

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar / Deutsches Herzzentrum München
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. A. Schömig)

Mobilisierung von zirkulierenden Progenitorzellen im akuten Myokardinfarkt.

Philipp Peter Moog

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. I. Ott
2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster

Die Dissertation wurde am 12.02.2007 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät der Medizin am 18.07.2007 angenommen.

Gliederung

1. Einleitung.....	4
1.1. Einführung: Pathophysiologie und Therapieansätze des akuten Myokardinfarkts.....	4
1.2. Mechanismen der Gefäßneubildung	5
1.2.1. Postnatale Vaskulogenese durch adulte endotheliale Vorläuferzellen.....	6
1.3. Charakterisierung von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen...7	
1.3.1. Expression von CD 34.....	8
1.3.2. Expression von CD 133.....	9
1.4. Zirkulierende Endothelzellen.....	10
1.5. Mechanismen der Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen und Stammzellen aus dem Knochenmark.....	10
1.6. Zirkulierende Stammzellen, Endothelvorläuferzellen und Endothelzellen bei koronarer Herzerkrankung.....	14
1.6.1. Ischämie-induzierte Mobilisation.....	14
1.6.2. Einflussfaktoren auf die Zahl zirkulierender Vorläuferzellen.....	18
2. Zielsetzung der Arbeit.....	21
3. Material und Methoden.....	22
3.1. Studiendesign	22
3.1.1. Infarktgruppe.....	22
3.1.2. Kontrollgruppe.....	23
3.1.3. Abnahmeprotokoll.....	23
3.2. Durchflusszytometrie.....	25
3.2.1. Aufbau eines Zytometers.....	25
3.2.2. Funktionsprinzip.....	26
3.2.3. Probenaufbereitung.....	27
3.2.4. Probenauswertung.....	28
3.3. Immunoassays.....	30
3.4. RNA-Präparation und Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion.....	31

4. Ergebnisse.....	33
4.1. Statistische Daten der Studienpopulation.....	33
4.2. Zirkulierende CD 133- positive Zellen	34
4.3. Zirkulierende Endothelzellen	35
4.4. Zirkulierende CD 34- positive Zellen.....	37
4.5. Serumkonzentrationen von IL-8	37
4.6. Serumkonzentrationen von VEGF, G-CSF, GM-CSF und SDF-1	38
5. Diskussion	40
5.1. Mobilisierung von CD 133-positiven Zellen nach akutem Myokardinfarkt	40
5.2. Mobilisierung von CD 34- positiven Zellen.....	42
5.3. zirkulierende Endothelzellen.....	44
5.4. VEGF, G-CSF, GM-CSF und SDF-1.....	44
5.5. Interleukin-8 und Stammzellmobilisierung.....	45
6. Zusammenfassung.....	49
7. Literaturverzeichnis.....	50

Danksagung

1. Einleitung

1.1 Einführung: Pathophysiologie und Therapieansätze des akuten Myokardinfarkts

Bei einem akuten Myokardinfarkt kommt es infolge eines kompletten Verschlusses einer Koronararterie und mangelnder Sauerstoffversorgung in ihrem Versorgungsbereich zu einer Gewebsnekrose, die im weiteren Verlauf durch Umbauprozesse in eine Myokardnarbe umgewandelt wird. Dieser Teil des Herzmuskels verliert dadurch seine physiologische Funktion und es kommt, je nach Größe der Läsion, zu Wandbewegungsstörungen mit konsekutiver Einschränkung der ventrikulären Pumpfunktion. Des Weiteren prädestinieren solche Narben in der Herzmuskulatur bekanntermaßen zur Entstehung lebensbedrohlicher Herzrhythmusstörungen, einer der Hauptkomplikationen nach einem stattgehabten Infarkt.

Deswegen liegt das Hauptbestreben in der Therapie des akuten Myokardinfarkts darin, die Vaskularisierung des betroffenen Versorgungsareals wiederherzustellen und somit das Ausmaß untergehenden Gewebes möglichst gering zu halten. Der klassische kausale Therapieansatz besteht hierbei in einer frühzeitigen Reperfusion des verschlossenen Koronargefäßes, sei es durch eine Lysetherapie oder besser noch durch eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA).

Der Körper besitzt darüber hinaus noch weitere eigene Mechanismen, wie er nekrotisches Gewebe neu organisieren und funktionalisieren kann, nämlich durch Einsprossen von Kapillaren aus dem Randbereich der Nekrose (Angiogenese), sowie durch de-novo-Synthese von Gefäßen mit Hilfe von im Blut zirkulierender sogenannter endothelialer Vorläuferzellen (Vaskulogenese). Auf die Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten der Gefäßneubildung in nekrotischem Gewebe soll im folgenden Abschnitt etwas genauer eingegangen werden, da vor allem der Mechanismus der Vaskulogenese neue, ergänzende Therapiemöglichkeiten eröffnen könnte, die derzeit Gegenstand intensiver experimenteller und klinischer Forschung sind.

1.2 Mechanismen der Gefäßneubildung

Die ersten Erkenntnisse über die Entwicklung von Blutgefäßen stammen von Beobachtungen am Embryo. Man fand heraus, dass sich im Embryo ab der dritten Entwicklungswoche so genannte Blutinseln bilden, die in ihrem Zentrum aus hämatopoetischen Stammzellen bestehen und in der Peripherie aus so genannten Angioblasten (Flamme, Risau, 1992). Die Angioblasten entsprechen embryonalen endothelialen Vorläuferzellen. Sie differenzieren aus zu reifen Endothelzellen und bilden so Endothelschläuche, die das Grundgerüst für die weitere Gefäßentstehung darstellen. Diese de-novo-Synthese von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen wird als Vaskulogenese bezeichnet.

Aus vorbestehenden Blutgefäßen können jedoch auch durch Proliferation aktivierter, differenzierter Endothelzellen auf verschiedene Art und Weise Gefäßaussprossungen oder Gefäßteilungen entstehen, die in der Folge zu funktionellen Gefäßen erweitert werden. Diese Art der Gefäßneubildung wird als Angiogenese bezeichnet und wird von den ortsständigen Endothel-, Bindegewebs- und Muskelzellen unter dem Einfluss einer Vielzahl von Botenstoffen vollzogen (Hanahan, Folkman 1996, Conway et al., Cardiovascular Res 2001).

Beiden Prozessen liegt dabei ein kompliziertes Zusammenspiel von proangiogenetischen und antiangiogenetischen Faktoren zugrunde, die in verschiedenen Situationen entweder zur Stimulation oder zur Inhibition der Gefäßbildung führen können (Conway et al, Cardiovasc. Res., 2001).

Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Mechanismen besteht darin, dass

- (a) die für die Vaskulogenese verantwortlichen endothelialen Vorläuferzellen ein vielfach höheres Proliferationspotential besitzen als ausdifferenzierte Endothelzellen (Lin et al., J Clin Invest, 2000; Forraz et al, Brit J Haemat, 2002) und somit ein schnelleres Gefäßwachstum gewährleisten
- (b) die Vaskulogenese im Gegensatz zur Angiogenese nicht unmittelbar an das lokale Vorbestehen von Blutgefäßen gebunden ist, da es sich um eine de-novo-Synthese handelt.

Es wurde lange Zeit angenommen, dass der Körper nach der Embryonalentwicklung die Möglichkeit zur Vaskulogenese verliert und nur noch durch Angiogenese Gefäßneubildung betreiben kann, da die Existenz von endothelialen Vorläuferzellen auf die Embryonalentwicklung beschränkt zu sein schien. Das würde bedeuten, dass infolge eines nekrotischen Geschehens lediglich das unmittelbar umgebende Gewebe zur Revaskularisierung beitragen könnte. Da die ortsständigen reifen Zellen jedoch ein geringeres mitotisches Potential besitzen als Stamm- oder Vorläuferzellen, kann sich dieser Prozess nur vergleichsweise langsam abspielen. Ein neuerer Ansatz zur Erklärung der Gefäßneubildung des adulten Organismus wurde möglich, als man die Existenz von adulten endothelialen Vorläuferzellen postulierte.

1.2.1 Postnatale Vaskulogenese durch adulte endotheliale Vorläuferzellen

Da bereits bekannt war, dass embryonale hämatopoetische Stammzellen und Angioblasten aus den embryonalen Blutinseln gemeinsame Oberflächenmoleküle (z. Bsp. CD34, vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2), Tie-2) exprimieren, lag die Vermutung nahe, dass diese Zelltypen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle, dem so genannten Hämangioblasten, entspringen (Weiss, Orkin, 1996).

1997 gelang es Asahara et al. mit Hilfe dieser Oberflächenmarker, einen Zelltyp aus menschlichem Erwachsenenblut zu isolieren, der zunächst die morphologischen Eigenschaften einer Stammzelle besaß, in der Zellkultur in vitro dann aber in der Lage war, zu Zellen mit endothelialen Eigenschaften auszudifferenzieren (Asahara et al. Science 1997). Diese Ergebnisse führten zu der Theorie, dass auch im Blut des erwachsenen Menschen (adulte) endotheliale Vorläuferzellen zirkulieren, die in der Lage sind, zu Orten der Gefäßneubildung zu migrieren und dort auszudifferenzieren, was dem Paradigma der Vaskulogenese entspräche.

Diese Vermutung wurde zunächst in diversen Tiermodellen untersucht, die zeigen konnten, dass es durch künstlich ausgelöste Extremitätenischämien am lebenden Tier zur Mobilisation endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark kommt, und dass diese zirkulierenden Stammzellen zu Orten der Gefäßneubildung wandern und sich dort ansiedeln und proliferieren (Takahashi et al., Nat Med, 1999, Asahara et al, Circ Res., 1999).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Injektion von menschlichen CD34-positiven Zellen bei Ratten mit einem künstlich verursachten Herzinfarkt durch Gefäßneubildung zu einer geringeren Narbenbildung und Verbesserung der linksventrikulären Funktion im Vergleich zu unbehandelten Ratten führt (Kocher et al., Nat Med, 2001).

Wichtig zu erwähnen ist auch, dass es sich bei den durch Vorläuferzellen entstandenen Gefäßen offenbar um funktionell intakte Gefäße handelte, die eine effektive Sauerstoffversorgung sicherten und nicht etwa um ein chaotisches Gefäßwachstum wie es z. Bsp. in malignen Tumoren zu beobachten ist.

Da im Tiermodell die Gewebischämie einen wirksamen Stimulus für die Freisetzung endothelialer Vorläuferzellen darstellte, war es natürlich von Interesse, die Mobilisation endothelialer Vorläuferzellen nach ischämischen Ereignissen am Menschen zu untersuchen. Eine erste Studie hierzu beschrieb, dass im Blut von Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt ein Anstieg der Anzahl CD34-positiver Zellen zu beobachten ist, mit einem Maximum am siebten Tag nach Infarkt (Shintani et al., Circulation, 2001). Auch nach einem akuten Gefäßtrauma wie bei Verbrennungsoptionen oder koronarer Bypassoperation kommt es zu einem Anstieg der endothelialen Vorläuferzellen im zirkulierenden Blut (Gill et al., Circ Res 2001). Es scheint also auch beim Menschen systemische Reaktionen auf Situationen der Gewebsschädigung zu geben, die zu einer Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen in den zirkulierenden Blutpool führen und die lokalen Reparaturmechanismen zur Gefäßneubildung ergänzen.

Im Kapitel 1.6 dieser Arbeit soll im Detail auf den aktuellen Kenntnisstand der Rolle von endothelialen Vorläuferzellen im Rahmen der koronaren Herzkrankheit und des akuten Myokardinfarktes eingegangen werden. Vorher erfolgt jedoch eine genauere Beschreibung von wichtigen Markermolekülen, die essentiell für die experimentelle Arbeit mit Zellen der endothelialen Reihe sind.

1.3 Charakterisierung von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen

Die Schwierigkeit bei der Untersuchung von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen besteht darin, dass es bislang keinen spezifischen Oberflächenmarker gibt, der ausschließlich auf dieser Zellart exprimiert wird. Es verhält sich vielmehr so, dass die Vorläuferzelle im Laufe ihrer Entwicklung bis zur reifen Endothelzelle verschiedene Phasen zu durchlaufen scheint, während derer

sich die Markerexpression kontinuierlich wandelt. Während sie am Anfang hauptsächlich stammzelltypische Marker exprimiert, produziert sie im Verlauf ihrer Reifung mehr und mehr endothelzellspezifische Marker und verliert die Stammzellcharakteristika (Hristov et al, Art., Thromb. and Vasc.Biol., 2003; Reyes et al, J Clin Invest, 2002). Das führt dazu, dass man bei der Auswahl der Markerkombination, die man z. Bsp. für eine Quantifizierung von endothelialen Progenitorzellen im peripheren Vollblut verwendet, sorgfältig unterscheiden muss, welche Marker lediglich auf Stammzellen vorkommen, welche daneben auch auf reifen Endothelzellen und welche ausschließlich auf reifen Endothelzellen.

Der prozentuale Anteil der zirkulierenden Vorläuferzellen an der Gruppe der zirkulierenden mononukleären Zellen ist außerdem so gering, dass eine genaue Charakterisierung zur Quantifizierung unabdingbar ist. Bei gesunden Probanden beträgt der Anteil von CD34+/CD133+/VEGFR2+ Zellen z. Bsp. nur 0,002% der Gesamtzahl zirkulierender mononukleärer Zellen (Peichev et al., Blood 2000), während der Anteil an CD 34-positiven Zellen bei 0,01% - 1,0% liegt.

Diese Daten lassen vermuten, dass man innerhalb der CD34-positiven Zellen wiederum verschiedenste Untergruppen mit verschiedenen Zelleigenschaften unterschieden werden muss.

1.3.1 Expression von CD 34

Nach der Entdeckung von Asahara et al. galt es zunächst, die Oberflächenstruktur der vermuteten endothelialen Vorläuferzelle näher zu charakterisieren, um genauere Aussagen über ihr Verhalten treffen zu können, denn CD34 als einer der klassischen Stammzellmarker wird zwar auf Stammzellen exprimiert, aber auch auf verschiedenen ausdifferenzierten Zellen, wie reifen Endothelzellen (Krause et al., Blood, 1996; Fina et al., Blood, 1990) oder embryonalen Fibroblasten (Brown et al., Int Immunol 1991).

Reife Endothelzellen können unter bestimmten pathologischen Umständen wie Sichelzellanämie (Sowemimo-Coker et al., Am J Hemat, 1989), nach perkutaner transluminaler Angioplastie (George et al., Thromb Haemost, 1992), Infektionen (Dignat-George et al, Eur J Haemat, 2000) oder im akuten Myokardinfarkt (Mutin et al., Blood, 1999) von der Gefäßwand abgelöst werden und im Blut zirkulieren. Während die Zahl zirkulierender Endothelzellen bei gesunden Probanden vernachlässigbar gering ist, kommt ihr in Situationen vermehrter

Endothelzellfreisetzung eine zu berücksichtigende Bedeutung zu. Deswegen kann es im akuten Myokardinfarkt zu Überschneidungen zwischen zwei prinzipiell unterschiedlichen Zelltypen kommen, wenn man nur das Vorhandensein von CD34 an der Oberfläche als Charakteristikum für zirkulierende Stammzellen voraussetzt.

1.3.2 Expression von CD 133

Es ist also eine differenziertere Charakterisierung mittels weiterer Oberflächenmoleküle nötig, um die Population der Vorläuferzellen genauer eingrenzen zu können.

Ein solches Oberflächenmolekül, das sogenannte CD 133 (anfangs „AC133“ genannt), wurde 1997 entdeckt (Yin et al., Blood, 1997) und einige Jahre später erfolgreich für die Isolation von endothelialen Vorläuferzellen verwendet (Peichev et al., Blood, 2000; Gehling et al., Blood, 2000). Hierbei handelt es sich um einen frühen Marker von hämatopoetischen Stammzellen aus dem adulten Knochenmark, der fetalen Leber und dem zirkulierenden Blut. Es ist ein transmembranäres Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kDa, dessen physiologische Funktion noch unbekannt ist.

Das Vorhandensein von CD 133 auf endothelialen Vorläuferzellen scheint ein Hinweis auf eine frühe zirkulierende Vorläuferzelle zu sein, die in der weiteren Entwicklung die Fähigkeit zur CD 133-Produktion verliert. Reife Endothelzellen exprimieren kein CD 133.

1.4 zirkulierende Endothelzellen

Wie weiter oben bereits erwähnt, weiß man, dass nach einem akuten Myokardinfarkt freigesetzte Endothelzellen im peripheren Blut zirkulieren, die bei ungenauer Markerauswahl dazu führen können, dass eine Unterscheidung zwischen endothelialer Vorläuferzelle und reifer Endothelzelle unmöglich ist. Deshalb wurde in dieser Arbeit neben der mRNA-Bestimmung von E-Selectin (wird von aktivierten Endothelzellen produziert) auch durchflusszytometrisch die Anzahl zirkulierender reifer Endothelzellen bestimmt. Dazu benötigt man einen Oberflächenmarker, der nur auf differenzierten Endothelzellen exprimiert wird und nicht auf Vorläuferzellen oder sonstigen im Vollblut zirkulierenden Zellen.

Ein solches Molekül ist P1H12. Mit monoklonalen Antikörpern gegen dieses Protein kann man spezifisch Endothelzellen markieren, da P1H12 auf keiner anderen im Blut

zirkulierenden Zelle vorhanden ist. Außerdem produzieren P1H12- positive Zellen auch von Willebrand-Faktor (vWF), Thrombomodulin und einige weitere Marker, die typischerweise auf reifen Endothelzellen vorkommen (Solovey et al., NEJM, 1997). P1H12 wird nicht von endothelialen Vorläuferzellen produziert.

1.5 Mechanismen der Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen und Stammzellen aus dem Knochenmark

Die genauen Mechanismen, die zu einer Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ins zirkulierende Blutvolumen führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Man kennt jedoch bereits aus Tierversuchen und Beobachtungen am Menschen mehrere Faktoren, die in verschiedenen pathologischen Situationen vermehrt produziert werden und zu einer erhöhten Anzahl zirkulierender Endothelvorläuferzellen führen.

Ein Schritt zur Mobilisierung ist die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), die zu einer Umwandlung eines membrangebundenen Kit- Liganden in einen löslichen Kit- Liganden führt, weshalb der cKit- positive Hämangioblast in die gefäßreiche Zone des Knochenmarks wandert (Heissig et al., Cell, 2002).

Als gemeinsamer Vorläufer von Endothelvorläuferzelle und hämatopoetischer Stammzelle muss dann eine Art Weichenstellung geschehen, zu welcher Zellart die weitere Entwicklung verläuft.

Eine bedeutende Rolle scheint hierbei dem vascular endothelial growth factor (VEGF) und seinen Rezeptoren, VEGFR-1 und -2, zuzukommen. Man weiß, dass die in-vivo-Applikation von VEGF bei Mäusen zu einer Mobilisation von Endothelvorläuferzellen aus dem Knochenmark und zu gesteigerter Gefäßneubildung führt (Asahara et al., EMBO J, 1999). Auch beim Menschen führt der Transfer des VEGF- Gens zu einer vermehrten Anzahl zirkulierender Endothelvorläuferzellen (Kalka et al., Circ Res, 2000). VEGF scheint aber nicht der einzige entscheidende Faktor für die weitere Entwicklung zur endothelialen Zelle zu sein, da Mäuse, denen das VEGF- Gen fehlt in gewissem Maße noch in der Lage sind, differenzierte Endothelzellen zu bilden, wenn auch die Gefäßbildung stark beeinträchtigt ist (Carmeliet et al., Nature, 1996). Fehlt ihnen jedoch der VEGFR-2, so können keine funktionellen Endothelzellen und Gefäße gebildet werden und die Mäuse sind nicht lebensfähig (Shalaby et al., Cell, 1997), was darauf hinweist, dass

auch andere Moleküle außer VEGF zur Endothelzellentwicklung beitragen, indem sie an den VEGFR-2 binden.

Hinweise für einen Einfluss auf die Stammzellmobilisierung gibt es weiterhin für granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) (Takahashi et al., Nat Med, 1999), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) (Gehling et al., Blood, 2000), Angiopoetin-1 (Hattori et al., J Exp Med, 2001) und stromal derived factor (SDF-1) (Peichev et al., Blood, 2000).

Bisher sind die genauen Mechanismen der Stammzellmobilisierung noch nicht genau bekannt, da es sich um ein sehr komplexes Zusammenspiel von vielen Faktoren handelt. Dabei übernehmen eine Reihe von verschiedensten biochemischen Stoffgruppen (Proteasen, Integrine, Zytokine, Zytokinrezeptoren) spezielle Aufgaben, die untereinander in Interaktion treten. So scheint eine Mobilisierung der an die Knochenmarksmatrix gebundenen Stammzelle unter anderem durch Spaltung bzw. Down-Regulation von Zell-Zellverbindungen und Zell-Matrixverbindungen erreicht werden (Papayannopoulou, Blood, 2004). Von extern applizierter G-CSF führt zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten und bringt diese zur Ausschüttung spezifischer und unspezifischer Proteasen aus ihren Granula (Jilma et al, Br J Haematol., 2000), was zur einer Proteolyse verschiedener Adhäsionsmoleküle im Knochenmark führt.

Serinproteasen akkumulieren im Knochenmark und können verschiedene Substrate spalten (z.Bsp. vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), c-kit, CXC chemokine receptor 4 (CXCR-4) und stromal derived factor 1 (SDF-1)), welche die Adhäsion der Stammzellen im Knochenmark gewährleisten, und somit die Stammzellmobilisierung begünstigen (Lévesque et al, Blood, 2001; Lévesque et al, J Clin Invest, 2003). Eine besonders wichtige Funktion für das Verbleiben von Stammzellen im Knochenmark und das Zurückkehren (Homing) zirkulierender Stammzellen ins Knochenmark scheinen hierbei die Interaktionen zwischen SDF-1 und seinem Rezeptor CXCR-4 zu haben, in die mehrere Faktoren eingreifen können (Lapidot, Petit, Exp Hematol, 2002).

Es ist anzunehmen, dass durch Infiltration von Entzündungszellen in ein ischämisches Gewebe die Ausschüttung verschiedener, systemisch zirkulierender Zytokine erfolgt, die die Freisetzung von hämopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark fördern können.

Da man weiß, dass es während eines akuten Myokardinfarktes zu einer systemischen Entzündungsreaktion kommt, bei der verschiedene Zytokine wie Interleukin-6 und Interleukin-8 freigesetzt werden (Neumann et al., *Circulation*, 1995; Pannitteri et al., *Am J Card*, 1997) , ist es deswegen von Interesse zu untersuchen, ob auch solche inflammatorischen Zytokine eine Mobilisierung von Stammzellen bewirken können, was ja wiederum einen positiven Aspekt einer solchen Entzündungsreaktion darstellen könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Serum- CRP- Konzentrationen positiv mit der Anzahl zirkulierender Endothelvorläuferzellen bei Patienten mit instabiler Angina pectoris korreliert sind (George et al, *European Heart J*, 2004).

Auch häufen sich die Hinweise, dass IL-8 über eine Steigerung der MMP-9 Aktivität neutrophiler Granulozyten in die Mobilisierung von Stammzellen eingreifen kann (Pelus et al, *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002).

Grundzüge der Mobilisierung sollen vereinfacht in Abbildung 1 verdeutlicht werden.

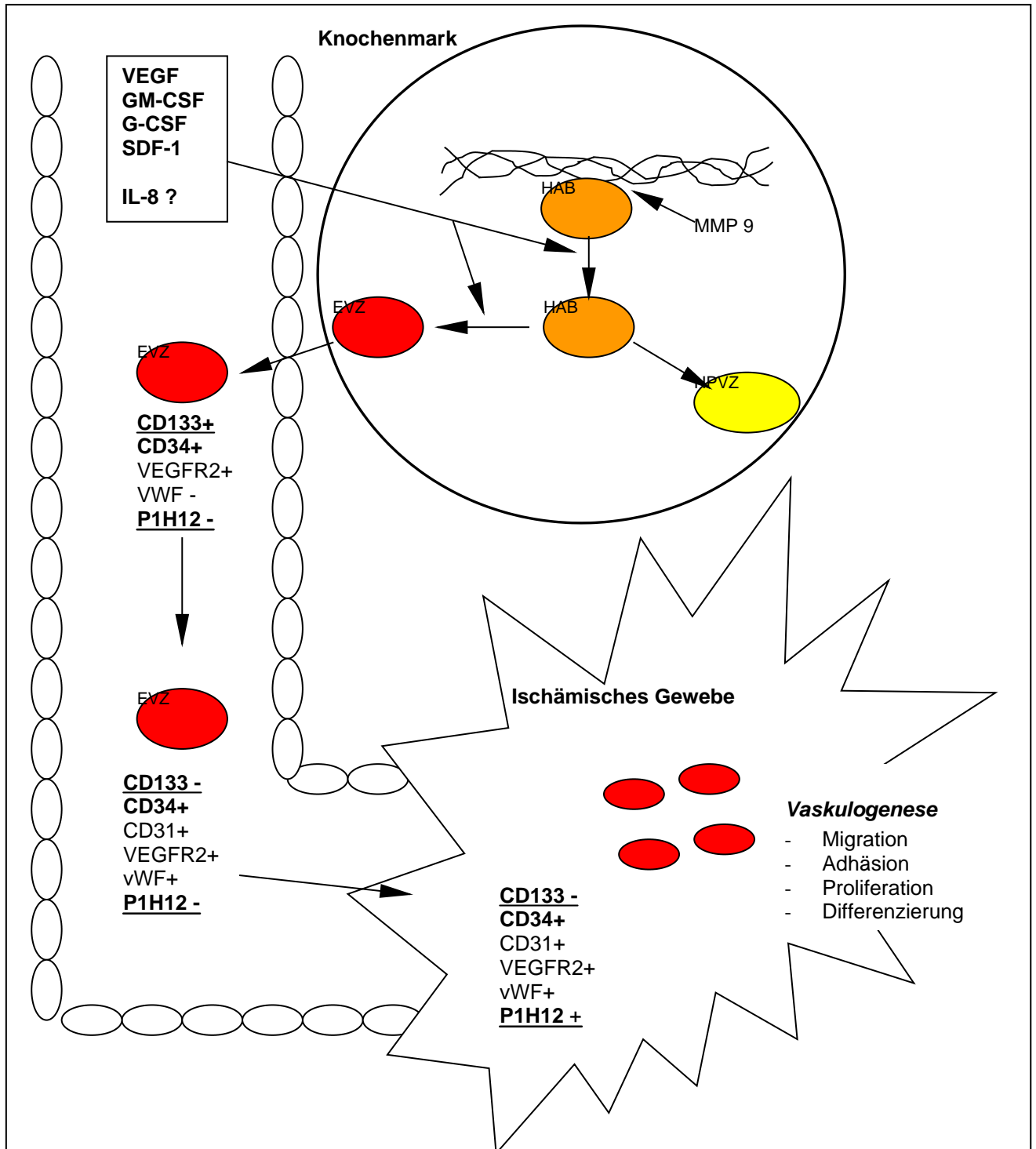


Abb.1: Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (HAB = Hämangioblast; EVZ= endotheliale Vorläuferzelle; HPVZ = hämatopoetische Vorläuferzelle). Modifiziert nach Hristov et al, J Cell Mol Med, 2004.

1.6 Zirkulierende Stammzellen, Endothelvorläuferzellen und Endothelzellen bei koronarer Herzerkrankung

Nachfolgend sollen einige bisherige Untersuchungen von zirkulierenden Stammzellen, endothelialen Vorläuferzellen und Endothelzellen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung zusammengefasst werden und die Assoziation deren Mobilisation mit der systemischen Entzündungsreaktion im akuten Myokardinfarkt beschrieben werden.

1.6.1 Ischämie-induzierte Zellmobilisation

Eine akute Gewebischämie war, wie weiter oben erwähnt, in diversen Tiermodellen ein wirksamer Stimulus für die Mobilisation von Stamm- und Vorläuferzellen.

Erste Untersuchungen bei 16 Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigten einen Konzentrationsanstieg zirkulierender CD34+ Zellen nach Infarkt mit einem Anstiegsmaximum am siebten Tag nach Infarkt (Shintani et al., Circulation, 2001). In der Zellkultur exprimierten diese Zellen endotheliale Marker (CD31, vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin), kinase insert domain receptor (KDR)) und besaßen proliferatives Potential. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=8, Patienten mit atypischen Brustschmerzen und koronarangiographischem Ischämieausschluss) war die Konzentration der CD34+ Zellen am ersten Tag nicht erhöht (ca. 0,1% der Leukozyten in beiden Gruppen). Eine weitere Differenzierung der CD34+ Zellen wurde in dieser Arbeit nicht gemacht. Außerdem konnte ein signifikanter Anstieg der Serumkonzentration von VEGF festgestellt werden, dessen Maximum am siebten Tag nach Infarkt lag; andere Zytokinkonzentrationen wie von G-CSF, GM-CSF oder IL-8 stiegen jedoch nicht an. Diese Beobachtungen zeigten, dass sich die Mobilisation von CD34+ Zellen im akuten Myokardinfarkt mit einer zeitlichen Latenz von einigen Tagen vollzieht.

In einer neueren Studie wurde hingegen beschrieben, dass der Anstieg von zirkulierenden CD34+ Zellen schon in den ersten Stunden nach einem Herzinfarkt am höchsten ist, um dann im Verlauf wieder langsam abzufallen (Massa et al., Blood, 2004). Die Proben am Aufnahmetag zeigten eine 5,8-fach höhere Konzentration der CD34+ Zellen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Patienten mit KHK und stabiler Angina pectoris). Dabei betrug der durchflusszytometrisch gemessene Anteil der CD34+ Zellen an den kernhaltigen Blutzellen ungefähr 1,9% in der Infarktgruppe. Bei weiterer Differenzierung mittels Mehrfachfärbung (CD34, CD133, VEGFR2) betrug

der Anteil der CD34+/CD133+/VEGFR2+ Zellen, die die mutmaßlichen endothelialen Vorläuferzellen repräsentieren, nur durchschnittlich 6,7% der Gesamtzahl der CD34+ Zellen. In der Kontrollgruppe war er jedoch mit 0,9% noch niedriger. Also zeigte sich einerseits zwar zum Aufnahmezeitpunkt eine signifikante Erhöhung der endothelialen Vorläuferzellen in der Infarktgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Andererseits scheinen aber immerhin ca. 93% der Zellen andere CD34+ Zellgruppen zu beinhalten, die im akuten Myokardinfarkt ins periphere Blut mobilisiert werden. Daten zur prozentualen Verteilung der CD34+ Zellen sieben Tage nach Infarkt sind dieser Arbeit nicht zu entnehmen. Die Konzentrationen von SDF-1 waren in Infarktgruppe und Kontrollgruppe vergleichbar, während am Aufnahmetag eine signifikant erhöhte VEGF-Konzentration in der Infarktgruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gemessen wurde, die im weiteren Verlauf dann wieder abfiel. Allerdings waren die Konzentrationsunterschiede in einer Kontrollgruppe mit stabiler Angina pectoris am Aufnahmetag nicht signifikant. Es ist also nicht klar, ob die VEGF-Erhöhung auf die akute Ischämie oder auf eine Induktion durch arteriosklerotische Veränderungen zurückzuführen ist.

Auch eine andere Studie zeigte einen Anstiegsmaximum von CD34+ Zellen 24 Stunden nach akutem Myokardinfarkt und eine signifikant höhere Konzentration dieser Zellen im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris und zu Probanden ohne KHK (Wojakowski et al., *Circulation*, 2004). Auch CD117+ Zellen waren zu diesem Zeitpunkt deutlich erhöht und fielen sieben Tage nach Infarkt wieder deutlich ab. CD117 ist ein Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, der von einem Teil der CD34+ Zellen exprimiert wird. Allerdings wurden keine Angaben zu dem Anteil doppelt positiver Zellen (CD34+CD117+) gemacht. Mit CD133 oder VEGFR2 wurde in dieser Studie nicht gearbeitet, da der Fokus auf Vorläuferzellen von Herzmuskelzellen gelegt werden sollte. Interessanterweise wurde in dieser Studie ein Konzentrationsanstieg von VEGF und SDF-1 mit Anstiegsmaximum am siebten Tag nach Infarkt beobachtet. Hingegen waren die Konzentrationen von G-CSF und IL-6 nach 24 Stunden in der Infarktgruppe am höchsten und deutlich höher als in den Kontrollgruppen (stabile Angina pectoris und Patienten ohne KHK).

In einer ähnlich angelegten Studie wurde eine signifikante Erhöhung der Zahl zirkulierender CD34+ Zellen nach akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit gesunden Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren

gefunden (Paczkowska et al, Eur J Haematol). Diese Erhöhung war bereits nach 24 Stunden zu beobachten und blieb auch nach zwei und nach sechs Tagen nachweisbar. Es wurde keine weitere durchflusszytometrische Differenzierung der CD34+ Zellen gemacht, jedoch untersuchte man darüber hinaus die Anzahl der zirkulierenden colony forming units (CFU-GM) als Nachweis von myeloischen Vorläuferzellen. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der Infarktgruppe mit einem Anstiegsmaximum am sechsten Tag nach Infarkt.

Es gibt also widersprüchliche Daten bezüglich der Freisetzung von Stamm- und Vorläuferzellen nach akutem Myokardinfarkt, die sich vor allem in der Latenz und dem Ausmaß der Mobilisierung unterscheiden. Auch die Dynamik der gemessenen Zytokinkonzentrationen zeigten entweder einen eher frühen (0-24 Stunden) oder einen eher späten Gipfel (sechs bis sieben Tage nach Infarkt).

Erschwert wird ein objektiver Vergleich der bisherigen Studien durch die unterschiedlichen Studienprotokolle und die unterschiedliche Ergebnisdarstellung, wobei vor allem verschiedene Zielantigene benutzt wurden, die Zahl der gemessenen Zellen variierten, die Fallzahlen sehr unterschiedlich hoch ausfielen und zwischen relativer Anzahl und absoluter Anzahl der gemessenen Zellen unterschieden werden muss. Jedoch fallen auch bei vergleichbaren Variablen teils große Unterschiede zwischen einzelnen Studien auf, was in Tabelle 1 anhand der Zahl zirkulierender CD34+ Zellen exemplarisch gezeigt werden soll.

So werden beispielsweise in vergleichbaren Studienpopulationen (Patienten mit akutem Myokardinfarkt) völlig voneinander abweichende Dimensionen in den Ausgangswerten der CD34+ Zellen zum ersten Untersuchungszeitpunkt beschrieben: ca. 4 CD34+ Zellen / μ l bei Paczkowska et al. gegenüber 752 CD34+ Zellen / μ l bei Wojakowski et al.

Deshalb sollten standardisierte Protokolle zur durchflusszytometrischen Messung von Zellgruppen Anwendung finden, um Studienergebnisse besser miteinander vergleichen zu können und die Zahl der systematischen Fehler auf ein Minimum zu reduzieren. Für die Messung von CD34+ Zellen gibt es bereits Leitlinien der International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE), an die das Messprotokoll dieser Arbeit bei der Bestimmung der CD34+ Zellen Anlehnung fand (Keeney et al., Cytometry 1998).

	<i>Shintani et al., Circulation, 2001</i>	<i>Wojakowski et al., Circulation, 2004</i>	<i>Massa et al., Blood, 2005</i>	<i>Paczkowska et al., Eur J Haematol, 2005</i>	<i>Werner et al., NEJM, 2005</i>
Patientenkollektiv	- Patienten mit AMI (n=16); - Patienten mit atypischen Brustschmerz ohne KHK (n=8)	- Patienten mit AMI (n=56); - Patienten mit SAP (n=39); - Patienten ohne KHK (n=20)	- Patienten mit AMI (n=26); - Patienten mit SAP (n=10); - Patienten ohne KHK (n=17)	- Patienten mit AMI (n=48); - Patienten mit Schlaganfall (n=28); - gesunde Probanden (n=10)	- Patienten mit KHK (n=519)
Färbungen	CD34	CD34, CD117, CXCR4	CD34, CD38, CD117, CD133, VEGFR-2, CD45	CD34	CD34, KDR, CD133
Durchflusszytometrische Ergebnisse:	Baseline: <math> < 100 / 10^6 </math> Leukozyten	Baseline: 752 / μ l	Baseline: ca. 200 / μ l	Nach 24 Std.: 4,14 / μ l (Median)	Baseline: 12-1039 (CD34+/KDR+) /10.000
CD34+ Zellen in AMI-Gruppe	Nach 7 Tagen: >200 / 10^6 Leukozyten	Nach 7 Tagen: 882 / μ l	Nach 7 Tagen: ca. 50 / μ l	nach 6 Tagen: 6,57 / μ l (Median)	gezählte Lymphozyten (mean: 86,3+/-71,9)
Anzahl gezählter Zellen pro Probe	Keine Angabe	Keine Angabe	Mindestens 200.000 CD45+ Zellen	Keine Angabe	10.000 Zellen im Lymphozytengate

Tab.1: Vergleich einiger bisher veröffentlichten Studien zur Stammzellmobilisierung nach akutem Myokardinfarkt (AMI). SAP: stabile Angina pectoris; KHK: Koronare Herzkrankheit.

1.6.2 Einflussfaktoren auf die Zahl zirkulierender Vorläuferzellen

Mittlerweile kennt man verschiedene Faktoren, die offensichtlich einen Einfluss auf die Konzentration endothelialer Vorläuferzellen haben. Dazu gehören Situationen, die einen Stimulus für die Freisetzung der Vorläuferzellen bieten, wie z. Bsp. Gefäßtraumen durch Operationen und Verbrennungen (Gill et al., *Circ Res*, 2001) oder Tumorleiden, da bekanntermaßen auch in Tumorgewebe Vaskulogenese und Angiogenese stattfinden (Davidoff et al., *Clin Canc Res*, 2001; Lyden et al., *Nat Med*, 2001).

Andererseits scheint die Anzahl und die Migrationsfähigkeit endothelialer Vorläuferzellen bei Menschen mit kardiovaskulären Risikofaktoren reduziert zu sein (Vasa et al., *Circ Res*, 2001; Hill et al., *NEJM*, 2003). Insbesondere bei Patienten mit Diabetes mellitus vom Typ II scheint nicht nur die Anzahl vermindert zu sein, sondern auch die Funktion der Vorläuferzellen gestört zu sein (Tepper et al., *Circulation*, 2002). Isolierte Endothelvorläuferzellen zeigten *in vitro* ein niedrigeres proliferatives Potential und eine wenig ausgeprägte Fähigkeit, Endothelschläuche zu bilden.

Man konnte auch zeigen, dass das biologische Alter eine Rolle spielt, da die VEGF-induzierte Fähigkeit zur Stammzellmobilisation beim alten Menschen geringer ist als bei jüngeren Patienten (Kalka et al., *Circulation*, 1999).

Eine Arbeit konnte eine negative Korrelation zwischen klinischem Grad einer Herzinsuffizienz und der Anzahl zirkulierender CD34+ Zellen und endothelialen Vorläuferzellen (CD34+CD133+VEGFR2+) zeigen (Valgimigli et al., *Circulation* 2004). Bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz vom Grad NYHA I-II waren signifikant erhöhte Zahlen von Endothelvorläuferzellen im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten aufgefallen. Interessanterweise war deren Zahl bei Patienten mit Grad NYHA IV signifikant niedriger als bei den gesunden Patienten.

Diese Daten weisen darauf hin, dass endothelialen Vorläuferzellen eine pathophysiologische Bedeutung im Rahmen der koronaren Herzerkrankung zukommt. Unterstützt werden diese Hinweise durch Ergebnisse einer Studie an 20 Patienten mit Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI), bei denen die Korrelation zwischen der Anzahl zirkulierender Endothelvorläuferzellen und dem Vorhandensein von koronaren Kollateralgefäßen untersucht wurde (Lev et al., *J Vasc Res* 2005). In der Gruppe der Patienten mit ausgeprägten Kollateralen war die relative Anzahl der Endothelvorläuferzellen unmittelbar nach PTCA signifikant höher als in der

Patientengruppe ohne Kollateralen. Allerdings muss einschränkend hinzugefügt werden, dass die PTCA bei der Gruppe mit den Kollateralen durchschnittlich einen Tag später (nämlich nach ca. 2,7 Tagen) erfolgte als in der Gruppe ohne ausgeprägte Kollateralen. Wenn man bedenkt, dass eine ischämie-induzierte Mobilisation von Endothelvorläuferzellen eventuell erst mit einer zeitlichen Latenz von einigen Tagen einsetzt, so könnte alleine diese Tatsache schon die höhere Konzentration bei der einen Gruppe erklären.

Allerdings konnte eine 2005 veröffentlichte prospektive Studie (über 12 Monate) an 519 Patienten mit KHK einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Zahl zirkulierender Endothelvorläuferzellen und kardiovaskulärer Ereignisse bzw. Mortalität herstellen (Werner et al, NEJM 2005). Hier war eine niedrige Konzentration von Endothelvorläuferzellen ein prognostisch ungünstiger Faktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (Herzinfarkt, Hospitalisierung, neuerliche PTCA oder Tod durch kardiovaskuläre Komplikationen) innerhalb der ersten 12 Monate nach Studienbeginn.

Interessanterweise fördern auch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren die Freisetzung von Endothelvorläuferzellen (Vasa et al., Circulation, 2001). Einen beteiligten Mechanismus konnte man in vitro nachvollziehen, wo eine Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-pathways in Endothelvorläuferzellen gezeigt werden konnte (Dimmeler et al., J Clin Invest, 2001).

Einflussfaktor	Änderung in Zahl / Funktion von EPC oder CD34+ Zellen	Untersucher
Physiologisch:		
Geschlecht	↑CD34+/VEGFR2+ Zellen	Strehlow et al., <i>Circulation</i> 2003
Körperliches Training	↑EPC-Anzahl	Adams et al. <i>ATVB</i> 2004
Pathologisch:		
KHK/ Anzahl von Risikofaktoren	↓EPC-Anzahl und Migration ↓CD34+/KDR+ Zellen	Vasa et al. <i>Circ Res</i> 2001
Nikotin	↓EPC oder CD34+/KDR+ Zellen	
Positive Familienanamnese	↓EPC oder CD34+/KDR+ Zellen	
Arterielle Hypertonie	↓EPC Migration	
Kumulatives kardiovaskuläres Risikoprofil	↓EPC CFUs	Hill et al. <i>NEJM</i> 2003
Myokardinfarkt	↑CD34+ Zellen ↑CD34+/AC133+/VEGFR2+ Zellen	Shintani et al. <i>Circulation</i> 2001
Gefäßverletzung	↑AC133+/VEGFR2+ Zellen	Gill et al. <i>Circ Res</i> 2001
Herzinsuffizienz (NYHA I-II)	↑CD34+ Zellen ↑CD34+/AC133+/VEGFR2+ Zellen ↑EPC CFUs	Valgimigli et al. <i>Circulation</i> 2004
Herzinsuffizienz (NYHA III-IV)	↓CD34+ Zellen ↓CD34+/AC133+/VEGFR2+ Zellen ↓EPC CFUs	
In-Stent-Restenose	↓EPC CFUs ↓EPC Adhäsion	George et al. <i>ATVB</i> 2003
Medikamente und Zytokine :		
HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren	↑EPC-Anzahl	Dimmeler et al. <i>J Clin Invest</i> 2001
G-CSF	↑CD133+/VEGFR2+ Zellen	Peichev et al. <i>Blood</i> 2000
Erythropoietin	↑CD34+/CD45+ Zellen	Bahlmann et al. <i>Blood</i> 2004

Tabelle 2: physiologische, pathologische und medikamentöse Einflussfaktoren auf Zahl und Funktion zirkulierender Endothelvorläuferzellen (aus: Hristov, Weber; J. Cell. Mol. Med. 2004) EPC: Endothelprogenitorzelle; CFU: colony forming unit; VEGFR2/KDR: vascular endothelial growth factor receptor 2.

Für eine effektive Bewertung von Untersuchungen auf dem Gebiet der Stammzellmobilisation im akuten Myokardinfarkt ist es also wichtig,

- (a) die zu untersuchende Zellart mit Hilfe möglichst spezifischer Oberflächenmarker gegen interferierende andere Zellarten abzugrenzen und
- (b) bekannte pathophysiologische Einflußgrößen auf deren Mobilisation bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen (Tab. 2).

2 Zielsetzung der Arbeit

Mit dieser Arbeit sollte die Assoziation von IL-8 mit der Stammzellmobilisation im akuten Myokardinfarkt untersucht werden. Folgende Fragen waren hierfür relevant.

1. Mit welcher zeitlichen Latenz und in welchem Ausmaß findet im akuten Myokardinfarkt eine Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark statt?

Wie weiter oben bereits erwähnt, gibt es widersprüchliche Daten über die zeitliche Dauer bis zum Maximum der Anzahl im Blut nachweisbarer Stammzellen nach einem Myokardinfarkt. Bei der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe sequentieller Blutabnahmen zu festgelegten Zeitpunkten bis zu sieben Tagen nach dem Infarkt ereignis die absolute und die relative Anzahl zirkulierender Stammzellen und somit deren Mobilisierungskinetik bestimmt werden.

2. Werden reife Endothelzellen im akuten Myokardinfarkt ins Blut freigesetzt?

In den angeführten Studien war meist CD34 einer der Hauptmarker für die Charakterisierung zirkulierender Stammzellen. Da CD34 jedoch auch auf reifen Endothelzellen vorkommt und somit zu einer Art Schnittmengenbildung zwischen differenzierten Zellen und weniger differenzierten Vorläuferzellen führen kann, sollte auch die Anzahl reifer zirkulierender Endothelzellen zu den festgelegten Blutentnahmezeitpunkten bestimmt werden, um diese Zellart von den zirkulierenden Stammzellen abgrenzen zu können.

3. Welche Zytokine sind an der systemischen Entzündungsreaktion nach akutem Myokardinfarkt beteiligt?

Mit Hilfe von Immunoassays wurde die Konzentration der Zytokine vascular endothelial growth factor (VEGF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), stromal cell derived factor-1 (SDF-1) und Interleukin 8 (IL-8) im zeitlichen Verlauf untersucht, um eine eventuell vorhandene Freisetzungskinetik beschreiben zu können.

4. Gibt es eine Assoziation zwischen der Serumkonzentration der gemessenen Zytokine (insbesondere IL-8) und der Anzahl zirkulierender Stammzellen?

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Es wurden insgesamt 42 Patienten in die Studie eingeschlossen; davon bildeten 22 Patienten mit akutem Myokardinfarkt die Studiengruppe und 20 Patienten mit stabiler Angina pectoris bei koronarer Herzerkrankung die Kontrollgruppe. Bei beiden Patientenkollektiven wurden durch sequentielle Blutabnahmen Vollblutproben für die weitere Verarbeitung gewonnen. Die Untersuchungen wurden für beide Gruppen mit den gleichen Arbeitsprotokollen durchgeführt, wobei aus logistischen Gründen die 4. Blutabnahme bei der Kontrollgruppe entfallen musste, da die Patienten zu diesem Zeitpunkt bereits wieder aus dem Krankenhaus entlassen waren. Die Blutabnahmen erfolgten unmittelbar vor therapeutischer Intervention sowie 24 Stunden, 48 Stunden und am 7. Tag (nur bei Infarktgruppe) nach Intervention. Alle Patienten wurden aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis in die Untersuchung.

3.1.1 Infarktgruppe

Eingeschlossen in die Studie wurden Patienten

- mit prolongierten ($t > 20$ min.) Nitrat – resistenten Thoraxschmerzen mit Beginn innerhalb der letzten 24 Stunden vor Aufnahme und

- persistierenden signifikanten ST – Hebungen (> 0,1 mV in zwei oder mehr Extremitätenableitungen oder > 0,2 mV in zwei oder mehr Brustwandableitungen) und
- signifikant erhöhter Serum- Creatinkinase.

Ausschlusskriterien waren chronisch – entzündliche Erkrankungen, hämatologische Erkrankungen, Infektionen, Tumorleiden, Therapie mit Zytostatika und vorausgegangene Operationen, da all diese Zustände einen Einfluss auf die Zahl zirkulierender Stammzellen haben können.

Bei allen Patienten wurde sofort eine therapeutische perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit Stentimplantation durchgeführt.

Medikation: Präinterventionell erhielten alle Patienten

- 500 mg Aspirin intravenös
- 5000 IE Heparin intravenös
- 600 mg Clopidogrel oral

zusätzlich zu ihrer üblichen Medikation.

3.1.2 Kontrollgruppe

In die Kontrollgruppe eingeschlossen wurden Patienten

- mit Episoden von belastungsabhängiger stabiler Angina pectoris und
- koronarangiografischen Nachweis einer koronaren Herzkrankheit, die
- eine therapeutische Intervention (Ballondilatation/ Stenteinlage) notwendig machte.

Es galten die gleichen Ausschlusskriterien wie für die Infarktgruppe.

3.1.3 Abnahmeprotokoll

Bei der Infarktgruppe fanden an vier verschiedenen Zeitpunkten und bei der Kontrollgruppe an drei verschiedenen Zeitpunkten peripher – venöse Blutabnahmen statt. Das Probenmaterial für die FACS – Analyse 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.

Das Serummaterial für die Bestimmung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen mittels ELISA wurde abzentrifugiert, bei – 20° C tiefgefroren und im Intervall untersucht.

Die Blutabnahmezeitpunkte waren festgelegt auf

T 1: bei Aufnahme vor Intervention

T 2: 24 Stunden nach Intervention

T 3: 48 Stunden nach Intervention

T 7: am siebten Tag nach Intervention

Bei der Kontrollgruppe entfiel Abnahmezeitpunkt T7 aus oben erwähnten Gründen. Das Abnahmeprotokoll ist in Abbildung 2 noch einmal veranschaulicht dargestellt.

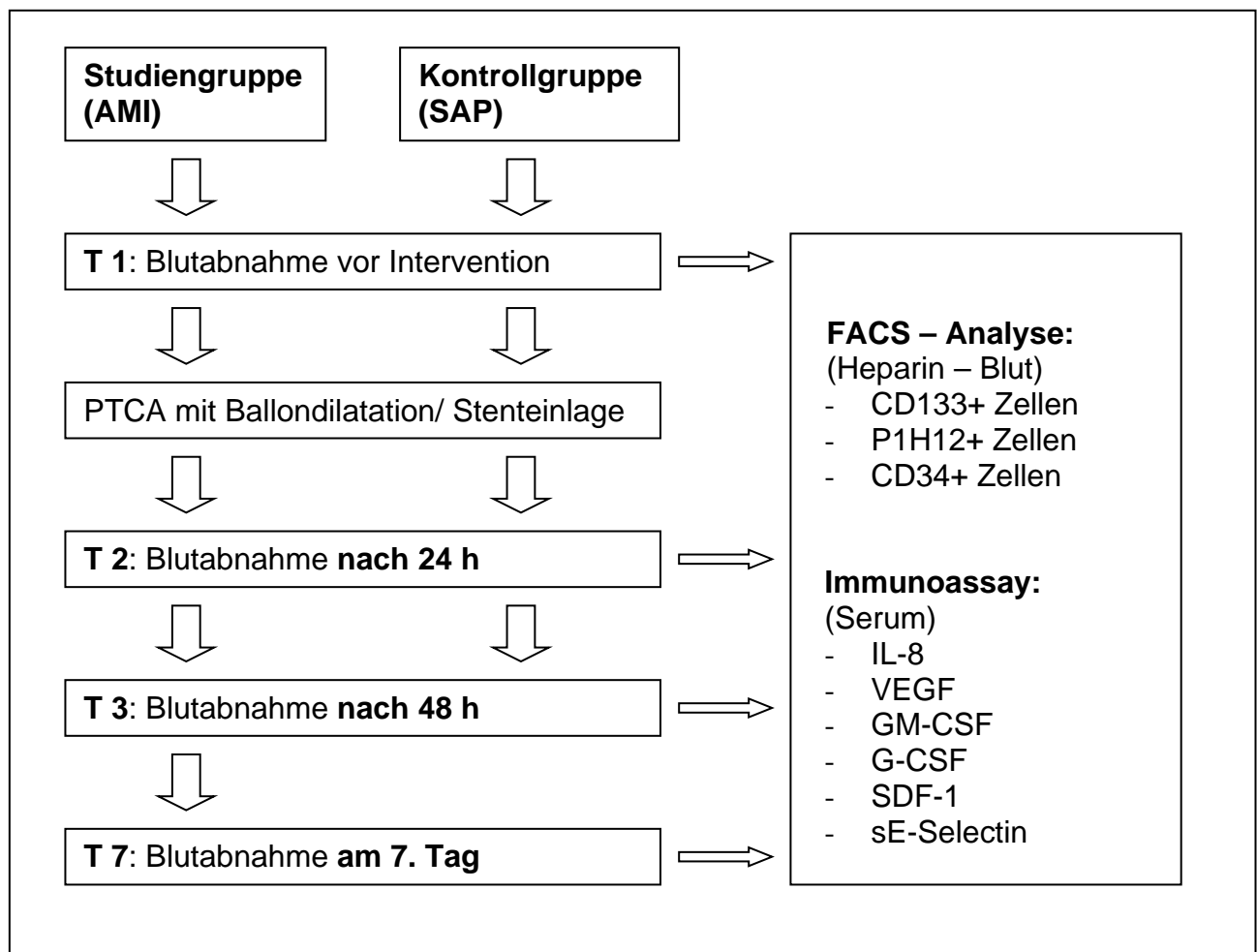


Abb. 2: Abnahmeprotokoll der Studie

3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie nutzt die Verschiedenartigkeit physikalischer und biochemischer Zellparameter zur Charakterisierung und Quantifizierung von Zellen. Dabei spielen im Wesentlichen drei Faktoren eine entscheidende Rolle: die Grösse der Zelle, ihre Granularität, und schließlich die Expression von Zielmolekülen, die mit Hilfe monoklonaler Antikörper markiert werden können. Grundlegendes Prinzip ist dabei die Detektion von Licht, das einerseits durch die Grösse und die Granularität der Zelle gestreut wird und andererseits von fluoreszierenden Antikörpern emittiert wird. Die Zellen passieren in der Probenflüssigkeit schwimmend einen Laserstrahl, dessen Licht durch die Zelleigenschaften verändert wird und dadurch in verschiedene dahinter befindliche Messkanäle gelenkt und gemessen wird.

3.2.1 Aufbau eines Zytometers

Ein Durchflusszytometer besteht, vereinfacht dargestellt, aus drei Komponenten: dem Flüssigkeitssystem, der Optik und der Elektronik. Das Flüssigkeitssystem dient der Zufuhr und Fokussierung der Zellen im Messpunkt. Dieser befindet sich im Inneren der Messkuvette, durch die sich die Zellen in einer laminaren Stömung bewegen. 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 unterteilt in 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, das die spezifischen Wellenlängen der emittierten Lichtsignale zu den entsprechenden optischen Detektoren leitet.

Das elektronische System sorgt dafür, dass die optischen Signale zunächst in sogenannte relative Spannungspulse umgewandelt werden, die anfangs analog vorliegen. Diese werden wiederum von einem Datenprozessor in digitale Signale umgewandelt und auf dem Rechner grafisch dargestellt.

3.2.2 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. Außerdem sind die interessierenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern beladen, welche selbst Licht emittieren. 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, so dass man dadurch in der Lage ist, auf einer Zelle mehrere verschiedene Antigene zu markieren, 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.

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

Tab. 3: 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 möglich entsprechend den Licht brechenden und Licht emittierenden Eigenschaften der Zellen. Durch Einlegen so genannter Analysefenster und die freie Wählbarkeit der Achsen kann die interessierende Zellpopulation fokussiert werden

und in Bezug auf die Gesamtprobe oder in Bezug auf andere Populationen rechnerisch analysiert werden.

3.2.3 Probenaufbereitung

Für die Oberflächenfärbungen wurde heparinisertes Vollblut verwendet, von dem zunächst je 100 µl in drei auf Eis befindliche FACS- Messröhrchen pipettiert wurden. Danach wurde zu jedem der drei Proben eine bestimmte Menge verschiedener Antikörper zugegeben. In den Tabellen 3 – 5 sind die jeweiligen Färbungen angeführt.

Antikörper	Fluoreszenz	Hersteller	Menge
Anti- AC133/2	Phycoerythrin (PE)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany	10 µl
Anti- CD 34	Fluoreszeinisothiozyanid (FITC)	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA	10 µl
Anti- CD 45	Allophycocyanin (APC)	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA	5 µl

Tab.4: Antikörper zur Stammzellfärbung

Antikörper	Fluoreszenz	Hersteller	Menge
Anti- P1H12	PE	Chemicon International, Temecula, USA	1 µl
Anti- CD 34	FITC	s.o.	10 µl
Anti- CD 45	APC	s.o.	5 µl

Tab.5: Antikörper zur Endothelzellfärbung

Antikörper	Fluoreszenz	Hersteller	Menge
Anti- IgG	PE	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA	1,5 µl
Anti- IgG	FITC	Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA	2 µl
Anti- CD 45	APC	s.o.	5 µl

Tab.6: Antikörper zur Isotypmessung

Die mit den Antikörpern versehenen Proben wurden nun 20 Minuten lang auf Eis und nach Zugabe von 1 ml einer Erythrozytenlyselösung (FACS- Lysing solution, BD Biosciences, San Jose, USA, im Verhältnis 1:9 in bidestilliertem Wasser verdünnt) für weitere zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte eine Waschprozedur, bei der zu jeder Probe 2 ml einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung pipettiert wurde und das Gemisch für 5 Minuten bei 4° C und 1700 U/min. zentrifugiert wurde. Daraufhin folgte die Resuspension der Zellen in 500 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung und die Messung der Probe im Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, USA).

3.2.4 Probenauswertung

In einem ersten Auswerteschritt wurden 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 Vorwärtsstreulicht darstellt und auf der y-Achse die CD45 APC - Fluoreszenz der Zellen anzeigt. Da CD45 ein spezifisches Oberflächenantigen mononukleärer Blutzellen ist (Sasaki et al., Int J Biochem Cell Biol, 2001), konnte durch Einlegen eines die CD45+ Zellgruppe eingrenzenden Analysefensters G1 eine erste Kategorisierung erzielt werden.

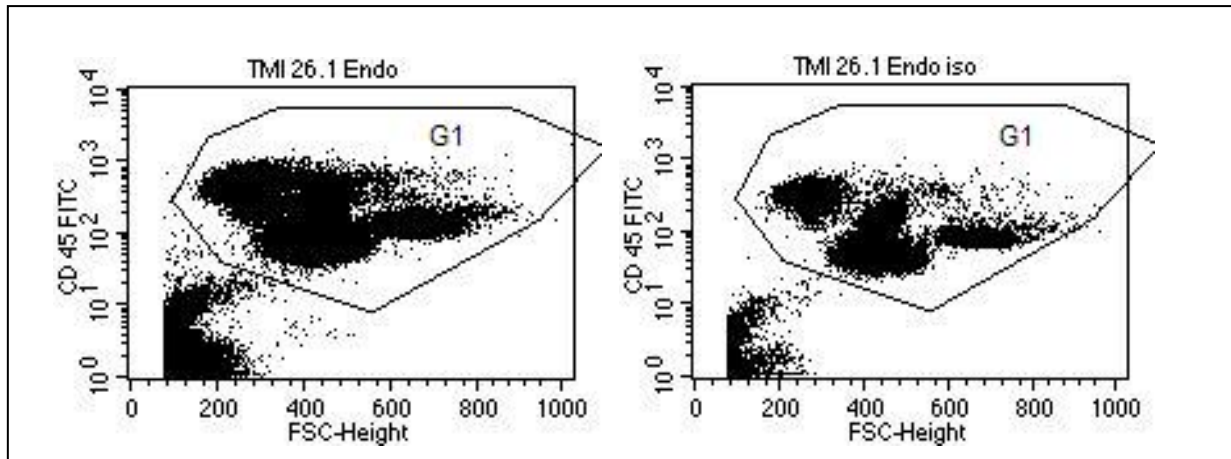


Abb.3: Punktdiagramm einer durchflusszytometrischen Messung: x-Achse: Vorwärtsstreulicht; y-Achse: CD45-Fluoreszenz; Gate 1 (G1): CD45+ Zellen; linke Seite: Probe zur Endothelzellmessung und CD34-Messung; rechte Seite: Isotypmessung.

Im nächsten Punktdiagramm wurden 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. Hier fielen die interessierenden Populationen als nur schwach CD45 exprimierend auf, weshalb auf die so genannten CD45dim Zellen gegaht wurde. Somit konnte die relative Anzahl von CD34+ Zellen unter den CD45dim Zellen ermittelt werden.

Analog dazu erfolgte die Bestimmung der relativen Anzahl von CD133+ Zellen sowie von P1H12+ Zellen.

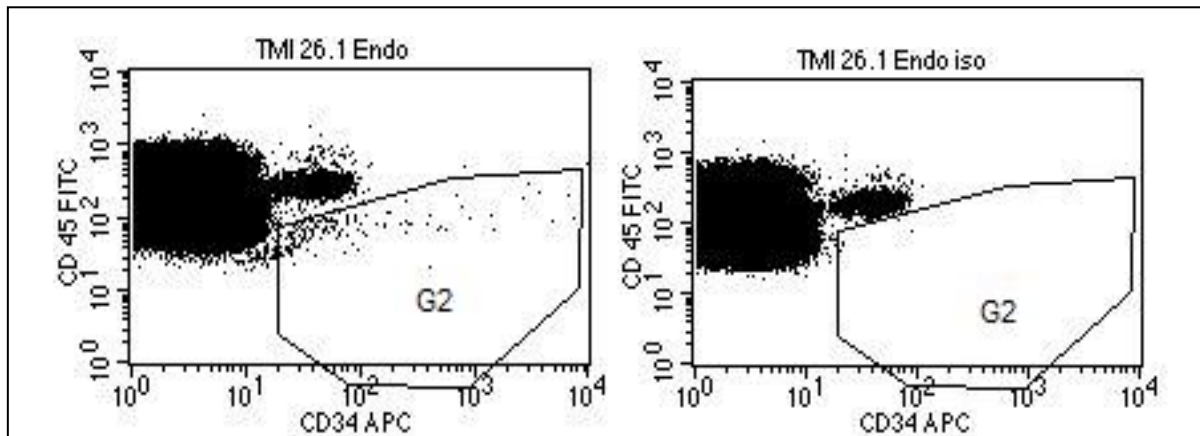


Abb. 4: Punktdiagramm zur Bestimmung von CD34+ Zellen. x-Achse: CD34-Fluoreszenz; y-Achse: CD45+ Zellen aus Gate1 (G1); Gate 2 (G2): CD34+CD45dim-Zellen. linke Seite: spezifische Messung; rechte Seite: Isotypmessung.

3.3 Immunoassays

Mit der so genannten Sandwich- ELISA- Technik wurden die Serumkonzentrationen von IL-8, löslichem E-Selectin (sE-Selectin), G-CSF, GM-CSF, SDF-1 und VEGF zu den verschiedenen Abnahmezeitpunkten mit Hilfe von Immunoassays (HS-G-CSF, GM-CSF, VEGF und IL-8 Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) bestimmt. Die Detektionsgrenze lag für sE-Selectin bei 0,1 ng/ml, für G-CSF bei 0,4pg/ml, für GM-CSF bei 3 pg/ml, für SDF bei 1 pg/ml, für VEGF bei 5 pg/ml und für IL-8 bei 31,2 pg/ml. Hier sei kurz exemplarisch die Untersuchungsmethode des Sandwich-ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) am Beispiel von IL-8 erläutert werden:

Eine mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen IL-8 beschichtete Mikrotiterplatte wird mit dem Patientenserum inkubiert. Auf diesen Schritt folgt die Inkubation der Probe mit einem zweiten gegen IL-8 gerichteten polyklonalen Antikörper, an den eine Peroxidase gebunden ist. Diese enzymgebundenen Antikörper binden an ein anderes Epitop des IL-8- Moleküls, so dass das IL-8 wie in einem Sandwich von den Antikörpern umgeben wird. Nach mehreren Waschschritten, die der Entfernung überschüssiger Serumbestandteile sowie überschüssiger Antikörper dienen, wird die Probe unter Lichtausschluss mit einer Substratlösung inkubiert. Die antikörpergebundenen Enzyme wandeln nun das farblose Substrat in ein farbiges Produkt um, das mit Hilfe eines

Mehrkanalspektrometers mit Glasfaseroptik gemessen wird. Somit ist der Umsatz von Substrat zu Produkt unter standardisierten Bedingungen direkt proportional zur Anzahl der gebundenen IL-8- Moleküle.

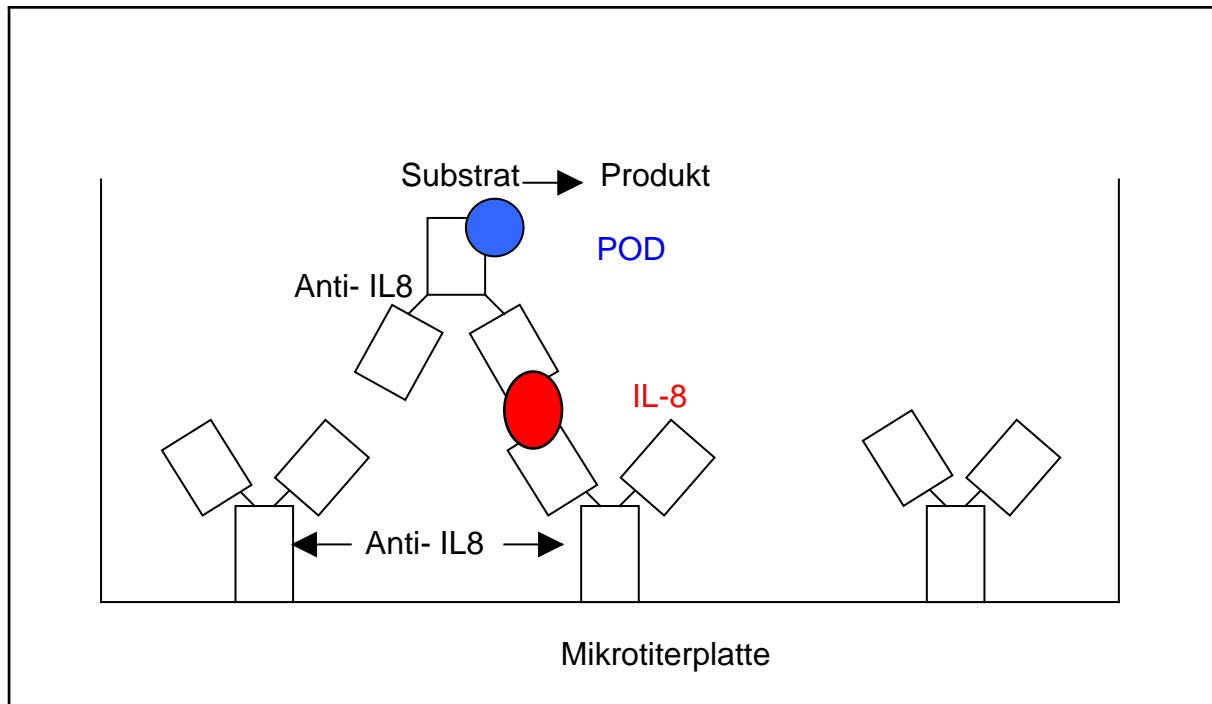


Abb. 5: Funktionsprinzip des Sandwich- ELISA; POD = Peroxidase

3.4 RNA-Präparation und Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion

Bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) werden bestimmte Genexpressionen auf RNA-Ebene nachgewiesen. Hierzu wird die interessierende Patienten-RNA zunächst von einer reversen Transkriptase zu DNA transkribiert.

Diese DNA wird anschließend in vitro durch eine DNA-Polymerase folgendermaßen vermehrt: Nachdem man die DNA-Doppelstränge durch Erwärmen getrennt hat, 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).

Eine quantitative Aussage über die Expression eines Gens wird erschwert durch die Tatsache, dass nach einer Phase der exponentiellen DNA-Amplifikation eine Schwelle erreicht wird, bei der 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 niedriger liegt. Um Unterschiede in der Amplifikationseffizienz und der RNA-Präparation zu minimieren erfolgt eine Relation zu einem laborinternen Standardkontrollgen, das in dieser Arbeit die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase war.

Zur Untersuchung der E-Selectin Expression auf RNA-Ebene wurde die RNA der kernhaltigen Blutzellen aus EDTA-Plasma mit Hilfe eines RNA-Extraktionsassays gemäß den Angaben des Herstellers isoliert (RNeasy Blood Mini Kit, Quiagen, Crawley, U.K.).

Danach wurde eine reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) 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) wurden die Primersequenzen 5'GTTGTCATGGATGACCTTGGCC3' und 5'CCACCCATGGCAAATTCCATGG3' verwendet; für E-Selectin die Primersequenzen 5'CTCTGACAGAAGAAGCCAAF3' und 5'ACTTGAGTCCACTGAAGGCA3'.

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

Die Dichte des durch Elektrophorese gemessenen E-Selectin PCR-Produktes wurde in Verhältnis zur GAPDH-Intensität derselben Probe gesetzt und dieses Verhältnis stellte dann die Messung des spezifischen E-Selectin-RNA-Gehaltes der Probe dar.

4. Ergebnisse

4.1 Statistische Daten der Studienpopulation:

Die beiden Studienpopulationen unterschieden sich in den meisten relevanten klinischen Parametern nicht signifikant voneinander. Von besonderem Interesse waren hier unter anderem kardiovaskuläre Risikofaktoren, Anzahl betroffener Gefäße, das Alter und die Art der medikamentösen Dauermedikation zum Einschlusszeitpunkt (Tab.6).

	Stabile Angina (n=20)	Akuter Mykardinfarkt (n=22)	P
Geschlecht (W/M)	4/16	6/16	0.8
Alter	69 (58-79)	63 (44-81)	0.7
Aktive Raucher (%)	6 (30)	4 (20)	0.4
Hypercholesterinämie (%)	15 (75)	14 (64)	0.4
Arterielle Hypertonie (%)	14 (70)	15 (68)	0.7
Diabetes mellitus (%)	2 (10)	5 (23)	0.3
1-Gefäßerkrankung (%)	5 (25)	9 (41)	0.3
2-Gefäßerkrankung (%)	8 (40)	7 (32)	0.6
3-Gefäßerkrankung (%)	6 (30)	6 (27)	0.4
Medikamente:			
ACE-Hemmer	13 (65)	4 (18)	<0.01
β-Blocker	15 (75)	6 (27)	<0.01
Aspirin	14 (70)	6 (27)	<0.01
Clopidogrel	8 (40)	4 (20)	<0.01
Statine	12 (60)	2 (9)	<0.01
CK max, U/L	<80	1517 (432-4480)	<0.01

Tab. 7: statistische Daten der Studiengruppen

Im letztgenannten Punkt fand sich allerdings ein Unterschied, der an dieser Stelle erwähnt werden muss, da der Anteil von Patienten mit vorbestehender kardiovaskulärer Dauermedikation in der Kontrollgruppe signifikant höher war als in der Studiengruppe.

Kein Patient erlitt einen Reinfarkt oder starb während des Krankenhausaufenthaltes. Bei allen Patienten wurde durch erfolgreiches Stenting ein Fluss Grad TIMI 3 und eine Reduktion des Stenosendurchmessers auf <15%.

4.2 Zirkulierende CD133+ Zellen

Die relative Anzahl von CD133+ Zellen im zirkulierenden Blut der Infarktpatienten war am siebten Tag nach therapeutischer Intervention im Schnitt sechs mal so hoch wie der Ausgangswert am Tag eins. In der Kontrollgruppe ließ sich hingegen im Verlauf kein Anstieg der relativen Anzahl der CD133+ Zellen beobachten, wobei wie oben bereits angesprochen der Beobachtungszeitraum der Kontrollgruppe lediglich drei bis vier Tage betragen konnte und somit der Bestimmung am siebten Tag nicht durchgeführt werden konnte. Die relative Anzahl zirkulierender CD133+ Zellen war jedoch in der Kontrollgruppe von Beginn an höher als in der Infarktgruppe. Dabei ist zu beachten, dass die CD133+ Zellen überhaupt nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtzahl zirkulierender mononukleärer Zellen ausmachen, nämlich in der Regel weniger als 0,1% der zirkulierenden mononukleären Zellen (s. Abb. 6).

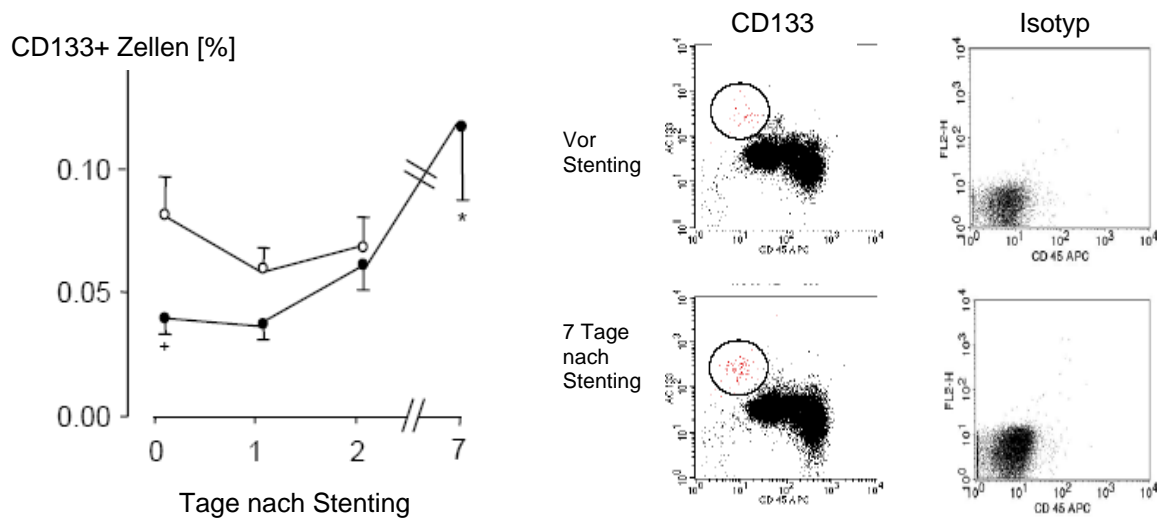


Abb. 6: linke Seite: prozentualer Anteil von CD133+ Zellen an den mononukleären Zellen bei Patienten mit AMI (schwarze Kreise) und Patienten mit SAP (weiße Kreise) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

Rechte Seite: FACS-Analyse eines Patienten mit Myokardinfarkt zum Zeitpunkt T1 (obere Punktdiagramme) und zum Zeitpunkt T7 (untere Punktdiagramme). x-Achse: CD45-Fluoreszenz; y-Achse: CD133-Fluoreszenz. Auf der rechten Seite sind jeweils die Isotypfärbungen aufgeführt.

* bedeutet $p < 0,01$ im Vergleich zu Werten vor PTCA. + bedeutet $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.3 Zirkulierende Endothelzellen

Die relative Anzahl von P1H12+ Zellen war in der Infarktgruppe am Aufnahmetag signifikant erhöht und fiel am ersten postinterventionellen Tag schon wieder ab. Es zeigte sich im weiteren Verlauf kein Wiederanstieg, die gemessenen Prozentsätze waren gleich bleibend niedrig.

Bei den Patienten mit stabiler Angina pectoris konnte weder bei Aufnahme noch an den postinterventionellen Tagen eine Erhöhung der relativen Anzahl von P1H12+ Zellen im zirkulierenden Blut gefunden werden.

Die relative Anzahl von P1H12+ Zellen war in der Infarktgruppe von Beginn an höher als in der Kontrollgruppe.

P1H12+ Zellen (%)

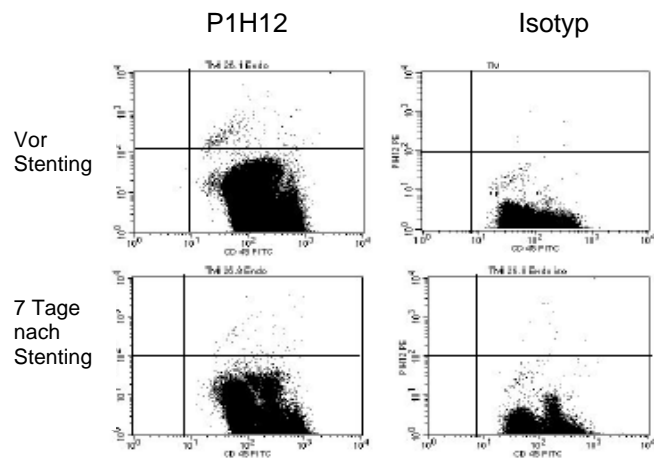
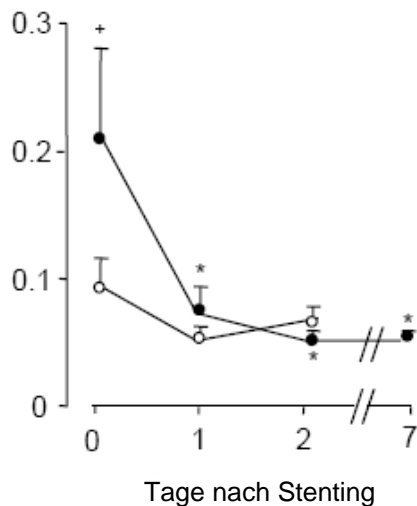


Abb. 7: linke Seite: prozentualer Anteil von P1H12+ Zellen an den mononukleären Zellen bei Patienten mit AMI (schwarze Kreise) und Patienten mit SAP (weiße Kreise) zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. * bedeutet $p < 0,01$ im Vergleich zu Werten vor PTCA. + bedeutet $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Rechte Seite: FACS-Analyse eines Patienten mit Myokardinfarkt zum Zeitpunkt T1 (obere Punktdiagramme) und zum Zeitpunkt T7 (untere Punktdiagramme). x-Achse: CD45-Fluoreszenz; y-Achse: P1H12-Fluoreszenz. Auf der rechten Seite sind jeweils die Isotypfärbungen aufgeführt.

Da Hypoxie die Expression von E-Selectin auf aktivierten Endothelzellen stimulieren kann (Armstrong et al, Circulation, 2006), wurde die E-Selectin-RNA-Expression der zirkulierenden Blutzellen als Hinweis für die zirkulierenden aktivierten Endothelzellen bestimmt. Die Messergebnisse verhielten sich analog zu den P1H12+ Zellen. Die E-Selectin-RNA-Expression war bei den Infarktpatienten am Aufnahmetag signifikant höher als zwei Tage nach Stentimplantation. In der Kontrollgruppe war die E-Selectin-Expression deutlich niedriger als in der Infarktgruppe.

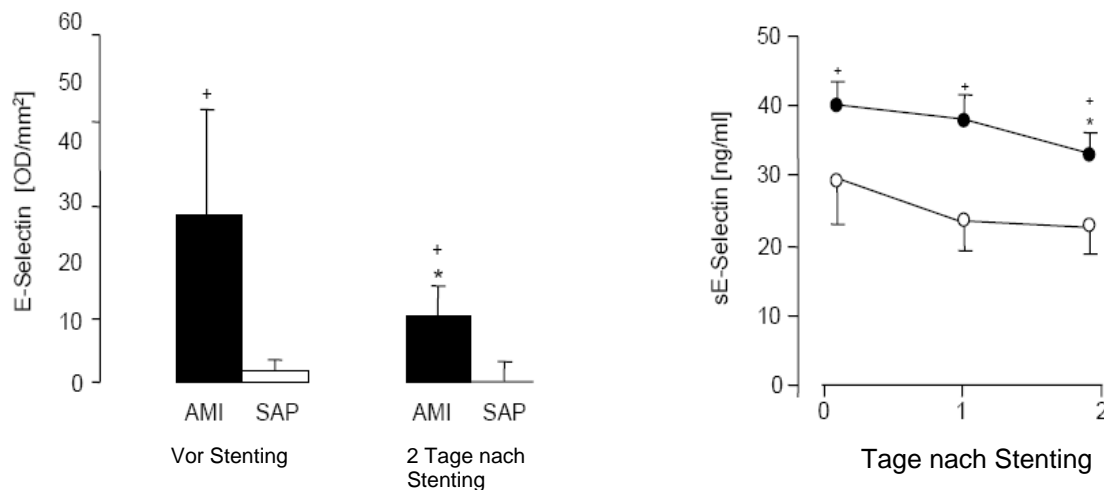


Abb. 8: Linkes Diagramm: Verlauf der E-Selectin-RNA-Expression im Blut von Patienten mit Infarkt (AMI) und stabiler AP (SAP) vor und nach Stentimplantation.

Rechtes Diagramm: Verlauf der Konzentrationen von löslichem E-Selectin (sE-Selectin) in der Infarktgruppe (schwarze Kreise) und in der Kontrollgruppe (weiße Kreise).

* bedeutet $p < 0,01$ im Vergleich zum Aufnahmezeitpunkt; + bedeutet $p < 0,01$ im Vergleich zu Patienten mit SAP.

4.4 Zirkulierende CD34-positive Zellen

Bei Färbung der mononukleären Blutzellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD34 zeigte die statistische Auswertung der Punktdiagramme, dass es weder in der Infarktgruppe noch in der Kontrollgruppe zu signifikanten Konzentrationsveränderungen kam. In der Infarktgruppe konnte lediglich ein gewisser Trend gesehen werden, der von einer initial höheren relativen Zahl von CD34-Zellen zunächst leicht abfiel und am siebten Tag wieder eine leichte Zunahme beschrieb. Die Veränderungen waren jedoch nicht signifikant.

4.5 Serumkonzentrationen von Interleukin 8

Die Serumkonzentrationen von Interleukin 8 waren am ersten postinterventionellen Tag in beiden Studiengruppen signifikant höher als bei Aufnahme, jedoch war der Anstieg in der Infarktgruppe steiler als in der Kontrollgruppe. Die durchschnittliche Ausgangskonzentration von IL-8 war in der Infarktgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe. In der Infarktgruppe korrelierte die Konzentration von IL-8 am 2. Tag positiv mit der relativen Anzahl zirkulierender CD133+ Zellen am siebten

postinterventionellen Tag. Patienten mit einer stärkeren akuten IL-8- Antwort zeigten somit auch eine stärkere Mobilisation von Stammzellen im weiteren Verlauf.

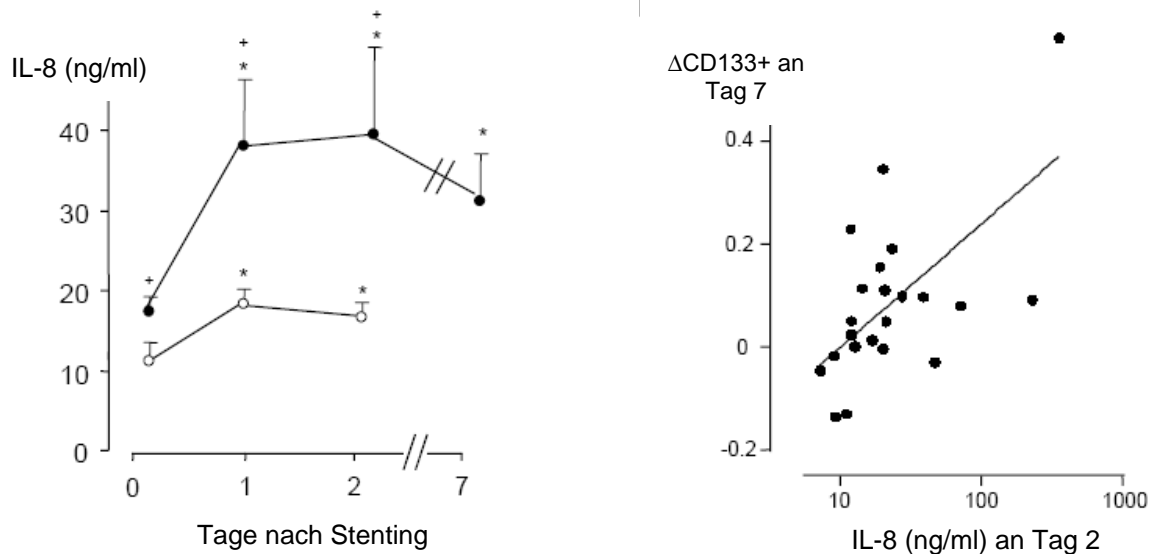


Abb. 9: Linkes Diagramm: Verlauf der Serumkonzentrationen von IL-8 in der Infarktgruppe (schwarze Punkte) und in der Kontrollgruppe (weiße Punkte).

* bedeutet $p < 0,01$ im Vergleich zum Zeitpunkt T1 (bei Aufnahme). + bedeutet $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Rechtes Diagramm: Korrelation zwischen IL-8-Konzentration zum Zeitpunkt T2 (24 Stunden nach Aufnahme) und dem Anstieg der CD133+ Zellen zum Zeitpunkt T7 (am siebten Tag nach Aufnahme).

4.6 Serumkonzentrationen von VEGF, G-CSF, GM-CSF und SDF-1

Der Verlauf der Konzentrationen von VEGF, G-CSF, GM-CSF und SDF-1 verhielt sich unabhängig von den beobachteten zellulären Kinetiken. In der Infarktgruppe wurde ein Anstieg der Konzentrationen von G-CSF und VEGF zu den Zeitpunkten T2 und T3 im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet. Ein ähnlicher Anstieg war in der Kontrollgruppe weniger stark ausgeprägt. Allerdings konnte hier im Gegensatz zu IL-8 keine Korrelation mit dem späteren Anstieg der CD133+ Zellen gefunden werden.

Für GM-CSF und VEGF wurden diese Verläufe nicht beobachtet. Es kam zu keinen signifikanten Konzentrationsunterschieden der beiden Zytokine im Verlauf des akuten Myokardinfarktes. Auch im Gruppenvergleich ergaben sich keine

nennenswerten Konzentrationsunterschiede, die auf eine allgemeine Aktivierung oder Mehrsynthese dieser Faktoren bei den Infarktpatienten hindeuten könnte.

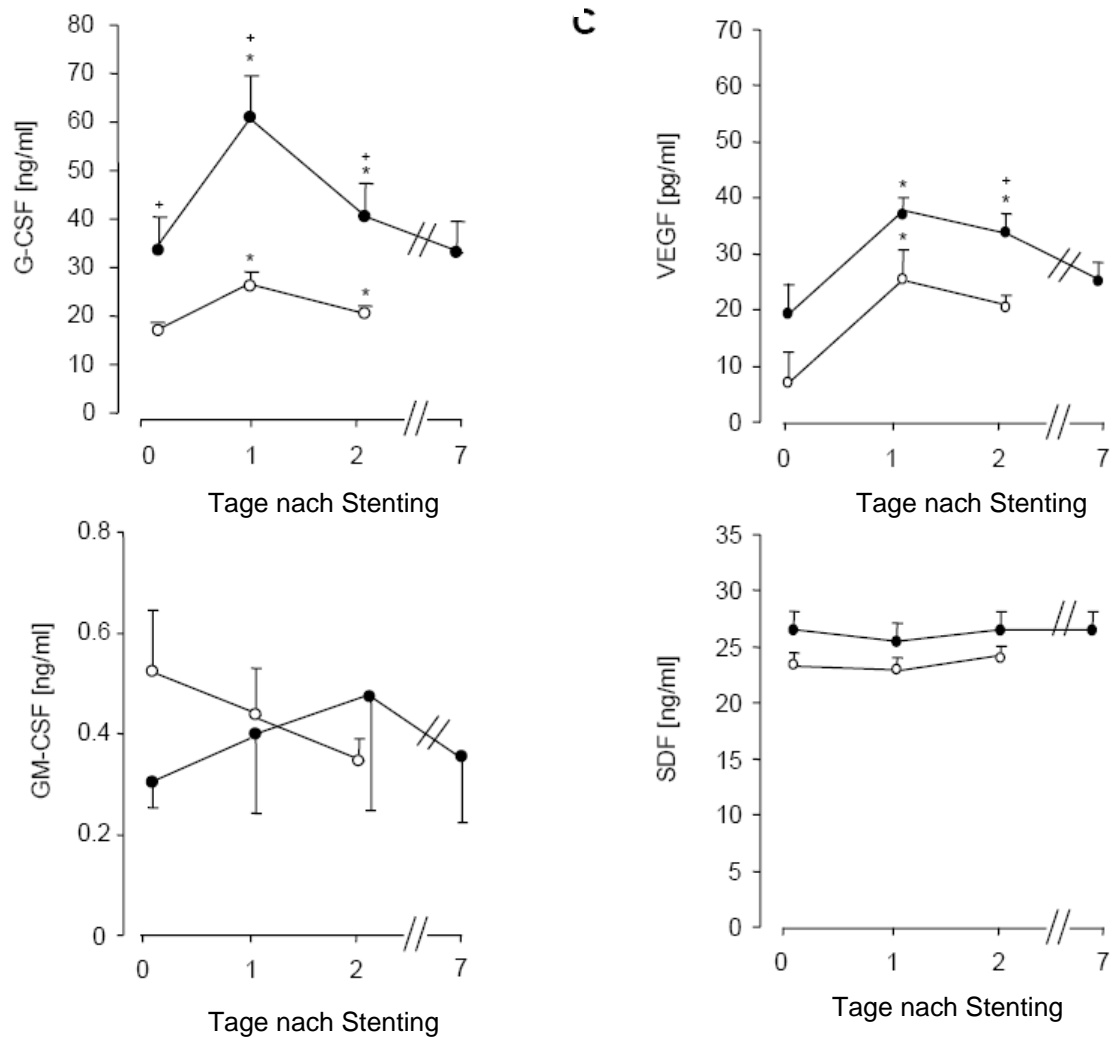


Abb. 10: Verlauf der Plasmakonzentrationen verschiedener Zytokine (G-CSF; GM-CSF; VEGF; SDF-1) in der Infarktgruppe (schwarze Punkte) und in der Kontrollgruppe (weiße Punkte).

* bedeutet $p < 0,01$ im Vergleich zum Zeitpunkt T1 (bei Aufnahme). + bedeutet $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

5 Diskussion

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sollen zunächst kurz zusammengefasst werden:

1. Zirkulierende Endothelvorläuferzellen und CD133+ Stammzellen werden 2-7 Tage nach akutem Myokardinfarkt ins Blut mobilisiert.
2. P1H12+ Zellen und E-Selectin-RNA-Expression sind nur in der Akutphase des Infarktes erhöht und fallen schon 24 Stunden nach Aufnahme wieder ab, was auf eine Freisetzung von Endothelzellen aus dem infarzierten Myokard hindeutet.
3. Erhöhte Plasmakonzentrationen von IL-8, VEGF und G-CSF wurden 24 und 48 Stunden nach Stenting gemessen. Da die IL-8-Spiegel signifikant mit dem Anstieg von CD133+ Zellen korrelierten, könnte IL-8 zur Stammzellmobilisation nach Myokardinfarkt beitragen.

5.1 Mobilisierung von CD133+ Zellen nach akutem Myokardinfarkt

Aufgrund zahlreicher Hinweise für eine mögliche Bedeutung endothelialer Vorläuferzellen für die Neovaskularisation ischämischen Gewebes in Tiermodellen sowie im menschlichen Organismus (Rafii, J Clin Invest, 2000; Isner et al, J Clin Invest, 1999; Griffioen et al, Pharmac Rev, 2000) sollte eine quantitative Untersuchung dieses Zelltyps in der Folge eines akuten Myokardinfarktes vollzogen werden. Weil dabei vor allem auf den Stammzellcharakter dieser Zellen eingegangen werden sollte, war das identifizierende Kennzeichen der Stamm- bzw. Progenitorzelle das Vorhandensein des Oberflächenmoleküls CD133, das auf einer Population von CD34+ Blutzellen exprimiert wird. In Modellen der Knochenmarkstransplantation am Schaf zeigen verabreichte CD133+ Zellen erfolgreiches Homing und Besiedlung des Knochenmarks der Versuchstiere. CD133 wird nicht von differenzierten Zellen gebildet (Yin et al., Blood, 1997).

Die Ergebnisse in der Infarktgruppe zeigen, dass es unmittelbar nach dem ischämischen Ereignis noch nicht zu einer Reaktion im Sinne einer sofortigen Erhöhung der Anzahl zirkulierender Stammzellen zu kommen scheint. Nach einer Latenzzeit von einigen Tagen zeigt sich jedoch ein signifikanter Anstieg der CD133+ Zellen im Vergleich zum Ausgangswert. Das durchschnittliche Maximum wird zum Zeitpunkt der vierten Probenentnahme am Tag 7 nach Infarkt beobachtet. Ob dieser Zeitpunkt den Beginn einer Mobilisierung darstellt oder bereits das eigentliche Maximum, kann aufgrund des Studienprotokolls, in dem der siebte Tag der letzte

Untersuchungszeitpunkt ist, nicht gesagt werden. Es ist festzuhalten, dass es nach akutem Myokardinfarkt zu einer vermehrten Zirkulation von Stammzellen im peripheren Blut kommt, die eine systemische Antwort auf das ischämische Ereignis darstellt. Die zeitliche Latenz von mehreren Tagen lässt vermuten, dass im Rahmen der Ischämie relativ langsame Signalkaskaden ablaufen müssen, die diese zeitliche Verzögerung erklären. In der Kontrollgruppe erfolgte kein Anstieg der relativen Anzahl von zirkulierenden CD133+ Zellen, wenn auch der Ausgangswert im Vergleich zur Infarktgruppe signifikant höher lag. Wegen der frühzeitigen Krankenhausentlassung von Patienten mit stabiler Angina pectoris konnte leider in der Kontrollgruppe kein vergleichbar später Abnahmezeitpunkt untersucht werden. In einer Nachuntersuchung von 10 Patienten mit identischen Ein- und Ausschlusskriterien wie die Kontrollgruppe wurde jedoch ein später Abnahmezeitpunkt ermöglicht, und es kam nicht zu einer signifikanten Erhöhung der CD133+ Zellen im Vergleich zum Ausgangswert.

Die Ergebnisse der Mobilisation von Stamm- und Vorläuferzellen im akuten Myokardinfarkt stimmen überein mit der bereits erwähnten Untersuchung aus dem Jahre 2001, bei der das Augenmerk auf die CD34+ Zellen gelegt wurde und ebenfalls ein Anstiegsmaximum nach einer Woche zeigte (Shintani et al., *Circulation* 2001). In neueren Studien zur Mobilisation von Stammzellen im akuten Myokardinfarkt zeigten sich jedoch gegensätzliche Ergebnisse, denn es wurde eine zeitlich viel frühere Antwort gesehen, nämlich bereits nach 24 Stunden (Massa et al., *Blood* 2004; Wojakowski et al., *Circulation* 2004). Auch bei diesen Studien galt CD34 als bedeutender Marker für Zellen mit Vorläufercharakter. Da CD34 auch auf reifen Endothelzellen vorkommt, könnte es hier zur Messung einer Mischpopulation von CD34+ reifen Endothelzellen und Vorläuferzellen gekommen sein. Ein Hinweis auf den geringen Anteil von Stammzellen 24 Stunden nach Infarkt zeigt die Differenzierung der CD34+ Zellen in den Mehrfachfärbungen von Massa und Kollegen. Die CD133+/CD34+/VEGFR2+ Zellen machten nur 6,7% der CD34+ Zellen aus, so dass vermutet werden kann, dass die Dynamik im Verlauf von CD34+ Zellen in der Frühphase nach akutem Myokardinfarkt nur zu einem sehr kleinen Teil von Veränderungen in der Zahl zirkulierender Endothelvorläuferzellen herrührt und mehr von anderen CD34+ Subpopulationen bestimmt wird. Auch in der Arbeit von Wojakowski und Kollegen standen die CD34+ Zellen im Mittelpunkt des Interesses,

weshalb eine Aussage zur Mobilisation von Stamm- und Vorläuferzellen wegen der möglichen Interferenz durch eine mögliche ischämieinduzierte Freisetzung von reifen Endothelzellen problematisch wird. Die Ergebnisse der Untersuchung von CD34+ Zellen in dieser Arbeit werden weiter unten (Abschnitt 5.2) diskutiert.

Zur Erklärung der höheren Ausgangskonzentration von CD133+ Zellen in der Kontrollgruppe kann die Änderung der Konzentration dieser Zellen durch verschiedene beeinflussbare und nicht beeinflussbare intermittierende Parameter herangezogen werden. So wiesen z. Bsp. signifikant mehr Kontrollpatienten eine medikamentöse Dauertherapie auf, darunter auch die so genannten Statine, deren Einnahme mit einer Erhöhung zirkulierender Endothelvorläuferzellen einhergeht (Dimmeler et al., J Clin Invest, 2001). Für eine statistisch fundierte Aussage über klinische Risikofaktoren und somit eine weitere Unterteilung der Studienpopulationen nach weiteren klinischen Gesichtspunkten wie z. Bsp. Schweregrad einer vorliegenden Herzinsuffizienz oder Vorhandensein eines Diabetes mellitus waren die Studiengruppen jedoch zu klein, weshalb hier nicht weiter darauf eingegangen werden kann. Letztlich kann hier jedoch empirisch aufgrund des Verteilungsmusters der klinischen Daten ein gewisser Zusammenhang angenommen werden.

Ob die CD133+ Zellen tatsächlich zu den ischämischen Myokardarealen wandern und zur Neovaskularisierung beitragen und ob dies dann in-vivo zu einer kleineren Narbe und mehr funktionell erhaltenem Myokardgewebe und infolgedessen zu einer Mortalitätssenkung führen kann, bleibt offen und muss in weiteren Studien untersucht werden.

5.2 Mobilisierung von CD34+ Zellen

Da CD34 als Oberflächenmerkmal von Stammzellen eine bedeutende Rolle im wissenschaftlichen sowie im klinischen Kontext spielt und CD133 vornehmlich auf CD34+ Zellen exprimiert wird, sollten die Blutproben der Studienpopulationen auch auf die relative Anzahl dieser Zellen an der Gesamtzahl kernhaltiger Blutzellen untersucht werden. Hier zeigte sich jedoch weder in der Kontrollgruppe noch in der Infarktgruppe ein signifikanter Konzentrationsanstieg im Laufe der Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Beobachtungen der CD133+ Zellen und der CD34+ Zellen könnte sein, dass CD34 ein auf Stammzellen vorkommendes Molekül ist, das allerdings auch auf reifen Endothelzellen,

Fibroblasten und glatten Muskelzellen vorkommt (Miettinen et al., Mod. Pathol., 1994). Bei den meisten Untersuchungen von CD34+ Stammzellen spielt die Gruppe der zirkulierenden Endothelzellen eine untergeordnete Rolle, da sie einen geringen Anteil der im Blut zirkulierenden Zellen ausmacht. Bedeutender scheint ihre Rolle aber in Situationen der gesteigerten Endothelabschilferung zu sein wie das z.Bsp. bei Sichelzellanämie, interventioneller Angiografie oder akutem Myokardinfarkt der Fall ist (Sowemimo-Coker et al., Am J Hemat, 1989; George et al., Thromb Haemost, 1992; Mutin et al., Blood, 1999).

Ein fehlender Anstieg von CD34+ Zellen im Verlauf des Myokardinfarktes in der vorliegenden Arbeit ließe sich dadurch erklären, dass zum Zeitpunkt T1 gelöste, reife Endothelzellen im peripheren Blut vorhanden waren, die, würden sie als Stammzellen interpretiert, zu einem falsch hohen Ausgangswert führen. Ein signifikanter Anstieg kann deswegen bei den CD34+ Zellen im weiteren Verlauf nicht beobachtet werden, weil einerseits die Zahl zirkulierender Endothelzellen nach 24 Stunden rasch abnimmt und zum anderen die Freisetzung der ebenfalls CD34+ Stammzellen erst nach einer längeren Latenzzeit von etwa 48 Stunden zu beginnen scheint und ihr Maximum im untersuchten Zeitraum erst am siebten Tag erreicht. Man kann also in Anbetracht dieser Beobachtungen nicht CD34 alleine als maßgeblichen Marker für den Stammzellcharakter von Zellen heranziehen, da es durch das Vorhandensein dieses Moleküls auf zwei unterschiedlichen Zellpopulationen mit verschiedenen Freisetzungskinetiken zur Interferenz kommt. Diese Tatsache kann unter anderem die gegensätzlichen Untersuchungsergebnisse von Massa et al und von Wojakowski et al erklären. Darüber hinaus muss auch noch einmal angemerkt werden, dass ein direkter Vergleich der Studien zur Stammzellmobilisierung im akuten Myokardinfarkt nur schwer möglich ist, da sich die bisher durchgeführten Studien nicht nur in der Patientenzahl sondern auch in Färbemethoden (Einfachfärbung bis Dreifachfärbung) und offensichtlich auch in den angewandten Messmodalitäten unterscheiden, was man exemplarisch an den sehr unterschiedlichen absoluten Ausgangswerten für CD34+ Zellen zum ersten Untersuchungszeitpunkt in der Infarktgruppe festmachen kann (siehe auch Tabelle 1 im Einleitungsteil).

5.3 zirkulierende Endothelzellen

Zur Untersuchung der zirkulierenden aktivierten Endothelzellen wurde der endothelspezifische Marker P1H12 herangezogen, der bislang auf keinem anderen Zelltyp im zirkulierenden Blut gefunden wurde. Außerdem wurde die Produktion von E-Selectin untersucht. Bei den durchflusszytometrischen Messungen der zirkulierenden P1H12+ Zellen fiel eine signifikante Konzentrationserhöhung bei den Infarktpatienten am Aufnahmetag auf. Im weiteren Verlauf ging deren Konzentration deutlich zurück. Analog dazu verhielt sich der mRNA- Nachweis von E-Selectin als Zeichen von erhöhter Endothelzellaktivität im Blut der Infarktpatienten. Auch das lösliche E-Selectin, gemessen mittels Immunoassay, war in der Infarktgruppe zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant höher konzentriert als in der Kontrollgruppe.

Insgesamt zeigte sich also eine signifikant erhöhte relative Anzahl zirkulierender Endothelzellen bei den Infarktpatienten zum Aufnahmezeitpunkt vor der koronarangiographischen Intervention. Innerhalb der nächsten 24 Stunden - zum zweiten Untersuchungszeitpunkt - fiel die Konzentration dieser Zellen wieder deutlich ab. In der Kontrollgruppe ließ sich weder ein Konzentrationsabfall noch ein Anstieg nach Intervention beobachten, so dass am ehesten davon auszugehen ist, dass die Phase der Gewebischämie zu einer vermehrten Freisetzung reifer Endothelzellen aus dem betroffenen Versorgungsgebiet geführt hat und dass der Einfluss des therapeutischen Vorgehens hier nicht ins Gewicht zu fallen scheint. Andernfalls wäre in der Kontrollgruppe zum zweiten Blutabnahmezeitpunkt ebenfalls ein Anstieg zu erwarten gewesen. Wenn man nun berücksichtigt, dass CD34 auch auf reifen Endothelzellen vorkommen kann, so kann hiermit auch die fehlende Dynamik im Verhalten der CD34+ Zellen erklärt werden, da zum ersten Abnahmezeitpunkt in der Infarktgruppe die reifen P1H12+/CD34+ Endothelzellen einen bedeutenden Anteil an dieser Population zu haben scheinen, während zum Zeitpunkt der letzten Blutabnahme nach einer Woche fast keine Endothelzellen mehr zirkulieren, wohl aber die mobilisierten CD133+/CD34+ Stammzellen.

5.4 VEGF, G-CSF, GM-CSF und SDF-1

Nach den Hinweisen aus diversen Tiermodellen scheint die Mobilisierung solcher endothelialer Vorläuferzellen einen Nutzen hinsichtlich der Verkleinerung des vernarbenden Gewebeareals zu haben. Ob dies auch auf den menschlichen

Organismus übertragen werden kann, muss noch geklärt werden. Es scheint jedoch so zu sein, dass im Tierversuch durch artifizielle Steigerung der Zahl zirkulierender Vorläuferzellen, sei es durch intravenöse Applikation von Stammzellen oder durch Applikation von Wachstumsfaktoren, eine weitere Verbesserung der Neovaskularisierung erreicht werden kann. Wenn dies auf den menschlichen Organismus ebenfalls zutreffen würde, könnten sich daraus zukünftig weitere ergänzende therapeutische Optionen zur Behandlung des akuten Myokardinfarkts ergeben. Hierzu müssen jedoch tiefere Einblicke in die physiologischen Mobilisierungswege erlangt werden. Man weiß, dass Wachstumsfaktoren mit Einfluss auf das Knochenmark wie VEGF, GM-CSF oder auch G-CSF eine wichtige Rolle in der Mobilisation von Endothelvorläuferzellen spielen (Kalka et al., Proc Natl Acad Sci USA 2000; Takahashi et al., Nat Med 1999; Gehling et al., Blood 2000).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich sowohl ein Anstieg von VEGF als auch von G-CSF in den ersten 24 Stunden nach Infarkt. Es kam jedoch zu keinem nennenswerten Anstieg von GM-CSF oder SDF-1. In der Kontrollgruppe konnten ebenfalls leichte Plasmakonzentrationsanstiege dieser beiden Faktoren beobachtet werden, was auf einen möglichen Zusammenhang mit der therapeutischen Intervention hindeuten könnte. Der fehlende Anstieg von GM-CSF zeigt, dass es wohl verschiedene Signalwege gibt, die zu einer Stammzellfreisetzung führen können, dass aber im Rahmen der myokardialen Ischämie dem GM-CSF nur eine untergeordnete Rolle zuzukommen scheint. Ob der Anstieg von VEGF und G-CSF in beiden Gruppen nun durch die direkte mechanische Irritation am Koronararterienendothel zustande kommt, durch die damit verbundene kurzzeitige Ischämie oder auch durch periinterventionelle Medikamentengabe, bleibt offen. Jedenfalls kann vermutet werden, dass ein gewisses Profil und Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren stattfindet, die die Stammzellmobilisierung beeinflussen.

Von IL-8 und VEGF ist darüber hinaus bekannt, dass sie nicht nur die Zahl sondern auch die adhäsiven Kapazitäten und die so genannte Homing-Kapazität der Vorläuferzellen beeinflussen, was eine Effektivitätssteigerung des regenerativen Potentials bewirkt (Urbich et al, Circ Res, 2004)

5.5 Interleukin-8 und Stammzellmobilisierung

In der Infarktgruppe zeigte sich ein Anstieg der IL-8 Plasmakonzentrationen nach 24-48 Stunden nach Stenting, der deutlicher war als der leichte Anstieg in der

Kontrollgruppe. Dieser Freisetzung fand zwar früher statt als die Stammzellmobilisation, jedoch korrelierten die IL-8-Spiegel nach 24 Stunden positiv und signifikant mit den Konzentrationen der CD133+ Zellen nach 7 Tagen.

Dies könnte eine Hinweis darauf sein, dass IL-8 im akuten Myokardinfarkt von Zellen des ischämischen Gewebes ausgeschüttet wird und über noch zu untersuchende Signalwege zu einer Mobilisation von regenerativen Stammzellen aus dem Knochenmark führt.

Es ist bekannt, dass IL-8 im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion im akuten Myokardinfarkt vermehrt im zirkulierenden Blut nachzuweisen ist (Ren et al, Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2003). IL-8 ist ein wichtiges Regulatormolekül im Rahmen der transendothelialen Migration und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten (Huber et al., Science 1991; Kuijpers et al., J Cell Biol 1992). IL-8 kann von verschiedenen Zelltypen produziert werden und entweder zellgebunden oder im Plasma gelöst auftreten. Hierbei weist IL-8 jedoch verschiedene Kinetiken und Wirkorte auf. Von Endothelzellen produziertes zellgebundenes IL-8 führt zur transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten und fördert somit die lokale Entzündungsreaktion nach myokardialer Ischämie. Wird hingegen lösliches IL-8 zum apikalen Kompartiment hinzugegeben, erfolgt keine Granulozytenmigration (Huber et al., Science 1991). Jedoch scheint niedrig dosiert intravenös verabreichtes IL-8 die Leukozytenrekrutierung auch hemmen zu können, so dass IL-8 sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen haben kann (Hechtman et al., J Immunol 1991). Histopathologische Untersuchungen an ischämisch geschädigten Kaninchenherzen zeigten ein vermehrtes Vorkommen von IL-8 in Grenzonen zwischen ischämischem und lebendem Gewebe sowie ein vermehrtes Auftreten in den entzündlichen Herzmuskelinfiltraten (Kukielka et al., J Clin Invest 1995). IL-8 scheint also einerseits zur entzündlichen Herzmuskelschädigung nach akuter Ischämie unmittelbar beizutragen.

Andererseits scheint IL-8, ebenso wie VEGF, die Freisetzung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark zu fördern und darüber hinaus deren Adhäsivität zu steigern. Die Freisetzung der Progenitorzellen verlief demnach wie weiter oben beschrieben über eine Aktivierung der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) und des beta-2 Integrins LFA-1 (Pruijt et al., Curr Opin Hematol. 1999).

Die erhobenen Daten, insbesondere die Korrelation von IL-8 mit der Anzahl mobilisierter Stammzellen, zeigen, dass systemisch zirkulierendes IL-8 zu einer

Stammzellmobilisierung nach Myokardinfarkt beitragen könnte, die eine Neovaskularisation des geschädigten Gewebes bewirken kann.

Am Ende des Einleitungsteils wurden zur Zielsetzung der Arbeit drei Fragen gestellt, die an dieser Stelle zur Zusammenfassung der Ergebnisse beantwortet werden sollen.

1. Mit welcher zeitlichen Latenz und in welchem Ausmaß findet im akuten Myokardinfarkt eine Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark statt?

Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt findet sich im Schnitt sieben Tage nach dem Akutgeschehen ein signifikanter Anstieg von Stammzellen im zirkulierenden Blutvolumen. Diese Beobachtung kann bei Patienten mit stabiler Angina pectoris nach erfolgter koronarangiographischer Intervention nicht beobachtet werden, was auf einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen Ischämie und reaktiver Stammzellmobilisation hinweist. Die akute Myokardischämie ist somit offenbar auch im menschlichen Organismus ein wirksamer Stimulus für postnatale Vaskulogenese zur Durchblutungsverbesserung und möglicherweise einem verringerten Verlust der myokardialen Pumpfunktion verknüpft.

2. Werden reife Endothelzellen im akuten Myokardinfarkt ins Blut freigesetzt?

In den ersten 24 Stunden nach akutem Myokardinfarkt kommt es zu einer gesteigerten Zirkulation von reifen aktivierten Endothelzellen, die eine mögliche interferierende Variable bei Untersuchungen von CD34-positiven Zellen darstellt, da reife Endothelzellen ebenfalls CD34 an der Zelloberfläche tragen können. Auch hier kommt ursächlich die akute Ischämie als Auslöser in Betracht, da im weiteren Verlauf die Anzahl zirkulierender Endothelzellen wieder deutlich abfällt und in der Kontrollgruppe kein entsprechender Anstieg bei Aufnahme festzustellen war.

3. Welche Zytokine sind an der systemischen Entzündungsreaktion nach akutem Myokardinfarkt beteiligt?

In der Infarktgruppe waren IL-8, VEGF und G-CSF in unterschiedlichen zeitlichen Latenzen signifikant im Vergleich zum Ausgangswert angestiegen. Zum Teil muss diese Reaktion als Antwort auf die Ischämie gesehen werden. Allerdings fand sich in der Kontrollgruppe ebenfalls ein leichter Anstieg von VEGF und G-CSF, weshalb die therapeutische Intervention selbst ebenfalls ein Stimulus für die Entzündungsreaktion zu sein scheint. Lösliches GM-CSF und SDF-1 waren in dieser Studie offensichtlich von untergeordneter Bedeutung in dem untersuchten Zeitrahmen, was eine Beteiligung an der Entzündungsreaktion und Stammzellmobilisation aber keinesfalls ausschließt.

4. Gibt es eine Assoziation zwischen der Serumkonzentration verschiedener Zytokine (insbesondere IL-8) und der Anzahl zirkulierender Stammzellen?

Bei den untersuchten Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt erfolgte ein signifikanter Anstieg des zirkulierenden IL-8 sowie von VEGF und G-CSF. Die IL-8-Konzentrationen (nicht jedoch von VEGF und G-CSF) korrelierten positiv mit der relativen Anzahl zirkulierender Stammzellen am siebten Tag nach Infarkt. Somit scheint ein Wechselspiel verschiedener Faktoren eine ischämie-induzierte Stammzellfreisetzung aus dem Knochenmark zu bewirken. Dabei kann ein kausaler Zusammenhang zwischen zirkulierendem IL-8 und dem Ausmaß der Stammzellantwort angenommen werden.

6 Zusammenfassung

Seit einigen Jahren ist die Existenz regenerativer adulter Stammzellen bekannt, die nach Gewebeschäden im Blut zirkulieren und zur Gewebsreparatur in der Lage sind. Eine Gruppe davon beinhaltet sogenannte Endothelvorläuferzellen, die offensichtlich eine bedeutende Rolle bei der Neovaskularisierung von ischämischem Gewebe spielen, indem sie die Grundlage für eine de-novo-Synthese von Blutgefäßen bilden und somit zu einer verbesserten Gewebsdurchblutung nach einem ischämischen Ereignis führen.

Mit dieser Arbeit sollte die spontane Freisetzung zirkulierender Stammzellen nach einem akuten Myokardinfarkt am Menschen untersucht werden. Hierzu wurden bei Infarktpatienten und bei Patienten mit stabiler Angina pectoris sequentielle Blutabnahmen bei Aufnahme sowie nach 1, 2 und 7 Tagen durchgeführt, und es erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen charakteristische Oberflächenantigene mononukleärer zirkulierender Blutzellen. Gleichzeitig wurde durch Immunoassays die Serumkonzentration verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren gemessen, die im Zusammenhang mit einer Stammzellmobilisierung stehen könnten.

Es zeigte sich in der Infarktgruppe nach Stentimplantation ein signifikanter Anstieg von CD133+ Stammzellen im peripheren Blut, der am siebten Tag nach Infarzierung seinen Höhepunkt erreicht hatte und in der Kontrollgruppe ausblieb. Desweiteren korrelierte die Konzentration dieser Zellen am siebten Tag positiv mit der Serum-IL-8-Konzentration nach den ersten 24 Stunden. Auf eine hohe Konzentration von IL-8 folgte also eine starke Stammzellmobilisierung. Dies lässt vermuten, dass IL-8 im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion nach akutem Myokardinfarkt zur Mobilisation von regenerativen Stammzellen aus dem Knochenmark beiträgt.

7 Literaturverzeichnis

1. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise- induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 24:684-690, 2004.
2. Armstrong EJ, Morrow DA, Sabatine MS. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part II: acute-phase reactants and biomarkers of endothelial cell activation. *Circulation.* 113(7):e152-5, 2006.
3. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85: 221-228, 1999.
4. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzen B. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997.
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* 18: 3964-3972, 1999.
6. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*, 103: 921-926, 2004.
7. Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. The gene encoding the stem cell antigen CD34 is conserved in mouse and expressed in hemopoetic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol* 3:175, 1991.
8. Carmeliet P. Developmental biology: one cell, two fates. *Nature* 408: 43-45, 2000.

9. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439, 1996.
10. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Res* 49: 507-521, 2001.
11. Davidoff AM, NgCY, Brown P, Leary MA, Spurbeck WW, Zhou J, Horwitz E, Vanin EF, Nienhuis AW. Bone-marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Canc Res* 7: 2870-2879, 2001.
12. Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol* 65: 215-220, 2000.
13. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Aicher AM. HMG-CoA-reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3 kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 108: 391-397, 2001.
14. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75: 2417, 1990.
15. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* 116: 435-439, 1992.
16. Forraz N, Pettengell R, Deglesne PA, McGuckin CP. AC133+ umbilical cord blood progenitors demonstrate rapid self-renewal and low apoptosis. *Brit J Haematol* 119: 516-524, 2002.
17. Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95: 3106-3112, 2000.

18. George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Ambrosi P, Klein-Soyer C, Cazenave JP, Sampol J. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-endo 1 monoclonal antibody coupled to immunomagnetic beads: Demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost* 67: 147, 1992.
19. George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Shmilovich H, Finkelstein A, Herz I, Miller H, Keren G. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J* 25: 1003-1008, 2004.
20. George J, Herz I, Goldstein E, Abashidze S, Deutch V, Finkelstein A, Michowitz Y, Miller H, Keren G. Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23: e57-60, 2003.
21. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2+AC133+ endothelial precursor cells. *Circ Res* 88: 167, 2001.
22. Griffioen A, Molema G. Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52: 237-268, 2000.
23. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996.
24. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 193: 1005- 1014, 2001.

25. Hechtman DH, Cybulsky MI, Fuchs HJ, Baker JB, Gimbrone MA Jr. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J Immunology* 147: 883-892, 1991.
26. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109: 625-637, 2002.
27. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N Eng J Med* 348: 593-600, 2003.
28. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: Mobilization, Differentiation and Homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1185, 2003.
29. Hristov M, Weber C. Endothelial Progenitor Cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*, Vol 8 No 4: 498-508, 2004.
30. Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, Weiss SJ. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous IL-8. *Science* 254: 99-105, 1991.
31. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103: 1231-1236, 1999.
32. Jilma B, Hergovich N, Homoncik M, Jilma-Stohlawetz P, Kreuzer C, Eichler HG, Zellner M, Pugin J. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) down-regulates its receptor (CD114) on neutrophils and induces gelatinase B release in humans. *Br J Haematol*; 111: 314-320, 2000.
33. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. *Medizinische Mikrobiologie*, 9. Auflage, S. 415, Georg Thieme Verlag, 1998.

34. Kalka C, Masuda H, Gordon R, Silver M, Asahara T. Age dependent response in mobilization of endothelial progenitor cells to VEGF gene therapy in human subjects. *Circulation* 100: 1-40, 1999.
35. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res* 86: 1198-1202, 2000.
36. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland D.R. Single Platform Flow Cytometric Absolute CD34+ Cell Counts Based on the ISHAGE Guidelines. *Cytometry* 34: 61-70, 1998.
37. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7: 430-436, 2001.
38. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS CD34: Structure, Biology, and clinical utility. *Blood* 87: 1, 1996.
39. Kuijpers TW, Hakkert BC, Hart MHL, Roos D Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells. A role for platelet-activating-factor and Interleukin-8. *J Cell Biol* 117: 565- 572, 1992.
40. Kukielka GL, Smith CW, La Rosa G, Lane C, Entman ML, Anderson DC. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest.*; 6:2720-2728, 1995.
41. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the role of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*; 30: 973-981, 2002.

42. Lev EI, Kleiman NS, Birnbaum Y, Harris D, Korbling M, Estrov Z. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Coronary Collaterals in Patients with Non-ST Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Vasc Res* 42: 408-414, 2005.
43. Lévesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR-4/CSCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or Cyclophosphamide. *J Clin Invest.* 110: 187-196, 2003.
44. Lévesque JP, Takamatsu Y, Nillson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule -1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony stimulating factor. *Blood*; 98: 1289-1297, 2001.
45. Lin Y, Weisdorf D, Solovey A, Hebbel R. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105: 71-77, 2000.
46. Lyden d, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone-marrow derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7: 1194-1201, 2001.
47. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertolotti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. Increased circulating and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 105(1):199-206. 2005.
48. Miettinen M, Lindenmayer AE, Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y-antigens--evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willebrand factor. *Mod Pathol.* 7(1):82-90, 1994.

49. Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 93: 2951-2958, 1999.
50. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schoemig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 92: 748-755, 1995.
51. Paczkowska E, Larysz B, Rzeuski R, Karbicka A, Jalowinski R, Kornacewicz-Jach Z, Ratajczak MZ, Machalinski B. Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34+ cells are mobilized into peripheral blood during stress relates to ischemic stroke or acute myocardial infarction. *Eur J Haematol* 75: 461-467, 2005
52. Pannitteri G, Marino B, Campa PP, Martucci R, Testa U, Peschle C. Interleukins 6 and 8 as mediators of acute phase response in acute myocardial infarction *Am J Card* 80: 622-625, 1997.
53. Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*; 103: 1580-1585, 2004.
54. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95: 952-958, 2000.
55. Pelus, LM, Horowitz D, Cooper SC, King AG. Peripheral Blood stem cell mobilization – a role for CXC chemokines. *Crit Rev Oncol Hematol.* 43: 257-275, 2002.
56. Pruijt J, Willemze R, Fibbe W. Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8. *Curr Opin Hematol.*;6:152-158, 1999.

57. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality and promise. *J Clin Invest* 105: 17-19, 2000.
58. Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG. Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2: 242-256, 2003.
59. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109: 337-346, 2002.
60. Sasaki T, Sasaki-Irie J, Penninger JM. New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. *Int J Biochem Cell Biol* 33: 1041-1046, 2001.
61. Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. A requirement for Flk-1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89: 981- 990, 1997.
62. Shintani 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 myocardial infarction. *Circulation* 103: 2776-2779, 2001.
63. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Heibel R. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Eng J Med* 337: 1584-1590, 1997.
64. Sowemimo-Coker SO, Meiselman HJ, Francis RB. Increased circulating endothelial cells in sickle cell crisis. *Am J Hematol* 31: 263, 1989.
65. Strehlow K., Werner N., Berweiler J., Link A., Dirnagl U., Priller J., Laufs K., Ghaeni L., Milosevic M., Bohm M., Nickenig G., Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*, 107: 3059-3065, 2003.

66. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine- induced mobilization of bone- marrow- derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 4: 434-438, 1999.
67. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106: 2781-2786, 2002.
68. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95: 343-353, 2004.
69. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 110(10):1209-12. 2004.
70. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103: 2885, 2001.
71. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89: e1- e7, 2001.
72. Weiss M, Orkin SH In vitro differentiation of murine embryonic stem cells: new approaches to old problems. *J Clin Invest* 97: 591-595, 1996.
73. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcome. *N Eng J Med* 353: 999-1007, 2005

74. 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* 110: 3213-3220, 2004.
75. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012, 1997.

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. Ilka Ott für die Möglichkeit, in Ihrer Arbeitsgruppe mitzuwirken, und für die kompetenten theoretisch wissenschaftlichen und praktischen Ratschläge, die sie mir zuteil werden ließ.

Bedanken möchte ich mich bei den medizinisch technischen Assistentinnen und insbesondere bei Frau Annette Stobbe, die mich tatkräftig bei den labortechnischen Arbeiten unterstützt hat.

Meine Freunde und Mitdoktoranden Christoph Matissek und Dean Sobczyk seien hier ebenfalls dringend erwähnt. Sie sind mit mir zusammen durch viele lange Stunden der Laborarbeit gegangen und sorgten jederzeit für ein angenehmes und konstruktives Arbeitsklima und waren große Motivationshilfen in Phasen der Stagnation.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und vor allem meinen wunderbaren Eltern Jutta und Wolfgang Moog. Ohne ihre liebevolle Unterstützung und ohne den bedingungslosen Rückhalt, den sie mir zu allen Zeiten meines Lebens und Studiums gegeben haben, wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Ich danke meiner lieben Anna, die mein Leben erfüllt.

Meiner Familie in Liebe gewidmet