

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik III für Innere Medizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. E. Erdmann

**Unterschiedlicher Anstieg von CD34, KDR/CD34,
CD133/CD34 und CD117/CD34 positiven Zellen im
peripheren Blut von Patienten mit akutem Myokardinfarkt**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Franziska Grundmann
aus Hamburg

Promoviert am 03. September 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

2009

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. J. Müller-Ehmsen

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen von anderen Personen erhalten. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 08.05.09

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Privatdozent Dr. Müller-Ehmsen und Frau K. Schenk von mir selbst ausgeführt worden.

Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. E. Erdmann danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik unter der Betreuung von Herrn Professor R. Schwinger und Herrn Privatdozent Dr. med. J. Müller-Ehmsen durchführen zu können.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Privatdozent Dr. med. Müller-Ehmsen für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit. Seine geduldige Anleitung und freundschaftliche Führung waren für mich die wichtigste Unterstützung.

Bei Herrn Privatdozent Dr. med. Scheid bedanke ich mich für die Zusammenarbeit und Unterstützung im Rahmen des Projektes, für die Möglichkeit in seinem Labor Teile der Experimente durchzuführen, sowie die anregenden und fruchtbaren Diskussionen.

Meinen Kollegen aus dem Labor für Herzmuskelphysiologie und Molekulare Kardiologie, insbesondere Frau K. Schenk, Herrn B. Krausgrill und Frau D. Braun danke ich für Rat, Hilfe und Unterstützung sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Meinen Freunden, allen voran Frau L. Zobel danke ich für die Unterstützung während der Studienzeit und während der Durchführung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meinen Eltern Gudrun und Ulrich Grundmann danke ich für die Ermöglichung dieses Studiums, sowie für ihre liebevolle Unterstützung in all den Jahren. Meinem Bruder Dr. med. Sebastian Grundmann gebührt besonderer Dank für sein Vertrauen in mich, sowie für die Hilfe und den Rat in zahlreichen Situationen.

Meinen Eltern und meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 EPIDEMIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DES AKUTEN MYOKARDINFARKTES...	1
1.2 AKTUELLE THERAPIE UND IHRE GRENZEN	1
1.3 PROGENITORZELLEN - EINE NEUE THERAPIEOPTION?.....	2
1.3.1 Entdeckung, Charakterisierung und Phänotyp der endothelialen Progenitorzelle	2
1.3.2 Beeinflussung der Zahl und Funktion der EPC durch kardiovaskuläre Risikofaktoren und Erkrankungen	4
1.3.3 Präklinische und klinische Studien.....	6
2 ZIEL DER UNTERSUCHUNG.....	8
3 MANUSKRIFT „DIFFERENTIAL INCREASE OF CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 AND CD117/CD34 POSITIVE CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION“	9
4 DISKUSSION.....	17
4.1 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	17
4.2 SCHLUSSFOLGERUNG	23
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	23
6 LITERATURVERZEICHNIS	25
7 LEBENS LAUF	35

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes

Gemäß den Zahlen des Statistischen Bundesamtes Deutschland bilden die kardiovaskulären Erkrankungen die häufigsten Todesursachen. Allen voran ist hier die chronisch ischämische Herzerkrankung zu nennen (9,3% aller Sterbefälle). Es folgen der akute Myokardinfarkt (AMI, 7% aller Sterbefälle) sowie die Herzinsuffizienz (6% aller Sterbefälle) (für das Jahr 2007, Statistisches Bundesamt).

Die Entstehung und die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen haben eine Vielzahl von aufeinander folgenden Ereignissen als Ursache. Das Bestehen von Risikofaktoren wie z.B. Fettstoffwechselstörungen, Hypertonie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus sind initiale Faktoren, welche zur Entstehung von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose beitragen. Die Progression zur klinisch bedeutsamen koronaren Herzkrankheit hat eine Ischämie des Herzmuskels zur Folge und kann zu einem Myokardinfarkt führen. Durch die verbesserte Therapie ist die Sterblichkeit nach akutem Myokardinfarkt gesunken, so dass in der Folge immer mehr Patienten nach den komplexen Remodellingvorgängen an einer linksventrikulären Dilatation und an Herzinsuffizienz leiden.

1.2 Aktuelle Therapie und ihre Grenzen

Die aktuelle Therapie der koronaren Herzerkrankung hat zum Ziel, die Risikofaktoren für ein kardiovaskuläres Ereignis zu reduzieren (Gewichtsabnahme, körperliches Training, Nikotinabstinenz, gute Einstellungen von Diabetes mellitus) und unmittelbar das Risiko eines Myokardinfarktes zu reduzieren. Zum Einsatz kommen hier Acetylsalicylsäure, Betablocker, und Statine. Interventionell stehen perkutane Angioplastie (PTCA), Stenting und aortokoronare Bypass-Operationen zur Verfügung, um die Perfusionsbedingungen des Herzens zu verbessern.

Beim akuten Myokardinfarkt steht die mechanische Revaskularisierung eindeutig im Vordergrund, unterstützt durch Thrombozytenaggregationshemmer, (Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten), Antikoagulation und allgemeine Maßnahmen (O₂-Zufuhr, Sedierung). Durch eine rasche Wiedereröffnung des Gefäßes

kann verhindert werden, dass das abhängige Myokardgewebe vollständig nekrotisiert, wodurch Teile der Myokardfunktion erhalten werden können. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es jedoch keine etablierte Therapieoption, durch die die Regeneration des Herzmuskels nach Myokardinfarkt verbessert und bereits untergegangenes Herzmuskelgewebe revitalisiert würde, oder durch die eine Unterstützung bzw. Induktion der Gefäßregeneration und damit eine Verbesserung der Myokardperfusion erreicht werden könnte.

Genau dieser Therapieansatz ist Gegenstand der aktuellen Forschungen der Zellersatztherapie, bei der exogen zugeführte Zellen die Reparaturvorgänge unterstützen sollen. Zusätzlich finden vermehrt Untersuchungen zu körpereigenen Regenerationsvorgängen statt, um die Effektivität einer möglichen Zellersatztherapie zu steigern oder durch Induktion endogener Vorgänge die natürlich ablaufenden Regenerationsvorgänge nach Myokardinfarkt zu unterstützen.

1.3 Progenitorzellen - Eine neue Therapieoption?

1.3.1 Entdeckung, Charakterisierung und Phänotyp der endothelialen Progenitorzelle

Die Proliferation und Migration benachbarter Endothelzellen bei Zelluntergang innerhalb eines Gefäßes spielt bei der Regeneration des Endothels eine seit langem bekannte Rolle. Da das Proliferations- und somit Regenerationspotential reifer Endothelzellen stark limitiert zu sein scheint, wurde eine weitere Quelle der Regeneration postuliert [10]. Während der Embryogenese findet eine, sowohl regional als auch funktionell, enge Entwicklung von peripherem Blut und Gefäßwandstrukturen statt, welche die Existenz einer gemeinsamen Vorläuferzelle, dem sogenannten Hämangioblast, nahelegte. Im Jahr 1997 beschrieben Asahara und Kollegen erstmals zirkulierende Angioblasten im peripheren Blut des Menschen [3]. Andere Gruppen bestätigten die Existenz von „circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells“ [67] und lieferten Beweise für eine starke Interrelation zwischen Hämatopoese und Vaskulogenese bzw. Angiogenese [50].

Die so genannten Endothelialen Progenitorzellen (EPC) exprimieren CD34, ein Oberflächenantigen hämatopoetischer Stammzellen sowie den Leukozytenmarker CD45, und können *in vitro* einen endothelialen Phänotyp ausbilden [3, 30]. Sie sind an

Fibronektin adhären und zeigen die endotheltypische Aufnahme von acetyliertem LDL-Cholesterin sowie die Bindung von Ulex-Lektin [37, 76]. Darüber hinaus haben sie in Kultur das Potential zur Migration, zur Proliferation (Formation solitärer Kolonien) und zur Bildung von retikulären und tubulären Strukturen im Sinne einer primitiven Angiogenese [2, 53].

In vivo konnte gezeigt werden, dass diese so genannten endothelialen Progenitorzellen (EPC) zur Neoangiogenese nach Gewebeischämie beitragen können [2], und dass diese Zellen an der Endothelialisierung von Gefäßprothesen beteiligt sind [67].

Asahara et al. benutzten einen polyklonalen Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne des VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2) um zu zeigen, dass CD34+ und VEGFR-2+ zirkulierende EPC Kolonien formen und acetyliertes LDL aufnehmen. Bei der Injektion von CD34+, VEGFR-2+, CD34-, oder VEGFR-2 negativen Zellen in Kleintiere, bei welchen durch das Verursachen von Ischämie Neovaskularisation induziert wurde, inkorporierten vorwiegend die CD34+ und VEGFR-2+ Zellen in die vaskulären Strukturen: ein weiterer Hinweis dafür, dass diese Zellen Vorläufer von Endothelien sind.

Ein weiterer Stammzell-Marker, CD133 (=AC133), ein transmembranäres Glykoprotein mit 5 Domänen, dessen Funktion unbekannt ist, wird ebenfalls von bestimmten EPC exprimiert, jedoch nicht auf reifen endothelialen Zellen [87]. Bei der Reifung und Differenzierung von Endothelialen Progenitorzellen wird die CD133 Expression rasch herunter reguliert [46, 87]. Gehling und Kollegen [18] zeigten, dass durch G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) in das periphere Blut mobilisierte CD133+ Zellen bei der Kultivierung in Anwesenheit von VEGF (vascular endothelial growth factor) und SCF (stem cell factor) in endotheliale Zellen differenzierten. Phänotypisch zeigen diese Zellen endotheliale Eigenschaften, inklusive der Expression von VEGFR-2, Tie-2, und von Willebrand factor (vWF).

Peichev et al. [53] konnten zeigen, dass eine kleine Gruppe der CD34+ Zellen sowohl AC133, als auch VEGFR-2 exprimierten. Wurden diese Zellen mit VEGF, FGF-2 (fibroblast growth factor-2) und Kollagen inkubiert, resultierte dies in der Proliferation und Differenzierung der Zellen in AC133-, VEGFR-2+ reife endotheliale Zellen.

Hämangioblasten exprimieren außerdem das Protoonkogen CD117 [34, 52], welches für eine Rezeptor-Tyrosinkinase kodiert und eine wichtige Rolle für die Gametogenese, Melanogenese und Hämatopoese spielt [7]. Endotheliale Progenitorzellen exprimieren CD117 bis in die reifen Stadien hinein [58]. Die Forschungsgruppe um Li untersuchte

Zellen, welche eben diesen Marker exprimierten, und konnte zeigen, dass CD117+ Zellen *in vitro* innerhalb von 14 Tagen in Kultur in endotheliale Zellen differenzierten. *In vivo* zeigten die Zellen nach Implantation in ischämische Hinterläufe von Mäusen eine Inkorporation in kleine Gefäße, so dass auch hier eine Rolle in der Angiogenese angenommen werden muss [41]. Schließlich scheinen auch monozytäre, CD14+ Zellen eine Quelle für Endotheliale Progenitorzellen zu sein [59, 79] und *in vitro* tubuläre Strukturen ausbilden [64].

Diese vielfältigen Beobachtungen zeigen, dass der genaue Phänotyp der Endothelialen Progenitorzellen, ebenso wie ihr Ursprung und ihre komplexen funktionellen Eigenschaften weiterhin nicht vollständig geklärt sind. Vielmehr scheinen die unterschiedlichen exprimierten Oberflächenmarker einen Reifungsprozess widerzuspiegeln [26]. Die Mobilisierung der unreifen, noch CD117+ Zellen aus dem Verband der Knochenmarkszellen erfolgt durch die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase-9 und mit Beteiligung des Wachstumsfaktors SCF (stem cell factor), dessen Rezeptor die Tyrosinkinase CD117 bildet [23]. Zu diesem Zeitpunkt tragen die Zellen neben dem endothelialen Marker KDR/VEGFR-2 das CD34 und das CD133 Oberflächenmolekül. Während der Migration in die Blutbahn und im Verlauf der weiteren Zirkulation schreitet der Differenzierungsprozess der EPC weiter voran, und mit ihm kommt es zum Verlust von CD133 und der zunehmenden Expression von endothelialen Oberflächenmarkern, wie beispielsweise vascular endothelial (VE)-cadherin, von Willebrand factor, endothelialer Stickoxidsynthase, CD146, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) und E-Selektin [36, 57]. Letztendlich kommt es zur Integration der Zellen ins Gefäßendothel [26], wobei einen maßgeblichen Einfluss auf die endgültige Differenzierungsrichtung der Zellen offenbar die lokalen Umgebungsbedingungen haben. So können Monozyten, aber auch CD34 positive Zellen *in vitro* je nach Mediumkonditionen und vorhandenen Wachstumsfaktoren zu endothelialen Zellen, zu Makrophagen und dendritischen Zellen [79], aber auch zu glatten Muskelzellen [61] differenzieren.

1.3.2 Beeinflussung der Zahl und Funktion der EPC durch kardiovaskuläre Risikofaktoren und Erkrankungen

Trotz der sehr unterschiedlichen Methoden, mit denen der Einfluss von kardiovaskulären Risikofaktoren oder bereits manifester kardiovaskulärer Erkrankungen auf EPC untersucht

wurde, zeigen sich generell immer wieder zwei Muster: (1) Die EPC sind bei Patienten mit chronischen vaskulären Erkrankungen oder Risikofaktoren depletiert, und (2) ihre Anzahl ist als Antwort auf eine akute Schädigung erhöht.

Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (KHK) ist die Anzahl der EPC erniedrigt, und auch nach Korrektur für die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, Hypertonie, Diabetes, Rauchen, familiäre Disposition und LDL Cholesterinlevel, repräsentiert diese reduzierte EPC-Anzahl ein erhöhtes Risiko für Arteriosklerose [81]. Es besteht eine starke Korrelation zwischen der Anzahl der zirkulierenden EPC und dem kombinierten Framingham-Risiko-Score für Arteriosklerose [25], ebenso wie es bei Übergewicht zu einer – durch Gewichtsreduktion teils reversiblen – Reduktion der Anzahl der zirkulierenden Vorläuferzellen kommt [47]. Sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen konnte außerdem eine reduzierte funktionelle Aktivität von EPC bei Diabetes nachgewiesen werden [42, 74, 76]. Letztendlich müssen niedrige EPC-Spiegel im peripheren Blut als unabhängiger Prädiktor für ein schlechteres Überleben gesehen werden [65, 83].

Andererseits können Faktoren, welche das kardiovaskuläre Risiko senken, wie z.B. Östrogen [27-29], Statintherapie [80, 82] oder körperliche Betätigung [40] die EPC-Level im peripheren Blut anheben oder die Seneszenz der Zellen reduzieren. Dem Knochenmark entsprungene EPC konnten in verschiedenen Orten der Neovaskularisation während der Wundheilung, beim Tumorwachstum, sowie in ischämischem Skelettmuskel oder ischämischem Herzmuskel gefunden werden [2, 32]. Ähnliche EPC-Inkorporation wurde nach östrogeninduzierter Ovulation während der Neovaskularisation des Endometriums gezeigt [2]. Diese Beobachtungen legten die Hypothese nahe, dass EPC aus dem Knochenmark als physiologische Antwort auf eine notwendige Neovaskularisation in das periphere Blut entlassen werden, und sie dann zur Blutgefäßformation beitragen. Dass bei akuter vaskulärer Schädigung im Gegensatz zu den chronischen Krankheitszuständen und Schädigungsmustern EPC aus dem Knochenmark mobilisiert werden können, wurde in verschiedensten Untersuchungen gezeigt: Durch Verbrennung oder chirurgische Manipulation induzierte Gefäßverletzungen resultieren in der Freisetzung von VEGF und SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) und konsekutiv in einem Anstieg der CD133/VEGFR-2 positiven EPC [4, 19]. Die lokalen Konzentrationen von VEGF und SDF-1 sind an ischämischen Foci erhöht und fördern die Rekrutierung von EPC aus der Zirkulation an die Orte der Ischämie [11, 17]. Ebenso können Zytokine wie G-CSF

(Granulocyte-colony stimulating factor) und GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) zur Mobilisation von EPC und somit zur Unterstützung der Organregeneration beitragen [4, 73]. Bei Patienten mit Myokardinfarkt steigt die Anzahl der zirkulierenden EPC in der Akutphase parallel mit VEGF an [45, 68].

1.3.3 Präklinische und klinische Studien

Viele präklinische Studien konnten den therapeutischen Nutzen von EPC bei ischämischen Erkrankungen oder Gefäßschädigung am Tiermodell zeigen [2, 31, 35]. Die direkte Kontribution der EPC zum Gefäß im Sinne einer Inkorporation in das Endothel betrug je nach Modell oder Krankheit 1 bis 25 Prozent [51]. Zusätzlich zeigte sich in den Untersuchungen jedoch auch die Gefäßdicke erhöht. Dies spricht für die Tatsache, dass inkorporierte Progenitorzellen auch Wachstumsfaktoren freisetzen, welche auf parakrinem Wege die lokale Angiogenese fördern, gewebeständige Vorläuferzellen mobilisieren und/oder das Überleben der Zellen des Empfängers verbessern, also die Voraussetzungen für eine schnelle Revaskularisation, Proliferation und verbessertes Zellüberleben schaffen [39].

Aufgrund der Hinweise, dass Knochenmarkszellen möglicherweise durch Stimulation der Angiogenese und Verbesserung der Erholung ischämischen Gewebes an endogenen Reparaturmechanismen des Herzens beteiligt sind [32, 49, 68], und der zudem leichten Gewinnung der Zellen durch Knochenmarkspunktion wurden sehr rasch auch klinische Studien zur Therapie des Myokardinfarktes mit Knochenmarkszellen begonnen. Mehrere Phase-I-Studien mit Transplantation von mononukleären Knochenmarkszellen zur Behandlung von Myokardinfarkt, peripherer arterieller Verschlusskrankheit (= pAVK) KHK oder Herzinsuffizienz, welche die Machbarkeit und Sicherheit der Transplantationen zeigten, wurden durchgeführt [15, 21, 33, 54, 69, 71, 78].

In der TOPCARE-AMI (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction Trial) [62], wurden *ex vivo* expandierte mononukleäre Knochenmarkszellen oder aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes gewonnene und in Kultur angereicherte EPC bei einer randomisierten Gruppe von 20 Patienten mit akutem Myokardinfarkt intrakoronar appliziert. Die finalen 1-Jahres-Nachbeobachtungsergebnisse bestätigten die bereits nach 4 Monaten festgestellte Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion ebenso wie die Reduktion des endsystolischen Volumens und die Verkleinerung der dysfunktionellen Myokardareale bei

den mit Zellen behandelten Patienten, wobei die Verbesserung mit der Migrationskapazität der Zellen zu korrelieren scheint [6].

Die randomisierte und kontrollierte BOOST-Studie (Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration Trial) [85] evaluierte die therapeutischen Effekte von Knochenmarkszelltransfer bei 60 Patienten mit Myokardinfarkt, bei denen eine perkutane Koronarintervention durchgeführt wurde. In den Untersuchungen nach 6 Monaten zeigte sich zunächst eine Verbesserung der Ejektionsfraktion und systolischen Wandbewegung in der Infarktgrenzzone, jedoch war der Unterschied in der linksventrikulären Kontraktilität nach 18 Monaten nicht mehr signifikant. Die ebenfalls randomisierte ASTAMI-Studie aus Norwegen konnte nach sechs Monaten keine Unterschiede in der linksventrikulären Pumpfunktion zwischen den jeweils 50 Patienten der Zelltherapie-Gruppe und der Kontrollgruppe nachweisen [43]. Eine große randomisierte Placebo-kontrollierte Studie folgte mit REPAIR-AMI von Schächinger und Mitarbeitern aus Frankfurt, die jeweils 100 Patienten nach Rekanalisation des Infarktgefäßes zusätzlich zur Standard-Therapie entweder mononukleäre Knochenmarkszellen oder Mediumlösung intrakoronar injizierten. Nach einem Jahr war es in der Zelltherapie-Gruppe zu signifikant weniger kardiovaskulären Ereignissen und Rehospitalisierungen gekommen als in der Placebo-Gruppe, und die linksventrikuläre Pumpfunktion zeigte eine größere Verbesserung [63]. In einer anderen randomisierten Placebo-kontrollierten Studie von Janssens und Mitarbeitern aus Belgien an 67 Patienten konnte kein Unterschied für die globale linksventrikuläre Pumpfunktion gezeigt werden, jedoch waren die regionale Pumpfunktion und die Vitalität im Infarktgebiet in der Zelltherapie-Gruppe verbessert [33].

Obwohl diese ersten klinischen Studien beim Menschen, wenngleich kontrovers diskutiert, vorsichtigen Optimismus für das therapeutische Potential der EPC unterstützen, wurden durch die Studien auch einige wichtige neue Fragen evoziert: Eine Aussage über die effektivste Applikationsmethode der Zellen (z.B. intrakoronare Infusion oder intramyokardiale Einbringung in das Infarktareal) lässt sich aktuell noch nicht treffen, ebenso ist der optimale Transplantationszeitpunkt nach Infarkt unbekannt. Unklar bleibt auch, welche Zellpopulation genau transplantiert werden sollte, und ob Knochenmark oder peripheres Blut die Quelle dieser Zellen darstellen sollte.

2 Ziel der Untersuchung

Für die Zelltherapie oder die Unterstützung der endogenen Regenerationsvorgänge nach Myokardinfarkt ist ein genaues Wissen über die physiologischen Vorgänge der Mobilisation bei myokardialer Ischämie unabdingbar. Mehrere Studien haben die Mobilisation von Progenitorzellen nach Myokardinfarkt bereits untersucht. Bisher wurde jedoch entweder auf eine Analyse der Zellsubpopulationen verzichtet [68], oder einzelne Untersuchungszeitpunkte nach Myokardinfarkt wurden herausgegriffen, ohne dass eine deutliche Darstellung der Kinetik des Anstiegs erfolgte [45, 84]. Eine wichtige Limitation bestand außerdem in den bisher durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen der Untersuchungen. Da die CD34 positive Population nur ungefähr 0,03% der Leukozyten im peripheren Blut gesunder junger Personen ausmacht, ist es schwierig, weitere Zellsubpopulationen zu untersuchen, insbesondere wenn, wie bisher in den veröffentlichten Arbeiten geschehen, nur 50 000 bis 100 000 Leukozyten gemessen werden. Um dieses Problem zu umgehen, entwickelten wir eine neuartige FACS-Strategie (fluorescence activated cell sorting), die es uns erlaubte, die doppelt-positive Subpopulation aus ca. 1 Million Leukozyten zu bestimmen.

Das Ziel dieser Studie war, die pathophysiologische Mobilisierung der CD34 positiven Zellen nach Myokardinfarkt zu untersuchen, sowie die Zellsubgruppen, die an diesen endogenen Prozessen beteiligt sind, zu analysieren. Da eine allgemeingültige Charakterisierung der endothelialen Progenitorzellen bezüglich ihrer Oberflächenmarker weiterhin nicht existiert (siehe hierzu auch die Ausführungen in der Einleitung), die CD34/CD133 positiven Zellen, ebenso wie CD34/KDR positive Zellen jedoch allgemein als verschiedene Reifestadien der Endothelialen Progenitorzellen angesehen sind, und da ein mögliches Potential der Angiogenese und Neovaskularisation für EPC ebenso wie für CD117 positive Zellen bekannt ist [41], entschieden wir uns zur Untersuchung der CD34 positiven Zellen, sowie der KDR/CD34, CD133/CD34 und CD117/CD34 doppelt positiven Subpopulationen und analysierten deren Anzahl im peripheren Blut von Patienten nach Myokardinfarkt.

Das folgende Manuskript, welches 2007 im Journal „Clinical Research in Cardiology“ veröffentlicht wurde, zeigt die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit [20].

3 Manuskript „Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction”

F. Grundmann
C. Scheid
D. Braun
C. Zobel
H. Reuter
R.H.G. Schwinger
J. Müller-Ehmsen

Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction

Received: 13 December 2006
Accepted: 30 April 2007
Published online: 13 August 2007

Franziska Grundmann, MD
Daniela Braun, MS · Carsten Zobel, MD
Hannes Reuter, MD
Robert H.G. Schwinger, MD
Jochen Müller-Ehmsen, MD
Laboratory of Muscle Research
and Molecular Cardiology
Department of Internal Medicine III
University of Cologne
Cologne, Germany

Christof Scheid, MD
Laboratory of Bone Marrow
Transplantation
Department of Internal Medicine I
University of Cologne
Cologne, Germany

Priv.-Doz. Dr. Jochen Müller-Ehmsen (✉)
Department of Internal Medicine III
University of Cologne
Kerpener Str. 62
50937 Köln/Cologne, Germany
E-Mail: muller.ehmsen@uni-koeln.de

Abstract *Objective* Circulating progenitor cells (CPC) may contribute to cardiac regeneration and neovascularization after acute myocardial infarction (AMI). For potential therapeutic use, understanding the endogenous mechanisms after ischemia is inevitable. We investigated the absolute number, but also the subset composition of CD34+ CPC after AMI. *Methods* CD34+, KDR+/CD34+, CD133+/CD34+ and CD117+/CD34+ CPC were analyzed by FACS in peripheral blood of 10 patients with acute MI (59 ± 5 yrs, m/f=8/2) at day of AMI (day 0) and days 1–5. For comparison patients with stable coronary artery disease (CAD, n=12, 66 ± 2 yrs, m/f=10/2) and young healthy volunteers (n=7, 26 ± 2 yrs, m/f=3/4) were studied. *Results* CD34 and KDR/CD34, CD133/CD34, CD117/CD34 were increased day 3 and 4 after AMI. KDR+ fraction within CD34+

population remained unchanged ($58.3 \pm 7.8\%$ vs $55.3 \pm 10.6\%$), whereas CD133+ ($64.9 \pm 3.1\%$ vs $43.5 \pm 5.9\%$, $P=0.006$) and CD117+ fractions ($71.7 \pm 5.6\%$ vs $50.1 \pm 5.5\%$, $P=0.02$) were elevated. In CAD, all CPC and fractions were similar as AMI day 0. Healthy volunteers had more CD34+ than CAD and AMI day 0. Double positive CPC were also higher, but fractions were unchanged vs CAD with more KDR/CD34 in trend ($72.8 \pm 10.6\%$ vs $50.5 \pm 5.6\%$, $P=0.058$). After AMI both absolute numbers of CD34+ and their subset composition change, suggesting selective mobilization of CPC. Increased CPC after AMI never reach numbers of young healthy volunteers.

Key words myocardial infarction – circulating progenitor cells – myocardial regeneration – mononuclear cells – CD34

Introduction

In recent years the notion that acute myocardial infarction is followed by irreversible tissue damage and scar replacement has been undermined to some extent, due to various experimental data, suggesting a possible – albeit fragmentary – regeneration [1, 7]. Several therapeutical approaches make use of the idea that immature progenitor cells may stimulate

neovascularization and vascular and myocardial repair, thus enhancing the recovery of the cardiac function [11]. Although a number of experimental and clinical studies already investigated the therapeutic effect of an infusion of various distinct cell types isolated from bone marrow [10, 15] the endogenous mechanisms of regeneration, the knowledge of which could be conducive to finding the optimal cell population, have yet to be fully examined.

Several studies have investigated the mobilization of progenitor cells as a response to myocardial infarction. Shintani and coworkers quantified CD34+ mononuclear cells at day 1, 3, 7, 14 and 28 after MI, finding an increase after MI with a peak at day seven, but did not further investigate the different CD 34+ cell subtypes [12]. Other groups investigated several cell types at various single time points after MI with different strategies of fluorescent activated cell sorting (FACS) [4, 14]. One important limitation of the FACS analysis of progenitor cells is the low frequency of these cells in peripheral blood. The CD34 positive population averages at about 0.03% of the leukocytes in young healthy persons making it difficult to further distinguish the subpopulations of CD34 cells. Accordingly, this has not convincingly been done by previous studies, especially when only 50 000 or 100 000 leukocytes were studied (corresponding to 10–20 CD34 positive cells).

To overcome this problem we analyzed only those cells that were identified as CD 34 positive progenitor cells (ISHAGE criteria: size, granularity, CD45 and CD34 expression). Approximately 200 of these cells were counted, thereby the analysis allowed us to estimate the number of double positive cells from approximately 1 million leukocytes. In addition, the day-to-day analysis of cell counts that was applied in our study is advantageous over single time point determinations, because the time of peak cell counts may vary for specific subpopulations of cells and among patients.

The aim of the present study was to evaluate the pathophysiologic mobilization of CD34 positive cells after MI as well as to analyze the cell subsets involved in this endogenous process.

Cell lineages expressing CD34 surface antigen are a heterogeneous population and include haematopoietic as well as endothelial progenitor cells and more mature endothelial cells. Endothelial progenitor cells are mostly defined by the expression of CD34 and VEGFR-2 (KDR), although the CD34+/KDR+ fraction also comprises HSC (haematopoietic stem cells) [16]. A consistent characterization regarding the surface markers of the different subpopulations is still missing but it is widely accepted that CD34/CD133 positive cells are a less mature cell population than cells expressing CD34/KDR (VEGFR-2) and lacking CD133 [8]. From a more clinical point of view the possible potential of angiogenesis or neovascularization which is known for EPCs as well as for CD117+ cells [2] is the crucial aspect of interest. Therefore we investigated CD34 positive, and KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 double positive cells in response to myocardial infarction.

Methods

■ Patients

Ten consecutive patients who presented with acute myocardial infarction (chest pain, ECG changes, elevation of serum creatine kinase levels and significant CK-MB ratio) were enrolled in the study. The onset of symptoms was less than 12 hours before admission in all patients. Exclusion criteria were severe non-cardiac disorders, acute or chronic inflammatory processes, autoimmune or malignant disease or recent traumas (age 59 ± 5 yrs., m/f=8/2). For comparison patients with diagnosed CAD but without an acute ischemic event served as controls (n=12, age 66 ± 2 yrs., m/f=10/2). In addition young healthy volunteers (n=7, age 26 ± 2 yrs., m/f=3/4) were studied. A summary of patients' characteristics and lab values is given in table 1. Informed consent was given by all patients. The study was approved by the Local Ethics Committee at the University of Cologne (Nr. 03-179) and complies with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

■ Blood samples and FACS analysis

Samples of peripheral venous blood were collected within 12 hours after admission of patients (day 0) and collected daily until day 5 after MI. In the control groups samples were collected at an arbitrary time point. EDTA-peripheral blood samples were processed within 4 h after collection.

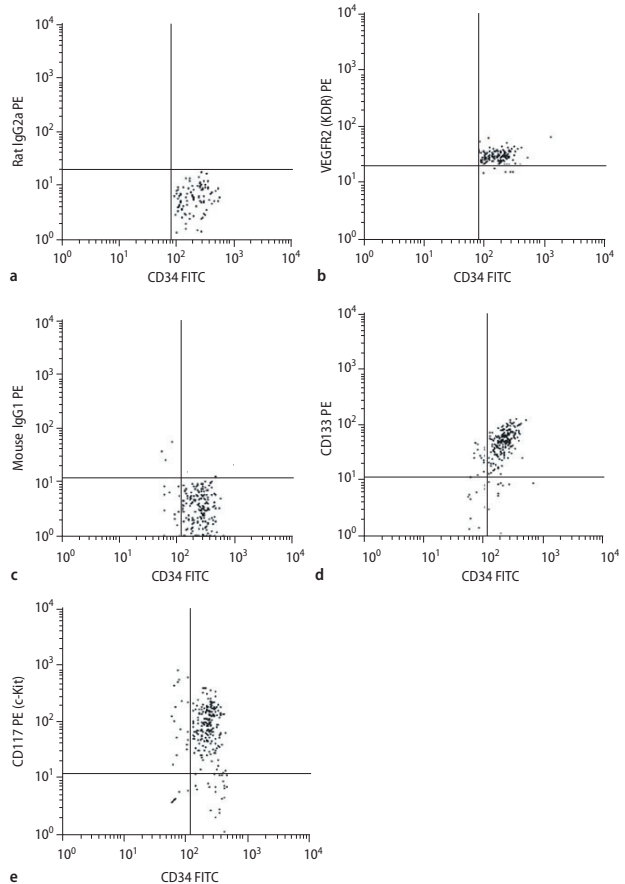
Table 1 Patients data

	MI	CAD	Control
N	10	12	7
Age, y	59 ± 5	66 ± 2 n.s. vs MI	26 ± 2 P<0.01 vs CAD and MI
Gender, m/f	8/2	10/2	3/4
Extent of disease (1/2/3 vessel)	3/3/4	4/2/6	
CK max (U/l)	2051 ± 442		
LDH initial (U/l)	505 ± 183		
LDH max (U/l)	754 ± 186		
STEMI/NSTEMI n (%)	8 (80)/2 (20)		
Ischemia location anterior/ posterior n (%)	6 (60)/4 (40)		
Hypertension, n (%)	6 (60)	12 (100)	0 (0)
HLP, n (%)	7 (70)	12 (100)	0 (0)
Diabetes mellitus, n (%)	3 (30)	6 (50)	0 (0)
Smoking, n (%)	5 (50)	2 (17)	4 (57)
β -blocker therapy, n (%)	9 (90)	11 (92)	0 (0)
ACE inhibitor, n (%)	6 (60)	5 (42)	0 (0)
Statin therapy, n (%)	9 (90)	11 (92)	0 (0)
Aspirin/Clopidogrel, n (%)	10 (100)	10 (83)	0 (0)

100 μ l of PB collected in EDTA containing tubes were incubated for 20 min with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD45 monoclonal antibody and phycoerythrin-conjugated anti-CD34 antibody. To exclude any bias by the choice of fluorescent dye, another 100 μ l sample was incubated with FITC-conjugated anti-CD34 antibody and PE-conjugated anti-CD45 antibody (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). To assess the subpopulations in each case 100 μ l of PB were stained with either PE-conjugated anti-VEGFR-2 (KDR) (eBioscience, San Diego, USA) antibody or anti-CD133 antibody (Miltenyi Biotec,

Bergisch-Gladbach, Germany) or anti-CD117 antibody (eBioscience, San Diego, USA) in addition to the FITC-conjugated anti-CD34 antibody (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Appropriate isotype controls were used for each staining procedure. After lysis of red cells, the samples were centrifuged and the pellets were resuspended in 300 μ l of phosphate buffered saline. Cells were analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). The analysis of the CD34+ haematopoietic cells was performed adopting the gating strategy defined by the International Society of Hae-

Fig. 1 Representative example of the fluorescent activated cell sorting (FACS) analysis of the CD34 positive cell subsets. KDR/CD34 double-positive cells (**b**) were defined according to their corresponding isotype control (**a**). Accordingly, CD133/CD34 double positive cells (**d**) and CD117+/CD34+ subsets (**e**) were defined according to their appropriate control (**c**)



matotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) guidelines and expressed as number per million white blood cells.

In order to gain reliable data for the subpopulation analysis, the data of the progenitor population was selectively acquired by only counting CD34 positive cells with a low granularity and the typical forward scatter profile. Afterwards the subpopulations were defined according to the corresponding isotype control (Fig. 1 a–d).

Data analysis and statistics

Data shown are mean $\pm$ SEM. Significant differences between groups were estimated with the help of computerized calculations with InStat® (GraphPad Software Inc., USA) applying the Student's t-test for paired and unpaired values.

Results

Circulating CD34+ cells and their subsets after MI

The longitudinal study of patients with MI showed that the mean value of the number of circulating CD34+ cells in PB was increased by a factor of 2.8 at day 4 after myocardial infarction vs. day 0 of MI. In parallel, the total number of KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 double positive cells increased after MI, with a peak at day 4 (Table 2, Fig. 2 a–d).

While the fraction of the KDR/CD34 double positive cells within the CD34+ population did not significantly change during the 5 day observation period after MI, the percentage of the CD133 and CD117 positive fractions of the CD34 positive population were elevated on day 3 and day 4, respectively ($P < 0.01$, Table 3, Fig. 3 a–c).

Circulating progenitor cells in patients with MI compared to patients with CAD and young healthy volunteers

As compared to patients with CAD, the CD34 positive cell count per million leukocytes was not statistically different in patients with MI at day 0. Furthermore, there were no differences in the amounts of KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 double positive cells in patients with MI at day 0 compared to patients with CAD (Table 2, Fig. 2 b–d), nor in the composition of the CD34 positive cell population (fractions of KDR/CD34, CD133/CD34, CD117/CD34, $P > 0.1$, Table 3, Fig. 3 a–c).

In addition, patients with MI (day 0) had a 3.4 fold lower count of CD34 positive cells than young healthy volunteers ($P = 0.01$, Table 2, Fig. 2a). At day 4 after MI this number was no longer different. Also the numbers of KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 double positive cells were lower in MI (day 0) vs young healthy volunteers (all $P < 0.05$, Table 2, Fig. 2 b–d). However, again this difference was no longer present at day 4 after MI. Patients with CAD had the same subsets within the CD34+ population as young healthy volunteers, but there was a non-significant trend for a lower KDR positive fraction ($P = 0.058$, Table 3, Fig. 3a).

Discussion

Recent data suggest that immature progenitor cells may contribute to regeneration after myocardial infarction. Although the transplantation of precursor cells may offer an attractive therapeutical approach and several promising clinical studies have been conducted, the knowledge about the endogenous processes and the different cell types which are mobilized after MI physiologically – albeit possibly important – is still scarce.

In this study we investigated the mobilization of CD34 positive progenitor cells and their KDR, CD133, and CD117 positive subsets between day 0 and day 5 after MI. This is the first study that con-

Table 2 Cell numbers per million leukocytes

	MI day 0	MI day 1	MI day 2	MI day 3	MI day 4	MI day 5	CAD	Healthy
CD34	92 $\pm$ 25	214 $\pm$ 64	176 $\pm$ 38	226 $\pm$ 35**	255 $\pm$ 46*	232 $\pm$ 57	143 $\pm$ 40	310 $\pm$ 70***
KDR/CD34	56 $\pm$ 19	76 $\pm$ 33	78 $\pm$ 15	98 $\pm$ 27	144 $\pm$ 32*	111 $\pm$ 36	63 $\pm$ 19	263 $\pm$ 85**
CD133/CD34	45 $\pm$ 13	90 $\pm$ 30	93 $\pm$ 22	151 $\pm$ 24*	160 $\pm$ 37*	116 $\pm$ 48	78 $\pm$ 29	214 $\pm$ 63***
CD117/CD34	47 $\pm$ 12	170 $\pm$ 57	132 $\pm$ 39	158 $\pm$ 28**	205 $\pm$ 43**	112 $\pm$ 52	105 $\pm$ 41	265 $\pm$ 86 ^(*)

* $P < 0.05$, ** $P = 0.01$ vs MI day 0; ^(*) $P < 0.05$, ^(*) $P = 0.09$ vs CAD
all cells expressed by 1 000 000 leukocytes

Fig. 2 (a) CD34 positive cells of patients with MI (day 0–day 5) in comparison to patients with CAD and young healthy volunteers. Cells were assessed twice: with PE-conjugated as well as with FITC-conjugated anti-CD34 antibody. Double positive KDR/CD34 (b), CD133/CD34 (c), and CD117/CD34 (d) cells of patients with MI (day 0–day 5), CAD and young healthy subjects. * $P < 0.05$, ** $P = 0.01$ vs MI day 0; # $P < 0.05$, (#) $P = 0.09$ vs CAD

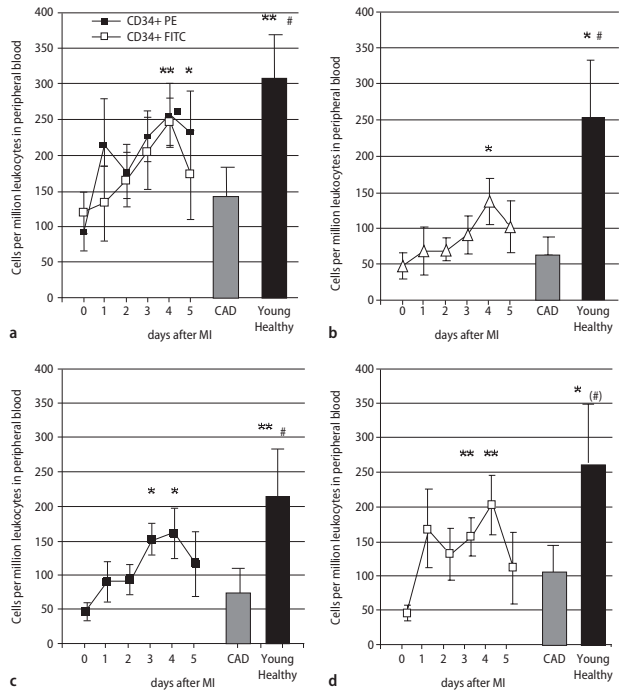


Table 3 Percentage of subtypes within CD34+ population

% within 34+ population	MI day 0	MI day 1	MI day 2	MI day 3	MI day 4	MI day 5	CAD	Healthy
KDR+/CD34+	55.3 ± 10.6	39.8 ± 6.6	45.6 ± 6.4	49.0 ± 10.7	58.3 ± 7.8	57.3 ± 6.5	50.5 ± 5.6	72.8 ± 10.7 [#]
CD133+/CD34+	43.5 ± 5.9	49.4 ± 8.2	53.3 ± 6.0	64.9 ± 3.1*	57.2 ± 8.4	45.6 ± 8.8	51.9 ± 3.2	59.8 ± 7.3
CD117+/CD34+	50.1 ± 5.5	62.1 ± 5.5	64.0 ± 6.4	67.4 ± 5.0	71.7 ± 5.6*	47.9 ± 8.6	63.3 ± 5.3	72.5 ± 7.9

* $P < 0.05$ vs MI day 0; [#] $P = 0.058$ vs CAD

tinuously describes the mobilization of these progenitor cell subsets within the first week of myocardial infarction in comparison to patients with CAD and young healthy controls. Besides the absolute number the composition of CD34+ cells after MI was investigated. The major findings of the study are, firstly, that myocardial infarction not only leads to quantitative but also to qualitative changes of the progenitor cells. Secondly, despite cell count increases after MI, the number of cells does not reach the value observed in young healthy volunteers, and

thirdly, our results indicate that the mobilization of progenitor cells after MI is selective for specific cell types.

Our hypothesis that the different subpopulations of CD34+ cells might have different functions and potentials is in accordance with the work of Vasa et al. [13]. In that study it was found that the amount of KDR+/CD34+ circulating progenitor cells is influenced by cardiovascular risk factors, while on the other hand these factors did not influence the number of CD133+/CD34+ circulating cells. One might

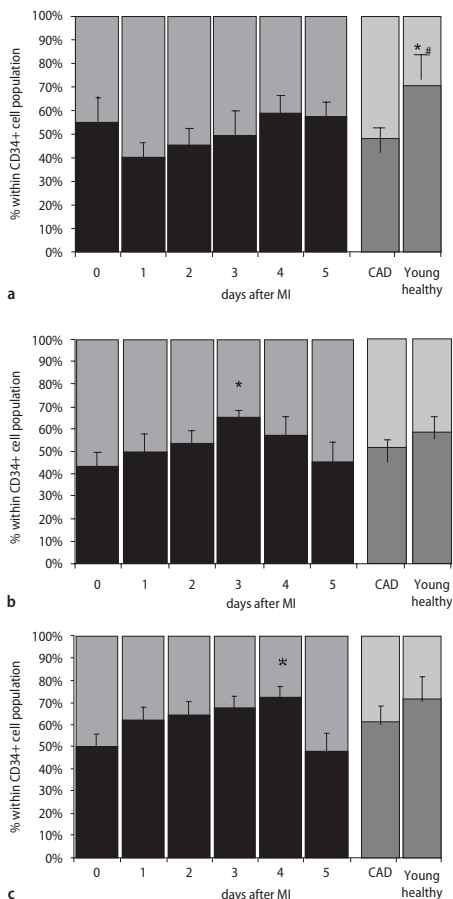


Fig. 3 Fractions of KDR+/CD34+ (a), CD133+/CD34+ (b) and CD117+/CD34+ (c) cell subsets, expressed as percentages of the CD34 positive cell population. The fractions of patients with MI (day 0–day 5) are compared to CAD and young healthy volunteers. * $P < 0.05$ vs MI day 0; # $P = 0.058$ vs CAD

speculate that in our patients, KDR+/CD34+ cells could not be mobilized to the extent of CD133+/CD34+ and CD117+/CD34+ cells due to their dependence on cardiovascular risk factors (with the consequence that the fraction of KDR+/CD34+ was not elevated after MI). The missing increase of this subset after MI could be explained either by (a) exhaus-

tion of the pool of stem/progenitor cells in the bone marrow, (b) reduced mobilization, or (c) reduced survival of these cells.

Shintani et al., who first reported the increase of CD34+ cells after MI, detected similar cell numbers and an elevation within the same range as we did, but did not further investigate the subpopulations. Wojakowski et al. found an increase of the CD117+/CD34+ subset after MI as we did, but did not present exact numbers, whereas they could only detect small numbers in healthy persons. This might be due to the higher age of their control group or to the different FACS approach, which also led to surprisingly high numbers of CD34+ cells [5, 14]. Massa et al. found no difference in the number of CD34+ cells between patients with stable angina and healthy controls and even more CD34+ cells in acute myocardial infarction on the day of admission than in healthy controls [4]. The discrepancy of these findings may be explained by the younger age of our control subjects since younger age may be associated with a higher number of CD34+ cells in peripheral blood, as suggested by our recent study [6].

Another discrepancy which cannot readily be explained is the peak of CD34+ cells at the day of admission that is described by Massa and colleagues. So far all studies investigating the mobilization [6, 12, 14] have found increased values at later dates. Physiologically, this delayed increase of CD34+ cells appears to be more plausible, since also after external stimulation of stem cell release by G-CSF it takes several days before the increase in CD34+ cells can be observed in peripheral blood [9].

Thus, our day-to-day analysis of haematopoietic stem cells is the first to describe convincing and conceivable kinetics, taking the different CD34+ cell subsets into account.

The importance of studying the specific progenitor subpopulations is further supported by findings of Madeddu et al. [3] who compared the therapeutic potential of KDR+/CD34+ with that of KDR-/CD34+ cells. KDR+/CD34+ cells did not only show greater resistance to apoptosis and ability to release VEGF-A, but – when injected into the hindlimb muscles in immunodeficient SCIDbg mice subjected to unilateral ischemia – also improved limb salvage and haemodynamic recovery to a greater extent than a 10× larger dosage of KDR-/CD34+ population. Li and co-workers separated CD117 positive cells from mature bone marrow cells (which are CD117 negative) and performed *in vitro* and *in vivo* investigations [2]. They detected significantly higher levels of VEGF secreted from the CD117 positive cells and observed a longer survival of CD117+ cells in culture which differentiated into endothelial cells. When implanted into ischemic hindlimbs of mice, the CD117 positive

cells showed incorporation in microvessels, in contrast to the CD117 negative population. The microvessel density and perfusion of the ischemic hindlimbs were significantly higher in the CD117+ than in the CD117- cell-implanted mice and also in a group that received total bone marrow cell implantation. The previous studies and our current report support the necessity for further investigations of the different cell subsets, which may help to develop

more specific and maybe more potent therapeutical approaches.

■ **Acknowledgment** The authors thank Ms. Kerstin Schenk and Ms. Sandra Winter for their excellent technical assistance. This work was supported by the Hans und Gertie Fischer-Stiftung (J.M.E., C.S. and R.H.G.S.) and by Köln Fortune (J.M.E., F.G.).

References

1. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107(11):1395–1402
2. Li TS, Hamano K, Nishida M, Hayaishi M, Ito H, Mikamo A, Matsuzaki M (2003) CD117+ stem cells play a key role in therapeutic angiogenesis induced by bone marrow cell implantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(3):H931–937
3. Madeddu P, Emanuelli C, Pelosi E, Salis MB, Cerio AM, Bonanno G, Patti M, Stassi G, Condorelli G, Peschle C (2004) Transplantation of low dose CD34-KDR+ cells promotes vascular and muscular regeneration in ischemic limbs. *Faseb J* 18(14):1737–1739
4. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertoletti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L (2005) Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 105(1):199–206
5. Müller-Ehmsen J, Grundmann F, Schwinger RH, Schinkothe T (2005) Letters regarding article by Wojakowski et al, “mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction”. *Circulation* 111(20):e307; author reply e307–308
6. Müller-Ehmsen J, Scheid C, Grundmann F, Hirsch I, Turan G, Tossios P, Mehlhorn U, Schwinger RH (2005) The mobilization of CD34 positive mononuclear cells after myocardial infarction is abolished by revascularization of the culprit vessel. *Int J Cardiol* 103(1):7–11
7. Orlie D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10344–10349
8. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MAS, Rafii S (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD341 cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95(3):952–958
9. Peters WP, Rosner G, Ross M, Vredenburg J, Meisenberg B, Gilbert C, Kurtzberg J (1993) Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. *Blood* 81(7):1709–1719
10. Schächinger V, Assmus B, Britten M B, Honold J, Lehmann R, Tepe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM (2004) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 44(8):1690–1699
11. Schächinger V, Assmus B, Honold J, Lehmann R, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM (2006) Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin Res Cardiol* 95(1):13–22
12. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T (2001) Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103(23):2776–2779
13. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89(1):E1–E7
14. Wojakowski W, Tendra M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, Wyderka R, Ochala A, Ratajczak MZ (2004) Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 110(20):3213–3220
15. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364 (9429):141–148
16. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C (1999) KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285(5433):1553–1558

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Jüngste Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass unreife Progenitorzellen zur Regeneration nach Myokardinfarkt beitragen. Obwohl die Transplantation von Vorläuferzellen eine attraktive therapeutische Option darstellt, und bereits zahlreiche vielversprechende klinische Studien durchgeführt wurden, ist das Wissen über die endogenen Prozesse und insbesondere die verschiedenen Zelltypen, welche nach Myokardinfarkt in das periphere Blut mobilisiert werden, weiterhin unzureichend. Mit den Untersuchungen dieser Arbeit zur ischämieinduzierten Mobilisation von Vorläuferzellen soll ein Beitrag zum besseren Verständnis der körpereigenen Prozesse geleistet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Myokardinfarkt nicht nur zu quantitativen, sondern auch zu qualitativen Veränderungen der Progenitorzellen des peripheren Blutes führt. Zusätzlich fiel auf, dass selbst bei Mobilisation von Zellen nach dem Infarkt nicht die peripheren Zellzahlen der jungen, gesunden Probanden erreicht werden. Außerdem lieferte die Untersuchung Hinweise darauf, dass die Mobilisation von Progenitorzellen nach Myokardinfarkt selektiv für bestimmte Zelltypen ist.

Einer der größten Kritikpunkte an allen Studien, die sich mit Endothelialen Progenitorzellen beschäftigen, bleibt das Fehlen einer einheitlichen Definition der EPC. Zunehmend wird sich um eine Vereinheitlichung bemüht [77]. Da jedoch bei verschiedenen Zelltypen davon ausgegangen werden muss, dass sie *in vivo* einen positiven Einfluss auf die endotheliale Funktion und die Regenerationsfähigkeit haben, birgt eine festgelegte Charakterisierung auch die Gefahr, die Komplexität der beteiligten Mechanismen und ggf. Zelltypen zu verkennen und wichtige Zellsubpopulationen nicht in die Untersuchungen mit einzubeziehen, obwohl die Unterschiede und die genaue Funktion der Zellen weiterhin ungeklärt sind. In dieser Studie wurden die gängigen Charakterisierungen durch CD34 und KDR, sowie CD133 gewählt. Außerdem wurden zusätzlich CD117+ Zellen untersucht, da auch für diese Zellen ein angiogenetisches Potential bekannt ist [8, 13, 14, 41].

Ebenso uneinheitlich wie die Charakterisierung der Zellen bleiben auch weiterhin die Methoden zur Quantifizierung und Isolierung von EPC. Oftmals wurden in den

Untersuchungen nur 50 000 oder 100 000 Leukozyten auf Vorläuferzellen untersucht. Da bereits bei einem jungen gesunden Kollektiv nur mit einer CD34 positiven Population von ungefähr 0,03 % zu rechnen ist, erfasst die Messung nur ca. 10 bis 20 CD34 positive Zellen, so dass eine Analyse der CD34 positiven Subpopulationen erschwert ist. Die in unserer Studie eingesetzte Methode, bei der bereits während der Messung die CD34+ Zellen gemäß den ISHAGE Kriterien (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) [72] selektiv herausgefiltert werden, ermöglicht es, die Anzahl der doppelt-positiven Zellen in umgerechnet ca. einer Millionen Leukozyten zu erfassen und somit bessere Ausgangswerte zur Darstellung der Subpopulationen zu erhalten.

Zusätzlich bietet die tägliche Messung der Werte den Vorteil, dass – im Gegensatz zu Messungen zu einzelnen Zeitpunkten – , jeweils die vorherigen und folgenden Werte der Plausibilitätsprüfung dienen können, was gerade aufgrund der hohen inter- und intraindividuellen Spannbreite, sowie fehlender Normalwerte, welche zur Orientierung herangezogen werden können, wichtig erscheint. Trotzdem ist zu vermuten, dass auch die bisher standardmäßig eingesetzte Methode der FACS-Analyse nur begrenzt sensitiv bei der Detektion von Vorläuferzellen ist, und dass in Zukunft ggf. alternative Methoden – wie z.B. quantitative PCR – vermehrt eingesetzt werden müssen [70].

Da alle Studien, inklusive der hier vorgestellten Untersuchung, relative Unterschiede innerhalb des Patientenkollektivs bzw. der Kontrollgruppen betrachten, und da es keine Angaben über Normwerte innerhalb bestimmter Kollektive gibt, ist der Vergleich zwischen den Studien nur eingeschränkt möglich. Er wird zusätzlich durch die Tatsache erschwert, dass für die Darstellung der absoluten EPC-Anzahl unterschiedlichste Bezugsgrößen – wie zum Beispiel Zellzahl pro 1 Mio. Lymphozyten, Zellzahl pro μ l Blut, oder auch Zellzahl pro 1 Mio Leukozyten – gewählt werden. Der Nachteil der Angabe in Bezug auf die Leukozyten oder Lymphozyten, wie sie auch in dieser Arbeit gewählt wurde, ist, dass Einflüsse eines veränderten Blutbilds, wie z.B. einer stressinduzierten Leukozytose oder einer Entzündungsreaktion, auf den Anteil der EPC an den Leukozyten nicht ausgeschlossen werden können. In der hier diskutierten Studie wurde daher zusätzlich zu den Angaben pro Millionen Leukozyten die Datenauswertung der Zellsubpopulationen als Fraktion an den gemessenen CD34 positiven Zellen gewählt. So wird, unabhängig von der absoluten Anzahl der Vorläuferzellen, durch die Darstellung der Zelluntergruppen als Fraktion der Gesamtmenge, die qualitative Veränderung der CD34+ Gesamtpopulation berücksichtigt.

Auch die Arbeitsgruppe um Wojakowski [84] beobachtete bestimmte Zelluntergruppen und stellten ebenfalls einen Anstieg der CD117+/CD34+ Subpopulation nach Myokardinfarkt fest. Jedoch gaben Wojakowski und Mitarbeiter keine genauen Zahlen an. Ein weiterer Unterschied zwischen den hier vorgestellten Ergebnissen und den von Wojakowski et al. veröffentlichten Daten besteht in der geringen Anzahl der CD117+/CD34+ Population, den die Arbeitsgruppe bei gesunden Personen beschreibt. Möglicherweise ist diese Differenz auf das höhere Alter der Kontrollgruppe zurückzuführen, oder auf einen rein methodischen Unterschied, welcher auch in einer erstaunlich hohen Anzahl von CD34+ Zellen resultierte [48, 84].

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen haben Massa und Kollegen keinen Unterschied in der Anzahl der CD34+ Zellen zwischen Patienten mit stabiler Angina und gesunden Kontrollprobanden gefunden [45]. Allerdings beobachteten sie mehr zirkulierende CD34+ Zellen bei Infarktpatienten am Tag der Aufnahme als bei den gesunden Probanden. Diese Diskrepanz zu den Ergebnissen der hier durchgeführten Untersuchungen könnte durch das höhere Alter der Kontrollgruppe in der Studie von Massa und Kollegen erklärt werden, da niedrigeres Alter mit einer erhöhten Anzahl von CD34+ Zellen im peripheren Blut vergesellschaftet zu sein scheint [49]. Nicht ohne weiteres zu erklären ist jedoch die von Massa et al. beschriebene Spitze der CD34+ Zellen am Tag der Aufnahme der Infarktpatienten. Alle bisher publizierten Studien, welche die Mobilisation nach Myokardinfarkt untersuchten, fanden den Zellanstieg zu späteren Zeitpunkten [49, 68, 84]. Physiologischerweise erscheint der spätere Zuwachs an CD34+ Zellen im peripheren Blut plausibler, da es auch nach externer Stimulation von Stammzellen zum Beispiel durch G-CSF erst nach mehreren Tagen zu einem vermehrten Auftreten der Zellen in der Peripherie kommt [55]. Dementsprechend liegt mit der hier gezeigten täglichen Analyse des Vorkommens der Zellen in der peripheren Blutbahn die erste Untersuchung vor, die neben den CD34+ Subpopulationen auch die Kinetik des Zellanstiegs überzeugend darstellt.

Betrachtet man die in der Untersuchung gewonnenen Ergebnisse im Zusammenhang mit anderen veröffentlichten Studien, liegt ein auch Vergleich mit einer weiteren Untersuchung unserer Arbeitsgruppe nahe [47], da die verwendete Methode, die betrachteten Zellpopulationen sowie die Bezugsgrößen mit der vorliegenden Studie übereinstimmen. In der Studie von Müller-Ehmsen et al. wurde erstmals an einem gemischten Kollektiv von 149 freiwilligen Probanden eine negative Korrelation zwischen dem Body-Mass-Index (BMI) bzw. dem Hüftumfang und der Zahl der CD34 positiven Zellen im peripheren Blut

beobachtet. Auch bei allen betrachteten Subgruppen von CD34 nahm die Zellzahl im peripheren Blut (KDR/CD34, CD133/CD34, CD117/CD34) mit steigendem BMI ab. Die beobachteten Veränderungen waren durch eine Gewichtsreduktion teilweise reversibel: Nach einer sechsmonatigen Diät zeigten die CD34 und CD117/CD34 positiven Zellen einen vom Ausmaß der Gewichtsreduktion abhängigen Anstieg.

Eine Reduktion der Anzahl von endothelialen Progenitorzellen bei Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren konnte bereits in vorangegangenen Untersuchungen demonstriert werden [81]. Geht man von einem EPC-Verbrauch bei chronischer Belastung durch Risikofaktoren oder manifeste Erkrankungen aus, ist zu erwarten, dass bei dem Bestehen des Risikofaktors Übergewicht noch ohne Manifestation einer KHK die Anzahl der EPC zwar reduziert ist, jedoch ein geringerer Verbrauch stattfindet als bei Patienten, die bereits an einer manifesten Arteriosklerose der Koronargefäße leiden. In Übereinstimmung hiermit lagen die bei übergewichtigen Personen ermittelten Werte für CD34, CD133/CD34 und CD117/CD34 positive Zellen unterhalb des Niveaus der jungen, gesunden Kontrollprobanden unserer Studie, jedoch knapp oberhalb oder im Bereich der Ergebnisse der Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Auffällig ist in der Diätstudie unserer Arbeitsgruppe eine Reduktion der KDR/CD34 positiven Zellen und deren Anteil bei Übergewichtigen. Sowohl die Gesamtanzahl der Zellen als auch deren Anteil an den CD34+ Zellen liegt deutlich unterhalb des Niveaus der Patienten mit KHK. Man könnte also spekulieren, dass der negative Effekt des Übergewichts auf diese Zellgruppe besonders stark wirkt.

Die Hypothese, dass die verschiedenen CD34+ Subpopulationen verschiedenes Funktionspotential besitzen, deckt sich mit den Beobachtungen in zahlreichen anderen Arbeiten. So beschrieb die Arbeitsgruppe um Vasa [81], dass die Anzahl der KDR+/CD34+ zirkulierenden Progenitorzellen von kardiovaskulären Risikofaktoren beeinflusst wird, während diese Faktoren keine Auswirkungen auf die Menge der peripher zirkulierenden CD133+/CD34+ Zellen hatten. Auch in der hier vorgestellten Studie zeigten sich Unterschiede zwischen den Subgruppen. Es ließ sich ein Trend zu weniger CD34/KDR doppelt positiven Zellen bei Patienten mit KHK beobachten, und die Fraktion der KDR/CD34 doppelt-positiven Zellen war auch nach Myokardinfarkt nicht erhöht. Es wäre also denkbar, dass bei den von uns untersuchten Infarktpatienten eine Mobilisation von KDR+/CD34+ Zellen aufgrund ihrer Abhängigkeit von kardiovaskulären Risikofaktoren nicht im gleichen Maße möglich war wie die Mobilisation von

CD133+/CD34+ und CD117+/CD34+, mit der Konsequenz, dass der Anteil der KDR positiven Zellen an den CD34+ Vorläuferzellen nach Infarkt nicht erhöht war.

Die möglicherweise besondere Rolle der KDR positiven Subpopulation wird auch durch die Arbeiten von Madeddu und Kollegen [44] deutlich. Die Arbeitsgruppe verglich das therapeutische Potential von KDR+/CD34+ Zellen mit dem von KDR-/CD34+ Zellen. Die KDR+/CD34+ Zellpopulation zeigte nicht nur eine höhere Resistenz gegenüber Apoptose und stärkere Fähigkeit zur Sekretion von VEGF-A, sondern verbesserte bei Injektion der Zellen in die ischämische Hinterläufe von immundefizienten Mäusen auch die hämodynamische Regeneration. Die stärkere therapeutische Wirkung zeigte sich auch noch im Vergleich zu einer zehnfach höheren Zelldosis der KDR-/CD34+ Population. Zu entsprechenden Ergebnissen kam auch die Gruppe um Botta [5] in ihren Untersuchungen an immundefizienten NOD-SCID (SCID = severe combined immunodeficiency) Mäusen. Hier erfolgte nach Induktion eines Myokardinfarktes und Zelltransplantation die Beobachtung des Effektes von CD34 positiven Zellen, sowie von CD34+/KDR+ Zellen, verglichen mit der CD34+/KDR- Population. Ein Benefit bezüglich kardialer Hämodynamik konnte nur für die Gesamtpopulation der CD34 positiven Zellen und für die CD34/KDR doppelt-positive Untergruppe gesehen werden, nicht jedoch bei der Transplantation von CD34+/KDR-.

Eine weitere Studie beschreibt die CD34+/KDR+ Zellpopulation gar als Determinante einer subklinischen Atherosklerose, da von den gemessenen Zellpopulationen (CD34+, CD133+, CD34+/CD133+, CD34+/KDR+, CD133+/KDR+ und CD34+CD133+KDR+) nur eine reduzierte CD34+/KDR+ Subgruppe bei den Probanden mit einer Intima-Media-Verdickung der Carotis einherging, und der Grad der Verdickung mit dem Maß der Zellreduktion eng korrelierte [12]. Letztendlich ist davon auszugehen, dass die CD34/KDR doppelt-positive Zellpopulation durch Risikofaktoren besonders stark beeinflusst wird und evtl. sogar den subklinischen Beginn einer Atherosklerose widerzuspiegeln vermag. Zusätzlich kann aufgrund der Anzahl dieser doppelpositiven Zellen ein Voraussagewert für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit KHK [83] und bei Gesunden [65] getroffen werden.

Unklar bleibt aktuell, ob dies auch für andere Subpopulationen gilt, so dass man spekulieren könnte, dass die CD34+/KDR+ Zellen besonders von dem bereits erwähnten möglichen Verbrauch von EPC bei Patienten mit chronischen vaskulären Erkrankungen oder Risikofaktoren betroffen sind und daher durch Erschöpfung des Stammzell-

/Progenitorzell-Pools im Knochenmark oder durch reduziertes Überleben dieser Zellen eine Mobilisation nicht möglich ist. Andere Subpopulationen werden von chronischen Faktoren möglicherweise weniger beeinträchtigt und stellen eher eine akute Antwort auf Gewebeischämie dar.

Zu dieser These passt auch der in der hier vorgestellten Arbeit beobachtete Anstieg der CD117+ bzw. der CD133+ Population nach Myokardinfarkt. Die Gruppe um Fazel beschreibt wie auch andere Gruppen [16] am Tiermodell eindrucksvoll die nach Myokardinfarkt stattfindende Erhöhung der CD117+ (=c-kit) Zellzahl im Herzen [13, 14]. In der Arbeit wurde gezeigt, dass diese Zellen dem Knochenmark entspringen und durch VEGF-Erhöhung sowie Anheben des Angiopoietin-2 Spiegels ein die Angiogenese unterstützendes Milieu in der Infarktgrenzzone schaffen, welches wiederum in einem myofibroblastenreichen Reparaturvorgang resultiert. Bei Mutation im CD117 Rezeptor blieb eine Mobilisation der Zellen aus. Die Angiogenese sowie darauffolgende Reparaturmechanismen konnten nicht beobachtet werden, und letztendlich kam es zum zunehmenden Herzversagen. Knochenmarkstransplantation mit Wildtyp-Zellen führte wiederum zu einem Rückgang des kardiomyopathischen Phänotyps.

Auch für CD133+ Zellen werden Reaktionen auf akute ischämische Ereignisse beschrieben. So konnte für Zellen mit diesem Oberflächenmarker eine durch SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1) vermittelte Rekrutierung in ischämische Areale nach Myokardinfarkt gezeigt werden. Grundlagen der von Tang und Kollegen durchgeführten Untersuchungen [75] bildete die Tatsache, dass nach Induktion eines Myokardinfarktes im Mäusemodell vermehrte Expression von SDF-1 α im Grenzgebiet des Infarktes und im Infarktareal selbst nachgewiesen werden konnte [1]. Tang und Kollegen schlussfolgerten, dass es bei durch Adenovirus induzierter Geneinbringung und konsekutiv forcierter SDF-1 α -Expression zu verbesserter Regenerationsleistung kommen müsste, da die intrinsische SDF-1 α -Erhöhung selbst nur kurzweilig und somit insuffizient ist [9, 22]. Letztendlich zeigten sie in ihrem Mausmodell eine Erhöhung der CD133 mRNA (=messenger RNA) Expression in den SDF-1 α überexprimierenden Infarktarealen im Vergleich zu den Kontrollen. Simultan dazu stieg in diesen Gebieten auch die Anzahl der Zellen, die den Oberflächenmarker CD133 trugen und in den Arealen zur Neovaskularisation und Angiogenese beitrugen [9, 24, 86].

In einer anderen Untersuchung von Schömig [66] konnte nach Myokardinfarkt eine Korrelation zwischen dem Auftreten von CD133 positiven Zellen und Interleukin 8

festgestellt werden, einem Chemokin, welches im Rahmen der Entzündungsaktivierung auftritt, möglicherweise proangiogenetische Effekte aufweist und somit gegebenenfalls eine Rolle bei der Wundheilung spielt [38, 60]. Zusätzlich ist von Interleukin 8 eine Induktion der Stammzellmobilisierung durch Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase-9 bekannt[56]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass auch im Rahmen der Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt die Freisetzung der verschiedenen Botenstoffe die Mobilisation und die Rekrutierung bestimmter, aber nicht aller Vorläuferzellsubgruppen unterstützt.

Der in unserer Studie gezeigte Anstieg der CD117/CD34 positiven und CD133/CD34 positiven Subpopulation im peripheren Blut beim Menschen legt in Zusammenschau mit den am Tiermodell beobachteten und eng mit CD117 und CD133 exprimierenden Zellen verknüpften Regenerationsvorgängen bei akuter myokardialer Ischämie die Annahme von ähnlichen endogenen Mechanismen auch beim Menschen nahe.

4.2 Schlussfolgerung

Nach Myokardinfarkt kommt es nicht nur zu quantitativen, sondern auch zu qualitativen Veränderungen der Progenitorzellen im peripheren Blut. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die unterschiedlichen Zellpopulationen verschiedene spezifische Aufgaben bei endogenen Reparaturmechanismen haben könnten. Aussagen über die funktionelle Relevanz und das mögliche therapeutische Potential der einzelnen Zellsubgruppen fehlen bisher, so dass weitere Untersuchungen der unterschiedlichen Zelltypen notwendig sind, um möglicherweise spezifischere und potentere therapeutische Möglichkeiten nach Myokardinfarkt zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Progenitorzellen zur kardialen Regeneration und Neovaskularisation nach Myokardinfarkt beitragen. Diese Erkenntnis führte zu einer Vielzahl von Studien am Tier und beim Menschen, welche die Mobilisation oder Transplantation von Vorläuferzellen als Therapieoption untersuchen. Die endogenen Reparaturvorgänge, die bei der Regeneration eine Rolle spielen und somit einen potentiellen therapeutischen Nutzen bieten, bleiben jedoch weitgehend unklar, obwohl das

Wissen über diese Vorgänge für die Entwicklung von spezifischen und effektiven Therapien unerlässlich erscheint.

Um den Kenntnisstand auf diesem Gebiet zu erweitern wurde in dieser Arbeit daher die Mobilisation endogener Vorläuferzellen im peripheren Blut von Patienten nach Myokardinfarkt untersucht.

Per Durchflusszytometrie wurde die Anzahl der CD34⁺ Zellen sowie die KDR, CD133 und CD117 positiven Subgruppen dieser Population im peripheren Blut von 10 Patienten mit akutem Myokardinfarkt (59 ± 5 Jahre, m/w=8/2) am Tag des Infarktes sowie an den Tagen 1-5 untersucht. Als Kontrollgruppen dienten Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung (CAD, $n=12$, 66 ± 2 Jahre, m/w=10/2) und junge gesunde Probanden ($n=7,26 \pm 2$ Jahre, m/w=3/4). CD34 und KDR/CD34, CD133/CD34 und CD117/CD34 positive Zellen waren an den Tagen 3 und 4 nach Myokardinfarkt erhöht.

Die KDR positive Fraktion innerhalb der CD34⁺ Zellen blieb unverändert ($58.3 \pm 7.8\%$ vs. $55.3 \pm 10.6\%$), während die CD133⁺ Fraktion ($64.9 \pm 3.1\%$ vs. $43.5 \pm 5.9\%$, $P=0.006$) und CD117⁺ Fraktion ($71.7 \pm 5.6\%$ vs. $50.1 \pm 5.5\%$, $P=0.02$) erhöht waren. Bei Patienten mit stabiler KHK ergab sich eine ähnliche Anzahl an Zellen und Zusammensetzung der Populationen wie bei Patienten mit Myokardinfarkt am Tag 0. Gesunde Kontrollprobanden hatten mehr CD34⁺ und mehr KDR/CD34, CD133/CD34 und CD117/CD34 positive Zellen als Patienten mit KHK und Patienten mit Infarkt am Tag 0. Die Fraktionen der Zellen unterschieden sich bei den Gesunden im Vergleich zu Patienten mit koronarer Herzerkrankung nicht, allerdings zeigte sich ein leichter Trend zu mehr KDR/CD34⁺ Zellen ($72.8 \pm 10.6\%$ vs. $50.5 \pm 5.6\%$, $P=0.058$).

Nach Myokardinfarkt ist also nicht nur die absolute Anzahl der CD34 positiven Zellen im peripheren Blut gesteigert, sondern es verändern sich auch die Anteile der verschiedenen Subpopulationen im peripheren Blut. Diese Tatsache weist auf eine selektive Mobilisierung nach Myokardinfarkt hin, deren Bedeutung für endogene Regenerationsvorgänge in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden muss.

6 Literaturverzeichnis

1. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ (2004) Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 110:3300-3305
2. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Wagner M, Isner JM (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-228
3. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967
4. Bengel FM, Schachinger V, Dimmeler S (2005) Cell-based therapies and imaging in cardiology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32 Suppl 2:S404-416
5. Botta R, Gao E, Stassi G, Bonci D, Pelosi E, Zwas D, Patti M, Colonna L, Baiocchi M, Coppola S, Ma X, Condorelli G, Peschle C (2004) Heart infarct in NOD-SCID mice: therapeutic vasculogenesis by transplantation of human CD34+ cells and low dose CD34+KDR+ cells. *FASEB* 18:1392-1394
6. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM (2003) Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 108:2212-2218
7. Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A (1988) The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature* 335:88-89
8. Cimini M, Fazel S, Zhuo S, Xaymardan M, Fujii H, Weisel RD, Li RK (2007) c-kit dysfunction impairs myocardial healing after infarction. *Circulation* 116:177-82
9. De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, Truffa S, Biglioli P, Napolitano M, Capogrossi MC, Pesce M (2004) SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood* 104:3472-3482

10. Dignat-George F, Sampol J (2000) Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol* 65:215-220
11. Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, Ren G, Entman ML, Frangogiannis NG (2006) Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res* 324:475-488
12. Fadini GP, Coracina A, Baesso I, Agostini C, Tiengo A, Avogaro A, de Kreutzenberg SV (2006) Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke* 37:2277-2282
13. Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, Verma S, Weisel RD, Keating A, Li RK (2006) Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest* 116:1865-1877
14. Fazel SS, Chen L, Angoulvant D, Li SH, Weisel RD, Keating A, Li RK (2008) Activation of c-kit is necessary for mobilization of reparative bone marrow progenitor cells in response to cardiac injury. *FASEB* 22:930-940
15. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, Gomez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez O, Sanchez PL, Hernandez C, Sanz R, Garcia-Sancho J, Sanchez A (2004) Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 95:742-748
16. Fransioli J, Bailey B, Gude NA, Cottage CT, Muraski JA, Emmanuel G, Wu W, Alvarez R, Rubio M, Ottolenghi S, Schaefer E, Sussman MA (2008) Evolution of the c-kit-positive cell response to pathological challenge in the myocardium. *Stem Cells* 26:1315-1324
17. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC (2004) Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol* 164:1935-1947
18. Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W (2000) In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106-3112

19. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S (2001) Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 88:167-174
20. Grundmann F, Scheid C, Braun D, Zobel C, Reuter H, Schwinger RH, Müller-Ehmsen J (2007) Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction. *Clin Res Cardiol* 96:621-627
21. Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, Miura T, Matsuzaki M, Esato K (2001) Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 65:845-847
22. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitoriano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA (2001) Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 97:3354-3360
23. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, 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
24. Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M, Ichiki T, Takeshita A, Egashira K (2004) Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation* 109:2454-2461
25. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Wacławski MA, Quyyumi AA, Finkel T (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593-600
26. Hristov M, Erl W, Weber PC (2003) Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1185-1189
27. Imanishi T, Hano T, Nishio I (2005) Estrogen reduces angiotensin II-induced acceleration of senescence in endothelial progenitor cells. *Hypertens Res* 28:263-271
28. Imanishi T, Hano T, Nishio I (2005) Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens* 23:1699-1706

29. Imanishi T, Kobayashi K, Hano T, Nishio I (2005) Effect of estrogen on differentiation and senescence in endothelial progenitor cells derived from bone marrow in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 28:763-772
30. Ito H, Rovira, II, Bloom ML, Takeda K, Ferrans VJ, Quyyumi AA, Finkel T (1999) Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer Res* 59:5875-5877
31. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T (2002) Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 105:732-738
32. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107:1395-1402
33. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F (2006) Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367:113-121
34. Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G (1997) Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 124:2039-2048
35. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T (2000) Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3422-3427
36. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE, Jr. (2001) Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 7:1035-1040
37. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T (2001) Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103:634-637
38. Kukiela GL, Smith CW, LaRosa GJ, Manning AM, Mendoza LH, Daly TJ, Hughes BJ, Youker KA, Hawkins HK, Michael LH, et al. (1995) Interleukin-8 gene

- induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* 95:89-103
39. Kupatt C, Hinkel R, Lamparter M, von Bruhl ML, Pohl T, Horstkotte J, Beck H, Muller S, Delker S, Gildehaus FJ, Buning H, Hatzopoulos AK, Boekstegers P (2005) Retroinfusion of embryonic endothelial progenitor cells attenuates ischemia-reperfusion injury in pigs: role of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase. *Circulation* 112:1117-122
40. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickenig G (2004) Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109:220-226
41. Li TS, Hamano K, Nishida M, Hayashi M, Ito H, Mikamo A, Matsuzaki M (2003) CD117+ stem cells play a key role in therapeutic angiogenesis induced by bone marrow cell implantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H931-937
42. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ (2004) Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 53:195-199
43. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K (2006) Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355:1199-1209
44. Madeddu P, Emanuelli C, Pelosi E, Salis MB, Cerio AM, Bonanno G, Patti M, Stassi G, Condorelli G, Peschle C (2004) Transplantation of low dose CD34+KDR+ cells promotes vascular and muscular regeneration in ischemic limbs. *FASEB* 18:1737-1739
45. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertoletti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L (2005) Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 105:199-206
46. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90:5013-5021

47. Müller-Ehmsen J, Braun D, Schneider T, Pfister R, Worm N, Wielckens K, Scheid C, Frommolt P, Flesch M (2008) Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: beneficial effects of weight reduction. *Eur Heart J* 29:1560-1568
48. Müller-Ehmsen J, Grundmann F, Schwinger RH, Schinköthe T (2005) Letters regarding article by Wojakowski et al, "mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction". *Circulation* 111:e307; author reply e307-308
49. Müller-Ehmsen J, Scheid C, Grundmann F, Hirsch I, Turan G, Tossios P, Mehlhorn U, Schwinger RH (2005) The mobilization of CD34 positive mononuclear cells after myocardial infarction is abolished by revascularization of the culprit vessel. *Int J Cardiol* 103:7-11
50. Müller-Ehmsen J, Schmidt A, Krausgrill B, Schwinger RH, Bloch W (2006) Role of erythropoietin for angiogenesis and vasculogenesis: from embryonic development through adulthood. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H331-340
51. Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T, Kalka C (2002) Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol* 30:967-972
52. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H (1998) Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125:1747-1757
53. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, 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
54. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT (2003) Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 107:2294-2302

55. Peters WP, Rosner G, Ross M, Vredenburg J, Meisenberg B, Gilbert C, Kurtzberg J (1993) Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. *Blood* 81:1709-1719
56. Pruijt JF, Willemze R, Fibbe WE (1999) Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8. *Curr Opin Hematol* 6:152-158
57. Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Delilieri GL (2001) Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 115:186-194
58. Rafii S, Lyden D (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9:702-712
59. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL (2003) Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107:1164-1169
60. Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG (2003) Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2:242-256
61. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R (2002) Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8:403-409
62. Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM (2004) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 44:1690-1699
63. Schächinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM (2006) Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 27:2775-2783
64. Schmeisser A, Garlachs CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG (2001) Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers

- and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 49:671-680
65. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM (2005) Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111:2981-2987
 66. Schomig K, Busch G, Steppich B, Sepp D, Kaufmann J, Stein A, Schomig A, Ott I (2006) Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 27:1032-1037
 67. Shi Q, Raffi S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92:362-367
 68. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T (2001) Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103:2776-2779
 69. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361:45-46
 70. Steurer M, Kern J, Zitt M, Amberger A, Bauer M, Gastl G, Untergasser G, Gunsilius E (2008) Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: comparison of quantitative PCR and four-channel flow cytometry. *BMC Res Notes* 1:71
 71. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2001) [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr* 126:932-938
 72. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I (1996) The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother* 5:213-226
 73. Takamiya M, Okigaki M, Jin D, Takai S, Nozawa Y, Adachi Y, Urao N, Tateishi K, Nomura T, Zen K, Ashihara E, Miyazaki M, Tatsumi T, Takahashi T, Matsubara H (2006) Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized circulating c-Kit+/Flk-1+ progenitor cells regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:751-757

74. Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Lecomte-Raclet L, Clergue M, Duriez M, Tobelem G, Levy BI (2004) Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol* 164:457-466
75. Tang J, Wang J, Yang J, Kong X (2008) Adenovirus-mediated stromal cell-derived-factor-1alpha gene transfer induces cardiac preservation after infarction via angiogenesis of CD133+ stem cells and anti-apoptosis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 7:767-770
76. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC (2002) Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106:2781-2786
77. Timmermans F, Plum J, Yoder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J (2008) Endothelial progenitor cells: Identity defined? *J Cell Mol Med*
78. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP (2003) Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361:47-49
79. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S (2003) Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 108:2511-2516
80. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103:2885-2890
81. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89:E1-7
82. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM (2002) Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 105:3017-3024
83. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353:999-1007

84. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, Majka M, Kucia M, Maslankiewicz K, Wyderka R, Ochala A, Ratajczak MZ (2004) Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 110:3213-3220
85. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364:141-148
86. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T (2003) Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107:1322-1328
87. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997) AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90:5002-5012

7 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

- | | |
|---------------------|----------------------------|
| ▪ Name | Franziska Sophie Grundmann |
| ▪ Nationalität | deutsch |
| ▪ Geburtsdatum/-ort | 12. Juni 1980 in Hamburg |

AUSBILDUNG

- | | |
|-------------|--|
| ▪ 1999 | Abitur am „Gymnasium Corveystraße“ in Hamburg (Note 1,0) |
| ▪ 2000-2007 | Medizinstudium an der Universität zu Köln |
| ▪ 09/2002 | Physikum (Note 1,66) |
| ▪ 08/2003 | 1. Staatsexamen (Note 2,0) |
| ▪ 04/2006 | 2. Staatsexamen (Note 2,0) |
| ▪ 06/2007 | 3. Staatsexamen (Note 1,0) |
| ▪ 07/2007 | Approbation |

BERUFLICHER WERDEGANG

- | | |
|----------------|--|
| ▪ seit 08/2007 | Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin IV der Universität zu Köln (Nephrologie und Allgemeine Innere Medizin).
Leiter: Univ.- Prof. Dr. Th. Benzing |
|----------------|--|

FÖRDERUNG

- | | |
|-----------------|---|
| 06/2005-05/2006 | Promotionsstipendium für Studierende im Rahmen des Köln Fortune Programms |
|-----------------|---|

VERÖFFENTLICHUNGEN

- | | |
|---|---|
| ▪ Grundmann F, Scheid C, Braun D, Schwinger RHG, Müller-Ehmsen J. | Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction <i>Clin Res Cardiol.</i> 2007 Sep;96(9):621-7. |
| ▪ Müller-Ehmsen J, Scheid C, Grundmann F, Hirsch I, Turan G, Tossios P, Mehlhorn U, Schwinger RH. | The mobilization of CD34positive mononuclear cells after myocardial |

infarction is abolished by revascularization of the culprit vessel. *Int J Cardiol.* 2005;103:7-11.

- Müller-Ehmsen J, Grundmann F, Schwinger RHG, Schinköthe T. Letter regarding article by Wojakowski et al „mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction”. *Circulation* 2005; 111: e307.

PRÄSENTATIONEN

- Grundmann F, Schenk K, Scheid C, Müller-Ehmsen J. Unterschiedlicher Anstieg von CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 und CD117/CD34 positiven Zellen im peripheren Blut von Patienten mit akutem Myokardinfarkt. *Z. Kardiologie* 2005; Suppl. I, Vol 94; *Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, April 2005, Mannheim*

POSTERPRÄSENTATIONEN

- Grundmann F, Scheid C, Schinköthe T, Staib P, Braun D, Müller-Ehmsen . Anstieg von SCF und CD117 / CD34 doppelt positiven Zellen, aber nicht von allen CD117 positiven Zellen im peripheren Blut von Patienten nach Myokardinfarkt; *Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, April 2007, Mannheim*

AUSLANDSAUFENTHALTE

- | | |
|-------------------|---|
| ▪ 09/1996-11/1996 | Schulbesuch des „Johnson Collegiate“ in Regina / Kanada |
| ▪ 03/2000-10/2000 | Freiwilligendienst als Englischlehrerin für den „American Field Service“ in Nakhon Si Thammarat / Thailand |
| ▪ 02/2003-04/2003 | Famulatur in der Plastischen Chirurgie und Verbrennungschirurgie für Kinder im „Instituto de Salud del Niño“ in Lima / Peru |
| ▪ 08/2004-10/2004 | Famulatur in der Dermatologie im „Siriraj Hospital“ der Mahidol Universität in Bangkok / Thailand |
| ▪ 04/2006-08/2006 | Chirurgie im Rahmen des Praktischen Jahres in der Nelson Mandela Medical School in Durban / Südafrika |