

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Erste Medizinische Klinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Wirkung von Erythropoetin auf zirkulierende Progenitorzellen im akuten Myokardinfarkt – Substudie der REVIVAL-3 Studie

Felix Mohr

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 11.04.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2012 angenommen.

*„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem
Schlusspunkt, sondern mit einem Fragezeichen.“*

Hermann Hesse

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 Einführung	9
1.2 Akuter Myokardinfarkt: Pathogenese und endogene Reperationsmechanismen	9
1.3 Zirkulierende Progenitorzellen	11
1.3.1 Entwicklung und Differenzierung zirkulierender Progenitorzellen	11
1.3.2 Marker hämatopoetischer und endothelialer Progenitorzellen	12
1.3.3 Einflussgrößen auf die Konzentration und Funktionalität zirkulierender Progenitorzellen	13
1.3.4 Mobilisierung und Homing zirkulierender Progenitorzellen	16
1.3.5 Eigenschaften zirkulierender Progenitorzellen	17
1.3.6 Progenitorzelltherapien	17
1.4 Erythropoetin und seine Rezeptoren	19
1.4.1 Erythropoetin	19
1.4.2 Erythropoetinrezeptor	20
1.4.3 Hämatopoetische Wirkung von Erythropoetin	21
1.4.4 Nicht hämatopoetische Wirkung von Erythropoetin	22
1.4.5 Klinischer Einsatz	24
1.5 Zirkulierende Progenitorzellen, Erythropoetin und Myokardinfarkt	25
1.6 In-Stent Restenose: Ursachen und Mechanismen	26
2 ZIELSETZUNG DER STUDIE	28
2.1 Zielsetzung der REVIVAL-3 Hauptstudie	28
2.1.1 Arbeitshypothese	28
2.1.2 Endpunkte	28
2.1.3 Primärer Endpunkt	28
2.1.4 Sekundäre Endpunkte	29
2.2 Zielsetzung der REVIVAL-3 Substudie	29

3	STUDIENDESIGN	31
3.1	Studiendesign der REVIVAL-3 Hauptstudie	31
3.1.1	Einschlusskriterien	31
3.1.2	Ausschlusskriterien	32
3.1.3	Randomisierung	32
3.1.4	Applikation von Erythropoetin und Plazebo	32
3.1.5	Behandlung und Monitoring der Patienten	33
3.2	Studiendesign der REVIVAL-3 Substudie	34
3.2.1	Allgemeines	34
3.2.2	Studienprotokoll	34
4	METHODEN	36
4.1	Durchflusszytometrie	36
4.1.1	Aufbau eines Durchflusszytometers	36
4.1.2	Funktionsprinzip	36
4.1.3	Applikationsmöglichkeiten	38
4.1.4	Verwendete Fluorochrome	38
4.2	Probenaufbereitung	39
4.2.1	Verwendete Antikörperkonjugate	39
4.2.2	Aufbereitungsprotokoll	40
4.2.3	Messung und Analyse der Proben	41
4.2.4	Analyse des Messansatzes	46
4.3	Angiographische Daten	48
4.4	Statistische Analyse	48
5	ERGEBNISSE	49
5.1	Demographische Daten der Studienpopulation	49
5.2	Relevante Ergebnisse der Revival-3 Hauptstudie	51
5.3	Anzahl zirkulierender CD133 positiver Zellen und Oberflächenexpression von CXCR4	51
5.4	Progenitorzellen, Erythropoetin und Restenose	54
5.5	Progenitorzellen und MACCE	57

6	DISKUSSION	58
6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	58
6.2	Quantitative und Qualitative Messung von zirkulierenden Progenitorzellen	58
6.2.1	Methode der Durchflusszytometrie zur Klassifikation zirkulierender Progenitorzellen	58
6.2.2	Diversität der Definition von zirkulierenden Progenitorzellen	59
6.3	Dosisfindung von Erythropoetin	60
6.3.1	Erythropoetin und zirkulierende Progenitorzellen	61
6.3.2	Zusammenhang zwischen Erythropoetin, zirkulierenden Progenitorzellen und MACCE	64
6.3.3	Zusammenhang zwischen Erythropoetin, zirkulierenden Progenitorzellen und Restenose	65
6.4	Analyse der Ergebnisse im Kontext der aktuellen Forschung	67
7	ZUSAMMENFASSUNG	68
8	VERZEICHNISSE	69
8.1	Literaturverzeichnis	69
8.2	Abbildungsverzeichnis	81
8.3	Tabellenverzeichnis	82
8.4	Formelverzeichnis	83
9	ANHANG 1: STUDIENPROTOKOLL DER REVIVAL-3 STUDIE (ENGLISCH)	84
10	LEBENS LAUF	149
11	DANKSAGUNG	150

Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
ACT	aktivierte Gerinnungszeit (activated coagulation time)
APC	Allophycocyanin
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Bcl-2	B-cell-lymphoma-2
BMS	Bare Metal Stent
(MB-)CK	(MB-Form der) Kreatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
CXCR4	chemokine receptor type 4
DES	Drug Eluting Stent
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
EPC	endotheliale Progenitorzelle (endothelial progenitor cell)
FITC	Fluoreszein-Isotiozyanat
G(M)-CSF	Granulozyten(-Makrophagen)-Kolonie-stimulierender-Faktor (Granulocyte (macrophage) colony-stimulating-factor)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor(Granulocyte macrophage colony-stimulating-factor)
HIF-1	hypoxia inducible factor-1
HRF	hypoxia response element
IE	intrinsische Einheiten
IL	Interleukin
JAK-STAT	Janus kinase signal transducers and activators of transcription
KHK	koronare Herzkrankheit
MACCE	major adverse cardiac and cerebrovascular events
MAP	mitogen-activated-protein
MMP	Matrixmetalloprotease
ODDD	oxygen dependent degradation domain
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCI	perkutane Koronarintervention (percutaneous coronary intervention)
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PI-3	Phosphatidylinositol-3
PTCA	perkutane transluminale Koronarintervention (percutaneous, transluminal coronary intervention)
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
TGF	Transforming Growth Factor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α (tumor necrosis factor- α)
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Einführung

Herz-Kreislaufkrankungen sind in Industrienationen die häufigste Todesursache (Ross 1986). Zu den wichtigsten akuten Krankheitsbildern gehört hierbei der Myokardinfarkt. Mit der Etablierung der perkutanen Koronarintervention (Percutaneous Coronary Intervention, PCI) mit dem Ziel einer schnellen Reperfusion des ischämischen Gewebes durch Dilatation des betroffenen Herzkranzgefäßes konnte eine signifikante Mortalitätsreduktion erreicht werden (Keeley 2003). Zusätzlich zur Aufweitung des stenosierten Gefäßes hat sich die Einlage eines Metallnetzes, eines sogenannten Stents zur Prophylaxe eines schnellen Wiederverschlusses etabliert. Trotz prompter Wiedereröffnung des Gefäßes ergeben sich in vielen Fällen Folgekomplikationen. Kurzfristig führt die Einbringung körperfremder Materialien zu einer zytoproliferativen Reaktion des Endothels, langfristig ergeben sich Komplikationen wie die Herzinsuffizienz. Die Wahrscheinlichkeit, nach Herzinfarkt eine Herzinsuffizienz zu entwickeln ist in den letzten 30 Jahren verglichen mit der Mortalität nur mäßig gesunken (Velagaleti 2008). Im Hinblick auf diese Zahlen, auf die hohe Inzidenz des akuten Myokardinfarktes und auf entsprechende sozioökonomische Folgen der Erkrankung erscheint es geboten, hinsichtlich einer weiterführenden Therapie neue Ansatzpunkte zu verfolgen, um sowohl kurz- wie auch langfristige Komplikationen zu reduzieren und so die Morbidität und Mortalität des akuten Myokardinfarktes zu verringern.

1.2 Akuter Myokardinfarkt: Pathogenese und endogene Reperationsmechanismen

Die pathophysiologische Grundlage des akuten Myokardinfarktes ist in über 90% der Fälle die Bildung von Thromben an rupturierten atherosklerotischen Plaques. Diesen liegen metabolische, immunologische und inflammatorische Prozesse zu Grunde (Libby 2002). Folge sind Vasokonstriktion und Lumeneinengung mit nachfolgender Gewebeischämie.

Das Ausmaß der Zellschädigung durch Ischämie hängt von der Art des Gewebes, der Existenz von präformierten Kollateralkreisläufen und dem Ausmaß der ischämischen Präkonditionierung im Rahmen chronischer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit (KHK) ab (Chen 2006). Als Folge der Ischämie kommt es zur hypoxischen Herzdilatation, Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen und zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit Leukozytose und febrilen Temperaturen. Diese Umbauprozesse werden unter dem Begriff des Remodelings zusammengefasst (Pfeffer 1990).

Nach den Leitlinien des akuten Myokardinfarktes wird generell eine Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes angestrebt (Ven de Werf 2008). Hierbei können Reperfusionsschäden auftreten, welche zu einer weiteren Ausdehnung des Nekroseareals führen können (Yellon 2000). Klinisch manifestieren sich diese als „stunned myocardium“-Phänomen, also eine verlängerte postischämische Dysfunktion nach Reperfusion in Abwesenheit irreversibler Schäden. Weiterhin kann es zur Apoptose von Kardiomyozyten durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und freier Sauerstoffradikale (Frangogiannis 2002) und konsekutiv zum Remodeling vor allem des linken Ventrikels als Ausdruck der mikrovaskulären Dysfunktion kommen. Diese Mechanismen führen zum fibrotischen Umbau des Myokards und zur Hypertrophie der verbliebenen Herzmuskelzellen (Swan 1993).

Bisherige Annahmen gingen davon aus, dass das Herz nur in begrenztem Umfang befähigt ist, verloren gegangene Kardiomyozyten nachzubilden. Es wurden sowohl in gesunden Herzen als auch in Randgebieten des Myokardinfarktes sich teilende Kardiomyozyten nachgewiesen, wobei ihr Ursprung noch Gegenstand von Diskussion ist (Anversa 2002). Die Zellteilungsrate im Randgewebe von ischämischen Läsionen ist dabei um das 3 bis 4-fache erhöht (Beltrami 2001).

1.3 Zirkulierende Progenitorzellen

1.3.1 Entwicklung und Differenzierung zirkulierender Progenitorzellen

Im Blut zirkulierende Progenitorzellen entwickeln sich aus primitiven, pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks, wobei sich hämatopoetische und nicht hämatopoetische Zellpopulationen unterscheiden lassen. Stammzellen sind pluripotente Vorläuferzellen, das heißt, sie können sich in verschiedene Zelltypen und Gewebearten ausdifferenzieren. Im adulten Organismus sind Stammzellen im Knochenmark, dem Gehirn, der Haut und im Blut zu finden. Letztere werden als zirkulierende Stammzellen bezeichnet. Der Anteil adulter Stammzellen im Knochenmark beträgt etwa 0,1% an allen Zellen (Tsai 2009). Eine graphische Übersicht über die verschiedenen Populationen und ihre Vorläuferzelltypen gibt eine Übersichtsarbeit von Käßmeyer und Kollegen (siehe Abbildung 1). Hierbei wird deutlich, dass die Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen aus verschiedenen Stammzellpopulationen möglich ist. Klar wird hierbei auch, dass die Bildung von Endothelzellen nicht ausschließlich über endotheliale Vorläuferzellen sondern auch aus der monozytären Zellreihe oder direkt aus multipotenten Stammzellen erfolgen kann.

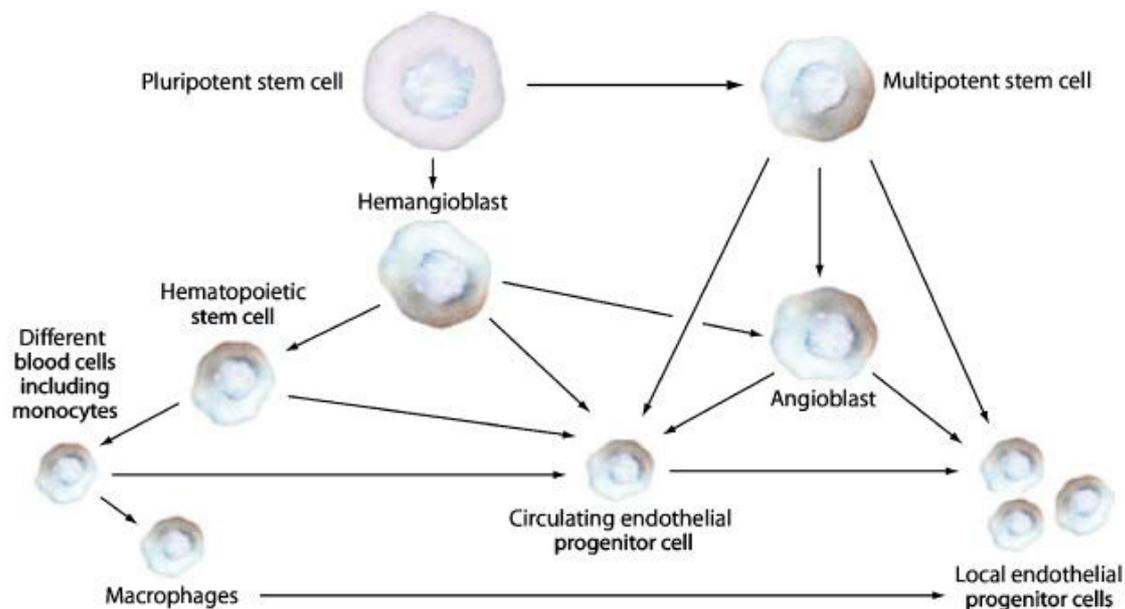


Abbildung 1: Übersicht über die Herkunft, das Differenzierungsverhalten und die Hierarchie adulter endothelialer Progenitorzellen;

Entnommen aus Käßmeyer und Kollegen (Kassmeyer 2009) (mit freundlicher Genehmigung von S. Käßmeyer)

1.3.2 Marker hämatopoetischer und endothelialer Progenitorzellen

Die Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen erfolgt im Knochenmark aus der hämatopoetischen Progenitorzelle, welche sich ihrerseits aus dem Hämangioblasten entwickelt (Asahara 1997). Hämatopoetische Progenitorzellen vermögen auch Ursprung der normalen Hämatopoese zu sein (Tsai 2009). Die einzelnen Entwicklungsstadien können anhand der Expression von Oberflächenmolekülen unterschieden werden. Hierbei sind vor allem die Marker CD34, CD133 und CD45 von Bedeutung.

CD34 ist ein membranständiges Protein, welches zur Abgrenzung hämatopoetischer zu mesenchymalen Stammzellen verwendet wird. Es wird sowohl auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen als auch auf entdifferenzierten Endothelzellen exprimiert (Fina 1990). Neben CD34 dient auch CD45 zur Unterscheidung zwischen mesenchymalen und hämatopoetischen Progenitorzellen. CD45 wird auch als Panleukozytenmarker bezeichnet, da er mit Beginn der hämatopoetischen Differenzierung auf allen Leukozytenpopulationen zu finden ist (Neuss 2004). Zur Unterscheidung CD34 positiver Stamm- und Progenitorzellen von ebenfalls CD34 positiven Endothelzellen dient CD133, ein Glykoprotein mit fünf Transmembraneinheiten (Gallacher 2000). Die Expression von CD133 ist auf adulten Hämangioblasten bzw. frühen endothelialen Progenitorzellen am höchsten (Asahara 2004). Die Differenzierung von hämatopoetischen zu endothelialen Progenitorzellen wird durch die Expression des Oberflächenmoleküls VEGFR2 charakterisiert (Urbich 2004).

Eine Übersicht über die verschiedenen Oberflächenmarker hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen und die verschiedenen Differenzierungsschritte hin zur adulten Endothelzelle gibt Tabelle 1. Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist CD133 nicht nur auf den hämatopoetischen Progenitorzellen, sondern auch auf endothelialen Progenitorzellen vorhanden. Über die Abgrenzung von hämatopoetischen zu endothelialen Progenitorzellen gibt es keinen Konsens (Leor 2006). Folgend werden hämatopoetische und endotheliale Progenitorzellen unter dem Begriff der zirkulierenden Progenitorzelle zusammengefasst, da beide mit dem Oberflächenmarker CD133 erfasst werden. Für das periphere Blut werden die Konzentrationen von zirkulierenden Progenitorzellen bei jungen, gesunden Probanden je nach Definition mit 0,1 bis 3 Zellen

pro Mikroliter beziehungsweise 0,03% der Blutleukozyten angegeben, (Grundmann 2007).

Bezeichnung	Expression von Oberflächenmolekülen			
	CD34	CD133	CD45	VEGFR2
Hämangioblast	positiv	positiv	negativ	negativ
hämatopoetische Progenitorzelle	positiv	positiv	schwach positiv	negativ
frühe endotheliale Progenitorzelle	positiv	positiv	positiv	schwach positiv
späte endotheliale Progenitorzelle	positiv	schwach positiv	positiv	positiv
adulte Endothelzelle	positiv	negativ	positiv	positiv

"zirkulierende Progenitorzellen"

Tabelle 1: Übersicht über die Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen durch Oberflächenmarker; hämatopoetische, sowie frühe und späte endotheliale Progenitorzellen werden im weiteren Verlauf unter dem Begriff der zirkulierenden Progenitorzelle zusammengefasst; erstellt nach Zusammenschau von Übersichtsarbeiten von Peichev, Urbich, Ding und Timmermans (Peichev 2000, Urbich 2004, Ding 2007 und Timmermans 2009)

1.3.3 Einflussgrößen auf die Konzentration und Funktionalität zirkulierender Progenitorzellen

Eine Reihe von endogenen und exogenen Faktoren beeinflusst die Zahl und Funktionalität von zirkulierenden Progenitorzellen. Eine detaillierte Auflistung findet sich in Tabelle 2. Eine Verminderung zirkulierender Progenitorzellen finden sich bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes, Hypercholesterinämie oder Rauchen (Vasa 2001a, Tepper 2002). Analog zeigt sich eine negative Korrelation des Framingham Scores, welches das Risiko innerhalb der nächsten zehn Jahre an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben quantifiziert, mit der Anzahl an zirkulierenden Vorläuferzellen (Hill 2003). Ebenso beobachtet man bei Patienten mit massiver endothelialer Schädigung wie Gefäßentzündungen eine verminderte Zahl von zirkulierenden Progenitorzellen (Holmen 2005).

Im Gegensatz hierzu bewirkt die Therapie kardiovaskulärer Risikofaktoren einen Konzentrationsanstieg von Progenitorzellen im Blut. So zeigen Patienten unter der plaquestabilisierenden Therapie mit HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren („Statine“) eine erhöhte Konzentration von Progenitorzellen im Blut (Vasa 2001b). Auch die Therapie des arteriellen Hypertonus mit Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten beeinflusst die Konzentration zirkulierender Progenitorzellen positiv (Imanishi 2004). Ebenso werden mehr Progenitorzellen bei körperlicher Aktivität mobilisiert (Laufs 2004).

Einige kardiovaskuläre Ereignisse wirken positiv auf die Zahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen. So finden sich im Rahmen einer niedriggradigen Herzinsuffizienz (Stadium der New York Heart Association, NYHA I und II) (Valgimigli 2004), bei Gefäßwandverletzungen (Gill 2001), nach Bypass-Operationen, Verbrennungen (Gehling 2000) und beim Schlaganfall (Taguchi 2004) eine erhöhte EPC-Konzentration. Auch beim akuten Myokardinfarkt werden deutlich erhöhte Konzentrationen an zirkulierenden hämatopoetischen und endothelialen Progenitorzellen beobachtet. Shintani und Kollegen beschrieben 2001 erstmals einen Anstieg CD34 positiver mononukleärer Zellen nach Myokardinfarkt (Shintani 2001). Schömig und Kollegen konnten einen Anstieg CD133 positiver zirkulierender Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt nachweisen (Schomig 2006). Bei Aufnahme waren die Konzentrationen noch signifikant niedriger als bei Patienten mit stabiler Angina pectoris, jedoch stiegen die Zahlen innerhalb von drei Tagen über die Werte der Kontrollgruppe. Auch im Vergleich zu Gesunden sind die Zahlen CD133 positiver zirkulierender Progenitorzellen signifikant erhöht (Voo 2008). Das Konzentrationsmaximum wird etwa drei bis vier Tage nach Aufnahme beobachtet (Grundmann 2007).

Das Ausmaß der myokardialen Schädigung im Echokardiogramm beziehungsweise die Plasmakonzentration der myokardspezifischen Kreatinkinase (MB-CK) korrelieren nicht mit der Konzentration zirkulierender Progenitorzellen. Dennoch ist das Outcome von Patienten, die bei Aufnahme eine erhöhte Zellkonzentration aufweisen im Hinblick auf ihr kardiovaskuläres Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko verbessert (Werner 2006). In vivo Wachstumsfaktoren wie Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (Takahashi 1999), VEGF (Kalka 2000), das Chemokin stromal cell derived factor (SDF)-1 (Yamaguchi 2003) und Erythropoetin (Bahlmann 2004) bewirken eine Erhöhung der Konzentration zirkulierender Vorläuferzellen.

Faktor	Zahl	Proliferation	Adhäsion	Migration	Organisationsfähigkeit	Quelle
akute ischämische Ereignisse	↑					Shintani 2001
Alter	↓			↓		Vasa 2001
Angiotensin-II-Rezeptorblocker	↑					Imanishi 2004
Anzahl atherosklerotischer Plaques	↓					Rouhl 2010
arterieller Hypertonus				↓		Vasa 2001
Aspirin		↓	↓		↓	Rouhl 2008
cholesterolare Diät	↑					Rouhl 2008
chronische Niereninsuffizienz	↓			↓	↓	Rouhl 2012
Diabetes mellitus Typ I	↓				↓	Loomans 2004
Diabetes mellitus Typ II			↓		↓	Tepper 2002
erhöhter Framingham-Risikoscore	↓					Rouhl 2008
erhöhtes LDL-Cholesterol		↓		↓		Vasa 2001, Chen 2004
Erythropoetin	↑		↑	↑		Bahlmann 2003, George 2005
G-CSF, GM-CSF	↑					Peichev 2000
Gefäßwandverletzungen	↑					Gill 2001
Herzinsuffizienz Grad I und II	↑					Valgimigli 2004
Herzinsuffizienz Grad III und IV	↓					Valgimigli 2004
Hyperhomocysteinämie	↓	↓	↓	↓		Chen 2004
In-stent Restenose	↓		↓			George 2003
koronare Herzkrankheit	↓					Vasa 2001
körperliche Aktivität	↑					Hristov 2005
Langzeit-Statintherapie	↓					Rouhl 2008
Östrogene	↑	↑		↑		Iwakura 2003
periphere arterielle Verschlusskrankheit	↓					Rouhl 2009
Ramipril	↑	↑	↑	↑		Rouhl 2008
Rauchen, Nikotin	↓	↓	↓	↓		Vasa 2001, Rouhl 2008
Rheumatoide Arthritis	↓		↓			Rouhl 2008
Schwangerschaft	↑					Rouhl 2008
Statine	↑					Dimmeler 2001
Vaskulitiden	↓					Rouhl 2008
VEGF		Überlebensfähigkeit und EPC-Zahl ↑				Shintani 2001, Tepper 2005
vergrößerte Intima-Media Dicke	↓					Rouhl 2011
weibliches Geschlecht	↑					Hristov 2004

Tabelle 2: Übersicht über positive (↑) und negative (↓) Einflussfaktoren auf die Anzahl, Proliferations-, Adhäsions-, Migrations- und Organisationsfähigkeit (in vitro) zirkulierender Progenitorzellen beim Menschen; EPC = endotheliale Progenitorzelle

1.3.4 Mobilisierung und Homing zirkulierender Progenitorzellen

Durch den Verschluss von Arterien und der Schädigung des Endothels kommt es zur Aktivierung von Thrombozyten. Diese setzen SDF-1 frei (Hristov 2007), ein aus der CXC-Subfamilie stammendes Chemokin, welches über den Blutstrom in das Knochenmark gelangt und dort durch Aktivierung einer Metalloprotease (Matrix-Metalloprotease-9) Progenitorzellen freisetzt (Heissig 2002). Darüber hinaus spielt SDF-1 für die zielgerichtete Migration von Stammzellen eine herausragende Rolle. Stammzellen, welche den SDF-1 Rezeptor CXCR4 exprimieren, sind in der Lage sich zielgerichtet entlang des SDF-1 Gradienten zu bewegen. Giebel und Kollegen beobachteten, dass CD133 positive Zellen eine leukozytenähnliche polarisierte Struktur mit einer vermehrten Expression von CXCR4 an der führenden Seite ausbilden (Giebel 2004). Dieser Mechanismus ist im Rahmen der embryonalen Vaskulo- und Organogenese von essentieller Bedeutung, so sind Knockout-Mäuse ohne SDF-1 oder CXCR4 nicht lebensfähig (Nagasawa 1996). Postnatal scheint CXCR4 und sein Ligand SDF-1 bei der Wundheilung und Vaskulogenese eine Rolle zu spielen. So wird SDF-1 von Endothelzellen und Fibroblasten in ischämischen Geweben, unter anderem in atherosklerotischen Plaques und bei Myokardinfarkt exprimiert (Ceradini 2004), wodurch CXCR4 positive Zellen aus dem Knochenmark mobilisiert werden (Asahara 1997). Die Anzahl von CXCR4 positiven Progenitorzellen im ischämischen Gebiet ist dabei indirekt proportional zum Sauerstoffpartialdruck.

Die Rekrutierung von CD133 positiven Progenitorzellen aus dem Blutstrom heraus schließt mehrere Schritte mit ein, die dem Homing adulter Blutleukozyten ähnelt (Lapidot 2005).

1.3.5 Eigenschaften zirkulierender Progenitorzellen

Zellen des Knochenmarks (Tanaka 2003) und zirkulierende Progenitorzellen (Han 2001) nehmen im Tierversuch an der Bildung einer neuen Endothelzellschicht im Bereich arterieller Endothelläsionen teil. Dabei ist das Ausmaß der Beteiligung von Knochenmark stämmigen Zellen und Leukozyten von der Art der arteriellen Verletzung abhängig. Entgegen der früheren Annahme, Gefäßneubildungen im erwachsenen Organismus erfolgten ausschließlich durch das Aussprossen bereits existierender Gefäße, also durch Angiogenese spielt auch die Vaskulogenese eine wichtige Rolle. Im Jahr 1994 beschrieben Shi und Kollegen erstmals die Bildung von Endothelzellinseln in ischämischen Geweben im Mausmodell, 1997 konnten Asahara und Kollegen zeigen, dass intravenös verabreichte CD34 positive Zellen bei Mäusen mit Extremitätenischämie zu einer Revaskularisierung in der betroffenen Extremität beitragen (Asahara 1997). Tepper und Kollegen beobachteten 2005, dass endotheliale Progenitorzellen zunächst extravaskuläre Cluster bilden, welche innerhalb von zwei Wochen konfluieren und spätestens nach drei Wochen Anschluss an das Gefäßsystem gefunden haben (Tepper 2005).

Neben Mausmodellen der Extremitätenischämie tragen auch in experimentellen Studien des Schlaganfalls (Shyu 2006), der diabetischen Neuropathie (Naruse 2005), des Herzinfarktes und im Rahmen der Tumervaskularisation (Asahara 1999) zirkulierende Progenitorzellen zur Neovaskularisation bei.

1.3.6 Progenitorzelltherapien

Ob zirkulierende Progenitorzellen auch beim Menschen einen positiven Effekt auf das Outcome nach Myokardinfarkt haben wurde bereits in einer Vielzahl von Studien überprüft. Die Rationale hinter dieser Therapie ergibt sich aus der Annahme, dass sich das Myokard nach ischämischen Ereignissen nur unvollständig regenerieren kann und sowohl die geschädigten Gefäße als auch das Myokard selbst, analog zu Ergebnissen aus in vitro Versuchen und Tiermodellen, von der Zuführung von entsprechenden Progenitorzellen profitieren kann. Eine der ersten Arbeiten hierzu war die TOPCARE-AMI Studie, welche 2002 von Assmus und Kollegen vorgestellt wurde (Assmus 2002).

Assmus und Kollegen zeigten, dass sowohl die intrakoronare Injektion von zirkulierenden Progenitorzellen als auch von mononukleären Zellen des Knochenmarks zu einer Verbesserung der ventrikulären Ejektionsfraktion und zu einer erhöhten Kontraktilität des Ventrikels führte. Diese Effekte waren auch vier Monate nach Injektion noch nachweisbar. Im Rahmen einer Meta-Analyse verglichen Martin-Rendon und Kollegen 2008 dreizehn Studien mit vierzehn Therapieregimes, die Stammzellen des Knochenmarks bzw. mononukleäre Zellen des Knochenmarks nach Myokardinfarkt verabreichten (Martin-Rendon 2008). Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bis drei bis sechs Monate nach Intervention. Der Myokardinfarkt der Patienten aller Studien wurde primär mit einer perkutanen Koronarintervention und Stenteinlage behandelt. Zwölf Therapieregimes applizierten gereinigte Progenitorzellen des Knochenmarks, bei zwei Studien wurden die Stammzellen mit Hilfe von G-CSF mobilisiert und aus dem peripheren Blut isoliert. Die Anzahl der eingeschlossenen Patienten reichte von 20 bis zu 204 Patienten. Die Metaanalyse ergab, dass eine Applikation von Stammzellen zu einer signifikanten Reduktion des linksventrikulären endsystolischen Volumens um durchschnittlich 4,7 Milliliter, zu einer Reduktion der Infarktgröße um durchschnittlich 3,5% und um einen Anstieg der linksventrikulären Ejektionsfraktion um durchschnittlich 3% führte.

Eine von Stamm und Kollegen veröffentlichte Arbeit legt nahe, dass auch gereinigte CD133 positive Zellen des Knochenmarks einen positiven Effekt auf die myokardiale Funktion nach ischämischen Ereignissen haben (Stamm 2003). Sechs männlichen Patienten mit Myokardinfarkt wurden innerhalb von zehn Tagen bis drei Monate nach dem Ereignis mit einem koronaren Bypass versorgt. Während der Operation wurden gereinigte, CD133 positive Zellen, welche am Tag zuvor durch Beckenkampnpunktion gewonnen wurden, in das Infarktgebiet eingespritzt. Alle sechs Patienten zeigten echokardiographisch eine deutliche Verbesserung der linksventrikulären Funktion sowie szintigraphisch eine deutlich verbesserte Perfusion.

Einzelstudien, die entweder mononukleäre Zellen des peripheren Blutes oder des Knochenmarkes verwendeten, verzeichneten darüber hinaus noch eine Verbesserung der Wandbewegung (Schachinger 2004, Strauer 2002).

Bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) führt die Applikation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes und des Knochenmarkes zu einer Steigerung der schmerzfreien Gehstrecke sowie einer Verbesserung des Knöchel-Arm-Index (Tateishi-Yuyama 2002).

1.4 Erythropoetin und seine Rezeptoren

1.4.1 Erythropoetin

Erythropoetin wird der Typ 1 Zytokin Superfamilie zugerechnet. Es ist ein unverzweigtes, saures Polypeptid, welches aus vier antiparallelen α -Helices besteht. Das native Erythropoetinmolekül weist eine heterogene Mikrostruktur auf. So unterscheiden sich einzelne Moleküle entweder in der Abfolge von Monosacchariden der Saccharidseitenketten oder in der Anzahl von endständigen N-Acetyl-Neuraminsäuren. Mit zunehmendem Sialinisierungsgrad nimmt die Halbwertszeit des Moleküls zu, seine Affinität am Erythropoetinrezeptor jedoch ab (Egrie 2001). Bei der Herstellung von Erythropoetinpräparaten wird dieses Verhalten genutzt. So besitzt Darbepoetin alpha eine vierfach geringere Affinität am Erythropoetinrezeptor und eine um das dreifache verlängerte Halbwertszeit als Epoetin beta (Egrie 2003). Das Hormon wird physiologischerweise beim Erwachsenen in den proximalen Tubuluszellen, den mesangialen und glomerulären Zellen der Niere und zum geringeren Teil auch im Leberparenchym gebildet. Darüber hinaus konnte eine geringe Syntheseaktivität in anderen Organen wie dem Gehirn, der Milz, der Lunge, im Knochenmark sowie in den Reproduktionsorganen nachgewiesen werden (Chong 2002a, Fisher 2003).

Das für Erythropoetin kodierende Gen, liegt auf dem q-Arm des Chromosoms 7. Das Ausmaß seiner Transkription hängt maßgeblich von HIF-1 und HIF-2 (Hypoxia-inducible factor 1 bzw. 2) ab. Beide Moleküle bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit. Die α - Untereinheit findet sich im Zytoplasma und besteht aus einer Region mit Prolylresten (oxygen-dependent degradation domain; ODDD) und der eigentlichen Transaktivierungsregion (transactivation domain; TAD). Unter normoxämischen Bedingungen wird das Molekül durch Hydroxylasen an seinen Prolylresten hydroxyliert. Die hydroxylierten Prolylreste interagieren mit dem Von-Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein, welches die Ubiquitierung und damit den Abbau des HIF-Moleküls durch Proteasen mediert. Unter hypoxämischen Bedingungen werden die Prolylhydroxylasen inhibiert, das HIF- α Molekül reichert sich im Zytoplasma an, bindet an Coaktivatoren und transloziert schliesslich in den Zellkern. Dort bindet es an die HIF- β Untereinheit und bildet so die Heterodimere HIF-1 oder HIF-2. Die so gebildeten Heterodimere interagieren mit HRE (hypoxia response element), einer Enhancerregion des Erythropoetingenens (Foley 2008). Durch diese Interaktion wird die Transkription des Genes verstärkt (Beck 1991).

1.4.2 Erythropoetinrezeptor

Der Erythropoetinrezeptor ist ein 66 Kilodalton schweres Glykoprotein, bestehend aus zwei Transmembranpeptidketten und gehört zur Familie der Zytokinrezeptoren. Erythropoetinrezeptoren wurden nicht nur im Knochenmark und in der Niere sondern auch in einer Vielzahl anderer Organe des menschlichen Organismus, unter anderem auf Kardiomyozyten des Atriums und des Ventrikels, sowie auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäß-Media gefunden. Eine Übersicht über das Vorkommen im menschlichen Organismus gibt Tabelle 2.

Der Rezeptor kann sich als Homodimer mit einem weiteren Erythropoetinrezeptor zusammenlagern. Dieser als „(EPOR)₂“ bezeichnete Rezeptor ist überwiegend im Knochenmark auf erythrozytäre Progenitorzellen zu finden (Silva 1996). Darüber hinaus vermag der Rezeptor mit dem common-beta-receptor (CD131) als Liganden ein Heterodimer zu bilden (Jubinsky 1997). CD131 ist ein Bestandteil der Rezeptoren der Zytokine Interleukin(IL)-3, Granulocyte macrophage colony-stimulating-factor (GM-CSF) und Interleukin(IL)-5. Das Erythropoetin-Rezeptor-Homodimer und CD131 bilden den β_2 -Rezeptor. Dieser Rezeptor besitzt eine geringere Affinität für Erythropoetin (Masuda 1993). Beide Rezeptoren können parallel auf der Oberfläche einer Zelle vorhanden sein, eine Hochregulierung von (EPOR)₂ erhöht auch die Rezeptordichte von CD131 (Ebie 2007). Weder (EPOR)₂ noch der CD131 besitzen eigene intrinsische Aktivität, sondern vermitteln ihre Wirkung über eine Reihe von Signaltransduktionskaskaden. Darunter befindet sich die JAK-STAT(Janus kinase-signal transducers and activators of transcription)-Signalkaskade, welche zur Hochregulierung von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen wie B-cell-lymphoma-2 (Bcl-2) führen, die Ras/MAP(Ras/mitogen-activated-protein)-Kinase und der PI(Phosphatidylinositol)-3-Kinase-Signaltransduktionsweg.

Weiterhin aktiviert Erythropoetin die Bildung der Protein Kinase-C und hemmt die Bildung des Nuclear Factor- κ B (Latini 2008). Den einzelnen Signalkaskaden werden verschiedene Aufgaben zugesprochen. Vermutlich können durch Veränderung der spezifischen Membrankonfiguration von Proteinuntereinheiten des Erythropoetinrezeptors selektiv spezifische Signaltransduktionswege aktiviert werden (Brines 2008).

Organsystem	Zellen
Knochenmark	erythroide Progenitorzellen
Niere	peritubuläre Zellen
Gehirn	Neuronen, Astrozyten
Herz	atriale und ventrikuläre Myozyten
Gefäße	Endothelzellen, glatte Muskelzellen
Reproduktionsorgane	Endometriumzellen, Follikelzellen des Ovars
Lunge	Alveolarmakrophagen
Verdauungsorgane	Mukosazellen des Magens
Prostata	Epithelzellen der Prostata

Tabelle 3: Verteilung von Erythropoetinrezeptoren im menschlichen Organismus nach Marzo (Marzo 2008); es gilt zu beachten, dass der Übersicht der Verteilung von Erythropoetinrezeptoren im menschlichen Organismus Studien zu Grunde liegen, die durch die Verwendung ungeeigneter Analysemethoden nicht zwischen der homodimeren und heterodimeren Isoform des Rezeptors zu unterscheiden vermögen

1.4.3 Hämatopoetische Wirkung von Erythropoetin

Auf das Knochenmark und die Niere zeigt Erythropoetin einen endokrinen Wirkmechanismus (Lappin 2002). Dabei findet sich eine Rückkopplungsschleife zwischen der Erythropoetin produzierenden Niere auf der einen und dem Erythrozyten produzierenden Knochenmark auf der anderen Seite. Im Knochenmark wirkt Erythropoetin auf die Differenzierung von erythroiden Stammzellen wie BFU-E (erythroiden Burst Forming Units) und CFU-E (erythroide Colony Forming Units) zu Normoblasten (Fisher 2003). Darüber hinaus werden ruhende Stammzellen reaktiviert (Ghezzi 2004).

1.4.4 Nicht hämatopoetische Wirkung von Erythropoetin

1.4.4.1 Entstehung und Regulation einer Immunreaktion in ischämischen Geweben

Jede Art von Zellschaden führt über eine Reihe von Mechanismen zu einer Entzündungsantwort des Organismus. Hypoxische Zustände wie sie beim Myokardinfarkt auftreten führen zum Integritätsverlust der Zellmembranen, wodurch Alarmine freigesetzt werden (Oppenheim 2005) und eine Entzündungsantwort generiert wird (Klune 2008). Zellen im Bereich der Läsion produzieren unter anderem das Zytokin Tumor necrosis factor(TNF)- α , welches pro-apoptotische Signalkaskaden in Nachbarzellen aktiviert, die Bildung freier Radikale fördert und eine generalisierte Entzündungsantwort bewirkt. Gleichzeitig reguliert TNF- α die Entzündungsreaktion. Dieser modulierende Effekt dient der Kontrolle und Begrenzung der Entzündung. Auch Erythropoetin und ist an dieser Modulation beteiligt. Erstmals wurde das Zusammenwirken von TNF- α und Erythropoetin in Mausmodellen des Schlaganfalls beschrieben. TNF- α induziert die Expression des Erythropoetinrezeptors im Gebiet des Zellschadens, hemmt aber die Produktion von Erythropoetin in diesem Gebiet (Sadamoto 1998, Nagai 2001). Im Bereich der Penumbra hingegen, also dem Areal, welches eine niedrige Sauerstoffspannung aufweist, der Sauerstoffpartialdruck aber noch hoch genug ist um ein Überleben der Zellen zu gewährleisten, wird eine ausgeprägte Produktion von Erythropoetin beobachtet (Bernaudin 1999). Die Konzentration von TNF- α nimmt somit vom Zentrum der Läsion zur Peripherie hin ab, die von Erythropoetin hingegen zu.

1.4.4.2 Gewebeprotective Effekte von Erythropoetin und seinen Rezeptoren

Sakanada und Kollegen wiesen 1998 erstmals die gewebeprotective Funktion von Erythropoetin im Mausmodell des Schlaganfalls nach (Sakanaka 1998), indem sie in einem eleganten Versuchsansatz zeigten, dass die Applikation von Erythropoetin das Infarktgebiet signifikant verkleinert, die Gabe des löslichen Erythropoetinrezeptors hingegen über eine Verminderung der Erythropoetinkonzentration das Infarktgebiet vergrößert. Gleichzeitig wiesen Sakanada und Kollegen damit nach, dass eine externe Applikation von Erythropoetin diese physiologischen Regulationsmechanismen positiv beeinflussen kann.

Seine direkte gewebeprotective Wirkung entfaltet Erythropoetin vorwiegend über seinen β_2 -Rezeptor (Brines 2004), indem es die Entzündungsantwort moduliert und Apoptosemechanismen von Zellen inhibiert. So reguliert Erythropoetin die Entzündungsantwort indem es die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin(IL)-6 und TNF- α hemmt (Strunk 2008, Yazihan 2008) und die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 positiv beeinflusst (Siren 2001). Die Apoptose wird vor allem über die Aktivierung des PI3-Kinase Weges (Parsa 2003) sowie über den MAP-Kinase Signalweg (Baker 2007) gehemmt. Weiterhin wirkt Erythropoetin protektiv auf Endothelzellen, indem es die Apoptose auch in diesen Zellen hemmt (Chong 2002b) und deren Proliferationsfähigkeit fördert (Anagnostou 1990). Hierdurch bleibt die Integrität des Zellverbandes und damit ein suffizienter Blutfluss in nachgeschalteten Regionen gewährleistet bleibt. Die antiapoptotischen Effekte des Erythropoetins laufen in Endothelzellen vor allem über die Aktivierung der Proteinkinase C (Wald 1996) und nachfolgend über die Hochregulierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) (Burger 2006). Das Hormon bewirkt dabei eine vermehrte Expression seines eigenen Rezeptors im Endothel und erhöht damit seine eigene Wirksamkeit (Beleslin-Cokic 2004).

Analog zu Schlaganfallmodellen zeigen Parsa und Kollegen in Ischämie-Reperfusion-Versuchen des Herzens, dass hochdosierte Erythropoetingaben antiapoptotische Effekte auf Kardiomyozyten aufweisen und das Infarktgebiet im Herzmuskelgewebe verringern können (Parsa 2003 und 2004). Ein funktioneller Erythropoetinrezeptor wurde hierbei von Wright und Kollegen nachgewiesen (Wright 2004). Hierbei scheint vor allem der Akt/PI3-Kinase-Transduktionsweg maßgeblich beteiligt zu sein (Hanlon 2005). Neben einer Verkleinerung des Infarktgebietes reguliert Erythropoetin Remodelingmechanismen (Calvillo 2003) und bewirkt im Mausmodell eine Verbesserung klinischer Parameter.

In Tiermodellen des Herzversagens verbesserte eine Erythropoetindosis von 40 Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht ($\mu\text{g}/\text{kg KG}$) alle drei Wochen signifikant die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, verhinderte die Dilatation des linken Ventrikels und führte zu einer gesteigerten Rekapillarisation des Infarktgebietes (Westenbrink 2007). Lipsic und Kollegen zeigte weiter, dass sowohl eine Hochdosistherapie mit Darbepoetin alpha mit 40 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ (entspricht 8000 IE) als auch eine niedrigere Dosierung von 20 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ (entspricht 4000 IE) zu einer Verbesserung der Herzfunktion führt, die Hochdosistherapie jedoch darüber hinaus einen Anstieg des Hämatokrits bewirkt (Lipsic 2008). Moon und Kollegen beobachteten, dass die kardioprotektive Wirkung von Erythropoetin abhängig von der Zeit zwischen Ischämiebeginn und Applikation von Erythropoetin ist (Moon 2005). Eine sehr geringe Dosis von 150 IE pro Kilogramm Körpergewicht war genauso effektiv wie eine Dosis von 3000 IE wenn sie innerhalb von vier Stunden nach Ischämiebeginn verabreicht wurde. Ebenso war eine einmalige Gabe von Erythropoetin einer mehrmaligen, über sieben Tage andauernden gleichwertig (Moon 2006).

1.4.5 Klinischer Einsatz

Die häufigste Indikation für den Einsatz von Erythropoetinpräparaten ist derzeit die Anämie im Rahmen des chronischen Nierenversagens mit einem konsekutivem Ausfall des Erythropoetin produzierenden Nierenparenchyms, tumorassoziierte Anämien, die Reduzierung von allogenen Bluttransfusionen bei elektiven Operationen und die Therapie Chemotherapeutika induzierter Anämien.

1.5 Zirkulierende Progenitorzellen, Erythropoetin und Myokardinfarkt

Auf Grund der bekannten Fähigkeiten zirkulierender Progenitorzellen galt es zu überprüfen, ob durch eine Erhöhung ihrer Konzentration die Prognose von Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen verbessert werden kann. Heeschen und Kollegen beobachteten 2003, dass bei koronarer Herzkrankheit die Konzentration zirkulierender Progenitorzellen mit dem Serumspiegel von Erythropoetin positiv korreliert (Heeschen 2003). Bahlmann und Kollegen zeigten ein Jahr später, dass eine Erythropoetingabe von Extern zur Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark führt (Bahlmann 2004). Eine wichtige Rolle scheint hier die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase in Stromazellen des Knochenmarks und Ihre Aktivierung über Erythropoetinrezeptoren zu spielen (Aicher 2003). Die erste Studie, welche den Einfluss von Erythropoetin bei akutem Myokardinfarkt untersucht wurde 2006 von Lipsic und Kollegen durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine kurzzeitige Erythropoetingabe zu einem signifikanten Anstieg endothelialer Progenitorzellen führt (Lipsic 2006). Nakamura und Kollegen beobachteten 2009, dass die maximal erreichte Erythropoetinkonzentration im Serum bei akutem Myokardinfarkt mit der Veränderung der linksventrikulären Ejektionsfraktion zwischen dem Tag der Aufnahme und dem Follow-Up nach sechs Monaten korreliert (Nakamura 2009). Ebenso ist im Tiermodell eine enge positive Korrelation zwischen der kardialen Funktion nach Ischämie, der Konzentration zirkulierender Progenitorzellen und der Kapillardichte neu gebildeter Gefäße im Bereich der Läsion nachweisbar (Westenbrink 2007).

Obwohl in einigen Studien eine Verbesserung der kardialen Funktion mit einem Anstieg des Hämatokrits einher ging, konnte die kardioprotektiven Wirkungen nicht der Induktion der erythrozytären Zelllinie zugesprochen werden, da dafür die Applikationszeit von EPO zu gering war (Parsa 2003), in vitro Versuche an Kardiomyozyten (Calvillo 2003) oder isolierten Herzen (Cai 2004) ähnliche Ergebnisse zeigten und Carbamyl-Erythropoetin, welches keine hämatopoetische Aktivität aufweist, ebenfalls kardioprotektive Ergebnisse reproduziert (Leist 2004).

1.6 In-Stent Restenose: Ursachen und Mechanismen

Die Ballondilatation von stenosierten Gefäßen und die Platzierung von Fremdkörpern im Gefäßlumen kann zur Bildung einer erneuten Verengung an gleicher Stelle, der so genannten In-Stent Restenose führen. Hauptort der Entstehung ist die mittlere Gewebsschicht der Arterien, die Gefäß-Media. Durch die Ballondilatation und nachfolgender Stenteinlage kommt es zur Abschabung der innersten Endothelzellschicht der Gefäße, der Intima. Diese endotheliale Denudation setzt eine Reihe von weiteren Mechanismen in Gang und wird als Hauptfaktor für die Entwicklung einer Restenose angesehen (Bennett 2001). Unter der geschädigten Intima kommt es zur lokalen Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Entzündungszellen und konsekutiv zur Apoptose glatter Muskelzellen und Proliferation von Myofibroblasten. An den hyperplastischen Vorgängen sind auch Entzündungszellen und zirkulierende Progenitorzellen des Knochenmarks beteiligt. Zirkulierende Progenitorzellen stellen bei Endothelläsionen bis zu 60% der glatten Muskelzellen der Media (Tanaka 2003). Konsistent dazu sind experimentelle Daten, welche die Beteiligung von Zytokinen, die Progenitorzellen mobilisieren identifiziert haben. So führt die Hemmung von SDF-1 α im Tierversuch nach Gefäßverletzung zu einer signifikant geringeren intimalen Hyperplasie (Zernecke 2005). Glatte Muskelzellen zeigen im Bereich von Restenosen eine vermehrte Expression von CXCR4- und G-CSF Rezeptoren (Zohlhofer 2001). Weitere Arbeitsgruppen belegten die führende Rolle der SDF-1 α /CXCR4-Achse bei neointimalen Prozessen (Kollet 2003, Tögel 2005, Zernecke 2005, Langwieser 2009). Weiterhin heften sich am geschädigten Endothel aktivierte Thrombozyten an, werden aktiviert und setzen die Wachstumsfaktoren Platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF) und transforming growth factor (TGF), sowie Thrombin frei. Alle vier Substanzen führen zu einer Stimulierung des Wachstums glatter Muskelzellen der Media (Ross 1990, Majesky 1991). Um derartig überschüssender Reaktionen zu vermeiden wurden speziell beschichtete Stents entworfen, welche durch Freisetzung zytostatischer Substanzen wie Sirolimus zu einer verminderten Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen führen (drug eluting stents, DES). Der Einsatz derartig beschichteter Stents führte zu einer Reduktion der Inzidenz von In-Stent Restenosen (Greenhalgh 2010). Dennoch stagniert die Restenoserate bei etwa 2% aller Koronarinterventionen mit Einlage eines DES (de la Torre-Hernandez 2008) und verringern das Outcome nach PCI (Ormiston 1997).

Dies lässt darauf hindeuten, dass weitere, bisher unbekannte Mechanismen bei der Entwicklung der In-Stent Restenose mitwirken.

2 Zielsetzung der Studie

2.1 Zielsetzung der REVIVAL-3 Hauptstudie

Das Ziel der REVIVAL-3 Hauptstudie war, zu überprüfen ob eine kurzzeitige, hochdosierte Erythropoetingabe bei Patienten mit Myokardinfarkt nach perkutaner Koronarintervention eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion bewirkt. Die Ergebnisse werden in dieser Arbeit auszugsweise vorgestellt und entsprechend markiert.

In einer Pilotstudie mit 22 Patienten mit Myokardinfarkt konnte die Sicherheit und Durchführbarkeit einer Erythropoetingabe nachgewiesen werden (Lipsic 2006). Darüber hinaus zeigte sich ein signifikanter Anstieg endothelialer Progenitorzellen nach PCI. Auf Grund des kleinen Patientenkollektivs konnte jedoch keine Aussage über die Wirkung von Erythropoetin auf die linksventrikuläre Funktion oder das klinische Outcome gemacht werden. Dies soll nun im Rahmen der REVIVAL-3 Studie überprüft werden.

2.1.1 Arbeitshypothese

Die Arbeitshypothese der REVIVAL-3 Hauptsudie lautet wie folgt:

In Patienten mit ST-Hebungsinfarkt, die sich einer erfolgreichen primären perkutanen Koronarintervention unterziehen, ist eine kurzzeitige Gabe von Erythropoetin mit einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion assoziiert.

2.1.2 Endpunkte

2.1.3 Primärer Endpunkt

Als primärer Endpunkt wurde folgender Parameter festgelegt:

Primärer Endpunkt ist die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, gemessen durch Magnetresonanztomographie 6 Monate nach Randomisierung.

2.1.4 Sekundäre Endpunkte

Sekundäre Endpunkte waren:

- Bestimmung bzw. Veränderung folgender mittels Magnetresonanztomographie bestimmten Parameter: linksventrikuläre Ejektionsfraktion nach 5 Tagen und 6 Monate nach Randomisierung, Infarktgröße nach 5 Tagen und 6 Monate nach Randomisierung
- Bestimmung bzw. Veränderungen folgender Parameter mittels Koronarangiographie: linksventrikuläre Volumina und Ejektionsfraktion zum Zeitpunkt der Intervention und 6 Monate nach Randomisierung, Quantifizierung von Wandbewegungsstörungen des linken Ventrikels nach Sheehan und Kollegen (Sheehan 1985) zum Zeitpunkt der Intervention und 6 Monate nach Randomisierung
- Ereignisse wie Tod, nochmaliger Myokardinfarkt, Revaskularisierung der infarktassoziierten Arterie oder Schlaganfall nach 30 Tagen und 6 Monaten nach Randomisierung (major adverse cardiac or cerebrovascular events, MACCE).

2.2 Zielsetzung der REVIVAL-3 Substudie

Die Zielsetzung der REVIVAL-3 Substudie, deren Ergebnisse in dieser Arbeit vorgestellt werden, konzentriert sich vor allem auf den Einfluss von Erythropoetin auf die qualitative und quantitative Dynamik zirkulierender Progenitorzellen in Patienten mit akutem ST-Hebungs Infarkt. Bisherige Studien deuten auf einen Anstieg der Konzentration peripherer Progenitorzellen hin, jedoch muss die Größe des Patientenkollektivs mit 22 Patienten als zu gering erachtet werden um eine endgültige Aussage treffen zu können (Lipsic 2006). Entsprechend werden im Rahmen der REVIVAL-3 Studie Konzentrationen zirkulierender Progenitorzellen im peripheren Blut zu festgelegten Zeitpunkten bestimmt und die Durchschnittswerte der Patienten mit Erythropoetin (Erythropoetingruppe) denen der Patienten mit Plazebo (Plazebogruppe) gegenübergestellt. Darüber hinaus wird die Expression endothelialer und hämatopoetischer Marker auf zirkulierenden Progenitorzellen und deren Veränderung im zeitlichen Verlauf nach Randomisierung unter dem Einfluss von Erythropoetin untersucht.

Weiterhin soll der Einfluss von Erythropoetin auf die Entwicklung von MACCE und das Auftreten von Restenosen und ihr Zusammenhang mit der Konzentration und Funktionalität von zirkulierenden Progenitorzellen untersucht werden.

Zusammenfassend lassen sich für die REVIVAL-3 Unterstudie folgende Fragestellungen festlegen:

1. Welchen Einfluss hat Erythropoetin auf die Konzentrationen zirkulierender Progenitorzellen im peripheren Blut nach Myokardinfarkt?
2. Welchen Einfluss hat Erythropoetin auf die Expression von Adhäsionsrezeptoren auf zirkulierenden Progenitorzellen im peripheren Blut nach Myokardinfarkt?
3. Gibt es bei Patienten mit Myokardinfarkt einen Zusammenhang zwischen Restenose und zirkulierenden Progenitorzellen im peripheren Blut?
4. Gibt es bei Patienten mit Myokardinfarkt einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MACCE oder Restenose und zirkulierenden Progenitorzellen im peripheren Blut?

3 Studiendesign

Sowohl die REVIVAL-3 Hauptstudie als auch die REVIVAL-3 Unterstudie wurden vor Beginn der Studienbeginn am 19. Oktober 2006 auf der Homepage zur Registrierung klinischer Studien der medizinischen Nationalbibliothek der Vereinigten Staaten von Amerika (National Library of Medicine, NLM; www.clinicaltrials.gov) unter der Identifikationsnummer „NCT00390832“ registriert. Des Weiteren ist im Anhang 1 das Studienprotokoll der Haupt- und Unterstudie dargestellt.

3.1 Studiendesign der REVIVAL-3 Hauptstudie

Die REVIVAL-3 Studie wurde als prospektive, doppelblinde, plazebokontrollierte, randomisierte Studie angelegt um den Effekt einer kurzzeitigen Gabe von Epoetin-Beta (NeoRecormon[®], F. Hoffmann - La Roche AG, Basel) auf die kardiale Funktion von Patienten mit perkutaner Koronarintervention nach Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung zu untersuchen. Die Studienpopulation wird auf 120 Patienten festgelegt, die im „Deutschen Herzzentrum“, München, sowie in der „Ersten Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar“, München, rekrutiert wurden. Beide Kliniken sind Klinken der Technischen Universität München.

Im Folgenden werden die wichtigsten Ein und Ausschlusskriterien sowie studienrelevante Daten aufgelistet. Für eine detaillierte Auflistung wird auf das Studienprotokoll im Anhang 1 verwiesen.

3.1.1 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patienten mit ST-Hebungsinfarkt, wobei die Symptome innerhalb der letzten 24 Stunden aufgetreten sein mussten. Die primäre perkutane Koronarintervention musste erfolgreich durchgeführt worden und die angiographisch abgeschätzte linksventrikuläre Ejektionsfraktion kleiner 50% sein. Darüber hinaus musste eine schriftliche Zustimmung des informierten Patienten oder seines/ihrer Bevollmächtigten (informed, written consent), an der Studie teilnehmen zu wollen, vorliegen. Bei Patientinnen im gebärfähigen Alter war ein negativer Schwangerschaftstest obligatorisch.

3.1.2 Ausschlusskriterien

Entsprechend des Studienprotokolls wurden Patienten unter 18 und über 80 Jahren, sowie Schwangere und Patienten mit einer Kontraindikation für die Magnetresonanztomographie ausgeschlossen. Weiterhin wurden Patienten im kardiogenen Schock, Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz (Stadium III oder IV der Killip Klassifikation) und Patienten mit folgenden Erkrankungen nicht in die Studie aufgenommen: bereits stattgehabter Myokardinfarkt, Perikarditis, maligne Grunderkrankungen oder andere Erkrankungen mit einer Lebenserwartung unter einem Jahr, Thrombolyse des zur Aufnahme führenden Myokardinfarktes, medikamentös nicht einstellbarer arterieller Hypertonus, Epilepsie, hämatologische Erkrankungen, das Gerinnungssystem betreffende Erkrankungen, Niereninsuffizienz mit einer glomerulären Filtrationsrate unter 30 Milliliter pro Minute und chronische Lebererkrankungen mit Erhöhung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase über dem 5-fachen des Normalwertes.

3.1.3 Randomisierung

Direkt nach erfolgreicher primärer PCI wurden die Patienten zu gleichen Teilen in die Erythropoetingruppe bzw. Plazebogruppe eingeteilt. Der Zeitpunkt Null wurde als der Zeitpunkt der Randomisierung festgelegt.

3.1.4 Applikation von Erythropoetin und Plazebo

Das Studienmedikament wurde mit einer Gesamtdosis von $9,9 \times 10^4$ IU appliziert, wobei die Gesamtdosis auf drei Gaben verteilt wird. Die einzelnen Dosen mit einer Dosis von $3,3 \times 10^4$ IU wurden jeweils in 50ml 0,9%iger Natriumchloridlösung als intravenöse Kurzinfusion über 30 Minuten verabreicht. Die Plazebogabe von 50ml 0,9%iger Natriumchloridlösung erfolgte analog zur Erythropoetingabe.

Die erste Gabe von Erythropoetin bzw. Plazebo erfolgte direkt nach Randomisierung, die zweite Gabe 24 Stunden, die dritte Gabe 48 Stunden nach Randomisierung (siehe Abbildung 2).

3.1.5 Behandlung und Monitoring der Patienten

Die medikamentöse Therapie der Patienten beinhaltete eine antithrombotische Therapie mit zweimal 75 Milligramm Clopidogrel täglich in den ersten drei Tagen gefolgt von einmal 75 Milligramm täglich für sechs Monate. Weiterhin wurde allen Patienten zweimal täglich 100 Milligramm Aspirin für einen unbegrenzten Zeitraum verordnet.

Nach Intervention wurden die Patienten auf Intensivstation überwacht und im Laufe ihres weiteren Klinikaufenthaltes auf Normalstation weiterverlegt. Das Follow-Up beinhaltete bis zur Entlassung eine tägliche Überwachung folgender Parameter:

- Gerinnungsparameter: aktivierte Gerinnungszeit (ACT) oder aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)
- kardiale Enzyme: Kreatinkinase (CK, CK-MB), Troponin T oder Troponin I
- Blutbild: Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit
- Leberenzyme: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Gamma-Glutamyl-Transferase (γ -GT)
- Nierenfunktionsparameter: Serumkreatinin
- Entzündungsparameter: C-reaktives Protein (CRP)

3.2 Studiendesign der REVIVAL-3 Substudie

3.2.1 Allgemeines

Die Patienten rekrutierten sich ausschließlich aus dem Patientenkollektiv der REVIVAL-3 Hauptstudie.

3.2.2 Studienprotokoll

Neben den täglich abgenommenen Laborparametern wurden nach festem Zeitschema insgesamt fünf Blutproben gewonnen (siehe Abbildung 2). Die erste Blutentnahme erfolgte direkt nach Randomisierung und vor der ersten Erythropoetingabe. Die zweite Blutentnahme wurde 12 Stunden nach der ersten Erythropoetingabe durchgeführt, die dritte unmittelbar vor der dritten Erythropoetingabe, die vierte 12 Stunden nach der dritten Erythropoetingabe und die fünfte 72 Stunden nach der dritten Erythropoetingabe.

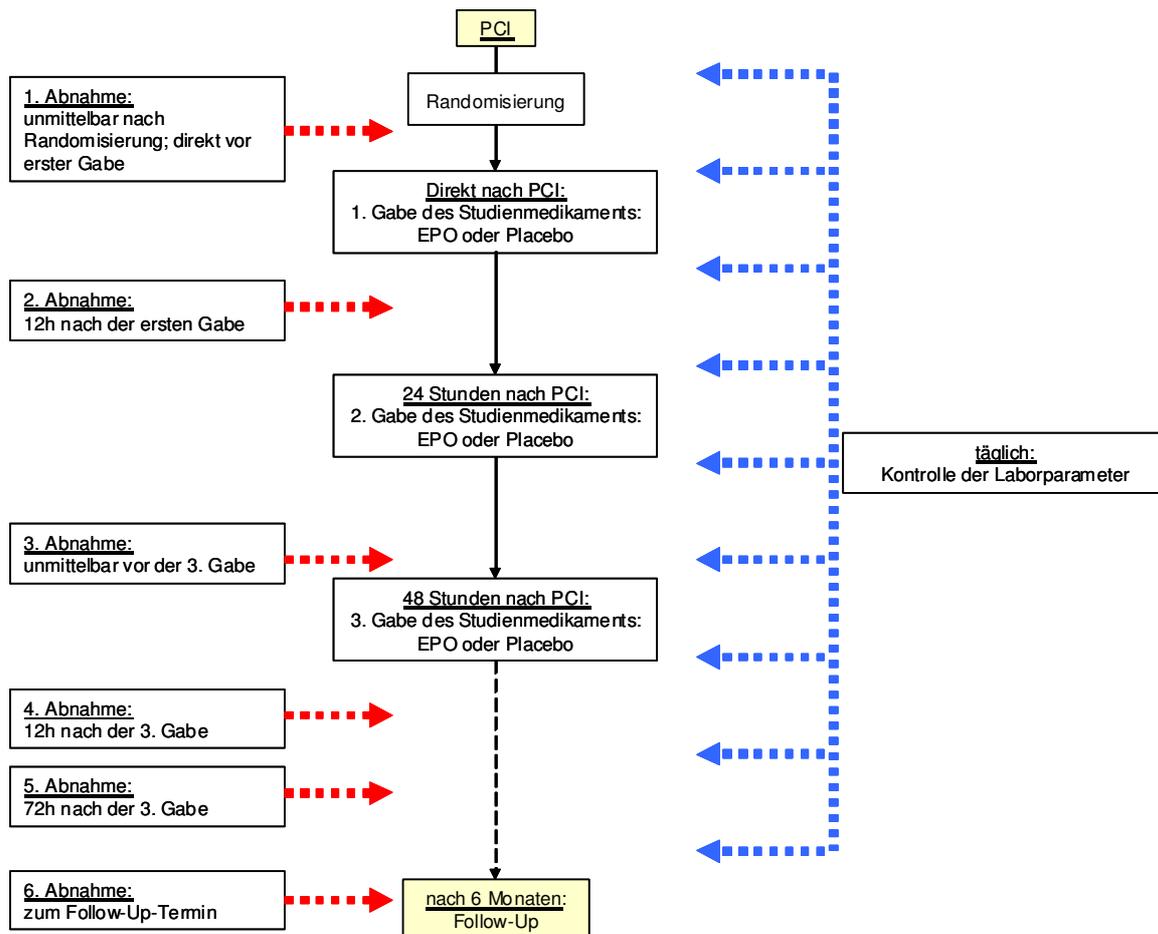


Abbildung 2: Studienprotokoll der REVIVAL-3 – Substudie; rote Pfeile markieren die Abnahmen der Blutproben für die Analyse zirkulierender Progenitorzellen; blaue Pfeile stehen für die tägliche Kontrolle der Laborparameter

4 Methoden

4.1 Durchflusszytometrie

4.1.1 Aufbau eines Durchflusszytometers

Das Durchflusszytometer „FacsCalibur“ der Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, welches die Grundlage der durchflusszytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Studie bildete, setzt sich – vereinfacht dargestellt – aus einer Messeinheit, bestehend aus dem Probenführungssystem, einem luftgekühlten 448 Nanometer (nm) Argonlaser und einem 633 nm Diodenlaser zur Fluoreszenzanregung, mehreren achromatischen, sphärischen Linsen, einem Spiegelsystem zur Auftrennung des emittierten Lichtes entsprechend ihrer Wellenlänge und fünf Photonenelektronen-Vervielfachern (photo multiplier) zur Detektion von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften zusammen. Das Durchflusszytometer ist mit einem Datenverarbeitungssystem verbunden, welches die Ergebnisse der Messungen interpretiert, speichert und in Echtzeit visualisiert.

4.1.2 Funktionsprinzip

Das Verfahren der Durchflusszytometrie vermag einzelne Leukozytenpopulation sehr genau, sowohl auf Grund ihrer Streulichteigenschaften als auch auf Grund ihrer spezifischen Fluoreszenzintensität zu unterscheiden.

Zur tatsächlichen Messung einer Probe muss diese als monodisperse Einzelzellsuspension vorliegen. Dies ist notwendig, da die Messeinheit des Durchflusszytometers nur die Parameter einer Zelle gleichzeitig messen kann. Die Probenlösung wird dazu mittig in einen laminaren Hüllstrom injiziert („A“ in Abbildung 3), wodurch die Probe zentriert und die Zellen hintereinander zum Analysepunkt („B“ in Abbildung 3) geleitet werden. Am Analysepunkt passieren die Zellen die Laser und streuen das Licht, wobei das Ausmaß der Streuung direkt proportional zum Zellvolumen, gemessen mit dem Vorwärtsstreulicht (FSC) und zur Zellgranularität, gemessen mit einem zur Bewegungsrichtung der Zellen rechtwinklig angebrachten Laser (Seitwärtsstreulicht SSC), ist. SSC korreliert mit dem Gehalt an Zellgranula in den Zellen, wodurch eine Differenzierung der einzelnen Leukozytensubpopulationen ermöglicht wird.

Wenn die Zellen vorher mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Antikörpern inkubiert wurden, absorbieren diese einen Teil der Laserenergie und emittieren Licht einer farbstoffspezifischen Wellenlänge. Zwischen der Expressionshäufigkeit eines bestimmten Antigens auf der Zelloberfläche und der messbaren Fluoreszenzintensität besteht ein linearer Zusammenhang (Watson 1986).

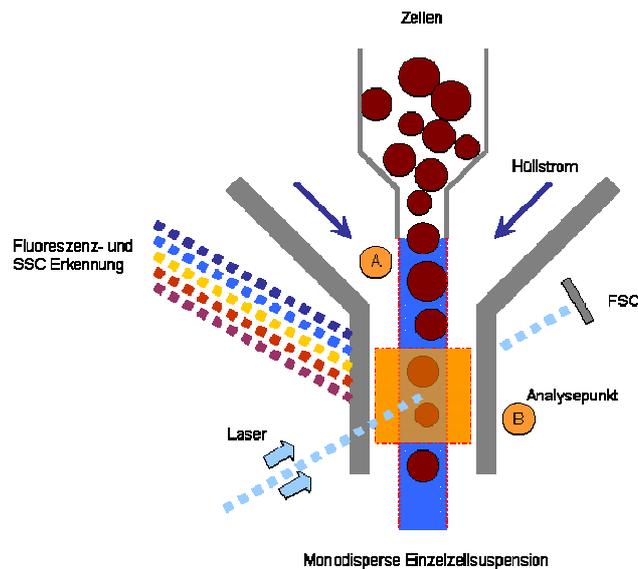


Abbildung 3: Schema der Probenmessung am Analysepunkt eines Durchflusszytometers; die Zellen werden in einen laminaren Hüllstrom (A) eingebettet und so zum Analysepunkt (B) geleitet

Lichtintensität und Streuung werden über ein Spiegelsystem und Filter den einzelnen Photodetektoren zugeleitet und dort in elektronische Signale umgewandelt. Dabei ist die Menge des auftreffenden Lichtes proportional zur entstehenden elektronischen Spannung und damit zum elektronischen Signal selbst.

Das Durchflusszytometer stellt im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie eine deutlich objektivere, zeitsparendere und kostengünstigere Methode dar, da die Messung automatisiert ist, bis zu 2000 Zellen pro Sekunde gemessen werden können und das Gerät in der Lage ist, bis zu neun verschiedene Parameter gleichzeitig zu messen.

4.1.3 Applikationsmöglichkeiten

Die Überlegenheit der Durchflusszytometrie gegenüber anderen Methoden hat dazu geführt, dass sie als Routineuntersuchung sowohl im klinischen Alltag, z.B. im Rahmen der Leukämiediagnostik, des „Immunmonitoring“ von HIV-Patienten, Organtransplantierten oder Tumorpatienten, als auch im Bereich der Forschung zur Differenzierung von Oberflächenantigenen und -rezeptoren sowie zur HLA-Typisierung verwendet wird.

4.1.4 Verwendete Fluorochrome

Zur Messung von Zellparametern mittels Durchflusszytometrie müssen Fluoreszenzmarkierte Antikörper an die Zelloberfläche binden. Dabei lassen sich durch den Einsatz verschiedener Fluorochrome eine Vielzahl von verschiedenen Eigenschaften gleichzeitig nachweisen. Limitierend ist dabei die Anzahl und Art der verwendeten Laser.

Die meisten Fluorochrome lassen sich durch Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488nm anregen. Dazu zählen Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridin-Chlorophyll-Protein-Komplex (PerCP). Durch den 633nm Diodenlaser kann unter anderem Allophycocyanin (APC) angeregt werden.

Für die Unterscheidung der einzelnen Fluorochrome sind ihre spezifischen Emissionsmaxima entscheidend. Liegen die Maxima weit genug auseinander, so können die einzelnen Fluorochrome von entsprechend eingestellten Photoelektronenvervielfachern detektiert werden. Eine Übersicht über die verwendeten Fluorochrome gibt Tabelle 4.

Messparameter	Messkanal	Absorptionsspektrum des Bandpassfilters in nm	Charakteristika des Fluorochroms		
			Fluorochrom	Maxima in nm	
				Absorption	Emission
Zellvolumen	Vorwärtsstreulicht (FSC)	488			
Zellgranularität	Seitwärtsstreulicht (SSC)	488			
Immun- fluoreszenz	FL1	530	FITC	495	519
	FL2	585	PE	480; 565	578
	FL3	670	7-AAD	546	647
	FL4	661	APC	650	660

Tabelle 4: Übersicht über die durch ein Durchflusszytometer messbaren Parameter und die in der Studie verwendeten Fluorochrome; FITC = Fluoreszin-Isotiozyanat; PE = Phycoerythrin; 7-AAD = 7-Actinomycin D; APC = Allophycocyanin

4.2 Probenaufbereitung

4.2.1 Verwendete Antikörperkonjugate

In der von uns durchgeführten Studie, wurden pro Blutprobe sechs Parameter mit Hilfe des Durchflusszytometers gemessen. Diese sind die Vorwärtsstreuung (FSC), Seitwärtsstreuung (SSC), sowie Immunfluoreszenzverteilungen für sieben mit fluoreszierenden Stoffen konjugierte Antikörper. Diese sind CD45, CD113, CXCR4 sowie 7-AAD. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Antikörperkonjugate findet sich in

Tabelle 5.

Spezifität	Klon	Spezies	Isotyp	Fluorochrom	Hersteller
CD45	2D1	Maus	IgG1	APC	1)
CD133	CD133/1	Maus	IgG1	PE	2)
CXCR4	FAB170F	Maus	IgG2A	FITC	3)
7-AAD				7-AAD	1)

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Antikörperkonjugate; 1) BD-Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA; 2) MACS-Mitenyi Biotec, Auburn, Kalifornien, USA; 3) R&D-Systems, Minneapolis, USA

4.2.2 Aufbereitungsprotokoll

Für die Fluoreszenzfärbung der Zellen wurden am sterilen Arbeitsplatz zwei Ansätze mit Heparinvollblut, nämlich ein Isotypansatz mit CD45 und ein Messansatz mit CD45, CD133, CXCR4 und 7-AAD vorbereitet (siehe Tabelle 6). In jedem Ansatz wurde entsprechend der Tabelle Antikörper vorgelegt. Beide Ansätze wurden auf 50 Mikroliter (μl) mit Vollblut aufgefüllt, entsprechend wurden für den Ansatz des Referenzwertes $48,75 \mu\text{l}$ ($50 \mu\text{l} - 1,25 \mu\text{l} = 48,75 \mu\text{l}$), für den Messansatz $36,25 \mu\text{l}$ ($50 \mu\text{l} - 13,75 \mu\text{l} = 36,25 \mu\text{l}$) hinzupipetiert.

Anschließend wurden beide Ansätze für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, danach mit $500 \mu\text{l}$ 10%iger FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, USA) aufgefüllt und für weitere 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben mit 2 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; Gibco-DPBS, Invitrogen Corporation, Auckland, Neuseeland) bei 1700 Umdrehungen pro Minute (u/min) für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zum Schluss wurden für die Messung am Durchflusszytometer 200 bis $300 \mu\text{l}$ PBS zugegeben.

Ansatz	Isotypansatz CD45	Messansatz CD133 und CXCR4
Antikörper	1,25 μl CD45	1,25 μl CD45, 5,0 μl CD133, 5,0 μl CXCR4, 2,5 μl 7-AAD
Summe Antikörper	1,25 μl	13,75 μl
Probenblut	auffüllen des Ansatzes mit EDTA-Vollblut auf 50 μl	
Inkubation	30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur	
Lyse	Lysieren der Erythrozyten mit 500 μl 1:10 verdünntem Lyse-Konzentrat	
Inkubation	10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur	
Waschen	2 x mit PBS, jeweils 5 Minuten bei 1700u/min	
Messung		

Tabelle 6: Pipettierschema REVIVAL-3 Unterstudie zur Analyse zirkulierender Progenitorzellen

4.2.3 Messung und Analyse der Proben

4.2.3.1 Qualitätssichernde Massnahmen

Die Messung der Proben erfolgte mit einem Gerät der Firma Becton Dickinson (FACS Calibur). Zur Analyse der Proben wurde ein angeschlossener Computer der Firma Macintosh und die Software CellQuest (BD Biosciences, San Jose, USA) verwendet. Während der gesamten Dauer der Studie wurden weder die Laser- oder Spiegelbauteile des Durchflusszytometers ausgewechselt oder in ihrer Konfiguration verändert, noch ein anderes Durchflusszytometer verwendet. Bei der Analyse der Proben wurde darauf geachtet, dass die Analyse der unterschiedlichen Antikörperansätze nach dem gleichen Schema verläuft. Darüber hinaus wurden alle Auswertungen ausschließlich durch meine Person durchgeführt um eine etwaige Variabilität der Ergebnisse innerhalb menschlicher Ermessensspielräume so gering wie möglich zu halten. Diese Maßnahmen sollen die Vergleichbarkeit und die Validität der Ergebnisse gewährleisten.

Generell wurde bei den Analysen immer der Isotypansatz, welcher nur Antikörper gegen CD45 enthält dem Messansatz gegenübergestellt. So konnte sichergestellt werden, dass zum Beispiel Verunreinigungen oder in Lösung befindliche ungebundene Antikörper irrtümlich als Zellen identifiziert wurden.

Um unspezifisch gefärbte Zellreste oder Thrombozyten Aggregationen aus der Messung auszuschließen, wurde die Analyse der einzelnen Antikörperansätze einheitlich mit der Analyse der aufgetragenen Population nach Größe und Granularität (FSC zu SSC) begonnen. Dabei wurden Ereignisse ausgeschlossen, die auf einem 1024 auf 1024 Punkte umfassenden Punktdiagramm eine Größe (FSC) unter 100-150 oder eine Granularität (SSC) unter 100-150 aufwiesen. Die durch diesen Vorgang gegatete Region R1 war Grundlage für alle weiteren Analysen. Region R1 wurde derartig gewählt, dass die mononukleären Zellen des peripheren Blutes, also Lymphozyten, Monozyten, sowie klein-granulierte neutrophile Granulozyten eingeschlossen wurden. (siehe Abbildung 4). Pro Probe wurden 20×10^4 Ereignisse gemessen, wobei die durchschnittliche Durchflussrate so gewählt wurde, dass sie 600 Ereignisse pro Minute nicht überschritt.

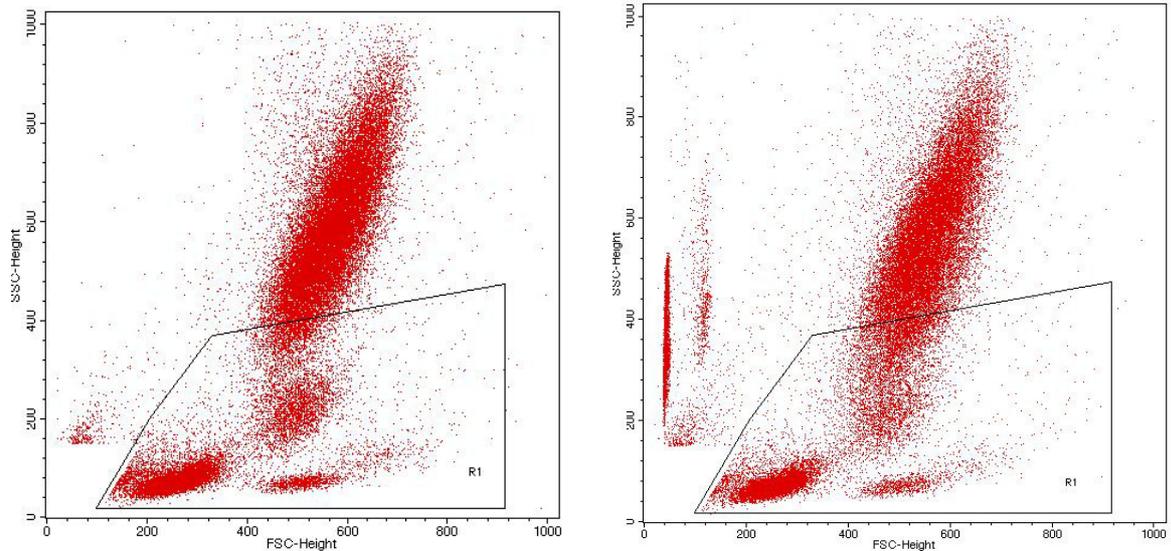


Abbildung 4: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung zur Darstellung der Größe und Granularität des Messansatzes; x-Achse: FSC, y-Achse: SSC; R1: mononukleäre Zellen

Links: Isotypansatz mit Anti-CD45 Antikörpern (AK); Rechts: Messansatz mit Anti-CD45 AK, Anti-CD133 AK, Anti-CXCR4 AK, 7-AAD, TruCount Mikropartikel

Die in Region R1 gategeten Zellen wurden anschliessend in einem neuen Punktdiagramm hinsichtlich ihrer Expression von CD45 und ihrer Größe (FSC) untersucht. In Region R2 wurden alle CD45 positiven Zellen eingeschlossen (siehe Abbildung 5).

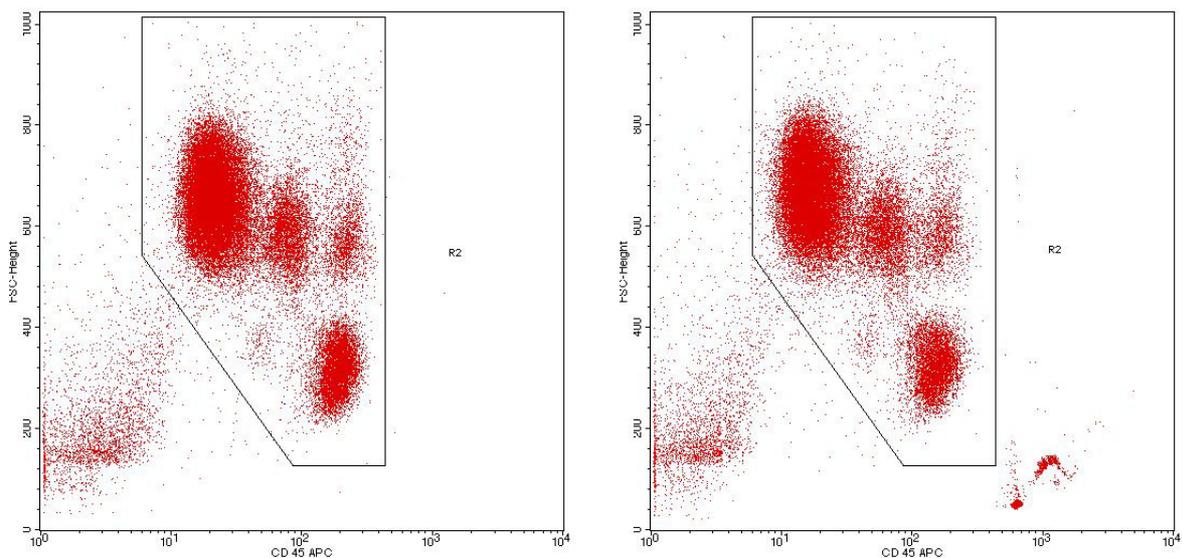


Abbildung 5: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung zur Darstellung CD45 positiver Zellen; x-Achse: Fluoreszenzintensität von Anti-CD45 AK, y-Achse: FSC; R2: Gesamtheit der CD45 positiven Zellen

Links: Isotypansatz mit Anti-CD45 AK; Rechts: Messansatz mit Anti-CD45 AK, Anti-CD133 AK, Anti-CXCR4 AK, 7-AAD, TruCount Mikropartikel

Da im Rahmen der durchflusszytometrischen Messung der Proben eine Analyse von 200.000 Zellen angestrebt wurde, schwankt die Menge an gemessener Zellsuspension mit ihrer Konzentration.

Um eine verlässliche Konzentrationsbestimmung und damit eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurde der Vollblutansatz vor Analyse im Durchflusszytometer in ein Röhrchen mit Microbeads (TruCount, Becton Dickinson) umpipetiert. Die Konzentrationen von Leukozytenpopulationen lassen sich dadurch mit geringem Fehler und hoher Reproduzierbarkeit bestimmen (Wayne 1998) und werden auf breiter Basis unter anderem für die korrekte Konzentrationsbestimmung von CD34 positiven Zellen verwendet (Sutherland 2009). TruCount Röhrchen enthalten eine gefriergetrocknete Substanz mit einer bekannten Anzahl an wasserlöslichen Mikropartikeln, die bei Anregung Licht eines breiten Spektrums mit hoher Intensität emittieren. Entsprechend lassen sich die Mikropartikel bei der Analyse in jedem Kanal detektieren. Die Intensität des Signals ist dabei jedoch so hoch, dass die gleichzeitige Analyse von im gleichen Kanal gemessenen fluoreszenzkonjugierten Antikörpern nicht beeinträchtigt wurde. Die Detektion der Mikropartikel erfolgte entsprechend der Anweisungen der Herstellerfirma in einem Punktdiagramm, das den Fluoreszenzkanal 1 (FL1-H in Abbildung 6) des Durchflusszytometers gegen den Fluoreszenzkanal 2 (FL2-H) des Durchflusszytometers gegeneinander aufträgt. Der Referenzwert wurde entsprechend eingestellt und – sofern Ereignisse im Referenzwert auftraten – von der Anzahl der gemessenen Mikropartikel subtrahiert. Die Mikropartikel wurden in Region R3 gegatet (siehe Abbildung 6).

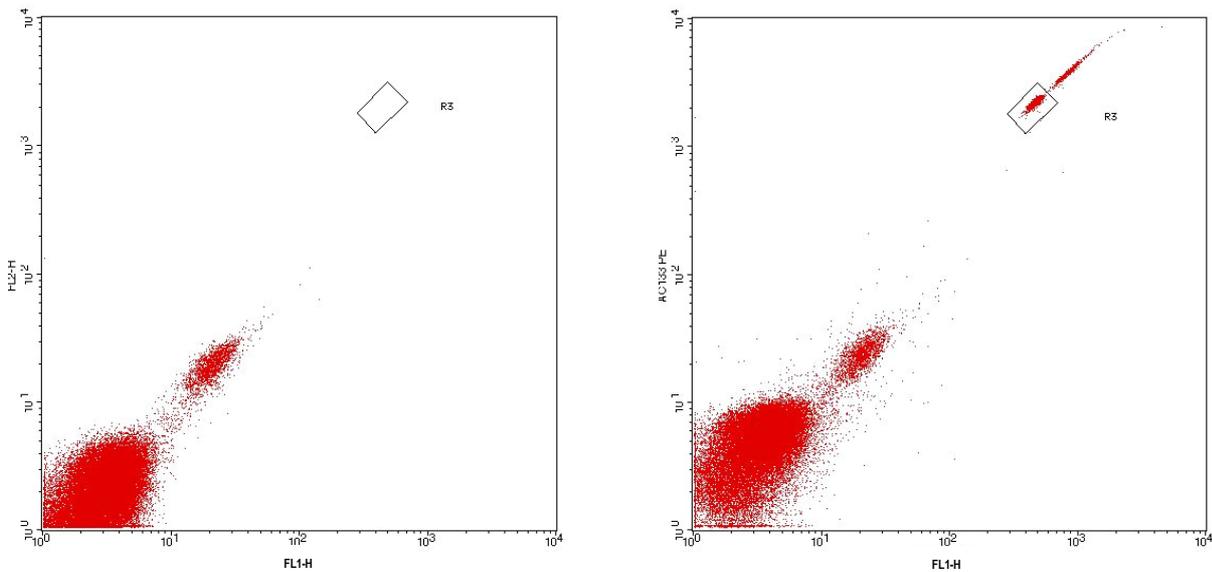


Abbildung 6: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung zur Messung der TruCount Mikropartikel im Rahmen der Konzentrationsbestimmung; R3: TruCount Mikropartikel, Gating nach Vorgabe des Herstellers

Links: Isotypansatz mit Anti-CD45 AK, x-Achse: 1. Fluoreszenzkanal (FL1-H), y-Achse: 2. Fluoreszenzkanal (FL2-H); **Rechts:** Messansatz mit Anti-CD45 AK, Anti-CD133 AK, Anti-CXCR4 AK, 7-AAD, TruCount Mikropartikel, x-Achse: 1. Fluoreszenzkanal (FL1-H), y-Achse: Anti-CD133 (AC133) AK

Mit Hilfe der gemessenen Anzahl an Mikropartikeln und der vom Hersteller angegebenen Anzahl an Mikropartikeln pro TruCount Röhrchen ließ sich die im Durchflusszytometer gemessene Menge mit Hilfe von Formel 1 bestimmen.

$$36,25\mu\text{l} \times \frac{[\text{gemessene Beads in der Analyse (R3)}]}{[\text{angegebene Beads im TruCount Röhrchen}]} = \text{gemessene Menge in } \mu\text{l}$$

Formel 1: Berechnung der gemessenen μl pro Ansatz mit Hilfe von TruCount Mikropartikeln; hierbei entsprechen 36,25 Mikroliter der im Ansatz hinzu gegebenen Flüssigkeiten

Mit Hilfe des aus der TruCount Zählung gewonnen Untersuchungsvolumens, der Anzahl CD45 positiver Ereignisse, sowie der im Blutbild mit Sysmex gemessenen relativen Mengen an Lymphozyten und gemischten weissen Blutkörperchen („mixed white blood cells“) lassen sich die Konzentrationen von CD45-positiven Zellen pro Mikroliter Vollblut berechnen (siehe Formel 2).

$$\frac{\text{Zahl der CD45 (R2)}}{\text{gemessene } \mu\text{l}} = \text{Zahl der CD45-positiven Zellen /}\mu\text{l VB}$$

Formel 2: Berechnung der Konzentration CD45 positiver Zellen im Vollblut

Um tote Zellen von der Zählung auszuschließen, wurden mit der Verwendung von 7-Aminoactinomycin (7-AAD) Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Hierbei wurde der Messansatz dem entsprechenden Isotypansatz gegenüber gestellt und der Zählbereich so gewählt, dass im Isotypansatz keine Zellen eingeschlossen wurden. Die so im Messansatz ausgewählten Zellen wurden bei der Identifizierung CD133 oder CXCR4 positiver Zellen nicht berücksichtigt (siehe Abbildung 7).

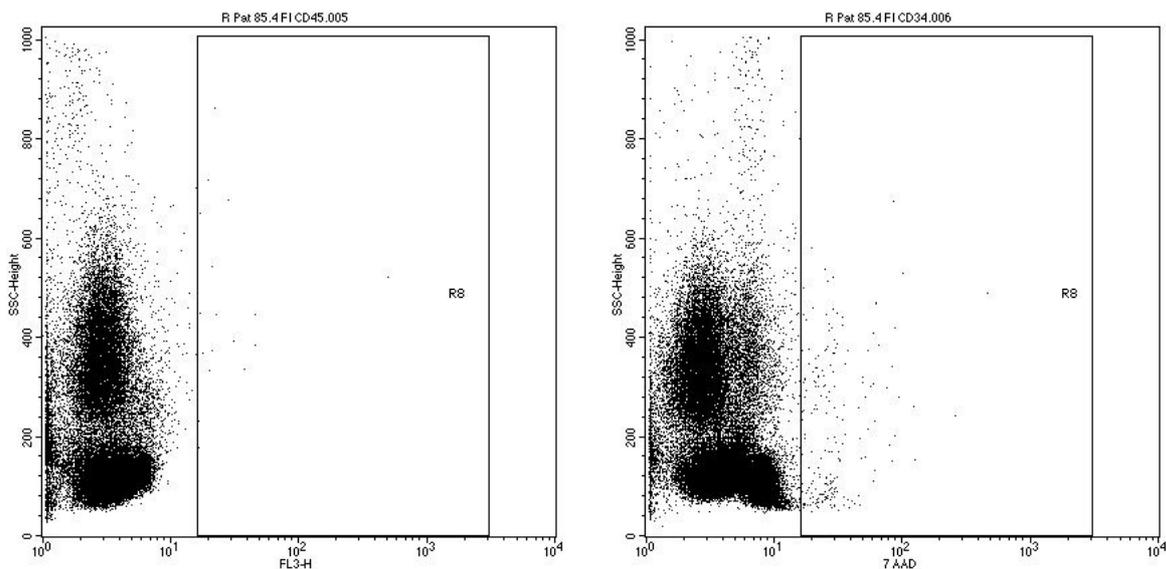


Abbildung 7: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung zur Identifizierung 7-AAD positiver Zellen; R8: 7-AAD positive Zellen

Links: Isotypansatz mit Anti-CD45 AK, x-Achse: 3. Fluoreszenzkanal (FL3-H), y-Achse: Zellgröße (SSC);
Rechts: Messansatz mit Anti-CD45 AK, Anti-CD133 AK, Anti-CXCR4 AK, 7-AAD, TruCount Mikropartikel, x-Achse: Fluoreszenzintensität von 7-AAD, y-Achse: Zellgröße (SSC)

4.2.4 Analyse des Messansatzes

Zur Messung CD133 positiver Zellen und der Fluoreszenzintensität von CXCR4 auf diesen Zellen wurde Gaterregion R1 aus obigem Gatingverfahren verwendet. Es wurde ein Punktdiagramm erstellt, in welchem die Zellgranularität (SSC) gegen die Fluoreszenzintensität von Anti-CD133 AK aufgetragen wurde. Wie in Abbildung 8 dargestellt wurden in Region R4 selektiv CD133 positive Zellen mit einer Granularität unter 200 ausgewählt. Diese Population entspricht klein-granulierten, CD133 positiven zirkulierenden Progenitorzellen. Zur Kontrolle wurde wiederum der Isotypansatz verwendet, welcher als einziges Antikörperkonjugat Anti-CD45 AK beinhaltet. Die im Isotypansatz in Region R4 auftretenden Ereignisse wurden auf die gemessene Menge in Mikroliter bezogen und von den Ereignissen im Messansatz im entsprechenden Verhältnis subtrahiert.

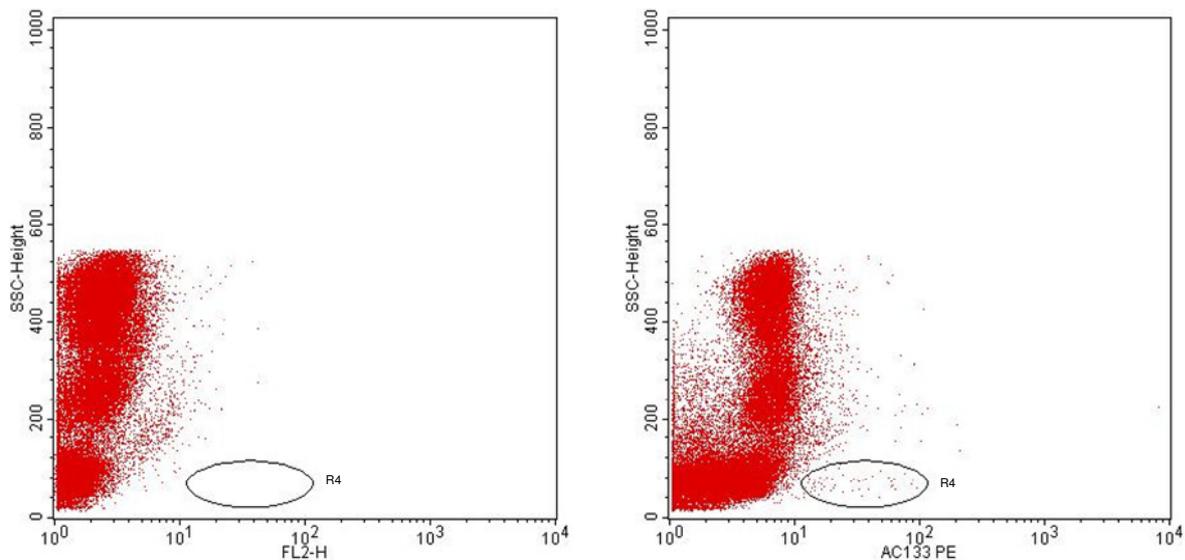


Abbildung 8: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung zur Identifizierung CD133 positiver Zellen; R4: CD133 positive Zellen

Links: Isotypansatz mit Anti-CD45 AK als Isotypkontrolle, x-Achse: 2. Fluoreszenzkanal (FL2-H), y-Achse: Zellgröße (SSC); **Rechts:** Messansatz mit Anti-CD45 AK, Anti-CD133 AK, Anti-CXCR4 AK, 7-AAD, TruCount Mikropartikel, x-Achse: Fluoreszenzintensität von Anti-CD133 (AC133) AK, y-Achse: Zellgröße (SSC)

Die Messung der CXCR4 Intensität auf CD133 positiven, klein-granulierten Zellen erfolgte aus Zellen der Region R4. Gemessen wurde eine Veränderung der Rezeptordichte und damit eine Veränderung der Intensität des Fluoreszenzsignales pro Zelle und nicht eine Veränderung der absoluten Zahl CXCR4 positiver Zellen (siehe Abbildung 9). Wie bei der Messung der CD133 positiven Zellen wurden auch hier Ereignisse im Isotypansatz von den Ereignissen im Messansatz im richtigen Verhältnis subtrahiert.

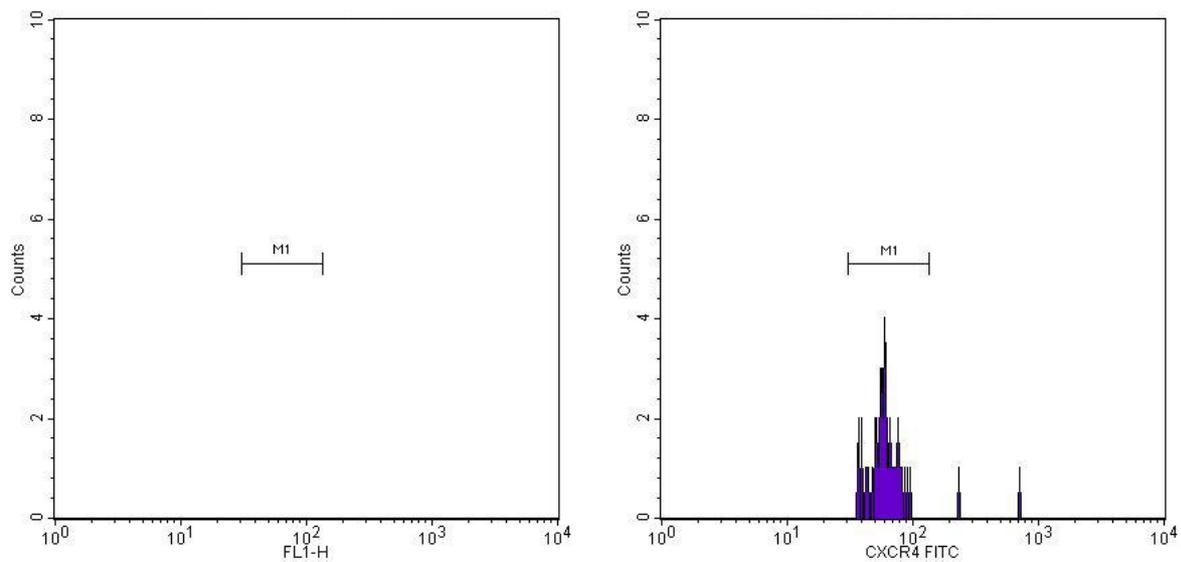


Abbildung 9: Histogramm zur Darstellung der CXCR4 FITC- Fluoreszenzintensität auf PE CD133 positiven Zellen aus Region R4

Links: Isotypansatz mit Anti-CD45 AK als Isotypkontrolle, x-Achse: 1. Fluoreszenzkanal (FL1-H), y-Achse: Anzahl (Counts); **Rechts:** Messansatz mit Anti-CD45 AK, Anti-CD133 AK, Anti-CXCR4 AK, 7-AAD, TruCount Mikropartikel, x-Achse: Fluoreszenzintensität von Anti-CXCR4 FITC AK, y-Achse: Anzahl (Counts)

4.3 Angiographische Daten

Der Stenosegrad der betroffenen Koronararterie wurde im Rahmen der kathetergestützten Angiographie an Tag 1 bestimmt. Bei 57 Patienten der Erythropoetingruppe (entspricht 84%) und bei 60 Patienten der Plazebogruppe (entspricht 86%) wurde zum Follow Up eine weitere Angiographie durchgeführt. Hierbei wurden unter anderem folgende Parameter erhoben:

- Grad der Stenose in Prozent (Diameter Stenosis [%]) zum Follow Up
- Anzahl der Patienten mit Restenose des Zielgebietes (Binary Restenosis) zum Follow Up; Restenose wurde als ein Stenosegrad von 50% oder mehr des Lumens definiert
- Kleinster Durchmesser des Lumens in Milimeter (Minimal Lumen Diameter [mm]) zum Follow Up
- Differenz zwischen dem kleinsten Durchmesser des Lumens zum Zeitpunkt der Randomisierung und zum Follow Up in Milimeter (Late lumen loss [mm])

4.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm S-Plus, Version 4.5 (S-Plus, Insightful Corp., Seattle, WA) durchgeführt. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test oder dem exakten Fisher Test für qualitative Variablen und dem T-Test analysiert.

5 Ergebnisse

5.1 Demographische Daten der Studienpopulation

Die Studien- und Kontrollgruppe war sowohl bezüglich ihrer demographischen Daten wie Alter, Geschlecht und Risikofaktoren als auch bezüglich ihrer angiographischen Daten wie Anzahl der betroffenen Gefäße, Infarktlokalisierung, Art der Intervention und postinterventionellem Ergebnis vergleichbar.

Während des Beobachtungszeitraumes von sechs Monaten verstarben zwei Patienten in der Erythropoetingruppe und drei in der Plazebogruppe. Vier Patienten der Erythropoetin- und ein Patient der Plazebogruppe erlitten entweder einen weiteren Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall. Eine In-Stent Rethrombose trat bei drei Patienten der Erythropoetin- und zwei Patienten der Plazebogruppe auf (Ott 2010).

	Erythropoetin- gruppe	Plazebo- gruppe	P
Anzahl der Patienten	68	70	
Alter in Jahren	59.1±13.0	62.1±12.3	0.18
Geschlecht M/W	56/12	82/18	0.25
Risikofaktoren			
– Diabetes mellitus	11 (16%)	10 (14%)	0.76
– Raucher	29 (43%)	30 (43%)	0.98
– Arterieller Hypertonus	43 (63%)	44 (63%)	0.96
– Hypoercholesterinämie	24 (35%)	25 (36%)	0.96
– Body mass index	28 ± 4	27 ± 4	0.42
Mehrgefäßerkrankung	42 (62%)	50 (71%)	0.23
Betroffene Gefäße			0.67
– LAD	34 (50%)	31 (44%)	
– RCA	30 (44%)	32 (46%)	
– LCX	4 (6%)	6 (9%)	
– LMCA	0	1 (1%)	
CKmax (U/l)	201 (121-450)	213 (124-312)	0.58
Art der Intervention			0.83
– Bare-metal Stent (BMS)	3 (4%)	3 (4%)	
– Drug-eluting Stent (DES)	63 (93%)	66 (95%)	
–Ballonangioplastie	2 (3%)	1 (1%)	
TIMI - Klassifikation nach Intervention			0.59
– 1 – no. (%)	0	1 (1%)	
– 2 – no. (%)	5 (7%)	6 (9%)	
– 3 – no. (%)	63 (93%)	63 (90%)	

Tabelle 7: Übersicht der in der Studie eingeschlossenen Patienten mit Alter, Geschlecht, Risikofaktoren und verschiedenen klinischen und angiographischen Parametern, aufgeschlüsselt nach Patienten der Erythropoetingruppe (linke Spalte) und Patienten der Plazebogruppe (mittlere Spalte); ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($P < 0.05$, rechte Spalte) ist bei keinem Parameter feststellbar

5.2 Relevante Ergebnisse der Revival-3 Hauptstudie

Alle Patienten wurden im Rahmen der Therapie des Myokardinfarktes mittels PCI behandelt. 63 Patienten (93%) der Erythropoetingruppe und 66 Patienten (95%) der Plazebogruppe wurden mit Drug-eluting Stents (DES) behandelt. Im Rahmen dieses Therapieverfahrens wurde bei allen Patienten angiographische Parameter ermittelt, welche den Ergebnissen der REVIVAL-3 Hauptstudie zu entnehmen sind. Bei 57 der Patienten (84%) der Erythropoetingruppe und 60 Patienten (86%) der Plazebogruppe ($P = 0,76$) wurde während des Follow Ups eine weitere Koronarangiographie durchgeführt (Kontrollangiographie). In der Erythropoetingruppe wurde ein signifikanter Anstieg der maximalen Retikulozyten- ($34,2 \pm 9,58 \times 10^4/\mu\text{l}$ vs. $16,8 \pm 6,58 \times 10^4/\mu\text{L}$, $P < 0,001$) sowie der maximalen Thrombozytenkonzentration ($265 \pm 70 \times 10^9/\text{L}$ vs. $232 \pm 74 \times 10^9/\text{L}$, $P < 0,001$) festgestellt. Bei der maximalen Hämoglobinkonzentration fand sich jedoch keine signifikante Veränderung ($14,8 \pm 1,6$ vs. $15 \pm 1,3$ md/dL, $P = 0,593$).

5.3 Anzahl zirkulierender CD133 positiver Zellen und Oberflächenexpression von CXCR4

Patienten der Erythropoetingruppe zeigten im Vergleich zur Plazebogruppe 48 und 60 Stunden nach Randomisierung signifikant höhere Werte ($P = 0,04$ bzw. $P = 0,006$) von zirkulierenden CD133 positiven Progenitorzellen (siehe Tabelle 8 und Abbildung 10).

In Bezug auf die Expression des Oberflächenrezeptors CXCR4 auf CD133 positiven Zellen konnte keine signifikante Veränderung der Rezeptordichte innerhalb der Plazebogruppe oder der Erythropoetingruppe über die Zeit festgestellt werden. Ebenso erbrachte der Vergleich beider Gruppen hinsichtlich der Rezeptordichte von CXCR4 keine signifikanten Ergebnisse (siehe Tabelle 9 und Abbildung 11).

CD133 positive Vorläuferzellen [Zellen/ μ l]					
	0 Std.	12 Std.	48 Std.	60 Std.	120 Std.
Patienten mit Plazebo (n = 70)	0,94 \pm 0,76	0,74 \pm 0,79	0,88 \pm 0,72	0,9 \pm 0,92	0,93 \pm 0,63
Patienten mit Erythropoetin (n = 68)	0,7 \pm 0,53	0,91 \pm 1,42	1,48 \pm 1,67	1,7 \pm 1,55	1,16 \pm 1,05
P	n.s.	n.s.	0,040	0,006	n.s.

Tabelle 8: Konzentration zirkulierender, CD133 positiver Progenitorzellen im Blut von Patienten mit Plazebo bzw. Erythropoetin; die Angabe der Konzentration erfolgt in Zellen pro Mikroliter; t entspricht dem Abnahmezeitpunkt, wobei t = 0 Stunden dem Zeitpunkt der Randomisierung entspricht; n.s. bedeutet „nicht signifikant“

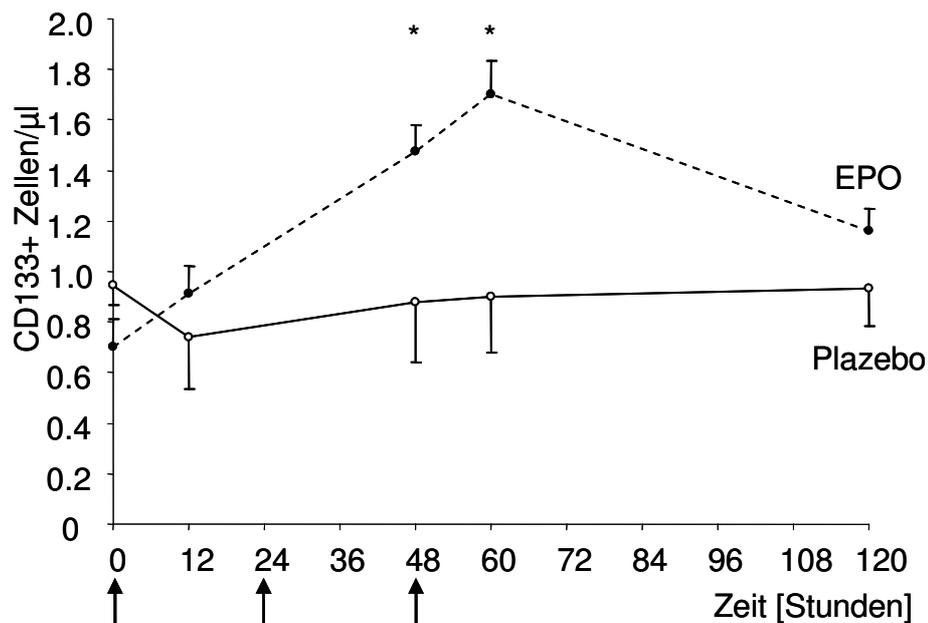


Abbildung 10: grafische Darstellung der Konzentration zirkulierender, CD133 positiver Progenitorzellen im Blut von Patienten mit Plazebo (durchgezogene Linie, Kreise) bzw. Erythropoetin (gestrichelte Linie, schwarze Punkte) mit Angabe der Standardabweichung; x-Achse: Zeitachse mit Angabe der Stunden nach Randomisierung, die Pfeile bezeichnen die drei Applikationszeitpunkte von Plazebo oder Erythropoetin; y-Achse: Konzentration zirkulierender CD133 positiver Progenitorzellen in Zellen pro Mikroliter; * bezeichnet ein signifikantes Ergebnis (P-Wert < 0.05)

Expression von CXCR4 auf CD133 positiven Vorläuferzellen [mittlere fl.]					
	0 Std.	12 Std.	48 Std.	60 Std.	120 Std.
Patienten mit Plazebo (n = 70)	54,08 ± 11,56	60,48 ± 12,27	82,01 ± 15,48	63,15 ± 13,16	71,69 ± 14,59
Patienten mit Erythropoetin (n = 68)	61,91 ± 12,45	53,72 ± 11,92	62,26 ± 14,05	61,55 ± 12,54	59,42 ± 14,94
P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 9: Expressionshäufigkeit von CXCR4 auf zirkulierenden, CD133 positiven Progenitorzellen im Blut von Patienten mit Plazebo bzw. Erythropoetin; die Angabe der Expressionshäufigkeit erfolgt in [mittlere fl], welche als relative, einheitslose Angabe der Stärke der Fluoreszenz direkt proportional zur Häufigkeit des auf der Oberfläche am CXCR4 Rezeptor gebundenen Antikörpers ist; t entspricht dem Abnahmezeitpunkt, wobei t = 0h dem Zeitpunkt der Randomisierung entspricht; n.s. bedeutet „nicht signifikant“

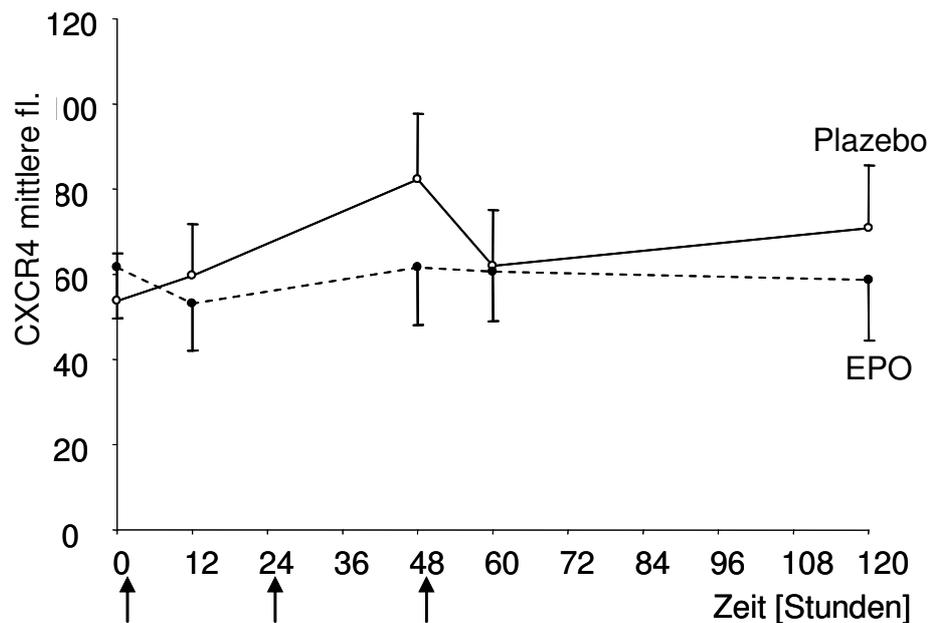


Abbildung 11: grafische Darstellung der Expressionshäufigkeit von CXCR4 auf zirkulierenden, CD133 positiven Progenitorzellen im Blut von Patienten mit Plazebo (durchgezogene Linie, Kreise) bzw. Erythropoetin (gestrichelte Linie, schwarze Punkte) mit Angabe der Standardabweichung; x-Achse: Zeitachse mit Angabe der Stunden nach Randomisierung, die Pfeile bezeichnen die drei Applikationszeitpunkte von Plazebo oder Erythropoetin; y-Achse: Angabe der Expressionshäufigkeit in [mittlere fl], welche als relative, einheitslose Angabe der Stärke der Fluoreszenz direkt proportional zur Häufigkeit des auf der Oberfläche am CXCR4 Rezeptor gebundenen Antikörpers ist

5.4 Progentiorzellen, Erythropoetin und Restenose

In der Erythropoetingruppe konnte bei der Kontrollangiographie eine signifikant höhere Koronarstenose im Vergleich zur Plazebogruppe (Einengung des Lumens um $32\% \pm 19\%$ vs. $26\% \pm 14\%$, $P = 0,046$; siehe Abbildung 12, Tabelle 10), wobei in der Erythropoetingruppe neun und in der Plazebogruppe fünf Patienten eine Restenose (Stenose von mehr als 50% des Lumens) aufwiesen (Binary Restenosis; 16% vs. 8% , $P = 0,214$). Es fand sich hierbei keine signifikante Korrelation der maximalen Konzentrationen von CD133 positiven Zellen mit dem Grad der Koronarstenose ($R = 0.15$, $P = 0.18$).

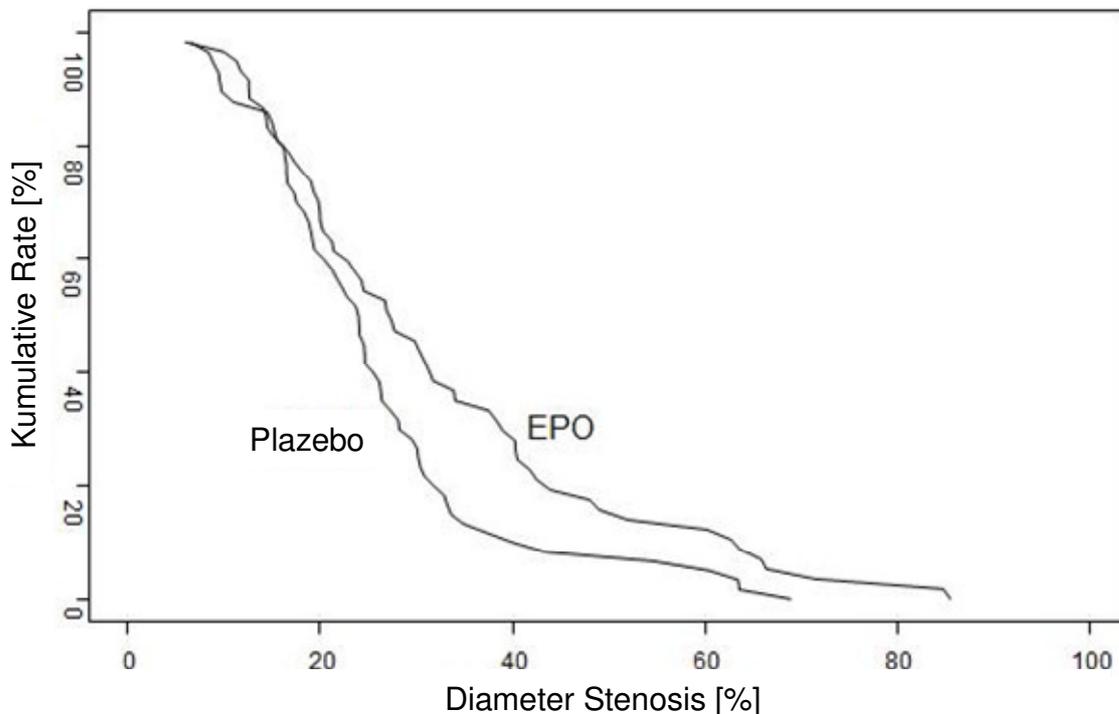


Abbildung 12: Vergleich der Lumeneinengung im Bereich der Koronarintervention (In-Stent Restenose) bei Patienten mit Plazebo und Erythropoetin bei der Kontrollangiographie zum Follow-Up; x-Achse: Auftragung der prozentualen Einengung des Lumens im Vergleich zum Lumendurchmesser nach Koronarintervention zum Zeitpunkt der Randomisierung; y-Achse: Auftragung des kumulierten Anteils der Patienten, welche zum Follow-Up mindestens eine dem jeweiligen x-Wert entsprechende Stenose des zum Randomisierungszeitpunktes intervenierten Gefäßabschnittes der Koronararterie aufweisen; Beispiel: eine mindestens 40%ige Stenose des Lumens fand sich bei zirka 10% der Patienten der Plazebogruppe und bei zirka 30% der Patienten der Erythropoetingruppe

Ergebnisse der Kontrollangiographie			
	Erythropoetingruppe (63 Patienten)	Plazebogruppe (66 Patienten)	P
Diameter Stenosis [%]	32 ± 19	26 ± 14	0.046
Binary Restenosis [no. (%)]	9 (16%)	5 (8%)	0.214
Minimal Lumen Diameter [mm]	2,1 ± 0,7	2,3 ± 0,6	0.070
Late lumen loss [mm]	0,3 ± 0,6	0,2 ± 0,5	0.152
IRA-Revasc [no (%)]	7 (10,3%)	2 (2,9%)	0.077

Tabelle 10: Übersicht über die Ergebnisse der Kontrollangiographie nach 4 bis 6 Monaten; Diameter Stenosis ergibt sich aus dem Verhältnis von Grad der Koronarstenose nach Koronarintervention zum Zeitpunkt der Randomisierung zu Grad der Koronarstenose bei Kontrollangiographie; Late Lumen loss gibt die Verringerung des Lumendurchmessers im Vergleich zum Zeitpunkt der Randomisierung in Millimeter an

Die Gegenüberstellung von Patienten mit Restenose und Patienten ohne Restenose zeigte keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Konzentrationsanstieg CD133 positiver zirkulierender Progenitorzellen vom Tag der Randomisierung bis 60 Stunden danach ($P = 0.93$). Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der maximalen Oberflächenexpression von CXCR4 auf CD133 positiven Zellen beobachtet werden ($P = 0.15$) (siehe Tabelle 11).

Darüber hinaus zeigte sich keine signifikante Korrelation des Late Lumen Loss mit der Konzentration zirkulierender CD133 positiver Zellen ($R = 0.19$, $P = 0,24$).

	Patienten mit Restenose (14 Patienten)	Patienten ohne Restenose (117 Patienten)	P
Konzentrationsunterschied CD133 positiver Zellen zwischen Randomisierung und nach 60h [Zellen/ μ l]	1,2 \pm 1,4	1,2 \pm 2,3	0.93
maximale Expression von CXCR4 auf CD133 positiven Zellen [mean fl.]	128,5 \pm 138,8	201,9 \pm 181,9	0.15

Tabelle 11: Übersicht über die Konzentration CD133 positiver zirkulierender Progenitorzellen im Blut von Patienten mit bzw. ohne Restenose; die Angabe der Expressionshäufigkeit erfolgt in [mittlere fl], welche als relative, einheitslose Angabe der Stärke der Fluoreszenz direkt proportional zur Häufigkeit des auf der Oberfläche am CXCR4 Rezeptor gebundenen Antikörpers ist

5.5 Progenitorzellen und MACCE

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von sechs Monaten wurde eine erneute Revaskularisierung der betroffenen Koronararterie bei sieben Patienten der Erythropoetin- und bei zwei Patienten der Plazebogruppe durchgeführt (P = 0.08). Neun Patienten der Erythropoetin- und vier Patienten der Plazebogruppe erreichten den Endpunkt MACCE (P = 0.13). Hierbei zeigte sich nach 60 Stunden nach PCI eine im Trend verringerte Konzentration von CD133 positiven Progenitorzellen bei Patienten der Erythropoetingruppe. Die Expression des Oberflächenrezeptors CXCR4 blieb hiervon jedoch unbeeinflusst (siehe Tabelle 12).

	Patienten mit MACCE (11 Patienten)	Patienten ohne MACCE (127 Patienten)	P
Konzentrationsunterschied CD133 positiver Zellen zwischen Randomisierung und 60h danach [Zellen/ μ l]	1,14 \pm 1,4	2,3 \pm 2,7	0.08
maximale Expression von CXCR4 auf CD133 positiven Zellen [mean fl.]	98,3 \pm 136,8	191,1 \pm 176,9	0.11

Tabelle 12: Übersicht über die Konzentration CD133 positiver zirkulierender Progenitorzellen im Blut von Patienten mit bzw. ohne MACCE; die Angabe der Expressionshäufigkeit erfolgt in [mittlere fl], welche als relative, einheitslose Angabe der Stärke der Fluoreszenz direkt proportional zur Häufigkeit des auf der Oberfläche am CXCR4 Rezeptor gebundenen Antikörpers ist

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Unter dem Einfluss von Erythropoetin steigt die Konzentration von zirkulierenden CD133 positiven Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu Plazebo signifikant an, die Expression von CXCR4 bleibt bei diesen Zellen jedoch unbeeinflusst. Die Gabe von Erythropoetin führt im Vergleich zu Plazebo angiographisch zu einer signifikant stärkeren Lumeneinengung im Bereich der Intervention, wobei die Häufigkeit von angiographischen Restenosen nicht erhöht ist. Diese Ergebnisse korrelieren weder mit einer Veränderung der Konzentration zirkulierender CD133 positiver Vorläuferzellen, noch mit der maximalen Expressionsintensität von CXCR4 auf diesen Zellen. Darüber hinaus führen kardiale, thrombembolische und zerebrovaskuläre Komplikationen (MACCE) zu einem geringeren Anstieg der Konzentration zirkulierender CD133 positiver Vorläuferzellen, wobei die Expressionsintensität von CXCR4 auf diesen Zellen unverändert bleibt.

6.2 Quantitative und Qualitative Messung von zirkulierenden Progenitorzellen

6.2.1 Methode der Durchflusszytometrie zur Klassifikation zirkulierender Progenitorzellen

Die Durchflusszytometrie hat sich zur Charakterisierung von in Lösung befindlicher Zellen durch ihre Expression von Oberflächenmarkern etabliert. Obwohl sich diese Methode durch einen hohen Technisierungs- und Standardisierungsgrad auszeichnet, gibt es Einschränkungen hinsichtlich ihrer Anwendung. Die Messproben müssen nach einem fest vorgeschriebenen Protokoll aufgearbeitet werden, wobei nur eine strenge Einhaltung zum Beispiel der Konzentrationsverhältnisse und Inkubationsdauer vergleichbare Ergebnisse garantiert. Darüber hinaus muss die Aufbereitung unter sterilen Kautelen erfolgen, damit eine Verunreinigung der Probe weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Zur Messung von sehr kleinen Populationen wie zirkulierende Progenitorzellen eignet sich die Durchflusszytometrie nur, wenn sehr große Zellzahlen analysiert werden. Die Konzentrationen von zirkulierenden Progenitorzellen wird je nach Definition mit 0,1 bis 3 Zellen pro Mikroliter beziehungsweise 0,03% der Leukozyten angegeben, (Grundmann 2007). Damit sich trotzdem Zellen gegenüber dem „Hintergrundrauschen“, welches sich durch Verunreinigungen ergibt, abgrenzen, ist die Messung von ausreichend vielen Zellen und das selektive Ausschließen von Zellresten und avitalen Zellen nötig. In unserer Studie wurde diesen Anforderungen durch Messung von 200.000 Zellereignisse pro Analyse und den Ausschluss sehr kleiner, wenig granulierter Zellbestandteile sowie 7-AAD positiver Zellen Rechnung getragen.

6.2.2 Diversität der Definition von zirkulierenden Progenitorzellen

In unserer Studie wurde als Marker zirkulierender Progenitorzellen CD133 benutzt. Im Gegensatz zu den meisten Studien haben wir auf die Oberflächenmarker CD45, CD34 und VEGFR2, welche „klassische“ endotheliale Progenitorzellen charakterisieren, verzichtet. Unser Vorgehen hat mehrere Gründe:

1. CD133 charakterisiert frühe zirkulierende Progenitorzellen. Diese Zellpopulation kann sich im weiteren Verlauf ihrer Differenzierung in CD34 positive endotheliale Progenitorzellen differenzieren (Gehling 2000). CD133 positive / CD34 negative Zellen weisen im Vergleich zu CD133/CD34 doppelt positiven Zellen eine höhere CXCR4 Expression auf, zeigen im Mausmodell eine schnellere Reendothelialisierung arterieller Gefäßläsionen (Friedrich 2006) und besitzen ein höheres angiogenes Potential (Reyes 2002) Umgekehrt zeigten Goussetis und Kollegen 2000, dass CD133 negative Zellen ein geringeres Proliferationspotential besitzen (Goussetis 2000). Case und Kollegen stellten weiterhin fest, dass Zellen, die vierfach positiv für CD45, CD34, CD133 und VEGFR2 sind in vitro kein angiogenetisches Poteintial besitzen (Case 2007).

2. Die Mehrheit CD34 positiver Zellen exprimiert auch CD133 (Yin 1997), wobei zum Beispiel im Nabelschnurblut nur 75% der CD133 positiven Zellen auch positiv für CD34 sind (Pasino 2000). Somit werden mehr zirkulierende Progenitorzellen erfasst, wenn als Marker CD133 verwendet wird.
3. Der Anteil der Zellen, die dreifach positiv für CD133, CD34 und VEGFR2 sind wird mit circa 0,01 bis 0,0001% der zirkulierenden mononukleären Zellen angegeben (Khan 2005). Somit läge bei 200.000 gemessenen Zellen und einem Anteil der mononukleären Zellen an den Leukozyten von 7% die gemessene Zellzahl mit maximal 1,4 Zellen pro Messung im nicht mehr verwertbaren Bereich.

6.3 Dosisfindung von Erythropoetin

Von einigen Autoren, wie zum Beispiel Brines und Kollegen (Brines 2006) wird in Übersichtsarbeiten postuliert, dass der gewebeprotective Effekt von Erythropoetin sowohl durch den homodimeren Erythropoetinrezeptor als auch durch einen speziellen Erythropoetinrezeptor Subtyp, dem β 2-Rezeptor mediert wird. Im Gegensatz zu den Erythropoetinrezeptoren des Knochenmarks wird dieser Rezeptor aus dem „klassischen“ Erythropoetinrezeptor und CD131 gebildet. Interessant ist, dass der β 2-Rezeptor eine geringere Affinität zu Erythropoetin aufweist. Entsprechend kann die zytoprotektive Wirkung von Erythropoetin nur durch hohe Dosen erreicht werden. Um negativen Effekten wie einer Erhöhung des Hämatokrits oder der Thrombozytenzahl vorzubeugen, erschien eine kurzzeitige, hochdosierte Erythropoetingabe als beste und sichere Lösung, wobei Epoetin Beta gegenüber Darbepoetin Alpha auf Grund seiner kürzeren Halbwertszeit und höheren Rezeptoraffinität besser geeignet erscheint (Egrie 2003). Abbildung 13 zeigt den schematisch Konzentrationsverlauf bei einer einmaligen Erythropoetingabe von 100 bzw. 500 Internationalen Einheiten (IU) pro Kilogramm Körpergewicht. Aus der Grafik wird deutlich, dass die Dosierung hoch genug gewählt werden muss, damit eine Aktivierung der β 2-Rezeptoren erfolgt. Obwohl die gewebeprotective Wirkung nur sehr kurz anhält, ist die erythropoetische Wirkung von Epoetin Beta entsprechend länger vorhanden. Analog zu anderen Studien mit selber Dosierung (Ferrario 2011) konnte in unserer Studie zwar keine Erhöhung der Hämoglobinkonzentration beobachtet werden, jedoch zeigte sich die Wirkung auf das hämatopoetische System durch einen Anstieg der Thrombozytenzahlen (Ott 2010).

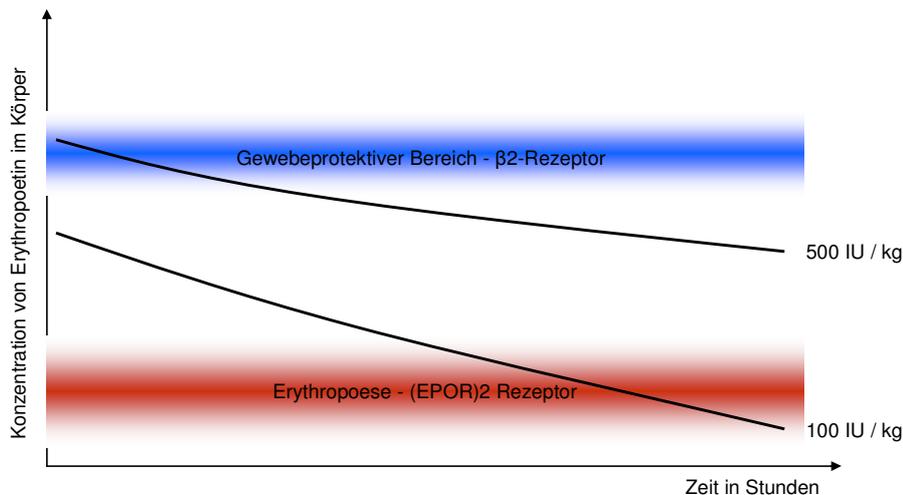


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Affinitätsbereiche von Erythropoetinrezeptoren und des Konzentrationsverlaufes von Erythropoetin bei einer einmaligen Dosierung von 500 bzw. 100 Internationalen Einheiten pro Kilogramm Körpergewicht; angepasst nach Brines und Kollegen (Brines 2006)

6.3.1 Erythropoetin und zirkulierende Progenitorzellen

Im Rahmen dieser Studie wurde unter anderem untersucht, welchen Einfluss eine hochdosierte intravenöse Gabe von Erythropoetin bei akutem Myokardinfarkt auf die Konzentration und Funktionalität von zirkulierenden Progenitorzellen hat. Bisher wurde der Zusammenhang zwischen zirkulierenden Progenitorzellen, akutem Myokardinfarkt und Erythropoetin vor allem isoliert betrachtet. Massa und Kollegen beobachteten 2005, dass direkt nach Myokardinfarkt unter anderem die Konzentration zirkulierender CD133 positiver Progenitorzellen signifikant ansteigt und im Lauf der ersten Woche wieder deutlich absinkt. Dabei bleiben die Konzentrationen jedoch höher als die von gesunden Probanden (Massa 2005). Heeschen und Kollegen beobachteten 2003, dass Erythropoetin Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisieren kann (Heeschen 2003).

Unsere Studie zeigte nun, dass Erythropoetin die Konzentration CD133 positiver Progenitorzellen bei akutem Myokardinfarkt erhöht und dabei die Expression von CXCR4 nicht beeinflusst wird. Untersuchungen anderer Gruppen können diese Beobachtungen nur bedingt stützen. Ferrario und Kollegen zeigten 2009 bei einem kleinen Patientenkollektiv von 15 Patienten, dass 72 Stunden nach Applikation von Erythropoetin die Konzentration CD34 positiver Progenitorzellen erhöht war.

Eine Analyse der Konzentration von für CD45 und CD34 doppelt positiven Zellen zeigte keine signifikante Konzentrationssteigerung. Ähnliche Ergebnisse lieferten Taniguchi und Kollegen 2010. Hier unterschied sich die Konzentration von für CD45, CD133 und CD34 dreifach positiven Zellen nach 4 Tagen nicht signifikant von Patienten mit Plazebo. Die Expression von CXCR4 wurde in diesen Arbeiten nicht untersucht. Für die Unterschiede zwischen unseren Ergebnissen und den Arbeiten anderer Gruppen kann es mehrere Gründe geben.

1. Zum einen wurde in unserer Studie der Marker CD45 nicht zur Identifizierung von zirkulierenden Progenitorzellen verwendet. Die Verwendung von CD45 zur Klassifikation zirkulierender Progenitorzellen wird kontrovers diskutiert. Case und Kollegen beobachteten 2007, dass sich ausschließlich CD45 negative endotheliale Progenitorzellen zu Endothelzellen weiter differenzieren können. Diese Feststellung steht konträr zur Arbeit von Peichev und Kollegen, welche Progenitorzellen als CD45 positiv ausweisen (Peichev 2000). Eine weitere Arbeit beschreibt CD133 positive Progenitorzellen, welche sich zu Endothelzellen differenzieren als CD45 negativ (Quirici 2001). Auf Grund dieser Datenlage hatten wir uns dazu entschlossen, CD45 nicht als Marker zirkulierender Progenitorzellen zu verwenden.
2. Sowohl in der Arbeit von Ferrario als auch in der von Taniguchi wird die Konzentration zirkulierender Progenitorzellen mit Hilfe der Leukozytenzahl bestimmt. Diese Methode ist für die genaue Erfassung kleiner Zellpopulationen nur bedingt geeignet, da der Fehler von Zellzählgeräten für Mono- und Lymphozyten bei 3 bis 4 Prozent liegt (nach Angaben des Herstellers; angegeben für ein übliches Zellzählgerät, XE2100 der Firma SYSMEX), die Konzentration von für CD45 / CD133 / CD34 dreifach positiven Zellen im peripheren Blut jedoch maximal 0,01% der zirkulierenden monozytären Zellen beträgt (Khan 2005). Genaue Konzentrationsbestimmungen sind somit mit dieser Methode nicht möglich und die Ergebnisse entsprechend zu bewerten. Dem gegenüber bietet die von uns verwendete Methode der Konzentrationsbestimmung mittels Mikropartikel die Möglichkeit, auch sehr kleine Zellpopulationen zu erfassen.

Über die Expression von CXCR4 auf zirkulierenden Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurde bisher nur wenig berichtet. Leone und Kollegen (Leone 2005) beobachteten fünf Tage nach Myokardinfarkt eine „hohe Expression“ von CXCR4 auf etwa 45% der CD34 positiven Zellen. Wojakowski und Kollegen zeigten, dass die Konzentration CXCR4 positiver Zellen zum Zeitpunkt des Myokardinfarktes signifikant höher ist als bei gesunden Patienten, im Verlauf jedoch nicht weiter ansteigt (Wojakowski 2006). Sepp und Kollegen beschrieben 2009 eine erhöhte Expression von CXCR4 auf CD133 positiven Progenitorzellen bei Patienten mit instabilen Plaques der Carotiden (Sepp 2009). Die Daten dieser Studie sind mit unserer Arbeit insofern vergleichbar, als dass die Ruptur instabiler Plaques auch beim akuten Myokardinfarkt eine wichtige Rolle spielt. Beide Arbeiten wurden mit denselben Methoden erbracht. Sepp und Kollegen geben die durchschnittliche Expression von CXCR4 mit $86,74 \pm 5,64$ an, die Expression bei Patienten unserer Studie bei Randomisierung ist mit $54,08 \pm 11,56$ (Plazebo) bzw. $61,91 \pm 12,45$ (Erythropoetin) deutlich niedriger. Gleichzeitig sind jedoch die absoluten Zellzahlen CD133 positiver Zellen bei Sepp und Kollegen mit $0,14 \pm 0,04$ Zellen/ μ l im Vergleich zu unserer Arbeit ($0,94 \pm 0,76$ Zellen/ μ l bei Plazebo bzw. $0,7 \pm 0,53$ Zellen/ μ l bei EPO) deutlich niedriger. Die beobachteten Unterschiede könnten auf die Wirkung von Erythropoetin oder auf die unterschiedlichen Patientenkollektive zurückgeführt werden. Es zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Plazebo- und der Erythropoetingruppe hinsichtlich der CXCR4 Expression. Wahrscheinlicher ist, dass CXCR4 positive Zellen auf Grund ihrer Homing Kapazität bereits in den Bereich der Gefäßläsion migriert sind. Dass im weiteren Verlauf die Expressionsdichte von CXCR4 weder in der Plazebo- noch in der Erythropoetingruppe ansteigt, könnte auf einen erhöhten Verbrauch dieser Zellen hindeuten.

6.3.2 Zusammenhang zwischen Erythropoetin, zirkulierenden Progenitorzellen und MACCE

Patienten der Erythropoetingruppe weisen in unserer Studie eine erhöhte Rate an MACCE auf, wobei diese Ereignisse im Trend mit einem geringeren Anstieg CD133 positiver Zellen assoziiert sind. Die Ergebnisse werden durch die Beobachtungen der REVEAL Studie gestützt (Najjar 2011). Najjar und Kollegen berichten, dass sowohl innerhalb der ersten sieben Tage als auch über den ganzen Beobachtungszeitraum von 6 Monaten Patienten der Erythropoetingruppe signifikant häufiger kardiale oder zerebrovaskuläre Ereignisse erlitten. Diese Ergebnisse legen eine durch Erythropoetin induzierte Beteiligung zirkulierender Progenitorzellen an der Progression von MACCE auslösenden Pathologien mit einem erhöhtem Verbrauch der Progenitorzellen nahe. Zumeist bilden atherosklerotische Plaques die pathologische Grundlage für MACCE typische Komplikationen wie zum Beispiel den akuten Schlaganfall. Durch Größenzunahme wird die schützende fibröse Kappe zunehmend dünner. Rupturiert sie, können sich wandständige Thromben bilden und zu einem Gefäßverschluss führen. Tatsächlich wiesen George und Kollegen 2004 an Mäusen mit fehlendem Apolipoprotein-E nach, dass nach Applikation endothelialer Progenitorzellen des Knochenmarks eine Anreicherung von zirkulierenden Progenitorzellen in atherosklerotischen Läsionen stattfindet (George 2005). Dabei fanden sich die Zellen überwiegend im lipidreichen Kern und weniger in endothelialen oder subendothelialen Regionen. Die Läsionen waren signifikant größer und die fibrösen Kappen der Plaques signifikant dünner als bei Mäusen, welche endotheliale Progenitorzellen aus der Milz oder unselektierte Zellen des Knochenmarks erhielten. Weiterhin waren proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 erhöht und antiinflammatorische wie Interleukin-10 erniedrigt. Haghghat und Kollegen zeigten 2007, dass auch G-CSF, welches ebenfalls Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisiert, zu einer Vergrößerung atherosklerotischer Plaques führt (Haghghat 2007). Somit ist es möglich, dass vor allem zirkulierende Progenitorzellen und weniger eine direkte Erythropoetinwirkung für die Entwicklung von Komplikationen im arteriellen Gefäßsystem verantwortlich zu machen sind.

6.3.3 Zusammenhang zwischen Erythropoetin, zirkulierenden Progenitorzellen und Restenose

In unserer Arbeit wirkte sich Erythropoetin negativ auf die Anzahl kardialer und zerebrovaskulärer Ereignisse (MACCE) und auf die Restenoserate aus.

In-Stent Restenose ist eng mit der übermäßigen Proliferation glatter Muskelzellen im Bereich der Gefäßläsion assoziiert. Die Rolle von Erythropoetin bei diesen Vorgängen bleibt kontrovers diskutiert. Zum einen vermag Erythropoetin sowohl über die direkte Stimulation lokaler Endothelzellen als auch über eine verstärkte Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen die Entwicklung einer neointimalen Hyperplasie durch verstärkte Reendothelialisierung zu verhindern (Urao 2006), zum anderen induziert es in glatten Muskelzellen der Gefäßmedia hyperplastische Prozesse (Janmaat 2010).

Hierbei ist zu anzu merken, dass die beobachteten Effekte mit der Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalkaskaden assoziiert sind. Bei Urao und Kollegen erfolgt die antiproliferative Wirkung durch Beteiligung des Akt-Signalweges und konsekutiv der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase. Janmaat und Kollegen wiesen eine vermehrte Aktivität des STAT-5 Signalweges in Endothelzellen nach, welcher durch Bildung von Platelet-derived-growth-factor (PDGF)-B einen Proliferationsreiz für glatte Muskelzellen setzt. Ob nun Erythropoetin positiv oder negativ auf die Entwicklung einer Restenose einwirkt ist also möglicherweise abhängig davon, welche Signalkaskade aktiviert wird.

Je nach Applikationszeitpunkt und -menge von Erythropoetin und möglicherweise weiteren, bisher nicht bekannten Einflussfaktoren könnte die „Bereitschaft“ endothelialer Zellen variieren, die eine oder andere Signalkaskade zu aktivieren. Ursächlich hierfür könnten parakrine Effekte und Ihre Wirkung auf zirkulierende Progenitorzellen sein, zumal das betroffene Herzmuskelgewebe durch eine plötzlich auftretende Ischämie und später durch die Reperfusion extremen Belastungen ausgesetzt ist. So zeigen zum Beispiel Studien an Tiermodellen des Myokardinfarktes, dass vor allem innerhalb der ersten drei bis 12 Stunden die Expression von Interleukin-1, welches das Differenzierungsverhalten, die Koagulationsneigung (Daculsi 2007) und die Proliferationsaktivität (Moldenhauer 2008) von endothelialen Progenitorzellen moduliert, massiv erhöht ist und innerhalb von 3 Tagen auf Normalwerte abfallen (Deten 2002). Die Konzentration von Zytokinen im Bereich ischämischer Läsionen ist also über die Zeit relativ schnellen Änderungen unterworfen.

Auch der Effekt zirkulierender Progenitorzellen auf die Entwicklung einer Restenose scheint nicht linearer Natur zu sein. Wiewohl unsere Studie keinen Zusammenhang zwischen Restenose bzw. dem Grad der Koronarstenose und der Konzentration CD133 positiver Zellen aufzeigt, gibt es eine Reihe von Arbeiten, die einen solchen nahelegen. Möglicherweise ist ein fehlender Zusammenhang in unserer Studie der geringen Häufigkeit des Ereignisses geschuldet. Wie bereits erwähnt, belegen Studien den protektiven Effekt von zirkulierenden Progenitorzellen im Hinblick auf neointimale Proliferationsprozesse. Gleichzeitig sind bei Patienten, welche im weiteren Verlauf eine Restenose entwickeln, erhöhte Konzentrationen CD133 (Pelliccia 2010) beziehungsweise CD34 positiver Zellen (Schober 2005) messbar. Skowasch und Kollegen belegten 2003, dass Zellen des Knochenmarks an der Entwicklung neointimaler Hyperplasien beteiligt sind (Skowasch 2003). Tatsächlich gibt es Studien, die belegen, dass sich zirkulierende Progenitorzellen in glatte Muskelzellen differenzieren können (Simper 2002), welche eine Rolle bei der Entstehung von In-Stent Restenosen spielen. Auch die Ergebnisse autologer Stammzelltransfusionen bei Myokardinfarkt geben weitere Hinweise darauf, dass Erythropoetin einen Einfluss auf die Wirkweise von Zellen des Knochenmarks bei der Entwicklung einer Restenose hat. Nach intrakoronarer Applikation von gereinigten mononukleären Zellen des Knochenmarks unmittelbar nach akutem Myokardinfarkt wurden vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse wie Reinfarkte beobachtet (Zhang 2009), wobei bei einer verspäteten Applikation nach vier bis sieben Tagen diese Effekte nicht mehr nachweisbar waren. Entsprechend ist es denkbar, dass bei der Wirkung von durch Erythropoetin mobilisierten Progenitorzellen bei akutem Myokardinfarkt der Zeitraum zwischen Beginn der Symptome, PCI und Applikationszeitpunkt von Erythropoetin eine Rolle spielt.

Unsere Studie beobachtet keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expressionshäufigkeit von CXCR4 und Restenose, jedoch gibt es weiterhin deutliche Hinweise auf eine Beteiligung der SDF1/CXCR4 Achse. Sowohl die Hemmung des CXCR4 Rezeptors (Karshovska 2008) als auch der SDF-1 Produktion (Zernecke 2005) führt zu einer signifikant verringerten neointimalen Proliferation. Analog hierzu findet sich eine vermehrte Expression von CXCR4 Rezeptoren auf glatten Muskelzellen der Media (Zohlhofer 2001). Gerade bei Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt, die mit Integritätsstörungen des endothelialen Verbandes einhergehen. Ist der „Verbrauch“ von zirkulierenden, CXCR4 positiven Zellen besonders hoch.

Möglicherweise lässt sich so der fehlende Anstieg CXCR4 positiver Zellen in meiner Arbeit erklären: zirkulierende Progenitorzellen mit hoher CXCR4 Expression besitzen ein starkes chemotaktisch gesteuertes Migrationspotential und werden so mit höherer Wahrscheinlichkeit in den Bereich arterieller Endothelläsionen migrieren. So findet sich zum Beispiel auch bei der Mobilisierung von zirkulierenden Progenitorzellen bei Myokardinfarkt durch G-CSF eine erhöhte Restenoserate und sogar erniedrigte CXCR4 Expression [461 - Stein 2010 Expression of CXCR4. Es ist möglich, dass die Homingkapazität aber nicht allein durch die Expression von CXCR4 kodiert ist. So konnte zum Beispiel bei ausgereiften B-Lymphozyten trotz hoher CXCR4 Expression eine nur geringe Reaktion auf SDF-1 beobachtet werden (Honczarenko 1999). In Zusammenschau kann also gesagt werden, dass zirkulierende Progenitorzellen an der Entstehung der Restenose beteiligt sein müssen, wiewohl der genaue Ablauf noch nicht erforscht ist.

6.4 Analyse der Ergebnisse im Kontext der aktuellen Forschung

Diese Ergebnisse stützen bisherige Beobachtungen, welche von einem Zusammenhang zwischen der Mobilisierung von zirkulierenden Progenitorzellen und dem Auftreten von kardialen und zerebrovaskulären Ereignissen ausgehen. Eine Beteiligung des CXCR4 Rezeptors ist dabei naheliegend. Ebenso konnten bisherige Vermutungen bestätigt werden, dass Erythropoetin die Bildung von Restenosen begünstigt. Ob dies direkt durch Erythropoetin medierte Effekte oder über die Mobilisierung und Aktivierung von zirkulierenden Progenitorzellen geschieht, bleibt abzuwarten.

Der Vergleich dieser Studie mit anderen Forschungsarbeiten und die Einordnung in einen höheren Kontext gestaltet sich insbesondere auf Grund der heterogenen Definition des Begriffes der „zirkulierenden Progenitorzellen“ schwierig. Wie beschrieben existiert eine Vielzahl von Definitionen dieses Zelltyps, wobei deren Vorkommen, Eigenschaften und Funktion sich je nach gewählter Definition zum Teil deutlich unterscheiden oder sogar widersprechen.

Solange also die einzelnen Populationen von Progenitorzellen einander gleichgestellt, keine festen Protokolle für die Detektierung, Isolierung und Anreicherung der Progenitorzellen definiert werden, keine stimmige Hypothese bezüglich der Aufgaben und Wirkweisen der einzelnen Zelltypen vorhanden ist und keine Strategien entworfen wurde, um die in vivo Funktion dieser Zelltypen zu untersuchen, kann nicht nur keine sichere Aussage über die Bedeutung der zirkulierenden Progenitorzellen getroffen werden, sondern auch kein klinischer Nutzen daraus gezogen werden.

7 Zusammenfassung

Seit sich für den Einsatz hämatopoetischer Vorläuferzellen im Myokardinfarkt in experimentellen Modellen des Herzinfarktes Verbesserungen hinsichtlich der myokardialen Funktion zeigen, wird die Applikation bzw. Mobilisierung derartiger Zellen als möglicherweise neue zukünftige Therapieoption gesehen. Erythropoetin könnte einerseits durch Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark, andererseits durch Hemmung der Apoptose und Stimulation der Vaskulogenese regeneratives Potential besitzen. Ziel dieser Studie war erstens den Einfluss von Erythropoetin auf die Mobilisierung und Funktionalität von zirkulierenden Progenitorzellen zu ermitteln, zweitens die Wirkung von Erythropoetin hinsichtlich des Auftretens einer Restenose und von kardialen und zerebrovaskulären Ereignissen festzustellen und drittens Veränderungen der Zahl und Funktionalität von zirkulierenden Progenitorzellen zu evaluieren.

In der durchgeführten Studie wurde beobachtet, dass unter dem Einfluss von Erythropoetin die Konzentration zirkulierender CD133 positiver Progenitorzellen ansteigt und sich auf diesen Zellen die Expression von CXCR4 nicht verändert. Gleichzeitig zeigen sich unter Erythropoetin vermehrt angiographisch Restenosen, wobei dieses Ereignis weder mit der Konzentration zirkulierender Progenitorzellen noch mit der Expressionshäufigkeit von CXCR4 korreliert. Im Trend korreliert jedoch die Häufigkeit kardiovaskulärer oder zerebraler Ereignisse negativ mit der Konzentration CD133 positiver zirkulierender Progenitorzellen.

8 Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

- Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (2003). Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells; Nat Med **9**(11); 1370-6.
- Anagnostou, A., Lee, E. S., Kessimian, N., Levinson, R., Steiner, M. (1990). Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells; Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15); 5978-82.
- Anversa, P., Nadal-Ginard, B. (2002). Myocyte renewal and ventricular remodelling; Nature **415**(6868); 240-3.
- Asahara, T., Kawamoto, A. (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis; Am J Physiol Cell Physiol **287**(3); C572-9.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., Isner, J. M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization; (221-8).
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis; Science **275**(5302); 964-7.
- Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S., Zeiher, A. M. (2002). Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI); Circulation **106**(24); 3009-17.
- Bahlmann, F. H., De Groot, K., Spandau, J., Landry, A. L., Hertel, B., Duckert, T., Boehm, S. M., Menne, J., Haller, H., Fliser, D. (2004). Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells; Blood **103**(3); 921-6.
- Bahlmann, F. H., DeGroot, K., Duckert, T., Niemczyk, E., Bahlmann, E., Boehm, S. M., Haller, H., Fliser, D. (2003). Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin; Kidney Int **64**(5); 1648-52.
- Baker, J. E., Kozik, D., Hsu, A. K., Fu, X., Tweddell, J. S., Gross, G. J. (2007). Darbeoetin alfa protects the rat heart against infarction: dose-response, phase of action, and mechanisms; J Cardiovasc Pharmacol **49**(6); 337-45.
- Beck, I., Ramirez, S., Weinmann, R., Caro, J. (1991). Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene; J Biol Chem **266**(24); 15563-6.
- Beleslin-Cokic, B. B., Cokic, V. P., Yu, X., Weksler, B. B., Schechter, A. N., Noguchi, C. T. (2004). Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells; Blood **104**(7); 2073-80.
- Beltrami, A. P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S. M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C. A., Anversa, P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction; N Engl J Med **344**(23); 1750-7.

- Bennett, M. R., O'Sullivan, M. (2001). Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy; Pharmacol Ther **91**(2); 149-66.
- Bernaudin, M., Marti, H. H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E. T., Petit, E. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice; J Cereb Blood Flow Metab **19**(6); 643-51.
- Braunwald, E., Kloner, R. A. (1982). The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction; Circulation **66**(6); 1146-9.
- Brines, M., Cerami, A. (2006). Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise; Kidney Int **70**(2); 246-50.
- Brines, M., Cerami, A. (2008). Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response; J Intern Med **264**(5); 405-32.
- Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., Latini, R., Xie, Q., Smart, J., Su-Rick, C., Pobre, E., Diaz, D., Gomez, D., Hand, C., Coleman, T., Cerami, A. (2004). Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor; Proc Natl Acad Sci U S A **101**(41); 14907-12.
- Burger, D., Lei, M., Geoghegan-Morphet, N., Lu, X., Xenocostas, A., Feng, Q. (2006). Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase; Cardiovasc Res **72**(1); 51-9.
- Cai, Z., Semenza, G. L. (2004). Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury; Circulation **109**(17); 2050-3.
- Calvillo, L., Latini, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Ghezzi, P., Salio, M., Cerami, A., Brines, M. (2003). Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling; Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8); 4802-6.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease; Nat Med **9**(6); 653-60.
- Case, J., Mead, L. E., Bessler, W. K., Prater, D., White, H. A., Saadatzaheh, M. R., Bhavsar, J. R., Yoder, M. C., Haneline, L. S., Ingram, D. A. (2007). Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors; Exp Hematol **35**(7); 1109-18.
- Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., Capla, J. M., Galiano, R. D., Levine, J. P., Gurtner, G. C. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1; Nat Med **10**(8); 858-64.
- Chen, C. P., Lee, Y. J., Chiu, S. T., Shyu, W. C., Lee, M. Y., Huang, S. P., Li, H. (2006). The application of stem cells in the treatment of ischemic diseases; Histol Histopathol **21**(11); 1209-16.
- Chen, J. Z., Zhang, F. R., Tao, Q. M., Wang, X. X., Zhu, J. H., Zhu, J. H. (2004). Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia; Clin Sci (Lond) **107**(3); 273-80.
- Chong, Z. Z., Kang, J., Maiese, K. (2002a). Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades; J Cereb Blood Flow Metab **22**(5); 503-14.
- Chong, Z. Z., Kang, J., Maiese, K. (2002b). Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases; Circulation **106**(23); 2973-9.

- Daculsi, R., Remy-Zolghadri, M., Grellier, M., Conrad, V., Fernandez, P., Bareille, R., Bordenave, L. (2007). Signal transduction and procoagulant state of human cord blood--progenitor-derived endothelial cells after interleukin-1alpha stimulation; Endothelium **14**(3); 163-71.
- de la Torre-Hernandez, J. M., Alfonso, F., Hernandez, F., Elizaga, J., Sanmartin, M., Pinar, E., Lozano, I., Vazquez, J. M., Botas, J., Perez de Prado, A., Hernandez, J. M., Sanchis, J., Nodar, J. M. R., Gomez-Jaume, A., Larman, M., Diarte, J. A., Rodriguez-Collado, J., Rumoroso, J. R., Lopez-Minguez, J. R., Mauri, J. (2008). Drug-eluting stent thrombosis: results from the multicenter Spanish registry ESTROFA (Estudio ESpanol sobre TROmbosis de stents FARmacoactivos); J Am Coll Cardiol **51**(10); 986-90.
- Deten, A., Volz, H. C., Briest, W., Zimmer, H. (2002). Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats; Cardiovasc Res **55**(2); 329-40.
- Dimmeler, S., Aicher, A., Vasa, M., Mildner-Rihm, C., Adler, K., Tiemann, M., Rutten, H., Fichtlscherer, S., Martin, H., Zeiher, A. M. (2001). HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway; J Clin Invest **108**(3); 391-7.
- Ding, D., Shyu, W., Lin, S., Li, H. (2007). The role of endothelial progenitor cells in ischemic cerebral and heart diseases; Cell Transplant **16**(3); 273-84.
- Ebie, A. Z., Fleming, K. G. (2007). Dimerization of the erythropoietin receptor transmembrane domain in micelles; J Mol Biol **366**(2); 517-24.
- Egrie, J. C., Browne, J. K. (2001). Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP); Nephrol Dial Transplant **16 Suppl** 33-13.
- Egrie, J. C., Dwyer, E., Browne, J. K., Hitz, A., Lykos, M. A. (2003). Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin; Exp Hematol **31**(4); 290-9.
- Farb, A., Weber, D. K., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Virmani, R. (2002). Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans; Circulation **105**(25); 2974-80.
- Ferrario, M., Arbustini, E., Massa, M., Rosti, V., Marziliano, N., Raineri, C., Campanelli, R., Bertoletti, A., De Ferrari, G. M., Klersy, C., Angoli, L., Bramucci, E., Marinoni, B., Ferlini, M., Moretti, E., Raisaro, A., Repetto, A., Schwartz, P. J., Tavazzi, L. (2011). High-dose erythropoietin in patients with acute myocardial infarction: a pilot, randomised, placebo-controlled study; Int J Cardiol **147**(1); 124-31.
- Ferrario, M., Massa, M., Rosti, V., Campanelli, R., Ferlini, M., Marinoni, B., De Ferrari, G. M., Meli, V., De Amici, M., Repetto, A., Verri, A., Bramucci, E., Tavazzi, L. (2007). Early haemoglobin-independent increase of plasma erythropoietin levels in patients with acute myocardial infarction; Eur Heart J **28**(15); 1805-13.
- Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A., Greaves, M. F. (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells; Blood **75**(12); 2417-26.
- Fisher, J. W. (2003). Erythropoietin: physiology and pharmacology update; Exp Biol Med (Maywood) **228**(1); 1-14.
- Foley, R. N. (2008). Erythropoietin: physiology and molecular mechanisms; Heart Fail Rev **13**(4); 405-14.
- Frangogiannis, N. G., Smith, C. W., Entman, M. L. (2002). The inflammatory response in myocardial infarction; Cardiovasc Res **53**(1); 31-47.

- Friedrich, E. B., Walenta, K., Scharlau, J., Nickenig, G., Werner, N. (2006). CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities; Circ Res **98**(3); e20-5.
- Gallacher, L., Murdoch, B., Wu, D. M., Karanu, F. N., Keeney, M., Bhatia, M. (2000). Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7; Blood **95**(9); 2813-20.
- Gehling, U. M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N., Kluge, K., Schafer, B., Hossfeld, D. K., Fiedler, W. (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells; Blood **95**(10); 3106-12.
- George, J., Afek, A., Abashidze, A., Shmilovich, H., Deutsch, V., Kopolovich, J., Miller, H., Keren, G. (2005). Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice; Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12); 2636-41.
- Ghezzi, P., Brines, M. (2004). Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine; Cell Death Differ **11 Suppl 1**S37-44.
- Giebel, B., Corbeil, D., Beckmann, J., Hohn, J., Freund, D., Giesen, K., Fischer, J., Kogler, G., Wernet, P. (2004). Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells; Blood **104**(8); 2332-8.
- Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M. L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H., Rafii, S. (2001). Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells; Circ Res **88**(2); 167-74.
- Goussetis, E., Theodosaki, M., Paterakis, G., Peristeri, J., Petropoulos, D., Kitra, V., Papassarandis, C., Graphakos, S. (2000). A functional hierarchy among the CD34+ hematopoietic cells based on in vitro proliferative and differentiative potential of AC133+CD34(bright) and AC133(dim-)/CD34+ human cord blood cells; J Hematother Stem Cell Res **9**(6); 827-40.
- Greenhalgh, J., Hockenhull, J., Rao, N., Dundar, Y., Dickson, R. C., Bagust, A. (2010). Drug-eluting stents versus bare metal stents for angina or acute coronary syndromes; Cochrane Database Syst Rev (5); CD004587.
- Grundmann, F., Scheid, C., Braun, D., Zobel, C., Reuter, H., Schwinger, R. H. G., Muller-Ehmsen, J. (2007). Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction; Clin Res Cardiol **96**(9); 621-7.
- Haghighat, A., Weiss, D., Whalin, M. K., Cowan, D. P., Taylor, W. R. (2007). Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor exacerbate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice; Circulation **115**(15); 2049-54.
- Han, C. I., Campbell, G. R., Campbell, J. H. (2001). Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation; J Vasc Res **38**(2); 113-9.
- Hanlon, P. R., Fu, P., Wright, G. L., Steenbergen, C., Arcasoy, M. O., Murphy, E. (2005). Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling; FASEB J **19**(10); 1323-5.
- Heeschen, C., Aicher, A., Lehmann, R., Fichtlscherer, S., Vasa, M., Urbich, C., Mildner-Rihm, C., Martin, H., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (2003). Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization; Blood **102**(4); 1340-6.

- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A. S., Werb, Z., Rafii, S. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand; Cell **109**(5); 625-37.
- Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P. J., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A., Finkel, T. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk; N Engl J Med **348**(7); 593-600.
- Holmen, C., Elsheikh, E., Stenvinkel, P., Qureshi, A. R., Pettersson, E., Jalkanen, S., Sumitran-Holgersson, S. (2005). Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial progenitor cell dysfunction in patients with vasculitis and kidney involvement; J Am Soc Nephrol **16**(10); 3110-20.
- Honzczarenko, M., Douglas, R. S., Mathias, C., Lee, B., Ratajczak, M. Z., Silberstein, L. E. (1999). SDF-1 responsiveness does not correlate with CXCR4 expression levels of developing human bone marrow B cells; Blood **94**(9); 2990-8.
- Hristov, M., Weber, C. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance; J Cell Mol Med **8**(4); 498-508.
- Hristov, M., Zerneck, A., Bidzhekov, K., Liehn, E. A., Shagdarsuren, E., Ludwig, A., Weber, C. (2007). Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury; Circ Res **100**(4); 590-7.
- Imanishi, T., Hano, T., Nishio, I. (2004). Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced proliferation and network formation of endothelial progenitor cells; Hypertens Res **27**(2); 101-8.
- Iwakura, A., Luedemann, C., Shastry, S., Hanley, A., Kearney, M., Aikawa, R., Isner, J. M., Asahara, T., Losordo, D. W. (2003). Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury; Circulation **108**(25); 3115-21.
- Janmaat, M. L., Heerkens, J. L. T., de Bruin, A. M., Klous, A., de Waard, V., de Vries, C. J. M. (2010). Erythropoietin accelerates smooth muscle cell-rich vascular lesion formation in mice through endothelial cell activation involving enhanced PDGF-BB release; Blood **115**(7); 1453-60.
- Jubinsky, P. T., Krijanovski, O. I., Nathan, D. G., Tavernier, J., Sieff, C. A. (1997). The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor; Blood **90**(5); 1867-73.
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravereaux, E., Pieczek, A., Iwaguro, H., Hayashi, S. I., Isner, J. M., Asahara, T. (2000). Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects; Circ Res **86**(12); 1198-202.
- Karshovska, E., Zagorac, D., Zerneck, A., Weber, C., Schober, A. (2008). A small molecule CXCR4 antagonist inhibits neointima formation and smooth muscle progenitor cell mobilization after arterial injury; J Thromb Haemost **6**(10); 1812-5.
- Kassmeyer, S., Plendl, J., Custodis, P., Bahramsoltani, M. (2009). New insights in vascular development: vasculogenesis and endothelial progenitor cells; Anat Histol Embryol **38**(1); 1-11.
- Keeley, E. C., Boura, J. A., Grines, C. L. (2003). Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials; Lancet **361**(9351); 13-20.
- Khan, S. S., Solomon, M. A., McCoy, J. P. J. (2005). Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry; Cytometry B Clin Cytom **64**(1); 1-8.

- Clune, J. R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T. R., Tsung, A. (2008). HMGB1: endogenous danger signaling; Mol Med **14**(7-8); 476-84.
- Kollet, O., Shvitiel, S., Chen, Y., Suriawinata, J., Thung, S. N., Dabeva, M. D., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S., Goichberg, P., Kalinkovich, A., Arenzana-Seisdedos, F., Nagler, A., Hardan, I., Revel, M., Shafritz, D. A., Lapidot, T. (2003). HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver; J Clin Invest **112**(2); 160-9.
- Langwieser, N., Schwarz, J. B. K., Reichenbacher, C., Stemmer, B., Massberg, S., Langwieser, N. N., Zohlhofer, D. (2009). Role of bone marrow-derived cells in the genetic control of restenosis; Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(10); 1551-7.
- Lapidot, T., Dar, A., Kollet, O. (2005). How do stem cells find their way home?; Blood **106**(6); 1901-10.
- Lappin, T. R., Maxwell, A. P., Johnston, P. G. (2002). EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions; Stem Cells **20**(6); 485-92.
- Latini, R., Brines, M., Fiordaliso, F. (2008). Do non-hemopoietic effects of erythropoietin play a beneficial role in heart failure?; Heart Fail Rev **13**(4); 415-23.
- Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jurgens, K., Mische, E., Bohm, M., Nickenig, G. (2004). Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis; Circulation **109**(2); 220-6.
- Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., Savino, C., Bianchi, M., Nielsen, J., Gerwien, J., Kallunki, P., Larsen, A. K., Helboe, L., Christensen, S., Pedersen, L. O., Nielsen, M., Torup, L., Sager, T., Sfacteria, A., Erbayraktar, S., Erbayraktar, Z., Gokmen, N., Yilmaz, O., Cerami-Hand, C., Xie, Q., Coleman, T., Cerami, A., Brines, M. (2004). Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic; Science **305**(5681); 239-42.
- Leone, A. M., Rutella, S., Bonanno, G., Abbate, A., Rebutzi, A. G., Giovannini, S., Lombardi, M., Galiuto, L., Liuzzo, G., Andreotti, F., Lanza, G. A., Contemi, A. M., Leone, G., Crea, F. (2005). Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function; Eur Heart J **26**(12); 1196-204.
- Leor, J., Marber, M. (2006). Endothelial progenitors: a new Tower of Babel?; J Am Coll Cardiol **48**(8); 1588-90.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis; Nature **420**(6917); 868-74.
- Lipsic, E., van der Meer, P., Voors, A. A., Westenbrink, B. D., van den Heuvel, A. F. M., de Boer, H. C., van Zonneveld, A. J., Schoemaker, R. G., van Gilst, W. H., Zijlstra, F., van Veldhuisen, D. J. (2006). A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study; Cardiovasc Drugs Ther **20**(2); 135-41.
- Lipsic, E., Westenbrink, B. D., van der Meer, P., van der Harst, P., Voors, A. A., van Veldhuisen, D. J., Schoemaker, R. G., van Gilst, W. H. (2008). Low-dose erythropoietin improves cardiac function in experimental heart failure without increasing haematocrit; Eur J Heart Fail **10**(1); 22-9.
- Loomans, C. J. M., de Koning, E. J. P., Staal, F. J. T., Rookmaaker, M. B., Verseyden, C., de Boer, H. C., Verhaar, M. C., Braam, B., Rabelink, T. J., van Zonneveld, A. (2004). Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes; Diabetes **53**(1); 195-9.

- Majesky, M. W., Lindner, V., Twardzik, D. R., Schwartz, S. M., Reidy, M. A. (1991). Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury; J Clin Invest **88**(3); 904-10.
- Martin-Rendon, E., Brunskill, S. J., Hyde, C. J., Stanworth, S. J., Mathur, A., Watt, S. M. (2008). Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review; Eur Heart J **29**(15); 1807-18.
- Marzo, F., Lavorgna, A., Coluzzi, G., Santucci, E., Tarantino, F., Rio, T., Conti, E., Autore, C., Agati, L., Andreotti, F. (2008). Erythropoietin in heart and vessels: focus on transcription and signalling pathways; J Thromb Thrombolysis **26**(3); 183-7.
- Massa, M., Rosti, V., Ferrario, M., Campanelli, R., Ramajoli, I., Rosso, R., De Ferrari, G. M., Ferlini, M., Goffredo, L., Bertolotti, A., Klersy, C., Pecci, A., Moratti, R., Tavazzi, L. (2005). Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction; Blood **105**(1); 199-206.
- Masuda, S., Nagao, M., Takahata, K., Konishi, Y., Gallyas, F. J., Tabira, T., Sasaki, R. (1993). Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells; J Biol Chem **268**(15); 11208-16.
- Moldenhauer, A., Genter, G., Lun, A., Bal, G., Kiesewetter, H., Salama, A. (2008). Hematopoietic progenitor cells and interleukin-stimulated endothelium: expansion and differentiation of myeloid precursors; BMC Immunol **9**56.
- Moon, C., Krawczyk, M., Lakatta, E. G., Talan, M. I. (2006). Therapeutic effectiveness of a single vs multiple doses of erythropoietin after experimental myocardial infarction in rats; Cardiovasc Drugs Ther **20**(4); 245-51.
- Moon, C., Krawczyk, M., Paik, D., Lakatta, E. G., Talan, M. I. (2005). Cardioprotection by recombinant human erythropoietin following acute experimental myocardial infarction: dose response and therapeutic window; Cardiovasc Drugs Ther **19**(4); 243-50.
- Nagai, A., Nakagawa, E., Choi, H. B., Hatori, K., Kobayashi, S., Kim, S. U. (2001). Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture; J Neuropathol Exp Neurol **60**(4); 386-92.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1; Nature **382**(6592); 635-8.
- Najjar, S. S., Rao, S. V., Melloni, C., Raman, S. V., Povsic, T. J., Melton, L., Barsness, G. W., Prather, K., Heitner, J. F., Kilaru, R., Gruberg, L., Hasselblad, V., Greenbaum, A. B., Patel, M., Kim, R. J., Talan, M., Ferrucci, L., Longo, D. L., Lakatta, E. G., Harrington, R. A. (2011). Intravenous erythropoietin in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: REVEAL: a randomized controlled trial; JAMA **305**(18); 1863-72.
- Nakamura, R., Takahashi, A., Yamada, T., Miyai, N., Irie, H., Kinoshita, N., Sawada, T., Azuma, A., Matsubara, H. (2009). Erythropoietin in patients with acute coronary syndrome and its cardioprotective action after percutaneous coronary intervention; Circ J **73**(10); 1920-6.
- Naruse, K., Hamada, Y., Nakashima, E., Kato, K., Mizubayashi, R., Kamiya, H., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Murohara, T., Matsubara, T., Oiso, Y., Nakamura, J. (2005). Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy; Diabetes **54**(6); 1823-8.

- Neuss, S., Becher, E., Woltje, M., Tietze, L., Jahnen-Dechent, W. (2004). Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing; Stem Cells **22**(3); 405-14.
- Oppenheim, J. J., Yang, D. (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses; Curr Opin Immunol **17**(4); 359-65.
- Ormiston, J. A., Stewart, F. M., Roche, A. H., Webber, B. J., Whitlock, R. M., Webster, M. W. (1997). Late regression of the dilated site after coronary angioplasty: a 5-year quantitative angiographic study; Circulation **96**(2); 468-74.
- Ott, I., Schulz, S., Mehilli, J., Fichtner, S., Hadamitzky, M., Hoppe, K., Ibrahim, T., Martinoff, S., Massberg, S., Laugwitz, K., Dirschinger, J., Schwaiger, M., Kastrati, A., Schmig, A. (2010). Erythropoietin in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized, double-blind trial; Circ Cardiovasc Interv **3**(5); 408-13.
- Parsa, C. J., Kim, J., Riel, R. U., Pascal, L. S., Thompson, R. B., Petrofski, J. A., Matsumoto, A., Stamler, J. S., Koch, W. J. (2004). Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts; J Biol Chem **279**(20); 20655-62.
- Parsa, C. J., Matsumoto, A., Kim, J., Riel, R. U., Pascal, L. S., Walton, G. B., Thompson, R. B., Petrofski, J. A., Annex, B. H., Stamler, J. S., Koch, W. J. (2003). A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart; J Clin Invest **112**(7); 999-1007.
- Pasino, M., Lanza, T., Marotta, F., Scarso, L., De Biasio, P., Amato, S., Corcione, A., Pistoia, V., Mori, P. G. (2000). Flow cytometric and functional characterization of AC133+ cells from human umbilical cord blood; Br J Haematol **108**(4); 793-800.
- Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors; Blood **95**(3); 952-8.
- Pelliccia, F., Cianfrocca, C., Rosano, G., Mercurio, G., Speciale, G., Pasceri, V. (2010). Role of endothelial progenitor cells in restenosis and progression of coronary atherosclerosis after percutaneous coronary intervention: a prospective study; JACC Cardiovasc Interv **3**(1); 78-86.
- Pfeffer, M. A., Braunwald, E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications; Circulation **81**(4); 1161-72.
- Quirici, N., Soligo, D., Caneva, L., Servida, F., Bossolasco, P., Deliliers, G. L. (2001). Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells; Br J Haematol **115**(1); 186-94.
- Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H., Verfaillie, C. M. (2002). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow; J Clin Invest **109**(3); 337-46.
- Ross, R. (1986). The pathogenesis of atherosclerosis--an update; N Engl J Med **314**(8); 488-500.
- Ross, R., Masuda, J., Raines, E. W. (1990). Cellular interactions, growth factors, and smooth muscle proliferation in atherogenesis; Ann N Y Acad Sci **598**102-12.
- Rouhl, R. P. W., van Oostenbrugge, R. J., Damoiseaux, J., Cohen Tervaert, J., Lodder, J. (2008). Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts; Stroke **39**(7); 2158-65.

- Sadamoto, Y., Igase, K., Sakanaka, M., Sato, K., Otsuka, H., Sakaki, S., Masuda, S., Sasaki, R. (1998). Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery; Biochem Biophys Res Commun **253**(1); 26-32.
- Sakanaka, M., Wen, T. C., Matsuda, S., Masuda, S., Morishita, E., Nagao, M., Sasaki, R. (1998). In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage; Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8); 4635-40.
- Schachinger, V., Assmus, B., Britten, M. B., Honold, J., Lehmann, R., Teupe, C., Abolmaali, N. D., Vogl, T. J., Hofmann, W., Martin, H., Dimmeler, S., Zeiher, A. M. (2004). Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial; J Am Coll Cardiol **44**(8); 1690-9.
- Schomig, K., Busch, G., Steppich, B., Sepp, D., Kaufmann, J., Stein, A., Schomig, A., Ott, I. (2006). Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction; (1032-7).
- Sepp, D., Esposito, L., Zepper, P., Ott, I., Feurer, R., Sadikovic, S., Hemmer, B., Poppert, H. (2009). Surface expression of CXCR4 on circulating CD133progenitor cells is associated with plaque instability in subjects with carotid artery stenosis; J Angiogenes Res **110**.
- Sheehan, F. H., Mathey, D. G., Schofer, J., Dodge, H. T., Bolson, E. L. (1985). Factors that determine recovery of left ventricular function after thrombolysis in patients with acute myocardial infarction; Circulation **71**(6); 1121-8.
- Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y., Imaizumi, T. (2001). Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction; Circulation **103**(23); 2776-9.
- Shyu, W., Lin, S., Chiang, M., Su, C., Li, H. (2006). Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats; J Neurosci **26**(13); 3444-53.
- Silva, M., Grillot, D., Benito, A., Richard, C., Nunez, G., Fernandez-Luna, J. L. (1996). Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2; Blood **88**(5); 1576-82
- Simper, D., Stalboerger, P. G., Panetta, C. J., Wang, S., Caplice, N. M. (2002). Smooth muscle progenitor cells in human blood; Circulation **106**(10); 1199-204.
- Siren, A. L., Fratelli, M., Brines, M., Goemans, C., Casagrande, S., Lewczuk, P., Keenan, S., Gleiter, C., Pasquali, C., Capobianco, A., Mennini, T., Heumann, R., Cerami, A., Ehrenreich, H., Ghezzi, P. (2001). Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress; Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7); 4044-9.
- Skowasch, D., Jabs, A., Andrie, R., Dinkelbach, S., Luderitz, B., Bauriedel, G. (2003). Presence of bone-marrow- and neural-crest-derived cells in intimal hyperplasia at the time of clinical in-stent restenosis; Cardiovasc Res **60**(3); 684-91.
- Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M., Steinhoff, G. (2003). Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration; Lancet **361**(9351); 45-6.

- Stein, A., Zohlnhofer, D., Pogatsa-Murray, G., von Wedel, J., Steppich, B. A., Schomig, A., Kastrati, A., Ott, I. (2010). Expression of CXCR4, VLA-1, LFA-3 and transducer of ERB in G-CSF-mobilised progenitor cells in acute myocardial infarction; Thromb Haemost **103**(3); 638-43.
- Strauer, B. E., Brehm, M., Zeus, T., Kosterling, M., Hernandez, A., Sorg, R. V., Kogler, G., Wernet, P. (2002). Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans; Circulation **106**(15); 1913-8.
- Strunk, T., Hartel, C., Temming, P., Matzke, N., Zimmer, J., Schultz, C. (2008). Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes; Acta Paediatr **97**(1); 16-20.
- Sutherland, D. R., Nayyar, R., Acton, E., Giftakis, A., Dean, S., Mosiman, V. L. (2009). Comparison of two single-platform ISHAGE-based CD34 enumeration protocols on BD FACSCalibur and FACSCanto flow cytometers; Cytotherapy **11**(5); 595-605.
- Swan, H. J. (1993). Left ventricular systolic and diastolic dysfunction in the acute phases of myocardial ischaemia and infarction, and in the later phases of recovery. Function follows morphology; Eur Heart J **14 Suppl A**48-56.
- Taguchi, A., Matsuyama, T., Moriwaki, H., Hayashi, T., Hayashida, K., Nagatsuka, K., Todo, K., Mori, K., Stern, D. M., Soma, T., Naritomi, H. (2004). Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function; Circulation **109**(24); 2972-5.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J. M., Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization; Nat Med **5**(4); 434-8.
- Tanaka, K., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R. (2003). Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries; Circ Res **93**(8); 783-90.
- Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H., Shimada, K., Iwasaka, T., Imaizumi, T. (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial; Lancet **360**(9331); 427-35.
- Tepper, O. M., Capla, J. M., Galiano, R. D., Ceradini, D. J., Callaghan, M. J., Kleinman, M. E., Gurtner, G. C. (2005). Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells; Blood **105**(3); 1068-77.
- Tepper, O. M., Galiano, R. D., Capla, J. M., Kalka, C., Gagne, P. J., Jacobowitz, G. R., Levine, J. P., Gurtner, G. C. (2002). Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures; Circulation **106**(22); 2781-6.
- Timmermans, F., Plum, J., Yoder, M. C., Ingram, D. A., Vandekerckhove, B., Case, J. (2009). Endothelial progenitor cells: identity defined?; J Cell Mol Med **13**(1); 87-102.
- Togel, F., Isaac, J., Hu, Z., Weiss, K., Westenfelder, C. (2005). Renal SDF-1 signals mobilization and homing of CXCR4-positive cells to the kidney after ischemic injury; Kidney Int **67**(5); 1772-84.
- Tsai, S., Butler, J., Rafii, S., Liu, B., Kent, K. C. (2009). The role of progenitor cells in the development of intimal hyperplasia; J Vasc Surg **49**(2); 502-10.
- Um, M., Gross, A. W., Lodish, H. F. (2007). A 'classical' homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells; Cell Signal **19**(3); 634-45.

- Urao, N., Okigaki, M., Yamada, H., Aadachi, Y., Matsuno, K., Matsui, A., Matsunaga, S., Tateishi, K., Nomura, T., Takahashi, T., Tatsumi, T., Matsubara, H. (2006). Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia; Circ Res **98**(11); 1405-13.
- Urbich, C., Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology; Circ Res **95**(4); 343-53.
- Valgimigli, M., Rigolin, G. M., Fucili, A., Porta, M. D., Soukhomovskaia, O., Malagutti, P., Bugli, A. M., Bragotti, L. Z., Francolini, G., Mauro, E., Castoldi, G., Ferrari, R. (2004). CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure; Circulation **110**(10); 1209-12.
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Adler, K., Aicher, A., Martin, H., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (2001b). Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease; (2885-90).
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (2001a). Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease; Circ Res **89**(1); E1-7.
- Velagaleti, R. S., Pencina, M. J., Murabito, J. M., Wang, T. J., Parikh, N. I., D'Agostino, R. B., Levy, D., Kannel, W. B., Vasan, R. S. (2008). Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction; Circulation **118**(20); 2057-62.
- Ven de Werf, F., Bax, J., Betriu, A., Blomstrom-Lundqvist, C., Crea, F., Falk, V., Filippatos, G., Fox, K., Huber, K., Kastrati, A., Rosengren, A., Steg, P., Tubaro, M., Verheuggt, F., Weidinger, F., Weis, M. (2008). Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation; European Heart Journal **29**(23); 2909-2945.
- Voo, S., Eggermann, J., Dunaeva, M., Ramakers-van Oosterhoud, C., Waltenberger, J. (2008). Enhanced functional response of CD133+ circulating progenitor cells in patients early after acute myocardial infarction; Eur Heart J **29**(2); 241-50.
- Wald, M. R., Borda, E. S., Sterin-Borda, L. (1996). Mitogenic effect of erythropoietin on neonatal rat cardiomyocytes: signal transduction pathways; J Cell Physiol **167**(3); 461-8.
- Watson, J. V., Walport, M. J. (1986). Molecular calibration in flow cytometry with sub-attogram detection limit; J Immunol Methods **93**(2); 171-5.
- Wayne, P. (1998). Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; National Committee for Clinical Laboratory Standards; (doc H42-A).
- Werner, N., Nickenig, G. (2006). Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy?; Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(2); 257-66.
- Westenbrink, B. D., Lipsic, E., van der Meer, P., van der Harst, P., Oeseburg, H., Du Marchie Sarvaas, G. J., Koster, J., Voors, A. A., van Veldhuisen, D. J., van Gilst, W. H., Schoemaker, R. G. (2007). Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization; Eur Heart J **28**(16); 2018-27.

- Wojakowski, W., Tendera, M., Zebzda, A., Michalowska, A., Majka, M., Kucia, M., Maslankiewicz, K., Wyderka, R., Krol, M., Ochala, A., Kozakiewicz, K., Ratajczak, M. Z. (2006). Mobilization of CD34(+), CD117(+), CXCR4(+), c-met(+) stem cells is correlated with left ventricular ejection fraction and plasma NT-proBNP levels in patients with acute myocardial infarction; Eur Heart J **27**(3); 283-9.
- Wojchowski, D. M., Gregory, R. C., Miller, C. P., Pandit, A. K., Pircher, T. J. (1999). Signal transduction in the erythropoietin receptor system; Exp Cell Res **253**(1); 143-56.
- Wright, G. L., Hanlon, P., Amin, K., Steenbergen, C., Murphy, E., Arcasoy, M. O. (2004). Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury; FASEB J **18**(9); 1031-3.
- Yamaguchi, J., Kusano, K. F., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., Bosch-Marce, M., Masuda, H., Losordo, D. W., Isner, J. M., Asahara, T. (2003). Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization; Circulation **107**(9); 1322-8.
- Yazihan, N., Karakurt, O., Ataoglu, H. (2008). Erythropoietin reduces lipopolysaccharide-induced cell Damage and midkine secretion in U937 human histiocytic lymphoma cells; Adv Ther **25**(5); 502-14.
- Yellon, D. M., Baxter, G. F. (2000). Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality?; Heart **83**(4); 381-7.
- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J., Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells; Blood **90**(12); 5002-12.
- Zernecke, A., Schober, A., Bot, I., von Hundelshausen, P., Liehn, E. A., Mopps, B., Mericskay, M., Gierschik, P., Biessen, E. A., Weber, C. (2005). SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells; Circ Res **96**(7); 784-91.
- Zhang, S., Sun, A., Xu, D., Yao, K., Huang, Z., Jin, H., Wang, K., Zou, Y., Ge, J. (2009). Impact of timing on efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow stem cells transplantation in acute myocardial infarction: a pooled subgroup analysis of randomized controlled trials; Clin Cardiol **32**(8); 458-66.
- Zohlhofer, D., Klein, C. A., Richter, T., Brandl, R., Murr, A., Nuhrenberg, T., Schomig, A., Baeuerle, P. A., Neumann, F. J. (2001). Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation; Circulation **103**(10); 1396-402.

8.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Übersicht über die Herkunft, das Differenzierungsverhalten und die Hierarchie adulter endothelialer Progenitorzellen;	11
Abbildung 2: Studienprotokoll der REVIVAL-3 – Substudie; rote Pfeile markieren die Abnahmen der Blutproben für die Analyse zirkulierender Progenitorzellen; blaue Pfeile stehen für die tägliche Kontrolle der Laborparameter	35
Abbildung 3: Schema der Probenmessung am Analysepunkt eines Durchflusszytometers; die Zellen werden in einen laminaren Hüllstrom (A) eingebettet und so zum Analysepunkt (B) geleitet	37
Abbildung 4: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung zur Darstellung der Größe und Granularität des Messansatzes; x-Achse: FSC, y-Achse: SSC; R1: mononukleäre Zellen	42
Abbildung 5: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung zur Darstellung CD45 positiver Zellen; x-Achse: Fluoreszenzintensität von Anti-CD45 AK, y-Achse: FSC; R2: Gesamtheit der CD45 positiven Zellen	42
Abbildung 6: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung zur Messung der TruCount Mikropartikel im Rahmen der Konzentrationsbestimmung; R3: TruCount Mikropartikel, Gating nach Vorgabe des Herstellers	44
Abbildung 7: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung zur Identifizierung 7-AAD positiver Zellen; R8: 7-AAD positive Zellen	45
Abbildung 8: Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Messung zur Identifizierung CD133 positiver Zellen; R4: CD133 positive Zellen	46
Abbildung 9: Histogramm zur Darstellung der CXCR4 FITC- Fluoreszenzintensität auf PE CD133 positiven Zellen aus Region R4	47
Abbildung 12: Vergleich der Lumeneinengung im Bereich der Koronarintervention (In-Stent Restenose) bei Patienten mit Placebo und Erythropoetin bei der Kontrollangiographie zum Follow-Up; x-Achse: Auftragung der prozentualen Einengung des Lumens im Vergleich zum Lumendurchmesser nach Koronarintervention zum Zeitpunkt der Randomisierung; y-Achse: Auftragung des kumulierten Anteils der Patienten, welche zum Follow-Up mindestens eine dem jeweiligen x-Wert entsprechende Stenose des zum Randomisierungszeitpunktes intervenierten Gefäßabschnittes der Koronararterie aufweisen; Beispiel: eine mindestens 40%ige Stenose des Lumens fand sich bei zirka 10% der Patienten der Placebogruppe und bei zirka 30% der Patienten der Erythropoetingruppe	54

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Charakterisierung hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen durch Oberflächenmarker; hämatopoetische, sowie frühe und späte endotheliale Progenitorzellen werden im weiteren Verlauf unter dem Begriff der zirkulierenden Progenitorzelle zusammengefasst; erstellt nach Zusammenschau von Übersichtsarbeiten von Peichev, Urbich, Ding und Timmermans (Peichev 2000, Urbich 2004, Ding 2007 und Timmermans 2009)	13
Tabelle 2: Übersicht über positive (↑) und negative (↓) Einflussfaktoren auf die Anzahl, Proliferations-, Adhäsions-, Migrations- und Organisationsfähigkeit (in vitro) zirkulierender Progenitorzellen beim Menschen; EPC = endotheliale Progenitorzelle	15
Tabelle 3: Verteilung von Erythropoetinrezeptoren im menschlichen Organismus nach Marzo (Marzo 2008); es gilt zu beachten, dass der Übersicht der Verteilung von Erythropoetinrezeptoren im menschlichen Organismus Studien zu Grunde liegen, die durch die Verwendung ungeeigneter Analysemethoden nicht zwischen der homodimeren und heterodimeren Isoform des Rezeptors zu unterscheiden vermögen	21
Tabelle 4: Übersicht über die durch ein Durchflusszytometer messbaren Parameter und die in der Studie verwendeten Fluorochrome; FITC = Fluoreszin-Isothiozyanat; PE = Phycoerythrin; 7-AAD = 7-Actinomycin D; APC = Allophycocyanin	39
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Antikörperkonjugate; 1) BD-Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA; 2) MACS-Mitenyi Biotec, Auburn, Kalifornien, USA; 3) R&D-Systems, Minneapolis, USA	39
Tabelle 6: Pipettierschema REVIVAL-3 Unterstudie zur Analyse zirkulierender Progenitorzellen	40
Tabelle 7: Übersicht der in der Studie eingeschlossenen Patienten mit Alter, Geschlecht, Risikofaktoren und verschiedenen klinischen und angiographischen Parametern, aufgeschlüsselt nach Patienten der Erythropoetingruppe (linke Spalte) und Patienten der Placebogruppe (mittlere Spalte); ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($P < 0.05$, rechte Spalte) ist bei keinem Parameter feststellbar	50
Tabelle 8: Konzentration zirkulierender, CD133 positiver Progenitorzellen im Blut von Patienten mit Placebo bzw. Erythropoetin; die Angabe der Konzentration erfolgt in Zellen pro Mikroliter; t entspricht dem Abnahmezeitpunkt, wobei $t = 0$ Stunden dem Zeitpunkt der Randomisierung entspricht; n.s. bedeutet „nicht signifikant“	52
Tabelle 9: Expressionshäufigkeit von CXCR4 auf zirkulierenden, CD133 positiven Progenitorzellen im Blut von Patienten mit Placebo bzw. Erythropoetin; die Angabe der Expressionshäufigkeit erfolgt in [mittlere fl], welche als relative, einheitslose Angabe der Stärke der Fluoreszenz direkt proportional zur Häufigkeit des auf der Oberfläche am CXCR4 Rezeptor gebundenen Antikörpers ist; t entspricht dem Abnahmezeitpunkt, wobei $t = 0$ h dem Zeitpunkt der Randomisierung entspricht; n.s. bedeutet „nicht signifikant“	53

Tabelle 10: Übersicht über die Ergebnisse der Kontrollangiographie nach 4 bis 6 Monaten; Diameter Stenosis ergibt sich aus dem Verhältnis von Grad der Koronarstenose nach Koronarintervention zum Zeitpunkt der Randomisierung zu Grad der Koronarstenose bei Kontrollangiographie; Late Lumen loss gibt die Verringerung des Lumendurchmessers im Vergleich zum Zeitpunkt der Randomisierung in Millimeter an	55
Tabelle 11: Übersicht über die Konzentration CD133 positiver zirkulierender Progenitorzellen im Blut von Patienten mit bzw. ohne Restenose; die Angabe der Expressionshäufigkeit erfolgt in [mittlere fl], welche als relative, einheitslose Angabe der Stärke der Fluoreszenz direkt proportional zur Häufigkeit des auf der Oberfläche am CXCR4 Rezeptor gebundenen Antikörpers ist	56
Tabelle 12: Übersicht über die Konzentration CD133 positiver zirkulierender Progenitorzellen im Blut von Patienten mit bzw. ohne MACCE; die Angabe der Expressionshäufigkeit erfolgt in [mittlere fl], welche als relative, einheitslose Angabe der Stärke der Fluoreszenz direkt proportional zur Häufigkeit des auf der Oberfläche am CXCR4 Rezeptor gebundenen Antikörpers ist	57

8.4 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der gemessenen μl pro Ansatz mit Hilfe von TruCount Mikropartikeln; hierbei entsprechen 36,25 Mikroliter der im Ansatz hinzu gegebenen Flüssigkeiten	44
Formel 2: Berechnung der Konzentration CD45 positiver Zellen im Vollblut	45

9 Anhang 1: Studienprotokoll der REVIVAL-3 Studie (Englisch)

PROTOCOL

**PROSPECTIVE, RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL OF
ERYTHROPOIETIN IN PATIENTS WITH ST-SEGMENT ELEVATION MYOCARDIAL INFARCTION
UNDERGOING PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION**

*(**RE**generation of **V**ital Myocardium in **ST**-Segment Ele**V**ation Myocardi**AL** Infarction by
Erythropoietin - **REVIVAL-3**)*

EUDRACT # 2006-003819-45

PROTOCOL CODE # GE IDE No. I01106

INVESTIGATORS: Single Center

STEERING COMMITTEE: A. Schömig, MD (chairman)
Deutsches Herzzentrum München
Klinik an der Technischen Universität München
Lazarettstr. 36
80636 Munich
Germany

I. Ott, MD (principal investigator)
Deutsches Herzzentrum München
Klinik an der Technischen Universität München
Lazarettstr. 36
80636 Munich
Germany

J. Mehilli, MD
Deutsches Herzzentrum München
Klinik an der Technischen Universität München
Lazarettstr. 36
80636 Munich
Germany

SPONSOR	Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen Deutsches Herzzentrum München Lazarettstr. 36 80636 Munich Germany
COORDINATING CENTER	INTRACORONARY STENTING AND ANTITHROMBOSIS RESEARCH CENTER Technische Universität München Lazarettstr. 36 80636 Munich Germany
PROJECT MANAGER	Stefanie Schulz, MD INTRACORONARY STENTING AND ANTITHROMBOSIS RESEARCH CENTER Lazarettstr. 36 80636 Munich Germany
EVENT ADJUDICATION COMMITTEE	D. Hall, MD L. Goedel-Meinen, MD P. Barthel, MD
IMAGING CORE LABORATORY	Tarek Ibrahim, MD Coordinator MRI Core Laboratory Lazarettstr. 36 80636 Munich Germany

Olga Bruskina, MD

Coordinator

QCA Core Laboratory

***ISAR*Research** Center

Lazarettstr. 36

80636 Munich

Germany

Stephan Nekolla, MD

Coordinator

Scintigraphic Core Laboratory

Klinikum rechts der Isar

Ismaningerstr. 22

81675 Munich

Germany

TABLE OF CONTENTS

1. Protocol Synopsis

2. List of Abbreviations

3. Background

4. Study Objectives

4.1. Hypothesis

4.2. Primary End point

4.3. Secondary End points

5. Study Design

5.1. Inclusion criteria

5.2. Exclusion criteria

6. Study Plan

6.1. Study Duration and Time Frames

6.2. Pre-enrollment Procedures

6.3. Randomization

6.4. Study Drug and Rationale of Study Drug Dose Selection

6.5. Study Drug Preparation

6.6. Peri- And Post-interventional Therapy and Management

6.7. Discontinuation of the Study Drug

6.8. Follow-up Protocol

6.8.1. Clinical Laboratory Evaluation

6.8.2. Clinical Monitoring

6.8.3. Imaging

6.8.4. Trial discontinuation

6.8.5. Patient Withdrawal

7. Monitoring of Trial Safety

8. Statistical Considerations

8.1. Endpoints

8.1.1. Primary Endpoint

8.1.2. Secondary endpoints

8.2. Pre-specified Subgroup Analysis

8.3. Sample Size Estimation

8.4. Analysis Plan

9. Ethical Aspects

9.1. Ethical guidelines

9.2. Informed Consent

9.3. Ethics Committee

10. Regulatory Considerations

10.1. Monitoring of study conduct

10.2. Data collection and tracking

10.3. Time Windows for Receipt of Clinical and Laboratory Data

10.4. Adverse Events

11. Study administrative Structure**11.1. Steering Committee****11.2. Event Adjudication Committee****11.3. Operation Committee****11.4. Imaging Core Laboratory****12. Publication policy****13. Substudy: Progenitor Cell Mobilization, Inflammatory And Hemostatic Biomarkers****13.1. Background of the Sub-study****13.2. Rationale of Sub-study****13.3. Sub-study Objectives****13.4. Sub-study Design****13.4.1. Overview****13.4.2. Methods****13.4.3. Hypothesis and Statistical analysis****12. Bibliography**

Appendix 1	Definitions
Appendix 2	Sample Informed Consent
Appendix 3	Study Schedule assessment
Appendix 4	Study Flow Chart
Appendix 5	Transfusion Guidelines
Appendix 6	Study Drugs Preparation

1. PROTOCOL SYNOPSIS

Title:	Prospective, Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial Of Erythropoietin In Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Undergoing Percutaneous Coronary Intervention (REVIVAL-3)
Design:	Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled
Hypothesis:	Erythropoietin is superior to placebo with respect to left ventricular (LV) ejection fraction at 4-6 months in patients with ST-elevation myocardial infarction (STEMI) undergoing PCI
Key Inclusion Criteria:	Patients with STEMI \leq 24 hours undergoing primary PCI, LV ejection fraction $<$ 50%, informed, written consent
Key Exclusion Criteria:	Age \leq 18 years and $>$ 80 years Thrombolysis for the index infarction Cardiogenic shock Contraindication to magnetic resonance imaging (MRI)
Primary endpoint:	Left ventricular (LV) ejection fraction 4-6 months after randomization measured by MRI.
Secondary endpoints:	Change in LV ejection fraction and infarct size from 5-7 days to 4-6 months after randomization measured by MRI Death, recurrent myocardial infarction, repeat infarct artery revascularization and stroke at 30 days and 6 months
Randomization:	Erythropoietin versus Placebo

- Sample size:** Sample size calculation is based on the following assumptions regarding the primary endpoint: LV ejection fraction of 50% ($\pm 9\%$) with erythropoietin vs. 45% ($\pm 9\%$) with placebo. With a 2-sided α level of 0.05 and power of 80%, 52 patients are required in each group. We intend to include 120 patients compensating for possible missing MRI investigations and withdrawals
- Follow-up:** MRI at 5-7 days and 4-6 months after randomization,
Clinical follow-up at 30 days and 4-6 months
- Sub-study:** Changes in progenitor cell mobilization, inflammatory and hemostatic biomarkers

ABSTRACT

Reperfusion therapies in acute myocardial infarction aim to restore the coronary artery flow stopping the myocardial cell death of the jeopardized region. Nowadays there are no doubts about the superiority of mechanical reperfusion with percutaneous coronary intervention (PCI) to pharmacological reperfusion strategies with thrombolysis alone or combined with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors regarding the restoration of TIMI flow, improvement of left ventricular function and reduction of the risk of death, myocardial reinfarction or revascularization^{1,2}. However, a relevant number of patients experience heart failure due to irreversible myocardial damage and left ventricular remodeling, even after successful reperfusion^{3,4}. Thus, there is an increasing interest to assess additional pharmacologic strategies to protect the reperfused myocardium against programmed cell death or apoptosis. Strategies of glucose and insulin infusion to stop necrosis of the jeopardized myocardium^{5,6} or injection or recruitment of stem cells to the site of injury with various cytokines^{7,8,9,30} have shown either no effect or contradictory results.

Erythropoietin, an endogenous glycoprotein and a very effective chronic therapy for millions of patients with anemia and accompanying severe comorbidities has lately been shown to exert others than merely hematopoietic functions¹⁰⁻¹³. Due to attenuation of cell apoptosis and necrosis¹⁴⁻¹⁹ and/or enhancing neovascularisation²⁰⁻²¹, erythropoietin could be protective after myocardial ischemia and reperfusion and lead to infarct size reduction and improvement in left ventricular function^{14-19, 24}. In a controlled clinical trial, short-term administration of erythropoietin in patients with ischemic stroke was associated with a significantly better functional recovery, with a lower level of circulating damage markers and a strong trend to smaller infarct sizes measured by magnetic resonance imaging²². While leaving hematocrit and platelet counts unchanged, short-term administration of erythropoietin was shown to be safe and very well tolerated (no side effects reported or observed). The protective effects of short-term erythropoietin in acute ischemic brain damage are further evaluated in an ongoing multi-center trial in Germany²³. Considering the preclinical and clinical data erythropoietin is an attractive candidate to be evaluated in patients with acute myocardial infarction. In a pilot trial enrolling 22 patients with acute myocardial infarction short-term administration of erythropoietin was shown to be safe and to significantly increase the level of endothelial progenitor cells after percutaneous coronary intervention. However, the very small

population did not allow evaluating the benefit in left ventricular function or clinical outcomes²⁴.

The aim of the REVIVAL-3 study is to investigate if there is any additional benefit with short-term administration of erythropoietin after successful primary percutaneous coronary intervention (PCI) in terms of left ventricular function and clinical outcomes. Patients less than 80 years of age presenting with their first ST-elevation acute myocardial infarction within 24 hours from the onset of symptoms, with reduced left ventricular systolic function, without cardiogenic shock, without life-limiting comorbidities, without hematological disorders, without uncontrolled hypertension, without end stage renal failure or any contraindications to magnetic resonance imaging, who undergo successful primary PCI and give their written informed consent, will be enrolled in the study. Erythropoietin beta or placebo will be administered intravenously immediately, at 24 and 48 hours after PCI. The entire dose given in three equal parts will comprise 100.000 units per patient. The primary end point of the study is left ventricular ejection fraction at 4-6 months after randomization measured by MRI. The sample size needed is 52 patients for each group calculated on the following assumptions regarding the primary endpoint: 2-sided α level of 0.05, power of 80% and 5% higher left ventricular ejection fraction in the erythropoietin group. In order to compensate for possible missing MRI investigations and withdrawals, we intend to include 120 patients. Statistical analysis will be performed according to the intention-to-treat principle. Other endpoints include change in left ventricular ejection fraction from 5-7 days to 4-6 months after randomization in MRI, change in infarct size measured by MRI and SPECT, left ventricular volumes in MRI, change in angiographic left ventricular ejection fraction and number of hypokinetic chords, binary restenosis as well as adverse clinical events such as death, recurrent myocardial infarction, recurrent intervention in the infarct related artery and stroke. Clinical follow-up will be performed during hospital stay, at 30 days and at 6 months after randomization. A sub-study examines changes in progenitor cell mobilization and inflammatory and hemostatic biomarkers.

2. LIST OF ABBREVIATIONS

AEF	Adverse Event Form
ACT	Activated Clotting Time
AMI	Acute Myocardial Infarction
aPTT	Activated Prothrombin Time
BMSC	Bone marrow stem cell
CI	Confidence Interval
CK	Creatine Kinase
CRF	Case Report Form
CRP	C-Reactive Protein
EAC	Event Adjudication Committee
EC/IRB	Ethics Committee/Institutional Review Board
ECG	Electrocardiogram
EF	Ejection Fraction
EPO	Erythropoietin
Epoetin	recombinant human erythropoietin
FHS	Framingham Heart Study
GFR	Glomerular Filtration Rate
GOT	Aspartate Aminotransferase
GPT	Alanine Aminotransferase
LV-EF	Left ventricular ejection fraction
INR	International Normalized Ratio
MI	Myocardial Infarction
MRI	Magnetic Resonance Imaging
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute
PCI	Percutaneous Coronary Intervention
PRCA	Pure red cell anemia
QCA	Quantitative Coronary Angiography
RR	Relative Risk
SC	Steering committee
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
STEMI	ST-segment Elevation Myocardial Infarction
TVR	Target Vessel Revascularization
ULN	upper limits of normal

3. BACKGROUND

Based on the 44-year follow-up of the NHLBI's FHS, nearly 22% of male and 46% of female patients suffering from acute myocardial infarction will be disabled with heart failure within six years due to irreversible myocardial damage and left ventricular remodeling²⁵. Reperfusion therapies in acute myocardial infarction aim to restore the coronary artery flow stopping the myocardial cell death of the jeopardized region. Nowadays there are no doubts about the superiority of mechanical reperfusion with percutaneous coronary intervention to pharmacological reperfusion strategies with thrombolysis alone or combined with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors regarding the restoration of TIMI flow, improvement of left ventricular function and reduction of the risk of death, myocardial reinfarction or revascularization^{1,2}. However, a relevant number of patients experience heart failure even after successful reperfusion and additional angiotensin-converting-enzyme inhibition, aldosterone- and beta-blockage^{3,4}. Thus, there is an increasing interest to assess additional pharmacologic strategies to protect the jeopardized myocardium against programmed cell death or apoptosis by ischemic conditions. Protection of cardiomyocytes from hypoxia-induced cell death and reperfusion injury would increase viable myocardium providing acute and chronic benefits after acute myocardial infarction.

Efforts of metabolic modulation of acute myocardial infarction with glucose-insulin-potassium infusion were very promising in the era of no reperfusion²⁶, while adding no additional benefit in terms of myocardial salvage and clinical outcomes after mechanical reperfusion^{5,6}. Moreover, administration of agents to reduce reperfusion injury such as inhibitors of CD11/CD18 integrin receptors hoping to decrease neutrophil infiltrations resulting in reduction of infarct size has shown no measurable benefit²⁷. There is evidence in laboratory animals that adult stem cells can transdifferentiate, for example bone marrow stem cells into hepatocytes²⁸. Even though animal data do not support the transdifferentiation of bone marrow stem cells (BMSC) into cardiomyocytes²⁹, a number of considerable studies has been performed investigating the benefit of intracoronary injection or cytokine-induced recruitment of stem cells to the site of injury in infarct size reduction and ventricular function improvement^{7,8,9,30}. The degree of the beneficial effect of BMSC on infarct size or ventricular function was either the same as with placebo or small, significant and clinically vague. If there was an effect the authors

hypothesized to be partly as a result of cytokine productions (paracrine function) that enhance myocardial regeneration.

The hematopoietic cytokine erythropoietin and its receptor have been shown to be present in tissues outside the blood including the heart, suggesting potential roles of erythropoietin signaling beyond hematopoiesis¹⁰⁻¹³. Experimental studies have demonstrated that short-term treatment with recombinant erythropoietin is effective in protection of ischemic neural and myocardial tissue¹⁰⁻¹⁹.

The protective effects of short-term treatment with erythropoietin in acute cardiac ischemia are due to a reduction in apoptotic myocytes with reduced cellular damage and improved cardiac function after ischemia-reperfusion¹⁵⁻¹⁸. In addition, erythropoietin was shown to stimulate the mobilization of endothelial progenitor cells from the bone marrow²⁰. Mobilization and activation of these progenitor cells was associated with neovascularization of ischemic myocardium that may play a beneficial role in the later phase of post myocardial infarction remodeling. Expanding evidence suggest that erythropoietin is also involved in angiogenesis: stimulation of cultured endothelial cells with erythropoietin resulted in proliferation, chemotaxis and differentiation into vascular structures²¹.

The protective properties of short-term erythropoietin in brain ischemia have been successfully tested in a controlled clinical trial with stroke patients²². Erythropoietin treatment significantly improved functional outcome in these patients, and was associated with a trend towards smaller infarct sizes, assessed by MRI, and a decrease in ischemic brain and related markers. The authors explained their findings by the antiapoptotic effects of short-term erythropoietin treatment, leading to neuroprotection by reduction in ischemic brain damage. These first data are currently evaluated in a multicenter study using the same protocol²³.

Considering the preclinical and clinical data erythropoietin is an attractive and very safe candidate to be evaluated in patients with acute myocardial infarction. In a pilot trial enrolling 22 patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction short-term treatment with erythropoietin was safe and significantly increased the level of endothelial progenitor cells after percutaneous coronary intervention. However, the very small population did not allow evaluating the benefit in left ventricular function or clinical outcomes²⁴.

In the ***Regeneration of Vltal Myocardium in ST-Segment EleVation MyocardiAL Infarction by Erythropoietin - REVIVAL-3 Study*** we aim to investigate the effect of short-

term intravenous administration of erythropoietin on late-term left ventricular systolic function.

4. STUDY OBJECTIVES

4.1. HYPOTHESIS

In patients with STEMI undergoing successful primary PCI short-term administration of erythropoietin is associated with an improvement in myocardial function.

4.2. PRIMARY END POINT

Primary endpoint is left ventricular ejection fraction 4-6 months after randomization measured by magnetic resonance imaging

4.3. SECONDARY END POINTS

Changes in MRI determined left ventricular ejection fraction from 5-7 days to 4-6 months after randomization

Changes in MRI and SPECT determined infarct size from 5-7 days to 4-6 months after randomization

Change in angiographically determined left ventricular ejection fraction and hypokinetic chords from baseline (study entry) to 4-6 months after randomization

Left ventricular volumes in MRI

Binary restenosis

Incidence of death, recurrent myocardial infarction, infarct-related artery revascularization and stroke at 30 days and 6 months

It will be monitored:

Bleeding complications, need for blood transfusion and thromboembolic complications such as stent thrombosis, deep vein thrombosis or pulmonary thromboembolism.

5. STUDY DESIGN

This is a prospective, double-blind, placebo-controlled, randomized trial designed to study the effects of short-term erythropoietin (NeoRecormon®) on cardiac function in patients with STEMI undergoing PCI.

The study population will consist of 120 patients enrolled at the Deutsches Herzzentrum and the 1st Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität Munich.

5.1. INCLUSION CRITERIA

1. Patients presenting within 24 hours from the onset of symptoms, with chest pain lasting ≥ 20 minutes and with ≥ 0.1 mV of ST-segment elevation in ≥ 2 limb leads or ≥ 0.2 mV in ≥ 2 contiguous precordial leads or new left bundle branch block on surface ECG.
2. Successful primary PCI.
3. Angiographically estimated left ventricular ejection fraction $<50\%$.
4. Informed, written consent by the patient or her/his legally-authorized representative for participation in the study.
5. In women with childbearing potential a pregnancy test is obligatory.

5.2. EXCLUSION CRITERIA

1. Age ≤ 18 years and > 80 years
2. Cardiogenic shock
3. Thrombolysis for the index infarction
4. Pericarditis
5. Malignancies or other comorbid conditions (for example severe liver, renal and pancreatic disease) with life expectancy less than one year that may result in protocol non-compliance
6. Previous myocardial infarction
7. Planned staged PCI procedure within 30 days from index procedure or prior PCI within the last 30 days
8. Uncontrolled hypertension $>160/100$ mmHg unresponsive to therapy
9. Epilepsy
10. Active bleeding; bleeding diathesis; history of gastrointestinal or genitourinary bleeding, recent trauma or major surgery in the last months; history of intracranial bleeding or structural abnormalities; suspected aortic dissection; and patient's refusal to blood transfusion

11. Hematological disorders such as essential thrombocytosis, megakaryoblastic leukemia, polycythemia vera
12. Relevant hematological deviations:
 - hemoglobin < 100 g/l or hemoglobin >160 g/l
 - platelet count < 100×10^9 cells/l or platelet count > 600×10^9 cells/l
13. Any contraindication to magnetic resonance imaging:
 - electronically, magnetically, and mechanically activated implants such as cardiac pacemakers, automatic cardioverter defibrillators, joint prostheses, surgical/vascular clips, cochlear implants, neurostimulators, infusion pumps, metallic splinters in the eye, prosthetic heart valves, if dehiscence is suspected
14. Glomerular filtration rate (GFR) < 30 ml/min or serum creatinine >30 mg/l or dependence on renal dialysis
15. Chronic liver disease with GOT > 5-fold over the normal range
16. Known allergy to the study medications: erythropoietin, true anaphylaxis after prior exposure to contrast media
17. Phenylketonuria
18. Previous enrollment in this trial
19. Women who are known to be pregnant, who are of childbearing potential and test positive for pregnancy, who have given birth within the last 90 days, who are breastfeeding
20. Patient's inability to fully cooperate with the study protocol
21. Other contraindication according to the summary of product characteristics of recombinant human erythropoietin beta (NeoRecormon[®])

6. STUDY PLAN

6.1. STUDY DURATION AND TIME FRAMES

The planned duration of the study is 30 months.

Study time frames:

September 2006	Submission of study documentation to the Ethics Committee, BfArm, BOB	ISAResearch Center
December 2006	Study start date	DHM & RDI
December 2008	Last patient enrolled	DHM & RDI
July 2009	Last follow-up date	ISAResearch Center
August 2009	Data Base Closure	ISAResearch Center
September 2009	Study Completion Date	ISAResearch Center

6.2. PRE-ENROLLMENT PROCEDURES

Patients meeting the inclusion criteria and are scheduled to undergo coronary angiography, are considered candidates for participation in this study. Known anatomy or a definite planned PCI procedure is not required for pretreatment in advance of possible enrollment in the trial. Informed, written consent will be obtained for this study by the local principal investigator or his/her designee from all patients or their legally-authorized representative, prior to the performance of any protocol-specific procedure.

Per standard clinical practice, the following baseline procedures will be performed prior to randomization:

1. Targeted medical history and physical examination, including pulse, blood pressure, height and weight.
2. 12-lead ECG documenting the qualifying ischemic changes.
3. Screening laboratory tests:
 - hemoglobin, hematocrit, white blood cell count, platelet count,
 - serum creatinine, activated partial thromboplastin time (aPTT), international normalized ratio (INR),
 - GOT, GPT, α -GT, CK and its MB fraction (CK-MB), Troponin T or I.
4. Technetium 99m sestamibi scintigraphy
5. Diagnostic coronary angiography and left ventriculography according to conventional and local standards

Per standard clinical practice, the following medication will be given prior to randomization:

1. An oral loading dose of 600 mg clopidogrel
2. Aspirin 500mg intravenously
3. Heparin 5000IU as intravenous bolus, if not given or given > 2 hours before admission

All other medications such as nitrates, β -blockers, etc. will be given at the discretion of the attending physician

6.3. RANDOMIZATION

Allocation to treatment will be made by means of sealed envelopes containing a computer-generated sequence. This will be done immediately after successful primary PCI (at the cathlab). Patients who meet all of the inclusion criteria and none of the exclusion criteria will be randomized in the order that they qualify. Patients will be allocated to one of two groups (erythropoietin or placebo) in equal proportions. The two treatment groups will be studied concurrently. Time zero is defined as the time of randomization. Patients will be considered enrolled in the study and eligible for the final intention to treat analysis at the time of randomization.

6.4. STUDY DRUG AND RATIONALE OF STUDY DRUG DOSE SELECTION

Patients enrolled in REVIVAL-3 will receive $3,3 \times 10^4$ IU of recombinant human erythropoietin beta or placebo immediately, 24 hours and 48 hours after percutaneous coronary intervention, providing a cumulative dose of 10×10^4 IU for each patient. No further dose escalation is intended.

This dosage has been selected on the basis of a previous conducted controlled trial²² and an ongoing multicenter trial in patients with acute ischemic brain injury²³.

Since its first clinical use in 1985, recombinant human erythropoietin has been administered to millions of patients, many with associated serious medical conditions. Erythropoietin is one of the best-characterized and tolerated drugs with a wide therapeutic margin. Most, if not all adverse effects occur during chronic treatment with erythropoietin. For autologous blood donation the dose of recombinant human erythropoietin beta recommended in the Summary of Product Characteristics is 1.600 IU per kg bodyweight per week. Hence, an average weight patient receives 100.000 IU

weekly. The same dosage of 100.000 IU within three days has proven to be safe and well tolerated in stroke patients²². In this study, 13 patients received $3,3 \times 10^4$ IU recombinant human erythropoietin beta intravenously once daily for the first 3 days after stroke. Moreover, in a subsequent double-blind randomized trial, 40 patients received either 100.000 IU of recombinant human erythropoietin beta or saline within three days. Using this protocol, intravenous erythropoietin beta had been well tolerated and no safety concerns were identified. Importantly, with respect to the submitted protocol short-term treatment with erythropoietin did not effect hematocrit, hemoglobin, red blood cell and platelet counts. These parameters remained unchanged throughout the 30 day observation period. Short-term administration of erythropoietin in the above mentioned two studies was not associated with any changes in blood pressure or occurrence of thrombotic or thromboembolic events.

Among side effects of long-term treatment with erythropoietin, increase in blood pressure and occurrence of headaches are the most common ones, reported in up to 10% of patients receiving erythropoietin chronically with the objective to correct anemia. Since erythropoietin-induced hypertension occurs after several weeks of therapy this side effect is unlikely to occur after short-term therapy. This is further supported by studies in animals and patients^{31,32} and in a clinical trial with stroke patients²², confirming that short-term treatment with erythropoietin has no immediate effect on blood pressure. Even though not observed with short-term therapy, patients with known epilepsy and uncontrolled hypertension $>160/110$ mmHg unresponsive to therapy will be excluded from the REVIVAL-3 study.

Thrombotic and thromboembolic events have been reported as another side effect of long-term erythropoietin administration with a frequency of 1-10% in patients chronically treated for renal anemia and predominantly in patients with cancer-related anemia. However, no thrombotic and thromboembolic events were reported in two clinical trials using short-term, non-hemoglobin affecting dosing regimens^{22, 24}.

Rarely skin reactions like itching, rash or urticaria occur during erythropoietin treatment. Isolated cases of anaphylactoid reactions have been observed. In controlled clinical trials the incidence of hypersensitivity was not increased. In the REVIVAL-3 trial erythropoietin will be administrated only under medical supervision so that any occurring hypersensitive or anaphylactic reaction can be treated immediately.

Mild to moderate flu-like symptoms occur in 5% of patients on initiating erythropoietin therapy. Usually symptoms resolve spontaneously and medical treatment is seldom required.

In very rare conditions (about 200 cases worldwide) chronic treatment with erythropoietin triggers formation of erythropoietin-neutralizing antibodies, causing pure red cell aplasia (PRCA). This is not applicable for this study since first, by definition of Eckardt and Casadevall³³ the diagnosis of erythropoietin induced PRCA requires a treatment period with erythropoietin for at least three weeks to induce antibody formation. Patients enrolled in the REVIVAL-3 trial will receive short-term treatment (for 3 consecutive days), that has not been reported to induce formation of anti-erythropoietin antibodies. Second, almost all cases of erythropoietin-induced PRCA involved patients who had received chronic subcutaneous injections of erythropoietin. Intravenous administration, as intended to be used in the REVIVAL-3 trial, is unlikely to evoke an immune response. Third, in 92 percent of the reported erythropoietin-induced PRCA cases, Eprex[®], a recombinant erythropoietin alfa formulation was used. Fourth, the incidence of erythropoietin-associated PRCA decreased by more than 80% worldwide after 2001, when the subcutaneous license for erythropoietin alfa was suspended and improvements in the storage and handling were made, probably by reducing immunogenic components³⁴.

In the REVIVAL-3 trial, a similar dosing regimen that has proven to be safe in patients with stroke²² will be adopted for patients with acute myocardial infarction. A comparable regimen with darbepoetin alfa has recently been used in patients with STEMI and proven to be safe and well tolerated²⁴. Patients with ST-segment myocardial infarction presenting within 24 hours after the onset of symptoms and undergoing percutaneous coronary intervention were randomized to receive an intravenous injection of long-acting analogue darbepoetin alfa or no additional medication. The dose of darbepoetin in this study was chosen on the basis of 100.000 IU short-acting recombinant human erythropoietin beta used for stroke patients²². To achieve similar plasma levels with the long-acting analogue, a 40% lower dose was chosen and patients received just one high-dose instead of three infusions. Finally, the measured erythropoietin serum levels (4.000–6.000 IU/l) were similar in both trials^{22,24}. No hypertensive, thrombotic, thromboembolic or other serious adverse events were observed during follow-up.

Based on the well established and defined safety profile of erythropoietin in clinical practice no specific adverse events are to be expected in this study using a short-term

treatment strategy. Contrarily, the current available experimental and clinical data suggest that the proposed study is likely to be beneficial in the therapy of acute myocardial infarction.

6.5. STUDY DRUG PREPARATION

Study drugs will be prepared in the pharmacy as explained in appendix 6. Vials with an identical appearance will be used for this purpose. Sealed envelopes will contain the treatment code and will be numbered sequentially on the basis of a computer-generated randomization list. Under no circumstances may the study treatment be unblinded to the investigators unless a serious complication occurs after assignment and enrollment in the study requiring unblinding and emergency treatment.

6.6. PERI- AND POST-INTERVENTIONAL THERAPY AND MANAGEMENT

6.6.1. Peri-interventionally

Immediately after the decision to perform the intervention, patients will be given 500 mg aspirin intravenously (if they did not receive it within the prior 12 hours). The doses of heparin will be 60 UI (in case of additional abciximab) – 140 UI /kg of body weight. Abciximab (0.25 mg/kg of body weight bolus, followed by a 0.125 µg/kg per minute [maximum, 10 µg/min] infusion for 12 hours), will be given at the discretion of the attending physician.

6.6.2. Study drug administration

Immediately after successful primary PCI, randomization is performed at the cathlab between erythropoietin (NeoRecormon[®], La Roche, Basel) and placebo.

Erythropoietin will be given at a dosage of $3,3 \times 10^4$ IU in 50ml 0,9% NaCl over 30 minutes. Similarly placebo will be given as an intravenous infusion of 50ml 0,9% NaCl over 30 minutes. Double blinding will be maintained by using a dummy technique consisting of identical erythropoietin and placebo vials. Repeated intravenous infusion of erythropoietin ($3,3 \times 10^4$ IU/ 50ml infusion over 30 minutes) or placebo will be given 24 and 48 hours after PCI.

6.6.3. Post-interventionally

Sheath should be removed and manual compression applied if ACT or aPTT have fallen below 175 seconds or 50 seconds, respectively. After the intervention, all patients will receive 100-200 mg/day aspirin indefinitely, clopidogrel 75-150 mg for the first 3 days (or until discharge) followed by 75 mg/day for at least 6 months and other cardiac medications according to the judgment of patient's physician (e.g. β -blockers, ACE-inhibitors, statins etc).

6.7. DISCONTINUATION OF THE STUDY DRUG

Study drug should be discontinued in case of:

1. hemodynamic instability (systolic blood pressure <80mmHg systolic, unresponsive to fluids or necessitating the infusion of catecholamines)
2. increase in hemoglobin concentration >160 g/l
3. increase in platelet count > 600×10^9 cells/l
4. anaphylaxis or hypersensitivity to the study drug
5. thrombotic or thromboembolic events.

The reason for discontinuation of the study treatment and the exact duration of the infusion of study drug should be reported on the electronic Case Report Forms (eCRF). These complications should be treated according to local standards and the type of treatment should also be reported on the Adverse Event Form (AEF).

6.8. FOLLOW-UP PROTOCOL

6.8.1. LABORATORY EVALUATION

ACT or aPTT: Blood samples should be drawn post-procedurally to guide the timing of sheath removal.

Cardiac enzymes: Blood samples will be drawn every 8 hours for the first 24 hours after randomization and daily afterwards for the determination of CK, CK-MB, Troponin T or I. After the first 24 hours, cardiac markers are to be assessed more frequently if there is suspicion of recurrent ischemic event.

Hemoglobin, Hematokrit, Red Blood Cell Count, White Blood Count, Platelets: will be analyzed daily after randomization until discharge.

Liver Function Test: GOT, GPT and γ -GT will be analyzed daily after randomization until discharge.

Renal Function Test: serum creatinine will be analyzed daily after randomization until discharge.

Systemic inflammatory reaction: C-reactive protein will be analyzed daily after randomization until discharge.

6.8.2. CLINICAL MONITORING

All patients will be evaluated at the following time points:

(see also Appendix 3 study schedule assessment)

In-hospital: Patients will be monitored clinically.

1 month: Patients will be contacted by phone or office visit.

4-6 months: Patients will be scheduled for MRI and SPECT. In case of refusal they will be contacted by phone. Coronary angiography at 4-6 months is encouraged.

Patients will be monitored throughout the 6-months study period for the occurrence of the following clinical events: death, recurrent MI, ischemia-driven coronary revascularization consisting of either PCI or coronary artery bypass graft surgery (CABG) and stroke. Also, they will be monitored for the occurrence of in-hospital bleeding, thrombocytopenia, thrombotic or thromboembolic events or need for blood transfusion.

Adverse events will be evaluated by the local principal investigator and recorded on electronic CRF. Every event will be monitored until it is adequately resolved or explained. The local principal investigator will evaluate causality and expectancy of the event. The AEF must be documented on the Electronic Database of the Coordinating Center (ISAResearch Center) within 24 hours of knowledge of the event. Suspected Unexpected Severe Adverse Events (SUSAR) will be reported within 7 days (or 15 days at long-term follow-up) to the responsible authorities (BfARM; EC and BOB)

6.8.3. IMAGING

A resting technetium-99m (Tc-99m) sestamibi single photon emission computed tomography (SPECT) study will be performed immediately after as well as 5-7 days and 4-6 months after randomization according to standard care of patients with acute myocardial infarction. Detailed description of the methods that will be used to measure infarct size as a percentage of the left ventricle has been done previously³⁶.

MRI will be performed immediately after (if possible) as well as 5-7 days and 4-6 months after randomization in supine position with a 1.5-T clinical scanner (Siemens Sonata; Erlangen, Germany) equipped with a dedicated cardiac phased-array surface coil. All images will be obtained during repeated breath-holds and will be gated to the ECG. Cine images of the entire left ventricle will be acquired in contiguous short-axis views using a gradient-echo MR sequence with a slice thickness of 8 mm. A gadolinium-based contrast agent (gadolinium-diethylene-triamine-pentaacetic acid; Gd-DTPA, Magnevist[®], Schering-AG, Germany) will be administered intravenously at a dose of 0.2 mmol / kilogram of body weight. After 20 minutes, contrast-enhanced T1 weighted images will be acquired in contiguous short-axis views of the entire left ventricle with the use of a three-dimensional segmented inversion-recovery fast low-angle shot pulse sequence with a slice thickness of 8 mm. The inversion time will be individually chosen to null normal myocardium. Contrast-enhanced MR imaging will be analyzed in random order by an experienced observer who will be unaware of the patient's identity and treatment. Epi- and endocardial contours will be outlined on all short-axis images to calculate the total myocardial volume. Myocardial contrast enhancement will be manually traced to determine the infarct volume. Myocardial infarct size will be

quantified in percent of the left ventricle by dividing the myocardial enhancement volume by the total myocardial volume. To determine the ejection fraction (EF), a second observer who is blinded to the treatment and unaware of the results of contrast-enhanced MRI will outline the left ventricular borders on the short-axis cine images. EF will be calculated by subtracting the volume at end systole from the volume at end diastole divided by the volume at end diastole.

The angiographic analysis will measure restenosis rate and angiographic EF as described³⁶.

All studies will be processed and measured in the Scintigraphic Core Laboratory, the Magnetic Resonance Imaging Core Laboratory and the Quantitative Coronary Angiography (QCA) Core Laboratory by experienced operators who are unaware of the assigned therapy.

6.8.4. TRIAL DISCONTINUATION

All patients enrolled will be followed up clinically for 6 months. In the case of more than expected thromboembolic complications the Steering Committee can decide premature discontinuation of the trial.

6.8.5. PATIENT WITHDRAWAL

Patients have the right to discontinue study participation at any time. In such a case, the patient is still enrolled in the study but the study specific procedures and follow-ups won't be performed.

7. MONITORING OF TRIAL SAFETY

Events will be assessed by the principal investigator and evaluated by two members of the Event Adjudication Committee (EAC) blinded to the patient's allocation. Because of the small sample size of the study, no interim analysis will be performed. In case the EAC will notice an increase in thrombotic complications (in STOPAMI and BRAVE trials the combined incidence of death, reinfarction and stroke at 6 months was 4.7 to 8.5%) the DSMB will be unblinded to treatment allocation and may recommend to stop the trial in case of a disadvantage of the erythropoietin group.

8. STATISTICAL CONSIDERATIONS

8.1. ENDPOINTS

8.1.1. PRIMARY ENDPOINT

The primary endpoint is left ventricular ejection fraction at 4-6 months after randomization measured by MRI.

8.1.2. SECONDARY ENDPOINTS

Changes in MRI determined left ventricular ejection fraction from 5-7 days to 4-6 months after randomization

Changes in MRI and SPECT determined infarct size from 5-7 days to 4-6 months after randomization

Change in angiographically determined left ventricular ejection fraction and hypokinetic chords from baseline (study entry) to 4-6 months after randomization

Left ventricular volumes in MRI

Binary restenosis

Incidence of death, recurrent myocardial infarction, infarct-related artery revascularization and stroke at 30 days and 6 months

It will be monitored:

Bleeding complications, need for blood transfusion and thromboembolic complications such as stent thrombosis, deep vein thrombosis or pulmonary thromboembolism.

8.2. PRE-SPECIFIED SUBGROUP ANALYSIS

Analysis of the primary and secondary endpoints will be performed according to age, left ventricular ejection fraction measured by MRI and renal function.

8.3. SAMPLE SIZE ESTIMATION

A difference of 5% in MRI measured left ventricular ejection fraction is considered to be clinical relevant. At 4-6 months mean left ventricular ejection fraction of 45% ($\pm 9\%$) is expected in the placebo group, resulting in an estimate mean left ventricular ejection fraction of 50% ($\pm 9\%$) in the erythropoietin group. With a 2-

sided α level of 0.05 and power of 80%, 52 patients are required in each group. We intend to include 120 patients in order to compensate for possible missing MRI investigations and withdrawals.

8.4. ANALYSIS PLAN

Categorical variables such as demographics and medical history data will be summarized using frequencies and proportions and will be compared using the chi-square test or Fisher's exact test, as appropriate. Continuous data will be summarized using mean \pm standard deviation or median [25th, 75th percentiles] and will be compared using Student t test or nonparametric Wilcoxon rank-sum test. All tests will be two-sided and an alpha level of 0.05 will be considered statistically significant. No adjustment will be made for the primary and secondary endpoint comparisons.

All analyses will be performed after database lock (after entering the follow-up data of the last patient) in a blinded manner regarding the randomly assigned treatment and on an intention-to-treat basis. Unblinding of the study groups will be done after completion of the statistical analyses regarding the primary endpoint. All statistical analyses will be carried out with S-PLUS version 4.5 (Insightful Corp, Seattle, Wash)

9. ETHICAL ASPECTS

9.1. ETHICAL GUIDELINES

The study organizers have the overall responsibility for the conduct of the study, including assurance that the study is conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki as amended in South Africa (1996) and with the International Conference on Harmonization „Good Clinical Practices“.

The patient's name will not be noted on any of the study documents to maintain patient's confidentiality. In compliance with regulations regarding the monitoring of clinical studies it is required that investigators permit monitor and members of EAC to review the portion of patient's medical record that is directly related to the study. This shall include, but is not limited to, relevant study documentation: medical histories to verify eligibility, laboratory test results to verify transcription accuracy, treatment and diagnostic reports, admission/discharge summaries for hospital admission occurring while the patient is on the study and autopsy reports for deaths occurring during or in temporal proximity to the study.

9.2. INFORMED CONSENT

Prior to participating in the study the investigator will inform the patient orally and in writing about the scope and purpose, rights, duties and possible risks/ benefits of the study in a lay language. Patients must be informed that their records will be subject to review by study monitor and potentially also to regulatory agency representatives in an anonymized manner. Also, patients must be assured that they may withdraw from the study at any time for any reason and receive alternative conventional therapy as indicated. The patient has to authorise the release of his medical data by signing the "Patient Informed Consent form". Failure to obtain such a signed form renders the subject ineligible for the registry. A signed copy of the form must be kept on the patient's file and a signed copy must be kept on file by the investigator.

9.3. ETHICS COMMITTEE

Prior to participation in this study medical Ethics Committee approval for the protocol and informed consent form will be obtained. Until the study is completed, the Principal Investigator will advise her EC of the progress of this study, minimally, on an annual basis. Further, any amendments to the protocol, as well as associated consent from changes, will be submitted to the EC and written approval obtained prior to implementation.

10. REGULATORY CONSIDERATIONS

10.1. MONITORING OF STUDY CONDUCT

In the initial phase of the study, periodic visits between the organizers and the clinical sites will be performed to resolve any problems concerning patient recruitment, protocol compliance, and data collection.

The sponsor ensures that investigators permit monitors and members of EAC to review the portion of patient's medical record that is directly related to the study. This shall include, but is not limited to, relevant study documentation: medical histories to verify eligibility, laboratory test results to verify transcription accuracy, diagnostic and treatment reports, admission/discharge summaries for hospital admission occurring while the patient is on the study and autopsy reports for deaths occurring during or in temporal proximity to the study.

10.2. DATA COLLECTION AND TRACKING

Research coordinators (study nurses and technicians) will perform primary data collection on source-documented hospital chart reviews. Source data include all information in original records and certified copies of original records of clinical findings, observation, or other activities in the clinical trial necessary for the reconstruction and evaluation of the trial. The required data will be documented on the Case Report Forms.

The sponsor ensures that the investigators provide direct access to source data/documents for trial-related monitoring, audits, independent ethics committee review and regulatory inspections.

The sponsor verifies that each subject has consented, in writing, to direct access to his/her original medical records for trial-related monitoring, independent ethics committee review and regulatory inspections.

Any party with direct access to source data/source documents should take all reasonable precautions within the constraints of the applicable regulatory requirements to maintain the confidentiality of subject's identities and sponsor's proprietary information.

10.3. TIME WINDOWS FOR RECEIPT OF CLINICAL AND LABORATORY DATA

All clinical, laboratory and imaging data will be sent to ISAResearch Center at the Deutsches Herzzentrum Munich.

Time windows for data submission are:

Patient Screening and Tracking Form will be filled out daily.

Adverse Event Forms will be filled out within 24 hours of knowledge of the event.

Source information of events will be copied from the patient's file and send to the ISAResearch Center after the event was solved.

Angiograms, scintigrams and MR images will be sent to the Core Labs after their performance.

10.4. ADVERSE EVENTS

Adverse events will be evaluated by the local principal investigator (PI) and recorded on the CRF (Adverse Event Form – AEF). The local principal investigator also assesses the seriousness, causality, expectedness, and intensity of each adverse event. In the case of a Suspected Unexpected Serious Adverse Event (SUSAR), sponsor reports all life threatening or fatal SUSAR within 7 days and all non life threatening SUSAR within 15 days to the local Ethic Committee and the competent authorities (BfArM). Moreover, all investigators participating in the trial will be informed by the sponsor.

Adverse Event (AE) is any untoward medical occurrence in a patient administered a pharmaceutical product and which does not necessarily have to have a causal relationship with this treatment. An adverse event (AE) can therefore be any unfavorable and unintended sign (including an abnormal laboratory finding, for example), symptom, or disease temporally associated with the use of a medicinal product, whether or not considered related to the medicinal product.

Serious Adverse Event (SAE) or reaction is any untoward medical occurrence that at any dose results in death, is life-threatening, requires hospitalization or prolongation of existing hospitalization, results in persistent or significant disability/incapacity, or is a congenital anomaly/birth defect.

Suspected Unexpected Serious Adverse Reaction (SUSAR) is a suspected serious adverse reaction, which nature, severity or outcome is not consistent with information in the relevant source document(s) [in the case of the ISAR-SAFE trial the Summary of Medical Product Characteristics of clopidogrel]. Until source documents are amended, expedited reporting is required for additional occurrences of the reaction.

11. STUDY ADMINISTRATIVE STRUCTURE

11.1. STEERING COMMITTEE

The Steering Committee is responsible for overseeing the good execution and administrative progress of the protocol; will meet regularly to monitor patient accrual, compliance with the protocol and to determine policy regarding individual publications arising from data generated from this study.

Members of the **STEERING COMMITTEE** are:

Albert Schömig, MD (Chairman)

Ilka Ott, MD (Principal investigator)

Julinda Mehilli, MD.

11.2. EVENT ADJUDICATION COMMITTEE

The EAC will establish explicit rules outlining the minimum amount of data required and the algorithm followed in order to classify a clinical event. It will develop specific criteria used for the categorisation of clinical events and clinical endpoints in the study within the framework of the definitions pre-specified in this protocol. All members of the committee will be blinded to the primary results of the trial and will be blinded to the randomized treatment for any adjudicated patient. In case the EAC will notice any increase which is above the expected rate of complications in a comparable patient population (in STOPAMI and BRAVE trials the combined incidence of death, reinfarction and stroke at 6 months was 4.7 to 8.5%) the EAC will be unblinded to treatment allocation and may recommend to stop the trial in case of a result unfavouring the erythropoietin group.

Members of the **EAC** are:

D. Hall, MD (Chairman)

L. Goedel-Meinen, MD

P. Barthel, MD

11.3. OPERATION COMMITTEE

The Operation Committee is a team of Clinical Data Coordinators and of Pharmacists responsible for the day-to-day administrative management of the study. Its members will provide technical support during the use of study drug and assistance with study management issues.

11.4. IMAGING CORE LABORATORY

The MRI, Scintigraphic and QCA Core Laboratories will adjudicate imaging endpoints in accordance with the Core Laboratory guidelines.

12. PUBLICATION POLICY

Publication of primary and secondary data in a peer review is intended.

13. SUBSTUDY: PROGENITOR CELL MOBILIZATION, INFLAMMATORY AND HEMOSTATIC BIOMARKERS

This trial contains one voluntary sub-study.

13.1. BACKGROUND OF THE SUB-STUDY

The loss of cardiomyocytes during infarction results in heart failure with impaired systolic left ventricular function. Circulating progenitor cells have been shown to contribute to vasculogenesis and thereby improve myocardial function. Moreover, the release of paracrine factors by progenitor cells might contribute to neovascularization and scar remodeling³⁵. Erythropoietin was shown to mobilize these progenitor cells²⁰.

Numerous studies have established the importance of inflammation and hemostasis in the progress of coronary artery disease. Recently trials have identified linkages between elevation in inflammatory and hemostatic biomarkers and adverse ischemic events. Biomarkers providing correlation with disease severity and prognosis could offer the opportunity to identify patients at higher risk for adverse cardiac events.

Following plaque rupture, coronary thrombosis and subsequent myocardial infarction occurs. Elevation in serum hemostatic markers may reflect an inherited or acquired

propensity to thrombosis. The potential role and prognostic importance of components of the coagulation cascade in patients with ischemic coronary syndromes is still limited and deserves further investigation.

13.2. RATIONALE OF SUB-STUDY

Previous trials have shown that erythropoietin mobilizes progenitor cells²⁰. Since these progenitor cells contribute to cardiac regeneration we sought to investigate the implication of short-term erythropoietin treatment on progenitor cells mobilization and on clinical outcome. For many serum inflammatory and hemostatic markers and association with acute coronary syndrome is described. But so far only limited data exist about the effects of short-term erythropoietin treatment in acute myocardial infarction on biomarkers. In addition, the temporal stability of these biomarkers and its prognostic value has not been determined comprehensively. Treating the underlying plaque by percutaneous coronary intervention and administration of erythropoietin may alter systemic inflammatory or hemostatic biomarkers. These changes in Biomarkers may have prognostic importance in predicting either acute or chronic response in the future and in identifying patients at higher risk for recurrent adverse cardiac events.

13.3. SUB-STUDY OBJECTIVES

To determine progenitor cell mobilization by erythropoietin in patients with acute myocardial infarction undergoing PCI.

To assess time course and prognostic value of different inflammatory and hemostatic biomarkers.

13.4. SUB-STUDY DESIGN

13.4.1. OVERVIEW

The Progenitor Cell Mobilization, and Inflammatory and Hemostatic Biomarker sub-study will enroll all patients eligible for the main protocol of the REVIVAL-3 trial. Serial biomarkers will be drawn at 7 time points during the hospital phase and at the 6 month follow-up.

13.4.2. METHODS

Informed, written consent for the sub-study should be obtained from consecutive patients with clinical eligibility for the main REVIVAL-3 protocol at the same time as the main study consent.

Blood for progenitor cell characterization, inflammatory and hemostatic biomarkers will be drawn from the patients:

1. before the first infusion of erythropoietin / placebo
2. immediately after the first infusion of erythropoietin / placebo
3. 8-12 hours after the first infusion of erythropoietin/ placebo
4. before the third infusion of erythropoietin / placebo
5. immediately after the third infusion of erythropoietin / placebo
6. 8-12 hours after the third infusion of erythropoietin / placebo
7. at day 4 after PCI
8. at follow up after 4-6 months.

Fifteen ml of blood will be collected into the following tubes: 2.5 ml blood will be drawn into tubes containing EDTA (1.6 mg/ml), 7.5 ml blood will be drawn in tubes for serum generation, 5 ml in Citrate (0.106mol) containing tubes. Blood samples will be transferred to the lab immediately and processed as followed:

1. Quantification of CD34+ progenitor cells will be performed from 100 µl EDTA blood using TrueCount beads, APC-anti CD45, FITC-anti CD34 and PE-anti CD133 using a FACS Calibur (Becton and Dickinson) according to standardized procedures. Moreover, sub-populations of endothelial (VEGFR+) and mesenchymal (CD117+) progenitor cell populations and expression of adhesion receptors CXCR4, LFA-1, VLA-4 will be measured. Activation of circulating

leukocytes will be analyzed by surface expression of Mac-1 on CD14+ and CD15+ leukocytes.

2. Platelet activation will be measured from 50 µl citrated plasma by flow cytometry with the use of anti-CD42b, anti-CD40L and anti-PAC1 antibodies.

3. EDTA plasma, citrated plasma and serum will be frozen immediately at -80°C and stored until analysis. Systemic inflammatory changes will be analyzed from plasma samples by flow cytometric bead array for IL-6, IL-8, IL-12, IL-1beta, TNF-alpha and IL-10. SDF-1 and VEGF concentrations will be measured from EDTA plasma and circulating prothrombin fragment F1+2 will be measured from citrated plasma by immunoassay.

Tests will be performed by experienced staff in the Experimental Cardiology Department of the Deutsches Herzzentrum Munich (working group of Ilka Ott, MD). As other biomarkers become available they may also be measured and correlated with clinical outcomes. Genetic analyses will not be performed as part of this sub-study.

13.4.3. HYPOTHESIS AND STATISTICAL ANALYSIS

This sub-study is considered hypothesis generating. Therefore no formal hypothesis is prespecified, though the analysis will focus on the objectives described above. Multiple end points will be determined, including primary and secondary end points delineated in the central REVIVAL-3 trial protocol. Endpoints event rates will be related to the various biomarkers at varying time periods. Similar statistical methodology will be utilized as described for the main REVIVAL-3 protocol.

12. BIBLIOGRAPHY

[1] Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Schricke U, Neverve J, Pache J, Martinoff S, Neumann FJ, Nekolla S, Blasini R, Seyfarth M, Schwaiger M, Schomig A; Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients With Acute Myocardial Infarction (STOPAMI-2) Study. Myocardial salvage after coronary stenting plus abciximab versus fibrinolysis plus abciximab in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet*. 2002 Mar 16;359(9310):920-5

[2] Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*. 2003 Jan 4;361(9351):13-20. Review.

[3] Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M; Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003 Apr 3;348(14):1309-21

[4] Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM; Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial Investigators. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med*. 2003 Nov 13;349(20):1893-906

[5] Pache J, Kastrati A, Mehilli J, Bollwein H, Ndrepepa G, Schuhlen H, Martinoff S, Seyfarth M, Nekolla S, Dirschinger J, Schwaiger M, Schomig A. A randomized evaluation of the effects of glucose-insulin-potassium infusion on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction treated with reperfusion therapy. *Am Heart J*. 2004 Jul;148(1):e3

[6] Mehta SR, Yusuf S, Diaz R, Zhu J, Pais P, Xavier D, Paolasso E, Ahmed R, Xie C, Kazmi K, Tai J, Orlandini A, Pogue J, Liu L; CREATE-ECLA Trial Group Investigators.

Effect of glucose-insulin-potassium infusion on mortality in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial. *JAMA*. 2005 Jan 26;293(4):437-46

[7] Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschlager G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schomig A; REVIVAL-2 Investigators. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2006 Mar 1;295(9):1003-10

[8] Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1210-21

[9] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1199-209

[10] Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;253:26-32

[11] Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:643-51

[12] Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10526-31

[13] Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4044-9

[14] Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest*. 2003;112:999-1007

[15] Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV, El-Sherif N. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308:990-4

[16] Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004;279:20655-62

[17] Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:473-9

[18] van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, de Boer RA, Suurmeijer AJ, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. Erythropoietin improves left ventricular function and coronary flow in an experimental model of ischemia-reperfusion injury. *Eur J Heart Fail*. 2004;6:853-9

[19] Cai Z, Semenza GL. Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2004;109:2050-3

[20] Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003;102:1340-6

[21] Ribatti D, Presta M, Vacca A. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res.* 2002;64:326-33

[22] Ehrenreich H, Hasselblat M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel S, Rustenbeck H, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, R  ther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel T, De Ryck M, Itri LM, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren A. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular Medicine.* 2002;8:495-505

[23] Ehrenreich H, Timner W, Siren AL. A novel role for an established player: anemia drug erythropoietin for the treatment of cerebral hypoxia/ischemia. *Transfus Apher Sci.* 2004;31:39-44

[24] Lipsic E, van der Meer P, Voors A, van den Heuvel F, de Boer H, van Zonneveld A, Schoemaker R, van Gilst W, Zijlstra F, van Vedhuisen D. A single bolus of a long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alfa in patients with acute myocardial infarction: a randomized feasibility and safety study. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2006

[25] Hurst W. *The Heart, Arteries and Veins.* 10th edition New York, NY: McGraw-Hill; 2001

[26] Fath-Ordoubadi F, Beatt KJ. Glucose-insulinpotassium therapy for treatment of acute myocardial infarction: an overview of randomized placebo-controlled trials. *Circulation.* 1997;96:1152-1156

[27] David P. Faxon, Raymond J. Gibbons, Nicolas A. F. Chronos, MD,† Paul A. Gurbel, MD, Florence Sheehan, The Effect of Blockade of the CD11/CD18 Integrin Receptor on Infarct Size in Patients With Acute Myocardial Infarction Treated With Direct Angioplasty: The Results of the HALT-MI Study. *JACC* 2002

[28] Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897-901

[29] Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668-73

[30] Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOW transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*. 2006 Mar 14;113(10):1287-94

[31] Hon G, Vaziri ND, Kaupke CJ, Tehranzadeh A, Barton CH. Lack of fast-acting effect of erythropoietin on arterial blood pressure and endothelin level. *Artif Org* 1995; 19: 188-191.

[32] Vaziri ND, Zhou XJ, Smith J, Oveisi F, Baldwin K, Purdy RE. In vivo and in vitro pressor effects of erythropoietin in rats. *Am J Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 1995; 269: F838-F845

[33] Eckardt KU and Nicole Casadevall N. Pure red-cell aplasia due to anti-erythropoietin antibodies. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18: 865–869

[34] Bennett CL, Luminari S, Nissenson AR, Tallman MS, Klinge SA, McWilliams N, McKoy JM, Kim B, Lyons EA, Trifilio SM, Raisch DW, Evens AM, Kuzel TM, Schumock GT, Belknap SM, Locatelli F, Rossert J, Casadevall N.: Pure red-cell aplasia and epoetin therapy. *N Engl J Med*. 2004 Sep 30;351(14):1403-8

[35] Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S.: Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005 Mar;45(3):321-5

[36] Schomig A, Kastrati A, Dirschinger J, Mehilli J, Schricke U, Pache J, Martinoff S, Neumann FJ, Schwaiger M. Coronary stenting plus platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000 Aug 10;343(6):385-91

APPENDIX 1 DEFINITIONS

DEATH:

During the trial it will be monitored death from any cause. In addition, the cause of death will be adjudicated.

ACUTE ST-SEGMENT ELEVATION MYOCARDIAL INFARCTION AT ENROLMENT:

Must fulfil the following criteria 1 AND 2 OR 3 while awaiting the return of cardiac markers

1. Typical chest pain (lasting ≥ 20 minutes) before admission

AND

2. New or presumably new ST-segment elevation ≥ 0.1 mV in ≥ 2 limb leads or ≥ 0.2 mV in ≥ 2 contiguous precordial ECG leads

OR

3. New or presumably new left bundle-branch block.

RECURRENT MYOCARDIAL INFARCTION

Diagnosis of recurrent infarction is based on the following criteria:

In case the biomarkers of the index MI are still increasing or peak not reached the patients had to have both new ECG changes consistent with MI (new or re-elevation of ST-segments ≥ 0.2 mV in ≥ 2 contiguous precordial leads or ≥ 0.1 mV in ≥ 2 adjacent limb ECG leads or development of new, abnormal Q-waves considered to be distinct from the evolution of the index MI) and recurrent ischemic discomfort lasting more than 20 minutes at rest or ischemia-triggered hemodynamic instability;

in case of falling but still above the upper limit of normal (ULN) biomarkers of the index MI the patients had to have either an increase of CK-MB (CK) $\geq 50\%$ over the nadir level or new ECG changes consistent with MI (see above); in case the biomarkers of the index MI were normalized the patients had to have a new increase of CKMB (CK) ≥ 3 times the ULN.

STENT THROMBOSIS:

Definite stent thrombosis:

presence of an acute coronary syndrome with angiographic or autopsy evidence of thrombus or occlusion

Probable stent thrombosis:

unexplained death within 30 days after the procedure or acute myocardial infarction involving the target-vessel territory without angiographic confirmation.

Possible stent thrombosis:

all unexplained death occurring at least 30 days after the procedure.

Acute stent thrombosis*: Occuring within 24 hours following the index PCI

Subacute stent thrombosis*: 24 hours to 30 days following the index PCI

Late stent thrombosis: 31 to 360 days following the index PCI

Very late stent thrombosis: after 360 days following the index PCI

*Early stent thrombosis includes patients with acute and subacute stent thrombosis (0-30 days following the index PCI).

INFARCT RELATED ARTERY (IRA)

Refers to the artery that supplies the infarct region.

PERCUTANEOUS CORONARY INTERVENTION (PCI)

Refers to all interventional cardiology methods for treatment of coronary artery disease. A PCI performed to the infarct related artery is called target vessel PCI.

URGENT REVASCULARIZATION:

Any PCI or bypass surgery for recurrent ischemia that in the investigators opinion can not be delayed for more than 24 hours and is defined by the investigator as a non-elective procedure.

TARGET LESION REVASCULARIZATION:

TLR is defined as any ischemia-driven repeat PCI of the target lesion or bypass surgery of the target vessel.

TARGET VESSEL REVASCULARIZATION:

TVR as any ischemia-driven repeat PCI or bypass surgery in any lesion of the target vessel. The target vessel is one of the 3 main epicardial coronary artery or bypass graft that contains the target lesion.

MULTIVESSEL DISEASE:

Presence of angiographically significant lesions (>50% lumen narrowing) in ≥ 2 major epicardial coronary arteries.

TRANSIENT ISCHEMIC NEUROLOGICAL ATTACK:

Presence of focal neurological or retinal symptoms lasting more than 30 seconds and resolving in less than 24 hours.

STROKE:

Acute neurological event of at least 24 hours of duration, with focal signs and symptoms and without evidence supporting any alternative explanation.

Ethiology:

Hemorrhagic stroke:

including intraparenchymal, subarachnoid hemorrhage and subdural hematomas

Ischemic stroke

Unknown cause:

in which case there was no brain imaging or autopsy

Degree of severity:

Non disabling stroke:

if he or she had no sequels or only a minor deficit (with the functional status unchanged). Modified Rankin scale grade of ≤ 3 (see below)

Disabling stroke:

if at the time of hospital discharge he or she had a moderate deficit (substantial limitation of activity and capabilities) or a severe deficit (inability to live independently or work).
Modified Rankin scale grade of ≥ 4 (see below)

Modified Rankin Scale - Stroke severity assessment scale

Scale 0

No symptoms at all

Scale 1

No significant disability despite symptoms: able to carry out all usual duties and activities

Scale 2

Slight disability: unable to carry out all previous activities but able to look after own affairs without assistance

Scale 3

Moderate disability: requiring some help, but able to walk without assistance

Scale 4

Moderately severe disability: unable to walk without assistance, and unable to attend to own bodily needs without assistance

Scale 5

Severe disability: bedridden incontinent and requiring constant nursing care and attention

BLEEDING:

These include all bleeding complications occurring after randomization of the patient. Bleeding localization, amount of hemoglobin and hematocrit drop, also the number of blood units transfused (if no transfusion was done give 0) must be recorded in the Adverse Event Form.

Major bleeding:

intracranial or clinically significant overt signs of hemorrhage associated with a drop of in hemoglobin of ≥ 50 g/L or an absolute drop in hematocrit of at least 15% (when Hb nicht available) *

Minor bleeding:

observed blood loss and a drop in hemoglobin of 30 to 50 g/L (when a Hb value was not available, a fall in the hematocrit of 9 % to <15% points) if no bleeding site was identifiable, or drop of ≥ 40 g/L in hemoglobin (or $\geq 12\%$ in hematocrit)*

*To account for transfusion, hemoglobin and hematocrit measurements will be adjusted for any packed red blood cells (PRBCs) or whole blood given between baseline and post-transfusion measurements. A transfusion of one unit of blood will be assumed to result in an increase of 1 g/dl in hemoglobin (Hb) or of 3% in hematocrit (Hct).

The true change in hemoglobin or hematocrit if there has been an intervening transfusion between two blood measurements must be calculated:

$$\Delta \text{Hb} = [\text{baseline Hb} - \text{post transfusion Hb}] + [\text{number of transfused units}]$$

$$\Delta \text{Hct} = [\text{baseline Hct} - \text{post transfusion Hct}] + [\text{number of transfused units} \times 3]$$

THROMBOCYTOPENIA:

Decrease in platelet count $\leq 100 \times 10^9$ cells/l and a fall more than 25% from baseline and exclusion of pseudothrombocytopenia. The severity of thrombocytopenia and the number of platelet units transfused (if no transfusion was done give 0) must be recorded. Also, the date and time in which the nadir of platelet count develops must be recorded. A decrease in platelet count $< 20 \times 10^9$ /l is considered *profound thrombocytopenia*.

ACCESS SITE COMPLICATION:

Vascular complications such as hematoma requiring transfusion, surgical repair or prolonged hospitalization, pseudoaneurysm and arteriovenous fistula should be recorded.

NYHA CLASSIFICATION OF HEART FAILURE*Class I*

No limitation of activities; patients suffer no symptoms from ordinary activities.

Class II

Slight, mild limitation of activity; patients are comfortable with rest or with mild exertion.

Class III

Marked limitation of activity; patients are comfortable only at rest.

Class IV

Patients who should be at complete rest, confined to bed or chair; any physical activity brings on discomfort and symptoms occur at rest.

SMOKING STATUS:

Smoker: regular cigarette smoking in the prior 6 months.

Nonsmoker: no regularly cigarettes smoking at any time (according to WHO also former smoker that quit smoking for at least 10 years).

Former smoker: those who had quit smoking at least 6 months before the index PCI.

Quitter: the one who permanently quit smoking immediately after the index PCI.

Persistent smoker: the one who smoked before and after the index PCI.

DIABETES MELLITUS:

Active treatment with insulin or an oral hypoglycemic agent at admission.

Patients diagnosed with diabetes who are on dietary therapy alone, documentation of an abnormal fasting blood glucose or glucose tolerance test based on the World Health Organization criteria is required.

FAMILY HISTORY OF CAD:

Angina pectoris, myocardial infarction, or sudden abrupt death without obvious cause, before the age of 55 in a first-degree blood male relative (parent, sibling, or children related by blood) or before the age of 65 in a first-degree blood female relative.

HISTORY OF HYPERCHOLESTEROLEMIA:

Patients with any one of the following:

1. Prior total cholesterol > 240 mg/dl
2. Prior treatment with a lipid lowering agent

REFERENCES:

1. The TIMI Study Group. Definitions used in TIMI trials. Available at: <http://www.timi.org>. Accessed November 22, 2004.
2. Campeau, L., *Letter: Grading of angina pectoris*. *Circulation*, 1976; **54**(3): 522-3.
3. Bonita, R. and R. Beaglehole, *Recovery of motor function after stroke*. *Stroke*, 1988; **19**(12): 1497-500.
4. Hasdai D, Garratt KN, Grill DE, Lerman A, Holmes DR Jr. *Effect of smoking status on the long-term outcome after successful percutaneous coronary revascularization*. *NEJM* 1997; **336**(11): 755-61.
5. The EPISTENT Investigators. *Randomized placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade*. *Lancet* 1998; **352**: 87-92.

9.1 APPENDIX 2 SAMPLE INFORMED CONSENT

9.1.1.1 Patienteninformation zur Studie

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

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

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

Gibt es zusätzliche Behandlungsmöglichkeiten?

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

Welche Behandlungsmöglichkeiten schlagen wir Ihnen vor?

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

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

oder

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

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

Wie gestaltet sich der Behandlungs- und Untersuchungsablauf?

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

Hat die Festlegung der Therapie Nachteile für mich?

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

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

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

Versicherungsbestimmungen:

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

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

9.1.1.2 Einverständniserklärung

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

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

Einwilligungserklärung zum Datenschutz (gemäß Arzneimittelgesetz)

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

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

München, den _____

—
Unterschrift des Patienten

Unterschrift des aufklärenden Arztes

Einwilligung zur Aufzeichnung persönlicher Daten

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

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

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

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

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

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

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

3) Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist unwiderruflich. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der klinischen

Prüfung beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten ohne Namensnennung weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um

- a) Wirkungen des zu prüfenden Arzneimittels festzustellen
- b) sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden
- c) der Pflicht zur Vorlage vollständiger Zulassungsunterlagen zu genügen.

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

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

Datum

Name

Unterschrift

Patienteninformation

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

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

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

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgt in pseudonymisierter Form entsprechend den Datenschutzvorschriften. Die Gewinnung der Daten erfolgt ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken. Die Teilnahme an der Studie ist

Einverständniserklärung

zur Aufbewahrung und Analyse von entnommenen Blutproben zum
Zwecke der Wissenschaft

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

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

Datum

Name

Unterschrift

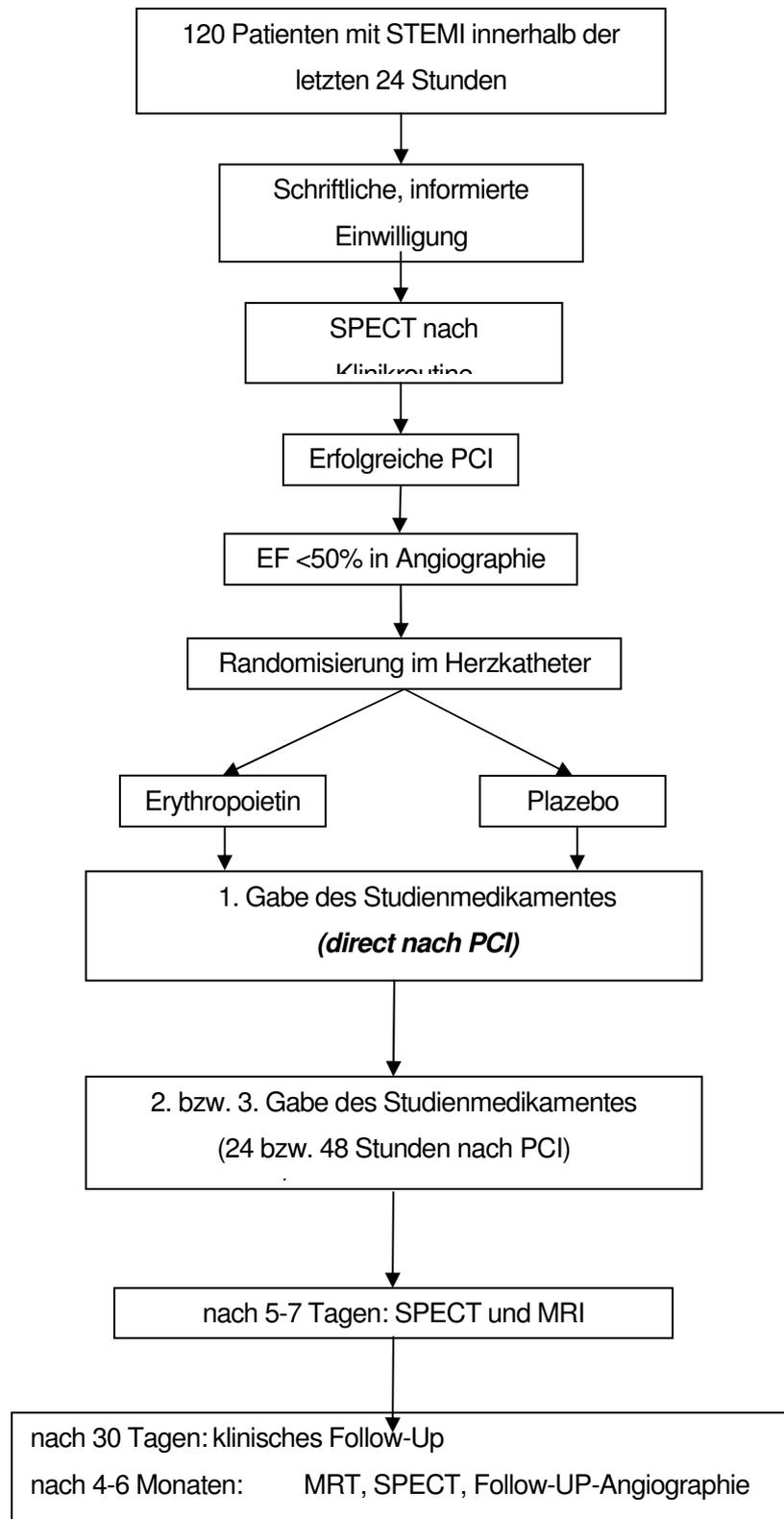
APPENDIX 3 STUDY SCHEDULE ASSESSMENT

PROCEDURES	Pre-randomization	Randomization	Post-randomization	After 8 hours	After 16 hours	After 24 hours	After 48 hours	After 56-60 hours	After 72 hours	After 4 days	Each day until discharge	5-7 days after randomization	Discharge	30 days (\pm 7 days)	4-6 months (\pm 14 days)
Demographic data															
ECG (<i>also for all ischemic events</i>)															
Troponin, CK, CK-MB ¹															
Patient informed consent															
Hemoglobin, Hematocrit, Red blood count, White blood count, Platelets															
Progenitor cell mobilisation, Biomarkers ²							³								
Creatinine, GOT, GPT, γ -GT, CRP															
Percutaneous coronary intervention															
Concomitant medication															
SPECT (<i>encouraged</i>)															
MRI															
Follow-up coronary angiography (<i>encouraged</i>)															
Adverse events monitoring															

¹ more often if suspicion for recurrent ischemic event

² see substudy in the protocol

³ blood for the sub-study will be drawn before and after the third infusion after 48 hours.

APPENDIX 4 STUDY FLOW CHART

APPENDIX 5 TRANSFUSION GUIDELINES

BLOOD TRANSFUSION GUIDELINES

The following recommendations are in accordance with the American College of Physicians Clinical Guideline: practice Strategies for Elective Red Blood Cell Transfusion (1992)

Transfusion in asymptomatic patients:

Assess the patient's intravascular volume status. Normovolemic anemia (hemoglobin 70 to 100 g/l) can be well tolerated in asymptomatic patients.

Restore adequately the intravascular volume of patients with crystalloids.

In asymptomatic, normovolemic patients with anemia who are at risk (*risk for myocardial ischemia, coronary artery disease, valvular heart disease, congestive heart failure, risk for cerebral ischemia, history of TIA, previous thrombotic stroke*), transfusion is not indicated unless the patient develops symptoms.

In the absence of risk, transfusion is not indicated, independent of hemoglobin level.

Transfusion symptomatic patients:

Use crystalloids to replace intravascular volume.

If symptoms (*syncope, dyspnea, postural hypotension, tachycardia, angina, TIA*) persist after volume repletion, the patient should receive transfusion(s) with autologous or homologous blood.

The patient should receive transfusion(s) on a unit-by-unit basis to relieve symptoms.

Remember: One unit may be sufficient.

PLATELET TRANSFUSION GUIDELINES

Discontinue study medication therapy

Transfusion of platelets should be considered for patients with profound thrombocytopenia (platelet count $< 20 \times 10^9$ cells/l)

Patients should be evaluated on an individual basis and the threshold below which to transfuse should be higher for patients with bleeding complications, those with other active medical problems such as fever, and those scheduled to undergo surgery.

Discontinue other possible offending medication (heparin etc.)

Continue aspirin and clopidogrel as appropriate, and consider discontinuation of clopidogrel only if there is a high suspicion for thrombocytopenia to be its consequence

Bed rest to avoid falls

Use stool softeners

Avoid intramuscular injection

Platelet counts every 12 hours until condition improves.

APPENDIX 6: STUDY DRUGS PREPARATION

Preparation of the study drugs for the clinical trial “Erythropoietin vs. placebo in patients with STEMI undergoing PCI”

The pharmacy provides for the patients

either a packet with

1 vial in aluminum foil: NeoRecormon® Multidose 100.000 I.E. powder (Epoietin beta)

1 vial: 5 ml preserved solvent (the solution in the ampoule of the original product is decanted in the vial)

1 reconstitution and withdrawal system

or a packet with

1 vial in aluminum foil: empty vial = placebo of NeoRecormon®

1 vial: NaCl 0,9 % 5 ml

1 reconstitution and withdrawal system

Label for the packets (plastic bags):

Medikation für die REVIVAL-3 Studie	Zur klinischen Prüfung bestimmt!
Randomisationsnummer :	
1 Injektionsflasche in Aluminiumfolie NeoRecormon® Multidose 100.000 I.E. Pulver (Epoietin beta) oder Placebo	
1 Injektionsflasche mit konserviertem Lösungsmittel (Benzylalkohol 4 mg/ml und 0,02 mg/ml Benzalkoniumchlorid in	
5ml Wasser für Injektionszwecke) oder Placebo (NaCl 0,9% 5 ml)	
1 Rekonstitutions- und Entnahmesystem	
Zubereitung :	
Gesamtes Lösungsmittel aus dem Vial aufziehen und mittels beigefügtem System in die Flasche mit Alufolie überführen.	
5 Minuten warten! Lösung dabei leicht schwenken. Nicht schütteln!	
Erst dann die Alufolie entfernen und Lösung auf Klarheit prüfen! Nur farblose u. partikelfreie Lösungen verwenden!	
Die erste Dosis 33.333.I.E. = 1,66 ml entnehmen, Rest mit Auflösdatum versehen und bei 2 - 8°C für die nächsten beiden Dosen aufbewahren (Haltbarkeit der Restlösung: 1 Monat im Kühlschrank).	
Die entnommene Dosis mit NaCl 0,9 % auf insgesamt 50 ml Perfusorlösung weiterverdünnen.	

Add 3 labels in the packets, which the nurses can use for marking the prepared solutions for perfusion of NeoRecormon® oder Placebo:

REVIVAL-3 StudiePerfusorlösung

NeoRecormon 33.333 I.E. oder Placebo

Rand.nr.....

Preparation of NeoRecormon® Multidose 100.000 I.E. (=Epoietin beta)

Use the original product from the company Roche.

Remove the plastic part of the caps. Cover the plugs with the same caps as the placebos (e.g. IVASeal III steril no. CP 3003 B, Baxa).

Cover the label with a white tape.

Wrap aluminum foil round the vials.

Label them:

<p>NeoRecormon® 100.000 I.E. (Epoietin beta) oder Placebo</p> <p>Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung</p> <p>Rand.nr.</p> <p>Ch.-B.</p> <p>Zur klinischen Prüfung bestimmt!</p> <p>Verw. bis: Monat Jahr (siehe Herstellerangabe oder, falls kürzer, wie Placebo)</p>
--

Note: The solution of NeoRecormon® must be checked for clearness. Therefore the user has to remove the aluminium foil five minutes after dissolving. So that the user can not see the original label of the manufacturer it must be covered with a white tape. To detect no difference between Epoietin and placebo the placebo vials must be covered with a white tape in the same way.

Preparation of the placebo of Epoietin beta: an empty vial

Sterilise 5ml injection vials (e.g. Zscheile & Klinger no. 24005), grey brombutyl plugs for lyophilisation (e.g. Zscheile & Klinger no. 54100) and grey flipp-off-caps (e.g. Zscheile & Klinger no. 75071).

Close the vials with the plugs and caps under laminar flow.

Remove the grey part of the caps. Cover the plugs again with IVA Seal III steril (no. CP 3003 B, Baxa).

Label the vials and cover the labels with a white tape.

Wrap aluminium foil round the vials.

Label them again:

<p>NeoRecormon® 100.000 I.E. (Epoietin beta) oder Placebo Pulver z. Herstellung einer Injektionslösung Rand.nr. Ch.-B. Zur klinischen Prüfung bestimmt! Verw. bis : Monat....Jahr.... (siehe Herstellerangabe oder, falls kürzer, wie Placebo) <small>Sponsor: Deutsches Herzzentrum München, Lazarettstr. 36, 80636 München</small></p>
--

**Preparation of the solvent of NeoRecormon® Multidose 100.000 I.E.
(=Epoietin beta)**

Used drug : solvent in the ampoules contained in the original product

Durability 18 months or like imprinted on the original ampoules if shorter

Storage at 2°C to 8°C

Package 5 ml injection vials of glass type 1 (e.g. Zscheile & Klinger no. 24005)
brombutyl plugs (e.g. Zscheile & Klinger no. 53201)
white caps (e.g. Zscheile & Klinger no. 75011)

For manufacture 70 x 5ml vials

1. Steam sterilisation (121°C / 15 minutes)

70 x 5ml injection vials

70 x brombutyl plugs

70 x flip-off –caps

2. Decanting under laminar flow

Fill the whole content of each ampoule with a sterile syringe in one of the sterilised 5 ml vials.

3. Close the vials with the plugs and flip-off-caps.

4. Test 7 vials (= 10 percent) for sterility.

5. Store 3 vials as samples in your pharmaceutical department.

6. Label them :

<p>Benzylalkohol 4 mg/ml u. 0,02 mg/ml Benzalkoniumchlorid in 5 ml Wasser für Injektionszwecke oder NaCl 0,9% 5 ml</p> <p>Lösungsmittel für NeoRecormon® 100.000 I.E. (Epoietin beta) oder Placebo</p> <p>Rand.nr.</p> <p>Ch.-B.</p> <p>Zur klinischen Prüfung bestimmt!</p>
--

Preparation of the solvent of the placebo

Used drug: sterile NaCl 0,9 % injection solution

Durability 18 months at 2°C to 8°C

Storage at 2°C to 8°C

Package 5 ml injection vials of glass type 1 (e.g. Zscheile & Klinger no. 24005)

brombutyl plugs (e.g. Zscheile & Klinger no. 53201)

white caps (e.g. Zscheile & Klinger no. 75011)

For manufacture 70 x 5 ml vials

1. Steam sterilisation (121°C / 15 minutes)

70 x 5 ml injection vials

70 x brombutyl plugs

70 x flip-off –caps

2. Bottling under laminar flow

Fill 5 ml of the NaCl solution with a sterile syringe or automatic filling equipment in each sterilised 5 ml vial.

3. Close the vials with the plugs and flip-off-caps.

4. Sterilise the filled vials (steam sterilisation 121°C / 15 minutes).

5. Test 10 vials for sterility.

6. Store 3 vials as samples in your pharmaceutical department.

7. Label them :

<p>Benzylalkohol 4 mg/ml und 0,02 mg/ml Benzalkoniumchlorid in 5 ml Wasser für Injektionszwecke oder NaCl 0,9% 5 ml Lösungsmittel für NeoRecormon® 100.000 I.E. (Epoietin beta) oder Placebo</p> <p>Rand.nr.</p> <p>Ch.-B.</p> <p>Zur klinischen Prüfung bestimmt!</p>

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Felix Mohr
Geburtsdatum und –ort	9. Januar 1984 in München
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schul- und Berufsausbildung

1994 – 2003	neusprachliches Gymnasium, Vaterstetten
2003	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
10/04 – 09/06	Studium der Humanmedizin, LMU München (Physikum 2006)
10/06 – 02/10	Studium der Humanmedizin, TU München
02/09 – 07/09	Auslandsstudium Humanmedizin, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spanien
01/10 – 05/10	1. PJ-Tertial Innere Medizin, Städtisches Klinikum Bogenhausen, München
05/10 – 09/10	2. PJ-Tertial Anästhesie, Klinikum rechts der Isar, München
09/10 – 01/11	3. PJ-Tertial Chirurgie, Städtisches Klinikum Bogenhausen, München
04/11	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/11	Approbation als Arzt
09/11 – 02/12	Assistenzarzt der Klinik für Anästhesie, Klinikum Neumarkt i. d. OPf.
seit 03/12	Assistenzarzt der Medizinischen Kliniken, Abteilung Kardiologie, Städtisches Klinikum Nürnberg

11 Danksagung

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Ilka Ott für die Überlassung des sehr spannenden Themas und die umfassende Betreuung während der Arbeit sowie bei Herrn Univ.-Prof. A. Schömig für die Durchführung der Arbeit in der Kardiologischen Klinik der Technischen Universität München sowie im Deutschen Herzzentrum München. Des Weiteren gilt mein Dank den mit der Durchführung betrauten Kollegen, insbesondere Frau Dr. Stefanie Schulz und Herrn Dr. Andreas Stein für die stets hilfsbereite und umfangreiche Begleitung während der praktischen und theoretischen Arbeiten.

Darüber hinaus will ich mich bei Frau Annette Stobbe und Frau Birgit Campbell des experimentellen Labors für Kardiologie des Deutschen Herzzentrums München für deren intensive Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten im Labor bedanken. Mein Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden, welche ebenfalls an der Durchführung der REVIVAL-3 mitgewirkt haben.

Ganz besonders will ich aber meinen Eltern Gabriele und Bernd Mohr danken, die mich nicht nur während meines Medizinstudiums immer mit voller Kraft unterstützt haben und denen ich diese Dissertation widme.