays gemäß den Angaben des Herstellers isoliert (Dynabeads / dT, Invitrogen, USA).

Die cDNA wurde mithilfe der superscript II - reverse Transkriptase (Invitrogen, USA) und dem Primer CFL5C (Metabion, Deutschland) synthetisiert.

Danach wurde eine reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) mit dem Expanded Long Template PCR-System (Roche, Schweiz) über 30 Zyklen durchgeführt: durch Denaturierung bei 95°C, Abkühlen bei 60°C für eine Minute und Ausdehnen bei 72°C für eine Minute.

Für Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) wurde der Primer Mm99999915, für CXCR4 der Primer Hs00976734 und für TOB der Primer Hs00675123 (alle Applied Biosystems, USA) verwendet.

Serielle Verdünnungen von cDNA wurden untersucht, um zu gewährleisten, dass keine Effekte auf die mRNA-Induktion durch den Plateau-Effekt verdeckt werden.

7 Statistik

Bei der REVIVAL2-Studie basierte die Berechnung der Patientenzahl (Probengröße) auf den folgenden Annahmen den primären Studienendpunkt betreffend: Reduktion der linksventrikulären Infarktgröße von mindestens 6% ($\pm 10\%$) unter G-CSF gegenüber 0% unter Placebo ($p=0.05$, Power=80%).

Demzufolge würden 90 Patienten mit zwei vollständigen „Szintigraphie-Paaren“ (Baseline + Follow-Up) benötigt werden. Die Gesamtzahl der Patienten wurde auf 114 erweitert, um etwaigen fehlenden Szintigraphien Rechnung zu tragen.

Alle Analysen wurden auf der Basis des Intention-To-Treat-Prinzips durchgeführt und sämtliche Patientendaten randomisiert. Kategorische Daten werden als absolute Zahlen oder Proportionen (%) angegeben, kontinuierliche als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

Zur Darstellung von Unterschieden zwischen beiden Gruppen wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für kontinuierliche Daten verwendet. Ein zweiseitiger p-Wert von <0.05 wurde als Indikator für statistische Signifikanz herangezogen. Für die statistischen Analysen wurde S-Plus (Insightful Corp., Seattle, USA) Version 4.5 verwendet.

IV Ergebnisse

1 Patienten

1.1 Patientenauswahl

Es wurden insgesamt 114 Patienten in die REVIVAL2-Studie eingeschlossen: 90 Männer und 24 Frauen im Alter zwischen 32 und 82 Jahren nach akutem Myokardinfarkt und erfolgreicher perkutaner Koronarintervention. Die detaillierten Daten sind in Tabelle 3 zu finden. Werte in Klammern sind in Prozent angegeben, die restlichen in Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

Bezüglich der Patientencharakteristika wie Alter, Geschlecht, Risikofaktoren und Vormedikation ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen.

Tabelle 3, Patientenmerkmale

Patientenmerkmale	G-CSF (n = 56)	Placebo (n = 58)	P Wert
Alter, MW (SD) a	59.4 (12.0)	59.8 (10.3)	.93
Frauen	12 (21.4)	12 (20.7)	.91
BMI, MW (SD)†	27.2 (3.6)	27.5 (4.1)	.98
Arterieller Hypertonus	31 (55.4)	41 (70.7)	.13
Diabetes	6 (10.7)	10 (17.2)	.46
Raucher	25 (44.6)	27 (46.6)	.99
Hypercholesterinämie	23 (41.1)	24 (41.4)	.89
Mehrgefäßerkrankung	31 (55.4)	38 (65.5)	.36
Infarktlokalisierung:			
Anterior	30 (53.6)	28 (48.3)	.71
Inferior	19 (33.9)	18 (31.0)	.90
Lateral	7 (12.5)	12 (20.7)	.36
Herzfrequenz, MW (SD)	68 (9)	68 (10)	.81
Blutdruck, MW (SD)			
Systolisch mmHg	110 (15)	109 (15)	.86
Diastolisch mmHg	66 (9)	66 (8)	.28
Medikation bei Entlassung:			
β-Blocker	56 (100)	57 (98.3)	.98
ACE-Hemmer	55 (98.2)	57 (98.3)	.97
Statine	55 (98.2)	56 (96.6)	.97
Nitrate	0	2 (3.4)	.51

*Die Daten werden in absoluten Zahlen (Prozent) angezeigt, sofern nicht anders angegeben.

†Berechnet als Gewicht in Kilogramm geteilt durch die Körpergröße in Metern zum Quadrat.

1.2 Nebenwirkungen und Komplikationen

6 der 58 Patienten der Placebo Gruppe – das entspricht ca. 10% der Placebo Gruppe - gaben folgende Nebenwirkungen auf die Studienmedikation an: Hautausschlag und Übelkeit sowie leichter Muskelschmerz bei je einem Patienten, Müdigkeit und Kopfschmerzen bei je zwei Patienten.

In der G-CSF Gruppe gaben 15 der 56 Patienten – das entspricht ca. 27% der G-CSF Gruppe - folgende Nebenwirkungen an: Leichte bis moderate Knochen- und Muskelschmerzen bei je sieben Patienten, Müdigkeit bei je drei Patienten, subfebrile Temperaturen und Hautausschlag bei je zwei Patienten, sowie Übelkeit bei einem Patienten.

Es sei noch kurz erwähnt, dass im Rahmen der REVIVAL2-Studie ein Nachbeobachtungsintervall von 6 Monaten nach Myokardinfarkt und Gabe der Studienmedikation folgte. Während dieses Nachbeobachtungsintervalls verstarb ein Patient der G-CSF Gruppe (1,8%) in Folge von Kammerflimmern 12 Tage nach Einschluss in die Studie. Ein Patient der Placebo Gruppe (1,7%) erlitt einen erneuten Myokardinfarkt.

2 Standardlabor und Durchflusszytometrie

Die Resultate der laborchemischen- und durchflusszytometrischen Analysen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4, Laborwerte im Verlauf

		Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7
CD34+ (Zellen/μl)	G-CSF		12 $\pm$ 17	44 $\pm$ 167	72 $\pm$ 153	59 $\pm$ 148
	Placebo		9 $\pm$ 22	6 $\pm$ 11	5 $\pm$ 6	7 $\pm$ 13
Leukozyten (10^9/l)	G-CSF	8 $\pm$ 2	26 $\pm$ 8	42 $\pm$ 14	48 $\pm$ 15	19 $\pm$ 7
	Placebo	8 $\pm$ 2	9 $\pm$ 6	9 $\pm$ 10	8 $\pm$ 6	8 $\pm$ 2
Neutrophile (10^9 /l)	G-CSF		22.2 $\pm$ 6.2	34 $\pm$ 11	33.2 $\pm$ 11.3	13.4 $\pm$ 6.5
	Placebo		5.2 $\pm$ 2.8	5.1 $\pm$ 3.8	4.9 $\pm$ 3.8	4.6 $\pm$ 1.8
Lymphozyten (10^9 /l)	G-CSF		2 $\pm$ 1.2	3.5 $\pm$ 1.8	4.4 $\pm$ 2.2	2.3 $\pm$ 1.1
	Placebo		1.8 $\pm$ 1	1.8 $\pm$ 0.6	1.9 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.6
Monozyten (10^9 /l)	G-CSF		1.4 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 1.9	1.2 $\pm$ 0.6
	Placebo		0.7 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.3
Thrombozyten (10^9/l)	G-CSF	256 $\pm$ 78	262 $\pm$ 74	281 $\pm$ 86	287 $\pm$ 99	237 $\pm$ 99
	Placebo	241 $\pm$ 59	258 $\pm$ 70	278 $\pm$ 85	295 $\pm$ 78	305 $\pm$ 98
Lactatdehydrogenase (U/l)	G-CSF	465 $\pm$ 201	435 $\pm$ 206	467 $\pm$ 173	604 $\pm$ 245	406 $\pm$ 162
	Placebo	475 $\pm$ 194	368 $\pm$ 121	311 $\pm$ 91	284 $\pm$ 75	260 $\pm$ 57
Alkalische Phosphatase (U/l)	G-CSF	90 $\pm$ 25	85 $\pm$ 25	146 $\pm$ 34	235 $\pm$ 62	188 $\pm$ 43
	Placebo	97 $\pm$ 54	84 $\pm$ 36	90 $\pm$ 42	95 $\pm$ 48	93 $\pm$ 43
C-reaktives Protein (mg/l)	G-CSF	4.3 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.3
	Placebo	3.4 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.5	2.4 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.5

Normalwerte: Leuk 4-9x10⁹/l, Neut 1.9-8.0x10⁹/l, Lym 1.2-3.5x10⁹/l, Mon 0.3-0.5x10⁹/l, Thr 130-370x10⁹/l, LDH 135-370U/l, AP 60-130U/l, CRP 0-5mg/l

Die subkutane Behandlung mit der Studienmedikation erfolgte wie bereits beschrieben von Tag 1 bis 7, das entspricht 6 bis 12 Tage nach Myokardinfarkt. Im Folgenden beziehen sich alle Angaben auf die Bezeichnung Tag 1 bis 7.

2.1 Mobilisation der Progenitorzellen (CD34+-Zellen)

2.1.1 Studiengruppe mit G-CSF-Gabe

In der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe zeigte sich eine signifikant höhere Mobilisation der CD34+ Progenitorzellen. Die Zahl der Progenitorzellen stieg bis Tag 5 der Therapie kontinuierlich an, um erst am Tag 7 der Therapie wieder abzufallen (Tabelle 4 / Abbildung 3).

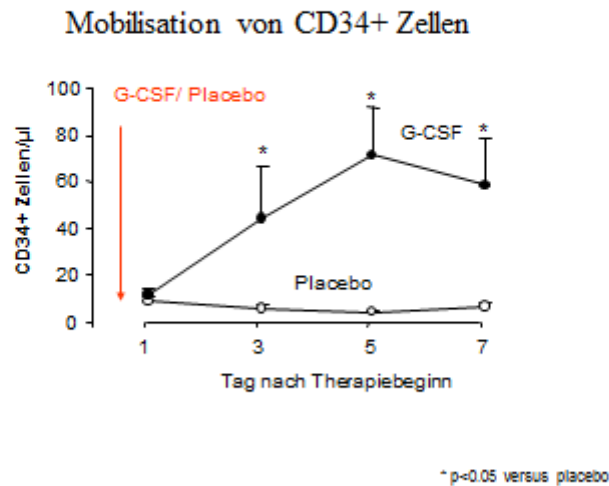
Außerdem ließ sich beobachten, dass in dieser Studiengruppe auch die Leukozytenzahl kontinuierlich bis Tag 5 der Therapie statistisch signifikant zunahm. Ebenfalls einen Anstieg zeigten die Laktatdehydrogenase und die alkalische Phosphatase.

2.1.2 Studiengruppe mit Placebo-Gabe

In der Studiengruppe mit Placebo-Gabe waren weder eine signifikante Mobilisation von CD34+-Progenitorzellen zu beobachten (Tabelle 4 / Abbildung 3) noch ein signifikanter Anstieg der Leukozyten, der Laktatdehydrogenase oder der alkalischen Phosphatase.

Sowohl bei der Messung des C-reaktiven Proteins als auch bei der der Thrombozyten ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen.

In der folgenden Abbildung ist der zeitliche Verlauf der CD34+-Progenitorzellen nach G-CSF- beziehungsweise Placebo-Gabe dargestellt (Abbildung 3).



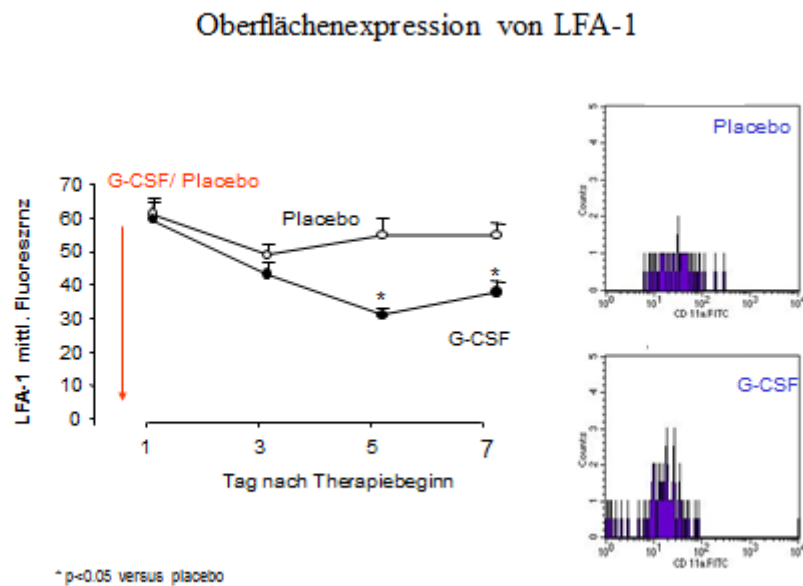
3 Zelloberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle

In den beiden Studiengruppen zeigten die CD34+-Progenitorzellen statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche.

3.1 Oberflächenexpression von LFA-1

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe eine signifikant niedrigere Expression von LFA-1 auf den CD34+-Zellen an Tag 5 und 7 nach Therapiebeginn. An Tag 1 und 3 nach Therapiebeginn war im Vergleich zur Studiengruppe mit Placebo-Gabe kein signifikanter Unterschied zu beobachten.

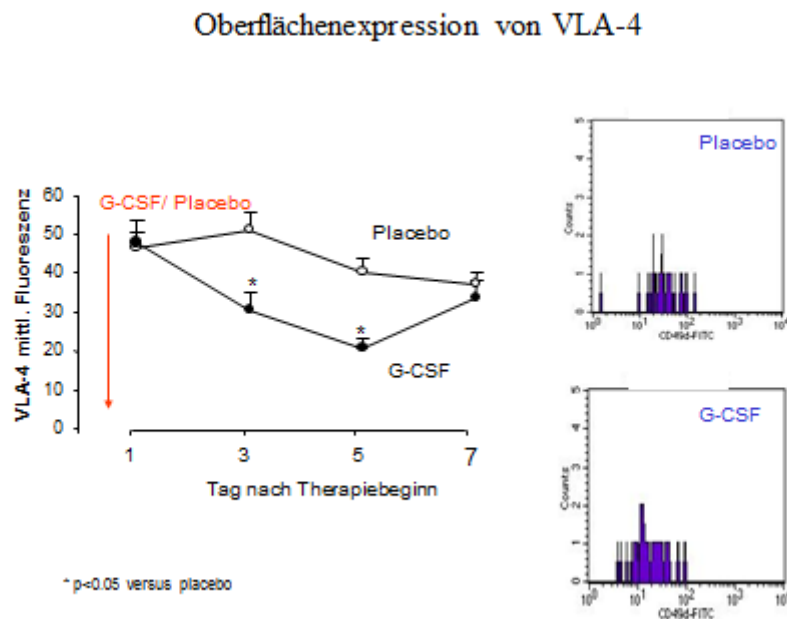
Im Folgenden ist der zeitliche Verlauf von LFA-1 nach G-CSF- beziehungsweise Placebo-Gabe dargestellt (Abbildung 4). Rechtsseitig sieht man die jeweilige FACS-Analyse.



3.2 Oberflächenexpression von VLA-4

An Tag 1 nach Therapiebeginn war die Menge des Adhäsionsrezeptors VLA-4 in beiden Studiengruppen gleich. In der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe kam es anschließend, also an Tag 3 und 5 nach Therapiebeginn, zu einer statistisch signifikant niedrigeren Expression von VLA-4-Adhäsionsrezeptoren. An Tag 7 nach Therapiebeginn war die Menge des VLA-4 in beiden Studiengruppen wieder annähernd gleich.

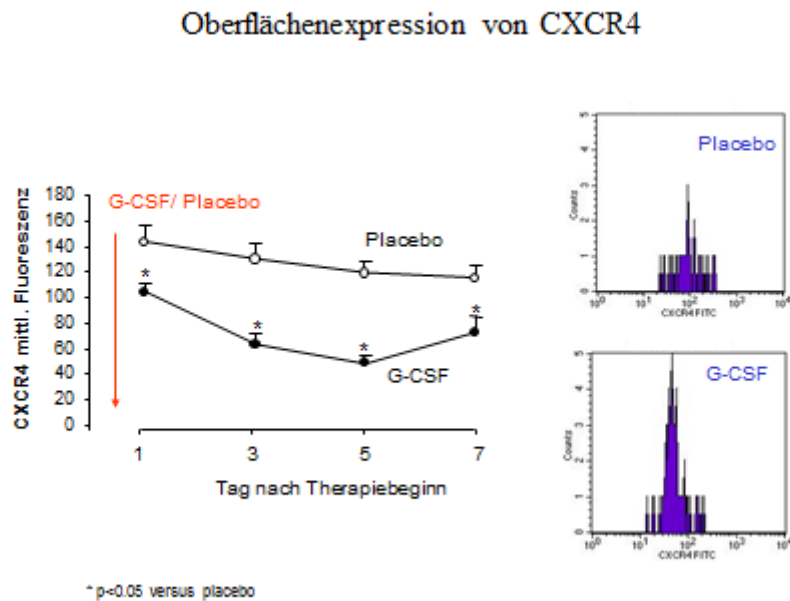
Im Folgenden ist der zeitliche Verlauf von VLA-4 nach G-CSF- beziehungsweise Placebo-Gabe dargestellt (Abbildung 5). Rechtsseitig sieht man die jeweilige FACS-Analyse.



3.3 Oberflächenexpression von CXCR4

Die Expression des Adhäsionsrezeptors CXCR4 war in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe zu jedem Zeitpunkt, also an Tag 1, 3, 5 und 7 nach Therapiebeginn, statistisch signifikant niedriger als in der Studiengruppe mit Placebo-Gabe.

Im Folgenden ist der zeitliche Verlauf von CXCR4 nach G-CSF- beziehungsweise Placebo-Gabe dargestellt (Abbildung 6). Rechtsseitig sieht man die jeweilige FACS-Analyse.



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten Adhäsionsrezeptoren in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe an Tag 5 nach Therapiebeginn die niedrigste Expression zeigten beziehungsweise dass sich an Tag 5 nach Therapiebeginn der größte Unterschied bezüglich der Oberflächenexpression zwischen den beiden Studiengruppen zeigte.

Prozentual gesehen kam es in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe zu einer Abnahme der LFA-1-Expression um 44%, zu einer Abnahme der VLA-4-Expression um 49% und zu einer Abnahme der CXCR4-Expression sogar um 60% ($p < 0.05$).

Zur Erinnerung, an Tag 5 nach Therapiebeginn erreichte die Menge der CD34+-Progenitorzellen in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe ihr Maximum.

4 mRNA-Expression von CXCR4 und TOB

4.1 mRNA-Expression von CXCR4

Wie bereits oben beschrieben kam es zu einer verminderten Oberflächenexpression von CXCR4 in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe. Parallel dazu zeigte sich auch eine verminderte Genexpression des CXCR4 in den durch G-CSF mobilisierten CD34+-Progenitorzellen.

Quantitativ ergab sich eine Genexpression des CXCR4 in den CD34+-Progenitorzellen in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe von 2.38 ± 0.85 .

Im Vergleich dazu zeigte sich in der Studiengruppe mit Placebo-Gabe quantitativ eine Genexpression des CXCR4 in den CD34+-Progenitorzellen von 7.60 ± 2.06 ($P=0.04$).

4.2 mRNA-Expression von TOB

Es zeigte sich eine statistisch signifikante, verminderte Genexpression des antiproliferativen TOB in den mononukleären Zellen nach G-CSF-Gabe am Tag 5 nach Therapiebeginn. TOB wird in unreifen Zellen weniger exprimiert.

Quantitativ ergab sich eine Genexpression des TOB in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe von 1.26 ± 0.59 .

Im Vergleich dazu zeigte sich in der Studiengruppe mit Placebo-Gabe quantitativ eine Genexpression des TOB von 4.58 ± 0.90 ($P=0.07$).

Folgende Abbildungen zeigen die quantitative mRNA-Expression von CXCR4 beziehungsweise von TOB in mononukleären Zellen bei Patienten mit Myokardinfarkt 5 Tage nach Therapiebeginn mit G-CSF-Gabe ($n=10$) oder Placebo-Gabe ($n=10$) (Abbildung 7 bis 9).

Verminderte Expression von CXCR4 mRNA nach G-CSF-Gabe

Gene Name	P-Wert	Neupogen	Placebo
growth arrest & DNA-damage-inducible protein 153	0.031		
integrin alpha 7B precursor (IGA7B)	0.016		
granulocyte colony stimulating factor receptor	0.046		
cell surface glycoprotein mac-1 alpha; CD11B	0.046		
c-src kinase (CSK); protein-tyrosine kinase cpl	0.01		
fli-1 oncogene; ergB transcription factor	0.046		
macrophage colony stimulating factor I receptor	0.000		
osteoclast stimulating factor	0.046		
platelet-activating factor receptor (PAFR)	0.038		
TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)	0.025		
nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit	0.038		
→ CXCR4 receptor	0.038		

< 0,05 0,05-0,2 0,2-0,4 0,4-0,8 > 0,8
 Signalintensität (arbitrary units)

Abbildung 8 (Einheit: CXCR4 mRNA fold-change)

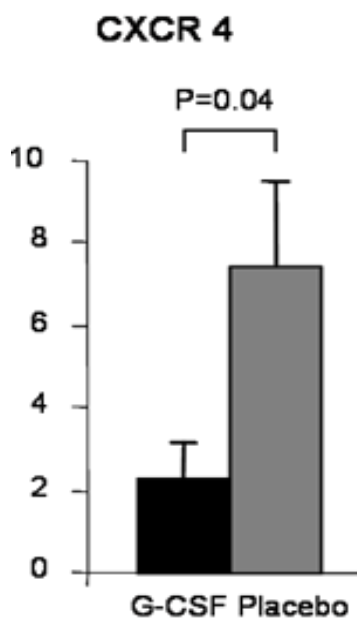
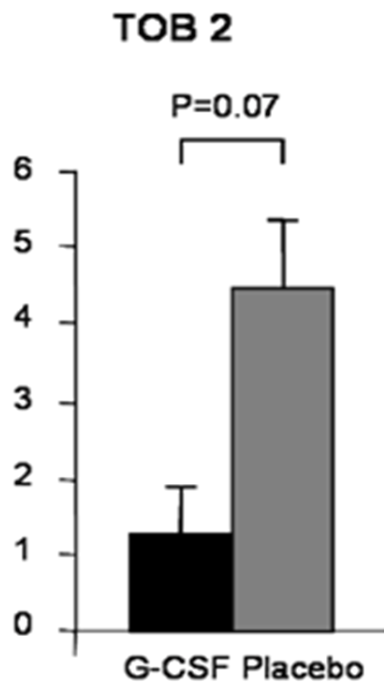


Abbildung 9 (Einheit: TOB mRNA fold-change)



Es sei noch kurz erwähnt, dass in der Studie außerdem die mRNA-Expression des Osteoklasten-stimulierenden-Faktors untersucht wurde. Der Einfluss von aktivierten Osteoklasten auf die Mobilisation von Progenitorzellen ist seit kurzem Gegenstand der Forschung. Der Osteoklasten-stimulierende-Faktor ist ein intrazelluläres Protein, das generell in verschiedenen menschlichen Geweben vorkommt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Faktor die Ausbildung von Osteoklasten sowie die Knochenresorption induziert.

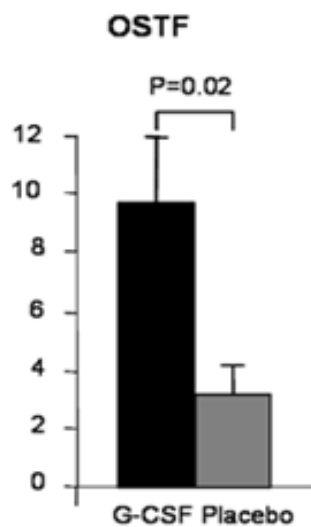
Interessanterweise war die Genexpression des Osteoklasten-stimulierenden-Faktors in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe erhöht.

Quantitativ ergab sich eine Genexpression des Osteoklasten-stimulierenden-Faktors in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe von 9.78 ± 2.26 .

Im Vergleich dazu zeigte sich in der Studiengruppe mit Placebo-Gabe quantitativ eine Genexpression des Osteoklasten-stimulierenden-Faktors in den CD34⁺-Progenitorzellen von 3.34 ± 0.93 ($P=0.02$).

Folgende Abbildung zeigt die quantitative mRNA-Expression des Osteoklasten-stimulierenden-Faktors bei Patienten mit Myokardinfarkt 5 Tage nach Therapiebeginn mit G-CSF-Gabe (n=10) oder Placebo-Gabe (n=10) (Abbildung 10).

Abbildung 10 (Einheit: OSTF mRNA fold-change)



5 Ergebnisse der REVIVAL2-Studie

Im Folgenden werden die Ergebnisse der REVIVAL2-Studie kurz zusammengefasst:

Um die Infarktgröße zu ermitteln, wurde sowohl zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses als auch zum Zeitpunkt des Follow-Up's eine T99m-Myokardszintigraphie durchgeführt. Es zeigte sich zu Beginn der Studie eine etwa gleiche Infarktgröße in den beiden Studiengruppen. Es kam im Verlauf zu keiner signifikant unterschiedlichen Reduktion der Infarktgröße in den beiden Studiengruppen.

Die linksventrikuläre Funktion wurde mittels MRT und Angiographie kontrolliert. Die MRT zeigte zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses keine Unterschiede bezüglich linksventrikulärer Volumina und Ejektionsfraktion zwischen den beiden Studiengruppen. Darüber hinaus kam es zu keiner signifikant unterschiedlichen Verbesserung der Ejektionsfraktion im weiteren Verlauf.

Die Angiographie zum Zeitpunkt des Follow-Up's konnte keine signifikanten Unterschiede sowohl in der regionalen als auch in der globalen linksventrikulären Funktion zwischen den beiden Studiengruppen zeigen.

Bezüglich der Zahl der angiographisch nachgewiesenen Re-Stenosen im Infarktgebiet zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen.

Eine Re-Intervention im Bereich des Infarktgefäßes musste bei etwa der gleichen Anzahl an Patienten sowohl in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe als auch in der Studiengruppe mit Placebo-Gabe durchgeführt werden.

V Diskussion

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit werden zunächst nochmals zusammengefasst:

1. In der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe zeigen die durch G-CSF mobilisierten CD34+-Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine statistisch signifikante, verminderte Oberflächenexpression der Adhäsionsrezeptoren VLA-4, LFA-1 und des Chemokinrezeptors CXCR4 im Vergleich zur Studiengruppe mit Placebo-Gabe.
2. In der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe kommt es zu einer statistisch signifikanten, verminderten mRNA-Expression von CXCR4 und TOB im Vergleich zur Studiengruppe mit Placebo-Gabe sowie zu einer statistisch signifikanten, vermehrten mRNA-Expression von OSTF im Vergleich zur Studiengruppe mit Placebo-Gabe.

Schömig et al. zeigten, dass ein akuter Myokardinfarkt die Mobilisation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut induziert. Außerdem beobachteten sie eine Korrelation zwischen Interleukin 8 und zirkulierenden Progenitorzellen im Falle eines akuten Myokardinfarkts.⁴²

In der REVIVAL2-Studie konnten CD34+-Progenitorzellen durch die Gabe von G-CSF bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt erfolgreich mobilisiert werden.⁵³ Dies wurde auch in anderen Studien gezeigt: Calandra et al. stellten fest, dass die gleichzeitige Gabe von AMD3100 und G-CSF eine erfolgreiche Mobilisation von CD34+-Progenitorzellen bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen, Morbus Hodgkin oder multiplen Myelomen zur Folge hatte.¹²

Jedoch wurde in der REVIVAL2-Studie auch deutlich, dass eine - wenn auch effektive - Stammzellmobilisation durch G-CSF-Gabe keinen Einfluss auf die Infarktgröße oder die linksventrikuläre Funktion nach einem akuten Myokardinfarkt hat.

Eine generell mögliche Erklärung ist, dass das infarzierte Myokard zum Zeitpunkt der Stammzell-Mobilisation für eine signifikante Rekrutierung nicht geeignet war. Andererseits wurde der gleiche Zeitraum - nämlich 4 bis 6 Tage nach Infarktgeschehen - wie in den Studien gewählt, in denen ein positiver Effekt der Stammzell-basierten Therapie beobachtet werden konnte.³²

Eine weitere mögliche und generelle Erklärung ist, dass durch die Behandlung mit G-CSF die falsche Art CD34-positiver Zellen mobilisiert wurde. Das CD34-Oberflächenantigen wird sowohl auf hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPCs) als auch endothelialen Vorläuferzellen

(EPCs) sowie auf reifen endothelialen Zellen exprimiert.²⁵ Man vermutet, dass hämatopoetische und endotheliale Vorläuferzellen unterschiedliche Aufgaben bei der Geweberegeneration haben: Während die endothelialen Vorläuferzellen die Angiogenese induzieren, wird den hämatopoetischen Vorläuferzellen die Fähigkeit zugesprochen, neue Kardiomyozyten ausbilden zu können. Diese Transdifferenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in Kardiomyozyten wird allerdings auch angezweifelt.^{8,35} Vielmehr werden die endothelialen Vorläuferzellen favorisiert, die für den positiven Stammzell-Effekt verantwortlichen Zytokine im infarzierten Myokard hervorzubringen.¹⁷ G-CSF mobilisiert jedoch überwiegend die hämatopoetischen Vorläuferzellen.²⁰

Die Funktionalität der durch G-CSF mobilisierten Stammzellen könnte zusätzlich durch die Tatsache beeinträchtigt gewesen sein, dass es sich vor allem um unreife Zellen handelt. Diese Stammzellen könnten demnach eine verminderte Fähigkeit zur Verankerung, Proliferation und Differenzierung im Zielgewebe besessen haben. Im Rahmen von intrakoronarer Stammzell-Applikation konnte nämlich nachgewiesen werden, dass die Fähigkeit der transplantierten Zellen zur Migration den entscheidenden Faktor darstellte.⁹

Die REVIVAL2-Studie zeigte, dass G-CSF-induzierte Mobilisation von Progenitorzellen keinen klinischen Vorteil für den Verlauf eines akuten Myokardinfarkts hat. Inwieweit CD34+-Progenitorzellen sich bezüglich Zellproliferation, „homing“ und Adhäsion nach Mobilisation durch G-CSF unterscheiden, wurde in verschiedenen Studien untersucht.

Forrester et al. zeigten, dass der als „homing“ bezeichnete Prozess der Verankerung und des Anwachsens mobilisierter Stammzellen in der verletzten Region des Myokards eine wichtige Rolle in der Stammzell-basierten Regeneration dieses Areals spielt.¹⁵ Genau auf diese „homing“-Fähigkeit haben die Adhäsionseigenschaften der Progenitorzellen im Infarktgebiet entscheidenden Einfluss.

In dieser Arbeit wurde die Oberflächenexpression eben der Adhäsionsrezeptoren untersucht, von denen bekannt ist, dass sie wesentlich zur „homing“-Fähigkeit der Progenitorzelle aus der Peripherie ins ischämische Myokardgebiet beitragen: die Adhäsionsmoleküle LFA-1 und VLA-4 sowie der Chemokinrezeptor CXCR4.

Mittels durchflusszytometrischer Analyse konnte demnach zum ersten Mal gezeigt werden, dass es nach G-CSF-Gabe bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt zu einer verminderten Expression der Adhäsionsmoleküle LFA-1 und VLA-4 sowie des Chemokinrezeptors CXCR4 auf CD34+-Progenitorzellen kommt. Des Weiteren besteht die Annahme, dass die proliferative Fähigkeit einer Progenitorzelle Einfluss auf ihr regeneratives Potential hat.

In dieser Substudie konnte erstmals eine verminderte mRNA-Expression von CXCR4 und von TOB auf CD34+-Progenitorzellen nach G-CSF-Gabe bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt beobachtet werden.

Frühere Studien haben bereits bewiesen, dass bei Patienten mit chronisch ischämischer Herzerkrankung die endothelialen Progenitorzellen, die durch G-CSF mobilisiert wurden, im Vergleich zu zirkulierenden Progenitorzellen, die nicht mobilisiert wurden, eine verminderte Affinität zum Chemokin Stroma-Cell-derived Factor 1 (SDF-1) - auch CXCL-12 genannt - haben, außerdem eine verminderte Expression des CXCR4-Epitops 6H8 und eine reduzierte regenerative Fähigkeit aufweisen.¹⁹

Das Chemokin SDF-1 beziehungsweise CXCL-12 ist ein chemotaktisch wirkendes, das heißt die Zellbewegung steuerndes Zytokin und Peptid, das eine Schlüsselrolle beim „homing“, also bei der Mobilisierung und zielgerichteten Wanderung von Stammzellen in ihre Speicher- oder ihre Verwendungsorte, bei der Organogenese sowie der Organ- und Wundheilung spielt. Seine Effekte vermittelt dieses Chemokin eben durch Bindung an zwei verschiedene Chemokinrezeptoren, CXCR4 und CXCR7.¹¹

Wenn auch andererseits nachgewiesen wurde, dass die Wirkung des SDF-1 alleine nicht ausreichend ist für die Rekrutierung von zirkulierenden Stammzellen in das Infarktareal.¹

Es scheint vielmehr, dass die gleichzeitige Expression verschiedener Gene die Voraussetzung für eine erfolgreiche Verankerung mobilisierter Stammzellen im Zielgewebe ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen auch mit anderen Studien überein, in denen beobachtet wurde, dass die G-CSF-assoziierte Mobilisation zumindest teilweise durch die gesteigerte Aktivität von Proteasen induziert wird, die Adhäsionsrezeptoren und deren bindende Proteine spalten.

Wie bereits erwähnt, kam es in der oben genannten Studie zu einer verminderten Expression des CXCR4-Epitops 6H8.¹⁹ Durch G-CSF aktivierte Proteasen spalten das 6H8-Epitop und reduzieren dadurch die funktionelle Aktivität des Chemokinrezeptors CXCR4. Es wird angenommen, dass die dadurch verminderte Signalwirkung des CXCR4-Rezeptors nach G-CSF-Gabe die Wanderung der endothelialen Progenitorzellen hemmt.^{14, 46}

In anderen Studien konnte beobachtet werden, dass Leukozyten-Proteinasen die Proteolyse der extrazellulären Aminosäureterminalen Domäne von CXCR4-exprimierenden Zellen induzieren.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Studien: Zellen, die mit Leukozyten-Elastase behandelt wurden, verloren das Aminosäureterminale Epitop 6H8, wohingegen Epitope, die durch mAb 12G5 nachgewiesen wurden, erhalten blieben.⁵⁰ Bei mAb 12G5 handelt es sich um den anti-CXCR4 monoklonalen Antikörper 12G5.

Die Behandlung mit G-CSF begünstigt die Anreicherung von neutrophilen proteolytischen Enzymen im Knochenmark, wie die Neutrophilen-Elastase, das Cathepsin-G und MMP-9.²⁹

Andererseits gibt es auch experimentelle Studien mit Mäusen, die über eine unzureichende Anzahl von Proteasen verfügten. Hier konnte man sehen, dass eine Mobilisation der Progenitorzellen durch G-CSF-Gabe auch ohne Proteasen möglich ist.³⁰

Dies führt zu der Annahme, dass es noch andere Mechanismen geben muss, die an der G-CSF assoziierten Mobilisation beteiligt sind.

Andere Studien lieferten den Beweis, dass die durch G-CSF reduzierte Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 bei der Mobilisation von myeloischen Zellen eine wichtige Rolle spielt.²³

Entsprechend wurde in dieser Studie ein Abfall des Chemokinrezeptors CXCR4 und der Adhäsionsmoleküle LFA-1 und VLA-4 auf zirkulierenden CD34+-Progenitorzellen nach G-CSF-Gabe beobachtet. Die Abnahme der Antikörperbindung durch 12G5 mAb, den wir in dieser Studie benutzten, mag vielleicht nicht den Abbau, jedoch die Herunterregulierung des CXCR4 auf CD34+-Progenitorzellen nach G-CSF-Behandlung widerspiegeln. Diese Theorie wird weiterhin unterstützt durch die Tatsache, dass es zu einer verminderten Expression der entsprechenden mRNA auf den CD34+-Progenitorzellen kam. Da in dieser Studie die CD34+-Progenitorzellen ohne „ex vivo“-Kulturen der Zellen direkt analysiert wurden, scheint das Ergebnis der Studie wahrhaftig den „in vivo“-Status der Zellen zu reflektieren.

Diese Ergebnisse gehen auch mit den Ergebnissen anderer Studien einher, in denen gezeigt wurde, dass der Transkriptionsrepressor „growth factor independence-1“ (Gfi-1) bei der durch G-CSF induzierten Mobilisation der Zellen granulözytärer Abstammung aus dem Knochenmark ins periphere Blut involviert ist und dass G-CSF in vitro und in vivo die Expression des Gfi-1-Repressors begünstigt und die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 runterreguliert.^{23, 43} Als Repressor bezeichnet man ein DNA-bindendes Regulator-Protein, welches an den Operator bindet und damit die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor blockiert, wodurch die Transkription des Gens (oder Operons) verhindert wird.

Die Regulation auf Transkriptionsebene scheint ebenfalls wichtig zu sein: die mRNA des Chemokins SDF-1 war in Knochenmarkzellen während der G-CSF-Gabe herunterreguliert.⁴³ In dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass durch G-CSF mobilisierte Progenitorzellen nicht nur eine reduzierte Anzahl von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche haben, was eine Folge des Spaltens durch Proteasen sein könnte, sondern auch eine verminderte mRNA-Menge, die für den wichtigen Chemokinrezeptor CXCR4 codiert.

Transducer of Erb2 wird in undifferenzierten Zellen weniger exprimiert, in dieser Studie wurde eine signifikante Herunterregulation in der Studiengruppe mit G-CSF-Gabe beobachtet. Transducer of Erb2 (TOB) ist ein antiproliferatives Protein, das die Fähigkeit besitzt, das Zellwachstum zu regulieren. Sobald es exogen exprimiert wird, unterdrückt dieses Protein das Zellwachstum in Gewebekulturen.⁴⁰

Somit könnte eine verminderte Expression des TOB die proliferative Fähigkeit der durch G-CSF mobilisierten CD34+-Progenitorzellen verbessern.

Aber auch wenn eine gesteigerte Proliferation die regenerative Fähigkeit der CD34+-Progenitorzellen verbessert, könnte man annehmen, dass die verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle LFA-1 und VLA-4 sowie des Chemokinrezeptors CXCR4 diese Wirkung wieder aufhebt - und damit zur verminderten Rekrutierung der durch G-CSF mobilisierten CD34+-Progenitorzellen ins ischämische Myokard beiträgt.

Die Rolle der Osteoklasten während der Mobilisation durch G-CSF wurde bisher kontrovers diskutiert. Aktuelle Studien sprechen für eine wesentliche Beteiligung der Osteoklasten an parakrinen Effekten⁴⁹ sowie für eine Mobilisation von unreifen Progenitorzellen durch aktivierte Osteoklasten.²⁴

Durch G-CSF mobilisierte Progenitorzellen zeigten eine erhöhte Anzahl von mRNA, die für den Osteoklasten-stimulierenden-Faktor codiert. Dieser Osteoklasten-stimulierende-Faktor ist ein intrazelluläres Protein, das in vielen menschlichen Geweben exprimiert wird und die Ausbildung von Osteoklasten und die Resorption von Knochen induziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Studie zu der Hypothese führen, dass durch G-CSF mobilisierte Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt das klinische Ergebnis nicht verbessern konnten, weil durch die verminderte Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen auf eben diesen

Progenitorzellen sowohl die Rekrutierung ins ischämische Myokard als auch die regenerativen Fähigkeiten der Zellen vermindert sind.

Es gilt, Alternativen zu G-CSF zu finden, wie beispielsweise AMD 3100, Gro-beta oder EPO, die vielleicht andere Subtypen von Progenitorzellen ansprechen oder über andere Mechanismen effektiver arbeiten und somit Zellen mobilisieren, die eine bessere „homing“-Fähigkeit sowie bessere Kapazitäten besitzen, sodass letztendlich die Mobilisierung von Stammzellen in Zukunft dazu beitragen kann, das klinische Ergebnis bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt zu verbessern.

VI Zusammenfassung

Hintergrund: G-CSF induziert die Mobilisierung von Progenitorzellen. Die Mobilisierung ist ein in vielen Einzelschritten ablaufender Prozess. Hierbei sind Chemokine, Wachstumsfaktoren und Matrix-degradierende Enzyme involviert sowie Zelladhäsions-Interaktionen erforderlich, die durch spezifische Rezeptoren auf hämatopoetischen Zellen vermittelt werden. Mitglieder dieser Integrin-Familie der Adhäsionsrezeptoren sind im ganzen hämatopoetischen System weit verstreut. Vor allem die Adhäsionsmoleküle „very late antigen 4“ (VLA-4), „leukocyte function-associated antigen-1“ (LFA-1) sowie der „stroma-cell derived factor-1“ (SDF-1) und sein Rezeptor CXCR-4 spielen eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung und Rekrutierung von Progenitorzellen.

Methoden und Ergebnisse: In der REVIVAL-2 Studie, einer randomisierten, doppelblinden, Placebo kontrollierten Studie wurden 114 Patienten mit akutem Myokardinfarkt eingeschlossen. Fünf Tage nach erfolgreicher Reperfusion durch perkutane koronare Intervention wurde den Patienten entweder 10 µg/kg Körpergewicht G-CSF (56 Patienten) oder Placebo (58 Patienten) subkutan für 5 Tage injiziert. Venöse Blutabnahmen wurden am 1., 3., 5. und 7. Tag nach Gabe von G-CSF oder Placebo durchgeführt. Die Dichte der Adhäsionsrezeptoren VLA-4 und LFA-1 sowie des Chemokinrezeptors CXCR-4 auf zirkulierenden CD34⁺-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CD34⁺-Progenitorzellen durch G-CSF (72 ± 153 Zellen/µl versus 5 ± 6 Zellen/µl, $P < 0.05$). Die Epitopdichte von LFA-1, VLA-4 und CXCR4 auf den CD34⁺-Zellen war nach G-CSF Gabe im Vergleich zur Placebogruppe um 44%, 49% und 60% reduziert ($P < 0.05$).

Schlussfolgerung: Durch die verminderte Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsrezeptoren auf G-CSF mobilisierten CD34⁺-Zellen im akuten Myokardinfarkt könnte die myokardiale Rekrutierung der mobilisierten Zellen aus dem zirkulierenden Blut beeinflusst werden.

Literaturverzeichnis

1. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. *Stromal cell-derived factor 1-alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury.* Circulation 2004; 110: 3300-3305
2. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, Eckey T, Henze E, Zeiher AM, Dimmeler S. *Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labelling.* Circulation 2003; 107(16): 2134-2139
3. Amgen Europe B.V.; *Fachinformation Neupogen.* Stand 2008
4. Anversa P, Nadal-Ginard B. *Myocyte renewal and ventricular remodelling.* Nature 2002; 415: 240-243
5. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells.* Embo J. 1999; 18: 3964-3972
6. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. *Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI).* Circulation 2002; 106(24): 3009-3017
7. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. *Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes.* Circulation 2003; 107(7): 1024-1032
8. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. *Hematopoietic stem cells adopt mature hematopoietic fates in ischemic myocardium.* Nature 2004; 428: 668-673
9. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. *Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrastenhanced magnetic resonance imaging.* Circulation 2003; 108(18): 2212-2218
10. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Campbell T, Ito S, Mantel C. *AMD3100 and CD26 modulate mobilization, engraftment, and survival of hematopoietic stem and*

- progenitor cells mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 axis. Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1106: 1-19
11. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold MET, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med.* 203: 2201–2213, 2006
 12. Calandra G, McCarty J, McGuirk J, Tricot G, Crocker SA, Badel K, Grove B, Dye A, Bridger G. *AMD3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34+ cells from non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and/or cytokine treatment: compassionate use data. Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 331-338
 13. Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, Priestley GV, Papayannopoulou T. *Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. Blood.* 1997; 90: 4779-4788
 14. Fibbe WE, Pruijt JF, van Kooyk Y, Figdor CG, Opdenakker G, Willemze R. *The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8-induced stem-cell mobilization. Semin Hematol.* 2000; 37: 19-24
 15. Forrester JS, Price MJ, Makkar RR. *Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians. Circulation* 2003; 108: 1139-1145
 16. Haas R, Murea S. *The role of granulocyte colony-stimulating factor in mobilization and transplantation of peripheral blood progenitor and stem cells. Cytokines Mol Ther.* 1995 Dec; 1(4): 249-70
 17. Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. *A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. Circ Res* 2004; 94: 573-574
 18. Heimfeld S, Fogarty B, McGuire K, Williams S, Berenson RJ. *Peripheral blood stem cell mobilization after stem cell factor or G-CSF treatment: rapid enrichment for stem and progenitor cells using the CEPRATE immunoaffinity separation system. Transplant Proc.* 1992; 24: 2818
 19. Honold J, Lehmann R, Heeschen C, Walter DH, Assmus B, Sasaki K-I, Martin H, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. *Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 2238-2243

20. Hubel K, Engert A. *Clinical applications of granulocyte-colony stimulating factor: an update and summary*. Ann Hematol 2003; 82: 207-213
21. Kessinger A, Bishop MR, Jackson JD, O’Kane-Murphy B, Vose JM, Bierman PJ, Reed EC, Warkentin PI, Armitage JO, Sharp JG. *Erythropoietin for mobilization of circulating progenitor cells in patients with previously treated relapsed malignancies*. Exp Hematol. 1995; 23: 609-612
22. Kikuta T, Shimazaki C, Ashihara E, Sudo Y, Hirai H, Sumikuma T, Yamagata N, Inaba T, Fujita N, Kina T, Nakagawa M. *Mobilization of hematopoietic primitive and committed progenitor cells into blood in mice by anti-vascular adhesion molecule-1 antibody alone or in combination with granulocyte colony-stimulating factor*. Exp Hematol. 2000; 28: 311-317
23. Kim HK, De La Luz Sierra M, Williams CK, Gulino AV, Tosato G. *G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells*. Blood. 2006 Aug 1;108(3): 812-20
24. Kollet O, Dar A, Shivtiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T. *Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells*. Nat Med. 2006; 12: 657-664
25. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. *CD34: structure, biology and clinical utility*. Blood 1996; 87: 1-13
26. Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, Mullen M, Mealiffe M, Terstappen LW, Hardwick A, Moubayed M, Oldham F, Corringham RET, Ho AD. *Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation*. Blood. 1995 Jan 1; 85(1): 275-82
27. Lemoli RM, Tafuri A, Fortuna A, Petrucci MT, Ricciardi MR, Catani L, Rondelli D, Fogli M, Leopardi G, Ariola C, Tura S. *Cycling status of CD34+ cells mobilized into peripheral blood of healthy donors by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor*. Blood. 1997 Feb 15; 89(4): 1189-96
28. Leone AM, Rutella S, Bonanno G, Abbate A, Rebuzzi AG, Giovanni S, Lombardi M, Galiuto L, Liuzzo G, Andreotti F, Lanza GA, Contemi AM, Leone G, Crea F. *Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function*. Eur Heart J. 2005; 26: 1196-1204

29. Lévesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Williams B, Winkler IG, Simmons PJ. *Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment.* Exp Hematol. 2002 May; 30(5): 440-9
30. Lévesque JP, Liu F, Simmons PJ, Betsuyaku T, Senior RM, Pham C, Link DC. *Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice.* Blood. 2004; 104: 65-72
31. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari G, Ferlini M, Goffredo L, Bertolotti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. *Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction.* Blood. 2005; 105: 199-206
32. Mathura, Martin JF. *Stem cells and repair of the heart.* Lancet 2004; 364: 183-192
33. Matsuda S, Kawamura-Tsuzuku J, Ohsugi M, Yoshida M, Emi M, Nakamura Y, Onda M, Yoshida Y, Nishiyama A, Yamamoto T., *Tob, a novel protein that interacts with p185erbB2, is associated with anti-proliferative activity.* Oncogene. 1996 Feb 15; 12(4): 705-13
34. Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H. *Acceleration of healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment.* Circulation 2004; 109: 2572-2580
35. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H. *Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts.* Nature 2004; 328:664-668
36. Orlic D, Hill JM, Arai AE. *Stem cells for myocardial regeneration.* Circ Res 2002; 91(12): 1092-1102
37. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.* Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(18): 10344-10349
38. Ott I, Keller U, Knoedler M, Gotze KS, Doss K, Fischer P, Urlbauer K, Debus G, von Bubnoff N, Rudelius M, Schömig A, Peschel C, Oostendorp RA. *Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction.* Faseb J. 2005; 19: 992-994

39. Papayannopoulou T, Craddock C. *Homing and trafficking of hemopoietic progenitor cells*. Acta Haematol. 1997; 97:97-104
40. Sasajima H, Nakagawa K, Yokosawa H. *Antiproliferative proteins of the BTG/Tob family are degraded by the ubiquitin-proteasome system*. Eur J Biochem. 2002 Jul; 269(14): 3596-604
41. Sasaki T, Sasaki-Irie J, Penninger JM. *New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45*. Int J Biochem Cell Biol 2001; 33: 1041–1046
42. Schömig K, Busch G, Steppich B, Sepp D, Kaufmann J, Stein A, Schomig A, Ott I. *Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction*. Eur Heart J. May 2006; 27 (9): 1032-1037
43. Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, Winkler I, Levesque JP, Chappel J, Ross FP, Link DC. *G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow*. Blood. 2005 Nov 1; 106(9): 3020-7
44. Shier LR, Schultz KR, Imren S, Regan J, Issekutz A, Sadek I, Gilman A, Luo Z, Panzarella T, Eaves CJ, Couban S. *Differential effects of granulocyte colony-stimulating factor on marrow- and blood-derived hematopoietic and immune cell populations in healthy human donors*. Biol Blood Marrow Transplant. 2004; 10: 624-634
45. Shintai S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction*. Circulation 2001; 103(23): 2776-2779
46. Starckx S, Van den Steen PE, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. *Neutrophil gelatinase B and chemokines in leukocytosis and stem cell mobilization*. Leuk Lymphoma. 2002; 43: 233-241
47. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kosterling M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. *Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans*. Circulation 2002; 106(15): 1913-1918
48. Suzue T, Kawano Y, Takaue Y, Kuroda Y. *Cell processing protocol for allogeneic peripheral blood stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor*. Exp Hematol. 1994 Aug; 22(9): 888-92
49. Takamatsu Y, Simmons PJ, Moore RJ, Morris HA, To LB, Levesque JP. *Osteoclast-mediated bone resorption is stimulated during short-term administration of granulocyte colony-stimulating factor but is not responsible for hematopoietic progenitor cell mobilization*. Blood. 1998; 92: 3465-3473

50. Valenzuela-Fernández A, Planchenault T, Baleux F, Staropoli I, Le-Barillec K, Leduc D, Delaunay T, Lazarini F, Virelizier JL, Chignard M, Pidard D, Arenzana-Seisdedos F. *Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4*. J Biol Chem. 2002 May 3; 277(18): 15677-89
51. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, Wyderka R, Ochala A, Ratajczak MZ. *Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction*. Circulation. 2004; 110: 3213-3220
52. Zohlhöfer D, Dibra A, Koppara T, de Waha A, Sejersten Ripa R, Kastrup J, Valgimigli M, Schömig A, Kastrati A. *Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor for myocardial recovery after acute myocardial infarction: a meta-analysis*. J Am Coll Cardiol. 2008; 51:1429-1437
53. Zohlhöfer D, Ott I, Mehilli J, Schömig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schömig A. *Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial*. Jama 2006; 295: 1003-1010
54. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>

Originalarbeit

Stein A, Zohnhöfer-Momm D, Pogatsa-Murray G, von Wedel J, Steppich B, Schömig A, Kastrati A, Ott I. *Expression of CXCR4, VLA-1, LFA-3 and Transducer of ERB in G-CSF mobilized Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction*. Thrombosis and Haemostasis 2010 Mar 1;103(3):638-43

Zohnhöfer D, Ott I, Mehilli J, Schömig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schömig A. *A randomized Clinical Trial of Stem Cell Mobilization by Granulocyte-Colony Stimulating Factor in Patients with Acute Myocardial Infarction. (REVIVAL-2)*. JAMA. 2006 Mar 1;295(9):1003-1010

Lebenslauf

Danksagung

Frau Prof. Dr. med. I. Ott, Oberärztin an der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München Klinikum rechts der Isar / Deutsches Herzzentrum München, danke ich für die Vergabe des Themas, für die freundliche Unterstützung und wertvolle sowie umfassende Betreuung. Des Weiteren danke ich ihr für ihr großes Interesse und ihre stete Bereitschaft zur Diskussion.

Frau MTA B. Campbell und Frau MTA A. Stobbe des experimentellen Labors für Kardiologie des Deutschen Herzzentrums München danke ich für die hilfreiche und unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten im Labor.

Ebenfalls gilt mein Dank meinen Mitdoktoranden, die an der Durchführung der REVIVAL2-Studie mitgewirkt haben.

Und zuletzt gilt mein besonderer Dank den Patienten, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.