

Aus der Klinik für Kardiologie/Angiologie
des Universitären Herzzentrums Hamburg
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. med. Stefan Blankenberg

**Einfluss einer Amplatzer Okkluderimplantation auf die
Mobilisierung von hämatopoetischen
Stamm- und Progenitorzellen
bei Patienten mit atrialem Septumdefekt**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt

von

Michèle Ohland
aus Bad Homburg

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg: 13.09.2011

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Klinikdirektor: Professor Dr. med. Stefan Blankenberg

Betreuer der Arbeit: Professor Dr. med. Stephan Baldus

Prüfungsausschuss: der Vorsitzende: Prof. Dr. med. S. Baldus

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. med. K. Sydow

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Fiedler

Gewidmet meinen lieben Eltern

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 VORHOFSEPTUMDEFEKT	8
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE	8
1.1.2 ÄTIOLOGIE	8
1.1.3 PATHOPHYSIOLOGIE	10
1.1.4 THERAPIE	11
1.2 STAMMZELLEN	14
1.2.1 DEFINITION EINER STAMMZELLE	14
1.2.2 KEIMZELLENTWICKLUNG UND EMBRYONALE STAMMZELLEN	14
1.2.3 ADULTE STAMMZELLEN	16
1.2.4 HÄMATOPOESE	17
1.2.4.1 REGULATION DER HÄMATOPOESE	18
1.2.5 HÄMATOPOETISCHE STAMM- UND PROGENITORZELLEN	19
1.2.6 MOBILISIERUNG VON HÄMATOPOETISCHEN STAMM- UND PROGENITORZELLEN	21
2. Fragestellung	23
3. Material und Methoden	24
3.1 STUDIENDESIGN	24
3.1.1 OKKLUDERPATIENTEN	24
3.1.2 KONTROLLGRUPPEN	25
3.1.3 ABNAHMEPROTOKOLL	26
3.2 DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)	26
3.2.1 FUNKTIONSPRINZIP	26
3.2.2 GERÄTE UND MATERIALIEN	28
3.2.3 VERSUCHSANORDNUNG UND DURCHFÜHRUNG	29
3.3 COLONY ASSAYS	31
3.3.1 GERÄTE UND MATERIALIEN	31
3.3.2 VERSUCHSANORDNUNG UND DURCHFÜHRUNG	31
3.4 IMMUNOASSAYS (ELISA)	32
3.4.1 FUNKTIONSPRINZIP	32
3.4.2 GERÄTE UND MATERIALIEN	33
3.4.3 VERSUCHSANORDNUNG UND DURCHFÜHRUNG	33
3.5 STATISTIK	34

4. Ergebnisse	35
4.1 IMMUNPHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG DER ZIRKULIERENDEN HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN (FACS)	35
4.1.2 MOBILISIERUNG VON CD133⁺ ZELLEN	37
4.1.2.1 CD133⁺/CD34⁺ UND CD133⁺/CD34⁻ ZELLEN	37
4.1.2.2 CD133⁺/CD45⁺ UND CD133⁺/CD45⁻ ZELLEN	38
4.1.3 MOBILISIERUNG VON CD34⁺ ZELLEN	38
4.1.3.1 CD133⁺/CD34⁺ UND CD133⁻/CD34⁺ ZELLEN	38
4.1.3.2 CD34⁺/CD45⁺ UND CD34⁺/CD45⁻ ZELLEN	39
4.1.4 MOBILISIERUNG VON CD45⁺ ZELLEN	39
4.1.4.1 CD133⁺/CD45⁺ UND CD133⁻/CD45⁺ ZELLEN	39
4.1.4.2 CD34⁺/CD45⁺ UND CD34⁻/CD45⁺ ZELLEN	40
4.2 FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG MOBILISierter STAMM- UND PROGENITORZELLEN MITTELS COLONY ASSAYS	40
4.3 ANALYSE DER HSC MITTELS IMMUNOASSAYS (ELISA)	44
5. Diskussion.....	46
5.1 AUSWIRKUNG DER OKKLUDERIMPLANTATION AUF DIE MOBILISIERUNG VON HSC	48
5.1.1 MOBILISIERUNG DER CD 133⁺ ZELLEN NACH OKKLUDERIMPLANTATION	48
5.1.2 KOLONIEBILDENDES POTENTIAL DER ZIRKULIERENDEN ZELLEN	48
5.1.3 ANALYSE VON ZYTOKINEN UND SERUMPROTEINEN MIT MOBILISIERUNGSPOTENTIAL	49
6.Zusammenfassung	52
7.Literaturverzeichnis.....	54
8. Abbildungsverzeichnis	57
9. Tabellenverzeichnis.....	59
10. Anhang	61
10.1 MATERIALIEN FÜR ELISA	61
10.1.1 MCP-1	61
10.1.2 SDF-1	62
10.1.3 VEGF	63
10.1.4 MPO	63
10.1.5 MANN-WITHNEY-U-TEST DER FACS-MESSUNGEN	63
10.1.6 MANN-WITHNEY-U-TEST DER COLONY ASSAYS-MESSUNGEN	64
10.1.7 MANN-WITHNEY-U-TEST DER ELISA MESSUNGEN	64
11. Danksagung	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ASD	Atrialer Septumdefekt
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony-forming unit
E	Erythrozyt
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EPC	Endothelial progenitor cell (Endotheliale Progenitorzelle)
EPO	Erythropoetin
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
G-CSF	Granulocytes-colony-stimulating factor
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
KDR	Kinase-insert domain containing receptor (VEGF-Rezeptor 2)
L	Lymphozyt
M	Makrophage
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
Meg	Megakaryozyt
min.	Minute (n)
MNCs	Mononuclear cells (Mononukleäre Zellen)
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
MPO	Myeloperoxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phycoerythrin
PFO	Persistierendes Foramen Ovale
rpm	Rounds per minute
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SEM	Standard Error of the Mean
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumor Nekrosefaktor-alpha

TPO	Thrombopoetin
VEGF	Vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

1. Einleitung

1.1 Vorhofseptumdefekt

1.1.1 Epidemiologie

Der Vorhofseptumdefekt tritt mit einer Häufigkeit von 8-10 % aller angeborenen Herzfehler auf [29] und stellt somit nach dem Ventrikelseptumdefekt, dessen Häufigkeit 20-25 % beträgt, den zweithäufigsten angeborenen Herzfehler bei Erwachsenen dar [11, 12]. Die Inzidenz beträgt 6,4:10.000 Geburten. Mädchen sind doppelt so häufig betroffen wie Jungen [47]. Aufgrund der hohen Inzidenz kommt der kausalen Therapie des ASD bzw. seiner Folgezustände eine große Bedeutung zu.

1.1.2 Ätiologie

Vorhofseptumdefekte resultieren aus einem unvollständigen Verschluss der Herzscheidewand während der Organogenese in der Embryonalperiode des Menschen. Die Vorhofscheidewand wächst dabei von zwei Seiten, vom Bereich des Coronarvenensinus und von der Klappenebene, als jeweils eine Hälfte aufeinander zu. Diese beiden Hälften legen sich bei normalem Wachstum an ihrem Berührungspunkt übereinander.

Ein offenes Foramen ovale entsteht, wenn sich die beiden aufeinander zuwachsenden, überlappenden Septen (dünnes, linksatrial gelegenes Septum primum und das dickere, rechtsatrial gelegene Septum secundum) postpartal nicht aneinanderlegen und folglich miteinander verwachsen. Hiervon abzugrenzen sind Vorhofseptumdefekte, die auf einem unzureichenden Wachstum eines der beiden Vorhofblätter beruhen - Primum- oder Sekundumdefekt - je nachdem, ob das Vorhofblatt im Bereich des Sinus venosus oder der Klappenebene nicht ausreichend gewachsen ist.

Für die interventionelle Therapie ist die Unterteilung der Defekte entsprechend ihrer Lage und embryologischen Genese in drei Untergruppen von Bedeutung:

	Ostium-Sekundum-Defekt (ASD II)	Ostium-Primum-Defekt (ASD I)	Sinus-venosus-Defekt
Häufigkeit	80 %	9 %	11 %
Lokalisation	im Bereich der Fossa ovalis	kranial der AV-Klappenebene	oberer, selten unterer, Teil des Vorhofseptums, an der Einmündung der jeweiligen Vena cava in den rechten Vorhof
Besonderheit	Extremform des ASD II; komplettes Fehlen des Septum secundum; Größe sehr variabel	häufig mit Spaltbildung eines Segels der Mitralklappe mit konsekutiver Insuffizienz	fast immer mit Fehleinmündung der oberen Lungenvene in die Vena cava superior assoziiert

Tab.1: Übersicht der ASD-Typen

Der Ostium-Sekundum-Defekt (ASD II) ist mit 80 % der häufigste Vorhofseptumdefekt und liegt im Bereich der Fossa ovalis. Das PFO (Persistierendes Foramen ovale) gehört zum ASD II und stellt keinen Herzfehler im eigentlichen Sinne dar, sondern ist ein Überbleibsel des fetalen Kreislaufes. Bei 20-30 % der Kinder und Erwachsenen bleibt diese Verbindung jedoch in verschiedener Größe offen.

Der Ostium-Primum-Defekt (ASD I) liegt weiter unten in der Vorhofscheidewand nahe den Atrioventrikularklappen (Mitralklappe und Trikuspidalklappe) und geht häufig mit einer Spaltbildung eines Segels der Mitralklappe einher. Der ASD I wird wegen seiner Zugehörigkeit zum Fehlbildungskomplex des Atrioventrikularkanals als inkompletter atrioventrikulärer Septumdefekt bezeichnet.

Der Sinus-venosus-Defekt ist meist in oberen, in selteneren Fällen auch in unteren Teilen des Vorhofseptums, unmittelbar an der Einmündung der jeweiligen Hohlvene in den rechten Vorhof lokalisiert.

Die beiden letztgenannten Defekte (ASD I, Sinus-venosus-Defekt) zeichnen sich unter anderem durch ihre randständige Lage im Vorhofseptum aus. Die Randlage dieser Defekte hat einen interventionellen Verschluss bislang nicht möglich gemacht. Der ASD II hingegen zeichnet sich durch eine relativ zentrale Lage in der Scheidewand aus, die ihn für einen interventionellen Verschluss besonders prädestiniert.

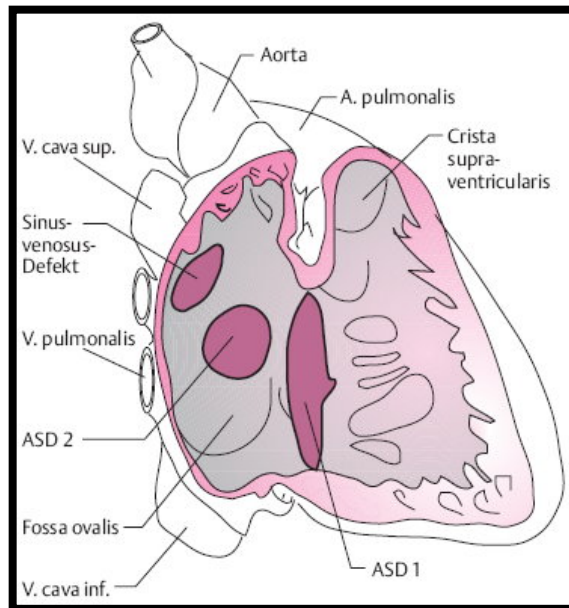


Abb.1: Graphische Darstellung der drei unterschiedlichen Formen eines Vorhofseptumdefektes [26]

1.1.3 Pathophysiologie

In einem gesunden Herzen ist der Füllungsdruck im linken Vorhof höher, da die Compliance des linken Ventrikels aufgrund der starken Muskulatur niedriger ist als die des rechten. Bei einem ASD entwickelt sich folglich ein Links-Rechts-Shunt. Die Shuntgröße und Richtung über die intraatriale Lücke werden durch die Defektgröße der Vorhofscheidewand, die Dehnbarkeit und den Füllungszustand der beiden Ventrikel bestimmt. Die resultierende Volumenüberbelastung des rechten Ventrikels und des pulmonalen Gefäßbettes wird normalerweise lange ohne das Entwickeln klinischer Symptome kompensiert, daher wird die Diagnose häufig erst in der Pubertät oder im frühen Erwachsenenalter gestellt. Selten besteht eine klinische Symptomatik bereits im Säuglings- oder Kindesalter.

Bei den selteneren größeren Defekten droht die Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie mit Rechtsherzinsuffizienz. Die Lebenserwartung beträgt dann (bei großer Streuung) im Mittel 40 Jahre [50].

Weiterhin kommt es zu Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen und Endokarditis (meist bei Septum-primum-Defekt), welche Embolien oder Hirnabszesse nach sich ziehen können [28, 38, 54].

Beim PFO besteht eine hohe Assoziation mit kryptogenen Insulten. Bei unter 55-Jährigen ist hier die Prävalenz bei einem PFO dreifach und bei einem gleichzeitig

vorhandenen Vorhofseptumaneurysma sechsfach höher als in einer Kontrollpopulation. Embolien aus den Bein- und Beckenvenen oder der Fossa ovalis selbst können über ein PFO in den Systemkreislauf gelangen und in Endarterien zu Infarkten führen. In den hirnversorgenden Arterien resultiert ein ischämischer Insult. In der Regel fehlen direkte Hinweise auf eine paradoxe Embolie, wie ein Gerinnsel im PFO oder eine tiefe Beinvenenthrombose. Gerade bei jüngeren Patienten sollte ein solcher Pathomechanismus angenommen werden, wenn andere potenzielle Ursachen für einen Apoplex ausgeschlossen wurden [6].

Beträgt die PFO-Häufigkeit in Autopsiestudien etwa 34 %, liegt sie bei jungen Schlaganfallpatienten bei bis zu 70 %. Die Wahrscheinlichkeit einer stattgehabten paradoxen Embolie vergrößert sich bei zusätzlichem Vorliegen eines atrialen Septumaneurysmas (ASA) [33].

Der Verschluss eines ventiloffenen Foramen ovale mittels Intervention oder Operation stellt für betroffene Patienten eine kausale Therapie zur Rezidivprophylaxe dar [13, 43].

1.1.4 Therapie

Die perkutane Implantation eines atrialen Septumokkluders ist ein etabliertes Verfahren bei Patienten mit hämodynamisch relevanten ASD und PFO.

Das grundsätzliche Prinzip eines Okkluders besteht im transvenösen Einbringen eines selbstexpandierenden Systems zum Verschluss des Vorhofseptumdefektes.

Die ersten tierexperimentellen Versuche eines kathetertechnischen Verschlusses wurden 1974 veröffentlicht [21]. Von dem ersten erfolgreichen interventionellen Verschluss eines ASD II beim Menschen berichteten King und Mills 1976 [22]. Es folgten Entwicklungen verschiedener Okkludersysteme, die besonders in den 80er- und 90er-Jahren von Rashkind und Lock weiter ausgebaut wurden [35, 44].

Heute ist der Verschluss eines ASD durch die Implantation eines Okkluders das Standardverfahren [50]. Die Erfolgsrate der Implantation mit vollständigem Verschluss des Defektes beträgt 94 % [26, 52]. Mögliche Komplikationen sind: die Fehllage und die Embolisation des Okkluders, eine durch den Okkluder bedingte Hämolyse, eine Klappeninsuffizienz durch die Prozedur, Verletzung von anderen Herz- und Gefäßstrukturen, Herzrhythmusstörungen, Infektion des Systems,

Thrombenauflagerung und deren Verschleppung und die Verletzung der A. femoralis sowie deren Verschluss. Die Komplikationsrate beträgt beim ASD-Verschluss 7 %, beim PFO-Verschluss 10 %. In einer Studie von Suchon et al. zeigten die Ergebnisse eines Vergleichs einer Patientengruppe, die einen chirurgischen Verschluss des ASD erhielt und einer Patientengruppen, die sich einem ASD-Verschluss mittels Okkluderimplantation unterzog, keinen signifikanten Unterschied in der Komplikationsrate (19,2 % vs. 26,7 % bei der ASO-Gruppe). Es zeigten sich jedoch ernstere Komplikationen bei der chirurgisch therapierten Patientengruppe. [52]

1.1.5 Implantationstechnik mittels Okkluder

Der Atrial-Septal-Occluder (ASO) ist ein selbstexpandierendes und zentrierendes Doppelschirmchen aus einem Nitinoldrahtgeflecht (Abb.2). Beide Schirmanteile sind durch einen zentralen Stent, dessen Durchmesser der Defektgröße entspricht, verbunden. In beide Schirme und den Stentanteil sind mit Dacron beschichtete Polyesterflicken eingenäht, die den Verschluss des Loches begünstigen.

Der ASO wurde Mitte der 90er-Jahre von dem österreichischen Wissenschaftler Professor Dr. Kurt Amplatz erfunden. Er produzierte diese Schirmprothese, welche Dank ihres besonderen Materials NiTiNol (Nickel Titanium Naval Ordnance Laboratory) die Eigenschaft hat, nach mechanischer Verformung wieder seine Ausgangsform einzunehmen. [17]

Nach invasiver Größenmessung des Defekts, wird der passende Doppelschirm ausgewählt und von femoralvenös über den ASD in den linken Vorhof geschoben. Im linken Vorhof werden der linksatriale Anteil und der zentrale Stentanteil entfaltet und durch Zurückziehen das Loch verschlossen, so dass der Stent den ASD vollständig auskleidet. Danach wird der rechtsatriale Anteil entwickelt und der Doppelschirm gebildet. [2]

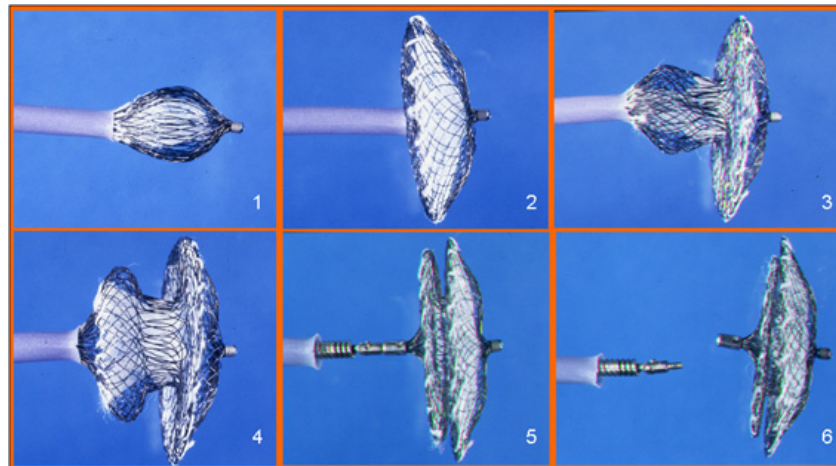


Abb.2: Freisetzen des Amplatzer Okkluders (Nitinoldrahtgeflecht mit Dacron-Patches) aus der Einführschleuse: Zur Freisetzung des Amplatzer Okkluders wird aus der Einführungsschleuse nacheinander der linksatriale Schirm (1 + 2), der Verbindungssteg (3), der mit dem ASD vollständig abschließt und der rechtsatriale Schirm (4 + 5) entwickelt. Abschließend wird das Einführungskabel von dem Schirm getrennt (6) [10]

Die Implantation wird sonographisch, mithilfe der transösophagealen Echokardiographie, überwacht (Abb.3), um eine Orientierungshilfe beim Plazieren zu ermöglichen, eine Verletzung intrakardialer Strukturen zu vermeiden und einen vollständigen Verschluss durch Kontrastmittelgabe nach Implantation nachzuweisen.

Indikation	Kontraindikation
- ASD II ohne Lungenvenenfehleinmündung	- bei fixierter pulmonaler Hypertonie mit einem pulmonal-arteriellen Widerstand über dem systemischen Widerstand mit Rechts- Links-Shunt (Eisenmenger- Reaktion)
- Verhältnis pulmonaler/systemischer Fluss >1,5:1	- Lungenvenenfehleinmündung
- Septumdefekt nicht größer als 40 mm	- nachweisbaren linksatrialen Thromben
- pulmonal-arterieller Widerstand erheblich geringer als systemischer Widerstand	- fehlender bzw. ≤ 5 mm breitem Rand des Septums

Tab.2: Indikation und Kontraindikation der Okkluderimplantation [7, 8, 26]

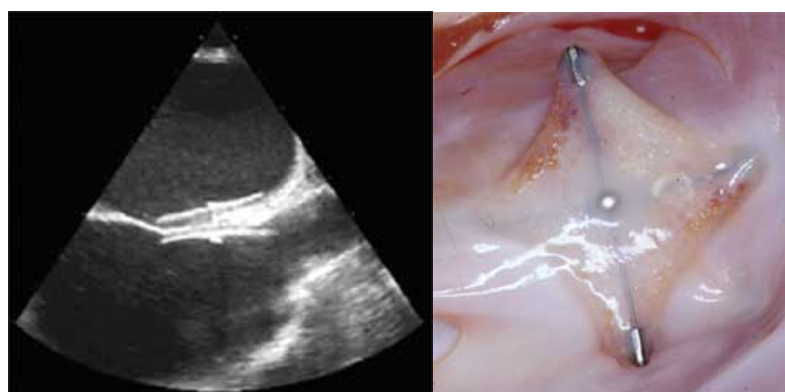


Abb.3: links: Darstellung des Verschlussimplantates (Cardia-PFO-Star-Occluder) zwischen den Vorhöfen mittels TEE, rechts: 29 Tage post implantationem [27]

Für den ersten postoperativen Tag erfolgt eine systemische Antikoagulation mit Heparin und im weiteren Verlauf für 6 Monate mit ASS und Clopidogrel.

1.2 Stammzellen

1.2.1 Definition einer Stammzelle

Eine Stammzelle ist eine unreife Zelle, die dadurch definiert ist, dass sie sich zum einen selbst erneuern kann und zum anderen differenziertere Tochterzellen (sogenannte Progenitorzellen) hervorbringen kann. Dies kann in einer Zellteilung erfolgen. Man nennt dieses Phänomen "asymmetrische Zellteilung" (siehe Abb. 4).

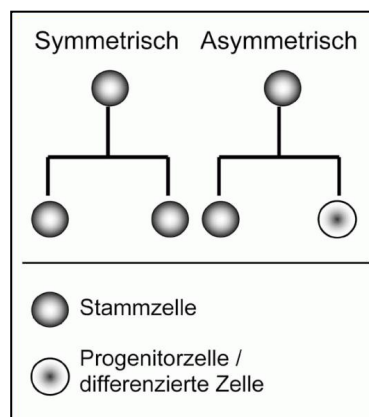


Abb.4: Symmetrische und asymmetrische Zellteilung [23]

Ob eine Stammzelle im Rahmen der Zellteilung sich selbst erneuert oder in ein weiterentwickeltes, nachgeordnetes Differenzierungsstadium übergeht, ist der Theorie nach einem stochastischen Prozess unterworfen, dessen Ergebnis auf Einzelniveau nicht vorhersehbar ist. [5]

Die Regulation dieses Vorgangs erfolgt möglicherweise durch die Proteine der Mutterzelle oder die lokale Umgebung, in der die Zellteilung stattfindet. Denkbar ist auch, dass beide Faktoren einen Einfluss auf die Differenzierung haben [51, 56]. Stammzellen werden nach ihrem Entwicklungspotential und Entwicklungsstadium in embryonale, fetale, Nabelschnurvenenblut- und adulte Stammzellen eingeteilt.

1.2.2 Keimzellentwicklung und embryonale Stammzellen

Nach Verschmelzung von Ei- und Samenzelle teilt sich die nun Zygote genannte Zelle mehrmals bis zum 16-Zell-Stadium. Im 4- und 8- Zell-Stadium sind die Zellen totipotent (siehe Tab.3). Sie können Zellen und Gewebe aller Keimblätter bilden

und haben damit das Potenzial, einen neuen Organismus zu bilden. Im späteren Blastozysten-Stadium sind die Zellen nur noch pluripotent, das heißt, es besteht die Fähigkeit der Differenzierung in zahlreiche Zelltypen, jeden Gewebes inklusive der Keimbahn. Eine komplette Organismuserzeugung ist jedoch ausgeschlossen.

[9]

Embryonale Stammzellen sind totipotent und pluripotent, adulte Stammzellen sind multipotent (Stammzellplastizität).

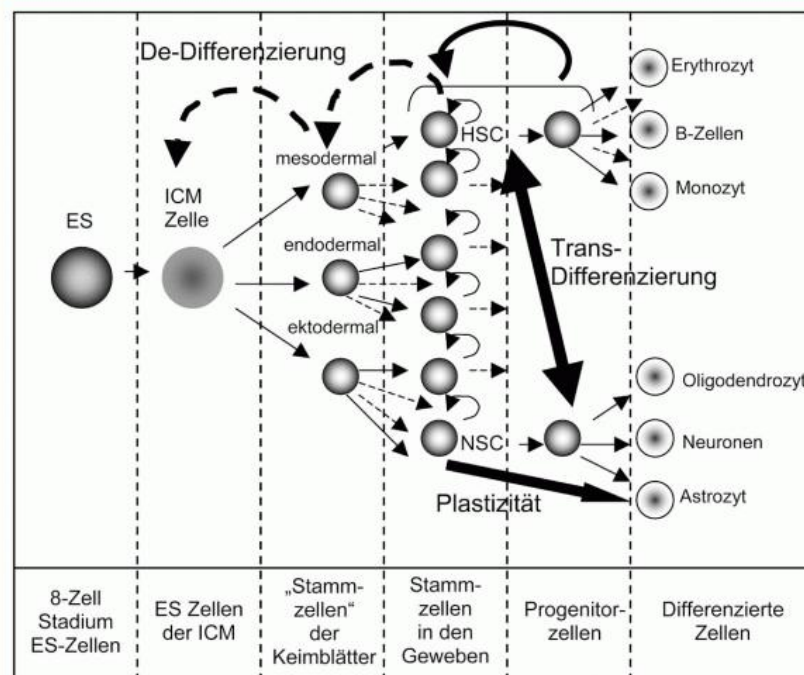


Abb.5: Differenzierungsmöglichkeiten der embryonalen Stammzellen: ESC = embryonale Stammzelle; ICM Zelle = Inner cell mass; HSC = hämatopoetische Stammzelle; NSC = neuronale Stammzellen [23]

Eine Hypothese ist, dass aus Progenitorzellen ebenfalls wieder unreife Stammzellen entstehen können. Dieser Prozess wird De-Differenzierung genannt (siehe Abb. 5).

	Zelle	Vorkommen	Eigenschaften
Totipotenz	Embryonen (Zygote)	Zygote (Blastomere) bis 8-Zell-Stadium	Differenzierung in jede Körperzelle möglich (Bildung eines kompletten, selbständig lebensfähigen Organismus)
Pluripotenz	Embryonale Stammzelle (ES); Embryonale Keimzelle (EG)	Blastozyste, embryonale Gonaden, Teratokarzinom	Differenzierung in zahlreiche Zelltypen (Fähigkeit, jedes Gewebe inklusive der Keimbahn zu bilden, aber keine komplette Organismuserzeugung möglich)
Multipotenz	Gewebespezifische adulte Stammzelle	z.B. Hämatopoetische SZ	Fähigkeit, eine begrenzte Zahl anderer Gewebe zu bilden

Tab.3: Totipotenz, Pluripotenz, Multipotenz von Stammzellen (SZ = Stammzellen; ESC = embryonale Stammzelle; EG = embryonale Keimzelle) [9]

Embryonale Stammzellen werden durch ihre Totipotenz definiert, das bedeutet, dass aus einer einzigen Zelle ein vollständiger Organismus entstehen kann. Ab dem Stadium der Blastozyste findet man pluripotente Zellen.

Experimentelle Studien haben ein großes Potenzial für embryonale Stammzellen zur Regeneration von Herzmuskelgewebe und zur Verbesserung der Herzfunktion gezeigt. Dennoch ist die Verwendung dieser Zellen, aufgrund ethischer Bedenken, umstritten und zudem müsste eine Immunsuppression durchgeführt werden. Des Weiteren besteht die Gefahr der malignen Entartung [25, 59].

1.2.3 Adulte Stammzellen

Als adulte Stammzellen werden die Stammzellen des erwachsenen Organismus bezeichnet. Sie kommen in verschiedenen differenzierten Geweben vor, wo sie dessen Regeneration dienen. Als bekannteste und bestuntersuchte Vertreter der adulten Stammzellen sind die hämatopoetischen Stammzellen zu nennen.

Sie werden für autologe und allogene Transplantation bei malignen hämatologischen Erkrankungen, einigen soliden Tumoren und definierten nichtmalignen Erkrankungen (zum Beispiel schweren Autoimmunerkrankungen) eingesetzt. Nach Myeloablation mittels Hochdosischemotherapie und/oder Radiatio ermöglichen diese Stammzellen die schnelle und zuverlässige Regeneration der Hämatopoese [1, 51, 56, 59].

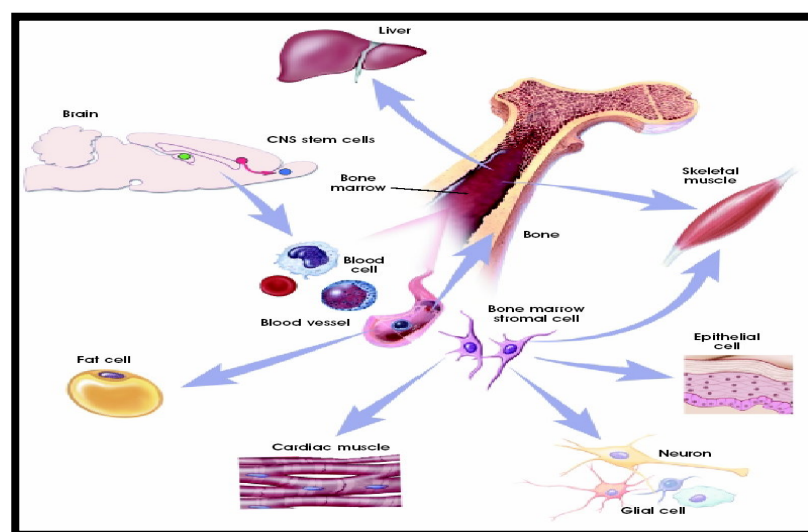


Abb.6: Differenzierungspotentiale von adulten Knochenmarkstammzellen. Neben der Hämatopoese besitzen sie möglicherweise das Potential, sich in verschiedene Zelltypen (Hepatozyten, Nervenzellen, Adipozyten, Osteozyten, Epithelzellen, Skelettmuskelzellen und Kardiomyozyten) auszdifferenzieren [57]

1.2.4 Hämatopoese

Das Wort Hämatopoese leitet sich vom Griechischen aus haima = Blut und poiesis = Bildung ab. Man geht davon aus, dass sich alle gebildeten Blutzellen aus einer einzigen Zelle entwickeln, die als multipotente hämatopoetische Stammzelle bezeichnet wird. (Vergleiche hierzu Abb.7)

Diese multipotenten Stammzellen werden auch als CFU (colony forming units) bezeichnet, weil sie je nach Entwicklungsstadium Zellklone bestimmter Zellreihen bilden können.

Die primäre hämatopoetische Stammzelle hat die Differenzierungsmöglichkeit in die myelopoetische und in die lymphatische Stammzelle. Aus der myelopoetischen Stammzelle bilden sich durch Differenzierung drei verschiedene Zellreihen:

- erythropoetische Reihe (burst forming units erythroid, BFU-E),
- thrombopoetische Reihe (colony forming units megacaryocyte, CFU-Meg),
- myelo-monozytäre Reihe (colony forming units granulo-monocyte, CFU-GM; colony forming units monocyte, CFU-M; colony forming units granulocyte, CFU-G)

Die lymphatische Stammzelle differenziert sich zu den Zellen der B-Zell- und T-Zell- sowie Natürliche Killer-Zellreihe. Die Myelopoese findet ausschließlich im Knochenmark statt, während die Lymphopoese auch in lymphatischen Organen erfolgt (für T-Lymphozyten im Thymus, für B-Lymphozyten in Lymphknoten und in der Milz).

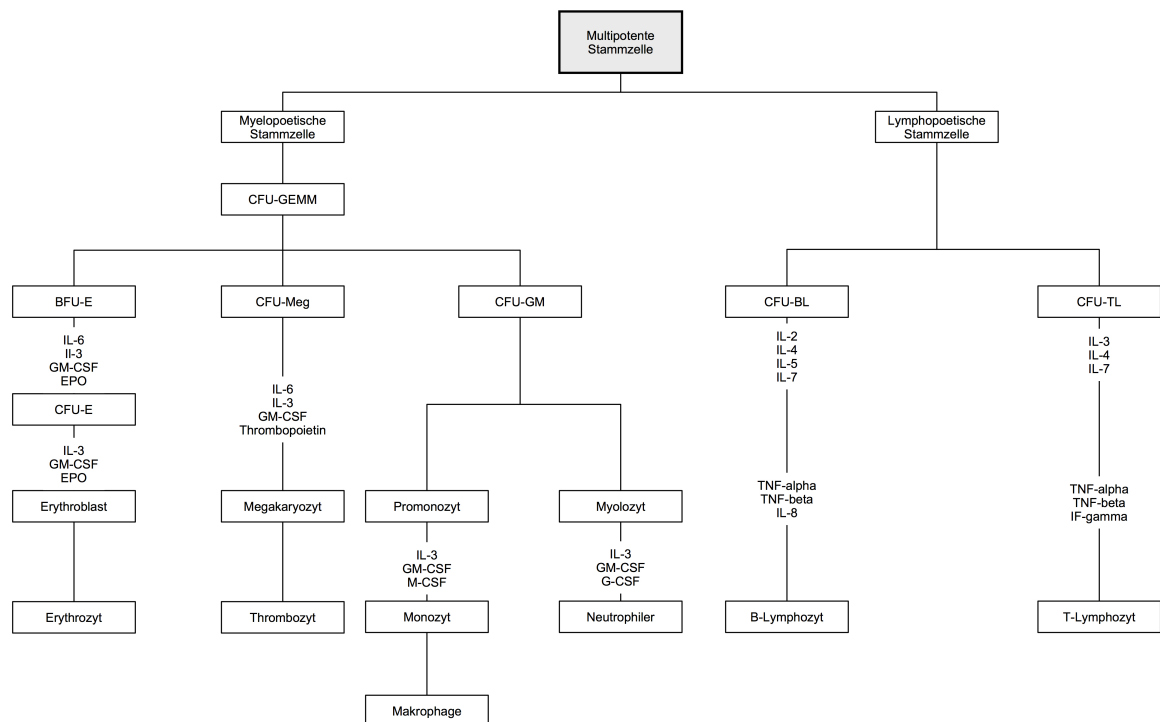


Abb.7: Schematische Darstellung der Hämatopoese (CFU-GEMM = Colony forming unite granulocyte, erythrocyte, macrophage, megacariocyte; BFU-E = Burst Forming Unit; CFU = Colony Forming Unit; Meg = Megaryozyt; E = Erythrozyt; G = Granulozyt; M = Monozyt; Eo = Eosinophiler Granulozyt, Baso = Basophiler Granulozyt; BL = B-Lymphozyt; TL = T-Lymphozyt; IL = Interleukin; GM-CSF = Granulozyten-, Makrophagen- Kolonie stimulierender Faktor; G-CSF = Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor; M-CSF = Makrophagen- Kolonie stimulierender Faktor ; TNF = Tumornekrosefaktor; IF = Interferon)

1.2.4.1 Regulation der Hämatopoese

Die Regulation der Hämatopoese beruht einerseits auf genetisch vorgegebenen Entwicklungsschritten (intrinsic control), andererseits auf exogenen Faktoren, wie dem Knochenmarkstroma und den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (extrinsic control).

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren üben einen stimulierenden Effekt auf Proliferation und Differenzierung der Blutzellen aus. Es sind kleine Peptide, Zytokine und andere Signalmoleküle, die als parakrine Hormone unter anderen in den Stromazellen des Knochenmarks (Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen) produziert und freigesetzt werden und vor Ort wirksam sind. Darüber hinaus sind an der Hämatopoese eine Reihe anderer Hormone, unter anderem Katecholamine, Steroidhormone, Schilddrüsenhormone und Wachstumshormone beteiligt [45].

Somit werden die einzelnen Differenzierungsschritte der Hämatopoese durch die

Wachstumsfaktoren gesteuert und durch Transkriptionsfaktoren auf Zellkernebene vermittelt.

In Tabelle 4 sind die Wachstumsfaktoren aufgelistet, die speziell an der Hämatopoese beteiligt sind.

Zytokin	Quelle	Effekte	Klinische Bedeutung
Erythropoetin	Niere	Erythropoese	renale Anämie und Tumoranämie
Thrombopoetin	Leber, Niere, KM-Stroma	Thrombopoese	-
G-CSF	Mo, Mp, G, Fib, En	Neutrophilenproduktion, -reifung, -aktivierung; Stammzellmobilisierung	Mobilisierung von Stammzellen beim Spender
GM-CSF	T, Mp, Fib, En	Stimuliert multipotente Vorläuferzellen, Neutrophilen-, Eosinophilen-, Monozytenreifung; Aktivierung von DC	experimentelle Immuntherapie (Tumorvakzinierung); (Anwendung zur Neutropenieverkürzung)
Stammzellfaktor	Fib	Stammzellen und primitive Progenitorzellen, stimuliert Mastzellen	-
Interferon- γ	Th1-T-Helferzellen, NK	zelluläre Abwehrreaktionen	Stimulation der zellulären Abwehrreaktion bei chronischer Granulomatose, Therapie des Riesenzelltumors
IL-2	Th-1-T-Helferzellen	Aktivierung von T- und NK-Zellen und Makrophagen	Tumorthherapie (Melanom, Nierenzellkarzinom)
IL-3	T, NK, En, Mo	Stimulation multipotenter Progenitorzellen	-
IL-4	Th2-T-Helferzellen, Mastzellen, Eo, Baso	Aktivierung von T- und Monozyten	-
IL-5	Th2-T-Helferzellen, Mastzellen, Eo	Stimulierung Produktion, Reifung und Aktivierung von Eosinophilen	-
IL-11	KM-Stromazellen	Stimulation früher Progenitoren und der Thrombopoese	-
TNF- α	Mp, NK, T, B	Entzündungsmediatoren	TNF- α -Antagonisten in der Therapie der rheumatoiden Arthritis

B = B-Zellen; DC = dendritische Zellen; En = Endothelzellen; Fib = Fibroblasten; G = Granulozyten; G-CSF = granulozytenstimulierender Faktor; GM-CSF = Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor; Mo = Monozyten; Mp = Makrophagen; NK=NK-Zellen; T = T-Zellen

Tab.4: Übersicht beteiligter Wachstumsfaktoren der Hämatopoese

1.2.5 Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen

Die zur Identifizierung von hämatopoetischen Progenitorzellen (Vorläuferzellen) wichtigste Oberflächenstruktur ist das CD34-Antigen. Dabei handelt es sich um ein Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 115 kD, das auf frühen hämatopoetischen Stammzellen einschließlich der lymphatischen Stammzelle exprimiert ist [5]. Außerdem kommt es auf reifen Gefässendothelzellen, Fibroblasten, EPC und intrahepatischen Progenitorzellen vor. Welche Funktion das CD34-Antigen hat, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass es als Adhäsionsmolekül dient. Im normalen Knochenmark lässt sich das CD34-Antigen auf 0,5-1 % der mononukleären Zellen nachweisen, im peripheren Blut liegt dieser Anteil unter 0,3 % [5].

Der Differenzierungsgrad der hierarchisch strukturierten hämatopoetischen Vorläuferzellen ist durch die Koexpression unterschiedlicher Membranantigene gekennzeichnet. So ist CD33 auf Zellen der myeloischen Reihe, CD2 auf T-

lymphozytären Zellen und CD19 auf B-lymphozytären Zellen exprimiert.

CD34-positive Progenitorzellen lassen sich so durch Koexpressionsstudien in ihrem Entwicklungsstadium und ihrer Entwicklungsrichtung voneinander unterscheiden [5]. Determinierte Progenitorzellen der myelomonozytären Reihe (CFU-GM, CFU-M, CFU-G) beispielsweise exprimieren neben CD34 die Oberflächenantigene CD33 und HLA-DR. Die multipotente Stammzelle ist durch das Fehlen von CD33, CD38 und anderer linienspezifischer Antigene bei gleichzeitigem Vorhandensein von CD34 und dem Rezeptor für das Zytokin „stem cell factor“ (CD117) charakterisiert. Mit zunehmender Reifung der hämatopoetischen Vorläuferzellen kommt es zu einer Herunterregulation der CD34-Expression.

Ein weiteres Oberflächenantigen, welches für die Detektion von hämatopoetischen Stammzellen eine Rolle spielt, ist dass vor allem auf unreiferen Progenitorpopulationen exprimierte CD133-Antigen (CD133). Das Oberflächenmolekül CD133 wurde 1997 von Yin und Miraglia et al. [61] erstmals beschrieben. Es handelt sich um ein transmembranäres Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kD, dessen physiologische Funktion noch unbekannt ist. Das CD133-Antigen geht ebenfalls im Zuge der Reifung der Vorläuferzellen verloren.

Obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass CD133 ausschließlich auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen vorkommt, haben spätere Arbeiten gezeigt, dass die CD133-positive Zellpopulation auch endotheliale Progenitorzellen beinhaltet. [15, 41] Inzwischen wurde das CD133-Antigen auch auf tumorinizierenden Stammzellen zahlreicher Karzinome nachgewiesen. Problematisch ist allerdings in diesem Zusammenhang, dass CD133 auf reifen Epithelzellen zahlreicher Organe bzw. Tumoren exprimiert wird.

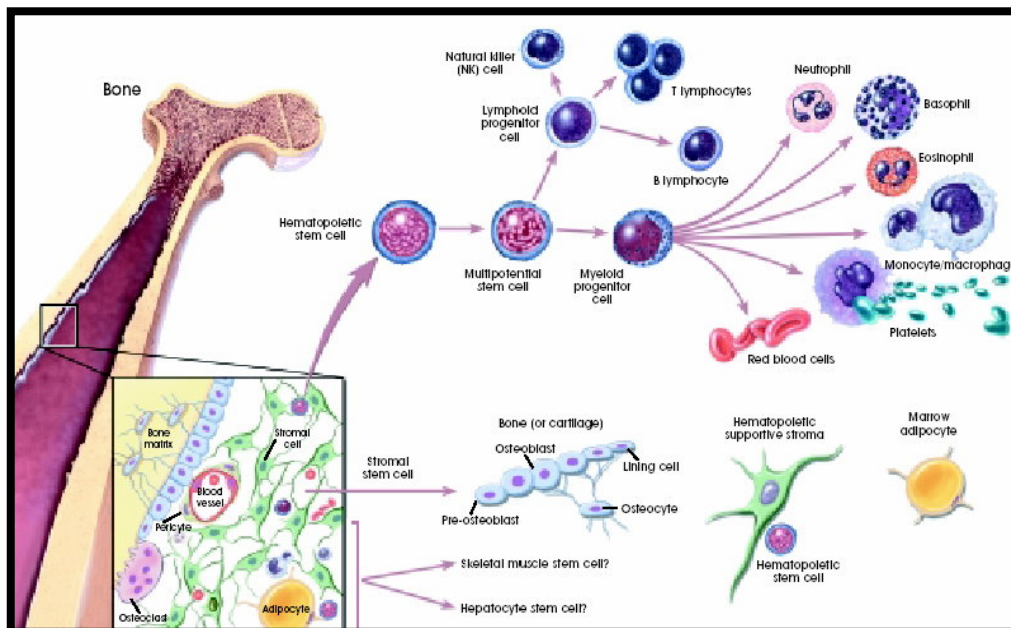


Abb.8: Differenzierung von hämatopoetischen und stromalen Stammzellen [57]

1.2.6 Mobilisierung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen

Die genauen Mechanismen der Stammzellmobilisierung sind bislang noch nicht vollständig geklärt, da es sich um ein komplexes Zusammenspiel von vielen Faktoren handelt. Dabei übernehmen eine Reihe von Proteasen, Integrine, Zytokine und Zytokinrezeptoren spezielle Aufgaben und treten untereinander in Interaktion. So scheint eine Mobilisierung der an die Knochenmarksmatrix gebundenen Stammzelle unter anderem durch Spaltung bzw. Down-Regulation von Zell-Zellverbindungen und Zell-Matrixverbindungen erreicht zu werden. [40]

Ein Schritt zur Mobilisierung ist die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), die zu einer Umwandlung eines membrangebundenen Kit-Liganden in einen löslichen Kit-Liganden führt, weshalb der c-Kit-positive Hämangioblast in die gefäßreiche Zone des Knochenmarks wandert [19].

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten führt zur Ausschüttung spezifischer Proteasen aus ihren Granula [17], was zu einer Proteolyse verschiedener Adhäsionsmoleküle im Knochenmark führt. Eine solche Aktivierung erzielt man auch durch extern appliziertes G-CSF [15]. Serinproteasen akkumulieren im Knochenmark und können verschiedene Substrate spalten, wie beispielsweise VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), c-kit, CXCR-4 (CXC chemokine receptor 4) und stromal derived factor-1 (SDF-1) [41]), welche die Adhäsion der

Stammzellen im Knochenmark gewährleisten. Ihre Spaltung begünstigt somit die Stammzellmobilisierung [31].

Die Stammzellmobilisierung wird weiterhin beeinflusst von GM-CSF (granulocyte monocyte colony stimulating factor) [53] und Angiopoetin-1 [18].

SDF-1 und sein Rezeptor CXCR-4 übernehmen gleichzeitig auch eine wichtige Funktion für das Verbleiben von Stammzellen im Knochenmark und das Homing (Zurückkehren zirkulierender Stammzellen ins Knochenmark) [30].

Es ist anzunehmen, dass durch Infiltration von Entzündungszellen in ein reaktiv verändertes Gewebe, zum Beispiel durch Ischämie oder Verletzung, die Ausschüttung verschiedener, systemisch zirkulierender Zytokine erfolgt, die die Freisetzung von hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark fördern können.

Eine Studie von George et al. weist darauf hin, dass die CRP-Konzentration des Serums positiv mit der Anzahl zirkulierender Endothelvorläuferzellen bei Patienten mit instabiler Angina pectoris korreliert ist [16].

Während eines akuten Myokardinfarktes kommt es zu einer systemischen Entzündungsreaktion, bei der verschiedene Zytokine wie Interleukin-6 und Interleukin-8, freigesetzt werden [39]. Es bleibt zu untersuchen, ob auch solche inflammatorischen Zytokine eine Mobilisierung von Stammzellen bewirken können.

Es bestehen weiterhin Hinweise, dass IL-8 über eine Steigerung der MMP-9 Aktivität neutrophiler Granulozyten an der Mobilisierung von Stammzellen beteiligt sein kann.

Alternativ und/oder additiv könnte es durch die Okkluderimplantation zu einer Verletzung des Septums und dadurch zu einer verstärkten Synthese von SDF-1 im Herzen kommen. SDF-1 wirkt dann als "Attractant" für Stamm- und Progenitorzellen des Knochenmarks.

2. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Mobilisierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen bei Patienten mit atrialem Septumdefekt (ASD) nach Implantation eines Okkluders. Die momentanen Therapieansätze der Behandlung eines ASD bestehen zum einen in der operativen Versorgung durch einen Patch (Perikard oder Dacron) oder eine Direktnaht und zum anderen in der Implantation eines Okkluders.

In vielen Studien z.B. Wojakowski et al. [58] konnte eine Mobilisierung von hämatopoetischen und endothelialen Stammzellen nach einer Schädigung von Blutgefäßen oder des Myokards nachgewiesen werden.

So wäre es denkbar, dass auch die Implantation eines Okkluders einen Reiz für die Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark, deren Adhäsion, und Integration ins Endothel darstellt.

Diese Studie untersucht den Einfluss der perkutanen Okkluderimplantation auf die Anzahl der zirkulierenden HSCs mittels phänotypischen und funktionellen Analysen.

Da Gewebeschädigungen ferner zu einer Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) führen können z.B. Wojakowski et al., wurden zirkulierende HSCs untersucht.

Hinsichtlich der Mobilisierung werden nachfolgende Fragen untersucht:

1. Findet eine Mobilisierung von HSC statt? Welchen Phänotyp haben die mobilisierten Zellen und wie sind sie funktionell definiert?

2. Ergeben sich mittels ELISA-Untersuchung Aufschlüsse über die Mediatoren und Zytokine, die bei der Mobilisierung beteiligt sind?

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Es wurden insgesamt 40 Probanden in die Studie eingeschlossen. Die Studiengruppe bestand aus 20 Probanden mit PFO, bei denen eine Okkluderimplantation durchgeführt wurde (m:w = 12:8; Durchschnittsalter = 48,65 ± 12,27 Jahre). Die beiden Kontrollgruppen umfassten zum einen 10 gesunde Patienten (Kontrollgruppe 1 = K1) (m:w = 3:7; Durchschnittsalter = 31,80 ± 6,34 Jahre) und zum anderen 10 Patienten, bei denen eine PTCA (Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie, d.h. eine koronarangiographische Intervention, welche mittels Herzkatheter und Röntgenkontrastmittel die Koronararterien darstellt und eine gleichzeitige Intervention erlaubt) durchgeführt wurde (Kontrollgruppe 2 = K2) (m:w = 7:3; Durchschnittsalter = 60,40 ± 8,78 Jahre).

Bei allen drei Patientenkollektiven wurden durch sequentielle Blutabnahmen Vollblutproben für die weitere Verarbeitung gewonnen. Die Untersuchung wurde für alle Gruppen mit den gleichen Analysemethoden durchgeführt.

Die Blutentnahmen bei der Studiengruppe erfolgten einen Tag präinterventionell sowie 24 h, 7 Tage und 28 Tage postinterventionell. Bei 9 von 20 Patienten konnten wir zudem eine Blutentnahme 6 Monate nach Implantation des Okkluders durchführen. Bei der Kontrollgruppe 1 wurden zwei Blutentnahmen im Abstand von mindestens einem Monat durchgeführt. Bei Kontrollgruppe 2 erfolgte am 1. Tag präinterventionell und einen Tag nach Koronarangiographie eine Blutentnahme.

Alle Patienten wurden über den Inhalt der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme (positives Votum der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg).

3.1.1 Okkluderpatienten

Eingeschlossen in die Gruppe wurden Patienten (siehe Tabelle 5):

- mit PFO, Vorhofseptumaneurysma und stattgehabter paradoxer Embolie
- mit hämodynamisch relevanten ASD II

	Alter	M/W	PFO/ASD	Paradoxe Embolie/zerebraler Insult/TIA in der Vorgeschichte
1	50	M	ASD	Insult
2	28	M	ASD	Thalamusinfarkt
3	42	W	ASD	TIA
4	62	W	PFO	Kleinhirnfarkt
5	56	M	ASD	Rez. Hirninfarkte
6	65	W	ASD	TIA
7	68	M	ASD	Thalamusinfarkt
8	37	M	ASD	
9	41	W	PFO	Rez. Kleinhirnfarkte
10	42	M	PFO	TIA
11	41	W	PFO	Mediateilterritorialinfarkt
12	37	W	ASD	Insult bei PE
13	53	M	ASD	Kleinhirnfarkt
14	54	M	ASD	
15	43	M	ASD	Thalamusinfarkt
16	64	M	ASD	
17	60	M	PFO	
18	61	W	ASD	
19	28	W	ASD	Thalamusinfarkt
20	41	M	ASD	

Tab.5: Patientenevaluation der Okkluderpatienten

Ausschlusskriterien waren chronisch entzündliche Erkrankungen, Tumorerkrankungen, das Vorliegen einer Anämie (Hämoglobinwert unter 12 g/dl) sowie Zustand nach Knochenmarkstransplantation und Infektionen, da diese Zustände Einfluss auf die Zahl zirkulierender Stamm- und Progenitorzellen haben können.

Bei allen Patienten wurde eine perkutane transluminale Okkluderimplantation durchgeführt. Postinterventionell erhielten alle Patienten für einen Zeitraum von 6 Monaten eine orale Medikation mit ASS 1 x 100 mg und Clopidogrel 1 x 75 mg zur Thromboseprophylaxe.

3.1.2 Kontrollgruppen

Kontrollgruppe 1 umfasste 10 gesunde Probanden. Kontrollgruppe 2 wurde aus 10 Patienten gebildet, die sich aus medizinischer Indikation einer elektiven Koronarintervention und damit einem katheterinterventionellem Eingriff ohne Implantation eines Schirms unterziehen mussten. Die Ausschlusskriterien für Kontrollgruppe 2 entsprachen denen der Studiengruppe.

3.1.3 Abnahmeprotokoll

Der Studiengruppe wurde, wie unter 3.1 beschrieben, viermal bzw. fünfmal, der Kontrollgruppe 1 und 2 je zweimal, 20 ml venöses Blut abgenommen (siehe Tabelle 6). Im Anschluss erfolgten die Analysen der Zellen und die Bestimmung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen.

Zeitpunkt	Studiengruppe	Kontrollgruppe 1	Kontrollgruppe 2
A	Bei Aufnahme vor Intervention	Zeitpunkt x	vor PTCA Intervention
B	24 h	> 1 Monat nach Zeitpunkt x	1 Tag nach Intervention
C	7 Tage	-	-
D	28 Tage	-	-
E	3-6 Monate	-	-

Tab.6: Blutabnahmeprotokoll

3.2 Durchflusszytometrie (FACS)

3.2.1 Funktionsprinzip

Ein Durchflusszytometer besteht aus 3 Komponenten (Flüssigkeitssystem, Optik und Elektronik).

Das Flüssigkeitssystem dient dem Einbringen der Zellen in den Messpunkt innerhalb der Messküvette, durch welche sich die Zellen in einer laminaren Strömung hindurch bewegen. Der Probenfluss wird vor der Küvette stark gebündelt, so dass jeder Tropfen, der die Messküvette passiert, nur eine geringe Zellzahl enthält. Nach „hydrodynamischer Fokussierung“ passieren die Zellen folglich wie Perlen an einer Perlenkette die Messkammer.

Das optische System setzt sich aus einer dem Messpunkt vorgeschalteten Optik zur Anregung der Zellen und einer hinter dem Messpunkt befindlichen Sammeloptik zusammen. Im Messpunkt werden die Zellen von einem fokussierten Laser bei einer dem Laserlicht entsprechenden Wellenlänge getroffen. Es kommt zur Anregung der von den antigenen Strukturen über monoklonale Antikörper gebundenen Fluorochrome, die ihrerseits Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Hinter dem Messpunkt befinden sich mehrere Linsen sowie ein System von Spiegeln und Filtern, das die spezifischen Wellenlängen der emittierten Lichtsignale zu den entsprechenden Detektoren leitet. Durch die Lichtstreuung an der Zelle kommt es zur Entstehung von Streusignalen, wobei die Vorwärtsstreuung (Forward-Scatter) der Größe und die Seitwärtsstreuung (Sideward-Scatter) der Granularität der Zelle entspricht.

Das elektronische System (Photoröhren und Photodioden) sorgen dafür, dass die optischen Signale in elektrische Impulse, die mit der Intensität des Lichtsignals korrelieren, umgewandelt werden. Die elektrischen Impulse werden wiederum von einem Datenprozessor in digitale Signale transformiert und zuletzt graphisch dargestellt. Die optische Darstellung der digitalen Messimpulse erfolgt durch zwei zweiachsige Punktdiagramme (Histogramme) in denen ein Punkt genau einer lichtemittierenden Zelle entspricht. Die interessierende Zellpopulation kann durch das Anlegen von Analysefenstern (sogen. "Gate") und die freie Wählbarkeit der Achsen fokussiert werden und in Bezug auf die Gesamtprobe und andere Populationen rechnerisch ermittelt werden. Mithilfe der Software BD FACSDIVA Software (BD Biosciences) werden die Daten ausgewertet und graphisch dargestellt.

Die Durchflusszytometrie bedient sich antigener Strukturen, die mittels fluoreszenzgekoppelter monoklonaler Antikörper markiert werden können. Werden zelluläre Antigene analysiert, spielen ferner die Größe und Granularität der Zellen eine entscheidende Rolle für die Interpretation des Messergebnisses. Das zugrunde liegende Prinzip basiert dabei auf der Detektion von Licht, das durch die Größe und die Granularität der Zelle gestreut und von fluoreszierenden Antikörpern emittiert wird. Die Zellen passieren einen Laserstrahl, dessen Vorwärts- und Seitwärtsstrahlung durch die Zelleigenschaften verändert wird. Je nach verwendetem Laser, führt das Laserlicht zu einer Anregung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, die ihrerseits Licht im grünen oder roten Wellenlängenbereich emittieren. Vorwärts- und Seitwärtsstrahlung sowie das Emissionslicht werden in verschiedene, dahinter angeordnete Messkanäle gelenkt und gemessen.

Die Phänotypisierung der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wurde mittels durchflusszytometrischer Messung am FACS-Canto-Gerät (Becton Dickinson GmbH Pharmingen, Deutschland) durchgeführt.

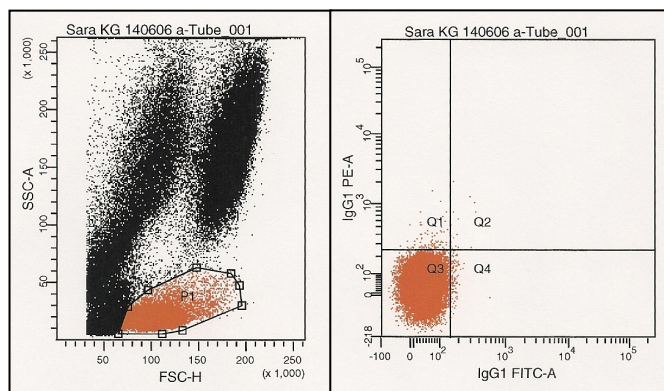


Abb.9: FACS Messung, eingetate Zellen = Mononukleäre Zellen

3.2.2 Geräte und Materialien

Lösungen	Hersteller
Erythrozytenlysepuffer	
Ammoniumchlorid (8,29 g)	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
Kaliumhydrogencarbonat (1,00 g)	MERK, Darmstadt, Germany
EDTA-Titriplex (0,372 g)	MERK, Darmstadt, Germany
Aqua dest. (1l)	MERK, Darmstadt, Germany
Dulbecco`s PBS, without Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH
FACS-Lösungen	
FACS CLEAN (Solution) 5l	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
FACS RINSE (Solution) 5l	BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Cell WASH	BD Biosciences, Heidelberg, Germany

Tab.7: Verwendete Lösungen

FACS	Hersteller
BD FACS Canto™ Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Germany, Clontech Discovery labware Immunocytometry Systems Becton Dickinson GmbH Pharmingen,D
FACS Röhrchen	BD Biosciences
Vortexer	Hersteller
Certomat ® MV	B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Germany

Tab.8: Verwendete Geräte

Antikörper Markierung	und	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
CD 45-PE			
CD 45-FITC			
Isotyp-Kontrolle (IgG - Simultantest Control $\gamma/\gamma 1$)		10 μ l	Becton Dickson Immunocytometry Systems, San Jose, USA
CD133-PE/CD34-FITC		10 μ l	Miltenyi Biotec GmbH/ BD Biosciences Pharmingen TM
CD14-FITC		10 μ l	Miltenyi Biotec GmbH/ BD Biosciences Pharmingen TM
CD45-FITC		10 μ l	Miltenyi Biotec GmbH/ BD Biosciences Pharmingen TM
CD34-PE		10 μ l	BD Biosciences Pharmingen TM
VEGFR-2-PE		10 μ l	Phycoerythrin Conjugated Mouse IgG1 R&D Systems, Minneapolis/BD Biosciences Pharmingen TM

Tab.9: Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie

Software	Hersteller
BD FACSDiva Software	BD Biosciences, Heidelberg, Germany

Tab.10: sonstige Materialien

3.2.3 Versuchsanordnung und Durchführung

Die Blutproben der Probanden umfassten drei 9 ml EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), eine 5,5 ml NH₄-Heparin-Monovette und eine 7,5 ml Serum-Monovette. Sie wurden nach dem in Tabelle 6 dargestellten Abnahmeprotokoll abgenommen. Wir überführten 20 ml des Vollblutes aus den EDTA-Monovetten in ein 50 ml Teströhrchen.

Zur Vorbereitung auf die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen zunächst mittels Erythrozytenlysepuffer [Erythrozytenlysepuffer: 8,29 g Ammoniumchlorid (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland), 1,00 g Kaliumhydrogencarbonat (MERK, Darmstadt, Germany), 0,372 g EDTA-Titriplex (MERK, Darmstadt, Germany)] vorbehandelt. Der Puffer wurde wie folgt hergestellt: 8,29 g Ammoniumchlorid, 1,00 g Kaliumhydrogencarbonat und 0,372 g EDTA-Titriplex wurden bei Raumtemperatur in 1 l Aqua dest. gelöst.

Der Erythrozytenlysepuffer wurde dem 50 ml Analyseröhrchen mit den darin befindlichen 20 ml Blut zugeführt und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 6 Minuten bei 1600 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand über dem Pellet wurde dekantiert und das Pellet selbst im verbleibenden Restvolumen resuspendiert. Es schloss sich eine erneute Erylsierung für 2 Minuten bei 4°C Kühlung an. Die Probe wurde nochmals, wie oben genannt, zentrifugiert, der Überstand über dem gebildeten Pellet dekantiert

sowie das Pellet erneut im Restvolumen resuspendiert.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit jeweils 50 ml PBS (Dulbecco's PBS, without Ca & Mg, PAA Laboratories GmbH, Pasching) gewaschen und bei 1600 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Probenvolumen mit PBS auf 50 ml eingestellt und 10 µl dieser Lösung zwecks Zellzählung in die Neubauerzählkammer eingebracht. Anschließend wurden 4 x 16 Quadranten der Zählkammer am Inversionsmikroskop ausgezählt und die Zellzahl der jeweiligen Probe wie folgt errechnet: (Gesamtzahl der Zellen : $4 \times 10^4 \times \text{Verdünnung} \times \text{Probenvolumen}$).

Darauffolgenden wurde entsprechend der Zellzahl in der Probe die benötigte Probenmenge für das Ansetzen der 6 FACS-Proben berechnet. Jedem Teströhrchen wurden 1×10^6 Zellen zugeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl der Fluoreszeinisothiozyanat-(FITC) oder Phycoerythrin-(PE) konjugierten monoklonalen Antikörper.

Bei allen verwendeten monoklonalen Antikörpern handelte es sich um Immunglobuline der Klasse IgG₁. Die Isotypkontrolle für alle Proben war ein FITC- und PE-konjugierter IgG1 Antikörper. Die Proben wurden durchmischt und bei 4°C über 15-30 min lichtgeschützt inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben mit PBS gewaschen und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet im Restvolumen suspendiert und in 500 µl PBS aufgenommen. Nach Durchmischung der Proben mittels Vortex-Gerät erfolgte die Messung am FACS-Canto-Gerät (Becton Dickinson GmbH Pharmingen, Deutschland), mittels des Softwareprogramms "Diva" (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

In Tabelle 9 sind die für die Messungen verwendeten Antikörper aufgeführt. Es wurden insgesamt 6 Messungen zu einer Probe durchgeführt. Als erstes wurde die Autofluoreszenz der Zellen und die Isotyp-Kontrollen gemessen, danach in jeweils gleicher Reihenfolge die Analyseröhrchen mit den verschiedenen FITC- und PE-konjugierten Antikörperkombinationen gefärbten Antikörper-Kombinationen.

3.3 Colony Assays

3.3.1 Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller
Inversionsmikroskop (OLYMPUS IX 50)	OLYMPUS optical Co. GmbH
Kamera (OLYMPUS CAMEDIA C-5050 Zoom Professional digital Compact camera)	OLYMPUS optical Co. GmbH

Tab.11: Verwendete Geräte

Materialien	Hersteller
Methylcellulose Medium (Methocult GF+ H4435)	CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH
Petrischalen	
Einwegpipetten	

Tab.12: Verwendete Materialien

3.3.2 Versuchsanordnung und Durchführung

Für die funktionelle Testung und indirekte Quantifizierung vermeintlicher zirkulierender hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen wurden Aliquots der Proben in ein semisoliden Nährmedium, welches mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren supplementiert war, eingebracht. Als wesentlicher Bestandteil enthielt das Medium Methylzellulose, darüber hinaus fetales Rinderserum, Rinderalbumin, Mercaptoethanol und L-Glutamin sowie die rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren Stem Cell Factor (SCF), GM-CSF, Interleukin-3 (IL-3), IL-6, G-CSF und Erythropoetin (EPO). Die Medien wurden in Form von 5 ml Aliquots tiefgefroren und für die Durchführung der Assays wieder aufgetaut.

Pro Probe wurden vier Petrischalen (Durchmesser 35 mm) angesetzt. Hierfür wurden zunächst 1×10^6 Zellen pro ml Medium, d.h. 5×10^6 erylierte, gewaschene Zellen mittels Eppendorf-Pipette in das Medium einpipettiert und umgehend mit der Pipettenspitze durch kreisende Bewegungen mit dem Medium gleichmäßig vermengt. Anschließend wurde das Zell-Medium-Gemisch mittels einer Motorpipette und einer 5ml Einwegpipette aspiriert und jeweils 1 ml in eine der vier Petrischalen transferiert. Der Rest des in der Pipette verbliebenen zähflüssigen Gemisches wurde verworfen. Um ein Austrocknen des Mediums zu vermeiden, wurden jeweils zwei der vier Petrischalen in eine große Petrischale eingebracht, die anschließend mit einer Aqua dest. befüllten Petrischale (Durchmesser 35 mm) bestückt wurde.

Die Petrischalen wurden dann für 14 Tage bei 37°C und 5 % Kohlendioxid (CO₂) inkubiert. Die Auswertung der Colony Assays erfolgte mittels Inversionsmikroskop. Hierbei wurden die Anzahl und die Morphologie der gebildeten Kolonien ermittelt. Bezüglich der Morphologie wurden die Kolonien folgenden Kategorien zugeordnet:

- burst-forming unit erythrocyte (BFU-E)
- colony-forming unit erythrocyte (CFU-E)
- colony-forming unit granulocyte-erythrocyte-macrophage-megakaryocyte (CFU-GEMM)
- colony-forming unit granulocyte-macrophage (CFU-GM)
- colony-forming unit granulocyte (CFU-G)
- colony-forming unit macrophage (CFU-M).

Cluster von CFUs der gleichen Kategorien wurden als "Nester" gezählt.

3.4 Immunoassays (ELISA)

3.4.1 Funktionsprinzip

Mit der sogenannten Sandwich-ELISA-Technik wurden die Serumkonzentrationen von Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) und Myeloperoxidase (MPO) zu den verschiedenen Zeitpunkten der Blutabnahme (siehe Tabelle 6) bestimmt. Die Detektionsgrenze lag für MCP-1 bei 0-2000 pg/ml, für VEGF bei 0-1000 pg/ml, für SDF-1 bei 0-10000 pg/ml und für MPO bei 0-8000 pmol/l. Das Prinzip der Sandwich-ELISA-Technik (ELISA = enzyme linked immuno sorbent assay) soll exemplarisch an MCP-1 erläutert werden.

Eine mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen MCP-1 beschichtete Mikrotiterplatte wird mit dem Patientenserum inkubiert. Anschließend wird die Platte gewaschen und alle ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt. Danach folgt die Inkubation der Probe mit einem zweiten gegen MCP-1 gerichteten polyklonalen Antikörper, an den eine Peroxidase gebunden ist. Diese enzymgebundenen Antikörper binden an ein anderes Epitop des MCP-1-Moleküls, so dass, das MCP-1 wie in einem Sandwich von den Antikörpern umgeben wird. Es folgt ein weiterer Waschschriff, der der Entfernung des überschüssigen zweiten Antikörpers dient. Anschließend wird die Probe unter Lichtausschluss mit einem

für die Peroxidase passenden chromogenen Substrat inkubiert. Die antikörpergebundene Peroxidase wandelt nun das farblose Substrat in ein farbiges Produkt um, das mithilfe eines Mehrkanalspektrometers mit Glasfaseroptik gemessen wird. Somit ist der Umsatz von Substrat zu Produkt unter standardisierten Bedingungen direkt proportional zur Anzahl der gebundenen MCP-1-Moleküle.

3.4.2 Geräte und Materialien

Immunoassay-Kits	Hersteller
Quantikine, Human CCL2/MCP-1 Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA Catalog Number DCP00, SCP00, PDCP00
Quantikine, Human CXCL12/SDF-1 α Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA Catalog Number DSA00, SSA00, PDSA00
Quantikine, Human VEGF Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA Catalog Number DVE00, SVE00, PDVE00
<i>CardioMPO</i> TM Enzyme Immunoassay Reagent Kit	PrognostiX, Cleveland, Ohio, USA Catalog Number 7601

Tab.13: Verwendete Antikörper für die ELISAs

Geräte	Hersteller
Filter-ELISA Plate Reader MRX	MRX Revelation
Software MRX ^{TC} Revelation	MRX Revelation
Plattenschüttler	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland

Tab.14: Verwendete Geräte

Materialien	Hersteller
Plattenabdichter	MRX Revelation

Tab.15: Sonstige für die ELISAs verwendete Materialien

3.4.3 Versuchsanordnung und Durchführung

Die Versuchsdurchführung wird hier exemplarisch für den MPO-ELISA Kit (*CardioMPO*TM Enzyme Immunoassay Reagent Kit) erläutert. Zunächst wurden die Mikrotiterplatten vorbereitet. Es wurden dazu 100 μ l einer zum Kit gehörenden *CardioMPO*TM Kalibratorlösung, die fünf verschiedenen Konzentrationen von humanem MPO enthält, in die entsprechenden Kavitäten der beschichteten Mikrotiterplatte einpipettiert. Ferner wurden 90 μ l des gebrauchsfertigen Assay-Puffers in weitere Kavitäten der Mikrotiterplatte gegeben, die für die Proben und

Kontrollen bestimmt waren. Dann wurden 10 µl der gut gemischten Proben und Kontrollen in die mit Puffer befüllten Kavitäten pipettiert. Hieran schloss sich die Probeninkubation an. Die Mikrotiterplatte wurde mit einem Plattenabdichter versiegelt und auf einem Plattenschüttler bei 500 rpm 45 Minuten bei Raumtemperatur (20-26°C) inkubiert. Anschließend wurden die Mikrotiterkavitäten viermal mit 400 µl des Assay-Puffers gewaschen und nach dem Waschvorgang sämtliche Reste des Waschpuffers mittels Pipette von der Platte entfernt. In einem nächsten Schritt wurden 100 µl des Anti-MPO Antikörperkonjugats in jede Kavität pipettiert. Dann wurde die Platte erneut versiegelt, auf einem Plattenschüttler bei 500 rpm 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wie oben beschrieben mit 400 µl Assay-Puffer pro Kavitäten viermal gewaschen.

Nach vollständiger Aspiration des Puffers wurden 100 µl Substratreagenz (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) plus Hydrogenperoxid (H_2O_2)) in jede Kavität pipettiert und danach wieder auf einem Plattenschüttler bei 500 rpm für 15 Minuten inkubiert.

Durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung (Sulfursäure (H_2SO_4)) in alle Kavitäten wurde die Reaktion angehalten. Durch vorsichtiges Schwenken der Platte wurde die Stopp-Lösung vermischt. Es musste sichergestellt werden, dass die blaue Farbe vollständig zu gelb umschlug. Die optische Dichte wurde bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät abgelesen.

3.5 Statistik

Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM (standard error of the mean). Die Verteilung der Messwerte wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test untersucht. Das Vorliegen von statistischer Signifikanz zwischen Behandlungsgruppe und Kontrollgruppe bzw. vor und nach Intervention wurde durch den t-Test für unverbundene Stichproben oder durch den Mann-Whitney U-Test überprüft. Ein p-Wert von kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 15.0 für Windows der Firma SPSS GmbH Software (München; Deutschland). Die im Ergebnisteil aufgeführten Tabellen und Diagramme wurden mit Microsoft Excel 2003 und Microsoft Word 2003 erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Immunphänotypische Charakterisierung und Quantifizierung der zirkulierenden hämatopoetischen Zellen (FACS)

Für die Identifizierung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen wurden die in Tabelle 17 dargestellten Antikörperkombinationen verwendet. In dieser Tabelle sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen (Standard Error of the Mean = SEM) der beiden Kontrollgruppen und der Okkluderpatienten zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten (siehe Tabelle 16) aufgeführt. Ferner sind die dazugehörigen Ergebnisse der Okkluderpatienten in Abbildung 10 graphisch dargestellt. Zunächst fallen die CD133⁺/45⁺ und CD34⁺/45⁺ Zellen auf, deren Zellzahl an der rechten y-Achse in Prozent abzulesen ist. Diese beiden Markerkombinationen zeigten sowohl bei der Studiengruppe als auch bei den Kontrollgruppen über alle Zeitpunkte der Messungen hinweg einen im Vergleich zu allen anderen Markerkombinationen sehr hohen prozentualen Anteil. Im zeitlichen Verlauf präsentieren die CD133⁺/45⁺ Zellen bei der Studiengruppe eine ansteigende Verlaufskurve (mit einem Abfall der Zellzahl zum Termin c). Bei den Kontrollgruppen besteht ein höheres Ausgangsniveau dieser Zellen. Die Markerkombination CD34⁺/45⁺ hat bei dem Vergleich der Kontrollgruppen mit der Studiengruppe keine nennenswerten Schwankungen bis auf das Ausgangsniveau der Studiengruppe, welches niedriger ist.

In der Abbildung 11 sind drei Markerkombinationen hervorgehoben (CD133⁺/34⁺, CD133⁺/45⁺ und CD34⁺/45⁺), die bei der Analyse der Daten eine zentrale Rolle spielen. Die CD 133⁺/34⁺ Zellen zeigen ihr Maximum am Tag 7 und bis 6 Monate nach Intervention einen signifikanten Abfall der Zellzahl. Die CD34⁺/45⁺ Zellen zeigen im zeitlichen Verlauf keinen signifikanten Unterschied in den Messergebnissen. Jedoch scheint eine Reduktion der CD 34⁺/45⁺ Zellen bei Kontrollgruppe 2 und der Studiengruppe nach der Intervention stattzufinden.

Beachtlich ist der Verlauf der CD133⁺/CD45⁺ Zellen. Sie zeigen einen Anstieg ihrer Zellzahl zum Termin b, aber auch ein erhöhtes Ausgangsniveau präinterventionell bei der Studiengruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Es folgt ein Abfall der Zellzahl bis zum Untersuchungszeitpunkt e.

Visite	Okkluderpatienten (S = Studiengruppe)	Kontrollgruppe 1 (K1 = gesundes Patientenkollektiv)	Kontrollgruppe 2 (K2 = Pat. mit PTCA Intervention)
A	Bei Aufnahme vor Intervention	Zeitpunkt x	vor PTCA Intervention
B	24 h	> 1 Monat nach Zeitpunkt x	1 Tag nach Intervention
C	7 Tage	-	-
D	28 Tage	-	-
E	3-6 Monate	-	-

Tab.16: Blutabnahmeprotokoll

Visite	K1	K2		Okkluderpatienten				
		A	B	A	B	C	D	E
CD in %	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM
133+/34+	0,10 ± 0,02	0,23 ± 0,07	0,14 ± 0,02	0,25 ± 0,06	0,15 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,03
133+/34-	4,01 ± 2,09	3,53 ± 0,73	4,10 ± 1,01	4,97 ± 1,41	4,61 ± 1,67	5,54 ± 2,16	3,18 ± 1,29	1,68 ± 0,64
133-/34+	0,15 ± 0,03	0,26 ± 0,08	0,37 ± 0,08	0,17 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,27 ± 0,05	0,18 ± 0,02	0,14 ± 0,02
133+/45+	1,01 ± 0,32	1,10 ± 0,29	1,22 ± 0,33	5,06 ± 1,38	5,86 ± 1,63	5,43 ± 2,11	2,44 ± 1,13	1,63 ± 0,76
133-/45+	0,12 ± 0,12	0,06 ± 0,04	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,09 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,03
133-/45-	97,74 ± 0,83	97,32 ± 0,74	98,70 ± 0,21	92,78 ± 2,06	95,13 ± 1,62	94,16 ± 2,16	96,63 ± 1,20	98,03 ± 0,69
34+/45+	0,09 ± 0,03	0,61 ± 0,25	0,24 ± 0,02	0,68 ± 0,25	0,30 ± 0,04	0,43 ± 0,11	0,26 ± 0,04	0,27 ± 0,04
34-/45-	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02
34-/45+	99,51 ± 0,05	99,63 ± 0,07	99,46 ± 0,16	95,38 ± 2,72	99,34 ± 0,06	99,27 ± 0,12	99,42 ± 0,06	99,41 ± 0,06

Tab.17: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der oberflächenmarkierten Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Kontrollgruppen und des Okkluderpatientenkollektivs. K1 = Kontrollgruppe 1 (gesunde Patienten); K2 = Kontrollgruppe 2 (PTCA Patienten); MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean

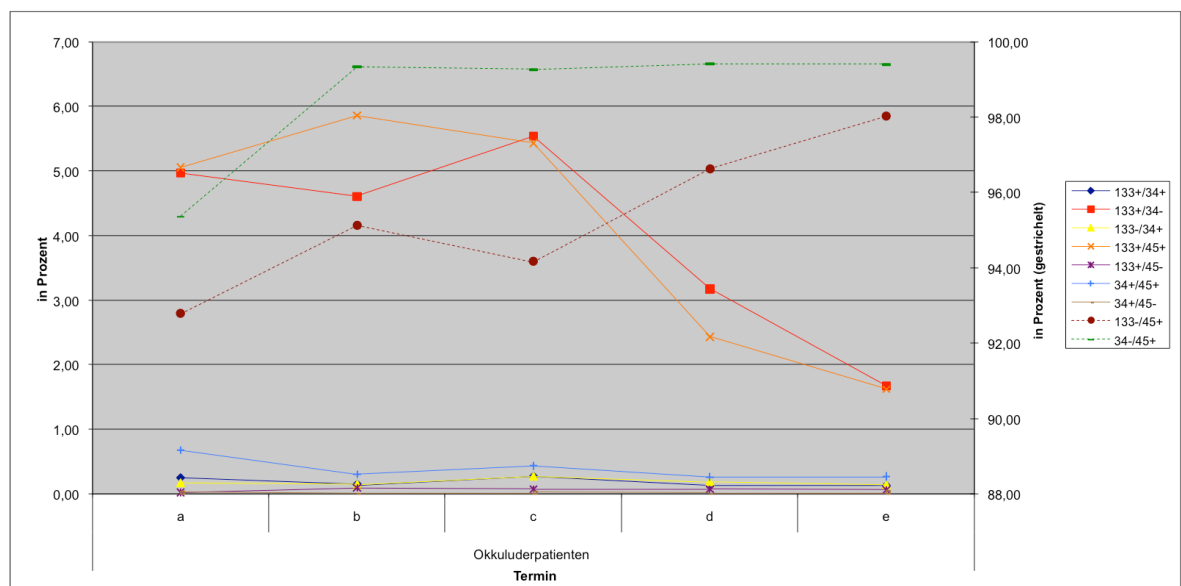


Abb.10: Verlauf der relativen Expression (Mittelwert in Prozent) der oberflächenmarkierten Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe/ Okkluderpatienten (S). Der Standardfehler (SEM) ist in der Abb. auf Grund der Übersichtlichkeit nicht aufgeführt (siehe Tab. 17)

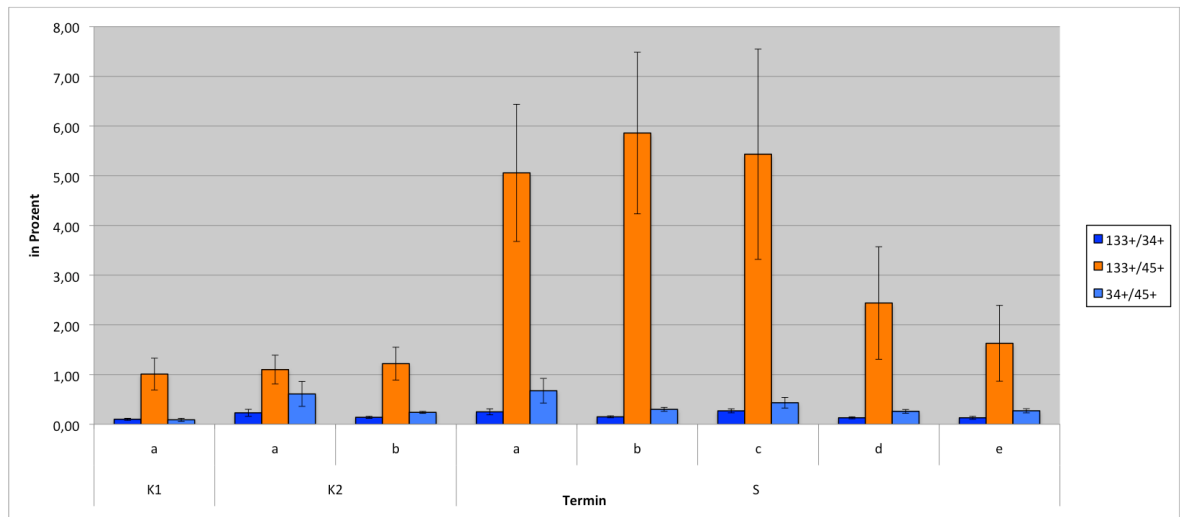


Abb.11: Verlauf der relativen Expression (Mittelwert in Prozent) der oberflächenmarkierten Zellen mit den Markerkombinationen CD133+/34+, CD133+/45+ und CD34+/45+ bezogen auf den Abnahmezeitpunkt von K1 (Kontrollgruppe 1) und K2 (Kontrollgruppe 2) und S (Studiengruppe). Signifikanter Unterschied K1 Termin a vs. K2 Termin a für die Marker CD133+/34+ ($p = 0,03$), CD34+/45+ ($p = 0,001$); signifikanter Unterschied für den Vergleich K1 Termin a vs. Studiengruppe Termin a ($p = 0,01$ für CD133+/34+; $p = 0,01$ für CD133+/45+; $p = 0,003$ für CD34+/45+)

Für die Einzelbetrachtung der Marker ist in den folgenden Abschnitten (4.1.2-4.1.5) in den Tabellen jeweils der Verlauf der Daten der Studiengruppe aufgeführt.

4.1.2 Mobilisierung von CD133⁺ Zellen

Im Folgenden wurde die Gesamtzahl zirkulierender CD133⁺ Zellen (Tabelle 18 und 19), also die Kombination jeweils von CD 133⁺ Zellen mit CD34⁺ beziehungsweise CD34⁻ Oberflächenmarkern sowie mit CD45⁺ beziehungsweise CD45⁻ Oberflächenmarkern, betrachtet.

4.1.2.1 CD133⁺/CD34⁺ und CD133⁺/CD34⁻ Zellen

Zunächst fällt der große prozentuale Unterschied der beiden dargestellten Zellarten auf. Es zeigt sich ein Abfall der Zellen direkt nach der Intervention (Termin b), ohne statistische Signifikanz. Das Maximum der dargestellten Markerkombinationen liegt jeweils bei Termin c, jedoch ohne signifikantes Unterschiedsniveau im Vergleich zu Termin a. Hervorzuheben ist ein deutlicher Abfall der CD133⁺/CD34⁺ Zellen zum Termin d, der auch 6 Monate postinterventionell unter dem Ausgangsniveau (Termin a) bestehen bleibt (Termin c vs. Termin e: $p = 0,01$; Termin a vs. Termin e: $p = 0,04$). Dagegen zeigen die CD133⁺/CD34⁻ Zellen im gesamten Verlauf keinen signifikanten Unterschied.

	Okkluderpatienten				
Visite	A	B	C	D	E
CD in %	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM
133+/34+	0,25 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,03
133+/34-	4,97 $\pm$ 1,41	4,61 $\pm$ 1,67	5,54 $\pm$ 2,16	3,18 $\pm$ 1,29	1,68 $\pm$ 0,64

Tab.18: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der CD133⁺/CD34⁺ und CD133⁺/CD34⁻ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean

4.1.2.2 CD133⁺/CD45⁺ und CD133⁺/CD45⁻ Zellen

Das prozentuale Ausgangsniveau ist auch bei diesen Markerkombinationen sehr unterschiedlich. Bei den CD133⁺/CD45⁺ Zellen kann ein Maximum am Termin b festgestellt werden und liegt im Vergleich zum Ausgangswert um 16 % höher und ist somit signifikant ($p = 0,01$). Ein signifikanter Unterschied besteht auch beim Vergleich von Termin a zu Termin e ($p = 0,05$) mit deutlicher Reduktion der gemessenen Zellen ab Termin c. Die Markerkombination CD133⁺/CD45⁻ zeigt bei geringem Ausgangsniveau einen 4,5-fachen Anstieg direkt nach der Intervention, ohne Signifikanz. Der weitere Verlauf zeigt eine annähernd konstante Zellzahl.

	Okkluderpatienten				
Visite	A	B	C	D	E
CD in %	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM
133+/45+	5,06 $\pm$ 1,38	5,86 $\pm$ 1,63	5,43 $\pm$ 2,11	2,44 $\pm$ 1,13	1,63 $\pm$ 0,76
133+/45-	0,02 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,03

Tab.19: Verlauf der relativen Expression (Mittelwert in Prozent) der CD133⁺/CD45⁺ und CD133⁺/CD45⁻ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean

4.1.3 Mobilisierung von CD34⁺ Zellen

Die Oberflächenkombinationen mit CD34⁺ Zellen sind in Tabelle 20 und 21 veranschaulicht.

4.1.3.1 CD133⁺/CD34⁺ und CD133⁻/CD34⁺ Zellen

Im Vergleich zu den oben beschriebenen Zellen ist der prozentuale Unterschied zwischen den beiden hier dargestellten Markerkombinationen geringer und zeigt einen annähernd gleichen zeitlichen Verlauf. Das Maximum beider Zelltypen ist bei Termin c (Termin b vs. Termin c: $p = 0,02$ für CD133⁺/CD34⁺ und CD133⁻/CD34⁺ Zellen). Ein Plateau wird bei den Terminen d und e beider Markerkombinationen erreicht, das jeweils auf dem Niveau von Termin b, also direkt postinterventionell liegt.

	Okkluderpatienten				
Visite	A	B	C	D	E
CD in %	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM
133+/34+	0,25 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,03
133-/34+	0,17 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,02

Tab.20: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der CD133⁺/CD34⁺ und CD133⁻/CD34⁺ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean

4.1.3.2 CD34⁺/CD45⁺ und CD34⁺/CD45⁻ Zellen

Die folgenden beiden Zelltypen zeigen eine auffällige Reduktion der prozentuellen Anzahl der Zellen direkt postinterventionell (Termin a vs. Termin b, keine Signifikanz). Bei beiden kommt es zu einem Anstieg zu Termin c. Es können jeweils keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf festgestellt werden.

	Okkluderpatienten				
Visite	A	B	C	D	E
CD in %	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM
34+/45+	0,68 $\pm$ 0,25	0,30 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,11	0,26 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,04
34-/45-	0,03 $\pm$ 0,03	0,01 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,02

Tab.21: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der CD34⁺/CD45⁺ und CD34⁺/CD45⁻ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean

4.1.4 Mobilisierung von CD45⁺ Zellen

In Tabelle 22 und 23 werden die zeitlichen Verläufe der Markerkombinationen CD133⁺/CD45⁺ und CD133⁻/CD45⁺ Zellen dargestellt.

4.1.4.1 CD133⁺/CD45⁺ und CD133⁻/CD45⁺ Zellen

Bei den in Tabelle 22 aufgeführten Zelltypen fällt zunächst das große unterschiedliche Ausgangsniveau auf. Das Maximum der CD133⁺/CD45⁺ Zellen liegt einen Tag postinterventionell (Termin b) und zeigt im zeitlichen Verlauf einen hohen prozentualen Abfall zu den Terminen d und e (Termin a vs. Termin b: p = 0,01; Termin a vs. Termin e: p = 0,05). Die Markerkombination CD133⁻/CD45⁺ verzeichnet dagegen einen stetigen Aufwärtstrend, mit Ausnahme von Termin c. Es kann kein signifikanter Unterschied im statistischen Vergleich für diese Markerkombination festgestellt werden (Termin a vs. Termin b: p = 0,38; Termin a vs. Termin e: p = 0,06).

	Okkluderpatienten				
Visite	A	B	C	D	E
CD in %	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM
133+/45+	5,06 $\pm$ 1,38	5,86 $\pm$ 1,63	5,43 $\pm$ 2,11	2,44 $\pm$ 1,13	1,63 $\pm$ 0,76
133-/45+	92,78 $\pm$ 2,06	95,13 $\pm$ 1,62	94,16 $\pm$ 2,16	96,63 $\pm$ 1,20	98,03 $\pm$ 0,69

Tab.22: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der CD133⁺/CD45⁺ und CD133⁻/CD45⁺ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean

4.1.4.2 CD34⁺/CD45⁺ und CD34⁻/CD45⁺ Zellen

Die folgenden beiden Markerkombinationen präsentieren ebenfalls ein hohes unterschiedliches Ausgangsniveau. Ein Tag postinterventionell kommt es bei den CD34⁺/CD45⁺ Zellen zu einer Reduktion um 56 %. Das Maximum liegt bei Termin a. Die CD34⁻/CD45⁺ Zellen haben nur eine minimale Schwankungsbreite. Ein signifikanter Unterschied im zeitlichen Verlauf kann bei beiden Zelltypen nicht festgestellt werden.

	Okkluderpatienten				
Visite	A	B	C	D	E
CD in %	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM	MW $\pm$ SEM
34+/45+	0,68 $\pm$ 0,25	0,30 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,11	0,26 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,04
34-/45+	95,38 $\pm$ 2,72	99,34 $\pm$ 0,06	99,27 $\pm$ 0,12	99,42 $\pm$ 0,06	99,41 $\pm$ 0,06

Tab.23: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der CD34⁺/CD45⁺ und CD34⁻/CD45⁺ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean

4.2 Funktionelle Charakterisierung und Quantifizierung mobilisierter Stamm- und Progenitorzellen mittels Colony Assays

Zur weiteren Charakterisierung und indirekten Quantifizierung zirkulierender Stamm- und Progenitorzellen wurden erylysierte Zellen der Patientenproben, wie unter Kapitel 3.3 beschrieben, in einem Colony Assay für hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen eingebracht. Nach 14 Tagen wurden Anzahl und Morphologie der gebildeten Kolonien bestimmt.

In Tabelle 24 sind die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen (Standard Error of the Mean = SEM) der beiden Kontrollgruppen und der Okkluderpatienten zu den jeweiligen Abnahmezeitpunkten (siehe Tabelle 16) für die angelegten Colony Assays in Prozent aufgeführt. Abbildung 12 zeigt den Verlauf der gebildeten Kolonien (Mittelwerte in Prozent mit den jeweiligen Standardabweichungen) für K1, K2 und S zum Termin a. Abbildung 13 entsprechend den Verlauf der Mittelwerte der gebildeten Kolonien (Mittelwerte in

Prozent mit den jeweiligen Standardabweichungen) für K2 und S zum Termin b.

Ein Vergleich der Termine a und b der Kontrollgruppe 2 ergab für alle CFUs keinen signifikanten Unterschied.

Die CFU-GM Kolonien zeigen bei Kontrollgruppe 1 und der Studiengruppe (vergleiche Abbildung 12) ein unterschiedliches Ausgangsniveau, mit einem statistischen Unterschied für Termin a ($p = 0,01$). Der Vergleich der Termine b von Kontrollgruppe 2 und der Studiengruppe ergaben für alle CFUs einen hochsignifikanten Unterschied (vergleiche Abbildung 13).

Bei Betrachtung der Studiengruppe in der Abbildung 14 fällt ein deutlicher Anstieg der CFU-E-Nest-Kolonien am postinterventionellen Termin auf (Termin b vs. Termin a; Anstieg um 109,36 %). Eine Signifikanz besteht nicht ($p = 0,15$). Im weiteren Verlauf fällt dieser Wert innerhalb einer Woche ab (Termin b zu Termin c; Abnahme um 67,09 %). Der Vergleich von CFU-G im zeitlichen Verlauf (Termin a zu Termin b) lässt auf einen Trend mit Anstieg der Kolonien schließen ($p = 0,07$; Anstieg um 59,44 %). Im weiteren Verlauf fällt zum Termin c der Wert unter das Ausgangsniveau ab. GFU-GM zeigt einen Abwärtstrend von Termin a zu c ($p = 0,04$; Abfall um 59,30 %).

Nach 6 Monaten lässt sich ein Anstieg der CFU-GM-, CFU-G-, CFU-G-Nest- und CFU-E-Nest-Kolonien ermitteln.

	K1	K2		Okkluderpatienten			
Visite	A	A	B	A	B	C	D
CFU in %	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM
CFU-E	8,60 ± 2,60	6,20 ± 0,96	7,63 ± 1,93	19,88 ± 9,99	19,20 ± 5,17	30,80 ± 14,17	26,60 ± 8,36
CFU-E-Nest	27,50 ± 13,05	4,00 ± 0,68	3,13 ± 1,76	41,12 ± 13,45	86,09 ± 26,08	28,33 ± 10,13	48,83 ± 22,59
CFU-GM	0,90 ± 0,50	0,20 ± 0,20	0,13 ± 0,13	4,83 ± 2,11	2,33 ± 0,49	1,00 ± 0,00	5,67 ± 2,91
CFU-G	15,70 ± 6,27	2,80 ± 1,22	5,63 ± 2,63	21,18 ± 4,94	33,77 ± 7,82	18,17 ± 6,54	24,25 ± 7,44
CFU-G-Nest	7,10 ± 2,40	0,40 ± 0,16	0,13 ± 0,13	10,50 ± 2,00	16,80 ± 4,38	8,50 ± 2,78	9,00 ± 3,87
CFU-M	4,70 ± 0,82	3,30 ± 0,96	4,50 ± 2,58	5,30 ± 1,55	8,40 ± 3,30	9,40 ± 2,11	7,33 ± 1,89

Tab.24: Anzahl in vitro generierter CFUs (Mittelwerte in Prozent) bezogen auf den Abnahmezeitpunkt von K1, K2 und der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean

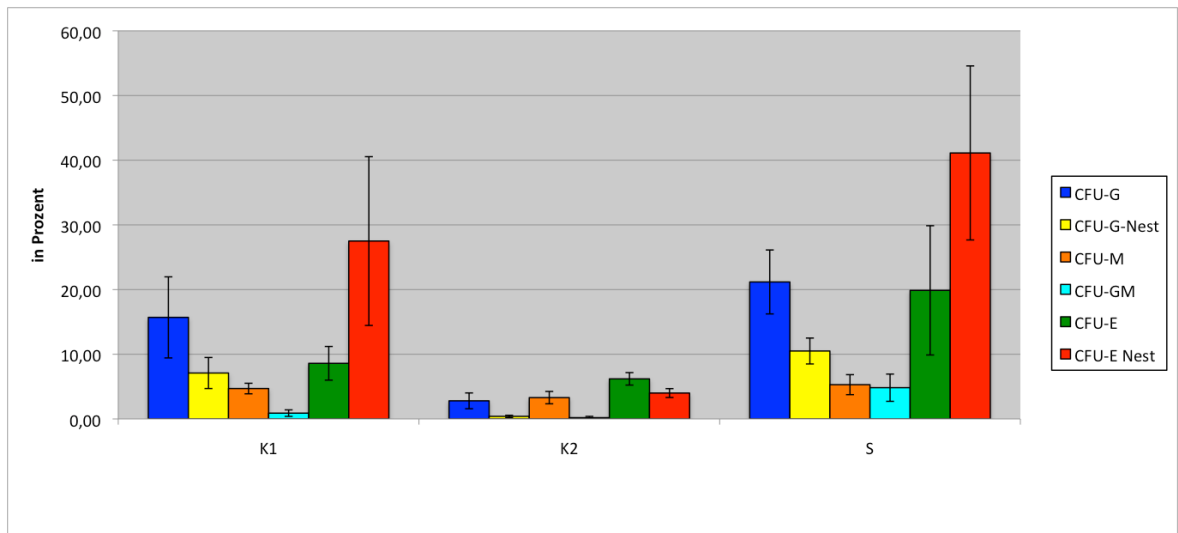


Abb.12: **Prozentuale Verteilung der in vitro generierten CFUs (Mittelwerte in Prozent mit Standardfehler) bezogen auf den Abnahmezeitpunkt a von K1, K2 und der Studiengruppe (S).** Signifikanter Unterschied im statistischen Vergleich für K1 (Termin a) mit der Studiengruppe (Termin a) für CFU-GM ($p = 0,001$); signifikanter Unterschied im statistischen Vergleich für Termin K2 (Termin a) mit der Studiengruppe (Termin a) für CFU-G, CFU-G-Nest, CFU-GM (jeweils $p = 0,001$) und CFU-E-Nest ($p = 0,013$)

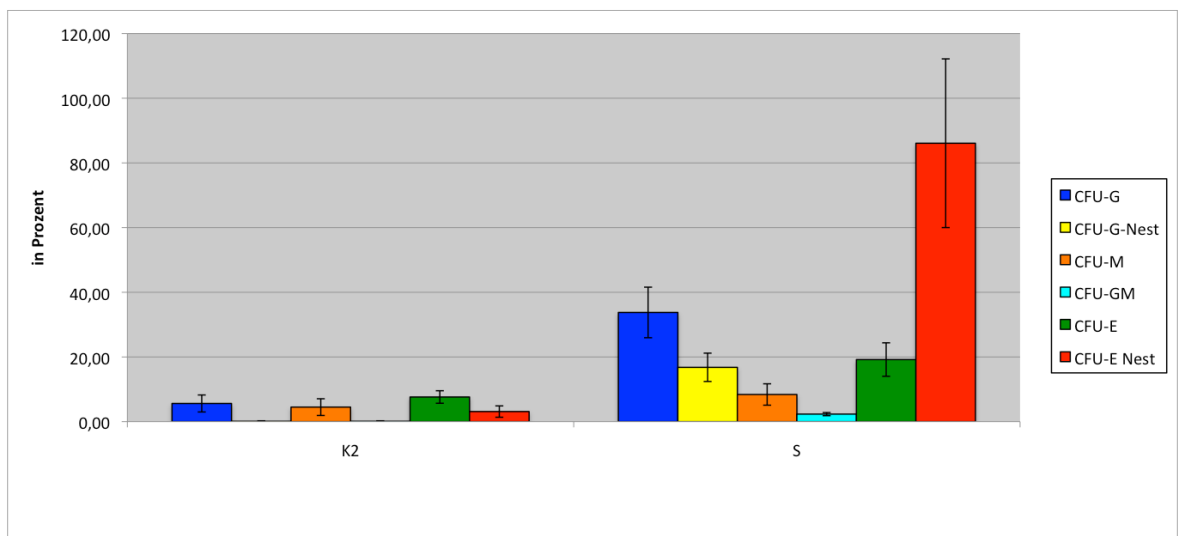


Abb.13: **Prozentuale Verteilung der in vitro generierten CFUs (Mittelwerte in Prozent mit Standardfehler) bezogen auf den Abnahmezeitpunkt b von K2 und der Studiengruppe (S).** Signifikanter Unterschied im statistischen Vergleich für Termin K2 (Termin b) mit der Studiengruppe (Termin b) für CFU-G, CFU-G-Nest, CFU-GM, und CFU-E-Nest (jeweils $p = 0,001$);

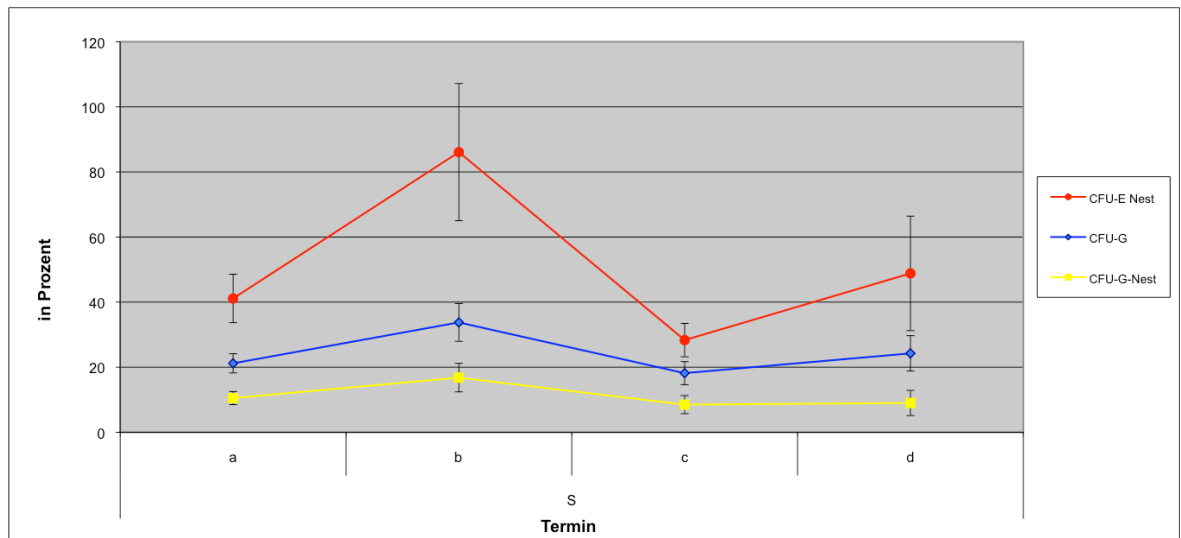


Abb.14: **Verlauf des relativen Wachstums (Mittelwert in Prozent mit Standardfehler) der CFUs bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe (S).**

In Abbildung 18 und 19 sind exemplarisch drei morphologisch verschiedene Kategorien hämatopoetischer Kolonien dargestellt.

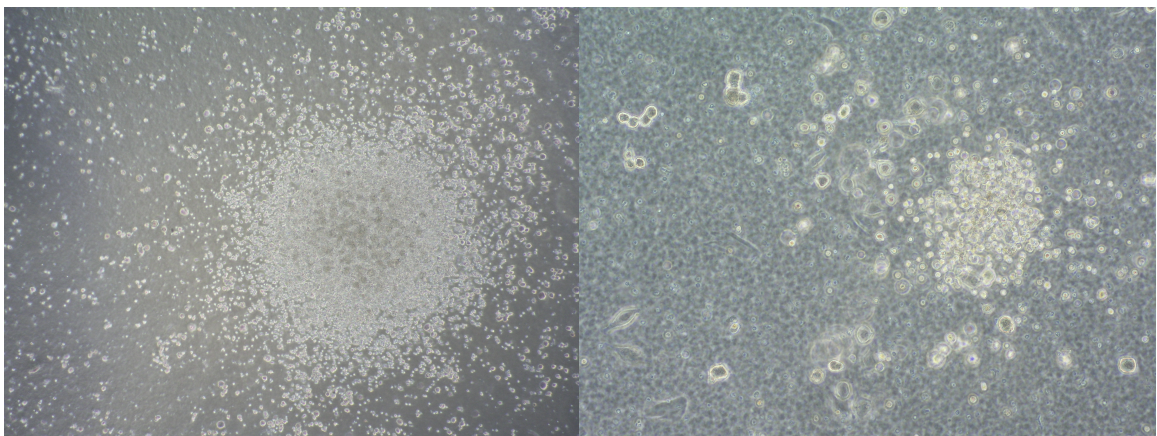


Abb.15: CFU-G (links, Vergrößerung 4-fach; rechts, Vergrößerung 10-fach) (CFU-G = Colony Forming Unit-Granulocyte)

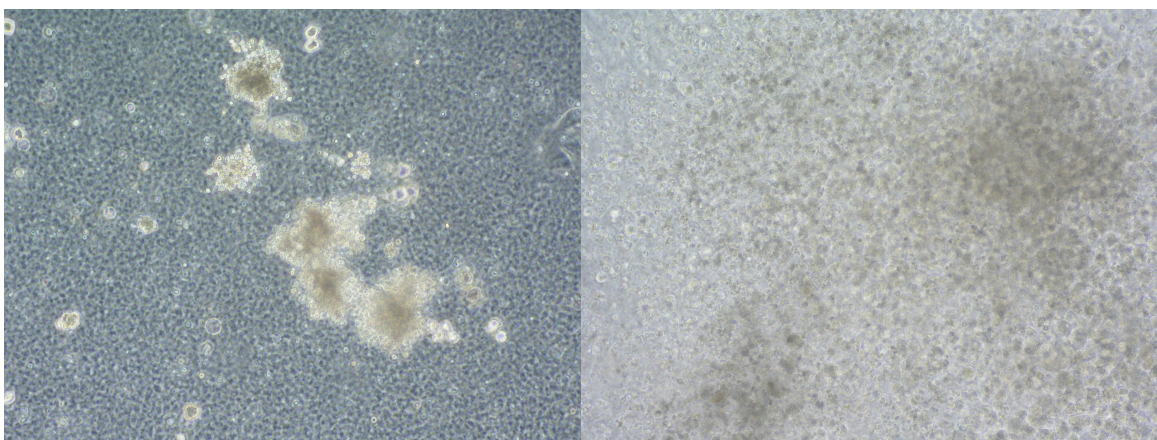


Abb.16: CFU-E-Nest (links, Vergrößerung 10-fach) CFU-GM (rechts, Vergrößerung 10-fach); (CFU-E-Nest = Colony Forming Unit-Erythrocyte-Nest); (CFU-GM = Colony Forming Unit-Granulocyte Monocyte)

4.3 Analyse der HSC mittels Immunoassays (ELISA)

In Tabelle 25 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Serumproteinkonzentrationen von MCP-1, VEGF, SDF-1 und MPO zu den jeweiligen Zeitpunkten von Kontrollgruppe 1, Kontrollgruppe 2 und der Studiengruppe dargestellt.

Bei SDF-1 befinden sich die Kontrollgruppe 1 (Termin a) und die Studiengruppe (Termin a) auf dem gleichen Ausgangsniveau. Im zeitlichen Verlauf von der Studiengruppe lässt sich eine stetige Abnahme der Serumkonzentration verfolgen (Termin a zu Termin e = Abnahme um 18,46 %). Statistisch ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied von Termin a zu Termin b ($p = 0,55$). Bei Kontrollgruppe 2 ist ebenfalls präinterventionell eine höhere Serumkonzentration als postinterventionell zu verzeichnen.

Bei Betrachtung der Konzentrationen von MPO ist festzustellen, dass Kontrollgruppe 2 zum Termin b den höchsten Wert der gesamten Messungen erreicht. Kontrollgruppe 2 zeigt hier einen postinterventionellen Anstieg (Termin b). Innerhalb der Studiengruppe lässt sich am Termin a die höchste Konzentration nachweisen, die dann innerhalb einer Woche abfällt. Es findet sich ein erneuter Anstieg zum Zeitpunkt d.

Die MCP-1 Konzentrationen weisen im zeitlichen Verlauf nur geringe Schwankungen auf. Der höchste Wert ist hier bei der Studiengruppe zum Termin c aufzufinden ($340,23 \pm 52,69 \text{ pg}/\mu\text{l}$). Die Statistik ergibt keine Signifikanz für Termin c zu Termin a ($p = 0,51$).

VEGF besitzt bei der Studiengruppe zum Termin d die höchste Konzentration. Kontrollgruppe 2 zeigt vor und nach Intervention ein nahezu gleiches Konzentrationslevel.

	K1	K2		Okkluderpatienten				
Visite	A	A	B	A	B	C	D	E
Antikörper	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM	MW ± SEM
MCP-1 in pg/µl	194,63 ± 17,44	273,97 ± 26,40	277,16 ± 27,06	306,67 ± 31,66	273,15 ± 24,66	340,23 ± 52,69	301,56 ± 32,32	303,18 ± 39,84
VEGF in pg/µl	53,92 ± 50,59	51,37 ± 10,01	38,14 ± 11,49	23,76 ± 35,02	42,71 ± 16,95	41,87 ± 17,50	80,24 ± 50,34	19,60 ± 6,76
SDF-1 in pg/ µl	2314,58 ± 117,14	2467,40 ± 213,20	2286,57 ± 169,79	2348,35 ± 128,71	2200,29 ± 98,82	2130,43 ± 266,78	2061,44 ± 96,47	1914,75 ± 126,67
MPO in ng/µl	51,31 ± 18,78	84,78 ± 39,87	97,25 ± 54,67	93,56 ± 32,68	52,96 ± 20,42	49,79 ± 11,06	93,15 ± 34,36	33,02 ± 4,34

Tab.25: Verlauf der Serumkonzentrationen von MCP-1, VEGF, SDF-1 gemessen in pg/µl; MPO gemessen in ng/µl bezogen auf den Abnahmezeitpunkt von K1, K2 und der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Implantation eines Okkluders, also einem Fremdkörper im kardiovaskulären System, eine Mobilisierung von hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen induziert. Hierzu wurden die Blutproben von 20 Patienten (Studiengruppe S) mit atrialem Septumdefekt vor und nach Okkluderimplantation analysiert. Zwei Kontrollgruppen dienten zum Vergleich der Ergebnisse der Studiengruppe: ein gesundes Probandenkollektiv, welches 10 Patienten umfasste (Kontrollgruppe 1) sowie ein Kollektiv von ebenfalls 10 Patienten, bei welchem eine PTCA durchgeführt wurde (Kontrollgruppe 2).

Somit konnte gezeigt werden, welche Effekte die intraatriale Okkluderimplantation bei dem Studienkollektiv im Vergleich zu gesunden Patienten und zu Patienten mit kathetergestützten Eingriff, jedoch ohne eine Fremdkörperimplantation dieser Größe, hat.

Auffällig ist, dass sich beim direkten Vergleich der Studiengruppe mit den Kontrollgruppen, bei allen gemessenen doppelt positiven Markern ($CD133^+/34^+$; $CD133^+/45^+$; $CD34^+/45^+$) in der FACS-Analyse, eine deutlich höhere Zellzahl bei der Studiengruppe finden lässt. Die Blutproben aller Patienten mit atrialem Septumdefekt wiesen präinterventionell bereits mehr zirkulierende hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen auf als bei der gesunden Kontrollgruppe.

Eine Ausnahme bilden hier die zwei Markerkombinationen, die im Gesamtvergleich auch die höchsten gemessenen Zellzahlen zeigen, dies sind die $CD133^-/45^+$ und $CD34^-/45^+$ Zellen. Die hohe Anzahl dieser Zellen ist darin begründet, dass, mit Ausnahme von Erythrozyten, fast alle Zellen des hämatopoetischen Systems CD45 exprimieren.

Im Vergleich der Studiengruppe zu der Kontrollgruppe 2 in Bezug auf die präinterventionelle Anzahl hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen bietet sich ein uneinheitlicheres Bild. Vier von neun gemessenen Markerkombinationen ($CD133^+/34^+$; $CD133^+/45^-$; $CD133^-/45^+$; $CD34^-/45^+$) zeigen zum Termin a bei Kontrollgruppe 2 eine höhere Zellzahl als bei der Studiengruppe zum Termin a. Dieses könnte darin begründet sein, dass die Anzahl von frühen endothelialen

Zellen (z.B. CD133⁻/CD34⁺) besonders nach einem akutem Myokardinfarkt, bei Angina pectoris sowie nach Gefäßverletzungen erhöht ist [3, 20, 32, 36, 49].

Andererseits ist bei der Herzinsuffizienz, der hauptursächlich eine KHK zugrunde liegt, mit zunehmendem Schweregrad (NYHA-Stadien) ein Abfall der zirkulierenden hämatopoetischen und endothelialen Stamm- und Progenitorzellen beschrieben [32]. In der vorliegenden Arbeit ist bei Kontrollgruppe 2 kein geschlechtsspezifischer Anstieg hinsichtlich der erhöhten Zellzahl zu erkennen; es handelt sich bei der Kontrollgruppe 2 jedoch um ein deutlich älteres Patientenkollektiv. Darüber hinaus ist die Kontrollgruppe 2 ein Patientenkollektiv, das vor allem aus KHK-Patienten besteht. Da der KHK pathogenetisch ein Endothelschaden zugrunde liegt, ist hier eine Korrelation zwischen erhöhter Zellzahl und dem untersuchten Patientenkollektiv zu sehen. Der Endothelschaden ist hierbei ein Reiz für die Mobilisierung von endothelialen Stamm- und Progenitorzellen.

Besonders hervorzuheben ist, dass eine Mobilisierung vornehmlich der CD133⁺/45⁺ Zellen 24 Stunden nach Okkluderimplantation stattfindet. Kritisch betrachtet werden muss jedoch die bereits präinterventionell erhöhte Zahl dieser Zellen. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass Patienten mit einem ASD bereits durch das Vorliegen eines ASD und der konsekutiv veränderten Hämodynamik aufgrund des Shunts eine erhöhte Zellzahl hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen aufweisen.

Bei der Auswertung der Colony Assays fiel zu dem Anstieg der CD133⁺/45⁺ Zellen ein konkordanter Anstieg der CFU-E-Nest-Kolonien (Termin b zu Termin a) der Studiengruppe auf, jedoch ohne signifikanten Unterschied.

Die Analyse von vier Serumproteinen, die bei der Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen eine Rolle spielen, zeigten lediglich Werte im Referenzbereich. Es fanden sich keine signifikanten Anstiege im zeitlichen Verlauf nach Okkluderimplantation.

5.1 Auswirkung der Okkluderimplantation auf die Mobilisierung von HSC

5.1.1 Mobilisierung der CD 133⁺ Zellen nach Okkluderimplantation

Unter den drei mittels FACS-Analyse untersuchten Antikörperkombinationen lässt sich nur ein Anstieg der CD133⁺/45⁺ nachweisen. Dieser findet in den ersten 24 Stunden nach der Okkluderimplantation statt. Auch Gehling et al. konnten bei Leber-Lebendspendern nach einer Leberteilresektion einen Anstieg von CD 133⁺/45⁺ Zellen in den ersten 12 Stunden postoperativ zeigen. Wenige dieser mobilisierten Zellen koexprimierten den Marker CD34. [14]

Die gemessene Zellzahl der CD133⁺/45⁺ Zellen steigt von Termin a (präinterventionell) zum Termin b (24 h postinterventionell) um 16 % (p = 0,01). Eine Mobilisierung der CD34⁺ Zellen scheint nicht stattzufinden. Lediglich die Markerkombination CD133⁺/CD34⁺ lässt den höchsten Wert zum Termin c (7 Tage postinterventionell) erkennen. Es besteht jedoch mit sehr geringem Unterschied im Vergleich dieser Zellzahl vor der Intervention keine statistische Signifikanz. Interessanterweise befinden sich die CD34⁺/CD45⁺ Zellen bei der Studiengruppe zum Zeitpunkt vor der Intervention auf dem höchsten Niveau und fallen nach der Okkluderimplantation deutlich ab. Es könnte sich bei diesen CD34⁺/CD45⁺ Zellen um EPCs handeln, die durch den bestehenden Septumdefekt mobilisiert wurden.

5.1.2 Koloniebildendes Potential der zirkulierenden Zellen

Ebenfalls zum Zeitpunkt b (in den ersten 24 Stunden postinterventionell) konnten wir mittels Colony Assay vorwiegend zwei verschiedene CFUs beobachten; dies waren die CFU-E-Nest-Kolonien und CFU-G-Kolonien. Im Vergleich zu den Ergebnissen präinterventionell fand sich zwar kein signifikanter Unterschied, jedoch ließ sich eindeutig ein Trend erkennen: CFU-E-Nest-Kolonien (Anstieg von Termin a zu b um 109,36 %) und CFU-G-Kolonien (Anstieg von Termin a zu b um 59,44 %).

Dies zeigten auch Gehling et al. in oben erwähnter Studie. Die nach Leberteilresektion mobilisierten CD133⁺ Zellen brachten CFUs der granulozytären, monozytären und makrophagozytären Zellreihe hervor. Diese mobilisierten CD133⁺ Zellen repräsentierten somit Vorläuferzellen der myelomonozytären Zellreihe [14]. Dies ließ sich auch in unserer Studie zeigen. Das Wachstum der CFU-E-Nest-Kolonien zeigt an, dass Progenitorzellen der roten Zellreihe durch die

Okkluderimplantation mobilisiert werden.

Auffällig ist, dass die Blutproben der gesunden Kontrollgruppe signifikant mehr CFUs generierten als die kranke Kontrollgruppe. Dies gilt für sämtliche CFUs der myelomonozytären Zellreihe (außer CFU-M) wie auch für die erythropoetischen Kolonien der Kategorie CFU-E-Nest und CFU-E. Die Ursache hierfür ist nicht klar. Ein Erklärungsansatz ist ein Nikotinabusus oder eine bestehende Schwangerschaft einer der Probandinnen, welche Einfluss auf die Zahl zirkulierender Vorläuferzellen hat [4]. Insgesamt zeigt sich eine auffällige Heterogenität in der Gruppe, vor allem bedingt durch einen Probanden mit hohen Werten unklarer Ursache. Dieses fiel bei detaillierter Betrachtung der Rohdaten aller Probanden auf. Der Proband zeigte sehr hohe Werte für die CFU-E-Nest- und CFU-G- und CFU-G-Nest-Kolonien auf, welche die Mittelwerte für diese Kolonien bei sonst unauffälligen Werten dieser Kontrollgruppe deutlich erhöhten.

5.1.3 Analyse von Zytokinen und Serumproteinen mit Mobilisierungspotential

Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnten wir keinen Anstieg von einem der vier mittels ELISA untersuchten Serumproteine SDF-1, MCP-1, VEGF und MPO nachweisen. Alle Messergebnisse befanden sich im jeweiligen Referenzbereich. Somit ließ sich in der Studiengruppe kein mit den Ergebnissen der FACS-Analysen und Colony Assays korrelierender Anstieg einer der Serumproteine zum Zeitpunkt b feststellen.

Bevor wir für jeden Einzelfall einen Erklärungsansatz für das Ausbleiben eines erwarteten Anstiegs der Serumproteine bieten, folgt eine kurze Darstellung der Zytokine und ihrer Funktion, um das Ergebnis erklären zu können.

Der verwendete Antikörper/Chemokin SDF-1 spielt eine zentrale Rolle in der Hämatopoese. Stromazellen sezernieren im Knochenmark große Mengen dieses Zytokins (stromal cell-derived factor-1 α = SDF-1 α). Es ist das erste Chemokin, welches als chemotaktischer Stammzellfaktor für unreife CD34⁺ Blutzellen entdeckt wurde. Sein einziger bisher bekannter Rezeptor ist CXCR4. Untersuchungen zur Chemotaxis von Stammzellen haben gezeigt, dass CXCR4 der einzige relevante Chemokinrezeptor auf hämatopoetischen Stammzellen ist und dass das von Knochenmarkstromazellen gebildete SDF-1 α daher eine herausragende Rolle für das „homing“ dieser Zellen ins Knochenmark spielt [60].

Peled et al. [42] postulierten die Beteiligung von SDF-1 α bei der Mobilisierung unreifer humaner CD34⁺ Zellen. Eine Studie von Kollet et al. verweist darauf, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 und sein Ligand, SDF-1, nicht nur eine Rolle bezüglich des homings von hämatopoetischen Stammzellen in das Knochenmark spielt, sondern auch die Rekrutierung von knochenmarksständigen HSC in die Leber induziert [24].

Wie in den Ergebnissen der FACS-Messung dargestellt, konnten wir keine signifikante Mobilisierung der CD34⁺ Zellfraktion nachweisen. Dieses Ergebnis korreliert folglich mit der gemessenen Serumkonzentration von SDF-1.

MPO ist ein Enzym in neutrophilen Granulozyten, das bei der Regulation und Terminierung von Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle spielt. MPO avanciert als Marker für adverse Ereignisse bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom. MPO identifiziert die Risiko-Patienten, die noch keinen laborchemischen Hinweis für einen Myokardzelluntergang aufweisen. Es scheint somit die Granulozytenaktivierung der Myokardzellnekrose vorauszugehen und ist möglicherweise ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus der Myokardischämie. [55]

In Anbetracht der proinflammatorischen Eigenschaften von MPO sind Patienten mit hereditär erhöhten MPO-Spiegeln möglicherweise gefährdeter, kardiovaskuläre Erkrankungen zu erleiden. In den Ergebnissen unserer ELISA-Messungen fällt bei der Kontrollgruppe K2 ein postinterventioneller Anstieg dieses Enzyms auf.

MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) spielt eine Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten im Rahmen von Verletzungen und Entzündungen. Matsushima et al. beschrieben 1989 erstmals MCP-1 beim Menschen. Es wird insbesondere von Monozyten beziehungsweise Makrophagen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fettgewebe gebildet. Auf Monozyten wirkt MCP-1 chemotaktisch und vermittelt damit eine Monozytenrekrutierung aus dem Blutkreislauf sowie deren Aktivierung [34, 37, 46, 48].

In unserer Studie hätte man erhöhte MCP-1-Werte innerhalb von der Kontrollgruppe 2 (Koronarangiographie-Gruppe) erwarten können. Diese Erwartungen bestätigten sich auch hier nicht in der Messung. Auch die MCP-1-Werte befanden sich wie oben beschrieben, im Referenzbereich und zeigten

somit keinen Hinweis für eine Beteiligung von MCP-1 bei der Mobilisierung von CD133⁺/45⁺ Zellen.

An der in unserer Arbeit beobachteten Mobilisierung von CD133⁺/45⁺ Zellen könnte ein anderes Chemokin, als die von uns gemessenen Serumproteine, beteiligt sein.

Für die Beurteilung der Ergebnisse ist wichtig, eine Beteiligung/Beeinflussung der verabreichten Medikamente während des Untersuchungszeitraums auszuschließen. Postinterventionell erhielten die Patienten eine systemische Antikoagulation mit Heparin bis zum darauf folgenden Tag (aPTT 50-60 Sekunden). Zur Vermeidung von Thrombusformationen am Implantat erhielten die Patienten über 6 Monate eine orale Medikation mit ASS 1 x 100 mg und Clopidogrel 1 x 75 mg (bis zur vollständigen Endothelialisierung des Schirms). Allerdings ist so ein Effekt weder für Aspirin und Plavix noch für Heparin beschrieben.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass

1. Patienten mit ASD/PFO erhöhte CD133⁺/45⁺ Zellen aufweisen
2. die Okkluderimplantation einen Abfall provoziert
3. die Okkluderimplantation einen passageren Anstieg der CFUs hervorruft

Somit ist die Reduktion der hämatopoetischen Progenitorzellen möglicherweise Ausdruck der veränderten Hämodynamik mit Reduktion des atrialen Shunts, die Erhöhung der CFU Ausdruck der Endothelialisierung des Fremdkörpers.

6.Zusammenfassung

Diese Studie untersucht den Einfluss einer perkutanen Okkluderimplantation auf die Anzahl zirkulierender hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen mittels phänotypischen und funktionellen Analysen.

Viele Studien belegen, dass eine Mobilisierung von hämatopoetischen und endothelialen Stammzellen nach einer Schädigung von Blutgefäßen stattfindet.

Es sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob die Okkluderimplantation für die Mobilisierung von Progenitorzellen einen Reiz im kardiovaskulären Gefäßsystem (Mikrogefäßtraumata und Reendothelialisierung) darstellt. Dabei bestand die Studiengruppe aus einem Probandenkollektiv mit ASD oder PFO.

Das Blut von den Teilnehmern der Studiengruppe wurde präinterventionell (vor Okkluderimplantation) und zu vier Zeitpunkten postinterventionell (nach Okkluderimplantation) analysiert. Gesunde Probanden und KHK-Patienten dienten als Kontrolle. Den gesunden Probanden (Kontrollgruppe 1) wurde einmalig, den KHK-Patienten (Kontrollgruppe 2) wurde im Abstand von 24 h zweimalig Blut abgenommen (vor und nach PTCA).

Alle Blutproben wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) auf bestimmte zelluläre Oberflächenantigene ($CD34^+$, $CD45^+$, $CD133^+$) untersucht, um mobilisierte Stamm- und Progenitorzellen zu detektieren und phänotypisch zu charakterisieren. Weiterhin wurden Colony Assays durchgeführt, um die mobilisierten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen funktionell zu charakterisieren und indirekt zu quantifizieren. Zur Beurteilung bei der Zellmobilisierung beteiligter Chemokine/Zytokine führten wir Immunoassays (ELISA) mit Antikörpern gegen MCP-1, VEGF, SDF-1 und MPO durch.

Die FACS-Analysen ergaben eine Mobilisierung von $CD133^+/45^+$ Zellen. Die Anzahl dieser Zellen war im Vergleich zu den übrigen Markerkombinationen bereits präinterventionell erhöht und zeigte zum Zeitpunkt b (24h nach Okkluderimplantation) einen statistisch signifikanten Anstieg um 16 % ($p = 0,01$). Hervorzuheben ist, dass die Zellzahl der $CD133^+/45^+$ Zellen postinterventionell (Termin c und d) unter das Ausgangsniveau (Termin a) abfällt. Der Grund hierfür kann der nun verschlossene Rechts- Links- Shunt durch die Okkluderimplantation und die damit behobene Hypoxie sein.

Die Zahl der CD133⁺/45⁺ Zellen beider Kontrollgruppen befand sich auf einem niedrigeren Ausgangsniveau als das der Studiengruppe. Bei Kontrollgruppe 2 zeigte sich ein geringer Anstieg der CD133⁺/45⁺ Zellen zum Zeitpunkt b. Eine Mobilisierung von CD34⁺ Zellen fand sich nicht.

Bei der Analyse der Markerkombination CD133⁺/CD34⁺ ist ein signifikanter Unterschied im statistischen Vergleich für Termin a zu Termin e zu verzeichnen ($p = 0,04$). Das Ausgangsniveau liegt im Vergleich zu den Kontrollgruppen höher. Der zeitliche Verlauf zeigt einen Abfall zu Termin b (24 h postinterventionell), ein Maximum zu Termin c (1 Woche postinterventionell) und fällt zu Termin d (28 Tage postinterventionell) und e (3-6 Monate postinterventionell) weit unter das Ausgangsniveau.

Mittels Colony Assay fanden wir ebenfalls konkordant zu den FACS-Messergebnissen zum Zeitpunkt b eine deutliche Zunahme in vitro generierter erythrozytärer und granulozytärer CFUs in der Studiengruppe. Bezüglich der erythrozytären CFUs fand sich hierbei im Vergleich zu Zeitpunkt a ein Anstieg um 109,36 %, für die granulozytären CFUs betrug der Anstieg 59,44 %.

Die mittels ELISA-Untersuchung untersuchten Serumproteine (SDF-1, MCP-1, VEGF, MPO) zeigten keinen mit den Ergebnissen der FACS-Messung und der Colony Assays korrelierenden Anstieg. Alle vier gemessenen Serumproteine befanden sich zu allen Abnahmezeitpunkten im Referenzbereich.

Die an der Mobilisierung der CD133⁺/CD45⁺ Zellen beteiligten Zytokine bzw. Serumproteine bleiben somit Gegenstand zukünftiger Forschung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine Implantation eines Vorhofseptum-Okkluders eine Mobilisierung von CD133⁺/CD45⁺ hämatopoetischen Progenitorzellen mit vornehmlich erythrozytärem und granulozytärem Differenzierungspotential 24 Stunden postinterventionell induziert. Diesen Rückschluss lässt die zeitgleiche Mobilisierung der CFUs ebenfalls zum Zeitpunkt b zu (Anstieg der CFU-E-Nest Kolonien und CFU-G-Kolonien). Darüber hinaus scheint bereits das Vorliegen eines offenen Foramen ovale mit einer erhöhten Freisetzung CD133⁺/CD45⁺ hämatopoetischer Progenitorzellen einherzugehen. Diese CD133⁺/CD145⁺-positiven Zellen fallen im Verlauf ab. Das kann ein Ausdruck des fehlenden Shunts nach der Okkluderimplantation sein.

7.Literaturverzeichnis

- 1 Bailey, A. S.; Jiang, S.; Afentoulis, M.; Baumann, C. I.; Schroeder, D. A.; Olson, S. B.; Wong, M. H.; Fleming, W. H. (2004). Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* 103, 13-19. (39)
- 2 Berger, F.; Ewert, P.; Stiller, B.; Dähnert, I.; Krings, G.; Vogel, M.; Lange, P.E. (1998) Initial klinische Ergebnisse mit dem Amplatzer Septal Occluder – ein selbstzentrierender Doppelschirm zum Verschluss von Vorhofseptumdefekten. *Zeitschrift für Kardiologie* 87, 185-190. (7)
- 3 Bouvier CA, Gaynor E, Cintron JR, Bernhardt B, Spaet TH. 1970. Circulating endothelium as an indication of vascular injury. *Thromb Diath Haemorrh Suppl.* 40: 163-168.
- 4 Buemi, M.; Allegra, A.; D'Anna, R.; Coppolino, G.; Crasci, E.; Giordano, D.; Loddo, S.; Cucinotta, M.; Musolino, C.; Teti, D. (2007). Concentration of circulating endothelial progenitor cells (EPC) in normal pregnancy and in pregnant women with diabetes and hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 196, 68 e1-6. (137)
- 5 Dreger, P.; Schmitz, N. (2004). Hämatopoetische Organe. In: *Transfusionsmedizin: Grundlagen-Therapie-Methodik.* Müller-Eckhardt, C.; Kiefel, V. Springer, Berlin, 21-23
- 6 Droste, D. W.; Freund, M.; Wichter, T. (2002). Paradoxe Hirnembolien als Ursache des Schlaganfalls. *Dtsch Arztebl* 99, 282-291. (108)
- 7 Du, Z. D.; Koenig, P.; Cao, Q. L.; Waight, D.; Heitschmidt, M.; Hijazi, Z. M. (2002). Comparison of transcatheter closure of secundum atrial septal defect using the Amplatzer septal occluder associated with deficient versus sufficient rims. *Am J Cardiol* 90, 865-869. (4)
- 8 Earing, M. G.; Cabalka, A. K.; Seward, J. B.; Bruce, C. J.; Reeder, G. S.; Hagler, D. J. (2004). Intracardiac echocardiographic guidance during transcatheter device closure of atrial septal defect and patent foramen ovale. *Mayo Clin Proc* 79, 24-34. (4)
- 9 Engelhardt, M.; Deschler, B.; Müller, C. I.; Lübbert, M. (2003). Plastizität adulter Stammzellen: Wunschtraum oder Realität?. *Deutsches Ärzteblatt* 49, 3236-3244.
- 10 Ewert, P.; (2003) Interventioneller Verschluss von Vorhofdefekten: Besondere Indikationen und neue therapeutische Strategien. *Habilitationsschrift für das Fach Pädiatrie.* Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität Berlin. www.edoc.hu-berlin.de/habilitationen/ewert-peter-2003-07-17/HTML/chapter1.html
- 11 Ewert, P.; Kretschmar, O.; Nürnberg, J.; Nagdyman, N.; Lange, P. E. (2002). Prophylaktische "Konditionierung" des linken Ventrikels vor ASD-Verschluss bei Patienten jenseits des 60. Lebensjahres. *Z Kardiologie* 91, 235. (51)
- 12 Ferencz, C.; Rubin, J. D.; McCarter, R. J.; Brenner, J. I.; Neill, C. A.; Perry, L. W.; Hepner, S. I.; Downing, J. W. (1985). Congenital heart disease: prevalence at livebirth. The Baltimore-Washington Infant Study. *Am J Epidemiol* 121, 31-36. (52)
- 13 Fisher, D. C.; Fisher, E. A.; Budd, J. H.; Rosen, S. E.; Goldman, M. E. (1995). The incidence of patent foramen ovale in 1,000 consecutive patients. A contrast transesophageal echocardiography study. *Chest* 107, 1504-1509. (53)
- 14 Gehling, U. M.; Willems, M.; Dandri, M.; Petersen, J.; Berna, M.; Thill, M.; Wulf, T.; Muller, L.; Pollok, J. M.; Schlagner, K.; Faltz, C.; Hossfeld, D. K.; Rogiers, X. (2005). Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *Journal of Hepatology* 43, 845-853. (116)
- 15 Gehling, U.M.; Ergün, S.; Schumacher, U.; Wagener, C.; Pantel, K.; Otte, M.; Schuch, G.; Schafhausen, P.; Mende, T.; Kilic, N.; Kluge, K.; Schafer, B.; Hossfeld, D. K.; Fiedler, W. (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106-3112. (126)
- 16 George, J.; Goldstein, E.; Abashidze, S.; Deutsch, V.; Shmilovich, H.; Finkelstein, A.; Herz, I.; Miller, H.; Keren, G. (2004). Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J* 25, 1003-1008. (133)
- 17 Gervink, R.; Ordemann, M. (2007). Hightech fürs Herz, Weltraumprobtes Know-how im Klinikeinsatz. *Ignition*, 42-45.
- 18 Hattori, K.; Dias, S.; Heissig, B.; Hackett, N. R.; Lyden, D.; Tateno, M.; Hicklin, D. J.; Zhu, Z.; Witte, L.; Crystal, R. G.; Moore, M. A.; Rafii, S. (2001). Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 193, 1005-1014. (130)

- 19 Heissig, B.; Hattori, K.; Dias, S.; Friedrich, M.; Ferris, B.; Hackett, N. R.; Crystal, R. G.; Besmer, P.; Lyden, D.; Moore, M. A.; Werb, Z.; Rafii, S. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625-637. (134)
- 20 Hladovec J, Prerovsky I, Stanek V, Fabian J. 1978. Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klinische Wochenschrift*, 56:1033-1036.
- 21 King, T. D.; Mills, N. L. (1974). Nonoperative closure of atrial septal defects. *Surgery* 75, 383-388. (8)
- 22 King, T. D.; Thompson, S. L.; Steiner, C.; Mills, N. L. (1976). Secundum atrial septal defect. Nonoperative closure during cardiac catheterization. *Jama* 235, 2506-2509. (113)
- 23 Koestenbauer, S.; Zech, N.H.; Juch, H.; Vanderzwalmen, P.; Schoonjns, L.; Dohr, G. (2006). Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. *Am j of reproductive immunology* 55, 169-180. (25)
- 24 Kollet, O.; Shviti, S.; Chen, Y. Q.; Suriawinata, J.; Thung, S. N.; Dabeva, M. D.; Kahn, J.; Spiegel, A.; Dar, A.; Samira, S.; Goichberg, P.; Kalinkovich, A.; Arenzana-Seisdedos, F.; Nagler, A.; Hardan, I.; Revel, M.; Shafritz, D. A.; Lapidot, T. (2003). HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34C stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 112, 160-169. (119)
- 25 Körbling, M.; Estrov, Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?. *N Engl J Med* 349, 570-582. (16)
- 26 Krakau, I.; Lapp, H.; (2009). *Das Herzkatheterbuch: Diagnostik und interventionelle Kathetertechniken*, 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, 348
- 27 Krischenowski, D. (2008) Behandlung paradoxer Embolien bei offenem Foramen ovale (PFO) und Vorhofseptumdefekt (ASD) mittels Schirmverschluss. www.krischenowski.de/foramen-ovale/klinik2.htm
- 28 Lamy, C.; Giannesini, C.; Zuber, M.; Arquizan, C.; Meder, J. F.; Trystram, D.; Coste, J.; Mas, J. L. (2002). Clinical and imaging findings in cryptogenic stroke patients with and without patent foramen ovale: the PFO-ASA Study. *Atrial Septal Aneurysm. Stroke* 33, 706-711. (114)
- 29 Lange, R. (2006), *Herzchirurgie*. In: *Chirurgie*. Siewert, J. R.. 8. Auflage. Springer, Berlin, 396 – 398.
- 30 Lapidot, T.; Petit, I. (2002). Current understanding of stem cell mobilization: the role of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 30, 973-981. (131)
- 31 Lévesque, J. P.; Takamatsu, Y.; Nillson, S. K.; Haylock, D. N.; Simmons, P. J. (2001). Vascular cell adhesion molecule -1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony stimulating factor. *Blood* 98, 1289-1297. (128)
- 32 Lorenz, F. 2008, Anzahl CD34/CD133-positiver Zellen im peripheren Blut von Patienten mit Herzinsuffizienz unterschiedlicher Schweregrade, S.76
- 33 Mas, J. L.; Arquizan, C.; Lamy, C.; Zuber, M.; Cabanes, L.; Derumeaux, G.; Coste, J. (2001), Recurrent cerebrovascular events associated with patent foramen ovale, atrial septal aneurysm, or both. *N Engl J Med* 345, 1740-1746. (109)
- 34 Matsushima, T.; Larsen, C. G.; DuBois, G.; Oppenheim, J.J. (1989). Purification and characterisation of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* 169, 1485-1490. (120)
- 35 Mills, N. L.; King, T. D. (2003). Late follow-up of nonoperative closure of secundum atrial septal defects using the King-Mills double-umbrella device. *Am J Cardiol* 92, 353-355. (9)
- 36 Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. 1999. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*, 93 (9):2951-2958.
- 37 Nelken, N.A.; Coughlin, S.R.; Gordon, D.; Wilcox, J. (1991). Monocyte chemotactic protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88, 1121-1127.
- 38 Oliver, J. M.; Gallego, P.; Gonzalez, A.; Benito, F.; Mesa, J. M.; Sobrino, J. A. (2002). Predisposing conditions for atrial fibrillation in atrial septal defect with and without operative closure. *Am J Cardiol* 89, 39-43. (111)
- 39 Pannitteri, G.; Marino, B.; Campa, P. P.; Martucci, R.; Testa, U.; Peschle, C. (1997). Interleukins 6 and 8 as mediators of acute phase response in acute myocardial infarction. *Am J Card* 80, 622-625. (132)

- 40 Papayannopoulou T. (2004). Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 103, 1580-1585. (128)
- 41 Peichev, M.; Naiyer, A. J.; Pereira, D.; Zhu, Z.; Lane, W. J.; Williams, M.; Oz, M. C.; Hicklin, D. J.; Witte, L.; Moore, M. A.; Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34 (+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958. (125)
- 42 Peled, A.; Petit, I.; Kollet, O.; Magid, M.; Ponomaryov, T.; Byk, T.; Nagler, A.; Ben-Hur, H.; Many, A.; Shultz, L.; Lider, O.; Alon, R.; Zipori, D.; Lapidot, T. (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283, 845-848. (117)
- 43 Penther, P. (1994). Patent foramen ovale: an anatomical study. Apropos of 500 consecutive autopsies. *Arch Mal Coeur Vaiss* 87, 15-21. (54)
- 44 Rashkind, W. J. (1983). Transcatheter treatment of congenital heart disease. *Circulation* 67, 711-716
- 45 Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München
- 46 Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood* 90, 909-928. (122)
- 47 Sadler, T. W. (2003). Herz und Gefäße. In: Medizinische Embryologie, Sadler, T. W., 10. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, 205 – 206.
- 48 Sartipy, P.; Loskutoff, D.J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7265-7270. (123)
- 49 Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki KI, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. 2001. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103:2776-2779.
- 50 Sievert, H.; Römer, A.; Gilfrich, H.-J. (2004). Operative Verfahren auf dem Rückzug – Kathetertechniken zur Therapie der Herzinsuffizienz. *Kliniker* 33, 62-67. (11)
- 51 Spradling, A.; Drummond-Barbosa, D.; Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104. (13)
- 52 Suchon, E.; Pieculewicz, M.; Tracz, W.; Przewlocki, T.; Sadowski, J.; Podolec, P. (2009). Transcatheter closure as an alternative and equivalent method to the surgical treatment of atrial septal defect in adults: comparison of early and late results. *Med Sci Monit* 15, CR612-617. (136)
- 53 Takahashi, T.; Kalka, C.; Masuda, H.; Chen, D.; Silver, M.; Kearney, M.; Magner, M.; Isner, J. M.; Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine- induced mobilization of bone-marrowderived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 4, 434-438. (129)
- 54 Vogel, M.; Berger, F.; Kramer, A.; Alexi-Meskishvili, V.; Lange, P. E. (1999). Incidence of secondary pulmonary hypertension in adults with atrial septal or sinus venosus defects. *Heart* 82, 30-33. (112)
- 55 Wainstein, R. V.; Wainstein, M. V.; Ribeiro, J. P.; Dornelles, L. V.; Tozzati, P.; Ashton-Prolla, P.; Ewald, I. P.; Vietta G.; Polanczyk, C. A. (2010). Association between myeloperoxidase polymorphisms and its plasma levels with severity of coronary artery disease. *Clin Biochem.* 43, 57-62. (138)
- 56 Watt, F. M.; Hogan, B. L. (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287, 1427-1430. (14)
- 57 Winslow, T.; Kibiuk, L.; Duckwall, C. (2004). Adult Stem Cell Manipulation and Possible Clinical Perspectives. In: *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie* 3, Zech, N.H., 93.
- 58 Wojakowski, W.; Kucia, M.; Kaźmierski, M.; Ratajczak, M. Z.; Tendera, M. (2008). Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: relevant reparatory mechanism?. *Heart* 94, 27-33. (22)
- 59 Wormer, E. J.; (2003). Mehr Wissen über Stammzellen. Lingen Verlag.
- 60 Wright, D. E.; Bowman, E. P.; Wagers, A. J.; Butcher, E. C.; Weissman, I. L. (2002). Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med* 195, 1145-1154. (119)
- 61 Yin, A.H.; Miraglia, S.; Zanjani, E. D.; Almeida-Porada, G.; Ogawa, M.; Leary, A. G.; Olweus, J.; Kearney, J.; Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012. (124)

8. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Graphische Darstellung der drei unterschiedlichen Formen eines Vorhofseptumdefektes [26]	10
Abb.2: Freisetzen des Amplatzer Okkluders (Nitinoldrahtgeflecht mit Dacron-Patches) aus der Einführschleuse: Zur Freisetzung des Amplatzer Okkluders wird aus der Einführungsschleuse nacheinander der linksatriale Schirm (1 + 2), der Verbindungssteg (3), der mit dem ASD vollständig abschließt und der rechtsatriale Schirm (4 + 5) entwickelt. Abschließend wird das Einführungskabel von dem Schirm getrennt (6) [10].....	13
Abb.3: links: Darstellung des Verschlussimplantates (Cardia-PFO-Star-Occluder) zwischen den Vorhöfen mittels TEE, rechts: 29 Tage post implantationem [27] ..	13
Abb.4: Symmetrische und asymmetrische Zellteilung [23].....	14
Abb.5: Differenzierungsmöglichkeiten der embryonalen Stammzellen: ESC = embryonale Stammzelle; ICM Zelle = Inner cell mass; HSC = hämatopoetische Stammzelle; NSC = neuronale Stammzellen [23]	15
Abb.6: Differenzierungspotentiale von adulten Knochenmarkstammzellen. Neben der Hämatopoese besitzen sie möglicherweise das Potential, sich in verschiedene Zelltypen (Hepatozyten, Nervenzellen, Adipozyten, Osteozyten, Epithelzellen, Skelettmuskelzellen und Kardiomyozyten) auszdifferenzieren [57]	16
Abb.7: Schematische Darstellung der Hämatopoese (CFU-GEMM = Colony forming unite granulocyte, erythrocyte, macrophage, megacariocyte; BFU-E = Burst Forming Unit; CFU = Colony Forming Unit; Meg = Megaryozyt; E = Erythrozyt; G = Granulozyt; M = Monozyt; Eo = Eosinophiler Granulozyt, Baso = Basophiler Granulozyt; BL = B-Lymphozyt; TL = T-Lymphozyt; IL = Interleukin; GM-CSF = Granulozyten-, Makrophagen- Kolonie stimulierender Faktor; G-CSF = Granulozyten- Kolonie stimulierender Faktor; M-CSF = Makrophagen- Kolonie stimulierender Faktor ; TNF = Tumornekrosefaktor; IF = Interferon)	18
Abb.8: Differenzierung von hämatopoetischen und stromalen Stammzellen [57]	21
Abb.9: FACS Messung, eingegatete Zellen = Mononukleäre Zellen	28
Abb.10: Verlauf der relativen Expression (Mittelwert in Prozent) der oberflächenmarkierten Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe/ Okkluderpatienten (S). Der Standardfehler (SEM) ist in der Abb. auf Grund der Übersichtlichkeit nicht aufgeführt (siehe Tab. 17)	36

Abb.11: Verlauf der relativen Expression (Mittelwert in Prozent) der oberflächenmarkierten Zellen mit den Markerkombinationen CD133+/34+, CD133+/45+ und CD34+/45+ bezogen auf den Abnahmezeitpunkt von K1 (Kontrollgruppe 1) und K2 (Kontrollgruppe 2) und S (Studiengruppe). Signifikanter Unterschied K1 Termin a vs. K2 Termin a für die Marker CD133+/34+ ($p = 0,03$), CD34+/45+ ($p = 0,001$); signifikanter Unterschied für den Vergleich K1 Termin a vs. Studiengruppe Termin a ($p = 0,01$ für CD133+/34+; $p = 0,01$ für CD133+/45+; $p = 0,003$ für CD34+/45+) 37

Abb.12: Prozentuale Verteilung der in vitro generierten CFUs (Mittelwerte in Prozent mit Standardfehler) bezogen auf den Abnahmezeitpunkt a von K1, K2 und der Studiengruppe (S). Signifikanter Unterschied im statistischen Vergleich für K1 (Termin a) mit der Studiengruppe (Termin a) für CFU-GM ($p = 0,001$); signifikanter Unterschied im statistischen Vergleich für Termin K2 (Termin a) mit der Studiengruppe (Termin a) für CFU-G, CFU-G-Nest, CFU-GM (jeweils $p = 0,001$) und CFU-E-Nest ($p = 0,013$) 42

Abb.13: Prozentuale Verteilung der in vitro generierten CFUs (Mittelwerte in Prozent mit Standardfehler) bezogen auf den Abnahmezeitpunkt b von K2 und der Studiengruppe (S). Signifikanter Unterschied im statistischen Vergleich für Termin K2 (Termin b) mit der Studiengruppe (Termin b) für CFU-G, CFU-G-Nest, CFU-GM, und CFU-E-Nest (jeweils $p = 0,001$); 42

Abb.14: Verlauf des relativen Wachstums (Mittelwert in Prozent mit Standardfehler) der CFUs bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe (S)..... 43

Abb.15: CFU-G (links, Vergrößerung 4-fach; rechts, Vergrößerung 10-fach) (CFU-G = Colony Forming Unit-Granulocyte)..... 43

Abb.16: CFU-E-Nest (links, Vergrößerung 10-fach) CFU-GM (rechts, Vergrößerung 10-fach); (CFU-E-Nest = Colony Forming Unit-Erythrocyte-Nest); (CFU-GM = Colony Forming Unit-Granulocyte Monocyte) 43

9. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Übersicht der ASD-Typen.....	9
Tab.2: Indikation und Kontraindikation der Okkluderimplantation [7, 8, 26]	13
Tab.3: Totipotenz, Pluripotenz, Multipotenz von Stammzellen (SZ = Stammzellen; ESC = embryonale Stammzelle; EG = embryonale Keimzelle) [9]	15
Tab.4: Übersicht beteiligter Wachstumsfaktoren der Hämatopoese	19
Tab.5: Patientenevaluation der Okkluderpatienten.....	25
Tab.6: Blutabnahmeprotokoll.....	26
Tab.7: Verwendete Lösungen.....	28
Tab.8: Verwendete Geräte	28
Tab.9: Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie	29
Tab.10: sonstige Materialien.....	29
Tab.11: Verwendete Geräte	31
Tab.12: Verwendete Materialien	31
Tab.13: Verwendete Antikörper für die ELISAs	33
Tab.14: Verwendete Geräte	33
Tab.15: Sonstige für die ELISAs verwendete Materialien	33
Tab.16: Blutabnahmeprotokoll.....	36
Tab.17: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der oberflächenmarkierten Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Kontrollgruppen und des Okkluderpatientenkollektivs. K1 = Kontrollgruppe 1 (gesunde Patienten); K2 = Kontrollgruppe 2 (PTCA Patienten); MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean	36
Tab.18: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der CD133 ⁺ /CD34 ⁺ und CD133 ⁺ /CD34 ⁻ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean	38

Tab.19: Verlauf der relativen Expression (Mittelwert in Prozent) der CD133 ⁺ /CD45 ⁺ und CD133 ⁺ /CD45 ⁻ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean	38
Tab.20: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der CD133 ⁺ /CD34 ⁺ und CD133 ⁻ /CD34 ⁺ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean	39
Tab.21: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der CD34 ⁺ /CD45 ⁺ und CD34 ⁺ /CD45 ⁻ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean	39
Tab.22: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der CD133 ⁺ /CD45 ⁺ und CD133 ⁻ /CD45 ⁺ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean	40
Tab.23: relative Expression (Mittelwerte in Prozent) der CD34 ⁺ /CD45 ⁺ und CD34 ⁻ /CD45 ⁺ Zellen bezogen auf den Abnahmezeitpunkt der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean	40
Tab.24: Anzahl in vitro generierter CFUs (Mittelwerte in Prozent) bezogen auf den Abnahmezeitpunkt von K1, K2 und der Studiengruppe; MW = Mittelwert. SEM = Standard Error of the Mean	41
Tab.25: Verlauf der Serumkonzentrationen von MCP-1, VEGF, SDF-1 gemessen in pg/μl; MPO gemessen in ng/μl bezogen auf den Abnahmezeitpunkt von K1, K2 und der Studiengruppe. MW = Mittelwert; SEM = Standard Error of the Mean	45

10. Anhang

10.1 Materialien für ELISA

10.1.1 MCP-1

Reagenzien und Materialien	Hersteller
MCP-1 Microplate - 96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a mouse monoclonal antibody against human MCP-1.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
MCP-1 Conjugate - 21 ml/vial of polyclonal antibody against MCP-1 conjugated to horseradish peroxidase, with preservatives.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
MCP-1 Standard - 10 ng/vial of recombinant human MCP-1 in a buffered protein base with preservatives, lyophilized.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Assay Diluent RD1-83 - 11 ml of a buffered protein base with preservatives. For serum/plasma samples.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Calibrator Diluent RD5L Concentrate - 21 ml/vial of a concentrated buffered protein base with preservatives. For cell culture supernate/urine samples.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Calibrator Diluent RD6Q - 21 ml/vial of animal serum with preservatives. For serum/plasma samples.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Wash Buffer Concentrate - 21 ml/vial of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservatives.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Color Reagent A -12.5 ml/vial of stabilized hydrogen peroxide.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Color Reagent B -12.5 ml/vial of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Stop Solution - 6 ml/vial of 2 N sulfuric acid.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Plate Covers - Adhesive strips.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

10.1.2 SDF-1

Reagenzien und Materialien	Hersteller
SDF-1_ Microplate - 96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a mouse monoclonal antibody against SDF-1_.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
SDF-1_ Conjugate - 21 ml/vial of a polyclonal antibody against SDF-1_ conjugated to horseradish peroxidase with preservatives.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
SDF-1_ Standard -100 ng/vial of recombinant human SDF-1_ in a buffered protein base with preservatives, lyophilized.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Assay Diluent RD1-55 - 11 ml/vial of a buffered protein base with blue dye and preservatives.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Calibrator Diluent RD6Q - 21 ml/vial of animal serum with preservatives.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Wash Buffer Concentrate - 21 mL/vial of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservatives.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Color Reagent A - 12.5 ml/vial of stabilized hydrogen peroxide.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Color Reagent B - 12.5 ml/vial of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Stop Solution - 6 ml/vial of 2 N sulfuric acid.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Plate Covers - Adhesive strips.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

10.1.3 VEGF

Reagenzien und Materialien	Hersteller
VEGF Microplate - 96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a mouse monoclonal antibody against VEGF.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
VEGF Conjugate - 21 ml/vial of polyclonal antibody against VEGF conjugated to horseradish peroxidase with preservatives.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
VEGF Standard - 2000 pg/vial of recombinant VEGF165 in a buffered protein base with preservatives, lyophilized.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Assay Diluent RD1W - 11 ml/vial of a buffered protein base with preservatives.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Calibrator Diluent RD5K - 21 ml/vial of a buffered protein base with preservatives. For cell culture supernate samples.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Calibrator Diluent RD6U - 21 ml/vial of animal serum with preservatives. For serum/plasma samples.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Wash Buffer Concentrate - 21 ml/vial of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservatives.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Color Reagent A - 12.5 ml/vial of stabilized hydrogen peroxide.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Color Reagent B - 12.5 ml/vial of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Stop Solution - 6 ml/vial of 2 N sulfuric acid.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Plate Covers - Adhesive strips.	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

10.1.4 MPO

10.1.5 Mann-Withney-U-Test der FACS-Messungen

Mann-Withney-U-Test									
	133+/34+	133+/34-	133-/34+	133+/45+	133+/45-	133-/45+	34+/45+	34+/45-	34-/45+
K1a vs K1b	0,10	0,63	0,20	0,97	0,94	0,90	1,00	1,00	0,31
K2a vs K2b	0,24	0,26	0,82	0,88	0,62	0,16	0,02	0,54	1,00
Sa vs Sb	0,15	0,68	0,68	0,01	0,15	0,38	0,37	0,75	0,59
Sa vs Sc	0,34	0,92	0,08	1,00	0,34	0,70	0,94	0,83	0,75
Sa vs Sd	0,09	0,43	0,56	0,29	0,37	0,19	0,20	0,51	0,29
Sa vs Se	0,04	0,15	0,72	0,05	0,15	0,06	0,35	0,09	0,28
Sb vs Sc	0,02	0,44	0,02	0,34	0,70	0,39	0,28	0,96	0,81
Sb vs Sd	0,63	0,60	0,26	0,72	0,67	0,51	0,57	0,66	0,40
Sb vs Se	0,37	0,27	1,00	0,69	0,95	0,23	0,71	0,10	0,38
Sc vs Sd	0,01	0,27	0,12	0,29	0,96	0,25	0,21	0,70	0,36
Sc vs Se	0,01	0,10	0,04	0,04	0,72	0,03	0,30	0,20	0,37
Sd vs Se	0,57	0,71	0,33	0,54	0,74	0,60	0,64	0,27	0,80
K1a vs Sa	0,02	0,25	0,35	0,01	0,67	0,05	0,00	0,34	0,07
K1b vs Sb	0,50	0,79	0,93	0,07	0,12	0,12	0,02	0,26	0,93
K1a vs Sb	0,14	0,48	0,46	0,08	0,13	0,24	0,00	0,22	0,06
K2a vs Sa	0,51	0,90	0,46	0,04	0,42	0,17	0,76	0,95	0,01
K2b vs Sb	0,63	0,33	0,03	0,32	0,28	0,08	0,39	0,66	0,14

10.1.6 Mann-Whitney-U-Test der Colony Assays-Messungen

Mann-Whitney-U-Test						
	CFU-G	CFU-G-Nest	CFU-M	CFU-GM	CFU-E	CFU-E-Nest
K1a vs K1b	0,354	0,066	0,826	0,517	0,029	0,157
K2a vs K2b	0,183	0,208	0,683	0,935	0,589	0,073
Sa vs Sb	0,068	0,448	0,456	0,513	0,562	0,139
Sa vs Sc	0,840	0,551	0,122	0,042	0,305	1,000
Sa vs Sd	0,741	0,610	0,208	0,896	0,377	0,651
Sb vs Sc	0,123	0,288	0,212	0,080	0,540	0,119
Sb vs Sd	0,261	0,357	0,761	0,291	0,540	0,291
Sc vs Sd	0,695	0,885	0,464	0,121	0,754	0,631
K1a vs Sa	0,139	0,166	0,876	0,010	0,265	0,673
K1b vs Sb	0,031	0,001	0,511	0,037	0,327	0,007
K1a vs Sb	0,047	0,074	0,500	0,028	0,111	0,041
K2a vs Sa	0,001	0,001	0,299	0,001	0,326	0,013
K2b vs Sb	0,001	0,001	0,081	0,001	0,090	0,001

10.1.7 Mann-Whitney-U-Test der ELISA Messungen

Mann-Whitney-U-Test				
	MCP-1	VEGF	SDF-1	MPO
K1a vs Sa	0,02	0,89	0,87	0,48
K1a vs Sb	0,02	0,11	0,46	0,18
K1a vs Sc	0,00	0,23	0,48	0,34
K1a vs Sd	0,01	0,54	0,13	0,40
K1a vs Se	0,01	0,11	0,04	0,27
Sa vs Sb	0,55	0,04	0,41	0,22
Sa vs Sc	0,51	0,12	0,43	0,35
Sa vs Sd	0,95	0,39	0,16	0,63
Sa vs Se	0,93	0,04	0,06	0,23
K1a vs K2a	0,06	0,20	0,23	0,82

11. Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. med. Ursula Gehling, die auf so überraschende Art und viel zu früh verstorben ist. Auch über die Zusammenarbeit während dieser Dissertation hinaus hatte ich die Gelegenheit, sie als einen sehr ehrlichen, interessierten und engagierten sowie überaus hilfsbereiten Menschen kennenzulernen, der nun nicht nur für Ihre Familie und Freunde eine große Lücke hinterlässt.

Ohne ihre klare Strukturierung des Themas und stete Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und Fragen wäre diese Studie nicht möglich gewesen. Die enge und kollegiale Zusammenarbeit sowie gute Betreuung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Stephan Baldus, dem stellv. Direktor und leitenden Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie am Universitären Herzzentrum Hamburg, für die Möglichkeit diese Arbeit mit seiner Unterstützung durchführen zu können.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. med. Sara Sheikhzadeh, Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie am Universitären Herzzentrum Hamburg, die mich in großem Umfang bei der praktisch-experimentellen Durchführung als auch bei der theoretischen Ausarbeitung des Themas unterstützt hat.

Allen Laborkollegen der Experimentellen Kardiologie möchte ich herzlich für das angenehme Arbeitsklima und die praktische Unterstützung danken, insbesondere Herrn Hartwig Wieboldt für die Fertigstellung der ELISA.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Benedikt große Darrelmann, der mir von Beginn bis Ende der Arbeit nicht nur emotional unterstützend und in Bezug auf alle erdenklichen Computerprobleme zur Seite stand, sondern mit seiner Motivation maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein großes Dankeschön möchte ich an meine Eltern richten, die mich während der gesamten Zeit meines Studiums mit all ihrer Kraft unterstützt haben und ohne die diese Arbeit niemals hätte entstehen können.

Eidesstattliche Versicherung:

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 (Ausgabe 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 Prüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Michèle Ohland