

**Aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg**

Intramyokardiale Transplantation
autologer CD133⁺ Knochenmarkszellen
nach endogenem Laser-induzierten ventrikulären Enhancement
im Rahmen Aortokoronarer Bypassoperationen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Lena Stephanie Michaelis de Vasconcellos geb. Ptok

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Michael Klein

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger Krauspe

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Assmann A, Heke M, Kröpil P, Ptok L, Hafner D, Ohmann C, Martens A, Karluß A, Emmert MY, Kutschka I, Sievers HH, Klein HM. Laser-supported CD133+cell therapy in patients with ischemic cardiomyopathy: initial results from a prospective phase I multicenter trial, PLoS One. 2014 Jul 7;9(7):e101449

I. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Problemstellung..... | 1 |
| 1.2 | Koronare Herzkrankheit..... | 2 |
| 1.2.1 | Therapie der Koronaren Herzkrankheit..... | 3 |
| 1.2.2 | Kausale Therapie..... | 4 |
| 1.2.3 | Symptomatische Therapie..... | 4 |
| 1.3 | Zelltherapie..... | 6 |
| 1.3.1 | Zellarten..... | 7 |
| 1.3.2 | Zellgewinnung..... | 10 |
| 1.3.3 | Zellapplikation..... | 10 |
| 1.4 | Transmyokardiale Laserrevaskularisation..... | 11 |
| 2 | Material und Methoden | 13 |
| 2.1 | Patientenakquisition..... | 13 |
| 2.1.1 | Einschlusskriterien für die Zelltherapiegruppe..... | 13 |
| 2.1.2 | Ausschlusskriterien für die Zelltherapiegruppe..... | 14 |
| 2.1.3 | Fall-Kontroll-Studie..... | 15 |
| 2.2 | Präoperative Diagnostik..... | 16 |
| 2.3 | Präoperative Patientencharakteristika..... | 16 |
| 2.3.1 | Präoperative kardiale Beeinträchtigung..... | 16 |
| 2.3.2 | Nebendiagnosen..... | 17 |
| 2.3.3 | Vorausgegangene Eingriffe..... | 18 |
| 2.3.4 | Präoperative Medikamente und Intubation..... | 19 |
| 2.3.5 | EuroSCORE II..... | 20 |
| 2.4 | Operations-Protokoll..... | 21 |
| 2.4.1 | Intraoperative autologe Knochenmarkszellgewinnung..... | 23 |
| 2.4.2 | CD133 ⁺ Knochenmarkszellaufbereitung..... | 23 |
| 2.4.3 | Revaskularisation und endogenes Laser-induziertes ventrikuläres Enhancement..... | 26 |
| 2.4.4 | Transplantation..... | 27 |
| 2.5 | Perioperative Dokumentation und Versorgung..... | 27 |
| 2.6 | Primäre Endpunkte..... | 28 |
| 2.7 | Sekundäre Endpunkte..... | 28 |
| 2.8 | Nachsorge..... | 28 |
| 2.9 | Methoden der statistischen Auswertung..... | 29 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3 | Ergebnis | 31 |
| 3.1 | <i>EuroSCORE II</i> | 31 |
| 3.2 | Machbarkeit des <i>Düsseldorfer Protokolls</i> | 32 |
| 3.3 | Postoperative Werte in der Klinik..... | 33 |
| 3.4 | Operative Mortalität | 34 |
| 3.5 | Nachsorge | 35 |
| 3.6 | Überlebensrate | 35 |
| 3.7 | Postoperative LVEF | 36 |
| 3.8 | Nachuntersuchung | 40 |
| 3.9 | Lebensqualität | 40 |
| 4 | Diskussion | 41 |
| 4.1 | Sicherheit und Machbarkeit | 41 |
| 4.2 | Simultaner Ablauf | 44 |
| 4.3 | Verbesserung der kardialen Funktion | 45 |
| 4.4 | Studienlimitation | 49 |
| 4.5 | Schlussfolgerung | 50 |
| 5 | Zusammenfassung | 51 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 53 |
| 7 | Eidesstattliche Versicherung | 63 |
| 8 | Danksagung | 64 |
| A1 | Anhang: Seattle Angina Fragebogen | 65 |

II. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----|
| Abb. 1: | Patientenkollektiv | 15 |
| Abb. 2: | <i>Düsseldorfer Protokoll</i> | 22 |
| Abb. 3: | <i>CliniMACS® plus Instrument</i> | 25 |
| Abb. 4: | Exemplarische Darstellung einer FACS Analyse der Reinheit der CD 133 ⁺ Zellen aus Gruppe A..... | 32 |
| Abb. 5: | Exemplarische Darstellung einer FACS Analyse der Vitalität der CD 133 ⁺ Zellen aus Gruppe A | 33 |
| Abb. 6: | <i>Kaplan-Meier-Kurve</i> | 36 |
| Abb. 7: | LVEF-Entwicklung in Gruppe A (***) = $p < 0,001$) | 37 |
| Abb. 8: | LVEF-Werte Gruppe A1 | 37 |
| Abb. 9: | LVEF-Werte ungematchter Patienten der Gruppe A | 38 |
| Abb. 10: | LVEF-Werte Gruppe B1 | 39 |
| Abb. 11: | LVEF-Zuwachs A1, B1 (* = $p < 0,05$) | 39 |

III. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Klassifikation der AP nach CCS [1, S. 26]..... | 3 |
| Tabelle 2: Präoperative kardiale Beeinträchtigung..... | 17 |
| Tabelle 3: Nebendiagnosen | 18 |
| Tabelle 4: Präoperative Medikation des Patientenkollektives | 19 |
| Tabelle 5: EuroSCORE II Ergebnisse im Einzelvergleich | 31 |
| Tabelle 6: Postoperative Werte in der Klinik | 34 |

IV. Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|------------|---|-------|--|
| (A)MI | (Akuter) Myokardinfarkt | HF | Herzfrequenz |
| ACB | Aortokoronare Bypassoperation | HLA | Humanes Leukozyten Antigen |
| AP | Angina Pectoris | HLM | Herz-Lungen- Maschine |
| BPS Puffer | Phosphat-gepufferte Salzlösung | HRST | Herzrhythmusstörung |
| CCS | Canadian Cardio- vascular Society | HSA | Humanes Serum Albumin |
| CD | Cluster of Differentiation | HSC | Hämatopoetische Stammzelle |
| CPC | Zirkulierende periphere Progenitorzelle | KHK | Koronare Herzkrankheit |
| EDTA | Ethylen- diamintetraacetat | LV | Linksventrikulär |
| ELIVE | endogenes Laser- induziertes ventrikuläres Enhancement | MACCE | Schwerwiegendes unerwünschtes Kardiovaskuläres oder Zerebrovaskuläres Ereignis |
| EF | Ejektionsfraktion | MNBMC | Mononukleäre Knochenmarkszelle |
| LVEF | Linksventrikuläre Ejektionsfraktion | MRT | Magnetresonanz- tomographie |
| EPC | Endotheliale Progenitorzelle | MSC | Mesenchymale Stammzelle |
| ESC | Embryonale Stammzelle | NU | Nachuntersuchung |
| EuroSCORE | European System for Cardiac Operative Risk Evaluation | OP | Operation |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting | pAVK | Peripher-arterielle Verschlusskrankheit |
| | | PCI | Perkutane Koronare Intervention |
| | | SD | Standardabweichung |

| | | | |
|---------|---|--------|-------------------------------------|
| SEM | Standardfehler | V-HRST | Ventrikuläre Herzrhythmusstörung |
| SV-HRST | Supraventrikuläre Herzrhythmusstörung | Z.n. | Zustand nach |
| TMLR | Transmyokardiale Laser- Revaskularisation | | |

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

In der Herzchirurgie sind circa. 75% aller durchgeführten Operationen (OP) Aortokoronare-Bypassoperationen (ACB). Die hohe Anzahl der Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen gibt Anlass, in diesem Bereich intensiver zu forschen, um neue Behandlungsmethoden zu entwickeln und bestehende zu verbessern. Dank umfangreicher Untersuchungen der therapeutischen Möglichkeiten bei Koronarer Herzkrankheit (KHK), ergeben sich immer vielfältigere Optionen zur Therapie und Intervention vor der OP. Die Verbesserung und Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten, zum Beispiel der Perkutanen Koronaren Intervention (PCI) mit Stent-Einlage, ermöglicht es, Patienten über einen längeren Zeitraum ohne ACB zu therapieren. Wenn schließlich eine ACB durch einen progredienten Befund indiziert ist, sehen sich Herzchirurgen zunehmend mit Patienten konfrontiert, die allgemein einen sehr schlechten gesundheitlichen Status aufweisen einhergehend mit einem höheren Risiko für Morbidität und Mortalität.

Unter diesen kardiochirurgischen Patienten gibt es eine kleine Gruppe von Hochrisikopatienten, die eine extrem reduzierte Herzfunktion aufweisen und im Hinblick auf Alternativen zur ACB (medikamentös, PCI) entweder bereits austherapiert sind oder bei denen diese generell nicht (mehr) in Frage kommen. Erschwerend sind dabei nicht mehr bypassfähige Koronargefäße, deren Versorgungsgebiet dringend revaskularisiert werden müsste. Publikationen der vergangenen Jahre verweisen auf die Möglichkeit myokardialer Regeneration durch Zelltherapie, insbesondere für Patienten mit austherapierter ischämischer Kardiomyopathie. Darüber hinaus konnten bei dieser Patientengruppe positive Effekte der Transmyokardialen Laserrevaskularisation (TMLR) aufgezeigt werden.

Anlässlich dieser Forschungserkenntnisse und mit Blick auf die Gruppe der oben vorgestellten KHK-Hochrisikopatienten soll die vorliegende Dissertationsschrift folgende Fragen beantworten:

1. Ist eine Kombination aus ACB und TMLR-unterstützter Zelltherapie sicher und durchführbar bei diesen Patienten?
2. Kann die Zellgewinnung und Zellaufbereitung parallel zur ACB erfolgen?
3. Trägt diese Dreifach-Therapie das Potenzial zur myokardialen Regeneration?

1.2 Koronare Herzkrankheit

In den aktuellen Nationalen Versorgungsleitlinien von 2013 wird die KHK wie folgt benannt:

„Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzarterien. Sie führt häufig zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Herzmuskel. Eine KHK ist mit einem erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko verbunden. Bei häufigem Auftreten von Angina-pectoris-Beschwerden ist die Lebensqualität vermindert.“ [1, S.24]

Epidemiologie und Ökonomie

Weltweit sind die Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache, in Deutschland waren es 2011 rund 40% [2, S.10; 3, S.1]. An erster Stelle steht nach Angaben des Statistischen Bundesamtes dabei die KHK mit 127.101 Todesfällen, gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (AMI) mit 52.113 Sterbefällen [3, S.4]. Die Lebenszeitprävalenz wird bei Männern auf ca. 30%, bei Frauen auf 15% geschätzt, wobei die Inzidenz im Alter zunimmt [4, S.236]. 15% der Gesamtkosten des Gesundheitssystems wurden 2006 für Herz-Kreislaufkrankungen investiert, gefolgt von Erkrankungen des Verdauungssystems mit 13,8% [5, S.13]. Diese Zahlen veranschaulichen den Stellenwert der Herz-Kreislaufkrankungen und verdeutlichen die Relevanz weiterer Forschung.

Ätiologie und Pathogenese

Ursache der KHK ist die Atherosklerose der Koronararterien. Die Entstehung der Gefäßverkalkung ist multifaktoriell bedingt, ihr Ursprung liegt häufig bereits im jungen Erwachsenenalter und sie ist zumeist systemisch ausgebreitet. Die Unterteilung der Entstehung erfolgt in:

Beeinflussbare Risikofaktoren

- Bluthochdruck
- Adipositas
- Fettstoffwechselstörungen
- Diabetes mellitus
- Nikotinabusus
- Körperlicher Bewegungsmangel
- Thrombophilie

Nicht beeinflussbare Risikofaktoren

- Alter (zunehmend)
- Geschlecht (♂ > ♀)
- Erbliche Faktoren

Die Atherosklerose in den Koronargefäßen führt zu einem erhöhten Koronarwiderstand, mit der Folge einer eingeschränkten Elastizität und Verengung der Gefäße. Unter Anstrengung kann es zu einem lokalen Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf kommen - einer Koronarinsuffizienz. Persistierender Sauerstoffmangel im Gewebe verursacht Ischämien. Nach Lage der atherosklerotischen Manifestation spricht man von Makroangiopathie oder Mikroangiopathie. Bei umfassend irreversibel geschädigtem Gewebe kommt es zu einer ischämischen Kardiomyopathie. Dort vorhandene kardiale Stammzellen sind nicht in der Lage dieses geschädigte Myokard ausreichend regenerativ zu verbessern [6]. Durch endogene Remodelingprozesse werden die irreversibel geschädigten Kardiomyozyten durch partiell azelluläres Narbengewebe ersetzt. Als Folge dessen resultieren der Verlust der strukturellen Integrität, mechanische Dysfunktionen und gegebenenfalls Herzrhythmusstörungen (HRST) [7]. Dadurch können Angina Pectoris (AP), verminderte körperliche Belastbarkeit, Myokardinfarkt (MI), Arrhythmien oder plötzlicher Herztod auftreten.

Einteilung der AP

Die Einteilung der AP ist in *Tabelle 1* aufgeführt. Sie erfolgt nach der *CCS-Klassifikation (Canadian Cardiovascular Society)* in vier Schweregrade, belastungsabhängig.

Tabelle 1: Klassifikation der AP nach CCS [1, S. 26]

| CCS Grad | Definition |
|----------|---|
| I | Keine AP bei Alltagsbelastung (Laufen, Treppensteigen), jedoch bei plötzlicher oder längerer physischer Belastung |
| II | AP bei stärkerer Anstrengung (schnelles Laufen, Bergaufgehen, Treppensteigen nach dem Essen, in Kälte, Wind oder psychischer Belastung) |
| III | AP bei leichter körperlicher Belastung (normales Gehen, Ankleiden) |
| IV | Ruhebeschwerden oder Beschwerden bei geringster körperlicher Belastung |

1.2.1 Therapie der Koronaren Herzkrankheit

Die Therapie der KHK gliedert sich in kausale und symptomatische Ansätze. Zu einer umfassenden Therapie, die bis zur Symptomfreiheit führt, ist eine symptomatische Behandlung der KHK im fortgeschrittenen Stadium unumgänglich, da kausale Ansätze nicht mehr zu einer adäquaten Restitution

führen können. Die Therapieansätze werden durch neue Forschungsergebnisse in den Leitlinien regelmäßig aktualisiert [1].

1.2.2 Kausale Therapie

Ein kausaler Therapieansatz bei der Behandlung der KHK bedeutet die Reduzierung bzw. Ausschaltung der Risikofaktoren einer Atherosklerose. Da die Grundbausteine der Atherosklerose bereits in jungen Jahren gelegt werden, ist es schwierig, nach der Manifestation einer Atherosklerose noch eine ausreichende Wirkung zu erzielen. Anhand spezifizierter Risikofaktoren kann man das Gesamtrisiko eines Patienten einschätzen und unter Mitarbeit des Patienten die beeinflussbaren Risikofaktoren verringern. Zu den kausalen Therapieansätzen zählen:

- Lebensstiländerung
- Bluthochdruckeinstellung
- Gewichtsreduktion
- Fettstoffwechselstörungen beseitigen
- Blutzuckerwerte kontrollieren sowie therapieren
- Nikotinkarenz
- Regelmäßige körperliche Bewegung
- Blutgerinnungswerte wenn nötig medikamentös einstellen.

1.2.3 Symptomatische Therapie

Um eine vollständige Symptombefreiheit bei den KHK-Patienten erreichen zu können, müssen neben den bereits erwähnten Maßnahmen noch weitere unterstützende Schritte eingeleitet werden. Zu den symptomatischen Therapieansätzen zählen die medikamentöse Therapie, revaskularisationstherapeutische Ansätze mit PCI, ggf. mit Stent-Einsatz sowie bei progredientem Befund eine ACB. Zuletzt besteht die Möglichkeit einer Herztransplantation.

Die Basistherapieempfehlung der medikamentösen Therapie zur Risikominderung eines MI und zur Senkung der Letalität besteht aus: [4, S.244]

- Thrombozytenaggregationshemmern
- Betarezeptorenblockern
- Statinen

Patienten, die der eingangs erwähnten Hochrisikogruppe angehören, bekommen in der Regel die medikamentöse Maximaltherapie. Zeigt diese aber keine ausreichende Wirkung, müssen weitergehende Therapiemaßnahmen eingeleitet werden. An diesem Punkt setzt die Revaskularisationstherapie an.

Eine Koronarrevaskularisation hat das Ziel, die Symptome und Folgen, z.B. das MI-Risiko zu senken und die Prognose der KHK zu verbessern. Durch die intensive Forschung und neue Erkenntnisse im Bereich der Revaskularisation unterliegen die Therapieempfehlungen einem stetigen Wandel. Die aufgeführten Angaben beruhen auf den Empfehlungen der *Nationalen Versorgungs-Leitlinie Chronische KHK 2. Auflage Version 1 Juli 2013*. Diese „begründen sich aus prospektiv-randomisierten Vergleichsstudien und risikoadjustierten Analysen großer Behandlungskohorten, untersetzt von Meta-Analysen“ [1, S.52]. Zu den etablierten Revaskularisationsverfahren gehören unter anderem die PCI und die ACB. Eine Revaskularisationstechnik ermöglicht allerdings in den wenigsten Fällen ein vollständiges Absetzen der Begleitmedikation.

Bei der PCI oder auch Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie wird ein Ballonkatheter in die Koronarien eingebracht und stenosierte Gefäße unter Druck langsam aufgeweitet. Es wurde 1978 erstmalig von *Gruntzig* beschrieben [8]. Häufig wird diese therapeutische Maßnahme in Kombination mit einer Stent-Implantation durchgeführt, um eine bessere und länger anhaltende Gefäßdurchlässigkeit zu erzielen. Dieses Verfahren ist gegenüber der ACB weniger invasiv und wird in vielen Fällen als therapeutische Maßnahme vor der ACB durchgeführt. Insbesondere hinsichtlich des Materials für Stents gab es in den letzten Jahren zahlreiche Weiterentwicklungen. So kommen heute vermehrt speziell mit antiproliferativen Substanzen beschichtete Stents zum Einsatz, die die Rate der Reinterventionen reduzieren können [4, S.245]. Jedoch konnte die Mortalität sowie die Inzidenz der MI im Vergleich zu unbeschichteten Stents nicht verbessert werden [9].

Indikationen für die PCI nach der *Nationalen Versorgungs-Leitlinie Chronische KHK 2. Auflage Version 1 Juli 2013* sind im Folgenden aufgeführt [1, S.53]:

- Nicht medikamentös beherrschbare AP
- Koronare ein- oder zwei-Gefäßerkrankungen mit hochgradigen proximalen Stenosen (>70%)
- Akuter und chronischer Verschluss von Koronargefäßen oder aortokoronaren Bypassgefäßen
- Eingeschlossen sind auch Patienten >75 Jahre mit persistierender Symptomatik.

Die ACB wurde 1968 erstmals von *Favaloro* beschrieben und hat sich seitdem in der Herzchirurgie etabliert [10]. Über einen Sternotomie-Zugang und unter Anwendung einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) wird bei der klassischen ACB mit Hilfe einer kardioplegischen Lösung ein Herzstillstand herbeigeführt. Die Sauerstoffanreicherung des Blutes und die Pumpfunktion übernimmt in dieser Zeit die HLM. Die Koronarstenosen werden durch Bypässe überbrückt, die aus körpereigenen Grafts, wie zum Beispiel der *Arteria thoracica interna* oder venösem Material (*Vena saphena*) bestehen. Diese Technik verbessert die Blutversorgung des Myokards distal des Stenosebereiches. Indikationen für die ACB nach der *Nationalen Versorgungs-Leitlinie Chronische KHK 2. Auflage Version 1 Juli 2013* sind im Folgenden aufgeführt [1, S.53f.]:

- Nicht medikamentös beherrschbare AP
- Koronare Mehrgefäßerkrankungen, besonders 3-Gefäßerkrankungen mit hochgradigen proximalen Stenosen (>70%)
- KHK mit signifikanter (>50%) linkskoronarer Hauptstammstenose
- Eingeschlossen sind auch Patienten >75 Jahre mit persistierender Symptomatik.

Die einzige Therapie, die dem Verlust der Kardiomyozyten entgegenwirkt, ist die Herztransplantation. Dies ist allerdings nur in seltenen Fällen eine erfolgreiche Alternative, da die Anzahl der Organspender in Deutschland, im Gegensatz zur Zahl der Patienten, die auf der Transplantationswarteliste stehen, sehr gering ist. Besonders für ältere Patienten ist es aufgrund höherer Komorbidität bedeutend schwerer oder altersbedingt gar nicht möglich, ein Transplantat zu erhalten. Außerdem gibt es auch Patienten, die aus persönlichen Gründen eine Organtransplantation ablehnen.

1.3 Zelltherapie

In den letzten Jahren rückte die Erforschung von therapeutischen Zellapplikationen und ihren Auswirkungen immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus. Eine Myokardischämie ist mit dem Untergang von Kardiomyozyten vergesellschaftet. Die aktuellen Therapiemöglichkeiten der KHK sind jedoch größtenteils symptomatisch, da ischämisches Gewebe nicht mehr kurativ behandelbar ist. Besonders im Bereich der irreversiblen Herzschädigung werden neue Ansätze erforscht, die eine Verbesserung der Herzleistung erbringen sollen. Die Erforschung der potenziell therapeutisch relevanten Zelllinien hat bereits zahlreiche Ergebnisse in Bezug auf die erfolgreiche Anzüchtbarkeit, die Anwendung *in vitro* und bei lebenden Organismen gebracht. Diese Kriterien waren für die Auswahl der Zellen in dieser Studie sehr hilfreich.

1.3.1 Zellarten

Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESCs), die Ausgangszellen für menschliches Leben, sind pluripotent. Somit haben sie das Potential, sich noch in jedes menschliche Gewebe auszudifferenzieren [11]. Jedoch stellt neben ethischer und moralischer Bedenken gegen die embryonale Stammzellforschung -oft auch kontrovers von Wissenschaftlern und Ethikern diskutiert- das *Embryonen-Schutzgesetz ESchG* vom 13.12.1990, zuletzt geändert 2001 (bislang noch) das größte Hindernis zur weiteren Erforschung dar und macht einen Einsatz als Therapiemöglichkeiten der KHK in Deutschland zurzeit unmöglich.

Postembryonale Stammzellen und Progenitorzellen

Die postembryonalen Stammzellen und Progenitorzellen umfassen eine ganze Reihe an Zellen, die nicht mehr pluripotent wie die ESCs, sondern nur noch multipotent sind.

Hierzu zählen unter anderem:

- Myoblasten
- Kardiale Stammzellen
- Knochenmarksprogenitorzellen mit:
 - Mesenchymale Stammzellen (MSCs)
 - Mononukleare Knochenmarkszellen (MNBMCs)
 - CD133⁺ Zellen

Myoblasten

Myoblasten sind die Stammzellen der Skelettmuskelfasern auch bekannt als Satellitenzellen. In geschädigte Rattenherzen transplantiert zeigten autolog verwendete Myoblasten Unterstützung der linksventrikulären (LV) Funktion sowie einen gemilderten Remodelingprozess nach MI [12]. 2003 konnten *Leobon et al.* Isolationen von transplantierten Myoblasten in Rattenherzen nachweisen, die sich jedoch nicht mit dem umgebenden Myokard synchronisierten [13]. In der großen randomisierten Placebo-kontrollierten Studie *MAGIC* wurden vermehrt Arrhythmien in der Gruppe der Myoblastenempfänger festgestellt [14]. Aus diesem Grund sollte der Einsatz diese Zellen kritisch betrachtet werden.

Kardiale Stammzellen

Entgegen der Annahme Kardiomyozyten hätten keine Proliferationskapazität mehr, fanden *Kajstura et al.* in Herzen bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie eine signifikant höhere Anzahl von mitotischen Kardiomyozyten als in gesunden Herzen [15]. Fakt ist allerdings, dass das

menschliche Herz nicht in der Lage ist, sich trotz kardialer Stammzellen bei ischämischen Erkrankungen selbst nachhaltig zu regenerieren. Mit kardialen Stammzellen behandelten Mäuse zeigten im Echokardiogramm einen besseren Erhalt der Vorderwanddicke sowie eine deutlich höhere Verkürzungsfraction des Herzens im Vergleich zu der Kontrollgruppe [16]. Im humanen Versuch würde vor allem die Gewinnung dieser kardial residierenden Zellen eine Herausforderung darstellen.

Knochenmarksprogenitorzellen

Knochenmarksprogenitorzellen sind eine sehr heterogene Gruppe an Zellen [17], deren wichtigste Vertreter in Bezug auf die Herzfunktion, im Folgenden vorgestellt werden.

MSCs sind Bindegewebsprogenitorzellen. Die große Variabilität von Bindegeweben in Form von Knochen, Knorpel, Muskel- und Sehngewebe sowie Fettgewebe zeigt das hohe Differenzierungspotential dieser Zellen. Im Kontext der KHK sind diese Stammzellen von besonderem Interesse im Hinblick auf die potenzielle Regeneration der myokardialen Funktion nach ausgedehnter myokardialer Ischämie. *Makino et al.* konnten in *in vitro* Studien MSCs von Mäusen isolieren und diese in synchron schlagende Kardiomyozyten differenzieren [18]. Zusätzlich konnte in einer *in vivo* Studie an Ratten nach autologer Transplantation eine Angiogenese im Myokardnarbenbereich nachgewiesen werden [19]. Bislang sind die meisten Nachweise von positiven Effekten nur in Tierstudien gezeigt worden. *Chen et al.* ist es gelungen, in einer randomisierten Studie mit 69 Probanden eine Steigerung der LV-Funktion nach autologer intrakoronarer MSC-Gabe bei Patienten nach AMI zu demonstrieren [20]. So positiv sich die Vielfalt der MSCs auf den ersten Blick darstellt, scheinen hier zugleich die Risiken zu liegen. In einer Studie, die ebenfalls an Mäusen durchgeführt wurde, fand man nach der Transplantation Ossifikationen im Infarktbereich [21]. Die genaue Steuerbarkeit der transplantierten Zellen, sich in gewünschte Gewebe zu differenzieren, bleibt problematisch.

Zu den MNBMCs werden unter anderem die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), die zirkulierenden peripheren Progenitorzellen (CPCs) sowie die zu den HSCs gehörenden endothelialen Progenitorzellen (EPCs) gezählt [17]. Diese Gruppe von Stammzellen findet sich als MNBMCs bereits häufig in Studien angewandt. *Yeh et al.* konnten im Tierexperiment zeigen, dass menschliche CPCs in Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen ausdifferenziert werden können [22]. *Orlic et al.* transplantierten im Tiermodell hämatopoetische Zelllinien und konnten somit demonstrieren, dass infarziertes Myokard das Potential hat, sich zu regenerieren [23]. Des Weiteren erforschten *Kocher et al.* im Tierexperiment, dass EPCs nach einem MI die Fibrosierung inhibieren [24]. Nach akuten ischämischen Ereignissen haben *Shinatani et al.* bei einer Studie mit 24 Patienten eine Mobilisierung von EPCs gesehen [25]. Im Gegensatz zum akuten Ereignis korrelierten die Anzahl und Aktivität der EPCs

antiproportional zu den Risikofaktoren der KHK [26]. In einer Metaanalyse von 18 klinischen Studien in Bezug auf die kardio-vaskuläre Wirkung nach Transplantation von MNBMCs, CPCs und auch MSCs fanden *Abdel-Latif et al.* heraus, dass diese Zellen eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) und des LV endsystolischen Volumens sowie eine Verkleinerung der Infarkt Narbe bei KHK Patienten bewirkten [27]. *Strauer et al.* konnten in einer Fall-Kontroll-Studie mit insgesamt 20 Patienten eine klinische Signifikanz bei der Verkleinerung der Infarktregion in der MNBMCs-Gruppe bestätigen ebenso eine Steigerung der Wandbewegung in der Infarktzone. Nicht signifikant waren diese Ergebnisse in der Kontrollgruppe. Des Weiteren stellte die Forschungsgruppe eine verbesserte Myokardperfusion bei der Fall-Gruppe fest. Sie kamen zu dem Schluss, die Methode sei sicher und machbar [28]. *Janssens et al.* konnten nach Injektion von NMBMCs hingegen keine Verbesserung der LV Funktion feststellen jedoch eine Reduktion der Infarkt Narbe bei Patienten nach MI [29]. Zusammenfassend kann man sagen, dass MNBMC offensichtlich in der Lage sind nach myokardialer Schädigung die LV-Funktion zu verbessern.

CD133⁺ Zellen

Diese spezielle Zellart wird hier noch einmal gesondert besprochen, da sie nicht ausschließlich einer Gruppe von Vorläuferzellen zugeordnet werden kann. CD bedeutet *Cluster of Differentiation* und bezeichnet mit dem 133⁺ ein spezielles Oberflächenmolekül, welches nur von bestimmten Zellen gebildet werden kann. Zu finden ist der CD133⁺-Marker unter anderem auf den bereits oben besprochenen HSCs und EPCs [30, 31, 32]. In der Tumorangio-genese und nach Gewebsverletzungen sind CD133⁺ Zellen vermehrt nachweisbar [33]. CD133⁺-Zellen stellen nach *Bhatia* eine multipotente Zellart dar, die sich sowohl in mesenchymale als auch in nicht-hämatopoetische Zelllinien weiterdifferenzieren können [34]. *Quirici et al.* konnten mit Hilfe ihrer Ergebnisse die Hypothese unterstützen, dass CD133⁺ Zellen ein großes neoangiogenetisches Potential besitzen. Sie sollen durch Inflammation aktiviert werden und zusätzlich die Hämatopoese unterstützen [35]. *Stamm* schreibt sogar, der „effektivste Weg“ pluripotente adulte Stammzellen zu bekommen, sei die gereinigte Isolation von CD133⁺ Zellen [36]. Der Anteil der CD133⁺ Zellen an den MNBMCs, zu denen sie gehören, ist mit ein Prozent sehr gering [32]. Dieser spezielle Oberflächenmarker birgt allerdings einen entscheidenden Vorteil. Mit Hilfe von Antikörpern gegen CD133⁺ ist es möglich, sehr reine Zellisolationen zu gewinnen, um diese dann gezielt ins Herz zu transplantieren [37, 38, 39]. Ausdifferenziertes Endothel besitzt keine CD133⁺ Oberflächenmarker mehr. Somit identifizieren diese Marker sehr genau die Progenitorzellen [40]. *Klein et al.* fanden in einer 10-Patienten-Studie heraus, dass CD133⁺ Knochenmarkszellen alleine bei Transplantation in den Herzmuskel von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie eine Verbesserung der Ejektionsfraktion (EF) des ischämischen Myokards bewirkten

[38]. *Manginas et al.* konnten in einer Sicherheits-und-Machbarkeits-Studie bei MI-Patienten eine Verbesserung der EF, der Koronarperfusion und des LV enddiastolischen sowie LV endsystolischen Volumens feststellen [39]. Zu diesem Ergebnis kamen auch *Stamm et al.* in einer Studienkombination von ACB und Transplantation von CD133⁺ Knochenmarkszellen. Gegenüber der Vergleichsgruppe ohne CD133⁺-Anwendung hatte die Versuchsgruppe signifikant bessere EF-Ergebnisse [36, 41]. Anhand dieser klinischen Studienergebnisse scheinen die CD133⁺-Zellen eine vielversprechende Population für die myokardiale Zelltherapie zu sein.

1.3.2 Zellgewinnung

Zur Zellgewinnung stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Einerseits die Knochenmarksaspiration beispielsweise aus dem Beckenkamm die sofort verfügbar ist. Andererseits besteht die Möglichkeit der peripheren Blutstammzellentnahme. Bei diesem Verfahren wird dem Spender über mehrere Tage das Hormon G-CSF gespritzt, das die Stammzellbildung und den Übergang ins Blut anregt. Diese können nach Blutentnahme durch Zellseparation isoliert werden.

1.3.3 Zellapplikation

Nach der Gewinnung von transplantierbaren Zellen, müssen diese dem Herzen zugeführt werden. Das Ziel ist es, eine möglichst große Zahl der angewendeten Zellen ins Herz zu bringen, welches durch folgende Applikationswege erreicht werden kann:

Die intravaskuläre Applikation scheint am wenigsten invasiv jedoch gelangen peripherer Injektion von Stammzellen lediglich 1% der Zellen an ihr eigentliches Ziel, das Herz, [42], weswegen diese Variante für klinische Studien eher ungeeignet scheint.

Die intrakoronare Applikation stellt eine gut erforschte Variante dar, Transplantationszellen direkt ins Herz zu geben. *Strauer et al.* und ebenso *Manginas et al.* konnten über dieses Verfahren erfolgreich CD133⁺ Zellen transplantieren und gute klinische Effekte erzielen [28, 39]. Bei diesem Verfahren wird per PCI mit einem OTW(*over the wire*)-Ballon-Katheter die Zellapplikation durchgeführt. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit, während einer PCI Stammzellen zu applizieren.

Die transendokardial Transplantation ist eine weitere transluminale Zellapplikationsmethode. *Fuchs et al.* formulierten nach einer Studie mit 10 Patienten die Schlussfolgerung, dass diese Methode sicher und durchführbar sei [43]. *Perin et al.* gelangten zu demselben Ergebnis [44].

Die transepikardiale Zellapplikation zählt gleichfalls zu den intramyokardialen Applikationsarten und setzt eine thorakale Inzision voraus. Vorher müssen die ischämischen Myokardareale durch Angiographie und Magnetresonanztomographie (MRT) definiert werden. Dadurch sind die transplantierten Zellen direkt am gewünschten Wirkort und können dort ihr Potential entwickeln. Wegen des invasiven Vorgehens findet sich in der Literatur wenig über alleinige Zellapplikationen. *Klein et al.* veröffentlichten 2006 eine Studie mit 10 Patienten, die nach Thorakotomie CD133⁺ Knochenmarkszellen transmyokardial injiziert bekommen hatten. Diese 10 Patienten zeigten eine Verbesserung der LV Funktion, eine Verringerung der AP-Symptome, gemessen anhand der *CCS Klassifikation* sowie eine Steigerung der Myokardkontraktilität [38]. Des Weiteren konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass die transepikardiale Zellapplikation, in Kombination mit der ACB sicher und effektiv ist [36, 41, 45], und das sogar über einen Zeitraum von mehr als 5 Jahren [46].

Zusammenfassend wirkt es zweckmäßig die Applikationsart an eine ohnehin vorgesehene OP bzw. Intervention anzupassen. Im Fall der Studiengruppe war es zum einen sinnvoll, transepikardial vorzugehen, da für die ACB ohnehin eine Thorakotomie erforderlich war und somit dem Patienten ein zusätzlicher transluminaler Zugangsweg erspart werden konnte. Zum anderen ist die intramyokardiale Applikation aus Sicht des Studienteams die quantitativ effektivste Variante im Hinblick auf die Deposition der Zellen im Zielgewebe Myokard.

1.4 Transmyokardiale Laserrevaskularisation

Ein großes Problem der Atherosklerose ist, dass sie sich in vielen Fällen nicht nur in den großen bypassfähigen Gefäßen manifestiert, sondern ebenfalls als Mikroangiopathie auftritt. In diesem Fall spricht man von diffuser KHK. Diese Tatsache führt dazu, dass ein Teil der Patienten trotz erfolgreicher ACB oder PCI weiterhin AP-Beschwerden aufweisen [47]. Zudem gibt es Myokardareale, die einer PCI bzw. ACB nicht zugänglich sind. Die TMLR ist ein Revaskularisationsverfahren, bei dem mit Hilfe eines Lasers Kanäle in das Myokard geschossen werden. Diese hat sich in den letzten Jahren bei Patienten bewährt, bei denen die medikamentöse Therapie, die PCI oder die ACB bezüglich der AP-Symptomatik keine langfristigen Erfolge aufweisen konnten, bzw. deren Koronargefäße diesen Verfahren nicht zugänglich waren. Für die TMLR gibt es verschiedene Arten von Lasern, wovon der *Kohlenstoffdioxid(CO²)-Laser* und der *Holmium:Yttrium-Aluminum-Garnet (Ho:YAG)-Laser* in den meisten Studien angewendet wurden. *Mirhoseini et al.* entwickelten 1981 als erste Arbeitsgruppe die TMLR mit Hilfe eines Lasers an Hundeherzen [48]. *Fischer et al.* konnten nachweisen, dass -je kleiner der gelaserte Kanal im Myokard war- umso mehr Angiogenese im Narbenbereich

induziert wurde. Dies war besonders beim CO²-Laser der Fall [49]. Hingegen zeigte der Ho:YAG-Laser einen deutlich höheren Fibroseindex und mehr Narbengewebe im gelaserten Myokard, was wiederum negative Einflüsse auf die Funktion des Herzen zeigte [50]. *Pratali et al.* haben die TMLR als „*einfaches Verfahren mit geringem operativen Risiko und geringer Morbidität*“ beschrieben [51]. Verglichen mit medikamentös behandelten Patienten, zeigten randomisiert zugeordneten TMLR Patienten geringere kardial assoziierte Krankenhausaufenthalte und weniger kardiale Ereignisse [52]. *Horvath et al.* fanden nach CO²-Laserbehandlungen eine symptomatische Verbesserung bis zu 7 Jahren [53]. Letztendlich konnte der Mechanismus der TMLR wissenschaftlich noch nicht endgültig geklärt werden. Es gibt viele kontroverse Diskussionen. Ob offenliegende Kanäle, sympathische Deinnervation oder Angiogenese die positiven Effekte hervorrufen bleibt zunächst ungeklärt [54, 55]. Aufgrund zahlreicher internationaler Arbeitsgruppen konnten eine signifikante Verbesserung der AP-Symptomatik um 2 CCS-Klassen, vermehrte Angiogenese, eine Verbesserung der EF sowie eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität nachgewiesen werden [52, 53 56, 57, 58, 59]. Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich nach *Wilke et al.* folgende Indikationen zur TMLR [47]:

- KHK mit diffusen Stenosen, die für eine ACB oder PCI nicht zugänglich sind
- Mikrovaskuläre Stenosen
- Refraktäre AP.

Aus den Erkenntnissen der 2004 veröffentlichten Studie von *Klein et al.* ergab sich die Hypothese, dass eine Kombination von TMLR und Zellanwendung potentiell eine regenerative Wirkung bei Patienten mit chronisch ischämischer Kardiomyopathie ausüben kann [60]. Für die aktuelle Studie wurde die Laseranwendung modifiziert, indem den präinterventionell diagnostizierten Myokardarealen geringere Laser-Energie -10 Joule für 13 Millisekunden pro Kanal- zugeführt wurde. Diese Neuerung sollte ein günstiges Umfeld für die transplantierten Zellen und ihre Wirkung auf das umliegende Gewebe ermöglichen. Die modifizierte Laseranwendung wird im Folgenden als *endogenes Laser-induziertes ventrikuläres Enhancement (ELIVE)* bezeichnet.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenakquisition

In die vorliegende Studie wurden in der *Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf* in den Jahren 2007 bis 2009 Patienten mit ischämisch bedingter, hochgradig reduzierter systolischer LV Funktion infolge chronisch verlaufener KHK eingeschlossen. Die prospektive Untersuchung der Sicherheit und Durchführbarkeit einer ACB mit *ELIVE* unterstützter Zelltherapie erfolgte zunächst an 18 Studienpatienten (Gruppe A). Zwecks Evaluation der Effektivität dieser Therapie im Vergleich zur ausschließlichen ACB wurde zusätzlich retrospektiv eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1.3). Die Studie erfüllt die Regeln und Grundsätze der *Ethikkommission* an der *Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität* und wurde von dieser begutachtet. Eine weitere positive Begutachtung erfolgte durch die *Ethikkommissionen der Leibniz Universität Hannover* und der *Universität zu Lübeck*. Die Ansprüche an eine *gute klinische Praxis (Good Clinical Practice, GCP)* wurden ebenfalls erfüllt. 2006 wurde die Studie durch das *Paul-Ehrlich-Institut*, das deutsche Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel, begutachtet. Die Studie ist registriert unter *EudraCT: 2005-004051-35*, *Current Controlled Trials number: ISRCTN49998633*. Diese Studie ist konzipiert als Multizenterstudie, wobei im Rahmen dieser Arbeit die ersten 18 Düsseldorfer Patienten ausgewertet wurden. Für die retrospektive Datenanalyse der Fall-Kontroll-Gruppen liegt ein Votum der Ethikkommission mit der Studiennummer 4872 vor.

2.1.1 Einschlusskriterien für die Zelltherapiegruppe

Die im Folgenden aufgezählten Kriterien waren Voraussetzung für den Studieneinschluss:

- Patient >18 Jahre
- Vorhandensein von mindestens einer Zwei-Gefäß-KHK, wobei mindestens ein Gefäß nicht Bypass-fähig sein durfte. Dieses Gefäß musste ein überlebensfähiges Myokardareal versorgen.
- Oben definiertes Areal mit verminderter Kontraktilität befand sich im Bereich der freien linken Ventrikelwand nachgewiesen durch Ventrikulographie und / oder präoperatives Echokardiogramm.
- Demonstration reduzierter Perfusion im betreffenden Areal mittels kardialem MRT oder CT.
- LVEF >15% und < 35%

- Schriftliche Einverständniserklärung

2.1.2 Ausschlusskriterien für die Zelltherapiegruppe

Folgende Kriterien führten zum Ausschluss von Probanden:

- Jegliche Umstände, die nach Dafürhalten des behandelnden Arztes eine erfolgreiche Zellentnahme oder -applikation ausschließen würden (z.B. Infektion, inpraktikable Knochenmarkspunktion)
- Jegliche Voraussetzung, die das Knochenmark schädigend beeinflussen könnte (Malignität, Zustand nach [Z.n.] Knochenmarksbestrahlung im Beckenbereich)
- Mitralklappeninsuffizienz > Stadium II
- Z.n. ventrikulären Arrhythmien, die weder medikamentös noch durch einen implantierbaren Kardioverter/Defibrillator kontrolliert werden können
- Zusätzlich erforderliche herzchirurgische Eingriffe (z.B. Klappenersatz)
- Notfall (OP < 48h nach Aufnahme)
- Nachweis eines Thrombus im rechten Atrium
- Vorausgegangene Herzoperation während der letzten sechs Monate (ausgenommen eine Herzschrittmacher-Implantation)
- Z.n. symptomatischer Karotissklerose (z.B. TIA, PRIND, Apoplex) weniger als drei Monate vor Studienintervention
- CK-Erhöhung (> dreifach) bei Patienten mit instabiler AP
- Terminale Niereninsuffizienz definiert als ein Kreatininwert von > 3,5 mg/dl oder Dialysepflichtigkeit
- Laufende Chemotherapie bei Krebserkrankung
- Lebenserwartung < zwei Jahren
- Thrombozyten < 100 000/ μ l
- Schwangerschaft
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie (< 30 Tage vorher)
- Hepatitis Infektion
- HIV
- Anämie

- Z.n. hämorrhagischer Diathese
- Unverträglichkeit gegen verwendete Medikamente (Heparin, Aspirin)
- Z.n. disseminierter intravaskulärer Koagulopathie
- Klinisch aktive Infektion zur Zeit der OP
- Unvermögen einer Nachsorge nach Protokollvorschrift
- Keine schriftliche Einverständniserklärung

2.1.3 Fall-Kontroll-Studie

Für die Zuordnung im Rahmen der Fall-Kontroll-Studie existierten 47 ACB Patienten (Gruppe B), die im gleichen Zeitraum operiert wurden. Voraussetzung war eine infolge ischämischer Kardiomyopathie hochgradig reduzierte LVEF. Mittels der *Propensity-Score-Analyse* konnten – unter Berücksichtigung der Outcome-relevanten präoperativen Charakteristika – 14 Patienten der Gruppe B passenden zu 14 Patienten der Gruppe A zugeordnet werden. Diese ausgewählten Patienten aus Gruppe A und B werden, wie in *Abb. 1* dargestellt, in die Gruppen A1 und B1 eingeteilt.

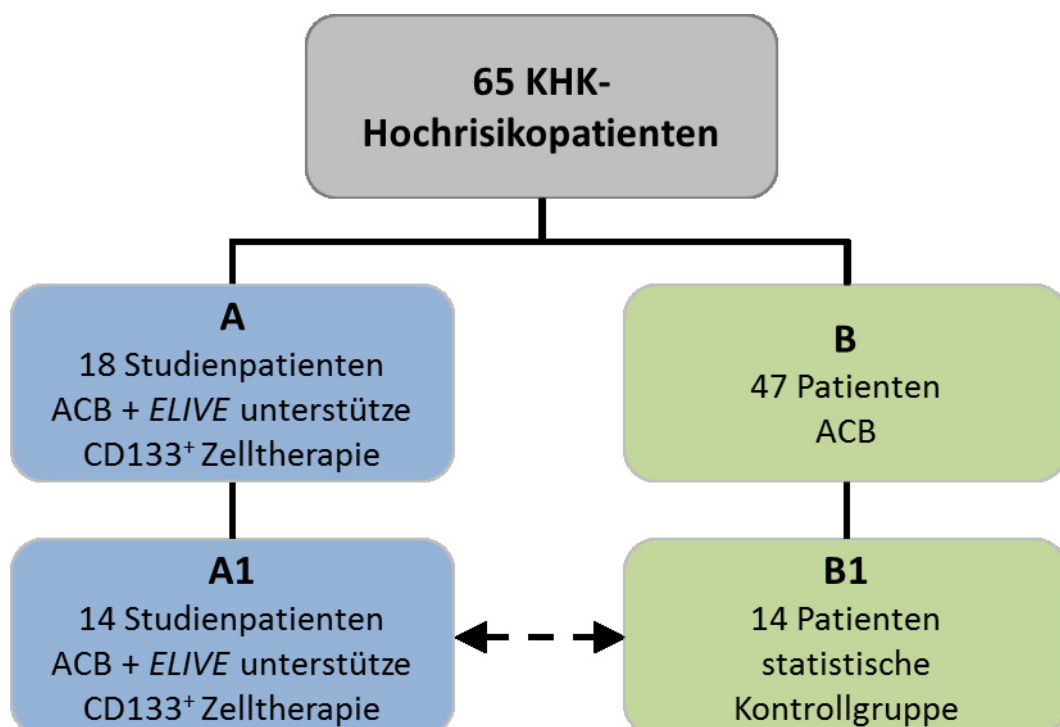


Abb. 1: Patientenkollektiv

2.2 Präoperative Diagnostik

Die Studienpatienten der Gruppe A durchliefen alle ein präoperatives Screening zur Abklärung und Bestätigung der OP-Indikation. Hierfür wurden folgende Parameter und Voraussetzungen untersucht:

- Infektionen (Hepatitis B und C, HIV)
- Präoperative Risikofaktoren
- Anamnese des kardialen Status
- Vorherige kardiovaskuläre OPs
- Medikation
- Basis-Labor inklusive Herzenzyme
- Zwölf-Kanal Elektrokardiogramm (EKG)
- Röntgen Thorax
- *Seattle Angina*-Fragebogen zur Evaluation der AP
- *CCS-Klassifikation*
- Echokardiogramm
- Kardiales MRT
- Koronarangiographie zur Definition des Myokardareals für die CD133⁺ Zelltransplantation, welches der ACB nicht zugänglich ist jedoch noch überlebensfähiges Myokard aufwies.

2.3 Präoperative Patientencharakteristika

Die Gruppe A bestand aus 15 Männern und drei Frauen, mit einem gemittelten Alter bei der OP von $63,9 \pm 2,3$ Jahren. Gruppe B setzte sich aus 38 Männern und neun Frauen im Alter von $66,5 \pm 1,7$ Jahren zusammen. Aus dieser Gruppe B konnten elf Männer und drei Frauen im Alter von $67,0 \pm 3,4$ Jahren (B1) statistisch mit 14 Patienten aus Gruppe A gematcht werden (\rightarrow A1 und B1). Die Gruppe A1 war im Mittel $66,1 \pm 2,3$ Jahre.

2.3.1 Präoperative kardiale Beeinträchtigung

Ein wichtiges Einschlusskriterium war die LVEF. Im Mittel betrug die durch Echokardiogramm ermittelte LVEF in der Studiengruppe A vor OP $25,4 \pm 1,1$ % sowie in der Gruppe A1 präoperativ $24,0 \pm 2,1$ %. Die Kontrollgruppe B1 hatte im Mittel eine LVEF von $28,1 \pm 1,6$ %. B hatte im Schnitt eine LVEF von $26,2 \pm 0,9$ %. Die LVEF der Gruppe B und B1 setzten sich aus der Ermittlung durch

ein Echokardiogramm oder einer Koronarangiographie zusammen. Wenn beide Werte vorlagen, wurde der Wert der Echokardiographie verwendet.

Innerhalb von 90 Tagen vor der OP erlitten 22,2% der Gruppe A und 28,6% der Gruppe A1, 50% der Gruppe B1 bzw. 55,3% der Gruppe B einen AMI. Bei 35,7% der Gruppe B1 sogar innerhalb der letzten 21 Tage vor der OP, jedoch keiner der Gruppe A. Hinzu kam bei 27,8% der Gruppe A, bzw. 28,6% der Gruppe A1 eine instabile AP sowie bei 21,4 % der Gruppe B1 und bei 21,3% des Patientenkollektives B. Die Einteilung der AP nach der *CCS Klassifikation* wurde nur bei der Gruppe A vollständig erhoben. Bei der Gruppe B war es nicht möglich, einen vollständigen Datensatz retrospektiv zu erheben. Weitere Werte der präoperativen kardialen Beeinträchtigung sind der *Tabelle 2* zu entnehmen.

Tabelle 2: Präoperative kardiale Beeinträchtigung

| Kardiale Parameter | Gruppe A [%] | Gruppe A1 [%] | Gruppe B1 [%] | Gruppe B [%] |
|-----------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| CCS < II | 22,2 | 28,6 | | |
| CCS > II | 77,8 | 71,4 | | |
| Instabile AP | 27,8 | 28,6 | 21,4 | 21,3 |
| CK > 399 CKMB > 9% | 5,6 | 7,1 | 14,3 | 12,8 |
| Troponin (+) | 5,6 | 7,1 | 50 | 51,1 |
| HRST HRST - neu | 22,2 5,6 | 21,4 0 | 35,7 14,3 | 31,9 12,8 |
| SV - HRST | 22,2 | 21,4 | 21,4 | 23,4 |
| V - HRST | 0 | 0 | 14,3 | 8,5 |
| HRST-Therapie | 11,1 | 7,1 | 7,1 | 17,0 |

2.3.2 Nebendiagnosen

Ein weiteres Einschlusskriterium war das Vorhandensein einer Mehrgefäß-KHK. Die Studienpatienten der Gruppe A wiesen eine 88,9%-Rate einer Drei-Gefäß-KHK auf bzw. 85,7% innerhalb der Gruppe A1. Die Kontrollgruppe B1 hatte eine

100%ige Rate einer Drei-Gefäß-KHK. Bei einer Mehrgefäß-KHK sehen die Leitlinien eine Indikation für eine Revaskularisation vor [vgl. Abschnitt 1.2.3 Symptomatisch]. Zusätzlich wiesen 16,7% der Gruppe A, 14,3% der Gruppe A1, 42,9% der Gruppe B1 sowie 51,1% der Gruppe B eine Hauptstammstenose der Koronarien auf.

88,9 % der Gruppe A davon 85,7% der Gruppe A1 litten an einer arteriellen Hypertonie. Bei der Gruppe B1 litten 85,7% an einer arterieller Hypertonie sowie 78,7% der Patienten der Gruppe B. Die Diabetes mellitus Rate lag bei der Gruppe A bei 55,6%, A1 bei 42,9% sowie bei der Gruppe B1 bei 42,9%. Die Gruppe B wies eine Rate von 25,5% von Diabetes mellitus Erkrankungen auf, wobei der Diabetes nicht weiter typisiert wurde. Die arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus Erkrankungen zählen zu den Risikofaktoren einer KHK. Die weiteren Nebendiagnosen können aus der unten stehenden *Tabelle 3* entnommen werden.

Tabelle 3: Nebendiagnosen

| Nebendiagnosen | Gruppe A [%] | Gruppe A1 [%] | Gruppe B1 [%] | Gruppe B [%] |
|---|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| pAVK | 5,6 | 7,1 | 14,3 | 31,9 |
| Cerebral- arterielle Verschlusskrankheit | 11,1 | 14,3 | 7,1 | 14,9 |
| COPD | 5,6 | 7,1 | 0 | 21,3 |
| Reduzierte Lungenfunktion | 5,6 | 7,1 | 0 | 2,1 |
| Pulmonale Hypertension | 0 | 0 | 0 | 2,1 |
| Kreatinin > 1,3 [mg/dl] | 38,9 | 35,7 | 35,7 | 36,2 |
| Neurologische Erkrankungen | 11,1 | 14,3 | 14,3 | 25,5 |

2.3.3 Vorausgegangene Eingriffe

Die ACB war bei 11,1% von A, bei jeweils 7,1% der Gruppe A1 und B1 sowie bei 4,3% von B eine Re-ACB und somit eine Re-Thorakotomie. Dies implizierte schwierigere OP-Vorraussetzungen aufgrund möglicher Verwachsungen. Einer PCI waren vor der OP bei 27,8% der Gruppe A, jeweils 21,4% der vergleichbaren Gruppen A1 und B1 und 23,4% der Gruppe B zugeführt worden.

2.3.4 Präoperative Medikamente und Intubation

Die präoperative Medikation des Patientenkollektives war vielfältig. Die eingenommene Rate der Kardiaka lag bei 100% der Gruppe A, somit auch 100% bei A1 und 92,9% bei B1 bzw. 87,2% in der Gruppe B. 94,4% der Patienten von A, 92,9% in Gruppe A1 sowie 92,9% der Gruppe B1 und 87,2% der Gruppe B hatten Antihypertensiva verschrieben bekommen. Anhand der hohen Prozentzahlen lässt sich erkennen, dass jeder Patient mehr als ein Medikament einnehmen musste. Die weiter eingenommenen Medikamente sind aus der unten stehenden *Tabelle 4* zu entnehmen. Ebenfalls erwähnenswert ist, dass kein Patient eine Gerinnungsstörung aufwies. Präoperativ katecholaminpflichtig und intubationspflichtig waren 7,1% der Patienten der Gruppe B1, jedoch 0% der Gruppe A und A1. Aus dem Patientenkollektiv B waren 6,4% katecholaminpflichtig und 8,5% intubationspflichtig. Ein Heparinperfusor lief präoperativ bei 38,9% der Gruppe A, bei 35,7% der Gruppe A1, bei 50% der Gruppe B1 sowie bei 55,3% der Gruppe B.

Tabelle 4: Präoperative Medikation des Patientenkollektives

| Medikament | Gruppe A [%] | Gruppe A1 [%] | Gruppe B1 [%] | Gruppe B [%] |
|------------------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| Phenprocoumon | 16,7 | 7,1 | 7,1 | 8,5 |
| ASS | 83,3 | 92,9 | 64,3 | 68,1 |
| GP IIb – IIIa Inhibitoren | 44,4 | 42,7 | 28,6 | 27,7 |
| Diuretika | 94,4 | 92,9 | 85,7 | 83,0 |

2.3.5 EuroSCORE II

Der *EuroSCORE* (*European System for Cardiac Operative Risk Evaluation*) ist ein aus präoperativen Patientencharakteristika zu berechnender Wert, der die postoperative Frühmortalität nach herzchirurgischen Eingriffen voraussagt und damit das operative Risiko abschätzen lässt. 2011 erfolgte eine Modifikation des bisherigen *EuroSCOREs* zum *EuroSCORE II* mit zusätzlicher Berücksichtigung der Nierenfunktion in klassifizierter Form und insulinpflichtigen Diabetes mellitus. Hierbei wird anhand folgender Parameter die Wahrscheinlichkeit der postoperativen Frühmortalität für jeden Patienten individuell berechnet [61]:

- Alter
- Geschlecht
- Nierenfunktion
- Chronisch pulmonale Erkrankungen
- Extrakardiale Manifestation der arteriellen Verschlusskrankheit
- Schlechter Allgemeinzustand bezogen auf neurologische oder muskuloskeletale Dysfunktion
- Rezidiv-OP am Herzen
- Aktive Endokarditis
- Kritischer präoperativer Zustand
- Insulinpflichtiger Diabetes mellitus
- NYHA Klassifikation
- CCS Klasse >III
- LVEF 30-50 % bzw. < 30%
- AMI < 90 Tage
- Pulmonaler Druck > 60 mmHg
- Dringlichkeit der OP
- Kombinationseingriff
- Thorakale Aorten Chirurgie

2.4 Operations-Protokoll

Das *Düsseldorfer Protokoll* (Abb. 2), für die kombinierte ACB mit *ELIVE* modifizierte CD133⁺ Zell-Transplantation, wurde nach den Regeln und Grundsätzen der Deklaration von Helsinki bzw. guter klinischer Praxis erstellt und von der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität zugelassen.

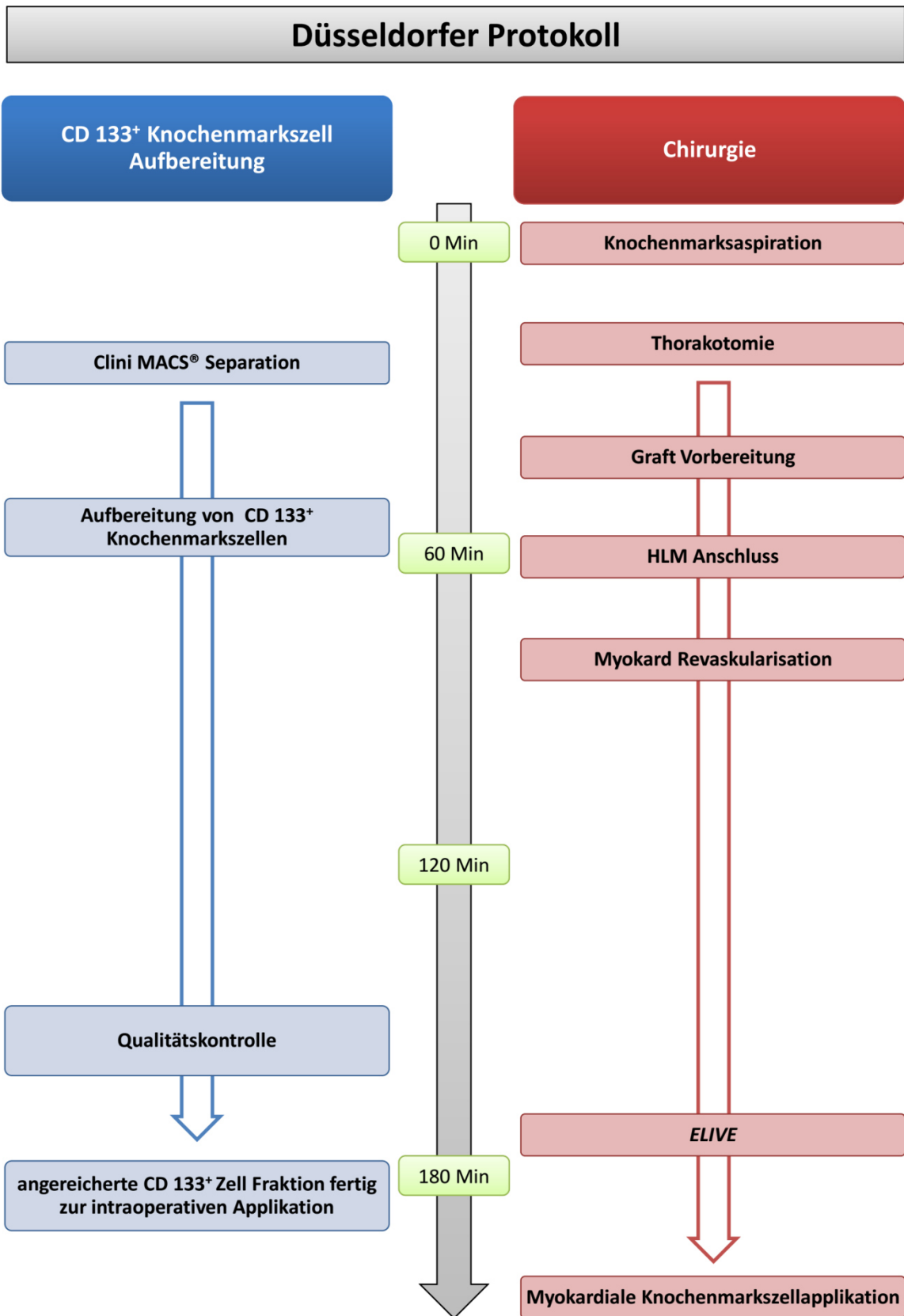


Abb. 2: *Düsseldorfer Protokoll*

Die kombinierte OP gliederte sich wie folgt:

1. Intraoperative autologe Knochenmarkszellgewinnung
2. Aufbereitung, Aufreinigung und Analyse der CD133+ Zellen
3. Parallel zu Punkt 2. ablaufende Koronarrevaskularisation und ELIVE
4. Transplantation der CD133+ Zellen

2.4.1 Intraoperative autologe Knochenmarkszellgewinnung

Zuerst wurde nach Einleitung einer Vollnarkose im OP-Saal durch den Anästhesisten der Patient in Seitenlage gebracht, um eine Knochenmarkspunktion im Beckenkamm zu ermöglichen. Diese diente der Gewinnung von Knochenmarksaspirat, aus dem in einem späteren Verfahren die CD133⁺ Knochenmarkszellen gewonnen wurden. Dem Studienpatient wurde zwischen 200-350 ml Knochenmark mit Heparin-benetzten Spritzen an mehr als zwei Punktionsstellen entnommen. Das Knochenmarksaspirat wurde in sterilen Blutbeuteln gesammelt und weiterverarbeitet. Anschließend wurde die Wunde mit einem sterilen Verband bedeckt. Ab diesem Zeitpunkt arbeiteten zwei Teams parallel. Ein Team kümmerte sich um die Aufreinigung und Konzentrierung der CD133⁺ Zellen. Das andere chirurgische Team führte die Revaskularisation und die *ELIVE* durch. Die Verfahren werden im Folgenden getrennt voneinander besprochen.

2.4.2 CD133⁺ Knochenmarkszellaufbereitung

Die Gewinnung einer reinen CD133⁺ Zelllösung aus dem autologen Knochenmarksaspirat erfolgte mit Hilfe des CE zertifizierten *CliniMACS® Systems (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)*. Die Technik berücksichtigt die Richtlinien europäischer Behörden für Medizinprodukte. Es ist ein geschlossenes Zellsortiersystem und nur *in vitro* anwendbar. Die folgenden Schritte wurden alle unter streng sterilen Bedingungen durchgeführt. Das *CliniMACS®* System funktioniert mit magnetisierten Antikörpern gegen den Zelloberflächenmarker CD133⁺, die diese Zellen aus einem Zellhaufen markierten und aussortierten. Dieser Vorgang gliedert sich in vier Schritte [62]:

1. Vorbereitung, Leukapheresat, magnetische Markierung der CD133⁺ Zellen mit dem *CliniMACS® CD133⁺ Reagent*
2. Start des *CliniMACS® plus Instrument*
3. Schlauchset Installation
4. *CliniMACS® Separation* der CD133⁺ Zellen aus dem Knochenmarksaspirat mit anschließender Analyse der Zellen

Schritt 1:

Das Knochenmarksaspirat wurde zügig nach der Entnahme mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA)/ Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS Puffer) inklusive 0,5% Humanes Serum Albumin (HSA) gewaschen. Um Knochenrückstände zu entfernen, wurde das Knochenmarksaspirat durch einen 100 µm Filter gegossen. Anschließend goss man das Knochenmarksaspirat noch einmal mit EDTA/PBS Puffer inklusive 0,5% HSA in eine Zentrifugationsbeutel. Das Knochenmarkszell-Puffer-Gemisch wurde durch ein *Terumo Sterile Connecting Device (TSCD®)* (*Terumo, Eschborn, Deutschland*) mit einem Abfallbeutel steril verbunden, in den nach der Zentrifugation (*Centrifuge Rotixa/P, Hettich, Tuttlingen, Deutschland*) mit Hilfe eines *Plasmaextraktors (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland)* der Überstand abgetrennt wurde. Das Zell-Puffer-Gemisch wurde bei Raumtemperatur (19°-25°C) mit 200xg 15 Minuten lang zentrifugiert. Der gesammelte Zellrückstand wurde wiederum mit *CliniMACS® Puffer* mit 0,5% HSA auf-suspendiert. Darauf folgte die Inkubation mit sterilem *CliniMACS® CD133⁺ Reagent* zur Markierung der benötigten CD133⁺ Zellen aus dem Knochenmarkszellgemisch. Das Reagenz beinhaltet monoclonale CD133⁺ Maus-Antikörper mit paramagnetischen Partikeln (Eisen-Dextran-Einheit). Die Partikel ermöglichten die Separation mittels Magneten. Das Zell-Puffer-Reagent-Gemisch wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem *Taumelgerät Polymax 1040 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)* inkubiert. Anschließend erfolgte ein doppelter Waschvorgang. Das Zellgemisch wurde hierbei mit *CliniMACS® Puffer* inklusive 0,5% HSA aufgefüllt und wiederum bei 200xg 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in einem Abfallbeutel aufgefangen und aufbewahrt. Nach zweimaligem Waschdurchlauf wurde dies Zellgemisch wieder mit Puffer aufgefüllt und 0,5 ml davon für Zellanalysen abgenommen. Ein Zellzähler (*SysMex®, Norderstedt, Deutschland*) erfasste die Anzahl der CD133⁺ Zellen. *Fluoreszenz Activated Cell Sorting*, kurz *FACS*, analysierte die Zellen zusätzlich durch *CD133⁺/2-Phycoerythrin (PE)*, *CD 45-Fluorescein (FITC)*, *CD 34-Allophycocyanin (APC)* (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany*) und *Propidium iodide*, um die Vitalität der Zellen zu ermitteln. Für die Analyse der Zellen wurde das Protokoll der ISHAGE-Leitlinien von hämatopoetischen Stammzellen genutzt [63]. Die Bestimmung der Reinheit, Zellzahl und Vitalität der CD133⁺ Zellen wurde durch das *Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika* der *Uniklinik Düsseldorf* durchgeführt.

Schritt 2 und 3

Diese beiden Schritte umfassten das Starten des *CliniMACS® plus Instrumentes* (Abb. 3) und die Installation der sterilen Schläuche und Beutel, um die automatische Zellseparation starten zu können.



Abb. 3: *CliniMACS® plus Instrument*

Schritt 4

Hierzu wurde die markierte Zellsuspension an das *CliniMACS® plus Instrumente* angeschlossen, wo sie durch eine Selektionssäule mit einem Permanentmagneten fließt, der die Antikörper-markierten CD133⁺ Zellen zurückhält, während die nicht markierten Zellen in einen so genannten Negativ-Fraktions-Beutel fließen. Dieser Waschvorgang wurde mehrmals durchgeführt, um ein möglichst reines CD133⁺ Zell-Ergebnis zu bekommen. Anschließend wurde der Magnet ausgeschaltet und die CD133⁺ Zellen in einem gesonderten

Beutel gesammelt. Eine erneute Zellanalyse wurde durchgeführt. Nur nach Bestimmung der Freigabeparameter, Zellzahl $\geq 0,5 \times 10^6$ und Vitalitätssoll $\geq 70\%$ wurden die konzentrierten Zellen zur Transplantation frei gegeben. Die aussortierten Anteile sind separat für 5 Jahre eingelagert worden, um eine mögliche spätere Analyse zu gewährleisten. Zusätzlich wurden mikrobiologische Untersuchungen zur Sterilitätskontrollen durch das *Institut für Mikrobiologie des Uniklinikums Düsseldorf* durchgeführt.

2.4.3 Revaskularisation und endogenes Laser-induziertes ventrikuläres Enhancement

Die Revaskularisation setzte sich aus der ACB und der anschließenden *ELIVE* zur Vorbehandlung des prädefinierten Myokardareals ohne direkte ACB Versorgung für die CD133⁺ Zellbehandlung zusammen. Dieser Vorgang fand direkt im Anschluss an die Knochenmarksaspiration statt. Es erfolgte die standardisierte ACB. Eine mediane Sternotomie und die Eröffnung des Perikards ermöglichten den Zugang zum Herzen. Die linke *Arteria thoracica interna* diente nach Freipräparierung und Unterbindung aller Seitenäste als arterieller Bypass. Des Weiteren wurde die *Vena saphena magna* aus einem Bein als venöser Bypassgraft verwendet. Nach der Saphenektomie erfolgten die Dichtigkeitsprüfung und die Vorbereitung der Vene zum Bypass. Anschließend wurde die HLM angeschlossen. Diese diente der extrakorporalen Zirkulation während der Kardioplegiephase. Die HLM übernahm währenddessen die Aufgabe des schlagenden Herzens, in dem sie das venöse Blut sammelte, mit Sauerstoff anreicherte und dieses dem Körper wieder zuführte. Somit hielt sie auch den arteriellen Blutdruck aufrecht. Zudem war es möglich, hierüber die Körperwärme zu regulieren. Grundvoraussetzung für die Anwendung der HLM war eine Vollheparinisierung, die im Anschluss an die OP wieder antagonisiert werden musste. Der venöse Abfluss in die HML erfolgte über die *Venae cavae superior* und *inferior*, der arterielle Zufluss in die distale *Aorta ascendens* unter proximaler Abklemmung der Aortenwurzel inklusive der Koronarostien. Die Kardioplegie diente der Myokardprotektion durch Unterbindung der elektrischen Aktivität. Die Herzmechanik kam zum Stillstand und ermöglichte ein ruhiges Operieren am Herzen. Zusätzlich wurde dadurch der Sauerstoffverbrauch des Herzens herabgesetzt. Außerdem wirkte eine eingeleitete Hypothermie kardioprotektiv, indem sie den Stoffwechsel des Myokards senkte, um dieses nicht unnötig zu schädigen. Die vorbereiteten Bypassgrafts wurden distal der signifikanten Koronarstenosen anastomosiert. Nach Abschluss der ACB-Revaskularisation wurde das Herz reaktiviert. Dies geschah infolge einer Reperfusion des Herzens mit körperwarmem Blut, wodurch die Kardiomyozyten ihre Funktion wieder aufnahmen. Falls erforderlich wurde bei Auftreten von Kammerflimmern mit einem Defibrillator die elektrische Erregung gebahnt. Die HLM blieb während der *ELIVE* und der CD133⁺

Applikation bei schlagendem und durchblutetem Herzen noch angeschlossen. Das prädefinierte ischämische Myokardareal für die Transplantation der CD133⁺ Zellen wurde im Anschluss an die ACB mit der *ELIVE* vorbehandelt. Hierfür wurden in dem definierten Areal im Abstand von einem cm 17-20 Kanäle mit 10 Joule für 13 Millisekunden pro Kanal in das überlebensfähige Myokard gelasert. Der hierbei angewendete Laser war ein CO² Laser (*PLC Medical Systems, Franklin, MA, USA*). Die Dauer der OP betrug zwischen 3 bis 4,5 Stunden.

2.4.4 Transplantation

Die vorbereiteten konzentrierten CD133⁺ Zellen (ca. 10 ml) wurden direkt im Anschluss an die Zellanalyse in das vorbehandelte Myokard transepikardial um die gelaserten Kanäle injiziert. Um jeden Laserkanal gab es bis zu 4 Einstichstellen mit je 0,2-0,5 ml. Insgesamt wurden bis zu 30 x 10⁶ autologe CD133⁺ Zellen mit einer Reinheit (Abb. 4) und Vitalität bis zu 99% (Abb. 5) transplantiert. Zum Ende der OP erfolgte die HLM Entfernung und der standardisierte Thoraxverschluss.

2.5 Perioperative Dokumentation und Versorgung

Im Anschluss an die OP folgte die weitere Betreuung der Patienten auf der Intensivstation, bis ein stabiler körperlicher Zustand die Verlegung auf eine periphere Station zuließ. Die perioperative Dokumentation bezog sich auf den Zeitraum des Krankenhausaufenthalts in der *Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie der Uniklinik Düsseldorf*. Postoperativ wurde auf den Katecholaminbedarf geachtet, die verwendeten Katecholamine waren: Dobutamin in der Konzentration von 10mg/ml, Arterenol 0,1mg/ml und Suprarenin 0,1mg/ml. Des Weiteren war eine Intubation von mehr als 48 Stunden gesondert zu vermerken. Der AMI sowie ein CK-Anstieg über 399 U/l bei einer CK MB über 9% sind für die Auswertung herangezogen worden, ebenso alle Arten eines Organversagens. Zu diesen zählten: Akutes Nierenversagen mit Dialysepflicht, Lungenversagen mit Reintubationspflicht und andere Organversagen, die nicht näher definiert waren. Neurologische Auffälligkeiten wie ein Durchgangssyndrom, sind ebenfalls dokumentiert worden. Der Bedarf an Erythrozyten Konzentraten und Fresh Frozen Plasma gingen zudem in die Auswertung mit ein. Zusätzlich zur Standardversorgung nach einer ACB bekamen die Studienpatienten zwölf, 24 und 48 Stunden nach OP eine Zusatzevaluation, bestehend aus körperlicher Untersuchung, Blutserumanalysen und zwölf-Kanal EKG. Vor der Entlassung des Patienten wurde nochmals eine laborchemische Untersuchung, ein Röntgen Thorax, ein Zwölf-Kanal EKG durchgeführt sowie die Medikation eingestellt. Zusätzlich wurden *Major Adverse Cardiovascular oder Cerebrovascular Events* (MACCE)

und *schwerwiegende Ereignisse* -bezogen auf organisches Versagen im Rahmen der klinischen Studie- dokumentiert, die im zeitlichen Zusammenhang standen.

2.6 Primäre Endpunkte

Die Sicherheit des Studienprotokolls in der klinischen Durchführung stellte den primären Endpunkt der registrierten Studie dar. Jegliches Auftreten von kardiovaskulären oder zerebralen Komplikationen und schwerwiegenden Vorfällen -sogenannten MACCE- in den ersten drei postoperativen Monaten wurde gewertet. Zu den definierten MACCE zählten:

- Kardial bedingter Todesfall
- AMI
- dringliche oder elektive PCI
- Schlaganfall
- TIA

Weitere Ereignisse für den kombinierten primären Endpunkt waren ein sekundärer Mitralklappendefekt oder eine Hospitalisierung infolge schwerwiegender Vorfälle kardialer Ursache.

2.7 Sekundäre Endpunkte

Die sekundären Endpunkte der registrierten Studie umfassten alle MACCE nach sechs und zwölf Monaten sowie folgende Ereignisse nach drei, sechs und zwölf Monaten: Unerwünschte kardiale Ereignisse, Schweregradentwicklung der Angina (CCS-Score-Entwicklung), MRT-basierte LV-Funktions-Bestimmung und Entwicklung der Lebensqualität. Der CCS-Score und die MRT-Daten werden in dieser Dissertation nicht beschrieben.

2.8 Nachsorge

Die Nachuntersuchung (NU) der Studienpatienten A erfolgte drei, sechs und zwölf Monate nach der OP und beinhaltete eine körperliche Untersuchung, Labordiagnostik, eine Röntgen-Thorax-Aufnahme (nur nach zwölf Monaten), die Komplikationsevaluation im Sinne der Dokumentation von *MACCE* und Aufzeichnung von schwerwiegenden Ereignissen. Die Herzfunktion wurde mittels EKG und Echokardiogramm überprüft. Zur Evaluation der Lebensqualität mussten die Patienten den *Seattle Angina Fragebogen*, der speziell für die KHK entwickelt wurde, beantworten. Die Kontrollgruppe wurden zwölf Monate nach OP echo- und elektrokardiographisch evaluiert. Darüber hinaus erfolgte bei

allen Probanden dieser Studie die Dokumentation des Zwei-Jahres-Überlebens. Bei Ergebnissen im direkten Gruppenvergleich wurden nur die Paare verglichen, bei denen bei beiden Matchingpartnern der präoperative und postoperative Wert vorhanden war. Im Vergleich innerhalb einer Gruppe wurden alle Patienten berücksichtigt, bei denen beide Patientendaten vorhanden waren.

2.9 Methoden der statistischen Auswertung

Die statistische Auswertung für die Vergleichbarkeit (Matching) der Patienten erfolgte durch einen unabhängigen Statistiker. Relevante präoperative Daten wurden in Excel-Tabellen zusammengefasst und zur weiteren Bearbeitung und Auswertung an den Statistiker weitergeleitet. Die hierzu genutzte Software *SAS-PC 9.2 (SAS Institute, Cary, USA)* wurde zur Datenanalyse und Auswertung von Forschungsdaten entwickelt. So genannte *Propensity-(Neigungs)-Scores*, in denen spezielle *Greedy-Matching-Algorithmen* mit *PROC LOGISTIC (SAS)* angewendet wurden, sind bewährte Verfahren, um eine mögliche statistische Verzerrung zu reduzieren [64]. Die beiden Patientengruppen mussten erst statistisch passend zugeordnet werden, um sie miteinander vergleichen zu können. Die relevanten Variablen für das statistische Matching wurden präoperativ erhoben und waren folgende:

- Geschlecht
- Alter
- Re-ACB
- PCI
- Instabile AP
- LVEF
- Hypertonie
- Diabetes mellitus
- pAVK
- COPD
- Niereninsuffizienz
- SV HRST
- AMI weniger als 21 Tage vor OP

Der präoperative AMI wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt, da seine Einbindung zu statistischen Instabilitäten des Matchings führte. Aus den restlichen erhobenen Daten und dem statistischen Matchverfahren konnten von 18 Studienpatienten und 47 Hochrisikopatienten der Vergleichsgruppe B 14 Matching-Paare ausgewählt werden.

Weitere operative und postoperative Daten wurden mit Unterstützung des *Graphpad Prism Version 5.01 (Graphpad Software, Inc, San Diego USA)* statistisch analysiert. Die deskriptive Statistik wurde als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Bestimmung der Normalverteilung kontinuierlicher Variablen erfolgte mithilfe des *Kolmogorov-Smirnov-Tests*. Abhängig von diesem Ergebnis erfolgte im Falle einer Normalverteilung die Auswertung durch einseitig oder beidseitig verbundene *t-Tests*. Wenn keine Normalverteilung vorlag, kam der verbundene nicht-parametrische *Wilcoxon-Rang-Tests* zur Anwendung. Zur Bestimmung nicht parametrischer nominal skaliertes Variablen wurde mit dem exakten *Fischer-Test* gerechnet. Varianzanalysen erfolgten mithilfe einer ANOVA. Die Patienten, die vorzeitig aus der Studie ausgeschieden sind, wurden für die Evaluation bis zu ihrem Ausscheiden beurteilt. Bei der Auswertung der EF im Vergleich der Gruppe A1 und B1 konnten nur die Paare ausgewertet werden wo bei beiden Partnern ein Vollständiger Datensatz vorlag.

Die Überlebenszeitanalyse über zwei Jahre der Gruppe A1 und B1 wurde durch den *Lograng Mantel-Cox Test* evaluiert und in einer zensierten *Kaplan-Meier-Kurve* dargestellt. Das Signifikanzniveau für alle statistischen Tests wurde mit $p < 0,05$ als signifikant festgelegt.

3 Ergebnis

3.1 EuroSCORE II

Die Wahrscheinlichkeit einer postoperativen Frühmortalität wurde durch den oben beschriebenen *EuroSCORE II* berechnet und eingeteilt. In der Gruppe A1 lag der EuroSCORE II bei $5,8 \pm 0,7\%$, vergleichsweise lag die Letalitäts-Wahrscheinlichkeit bei Gruppe B1 präoperativ bei $9,1 \pm 2,1\%$. Diese Werte waren nicht signifikant unterschiedlich ($p= 0.173$). Die ermittelten Durchschnittswerte der Gruppe A1 und B1 sind im Einzelvergleich in *Tabelle 5* aufgeführt.

Tabelle 5: EuroSCORE II Ergebnisse im Einzelvergleich

| Paar Nr. | Gruppe A1 [%] | Gruppe B1 [%] |
|----------|---------------|---------------|
| 1 | 6,63 | 7,06 |
| 2 | 8,20 | 7,03 |
| 3 | 6,29 | 3,54 |
| 4 | 5,15 | 8,86 |
| 5 | 2,36 | 3,33 |
| 6 | 4,96 | 34,04 |
| 7 | 7,34 | 7,18 |
| 8 | 5,41 | 7,74 |
| 9 | 4,07 | 1,85 |
| 10 | 4,48 | 9,36 |
| 11 | 10,93 | 11,15 |
| 12 | 8,99 | 1,96 |
| 13 | 4,93 | 13,71 |
| 14 | 0,91 | 10,36 |

3.2 Machbarkeit des *Düsseldorfer Protokolls*

In der kombinierten ACB mit *ELIVE*-unterstützter CD133⁺ Zelltherapie war es möglich, streng nach dem *Düsseldorfer Protokoll* vorzugehen (vgl. Abschnitt 2.4). Im Verlauf der Studienoperationen traten keine unvorhersehbaren Komplikationen auf, die eine Änderung des Protokolls nach sich gezogen hätten. Aufgrund zweier parallel arbeitender Teams war die Aufreinigung der autologen Knochenmarkszellen zeitgleich zur ACB ausführbar. Die Verwendung des *CliniMACS®-Systems* ermöglichte die Gewinnung von $11,0 \times 10^6 \pm 1,9$ CD133⁺ Zellen mit einer Reinheit von $85,0 \pm 1,5\%$ während der ACB. Alle Zellaufbereitungen geschahen ohne Komplikationen oder Aufbereitungsfehler. Das standardisierte Vorgehen gewährleistete die qualitative Aufbereitung der Zellen, so dass stets eine große Zellzahl intramyokardial appliziert werden konnte. Die *Abb. 4* zeigt exemplarisch eine FACS Analyse der Reinheit der CD133⁺ Zellen eines Patienten der Gruppe A. Die weitere Analyse der CD133⁺ Zellen ergab eine durchschnittliche Vitalität von $85,0 \pm 2,1\%$. Eine exemplarische Darstellung einer FACS Analyse der Vitalität aus Gruppe A ist in *Abb. 5* zu sehen.

Zusätzlich ermöglichte dieses standardisierte Vorgehen die gute Vergleichbarkeit innerhalb der Patientengruppe A. Die Dauer der Aufbereitung des Knochenmarksaspirats zu den konzentrierten CD133⁺ Zellen betrug $215 \pm 6,9$ Minuten, die kombinierte ACB mit *ELIVE* unterstützter Zelltherapie dauerte zwischen 3 bis 4,5 Stunden.

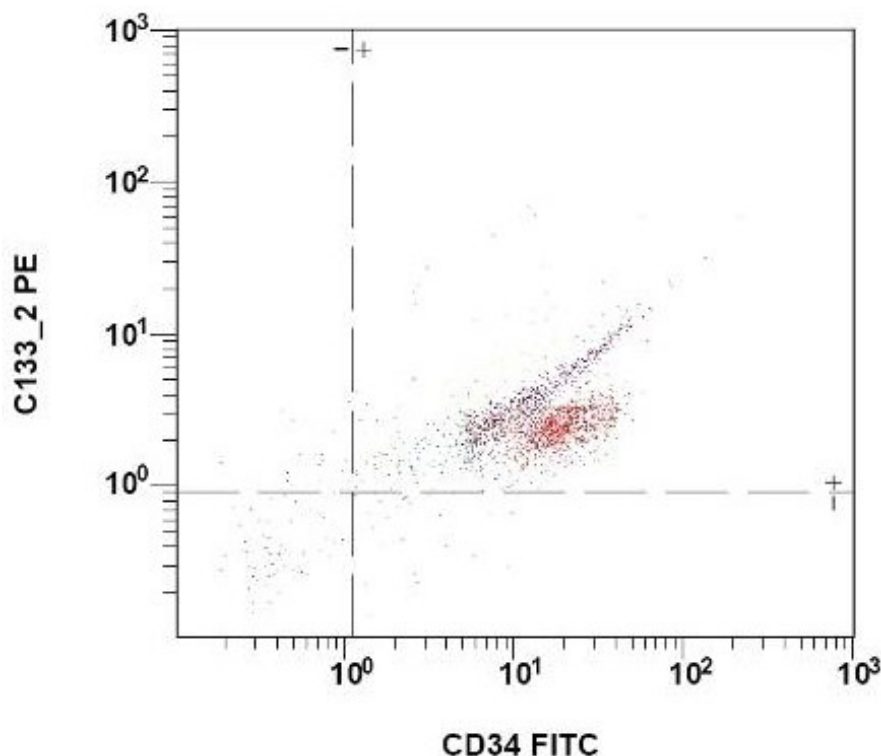


Abb. 4: Exemplarische Darstellung einer FACS Analyse der Reinheit der CD 133⁺ Zellen aus Gruppe A

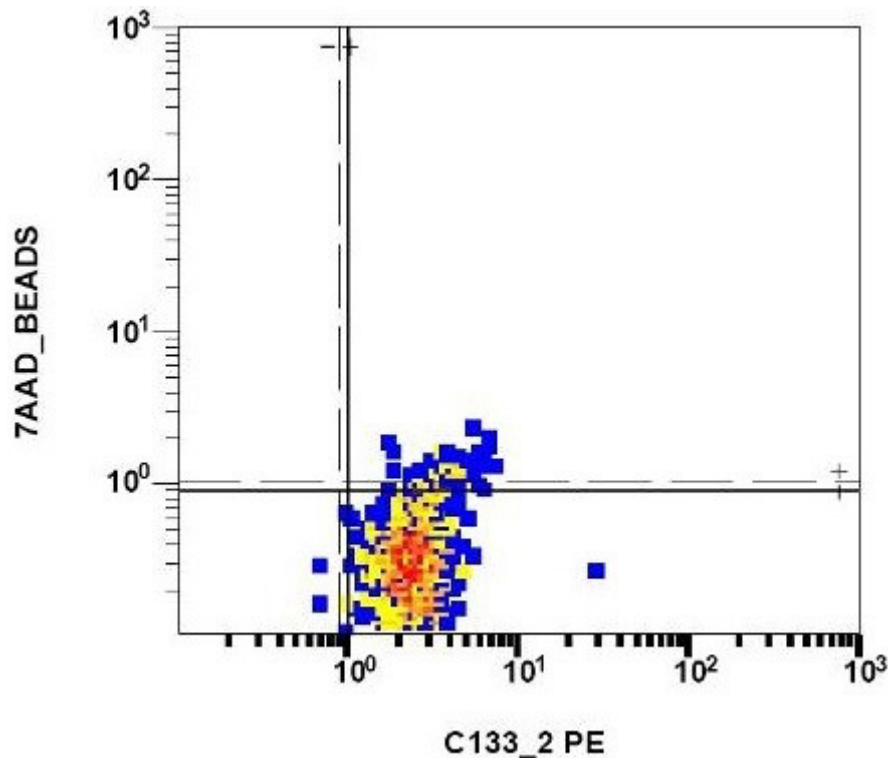


Abb. 5: Exemplarische Darstellung einer FACS Analyse der Vitalität der CD 133⁺ Zellen aus Gruppe A

3.3 Postoperative Werte in der Klinik

Im Anschluss an die ACB wurden alle Patienten zur weiteren Überwachung auf die Intensivstation verlegt. Im Schnitt verbrachten die Patienten in der Gruppe A $5 \pm 1,2$ Tage, in der Gruppe A1 $5 \pm 1,4$ Tage und in der Gruppe B1 $5 \pm 1,3$ Tage auf der Intensivstation. Ebenfalls dokumentiert wurde der Katecholaminbedarf zur Kreislaufstabilisierung. Zu den verwendeten Katecholaminen zählten: Dobutamin in der Konzentration von 10mg/ml, Arterenol 0,1mg/ml sowie Suprarenin 0,1mg/ml. Dieser Bedarf wurden nach folgenden Kriterien unterteilt: kein Bedarf, geringer Bedarf (bis zehn ml pro Stunde) und hoher Bedarf (mehr als zehn ml pro Stunde). In den Gruppen A, und B1 lag der Bedarf an Katecholaminen bei ca. der Hälfte der Patienten im geringen Bedarfsbereich, in der Gruppe A1 sogar bei über 60% der Patienten. Rund 40% der Patienten von A, A1 und B1 hatten einen hohen Verbrauch. Es gab insgesamt nur weniger als 10% der Patienten in jeder Gruppe, die keinen Katecholaminbedarf hatten. Die genauen prozentualen Anteile der Katecholaminbedürfnisse lassen sich aus *Tabelle 6* entnehmen. Noch im postoperativen stationären Aufenthalt nach der ACB, erlitten 7,1% der Patienten aus Gruppe B1 einen AMI. Hingegen in der Gruppe A gab es keinen AMI Vorfall. Die zusätzlich erhobenen postoperativen Daten vom Krankenhausaufenthalt sind ebenfalls aus der untenstehenden *Tabelle 6* zu entnehmen.

Tabelle 6: Postoperative Werte in der Klinik

| Postoperative Parameter | | Gruppe A | Gruppe A1 | Gruppe B1 |
|--|-------------|----------|-----------|-----------|
| Katecholaminbedarf | Kein | 5,6 % | 0 % | 7,1 % |
| | < 10 [ml/h] | 55,6 % | 64,3 % | 50 % |
| | > 10 [ml/h] | 38,9 % | 35,8 % | 42,9 % |
| Ventilationszeit > 48h | | 11,1 % | 7,1 % | 28,6 % |
| Lungenversagen | | 0 % | 0 % | 21,4 % |
| Akutes Nierenversagen | | 11,1 % | 7,1 % | 21,4 % |
| Neurologische Defizite | | 22,2 % | 21,4 % | 28,6 % |
| Anderes Organversagen | | 0 % | 0 % | 7,1 % |
| Anzahl Erythrozyten Konzentrate | | 2 ±0,4 | 1 ±0,4 | 2 ±0,5 |
| Anzahl Fresh Frozen Plasma Konzentrate | | 1 ±0,6 | 1 ±0,7 | 2 ±0,6 |
| CK > 399 & CK MB > 9% | | 0 % | 0 % | 7,1 % |

3.4 Operative Mortalität

Die operative Mortalität bezeichnet die Sterblichkeit, die ursächlich und zeitlich in Zusammenhang mit einer OP steht. Diese operative Phase umfasst einen Zeitraum von 30 Tagen postoperativ. Die Gruppe A1 wies keine Todesfälle innerhalb dieses Zeitraums auf. Aus der Gruppe B1 sind zwei Patienten (14,3%) im operativen Zeitraum verstorben, ein Patient an kardialer Ursache. Die operative Mortalität wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen A1 und B1 auf ($p=0,2407$). In der Gruppe A ist ein Patient in diesem Zeitraum an einer Urosepsis verstorben.

3.5 Nachsorge

Von 18 Studienpatienten der Gruppe A und den 14 gematchten Patienten der Gruppe B1 war es bei insgesamt neun Patienten nicht möglich, eine vollständige NU zu evaluieren. Fünf Patienten sind innerhalb der zwölfmonatigen Nachsorgeperiode verstorben, davon drei Patienten (21,4%) aus der Kontrollgruppe B1 und ein Patient aus der Gruppe A1 (7,1%). Bei je 14,3% der Vergleichspatienten der Gruppe A1 und B1 war es nicht durchführbar, alle vorgesehenen NUs zu komplettieren. Die Patienten, die vorzeitig aus der Studie ausgeschieden sind, wurden für die Evaluation bis zu ihrem Ausscheiden beurteilt. Insgesamt waren in der Gruppe A1 28,6% und in der Gruppe B1 35,8% nicht bis zum Ende der NU vollständig beurteilt worden.

3.6 Überlebensrate

In den Gruppen A und A1 gab es keinen kardial bedingten Todesfall im Verlauf der zwölfmonatigen Nachsorge. Ein Patient (7,1%) aus der Gruppe A1 verstarb im zweiten Monat postoperativ wegen eines rupturierten abdominalen Aortenaneurysmas. Im Vergleich dazu waren aus der Gruppe B1 im Zeitraum von zwei Monaten bereits drei Patienten (21,4%) verstorben. 67% der Todesursachen waren kardial bedingt. Somit ergab sich eine Überlebensrate von 78,6% nach zwei Monaten postoperativ in Gruppe B1, während A1 eine Überlebensrate von 92,8% aufwies. In der zwölfmonatigen NU-Periode verstarb kein weiterer Patient, so dass die Überlebensraten gleich blieben. Das Patientenüberleben wies keine signifikanten Unterschiede auf. Im Verlauf der zwei Folgejahre ergab sich für die Gruppe A1 eine zensierte Überlebenswahrscheinlichkeit von $85,1 \pm 9,7\%$, in der Gruppe B1 lag sie bei $77,1 \pm 11,7\%$ ($p=0.565$). Die zensierte *Kaplan-Meier-Kurve* ist in *Abb. 6* zu sehen. In der Gruppe A verstarb ein Patient im ersten Monat nach der Studienoperation an einer Urosepsis, dieser Patient gehörte zu den ungematchten Patienten.

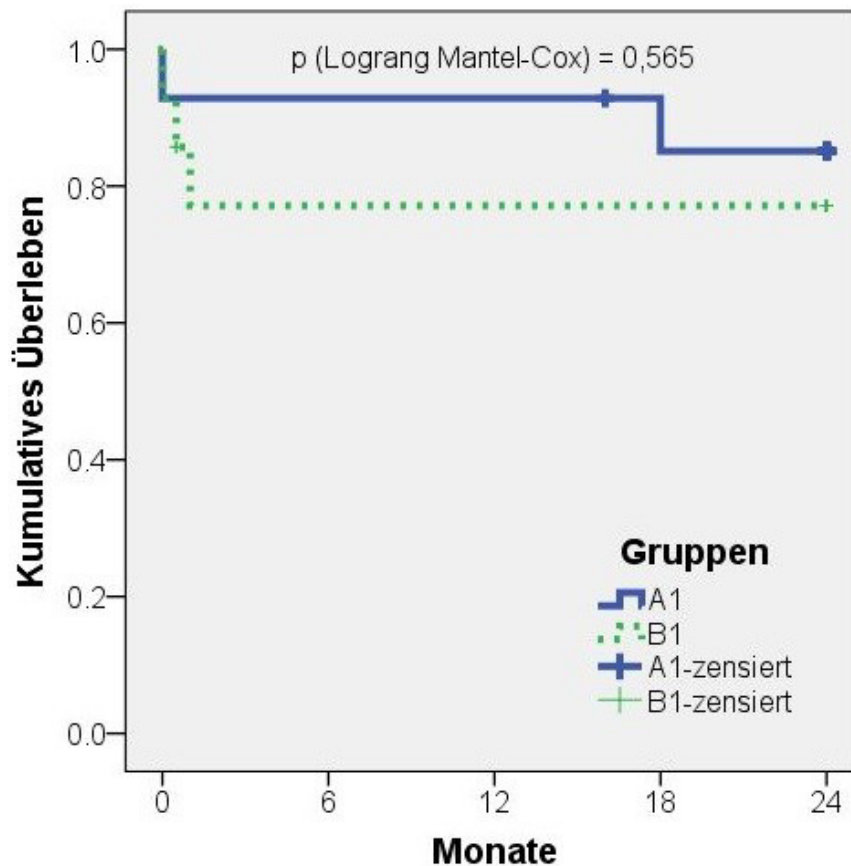


Abb. 6: Kaplan-Meier-Kurve

3.7 Postoperative LVEF

Die Veränderungen der LVEF nach der OP wurden im Hinblick auf die Studiengruppe A besonders beobachtet. Es wurden Echokardiogrammdaten nach drei, sechs und zwölf Monaten postoperativ erhoben. Die LVEF Werte der Gruppe B lagen aus der präoperativen Zeit vor, ebenso lag ein Datensatz von postoperativen LVEF Daten der gematchten Patienten der Gruppe B1 vor. Diese Daten sind zwölf Monate nach der ACB erhoben worden. Die echokardiographisch ermittelte LVEF der Gruppe A entwickelte sich im Mittel von präoperativ $25,9 \pm 1,3\%$ auf $40,7 \pm 2,1\%$ nach zwölf Monaten (mit $p < 0,001$). Die für den Vergleich herangezogenen Patienten der Gruppe A1 hatten eine Entwicklung von durchschnittlich $24,7 \pm 1,3\%$ präoperativ auf $38,4 \pm 2,1\%$ nach zwölf Monaten postoperativ (mit $p < 0,001$). Darüber hinaus war auch der Anstieg der LVEF Werte nach drei und sechs Monaten im Vergleich zum präoperativen Wert hoch signifikant ($p < 0,001$), siehe Abb. 7. Kein Patient wies in diesem Zeitraum eine Verschlechterung der Pumpfunktion des Herzens auf.

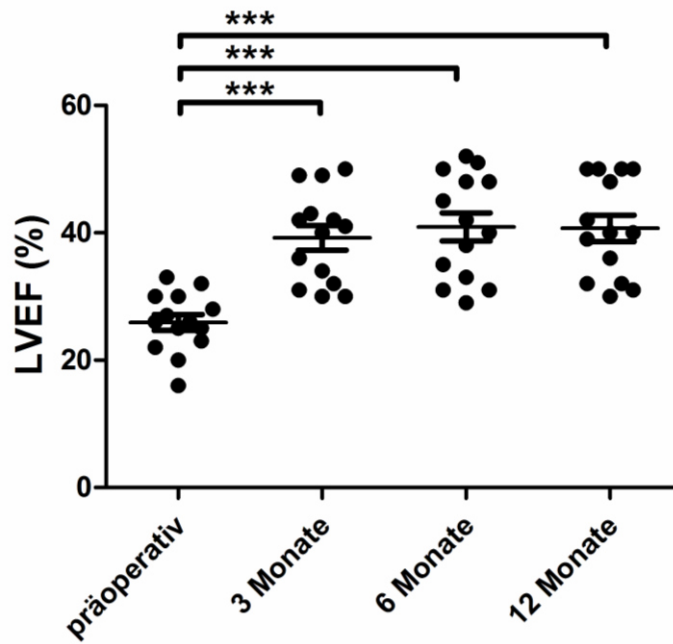


Abb. 7: LVEF-Entwicklung in Gruppe A (***) = $p < 0,001$)

Die patientenbezogenen LVEF Entwicklungen der Gruppe A1 sind der *Abb. 8* zu entnehmen, die ungematchten Patienten der Gruppe A sind in *Abb. 9* zu finden. Die mit * versehen präoperativen LVEF Werte wurden im Mittelwert nicht berücksichtigt.

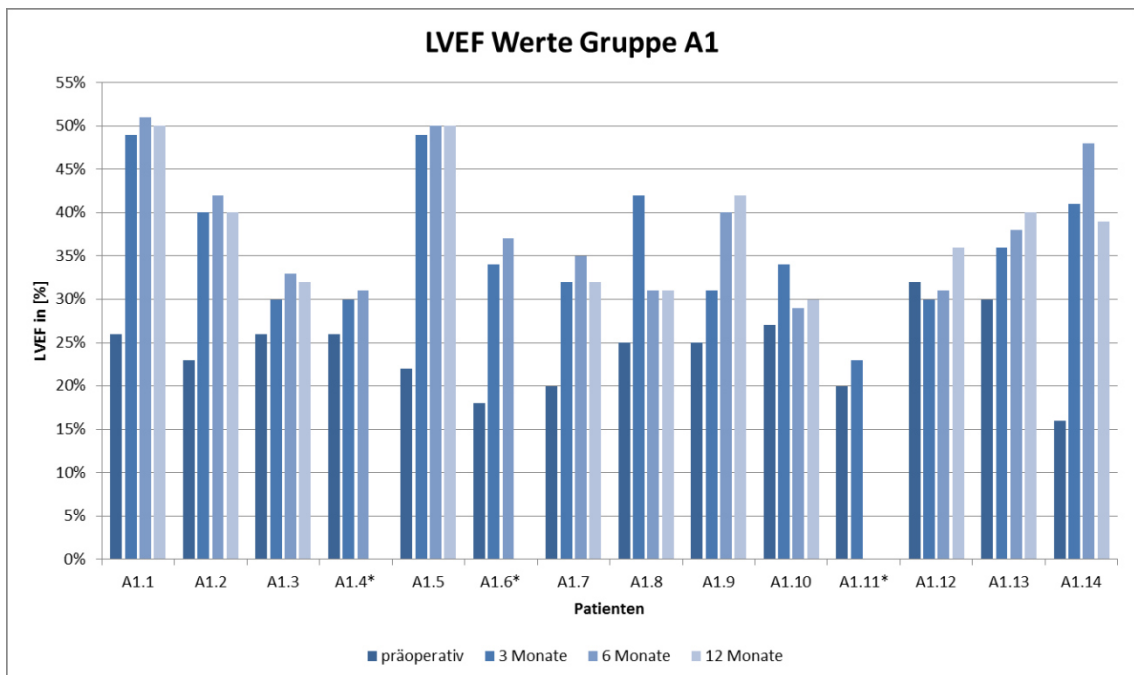


Abb. 8: LVEF-Werte Gruppe A1

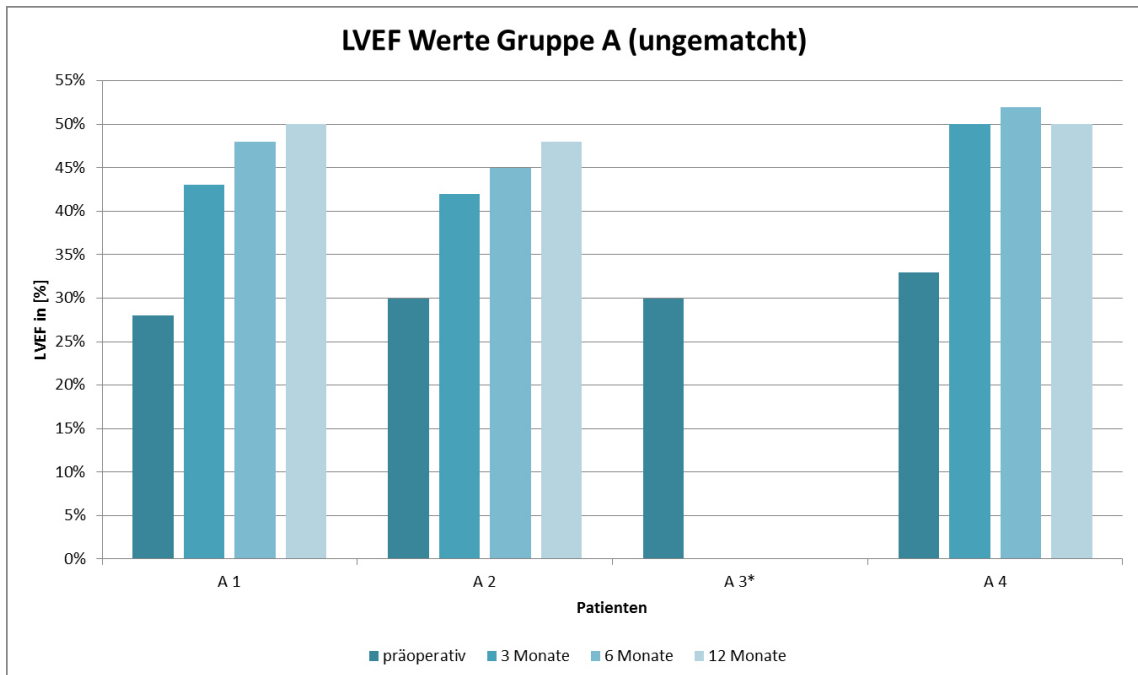


Abb. 9: LVEF-Werte ungematchter Patienten der Gruppe A

Die für den Vergleich der LVEF herangezogenen Patienten der Gruppe B1 zeigten im Durchschnitt eine LVEF von $31,3 \pm 1,3\%$ vor der OP und verbesserten sich im Mittel auf $34,2 \pm 2,2\%$ nach zwölf Monaten. Dieses Ergebnis zeigte in der statistischen Auswertung keine Signifikanz ($p=0,1632$). Es gab sowohl Verbesserungen als auch Verschlechterungen der Pumpfunktion in dieser Patientengruppe. Die patientenbezogenen Einzelwerte sind der untenstehenden *Abb. 10* zu entnehmen. Die mit * versehen präoperativen LVEF Werte wurden im Mittelwert nicht berücksichtigt.

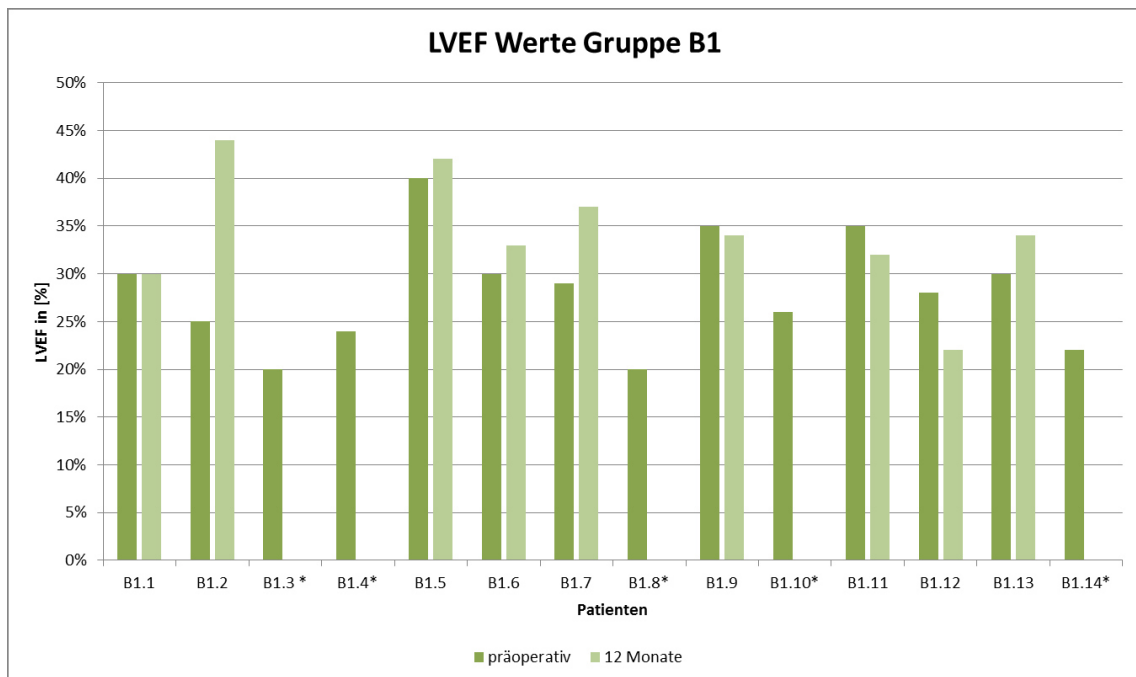


Abb. 10: LVEF-Werte Gruppe B1

Bei der Auswertung der vergleichbaren Paare der Gruppen A1 und B1 wurde ersichtlich, dass die absolute Steigerung der LVEF in der Gruppe A1 von präoperativ auf postoperativ $16,0 \pm 3,1\%$ betrug, während die zur Auswertung Herangezogenen der Gruppe B1 eine Verbesserung von durchschnittlich $3,7 \pm 3,0\%$ vorwies. Wie in *Abb. 11* zu sehen, war die LVEF Veränderungen im Vergleich zwischen den beiden Gruppen signifikant $p < 0,05$.

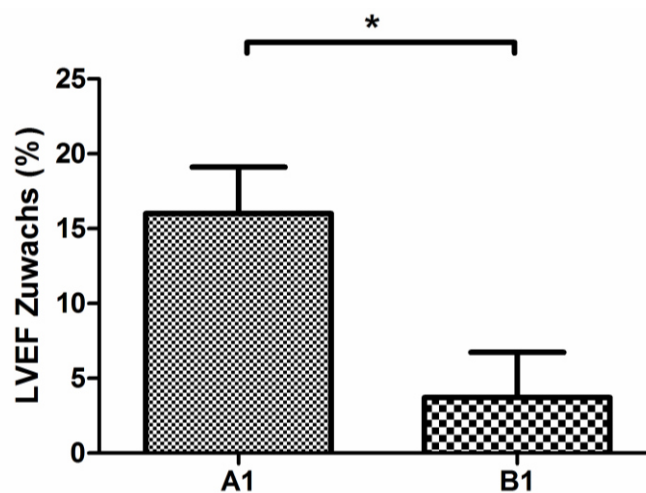


Abb. 11: LVEF-Zuwachs A1, B1 (* = $p < 0,05$)

Für diese Berechnung konnten nur die Paare verwendet werden, bei denen beide Werte vorhanden waren. Exemplarisch wurde hier das Paar 13 zur Darstellung der Werte vorgestellt. Beide vergleichbaren Patienten wiesen präoperativ eine LVEF von 30% auf, wobei sich die LVEF des Patienten A1.13 im Verlauf der zwölf-monatigen NU-Periode auf 40% steigerte, während der Patient B1.13 nach zwölf Monaten eine LVEF von 34% aufwies.

3.8 Nachuntersuchung

Die Ergebnisse der EKG-Auswertungen und Laboruntersuchungen sowie die Röntgenthorax-Diagnostik waren postoperativ unauffällig hinsichtlich chronisch ischämischer Kardiomyopathie-Patienten im Rahmen einer ACB. Während der gesamten Zeit der NU traten keine MACCE in der Gruppe A auf.

3.9 Lebensqualität

Die Auswertung des *Seattle Angina Fragebogens* der Gruppe A ergab eine Steigerung von 24,4 \pm 2,3 Punkten präoperativ auf 38,5 \pm 1,8 Punkte nach drei Monaten, weiter auf 39,5 \pm 2,1 Punkte nach sechs Monaten und auf 43,6 \pm 1,6 Punkte nach zwölf Monaten. Jeder postoperativ erhobene Wert ist in der Auswertung zum präoperativen Wert hoch signifikant verbessert ($p < 0,001$).

4 Diskussion

Im Hinblick auf die Patientengruppe mit ischämischer Kardiomyopathie, die medikamentös und interventionell atherapiert ist, stellte sich die Frage, ob diese Patienten von neueren Forschungserkenntnissen profitieren könnten. Jene geben den Ausblick, myokardiale Regeneration durch Zelltherapien und TMLR zu unterstützen [60, 65]. Eine Folge der diffusen KHK ist eine chronische Myokardischämie und AP. Im Endstadium leiden die Erkrankten an einer funktionell stark beeinträchtigenden ischämischen Kardiomyopathie. Das therapeutische Vorgehen in unserer Studie bestand in einer dreifachen kombinierten Therapie nach *Düsseldorfer Protokoll*, um dieser Patientengruppe eine neue Möglichkeit der Behandlung geben zu können. Hinsichtlich der Makroangiopathie war die Durchführung einer ACB notwendig. In Bezug auf die Mikroangiopathie erfolgte ein *ELIVE*. Zusätzlich bestand die Überlegung, eine mögliche Regeneration des Myokards mit einer CD133⁺ Zelltherapie zu unterstützen.

4.1 Sicherheit und Machbarkeit

In der Problemstellung dieser Arbeit wurde die Frage aufgeworfen, ob eine Kombination aus ACB und *ELIVE*-unterstützter CD133⁺ Zelltherapie sicher und durchführbar ist. Ein wichtiger Sicherheitsaspekt waren die Risiken, die im Vorhinein bewertet und für jeden Patienten individuell abgewägt werden mussten. In dieser Studie war es zudem nötig, die Risiken der einzelnen als sicher bewerteten Verfahren im Gesamtkonzept zu sehen und die Risikosummierung zu beurteilen. Für die Risikosummierung wurden folgende Punkte bewertet: Einerseits eine potentiell höhere Gefahr durch ein längeres und erweitertes OP-Verfahren mit Knochenmarkspunktion, *ELIVE* und Knochenmarkszellapplikation in kardial marginal kompensierten Patienten, andererseits eine mögliche geringere Belastung durch eine einmalige Anästhesie im Vergleich zu einem zweizeitigen Verfahren, wie es in früheren Studien mit Knochenmarkszellanwendung beschrieben worden ist. Ferner entfielen die zusätzliche Kultivierung und Lagerung der Zellen bis zur Transplantation mit Kontaminationsgefahr [41]. Diese Bewertungen und Abwägungen wurden seitens des *Paul Ehrlich Institutes* sowie auch von den Universitäts-zugehörigen Ethik-Kommissionen zur Zulassung der Studie akzeptiert.

Alle Elemente unserer Kombinationstherapie sind sowohl einzeln als auch teilkombiniert in Studien bei Tieren als auch in klinischen Studien bereits erprobt und als machbar beurteilt worden [39, 41, 48, 53, 54, 66]. Die ACB ist nach der *Nationalen Versorgungs-Leitlinie Chronische KHK 2. Auflage Version 1 Juli 2013* das etablierte Verfahren bei koronarer Mehrgefäßerkrankung mit

hochgradigen proximalen Stenosen sowie bei Patienten, die älter als 75 Jahren sind und persistierende Symptomatik aufweisen und ebenso bei nicht medikamentös beherrschbarer AP [1, S. 53f.]. Die ACB nimmt einen großen Anteil aller durchgeführten OPs in der Herzchirurgie ein. Durch die Weiterentwicklung der PCI werden Patienten in schlechterem kardialen Status der ACB zugeführt. Trotz schlechterer Voraussetzung für eine OP mit der Folge des höheren Risikos perioperativ zu versterben, sprechen hohe Überlebenszahlen in der Herzchirurgie, trotz älterer Patienten und höherer Morbidität, für die Sicherheit der ACB insgesamt [67].

Die TMLR fand in zahlreichen Studien Anwendung und zeigte neben der Machbarkeit und Sicherheit des Verfahrens eine signifikante Verbesserung der AP-Symptomatik um bis zu zwei CCS-Klassen bei refraktärer AP [47, 51, 55].

In der Literatur sind Studien zu finden, die eine Kombination aus ACB und TMLR evaluieren. *Allen et al.* veröffentlichten 2000 eine kombinierte Studie von ACB und TMLR und stellten dort die Sicherheit und Effektivität dieses Verfahrens vor. Die kombiniert behandelten Patienten wiesen eine geringere Mortalitätsrate auf als die Vergleichsgruppe mit ACB und einen geringeren Bedarf an inotropen Medikamenten. [54]. Zu unterstützenden Ergebnissen in Bezug auf die Sicherheit und die Effektivität des Verfahrens gelangten auch *Frazier et al.* In dieser randomisierten Studie wurden ACB und ACB kombiniert mit TMLR verglichen. 44 Patienten mit diffuser KHK und mindestens einer nicht-bypassfähigen Myokardregion wurden postoperativ im Verlauf von vier Jahren evaluiert. In diesem Zeitraum benötigte die Gruppe der kombinierten OP keine weitere Re-Revaskularisation, während 24% in der ACB Gruppe weitere Revaskularisationen brauchten [68].

Horvath et al. analysierten in einer Metastudie 5618 Patienten, die eine kombinierte OP bekommen hatten und fanden heraus, dass diese Patienten eine höhere Prävalenz zu diffuser KHK hatten, aber keine höhere Mortalität aufwiesen trotz erweiterter Operationstechnik. Sie schlussfolgerten, dass auch diese Methode der kombinierten ACB mit TMLR sicher und effektiv sei [69].

Die Zellgewinnung in unserer Studie erfolgte im OP-Saal nach eingeleiteter Narkose über eine Knochenmarkspunktion zeitlich vor Beginn der ACB. Eine Knochenmarkspunktion im Beckenkamm zur Gewinnung von Knochenmarkszellen ist neben der peripheren Gewinnung von Progenitorzellen ein alternatives Verfahren der Knochenmarkszellgewinnung. Die Zellaufbereitung erfolgte mit Hilfe des *CliniMACS® System*. Es wurde speziell von der *Firma Miltenyi Biotec GmbH* zur Aufbereitung sehr reiner Zellisolate durch magnetisierte Antikörper entwickelt. Technische Vorteile der CD133⁺ Zellen waren die autologe Gewinnung und die Möglichkeit, mithilfe von Antikörpern gegen CD133⁺ sehr reine Zellisolate zu gewinnen [37, 39]. In klinischen Studien fand das *CliniMACS®* Procedere bereits häufig Anwendung

[39, 41, 70]. *Jeevanantham et al.* konnten in einer Metaanalyse von 50 Knochenmarkszell-assoziierten Studien demonstrieren, dass bei Patienten mit chronisch ischämischer Kardiomyopathie die Transplantation von Knochenmarkszellen sicher ist [71]. Ebenso existieren Sicherheits- und Machbarkeitsstudien über die transmyokardiale Applikationsweise der Knochenmarkszellen in Kombination mit ACB [36, 39].

Das *Düsseldorfer Protokoll* konnte in allen Anwendungen der Gruppe A durchgeführt werden und musste weder abgebrochen oder angepasst werden. Im Zusammenhang mit der *ELIVE*-unterstützten CD133⁺ Anwendung traten perioperativ weder schwerwiegende Ereignisse noch *MACCE* auf. Es traten zudem keine *MACCE* im gesamten NU auf. Angesichts der Ergebnisse aus den NUs war zu folgern, dass die Gruppe A1 verglichen mit der Gruppe B1 keine körperlichen Nachteile oder gesundheitlichen Folgen im Sinne einer Verschlechterung hatte. Diese Resultate lassen schließen, dass die Kombination aus ACB, *ELIVE* und CD133⁺-Zelltherapie sicher und machbar im Hinblick auf die KHK-Hochrisikopatienten war.

Insgesamt zeigte die Gruppe A1 einen insignifikanten Unterschied im Überleben zur Gruppe B1. Dies zeigt, dass sie trotz eines erweiterten OP-Procedure keine vermehrte Rate an Todesfällen aufwies. Die Gruppe A1 zeigte sogar in der Gegenüberstellung eine Überlebensrate von 92,8% nach zwei Monaten postoperativ, die sich in den ersten zwölf Monaten nicht mehr änderte, während die Gruppe B1 mit einer Rate von 78,6% schlechter abschnitt. In der zensierten Überlebenswahrscheinlichkeit nach zwei Jahren hatte die Gruppe A1 eine 85,1 ±9,7%ige Lebenserwartung, im Vergleich dazu hatte ein Patient der Gruppe B1 eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 77,1 ±11,7% (p=0,565). Das insignifikante Ergebnis sollte sicherlich auch im Hinblick auf die sehr kleine Patientenzahl betrachtet werden.

Im Vergleich zur konventionellen ACB war der Ressourcenverbrauch in unserer Studie sicherlich etwas höher (Knochenmarkspunktion, Zellaufbereitungssystem, CO²-Lasengerät). Im Vergleich zu zweizeitigen Ablaufmöglichkeiten unserer Therapieelemente war diese Abfolge aber die wohl effektivste Möglichkeit. Eine Knochenmarkspunktion und Aufbereitung an einem anderen Tag vorzunehmen wie es in anderen Studien durchgeführt wurde, hätte sicherlich einen größeren zeitlichen Aufwand bedeutet und weitere Kosten verursacht [41, 72]. Zusätzliche Kosten für die Lagerung, doppelte Anästhesie, OP-Teams und Saalbelegungen müssten eingerechnet sowie das erhöhte Risiko der Kontamination des Zelltherapeutikums berücksichtigt werden.

Insgesamt konnten die Ergebnisse der Studie zeigen, dass das *Düsseldorfer Protokoll* zur ACB und *ELIVE* unterstützten CD133⁺ Knochenmarkszell-Transplantation sicher und machbar ist [66].

4.2 Simultaner Ablauf

In der initialen Problemstellung stellte sich als zweiter Punkt die Frage, ob es möglich ist, die Zellgewinnung und Zellaufbereitung parallel zur ACB durchzuführen. Sicherlich ist diese Frage als Teilfrage des ersten Punktes der Problemstellung zu sehen. Dennoch erschien es sinnvoll, diesen Teilaspekt des *Düsseldorfer Protokolls* noch einmal gesondert zu diskutieren, da es -nach Wissen der Arbeitsgruppe- die erste klinische Studie mit ACB und *ELIVE*-unterstützter CD133⁺ Zelltherapie innerhalb einer Operationssitzung war.

Um ein simultanes Vorgehen zu ermöglichen, brauchte es ein erfahrenes Team im Umgang mit der ACB sowie ein parallel arbeitendes Teammitglied zur Gewinnung, Aufbereitung und Charakterisierung der autologen Knochenmarkszellen. Durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit der *Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie* mit dem *Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika* des *Universitätsklinikums Düsseldorf* konnten diese Voraussetzungen erfüllt werden. Die strengen mikrobiologischen Kontrollen der Zellen erfolgten durch das *Institut für Mikrobiologie* des *Universitätsklinikums Düsseldorf*. Dieses Vorgehen ermöglichte die Gewinnung von hohen Zellzahlen bis zu 30×10^6 CD133⁺ Zellen mit einer Reinheit von $85,0 \pm 1,5\%$ und Vitalität von $85,0 \pm 2,1\%$. Diese Ergebnisse und die durchschnittliche Dauer der Zellaufbereitung von $215 \pm 6,9$ Minuten wurden befähigt durch die Anwendung des *CliniMACS® Systems*, welches sich bereits in zahlreichen klinischen Studien bewährt hat [37, 38, 39, 70, 72, 73]. Während der Studien-OPs kam es weder zu Aufbereitungsfehlern noch mussten Zellsuspensionen verworfen werden. In allen 18 Fällen der Patientengruppe A konnte die Zelltherapie komplikationslos angewendet werden. Es gab weder Aufreinigungs-, Applikationsfehler, noch Kontaminationen. Überdies kam es in keinem Fall zu einer Zelltherapie-assoziierten Komplikation in der zwölfmonatigen NU.

Diese Ergebnisse lassen die Folgerung zu, dass das speziell entwickelte *Düsseldorfer Protokoll* eine sehr reine Zellisolation mit hoher Vitalität ermöglicht. Die Vorteile dieses Verfahrens sind ein zeiteffektive Vorgehen von Zellgewinnung und Aufbereitung während der ACB mit geringstmöglicher Belastungszeit für den Patienten in Narkose. Zudem bietet das *Düsseldorfer Protokoll* die Möglichkeit, die Zelltherapie auch in Notfällen anzuwenden, da keine aufwendige Zellgewinnung, Aufbereitung und Lagerung präinterventionell benötigt [37, 41]. Besonders im Hinblick auf die körperliche Verfassung der Patienten mit funktionell stark beeinträchtigter Herzfunktion war es wichtig, ein Verfahren zu entwickeln, das einerseits flexibel ist und andererseits eine geringere Belastung durch effektivere Narkose bietet.

4.3 Verbesserung der kardialen Funktion

Als letzter Punkt der Problemstellung wurde die Frage aufgeworfen, ob die Dreifach-Therapie das Potential zur myokardialen Regeneration trägt. Um diese Frage beantworten zu können, war es sinnvoll die Studiengruppen im Vergleich auszuwerten. Die präoperative Übereinstimmung der Gruppen A1 und B1 war über das statistische Matching gewährleistet. Der bereits erwähnte *EuroSCORE II* zeigte, dass die Gruppe A1 ein geringeres Risiko der postoperativen Mortalität trug als die Gruppe B1. Dargelegt in Zahlen waren es $5,8 \pm 0,7\%$ für Gruppe A1 und $9,1 \pm 2,1\%$ für Gruppe B1. Diese Ergebnisse waren in der statistischen Auswertung jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Somit kann von einer Vergleichbarkeit der Gruppen ausgegangen werden. Unterstützend hierfür war ebenfalls das retrospektive Matching der Gruppen.

Das Risiko der postoperativen Mortalität wurde für das Studienkollektiv mit Hilfe des *EuroSCORE II* errechnet. Es zeigte sich, dass alle eingeschlossenen Patienten im Durchschnitt ein erhöhtes Risiko der postoperativen Frühmortalität aufwiesen. Die errechneten Werte zeigten keinen signifikanten Unterschied in den beiden gematchten Gruppen (siehe 2.3.5), so dass von vergleichbaren Voraussetzungen präoperativ auszugehen war.

Der wichtigste klinische Parameter für die myokardiale Regeneration war die Entwicklung der LVEF. Sowohl die Gruppe A als auch die Gruppe A1 zeigten hochsignifikante Ergebnisse ($p < 0,001$) in der präoperativen LVEF Entwicklung zu jeder ermittelten postoperativen LVEF (drei, sechs und zwölf Monate). In der Auswertung der Gruppe A1 steigerte sich die Auswurfleistung des Herzen von $24,7 \pm 1,3\%$ auf $38,4 \pm 2,1\%$ nach zwölf Monaten. Die Ergebnisse der Gruppe B1 fielen schlechter aus. Im Gegensatz zu den Gruppen A und A1 waren die Resultate der Auswertung bei einer Verbesserung der Auswurfleistung auf $34,2 \pm 2,2\%$ nach zwölf Monaten von $31,3 \pm 1,3\%$ präoperativ nicht signifikant ($p=0,1632$). In dieser Gruppe gab es sowohl Steigerungen der LVEF als auch Verschlechterungen ein Jahr nach der ACB.

In der Gegenüberstellung der Vergleichbaren Patienten der Gruppen A1 und B1 gab es einen signifikanten Unterschied der absoluten Ergebnisse ($p < 0,05$). Während in der Gruppe A1 eine Steigerung der LVEF von absolut $16,0 \pm 3,1\%$ erreicht wurde, war es in der Gruppe B1 lediglich eine Verbesserung von durchschnittlich $3,7 \pm 3,0\%$.

Diese Ergebnisse zeigen im Hinblick auf die Frage des Potenzials zur myokardialen Regeneration einen möglichen positiven Einfluss der *ELIVE* unterstützten CD133⁺ Zelltherapie auf die Herzfunktion. Denn bezüglich der insignifikanten Ergebnisse der Gruppe B1, bei der die konventionelle ACB als Therapie angewendet wurde, war der einzige Unterschied in der Therapie Gruppe A1 die *ELIVE* unterstützte CD133⁺ Zelltherapie. Dies legt nahe, dass die *ELIVE* unterstützte Zelltherapie ursächlich beteiligt war. Zur Anwendung der

ELIVE gibt es zwei Arten von Lasern, die in Studien Unterschiede in den Ergebnissen zeigten. Bezogen auf das Outcome war eine Verbesserung der Perfusion in den ischämischen Arealen um 20% bei der TMLR mit dem CO²-Laser zu finden [57]. Im Gegenzug dazu zeigten Studien mit der Anwendung des Ho:YAG-Lasers keine signifikante Verbesserung der Perfusion [55]. Unterschiede sind ebenfalls in den Langzeitergebnissen zu finden. *Horvath et al.* fanden in der Anwendung vom CO²-Laser von anfänglich 3,7 ±0,4 CSS-Klassen nach 5 Jahren eine Verbesserung auf durchschnittlich 1,6 ±1,0 CSS-Klassen [53], während sich die Qualität der Anwendung des Ho:YAG-Lasers in der Langzeitauswertung von anfänglich 3,5 ±0,5 auf 1,8 ±0,8 CCS-Klassen bereits nach 3 Jahren wieder verschlechterte auf durchschnittlich 2,2 ±0,7 CCS-Klassen [55]. Der CO²-Laser bietet neben dem ermittelten besseren Outcome auch einen entscheidenden Vorteil: Er lasert EKG R-Wellen getriggert um Arrhythmien zu verhindern [55]. Diese Vorteile sprachen im Vorhinein für die Anwendung des CO²-Lasers in der Studienoperation. Der Mechanismus der TMLR konnte bislang nicht endgültig geklärt werden, es gibt die Hypothese, dass ein TMLR vorbehandeltes Herz empfänglicher für Knochenmarksprogenitorzellen und Wachstumsfaktoren sei. *Spielstein et al.* konnten in Tierexperimenten feststellen, dass es zu einem verbesserten Transplantatüberleben sowie vermehrter Angiogenese im Narbenbereich kam [65]. In einer anderen Studie wurde über eine durch TMLR verursachte lokale Inflammation berichtet, die angiogenetische Differenzierung triggerte. Bei acht Patienten, die nach der Anwendung einer TMLR verstarben, wurden im Zeitraum bis sieben Tage nach der OP verschlossene Kanäle sowie Entzündungszellen gefunden. Drei Wochen postoperativ fanden die Pathologen Granulationsgewebe und Kapillarsprossung im Bereich der Kanäle [74]. In der Literatur gibt es einen 2-Fälle Report über eine angewandte CD133⁺ Knochenmarkszelltransplantation in Kombination mit TMLR. Jene beiden Patienten zeigten eine Steigerung der LVEF und eine signifikante Verbesserung der Myokardkontraktion [60].

Die zweite Komponente der Kombination ist die Zelltherapie. Nach Abwägen der Zellarten gegeneinander fiel die Entscheidung auf die CD133⁺ Zellen, eine gut erforschte Zellsorte (vgl. Abschnitt 1.3). Diese Zellen bieten ein großes neoangiogenetisches Potential [35]. Diese Eigenschaft war ideal für das neue Studiendesign, da durch die TMLR oder *ELIVE* Gewebereize in ischämischen Myokardregionen gesetzt wurden um ein verbessertes Überleben von transplantierten Zellen ermöglichen zu können [65]

Stamm et al. untersuchten die Kombination von ACB und CD133⁺ Zelltherapie, wonach die Studiengruppe signifikant bessere LVEF Ergebnisse erzielte [36, 41]. In der 2007 veröffentlichten Studie konnte eine absolute Steigerung der LVEF von +9,7 ±8,8% in der kombinierten Therapie festgestellt werden, wohingegen die mit der ACB therapierte Gruppe nur eine absolute Steigerung

von $3,4 \pm 5,5\%$ aufwies. Die Unterschiede der Gruppenergebnisse waren signifikant, jedoch lag die präoperative LVEF des gesamten Studienkollektives deutlich höher als im Vergleich zum Studienkollektiv A1. So wies die Zelltherapiegruppe in der Studie von *Stamm et al.* präoperativ eine LVEF von $37,4 \pm 8,4\%$ Standardabweichung (SD), in unserer *ELIVE* unterstützten Zelltherapiegruppe A1 eine durchschnittliche LVEF von $24,7 \pm 1,3\%$ auf [41]. Beim Vergleich der Ergebnisse dieser beiden Studien, stellt sich die Frage, welchen Einfluss die präoperative Herzfunktion auf das Outcome der Patienten hat. Denn bei der Betrachtung der Ergebnisse haben die nach dem *Düsseldorfer Protokoll* therapierten Patienten bei anfänglich deutlich schlechterer Herzfunktion eine deutlich höherer Steigerung der LVEF postoperativ [$+9,7 \pm 8,8\%$ (SD) bei *Stamm et al.* versus $16,0 \pm 3,1\%$ Gruppe A1]. Zusätzlich muss bei der Überlegung der mögliche Einfluss der *ELIVE* bedacht werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten allerdings die beiden Kontrollgruppen mit der Therapie der ACB [$+3,4 \pm 5,5\%$ (SD) bei *Stamm et al.* versus $3,7 \pm 3,0\%$ in Gruppe B1] [41]. Weitere Studien wären erforderlich, um diese speziellen Fragen untersuchen zu können.

In der Literatur sind wenige Studien zu finden, die sich mit der Kombination von TMLR und Stammzellanwendung beschäftigen. Spiegelstein et al. starteten mit der Hypothese, dass ein mit TMLR vorbehandeltes Herz empfänglicher sei für Knochenmarksprogenitorzellen und applizierte Wachstumsfaktoren: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Insuline-like Growth Factor-1 (IGF-1). Die Ergebnisse aus Rattenversuchen zeigten -verglichen mit der Kontrollgruppe- in der TMLR-Gruppe ein verbessertes Transplantat-Überleben, Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und vermehrte Angiogenese im Narbenbereich verglichen mit der Kontrollgruppe [65]. In einem 2-Fälle-Report haben *Klein et al.* eine angewandte CD133⁺ Knochenmarkszelltransplantation in Kombination mit TMLR beschrieben. Diese beiden Patienten zeigten eine Verbesserung der EF und eine signifikante Verbesserung der Myokardkontraktion [60]. Beide Fälle beruhten auf dem theoretischen Hintergrund von *Krabatsch et al.*, die 1996 über einen möglichen synergistischen Effekt von TMLR und Stammzellen berichteten. Sie stellten die Theorie auf, dass die lokale Inflammation, induziert durch TMLR, eine Informationsplattform für die applizierten Zellen bilden sollte (homing), die deren angiogenetische Differenzierung veranlasste [74].

Yerebakan et al. fanden in einer ACB Langzeitstudie mit CD133⁺ Zellanwendung heraus, dass eine Kombination sicher sei, jedoch keinen nachhaltigen Effekt auf die LVEF nach sechs Monaten, bei Patienten mit einer LVEF größer als 40% aufwies. Eine Ausnahme waren Patienten mit einer präoperativen LVEF von unter 40%, welche signifikante LVEF-Verbesserungen zeigten, insbesondere auch in der Langzeit NU von bis zu 9 Jahren. Ein

weiterer wichtiger Faktor sei der Zeitraum bis zur Transplantation nach einem AMI: Idealerweise sieben bis zwölf Wochen danach [72].

Nasser et al. veröffentlichten 2014 die doppelblind randomisierte CARDIO133 Studie. Eine ACB in Kombination mit CD133⁺ Zellanwendung zeigte bei den Patienten weder einen relevanten Effekt auf die LVEF noch auf die klinischen Symptome [75]. Diese Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass besonders im Umgang mit Zelltherapien eine sorgfältige Analyse und Vorauswahl der Patienten, die von einer Zelltherapie profitieren, getroffen werden sollte und in dem Bereich noch weitere klinische Studien gebraucht werden.

Eine Verbesserung der LVEF von $27,2 \pm 6,8\%$ (SD) auf $29,7 \pm 7,2$ (SD) bei Patienten mit eingeschränkter Herzfunktion und altem abgelaufenen AMI sowie eine Verbesserung der Koronarperfusion konnten *Manginas et al.* in einer Sicherheits- und Machbarkeitsstudie in der intrakoronaren Anwendung von CD133⁺ Zellen feststellen [39]. *Bartunek et al.* hingegen stellten in einer Gruppe AMI Patienten mit angewendeter intrakoronarer CD133⁺ Zelltherapie fest, dass diese Anwendung zwar machbar war und zur funktionellen Verbesserung der LVEF von anfänglich $45,0 \pm 2,5\%$ auf $52,1 \pm 3,5\%$ mit $p < 0,05$ führte, es allerdings vermehrt zu koronaren Vorfällen kam [70].

Die BONAMI Studie, in der der Effekt einer intrakoronaren BMC Anwendung nach AMI untersucht wurde, zeigte keinen nachhaltigen Effekt nach drei Monaten im Vergleich zur Kontrollgruppe [76]. Ähnliche insignifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe nach vier bis sechs Monaten infolge intrakoronarer BMC Anwendung nach AMI zeigten die HEBE und TIME Studie [77, 78].

Jeevanantham et al. sahen keinen signifikanten Unterschied im klinischen Outcome bei Patienten mit chronisch ischämischer Kardiomyopathie im Vergleich zwischen intrakoronarer oder intramyokardialer Injektion von Knochenmarkszellen. Jedoch konnte diese Arbeitsgruppe keinen signifikanten Unterschied in der Therapie von CD133⁺ Zellen hinsichtlich der LVEF und Narbengröße feststellen mit dem Verweis auf den möglichen Zusammenhang mit einer sehr kleinen Anzahl von verwertbaren Studien [71]. Unter Berücksichtigung der Indikation zur ACB des Studienkollektives erschien es sinnvoll, den intramyokardialen Weg der CD133⁺ Zellen zu wählen, da eine intrakoronare Gabe eine weitere Intervention vorausgesetzt hätte.

Die nicht signifikanten Ergebnisse der Gruppe B1 (ACB ohne Zelltherapie) im Hinblick auf eine Verbesserung der Myokardfunktion zeigen die Limitation dieses Ansatzes im Kontext der myokardialen Regeneration auf. Bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie mag sich der Nutzen der ACB primär auf die Prophylaxe fortschreitender Myokardschädigung beschränken. Dieses Ergebnis sollte sicherlich einerseits hinsichtlich der geringen Anzahl der Patienten betrachtet werden. Andererseits weist es darauf hin, dass es dringend nötig ist,

in diesem Bereich weiter zu forschen, um auch Hochrisikopatienten mit chronisch ischämischer Kardiomyopathie eine optimale Therapie zu ermöglichen.

Zudem deuten die teils widersprüchlichen Ergebnisse der Studien auf weiteren Forschungsbedarf auf diesem Gebiet hin. Angesichts des kleinen Studienkollektives scheint es sinnvoll, an einem größeren Patientenkollektiv mit prospektiv randomisiertem Studiendesign weitere Erkenntnisse zu erlangen.

Ein weiterer Aspekt war die Entwicklung der Lebensqualität für die einzelnen Patienten. Die WHO gab 1993 folgende Definition heraus: „*Lebensqualität ist die subjektive Wahrnehmung einer Person über ihre Stellung im Leben in Relation zur Kultur und den Wertsystemen, in denen sie lebt und in Bezug auf ihre Ziele, Erwartungen, Standards und Anliegen*“. Hierzu wurde der 1995 veröffentlichte *Seattle Angina Fragebogens* zur Auswertung herangezogen [79]. Die Studienergebnisse zeigten während der gesamten NU eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität in der Gruppe A.

4.4 Studienlimitation

Angesichts der kleinen Studiengruppe sind die Ergebnisse sicherlich kritisch zu bewerten, allerdings war nicht das primäre Ziel der Studie die Wirksamkeit der Therapie nachzuweisen. Im Sinne einer Sicherheits- und Machbarkeitsstudie sollte zunächst untersucht werden, ob die Durchführung der ACB, Zellgewinnung und *ELIVE* unterstützten CD133⁺ Zelltherapie innerhalb einer Operationssitzung Komplikationen verursacht. Aufgrund der Ergebnisse der Gruppe A1 konnte dies verneint werden. Zudem geben die Studienergebnisse Ausblick auf eine Verbesserung der kardialen Funktion nach der erweiterten Therapie, welche den Weg zur Untersuchung größerer Studienkollektive unter prospektiv randomisierten Bedingungen ebnet. In diesem Studiendesign war es nicht möglich, den Beitrag jedes einzelnen Verfahrens, sondern lediglich die Kombination der *ELIVE* unterstützten CD133⁺ Zellanwendung im Vergleich zur ACB zu bewerten. Die Untersuchung der einzelnen Komponenten würde einen sehr großen Studienaufwand bedeuten, der den Rahmen einer Sicherheits- und Machbarkeitsstudie sprengen würde. Dennoch war es möglich, die Tendenz zu erkennen, dass die *ELIVE* unterstützte CD133⁺ Zelltherapie als Erweiterung der ACB im Gegensatz zur alleinigen Anwendung der ACB signifikant bessere Ergebnisse erzielte. Die Mechanismen der Wirkungen sind nicht endgültig geklärt, dies stellt allerdings eine große Hürde dar, da es ethisch schwierig ist, systematische histologische Untersuchungen humaner Herzen nach Zelltransplantation zu rechtfertigen.

Aufgrund der ersten vielversprechenden Resultate der Gruppe A wurde retrospektiv eine Kontrollgruppe erstellt. Dies stellte in unserem Fall die unkomplizierteste Methode dar, eine Fall-Kontroll-Studie unter Einbeziehung

der bereits operierten Patienten durchzuführen. Die zum Matching verwendeten *Propensity*-(Neigungs)-*Scores*, in denen spezielle *Greedy-Matching-Algorithmen* mit *PROC LOGISTIC (SAS)* angewendet werden sind bewährte Verfahren um eine mögliche statistische Verzerrung zu reduzieren, da dies eine möglichst genaue retrospektive Vergleichbarkeit gewährleistet [64]. Viele Studien, in denen auch die Sicherheit und Machbarkeit eines neuen Verfahrens geprüft werden, werden mit einer Fallgruppe designt ohne eine bestehende Kontrollgruppe [43, 45, 51, 60]. Ein Problem bei der Anwendung einer retrospektiv erhobenen Kontrollgruppe war es, dass nur Daten verwendet werden konnten, die im postoperativen Zeitraum erhoben und dokumentiert wurden. So fehlten beispielsweise die vergleichbaren LVEF Kontrollen nach drei und sechs Monaten nach der OP der Gruppe B1. Die wichtigen Daten zur Sicherheit und Machbarkeit der Studie sowie der LVEF nach zwölf Monaten sind jedoch erhoben worden, so dass die Kernaussage dieser Studie sicherlich als Grundlage für weitere Studien herangezogen werden kann.

4.5 Schlussfolgerung

In der hier vorgestellten Studie hinsichtlich der Patienten mit schwerer ischämischer Kardiomyopathie konnte die Sicherheit und Machbarkeit des *Düsseldorfer Protokolls*- bestehend aus ACB und ELIVE unterstützter CD 133⁺ Zelltherapie - belegt werden. Weiterhin war es möglich zu demonstrieren, dass ein paralleler Ablauf von Zellaufbereitung zur ACB durchführbar war ohne die Notwendigkeit einer separaten präoperativen Zellgewinnung. Unter Anwendung des *Düsseldorfer Protokolls* konnte eine reine CD133⁺ Zellsuspension gewonnen werden. Ein großer Vorteil gegenüber Verfahren, die die Zellgewinnung präoperativ durchführen, ist die Möglichkeit, im Notfall auch flexibel durch den parallelen Ablauf der ACB und Zellaufbereitung eine Zelltherapie anzuwenden.

In Bezug auf unsere austerapierten Studienpatienten mit chronisch ischämischer Kardiomyopathie und einer Herzfunktion von unter 35% zeigten die myokard-funktionellen Ergebnisse eine signifikante Verbesserung nach Kombinations-Therapie und die Wirksamkeit der *ELIVE* unterstützten CD133⁺ Zelltherapie in Erweiterung zur ACB. Zudem konnte eine deutliche Steigerung der Lebensqualität der Patienten belegt werden.

Jedoch verbleiben ungeklärte Fragen angesichts der kontroversen Berichte anderer Studien. Besonders im Hinblick auf die optimale Auswahl der Patienten und die Effektivität der myokardialen Zelltherapie braucht es zukünftige große prospektive randomisierte klinische Studien, deren Initiierung auf Basis der vorliegenden Daten gerechtfertigt scheint.

5 Zusammenfassung

Die hohe Zahl von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie und eingeschränkter Therapiemöglichkeit insbesondere bei hochgradig reduzierter LVEF war Impuls zur Initiierung einer optimierten Therapie. Basierend auf neuen Erkenntnissen der autologen Stammzelltransplantation und TMLR ergab sich die Fragestellung, ob eine Kombination aus ACB und TMLR-unterstützter, modifizierter Zelltherapie nach dem speziell entwickelten *Düsseldorfer Protokoll* sicher und durchführbar ist und ob die Zellgewinnung und Zellaufbereitung parallel zur ACB erfolgen kann. Zudem war die Einschätzung des Potenzials einer myokardialen Regeneration dieser Dreifach-Therapie für Hochrisikopatienten relevant.

Das *Düsseldorfer Protokoll* gliedert sich in die Knochenmarkszellgewinnung durch Beckenkammpunktion, die zeitlich direkt darauf folgende ACB mit paralleler CD133⁺ Zellisolation sowie im Anschluss daran das *ELIVE* und die intramyokardiale Zellinjektion in ischämische Areale. In unserer Studie sind von 2007 bis 2009 65 Hochrisikopatienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie und einer LVEF zwischen 15% und 35% eingeschlossen worden. 18 Patienten wurden nach dem *Düsseldorfer Protokoll* operiert, 47 Patienten bekamen eine ACB. Retrospektiv konnten 14 Paare statistisch gematcht werden (Fallgruppe A1 vs. Kontrollgruppe B1). Die Evaluation der Lebensqualität erfolgte durch den *Seattle Angina Fragebogen* in der Fallgruppe. Die Nachuntersuchungsperiode betrug 12 Monate.

In allen 18 Patienten der Zelltherapiegruppe war das *Düsseldorfer Protokoll* klinisch anwendbar und führte zur Gewinnung einer CD133⁺ Zellreinheit von 85,0 ±1,5% und Vitalität von 85,0 ±2,1%. Zwischenfälle traten weder im parallelen Ablauf noch in der Zellanwendung auf. Die LVEF war in der Gruppe A1 von 24,7 ±1,3% präoperativ auf 38,4 ±2,1% nach zwölf Monaten postoperativ hoch signifikant angestiegen ($p < 0,001$). B1 zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied (von 31,3 ±1,3% auf 34,2 ±2,2% mit $p=0,1632$). Auch die Lebensqualität verbesserte sich in der Zelltherapiegruppe hoch signifikant.

In der hier vorgestellten Studie konnte die Sicherheit und Machbarkeit der Laser-unterstützten CD133⁺ Zelltherapie bei ACB- Patienten mit schwerer ischämischer Kardiomyopathie belegt werden. Im Besonderen wurde gezeigt, dass ein einzeitiges OP-Verfahren mit parallelem Ablauf von Zellaufbereitung und ACB zur sicheren Applikation eines reinen Zellisolats führt. Resultierend wird die Belastung für die kardial schwer beeinträchtigten Patienten auf einen einzigen Eingriff und die Notwendigkeit einer nur einmaligen Narkose reduziert und ermöglicht auch eine Anwendung in dringlichen Fällen. Darüber hinaus legen die Ergebnisse unserer Studie nahe, dass die Kombinations-Therapie

nicht nur eine Steigerung der postoperativen Lebensqualität bewirkt, sondern im Vergleich zu einer alleinigen ACB auch zu einer optimierten globalen Herzfunktion führt. Auf Basis dieser Ergebnisse ist die Initiierung multizentrischer, prospektiver, randomisiert kontrollierter Studien zum Nachweis der tatsächlichen myokardregenerativen oder -restaurierenden Effizienz Laser-unterstützter Zelltherapien sowie zur Bestimmung der besten präoperativen Kriterien der Patienten-Selektion gerechtfertigt.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). *Nationale Versorgungsleitlinie Chronische KHK – Langfassung*; 2 Auflage. Version 1, (Juli 2013).
- [2] The global burden of disease: 2004 update; WHO press; © World Health Organization Genf, Schweiz 2008, ISBN 978 92 4 156371 0.
- [3] Statistisches Bundesamt (Hrsg) (2011) Gesundheit, Todesursachen in Deutschland 2011, Fachserie 12, Reihe 4, 2012, Wiesbaden.
- [4] Herold, Gerd und Mitarbeiter, *Innere Medizin*; Köln, 2014.
- [5] Gesundheitsberichterstattung des Bundes Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt, Heft 48, Dezember 2009, Krankheitskosten, Berlin: Robert Koch-Institut, ISBN 978-3-89606-203-1.
- [6] Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008 Aug;58(2):88-111.
- [7] Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola E, Quaini F, Sonnenblick EH, Olivetti G, Anversa P. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation.* 1994 Jan;89(1):151-63.
- [8] Gruntzig A. Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis. *Lancet.* 1978 Feb 4;1(8058):263.
- [9] Kirtane AJ, Gupta A, Iyengar S, Moses JW, Leon MB, Applegate R, Brodie B, Hannan E, Harjai K, Jensen LO, Park SJ, Perry R, Racz M, Saia F, Tu JV, Waksman R, Lansky AJ, Mehran R, Stone GW. Safety and efficacy of drug-eluting and bare metal stents: comprehensive meta-analysis of randomized trials and observational studies. *Circulation.* 2009 Jun 30;119(25):3198-206.
- [10] Favaloro RG. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique. *Ann Thorac Surg.* 1968 Apr;5(4):334-9.
- [11] Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 2001;19(3):193-204.

- [12] Gmeiner M, Zimpfer D, Holfeld J, Seebacher G, Abraham D, Grimm M, Aharinejad S. Improvement of cardiac function in the failing rat heart after transfer of skeletal myoblasts engineered to overexpress placental growth factor. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Feb 15, 141(5):1238-45.
- [13] Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24;100(13):7808-11.
- [14] Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation.* 2008 Mar 4;117(9):1189-200.
- [15] Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8801-5.
- [16] Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart; *Circ Res.* 2004 Oct 29;95(9):911-21.
- [17] Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature.* 2008 Feb 21;451(7181):937-42.
- [18] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999 Mar;103(5):697-705.
- [19] Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function; *Circulation.* 1999 Nov 9;100(19 Suppl):II247-56.
- [20] Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004 Jul 1;94(1):92-5.

- [21] Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*. 2007 Aug 15;110(4):1362-9.
- [22] Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Körbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. 2003 Oct 28;108(17):2070-3.
- [23] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr 5;410(6829):701-5.
- [24] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001 Apr;7(4):430-6.
- [25] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001 Jun 12;103(23):2776-9.
- [26] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001 Jul 6;89(1):E1-7.
- [27] Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M, Dawn B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007 May 28;167(10):989-97.
- [28] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002 Oct 8;106(15):1913-8.

- [29] 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. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006 Jan 14;367(9505):113-21.
- [30] Joggerst SJ, Hatzopoulos AK. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev Mol Med*. 2009 Jul 8;11:e20
- [31] Jujo K, Li M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Oct;45(4):530-44.
- [32] Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res*. 2005 Feb 4;96(2):151-63.
- [33] Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(3):337-46.
- [34] Bhatia M. AC133 expression in human stem cells. *Leukemia*. 2001 Nov;15(11):1685-8.
- [35] Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol*. 2001 Oct;115(1):186-94.
- [36] Stamm C, Kleine HD, Westphal B, Petzsch M, Kittner C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2004 Jun;52(3):152-8.
- [37] Ghodsizad A, Klein HM, Borowski A, Stoldt V, Feifel N, Voelkel T, Piechaczek Ch, Burchardt E, Stockschröder M, Gams E. Intraoperative isolation and processing of BM-derived stem cells. *Cytotherapy*. 2004;6(5):523-6.
- [38] Klein HM, Ghodsizad A, Marktanner R, Poll L, Voelkel T, Mohammad Hasani MR, Piechaczek C, Feifel N, Stockschröder M, Burchardt ER, Kar BJ, Gregoric I, Gams E. Intramyocardial implantation of CD133⁺ stem cells improved cardiac function without bypass surgery. *Heart Surg Forum*. 2007;10(1):E66-9.

- [39] Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, Karatasakis G, Peristeri I, Theodorakos A, Leontiadis E, Plessas N, Theodosaki M, Graphakos S, Cokkinos DV. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2007 May 1;69(6):773-81.
- [40] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):952-8.
- [41] Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, David A, Liebold A, Nienaber C, Zurakowski D, Freund M, Steinhoff G. Intramyocardial delivery of CD133⁺ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007 Mar;133(3):717-25. Epub 2007 Feb 1.
- [42] Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, Eckey T, Henze E, Zeiher AM, Dimmeler S. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation*. 2003 Apr 29;107(16):2134-9.
- [43] Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour R, Waksman R, Weissman NJ, Cerqueira M, Leon MB, Epstein SE. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol*. 2003 May 21;41(10):1721-4.
- [44] Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belém L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatta R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*. 2003 May 13;107(18):2294-302.
- [45] Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schümichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003 Jan 4;361(9351):45-6.

- [46] Akar AR, Durdu S, Arat M, Kilickap M, Kucuk NO, Arslan O, Kuzu I, Ozyurda U. Five-year follow-up after transepicardial implantation of autologous bone marrow mononuclear cells to ungraftable coronary territories for patients with ischaemic cardiomyopathy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009 Oct;36(4):633-43.
- [47] Wilke NM, Zenovich A, Muehling O, Jerosch-Herold M. Novel revascularization therapies--TMLR and growth factor-induced angiogenesis monitored with cardiac MRI. *MAGMA.* 2000 Nov;11(1-2):61-4.
- [48] Mirhoseini M, Cayton MM. Revascularization of the heart by laser. *J Microsurg.* 1981 Jun;2(4):253-60.
- [49] Fisher PE, Khomoto T, DeRosa CM, Spotnitz HM, Smith CR, Burkhoff D. Histologic analysis of transmural channels: comparison of CO₂ and holmium:YAG lasers. *Ann Thorac Surg.* 1997 Aug;64(2):466-72.
- [50] Estvold SK, Mordini F, Zhou Y, Yu ZX, Sachdev V, Arai A, Horvath KA. Does laser type impact myocardial function following transmural laser revascularization? *Lasers Surg Med.* 2010 Dec;42(10):746-51.
- [51] Pratali S, Chiaramonti F, Milano A, Bortolotti U. Transmural laser revascularization 12 years later. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010 Oct;11(4):480-1.
- [52] Allen KB, Dowling RD, Fudge TL, Schoettle GP, Selinger SL, Gangahar DM, Angell WW, Petracek MR, Shaar CJ, O'Neill WW. Comparison of transmural revascularization with medical therapy in patients with refractory angina. *N Engl J Med.* 1999 Sep 30;341(14):1029-36.
- [53] Horvath KA, Aranki SF, Cohn LH, March RJ, Frazier OH, Kadipasaoglu KA, Boyce SW, Lytle BW, Landolfo KP, Lowe JE, Hattler B, Griffith BP, Lansing AM. Sustained angina relief 5 years after transmural laser revascularization with a CO₂ laser. *Circulation.* 2001 Sep 18;104(12 Suppl 1):I81-4.
- [54] Allen KB, Dowling RD, DelRossi AJ, Realyvasques F, Lefrak EA, Pfeffer TA, Fudge TL, Mostovych M, Schuch D, Szentpetery S, Shaar CJ. Transmural laser revascularization combined with coronary artery bypass grafting: a multicenter, blinded, prospective, randomized, controlled trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000 Mar;119(3):540-9.
- [55] Horvath KA. Mechanisms and results of transmural laser revascularization. *Cardiology.* 2004;101(1-3):37-47.

- [56] Aaberge L, Nordstrand K, Dragsund M, Saatvedt K, Endresen K, Golf S, Geiran O, Abdelnoor M, Forfang K. Transmyocardial revascularization with CO₂ laser in patients with refractory angina pectoris. Clinical results from the Norwegian randomized trial. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Apr;35(5):1170-7.
- [57] Frazier OH, March RJ, Horvath KA. Transmyocardial revascularization with a carbon dioxide laser in patients with endstage coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1999 Sep 30;341(14):1021-8.
- [58] van der Sloot JA, Huikeshoven M, Tukkie R, Verberne HJ, van der Meulen J, van Eck-Smit BL, van Gemert MJ, Tijssen JG, Beek JF. Transmyocardial revascularization using an XeCl excimer laser: results of a randomized trial. *Ann Thorac Surg.* 2004 Sep;78(3):875-81; discussion 881-2.
- [59] Spertus JA, Jones PG, Coen M, Garg M, Bliven B, O'Keefe J, March RJ, Horvath K. Transmyocardial CO₂ laser revascularization improves symptoms, function, and quality of life: 12-month results from a randomized controlled trial. *Am J Med.* 2001 Oct 1;111(5):341-8.
- [60] Klein HM, Ghodsizad A, Borowski A, Saleh A, Draganov J, Poll L, Stoldt V, Feifel N, Piecharczek C, Burchardt ER, Stockschläder M, Gams E. Autologous bone marrow-derived stem cell therapy in combination with TMLR. A novel therapeutic option for endstage coronary heart disease: report on 2 cases. *Heart Surg Forum.* 2004;7(5):E416-9.
- [61] Nashef SA, Roques F, Sharples LD, Nilsson J, Smith C, Goldstone AR, Lockowandt U.; EuroSCORE II. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012 Apr;41(4):734-44; discussion 744-5.
- [62] Handbuch CliniMACS® System der Firma Miltenyi Biotec GmbH, Deutschlandniederlassung: Friedrich-Ebert-Str. 68, 51429 Bergisch Gladbach, www.miltenyibiotec.com.
- [63] Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering J Hematother.* 1996 Jun;5(3):213-26.

- [64] Park DW, Kim YH, Song HG, Ahn JM, Oh J, Kim WJ, Lee JY, Kang SJ, Lee SW, Lee CW, Park SW, Yun SC, Jung SH, Choo SJ, Chung CH, Lee JW, Park SJ. Long-term comparison of drug-eluting stents and coronary artery bypass grafting for multivessel coronary revascularization: 5-year outcomes from the Asan Medical Center-Multivessel Revascularization Registry. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Jan 11;57(2):128-37.
- [65] Spiegelstein D, Kim C, Zhang Y, Li G, Weisel RD, Li RK, Yau TM Combined transmyocardial revascularization and cell-based angiogenic gene therapy increases transplanted cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Dec;293(6):H3311-6.
- [66] Hans Michael Klein, Alexander Assmann, Artur Lichtenberg and Michael Heke Intraoperative CD133⁺ cell transplantation during coronary artery bypass grafting in ischemic cardiomyopathy MMCTS, August, 11 2010; 2010 (0809): 3947.
- [67] Christiane Limberg; Trotz immer sichererer Herzchirurgie zu wenig Bypass-Operationen - neues Aortenklappenregister sammelt Daten; Pressestelle Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. 08.10.2010 Zugriffsdatum: 06.05.2014
- [68] Frazier OH, Tuzun E, Eichstadt H, Boyce SW, Lansing AM, March RJ, Sartori M, Kadipasaoglu KA. Transmyocardial laser revascularization as an adjunct to coronary artery bypass grafting: a randomized, multicenter study with 4-year follow-up. *Tex Heart Inst J.* 2004;31(3):231-9.
- [69] Horvath KA, Ferguson TB Jr, Guyton RA, Edwards FH. Impact of unstable angina on outcomes of transmyocardial laser revascularization combined with coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.* 2005 Dec;80(6):2082-5.
- [70] Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I., Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation.* 2005; 112(suppl): I-178– I-183.
- [71] Jeevanantham V, Butler M, Saad A, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B., Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2012 Jul 31;126(5):551-68. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.086074. Epub 2012 Jun 22.

- [72] Yerebakan C, Kaminski A, Westphal B, Donndorf P, Glass A, Liebold A, Stamm C, Steinhoff G. Impact of preoperative left ventricular function and time from infarction on the long-term benefits after intramyocardial CD133(+) bone marrow stem cell transplant. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;142:1530.e3–1539.e3.
- [73] Babin-Ebell J, Sievers HH, Charitos EI, Klein HM, Jung F, Hellberg AK, Depping R, Sier HA, Marxsen J, Stoelting S, Kraatz EG, Wagner KF. Transmyocardial laser revascularization combined with intramyocardial endothelial progenitor cell transplantation in patients with intractable ischemic heart disease ineligible for conventional revascularization: preliminary results in a highly selected small patient cohort. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2010 Feb;58(1):11-6.
- [74] Krabatsch T, Schäper F, Leder C, Tülsner J, Thalmann U, Hetzer R. Histological findings after transmyocardial laser revascularization. *J Card Surg.* 1996 Sep-Oct;11(5):326-31.
- [75] Nasser BA, Ebell W, Dandel M, Kukucka M, Gebker R, Doltra A, Knosalla C, Choi YH, Hetzer R, Stamm C. Autologous CD133+ bone marrow cells and bypass grafting for regeneration of ischaemic myocardium: the Cardio133 trial *Eur Heart J.* 2014 May 14;35(19):1263-74. doi: 10.1093/eurheartj/ehu007. Epub 2014 Feb 3.
- [76] Roncalli J, Mouquet F, Piot C, Trochu JN, Le Corvoisier P, Neuder Y, Le Tourneau T, Agostini D, Gaxotte V, Sportouch C, Galinier M, Crochet D, Teiger E, Richard MJ, Polge AS, Beregi JP, Manrique A, Carrie D, Susen S, Klein B, Parini A, Lamirault G, Croisille P, Rouard H, Bourin P, Nguyen JM, Delasalle B, Vanzetto G, Van Belle E, Lemarchand P. Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *Eur Heart J.* 2011;32:1748-1757.
- [77] Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, Tijssen JG, van der Giessen WJ, Tio RA, Waltenberger J, ten Berg JM, Doevendans PA, Aengevaeren WR, Zwaginga JJ, Biemond BJ, van Rossum AC, Piek JJ, Zijlstra F; HEBE Investigators. Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. *Eur Heart J.* 2011;32:1736-1747.

- [78] Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Ellis SG, Forder JR, Anderson RD, Hatzopoulos AK, Penn MS, Perin EC, Chambers J, Baran KW, Raveendran G, Lambert C, Lerman A, Simon DI, Vaughan DE, Lai D, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Thomas JD, Olson RE, Bowman S, Francescon J, Geither C, Handberg E, Kappenman C, Westbrook L, Piller LB, Simpson LM, Baraniuk S, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Spoon DB, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moyé LA, Simari RD; Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *JAMA*. 2012;308:2380-2389.
- [79] Spertus JA, Winder JA, Dewhurst TA, Deyo RA, Prodzinski J, McDonnell M, Fihn SD. Development and Evaluation of the Seattle Angina Questionnaire: a new functional status measure for coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1995 Feb;25(2):333-41.

7 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, 21. Juni 2018, Lena Stephanie Michaelis de Vasconcellos

8 Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H. M. Klein danke ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertationsschrift sowie hilfreiche Unterstützung und wertvolle Hinweise bei der Durchführung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Privatdozent Dr. med. A. Assmann danke ich für die engagierte Betreuung und die zahlreichen Diskussionen, seine thematischen, wissenschaftlichen und fachlichen Hinweise sowie für seine unermüdliche Hilfe bei der Niederschrift dieser Dissertationsarbeit.

Der Firma *Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland* danke ich für die Bereitstellung des Bildmaterials.

Meinen Eltern möchte ich danken für die Ermöglichung meines Studiums. Des Weiteren bedanke ich mich für ihre stetige Unterstützung und ihren Rückhalt, nicht nur hinsichtlich dieser Arbeit.

Meinem Ehemann Jörg Michaelis de Vasconcellos bin ich dankbar für Ermutigungen und seine computerfachlichen Ratschläge.

Sarah Reiche möchte ich danken für die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge, die mir wertvolle Anregung waren.

Zuletzt möchte ich allen danken, die mich in dieser Arbeit unterstützt haben.

4. Over the past 4 weeks, on average, how many times have you had to take nitros (nitroglycerin tablets) for your **chest pain, chest tightness, or angina**?

I take nitros...

| | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|--|--------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 4 or more times per day | 1-3 times per day | 3 or more times per week but not every day | 1-2 times per week | Less than once a week | None over the past 4 weeks |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

5. How bothersome is it for you to take your pills for **chest pain, chest tightness or angina** as prescribed?

| | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
| Very bothersome | Moderately bothersome | Somewhat bothersome | A little bothersome | Not bothersome at all | My doctor has not prescribed pills |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

6. How satisfied are you that everything possible is being done to treat your **chest pain, chest tightness, or angina**?

| | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Not satisfied at all | Mostly dissatisfied | Somewhat satisfied | Mostly satisfied | Highly satisfied |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

7. How satisfied are you with the explanations your doctor has given you about your **chest pain, chest tightness, or angina**?

| | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Not satisfied at all | Mostly dissatisfied | Somewhat satisfied | Mostly satisfied | Highly satisfied |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

8. Overall, how satisfied are you with the current treatment of your **chest pain, chest tightness, or angina**?

| | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Not satisfied at all | Mostly dissatisfied | Somewhat satisfied | Mostly satisfied | Highly satisfied |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

9. Over the past 4 weeks, how much has your **chest pain, chest tightness, or angina** interfered with your enjoyment of life?

| | | | | |
|--|--|--|--|---|
| It has severely limited my enjoyment of life | It has moderately limited my enjoyment of life | It has slightly limited my enjoyment of life | It has barely limited my enjoyment of life | It has not limited my enjoyment of life |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

10. If you had to spend the rest of your life with your **chest pain, chest tightness, or angina** the way it is right now, how would you reel about this?

| | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Not satisfied at all | Mostly dissatisfied | Somewhat satisfied | Mostly satisfied | Highly satisfied |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

ii. How often do you worry that you may have a heart attack or die suddenly?

| | | | | |
|---|--|---|---|--|
| I can't stop worrying about it | I often think or worry about it | I occasionally worry about it | I rarely think or worry about it | I never think or worry about it |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

"Reprinted from the Journal of the American College of Cardiology, Volume 25, Issue 2, February 1995, Spertus JA, Winder JA, Dewhurst TA, Deyo RA, Prodzinski J, McDonnell M, Fihn SD, Development and Evaluation of the Seattle Angina Questionnaire: a new functional status measure for coronary artery disease, Pages 339-41, Copyright 1995, with permission from Elsevier."

[https://doi.org/10.1016/0735-1097\(94\)00397-9](https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)00397-9)