

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar / Deutsches Herzzentrum München

**Die Anzahl zirkulierender CD34+CD133+Vorläuferzellen ist assoziiert mit
dem myokardialen Salvage Index im akuten Myokardinfarkt**

Dominik Sepp

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott
	2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 21.04.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 22.07.2009 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1. Einleitung	4
1.1. Koronare Herzkrankheit	4
1.2. Myokardinfarkt	6
1.3. Entzündungsreaktion beim Myokardinfarkt	7
1.4. Zirkulierende Vorläuferzellen	8
1.4.1. Übersicht	8
1.4.2. Klassifikation von Stamm- und Vorläuferzellen	9
1.4.3. Marker von endothelialen und hämatopoetischen Vorläuferzellen	10
1.4.4. Mobilisation von Vorläuferzellen	11
1.4.5. Rekrutierung von Vorläuferzellen	12
1.4.6. Physiologische Reparaturmechanismen durch zirkulierende Vorläuferzellen	12
1.5. Zytokine	13
1.5.1. Übersicht	13
1.5.2. CCL2	14
1.5.3. Tumornekrosefaktor- α	15
1.5.4. Interleukin 1 β	15
1.5.5. Interleukin 6	16
1.5.6. Interleukin 8	16
1.5.7. Interleukin 12	17
1.5.8. Interleukin 10	17
1.5.9. CXCL10	18
1.5.10. CXCL9	18
1.5.11. Vascular endothelial growth factor (VEGF)	18
1.5.12. Stromal cell-derived factor 1	19
1.6. Myokardialer Salvage	19
2. Zielsetzung	21
3. Material und Methoden	22
3.1. Patienteneinschlusskriterien	22
3.2. Ausschlusskriterien	22
3.3. Studienprotokoll	22
3.3.1. Therapieschema	22
3.3.2. Blutabnahmeschema	23
3.4. Methoden	23
3.4.1. Durchflusszytometrie	23
3.4.2. Myokardszintigraphie	30
3.4.3. Bestimmung der Zytokine	33
3.4.4. Bestimmung weiterer Parameter	34
3.5. Statistik	34
4. Ergebnisse	35
4.1. Klinische Daten des Patientengutes	35
4.2. Zirkulierende Vorläuferzellen	37
4.3. Salvage Index	38
4.4. Gruppenvergleich „salvage high“ vs. „salvage low“	40
4.4.1. Entzündungsparameter	40
4.4.2. Herzenzyme	42
4.4.3. Zytokine	43

4.4.4.	Zirkulierende CD34+CD133+Vorläuferzellen	46
5.	Diskussion	47
5.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	47
5.2.	Zirkulierende Vorläuferzellen im akuten Myokardinfarkt.....	47
5.2.1.	Oberflächenmarker CD34 und CD133.....	47
5.2.2.	Bedeutung von zirkulierenden Vorläuferzellen im akuten Myokardinfarkt	49
5.2.3.	Wirkmechanismen der zirkulierenden Vorläuferzellen	50
5.2.4.	Rekrutierung von Vorläuferzellen.....	51
5.3.	Zytokine im akuten Myokardinfarkt	51
5.4.	Troponin T.....	53
5.5.	Studienbeschränkungen.....	54
5.6.	Schlussfolgerung	54
6.	Zusammenfassung	56
7.	Anhang	57
7.1.	Abkürzungen	57
7.2.	Abbildungsverzeichnis	58
7.3.	Tabellenverzeichnis.....	58
7.4.	Literaturverzeichnis.....	59

1. Einleitung

Herz-/Kreislaufkrankungen sind weiterhin die häufigste Todesursache in den Industrienationen bei Erwachsenen. Hierbei spielen vor allem die koronare Herzerkrankung und deren akute Komplikation, der akute Myokardinfarkt, eine vorrangige Rolle. Dank verbesserter Therapieverfahren und breiterer Versorgung sank die Sterblichkeit an koronarer Herzerkrankung in Deutschland, den USA und den meisten westeuropäischen Ländern jedoch seit Beginn der 1980er Jahre deutlich [95]. Insbesondere die immer höhere Effizienz der Wiedereröffnung von Blutgefäßen mittels perkutaner Koronarintervention (PCI) sind dafür maßgeblich verantwortlich. Die Optimierung der frühen Rekanalisierung konnte den Anteil des geretteten Myokards erhöhen und die Mortalität senken. Die dem Heilungsprozess zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Es wird vermutet, dass zirkulierende Vorläuferzellen eine wichtige Rolle im Heilungsprozess spielen können, da sie Angiogenese, Vaskulogenese und Reendothelialisierung stimulieren [72]. Vorläuferzellen sind Abkömmlinge adulter Stammzellen und werden im akuten Myokardinfarkt aus dem Knochenmark mobilisiert [134]. Tierexperimentell wurden nach einem Myokardinfarkt endotheliale Vorläuferzellen an den Grenzen des Infarktareals nachgewiesen [7]. Über deren Wirkungsweise sowie deren Beeinflussung des Heilungsprozesses im Myokardinfarkt ist bisher wenig bekannt.

Des Weiteren ist die Entzündungsreaktion von großer Bedeutung für den Heilungsprozess. Versuche die Entzündungsreaktion mit Kortison nach einem Myokardinfarkt zu supprimieren endeten mit katastrophalen Ergebnissen aufgrund deutlich vergrößerter Infarktareale [119]. Im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es zur Ausschüttung zahlreicher Zytokine, deren Zusammenspiel für die Steuerung des zeitlichen Ablaufes der Entzündungsreaktion wichtig ist.

Eine genauere Kenntnis der nach einem Myokardinfarkt ablaufenden Prozesse könnte letztendlich neue Therapieoptionen möglich machen.

1.1. Koronare Herzkrankheit

Verschiedene Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit (KHK) sind bereits bekannt: zum einen konstitutionelle Faktoren wie genetische Disposition, Lebensalter und Geschlecht, zum anderen beeinflussbare Faktoren wie Hypercholesterinämie, Rauchen, arterielle

Hypertonie und Diabetes mellitus. Die Erforschung weiterer Risikofaktoren ist die Grundlage vieler aktueller Studien.

Bei der KHK bestehen atherosklerotische Veränderungen der Koronararterien. Atherosklerose entsteht über den Zeitraum von vielen Jahren. Das Fortschreiten der Atherosklerose ist ein diskontinuierlicher Prozess. Anfänglich bilden sich Lipideinlagerungen in die Intima media, die einen inflammatorischen Stimulus darstellen [93]. Die betroffenen Endothelzellen reagieren indem sie Adhäsionsmoleküle exprimieren, die die Leukodiapedese in die Gefäßwand ermöglichen. Monozyten differenzieren zu Makrophagen, aus denen sogenannte Schaumzellen entstehen, die mit Lipiden überladen sind. Dabei spielen „scavenger“-Rezeptoren eine wichtige Rolle, über welche Makrophagen oxidiertes LDL ungehemmt und konzentrationsunabhängig aufnehmen und speichern können. Die so entstandene Läsion wird auch „fatty streak“ genannt. Durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen kommt es zu einer weiteren Steigerung der Entzündungsreaktion sowie zu einer Proliferation der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand [149]. Unter anderen induzieren Interleukin-1 und Tumor-Nekrose-Faktor- α die lokale Produktion von Wachstumsfaktoren, die für die Entstehung der atherosklerotischen Plaque und die damit zusammenhängenden Komplikationen entscheidend ist. Demgegenüber inhibieren andere Zytokine wie z.B. Interferon- γ die Proliferation von glatten Muskelzellen. Es folgt ein Gewebeumbau bei dem eine Plaque mit fibröser Deckplatte und Lipidkern entsteht. Die atherosklerotische Läsion enthält Zytokine, die insbesondere die Th1-Antwort fördern [53]. Die aktivierten T-Zellen differenzieren daher vor allem zu Th1-Zellen, die wiederum das Makrophagen-aktivierende Zytokin Interferon- γ bilden. Dies löst eine Kaskade von proinflammatorischen Reaktionen aus, die das Fortschreiten der Atherogenese weiter begünstigen [141]. Das Einsprossen von Gefäßen aus den Vasa vasorum der Arterie kann zu weiteren Komplikationen führen. Zum einen können Leukozyten und Zytokine vermehrt in die Plaque gelangen und damit die Entzündungsreaktion weiter verstärken. Zum anderen besteht die Gefahr einer Einblutung in die Plaque sowie eines durch die Gefäßeinsprossung erhöhten Risikos für eine Plaqueruptur [33]. Bei einer Plaqueruptur kommt es durch die thrombogene Potenz des Plaqueinhalts zu einer Thrombozytenaktivierung mit nachfolgender Thrombose und somit zu einem partiellen oder kompletten Gefäßverschluss, der an den Koronargefäßen zu einem akuten Koronarsyndroms führen kann.

Symptome treten gewöhnlich erst dann auf, wenn die Atherosklerose zu einer Perfusionsstörung führt, die ein Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot verursacht. Physiologischerweise passen sich die Koronarien durch Dilatation dem

vermehrten Sauerstoffbedarf des Myokards an. Das geschädigte Endothel bei Atherosklerose führt jedoch zu Regulationsstörungen der Vasodilatation. Dafür ist unter anderem die unzureichende Produktion von NO (Stickoxid) ursächlich.

Nicht nur das Ausmaß des durch Atherosklerose reduzierten Lumens der Koronarien kann zu einem Missverhältnis führen. Auch vermehrter Sauerstoffbedarf des Myokards wie bei ausgeprägter linksventrikulärer Hypertrophie (z.B. bei Aortenstenose) oder vermindertes Sauerstoffangebot des Blutes bei schwerer Anämie können ein Sauerstoffdefizit mit entsprechender Symptomatik verursachen.

Die KHK kann zu folgenden klinischen Manifestationen führen: Stabile Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen, plötzlicher Herztod, ischämische Kardiomyopathie und dem akuten Koronarsyndrom, das die instabile Angina pectoris sowie den Myokardinfarkt zusammenfasst.

1.2. Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt ist die Folge einer plötzlichen Perfusionsminderung des Myokards nach thrombotischem Verschluss einer Koronararterie. Dies geschieht weniger durch eine sich langsam entwickelnde Atherosklerose einer Koronararterie sondern durch Fissur, Ruptur oder Ulzeration einer atherosklerotischen Plaque. Diese Gefäßverletzung verursacht über die Aktivierung der Thrombozyten die Bildung eines Thrombus und damit einen Gefäßverschluss. Verschiedene Faktoren können zu einer Plaqueruptur führen. Zum einen kann die Lipidanreicherung der Plaque zu einer Destabilisierung der fibrösen Deckplatte („cap“) führen. Zum anderen produzieren die eingewanderten Makrophagen und T-Zellen proinflammatorische Zytokine und Proteasen, die das Kollagen des fibrösen „caps“ degradieren und die Bildung einer stabilen Plaque verhindern können [2, 64, 65, 155].

Seltener können auch der embolische Verschluss einer Koronararterie, ein Gefäßspasmus, Gefäßmissbildungen oder entzündliche Gefäßerkrankungen zu einem Myokardinfarkt führen.

Das Ausmaß des durch den Gefäßverschluss entstandenen Myokardschadens hängt von der Lokalisation des Verschlusses, dem Grad und der Dauer des Verschlusses, dem Vorhandensein von Kollateralarterien und dem Sauerstoffbedarf des betroffenen Myokards ab.

Während das zentrale Areal des Infarktes irreversibel geschädigt ist, kann das Schicksal des umgebenen Gewebes, das sogenannte „Myocardium at risk“, noch beeinflusst werden. Dabei spielt insbesondere die zeitnahe Reperfusion sowie die Reduktion des myokardialen Sauerstoffbedarfs eine Rolle. Thrombolyse und perkutane Koronarintervention (PCI) können die Wiederherstellung des Blutflusses im verschlossenen Gefäß gewährleisten. Bei ca. einem Drittel der Patienten mit Myokardinfarkt kommt es innerhalb von 24 Stunden spontan zur Wiederherstellung der normalen Perfusion. Bei dieser Patientengruppe kann die Intervention die Normalisierung der Perfusion beschleunigen und damit die Größe des Infarktes limitieren. Im Tiermodell konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Dauer des Gefäßverschlusses und dem Ausmaß der myokardialen Nekrose nachgewiesen werden [118]. Der myokardiale Zelltod beginnt 20 Minuten nach Gefäßverschluss und ist nach ca. 6 Stunden vollständig abgeschlossen. Dieses Zeitfenster kann durch gutes Notfallmanagement sowie durch unbeeinflussbare Faktoren wie vorbestehende Kollateralisierung verlängert werden.

1.3. Entzündungsreaktion beim Myokardinfarkt

Innerhalb von Minuten nach einer myokardialen Ischämie kommt es zu reversiblen Schädigungen der Kardiomyozyten. Nach 20-40 Minuten entstehen irreversible Schädigungen der Zellen, die zur Zellnekrose führen können. Dadurch wird eine Entzündungsreaktion initiiert, die durch Reperfusion des ischämischen Areals noch beschleunigt und gesteigert wird [52]. Die negativen Effekte der Entzündungsreaktion konnten in experimentellen Studien beobachtet werden, die eine schädigende Wirkung der infiltrierenden Leukozyten und der Entzündungsmediatoren auf die Kardiomyozyten zeigten. In einer tierexperimentellen Studie wurde eine verminderte Infarktgröße bei Hunden nach Gabe von Kortikosteroiden nachgewiesen [94]. Eine nachfolgende Studie, bei der Patienten mit Myokardinfarkt Methylprednisolon verabreicht wurde, zeigte katastrophale Ergebnisse mit einem deutlich vergrößerten Infarktareal [119]. Daraus wurde gefolgert, dass die Entzündungsreaktion nicht nur negative Effekte hat, sondern essentiell für die Regeneration des Gewebes ist. Zytokine werden vom infarzierten Myokard ausgeschüttet und können so die Entzündungsantwort nach einem Myokardinfarkt regulieren. Dabei scheint die Komplementaktivierung einen wichtigen Faktor für die Auslösung der Zytokinkaskade darzustellen. Die Zytokine beeinflussen sich gegenseitig sowie die Leukozytenmigration, was in der Entzündungsphase nach einem Myokardinfarkt insbesondere von großer Bedeutung für die Beseitigung der toten Zellen ist [44, 45, 47]. Diese akute lokale Entzündungsreaktion wird im weiteren Verlauf durch eine

Suppression der Zytokinsynthese beendet und geht in die Phase des fibrösen Umbaus über. Für den Rückgang der Entzündungsreaktion scheinen die Zytokine Interleukin-10 und transforming growth Factor (TGF)- β eine wichtige Rolle zu spielen [51, 85].

Das Zusammenspiel der stimulierenden und supprimierenden Faktoren ist für die Heilungsprozesse nach einem Myokardinfarkt essentiell.

Die inflammatorischen Prozesse sind jedoch nicht lokal begrenzt. Post-mortem-Untersuchungen der Koronararterien von am akuten Myokardinfarkt verstorbener Patienten zeigten nicht nur eine diffuse T-Zell-Aktivierung in den betroffenen Gefäßen sondern auch an den Gefäßen des nicht betroffenen Myokards [137]. Die systemische Immunantwort ist eine Folge der Zytokinfreisetzung. Das Zytokin Interleukin-6 induziert in der Leber die Produktion von C-reaktivem Proteins (CRP) [6]. Eine positive Korrelation zwischen CRP und der Infarkt mortalität konnte bereits nachgewiesen werden, daher hat das Ausmaß der systemischen Entzündungsreaktion eine klinische Relevanz [160].

1.4. Zirkulierende Vorläuferzellen

1.4.1. Übersicht

Die Vermehrung und Differenzierung von embryonalen Stammzellen sind die Voraussetzung für die Entstehung von Gewebe und Organen. Während der Embryonalentwicklung geht die Pluripotenz der Stammzellen verloren. Adulte Stammzellen können zu Vorläuferzellen differenzieren, die nur noch eine eingeschränkte Fähigkeit zur Replikation und Differenzierung haben.

1997 wurden erstmals zirkulierende Vorläuferzellen beschrieben, die unter experimentellen Bedingungen in der Lage waren neue Gefäße zu bilden [8].

Es konnte gezeigt werden, dass sie Vaskulogenese und Angiogenese beeinflussen und die Erneuerung von Endothel verletzter Blutgefäße stimulieren können [72]. Dadurch könnte die Mobilisation von Vorläuferzellen einen physiologischen Reparaturmechanismus des Körpers darstellen.

1.4.2. Klassifikation von Stamm- und Vorläuferzellen

Im Knochenmark sind 0,1% der Zellen Stamm- und Vorläuferzellen [150]. Die Stammzellen werden klassifiziert in hämatopoetische und nicht-hämatopoetisch bzw. mesenchymale Stammzellen.

Mesenchymale Stammzellen (MSC) können in Myozyten, Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren. Sie lassen sich von hämatopoetischen Zellen insbesondere über das Fehlen der Oberflächenmarker CD45 und CD34 unterscheiden. Aufgrund des in vitro nachgewiesenen Potentials zu proliferieren und sich in mehrere verschiedene Zelltypen zu differenzieren, werden mesenchymale Stammzellen als Teil des körpereigenen Reparaturmechanismus bei Gewebsschädigung vermutet [25]. Im Rahmen eines Myokardinfarkts konnte tierexperimentell bereits nachgewiesen werden, dass mesenchymale Stammzellen ins infarzierte Myokard rekrutiert werden [14]. Kleinere Studien an Patienten zeigten, dass die Injektion von mesenchymalen Vorläuferzellen die linksventrikuläre Funktion nach Myokardinfarkt verbessert [27].

Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen (HSC) können in alle hämatopoetische Zelllinien differenzieren. Deren Oberflächenmarker CD34 wird zur Identifizierung der HSCs angewendet und dient zur Unterscheidung gegenüber mesenchymalen Stammzellen. In mehreren Studien ergaben sich Hinweise, dass HSC auch in nicht-hämatopoetische Zellen wie Muskelzellen und Endothelzellen differenzieren können [23, 166]. 1997 gelang es Asahara et al. am Menschen zirkulierende Vorläuferzellen zu isolieren, die den HSC-Oberflächenmarker CD34 exprimieren und in der Lage waren zu Endothelzellen zu differenzieren und in vitro Gefäßstrukturen zu bilden [8].

Vorläuferzellen, die sowohl HSC-Marker wie CD34 oder CD133 als auch Endothelmarker wie VEGFR aufweisen, werden als endotheliale Vorläuferzellen angesehen. Die Definition und spezifischen Charakteristika von endothelialen Vorläuferzellen werden jedoch weiterhin kontrovers diskutiert. Zum einen können auch Stammzellen ohne HSC-Marker wie mesenchymale Stammzellen endotheliale Marker exprimieren und damit eine weitere unabhängige Population endothelialer Vorläuferzellen darstellen. Zum anderen bleibt es unklar, inwieweit endotheliale Vorläuferzellen von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu unterscheiden sind. Manche Autoren vermuten, dass EPCs und HSCs getrennte Zellpopulationen mit einem gemeinsamen Vorläufer, dem Hämangioblasten, sind [150]. Andere Autoren gehen davon aus, dass EPCs aus HSCs hervorgehen und damit eine strenge Trennung nicht möglich ist [151]. Zusätzlich wird vermutet, dass Vorläuferzellen im Verlauf der Differenzierung unterschiedliche Oberflächenmarker aufweisen.

1.4.3. Marker von endothelialen und hämatopoetischen Vorläuferzellen

Die von Asahara et al. beschriebenen Vorläuferzellen, die in der Lage waren neue Gefäße zu bilden, waren durch den Oberflächenmarker CD34 charakterisiert [8]. CD34 ist ein membranständiges Protein mit einem Molekulargewicht von 116 kD. Es wird auf Stamm- und Progenitorzellen exprimiert aber auch auf Endothelzellen [22, 42]. Die Expression von CD34 ist bei unreifen Zellen am höchsten und nimmt je weiter sich die Zellen differenzieren ab. Die Expression von CD34 auf differenzierten Endothelzellen stellt jedoch insofern ein Problem dar, da unter pathologischen Umständen wie im Myokardinfarkt Endothelzellen vermehrt im Blutkreislauf zirkulieren können [105]. Die Messung von Vorläuferzellen mittels CD34 kann damit durch CD34-positive Endothelzellen verfälscht werden. Daher sind weitere Oberflächenmarker notwendig um Vorläuferzellen eindeutig abzugrenzen.

CD133 ist ein transmembranales Glykoprotein, das auf Stammzellen und Vorläuferzellen exprimiert wird, jedoch nicht auf differenzierten Endothelzellen und Monozyten vorkommt [63]. In vitro konnte bereits gezeigt werden, dass CD133-positive Zellen in Endothelzellen differenzieren können [57]. Die Verwendung von CD133 bietet den Vorteil, dass die gesuchten Vorläuferzellen von zirkulierenden reifen Endothelzellen eindeutig unterschieden werden können. Dies ist von Bedeutung, da während eines Myokardinfarkts reife Endothelzellen vermehrt in den Blutkreislauf gelangen und damit die Untersuchungsergebnisse verfälschen könnten.

Einen weiteren Marker endothelialer Vorläuferzellen stellt der auf reifen Endothelzellen vorkommende VEGF(vascular endothelial growth factor)-Rezeptor2 dar [152].

Es wird vermutet, dass Vorläuferzellen im Laufe ihrer Reifung eine unterschiedliche Ausprägung ihrer exprimierten Antigene aufweisen. CD133+/CD34+Zellen werden als die weniger reifen Vorläuferzellen angesehen, im Vergleich zu den CD34+/VEGFR2+Zellen, die bereits einen Endothelzellmarker besitzen [62]. Die Anzahl der zirkulierenden Vorläuferzellen, die sowohl CD34, CD133 als auch VEGFR2 exprimieren, wird in der Literatur als sehr gering eingeschätzt. Peichev et al. ordneten 0,002% der zirkulierenden mononukleären Zellen als CD34+CD133+VEGFR2+Zellen ein [115].

Eine weitere Studie untersuchte Vorläuferzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Dabei wurden sowohl CD34+Zellen, CD34+CD133+Zellen und CD34+VEGFR2+Zellen analysiert. Alle drei Zellpopulationen stiegen bis Tag 4 nach Myokardinfarkt an, wobei der Anstieg der CD34+CD133+Zellen am höchsten war [62]. Dies lässt vermuten, dass

insbesondere die CD34+CD133+Zellen eine Rolle bei den Reparaturmechanismen im Myokardinfarkt spielen.

Es wird weiterhin kontrovers diskutiert, ob endotheliale Vorläuferzellen und CD34+Vorläuferzellen getrennte Populationen darstellen, oder ob endotheliale Vorläuferzellen eine Subpopulation der CD34+Vorläuferzellen sind bzw. ob endotheliale Vorläuferzellen aus CD34+hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen.

1.4.4. Mobilisation von Vorläuferzellen

Die Anzahl der zirkulierenden Vorläuferzellen wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren korreliert die Anzahl der Risikofaktoren negativ mit der Anzahl der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen [70, 158]. Eine erniedrigte Anzahl von endothelialen Vorläuferzellen wiesen auch Patienten mit präklinischen atherosklerotischen Gefäßveränderungen auf [28, 70]. Ursächlich kann zum einen eine verminderte Mobilisierung der Vorläuferzellen aus dem Knochenmark sein, zum anderen ein erhöhter Verbrauch der Vorläuferzellen durch die Gefäßschädigung. Demgegenüber werden endotheliale Vorläuferzellen bei myokardialen Ischämien wie beim akuten Koronarsyndrom verstärkt mobilisiert [134]. Dies wurde in einer weiteren Studie sowohl für Vorläuferzellen mit einem endothelialen Marker und einem HSC-Marker (VEGFR und CD34) als auch für CD34+CD133+Vorläuferzellen bestätigt [62]. Auch ein vaskuläres Trauma kann einen raschen Anstieg der zirkulierenden Vorläuferzellen auslösen [61]. Es wird vermutet, dass der Anstieg zum einen durch die Ischämie bzw. das Trauma selbst, zum anderen durch die systemische Entzündungsreaktion verursacht wird [131]. Dabei spielt die Freisetzung von Mediatoren eine große Rolle. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Zytokine wie G-CSF, GM-CSF, Interleukine wie IL-7, IL-3, IL-12, Chemokine wie IL-8, VEGF und SDF-1 sowie das Glykoprotein-Hormon Erythropoetin die Mobilisation von Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark beeinflussen können [9, 86]. Insbesondere SDF-1 und VEGF werden bei der akuten Ischämie vermehrt in den Blutkreislauf freigesetzt und können so im Knochenmark die Mobilisation von Vorläuferzellen über einen MMP-9 (Matrix Metalloproteinase-9)-abhängigen Mechanismus induzieren [68, 89, 116, 134]. Klinische Studien konnten bereits eine Erhöhung der Anzahl der zirkulierenden endothelialer Vorläuferzellen durch die Gabe von G-CSF und EPO(Erythropoietin) nachweisen [12, 67, 170]. Auch bei der Gabe von HMG-CoA-

Reduktase-Hemmern (Statinen) zeigte sich bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine vermehrte Freisetzung zirkulierender endothelialer Vorläuferzellen [157].

1.4.5. Rekrutierung von Vorläuferzellen

Aufgrund der geringen Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen ist nicht nur deren Mobilisation in den Blutkreislauf, sondern auch deren Rekrutierung zum Zielorgan, das „Homing“, von besonderer Relevanz. Zunächst werden die Vorläuferzellen an den Ort der Ischämie gelenkt, wobei SDF-1 eine wichtige Rolle zu spielen scheint [24]. In vitro konnte bereits eine Vorläuferzellmigration durch SDF-1 nachgewiesen werden [101]. Der einzige bekannte Rezeptor von SDF-1 ist CXCR4, der auf Vorläuferzellen exprimiert wird [163]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktion von SDF-1 und CXCR4 während der Embryogenese eine wichtige Funktion für die Hämatopoese, die Kardiogenese und die Entwicklung der Gefäße hat [106, 142]. Daher wird vermutet, dass die SDF-1/CXCR4-Interaktion für das Homing der Vorläuferzellen ebenfalls ausschlaggebend ist.

Bei endothelialen Vorläuferzellen kommt es letztlich zu einer Adhäsion an das Endothel, das durch Zytokine bzw. durch die Ischämie aktiviert ist, und anschließend zu einer Migration der Vorläuferzelle durch das Endothel [154]. Adhäsion und Transmigration werden durch Integrine vermittelt, insbesondere das beta2-Integrin zeigte sich im Tierversuch von essentieller Bedeutung [26].

1.4.6. Physiologische Reparaturmechanismen durch zirkulierende Vorläuferzellen

Die Mobilisation von Vorläuferzellen kann als physiologischer Reparaturmechanismus des Körpers gesehen werden.

Bisher wurde angenommen, dass die Formation neuer Blutgefäße im ischämischen Gewebe ausschließlich durch die Proliferation und Migration ortsständiger Endothelzellen vermittelt wird, im Sinne einer Angiogenese. Die Neubildung von Gefäßstrukturen, die Vaskulogenese, wurde ausschließlich in der Embryonalphase vorkommend vermutet. 1997 konnten jedoch Asahara et al. endotheliale Vorläuferzellen nachweisen, die unter experimentellen Bedingungen neue Gefäße bilden konnten [8]. Damit ergaben sich erste Hinweise, dass nicht nur die ortsständigen Zellen zur Revaskularisierung nach einer Ischämie beitragen, sondern auch im Blutkreislauf zirkulierende Vorläuferzellen eine wichtige Rolle spielen könnten

indem sie die Angiogenese beeinflussen und ausserhalb der Embryonalzeit eine Vaskulogenese ermöglichen.

Im Tierversuch wurde bei Mäusen nach einem Myokardinfarkt Knochenmarksvorläuferzellen infundiert. Es zeigte sich bei den behandelten Mäusen eine verbesserte Kontraktilität und eine kleinere Infarktnarbe. Zusätzlich konnten mittels Markierung im Infarktgewebe transdifferenzierte aus dem Knochenmark stammende Zellen nachgewiesen werden [113]. Daher wurde primär vermutet, dass die Verbesserung der Myokardfunktion über die Transdifferenzierung von Vorläuferzellen in Kardiomyozyten funktioniert. Andere Studien konnten jedoch keine Hinweise für eine Transdifferenzierung von Knochenmarkszellen in Kardiomyozyten finden [104, 109]. Auch Zellfusionen werden als Ursache diskutiert [37]. Eine weitere Möglichkeit, wie Vorläuferzellen ihre Wirkung entfalten können, ist die Ausschüttung von Zytokinen, welche die physiologischen Reparaturmechanismen verstärken. In vitro konnte nachgewiesen werden, dass endotheliale Vorläuferzellen IL-8 und VEGF freisetzen, welche eine wichtige Rolle in der Neovaskularisation spielen [131, 168].

Tierexperimentell konnte eine durch Ischämie ausgelöste Mobilisation von endothelialen Vorläuferzellen nachgewiesen werden, die im Sinne eines endogenen Reparaturmechanismus zur Neovaskularisierung und Reendothelialisierung des ischämischen Areals beitragen konnte [7, 144].

1.5. Zytokine

1.5.1. Übersicht

Zytokine sind Proteine, die eine wichtige Rolle in der Interaktion der Zellen untereinander haben. Im wesentlichen werden fünf Hauptgruppen unterschieden: Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine.

a) Interferone sind Zytokine die insbesondere antivirale, antitumoröse und immunstimulierende Wirkungen haben. Sie werden vor allem von Leukozyten, Fibroblasten und T-Lymphozyten gebildet. Zusätzlich können sie durch ihr antiproliferatives und immunmodulatorisches Potential Metabolismus, Wachstum und Differenzierung von Zellen beeinflussen. Die drei wichtigsten Interferone sind IFN-alpha, IFN-beta und IFN-gamma.

- b) Interleukine sind Peptidhormone, die der Kommunikation zwischen Leukozyten und anderen am Immunsystem beteiligten Zellen dienen. Zu diesen gehören unter anderen die in dieser Studie gemessenen Zytokine IL-6, IL-8, IL-1 β und IL-12.
- c) Koloniestimulierende Faktoren sind Wachstumsfaktoren, die verantwortlich für die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen sind. Zu diesen gehören zum einen Erythropoetin, das die Bildung von Erythrozyten anregt, zum anderen G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor), das einen Wachstumsfaktor der Leukozyten darstellt.
- d) Tumor-Nekrose-Faktoren sind Zytokine des Immunsystems, die bei lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Sie können den Zelltod, Zellproliferation und Ausschüttung anderer Zytokine regeln. Zu ihnen gehört der in dieser Studie gemessene Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) sowie Tumor-Nekrose-Faktor- β (TNF β).
- e) Chemokine sind Mediatoren die durch Chemotaxis andere Zellen veranlassen zu dem Ort der Entstehung zu wandern. Dabei bewegen sich die Zellen anhand des Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration. In dieser Studie wurden die Chemokine CCL2, CXCL9 und CXCL10 untersucht.

Zytokine vermitteln ihre Wirkung auf die Zielzellen über spezifische, membrangebundene Rezeptoren. Sie können die Produktion anderer Zytokine stimulieren oder inhibieren und die Wirkungen anderer Zytokine fördern oder antagonisieren. So bilden die Zytokine einen komplexen Regelkreis.

Zytokine weisen zum Teil eine redundante Wirkung auf. Das bedeutet, dass verschiedene Zytokine auf einer Zelle die gleiche Wirkung haben können. Dies kann vor allem dann vorkommen, wenn die unterschiedlichen Zytokinrezeptoren ähnliche Untereinheiten besitzen und sich damit die Signalübertragungswege gleichen [114]. Auf der anderen Seite sind Zytokine häufig pleiotrop, das bedeutet, dass ein Zytokin mehrere Effekte verursachen kann.

1.5.2. CCL2

Das proinflammatorische Chemokin CCL2 („chemokine (C-C motif) ligand 2“) bindet sowohl an den Rezeptor CCR2 als auch an CCR4, der auf diversen Zelltypen unter anderem auf T-Zellen, Endothelzellen und Monozyten exprimiert wird [31]. CCL2 wird auch als „monocyte chemotactic protein-1“ (MCP-1) bezeichnet. Es wirkt chemotaktisch auf Monozyten und lässt sich vor allem in den Teilen atherosklerotischer Plaques nachweisen, in denen sich Makrophagen zeigen [120, 167]. In der Gefäßwand exprimieren neben glatten

Muskelzellen und Makrophagen hauptsächlich Endothelzellen CCL2 [56]. Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung oder kardiovaskulären Risikofaktoren zeigte sich CCL2 im Vergleich zu Patienten ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren erhöht [99]. Es wird vermutet, dass CCL2 eine Rolle in der Entstehung der Atherosklerose spielt. De Lemos et al. konnten bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom nachweisen, dass Patienten mit erhöhtem CCL2 ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkt/Tod haben [34]. Im akuten Myokardinfarkt konnte im Tiermodell eine Hochregulierung von CCL2 im Myokard nachgewiesen werden [77, 85, 111, 145]. CCL2-defiziente Mäuse hatten eine niedrigere und spätere Infiltration von Makrophagen in das Infarktareal im Vergleich zum Wildtyp. Auch der Ersatz der geschädigten Myozyten durch Granulationgewebe war verzögert. Das Remodeling des linken Ventrikel war bei CCL2-defizienten Mäusen abgeschwächt, das Ausmaß des Infarktes war jedoch vergleichbar mit dem des Wildtyps [36, 48].

1.5.3. Tumornekrosefaktor- α

Tumornekrosefaktor- α (TNF α) gehört zu den multifunktionalen proinflammatorischen Zytokinen, die bei lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt sind. TNF α wird von Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Mastzellen gebildet und bindet an die Rezeptoren TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) und TNFR2, die auf den meisten somatischen Zellen exprimiert werden. Er ist an der Pathogenese mehrerer kardialer Erkrankungen beteiligt, wie dem Myokardinfarkt, der chronischen Herzinsuffizienz, der Myokarditis, der sepsisassoziierten Myokarddysfunktion und der Koronarsklerose [73, 84, 92, 122, 135, 148]. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Ischämie TNF α im Myokard induzieren kann [133]. Insbesondere in der Reperfusionphase nach Myokardinfarkt zeigte sich tierexperimentell ein Anstieg von TNF α im Serum [138].

1.5.4. Interleukin 1 β

Interleukin-1 β (IL-1 β) gehört zu der Interleukin-1-Familie, zu der die proinflammatorischen Zytokine IL-1 α und IL-1 β , sowie der Rezeptorantagonist IL-1RA und die beiden Rezeptoren IL-1R type I (IL-1RI) and IL-1R type II (IL-1RII) gehören [5, 38]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Endothelzellen und glatte Muskelzellen von Gefäßen IL-1 β produzieren. Insbesondere Scherspannung kann die Ausschüttung von IL-1 β durch Endothelzellen erhöhen [140]. Der Rezeptor IL-1R type I wird insbesondere auf T-Zellen, IL-1R type II auf B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen exprimiert. Die proinflammatorischen Eigenschaften von IL-

1 β spielen eine Rolle bei der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques, bei dem Gewebsuntergang nach myokardialer Ischämie sowie bei der Restenose nach Koronarangioplastie [39]. Bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und Myokardinfarkt zeigte sich die Plasmakonzentration von IL-1 β signifikant erhöht. Über eine Stimulierung der IL-12 Produktion induziert IL-1 β indirekt eine Th1-Aktivierung [139]. IL-1 β kann im Rahmen einer Entzündungsreaktion koloniestimulierende Faktoren wie G-CSF induzieren, die, wie bereits erwähnt, die Mobilisation von Vorläuferzellen beeinflussen [69, 108]. Damit kann ein indirekter Zusammenhang zwischen IL-1 β und der Vorläuferzellmobilisation vermutet werden.

1.5.5. Interleukin 6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin der akuten-Phase-Reaktion. Es wird von Endothelzellen, Makrophagen, Monozyten und Fibroblasten produziert. IL-6 wird durch Antigene wie Lipopolysaccharide, Interleukin-1, TNF und Viren stimuliert. IL-6 konnte auch in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden [121]. Im Tierexperiment wurde IL-6 RNA im ischämischen Myokard nach der Reperfusion hochreguliert [51, 83]. Der IL-6 Rezeptor, über den das Zytokin seine Wirkung entfalten kann, besteht aus einer α -Kette (CD126) und einer β -Kette (gp130) und wird insbesondere auf Hepatozyten und Leukozyten exprimiert [123, 143, 165]. Bei der Maus konnte zwar eine Beeinflussung der kutanen Wundheilung durch IL-6 nachgewiesen werden, eine Beeinflussung der Infarktgröße und linksventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt zeigte sich jedoch nicht [54, 55]. Dagegen wiesen in klinischen Studien Patienten mit erhöhtem IL-6-Spiegel nach Myokardinfarkt und bei instabiler Angina pectoris eine schlechtere Prognose auf [20, 81]. Die prognostische Aussagekraft von IL-6 bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit kann jedoch bisher nicht sicher eingeordnet werden. Im Rahmen der akuten-Phase-Reaktion induziert die Freisetzung von IL-6 in der Leber die Produktion des C-reaktiven Proteins (CRP), das für die Prognose nach Myokardinfarkt ebenfalls eine Rolle spielt [6].

1.5.6. Interleukin 8

Interleukin-8 (IL-8) wird hauptsächlich von Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Melanozyten und Hepatozyten gebildet. IL-8 beeinflusst die Entzündungsreaktion und vermittelt proangiogenetische Effekte [86]. Insbesondere der durch

neutrophile Granulozyten vermittelte Teil der Entzündungsreaktion wird von IL-8 reguliert. Der IL-8 Rezeptor wird auf neutrophilen Granulozyten und T-Zellen exprimiert, wodurch die chemotaktische und aktivierende Wirkung von IL-8 auf diese Zellen erklärt werden kann [11, 29]. Im Tiermodell zeigte sich an den Grenzonen des Myokardinfarktes vermehrt IL-8 [82]. Weitere Studien weisen darauf hin, dass IL-8 über die Aktivierung von MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) und LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) die Mobilisation von Vorläuferzellen stimulieren kann [41, 88]. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt fand sich eine Korrelation zwischen der Anzahl der zirkulierenden Vorläuferzellen und IL-8 [131]. So wird vermutet, dass IL-8 den positiven Anteil der Entzündungsreaktion vermittelt.

1.5.7. Interleukin 12

Interleukin 12 (IL-12) ist ein T-Zell Wachstumsfaktor, der aus einem heterodimeren 70kDa-Glykoprotein (IL12-p70) besteht [153]. Insbesondere auf aktivierten T-Zellen kann der IL-12 Rezeptor nachgewiesen werden. IL-12 wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen sezerniert und stellt einen Mediator der Immunantwort vom TH1-Typ dar, indem es über die Aktivierung von spezifischen Transkriptionsfaktoren die Differenzierung von T-Helfer-Zellen (TH-Zellen) zu TH1-Zellen fördert und den TH1-Phenotyp stabilisiert [58, 103, 153]. In atherosklerotischen Plaques konnte bereits IL-12 nachgewiesen werden. IL-12 mRNA zeigte sich bei atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu nicht betroffenen Gefäßen erhöht. Daher wird vermutet, dass IL-12 über die Beeinflussung der T-Zellantwort zu der Entstehung der koronaren Herzerkrankung beitragen kann [153]. Insbesondere die durch IL-12 stimulierten TH1-Zellen fördern die lokale Entzündungsreaktion in atherosklerotischen Läsionen [17]. So war bei Patienten mit instabiler Angina pectoris der IL-12 Spiegel im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris signifikant erhöht. Im akuten Myokardinfarkt war der IL-12 Spiegel im Vergleich zu Patienten mit instabiler Angina pectoris jedoch erniedrigt. Dies kann über die während des Myokardinfarktes erhöhten Zytokine wie Interleukin 10 erklärt werden, die IL-12 unterdrücken können [139].

1.5.8. Interleukin 10

Interleukin 10 (IL-10) ist ein antiinflammatorisches Zytokin und wird hauptsächlich von Makrophagen und Th2-Zellen sezerniert. Es hemmt die Bildung von IL-12 und verhindert damit die Th1-Aktivierung [32]. Zusätzlich supprimiert IL-10 die Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-8 [35]. Daher wurde IL-10 ursprünglich cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) genannt. Bei Patienten mit akutem

Myokardinfarkt wurde im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris ein signifikant höherer IL-10-Spiegel festgestellt. Dieser Anstieg kann im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion gesehen werden [139]. Zusammenfassend trägt IL-10 im Rahmen des negativen Rückkopplungsmechanismus dazu bei, ein Überschießen der proinflammatorischen Zytokine in der Entzündungsreaktion zu verhindern.

1.5.9. CXCL10

CXCL10 wird auch „Interferon-inducible protein-10“ (IP-10) genannt und gehört zu den Chemokinen. Er bindet an den Rezeptor CXCR3, der insbesondere auf aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden kann. CXCL10 wird von Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Astrozyten, Monozyten und Neutrophilen durch Stimulation mit IFN- α , IFN- β und IFN- γ exprimiert [97, 156]. CXCL10 wirkt chemotaktisch auf Monozyten und aktivierte T-Lymphozyten. Zusätzlich induziert es die Adhäsion der T-Zellen am Endothel [146]. Es konnte nachgewiesen werden, dass CXCL10 die Angiogenese in vivo hemmt [3]. Im akuten Myokardinfarkt konnte im Tiermodell ein Anstieg von CXCL10 bis 3 Stunden nach Reperfusion beobachtet werden. Nach 24 Stunden konnte CXCL10 bereits nicht mehr nachgewiesen werden [50]. Der frühe Anstieg von CXCL10 kann durch TNF α erklärt werden, das die Expression von CXCL10 stimulieren kann und in der Frühphase des Myokardinfarktes bereits ausgeschüttet wird [49]. Es wird vermutet, dass die frühe Ausschüttung des angiostatischen Zytokins CXCL10 eine zu frühe Angiogenese im Myokardinfarkt verhindern soll, bevor tote Zellen und Debris durch infiltrierende Phagozyten entsorgt werden konnten.

1.5.10. CXCL9

CXCL9 gehört wie CXCL10 zu den Angiogenese hemmenden Chemokinen. Es wird ebenfalls durch IFN- α , IFN- β und IFN- γ stimuliert und bindet an den CXCR3-Rezeptor. Insbesondere Makrophagen sezernieren CXCL9 im Rahmen der Entzündungsreaktion. Dabei scheint die Stimulation der Makrophagen durch IFN- γ eine wichtige Rolle zu spielen [40].

1.5.11. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Der Wachstumsfaktor VEGF (vascular endothelial growth factor) ist ein Polypeptid, das in verschiedenen Isoformen vorkommt [91, 147]. VEGF bindet an zwei Tyrosinkinaserzeptoren, an VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR1) und an VEGF-Rezeptor 2

(VEGFR2/KDR). VEGFR1 wird insbesondere von Monozyten und glatten Muskelzellen exprimiert und spielt im „Remodeling“ von Gefäßen eine Rolle [15, 30, 43]. VEGFR2 wird hauptsächlich von Endothelzellen gebildet und beeinflusst die Proliferation, Differenzierung und Migration von Endothelzellen [100, 132]. VEGF ist zum einen über die Migration von Endothelzellen aus benachbarten Gefäßen zum anderen durch die Mobilisation von Vorläuferzellen an der Neubildung von Gefäßen beteiligt [19, 71, 115]. Im Tiermodell konnte nach Applikation von VEGF in ischämisches Gewebe bereits eine Verbesserung der Gewebsperfusion nachgewiesen werden [16]. Soeki et al. zeigten in einer Studie, dass Patienten mit akutem Myokardinfarkt einen höheren Level von VEGF aufwiesen. VEGF stieg bis zu Tag 7 nach Symptombeginn weiter an und wurde als Antwort auf die durch den Myokardinfarkt ausgelöste akute Entzündungsreaktion interpretiert [136].

1.5.12. Stromal cell-derived factor 1

SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) ist ein Chemokin, das eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Vorläuferzellen spielt [1, 79]. Insbesondere Endothelzellen, Osteoblasten und Fibroblasten produzieren SDF-1 [76]. SDF-1 bindet an den CXCR4-Rezeptor, der zahlreich auf Vorläuferzellen exprimiert wird [101]. Die Interaktion zwischen SDF-1 und CXCR4 beeinflusst die Proliferation und Mobilisierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, sowie das „Homing“ zum geschädigten Gewebe [66, 87, 163]. Im Tierversuch konnte bereits nachgewiesen werden, dass SDF-1 Vaskulogenese in vivo induzieren kann [124]. Dabei ist vor allem die durch SDF-1 gesteigerte Expression des Wachstumsfaktors VEGF von Bedeutung.

1.6. Myokardialer Salvage

Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt profitieren von einer Reperfusionstherapie, da das den Infarkt umgebende gefährdete Gewebe, das „Myocardium at risk“, noch beeinflusst werden kann [21]. Das gerettete Myokard, der sogenannte myokardiale Salvage, bildet die Differenz zwischen der finalen Infarktgröße und dem initialen Perfusionsdefekt ab. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich die myokardiale Perfusion durch Myokardszintigraphie mit TC^{99m} Sestamibi zuverlässig darstellen lässt, da eine enge Korrelation zwischen der regionalen myokardialen Perfusion und der TC^{99m} Sestamibi-Aufnahme in das Myokard

besteht [60]. Durch den Vergleich der Myokardszintigraphie nach Beginn des Myokardinfarkts und im weiteren Verlauf, lässt sich das gerettete Myokard, also der myokardiale Salvage bzw. der Salvage Index errechnen. Der myokardiale Salvage Index ist von klinischer Relevanz, da er einen stärkeren Prädiktor für die 6-Monats-Mortalität darstellt [107].

2. Zielsetzung

Ziel dieser Studie ist es, die Assoziation von zirkulierenden CD34+CD133+Vorläuferzellen und zirkulierenden Zytokinen mit dem myokardialen Salvage Index bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1. Patienteneinschlusskriterien

Es wurden 22 Patienten in die Studie eingeschlossen, die mit einem akuten Myokardinfarkt in das Deutsche Herzzentrum der Technischen Universität München eingeliefert wurden und folgende Einschlusskriterien erfüllten:

- Pectanginöse Beschwerden über mehr als 20 Minuten Dauer
- Schmerzbeginn vor weniger als 12 Stunden
- Troponin T-Serumwert > 0.03mg/l
- erhöhter CK-Wert mit mindestens 2-fachen maximalen Referenzbereich

Bei allen Patienten wurde unmittelbar nach Aufnahme eine perkutane Koronarintervention (PCI) durchgeführt.

Alle Patienten wurden ausführlich über die Studie aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung liegt vor.

3.2. Ausschlusskriterien

Patienten mit interferierenden chronisch entzündlichen, malignen, infektiösen oder schweren systemischen Erkrankungen wurden aus der Studie ausgeschlossen. Des weiteren stellten vorangegangene antiinflammatorische Medikamente mit Ausnahme von Acetylsalicylsäure ein Ausschlusskriterium dar.

3.3. Studienprotokoll

3.3.1. Therapieschema

Bei allen Patienten wurde zur Therapie des akuten Koronararterienverschlusses eine PCI über die Femoralarterie mit Stentimplantation durchgeführt. Vor der Intervention bekamen alle Patienten einen intravenösen Bolus von 5000 IE Heparin, 500mg Aspirin i.v., 1-3 mg Metoprolol und 600mg Clopidogrel, sowie 1-2 mal 5mg Morphin.

Während der Herzkatheteruntersuchung erhielten die Patienten 10.000 IE Heparin und zur Darstellung der Koronargefäße und der linken Herzkammer nichtionisches Kontrastmittel

(Imeron[®], Wirkstoff Iomeprol, Altana Pharma, Konstanz), das über den Katheter appliziert wurde.

Nach der Intervention wurde, sobald die aktivierte partielle Thromboplastinzeit unter 80 Sekunden gefallen war, die arterielle Schleuse gezogen und nach manueller Kompression an der Einstichstelle der Leiste ein zirkulärer Kompressionsverband angelegt.

3.3.2. Blutabnahmeschema

Den Patienten wurde vor der Intervention aus der Katheterschleuse Blut in eine Blutgas-Monovette und eine EDTA-Monovette abgenommen.

Die Röhrchen wurden jeweils nach unten beschriebenen Schema weiterverarbeitet.

3.4. Methoden

3.4.1. Durchflusszytometrie

3.4.1.1. Grundlagen

In einem Durchflusszytometer werden die suspendierten Einzelzellen einer Probe durch einen Laser geführt. Abhängig vom Zelltyp und der Probenvorbereitung senden die Zellen charakteristische Lichtsignale aus, die mit Detektoren nachgewiesen werden. Durch Umwandlung der optischen Signale in elektronische Signale und Digitalisierung, können die gesuchten Parameter der gemessenen Zellen am Bildschirm dargestellt und entsprechend ausgewertet werden.

Die drei wichtigsten Komponenten des Durchflusszytometers sind a) das Flüssigkeitssystem, das die Zellen zum Messpunkt transportiert und fokussiert, b) die Optik, bestehend aus Laser und Detektionsoptik und c) die Elektronik, die die Signale für die Computerdarstellung umwandelt.

a) das Flüssigkeitssystem

Die Zellsuspension wird aus dem Probenröhrchen durch Überdruck in die Messküvette befördert. Die Zellen werden dabei durch die umgebende Trägerflüssigkeit so stark beschleunigt, dass sich Zellaggregate auflösen. Durch die Querschnittsverringeringung in der Messküvette wird sowohl der Strom der Probenflüssigkeit als auch der Strom der Trägerflüssigkeit beschleunigt und verjüngt. Der Abstand der Zellen wird vergrößert, sodass

jede Zelle einzeln durch den Laserstrahl detektiert werden kann. Somit hat das Flüssigkeitssystem die Aufgabe der hydrodynamischen Fokussierung (Abbildung 1).

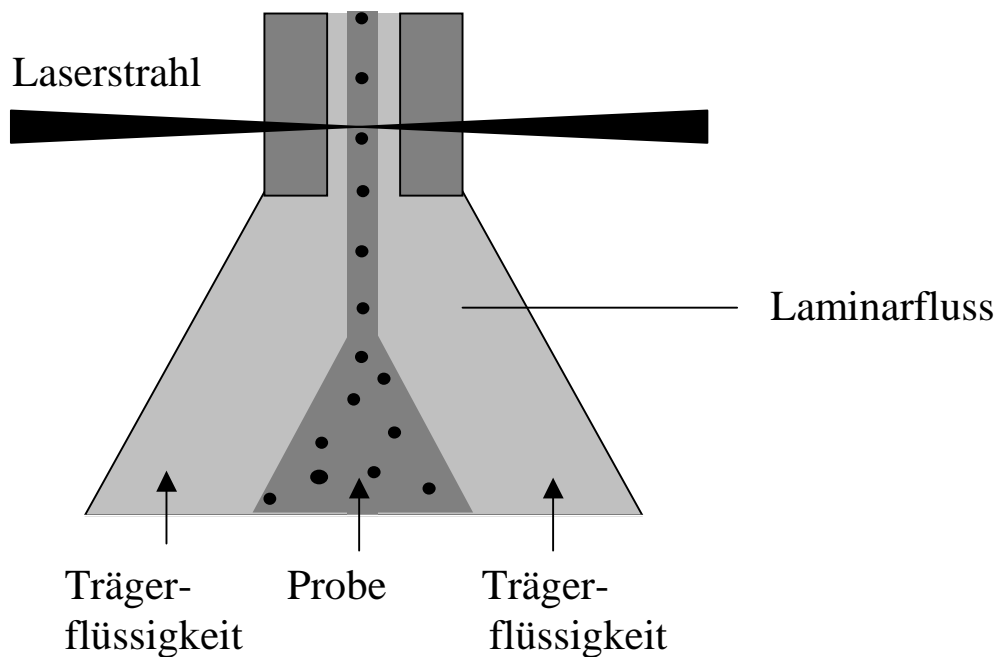


Abbildung 1: Flüssigkeitssystem des Durchflusszytometers

b) Die Optik

Die Optik der Anregung besteht aus einem luftgekühlten Argonlaser der Wellenlänge $\lambda = 488$ nm und einem Dioden-Laser der Wellenlänge $\lambda = 635$ nm zur Fluoreszenzanregung sowie Prismen um den Laserstrahl zu fokussieren.

Die Detektionsoptik besteht aus zwei Detektoren zur Messung der Streulicht- und vier Detektoren zur Messung der Fluoreszenzeigenschaften, sowie aus einem System von optischen Spiegeln und Filtern, das die spezifischen Wellenlängen der emittierten Lichtsignale zu den entsprechenden optischen Detektoren weiterleitet.

Auf diese Weise können folgende Parameter einer Zelle gemessen werden:

- Die relative Größe (Vorwärtsstreulicht)
- Die relative Granularität (Seitwärtsstreulicht)

- Die spezifische Fluoreszenz der durch einen fluoreszenz-gekoppelten Antikörper markierten Zelle. Die Standardfluoreszenzfarben sind FITC (Fluoreszeinisothiozyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridin Chlorophyll) und APC (Allophycocyanin).

c) Elektronik

Die Elektronik wandelt schließlich die an den Detektoren gemessenen optischen Signale in elektronische Signale in Form von Spannungsimpulsen um, digitalisiert die Daten und übermittelt diese an den Computer zur Analyse.

3.4.1.2. Prinzip der Zellanalyse

Zur Charakterisierung von Zellen können diese mit Antikörpern markiert werden, die spezifisch an Oberflächentrukturen der Zellen binden und ihrerseits mit einem Fluorochrom markiert sind. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommolekülen (Abbildung 2). Die Emissionsmaxima sind für FITC (Fluoreszeinisothiozyanat) 519nm, für PE (Phycoerythrin) 578nm, für PerCP (Peridin Chlorophyll) 675nm und für APC (Allophycocyanin) 660.

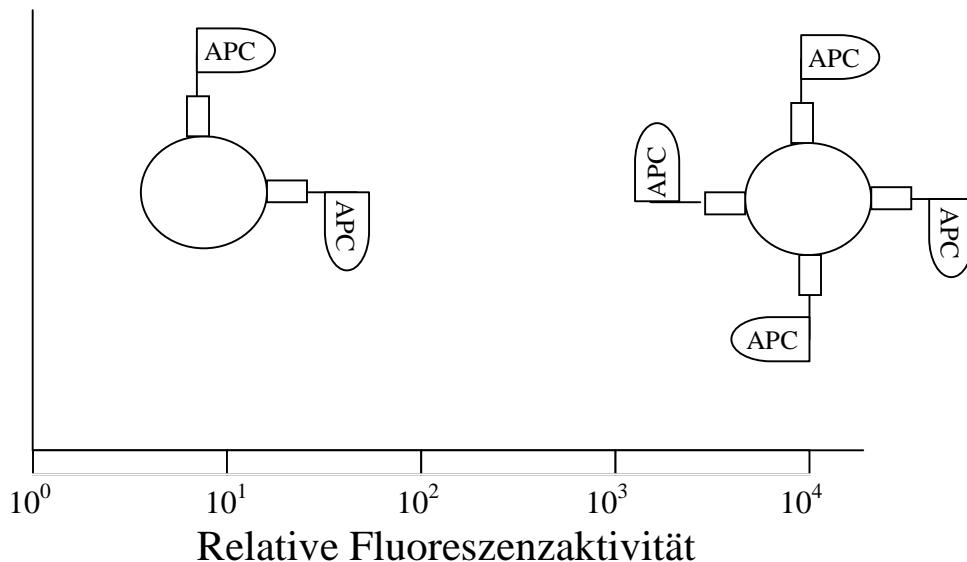


Abbildung 2: Relative Fluoreszenzaktivität mit dem Fluorochrom APC (Allophycocyanin)

Um die Zellen genauer einordnen zu können, besteht die Möglichkeiten die Zellen mit mehreren fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern zu markieren. Mit dem in dieser Studie verwendeten Durchflusszytometer FACS Calibur kann damit pro Zelle die relative Größe und Granularität sowie bis zu vier verschiedene Fluoreszenzen gemessen werden.

Bevor eine Messung durchgeführt werden kann müssen folgende Einstellungen vorgenommen werden. Der „Detector“, der das elektronische Signal verstärkt, muss anhand einer Kontrolllösung optimiert werden. Anschließend muss der „Threshold“ eingestellt werden, der ungewollte Signale wie Zelltrümmer filtert. Ein Problem bei Messungen mit verschiedenen Fluoreszenzen stellt die Überlappung der Emissionen dar. Fluoreszenzfarbstoffe strahlen nicht nur eine Farbe aus, sondern ein ganzes Spektrum. So misst der jeweilige Detektor nicht nur das dafür vorgesehene Fluoreszenzsignal eines Farbstoffs sondern auch die Fluoreszenzsignale der anderen Farbstoffe. Dies beeinträchtigt die Beurteilung der Ergebnisse, da man so bei Mehrfarbanalysen nicht mehr weiß, welcher Farbstoff das Signal des Detektors verursacht hat. Um dieses Phänomen zu vermeiden muss vor der Messung eine Kompensation durchgeführt werden, das bedeutet die Streuung der Fluoreszenzsignale abhängig von der Anzahl und der Art der verwendeten Farbstoffe rechnerisch zu korrigieren.

Die gemessenen Parameter der Zellen können nach der Messung als Histogramm (Häufigkeitsverteilung) oder Dot Plot (Punktwolken) dargestellt werden (Abbildung 3).

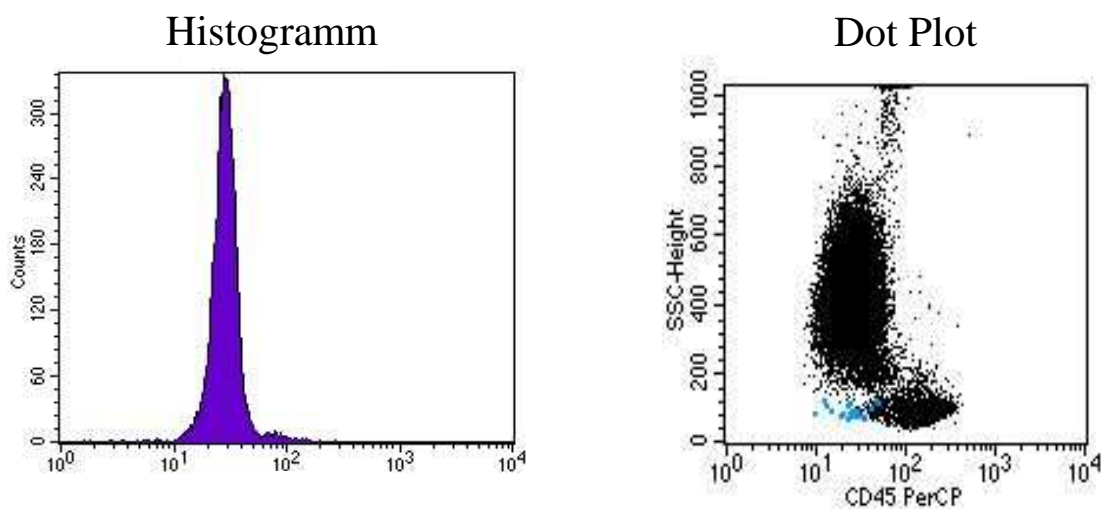


Abbildung 3: Darstellung eines Histogramms und eines Dot Plot

Um Zellpopulationen analysieren zu können, werden „Regionen“ (Gates) gesetzt, welche die jeweiligen Zellen aus der Gesamtheit zur weiteren Auswertung abtrennen. So können weitere Zelleigenschaften untersucht und gegebenenfalls mittels „Gating“ weitere Zellpopulationen abgetrennt werden. Die Zellen, die in einer Region zusammengefasst sind, können statistisch ausgewertet werden. Damit kann die genaue Anzahl der gemessenen Zellen der gesuchten Population angegeben werden.

3.4.1.3. Probenverarbeitung für die Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden 50 µl heparinisertes peripher-venöses Blut innerhalb von zwei Stunden nach Abnahme mit 1,25 µl eines Allophycocyanin (APC)-konjugierten anti-CD45-AK (Klon 2D1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), sowie mit 5 µl eines Phycoerythrin (PE)-konjugierten anti-CD133-AK (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) und mit 5 µl eines Fluoreszein-isothiozyanit (FITC)-konjugierten anti-CD34-AK (Klon 8G12, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) für 20 Minuten in Dunkelheit auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten des Probenansatzes mit FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 1:10 verdünnt mit Aqua dest., bei Zimmertemperatur in Dunkelheit 10 Minuten lang lysiert. Danach wurde der Probenansatz mit Dulbecco's PBS-Puffer (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) gewaschen und 5 Minuten bei 1700 Upm und 4°C zentrifugiert. Als Kontrolle wurden 50 µl heparinisertes peripher-venöses Blut der gleichen Probe ausschließlich mit 1,25µl des APC-konjugierten anti-CD45-AK nach oben beschriebener Methode inkubiert (Isotyp-Kontrolle). Nach Abnahme des überstehenden Puffers erfolgte entweder die unmittelbare durchflusszytometrische Analyse, oder eine Fixierung des Probenansatzes mit 150µl 1 %iger Paraformaldehyd-(PFA-)Lösung, wobei die Messung im Durchflusszytometer am nächsten Tag erfolgte. Zur quantitativen Analyse wurde der Probenansatz in ein TruCOUNT-Röhrchen (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) überführt. Die Messung erfolgte unter Verwendung des Facs-Gerätes FACS Calibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Dabei wurde die Fluoreszenzintensität von mindestens 50 000 Ereignissen gemessen und mit CellQuest-Software ausgewertet.

3.4.1.4. Bestimmung der CD34+CD133+Vorläuferzellen

Zur Bestimmung der CD34+CD133+Vorläuferzellen im Blut wurden die gemessenen FACS-Daten in Anlehnung an das Ishage-Protokoll nach folgendem Schema mit CellQuest-Software ausgewertet [78]:

Zuerst wurden die gemessenen Zellen in einem Punktdiagramm dargestellt, das die Zellen im Vorwärtsstreulicht sowie deren Fluoreszenz des APC-konjugierten CD45-AK darstellte. In diesem Diagramm wurde mittels Gating der Zelldebris aus der weiteren Auswertung abgetrennt. Im nächsten Schritt wurden die im ersten Diagramm eingeschlossenen Zellen in einem Diagramm dargestellt, bei dem die Fluoreszenz der Zellen des APC-konjugierten CD45-AK gegen die Fluoreszenz des PE-konjugierten anti-CD133-AK aufgetragen war. Um die CD133-positiven Zellen, die nur schwach CD45-positiv waren, wurde ein Gate gesetzt (R6). Analog wurden CD34-positive Zellen in einem weiteren Punktdiagramm dargestellt (R3). Zur Qualitätssicherung diente die dazugehörige Isotyp-Kontrolle, die ausschließlich mit APC-konjugiertem anti-CD45-AK inkubiert wurde und unspezifische Bindungen des Antikörpers überprüfen sollte (Abbildung 4 und 5).

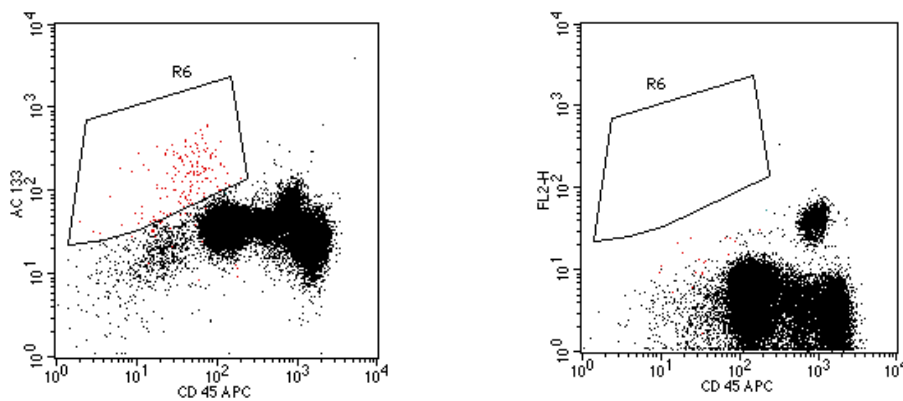


Abbildung 4: Bestimmung der CD133+Zellen in R6

Links Patientenprobe, rechts Isotyp-Kontrolle

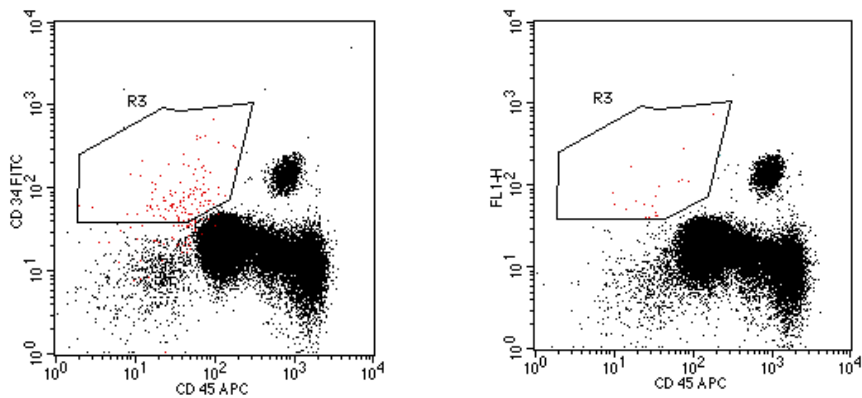


Abbildung 5: Bestimmung der CD34+Zellen in R3

Links Patientenprobe, rechts Isotyp-Kontrolle

Die Schnittmenge der in R6 und R3 gatedeten Zellen, also der CD133-positiven und CD34-positiven Zellen, wurden in R9 zusammengefasst und statistisch ausgewertet (Abbildung 6).

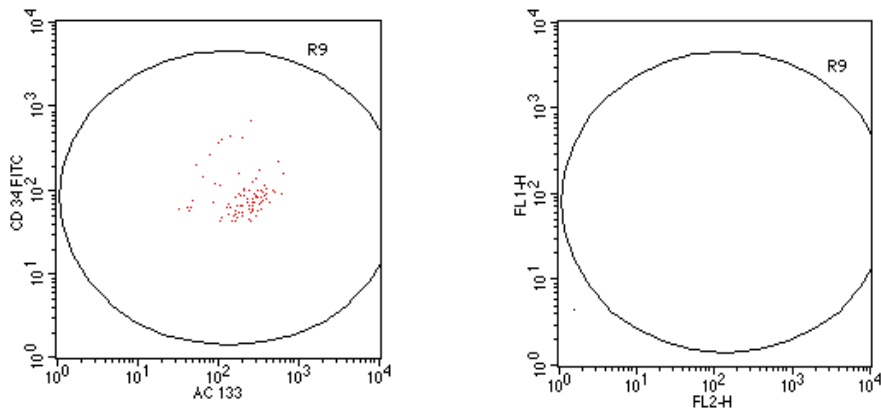


Abbildung 6: Bestimmung aller CD34+CD133+Zellen aus R6 und R3

Links Patientenprobe, rechts Isotyp-Kontrolle

Auf diese Weise konnte die absolute Anzahl der gemessenen CD34+CD133+Zellen bestimmt werden.

3.4.1.5. Quantitative Analyse

Zur Bestimmung der CD34+CD133+Zellen/ μ l Serum wurde das entsprechend oben beschriebenen Protokoll verarbeitete Blut in ein TruCOUNT-Röhrchen (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) überführt. In diesem Röhrchen ist eine bekannte Anzahl fluoreszierender Mikropartikel (sogenannte „Beads“) enthalten, die sich in der Probe lösen und wie immunphänotypisierte Zellen durchflusszytometrisch gemessen werden können. Die gemessenen Beads können in einem Dot Plot, bei dem die Fluoreszenz FL1 und FL2 gegeneinander dargestellt sind, gegatet und ausgezählt werden (Abbildung 7).

Durch folgende Formel können aus den gemessenen Beads, den gemessenen CD34+CD133Zellen und der vorgegebenen Anzahl von Beads pro Trucountröhrchen die Anzahl der CD34+CD133+Zellen pro μ l Blut ausgerechnet werden:

$$\text{Zellen}/\mu\text{l Blut} = \frac{\text{i. d. Probe gemessene Zellen} \times \text{„Beads“/TruCOUNT-Röhrchen}}{\text{gemessene „Beads“} \times 50}$$

3.4.2. Myokardszintigraphie

3.4.2.1. Grundlagen zu TC^{99m} Sestamibi

TC^{99m} Sestamibi (=Methoxy-isobutyl-isonitrit) ist ein lipophiler Kationenkomplex mit einer Halbwertszeit von 6,02 Stunden unter Emission von Gammstrahlung mit der Energie von 140 keV [74, 80]. TC^{99m} Sestamibi wird vor allem renal und über den Gastrointestinaltrakt ausgeschieden. Es unterliegt im Körper keinem Metabolismus [159]. Entscheidend für die Myokardszintigraphie ist eine enge Korrelation zwischen der regionalen myokardialen Perfusion und der TC^{99m} Sestamibi-Aufnahme in das Myokard [102].

3.4.2.2. Aufbau der Gammakamera

Die emittierte Strahlung wird mit einer Gammakamera gemessen. Diese besteht aus Kollimator, Natriumjodkristall, Lichtleiter, Sekundärelektronenvervielfacher, Lokalisationsmatrix und Analog-Digital-Wandler. Ein Kollimator ist eine Bleischeibe, die die Strahlung ähnlich einer Lochblende außerhalb eines bestimmten Raumwinkels ausblendet. Im

Natriumjodkristall wird bei der Absorption der Gammaquanten eine Lichtemission angeregt, die letztendlich in elektrische Impulse umgewandelt wird. Die Daten werden in den Schnittebenen parallel zu den Herzachsen rekonstruiert. Die Schnitte senkrecht zu dieser Achse werden als Kurzachsenschnitte bezeichnet, die Langachsenschnitte liegen dagegen parallel zur Herzachse [102]. Letztendlich ergibt diese Untersuchung eines Organs Schnittbilder, die sich mit den Ergebnissen anderer Schnittbildverfahren vergleichen lassen [129].

3.4.2.3. Durchführung der Untersuchung

Die Patienten bekamen vor der Koronarintervention eine intravenöse Injektion von 800MBq TC^{99m} Sestamibi. 6-8 Stunden nach der Injektion wurden die szintigraphischen Aufnahmen mittels Single-Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT) durchgeführt. Nach 5 Tagen wurde erneut eine Myokardszintigraphie nach gleichem Protokoll mit 300MBq wiederholt. Dieses Vorgehen wird routinemäßig bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt in der kardiologischen Abteilung des Deutschen Herzzentrums München angewendet.

In dieser Studie wurden die Aufnahmen mit einer digitalen Doppelkopfkamera (Siemens ECAM) und einem LEHR-Kollimator (low energy high resolution) angefertigt. Dabei rotierten die im 90°Winkel zueinander angeordneten Kameraköpfe über 180° um den Patienten. Pro Kamerakopf wurden 16 Aufnahmen über je 40 Sekunden in einer 64x64 Matrix akquiriert.

3.4.2.4. Auswertung

Um die myokardiale Aktivitätsverteilung volumetrisch quantitativ zu analysieren wurde die speziell für kardiale tomographische Datensätze entworfene Software „Munich Heart“ benutzt. Dabei werden sogenannte „Polar Maps“ verwendet, die zweidimensional die dreidimensionalen Aktivitätsverteilung des gesamten linksventrikulären Myokards darstellen (Abbildung 8).

Die höchste Aktivität, die innerhalb eines Polar Map gemessen wurde, erhielt den Wert 100%. Ein Aktivitätsdefekt wurde definiert als ein Areal, dessen Aktivität <50% der maximalen Aktivität ist. Die so errechneten Perfusionsdefekte wurden in Prozent des linken Ventrikels angegeben. Mit dieser Methode können der initiale Perfusionsdefekt (Perfusionsdefekt in Prozent des linken Ventrikels bei der initialen Untersuchung), der auch als „Area at risk“ bezeichnet wird, und der verbleibende Perfusionsdefekt (Perfusionsdefekt in Prozent des linken Ventrikels bei der Untersuchung nach 5 Tagen) berechnet werden. Der Salvage

errechnet sich durch die Subtraktion der verbleibenden Perfusionsdefektgröße von der initialen Perfusionsdefektgröße und entspricht letztendlich dem geretteten Myokard. In unserer Studie wurde hauptsächlich der Salvage Index betrachtet, der sich aus dem Salvage geteilt durch die initiale Perfusionsdefektgröße ergibt:

$$\text{Salvage Index} = \frac{\text{Initiale Perfusionsdefektgröße} - \text{verbleibende Perfusionsdefektgröße}}{\text{Initiale Perfusionsdefektgröße}}$$

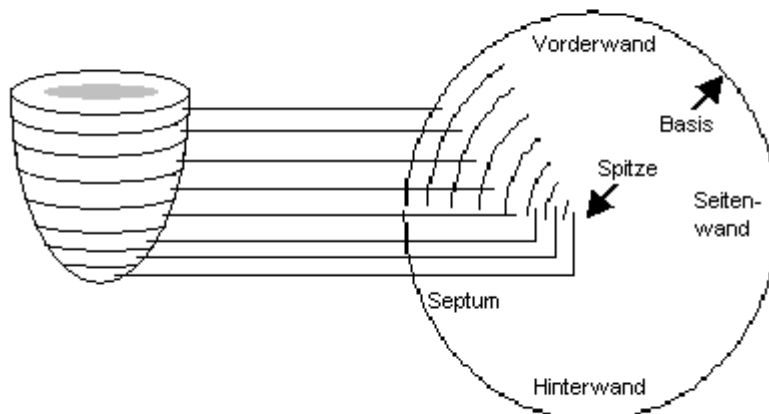


Abbildung 7: Prinzip der „Polar Maps“-Darstellung.

Projektion der unterschiedlichen Tomoszintigramme in eine Ebene

3.4.3. Bestimmung der Zytokine

Zur Bestimmung der Zytokine wurde unmittelbar nach Abnahme des EDTA-Röhrchens die Probe bei 3000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und der Überstand bis zur Messung bei minus 20° eingefroren.

3.4.3.1. ELISA

Für die Bestimmung des Zytokins VEGF wurde ein Sandwich Enzyme Immunoassay verwendet (Quantikine Human VEGF Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, USA).

Für die Untersuchung wurden 96-Well-Mikrotiterplatten verwendet an deren Boden der Antikörper gegen VEGF gebunden („gecoated“) ist. Die Patientenproben und die Standardproben wurden in die Wells pipettiert. Die in den Proben vorhandenen Zytokine wurden von den Antikörpern gebunden. Nachdem ungebundene Moleküle mit Waschpuffer herausgewaschen worden sind, wurden die Proben mit Enzym-gebundenen Antikörper gegen VEGF inkubiert. Als Enzym wurde dabei Meerrettich-Peroxidase benutzt. Nach erneutem Waschen wurde Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben, das mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase mit einem Farbumschlag reagiert. Die Farbreaktion wurde nach 25 Minuten durch die Zugabe einer Stopplösung (Schwefelsäure) beendet. Anschließend konnte die Intensität der Farbe bei 450nm in einem Photometer gemessen werden (Biotrak II Visible Plate Reader, GE Healthcare, Freiburg). Anhand der Standardreihen konnte daraus die Konzentration der Zytokine im Plasma quantitativ bestimmt werden.

3.4.3.2. Cytometric Bead Arrays (CBA)

Die quantitative Bestimmung der Zytokine IL-12, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8, CXCL9, CCL2 und CXCL10 aus dem Patientenplasma erfolgte mittels Cytometric Bead Arrays (CBA). Dafür wurde das „Human Inflammation Kit“ und das „Human Chemokine Kit“ von BD-Bioscience (San Diego, USA) verwendet.

Grundlage der Bestimmung mittels CBA sind Mikropartikel, sogenannte „Beads“, die jeweils mit einem für ein bestimmtes Zytokin spezifischen Antikörper gekoppelt sind. Jeder Mikropartikel hat eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität, die im Durchflusszytometer gemessen werden kann. Auf diese Weise ist die Diskriminierung der Zytokine in der selben Messung möglich. Zusätzlich werden die Zytokine mit einem PE-konjugierten Antikörper inkubiert, der für die Bestimmung der Konzentration von Bedeutung ist. Anschließend werden die Proben im Durchflusszytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, Mountain

View, CA, USA) gemessen. Anhand der gemessenen Fluoreszenz der Mikropartikel (Beads) und der PE-Fluoreszenzintensität kann anhand von Standardkurven mit Hilfe der „BD CBA Analysis Software“ die Konzentration der einzelnen Zytokine in pg/ml errechnet werden.

3.4.4. Bestimmung weiterer Parameter

Die weiteren Parameter wie CK, CK-MB, Troponin T, Leukozytenanzahl und CRP wurden im Institut für Klinische Chemie im Deutschen Herzzentrum München bestimmt. Die Maximalwerte von Troponin T, CK und CK-MB beziehen sich auf den gesamten stationären Aufenthalt.

Die Ejektionsfraktion wurde angiographisch während der Herzkatheteruntersuchung bei Aufnahme bestimmt.

3.5. Statistik

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurde SPSS 16.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) benutzt. Der Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde bei kategorialen Werten mittels Chi-Quadrat-Test durchgeführt, bei kontinuierlichen Werten mittels Mann-Whitney-U-Test. Korrelationen zwischen den Parametern wurden mittels Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten untersucht. Alle Tests wurden zweiseitig ausgeführt. Signifikanzen mit $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

Soweit nicht anders gekennzeichnet wird der Mittelwert gemeinsam mit dem sem (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben („Mittelwert \pm sem“).

4. Ergebnisse

4.1. Klinische Daten des Patientengutes

In die Studie wurden 22 Patienten eingeschlossen, die zwischen 48 und 75 Jahre alt waren. Es wurden ausschließlich männliche Patienten eingeschlossen. Der Mittelwert der Creatinkinase (Maximalwert) lag bei 2582,86 U/l, des Troponin T (ebenfalls Maximalwert) bei 5,23 µg/l. An Risikofaktoren bestanden insbesondere eine arterielle Hypertonie, eine Hypercholesterinämie und ein Nikotinabusus bei der Mehrzahl der Patienten. Bei 50% der Patienten wurde eine 3-Gefäßerkrankung, bei den restlichen 50% eine 1- Gefäß- bzw. eine 2-Gefäßerkrankung festgestellt. Bei allen 22 Patienten wurde eine Myokardszintigraphie bei Aufnahme und nach 5 Tagen durchgeführt (Tabelle1).

Patientendaten

n=22

Alter (Jahre), Mittelwert(range)	61,59 (48-75)
Risikofaktoren	
Rauchen	12 (55%)
Hypertonie	15(68%)
Hypercholesterinämie	15(68%)
Diabetes	8(36%)
EF (%)	40,36 (40,50)± 2,19
Max. CK (U/l)	2582,86(2505)± 349,71
Max. CKMB (U/l)	305,97(234,5)± 55,29
Max. TnT (µg/l)	5,23(3,64) ± 1,21
Initiale Perfusionsdefektgröße	37,77(35)±4,41
Salvage Index	0,28(0,24) ±0,05
Ausmaß der KHK	
1-GE	8(36%)
2-GE	3 (14%)
3-GE	11 (50%)
Medikamente	
Statine	4 (18%)
ACE-Hemmer	3(14%)
Betablocker	6(27%)
Thrombozyten- aggregationshemmer	6 (27%)
Diuretika	3 (14%)
Sartane	4 (18%)

AMI = akuter Myokardinfarkt, EF = Ejektionsfraktion; GE = Gefäßerkrankung

Angaben jeweils Mittelwert(Median) ± sem, Prozentangaben gerundet

Tabelle 1: Daten des Patientenkollektivs

4.2. Zirkulierende Vorläuferzellen

Der Mittelwert der bei Aufnahme gemessenen Anzahl der CD34+CD133+Vorläuferzellen im Blut der Patienten war 4,17 Zellen / μ l (sem= 0,75). Die Anzahl schwankte zwischen 0,46 und 16,66 Zellen/ μ l. Es gab keinen Hinweis auf eine Korrelation zwischen der Anzahl der Vorläuferzellen und den Laborparametern CK, CK-MB, Troponin T, CRP und Leukozytenzahl. Auch Alter, Risikofaktoren, die Anzahl der betroffenen Gefäße und die eingenommenen Medikamente ergaben keine signifikante Korrelation mit den gemessenen zirkulierenden Vorläuferzellen. Bei den Zytokinen konnte ebenfalls keine Korrelation zu den Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Tabelle 2).

Zwischen der Anzahl zirkulierender Vorläuferzellen und dem Salvage Index wurde eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,6 nachgewiesen (p=0,003).

		Mittelwert (Median) \pm sem	Korrelation mit Anzahl der gemessenen CD34+CD133+Vorläuferzellen	
	N		p	r
CCL2 (pg/ml)	22	135,59(116,5) \pm 23,28	n.s.	0,16
TNF α (pg/ml)	22	19,15(0) \pm 17,60	n.s.	-0,01
IL-1b (pg/ml)	21	339,98(0) \pm 323,06	n.s.	-0,09
IL-6 (pg/ml)	22	23,69(3,55) \pm 9,65	n.s.	-0,03
IL-8 (pg/ml)	22	18,73(12,6) \pm 2,67	n.s.	-0,39
IL-12 (pg/ml)	21	43,45(0) \pm 41,02	n.s.	0,09
IL-10 (pg/ml)	21	2,34(0) \pm 1,14	n.s.	0,17
CXCL10 (pg/ml)	22	741,27(520,5) \pm 161,89	n.s.	0,2
CXCL9 (pg/ml)	22	967,15(671,15) \pm 193,17	n.s.	0,14
VEGF(pg/ml)	22	100,1(52) \pm 28,18	n.s.	-0,21
Leukozyten(Zellen/nl)	22	11,22(11,2) \pm 0,72	n.s.	0,14
CRP(mg/dl)	22	19,81(7,15) \pm 9,97	n.s.	-0,05

Tabelle 2: Korrelation von Zytokinen und Entzündungsparametern mit zirkulierenden CD34+CD133+Vorläuferzellen

4.3. Salvage Index

Der Salvage Index lag bei den Patienten zwischen $-0,17$ und $+0,81$. Der Median betrug $0,24$ und der Mittelwert $0,28 \pm 0,06$. Die Patienten wurden anhand des Medians in zwei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe, die im weiteren „salvage high“ genannt wird, mit einem Salvage index $>0,24$ und eine Gruppe, die im weiteren „salvage low“ genannt wird, mit einem salvage index $<0,24$. In Hinblick auf Alter und Risikofaktoren wiesen die Patienten der „salvage high“-Gruppe im Vergleich zu den Patienten der „salvage low“-Gruppe keinen signifikanten Unterschied auf. Die initiale Perfusionsdefektgröße zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Tabelle 3, Abbildung 9).

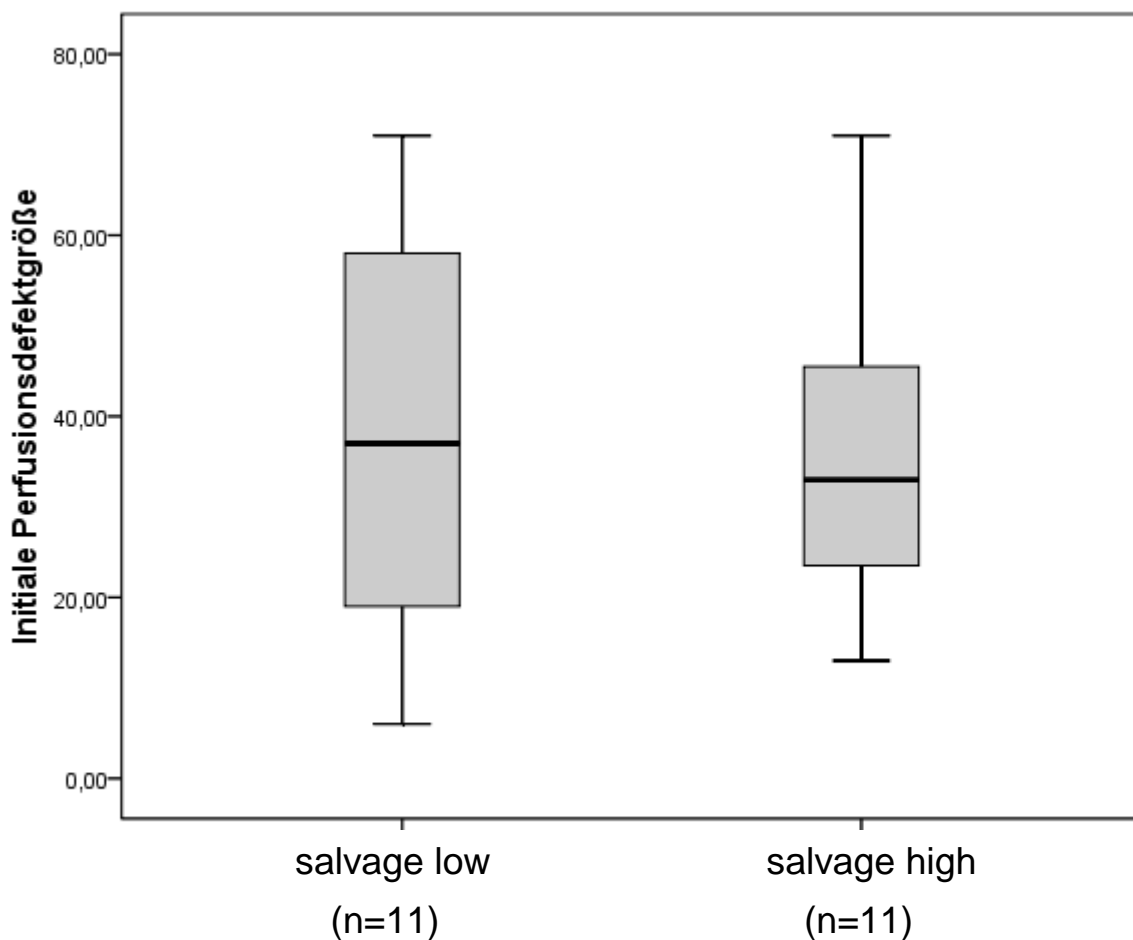


Abbildung 8: Initiale Perfusionsdefektgröße im Gruppenvergleich

	“salvage high” mit Salvage Index >0,24 n=11	“salvage low” mit Salvage index <0,24 n=11	p
Alter (Jahre), Mittelwert(range)	61,82 (48-75)	61,36 (50-74)	n.s.
Risikofaktoren			
Rauchen	7 (64%)	5 (45%)	n.s.
Hypertonie	7 (64%)	8(73%)	n.s.
Hypercholesterinämie	7 (64%)	8(73%)	n.s.
Diabetes	5(45%)	3(27%)	n.s.
EF (%)	42 (47)± 3,55	38,73 (37)± 2,64	n.s.
Max. CK (U/l)	2569,36(2320)± 506,08	2796,36(2880)± 623,79	n.s.
Max. CKMB (U/l)	293,58(280)± 81,96	318,36(186)± 78,03	n.s.
Max. TnT (µg/l)	5,46(3,56) ± 2,24	5,02(3,93) ± 1,19	n.s.
Initiale Perfusionsdefektgröße,	37,18(33)±5,58	38,36(37)±7,11	n.s.
Salvage Index	0,49(0,46) ±0,05	0,07(0,11) ±0,04	<0,001
Ausmaß der KHK			
1-GE	6 (55%)	2(18%)	n.s.
2-GE	1(9%)	2(18%)	n.s.
3-GE	4 (36%)	7 (64%)	n.s.
Medikamente			
Statine	0	4 (36%)	(0,07)
ACE-Hemmer	2(18%)	1(9%)	n.s.
Betablocker	2(18%)	4(36%)	n.s.
Thrombozytenaggregationshemmer	3 (27%)	3 (27%)	n.s.
Diuretika	1(9%)	2 (18%)	n.s.
Sartane	1(9%)	3 (27%)	n.s.

AMI = akuter Myokardinfarkt, EF = Ejektionsfraktion; GE = Gefäßerkrankung

Angaben jeweils Mittelwert(Median) ± sem, Prozentangaben gerundet

Tabelle 3: Patientenkollektiv „salvage high“ und „salvage low“

4.4. Gruppenvergleich „salvage high“ vs. „salvage low“

4.4.1. Entzündungsparameter

Die Leukozytenzahl bei Aufnahme zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den „salvage-high“-Patienten und den „salvage low“-Patienten. Der Mittelwert war in der „salvage high“-Gruppe bei 10,70 Zellen/nl (Median 11,25) und in der „salvage low“-Gruppe bei 11,70 Zellen/nl (Median 11,20) (Abbildung 10).

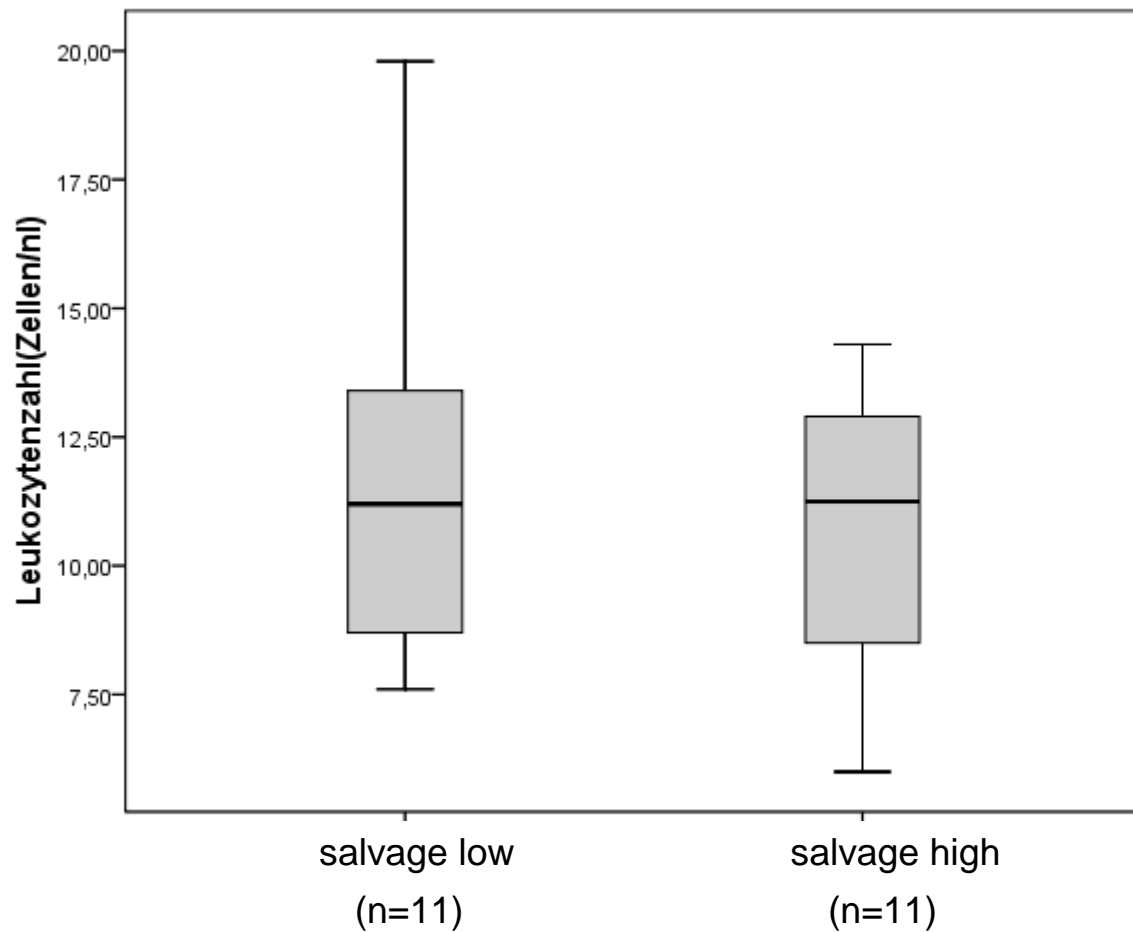


Abbildung 9: Leukozytenzahl im Gruppenvergleich

Das C-reaktive Protein war in der „salvage low“-Gruppe deutlich höher als in der „salvage high“-Gruppe (Mittelwert 27,85 vs. 9,97mg/dl; Median 9,1 vs. 4,5mg/dl), eine Signifikanz ergab sich jedoch nicht ($p=0,5$) (Abbildung 11).

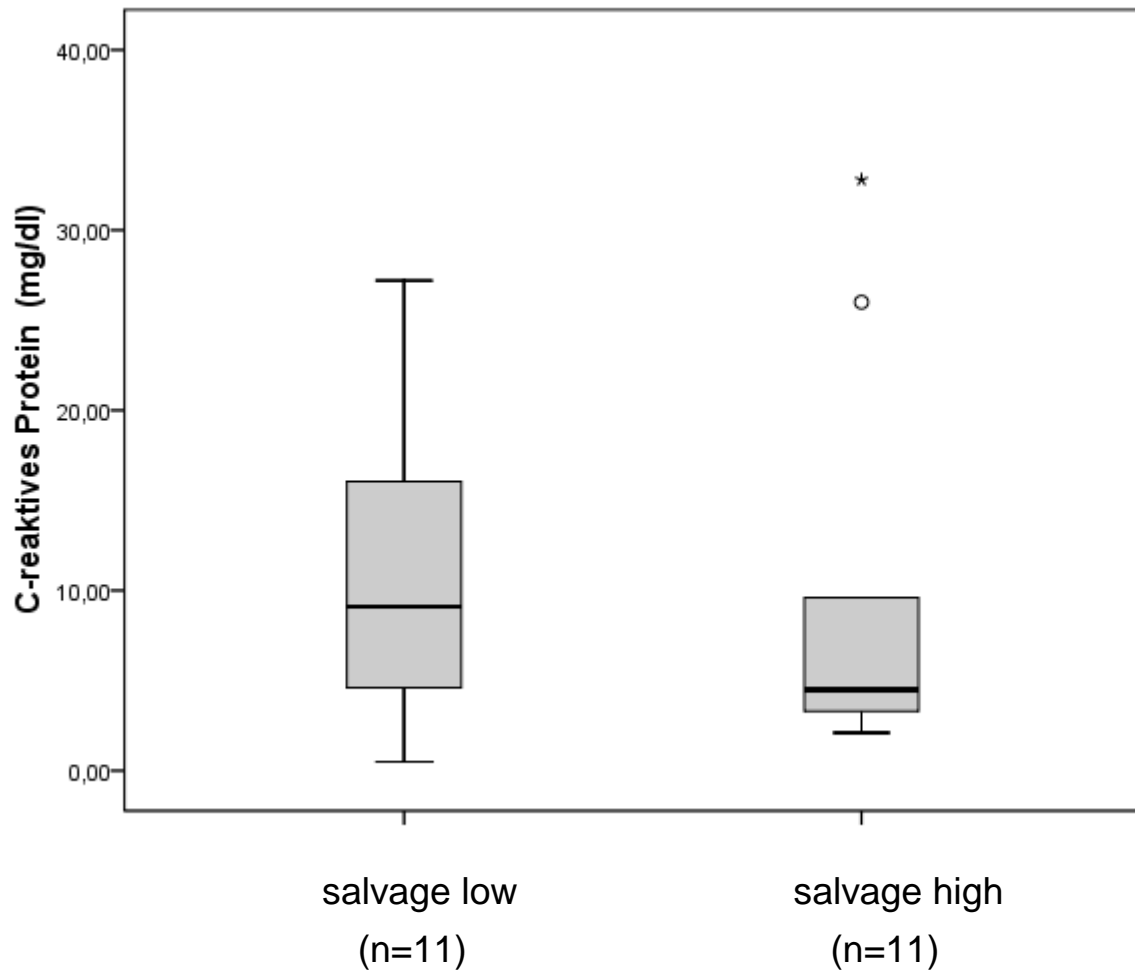


Abbildung 10: C-reaktives Protein im Gruppenvergleich

4.4.2. Herzenzyme

Troponin T bei Aufnahme zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen ($p=0,02$). Bei „salvage high“-Patienten lag der Mittelwert bei $0,22\mu\text{g/l}$, bei „salvage low“-Patienten lag der Mittelwert bei $0,95\mu\text{g/l}$ (Median $0,05$ vs. $1,28\mu\text{g/l}$) (Abbildung 12). Dagegen ergaben die während des stationären Aufenthaltes gemessenen Maximalwerte von Troponin T, CK und CK-MB keinen signifikanten Unterschied zwischen den Patientengruppen ($p=0,47/0,65/0,89$). Troponin T bei Aufnahme korrelierte mit der Zeitdauer zwischen Schmerzbeginn und Aufnahme ($r=0,786$, $p<0,01$). Zwischen den Patienten der „salvage low“- und „salvage high“-Gruppe ergaben sich jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der Zeit zwischen Symptombeginn und Aufnahme ($p=0,519$).

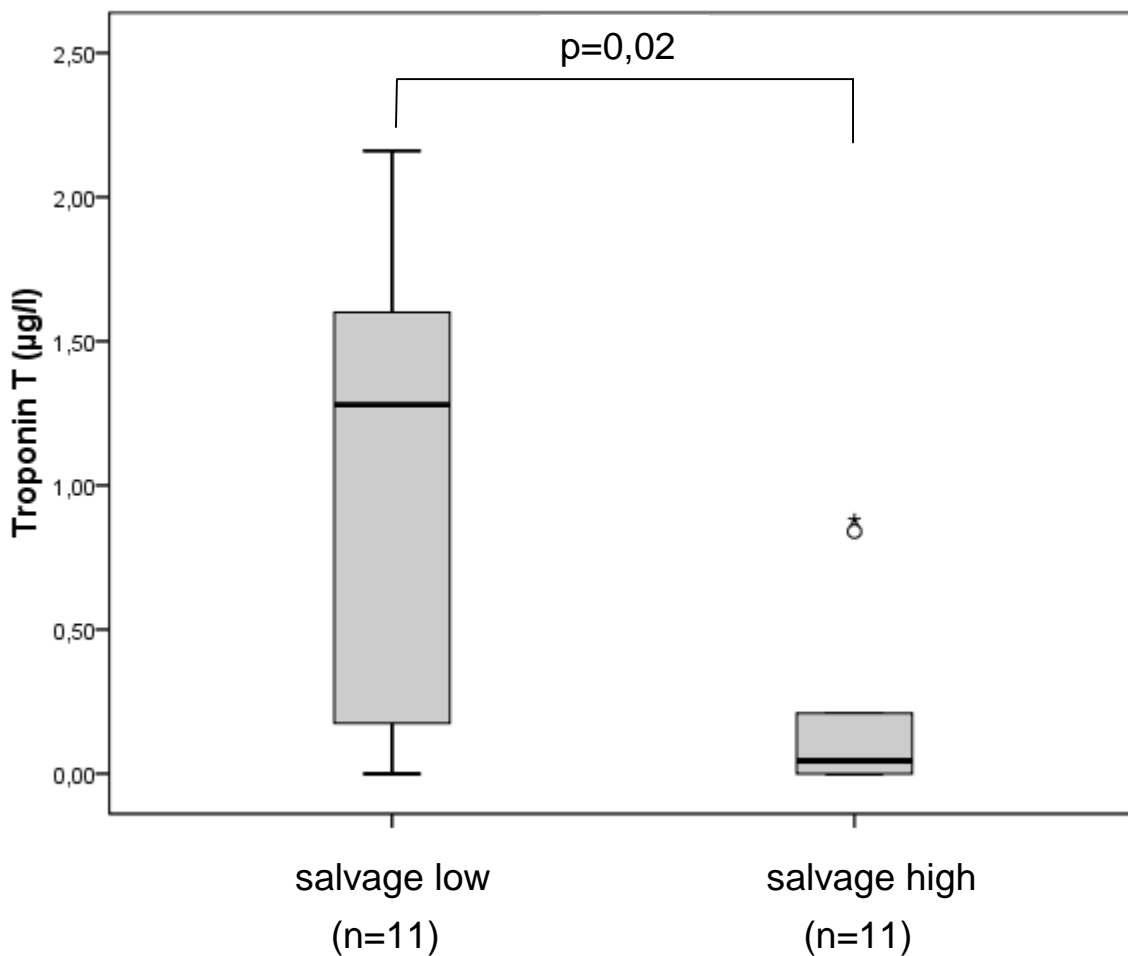


Abbildung 11: Troponin T im Gruppenvergleich

4.4.3. Zytokine

Die Zytokine IL-12, TNF α , IL-10, IL-6, IL-1 β , CCL2, und IL-8 waren jeweils in der „salvage high“-Gruppe im Mittelwert höher als die der „salvage low“-Gruppe.

Die Zytokine CXCL10, CXCL9 und VEGF waren dagegen in der „salvage high“-Gruppe gegenüber der „salvage low“-Gruppe erniedrigt. Eine Signifikanz ergab sich jedoch bei keinem der untersuchten Zytokine. (Tabelle 4, Abbildung 13 und 14).

	“salvage high” mit Salvage index >0,24	“salvage low” mit Salvage index <0,24	P
CCL2 (pg/ml)	153,87(148) \pm 35,5(n=11)	117,3(70,8) \pm 30,82(n=11)	n.S.
TNF α (pg/ml)	36,58(0) \pm 35,21(n=11)	1,73(0) \pm 1,04(n=11)	n.S.
IL-1 β (pg/ml)	694,28(0) \pm 678,49(n=10)	17,88(0) \pm 8,12(n=11)	n.S.
IL-6 (pg/ml)	33,75(0) \pm 18,59(n=11)	13,64(6,2) \pm 5,03(n=11)	n.S.
IL-8 (pg/ml)	19,95(12,2) \pm 4,61(n=11)	17,51(12,8) \pm 2,9(n=11)	n.S.
IL-12 (pg/ml)	89,66(2,25) \pm 86,02(n=10)	1,44(0) \pm 0,78(n=11)	n.S.
IL-10 (pg/ml)	3,69(0) \pm 2,28(n=10)	1,12(0) \pm 0,62(n=11)	n.S.
CXCL10 (pg/ml)	717,03(471,8) \pm 225,5(n=11)	765,52(569,2) \pm 243,12(n=11)	n.S.
CXCL9 (pg/ml)	932,87(801,2) \pm 277,67(n=11)	1001,42(544,1) \pm 281,75(n=11)	n.S.
VEGF (pg/ml)	97,81(52,4) \pm 36,49(n=11)	102,39(51,6) \pm 44,76(n=11)	n.S.

jeweils Mittelwert(Median) \pm sem

Tabelle 4: Zytokine im Vergleich zwischen „salvage high“-Gruppe und „salvage low“-Gruppe

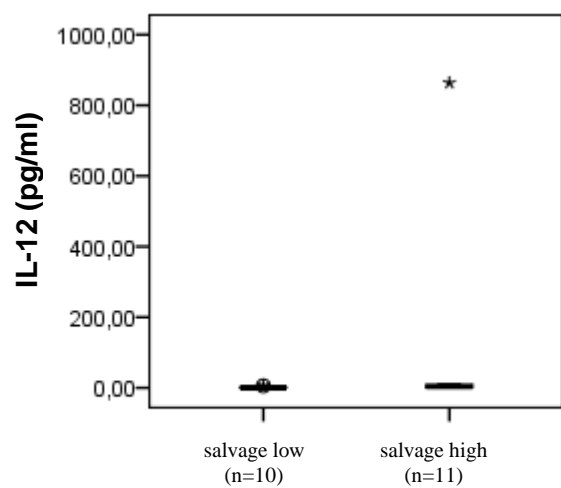
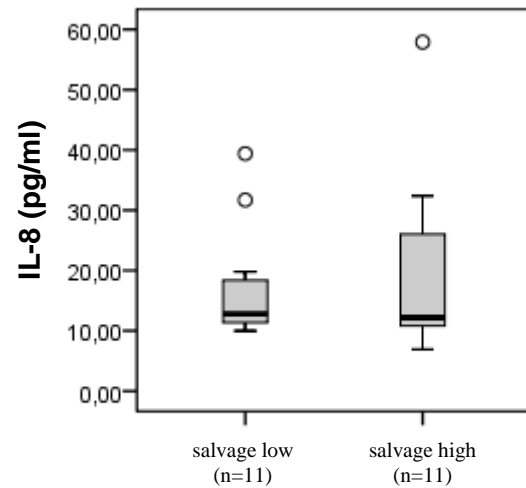
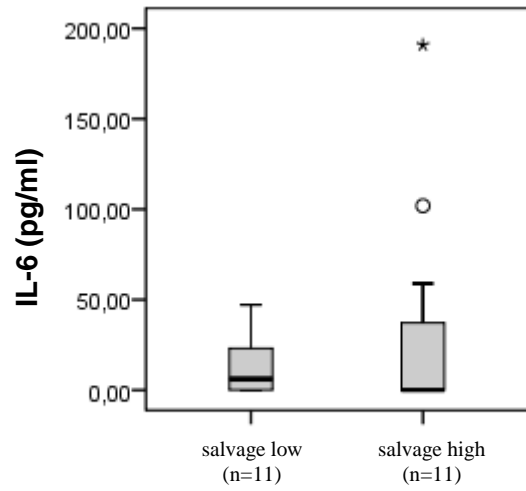
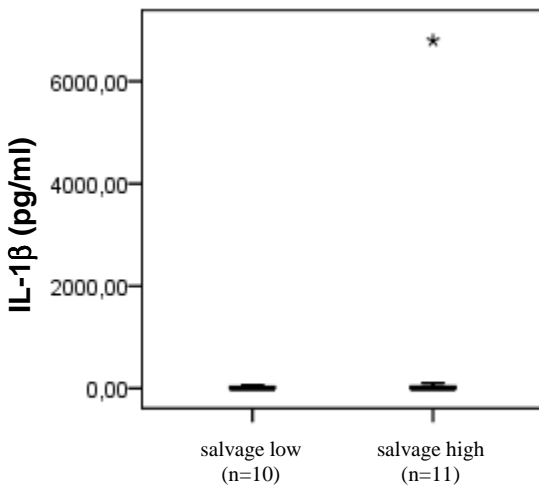
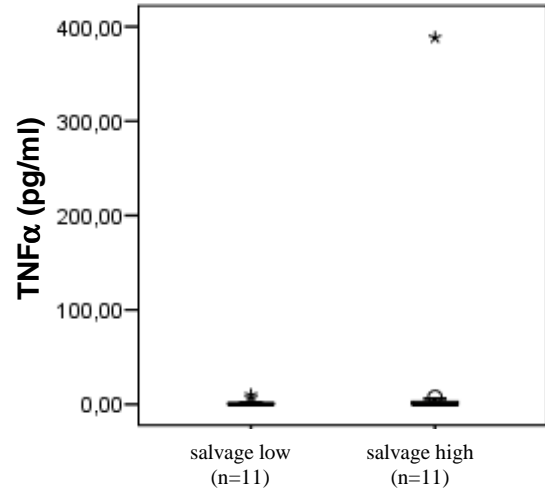
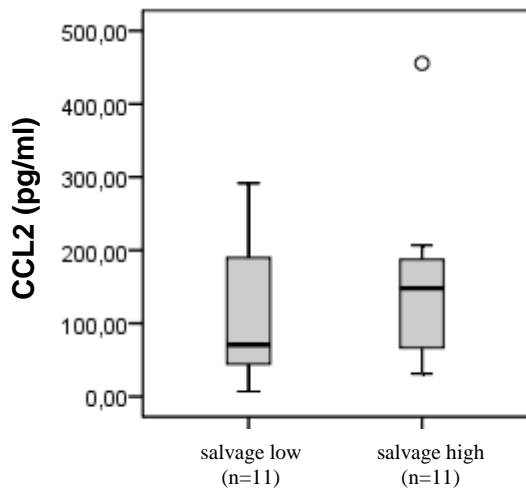


Abbildung 12: Zytokine im Gruppenvergleich(1)

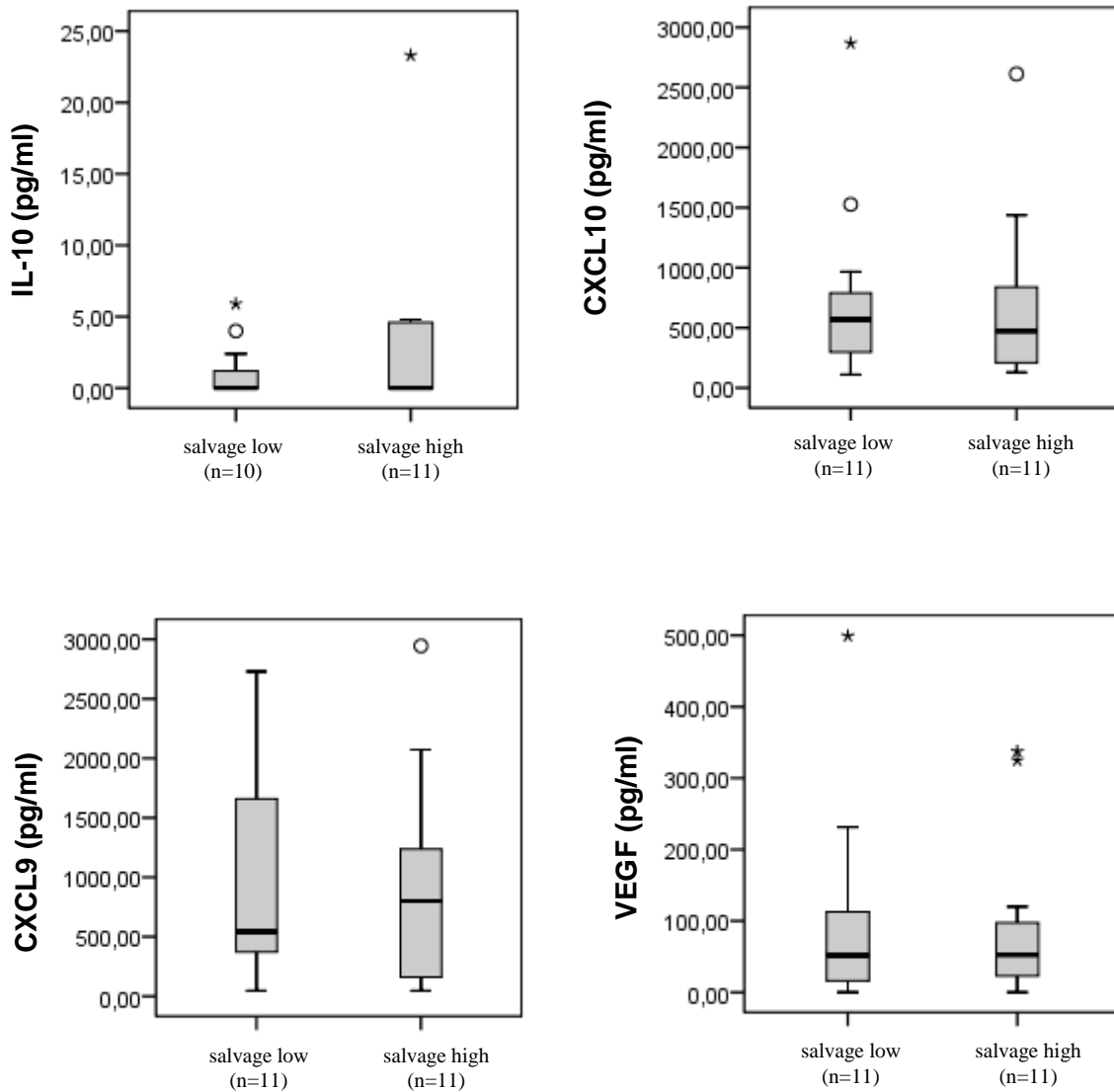


Abbildung 13: Zytokine im Gruppenvergleich(2)

4.4.4. Zirkulierende CD34+CD133+Vorläuferzellen

Die zirkulierenden CD34+CD133+Vorläuferzellen waren in der „salvage high“-Gruppe höher als in der „salvage low“-Gruppe. Der Mittelwert lag mit 5,82 Zellen/ μ l (\pm 1,28sem) mehr als doppelt so hoch in der „salvage high“-Gruppe verglichen mit der „salvage low“-Gruppe, deren Mittelwert bei 2,52 Zellen/ μ l (\pm 0,43sem) lag (Median 4,87 vs. 2,32 Zellen/ μ l). Der Unterschied ist mit $p=0,019$ signifikant (Abbildung 15).

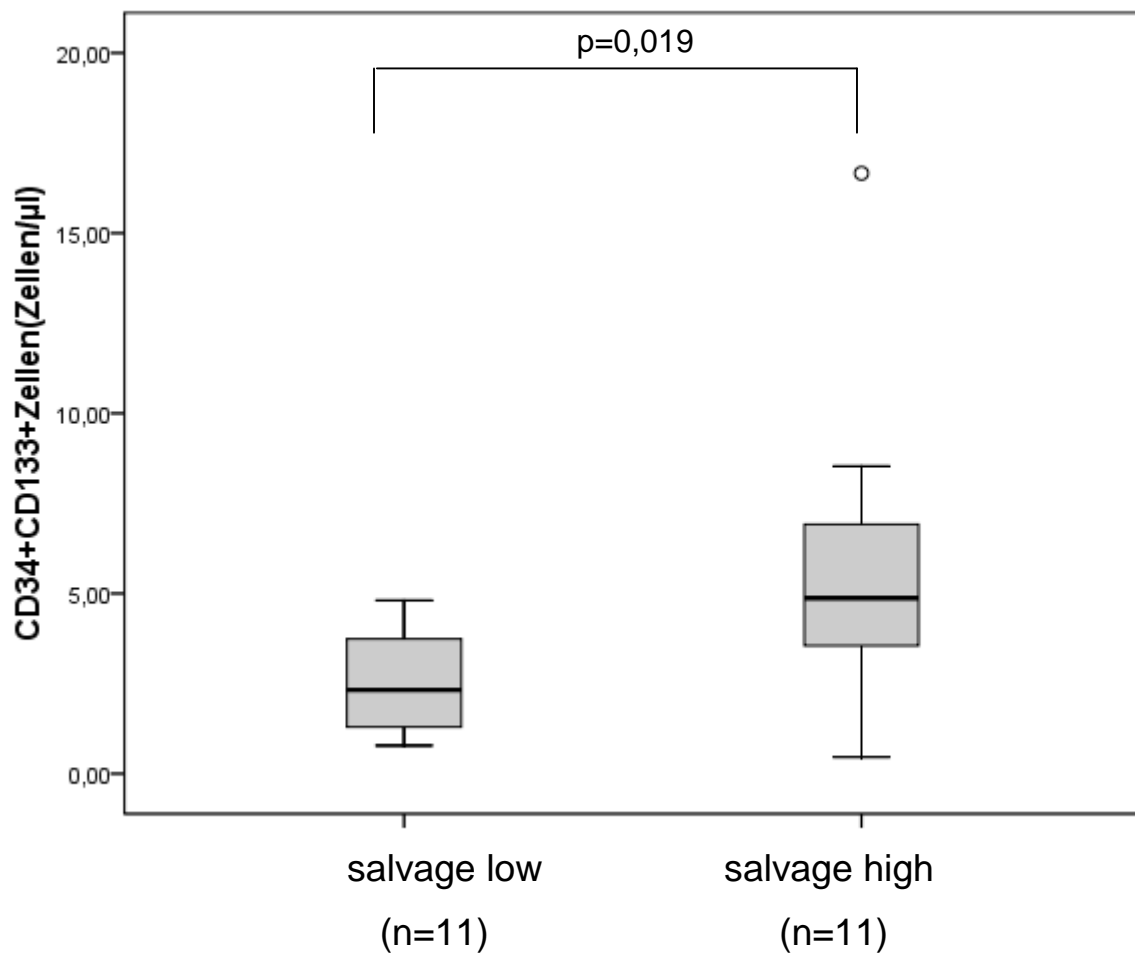


Abbildung 14: Zirkulierende Vorläuferzellen im Gruppenvergleich

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass nach einem akuten Myokardinfarkt Patienten mit einem höheren Salvage Index mehr zirkulierende CD34+CD133+Vorläuferzellen aufweisen als Patienten mit einem niedrigeren Salvage Index. Dagegen zeigten die Entzündungsparameter CRP und die Leukozytenzahl keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Auch die Anzahl der gemessenen Interleukine unterschied sich nicht signifikant. Unter den Herzenzymen war das bei Aufnahme gemessene Troponin T in der „salvage low“-Gruppe höher als in der „salvage high“-Gruppe. Die Maximalwerte während des stationären Aufenthaltes von Troponin T und CK/CK-MB unterschieden sich jedoch nicht.

5.2. Zirkulierende Vorläuferzellen im akuten Myokardinfarkt

5.2.1. Oberflächenmarker CD34 und CD133

Vorläuferzellen, die das Potential haben zu Endothelzellen zu differenzieren und in vitro Gefäßstrukturen zu bilden, wurden erstmalig 1997 beschrieben. Charakterisiert wurden sie durch den Oberflächenmarker CD34 [8]. CD34 wird jedoch sowohl auf hämatopoetischen Stammzellen (HSC) als auch auf differenzierten Endothelzellen exprimiert. Die Messung von im Blut zirkulierender Vorläuferzellen mittels CD34 würde daher durch CD34+Endothelzellen verfälscht werden. Daher wurde in dieser Studie zusätzlich der Marker CD133 verwendet, der ebenfalls auf Stamm- und Vorläuferzellen vorkommt, jedoch nicht auf differenzierten Endothelzellen. Um endotheliale Vorläuferzellen eindeutig von hämatopoetischen Vorläuferzellen abgrenzen zu können, muss zusätzlich ein Endothelmarker wie VEGFR nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht geklärt, ob es sich bei CD34+CD133+VEGFR2+ endothelialen Vorläuferzellen und CD34+CD133+Vorläuferzellen um zwei getrennte Populationen handelt, oder ob endotheliale Vorläuferzellen eine Subpopulation oder Abkömmlinge der CD34+CD133+Vorläuferzellen sind. Für letzteres spricht, dass CD34+CD133+Vorläuferzellen Eigenschaften aufweisen, die endothelialen Vorläuferzellen zugesprochen werden: In vitro differenzieren CD133+Zellen ebenfalls in

Endothelzellen [57]. Eine Mobilisation im akuten Myokardinfarkt wurde sowohl bei endothelialen Vorläuferzellen als auch bei CD34+CD133+Vorläuferzellen beobachtet [62].

Die zusätzliche Messung eines Endothelmarkers wie VEGFR2 ergibt folgende Problematik: Die Expression der Oberflächenmarker ändert sich während des Differenzierungsprozesses der Vorläuferzellen. Es wird vermutet, dass Endothelmarker erst später im Differenzierungsprozess ausgebildet werden. Wenn nur Vorläuferzellen gemessen werden, die einen bestimmten Endothelmarker exprimieren, besteht die Gefahr, dass nur ein Teil der gesuchten Zellen in die Messung einbezogen werden.

Des Weiteren ergeben sich bei der Messung der CD34+CD133+VEGFR2+Vorläuferzellen technische Probleme. Der Anteil von CD34+/CD133+/VEGFR2+Vorläuferzellen wird in der Literatur auf 0,002% der zirkulierenden mononukleären Zellen geschätzt [115]. Das bedeutet auf 50.000 durchflusszytometrisch gemessene Zellen kommt eine CD34+CD133+VEGFR2+Vorläuferzelle. Auch bei einer Steigerung der gemessenen Zellen auf 100.000 wäre die Streuung der gesuchten Zellen so hoch, dass die Ergebnisse nicht reliabel wären. Eine eigene Vorstudie erbrachte dementsprechend keine auswertbaren Ergebnisse. Eine weitere häufig verwendete Methode endotheliale Vorläuferzellen nachzuweisen ist es mononukleäre Zellen zu kultivieren. Die adhärenen Zellen, welche einen endothelialen Phänotyp aufweisen, der durch die Aufnahme von azetyliertem LDL (acLDL) und Bindung von Ulex-Lektin definiert ist, werden als endotheliale Vorläuferzellen angesehen. Rehman et al. wiesen jedoch nach, dass diese gemessenen Zellen keine endothelialen Vorläuferzellen sind, sondern Monozyten/Makrophagen-Marker exprimieren [117]. Daher wurde diese Methode zum Nachweis endothelialer Vorläuferzellen von uns nicht verwendet.

Grundmann et al. untersuchten in einer Studie die Mobilisation von Vorläuferzellen nach akutem Myokardinfarkt und untersuchten CD34+Vorläuferzellen, CD34+/CD133+Vorläuferzellen und CD34+/VEGFR2+Vorläuferzellen. Alle drei Zellpopulationen waren 4 Tage nach Myokardinfarkt gegenüber dem Ausgangswert erhöht [62]. Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass auch Vorläuferzellen ohne nachgewiesenen Endothelmarker zur Regeneration nach Myokardinfarkt beitragen können.

Daher wurden in unserer Studie Vorläuferzellen mit den Oberflächenmarkern CD34 und CD133 untersucht, die den endothelialen Vorläuferzellen bezüglich der Differenzierung und Mobilisation vergleichbar sind und reliabel mittels Durchflusszytometrie gemessen werden können.

5.2.2. Bedeutung von zirkulierenden Vorläuferzellen im akuten Myokardinfarkt

Zirkulierende Vorläuferzellen können zur Reparatur von ischämisch geschädigten Organen beitragen. Sie stimulieren Neovaskularisierung und Reendothelialisierung verletzter Blutgefäße [7, 144]. Kleinere Studien ergaben, dass sowohl endotheliale und hämatopoetische als auch mesenchymale Vorläuferzellen zur Regeneration des Myokards nach einem Myokardinfarkt beitragen können [27, 75].

Inwieweit Vorläuferzellen zur Restitution der Myokardfunktion nach akutem Myokardinfarkt notwendig sind und inwiefern dies klinisch zu nutzen ist, konnte bisher jedoch nicht abschließend geklärt werden.

Erste Hinweise erbrachten die tierexperimentellen Studien von Orlic et al., bei denen Mäusen nach Myokardinfarkt Knochenmarksvorläuferzellen infundiert wurden. Es zeigte sich bei den behandelten Mäusen eine verbesserte Kontraktilität sowie eine kleinere Infarktnarbe [112, 113]. Unter den klinischen Studien an Patienten sind insbesondere die TOPCARE-AMI Studie zu erwähnen, in der sich nach erfolgreicher perkutaner Reperfusion und intrakoronarer Vorläuferzellinfusion eine verbesserte linksventrikuläre Funktion sowie eine im MRT nachgewiesene Abnahme der Infarktgröße zeigte [125]. Des Weiteren konnte eine Normalisierung der koronaren Flussreserve im Infarktgefäß innerhalb von 4 Monaten bei den mit Vorläuferzellen behandelnden Patienten nachgewiesen werden, was als Parameter für die Vaskularisierung des Myokards gewertet werden kann [126, 128]. Dies entspricht der Beobachtung, dass Vorläuferzellen die Neovaskularisierung stimulieren. Weitere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen, dagegen konnten in der ASTAMI-Studie mit 100 Patienten keine Unterschiede zwischen den mit Knochenmarkszellen behandelten Patienten im Vergleich zur Placebo-Gruppe nachgewiesen werden [96, 127, 162]. Zusammenfassend kann bisher keine eindeutige Aussage über eine Verbesserung der klinischen Parameter durch infundierte Vorläuferzellen gemacht werden. Eine genauere Analyse der Vorläuferzellpopulationen wurde in diesen Studien nicht vorgenommen.

Auch die Mobilisierung von Vorläuferzellen durch die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor G-CSF hatte beim Menschen keinen Einfluss auf die Infarktgröße [170].

Über die Bedeutung der endogenen Mobilisierung von Vorläuferzellen nach einem Myokardinfarkt und deren mögliche positive Effekte ist ebenfalls wenig bekannt. Werner et al. konnten bei 519 Patienten mit koronarer Herzerkrankung nachweisen, dass eine erhöhte Anzahl von endothelialen Vorläuferzellen mit einem erniedrigten Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis assoziiert ist [161]. Laut einer weiteren Studie stellen endotheliale

Vorläuferzellen einen Marker für die Prognose kardiovaskulärer Ereignisse dar [130]. Inwieweit sich die endogene Mobilisierung der Vorläuferzellen auf den Verlauf des akuten Myokardinfarkts positiv auswirkt, wurde bisher nicht sicher geklärt.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass CD34+CD133+Vorläuferzellen positiv assoziiert sind mit dem geretteten Myokard im Verlauf eines Infarkts. Patienten mit einem höheren Anteil geretteten Myokards (Salvage Index) wiesen mehr CD34+CD133+Vorläuferzellen auf als Patienten mit einem niedrigeren Anteil geretteten Myokards. Aus diesem Ergebnis lässt sich ein positiver Effekt der CD34+CD133+Vorläuferzellen auf das potentiell zu rettende Gewebe („Myocardium at risk“) und damit auf die Infarktausdehnung vermuten. Sowohl der Salvage Index als auch die Infarktausdehnung stellen einen Prädiktor der Mortalität dar und sind daher von immenser klinischer Bedeutung [107]. Damit ergibt sich ein Hinweis darauf, dass Vorläuferzellen den klinischen Verlauf nach einem Myokardinfarkt positiv beeinflussen können.

Ein eindeutiger kausaler Zusammenhang zwischen CD34+CD133+Vorläuferzellen und dem myokardialen Salvage kann aus dem Ergebnis dieser Studie jedoch nicht abgeleitet werden. Möglich wäre ebenfalls, dass andere Faktoren, die das Myokard positiv beeinflussen, zusätzlich die Mobilisation von Vorläuferzellen stimulieren.

5.2.3. Wirkmechanismen der zirkulierenden Vorläuferzellen

In experimentellen Studien ergaben sich bereits Hinweise auf die Wirkmechanismen der Vorläuferzellen. Einer der ersten Erklärungsansätze war die Transdifferenzierung von Vorläuferzellen in Kardiomyozyten. In-vitro-Versuche konnten diese Hypothese bestätigen, aber auch bei ersten tierexperimentellen Studien ergaben sich Hinweise auf eine Transdifferenzierung von endothelialen Vorläuferzellen in Kardiomyozyten und deren Ansiedelung im Infarktgebiet [10, 113]. Mittlerweile wird diese Hypothese jedoch in Frage gestellt, da weitere Studien in vivo keinen Anhalt für eine Transdifferenzierung ergaben [13, 104]. Dennoch konnte auch in diesen Studien eine positive Beeinflussung der Myokardfunktion nachgewiesen werden, sodass andere Wirkmechanismen der Vorläuferzellen überdacht werden mussten. Die Möglichkeit einer Zellfusion wurde ebenfalls diskutiert [109]. Ein weiterer vielversprechender Wirkmechanismus der Vorläuferzellen sind parakrine Effekte durch die Freisetzung von Zytokinen. In vitro zeigten endotheliale und hämatopoetische Vorläuferzellen eine deutlich Ausschüttung des Wachstumsfaktors VEGF, der an der Neovaskularisierung beteiligt ist und damit die endogenen Reparaturmechanismen

unterstützen kann [152]. Daher wird der Zytokinproduktion von Vorläuferzellen die entscheidende Rolle in deren Wirkmechanismen beigemessen.

In der vorliegenden Studie konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Anzahl von CD34+CD133+Vorläuferzellen und VEGF nachgewiesen werden. Auch die Analyse der anderen gemessenen Zytokine ergab keine Assoziation zu der Anzahl der CD34+CD133+Vorläuferzellen.

5.2.4. Rekrutierung von Vorläuferzellen

Für Vorläuferzellen sind die Mobilisation und das „Homing“ zum geschädigten Gewebe entscheidend um funktionell wirksam zu werden. Die dabei wichtigsten in dieser Studie untersuchten Zytokine sind IL-8 und VEGF. Sie stimulieren die Mobilisation von endothelialen und hämatopoetischen Vorläuferzellen und steigen im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion nach einem Myokardinfarkt an [41, 66, 86, 131, 136]. Eine Assoziation der Anzahl der CD34+CD133+Vorläuferzellen mit den genannten Zytokinen konnte jedoch in der vorliegenden Studie nicht gefunden werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die einzelnen Zytokine nicht die Anzahl der CD34+CD133+Vorläuferzellen beeinflussen. Die Mobilisation der Vorläuferzellen könnte jedoch durch ein multifaktorielles Geschehen bedingt sein, bei dem auch Zytokine eine Rolle spielen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre der frühe Zeitpunkt der Messung nach dem Myokardinfarkt, zu dem die Aktivierung der Zytokinkaskaden erst initiiert wurde und die Zytokine ihre Wirkung noch nicht entfalten konnten.

5.3. Zytokine im akuten Myokardinfarkt

Nach einem Myokardinfarkt kommt es zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion. Zum einen kann diese potentiell den Kardiomyozyten schaden, zum anderen zeigte sich, dass die Entzündungsphase unabdingbar für den Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt ist um geschädigtes Gewebe und tote Zellen im Infarktareal zu beseitigen. Insbesondere das Gleichgewicht zwischen entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Zytokinen sowie der angiostatischen und proangiogenetischen Zytokine ist essentiell für den optimalen zeitlichen Ablauf der Entzündungsreaktion [46].

Zu den in dieser Studie untersuchten proinflammatorischen Zytokinen gehören IL-6, IL-8, TNF α , CCL2 und IL-1 β , von denen zumindest in Tierversuchen eine Induktion durch einen

Myokardinfarkt gezeigt werden konnte. Der Mittelwert der Zytokinkonzentrationen war zwar für alle proinflammatorischen Zytokine in der „salvage high“-Gruppe erhöht im Vergleich zur „salvage low“-Gruppe, einen signifikanten Unterschied gab es jedoch nicht. Es konnte also weder eine positive noch eine negative Assoziation der proinflammatorischen Zytokine zu dem „myocardium at risk“ belegt werden. Demgegenüber zeigten Bennermo et al. 2004, dass Patienten nach Myokardinfarkt mit einem höheren IL-6 Spiegel bei Aufnahme eine schlechtere Prognose haben [18]. Andere Studien wiesen Korrelationen von IL-6 zur Prognose erst zu einem späteren Zeitpunkt und nicht bei Aufnahme nach, sodass eine fehlende Assoziation der proinflammatorischen Zytokine zum Salvage Index in der vorliegenden Studie auch durch den frühen Zeitpunkt der Bestimmung erklärt werden kann [169].

Als Gegenspieler wurde das antiinflammatorisch wirksame Interleukin 10 (IL-10) gemessen, das ein Überschießen der Entzündungsreaktion verhindern soll und proinflammatorische Zytokine supprimiert. Die Bedeutung von IL-10 im Myokardinfarkt wird jedoch kontrovers diskutiert. Yang et al. zeigten, dass IL-10 defiziente Mäuse eine erhöhte Mortalität und eine gesteigerte Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt hatten [164]. Weitere Studien konnten zwar eine leichtgradig gesteigerte Entzündungsreaktion bei IL-10 defizienten Mäusen bestätigen, eine Assoziation zur Mortalität fanden sie jedoch nicht. Zusätzlich zeigten sie, dass der zeitliche Ablauf der Entzündungsreaktion und vor allem deren Rückbildung bei IL-10 defizienten Mäusen nicht gestört ist [171]. Auch in der vorliegenden Studie konnte keine signifikante Assoziation zwischen IL-10 und dem geretteten Myokard nachgewiesen werden. Daher kann vermutet werden, dass IL-10 für den Rückgang der Entzündungsreaktion und die Auswirkungen auf die überlebenden Kardiomyozyten nur eine untergeordnete Rolle spielt und andere Faktoren von größerer Bedeutung in diesem Zusammenhang sind.

Eine wichtige Funktion haben die angiostatischen Zytokine wie CXCL9 und CXCL10 als Gegenspieler der pro-angiogenetischen Zytokinen wie IL-8, um eine verfrühte Angiogenese zu verhindern. Über den Verlauf von CXCL9 ist bisher nichts bekannt. CXCL10 zeigt nach einem Myokardinfarkt einen frühen, nur für kurze Zeit bestehenden Anstieg. Es wird hypothesiert, dass CXCL10 die Angiogenese verhindert bis tote Zellen und Debris durch infiltrierende Phagozyten entsorgt werden konnten. Damit könnte CXCL10 für die Steuerung des zeitlichen Ablauf des Heilungsprozesses essentiell sein. Eine überschießende Reaktion könnte jedoch auch eine Supprimierung der Angiogenese darstellen. Für diese mögliche negative Auswirkung ergaben sich in unserer Studie Hinweise, da eine etwas erniedrigte Konzentration von CXCL9 und CXCL10 in der „salvage high“-Gruppe im Vergleich zur

„salvage low“-Gruppe nachzuweisen war. Also profitierten die Patienten mit weniger CXCL9/CXCL10 in Bezug auf das gerettete Myokard. Der Gruppenunterschied war jedoch nur geringfügig und nicht signifikant.

An der Neoangiogenese ist auch der Wachstumsfaktor VEGF beteiligt, der die Proliferation und Migration von Endothelzellen beeinflusst [19, 71, 115]. In vitro konnte durch die Gabe von VEGF bereits eine Verbesserung der Gewebsperfusion erzielt werden [16]. Daher wird auch im akuten Myokardinfarkt ein Benefit durch VEGF vermutet. In unserer Studie zeigte sich jedoch in der „salvage high“-Gruppe eine im Vergleich erniedrigte Konzentration von VEGF. Da dieser Unterschied nicht signifikant und der Abstand der Mittelwerte nur geringfügig war, lässt sich dieses Ergebnis nicht eindeutig werten.

Zusammenfassend ließen sich in der vorliegenden Studie keine weiteren Assoziationen zwischen Zytokinen und dem geretteten Myokard nach Myokardinfarkt nachweisen. Als mögliche Ursache lässt sich der frühe Bestimmungszeitpunkt diskutieren, da die Blutentnahmen unmittelbar nach Aufnahme erfolgte, zu einem Zeitpunkt an dem die Zytokinkaskaden erst initiiert wurden. Des Weiteren erfolgte die Rekanalisationstherapie und deren Beeinflussung der Zytokinausschüttung erst nach der Abnahme.

5.4. Troponin T

Troponin ist ein Proteinkomplex, der aus den Untereinheiten C, I und T besteht. Die Untereinheiten I und T kommen nur im Herzmuskel vor. Bei Zellschädigung wird Troponin in den Blutkreislauf freigesetzt und kann dort bestimmt werden. Troponin T und Troponin I sind hochspezifische und sensitive Marker eines Myokardschadens [110]. Nach einem Myokardinfarkt steigen Troponin T und I innerhalb von 4-6 Stunden im Blutkreislauf an. In dieser Studie zeigte sich das Troponin T bei Aufnahme bei Patienten der „salvage low“-Gruppe höher im Vergleich zu Patienten der „salvage high“-Gruppe. Die Maximalwerte von Troponin T im Verlauf des stationären Aufenthaltes unterschieden sich zwischen den Gruppen jedoch nicht. Mit diesem Ergebnis übereinstimmend konnte bereits nachgewiesen werden, dass Troponin T bei Aufnahme mit einem schlechteren klinischen Verlauf bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt assoziiert ist [59]. Eine weitere Studie, die Troponin I bei Aufnahme untersuchte, zeigte allerdings keine Assoziation zwischen Troponin I und dem myokardialen Salvage [90].

Ein möglicher Erklärungsansatz für die in dieser Studie nachgewiesene negative Assoziation von Troponin T bei Aufnahme und dem myokardialen Salvage stellt die positive Korrelation zwischen Troponin T und der Zeit zwischen Symptombeginn und Aufnahme dar. Allerdings

ergeben sich zwischen den Patienten der „salvage high“- und „salvage low“-Gruppe keine Unterschiede hinsichtlich der Zeit zwischen Auftreten der Symptome und Aufnahme im Krankenhaus. Es kann diskutiert werden, ob Troponin T bei Aufnahme einen genaueren Marker für die Dauer der Ischämie darstellt, als die subjektiven Angaben der Schmerzdauer des Patienten.

5.5. Studienbeschränkungen

Aufgrund der relativ niedrigen Patientenzahl dieser Studie können die Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die Zytokine bei fehlenden Signifikanzen nicht eindeutig gewertet werden. Signifikante Unterschiede können sich potentiell bei höherer Patientenzahl noch ergeben.

Des Weiteren muss der frühe Abnahmezeitpunkt im zeitlichen Verlauf des Myokardinfarkts berücksichtigt werden. Von vielen Zytokinen und Entzündungsparametern ist bekannt, dass sie erst im zeitlichen Verlauf durch einen Infarkt beeinflusst werden. So kann der Zeitpunkt der Bestimmung von Bedeutung für die Assoziation zu anderen Parametern sein. In dieser Studie wurden die zirkulierenden Vorläuferzellen und die Zytokine jedoch ausschließlich zum Zeitpunkt der Aufnahme noch vor der Rekanalisationstherapie bestimmt.

5.6. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass das gerettete Myokard (der Salvage Index) nach einem Myokardinfarkt mit zirkulierenden CD34+CD133+Vorläuferzellen positiv assoziiert ist. Dies ist von großer Bedeutung, da die Rettung des Myokards eines der wichtigsten therapeutischen Ziele nach einem Myokardinfarkt darstellt und für die Mortalität sowie den weiteren Verlauf entscheidend ist.

Eine Assoziation zwischen Anzahl der CD34+CD133+Vorläuferzellen und Zytokinkonzentration wurde in dieser Studie nicht nachgewiesen. Damit bleibt der Wirkmechanismus der Vorläuferzellen weiterhin unklar. Die Hypothese, dass Vorläuferzellen über die Freisetzung von Zytokinen ihre Wirkung entfalten, kann in dieser Studie nicht bestätigt werden.

Eine Beeinflussung des geretteten Myokards durch zirkulierende Zytokine zeigte sich in der vorliegenden Studie nicht.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass CD34+CD133+Vorläuferzellen eine wichtige Rolle im Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt spielen können. Für eine mögliche therapeutische Anwendung müssen jedoch Wirk- und Mobilisationsmechanismen noch weiter untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Vorläuferzellen sind Abkömmlinge adulter Stammzellen und werden im akuten Myokardinfarkt aus dem Knochenmark mobilisiert. Es wird vermutet, dass zirkulierende Vorläuferzellen von großer Bedeutung für den Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt sein können, da sie Angiogenese, Vaskulogenese und Reendothelialisierung stimulieren. Des Weiteren spielt im Heilungsprozess die Entzündungsreaktion mit der Ausschüttung von Zytokinen eine wichtige Rolle. In dieser Studie wurde die Assoziation von zirkulierenden CD34+CD133+Vorläuferzellen und zirkulierenden Zytokinen mit dem geretteten Myokard (Salvage Index) bei Patienten im akutem Myokardinfarkt untersucht.

In die Studie wurden 22 Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt eingeschlossen. Die Anzahl zirkulierender CD34+CD133+Vorläuferzellen wurde aus dem Serum mittels Durchflusszytometrie anhand der Oberflächenmarker CD45, CD34 und CD133 quantitativ bestimmt. Die quantitative Bestimmung der Zytokine CCL2, CXCL9, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF- α erfolgte mittels Cytometric Bead Arrays (CBA). VEGF wurde mittels eines Sandwich Enzyme Immunoassay gemessen. Der Salvage Index wurde durch eine Myokardszintigraphie mit TC^{99m} Sestamibi bestimmt.

In dieser Studie zeigte sich, dass bei Patienten mit einem höheren Salvage Index eine höhere Anzahl von CD34+CD133+Vorläuferzellen nachgewiesen werden konnte als bei Patienten mit einem niedrigeren Salvage Index. Die Konzentration der untersuchten zirkulierenden Zytokine zeigte jedoch weder eine Assoziation zum myokardialen Salvage Index noch zur Anzahl der CD34+CD133+Vorläuferzellen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass CD34+CD133+Vorläuferzellen eine wichtige Rolle im Heilungsprozess nach einem Myokardinfarkt spielen können. Die Assoziation von CD34+CD133+Vorläuferzellen und dem geretteten Myokard (Salvage Index) ist von großer klinischer Bedeutung, da die Rettung des Myokards nach einem Myokardinfarkt eines der wichtigsten therapeutischen Ziele darstellt und für den weiteren klinischen Verlauf und die Mortalität entscheidend ist.

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

ACS	Akutes Koronarsyndrom
AK	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
APC	Allophycocyanin
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CBA	Cytometric Bead Arrays
CK	Creatinkinase
CKMB	Muscle-Brain Fraktion der Creatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
EF	Ejektionsfraktion
EPC	Endotheliale Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells)
EPO	Erythropoetin
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GE	Gefäßerkrankung
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HSC	Hämatopoetische Stammzellen (hematopoietic stem cells)
IFN	Interferon
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
IL-7	Interleukin 7
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
KHK	Koronare Herzkrankheit
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
MMP-9	Matrix Metalloproteinase-9
NO	Stickoxid
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
sem	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNFR2	Tumor necrosis factor receptor 2
TnT	Troponin T
VEGF	Vascular endothelial growth factor

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flüssigkeitssystem des Durchflusszytometers	24
Abbildung 2: Relative Fluoreszenzaktivität mit dem Fluorochrom APC (Allophycocyanin)...	25
Abbildung 3: Darstellung eines Histogramms und eines Dot Plot.....	26
Abbildung 4: Bestimmung der CD133+Zellen in R6	28
Abbildung 5: Bestimmung der CD34+Zellen in R3	29
Abbildung 6: Bestimmung aller CD34+CD133+Zellen aus R6 und R3.....	29
Abbildung 7: Prinzip der „Polar Maps“-Darstellung.	32
Abbildung 8: Initiale Perfusionsdefektgröße im Gruppenvergleich	38
Abbildung 9: Leukozytenzahl im Gruppenvergleich	40
Abbildung 10: C-reaktives Protein im Gruppenvergleich.....	41
Abbildung 11: Troponin T im Gruppenvergleich	42
Abbildung 12: Zytokine im Gruppenvergleich(1).....	44
Abbildung 13: Zytokine im Gruppenvergleich(2).....	45
Abbildung 14: Zirkulierende Vorläuferzellen im Gruppenvergleich.....	46

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Daten des Patientenkollektivs	36
Tabelle 2: Korrelation von Zytokinen und Entzündungsparametern mit zirkulierenden CD34+CD133+Vorläuferzellen	37
Tabelle 3: Patientenkollektiv „salvage high“ und „salvage low“	39
Tabelle 4: Zytokine im Vergleich zwischen „salvage high“-Gruppe und „salvage low“- Gruppe	43

7.4. Literaturverzeichnis

1. A. Aiuti, I. J. Webb, C. Bleul, T. Springer and J. C. Gutierrez-Ramos. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med.* 1997;185:111-20
2. E. P. Amento, N. Ehsani, H. Palmer and P. Libby. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:1223-30
3. A. L. Angiolillo, C. Sgadari, D. D. Taub, F. Liao, J. M. Farber, S. Maheshwari, H. K. Kleinman, G. H. Reaman and G. Tosato. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med.* 1995;182:155-62
4. V. Appay and S. L. Rowland-Jones. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001;22:83-7
5. W. P. Arend. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol.* 1993;54:167-227
6. C. Arnaud, F. Burger, S. Steffens, N. R. Veillard, T. H. Nguyen, D. Trono and F. Mach. Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1231-6
7. T. Asahara, H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Wagner and J. M. Isner. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-8
8. T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman and J. M. Isner. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-7
9. T. Asahara, T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver and J. M. Isner. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J.* 1999;18:3964-72
10. C. Badorff, R. P. Brandes, R. Popp, S. Rupp, C. Urbich, A. Aicher, I. Fleming, R. Busse, A. M. Zeiher and S. Dimmeler. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation.* 2003;107:1024-32
11. M. Baggiolini, B. Dewald and B. Moser. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 1994;55:97-179
12. F. H. Bahlmann, K. De Groot, J. M. Spandau, A. L. Landry, B. Hertel, T. Duckert, S. M. Boehm, J. Menne, H. Haller and D. Fliser. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood.* 2004;103:921-6

13. L. B. Balsam, A. J. Wagers, J. L. Christensen, T. Kofidis, I. L. Weissman and R. C. Robbins. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004;428:668-73
14. I. M. Barbash, P. Chouraqui, J. Baron, M. S. Feinberg, S. Etzion, A. Tessone, L. Miller, E. Guetta, D. Zipori, L. H. Kedes, R. A. Kloner and J. Leor. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003;108:863-8
15. B. Barleon, S. Sozzani, D. Zhou, H. A. Weich, A. Mantovani and D. Marme. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 1996;87:3336-43
16. C. Bauters, T. Asahara, L. P. Zheng, S. Takeshita, S. Bunting, N. Ferrara, J. F. Symes and J. M. Isner. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation*. 1995;91:2802-9
17. M. Benaglio, A. Azzurri, A. Ciervo, A. Amedei, C. Tamburini, M. Ferrari, J. L. Telford, C. T. Baldari, S. Romagnani, A. Cassone, M. M. D'Elia and G. Del Prete. T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:6658-63
18. M. Bennermo, C. Held, F. Green, L. E. Strandberg, C. G. Ericsson, L. O. Hansson, H. Watkins, A. Hamsten and P. Tornvall. Prognostic value of plasma interleukin-6 concentrations and the -174 G > C and -572 G > C promoter polymorphisms of the interleukin-6 gene in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis. *Atherosclerosis*. 2004;174:157-63
19. G. Bergers, K. Javaherian, K. M. Lo, J. Folkman and D. Hanahan. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*. 1999;284:808-12
20. L. M. Biasucci, A. Vitelli, G. Liuzzo, S. Altamura, G. Caligiuri, C. Monaco, A. G. Rebuzzi, G. Ciliberto and A. Maseri. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation*. 1996;94:874-7
21. E. Braunwald. Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival. Should the paradigm be expanded? *Circulation*. 1989;79:441-4
22. J. Brown, M. F. Greaves and H. V. Molgaard. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*. 1991;3:175-84
23. F. D. Camargo, R. Green, Y. Capetanaki, K. A. Jackson and M. A. Goodell. Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med*. 2003;9:1520-7
24. D. J. Ceradini, A. R. Kulkarni, M. J. Callaghan, O. M. Tepper, N. Bastidas, M. E. Kleinman, J. M. Capla, R. D. Galiano, J. P. Levine and G. C. Gurtner. Progenitor cell

- trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004;10:858-64
25. G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton and J. Middleton. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25:2739-49
 26. E. Chavakis, A. Aicher, C. Heeschen, K. Sasaki, R. Kaiser, N. El Makhfi, C. Urbich, T. Peters, K. Scharffetter-Kochanek, A. M. Zeiher, T. Chavakis and S. Dimmeler. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med.* 2005;201:63-72
 27. S. L. Chen, W. W. Fang, F. Ye, Y. H. Liu, J. Qian, S. J. Shan, J. J. Zhang, R. Z. Chunhua, L. M. Liao, S. Lin and J. P. Sun. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004;94:92-5
 28. G. Chironi, L. Walch, M. G. Pernollet, J. Gariépy, J. Levenson, F. Rendu and A. Simon. Decreased number of circulating CD34+KDR+ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2007;191:115-20
 29. A. Chuntharapai, J. Lee, C. A. Hebert and K. J. Kim. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J Immunol.* 1994;153:5682-8
 30. M. Clauss, H. Weich, G. Breier, U. Knies, W. Rockl, J. Waltenberger and W. Risau. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 1996;271:17629-34
 31. M. J. Craig and R. D. Loberg. CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) in cancer bone metastases. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:611-9
 32. A. D'Andrea, M. Aste-Amezaga, N. M. Valiante, X. Ma, M. Kubin and G. Trinchieri. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* 1993;178:1041-8
 33. M. J. Davies. The composition of coronary-artery plaques. *N Engl J Med.* 1997;336:1312-4
 34. J. A. de Lemos, D. A. Morrow, M. S. Sabatine, S. A. Murphy, C. M. Gibson, E. M. Antman, C. H. McCabe, C. P. Cannon and E. Braunwald. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;107:690-5
 35. R. de Waal Malefyt, J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor and J. E. de Vries. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991;174:1209-20

36. O. Dewald, P. Zymek, K. Winkelmann, A. Koerting, G. Ren, T. Abou-Khamis, L. H. Michael, B. J. Rollins, M. L. Entman and N. G. Frangogiannis. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res.* 2005;96:881-9
37. S. Dimmeler, A. M. Zeiher and M. D. Schneider. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest.* 2005;115:572-83
38. C. A. Dinarello. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* 1991;77:1627-52
39. C. A. Dinarello. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996;87:2095-147
40. J. M. Farber. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:5238-42
41. W. E. Fibbe, J. F. Pruijt, Y. van Kooyk, C. G. Figdor, G. Opdenakker and R. Willemze. The role of metalloproteinases and adhesion molecules in interleukin-8-induced stem-cell mobilization. *Semin Hematol.* 2000;37:19-24
42. L. Fina, H. V. Molgaard, D. Robertson, N. J. Bradley, P. Monaghan, D. Delia, D. R. Sutherland, M. A. Baker and M. F. Greaves. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood.* 1990;75:2417-26
43. G. H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein and M. L. Breitman. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995;376:66-70
44. N. G. Frangogiannis. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res.* 2004;53:585-95
45. N. G. Frangogiannis. The role of the chemokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004;2:163-74
46. N. G. Frangogiannis. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008;58:88-111
47. N. G. Frangogiannis and M. L. Entman. Targeting the chemokines in myocardial inflammation. *Circulation.* 2004;110:1341-2
48. N. G. Frangogiannis and M. L. Entman. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15:163-9
49. N. G. Frangogiannis, M. L. Lindsey, L. H. Michael, K. A. Youker, R. B. Bressler, L. H. Mendoza, R. N. Spengler, C. W. Smith and M. L. Entman. Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation.* 1998;98:699-710
50. N. G. Frangogiannis, L. H. Mendoza, M. Lewallen, L. H. Michael, C. W. Smith and M. L. Entman. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *Faseb J.* 2001;15:1428-30

51. N. G. Frangogiannis, L. H. Mendoza, M. L. Lindsey, C. M. Ballantyne, L. H. Michael, C. W. Smith and M. L. Entman. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol.* 2000;165:2798-808
52. N. G. Frangogiannis, C. W. Smith and M. L. Entman. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53:31-47
53. J. Frostegard, A. K. Ulfgren, P. Nyberg, U. Hedin, J. Swedenborg, U. Andersson and G. K. Hansson. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999;145:33-43
54. M. Fuchs, A. Hilfiker, K. Kaminski, D. Hilfiker-Kleiner, Z. Guener, G. Klein, E. Podewski, B. Schieffer, S. Rose-John and H. Drexler. Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *Faseb J.* 2003;17:2118-20
55. R. M. Gallucci, P. P. Simeonova, J. M. Matheson, C. Kommineni, J. L. Guriel, T. Sugawara and M. I. Luster. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. *Faseb J.* 2000;14:2525-31
56. M. Gawaz, F. J. Neumann, T. Dickfeld, W. Koch, K. L. Laugwitz, H. Adelsberger, K. Langenbrink, S. Page, D. Neumeier, A. Schomig and K. Brand. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation.* 1998;98:1164-71
57. U. M. Gehling, S. Ergun, U. Schumacher, C. Wagener, K. Pantel, M. Otte, G. Schuch, P. Schafhausen, T. Mende, N. Kilic, K. Kluge, B. Schafer, D. K. Hossfeld and W. Fiedler. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood.* 2000;95:3106-12
58. T. Germann, M. K. Gately, D. S. Schoenhaut, M. Lohoff, F. Mattner, S. Fischer, S. C. Jin, E. Schmitt and E. Rude. Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur J Immunol.* 1993;23:1762-70
59. E. Giannitsis, M. Muller-Bardorff, S. Lehrke, U. Wiegand, R. Tolg, B. Weidtmann, F. Hartmann, G. Richardt and H. A. Katus. Admission troponin T level predicts clinical outcomes, TIMI flow, and myocardial tissue perfusion after primary percutaneous intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Circulation.* 2001;104:630-5
60. R. J. Gibbons, T. D. Miller and T. F. Christian. Infarct size measured by single photon emission computed tomographic imaging with (99m)Tc-sestamibi: A measure of the efficacy of therapy in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2000;101:101-8
61. M. Gill, S. Dias, K. Hattori, M. L. Rivera, D. Hicklin, L. Witte, L. Girardi, R. Yurt, H. Himmel and S. Rafii. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res.* 2001;88:167-74

62. F. Grundmann, C. Scheid, D. Braun, C. Zobel, H. Reuter, R. H. Schwinger and J. Muller-Ehmsen. 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.* 2007;96:621-7
63. R. Handgretinger, P. R. Gordon, T. Leimig, X. Chen, H. J. Buhring, D. Niethammer and S. Kuci. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;996:141-51
64. G. K. Hansson, M. Hellstrand, L. Rymo, L. Rubbia and G. Gabbiani. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med.* 1989;170:1595-608
65. G. K. Hansson, J. Holm and L. Jonasson. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol.* 1989;135:169-75
66. K. Hattori, B. Heissig, K. Tashiro, T. Honjo, M. Tateno, J. H. Shieh, N. R. Hackett, M. S. Quitarano, R. G. Crystal, S. Rafii and M. A. Moore. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 2001;97:3354-60
67. C. Heeschen, A. Aicher, R. Lehmann, S. Fichtlscherer, M. Vasa, C. Urbich, C. Mildner-Rihm, H. Martin, A. M. Zeiher and S. Dimmeler. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood.* 2003;102:1340-6
68. B. Heissig, K. Hattori, S. Dias, M. Friedrich, B. Ferris, N. R. Hackett, R. G. Crystal, P. Besmer, D. Lyden, M. A. Moore, Z. Werb and S. Rafii. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 2002;109:625-37
69. B. E. Henricson, R. Neta and S. N. Vogel. An interleukin-1 receptor antagonist blocks lipopolysaccharide-induced colony-stimulating factor production and early endotoxin tolerance. *Infect Immun.* 1991;59:1188-91
70. J. M. Hill, G. Zalos, J. P. Halcox, W. H. Schenke, M. A. Waclawiw, A. A. Quyyumi and T. Finkel. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600
71. J. Holash, P. C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos and S. J. Wiegand. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science.* 1999;284:1994-8
72. M. Hristov, W. Erl and P. C. Weber. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1185-9
73. M. W. Irwin, S. Mak, D. L. Mann, R. Qu, J. M. Penninger, A. Yan, F. Dawood, W. H. Wen, Z. Shou and P. Liu. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation.* 1999;99:1492-8

74. A. S. Iskandrian. Is redistribution important in sestamibi myocardial imaging? *J Nucl Med.* 1991;32:1966-7
75. H. Iwata and M. Sata. Potential contribution of bone marrow-derived precursors to vascular repair and lesion formation: lessons from animal models of vascular diseases. *Front Biosci.* 2007;12:4157-67
76. Y. Jung, J. Wang, A. Schneider, Y. X. Sun, A. J. Koh-Paige, N. I. Osman, L. K. McCauley and R. S. Taichman. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone.* 2006;38:497-508
77. T. Kakio, A. Matsumori, K. Ono, H. Ito, K. Matsushima and S. Sasayama. Roles and relationship of macrophages and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart. *Lab Invest.* 2000;80:1127-36
78. M. Keeney, I. Chin-Yee, K. Weir, J. Popma, R. Nayar and D. R. Sutherland. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *Cytometry.* 1998;34:61-70
79. C. H. Kim and H. E. Broxmeyer. In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood.* 1998;91:100-10
80. D. Kocher. Radioactive Decay Data Tables, DOE/TIC-11026, 108(1981). 1981
81. W. Kosmala, M. Przewlocka-Kosmala and W. Mazurek. Proinflammatory cytokines and myocardial viability in patients after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2005;101:449-56
82. G. L. Kukielka, C. W. Smith, G. J. LaRosa, A. M. Manning, L. H. Mendoza, T. J. Daly, B. J. Hughes, K. A. Youker, H. K. Hawkins, L. H. Michael and et al. Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest.* 1995;95:89-103
83. G. L. Kukielka, C. W. Smith, A. M. Manning, K. A. Youker, L. H. Michael and M. L. Entman. Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation.* 1995;92:1866-75
84. A. Kumar, C. Haery and J. E. Parrillo. Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin.* 2000;16:251-87
85. A. G. Kumar, C. M. Ballantyne, L. H. Michael, G. L. Kukielka, K. A. Youker, M. L. Lindsey, H. K. Hawkins, H. H. Birdsall, C. R. MacKay, G. J. LaRosa, R. D. Rossen, C. W. Smith and M. L. Entman. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation.* 1997;95:693-700

86. T. Lapidot and I. Petit. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol.* 2002;30:973-81
87. J. J. Lataillade, D. Clay, C. Dupuy, S. Rigal, C. Jasmin, P. Bourin and M. C. Le Bousse-Kerdiles. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood.* 2000;95:756-68
88. L. Laterveer, I. J. Lindley, M. S. Hamilton, R. Willemze and W. E. Fibbe. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood.* 1995;85:2269-75
89. S. H. Lee, P. L. Wolf, R. Escudero, R. Deutsch, S. W. Jamieson and P. A. Thistlethwaite. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med.* 2000;342:626-33
90. M. Leoncini, F. Bellandi, R. Sciagra, M. Maioli, A. Toso, A. Coppola, S. Sestini, A. Mennuti, R. P. Dabizzi and A. Pupi. Gated SPECT evaluation of the relationship between admission troponin I, myocardial salvage, and functional recovery in acute myocardial infarction treated by abciximab and early primary angioplasty. *J Nucl Med.* 2004;45:739-44
91. D. W. Leung, G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel and N. Ferrara. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989;246:1306-9
92. B. Levine, J. Kalman, L. Mayer, H. M. Fillit and M. Packer. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1990;323:236-41
93. P. Libby. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-74
94. P. Libby, P. R. Maroko, C. M. Bloor, B. E. Sobel and E. Braunwald. Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration. *J Clin Invest.* 1973;52:599-607
95. H. Löwel. Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes.* 2006;Heft 33:7
96. K. Lunde, S. Solheim, S. Aakhus, H. Arnesen, M. Abdelnoor and K. Forfang. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J.* 2005;39:150-8
97. A. D. Luster and J. V. Ravetch. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med.* 1987;166:1084-97
98. K. Ma, W. Xu, X. Shao, Yanyue, L. Hu, H. Xu, Z. Yuan, X. Zheng and S. Xiong. Coimmunization with RANTES plasmid polarized Th1 immune response against hepatitis B virus envelope via recruitment of dendritic cells. *Antiviral Res.* 2007;76:140-9

99. I. Martinovic, N. Abegunewardene, M. Seul, M. Vosseler, G. Horstick, M. Buerke, H. Darius and S. Lindemann. Elevated monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease. *Circ J.* 2005;69:1484-9
100. W. Matthews, C. T. Jordan, M. Gavin, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and I. R. Lemischka. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:9026-30
101. R. Mohle, F. Bautz, S. Rafii, M. A. Moore, W. Brugger and L. Kanz. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood.* 1998;91:4523-30
102. S. A. Mousa, J. M. Cooney and S. J. Williams. Relationship between regional myocardial blood flow and the distribution of ^{99m}Tc-sestamibi in the presence of total coronary artery occlusion. *Am Heart J.* 1990;119:842-7
103. C. A. Murphy, C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick and D. J. Cua. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2003;198:1951-7
104. C. E. Murry, M. H. Soonpaa, H. Reinecke, H. Nakajima, H. O. Nakajima, M. Rubart, K. B. Pasumarthi, J. I. Virag, S. H. Bartelmez, V. Poppa, G. Bradford, J. D. Dowell, D. A. Williams and L. J. Field. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004;428:664-8
105. M. Mutin, I. Canavy, A. Blann, M. Bory, J. Sampol and F. Dignat-George. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood.* 1999;93:2951-8
106. T. Nagasawa, S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani and T. Kishimoto. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996;382:635-8
107. G. Ndrepepa, J. Mehilli, M. Schwaiger, H. Schühlen, S. Nekolla, S. Martinoff, C. Schmitt, J. Dirschinger, A. Schomig and A. Kastrati. Prognostic value of myocardial salvage achieved by reperfusion therapy in patients with acute myocardial infarction. *J Nucl Med.* 2004;45:725-9
108. R. Neta, S. N. Vogel, J. M. Plocinski, N. S. Tare, W. Benjamin, R. Chizzonite and M. Pilcher. In vivo modulation with anti-interleukin-1 (IL-1) receptor (p80) antibody 35F5 of the response to IL-1. The relationship of radioprotection, colony-stimulating factor, and IL-6. *Blood.* 1990;76:57-62
109. J. M. Nygren, S. Jovinge, M. Breitbach, P. Sawen, W. Roll, J. Hescheler, J. Taneera, B. K. Fleischmann and S. E. Jacobsen. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med.* 2004;10:494-501

110. A. G. Olatidoye, A. H. Wu, Y. J. Feng and D. Waters. Prognostic role of troponin T versus troponin I in unstable angina pectoris for cardiac events with meta-analysis comparing published studies. *Am J Cardiol.* 1998;81:1405-10
111. K. Ono, A. Matsumori, Y. Furukawa, H. Igata, T. Shioi, K. Matsushima and S. Sasayama. Prevention of myocardial reperfusion injury in rats by an antibody against monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest.* 1999;79:195-203
112. D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, D. M. Bodine, A. Leri and P. Anversa. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;938:221-9; discussion 229-30
113. D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri and P. Anversa. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701-5
114. K. Ozaki and W. J. Leonard. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J Biol Chem.* 2002;277:29355-8
115. M. Peichev, A. J. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W. J. Lane, M. Williams, M. C. Oz, D. J. Hicklin, L. Witte, M. A. Moore and S. Rafii. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95:952-8
116. K. Pillarisetti and S. K. Gupta. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation.* 2001;25:293-300
117. J. Rehman, J. Li, C. M. Orschell and K. L. March. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 2003;107:1164-9
118. K. A. Reimer, J. E. Lowe, M. M. Rasmussen and R. B. Jennings. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* 1977;56:786-94
119. R. Roberts, V. DeMello and B. E. Sobel. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation.* 1976;53:I204-6
120. R. Ross. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-9
121. H. G. Rus, R. Vlaicu and F. Niculescu. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis.* 1996;127:263-71
122. M. Sack. Tumor necrosis factor-alpha in cardiovascular biology and the potential role for anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in heart disease. *Pharmacol Ther.* 2002;94:123-35

123. M. Saito, K. Yoshida, M. Hibi, T. Taga and T. Kishimoto. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol.* 1992;148:4066-71
124. R. Salcedo, K. Wasserman, H. A. Young, M. C. Grimm, O. M. Howard, M. R. Anver, H. K. Kleinman, W. J. Murphy and J. J. Oppenheim. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol.* 1999;154:1125-35
125. V. Schachinger, B. Assmus, M. B. Britten, J. Honold, R. Lehmann, C. Teupe, N. D. Abolmaali, T. J. Vogl, W. K. Hofmann, H. Martin, S. Dimmeler and A. M. Zeiher. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1690-9
126. V. Schachinger, B. Assmus, J. Honold, R. Lehmann, W. K. Hofmann, H. Martin, S. Dimmeler and A. M. Zeiher. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin Res Cardiol.* 2006;95:13-22
127. V. Schachinger, S. Erbs, A. Elsasser, W. Haberbosch, R. Hambrecht, H. Holschermann, J. Yu, R. Corti, D. G. Mathey, C. W. Hamm, T. Suselbeck, N. Werner, J. Haase, J. Neuzner, A. Germing, B. Mark, B. Assmus, T. Tonn, S. Dimmeler and A. M. Zeiher. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J.* 2006;27:2775-83
128. V. Schachinger and A. M. Zeiher. [Coronary microcirculation. Pathophysiology, clinical relevance, and importance for regenerative therapy after myocardial infarction]. *Herz.* 2005;30:641-50
129. Schicha. *Nuklearmedizin*, Schattauer Verlag. 1993
130. C. Schmidt-Lucke, L. Rossig, S. Fichtlscherer, M. Vasa, M. Britten, U. Kamper, S. Dimmeler and A. M. Zeiher. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005;111:2981-7
131. K. Schomig, G. Busch, B. Steppich, D. Sepp, J. Kaufmann, A. Stein, A. Schomig and I. Ott. Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2006;27:1032-7
132. F. Shalaby, J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X. F. Wu, M. L. Breitman and A. C. Schuh. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995;376:62-6
133. B. D. Shames, H. H. Barton, L. L. Reznikov, C. B. Cairns, A. Banerjee, A. H. Harken and X. Meng. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock.* 2002;17:114-9

134. S. Shintani, T. Murohara, H. Ikeda, T. Ueno, T. Honma, A. Katoh, K. Sasaki, T. Shimada, Y. Oike and T. Imaizumi. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:2776-9
135. S. C. Smith and P. M. Allen. Neutralization of endogenous tumor necrosis factor ameliorates the severity of myosin-induced myocarditis. *Circ Res*. 1992;70:856-63
136. T. Soeki, Y. Tamura, H. Shinohara, H. Tanaka, K. Bando and N. Fukuda. Serial changes in serum VEGF and HGF in patients with acute myocardial infarction. *Cardiology*. 2000;93:168-74
137. L. G. Spagnoli, E. Bonanno, A. Mauriello, G. Palmieri, A. Partenzi, G. Sangiorgi and F. Crea. Multicentric inflammation in epicardial coronary arteries of patients dying of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:1579-88
138. F. Squadrito, D. Altavilla, B. Zingarelli, M. Iocolano, G. Calapai, G. M. Campo, A. Miceli and A. P. Caputi. Tumor necrosis factor involvement in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*. 1993;237:223-30
139. B. A. Steppich, P. Moog, C. Matissek, N. Wisniowski, J. Kuhle, N. Joghetaei, F. J. Neumann, A. Schomig and I. Ott. Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes. *Atherosclerosis*. 2007;190:443-51
140. A. V. Sterpetti, A. Cucina, A. Fragale, S. Lepidi, A. Cavallaro and L. Santoro-D'Angelo. Shear stress influences the release of platelet derived growth factor and basic fibroblast growth factor by arterial smooth muscle cells. Winner of the ESVS prize for best experimental paper 1993. *Eur J Vasc Surg*. 1994;8:138-42
141. S. J. Szabo, B. M. Sullivan, S. L. Peng and L. H. Glimcher. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:713-58
142. K. Tachibana, S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto and T. Nagasawa. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 1998;393:591-4
143. T. Taga, M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano and T. Kishimoto. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*. 1989;58:573-81
144. T. Takahashi, C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J. M. Isner and T. Asahara. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-8
145. S. T. Tarzami, R. Cheng, W. Miao, R. N. Kitsis and J. W. Berman. Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:209-21

146. D. D. Taub, A. R. Lloyd, K. Conlon, J. M. Wang, J. R. Ortaldo, A. Harada, K. Matsushima, D. J. Kelvin and J. J. Oppenheim. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med.* 1993;177:1809-14
147. E. Tischer, D. Gospodarowicz, R. Mitchell, M. Silva, J. Schilling, K. Lau, T. Crisp, J. C. Fiddes and J. A. Abraham. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165:1198-206
148. G. Torre-Amione, S. Kapadia, J. Lee, J. B. Durand, R. D. Bies, J. B. Young and D. L. Mann. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation.* 1996;93:704-11
149. T. Trepels, A. M. Zeiher and S. Fichtlscherer. [Acute coronary syndrome and inflammation. Biomarkers for diagnostics and risk stratification]. *Herz.* 2004;29:769-76
150. S. Tsai, J. Butler, S. Rafii, B. Liu and K. C. Kent. The role of progenitor cells in the development of intimal hyperplasia. *J Vasc Surg.* 2009;49:502-10
151. C. Urbich and S. Dimmeler. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:318-22
152. C. Urbich and S. Dimmeler. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004;95:343-53
153. K. Uyemura, L. L. Demer, S. C. Castle, D. Jullien, J. A. Berliner, M. K. Gately, R. R. Warriar, N. Pham, A. M. Fogelman and R. L. Modlin. Cross-regulatory roles of interleukin (IL)-12 and IL-10 in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1996;97:2130-8
154. P. Vajkoczy, S. Blum, M. Lamparter, R. Mailhammer, R. Erber, B. Engelhardt, D. Vestweber and A. K. Hatzopoulos. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med.* 2003;197:1755-65
155. A. C. van der Wal, A. E. Becker, C. M. van der Loos and P. K. Das. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994;89:36-44
156. P. Vanguri and J. M. Farber. Identification of CRG-2. An interferon-inducible mRNA predicted to encode a murine monokine. *J Biol Chem.* 1990;265:15049-57
157. M. Vasa, S. Fichtlscherer, K. Adler, A. Aicher, H. Martin, A. M. Zeiher and S. Dimmeler. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation.* 2001;103:2885-90
158. M. Vasa, S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A. M. Zeiher and S. Dimmeler. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor

- cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:E1-7
159. F. J. Wackers, D. S. Berman, J. Maddahi, D. D. Watson, G. A. Beller, H. W. Strauss, C. A. Boucher, M. Picard, B. L. Holman, R. Fridrich and et al. Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: human biodistribution, dosimetry, safety, and preliminary comparison to thallium-201 for myocardial perfusion imaging. *J Nucl Med.* 1989;30:301-11
 160. M. Weber and C. Hamm. [Redefinition of myocardial infarction--relevance of biomarkers]. *Herz.* 2008;33:115-21
 161. N. Werner, S. Kosiol, T. Schiegl, P. Ahlers, K. Walenta, A. Link, M. Bohm and G. Nickenig. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med.* 2005;353:999-1007
 162. K. C. Wollert, G. P. Meyer, J. Lotz, S. Ringes-Lichtenberg, P. Lippolt, C. Breidenbach, S. Fichtner, T. Korte, B. Hornig, D. Messinger, L. Arseniev, B. Hertenstein, A. Ganser and H. Drexler. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364:141-8
 163. J. Yamaguchi, K. F. Kusano, O. Masuo, A. Kawamoto, M. Silver, S. Murasawa, M. Bosch-Marce, H. Masuda, D. W. Losordo, J. M. Isner and T. Asahara. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation.* 2003;107:1322-8
 164. Z. Yang, B. Zingarelli and C. Szabo. Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2000;101:1019-26
 165. H. Yawata, K. Yasukawa, S. Natsuka, M. Murakami, K. Yamasaki, M. Hibi, T. Taga and T. Kishimoto. Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *Embo J.* 1993;12:1705-12
 166. E. T. Yeh, S. Zhang, H. D. Wu, M. Korbling, J. T. Willerson and Z. Estrov. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation.* 2003;108:2070-3
 167. S. Yla-Herttuala, B. A. Lipton, M. E. Rosenfeld, T. Sarkioja, T. Yoshimura, E. J. Leonard, J. L. Witztum and D. Steinberg. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:5252-6
 168. C. H. Yoon, J. Hur, K. W. Park, J. H. Kim, C. S. Lee, I. Y. Oh, T. Y. Kim, H. J. Cho, H. J. Kang, I. H. Chae, H. K. Yang, B. H. Oh, Y. B. Park and H. S. Kim. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation.* 2005;112:1618-27

169. A. Ziakas, S. Gavriliadis, G. Giannoglou, E. Souliou, K. Gemitzis, D. Kalampalika, M. A. Vayona, I. Pidonia, G. Parharidis and G. Louridas. In-hospital and long-term prognostic value of fibrinogen, CRP, and IL-6 levels in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis. *Angiology*. 2006;57:283-93
170. D. Zohnhofer, I. Ott, J. Mehilli, K. Schomig, F. Michalk, T. Ibrahim, G. Meisetschlager, J. von Wedel, H. Bollwein, M. Seyfarth, J. Dirschinger, C. Schmitt, M. Schwaiger, A. Kastrati and A. Schomig. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *Jama*. 2006;295:1003-10
171. P. Zymek, D. Y. Nah, M. Bujak, G. Ren, A. Koerting, T. Leucker, P. Huebener, G. Taffet, M. Entman and N. G. Frangogiannis. Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007;74:313-22

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Frau Professor Ilka Ott für die Überlassung dieses spannenden Themas, für die vielen Anregungen und für die engagierte Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei den medizinisch technischen Assistentinnen Frau Annette Stobbe und Frau Birgit Campbell für ihre wertvolle Hilfe bedanken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. Marc Wermke von der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin (Deutsches Herzzentrum München) und Frau Raymonde Busch vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie (TU München) für ihre kompetente Beratung.

Ein weiterer Dank gilt meinem Mitdoktoranden Jan Kaufmann für die gute Zusammenarbeit, die sehr zu dieser Arbeit beigetragen hat.