

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Aus der Klinik und Poliklinik für Herz- und Gefäßchirurgie  
des Universitären Herzzentrums

Direktor Prof. Dr. Herman Reichenspurner, Ph.D.

## **Langzeitergebnisse nach autologer skeletaler Myoblastentransplantation zur Behandlung der ischämischen Kardiomyopathie am Beispiel der MAGIC (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy) Phase II Studie – eine Einzelzentrumsbeobachtung**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Jens Brickwedel  
aus Peine

Hamburg 2013

Gewidmet meiner Familie

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:** *19.12.2013*

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:**

*PD Dr. T. Gallien*

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:**

*PD Dr. K. Sydow*

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:**

## **Inhaltsverzeichnis**

1.	Einleitung	1 - 4
2.	Material und Methoden	5 - 6
3.	Ergebnisse	7 - 8
4.	Diskussion	9 - 12
5.	Zusammenfassung	13
6.	Abkürzungsverzeichnis	14
7.	Literaturverzeichnis	15 - 20
8.	Danksagung	21
9.	Lebenslauf	22 - 25
10.	Eidesstattliche Versicherung	26
11.	Promotionsbezogene Publikation	27

## 1. Einleitung

Die koronare Herzerkrankung, häufig als KHK abgekürzt, ist eine chronische, über Jahre fortschreitende Erkrankung der Koronararterien. Die Progredienz der Erkrankung führt zu einem Missverhältnis zwischen myokardialem Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot, der kardialen Ischämie [nationale Versorgungsleitlinie KHK 2008]. Die akute Ischämie kommt zum Ausdruck durch ein akutes Koronarsyndrom, die chronische Ischämie zeigt sich im Vollbild als ischämische Erkrankung des Myokards mit der Ausbildung der ischämischen Kardiomyopathie (ICM) [Felker et al. 2002].

Die KHK gehört in die Gruppe der Herz- Kreislauferkrankungen, welche die häufigste Todesursache der Industrienationen widerspiegeln [Niederlaender et al. 2006]. Im Jahr 2004 zeigte die chronisch ischämische Herzerkrankung die höchste geschlechtsspezifische Mortalitätsrate für Frauen (11,1%) und Männer (9,3%) in Deutschland [Schelhase et al. 2006]. Die ICM als eine Manifestation der chronischen KHK [Felker et al. 2002] entsteht durch „ventrikuläres Remodeling“, einer physiologischen Adaptation des Myokards an die stattgehabte myokardiale Ischämie und führt zu einer Größen-, Form- und Funktionsveränderung des myokardialen Ventrikels [Sutton et al. 2000].

Aktuell stehen folgende medikamentöse und chirurgische Therapieoptionen zur Verfügung: Pharmakotherapie [Frigerio et al. 2003], operative Myokardrevaskularisation (CABG) [Ruß et al. 2009], optional ohne die Zuhilfenahme der Herz-Lungen-Maschine [Deuse et al. 2003], Mitralklappenrekonstruktion falls die KHK zu einer Mitralklappeninsuffizienz geführt hat [Prifti et al. 2009, Komeda et al. 2009], linksventrikuläre Reduktionsplastik nach Dor bei Ausbildung eines ventrikulären Aneurysmas [Doenst et al. 2004]. Falls diese „stabilisierenden Therapien“ nicht ausreichend sind bleibt noch die chirurgische Therapie der Herztransplantation, welche allerdings aufgrund der Organknappheit kein breit anwendbares therapeutisches Angebot darstellt [DGTHG Leistungsstatistik 2012]. Zudem ist der Anteil der Patienten mit ICM ab dem 65. Lebensjahr signifikant höher als in

den Altersgruppen davor, weshalb ebenso eine Transplantation in den allermeisten Fällen als Therapieoption nicht in Frage kommt [Statistik der kassenärztlichen Bundesvereinigung]. Moderne Unterstützungssysteme sind heutzutage zwar tragbar, haben jedoch nach wie vor relevante Risiken für Blutungen, Infektion und Thrombembolien [Lok et al. 2013].

Trotz dieser vielschichtigen und unterschiedlichen Therapieansätze liegt die fünf Jahres Überlebensrate der ICM lediglich bei etwa 50% [Felker et al. 2002]. Neue, das Myokard regenerierende, Therapieansätze werden deshalb untersucht.

Damit kardiale, regenerative Therapien funktionieren müssen muss Abstand genommen werden von dem lange bestehenden Paradigma, dass das Herz ein postmitotisch fixiertes Organ ist [Chien 2004]. Um diese These zu stärken, konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung eines endogenen Pools kardialer Stammzellen innerhalb des Myokards bzw. die *in vivo* Applikation von zuvor *in vitro* vermehrten Zellen zu einer funktionalen Verbesserung des Myokards führt. So können Myozyten neu mit Koronargefäßen formatiert und nekrotisches Herznarbengewebe kann durch neues, besser funktionierendes Myokard ersetzt werden [Smith et al. 2007]. Eine Transdifferenzierung von adulten Stammzellen in Kardiomyozyten scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein [Balsam et al. 2004, Murry et al. 2004]. Auf die einzelnen Mechanismen soll hier im Weiteren jedoch nicht eingegangen werden. Eine Übersicht der infrage kommenden Zellen für die myokardiale Therapie ist hier tabellarisch zusammengestellt [Leor et al. 2005].

Skeletale Myoblasten bieten in der Verwendung in der Zelltherapie viele Vorteile. Sie sind:

- einfach zu gewinnen, da sie mit 2-5% im Skelettmuskel vorkommen
- können *in vitro* leicht proliferiert werden
- sind relativ ischämieresistent
- sind fixiert in ihrer Zelllinie
- haben eine geringe Tumorigenität

- sind autolog in großer Anzahl ohne ethische Probleme zu gewinnen und benötigen deswegen im Weiteren keine immunsuppressive Therapie [Durrani et al. 2010].

	<b>Autolog</b>	<b>Verfüg-barkeit</b>	<b>Kardiale „Myogenese“</b>	<b>Klinische Erfahrung</b>	<b>Probleme/Sicherheit</b>
<b>Fetale Kardiomyozyten</b>	nein	limitiert ethisch?	ja	nein	Abstoßung
<b>Embryonale Stammzellen</b>	nein	limitiert ethisch?	ja	nein	Abstoßung/ Teratome
<b>Skeletale Myoblasten</b>	ja	gut	diskutiert	ja	Arrhythmien
<b>Unselektierte Knochenmarkzellen</b>	ja	gut	diskutiert	ja	Kalzifikation
<b>Mesenchymale Stammzellen</b>	ja	gut	ja	nein	Kalzifikation
<b>Hämatopoetische Stammzellen</b>	nein	gut	diskutiert	ja	Nein
<b>Fibroblasten</b>	ja	gut	nein	nein	Nein
<b>Glatte Muskelzellen</b>	ja	gut	nein	nein	Nein

Tabelle 01: Vor –und Nachteile unterschiedlicher Zelltypen für die myokardiale Restauration [modifiziert nach Leor et al. 2005]

---

Der erste zelltherapeutische Ansatz mit transplantierten Myoblasten für geschädigtes Myokard wurde von CE Murry et al. 1996 in einem Tierversuch beschrieben. Die Zellen konnten transplantiert werden und fusionierten dort zu Myofilamenten. Allerdings bildeten die transplantierten Zellen keine Zellverbindungen aus. Interessanter Weise änderten die Skelettmuskelzellen

ihre normalerweise exprimierten schnellen Myofilamente in langsame. Diese Änderung geschah schneller in Bereichen in denen schon eine "Wundheilung" nach Ischämie eingetreten war, als in den akut ischämisch gewordenen Arealen [Koh et al. 1993, Murry et al. 1996].

In einer weiteren experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass transplantierte Myoblasten einen positiven Einfluss auf das Remodeling nach myokardialer Ischämie haben, was zu einer Verminderung linksventrikulärer Diameter (LVEDD und LVESD) führt. Einhergehend mit der stabilisierten linksventrikulären Funktion zeigte die Gruppe nach Myoblastentransplantation eine erhöhte Übungskapazität [Jaine et al. 2001].

Menasché beschrieb 2001 die erste erfolgreiche Myoblastentransplantation beim Menschen [Menasché et al. 2001]. Im Weiteren erfolgte die Planung und Durchführung der MAGIC Phase I Studie, welche zum Einen die Durchführbarkeit und Sicherheit der Myoblastentransplantation zeigte und zum Anderen die Ergebnisse der tierexperimentellen Studien bestätigte, so dass die Phase II [Menasché et al. 2008] Studie geplant wurde. Aufgrund der Arbeit von Pouzet et al. wurde die Studie nicht nur zweiseitig mit einer Placebogruppe, sondern zusätzlich auch mit zwei unterschiedlichen Verumgruppen geplant, um eine Dosis-Wirkungsbeziehung zeigen zu können [Pouzet et al. 2001].

Die Nachuntersuchungen der MAGIC Phase II Studie waren auf 1 Jahr begrenzt. Langzeitdaten aus diesem Studienaufbau gibt es bis dato nicht. Es wurden lediglich die Langzeiterfahrungen der Phase I Studie publiziert [Hagège et al. 2006]. Allerdings handelte es sich hierbei um eine sehr inhomogene Kohorte von nur neun nicht randomisierten Patienten mit einer mittleren Nachuntersuchungsdauer von im Median 52 Monaten, einem Nachuntersuchungszeitraum von 18 – 58 Monaten.

Da somit nur ungenügende Langzeitdaten nach autologer myokardialer Myoblastentransplantation vorhanden sind, führten wir die Nachuntersuchungen bei unseren Patienten der MAGIC Phase II Studie auch nach Studienende fort um so einen Einblick in die Langzeitsicherheit und Effektivität nach autologer Myoblastentransplantation zur Behandlung der ICM zu bekommen.

## 2. Material und Methoden

Die MAGIC Phase II Studie wurde von Philipp Menasché [Menasché et al. 2008] ausführlich beschrieben. Die Studie wurde durchgeführt nach den Kriterien „of Good Clinical Practice“ und begonnen nach einem positiven Votum der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer [Bearb.-Nr. 2148 vom 16.04.2004]. Der schematische Studienablauf wird durch die Abbildung 01 wiedergegeben.

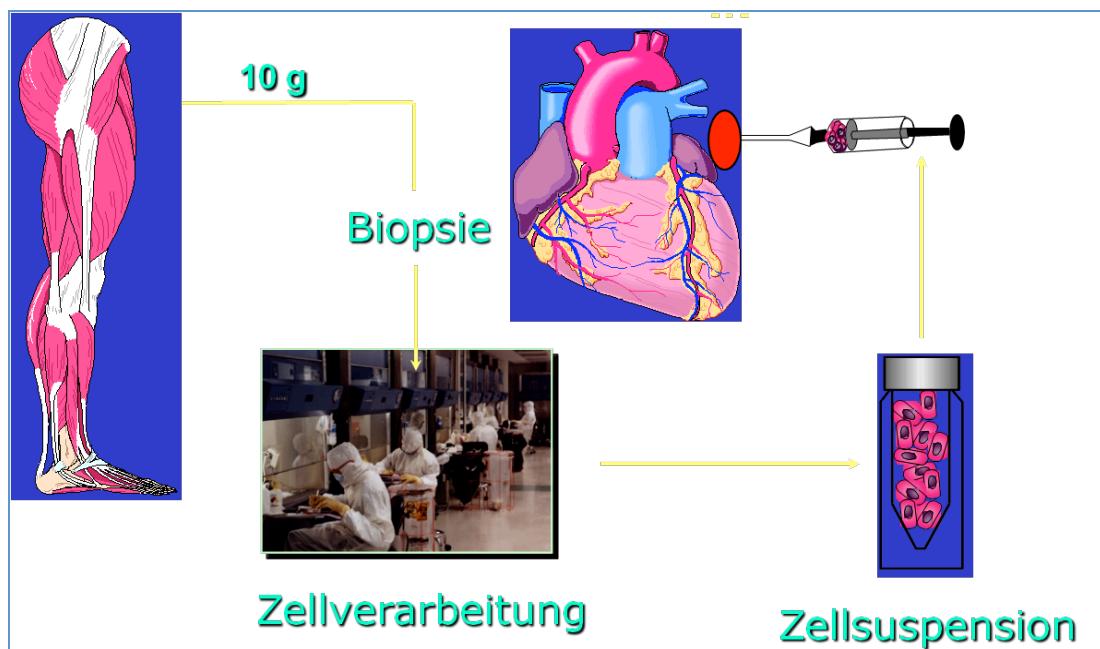


Abbildung 01: schematischer Studienablauf von der Muskelbiopsie, über die Zellverarbeitung bis zur Myoblastentransplantation

---

Aus unserer Kohorte wurden 2 Patienten in die Hochdosisgruppe (HDG), 2 Patienten in die Niedrigdosisgruppe (NDG) und 3 Patienten in die Placebogruppe (PG) randomisiert. Als Vorlage der jährlich fortgeführten Nachuntersuchungen wurde die 12-Monats-Nachuntersuchung, des ursprünglichen Studienprotokolls gewählt. Im Weiteren wurde dann allerdings auf die Blutentnahmen verzichtet. Es wurde im Einzelnen eine Anamnese erhoben, die NYHA Klasse erfragt, ein Ruhe-EKG geschrieben, der implantierte

Defibrillator (ICD) ausgelesen und eine transthorakale Echokardiographie durchgeführt. In Anlehnung an das ursprüngliche Studienprotokoll der echokardiographischen Untersuchung (durchgeführt mit Vivid 7, GE Healthcare) wurden die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) sowie die linksventrikulären enddiastolischen (LVEDV) als auch die endsystolischen (LVESV) Volumina bestimmt. Eine Wandbewegungsanalyse der 16 Segmente erfolgte ebenso. Die Patienten wurden in der klinischen Routine in den Fachambulanzen des Universitären Herzzentrums untersucht.

Obwohl die Phase II Studie formell abgeschlossen und die Zuordnung der Patienten zu den Studiengruppen bekannt war, wussten weder die Echokardiographieuntersucher noch die den ICD auslesenden Kollegen, in welchen Behandlungsarm die Patienten randomisiert waren. Lediglich die klinischen Untersuchungen wurden durch mich durchgeführt und waren somit ungeblendet.

Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Fortführung der Datenerhebung sowie zum Kontakt und der Datenfreigabe der weiterbehandelnden Kollegen anderer Fachrichtungen.

Die Daten wurden entweder als absolute Zahlen oder als Mittelwerte mit Standardabweichung in der Auswertung angegeben. Die Angaben der LVEF erfolgten als Prozent. Die Aufarbeitung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 13 (IBM). Auf eine statistische Aufarbeitung wurde bei diesen kleinen und inhomogenen Gruppen verzichtet.

### **3. Ergebnisse**

Die wesentlichen Ergebnisse der Langzeitbeobachtung nach autologer Myoblastentransplantation sind in den Tabellen 1 – 3 sowie in „Figure“ 1 und 2 der beiliegenden Publikation dargestellt.

1. Der Nachbeobachtungszeitraum umfasste im Mittel  $72 \pm 5,3$  Monate (eine Zeitspanne von 64 bis 80 Monaten)
  
2. Alle Patienten waren zur abschließenden Untersuchung am Leben (100%).  
Die Nachuntersuchungen waren komplett.
  
3. Im Langzeitverlauf, d.h. nach mehr als einem Jahr, kam es zum fünfmaligen Auslösen der im Rahmen der Studie implantierten ICDs. Hiervon entfielen 3 ICD-Aktionen in die HDG, 2 ICD-Aktionen waren jedoch bedingt durch ein Fehlsensing einer fehlerhaften ICD Sonde. Eine ICD-Aktion erfolgte aufgrund einer langsamen ventrikulären Tachykardie. In der NDG kam es ebenso zu einer ICD-Aktion wegen eines Fehlsensings der fehlerhaften Sonde. In der PG kam es zu einer ICD-Aktion aufgrund einer ventrikulären Tachykardie. Bei einem Patienten wurde der ICD wegen einer Systeminfektion nach 59 Monaten explantiert.
  
4. Im Nachuntersuchungszeitraum erfolgte lediglich eine koronare Reintervention bei einem Patienten aus der NDG. Es wurde ein Marginalast mittels perkutaner koronarer Angioplastie (PTCA) und Stenting behandelt (Taxus®). Spezielle Langzeitkomplikationen, die in einem Zusammenhang mit der Myoblastentransplantation stehen könnten wurden klinisch nicht beobachtet.

5. Die transthorakale Echokardiographie zeigte ihre Limitation zur Beurteilung der Wandkinetik als auch der Volumina bei sehr großen, hypokontraktilen Ventrikeln (Patient 10) und bei sehr adipösen Patienten (Patient 08).
6. Die Geometrie der myopathischen Ventrikel änderte sich im Verlauf der Nachuntersuchung. Initial zeigten alle Patienten gruppenunabhängig eine Reduktion der Volumina. Dieser positive Trend setzte sich allerdings nur in der HDG im weiteren Verlauf fort. Die NDG zeigte im Laufe der Nachuntersuchung eine geringe Zunahme der Volumina. In der PG kam es zu einer Zunahme der Volumina über die Zeit.
7. Die LVEF zeigte in der HDG eine initiale Verbesserung von 29% bis 35,3%. Im Weiteren näherte sich die LVEF wieder dem Ausgangswert an. In der NDG zeigte sich der beste Wert mit 35% LVEF 6 Monate postoperativ. Es kam zu einer Abnahme von 6% in den weiteren 6 Monaten. Im Langzeitverlauf blieb der Wert in etwa stabil. Die LVEF in der PG nahm im Laufe der Zeit von 31% bis auf 28% ab. Es gab allerdings einen gegenläufigen Peak nach 12 Monaten bis auf 32%.
8. Insgesamt wurden 10 der zuvor akinetischen Segmente mit Myoblasten behandelt, jeweils 5 Segmente der HDG ( $n=2$ ) und der NDG ( $n=2$ ). Die 6 Monats-Nachuntersuchung zeigte eine verbesserte Kontraktilität in 1 der 10 Segmente (HD). Bei der abschließenden Untersuchung zeigten insgesamt 3 der 10 Segmente eine verbesserte Kontraktilität (1 Segment HDG, 2 Segmente NDG). Den 3 Patienten der PG wurden insgesamt 7 Segmente mit der Placebolösung injiziert. Es kam zu einer lokalen Verbesserung der Kontraktilität nach 6 Monaten von einem Segment und im abschließenden Ultraschall von 2 Segmenten. Allerdings konnten 2 Patienten bei der abschließenden Ultraschalluntersuchung nicht ausreichend untersucht werden (siehe Punkt 5).

## 4. Diskussion

Die MAGIC Phase II Studie war die erste placebokontrollierte, prospektiv randomisierte, doppelblinde Multicenterstudie zur Evaluation der Sicherheit und Effektivität der autologen Myoblastentransplantation für die Behandlung der ICM. Die Patienten, die an der hier evaluierten Langzeitnachuntersuchung nach Myoblastentransplantation teilnahmen, waren Teil der MAGIC Studie aus unserem Zentrum. Die MAGIC Studie konnte weder eine Verbesserung der regionalen Kontraktilität noch eine Verbesserung der globalen LVEF zeigen. Allerdings kam es zu einer Verringerung der LVEDV und LVESV nach Hochdosistherapie mit Myoblasten. Ventrikuläre Arrhythmien traten frühpostoperativ gehäuft auf, ohne allerdings eine statistische Signifikanz zu erreichen. Dies war allerdings möglicherweise den kleinen Kohorten geschuldet [Menasché et al. 2008].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in der Langzeitnachuntersuchung die gleichen Ergebnisse wie die MAGIC Phase II Studie. Auch in unserer kleinen Kohorte sahen wir ein verbessertes, ein umgekehrtes Remodeling in der HDG mit reduzierten LVEDV und LVESV. Die bei der Myoblastentransplantation beobachtete Häufung von ventrikulären Arrhythmien [Gepstein et al. 2010] scheint lediglich in der Frühphase nach Transplantation relevant zu sein [Povsic et al. 2011]. Auch in unserem Patientenkollektiv sahen wir im Langzeitverlauf kein vermehrtes Auftreten von ventrikulären Arrhythmien.

Insbesondere nach den Erfahrungen Menaschés Phase I Studie liegt ein Fokus aller mit Myoblasten durchgeführten Studien auf dem Risiko für das Auftreten neuer ventrikulärer Arrhythmien [Menasché et al. 2003]. Die elektrophysiologische Erklärung für das gehäufte Auftreten von ventrikulären Arrhythmien liegt in der Tatsache, dass es nicht zur Ausbildung einer elektromechanischen Kopplung zwischen den Kardiomyozyten und den transplantierten Myoblasten kommt. Es werden keine sogenannte „Gebjunctions“ ausgebildet [Abraham et al. 2005]. Elektrophysiologisch handelt es sich um eine Reentrytachykardie, da man die ventrikulären Tachykardien

entrainen und sie mittels Stimulation terminieren konnte. Beides spricht also für eine ventrikuläre Tachykardie auf der Basis einer Kreiserregung [Gepstein et al. 2010]. Das Patienten mit hochgradig reduzierter linksventrikulärer Funktion bei ischämischer Genese ein erhöhtes Risiko für ventrikuläre Herzrhythmusstörungen haben ist seit der MAdIT II Studie bekannt [Moss et al. 2002]. Auch alle unsere 7 Patienten zeigten bereits vor Studienbeginn in den präoperativ durchgeführten Langzeit-EKGs ventrikuläre Arrhythmien. Die MAGIC Phase II Studie zeigte keine statistisch signifikante Häufung von ventrikulären Arrhythmien nach Myoblastentransplantation, allerdings zeigte sich eine zahlenmäßige Häufung [Menasché et al. 2008]. Gleicherweise zeigten Povsic et al. in einer kardiologisch, interventionellen Studie mit autologer Myoblastentransplantation [Povsic et al. 2011]. Die beiden Patienten unserer Kohorte, die eine frühpostoperative ICD Therapie erfuhr (nach 1, 3 und 5 Monaten) waren in der NDG und in der PG. Bei beiden Patienten hatte bereits präoperativ das Langzeit-EKG multiforme ventrikuläre Extrasystolen und Salven gezeigt. Beide wurden nach Einschluss in die Studie, wie alle Patienten der MAGIC Studie, für mindestens 6 Monate mit Amiodaron behandelt. Die späte ICD Therapie von Patient 10 aus der PG ist wahrscheinlich auf eine Selbstmedikation mit Sildenafil zurückzuführen [Piccirillo et al. 2002].

Weitere mögliche Risiken nach kardialer Zelltherapie sind onkogene Transformation der transplantierten Zellen [Behfar et al. 2007], hämatogene Streuung im Körper [Gnecchi et al. 2008], abnorme Zelldifferenzierung [Breitbach et al. 2007], und eine beschleunigte Artherosklerose, die zu einer höheren Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen führt [Bartunek et al. 2005]. Hierfür fanden wir allerdings in der klinischen Nachuntersuchung keinen Anhalt.

Das fünf Jahresüberleben nach isolierter aortokoronarer Bypassversorgung für Patienten mit ICM wird in der Literatur mit etwa 70% angegeben [Appoo et al. 2004] oder zeigt eine jährliche Mortalität von 3-4% [Vidal-Perez et al. 2013]. Ein Patient unserer kleinen Gruppe wurde innerhalb der ersten 6 Monate mit kardialer Dekompensationen dreimal wieder stationär aufgenommen. Späte Wiederaufnahmen aufgrund von kardialer Dekompensation gab es nur in der

PG. Epidemiologische Studien gehen von einem Risiko von 33% innerhalb von zwei Jahren für eine erneute kardiale Dekompensationen und damit verbunden eine Wiederaufnahme im Krankenhaus aus [Vidal-Perez et al. 2013]. Während des kompletten Nachuntersuchungszeitraums waren alle Patienten unserer Gruppe in einem klinisch stabilen Zustand. Dieses positive Ergebnis kann der kompletten myokardialen Revaskularisation sowie der entsprechenden Medikation zugeschrieben werden.

Kardiale Zelltherapien führen im Allgemeinen zu einem verbesserten linksventrikulären Remodeling, was durch verkleinerte linksventrikuläre Volumina zum Ausdruck kommt. Auch zeigen die meisten Arbeiten eine leicht verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion [Povsic et al. 2011]. Die Mechanismen, wie Zelltherapien zu einem verbesserten Remodeling führen, sind noch nicht in ihrer Gesamtheit verstanden. Unterschiedliche Theorien wurden zwischenzeitlich entwickelt und wieder verworfen. Seidel et al. haben drei mögliche Mechanismen zusammengefasst, wie möglicherweise transplantierte Myoblasten die kardiale Funktion verbessern können:

- 1.) die transplantierten Myoblasten wirken wie ein verstärkendes Gerüst und führen so zur Eingrenzung der Infarktgröße und zu einem verbesserten Remodeling
- 2.) aufgrund ihrer kontraktilen Eigenschaften wirken die Myoblasten direkt bei der systolischen Wandfunktion mit
- 3.) die transplantierten Myoblasten bilden einen Reiz zur Freisetzung von endogenen Wachstums- und Angiogenesefaktoren [Seidel et al. 2009]. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird die Zytokin- Paracrine Hypothese favorisiert. Es wird angenommen, dass eine Kaskade von mehr als 30 unterschiedlichen Faktoren involviert ist, die zu dem verbesserten Remodeling führen [Gnecchi et al. 2008].

Nach einer initialen Reduktion der linksventrikulären Volumina bei der 6-Monats-Nachuntersuchung kam es bei den vier Verumpatienten nach 12 Monaten wieder zu einer leichten Zunahme der linksventrikulären Volumina,

welche sich an den präoperativen Werten orientierten. Bei der abschließenden Untersuchung zeigte die HDG kleinere Volumina als die NDG. Die PG zeigte lediglich eine Verbesserung zur 6 Monatsnachuntersuchung, danach nahmen die Volumina stetig zu. Ähnlich verhielt sich die linksventrikuläre Ejektionsfraktion über die Zeit in den drei Gruppen. Ghods et al. konnten allerdings auch zeigen, dass sich der linke Ventrikel nach einer Bypassoperation bedingt erholen kann, was somit auch zu einer begrenzt verbesserten Pumpfunktion führen kann [Ghods et al. 1995]. Bei den kleinen Gruppen ist allerdings auch eine zufällige Verbesserung nicht ausgeschlossen.

Die Evaluation des linken Ventrikels zeigte sich im Langzeitverlauf als besonders erschwert. Obwohl das ursprüngliche Studienprotokoll der echokardiographischen Untersuchung weiter verfolgt wurde, konnten nicht immer komplett auswertbare Befunde erstellt werden. Es ist bekannt, dass die Echokardiographie nicht immer eine optimale Bildqualität liefert und dass es eine hohe Intra- und Interbeobachtervariabilität gibt [McGowan et al. 2003]. Leider war aufgrund des primär implantierten ICDs eine Nachuntersuchung mittels MRT nicht möglich, obwohl dies verlässliche Informationen mit akzeptabler Variabilität der vorliegenden Fragestellungen hätte liefern können [Grothues et al. 2002].

Eine Limitation der Daten entsteht durch die kleinen Gruppen, weshalb die Aussagen auch deskriptiv gehalten und nicht statisch berechnet wurden. Die Ergebnisse dieser kleinen Kohorte sind somit nicht direkt auf eine größere Population übertragbar und bedürfen im Weiteren einer kritischen Anwendung, zeigen aber umso mehr die Notwendigkeit, großer klinischer Studien mit einem entsprechend langen Nachuntersuchungszeitraum.

## **5. Zusammenfassung**

Die kausalen Behandlungsmöglichkeiten der ICM sind begrenzt. Kardiochirurgische und kardiologische Interventionen sind lediglich bei ausreichend vitalem Restmyokard erfolgversprechend. Deswegen sind zelltherapeutische Ansätze vermehrt Gegenstand der klinischen Forschung. Bereits vor mehr als 10 Jahren betraten die Myoblasten diese Bühne und wurden im Rahmen der autologen skeletalen Myoblastentransplantation für die Behandlung der ischämischen Kardiomyopathie untersucht. Allerdings gibt es kaum Langzeiterfahrungen nach myokardialer Myoblastentransplantation. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Langzeitsicherheit und Effektivität dieser Therapie zu untersuchen.

An der multizentrischen MAGIC Phase II Studie nahmen insgesamt 120 Patienten zwischen 2004 und 2006 teil. Von diesen 120 Patienten wurden 7 Patienten von unserem Zentrum behandelt. Die Patienten erhielten zusätzlich zur aortokoronaren Bypassoperation entsprechend ihrer Randomisierung eine Myoblastenlösung in die myokardiale Narbe und Randzone (Injektionsvolumen: 400 Millionen Zellen, n=2 Niedrigdosis; 800 Millionen Zellen, n=2 Hochdosis) oder Placebolösung (n=3) injiziert. Nach Abschluss der MAGIC Studie führten wir die Nachuntersuchungen bei unseren Patienten fort.

Kein Patient verstarb in dem Nachuntersuchungszeitraum. Es kam zu keiner Häufung von ventrikulären Arrhythmien. Die linksventrikuläre Pumpfunktion änderte sich nur gering in den drei Gruppen. Die linksventrikulären Volumina besserten sich in der Hochdosisgruppe, blieben in etwa unverändert in der Niedrigdosisgruppe und nahmen in der Placebogruppe zu.

Die myokardiale Myoblastentransplantation scheint ein sicherer Therapieansatz für die Behandlung der ICM zu sein. Ein verbessertes Remodeling zeigte sich im Langzeitverlauf allenfalls nur für die Hochdosisgruppe. Allerdings muss man mit der Interpretation dieser Ergebnisse, aufgrund der kleinen Gruppe, zurückhaltend sein.

## **6. Abkürzungsverzeichnis**

EKG	Elektrokardiogramm
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
HDG	Hochdosisgruppe
ICD	internal cardioverter-defibrillator (engl.), implantierbarer Kardioverter- Defibrillator
ICM	ischemic cardiomyopathy (engl.)
KHK	Koronare Herzerkrankung
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
MAGIC	Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (engl.), Autologe Myoblastentransplantation bei ischämischer Kardiomyopathie
MRT	Magnetresonanztomographie
NDG	Niedrigdosisgruppe
NYHA	New York Heart Association (engl.)
PG	Placebogruppe

## 7. Literaturverzeichnis

- Abraham MR, Henrikson CA, Tung L, Chang MG, Aon M, Xue T, Li RA, O'Rourke B, Marban E. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res.* 2005;97:159-167
- Appoo J, Norris C, Merali S, Graham MM, Koshal A, Knudtson ML, Ghali WA. Long-Term Outcome of Isolated Coronary Artery Bypass Surgery in Patients with Severe Left Ventricular Dysfunction. *Circulation* 2004;110:II-13-II-17
- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668-73. Chien KR. Stem cells: lost in translation. *Nature* 2004; 428: 607-608
- Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction. *Circulation* 2005;112:I-178-I-183
- Behfar A, Terzic A. Optimizing adult mesenchymal stem cells for heart repair. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42(2):283-284
- Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JWU, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Potential risk of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007;110:1362-1369
- Deuse T, Detter C, Samuel V, Boehm DH, Reichenspurner H, Reichert B. Early and midterm results after coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass: which patient population benefits the most? *Heart Surg Forum* 2003, 6 (2), 77-83

Doenst T, Schlensak C, Beyersdorf F. Ventrikelseptoplastik bei ischämischer Kardiomyopathie. *Dtsch Arztebl* 2004; 101 (9), A 570-576

Durrani S, Mikhail K, Ashraf M, Haider KH. Skeletal myoblasts for cardiac repair. *Regen Med.* 2010; 5(6); 919-932

Felker GM, Linda KS, O'Connor CM. A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 39; 210-218

Frigerio M, Roubina E. Drugs for left ventricular remodeling in heart failure. *Am J Cardiol.* 2005; 96(12A): 10L-18L

Gepstein L, Ding C, Rahmutula D, Wilson EE, Yankelson L, Caspi O, Gepstein A, Huber I, Olgm JE. In vivo assessment of the electrophysiological integration and arrhythmogenic risk of myocardial cell transplantation strategies. *Stem Cells*;28(12):2151-61

Ghods M, Pancholy S, Cave V, Cassell D, Heo J, Iskandrian AS. Serial changes in left ventricular function after coronary artery bypass: implications in viability assessment. *Am Heart J* 1995;129:20-23

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy. *Circ Res.* 2008;103:1204-1219

Grothues F, Smith GC, James C.C. Moon, Bellenger NG, Collins P, Klein HU, Pennell JP. Comparison of interstudy reproducibility of cardiovascular magnetic resonance with two-dimensional echocardiography in normal subjects and in patients with heart failure or left ventricular hypertrophy. *AM J Cardiol* 2002;90:29-34

Hagège AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alhéritière A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasché P. Skeletal Myoblast Transplantation in Ischemic Heart Failure. Long-Term Follow-Up of the First Phase I Cohort of Patients. *Circulation.* 2006;114:I-108–I-113.

Jaine M, DerSimonian H, Brenner DA, Ngoy S, Teller P, Edge AS, Zawadzka A, Wetzel K, Sawyer DB, Colucci WS, Apstein CS, Liao R. Cell Therapy Attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 1920-1927

Koh GY, Klug MG, Soonpaa MH, Field LJ. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 92: 1548-1554

Komeda M, Kitamura H, Fukaya S, Okawa Y. Surgical treatment for functional mitral regurgitation. *Cir J* 2009; Suppl A: A-23-A-28

Leor J, Amsalem Y, Cohen S. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacol Ther.* 2005;105:151-63.

Lok SI, Martina JR, Hesselink T, Rodermans BF, Hulstein N, Winkens B, KLöpping C, Kirkels JH, Doevedans PA, Ramjankhan F, Weger RA, Jonge ND, Lahpor JR. Singel-Centre experience of 85 patients with a continuous-flow left ventricular assist device: clinical practice and outcome after extended support. *Eur J Cardiothorac Surg* 2013 Jul 18

McGowan JH, Cleland JG. Reliability of reporting left ventricular systolic function by echocardiography: a systemic review of 3 methods. *Am Heart J* 2003;146:388-397

Mensché P, Hagège AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *The Lancet* 2001; 357: 279-280

Menasché P, Hagège AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078-83

Mensché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquet L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos MI, Hagège AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial: First randomised placebo-controlled study of myblast transplantation. *Circulation* 2008; 117: 1189-1200

Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW, Andrews ML. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N Engl J Med.* 2002;346: 877-883

Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal Myoblast Transplantation for Repair of Myocardial Necrosis. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98(11): 2512-2523

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428:664-8.

Nationale Versorgungsleitlinie Chronische KHK der Bundesärztekammer, Version 1.8, April 2008, [www.khk-versorgungsleitlinien.de](http://www.khk-versorgungsleitlinien.de)

Niederlaender E. Causes of death in the EU, Eurostat- Jahrbuch 06.2006, [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/health/public\\_health/odata\\_public\\_health/main\\_tables](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/health/public_health/odata_public_health/main_tables) (am 11.08.2013)

Piccirillo G, Nocco M, Lionetti M, Moisè A, Naso C, Marigliano V, Cacciafesta M. Effects of sildenafil citrate (Viagra) on cardiac repolarization and on autonomic control in subjects with chronic heart failure. *Am Heart J.* 2002;143(4):703-10

Pouzet B, Vilquin JT, Hagege A, Scorsin M, Messas E, Fiszman M, Schwartz K, Mensché P. Factors Affecting Functional Outcome After Skeletal Myoblast Transplantation. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 844-851

Povsic TJ, Connor CM, Henry T, Taussig A, Kereiakes DJ, Fortuin FD, Niederman A, Schatz R, Spencer R, Owens D, Banks M, Joseph D, Roberts R, Alexander JH, Sherman W. A double-blind, randomized, controlled multicenter study to assess the safety and cardiovascular effects of skeletal myoblast implantation by catheter delivery in patients with chronic heart failure after myocardial infarction. *Am Heart J* 2011;162(4):654-662

Prifti E, Bonacchi M, Frati G, Giunti IG, Leacche M, Proietti P, Babatasi G, Sani G. Should mild-to-moderate and moderate ischemic mitral regurgitation be corrected in patients with impaired left ventricular function undergoing simultaneous coronary revascularisation. *J Card Surg.* 2001, 16 (6), 473-83

Schelhase T, Rübenach SP et al. Statistisches Bundesamt, Wirtschaft und Statistik 6/2006:602-621.

Seidel M, Borczynska A, Rozwadowska N, Kurpisz M. Cell-based therapy for heart failure: Skeletal moblasts. *Cell transplantation* 2009;18: 695-707

Smith RR, Barile L, Cho CH, Leppo MK, Hare JM., Messina E, Giacomello A, Abraham R, Marbán E. Regenerative Potential of Cardiosphere-Derived Cells Expanded From Percutaneous Endomyocardial Biopsy Specimens. *Circulation* 2007; 115: 896-908

Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodelling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000; 101; 2981-2988

Ruß M, Cremer J, Krian A, Meinertz T, Werdan K, Zerkowski HR. Different treatment options in chronic coronary artery disease. *Dtsch Arztebl Int* 2009, 106 (15), 253-61

Statistik der kassenärztlichen Bundesvereinigung für die Häufigkeit der Behandlung für chronische ischämischen Herzkrankheit,  
[www.kbv.de/ais/12893.html](http://www.kbv.de/ais/12893.html)

Vidal-Perez R, Otero-Ravina F, Franco M, Rodriguez Garcia JM, Stolle RL, Alvarez RE, Diaz CI, Lopez EO, Vazquez Lopez MJ, Gonzalez-Juanatey JR. Determinants of cardiovascular mortality in a cohort of primary care patients with chronic ischemic heart disease. BARBANZA Ischemic Heart (BARIHD) study. *Int J Cardiol.* 2013;167:442-50

Votum der Ethik-Komission Hamburg, Bearb.-Nr. 2148 vom 16.04.2004

## **8. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Reichenspurner für die Überlassung des Themas und die fortwährende Motivation, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn PD Dr. Gulbins für die hervorragende Betreuung, Hilfsbereitschaft und die aufgebrachte Geduld.

Frau Sprathof aus dem Studienbüro, die die Nachuntersuchungen mit koordiniert hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Frau, für die fortwährende Unterstützung.

## **Wissenschaftliche Arbeiten**

---

### **Publikation/ Artikel:**

Kropf S, Hommel G, Schmidt U., **Brickwedel J**, Jepsen MS. Multiple Comparisons of Treatments with Stable Multivariate Tests in a Two-Stage Adaptive Design, Including a Test for Non-Inferiority. *Biometrical Journal* 42 (2000) 8, 35-49

Conradi L, Treede H, **Brickwedel J**, Reichenspurner H. Use of Initial Biventricular Mechanical Support in a Case Postinfarction Ventricular Septal Rupture as a Bridge to Surgery. *Annals of Thoracic Surgery* 2009 May; 87(5):e 37-39

### **Publikation/ Abstrakt zum Thema Myoblasten:**

**Brickwedel J**, Sill B, Boehm DH, Reichenspurner H. Long-term follow-up after skeletal myoblast transplantation in ischemic heart disease (MAGIC Phase II Study). *Thorac cardiovasc Surg* 2011; 56: V230-

**Brickwedel J**, Böhm DH, Rybczynski M, Reichenspurner H. MAGIC (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy) Phase II Study: The Hamburg Experience. *Thorac cardiovasc Surg* 2008; 56: V159-

**Brickwedel J**, Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Boehm DH, Reichenspurner H. The MAGIC Phase II Study (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic cardiomyopathy): an interim analysis. [www.ismics.org/abstracts/2007ISMICS07\\_5.html](http://www.ismics.org/abstracts/2007ISMICS07_5.html)

**Brickwedel J**, Böhm DH, Rybczynski M, Reichenspurner H. MAGIC (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy) Phase II Study: interim analysis from a single center perspective. *Thorac cardiovasc Surg* 2007; 55: MP\_123-

**Brickwedel J**, Boehm DH, Reichenspurner H. Sophisticated Logistic Pathways: Magic Phase II Study (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy). Innovations: Technology & Techniques in Cardiothoracic & Vascular Surgery 1 (4):206, Summer 2006

**Brickwedel J**, Boehm DH, Reichenspurner H. New Surgical Techniques in the Treatment of Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC II Study). Progress in Coronary Artery Disease – Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Congress on Coronary Artery Disease (2005), 373-377

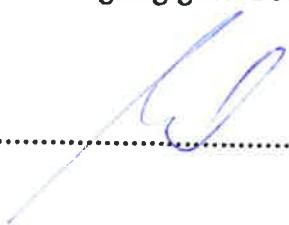
**10. Eidesstattliche Versicherung [als letztes Blatt in die Dissertation einzubinden]**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....



## **11. Promotionsbezogene Publikation**

EJCTS/2012/344291 Long-term follow-up after autologous skeletal myoblast  
> transplantation in ischemic heart disease

TOC Category: Cardiac general, Original  
> article (ICVTS) (received: August 16, 2013)

**Long-term follow-up after autologous skeletal myoblast transplantation in  
ischemic heart disease**

Jens Brickwedel, M.D., Helmut Gulbins, M.D., Hermann Reichenspurner, M.D., Ph.D.

University Heart Center Hamburg, Department of Cardiovascular Surgery, Germany

Jens Brickwedel M.D.

University Heart Center Hamburg

Martinistraße 52

20246 Hamburg

Germany

Tel. +4940741053440

Fax. +4940741054926

E-mail: [j.brickwedel@uke.uni-hamburg.de](mailto:j.brickwedel@uke.uni-hamburg.de)

Word count abstract 306 words

Word count article 2858 words

## **Abstract**

**Introduction:** Short-term follow-up after autologous skeletal myoblasts (ASM) transplantation (Tx) (MAGIC Phase II Study) for the treatment of ischemic cardiomyopathy revealed improved left ventricular (LV) remodeling. Our study reports the longest long-term worldwide follow-up of a single center cohort, focusing on the safety and efficacy of ASM-Tx.

**Methods:** The multicenter MAGIC Phase II study involved 120 patients and was conducted between 2004 and 2006. Out of 120 patients involved in the entire study, the cohort treated at our institution contained 7 patients only. These 7 patients received, in addition to the coronary bypass grafting (CABG), ASM-Tx (injection volume: 400 million cells, n=2 low dosage; 800 million cells, n=2 high dosage) or placebo (n=3) injections. After closure of the MAGIC registry, we conducted a long-term follow-up of our 7 patient cohort. The mean follow-up was  $72.0 \pm 5.3$  months. Follow-up was complete for echo data, implanted cardioverter defibrillator (ICD) report, clinical investigation and NYHA class.

**Results:** At final follow-up all patients were alive, 5 were in NYHA class 1 or 2. There were 6 hospitalizations for congestive heart failure during follow-up (one patient from each group). One patient (placebo group) was treated twice for ventricular fibrillation by the ICD. The LV ejection fraction remained stable in all 3 groups ( $31.1 \pm 3.9\%$  preoperative vs.  $29.4 \pm 4.4\%$  at final follow-up). The LV volumes were reduced in the high dosage group, remained unchanged in the low dosage group, and deteriorated in the placebo group.

**Conclusion:** Our long-term data confirm the findings of the MAGIC study. The LV function did not improve, but the long-term LV volumes in the high-dosage group were reduced. During the follow-up there were also no additional arrhythmogenic incidences. Our data could imply that CABG in combination with ASM-Tx is safe and has beneficial therapeutic effects in the long-term. However, due to the small patient number, the clinical impact is limited.

## **Key words:**

Cardiac cell therapy, long-term follow-up, chronic ischemic heart disease

## **Introduction:**

At present, cardiovascular disease remains a major public health problem. In 2004 nearly half of all reported deaths in the German population were due to cardiovascular disease. Chronic ischemic heart disease caused by myocardial remodeling presented the highest gender-specific mortality rate for women (11.1%) and men (9.3%) in 2004 in Germany [1,2]. Chronic ischemic heart disease [3] has a poor prognosis, and can only be positively affected by coronary revascularization if there is still viable myocardium [4]. Since treatment options are limited for patients with chronic ischemic heart disease, it presents a need for innovative therapeutic concepts for these patients.

Myoblasts, as a possible source of myocardial cell therapy have been investigated over the past decade. Philipp Menasché described intramyocardial cell delivery of myoblasts as a potential treatment option for chronic ischemic heart disease [5]. In 2004 the MAGIC Phase 2 Study (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy), based on the promising results of the Phase 1 study [6], commenced. This study evaluated the safety and efficacy of myoblast transplantation in a double blinded, multi center, prospective randomized placebo controlled set-up [7]. In 2006 Philipp Menasché published the long term follow-up data of the Phase 1 study experience of myoblast transplantation in patients with chronic ischemic heart disease. The Phase 1 cohort was the first to publish long-term data, however, the follow-up was conducted over a wide range from 18 to 58 months (median follow-up of 49.4 months) [8]. The MAGIC study protocol had a limited 12 month follow-up. Having identified the need for long-term completed follow-up in this field of study, we continued to follow-up our patients who participated in the MAGIC Phase 2 Study up until July 2011.

Skeletal myoblasts, as a possible source for regenerating cardiac therapy, still continue to remain a topic of research in experimental [9,10] and clinical setups [18].

## **Materials and Methods:**

### **Study Design and Group**

The in- and exclusion criteria, intervention, randomization and blinding procedures and the results of the underlying study have been described in detail by Menasché et al. [7].

Between 2004 and 2006 a total of 120 patients were included in the MAGIC Phase 2 Study. Ten of these patients were included in the study at our institution, of which 7 were randomized and treated in addition to the coronary bypass grafting with a myoblast or placebo solution. The patient characteristics are summarized in table 1. All participating patients of the initial Phase 2 Study signed informed consent, which was approved by the local ethics

committee. Our 7 patients also signed informed consent, in order to give access to their complete medical history for the long-term follow-up.

To recapitulate the concept of the MAGIC Study: patients with chronic ischemic heart disease, with a left ventricular ejection fraction from 35% down to 15% and an indication for a coronary artery bypass operation were included. Prior to randomization, all patients underwent transthoracic ultrasound (rest and dobutamine stress) to include only patients with a fixed akinesia affecting at least 2 accessible, contiguous left ventricular segments [19]. After randomization, 10g of skeletal muscle were taken from the upper thigh. A cell solution containing skeletal myoblasts was manufactured from the biopsy taken (vastus lateralis muscle). The cell solution, containing either  $800 \times 10^6$  (high dosage group) or  $400 \times 10^6$  cells (low dosage group) or placebo solution, was injected into the infarcted myocardium and the border zone of the infarction during the coronary bypass operation. All patients (placebo and treatment group) received an implanted cardiac defibrillator (ICD) and treatment with amiodarone prior to discharge based on the experience of the Phase I Study.

### **Follow-up data**

Between 2004 to July 2011 the patients were followed-up on an annual basis. The follow-up included clinical investigation, ICD report, and transthoracic echocardiogram when required. The echocardiographic examinations for left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular enddiastolic and endsystolic volume (LVEDV and LVESV) were performed according to the standard protocol of the study. For the follow-up echocardiographic studies a Vivid 7, GE Healthcare, was used.

### **Statistics**

All results are reported as an average and standard deviation (mean $\pm$ SD). The data include the original source data of the MAGIC Phase 2 Study (centrally evaluated echocardiogram studies, ICD reports) of our patients and locally generated and interpreted data after closure of the study register. The small patient numbers and the intraindividual variability of the results limit interpretation, making statistical analysis inappropriate. For this reason, descriptive statistical methods were used.

All authors had full access to the data and take responsibility for accuracy. All authors have read and approved the written manuscript.

## **Results**

There were three patient withdrawals prior to randomization. Patient 04 was excluded due to heart failure prior to scheduled surgery. Patient 06 had an ejection fraction of more than 35% and was thus excluded. Patient 07 withdrew himself from the study for personal reasons.

We followed up all seven male patients who were randomized for the MAGIC Study, 2 of whom were allocated to the high-dosage group, 2 to the low-dosage, and 3 to the placebo group. The mean follow-up was  $72.0 \pm 5.3$  (range 80 to 64) months. The follow-up was complete (100%). Bypass grafting was performed following the preoperative angiogram. All patients had an initial posterior ischemic area which was treated either with the cell or the placebo solution. The pre- and peri-operative details of all patients are shown in table 1.

## **Safety issues**

There was no mortality during the follow-up. At the last follow-up (see table 2) all patients were in a good, stable medical condition at home, using specific medication including aspirin and/ or clopidogrel or phenprocoumon, beta-blocker, ACE-inhibitor or AT<sub>1</sub>-receptor antagonist, and statin. Additionally, 2 of 7 patients were treated with digoxins, 4 of 7 patients with diuretics, 2 of 7 with an aldosterone antagonist, 1 of 7 with central alpha blockade, and 1 of 7 patients with sotalol. Five patients had retired during follow-up and two patients were still employed.

The patients of the high dosage group remained in their NYHA functional class during follow-up. There was no readmission for heart failure or coronary re-intervention in this group. Patient 01 experienced two episodes of ICD firing due to sensing lead failure. Patient 03 was treated once for slow ventricular tachycardia.

In the low-dosage group patient 09 improved from NYHA class 3 to 2, and patient 02 deteriorated from NYHA class 1 to 2. The latter patient was also readmitted 4 times for heart failure within the follow-up period and received two ICD shocks in the first month (for supraventricular tachycardia and cluster ventricular tachycardia), and one in the third month (for high frequency atrial fibrillation). Patient 09 experienced ICD firing due to sensing lead failure and underwent percutaneous coronary intervention (PCI) because of progression of the coronary artery disease. He was, therefore, treated with PCI and stenting (Taxus® in first marginal artery).

At final follow-up, the NYHA class of the three patients of the placebo group remained unchanged. Patient 10, however, did improve in the early postoperative phase, but deteriorated again 40 months postoperatively from NYHA 2 to 3. Following echocardiography an anterior infarction might have been the underlying cause of the deterioration, but a final diagnosis could not be established due to poor patient compliance. None of the patients in

this group underwent coronary intervention, but patient 08 and 10 were each readmitted once for heart failure. The ICD of patient 05 was explanted after the system got infected with staphylococcus aureus and, to date, still has not been replaced. Patient 10 was treated for ventricular fibrillation in month 5 and 24.

During follow-up there was no clinical evidence for any patient of either relevant long-term side effects after myoblast wash out from the heart to peripheral organs, or cancer.

### **Functional issues**

The functional analysis is based on the results of the echocardiographic investigations throughout this study. The investigation at 6 month follow-up for patient 10 and the investigation for patient 08 at 12 months and 69 months could not be adequately interpreted due to poor echo quality.

The geometry of the left ventricle changed during follow-up. There was an initial improvement in all 3 groups for both LVESV and LVEDV at 6 and 12 months follow-up. This positive tendency continued in the long term follow-up for the high dosage group only. The low dosage group, however, did not show this positive tendency in the long term as compared to the preoperative levels. The diameters in the placebo group deteriorated over time and showed an increase of the left ventricular volumes, particularly after 12 months. Details of the echocardiographic findings described above are shown in table 3 and figure 1 and 2.

The contractility of the left ventricle and the ventricular wall dynamics showed different tendencies. The LVEF improved in the high-dosage group within the first year from 29% to 35.5%. During the long term follow-up over it decreased to 32%. The low dosage group showed its peak at 6 months when the LVEF reached 35%. At 12 months follow-up it decreased to 29%, but thereafter remained stable. In the placebo group the LVEF showed an overall decrease during the follow-up: at 6 months the LVEF decreased from 31% to 25%, at 12 months it increased again to 32%, and at final follow-up decreased again to 28%.

Within our cohort a total of 10 akinetic segments were treated. There were 5 segments (2 patients) treated with a high dose myoblast solution, and 5 segments (2 patients) with the low dose cell solution. Additionally, 7 segments (3 patients) were injected with the placebo solution (as demonstrated in table 3). At 6 months follow-up 1 of the 10 grafted segments (pt. 01 – high dosage group) showed a new contractility. At final follow-up 3 of the 10 grafted segments had improved (one of the high dosage group, two of low dosage group). In the placebo group there was an improvement at 6 months follow-up in 1 out of 7 segments, and at final follow-up in 2 out of 7 segments. Due to poor investigational quality 2 patients could not be re-evaluated at follow-up.

## **Discussion**

The MAGIC Phase II Study was the first multicenter double blinded, prospective randomized, placebo controlled study evaluating the safety and efficacy of skeletal myoblast transplantation for ischemic heart disease. The patients of this long-term follow-up were part of the MAGIC Phase II Study at our center. This study did not demonstrate a significant improvement in regional or global LV function, but showed beneficial effects of myoblast engraftment on LV dimensions. There was no statistical significance demonstrated for an increased risk for arrhythmias after myoblast transplantation [7].

This long-term study revealed the same findings as that of the MAGIC Phase II Study. The improved remodeling in the high dosage group with reduced LV volumes remained unchanged and there was also no increased incidence of ventricular arrhythmia treated or detected by the implanted ICD. No side effects after myoblast wash out were detected clinically.

Long term, 5 year survival after isolated coronary artery bypass operation for patients with ischemic heart disease and an impaired left ventricular function is stated to be around 70% [13] or have an annual mortality rate of 3-4% [22]. In our small study cohort, one patient of the low-dosage group was re-admitted three times for congestive heart failure within 6 months after the initial treatment. Late re-admissions (i.e. after 2 years) were predominately seen in the placebo group. Epidemiological studies quote a risk of re-hospitalization of about 33% within two years [22]. Over our completed 5 year follow-up period, all the patients who participated in our study remained clinically stable. This clinically stable condition of all our patients could be attributed to the operative revascularization in combination with adequate medical treatment.

Following the experience of the Phase I study, the major safety concern using skeletal myoblasts as a possible source for myocardial cell therapy was the arrhythmogenic potential [6]. The electrophysiological reason for this increased tendency for arrhythmias is the absence of electromechanical coupling (i.e. the absence of gap junctions) of the transplanted myoblasts [23]. Furthermore, the MADIT II Study revealed an increased risk for ventricular arrhythmia in patients with a severely reduced ejection fraction in combination with an ischemic history [11]. In all seven patients of our cohort we detected ventricular arrhythmia prior to the study intervention (see table 1). The Magic Phase II Study did not reveal a statistical significant difference for an increased risk of arrhythmia amongst the 3 groups after intervention [7]. Povsic et al also documented an increase of ventricular arrhythmias in the myoblast groups, but just by number. However, their results were not statistically significant [18]. The two patients of our cohort who had adequate ICD firing in the early phase at 1, 3 and 5 months follow-up were in the low-dosage and in

the placebo control group. Both patients had already revealed multiform ventricular extrasystoles and salvos in the preoperative Holter-ECG and, as every MAGIC patient, received amiodarone treatment after myoblast transplantation for a minimum of 6 months. The late ICD firing in patient 10 could probably be attributed to the fact that the patient did not take his prescribed medication on a regular basis, as well as taking unprescribed sildenafil [12].

Other safety concerns of cardiac cell therapy include arrhythmogenesis [6], as well as oncogenic transformation [14], multiorgan seeding [15], aberrant cell differentiation [16], and accelerated atherosclerosis which could lead to a higher incidence of coronary events [17].

Cell therapies in general may lead to an improved left ventricular remodeling measured mainly with reduced left ventricular volumes and slightly improved ejection fraction [18]. The mechanisms by which cell therapy could lead to an improved remodeling are not clearly understood. Various theories have been introduced and rejected. Seidel et al. summarized three possible mechanisms by which transplanted myoblasts, with respect to their cellular activity, might improve cardiac function: 1) the implanted cells act as a strengthening scaffold within the ventricular wall and lead to a limitation of the infarct size and an improved remodeling; 2) due to their contractile properties, transplanted myoblasts contribute directly to the cardiac systolic function; 3) the transplanted myoblasts constitute a potent source of growth and/or angiogenic factors as well as a paracrine effect stimulated through the transplanted cells. At present, a cytokine-paracrine hypothesis is favored, with the assumption that more than 30 factors involved in different pathways and cascades are responsible for the improved remodeling [15]. However, the observed changes are most likely multifactorial [20]. After an initial improvement of the myocardial volumes at 6 months follow-up, the four patients of the treatment groups showed a slight decline towards the preoperative levels at 12 months follow-up. At final follow-up, the high dosage group showed smaller volumes than the low dosage group. The placebo group also showed an initial improvement at 6 months follow-up, but continued to increase the left ventricular volumes again from 6 months onwards. Similar findings were documented for the LVEF for the follow-up period. Left ventricles have also a chance for improvement after isolated coronary artery bypass [24]. Therefore, it must be taken into consideration that the documented left ventricular changes in our small cohort could be incidental.

The evaluation of the grafted segments for wall motion with echocardiography is questionable in this study setup. Despite the fact that we followed the standardized protocol, echo investigational quality was often poor in certain patients and received data was thus incomplete. It is a known fact that echocardiographic imaging can be of poor

quality with a high intra- and inter-observer variability [25]. MRI is known to provide reliable information with acceptable variability, but unfortunately could not be considered as an option due to the ICD implant [21].

### **Limitations**

Patient numbers in the groups are low and comparisons are thus of a descriptive nature rather than statistical. The results of this long-term follow-up study are thus limited to the small patient numbers, and should be taken into consideration when applying it to bigger patient populations. Inter-observer variability needs to be taken in account since follow-up echocardiographies were not interpreted in the MAGIC Phase II Study core laboratory.

### **Conclusion**

Cardiac cell therapies, such as skeletal myoblasts, are known to limit infarction size and improve cardiac remodeling. Our long-term data confirm the findings of the MAGIC study. The LV function did not improve, but the long-term LV volumes in the high-dosage group were reduced. During the follow-up there were also no additional arrhythmogenic incidences in the high-dosage or the low-dosage group. Our data suggests that CABG in combination with ASM-Tx could be safe and might have beneficial therapeutic effects in the long-term. However, due to the small patient number, the clinical impact is limited. The mechanisms by which cell-based therapy improves cardiac function are not yet clearly understood and there is an obvious need to conduct further long-term studies with bigger patient groups to prove the feasibility and safety of these modern concepts of cell delivery for the treatment of ischemic cardiomyopathy. Therefore, skeletal myoblasts remains a possible source of treatment for chronic ischemic heart disease.

### **Conflict of interest**

We certify that there is no conflict of interest with any financial organization regarding the material discussed in the manuscript.

Table 1: patient characteristics

patient profile	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
<b>Randomization</b>	high-dose	low-dose	high-dose	excluded	placebo	excluded	Withdrawn	placebo	low-dose	placebo
<b>myoblast target</b>	posterior	Posterior	Posterior	Na	posterior	na	na	posterior	Posterior	posterior
<b>Age</b>	54	64	53	67	55	64	56	68	55	63
<b>BMI</b>	25	5	25	24	27	24	28	38	30	27
<b>NYHA</b>	2	1	1	4	2	2	2	3	3	3
<b>prv. Infarction</b>	yes	Yes	Yes	Yes	yes	yes	Yes	yes	Yes	yes
<b>EF [%]</b>	33	34	25	24	31	35	20	34	32	26
<b>rhythm pre-OP</b>	SR	AF	SR	SR	SR	SR	SR	AF	SR	SR
<b>Arrhythmia pre-OP</b>	multif. VES	multif. VES	ventic. fib.	ventric. fib.	multif. VES	multif. VES	multif. VES	multif. VES	VES	VES
<b>CAD</b>	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>pathological wall motion pre- OP</b>	posteriolat.	posteriolat.	posteriolat.	ant. + posteriolat	posterior	anterolateral + inferior	anterolateral	posteriorseptal	Posterior	posterior
<b>bypass grafting</b>	OM	CX	LAD, Diag, OM		LAD, CX			LAD, OM	LAD, Diag, OM, RIVP	LAD, RIVP
<b>diabetes mellitus</b>		X			X	X				
<b>Hyperlipidaemia</b>	X	X	X	X	X	X	X	X		
<b>Hypertension</b>	X	X		X		X	X	X	X	X
<b>smoking</b>	X	X	X	X	X	X	X	X		X
<b>impaired renal fct.</b>		X						X	X	X
<b>COPD</b>	X					X				
<b>Pavd</b>	X	X	X		X	X				X

BMI = body mass index, NYHA = New York Heart Association, prv. = previous, OP = operation, CAD = coronary artery disease, fct. = function, COPD = chronic obstructive pulmonary disease, pavd = peripheral artery vessel disease, SR = sinus rhythm, AF = atrial fibrillation, EF = ejection fraction, VES = ventricular extra systole, multi = multiform, posterolat. = posterolateral, ant. = anterior, OM = obtuse marginal branch, CX = circumflex artery, LAD = left anterior descending, Diag. = diagonal branch, RIVP = right marginal artery, na = not applicable

Table 2: safety issues

Patient	01 (hd)	02 (ld)	03 (hd)	05 (pla.)	08 (pla.)	09 (ld)	10 (pla.)
NYHA at follow-up	2	2	1	2	3	2	3
coronary reintervention	no	no	no	no	no	1	no
ICD firing	2	3	1	no	no	1	2
readmission for heart failure [month]	no	4 (1,3,6,36)	no	no	1 (68)	no	1 (40)
follow-up [month]	80	75	74	74	69	68	64

hd = high dosage, ld = low dosage, pla. = placebo control, NYHA = New York Heart Association, ICD = internal cardioverter defibrillator

Table 3: functional issues

Patient	LVEF (%) Pre-M6-M12-FU	Akinetic Grafted	LVESV	LVEDV
		Segments Pre-M6-FU	Pre-M6-M12-FU	Pre-M6-M12-FU
01 (hd)	33-27-33-30	2-1-1	140-130-120-105	210-181-177-151
02 (ld)	34-29-20-23	2-2-2	130-144-188-134	179-204-237-175
03 (hd)	25-37-38-34	3-3-3	98-79-124-111	150-127-201-168
05 (pla.)	34-35-42-27	2-1-0	90-101-55-135	125-156-109-185
08 (pla.)	34-31-XX-XX	3-3-XX	132-103-XX-XX	188-150-XX-XX
09 (ld)	32-41-38-35	3-3-1	118-75-66-134	170-129-116-208
10 (pla.)	26-10-23-29	2-XX-2	220-175-186-239	302-200-243-337

hd = high dosage, ld = low dosage, pla. = placebo control, LVEF = left ventricular ejection fraction, LVESV = left ventricular endsystolic volume, LVEDV = left ventricular enddiastolic volume, Pre = preoperative, M6 = 6 months follow-up, M12 = 12 months follow-up, FU = final months follow-up, XX = no values available

Figure 1 (LVEDV over time)

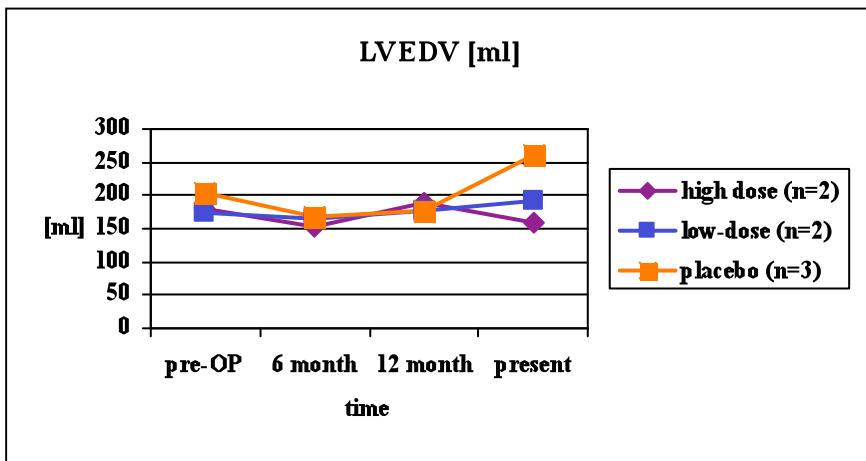
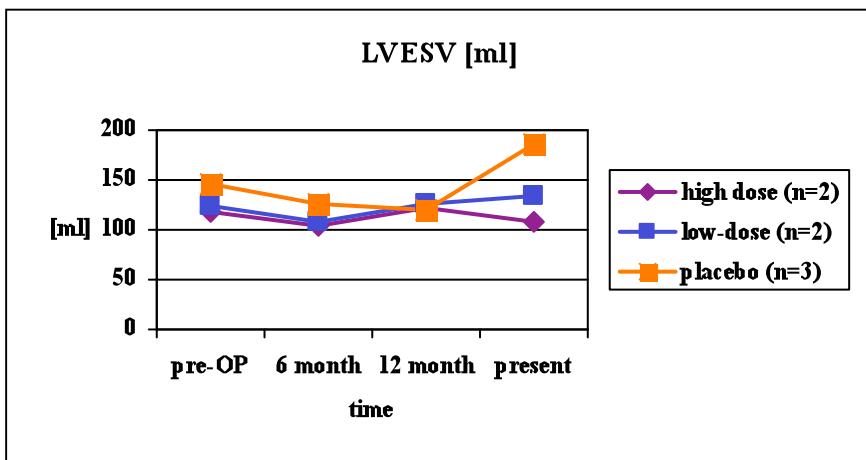


Figure 2 (LVESV over time)



- 01 Schelhase T, Rübenach SP. Die Todesursachenstatistik – Methodik und Ergebnisse 2004. Statistisches Bundesamt, Wirtschaft und Statistik 6/2006:614-629.
- 02 Agnoletti G, Cargnoni A, Agnoletti L, Di Marcello M, Balzarini P, Pasini E, Gitti G, Martina P, Ardesi R, Ferrari R. Experimental Ischemic Cardiomyopathy: Insights into Remodeling, Physiological Adaptation, and Humoral Response. Ann of Clin Lab Sci. 2006;36(3):333-340.
- 03 Levy D, Kenchaiah S, Larson M, Benjamin EJ, Kupka MA, Ho KKL, Murabito JM, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. N Engl J Med 2002; 347:1397–02.
- 04 Rizzello V, Poldermans D, Biagini E, Schinkel AFL, Boersma E, Boccanelli A, Marwick T, Roelandt JRTC, Bax JJ. Prognosis of patients with ischaemic cardiomyopathy after coronary revascularisation: relation to viability and improvement in left ventricular ejection fraction. Heart 2009;95:1273–1277.
- 05 Menasché P, Hagège AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. Lancet 2001;357:279-280
- 06 Menasché P, Hagège AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol 2003;41:1078–83
- 07 Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquet L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagège AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial. First Randomized Placebo-Controlled Study of Myoblast Transplantation. Circulation. 2008;117:1189-1200
- 08 Hagège AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alhéritière A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasché P. Skeletal Myoblast Transplantation in Ischemic Heart Failure. Long-Term Follow-Up of the First Phase I Cohort of Patients. Circulation. 2006;114:I-108–I-113.
- 09 Poppe A, Golsong P, Blumenthal B, von Wattenwyl R, Blanke P, Beyersdorf F, Schlensak C, Siepe M. Hepatocyte growth factor-transfected skeletal myoblasts to limit the development of postinfarction heart failure. Artif Organs 2012; 36(3):228-46
- 10 Blumenthal B, Poppe A, Golsong P, Blanke Ph, Rylski B, Beyersdorf F, Schlensak C, Siepe M. Functional regeneration of ischemic myocardium by transplanted cells over expressing stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): intramyocardial injection versus scaffold-based application. Eur J Cardiothorac Surg 2011; 40: e135-e141
- 11 Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW, Andrews ML. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. N Engl J Med. 2002;346: 877-883
- 12 Piccirillo G, Nocco M, Lionetti M, Moisè A, Naso C, Marigliano V, Cacciafesta M. Effects of sildenafil citrate (Viagra) on cardiac repolarization and on autonomic control in subjects with chronic heart failure. Am Heart J. 2002;143(4):703-10
- 13 Appoo J, Norris C, Merali S, Graham MM, Koshal A, Knudtson ML, Ghali WA. Long-Term Outcome of Isolated Coronary Artery Bypass Surgery in Patients with Severe Left Ventricular Dysfunction. Circulation 2004;110;II-13-II-17

- 14 Behfar A, Terzic A. Optimizing adult mesenchymal stem cells for heart repair. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(2):283-284
- 15 Gnech M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy. *Circ Res*. 2008;103:1204-1219.
- 16 Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JWU, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Potential risk of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007;110:1362-1369
- 17 Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction. *Circulation* 2005;112:I-178-I-183
- 18 Povsic TJ, Connor CM, Henry T, Taussig A, Kereiakes DJ, Fortuin FD, Niederman A, Schatz R, Spencer R, Owens D, Banks M, Joseph D, Roberts R, Alexander JH, Sherman W. A double-blind, randomized, controlled multicenter study to assess the safety and cardiovascular effects of skeletal myoblast implantation by catheter delivery in patients with chronic heart failure after myocardial infarction. *Am Heart J* 2011;162(4):654-662
- 19 Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, Pennell DJ, Rumberger JA, Ryan T, Verani MS. American Heart Association Writing Group on Myocardial Segmentation and Registration for Cardiac Imaging. *Circulation*. 2002;105:539-42
- 20 Seidel M, Borczynska A, Rozwadowska N, Kurpisz M. Cell-based therapy for heart failure: Skeletal moblasts. *Cell transplantation* 2009;18: 695-707
- 21 Grothues F, Smith GC, James C.C. Moon, Bellenger NG, Collins P, Klein HU, Pennell JP. Comparison of interstudy reproducibility of cardiovascular magnetic resonance with two-dimensional echocardiography in normal subjects and in patients with heart failure or left ventricular hypertrophy. *AM J Cardiol* 2002;90:29-34
- 22 Vidal-Perez R, Otero-Ravina F, Franco M, Rodriguez Garcia JM, Stolle RL, Alvarez RE, Diaz CI, Lopez EO, Vazquez Lopez MJ, Gonzalez-Juanatey JR. Determinants of cardiovascular mortality in a cohort of primary care patients with chronic ischemic heart disease. BARBANZA Ischemic Heart (BARIHD) study. *Int J Cardiol*. 2013;167:442-50
- 23 Abraham MR, Henrikson CA, Tung L, Chang MG, Aon M, Xue T, Li RA, O' Rourke B, Marban E. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res*. 2005;97:159-167
- 24 Ghods M, Pancholy S, Cave V, Cassell D, Heo J, Iskandrian AS. Serial changes in left ventricular function after coronary artery bypass: implications in viability assessment. *Am Heart J* 1995;129:20-23
- 25 McGowan JH, Cleland JG. Reliability of reporting left ventricular systolic function by echocardiography: a systemic review of 3 methods. *Am Heart J* 2003;146:388-397