Mobilisation zirkulierender endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Christoph Heinrich Eugen Nau

aus

Essen

Berichter: Herr Professor
Dr. med. Peter Walter Radke

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Christian Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 KORONARE HERZERKRANKUNG UND MYOKARDINFARKT - PATHOPHYSIOLOGIE 1

1.2 KLINISCHE DEFINITION 4

1.3 DIREKTE PERKUTANE REVASKULARISATION 7

1.4 ENDOTHELIALE PROGENITORZELLEN 10

1.4.1 Charakterisierung der EPCs 12

1.4.2 Mobilisation und Regulation der EPCs 12

1.4.3 Atherogenese und EPCs 13

1.4.4 EPCs, Myokardinfarkt und KHK: Ziele der Arbeit 14

2 MATERIAL UND METHODEN 15

2.1 PATIENTEN 15

2.1.1 Definition ST-Hebungsinfarkt (STEMI) 17

2.1.2 Kontrollgruppe 17

2.2 DURCHFÜHRUNG DER PTCA 18

2.3 „MYOKARDIALER „BLUSH GRADE““ (MBG) 18

2.4 „TIMI „FRAME COUNT““ (TFC) 20

2.5 ISOLATION UND KULTUR VON HUMANEN EPCS 21

2.6 IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG DER ISOLIERTEN UND ZIRKULIERENDEN EPCS ANHAND DER DURCHFLUßZYTOMETRIE 22

2.7 CFU ASSAY 23

3 ERGEBNISSE 25

3.1 GRUNDLEGENDE KLINISCHE, LABOR- UND EPC CHARAKTERISTIKA 26

3.1.1 Grundlegende klinische, Labor- und EPC Charakteristika, Überlebende vs. Tote 32

4 DISKUSSION 33

5 LIMITATIONEN 39

6 ZUSAMMENFASSUNG 41

7 LITERATURVERZEICHNIS 42

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 49

9 TABELLENVERZEICHNIS 50

DANKSAGUNG 51

ERKLÄRUNG ZUR DATENAUFBEWAHRUNG 52

LEBENSLAUF 53

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom
Acyl- CoA	Acyl- Coenzym A
ATP	Adenosintriphosphat
CEC	Zirkulierende endotheliale Zellen
CEP	Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen
CFU	Kolonie- bildende- Einheit
CK	Kreatinkinase
CO2	Kohlendioxid
CRP	C- reaktives Protein
cTFC	Korrigierter TIMI
EKG	Elektrokardiogramm
EMP	Endotheliale Mikropartikel
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
G- CSF	Granulozyten- Kolonie- Stimulierender- Faktor
GP	Glykoprotein
HMG- CoA	Hydroxymethylglutaryl- Coenzym A
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Left anterior descending artery
LDL	Low density Lipoprotein
MBG	Myokardialer „blush grade“
MO	Mononukleäre Zellen
NAD/ NADH	Nicotinamid- Adenin- Dinucleotid (hydroxiliert)
NSTEMI	Non- ST- elevated myocardial infarction

OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PBMC	Periphere- Mononukleäre- Blutzellen
PBS	Phosphat- Saline- Puffer
PCI	Perkutane- Koronare- Intervention
PFA	Paraformaldehyd
PIGF	Plazentawachstumsfaktor
PPCI	Primäre PCI
PTCA	Perkutane- Transluminale- Koronarangioplastie
RCA	Arteria coronaria dextra
RCX	Ramus circumflexus
SDF	Stromal derived factor
STEMI	ST- elevated myocardial infarction
TrT	Troponin T
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

1 Einleitung

Die koronare Herzerkrankung mit ihren Manifestationsformen, wie dem akuten Myokardinfarkt, stellt die häufigste Todesursache in der industrialisierten Welt dar [1, 2]. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes verstarben im Jahr 2006 in Deutschland 64 796 Personen an einem Myokardinfarkt. Dies entspricht 7,9 % der Gesamtmortalität in Deutschland. Auch als Folge einer in den letzten Jahren stetig sinkenden Sterblichkeit des akuten Myokardinfarkts aufgrund neuer Behandlungsmöglichkeiten (z.B. direkte Katheterintervention), sowie des demographischen Wandels, steigt die Inzidenz der Erkrankung in den Industriestaaten.

Der Myokardinfarkt ist pathophysiologisch prinzipiell durch eine transiente oder permanente Unterbrechung der myokardialen Perfusion mit nachfolgender irreversibler Nekrose des abhängigen Myokardareals charakterisiert. Die Morbidität und Mortalität des Myokardinfarktes beruhen in erster Linie auf dem Auftreten maligner Herzrhythmusstörungen (brady- oder tachykard), wie aber auch auf dem Verlust kontraktiler Elemente mit nachfolgender Insuffizienz und Pumpversagen des Herzens.

1.1 Koronare Herzerkrankung und Myokardinfarkt - Pathophysiologie

Die Atherosklerose, welche die Grundlage für die KHK und somit auch für den akuten Myokardinfarkt darstellt, wird von der Weltgesundheitsorganisation [3] folgendermaßen definiert: „ Es handelt sich bei der Atherosklerose um eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen,

Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ [3].

Risikofaktoren, die das Auftreten begünstigen sind zum einen die unbeeinflussbaren Faktoren wie familiäre Disposition, Lebensalter, männliches Geschlecht und zum anderen die beeinflussbaren Faktoren wie Fettstoffwechselstörung, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom, Rauchen, Bewegungsmangel und Stress [4].

Einer der ersten Schritte der Atherogenese besteht in einer Schädigung der Intima mit nachfolgender ödematöser Aufquellung. Durch Einlagerung von Lipiden direkt unter das Endothel entstehen Fettstreifen, sogenannte „fatty streaks“. Die eingelagerten Lipoproteine werden nachfolgend von Makrophagen und Myozyten phagozytiert, es bilden sich Schaumzellen, mit nicht vollständig abgebauten Lipoproteinen. Der Untergang von Schaumzellen verstärkt den inflammatorischen Prozess, der auch von oxidierten LDL - Cholesterinpartikeln initiiert wurde. Die Gesamtheit dieses Prozesses löst einen proliferativen Reiz aus und es kommt zur Bindegewebsneubildung. Das Atherom wächst zunächst nach außen, doch im weiteren Verlauf kommt es zu einer progredienten Lumenreduktion der Arterien (Glagov- Effekt).

Monozyten produzieren Abbauenzyme wie Kollagenasen und Elastasen, die in der Lage sind, die fibröse Kappe des Atheroms zu schwächen und zum Einriss zu bringen. Auf diesem Wanddefekt bildet sich nun ein Abscheidungsthrombus, der über die Embolisation einzelner Fragmente zu Mikroinfarkten führen kann. Kommt es jedoch zu einem vollständigen Verschluß der Koronararterien oder großer Seitäste entsteht das Vollbild eines Infarktes (elektrokardiographisch als ST-Streckenelevation erkennbar).

Dieser betrifft in circa 95% der Fälle den linken Ventrikel und schließt meist alle Wandschichten mit ein (transmuraler Infarkt/ Q-Wave Infarkt). Gelegentlich ist nur die subendokardiale Zone vom Verschluß betroffen (Innenschichtinfarkt, „letzte Wiese“). Klinisch wegweisend sind eine persistierende Angina pectoris oder Dyspnoe Symptomatik, Schwächegefühl, Todesangst, vegetative Symptome und Herzrhythmusstörungen [4].

Sinkt der Koronargefäßfluss signifikant auf unter 25% des normalen Ruheflusses kommt es zur anaeroben Glykolyse [5]. Gleichzeitig verbleiben durch die stagnierende Blutsäule Stoffwechselprodukte wie NADH, Laktat, CO2, langkettiges Acyl-CoA und langkettiges Acyl-Carnitin im Myokard. Dadurch wird die glykolytische ATP-Bildung blockiert und die Zellmembran, die Mitochondrien und das sarkoplasmatische Retikulum werden geschädigt. Ein unkontrollierter Calcium-Ionen Einstrom in die Myokardzellen führt zu einer Relaxation (hypoxische Herzdilatation) mit der Folge einer regionalen Wandbewegungsstörung (Akinesie).

Durch die Zellschädigung werden unter anderem Phospholipasen freigesetzt, die zu einer weitergehenden Schädigung führen und intrazelluläre Enzyme wie die Kreatinphosphokinase und Laktathydrogenase serologisch nachweisbar werden. Der sich anschließende inflammatorische Prozess wird durch Mediatoren, wie Prostaglandine und Leukotriene in Gang gesetzt, welche selber wiederum durch die Phospholipase gebildet wurden.

Die gestörte Membranfunktion kann elektrokardiographisch erfasst werden. Der Elektrolytgradient bricht zusammen, was sich als ST-Hebung im EKG manifestiert.

Sobald die Membranfunktion völlig erloschen ist, bilden sich die ST-Hebungen wieder zurück.

Nach einigen Stunden zerfallen die Sarkomere samt ihrer Myofibrillen. Das makroskopisch erkennbare Infarktgebiet entspricht nie einer scharf begrenzten Nekrosezone, sondern wird von einer perinekrotischen Zone umgeben, die epikardialwärts liegt und reversibel geschädigte Myokardzellen enthält.

1.2 Klinische Definition

In den letzten Jahren hat sich hinsichtlich der Definition des akuten Myokardinfarkts eine neue Einteilung etabliert, wobei die EKG-Diagnostik sowie kardiale Marker (vor allem Troponine) eine entscheidende Position einnehmen [6-8]. Die Phasen der koronaren Herzkrankheit, die unmittelbar lebensbedrohlich sind, werden unter dem Begriff des „Akuten Koronarsyndroms“ (ACS) zusammengefasst [9, 10]. Hierunter fallen die instabile Angina pectoris, der akute nicht ST-Elevations Myokardinfarkt sowie der ST- Strecken Myokardinfarkt [11].

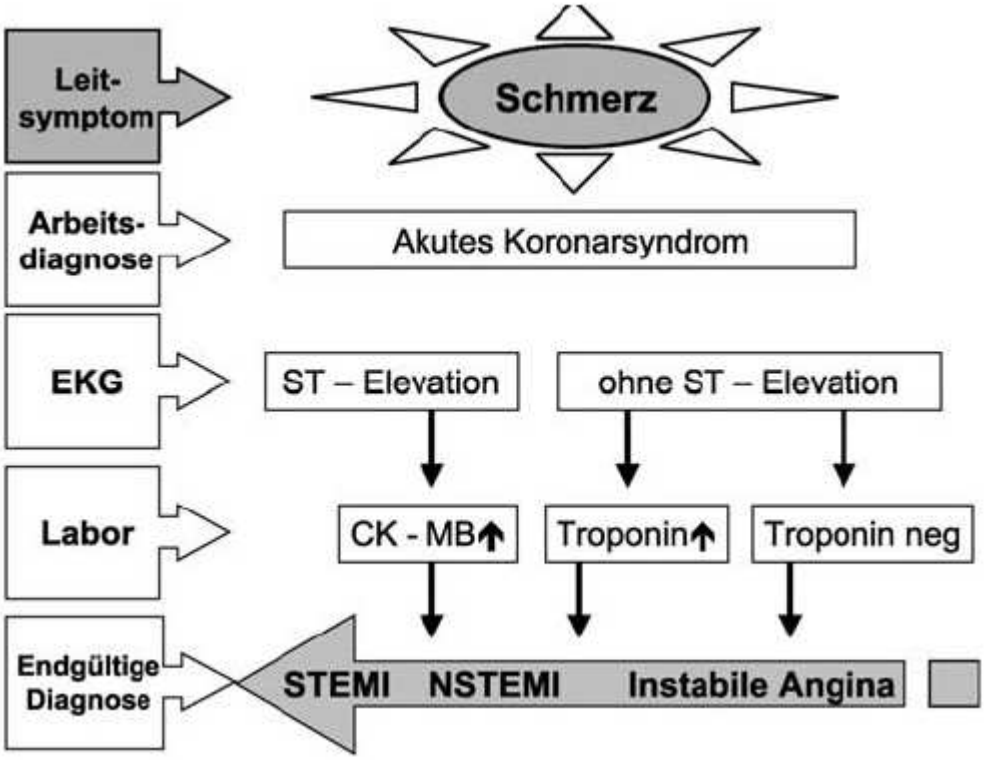

Abbildung 1: Akutes Koronarsyndrom-Terminologie [12]

Die Diagnose eines ST-Hebungsinfarktes (STEMI) wird alleinig durch die Präsenz von ST-Streckenhebungen im EKG bei gleichzeitig bestehender typischer pectanginöser Beschwerdesymptomatik gestellt, nachfolgend kommt es in den meisten Fällen zu einer Erhöhung der Creatinkinase und Creatinkinase- MB Fraktion [12]. Fehlende ST-Streckenhebungen bei positiven Troponin- Laborwerten (>99% Perzentile) führen zur Diagnose eines Nicht-ST-Hebungsinfarkts (NSTEMI). Sind sowohl der EKG- als auch der Laborbefund negativ, wird die Diagnose der Instabilen Angina pectoris gestellt.

Diese Form der Risikostratifizierung hat enorme Konsequenzen auf die sich anschließende Therapie [13-20]. Nach Diagnosestellung eines STEMI sollte eine sofortige katheterinterventionelle Reperfusionstherapie (direkte PTCA) durchgeführt

werden, bei fehlender Möglichkeit der direkten PTCA optional auch eine Thrombolysetherapie. Bei einem NSTE- Akutem Koronarysyndrom sollte zwischen Patienten mit und ohne Risikomerkmale unterschieden werden. Risikomerkmale stellen eine Troponinerhöhung (d.h. NSTEMI), ST-Streckensenkungen >0,1 mV, die hämodynamische Instabilität, eine Rhythmusinstabilität, die refraktäre Angina und der Diabetes mellitus dar. In diesen Fällen wird eine invasive Herzkatheterdiagnostik innerhalb der ersten 48 Stunden- bei Beschwerdepersistenz auch rasch- nach dem Schmerzereignis empfohlen. Bestehen keine Risikomerkmale und verbleibt der Patient beschwerdefrei, so wird nach wiederholter 12-Kanal EKG-Diagnostik und weiterhin fehlendem Risikoprofil eine konservative Therapie angestrebt [11, 21]. Sind im weiteren Verlauf Risikomerkmale oder eine erneute Angina pectoris aufgetreten, so werden auch diese Patienten präferentiell der invasiven Katheterdiagnostik zugeführt. Im anderen Fall sollte eine Ischämiediagnostik erfolgen.

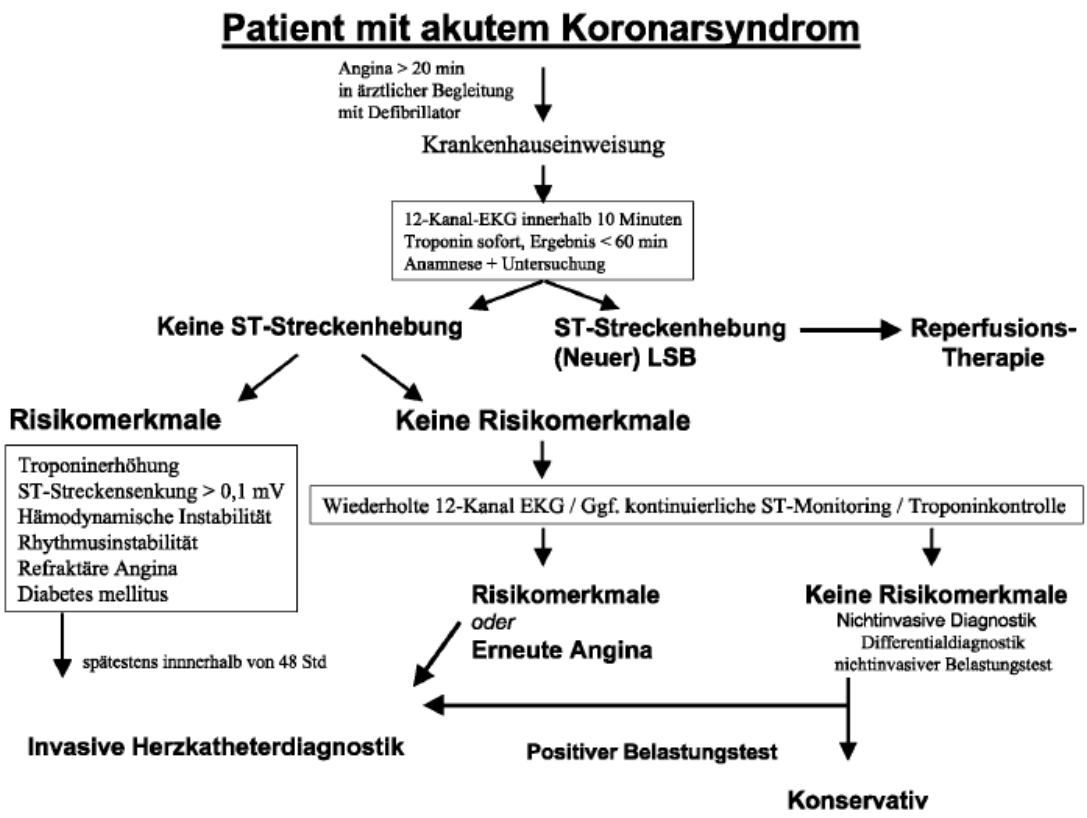

Abbildung 2: Algorithmus zur Diagnosefindung und Risikostratifizierung bei Akutem Koronarsyndrom [12]

1.3 Direkte Perkutane Revaskularisation

Die PCI ist heutzutage der Goldstandard in der Therapie des ST-Hebungsinfaktes. Ihre Überlegenheit wird allerdings durch ein enges therapeutisches Zeitfenster nach dem Infarkt und die in etwa nur 20% der Krankenhäuser gegebenen PCI-Interventionsmöglichkeiten eingeschränkt, so dass die Lysetherapie zu bevorzugen ist, sobald die PCI nicht schnell genug (innerhalb von 2 Stunden nach erstem medizinischen Kontakt) durchgeführt werden kann [12].

Die Indikation für eine PCI wird wie oben angesprochen schon anhand der EKG-Diagnostik gestellt. Das sind bei typischem klinischem Beschwerdebild:

1. ST-Streckenhebung von ≥ 0,1 mV in mindestens zwei zusammenhängenden Extremitätenableitungen, oder
2. ≥ 0,2 mV in mindestens zwei zusammenhängenden Brustwandableitungen, oder
3. Linksschenkelblock mit infarkttypischer Symptomatik

Wegen der zeitlichen Dringlichkeit der Maßnahmen und des fehlenden Anstiegs spezifischer biochemischer Marker (Myoglobin, Troponin T, Troponin I, CKMB) innerhalb der ersten zwei Stunden, darf der laborchemische Nachweis bei Patienten mit ST-Streckenhebungsinfarkt im EKG und typischer Klinik nicht abgewartet werden. Bei Diskrepanz zwischen EKG- Befund und Klinik sollten weitere diagnostische Maßnahmen (z.B. Echokardiographie) aus differentialdiagnostischen Erwägungen zur Entscheidungsfindung hinzugezogen werden.

Prä/ peri- prozedural sollte die Gabe von GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Abciximab, Tirofiban, Eptifibatide) erwogen werden, welche Einfluss auf die Thrombuslast und möglicherweise auch auf die mikrovaskuläre Integrität nehmen können [22-24]. Das Zeitintervall zwischen Aufnahme und Durchführung der PCI sollte nicht länger als 60 min betragen.

Technisch wird zunächst retrograd über die Arteria femoralis (oder A. radialis) ein Führungskatheter eingebracht, der im Ostium des Herzkranzgefäßes zu liegen kommt. Nachfolgend wird ein dünner Draht in das stenosierte Gefäß und über die Stenose/ den Verschluss vorgeführt, um über diesen einen Ballonkatheter einzubringen. Dieser wird

über die verengte Stelle des Gefäßes geführt, der Ballon entfaltet, der somit den Thrombus und die zugrunde liegende Stenose dilatiert [25]. In fast 90% der Fälle gelingt es, den Blutfluss im zuvor verschlossenen Gefäß wieder herzustellen. Die PCI kann bei der Behandlung des akuten Myokardinfarktes in unterschiedlicher Weise eingesetzt werden. Man unterscheidet in:

1. Primär (oder Direkt-) Dilatation, d.h. Ballondilatation als alleinige Therapie ohne eine zusätzliche Lysetherapie
2. Kombination einer Ballondilatation mit einer Fibrinolysetherapie (faciliated PCI):
    a) Akut-PCI: Beginn mit intravenöser Lyse und sofort anschließender PCI
    b) Frühe-PCI: PCI am 1.-2. Tag nach einer Lysetherapie
    c) Späte-PCI: PCI > 2. Tag nach einer Lysetherapie
    d) Rescue-PCI: PCI bei ineffektiver Lysetherapie

Bei dem Konzept der sogenannten „facilitated PCI“ werden derzeit nur die Vorgehensweisen unter 2b) und 2d) verwendet.

Die Infarktsterblichkeit konnte durch die PCI, im Gegensatz zur Fibrinolyse, um relative 25% gesenkt werden, weshalb sich die PCI in der Reperfusionsstrategie durchgesetzt hat [26-29]. Auch das Risiko schwerwiegender intrakranieller Blutungen konnte im Vergleich zur Fibrinolyse um absolute 1% gesenkt werden [26]. Das Re-Infarktrisiko wird durch die PCI um mehr als die Hälfte gesenkt, was als positives Ergebnis auch im Langzeitverlauf erhalten bleibt [27, 30]. Meistens wird die PCI durch eine Stentimplantation ergänzt, wodurch das Risiko der Restenosierung signifikant gesenkt wird [31]. Der Stellenwert Medikamenten- beschichteter Stents im Kontext des

akuten Myokardinfarkts ist aufgrund des potentiellen Risikos von Stent- Thrombosen noch nicht vollständig geklärt.

1.4 Endotheliale Progenitorzellen

Endotheliale Progenitorzellen sind aus dem Knochenmark stammende, sich von CD34+ mononukleären Zellen ableitende Vorläuferzellen, die bei Myokardinfarkt- und KHK-Patienten vermehrt nachgewiesen werden können [32].

Bislang wird davon ausgegangen, dass die Reparatur einer Endothelläsion nach Myokardinfarkt *per continuitatem*, also durch angrenzende Zellen, erfolgt [33]. In den letzten Jahren waren zirkulierende endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark Gegenstand weitergehender Untersuchungen [34, 35].

Primär scheint das Differenzierungs- und Regenerationspotential adulter Stammzellen gewebespezifisch determiniert zu sein. Am Beispiel der Hämatopoese wurde ein dreistufiger, unidirektionaler und irreversibler Reifungsprozess postuliert, der nach eingehenden Untersuchungen jedoch in Frage gestellt wird [36]. Wichtige Befunde stammen aus der Transplantationsmedizin [37-40]. So findet man nach Transplantation eines weiblichen Herzens in einen männlichen Empfänger XY-Kardiomyozyten im Spenderorgan. Somit kann es möglicherweise zur Einwanderung von fremden, also nicht-kardialen, Zellen und zur anschließenden Differenzierung gekommen sein. Dieses Ergebnis lässt die Annahme von zirkulierenden, nicht ortsständigen Zellen zu, die über eine größere Fähigkeit zur Differenzierung verfügen. Experimentelle Untersuchungen, bei denen Stamm- und Progenitorzellen lokal und systemisch im Tiermodell und am

Patienten appliziert wurden, scheinen diese Beobachtungen zu stützen, da eine Regeneration von ischämischem Myokard postuliert wird [41-44]. Allerdings kam es in diesen Fällen nicht nur zu einem myokardialem Zellersatz, sondern auch zu einer verstärkten Angiogenese im geschädigten Gewebe.

Eine bi- direktionale Entwicklung von Stamm- und Progenitorzellen scheint möglich, da es nach Injektion von neuronal geprägten Stammzellen in Skelettmuskel zur Transdifferenzierung dieser Zellen in Skelettmuskelzellen kommt [45].

Diese Erkenntnisse lassen eine veränderte Sichtweise in so fern zu, als dass die Möglichkeit zur Differenzierung einer Zelle mit zunehmender Reifung abnimmt, aber Stammzelleigenschaften bis zu einem gewissen Grad durch humorale Faktoren erneut rekrutierbar sind. Somit könnten de- differenzierte Zellen in einen unreiferen Zustand zurückgeführt werden, um durch Redifferenzierung am Gewebeersatz teilzunehmen [46].

Als gemeinsame Ursprungszelle für Blutzellen und Gefäßwandzellen wird ein Hämangioblast vermutet, da die räumliche und funktionelle Entwicklung dieser Zellen parallel abläuft. Asahara isolierte 1997 anhand von Oberflächenmarkern Angioblasten, die sich in vitro in Endothelzellen und in vivo, nach Transplantation in ischämisches Gewebe, in Zellen der Neoangiogenese differenzierten [34, 47].

1.4.1 Charakterisierung der EPCs

Zur phänotypischen Charakterisierung der EPCs werden spezifische Oberflächenmarker verwendet. Die reifen Zellen verfügen über den Marker CD34 und Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor-2 (VEGFR2 oder KDR), wobei die unreifen Subpopulationen zusätzlich CD133 aufweisen [48-50]. Diese Oberflächenmarker können auch auf embryonalen Angioblasten gefunden werden, was den unreifen Charakter dieser Zellen veranschaulicht. Eine weitere Identifikation kann durch die Fähigkeit der EPCs in Kultur acetyliertes „low density lipoprotein“ (acLDL) aufzunehmen und Lektin binden zu können vorgenommen werden [47, 51]. Langzeitstudien zeigen Proliferationspotential und eine Fähigkeit zur bidirektionalen Differenzierung in hämatopoietische Zellen und Endothelzellen. Anhand ihres Aufenthaltsortes werden weiterhin im Blut zirkulierende (CEP) und ortsständige EPCs im Knochenmark oder Gewebe unterschieden [48]. EPCs und CEPs sind in der Lage koloniebildende Einheiten mit Differenzierungspotential in Endothelzellen zu bilden (so genannte late-out-growth colony-forming units-endothelial cells, CFU-EC). Das unterscheidet sie von abgeschilferten zirkulierenden Endothelzellen (CEC). Schwierig ist die Abgrenzung von CEPs gegenüber Subpopulationen myelomonozytären Ursprungs [52]. Eine klare Unterscheidung zwischen EPCs, CEPs und myelomonozytären Zellen kann beim Menschen nur durch den Oberflächenmarker CD133 erfolgen.

1.4.2 Mobilisation und Regulation der EPCs

EPCs werden durch unterschiedliche Faktoren mobilisiert, wobei die ischämische Gewebsschädigung nach Myokardinfarkt mit an erster Stelle zu nennen ist [49]. Parallel

zu einem signifikanten Anstieg der CD133 und VEGFR2 positiven Zellen findet ein enormer Anstieg der VEGF Konzentration im Plasma statt, dessen Maximum am siebten Tag nach dem Infarktereignis erreicht ist [32]. Im Mäusemodell kann eine erhöhte Anzahl an CEPs im peripheren Blut und eine gesteigerte Neoangiogenese nach Induktion einer Gewebeischämie im Bereich der Hinterläufe beobachtet werden. Auch die exogene Zufuhr von dem Zytokin G-CSF hat positive Effekte auf die Mobilisation von Stamm- und Progenitorzellen [47]. Hormone wie SDF-1, Angiopoetin, PIGF, Erythropoetin und Östrogene tragen ebenso zu einem erhöhten EPC-Spiegel bei, wie HMG-CoA-Reduktase Hemmer und körperliche Bewegung[53-58].

1.4.3 Atherogenese und EPCs

Der für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit wichtige Endothelzellschaden kann durch die Anzahl der endothelialen Mikropartikel (EMP) quantifiziert werden [59], wobei Patienten mit Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie [60], Diabetes mellitus [61], akutem Koronarsyndrom [62] und Myokardinfarkt [63] eine erhöhte EMP-Anzahl aufweisen. Der Endothelschaden und die mangelhafte Regeneration spielen eine wesentliche Rolle für die Ausbildung einer Atherosklerose. Patienten, die nun eine manifeste KHK ausgebildet haben und zusätzlich mit den genannten kardiovaskulären Risikofaktoren behaftet sind, verfügen über eine deutlich reduzierte Anzahl an CEPs [51]. So ist die Migration und Funktionalität von EPCs bei Diabetikern signifikant eingeschränkt [64]. Die vaskuläre Endothelfunktion korreliert mit der Zahl der CFU-EC, die aus den EPCs hervorgehen [65]. Im Tierversuch mit atherosklerotischen ApoE-Knock-out-Mäusen wurden dauerhaft Stammzellen von gesunden Wildtyptieren in die kranken Tiere infundiert, wobei eine Hemmung der Atheroskleroseprogression zu

verzeichnen war. Die Anzahl der EPCs nimmt allerdings mit dem Alter der Mäuse ab [66]. Weitere Untersuchungen an Nagern belegen die Beteiligung der EPCs und CEPs an der Reendothelialisierung [67, 68]. So lassen sich fluoreszenzmarkierte, transplantierte Stammzellen im Bereich von Endothelläsionen nachweisen. Nach Gabe von Statinen nimmt hierbei die Zahl der CEPs noch zu und der Prozess der Reendothelialisierung beschleunigt sich. Assoziiert ist dieser Vorgang mit einer Reduktion der Neointimaausbildung [69].

1.4.4 EPCs, Myokardinfarkt und KHK: Ziele der Arbeit

Patienten mit akutem Myokardinfarkt weisen im Vergleich zu Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung eine größere Anzahl mononukleärer Zellen auf [70]. Gleichzeitig kann auch eine absolute Erhöhung von CD34+ Zellen beobachtet werden. Gleichsam erhöht ist die absolute Anzahl an CD34+ Zellen von Infarktpatienten und Patienten mit stabiler KHK gegenüber gesunden Kontrollgruppen.

Unklar erscheint momentan, ob es im Kontext des akuten Myokardinfarkts zu einer spezifischen Mobilisation von EPCs kommt und ob diese die gleiche funktionelle Potenz aufweisen, wie solche von Patienten mit stabiler KHK.

Ziel dieser Untersuchung war somit, die Anzahl und Funktionalität von EPC im akuten Myokardinfarkt zu beschreiben und weiterhin klinische, laborchemische und angiographische Korrelate einer erhöhten Anzahl an EPC zu identifizieren.

2 Material und Methoden

Die Untersuchung wurde als monozentrische, prospektive Studie an der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums der RWTH Aachen durchgeführt. Das Ethikkomitee der medizinischen Fakultät überprüfte die Studie, alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.1 Patienten

Eine Gesamtanzahl von 80 Patienten wurde in die Analyse eingeschlossen. Zunächst erfolgte der Einschluss von 40 Patienten mit akutem ST- Hebungsmyokardinfarkt (STEMI) und erfolgreicher primärer perkutaner koronarer Intervention (PPCI), die innerhalb der ersten 12 Stunden nach Schmerzereignis erfolgte. Die Kontrollgruppe bestand aus 40 Patienten mit stabiler KHK, bei denen eine elektive PCI einer Koronargefäßläsion durchgeführt worden war. Diese Kontrollgruppe wurde nach drei klinischen Variablen, die signifikant mit der Anzahl an EPC assoziiert sind (Alter, Geschlecht, Statintherapie), der Infarktgruppe zugeordnet.

Bei allen Patienten wurden klinische Basischarakteristika, ein komplettes Labor mit kardialen Markern und der myokardiale „blush grade“ [71] als einen Marker für die myokardiale Reperfusion (mikrovaskuläre Intergrität) bestimmt. Alle klinischen Daten wurden mit den Originalakten abgeglichen und verifiziert.

Kardiale Risikofaktoren wurden wie folgt definiert:

1. Arterielle Hypertonie: Blutdruck ≥140/90 mmHg oder Patienten, welche unter antihypertensiver Therapie stehen.
2. Hypercholesterinämie: Cholesterin ≥160 mg/dl LDL-Cholesterin oder Einnahme von lipidsenkender Medikation. Patienten wurden als „statin-positiv“ bezeichnet, wenn die Therapie mindestens vier Wochen vor Aufnahme in die Klinik begonnen worden war.
3. Diabetes mellitus wurde nach der Klassifikation der American Diabetes Association von 1997 definiert. Diese besagt: Diabetes mellitus bezeichnet eine Gruppe von metabolischen Krankheiten, die durch eine Hyperglykämie charakterisiert ist und auf einem Defekt der Insulinsekretion, Insulinwirkung, oder beidem basiert. Die chronische Hyperglykämie des Diabetes ist assoziiert mit einem Langzeitschaden, Dysfunktion und Versagen verschiedener Organe, besonders der Augen, Nieren, Nerven, Herz und Blutgefäße. Richtwerte zur Feststellung eines Diabetes mellitus sind: Entweder Diabetes spezifische Symptome plus venöse Gelegenheitsblutzuckerkonzentration von ≥200 mg/dl (11.1 mmol/l). Diese ist unabhängig von der Tageszeit und der letzten Nahrungsaufnahme. Die klassischen Diabetessymptome sind Polyurie, Polydipsie und ungewollter Gewichtsverlust. Oder ein Nüchtern-Plasma- Glukosewert von ≥126 mg/dl (7.0 mmol/l), wobei die letzte Nahrungsaufnahme 8 Stunden zurückliegen muß. Oder ein 2- Stunden Wert nach Glukoseaufnahme von ≥200 mg/dl (11.1 mmol/l) während eines OGTT.

2.1.1 Definition ST-Hebungsinfarkt (STEMI)

Ein akuter ST-Hebungsinfarkt (STEMI) wurde folgendermaßen definiert:

1. Typischer pectanginöser Schmerz, der länger als 30 Minuten andauerte
2. ST- Streckenhebung >0,2 mV in ≥2 benachbarten EKG- Ableitungen
3. Totale oder subtotale Lumenokklusion der zugehörigen Koronararterie
4. TIMI Fluss Stadium 0 oder 1 vor der primären PCI
5. Fehlen eines kürzlich aufgetretenem Schädel-Hirn-Traumas oder intrakranieller Blutungen

Bei allen Patienten wurde eine ausführliche Anamnese, eine körperliche Untersuchung, ein 12-Kanal EKG, ein komplettes Labor einschließlich Troponin T Bestimmung (quantitativer ELISA, Roche Diagnostics), eine Koronarangiographie sowie eine Echokardiographie durchgeführt. Als Erstmaßnahme erhielten alle Patienten 500 mg Aspirin, 5000 iE Heparin i.v. und 600 mg Clopidogrel. Die Verwendung eines GP IIb/IIIa Rezeptorantagonisten war abhängig vom Operateur und der individuellen Situation während der Intervention. Die PTCA wurde nach gängigen Techniken durchgeführt, alle Patienten erhielten einen Stent.

2.1.2 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe wurden Patienten herangezogen, bei denen eine elektive koronare Stentimplantation durchgeführt wurde. Bei dieser Gruppe wurden sämtliche Daten erfasst, die bei der Index- (Infarkt) Gruppe ebenfalls erhoben wurden. Aus einer Gruppe

von 250 Patienten wurden 40 Patienen nach den Kriterien und in deren Reihenfolge Alter, Geschlecht, Statintherapie der Indexgruppe zugeordnet.

2.2 Durchführung der PTCA

Die Koronarangiographie wurde mit einer Bildfrequenz von 12,5/s durchgeführt und anschließend erfolgte die Auswertung der Angiogramme off-line mit der Hilfe von QuantCor, CAAS II (Siemens, Erlangen, Germany).

Die Quantifizierung des epikardialen Blutflusses und der myokardialen Reperfusion nahmen zwei unabhängige, erfahrene Kardiologen vor, die gegenüber allen Patientendaten geblindet waren.

Der Blutfluss im LAD/ RCX/ RCA der Koronarien wurde auf zwei verschiedene Arten eingeteilt. Zum einen anhand des „TIMI frame count“ (Thrombolysis in Myocardial Infarction) und zum anderen anhand des myokardialen „blush grade“ auf die in den folgenden Abschnitten noch eingegangen wird.

2.3 Myokardialer „blush grade“ (MBG)

Der myokardiale „blush grade“ bezeichnet eine Methode anhand derer versucht wird die Gewebedurchblutung des Herzmuskels zu klassifizieren. Nach intrakoronarer Applikation von 200 µg Nitroglycerin zur maximalen Gefäßdilatation wird die

Kontrastmittelanreicherung im Herzmuskelgewebe, welches von der rekanalisierten Arterie versorgt wird verglichen.

Der MBG wurde von einem geblindeten, erfahrenem Untersucher anhand des Abschluss- Angiogramms bestimmt und wird wie folgt eingeteilt:

Tabelle 1: Einteilungskriterien des MBG	
Grad 0	Keine Kontrastmittelanreicherung
Grad I	Minimale Kontrastmittelanreicherung
Grad II	Mäßige Kontrastmittelanreicherung, jedoch geringer als im nicht infarzierten Gewebe
Grad III	Normale Kontrastmittelanreicherung, vergleichbar der im nicht infarzierten Gewebe

Es werden vier Grade der Kontrastmittelanreicherung beziehungsweise Durchblutungsgrade definiert. Bei Grad 0 ist im Gewebe keinerlei Kontrastmittel-anreicherung erkennbar. Grad I bezeichnet eine minimale Kontrastmittelanreicherung im zu versorgenden Gewebe. Bei stärkerer Anfärbung des Gebietes, aber immernoch geringerer als in nicht infarzierten Gebieten wird der Grad II vergeben. Entspricht die Blutversorgung und somit die Anfärbung des Gewebes einem nicht infarzierten Gebiet so ist dieses als Grad III definiert [72].

2.4 TIMI „frame count“ (TFC)

Der TIMI „frame count“ (TIMI = Thrombolysis In Myocardial Infarction) basiert auf der visuellen Einschätzung der Kontrastmittelanreicherung in der vom Infarkt betroffenen Arterie. Die Koronarperfusion wird in vier Klassen eingeteilt, um eine semiquantitative Abschätzung zu erreichen [73].

Tabelle 2: TIMI Klassifikation	
TIMI 0	Verschluß mit fehlender Darstellung im distalen Gefäßanteil
TIMI I	Verzögerter Fluss mit inkompletter Darstellung des distalen Gefäßabschnittes
TIMI II	Darstellung des Gefäßes distal der Stenose mit verlangsamten Fluss des Kontrastmittels im Vergleich zu anderen Gefäßanteilen
TIMI III	Normaler Ein- und Ausstrom des Kontrastmittels

Beim Verfahren des TIMI „frame count“ bzw. des korrigierten TIMI „frame counts“ (cTFC) wird versucht, ein objektives Maß der Geschwindigkeit des koronaren Blutflusses zu erhalten. Während des Abschluss- Angiogramms werden pro Sekunde 12,5 Einzelbilder (Frames) aufgenommen. Beim TIMI „frame count“ wird anhand der Anzahl der Einzelbilder des Angiogramms die Zeit bestimmt, die das injizierte Kontrastmittel benötigt, um das Gefäß zu durchfließen. Die Zählung der Bilder beginnt, wenn das Kontrastmittel das gesamte Gefäß ausfüllt. Erreicht das Kontrastmittel einen bestimmten, für das Gefäß definierten und standardisierten Abschnitt, so wird die Zählung des „Frames“ beendet.

Um die natürlichen Längenunterschiede der kürzeren RCA und LCX mit der langen, linken Korornararterie (LAD) vergleichbar zu machen, ist ein Korrekturfaktor notwendig. Die erhaltenen Frames, die man im Angiogramm des LAD gezählt hat, werden durch den Faktor 1,7 dividiert. Dieser Faktor spiegelt das durchschnittliche Längenverhältnis des Frame- Counts von LAD zu RCA bzw. LCX wider.
Um die in Deutschland übliche Bildrate von 12,5 Bildern/ s auf die in den USA übliche Rate von 30 Bilder/ s umzurechnen wird ein weiterer Korrekturfaktor eingesetzt. Hierzu werden alle Werte mit dem Faktor 2,4 multipliziert. Der Normwert für gesunde, nicht behandelte Gefäße liegt somit für den cTFC bei 21,3 Bildern.

2.5 Isolation und Kultur von humanen EPCs

In beiden Gruppen wurde die absolute Anzahl der mononukleären Zellen, die Zahl der EPCs durch FACS Analyse und die An- bzw. Abwesenheit der Colony-forming units (CFU) als funktioneller Marker bestimmt.

EPCs wurden aus 20ml durch Citrat/ Dextrane antikoaguliertem venösem Vollblut isoliert, welches 24 ± 2 Stunden nach koronarer Intervention bei allen Patienten abgenommen worden war. Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden mittels der Biocoll (Biochrom AG) Dichtegradienten- Zentrifugation getrennt, anschließend zweimal in einem Phosphat Saline Puffer (PBS) gewaschen und gezählt. Nach Einbringen der PBMCs in das mikrovaskuläre endotheliale Wachstumsmedium MV2 (PromoCell) wurden T-25 Kulturen mit diesen Zellen beschichtet, welche bereits vorher mit 25 µg/ml humanem Fibronektin (Harbor Bioproducts Inc.) bedeckt waren. Nach vier Tagen wurden alle nicht haftenden Zellen entfernt und frisches Medium

hinzugefügt. Am siebten Tag wurden anhaftende Zellen mittels Accutase (PAA Laboratories) gelöst, gezählt und der weiteren Analyse zugeführt.

2.6 Identifizierung und Quantifizierung der isolierten und zirkulierenden EPCs anhand der Durchflußzytometrie

Zur Aufnahme von 1,1´- dioctadecyl – 3,3,3´,3´- tetramethylindocarbocyanin markiertem Ac-LDL (Dil-Ac-LDL, Cell Systems) wurden die Zellen zwei Stunden lang mit 10 µg/ml Dil-Ac-LDL bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 2% iger Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert und mit 10 µg/ml FITC markiertem Ulex europaeus Agglutinin-I (Lectin, Sigma-Aldrich) eine Stunde lang gebeizt [51, 64, 74]. Die Zellen wurden durch die Verwendung von geeigneter Fluoreszenzkompensation und Streulichteinlass im FACScalibur- Durchflußzytometer (Becton Dickinson) gemessen. Die Analyse wurde unter Verwendung von Fluoreszenz-1/ Fluoreszenz-2 Punktdiagramm Quadranten Statistik und manuellem Durchlass (Cell Quest Pro Software, Becton Dickson) durch eine geblindete, randomisierte Vorgehensweise durchgeführt. Dabei wurden Patientencharakteristika und Statineinnahme berücksichtigt. Der Prozentsatz der Dil- Ac- LDL/ Lektin doppelt-positiven EPCs wurde bestimmt und verwendet um die absolute EPC Anzahl unter allen anhaftenden (d.h. kultivierten) Zellen zu berechnen. Die absolute EPC Anzahl wurde auf die Gesamtmenge der Blutentnahme bezogen (EPC/µl). Diese Zahl wurde anschließend in Bezug gesetzt zur Menge der PBMCs in der entsprechenden Blutmenge und ausgedrückt als relative EPC Anzahl (EPCs/ PBMCs).

2.7 Quantifizierung koloniebildender Einheiten: „CFU Assay“

Am siebten Tag in Kultur wurden die EPCs unter dem Phasenkontrastmikroskop ausgewertet und hinsichtlich ihrer spindelförmigen Erscheinung und der Fähigkeit, Kolonie-Formierende Einheiten (CFUs) zu entwickeln, charakterisiert. EPC- CFUs bestanden aus einem zentralen Kern, überwiegend kugelförmiger Zellen, umgeben von länglich wachsenden Zellen. Zusätzlich wurde am fünften Tag ein spezieller EPC- CFU Assay mit dem EndoCult™ Flüssigmediumkit (Stem Cells Technologies) laut Protokoll des Herstellers durchgeführt.

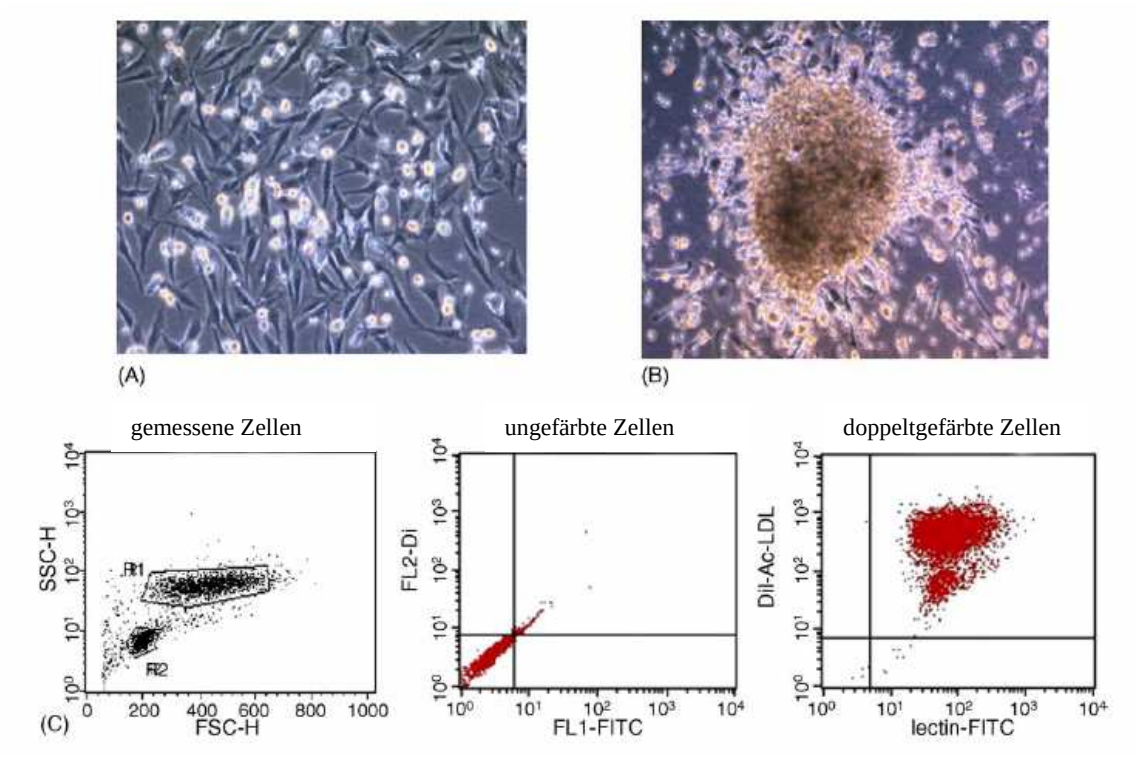

Abbildung 3: Charakterisierung von isolierten EPCs. (A) Spindelförmige Zellen nach 7 Tagen Kultivierung. (B) Kolonie- bildende Einheiten mit einem zentralen Kern und länglich wachsenden Zellen in der Peripherie. (C) Messung von adaptierten Zellen mittels der Durchflusszytometrie. Die graphische Punktanalyse im Streudiagramm (FSC/ SSC) zeigt zwei Populationen (gates R1 und R2, linkes Diagramm). Zellen im Bereich R1 positiv gefärbt mittels Dil-Ac-LDL/ Lektin (rechtes Diagramm), verglichen mit ungefärbten Kontrollen (mittleres Diagramm), wurden als EPCs bezeichnet. [75]

3 Ergebnisse

Die Koronare Intervention war bei allen Patienten erfolgreich. Ein Vergleich zwischen grundlegenden klinischen, Labor- und cEPC- Charakteristika, bei Patienten mit stabiler KHK und akutem STEMI zeigt Tabelle 1. Aufgrund des Zuordnungsprozesses waren kardiovaskuläre Risikofaktoren und die Geschlechtsverteilung in beiden Gruppen nahezu identisch. Die Gesamtanzahl an Leukozyten, mononukleären Zellen und cEPCs war in der STEMI Gruppe höher, wohingegen die cEPC/ MO Rate und die Menge der Kolonie-Formierenden Einheiten geringer war, verglichen mit den Patienten mit stabiler KHK.

3.1 Grundlegende klinische, Labor- und EPC Charakteristika

Tabelle 3: Grundlegende klinische, Labor- und EPC Charakteristika bei Patienten mit STEMI (ST-elevation myocardial infarction) und KHK (Koronare Herzkrankheit)

	Akuter STEMI	Stabile KHK	Signifikanz
Anzahl der Patienten	40	40	
Alter (Jahre)	60±13	62±12	n.s.
Männlich	32 (80%)	32 (80%)	n.s.
Diabetes mellitus	7 (18%)	7 (18%)	n.s.
Arterieller Hypertonus	26 (65%)	26 (65%)	n.s.
Hypercholesterinämie	38 (95%)	37 (93%)	n.s.
Statineinnahme	36 (90%)	36 (90%)	n.s.
Raucheranamnese	30 (75%)	30 (75%)	n.s.
Leukozyten/ µl	12550± 4232	8329± 3148	<0,05
CRP Aufnahme (mg/dl)	31.3± 47.4	8.3± 3.5	<0,01
TrT Aufnahme (U/l)	1.07± 3.67	n.a.	n.a.
CK Aufnahme (U/l)	997± 1830	68± 29	<0,01
CK max. (U/l)	3342± 2432	n.a.	n.a.
EPC Anzahl (per µl)	1 078 260±508994	683 435±353468	<0,05
EPC/ MO Verhältnis	0.028± 0.022	0.041± 0.065	<0,05
Koloniebildende Einheiten	8 (20%)	16 (40%)	<0,05

n. a. nicht bei allen Patienten bestimmt; n.s. nicht signifikant; Definition: Arterieller Hypertonus: Blutdruck ≥ 140/90 mmHg, oder Einnahme antihypertensiver Medikation. Hypercholesterinämie: ≥160 mg/dl Low-density Lipoprotein Cholesterin, oder Einnahme von lipidsenkender Medikation; CRP – C-reaktives Protein, TrT – Troponin T, CK – CreatinKinase, MO – mononukleäre Zellen

In beiden Gruppen befanden sich jeweils 40 Patienten, die im Mittel 60± 13 bzw. 62± 12 Jahre alt waren.

Bei den laborchemischen Befunden konnten signifikante Unterschiede ermittelt werden. Die Leukozytenanzahl betrug 12550/µl± 4232 in der Gruppe der Infarktpatienten und 8329/µl± 3148 in der Gruppe der KHK- Patienten ($p<0,05$). Auch der CRP- Wert unterscheidet sich mit 31,3 mg/dl ± 47,4, in der STEMI- Gruppe, und 8,3 mg/dl± 3,5 in der KHK- Gruppe signifikant von einander ($p<0,01$). Als Ausmaß für die myokardiale Schädigung wurde die Kreatinkinase bestimmt, die bei den Infaktpatienten 997 U/l ± 1830 und bei den KHK- Patienten 68 U/l± 29 beträgt ($p<0,01$). Die EPC Gesamtanzahl von 1 078 260/ µl±508994 ist auf Seite der STEMI- Gruppe im Gegensatz zu 683 435/ µl± 353468 auf der Seite der KHK- Gruppe ebenfalls signifikant höher ($p<0,05$).

Genau umgekehrt verhält es sich in Bezug auf die relative EPC Anzahl und die CFU-Gesamtmenge. Hier liegt das EPC/ MO Verhältnis mit 0,041± 0,065 bei den KHK-Patienten signifikant höher als bei der STEMI- Patientengruppe mit 0,028± 0,022 ($p<0,05$). Gleiches gilt für die Anzahl der ausgewerteten CFUs. Diese sind mit 16 (40%) im KHK- Kollektiv signifikant höher als im STEMI- Kollektiv mit lediglich 8 (20%) ($p<0,05$).

Tabelle 4: Grundlegende klinische, Labor- und EPC Charakteristika bei Patienten mit einer hohen und niedrigen EPC Anzahl

	Niedrige EPC Anzahl	Hohe EPC Anzahl	Signifikanz
Anzahl der Patienten	20	20	
Alter (Jahre)	62±14	59±15	n.s.
Diabetes mellitus	3 (15%)	4 (20%)	n.s.
Arterieller Hypertonus	12 (60%)	14 (70%)	n.s.
Hypercholesterinämie	20 (100%)	18 (90%)	n.s.
Statineinnahme	17 (85%)	19 (95%)	n.s.
CRP Aufnahme (mg/dl)	36.5± 59.1	26.1± 33.3	n.s.
TrT Aufnahme (U/l)	1.86± 5.2	0.36± 1.0	<0,05
CK Aufnahme (U/l)	1458± 2485	559± 893	<0,05
CK max. (U/l)	3291± 2345	3393± 2577	n.s.
EPC Anzahl (per µl)	714584±209136	1441936±457826	<0,05
EPC/ MO Verhältnis	0.016± 0.013	0.039± 0.044	<0,05
Koloniebildende Einheiten	3 (15%)	6 (30%)	<0,05

n. a. nicht bei allen Patienten bestimmt; n.s. nicht signifikant; Definition: Arterieller Hypertonus: Blutdruck ≥ 140/90 mmHg, oder Einnahme antihypertensiver Medikation. Hypercholesterinämie: ≥160 mg/dl Low-density Lipoprotein Cholesterin, oder Einnahme von lipidsenkender Medikation; CRP – C-reaktives Protein, TrT – Troponin T, CK – CreatinKinase, MO – mononukleäre Zellen

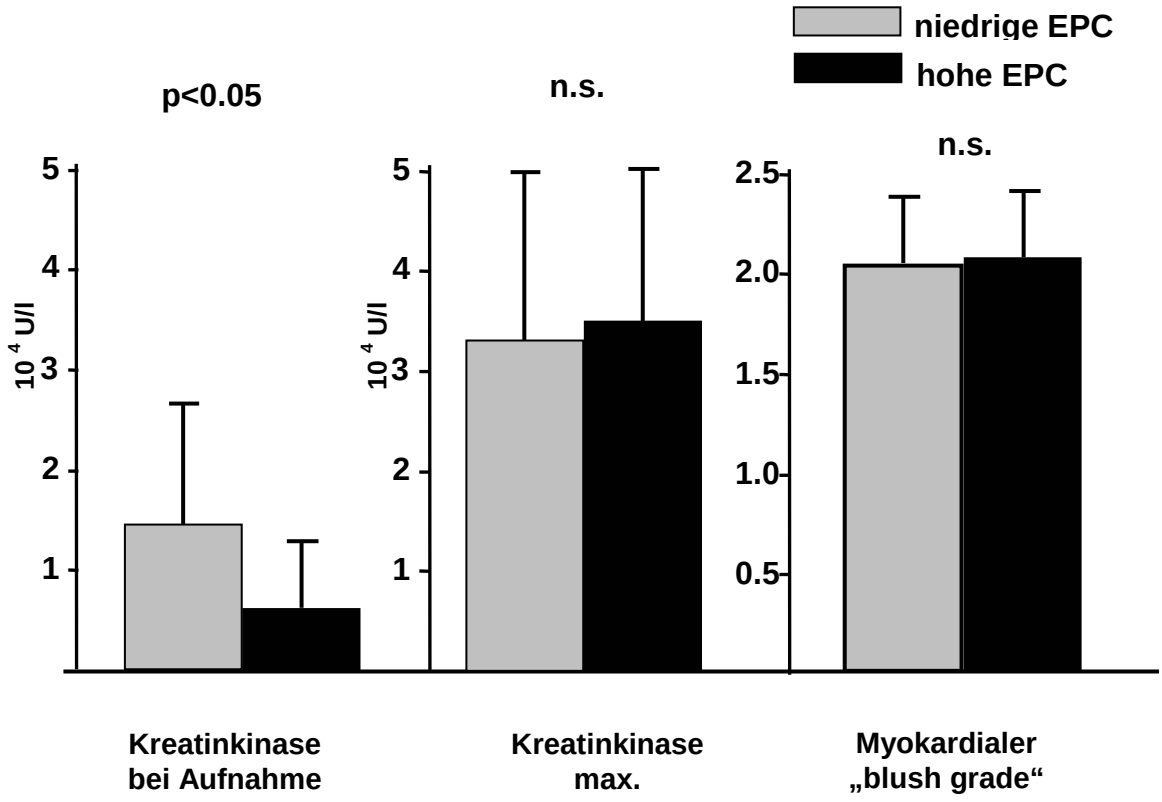

Abbildung 4: Unterschiede in der CK bei Aufnahme, der maximalen CK sowie dem myokardialen „blush grade“ bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und hoher oder niedriger EPC-Zahl

Patienten mit einem akuten STEMI wurden in einem weiteren Schritt geteilt in eine Gruppe mit hohem cEPC- Wert (cEPC Anzahl über dem Median) und in eine Gruppe mit einem niedrigen cEPC- Wert (cEPC Anzahl unter dem Median) (Tabelle 4). Diese unterscheiden sich sowohl in der Gesamt- EPC- Anzahl mit 714 584/ µl ±209136, in der Gruppe der Patienten mit niedrigen EPC- Werten, gegenüber 1 441 936/ µl ±457826 in der Gruppe der Patienten mit hohen EPC- Werten signifikant ($p < 0,05$) voneinander, als auch im EPC/ MO Verhältnis (0,016 niedrige EPC Anzahl zu 0,039 hohe EPC Anzahl).

In der Gruppe der Patienten mit einer niedrigen EPC- Anzahl ist die Menge der Kolonie- bildenden- Einheiten mit 3 signifikant geringer, als in der Gruppe der Infarktpatienten mit einer hohen EPC- Anzahl (6).

Trotz der Tatsache, dass die Patienten mit einer hohen EPC Anzahl einen signifikant geringeren CK- Wert bei Aufnahme hatten, unterschieden sich die maximale CK und der myokardiale „blush grade“ nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen.

Tabelle 5: Grundlegende klinische, Labor- und EPC Charakteristika in Abhängigkeit vom Aufnahme Troponin T (über vs. unter Median)

	Niedriges Troponin T bei Aufnahme	Hohes Troponin T bei Aufnahme	Signifikanz
Anzahl der Patienten	20	20	
Diabetes mellitus	4 (20%)	3 (15%)	n.s.
Arterieller Hypertonus	14 (70%)	13 (65%)	n.s.
Hypercholesterinämie	10 (50%)	14 (70%)	n.s.
Raucheranamnese	13 (65%)	11 (55%)	n.s.
CRP Aufnahme (mg/dl)	10,7±8,2	51,15±61,35	<0,05
TrT Aufnahme (U/l)	0,01±0,01	2,02±4,92	<0,01
CK Aufnahme (U/l)	632±1564	1345±2119	<0,05
CK max. (U/l)	2843±2419	3841±2403	n.s.
EPC Anzahl (per µl)	1044338±404937	1112182±604473	n.s.
EPC/ MO Verhältnis	0,03±0,02	0,03±0,03	n.s.
Koloniebildende Einheiten	0,25	0,16	n.s.

n. a. nicht bei allen Patienten bestimmt; n.s. nicht signifikant; Definition: Arterieller Hypertonus: Blutdruck ≥ 140/90 mmHg, oder Einnahme antihypertensiver Medikation. Hypercholesterinämie: ≥160 mg/dl Low-density Lipoprotein Cholesterin, oder Einnahme von lipidsenkender Medikation; CRP – C-reaktives Protein, TrT – Troponin T, CK – CreatinKinase, MO – mononukleäre Zellen

In Tabelle 5 wurde das Patientenkollektiv der Infarktpatienten in eine Gruppe unterteilt, in der sich jeweils 20 Patienten mit einem hohen und 20 Patienten mit einem niedrigen Troponin (TrT) bei Aufnahme gegenüber stehen. Die Werte für die EPCs, wie Gesamt-EPC- Anzahl, EPC/ MO Verhältnis und koloniebildende Einheiten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

3.1.1 Grundlegende klinische, Labor- und EPC Charakteristika, Überlebende vs. Tote

Die 30- Tages Mortalität bei Patienten mit STEMI betrug 9%. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in klinischen oder Laborparametern zwischen Überlebenden und Toten.

4 Diskussion

Trotz einer zunehmenden Anzahl klinischer Untersuchungen bezüglich der Sicherheit und Wirksamkeit einer Therapie mit endothelialen Progenitorzellen im akuten Myokardinfarkt ist die Physiologie der cEPC Mobilisation im klinischen Kontext noch nicht gänzlich geklärt. Insbesondere ist der relative Anteil der cEPCs im Vergleich zu anderen mononukleären, inflammatorischen Zellen im Hinblick auf adaptive und regenerative Vorgänge nach einem akuten Infarkt noch nicht vollständig verstanden. Ziel dieser Untersuchung war daher, die Gesamtmenge und die Funktionalität der cEPCs bei Patienten mit akutem ST- Hebungsinfarkt gegenüber Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit in einer Paargruppenanalyse zu evaluieren.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen:

1. Bei Patienten mit STEMI kommt es zu einer gleichartigen Mobilisation von mononukleären Zellen und von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (EPC).
2. Akut mobilisierte EPCs von Patienten mit STEMI sind funktionell weniger potent als solche von Patienten mit stabiler KHK.
3. Eine höhere EPC Anzahl geht möglicherweise mit einem geringeren myokardialen Schaden zum Zeitpunkt der Untersuchung einher.
4. Eine vorher angenommene Assoziation zwischen der EPC Anzahl und dem Grad der myokardialen Reperfusion im Bereich der erfolgreich rekanalisierten infarktabhängigen Arterie konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden.

Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen im akuten Myokardinfarkt

Das Konzept der Zelltherapie (z.B. Stammzellen, endotheliale Progenitorzellen) zur Therapie des (akuten) Myokardinfarkts hat in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit erzeugt [76]. Nach einer Reihe experimenteller Arbeiten haben klinische Untersuchungen in diesem Kontext konträre Ergebnisse erbracht [77]. Zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Bedeutung sowie des therapeutischen Potentials von EPCs im Kontext des akuten Myokardinfarkts erscheint es zunächst jedoch notwendig, das Ausmaß der Mobilisation von EPCs im Infarkt weitergehend zu untersuchen.

Eine Anzahl von Arbeiten an weitgehend kleinen Patientenkollektiven hat in den vergangenen Jahren einen Anstieg von cEPCs im Infarkt gegenüber Kontrollkollektiven (z.B. gesunde Kontrollen oder Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung) aufzeigen können. Wichtige Ergebnisse liefert die Übersichtsarbeit von Boos aus dem Jahre 2006, „Circulating endothelial cells in cardiovascular disease“ [78]. Das Maximum einer EPC Mobilisation scheint, Shintani folgend, nach 7 Tagen vorzuliegen [32, 79], wobei Massa mit seiner Arbeitsgruppe analysierte, dass bis zu 2 Monate nach Infarkt EPCs noch immer messbar erscheinen [79].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proben im Mittel 24±2 Stunden nach Infarkt abgenommen. Auch hier zeigten sich, gegenüber einem Kontrollkollektiv mit stabiler koronarer Herzerkrankung, signifikant höhere EPC Zahlen im peripheren Blut. Bislang war jedoch nicht vollständig geklärt, ob es im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts zu einer spezifischen (exklusiven) Mobilisation kompetenter EPCs gegenüber anderen mononukleären Zellen kommt. Ein solcher Befund würde das therapeutische Potential von EPCs weitergehend unterstützen.

Die vorliegende Arbeit konnte aber nun zeigen, dass im akuten ST-Streckenhebungsinfarkt zwar signifikant mehr cEPCs im Blut der Patienten vorhanden sind, als bei Patienten mit stabiler KHK, hier jedoch kein exklusiver Anstieg von cEPCs zu beobachten ist. Vielmehr ist eine Erhöhung der gesamten mononukleären Zellen zu sehen, wobei die Mobilisation der EPCs im Gegensatz zu mononukleären Zellen sogar unterproportional erfolgt. Zu ganz ähnlichen Ergebnissen sind Gaspardone und Mitarbeiter in einer unlängst publizierten Arbeit gekommen [70]. Er beschreibt in dieser, dass schon allein die Arteriosklerose bei Patienten mit stabiler KHK einen ausreichenden Trigger für die Mobilisation der EPCs darstellt. Er postuliert desweiteren, dass der Prozentsatz der cEPCs abhängig sein muss von einem tonischen Gefäßprozess, hervorgerufen durch chronische Stimuli wie Hypertonus, Diabetes mellitus, familiäre Veranlagung und chronischen inflammatorischen Stimuli. Diese tonische Mobilisation könnte ihm zufolge äußerst hilfreich sein für den Langzeitumsatz und den Ersatz von geschädigten vaskulären Zellen. Die Befunde deuten zusammenfassend auf eine fehlende Spezifität in der Mobilisierung sowie auch des therapeutischem Potentials von EPCs im Kontext des STEMI hin.

Funktionelle Kompetenz mobilisierter EPC

Neben der Anzahl mobilisierter EPCs ist für die pathophysiologische Bedeutung, wie aber auch das therapeutische Potential, die funktionelle Kompetenz von großer Bedeutung. Hierzu finden sich in der Literatur nur wenige Befunde. Während in einer Arbeit die Bildung von EPC Clustern bei Patienten im akuten Infarkt signifikant über der von Kontrollpersonen lag [79], weisen andere Daten darauf hin, dass die Kapazität zur Bildung von EPC Kolonien von Tag 1 zu Tag 7 noch signifikant ansteigt [32].

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich einerseits eine unterproportionale Mobilisation von EPCs gegenüber Patienten mit stabiler KHK. Andererseits zeigte sich, dass Patienten mit einer stabilen KHK signifikant mehr Kolonie- bildende Einheiten bilden, als Patienten mit akutem Infarkt an Tag 1.

Diese Beobachtung kann einerseits Folge des gewählten Abnahmezeitpunkts sein, da sich das Maximum an Kolonie- bildenden Einheiten erst an Tag 7 zeigt [32]. Andererseits kann dieser Befund die fehlende Spezifität der mobilisierten EPCs im Kontext des akuten Infarkts weitergehend unterstützen und das therapeutische Potential in Frage stellen.

In Abhängigkeit von der Zeitdauer scheinen unterschiedliche Gruppen von EPCs synthetisiert zu werden. Nur die „langsam“ gebildeten EPCs sind in der Lage hochpotent zu fungieren. Somit scheint die Prognose der Patienten primär nicht von der Gesamtzahl der EPCs, sondern eher von der Funktionalität der Zellen abhängig zu sein. Die alleinige Bestimmung der Menge an EPCs im peripheren Blut lässt somit wohl keine Aussage bezüglich der Prognose des Patienten zu. Entscheidend ist eher die Frage, ob diese Zellen langsam mobilisiert wurden und somit potenter sind.

Potentielle Myokard- protektive Effekte von EPC

Die potentiellen Mechanismen, über welche EPCs protektive Effekte im Rahmen des akuten Myokardinfarkts ausüben können sind mannigfaltig. Vorangegangene Studien konnten einen Zusammenhang zwischen protektiven Effekten hinsichtlich der Infarktgröße durch eine höhere Anzahl an EPC zeigen, wobei die EPCs wahrscheinlich die Neovaskularisation stimulieren und positive Effekte auf das ventrikuläre Remodeling ausüben. Desweiteren konnte Namaguchi zeigen, dass auch die

Ejektionsfraktion gesteigert und das linksventrikuläre- endsystolische Volumen reduziert wird [80].

Die Annahme, dass die Gesamtanzahl der mobilisierten EPCs einen positiven Effekt auf das Ausmaß der myokardialen Schädigung ausübt, konnte in unserer Untersuchung nicht bestätigt werden. Als Parameter für das Ausmaß der myokardialen Schädigung wurden CRP, TrT, und die CK- Werte, sowohl bei Aufnahme, als auch im Maximum bestimmt. Es zeigte sich zwar durchschnittlich eine signifikant niedrigere myokardiale Schädigung bei Aufnahme in jener Patientengruppe mit EPC Zahlen über dem Mittel. Diese Beobachtung ist aber bei dem relativ kleinen Patientenkollektiv wahrscheinlich auf einige wenige Patienten mit sehr hoher CK bei Aufnahme in der „niedrig EPC Gruppe“ zurück zu führen. Das Ausmaß der maximalen myokardialen Schädigung war jedoch in beiden Gruppen gleichartig. Aufgrund einer fehlenden systematischen Nachbeobachtung können in dieser Arbeit leider keine Aussagen zu dem oben angesprochenen Aspekt des positiven Remodelings getroffen werden.

Bedeutung endothelialer Progenitorzellen für den Erfolg der myokardialen Reperfusion

Die Wiederherstellung eines suffizienten Blutflusses im Bereich der Infarktarterie stellt eine prinzipielle Forderung in der Therapie des akuten Myokardinfarktes dar („Open artery hypothesis“) [81]. Nachfolgend hat sich jedoch ebenso gezeigt, dass eine verminderte myokardiale Reperfusion trotz offener Infarktarterie unter anderem zu einem ungünstigen ventrikulären Remodeling führen kann und somit letztendlich auch die Prognose des Patienten entscheidend bestimmt [72]. Die Messung des myokardialen „blush grade“ erlaubt die Abschätzung der myokardialen Reperfusion. In der hier

durchgeführten Studie zeigte sich kein Einfluss der EPC Anzahl oder Funktionalität auf das Ausmaß der myokardialen Reperfusion. Diese Befunde lassen vermuten, dass aufgrund der fehlenden Beeinflussung von Infarktgröße sowie der myokardialen Reperfusion die Bedeutung von EPCs im Kontext des akuten, erfolgreich reperfundierten ST- Elevationsmyokardinfarkts gering ist.

5 Limitationen

In unserer Arbeit konnten neue Erkenntnisse bezüglich der EPC Funktionen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt gewonnen werden. Dennoch weist diese Untersuchung intrinsische Limitationen auf, die erwähnt werden sollten.

Die Kontrollgruppe der KHK Patienten bestand aus 250 Patienten die alle einer PCI zugeführt wurden. Die Dauer der pectanginösen Beschwerden und somit der zugrunde liegenden koronaren Herzerkrankung war nicht bekannt. Besteht die Symptomatik längere Zeit, ist auch potentiell von einer verstärkten Neoangiogenese des chronisch ischämischen Myokardareals auszugehen. Hingegen werden möglicherweise bei einer „de novo“ Angina und zeitnaher Katetherintervention neoangiogenetische Prozesse keine größere Rolle in diesem Kontext spielen.

Alle Patienten der KHK Kontrollgruppe wurden nach 3 relevanten Kriterien der EPC Mobilisation (Alter, Geschlecht, Statineinnahme) der Infarktgruppe zugeordnet. Über diese 3 essentiellen Parameter hinaus existieren weitere Einflussgrößen wie z.B. die Anzahl der Gefäßerkrankungen, die Einnahme von Hormonpräparaten oder die körperliche Konstitution. Es korrelierte zwar grundsätzlich die Gesamtmenge der weiteren Risikofaktoren wie Diabetes mellitus oder Hypercholesterinämie innerhalb beider Gruppen. Der Zuordnungsprozess basierte aber prinzipiell nicht auf allen Determinanten der EPC Mobilisation.

Unsere Daten basieren auf der Blutentnahme 24±2 h nach der PCI. Das Maximum nach 7 Tagen oder das weitere Verhalten der EPCs 1-2 Monate später wurde nicht untersucht, obwohl die EPCs dann immer noch nachweisbar sind. Die Gesamtmenge der Kolonie-

bildenden- Einheiten ist in der KHK Gruppe signifikant höher als in der Infarktgruppe. Es lässt sich allerdings keine Aussage darüber treffen, ob dieses Verhältnis auch nach längerer Zeit bestehen bleibt.

Ein weiterer Aspekt der fehlenden systematischen Nachuntersuchung ist die, in der Diskussion bereits angesprochene, niedrigere myokardiale Schädigung in der Gruppe der Patienten mit einer hohen EPC Anzahl unter den Infarktpatienten. Da sich jeweils nur 20 Patienten gegenüberstehen, ist nicht ausuzuschliessen, dass einige wenige unter den „niedrig EPC“ Patienten über eine extrem hohe CK bei Aufnahme verfügt haben und das Ergebnis dem „sampling error“ bei kleiner Stichprobengröße zuzuschreiben ist.

6 Zusammenfassung

Die Rolle der EPCs im Kontext des akuten Myokardinfarkts ist nicht vollständig geklärt und daher Gegenstand intensiver Forschungsaktivitäten. Unklar erscheint momentan im Besonderen, ob es zu einer spezifischen Mobilisation von EPCs kommt und ob diese die gleiche funktionelle Potenz aufweisen, wie solche von Patienten mit stabiler KHK. Ziel dieser Untersuchung war daher, die Anzahl und Funktionalität von EPC im akuten Myokardinfarkt zu beschreiben und weiterhin klinische, laborchemische und angiographische Korrelate einer erhöhten Anzahl an EPC zu identifizieren.

In diese Arbeit eingeschlossen wurden 40 Patienten mit akutem ST- Hebungsinfarkt und als Kontrollgruppe 40 Patienten mit stabiler KHK. Bei allen Patienten wurde eine erfolgreiche PTCA und Stentimplantation durchgeführt. Die Zuordnung beider Gruppen erfolgte über die Kriterien des Alters, des Geschlechts und der Statineinnahme als Determinanten der physiologischen EPC Mobilisation.

Im Ergebnis zeigte sich, dass es bei Patienten mit STEMI zu einer gleichartigen Mobilisation von mononukleären Zellen und zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (EPC) kommt und dass vor allem akut mobilisierte EPCs von Patienten mit STEMI funktionell weniger potent als solche von Patienten mit stabiler KHK sind. Weiterhin ließ sich zeigen, dass eine vorher postulierte Assoziation zwischen der EPC Anzahl und dem Grad der myokardialen Reperfusion im Bereich der erfolgreich rekanalisierten infarktabhängigen Arterie nicht besteht.

Zusammenfassend scheint daher die Unspezifität der physiologischen EPC Mobilisation im akuten Infarktgeschehen das Konzept einer spezifischen EPC Therapie in diesem Kontext nicht zu unterstützen. Weitere grundlagenwissenschaftliche Untersuchungen werden notwendig sein, um das therapeutische Potential der EPCs weitergehend zu evaluieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Erhardt, L. and F.D. Hobbs, *Public perceptions of cardiovascular risk in five European countries: the react survey.* Int J Clin Pract, 2002. **56**(9): p. 638-44.
2. Bundesamt, S., *Todesursachenstatistik.* 2006.
3. WHO, *WHO technical report series.* 1957.
4. Herold, G., *Innere Medizin.* 2003.
5. Riede, U., *Allgemeine und spezielle Pathologie.*
6. Holmvang, L., et al., *Relative contributions of a single-admission 12-lead electrocardiogram and early 24-hour continuous electrocardiographic monitoring for early risk stratification in patients with unstable coronary artery disease.* Am J Cardiol, 1999. **83**(5): p. 667-74.
7. Kaul, P., et al., *Prognostic value of ST segment depression in acute coronary syndromes: insights from PARAGON-A applied to GUSTO-IIb. PARAGON-A and GUSTO IIb Investigators. Platelet IIb/IIIa Antagonism for the Reduction of Acute Global Organization Network.* J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(1): p. 64-71.
8. Savonitto, S., et al., *Prognostic value of the admission electrocardiogram in acute coronary syndromes.* Jama, 1999. **281**(8): p. 707-13.
9. Braunwald, E., *Unstable angina. A classification.* Circulation, 1989. **80**(2): p. 410-4.
10. Hamm, C.W. and E. Braunwald, *A classification of unstable angina revisited.* Circulation, 2000. **102**(1): p. 118-22.
11. Hamm, C.W., *[Guidelines: acute coronary syndrome (ACS). 1: ACS without persistent ST segment elevations]*. Z Kardiol, 2004. **93**(1): p. 72-90.
12. Hamm, C.W., *[Guidelines: Acute coronary syndrome (ACS). II: Acute coronary syndrome with ST-elevation]*. Z Kardiol, 2004. **93**(4): p. 324-41.
13. Smith, S.C., Jr., et al., *ACC/AHA guidelines for percutaneous coronary intervention (revision of the 1993 PTCA guidelines)-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee to revise the 1993 guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty) endorsed by the Society for Cardiac Angiography and Interventions.* Circulation, 2001. **103**(24): p. 3019-41.

14. Morey, S.S., *ACC and AHA update guidelines for coronary angiography. American College of Cardiology. American Heart Association.* Am Fam Physician, 1999. **60**(3): p. 1017-20.
15. *Guideline for the management of patients with acute coronary syndromes without persistent ECG ST segment elevation. British Cardiac Society Guidelines and Medical Practice Committee and Royal College of Physicians Clinical Effectiveness and Evaluation Unit.* Heart, 2001. **85**(2): p. 133-42.
16. Diderholm, E., et al., *ST depression in ECG at entry indicates severe coronary lesions and large benefits of an early invasive treatment strategy in unstable coronary artery disease; the FRISC II ECG substudy. The Fast Revascularisation during InStability in Coronary artery disease.* Eur Heart J, 2002. **23**(1): p. 41-9.
17. Pepine, C.J., et al., *ACC/AHA guidelines for cardiac catheterization and cardiac catheterization laboratories. American College of Cardiology/American Heart Association Ad Hoc Task Force on Cardiac Catheterization.* Circulation, 1991. **84**(5): p. 2213-47.
18. Braunwald, E., et al., *ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction--summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina).* J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(7): p. 1366-74.
19. Schuster, S., et al., *[Use of coronary angiography after acute myocardial infarction in Germany: a comparison of daily clinical practice with international guidelines. MITRA Study]*. Z Kardiol, 1999. **88**(10): p. 795-801.
20. Scanlon, P.J., et al., *ACC/AHA guidelines for coronary angiography. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee on Coronary Angiography). Developed in collaboration with the Society for Cardiac Angiography and Interventions.* J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(6): p. 1756-824.
21. Patel, D.J., et al., *Early continuous ST segment monitoring in unstable angina: prognostic value additional to the clinical characteristics and the admission electrocardiogram.* Heart, 1996. **75**(3): p. 222-8.

22. van den Merkhof, L.F., et al., *Abciximab in the treatment of acute myocardial infarction eligible for primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. Results of the Glycoprotein Receptor Antagonist Patency Evaluation (GRAPE) pilot study.* J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(6): p. 1528-32.
23. Cutlip, D.E., et al., *Emergency room administration of eptifibatide before primary angioplasty for ST elevation acute myocardial infarction and its effect on baseline coronary flow and procedure outcomes.* Am J Cardiol, 2001. **88**(1): p. A6, 62-4.
24. Lee, D.P., et al., *Adjunctive platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibition with tirofiban before primary angioplasty improves angiographic outcomes: results of the TIrofiban Given in the Emergency Room before Primary Angioplasty (TIGER-PA) pilot trial.* Circulation, 2003. **107**(11): p. 1497-501.
25. Thieme, *Innere Medizin.*
26. Keeley, E.C., J.A. Boura, and C.L. Grines, *Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials.* Lancet, 2003. **361**(9351): p. 13-20.
27. Zijlstra, F., et al., *Long-term benefit of primary angioplasty as compared with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction.* N Engl J Med, 1999. **341**(19): p. 1413-9.
28. Weaver, W.D., et al., *Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review.* Jama, 1997. **278**(23): p. 2093-8.
29. Grines, C., et al., *Primary coronary angioplasty compared with intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: six-month follow up and analysis of individual patient data from randomized trials.* Am Heart J, 2003. **145**(1): p. 47-57.
30. Nunn, C.M., et al., *Long-term outcome after primary angioplasty: report from the primary angioplasty in myocardial infarction (PAMI-I) trial.* J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(3): p. 640-6.
31. Serruys, P.W., et al., *Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease (Benestent II).* Lancet, 1998. **352**(9129): p. 673-81.
32. Shintani, S., et al., *Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction.* Circulation, 2001. **103**(23): p. 2776-9.

33. Werner, N. and G. Nickenig, *[Vascular progenitor cells and atherogenesis. Regression and regeneration using bone marrow?]*. Dtsch Med Wochenschr, 2004. **129**(22): p. 1269-75.
34. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization.* Circ Res, 1999. **85**(3): p. 221-8.
35. Crosby, J.R., et al., *Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation.* Circ Res, 2000. **87**(9): p. 728-30.
36. Metcalf, D., *Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct?* Ann N Y Acad Sci, 1999. **872**: p. 289-303; discussion 303-4.
37. Hove, W.R., et al., *Extensive chimerism in liver transplants: vascular endothelium, bile duct epithelium, and hepatocytes.* Liver Transpl, 2003. **9**(6): p. 552-6.
38. Ikpeazu, C., et al., *Donor origin of circulating endothelial progenitors after allogeneic bone marrow transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2000. **6**(3A): p. 301-8.
39. Muller, P., et al., *Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts.* Circulation, 2002. **106**(1): p. 31-5.
40. Quaini, F., et al., *Chimerism of the transplanted heart.* N Engl J Med, 2002. **346**(1): p. 5-15.
41. Strauer, B.E., et al., *[Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]*. Dtsch Med Wochenschr, 2001. **126**(34-35): p. 932-8.
42. Assmus, B., et al., *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI).* Circulation, 2002. **106**(24): p. 3009-17.
43. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.* Nature, 2001. **410**(6829): p. 701-5.
44. Strauer, B.E., et al., *Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans.* Circulation, 2002. **106**(15): p. 1913-8.
45. Galli, R., et al., *Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells.* Nat Neurosci, 2000. **3**(10): p. 986-91.

46. Blau, H.M., T.R. Brazelton, and J.M. Weimann, *The evolving concept of a stem cell: entity or function?* Cell, 2001. **105**(7): p. 829-41.
47. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.* Science, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
48. Rafii, S. and D. Lyden, *Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration.* Nat Med, 2003. **9**(6): p. 702-12.
49. Gill, M., et al., *Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells.* Circ Res, 2001. **88**(2): p. 167-74.
50. Handgretinger, R., et al., *Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **996**: p. 141-51.
51. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.* Circ Res, 2001. **89**(1): p. E1-7.
52. Rehman, J., et al., *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors.* Circulation, 2003. **107**(8): p. 1164-9.
53. Strehlow, K., et al., *Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation.* Circulation, 2003. **107**(24): p. 3059-65.
54. Heeschen, C., et al., *Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization.* Blood, 2003. **102**(4): p. 1340-6.
55. Hattori, K., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells.* J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1005-14.
56. Hattori, K., et al., *Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment.* Nat Med, 2002. **8**(8): p. 841-9.
57. Laufs, U., et al., *Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis.* Circulation, 2004. **109**(2): p. 220-6.
58. Yamaguchi, J., et al., *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization.* Circulation, 2003. **107**(9): p. 1322-8.

59. Jimenez, J.J., et al., *Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis.* Thromb Res, 2003. **109**(4): p. 175-80.
60. Preston, R.A., et al., *Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles.* Hypertension, 2003. **41**(2): p. 211-7.
61. Sabatier, F., et al., *Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles.* Diabetes, 2002. **51**(9): p. 2840-5.
62. Bernal-Mizrachi, L., et al., *High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes.* Am Heart J, 2003. **145**(6): p. 962-70.
63. Boulanger, C.M., et al., *Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction.* Circulation, 2001. **104**(22): p. 2649-52.
64. Tepper, O.M., et al., *Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures.* Circulation, 2002. **106**(22): p. 2781-6.
65. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk.* N Engl J Med, 2003. **348**(7): p. 593-600.
66. Rauscher, F.M., et al., *Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis.* Circulation, 2003. **108**(4): p. 457-63.
67. Walter, D.H., et al., *Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells.* Circulation, 2002. **105**(25): p. 3017-24.
68. Werner, N., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1567-72.
69. Werner, N., et al., *Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury.* Circ Res, 2003. **93**(2): p. e17-24.
70. Gaspardone, A., et al., *Progenitor cell mobilisation in patients with acute and chronic coronary artery disease.* Heart, 2006. **92**(2): p. 253-4.
71. Henriques, J.P., et al., *Angiographic assessment of reperfusion in acute myocardial infarction by myocardial „blush grade“*. Circulation, 2003. **107**(16): p. 2115-9.

72. van 't Hof, A.W., et al., *Angiographic assessment of myocardial reperfusion in patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction: myocardial „blush grade“. Zwolle Myocardial Infarction Study Group.* Circulation, 1998. **97**(23): p. 2302-6.

73. Gibson, C.M., et al., *TIMI „frame count“: a quantitative method of assessing coronary artery flow*. Circulation, 1996. **93**(5): p. 879-88.

74. Vasa, M., et al., *Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease.* Circulation, 2001. **103**(24): p. 2885-90.

75. Hristov, M., et al., *Reduced numbers of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease associated with long-term statin treatment.* Atherosclerosis, 2007. **192**(2): p. 413-20.

76. Rosenzweig, A., *Cardiac cell therapy--mixed results from mixed cells.* N Engl J Med, 2006. **355**(12): p. 1274-7.

77. Dimmeler, S., J. Burchfield, and A.M. Zeiher, *Cell-based therapy of myocardial infarction.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(2): p. 208-16.

78. Boos, C.J., G.Y. Lip, and A.D. Blann, *Circulating endothelial cells in cardiovascular disease.* J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(8): p. 1538-47.

79. Massa, M., et al., *Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction.* Blood, 2005. **105**(1): p. 199-206.

80. Numaguchi, Y., et al., *The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction.* Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I114-9.

81. Anderson, J.L., et al., *TIMI perfusion grade 3 but not grade 2 results in improved outcome after thrombolysis for myocardial infarction. Ventriculographic, enzymatic, and electrocardiographic evidence from the TEAM-3 Study.* Circulation, 1993. **87**(6): p. 1829-39.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Akutes Koronarsyndrom-Terminologie 5

Abbildung 2: Algorithmus zur Diagnosefindung und Risikostratifizierung 7

Abbildung 3: Charakterisierung von isolierten EPCs. (A) Spindelförmige Zellen nach 7 Tagen Kultivierung. (B) Kolonie- bildende Einheiten mit einem zentralen Kern und länglich wachsenden Zellen in der Peripherie. (C) Messung von adaptierten Zellen mittels der Durchflusszytometrie. Die graphische Punktanalyse im Streudiagramm (FSC/ SSC) zeigt zwei Populationen (gates R1 und R2, linkes Diagramm). Zellen im Bereich R1 positiv gefärbt mittels Dil-Ac-LDL/ Lektin (rechtes Diagramm), verglichen mit ungefärbten Kontrollen (mittleres Diagramm), wurden als EPCs bezeichnet. 24

Abbildung 4: Unterschiede in der CK bei Aufnahme der maximalen CK sowie dem Myokardialem „blush grade“ bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und hoher oder niedriger EPC-Zahl 29

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilungskriterien des MBG 19

Tabelle 2: TIMI Klassifikation..... 20

Tabelle 3: Grundlegende klinische, Labor- und EPC Charakteristika bei Patienten mit STEMI (ST-elevation myocardial infarction) und KHK (Koronare Herzkrankheit) 26

Tabelle 4: Grundlegende klinische, Labor- und EPC Charakteristika bei Patienten mit einer hohen und niedrigen EPC Anzahl..... 28

Tabelle 5: Grundlegende klinische, Labor- und EPC Charakteristika in Abhängigkeit vom Aufnahme Troponin T (über vs. unter Median)..... 31

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter Radke, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit durchführen zu können. Ich bedanke mich für die ausgezeichnete Betreuung und sein außergewöhnliches Engagement.

Zu nennen ist desweiteren mein guter Freund und Doktorandenpartner Falk Ullerich, auf dessen Zuverlässigkeit ich bauen konnte und durch den es möglich war die Jahre der Promotionsarbeit mit viel Freude zu bewältigen.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei den Mitarbeitern des kardiologischen Labors der Uniklinik Aachen, vor allem bei unserer MTA Dorothee Scheller für ihren unermüdlichen Einsatz.

Meiner Schwester möchte ich danken, die mit ihren EDV Kenntnissen viele Layoutprobleme lösen konnte.

Erklärung zur Datenaufbewahrung

Erklärung § 5 Abs 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

- bei mir, Christoph Heinrich Eugen Nau, Heinrich-Hoffmann-Str. 1, 60528 Frankfurt (Main)
- in der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Aachen
- bei meinem Betreuer, Prof. Dr. Peter Radke, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Lübeck

hinterlegt sind.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christoph Heinrich Eugen Nau
Anschrift: Heinrich-Hoffmann-Str. 1
60528 Frankfurt (Main)
Geburtsdatum: 12.08.1980
Geburtsort: Essen

Schulbildung

1990 – 1996: Gymnasium Essen-Werden
1996 – 1997: St. Francis de Sales High School, Toledo, USA
1997 – 1999: Gymnasium Essen-Werden, Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Bundeswehr

1999 – 2000: Fernmelderegiment 930 Gerolstein
Fernmelderegiment 990 Essen

Lebenslauf

Studium

2000 – 2002:	Semmelweis Universität Budapest
	Abschluss: Ärztliche Vorprüfung
2002 – 2003:	Universität Rostock
	Abschluss: 1. Staatsexamen
2003 – 2005:	RWTH Aachen
	Abschluss: 2. Staatsexamen
2006 – 2007:	Praktisches Jahr
	Innere Medizin, Anästhesiologie, Marienhospital Aachen
	Chirurgie, Hôpital Cantonal de Fribourg, Schweiz
2007 :	Abschluss des Studiums mit Erwerb des
	3. Staatsexamens im Juni 2007

Dissertation und wissenschaftliche Mitarbeit

Thema:

Mobilisation endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt

Betreuung durch Prof. Dr. med. P. Radke, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

Mitarbeit an einer tierexperimentellen Arbeit zum Thema:
Restenosierung nach Stentimplantation bei diabetischen Kaninchen nach Applikation von löslichem RAGE