

**Effekt von Darbepoetin alfa auf die Endothelfunktion und auf die Anzahl
endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Karin Henriette Wodack geb. Alberti
aus Bad Neuenahr
2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Nickenig
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Eicke Latz

Tag der Mündlichen Prüfung: 03.11.2010

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. med. Georg Nickenig

**Meinen Eltern und meinem Mann
in Liebe gewidmet**

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung.....	9
1.1. Aufgaben des Endothels	10
1.2. Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose.....	11
1.2.1. Pathogenese der Atherosklerose	11
1.2.2. Diagnostik der endothelialen Dysfunktion	17
1.3. Endotheliale Progenitorzellen	18
1.3.1. Charakteristika der endothelialen Progenitorzellen.....	18
1.3.2. Mobilisation endothelialer Progenitorzellen.....	20
1.3.3. Endotheliale Progenitorzellen und Erythropoietin.....	21
1.4. Erythropoietin und Darbepoetin alfa.....	23
1.4.1. Erythropoietin.....	23
1.4.2. Darbepoetin alfa.....	24
1.5. Fragestellung und Zielsetzung	26
2. Patienten und Methoden.....	27
2.1. Studienkollektiv	27
2.1.1. Einschlusskriterien	27
2.1.2. Ausschlusskriterien	28
2.1.3. Abbruchkriterien.....	28
2.1.4. Randomisierung.....	29
2.2. Prüfmedikation	30
2.3. Studienprotokoll	31
2.4. Ultraschallmessungen.....	32
2.4.1. Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis	33
2.4.2. Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-unabhängigen Dilatation der Arteria brachialis	36

2.4.3.	Prinzip der sonographischen Quantifizierung des arteriellen Durchmessers	37
2.4.4.	Prinzip der dopplersonographische Untersuchung des Blutvolumenflusses in der Arteria brachialis	40
2.5.	Blutabnahmen	42
2.6.	Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen	42
2.7.	Statistik	46
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Studienpopulation	47
3.1.1.	Anzahl eingeschlossener Probanden	47
3.1.2.	Basisdaten	47
3.2.	Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis	49
3.3.	Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-unabhängigen Dilatation der Arteria brachialis	52
3.4.	Dopplersonographische Bestimmung des Blutvolumenflusses in der Arteria brachialis unmittelbar nach Deflation	53
3.5.	Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen	54
3.6.	Effekt von Darbepoetin alfa auf den Hämoglobin Wert und die Retikulozyten	57
3.7.	Abweichungen vom Prüfplan	58
4.	Diskussion	60
4.1.	Methodenkritik	60
4.1.1.	Quantifizierung der Endothel-abhängigen Dilatation mit Hilfe der FMD-Messung	60
4.1.2.	Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen mittels FACS-Analyse	63
4.2.	Kritische Betrachtung der Untersuchungsergebnisse	64
4.3.	Kritische Betrachtung von Darbepoetin alfa	68
4.4.	Klinische Bedeutung und Ausblick	70

5. Zusammenfassung	71
6. Anhang	72
6.1. Probandeninformation.....	72
6.2. Information zur Prüfmediakation	82
7. Literaturverzeichnis	84
8. Danksagung	98

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
APC	Allophycocyanin
BMI	Body Mass Index
EBM	Endothelial Cell Basal Medium
EDHF	Endothelium-hyperpolarizing factor
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
EPO	Erythropoietin
FACS	fluorescence activated cell sorter
FMD	Flow mediated dilation
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GTN	Glyceroltrinitrat
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
IMT	intima-media thickness
kD	Kilodalton
KDR	Kinase Insert Domain Receptor
KHK	koronare Herzerkrankung
MI	Myokardinfarkt
MNC	mononukleäre Zellen
NESP	New Erythropoiesis Stimulating Protein
NMD	endothelunabhängige, nitroinduzierte Vasodilatation
NO	Stickstoffmonoxid
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat Buffet Solution
PGI ₂	Prostacyclin 2
PW-Doppler	pulsed waved Doppler
rHuEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
VEGF	vascular endothelial groth factor

1. Einleitung

Laut Angaben des statistischen Bundesamtes waren Herzkreislauferkrankungen auch im Jahr 2007 Todesursache Nummer eins in Deutschland. Die Anzahl der Todesfälle aufgrund von Erkrankungen des Herzkreislaufsystems belief sich in diesem Jahr auf 358.684. Das bedeutet, dass 43,4% aller Todesfälle auf das Vorliegen einer Herzkreislauferkrankung zurückzuführen sind (Statistisches Bundesamt, Todesursachen 2007, Statistisches Jahrbuch 2009). Auch volkswirtschaftlich stellen Herzkreislauferkrankungen eine enorme Belastung dar. So betragen allein im Jahr 2004 die direkten Krankheitskosten 15 722 Millionen Euro, im Jahr 2006 waren es bereits 16 879 Millionen Euro (Statistisches Bundesamt, Statistisches Jahrbuch 2009).

Unter einer koronaren Herzerkrankung (KHK) wird die Manifestation einer Atherosklerose an den Koronargefäßen verstanden. Dabei haben pathophysiologische Veränderungen des Gefäßendothels sowohl bei der Entstehung, als auch dem Fortschreiten der Atherosklerose eine zentrale Rolle (Ross, 1999). Störungen der Endothelfunktionen werden unter dem Oberbegriff der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst. Neben funktionellen Veränderungen spielen auch strukturelle und physiko-mechanische Veränderungen eine wichtige Rolle in der Frühphase der Entstehung einer Atherosklerose. Diese treten in Form von Wandverdickungen und Elastizitätsverlusten arterieller Gefäße auf und haben prognostische Bedeutung in der Entstehung symptomatischer Atherosklerosestadien (Baldassarre et al., 2000; Davis et al., 2001). Einige klinische Studien deuten darauf hin, dass die Frühstadien einer endothelialen Dysfunktion therapeutisch rückführbar sind (Celermajer, 1997; O'Driscoll et al., 1997). Somit würde der Früherkennung und ein frühzeitiger Therapiebeginn der endothelialen Dysfunktion eine noch größere Bedeutung zukommen.

1.1. Aufgaben des Endothels

Als Endothel werden die zum Gefäßlumen hin gerichteten Zellen der innersten Wandschicht der Blutgefäße bezeichnet. Sie wird auch Intima genannt. Eine Schlüsselrolle des Endothels liegt in der Regulierung des Gefäßtonus. Dieses geschieht zum einen durch die Bildung und das Freisetzen vasoaktiver Autakoide und zum anderen durch eine Beeinflussung des Endothels von einer Reihe im Blut zirkulierender vasoaktiver Substanzen. Diese zirkulierenden Substanzen, die über das Endothel wirken, sind u.a. Adenosin, Angiotensin I und II und Histamin. Autakoide, die das Endothel selber bildet, sind: Endothelium-derived relaxing factor (EDRF), der identisch ist mit Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin 2 (PGI₂), der Endothelium-hyperpolarizing factor (EDHF) sowie Endothelin (Busse und Fleming, 1993). Weiterhin kontrolliert das Endothel die Hämostase und dient als Barriere beim Stoffaustausch zwischen intra- und extravasalen Raum. Zudem beteiligt es sich an Gerinnungs- und Entzündungsprozessen und hat eine wichtige Rolle bei der Angiogenese.

NO ist das wichtigste der im Endothel gebildeten Autakoide. Dieser endotheliale Faktor, der die glatte Gefäßmuskulatur relaxiert, wurde bereits 1980 entdeckt (Furchgott und Zawadzki, 1980). Die Freisetzung von endogenem NO erfolgt entweder aufgrund mechanischer Stimulation des Endothels, wie zum Beispiel durch die Schubspannung des strömenden Blutes, oder es wird durch die im Blut zirkulierenden vasoaktiven Substanzen über einen Rezeptor vermittelt freigesetzt (Lamontagne et al., 1992). Dieser Vorgang wird als endothelabhängige Vasodilatation bezeichnet. Besteht eine endotheliale Schädigung, wird nur eine reduzierte Menge an endogenem NO freigesetzt. So kann es zu einem Übergewicht der vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen kommen und somit zu einem Gefäßspasmus.

Neben der endothelabhängigen Vasodilatation gibt es auch die endothel-unabhängige Vasodilatation, welche mit exogen zugeführten Stickstoffmonoxidpräparaten, meist mit Glyceroltrinitrat (GTN), getestet werden kann.

1.2. Endotheliale Dysfunktion, Atherosklerose

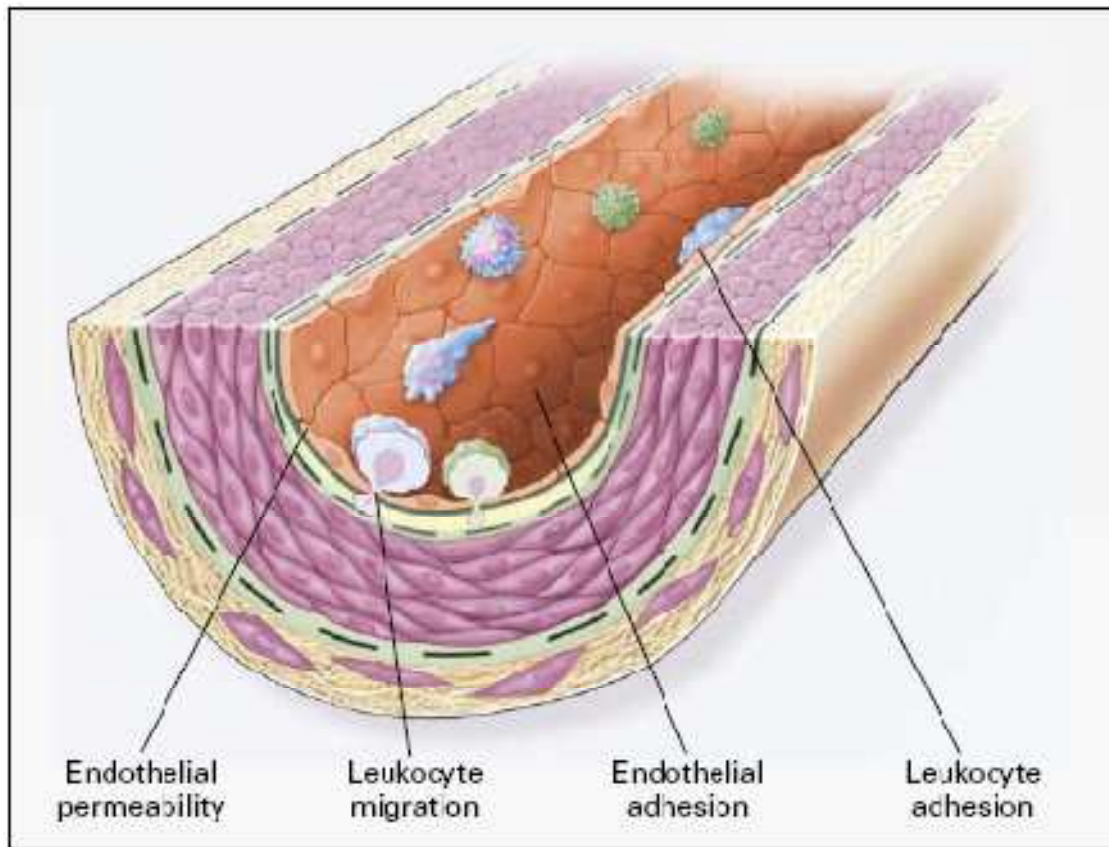
1.2.1. Pathogenese der Atherosklerose

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine systemische Erkrankung, die alle Arterien des Körpers betrifft (Rosenson und Koenig, 2003). Die Ätiologie der Atherosklerose war lange Zeit unklar. Mit ersten Ergebnissen der Framingham-Studie wurde 1961 das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren etabliert (Kannel et al., 1961). Aufgrund empirisch erhobener Daten sind eine Hypertonie, ein Diabetes mellitus, eine Hypercholesterinämie, ein Nikotinabusus und eine familiäre Disposition als Risikofaktoren detektiert worden. Aber auch Bewegungsmangel, psychische Belastung wie z.B. Stress und/oder eine Adipositas tragen nach heutigem Wissensstand zu der Entstehung der Atherosklerose bei. Des Weiteren werden Ursachen wie z.B. ein erhöhter Homocystein-Wert oder aber auch ein erhöhtes Lipoprotein(a) diskutiert (Bennet et al., 2008; Kerkeni et al., 2008; Sorensen et al., 1994). Zudem konnte eine Assoziation zwischen Alter, Geschlecht und einer Einschränkung der Endothelfunktion festgestellt werden. Dabei fiel auf, dass vor allem gesunde Männer, auch ohne Vorliegen weiterer Risikofaktoren, viel früher an einer stetig zunehmenden endothelialen Dysfunktion leiden als Frauen (Celermajer et al., 1994).

Die Pathogenese der Atherosklerose ist in verschiedene Stadien zu unterteilen: Im Initialstadium steht eine Schädigung des Endothels im Mittelpunkt. Diese Endothelschädigung beruht zumeist auf dem Vorliegen eines oder mehrerer der oben genannten Risikofaktoren. Die Endothelzellen zeigen eine erhöhte Rate an Apoptose und oxidativen Stress. Das gesamte Endothel wird permeabler, was zu einer Immigration von Leukozyten führt. Es kommt zur verstärkten Adhäsion der Leukozyten am Endothel. Dieses Stadium entspricht dem Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion (Ross, 1999). In der Folge kommt es zur Migration von Monozyten, Makrophagen und glatten Muskelzellen in die Intima. Dort nehmen diese Zellen z.T. mittels spezieller Mechanismen (scavenger-receptor) Lipide auf. Es entstehen sogenannte Schaumzellen, welche makroskopisch auch als fatty-streaks bezeichnet werden (Ross, 1999; Stary et al., 1994). Des Weiteren kommt es zu einer T-Zell Aktivierung. Durch

das Freisetzen von Wachstumsfaktoren, die Einlagerung von Lipiden und durch einen nekrotischen Untergang der Schaumzellen entstehen letztendlich fibröse Plaques und Verkalkungen, die hämodynamisch relevante Stenosierungen bilden können (Ross, 1999). Daneben kann es aufgrund eines rupturierten Plaques zu einer Thrombusbildung mit anschließendem akuten Gefäßverschluss kommen (Ross, 1999; Stary et al., 1995).

Die Frühstadien der Atherosklerose an den Koronargefäßen verursachen in der Regel keine Beschwerden bei den Betroffenen. Daher weisen Patienten mit einer endothelialen Dysfunktion und Lipidablagerungen in der Gefäßwand meist keine klinische Symptomatik auf, so dass die Erkrankung über Jahre still vorliegen und weiter fortschreiten kann (Bauters, 2008). Erst wenn es zu progredienten, höhergradigen Stenosen kommt, treten Beschwerden, meist in Form einer Angina pectoris Symptomatik auf. Dazu kommt es aufgrund einer Unterversorgung des von dem betroffenen Gefäß abhängigen Myokards. Ferner verursachen Plaquerupturen und/oder Plaqueerosionen mit anschließender Thrombusbildung das akute Koronarsyndrom, einschließlich des plötzlichen Herztodes (Bauters, 2008; Davies, 2000).



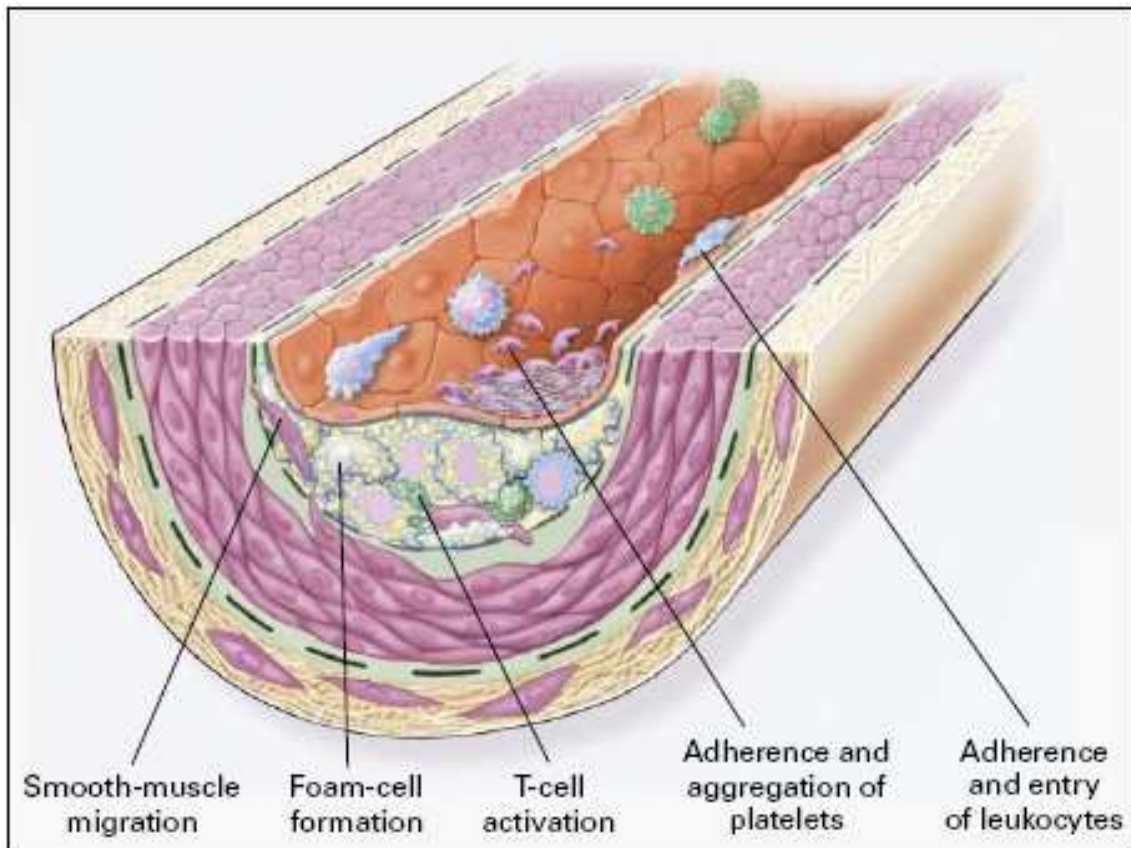
Aus Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340: 115-126

Abb. 1: Pathomechanismus der Atherosklerose.

Stadium 1 der Atheroskleroseentstehung:

Endotheliale Dysfunktion. Die Permeabilität des Endothels ist erhöht. Meist aufgrund des Vorliegens eines oder mehrerer Risikofaktoren.

Dargestellt ist die folgende Migration und Adhäsion von Leukozyten.

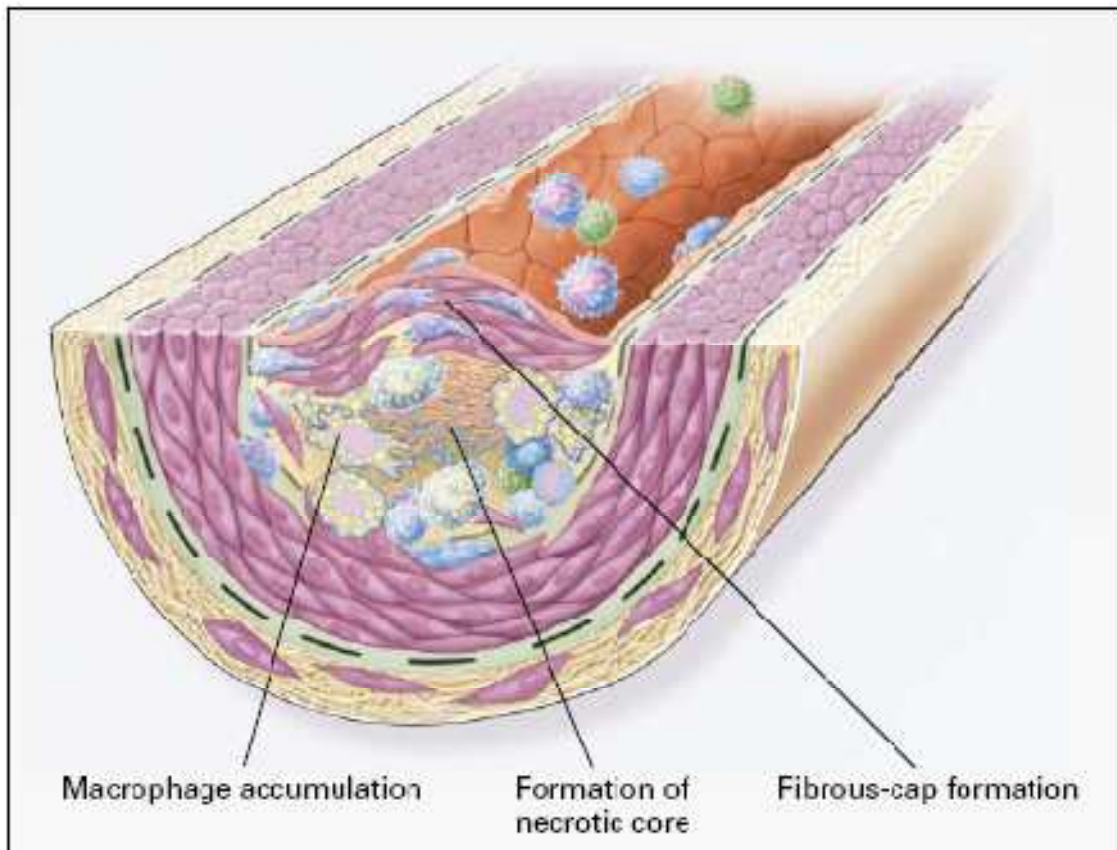


Aus Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340: 115-126

Abb. 2: Pathomechanismus der Atherosklerose.

Stadium 2 der Atheroskleroseentstehung:

Fatty-streak Formation. In Folge der Endothelschädigung kommt es zur Migration von Monozyten, Makrophagen und glatten Muskelzellen in die Intima. Dargestellt ist die Ausbildung von Fatty-streaks durch die Aufnahme von Lipiden. Zudem werden T-Zellen aktiviert.



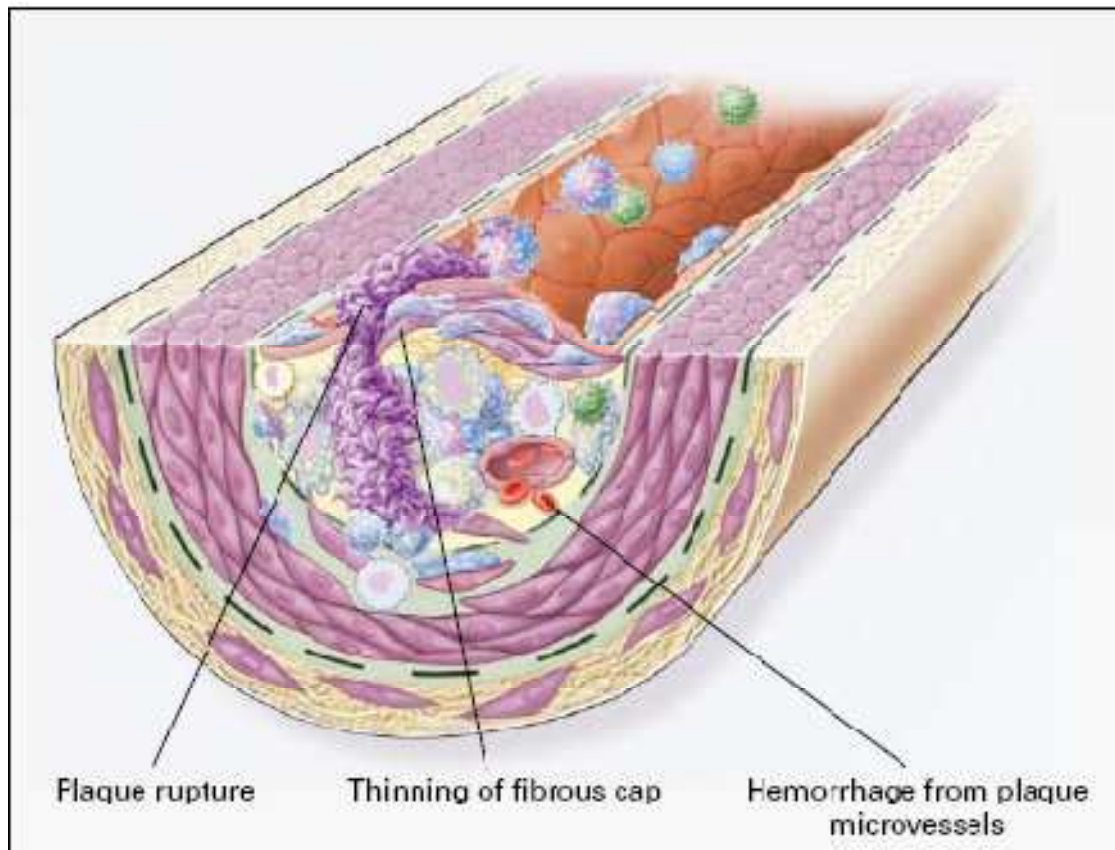
Aus Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340: 115-126

Abb. 3: Pathomechanismus der Atherosklerose.

Stadium 3 der Atheroskleroseentstehung:

Ausbildung einer komplizierten, arteriosklerotischen Läsion.

Durch weitere Ablagerung von Lipiden, dem nekrotischen Untergang von Schaumzellen und durch das Freisetzen von Wachstumsfaktoren kommt es zur Ausbildung von fibrösen Plaques und Verkalkungen, die hämodynamisch relevante Stenosierungen bilden können.



Aus Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340: 115-126

Abb. 4: Pathomechanismus der Atherosklerose.

Stadium 4 der Atheroskleroseentstehung:

Plaqueruptur.

Aufgrund eines rupturierten Plaques kann es zu einer Thrombusbildung mit anschließendem akuten Gefäßverschluss kommen.

1.2.2. Diagnostik der endothelialen Dysfunktion

Wie bereits oben erwähnt kommt es im Stadium der endothelialen Dysfunktion durch eine verminderte NO-Freisetzung des Endothels zu einer Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation. Diese funktionelle endotheliale Dysfunktion kann bereits frühzeitig bei beschwerdefreien Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren nachgewiesen werden (Celermajer et al., 1992,1994). Die Bestimmung der Endothelabhängigen Vasodilatation bildet somit eine zentrale Säule in der Diagnostik der endothelialen Dysfunktion (Kelm und Strauer, 1999). Eine Möglichkeit der Überprüfung der Endothelfunktion stellt die intraarterielle Gabe von Acetylcholin und Nitroglycerin mit gleichzeitiger angiografischer Detektion dar. Bei intaktem Endothel kommt es durch Acetylcholingabe zu einer endothelvermittelten Vasodilatation. Bei bereits geschädigtem Endothel tritt hingegen der paradoxe Effekt einer Vasokonstriktion auf (Schächinger, 2000). Bei diesem Verfahren handelt es sich jedoch um ein invasives Verfahren, das in der Praxis selten Anwendung findet. Ein etabliertes nicht-invasives Verfahren in der Diagnostik der endothelialen Dysfunktion stellt die Quantifizierung der flussvermittelten Dilatation (FMD=Flow mediated dilation) peripherer Arterien (Arteria brachialis, Arteria femoralis) mittels hochauflösenden Ultraschalls dar (Anderson, 2007; Celermajer, 1998). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die periphere Endothelfunktion mit der Funktion der Herzkranzgefäße in Beziehung steht (Neunteufl et al., 1997). Gleichfalls wurde von einer Korrelation zwischen der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis und einer Verminderung der FMD in der Arteria brachialis berichtet (Enderle et al., 1998). Eine herabgesetzte FMD Messung und das gleichzeitige Vorliegen einer Angina Pectoris Symptomatik gelten zusammen als sensitive Indikatoren für das Bestehen einer KHK (Jambrik et al., 2004). Ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren und der FMD ließ sich ebenfalls herstellen. Bei Patienten mit einer familiären Hypercholesterinämie lag bereits im Kindesalter eine signifikante Reduktion der FMD vor (Celermajer, 1992). Außerdem ließ sich belegen, dass es zu einer akuten Verminderung der FMD nach dem Rauchen einer einzelnen Zigarette kommt (Lekakis et al., 1997).

Ein weiteres nicht-invasives Messverfahren zur Diagnostik der endothelialen Dysfunktion stellt das EndoPAT 2000 dar. Dieses System wurde von der Firma Itama

Medical etabliert. Es besteht aus einem Clip, der am Finger des Probanden angebracht wird. In diesem Clip befinden sich Sensoren, die den Tonus in peripheren Arterien (PAT=peripheral artery tone) anhand der pulsatilen Volumenänderung im Gefäß messen. Es wird wie bei der FMD-Messung ein Oberarmcuff angebracht und eine Ischämie durch Okklusion der A. brachialis über fünf Minuten durchgeführt. Die Daten vor und nach der Ischämiezeit werden automatisch durch die integrierte EndoPAT Software analysiert. Die erhobenen Daten können zur weiteren Bearbeitung auf ein Standard Computersystem übertragen werden. Eine ausreichende Anzahl an Studien zur Validität dieses Verfahrens liegen vor (Hamburg et al., 2008; Selamet Tierney, 2009). Bei Vergleichen zwischen der FMD-Messung und den Messungen mittels EndoPAT 2000 wurde eine signifikante Korrelation der Ergebnisse beobachtet (Dhindsaa et al., 2008). Als Vorteile des EndoPAT 2000 sind zu nennen: Zeitersparnis bei der Untersuchung, weniger Belastung für den Patienten, automatische Datenanalyse und eine einfache Handhabung. Als Nachteil ist zu nennen, dass es insgesamt eine geringe Datenlage zu diesem Verfahren gibt und es daher noch nicht abschließend beurteilbar ist.

1.3. Endotheliale Progenitorzellen

1.3.1. Charakteristika der endothelialen Progenitorzellen

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) sind Zellen, die wahrscheinlich aus dem Knochenmark stammen. EPC gelten als eine spezielle Form von Stammzellen (Miller-Kasprzak und Jagodziński, 2007). Sie spielen bei der Gefäßneubildung im adulten Organismus eine wichtige Rolle. Adultes Knochenmark ist in der Lage EPC freizusetzen und z.B. nach einer Ischämie eine Neovaskularisation an den Myokardgefäßen zu veranlassen (Tse et al., 2007). EPC sind sowohl an der physiologischen als auch an der pathologischen Gefäßneubildung (Vaskulogenese) beteiligt. Die Beteiligung endothelialer Progenitorzellen an der Regeneration des Gefäßendothels verschiedener Organe konnte von Asahara et al. bereits 1999 gezeigt werden. Neben der Beteiligung an der Gefäßneubildung sind EPC an der

Wiederherstellung einer intakten Endothelschicht, der Reendothelialisierung, beteiligt. Nach Induktion einer Endothelschädigung tragen EPC zur Regeneration des geschädigten Areals bei (Werner et al., 2002, 2003). Durch Transfusion aus der Milz gewonnener EPC konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass es im Vergleich zu Kontrolltieren zu einer deutlich beschleunigten Reendothelialisierung des verletzten Areals und damit verbunden zu einer reduzierten Neointima-Bildung kam (Werner et al., 2003). Ebenso konnte ein regeneratives Potential der EPC im Rahmen ischämischer Erkrankungen in verschiedenen tierexperimentellen Modellen gezeigt werden. So zeigte sich in Herzinfarktmodellen an Ratten nach der Transplantation von EPC eine erhöhte Kapillardichte und ein vermindertes Remodeling (bindegewebiger Umbau) im Infarktareal sowie eine deutlich bessere linksventrikuläre Herzfunktion im Vergleich zu Kontrolltieren (Kocher et al., 2001). Diese Ergebnisse führten zur Initiierung klinischer Studien, die einen Zusammenhang zwischen EPC und Patienten mit akutem Myokardinfarkt prüften (Schächinger et al., 2006; Stamm et al., 2003). Auch die direkte endomyokardialen Implantation von Knochenmarkzellen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung führte zu einer Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (Tse et al., 2007). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass es eine Korrelation zwischen der Anzahl an zirkulierenden EPC und dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit einer KHK gibt. Patienten mit einer KHK und einer niedrigen Anzahl an zirkulierenden EPC wiesen eine höhere Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse auf (Werner et al., 2007).

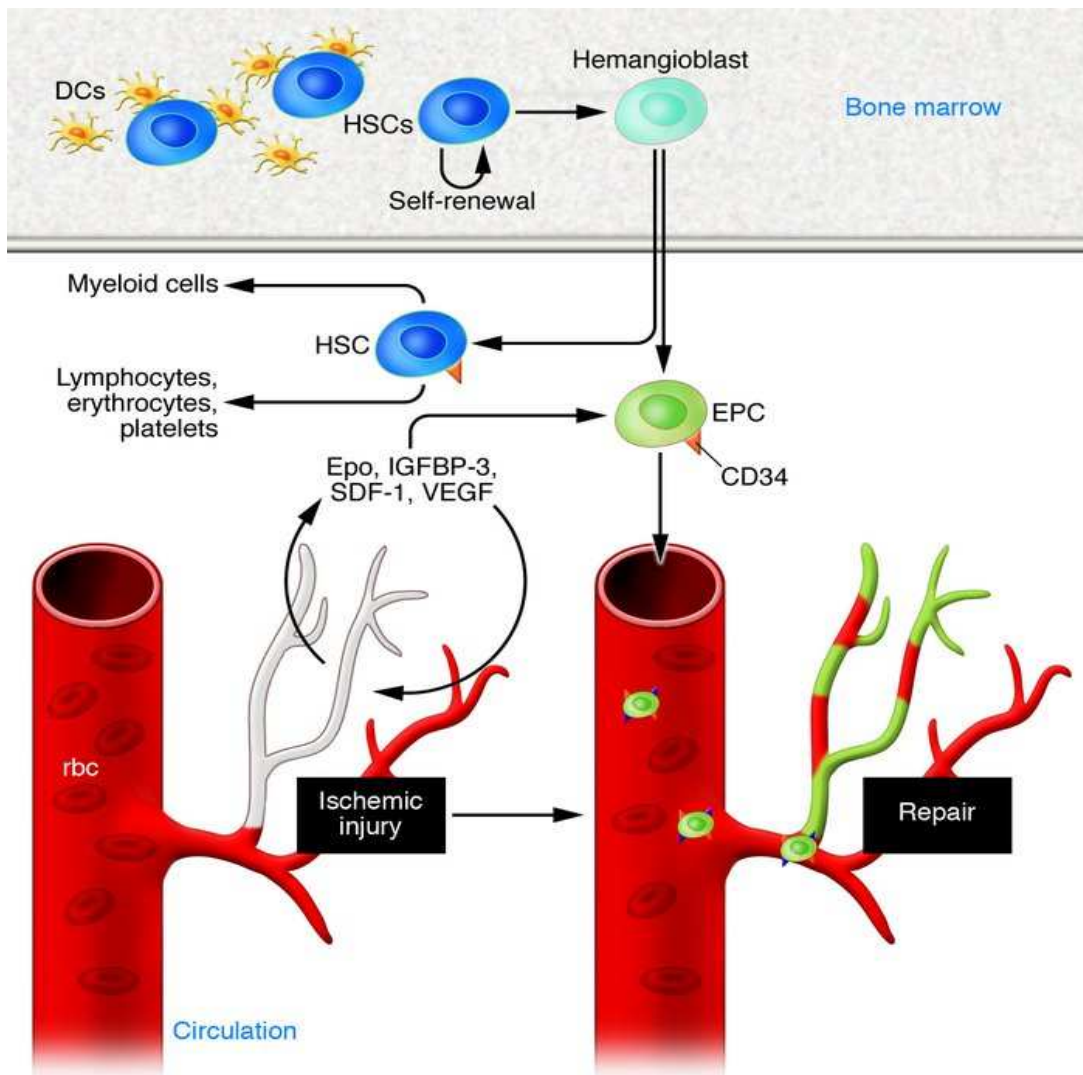
Zusammenfassend haben die genannten Arbeiten starke Hinweise erbracht, dass EPC an der physiologischen und an der pathologischen Vaskulogenese im Rahmen der Wundheilung oder bei Tumorwachstum und bei ischämischen Prozessen beteiligt sind (Asahara et al., 1999; Schächinger et al., 2006; Stamm et al., 2003; Tse et al., 2007). Des Weiteren haben EPC eine Funktion bei der Reendothelialisierung von geschädigten Gefäßarealen und bei der zerebralen, der retinalen und der lymphoiden Gefäßneubildung (Grant et al., 2002; Salven et al., 2003; Werner et al., 2003).

1.3.2. Mobilisation endothelialer Progenitorzellen

Während die exakten Mechanismen der Freisetzung der EPC aus dem Knochenmark noch nicht vollständig geklärt sind, sind verschiedene endogene oder exogene Faktoren bekannt, die die Anzahl der EPC im peripheren Blut erhöhen (Aicher et al., 2005). Einen besonderen Einfluss auf die Mobilisierung der EPC hat eine Gewebeischämie (Park et al., 2004; Shintani et al., 2001; Takahashi et al., 1999). So zeigte sich im Tiermodell nach Unterbindung der Gefäßversorgung des Hinterlaufs in Mäusen und nach Provokation eines akuten Myokardinfarktes durch Ligatur eine erhöhte Anzahl der EPC im peripheren Blut (Shintani et al., 2001; Takahashi et al., 1999). Die Ischämie-bedingte Mobilisierung der EPC wird durch Zytokine gesteuert. Folglich ließ sich ein Anstieg der Plasmakonzentration des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt nachgewiesen werden (Shintani et al., 2001). Auch nach einem Verbrennungstrauma oder nach Anlage eines Koronararterienbypasses wurde parallel zu einer endogenen Erhöhung des VEGF-Plasmaspiegels eine Mobilisierung der EPC beobachtet (Gill et al., 2001). Mit hoher Wahrscheinlichkeit stellt der kontinuierliche Ersatz oxidativ geschädigter, apoptotischer Endothelzellen durch EPC einen wesentlichen vaskulären Reparaturmechanismus dar. Daher wurden bereits mehrere Studien initiiert, die das therapeutische Prinzip einer erhöhten EPC Freisetzung untersuchten. Neben der endogenen Erhöhung kann durch die exogene Zufuhr von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, eine Mobilisierung der EPC erreicht werden (Asahara et al., 1999). So konnte im Mausmodell nach intraperitonealer Gabe von rekombinantem VEGF eine erhöhte Anzahl sowohl von zirkulierender als auch von kultivierbarer EPC nachgewiesen werden (Asahara et al., 1999). Darüber hinaus wurden in anderen Studien noch weitere Stoffe detektiert, die in der Lage sind, EPC zu mobilisieren. Unter anderem bewirkt das Zytokin G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung eine solche Mobilisation (Powell et al., 2005). Ferner sind HMGCoA-Reduktasehemmer (Statine) oder Östrogene zur Rekrutierung von EPC imstande (Dimmeler et al., 2001; Strehlow et al., 2003; Vasa et al., 2001).

1.3.3. Endotheliale Progenitorzellen und Erythropoietin

Erythropoietin (EPO) zeigte in der Vergangenheit die Fähigkeit EPC aus dem Knochenmark zu mobilisieren (Bahlmann et al., 2004; Grant et al., 2008; Heeschen et al., 2003). Der genaue Mechanismus zur Mobilisation der EPC durch Erythropoietin ist noch nicht ausreichend geklärt. Eine im Jahr 2008 von Belonje et al. durchgeführte prospektive, klinische Studie zeigte, dass es nach dem Verabreichen von EPO bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt zu einer Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion und zu einer Reduktion des Infarktausmaßes kam. Gleichzeitig illustrierte die Studie, dass die Anzahl an EPC durch EPO gesteigert und somit ein Anstieg der Angiogenese verzeichnet werden konnte (Belonje et al., 2008)



Aus Grant MB, Boulton ME, Ljubimov AV. Erythropoietin: when liability becomes asset in neurovascular repair. J. Clin. Invest 2008; 118: 467-470

Abb. 5: Darstellung des angiogenetischen Effektes von EPO.

Aus der Abbildung geht hervor, dass EPO in der Lage ist v.a. CD34+ EPC aus dem Knochenmark zu mobilisieren. Diese bewirken wiederum eine Initiierung der Gefäßreparatur im Sinne einer Reendothelialisierung. Dieses geschieht v.a. in ischämisch geschädigten Gefäßarealen.

DCs: dendritische Zellen, HSCs: hämatopoetische Stammzellen, rbc: rote Blutzellen, SDF-1: stromal cell-derived factor 1, IGFBP-3: insulin-like growth factor-binding protein3

1.4. Erythropoietin und Darbepoetin alfa

1.4.1. Erythropoietin

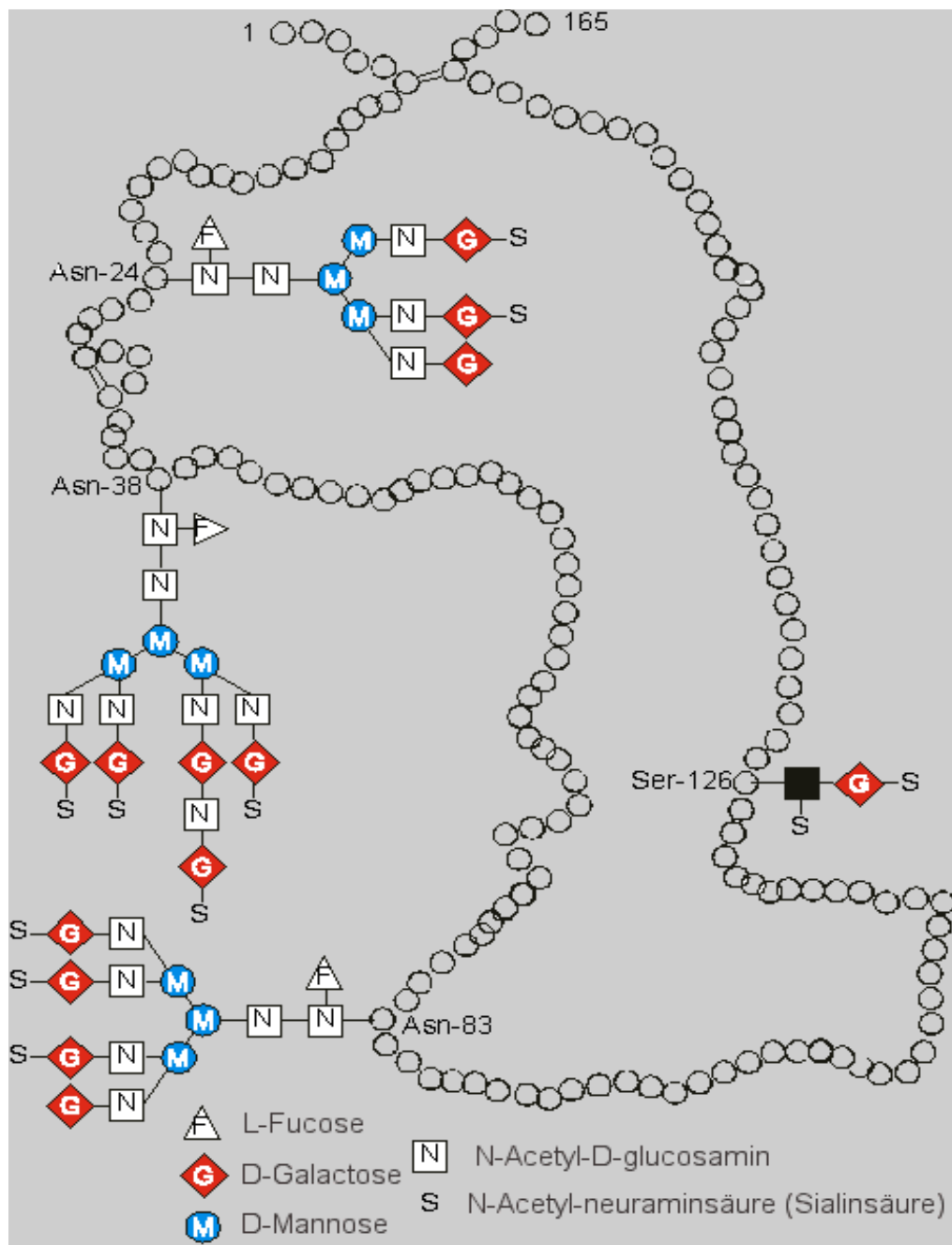
Humanes EPO ist ein Peptidhormon, das die Erythropoese stimuliert (Agarwal und Prchal, 2008). Es besteht aus einer Eiweißkette von 165 Aminosäuren, an die vier komplexe Kohlenhydratseitenketten angebunden sind. Das Molekulargewicht beträgt 30,4 kD (Peterson und Katusic, 2007). Dabei entfallen 40% des Molekulargewichtes auf den Kohlenhydratanteil. Das codierende Gen für EPO liegt beim Menschen auf Chromosom 7. Im adulten Organismus wird EPO vor allem in den Nieren produziert. Ein geringer Anteil wird in der Leber gebildet. Im fetalen Organismus stellt die Leber den entscheidenden Produktionsort für EPO dar (Fisher, 2003). EPO ist ein essentieller Wachstums- und Überlebensfaktor für späte erythroide Vorläuferzellen (Eckardt, 1994; Krantz, 1991). Die Bindung von EPO an spezifische Oberflächenrezeptoren dieser Zellen ermöglicht ihre Ausdifferenzierung zu Retikulozyten und Erythrozyten, indem ein frühzeitiger, vorprogrammierter Zelltod (Apoptose) verhindert wird (Fisher, 2003). Jegliche Form von Sauerstoffmangel, sei es durch Reduktion der Sauerstofftransportkapazität bei Anämie oder durch Verminderung der arteriellen Sauerstoffsättigung bei Ventilationsstörungen oder wegen einer Höhenexposition, führt normalerweise nach 1,5 Stunden zu einem Anstieg des EPO-Spiegels (Peterson und Katusic, 2007). Bei anhaltenden, schweren Anämien können bis zu tausendfach erhöhte Plasmakonzentrationen an EPO nachgewiesen werden. Zudem ist heute bekannt, dass EPO auch eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielt.

Am Herz wirkt EPO protektiv gegenüber ischämischen Ereignissen, indem es den kontrollierten Zelltod (Apoptose) der Zellen vermindert (Fiordaliso et al., 2005). Andere Effekte von EPO sind die Mobilisation von EPC, eine Stimulation der Angiogenese und eine Stimulation der Proliferation von Gefäß- und Endothelzellen (Bahlmann et al., 2004; Fisher, 2003; Heeschen et al., 2003).

Des Weiteren ist es heute dank gentechnischer Verfahren möglich, rekombinantes humanes Erythropoietin (rHuEPO) in größeren Mengen herzustellen. Infolgedessen ist es möglich, die oben genannten Effekte von EPO durch die Applikation der rekombinanten Formen therapeutisch zu nutzen

1.4.2. Darbepoetin alfa

Bei Darbepoetin alfa (Aranesp[®]) handelt es sich um ein gentechnisch rekombinantes humanes Erythropoetin Analogon. Es wird häufig als NESP (New Erythropoiesis Stimulating Protein) bezeichnet. Es ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 34 kD und wird aus den Ovarialzellen von chinesischen Hamstern hergestellt. Bei einem EPO Molekül werden fünf der insgesamt 165 Aminosäuren ausgetauscht. Dieser Austausch findet an den Positionen 30, 32, 87, 88 und 90 statt. An den Positionen 30 und 88 erfolgt zusätzlich die Ankoppelung der Aminosäure Asparagin. Darbepoetin alfa weist im Vergleich zu EPO sechs anstatt vier Zuckerseitenketten auf. Diese zusätzlichen Seitenketten sorgen dafür, dass sich das Molekulargewicht von 30 kD bei EPO auf 37 kD beim Darbepoetin erhöht und es so zu einem Anstieg der Serumhalbwertszeit und der in vivo-Aktivität kommt. So beträgt die Serumhalbwertszeit bei EPO 8,5 Stunden und bei Darbepoetin alfa 25,3 Stunden (Debra et al., 2002). Dies hat wiederum zur Folge, dass Darbepoetin alfa therapeutisch seltener appliziert werden muss als EPO. So reicht beim Darbepoetin alfa eine einmalige Applikation pro Woche aus, was zu einer wesentlich besseren Patienten Compliance führt (Elliot et al., 2008). Weiterhin ist zu erwähnen, dass trotz dieser Veränderungen am Molekül, Darbepoetin alfa den gleichen Wirkmechanismus und die gleiche Spezifität für den Erythropoetinrezeptor besitzt wie EPO. Darbepoetin alfa stimuliert in gleicher Weise die Erythropoese in den Stammzellen des Knochenmarks. Daraus resultiert ebenfalls eine Erhöhung der Anzahl an späten erythroiden Vorläuferzellen wie Retikulozyten und Erythrozyten. Bisher wurden weder gewebefremde noch unspezifische Wirkungen beobachtet. Ebenso wenig wurden Bindungen an andere Rezeptoren festgestellt (Egrie et al., 2001).



Aus Machnik M, Bialas B, Schänzer W. Der direkte Nachweis von rekombinatem Erythropoietin (rEPO) in Urin. Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule Köln, 18.2.2002

Abb. 6: Schematische Darstellung eines EPO Moleküls.

Zu sehen ist ein Glycoprotein mit 165 Aminosäuren. An den Positionen 24, 38, 83 und 126 befindet sich jeweils eine der vier Zuckerseitenketten.

1.5. Fragestellung und Zielsetzung

Laut den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung besteht die Therapie der KHK aus drei Säulen. Die erste Säule stellt den Komplex aus Risikofaktoren-Management und Prävention wie Gewichtsreduktion, regelmäßigem körperlichem Training und einer zielgerichteten Ernährungsumstellung dar. Die zweite Säule wird von der medikamentösen Therapie gebildet. Dort stehen derzeit folgende Präparate mit einer gesicherten Wirksamkeit zur Verfügung: Thrombozytenaggregationshemmer, Betarezeptorblocker, Nitrate und andere NO-Donatoren, Calciumkanalblocker, ACE-Hemmer, AT-1-Rezeptorantagonisten und cholesterinsenkende Mittel wie z.B. Statine. Die dritte Säule wird von den interventionellen Therapieoptionen gebildet (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V., 2003). In dem Bereich der medikamentösen Therapie ist derzeit leider für keines der oben genannten Medikamente eine kausale Therapie der KHK nachgewiesen.

Tierexperimentelle Studien belegen eine potentielle vaskuloprotektive Rolle von EPO über die Mobilisation von EPC (Heeschen et al., 2003; Schröder et al., 2009). Bislang wurde dieses Therapieprinzip im Menschen nicht untersucht. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wirkung der Applikation von rHuEPO auf die endotheliale Funktion und die EPC Mobilisierung in Patienten mit KHK zu untersuchen.

2. Patienten und Methoden

2.1. Studienkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden insgesamt 20 Patienten (n= 20) mit einer angiografisch gesicherten KHK eingeschlossen. Es wurden durch Randomisierung zwei Patientengruppen zu jeweils 10 Patienten gebildet. Die eine Gruppe bildete die Verumgruppe, die andere die Placebogruppe. Das Alter der Probanden lag zwischen 46 und 78 Jahren. In Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und deren Überarbeitungen mussten alle Patienten vor Einschluss in die Studie ihre Einwilligung zu der Teilnahme an der Studie erklären. Der Studienleiter klärte jeden Patienten über Hintergründe, Ablauf der Studie, Nutzen und Risiken einer Teilnahme, Versicherung bei studienbedingter Schädigung und die Möglichkeit eines Widerrufs der Einwilligung ohne jeglichen Nachteil auf. Jedem Patienten wurde eine Patienteninformation ausgehändigt und ausreichende Bedenkzeit gegeben. Mit der Einwilligung zur Studienteilnahme erklärte der Proband sich damit einverstanden, dass seine im Rahmen der Studie ermittelten Daten aufgezeichnet wurden. Des Weiteren stimmte er, im Falle einer Notwendigkeit, einer verschlüsselten Weitergabe der erhobenen Daten zu. Sämtliche Studienteilnehmer wurden aus dem Patientengut der Kardiologie der Medizinischen Klinik II der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn rekrutiert. Die Patienteninformation und Patienteneinwilligungserklärung befinden sich in Anlage 1 dieser Arbeit.

2.1.1. Einschlusskriterien

Das Hauptdiagnose- und Einschlusskriterium stellte das Vorhandensein einer angiografisch gesicherten KHK dar. Zudem musste die medikamentöse Therapie der Patienten stabil bleiben. Die Altersbeschränkung lag zwischen 30 und 80 Jahren. Fertile Frauen waren von der Teilnahme ausgeschlossen. Dabei wurde nicht gebärfähig wie folgt definiert: Entweder lag die letzte natürliche Menstruation mindestens 24 Monate vor Einschluss in die Studie zurück, ohne dass in dieser Zeit

gestillt wurde oder es lag eine chirurgische Sterilisierung (d. h. Tubenligatur) oder eine Hysterektomie vor Einschluss vor.

2.1.2. Ausschlusskriterien

Patienten die zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie an einem akuten Koronarsyndrom oder an einer akuten Herzinsuffizienz litten, konnten nicht eingeschlossen werden. Außerdem konnten Patienten, die im letzten Monat vor Einschluss einen Myokardinfarkt und/oder Apoplex hatten, nicht eingeschlossen werden. Zudem von einer Teilnahme ausgeschlossen waren Patienten, welche in der Anamnese eine Venenthrombose, eine Lungenembolie oder ein Tumorleiden aufwiesen. Sowohl Patienten mit einer unbehandelten oder komplizierten, schweren Hypertonie als auch Patienten mit höhergradigen Herzklappenvitien waren ausgeschlossen. Unter höhergradigen Herzklappenvitien wurden Vitien größer II. Grades definiert. Auch psychiatrisch erkrankte Patienten, suchtkranke Patienten oder Patienten mit einer bekannten Epilepsie als auch Patienten mit einer hämatologischen Erkrankung waren nicht einzuschließen. Zudem galten folgende Grenzwerte für nachstehende serologische Parameter: Kreatinin <2mg/dl, Hämoglobin >12g/dl aber <15g/dl und ein normwertiges Kalium. Zudem durfte keine Leberinsuffizienz vorliegen. Als Leberinsuffizienz galt eine dreifache Erhöhung der Transaminasen, ein Spontanquick < 50% und eine Cholinesterasetätigkeit von <50%.

2.1.3. Abbruchkriterien

Als Abbruchkriterien galten solche, die als mögliche Nebenwirkungen der Prüfmedikation anzusehen waren. Dieses sind Zeichen einer allergischen Reaktion wie Hautausschläge, Ödeme, Dyspnoe, Juckreiz, Rötung oder Schwellung im Bereich der Injektionsstelle. Weitere Nebenwirkungen der Prüfmedikation sind Übelkeit, Kopfschmerzen, Schwindel oder Sehstörungen, Blutdruckentgleisung, Thrombembolien Gelenk- und Muskelschmerzen und Nasenbluten. Da es durch Darbepoetin alfa zu

einer gesteigerten Erythropoese kommt, galt es den Hämoglobin-Wert (Hb-Wert) während der gesamten Studie engmaschig zu kontrollieren. Ein Anstieg des Hämoglobins um $\geq 2\text{g/dl}$ während der Studie galt als Abbruchkriterium. Auch der Anstieg des Hb-Wertes über 15g/dl führte zum Abbruch.

2.1.4. Randomisierung

Die Randomisierung erfolgte in zwei Blöcken. Hierfür wurden zweimal zehn identische und blickdichte Faltkarten auf der Innenseite im gleichen Verhältnis mit den Ziffern 0 oder 1 beschriftet und in identische Umschläge verbracht. Jeweils zehn Umschläge wurden dann verschlossen, gemischt und auf der Außenseite mit 1 bis 10 bzw. 11 bis 20 durchnummeriert und beim Prüfarzt aufbewahrt. Nach dem Einschluss eines Probanden durch den Prüfarzt, öffnete dieser während der Eingangsuntersuchung den Umschlag mit der jeweils nächsten Nummer. Die Ziffer 0 bedeutete eine Randomisierung in die Placebogruppe, die Ziffer 1 eine Randomisierung in die Verumgruppe. Die Zugehörigkeit zu den einzelnen Gruppen blieb dem Untersucher und Auswerter unbekannt. Lediglich der Prüfarzt, der für die Medikamentenapplikation zuständig war, kannte die Zugehörigkeit der Patienten zu den Gruppen. Für jeden Probanden wurde bei Einschluss in die Studie ein Protokoll angelegt. Auf diesem wurden alle erhobenen Daten wie Blutdruck, aktuelle Medikation und Befinden protokolliert. Auf dem Protokoll wurden auch die Gruppe und die erfolgte Applikation der Injektion vom Prüfarzt dokumentiert. Das Protokoll war während der gesamten Studiendauer für den Patienten nicht einsehbar und befand sich beim Prüfarzt.

2.2. Prüfmedikation

Bei der Verumgruppe wurde als Prüfmedikation Darbepoetin alfa verwendet. Darbepoetin alfa wird von der Firma Amgen unter dem Handelsnamen Aranesp[®] vertrieben. Bei Darbepoetin alfa handelt es sich, wie bereits unter Punkt 1.5.2. erwähnt, um ein dem EPO eng verwandtes Protein, welches aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters mittels rekombinanter DNA-Technologie hergestellt wird. Derzeit ist Darbepoetin alfa in Europa zur Behandlung der Anämie bei chronischer Niereninsuffizienz bei Erwachsenen oder Kindern, die älter als 11 Jahre sind, und zur Behandlung der symptomatischen Anämie bei erwachsenen Tumorpatienten mit nicht-myeloischen malignen Erkrankungen, die eine Chemotherapie erhalten, zugelassen. Bei Aranesp[®] handelt es sich um eine sterile, farblose, konservierungsstofffreie Lösung zur intravenösen oder subkutanen Applikation. Auf dem deutschen Markt erhältlich und auch in dieser Studie eingesetzt, wurden Fertigspritzen zu jeweils 60 Mikrogramm Wirkstoff. Eine Fertigspritze enthält 0,3ml Injektionslösung mit jeweils 200 Mikrogramm Wirkstoff pro Milliliter. Probanden der Verumgruppe erhielten Darbepoetin an Tag 1, 8 und 15, also dreimal im Rahmen der Studie, subcutan appliziert. Die Gesamtdosis betrug somit pro Patient 180 Mikrogramm. Neben dem Wirkstoff enthält die Injektionslösung als Hilfsstoffe zur Pufferung Natriumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumchlorid, Polysorbat 80 und Wasser für Injektionszwecke.

Patienten der Placebogruppe erhielten an Tag 1, 8 und 15 jeweils 0,3ml isotonische Kochsalzlösung (Isotonische Natriumchloridlösung 0,9%, Braun, Melsungen) subcutan injiziert. Die Kochsalzlösung wurde unmittelbar vor der Gabe unter sterilen Bedingungen in eine 1ml-Einweg-Spritze (BD Plastipak[™], Becton Dickinson GmbH, Madrid, Spanien) gefüllt und mittels einer subcutan-Nadel (BD Microlance[™] 3, 0,4x19mm, Becton Dickinson GmbH, Drogheda, Irland) verabreicht. Das Aufziehen erfolgte für jeden Probanden einzeln und unmittelbar vor Injektion durch den applizierenden Arzt selbst, so dass keine Verwechslung möglich war.

2.3. Studienprotokoll

Die Genehmigung der vorliegenden Studie erfolgte durch die Ethikkommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Bei der Studie handelte es sich um eine monozentrische, prospektive, einfachverblindete, Placebo-kontrollierte Studie. Der Beginn der Studie bestand aus der Rekrutierung von geeigneten Probanden, die die Einschlusskriterien erfüllten, aber keine Ausschlusskriterien aufwiesen. Nach Detektion solcher Patienten folgte ein ausführliches Anamnese- und Aufklärungsgespräch durch den Prüfarzt. Die Patienten erhielten eine Patienteninformation und Patienteneinwilligungserklärung für Ihre Unterlagen. Nach ausreichender Überlegungszeit wurden die Patienten telefonisch kontaktiert. Die Termine für die Untersuchungen wurden festgelegt.

An Tag 1 der Studie wurde zunächst die Patienteneinwilligungserklärung sowohl vom Patienten als auch vom Prüfarzt unterzeichnet. Der Prüfarzt erkundigte sich nach dem derzeitigen Befinden des Patienten, machte eine kurze Anamnese und eine körperliche Untersuchung. Jeder Patient erhielt genügend Zeit, um Fragen zur Studie zu stellen. Des Weiteren wurde die aktuelle Medikamentenanamnese erhoben. Zudem wurde der Puls und der Blutdruck beidseits ermittelt. Alle erhobenen Daten wurden direkt in das Studienprotokoll des jeweiligen Patienten eingetragen. Es folgte die eigentliche Ultraschalluntersuchung und eine Blutentnahme. Zum Schluss erhielt der Patient das für ihn vorher durch Randomisierung ausgewählte Medikament, also entweder Aranesp[®] 60µg oder 0,3ml isotonische NaCl-Lösung, durch den Prüfarzt appliziert. Die Patienten erhielten zudem eine Visitenkarte mit den Telefonnummern der Klinik und der Prüfarzte und wurden explizit gebeten, sich bei Unwohlsein und/oder Auftreten von Nebenwirkungen direkt bei den zuständigen Ärzten oder in der Klinik zu melden. Für einen möglichen Notfall beinhaltete diese Karte die Information, dass der Patient an einer klinischen Studie teilnimmt, mit der Möglichkeit der Applikation von Aranesp[®] 60µg oder eines Placebos.

An Tag 8 und an Tag 15 der Studie kamen die Patienten erneut in die Klinik. An diesen Tagen fand eine ausführliche Anamnese, insbesondere über eventuell aufgetretene Nebenwirkungen, durch den Prüfarzt statt. Des Weiteren unterzogen sich die Probanden einer Blutentnahme. Zudem erhielten die Patienten Aranesp[®] 60µg oder

0,3ml isotonische NaCl-Lösung appliziert.

An Tag 21 der Studie fand bei den Patienten wieder eine ausführliche Anamnese, insbesondere über eventuell aufgetretene Nebenwirkungen, und eine körperliche Untersuchung durch den Prüfarzt statt. Zudem wurden die Abschlussultraschallmessung und eine Blutentnahme durchgeführt. Im Rahmen der Ultraschalluntersuchung wurden wieder der Puls, der beidseitige Blutdruck und ein EKG registriert und dokumentiert. Eine weitere Applikation von Verum oder Placebo fand zu diesem Zeitpunkt nicht mehr statt.

2.4. Ultraschallmessungen

Bei dem verwendeten Ultraschallgerät handelte es sich um das Modell Vivid 7 Dimension von der Firma GE Medical Systems Ultrasound AS, Horten, Norwegen, mit der S/N Nummer 7545V7C. Der verwendete Schallkopf war ein hochauflösender 10 MHz Linear Array Schallkopf (Modell 2302650, Seriennummer 55001WP2). Die Eindringtiefe wurde auf 4 cm festgelegt. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Sie erfolgten jeweils morgens, um zirkadiane Schwankungen auszuschließen. Zudem wurden alle Patienten dazu angehalten vor den jeweiligen Messungen nüchtern zu sein. Der Proband lag während der gesamten Messung in entspannter Position auf dem Rücken auf einer Untersuchungsfläche. Der rechte Arm wurde in 40° bis 60° Abduktionsstellung gelagert. EKG-Elektroden wurden für die R-Zacken getriggerte Bildspeicherung am Probanden angebracht. Sämtliche erhobenen Bilddaten wurden vom Ultraschallgerät auf den kliniksinternen Server übertragen. Dieses geschah mittels der Software Xcelera Echo (Xcelera Echo 1,2L4SP2, Version vom 21.06.2007, Philips Medical Systems, PC Best, Niederlande).

2.4.1. Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis

Das Prinzip der Messung der Endothel-abhängigen Dilatation der A. brachialis beruht auf einer Zunahme des Durchmessers des Gefäßes nach einer physiologischen Stimulation der endothelialen NO-Synthese durch Steigerung der Fließgeschwindigkeit. Diese wird als flussvermittelte Dilatation oder als Flow mediated dilation (FMD) bezeichnet (Balletshofer et al., 2003; Coretti et al., 1995, 2002; Kelm, 2002; Sorenson et al., 1995). Dazu wurden dem Patienten nach einer zehnmütigen Ruhepause der Puls und der Blutdruck beidseitig gemessen. Dann wurde eine Blutdruckmanschette am proximalen rechten Oberarm angebracht. Mittels hochauflösendem Ultraschall wurde zunächst die A.brachialis aufgesucht und im Längsschnitt dargestellt. Um sicherzustellen, dass die Messungen bei einem Probanden immer an derselben Stelle erfolgten, wurde die A. brachialis in der Ellenbeuge so eingestellt, dass proximal der Bifurkation in A. radialis und A. ulnaris gemessen wurde. Die Bifurkation wurde so dargestellt, dass sie am äußersten Bildrand zu sehen war. Die Schallkopfposition wurde mittels eines wasserfesten Stiftes auf der Haut markiert. Zunächst wurde mittels Doppler die Blutflussgeschwindigkeit in der A. brachialis bestimmt. Mittels Cine-Loop wurde der Ruhediameter der A. brachialis aufgezeichnet und später am PC gemessen. Diese Werte stellten die Ausgangswerte dar.

Um eine flussvermittelte Vasodilatation (FMD) der Gefäße zu erreichen, wurde anschließend der Arm für fünf Minuten mittels der anliegenden Blutdruckmanschette gestaut. Die Stauung wurde einheitlich mit 50mmHg über dem gemessenen systolischen RR-Wert durchgeführt. Durch die Stauung wurde distal der Manschette eine komplette Ischämie erzeugt. Nach fünf Minuten wurde die Staumanschette gelöst, wodurch es zu einem vermehrten Bluteinstrom in die postischämisch vasodilatierten Armgefäße kam. Die erhöhte lokale mechanische Krafteinwirkung auf die Gefäßinnenwand in der zuführenden Oberarmarterie bewirkt eine scherkraftinduzierten NO-Freisetzung aus den Endothelzellen proximal des ischämischen Gebietes, was konsekutiv zu einer lokalen Vasodilatation führt (Corson et al., 1996; Dimmeler et al., 1999). Innerhalb von 10 Sekunden nach Deflation der Blutdruckmanschette wurde erneut mittels Doppler die Blutflussgeschwindigkeit der A. brachialis gemessen, um den

erhöhten Blutfluss zu dokumentieren. Da die flussvermittelte Vasodilatation nach ca. 60 Sekunden nach Deflation ihr Maximum erreicht (Coretti et al., 2002), wurde zu diesem Zeitpunkt im kontinuierlichen 2D-Modus drei aufeinander folgende RR-Intervalle EKG-getriggert aufgezeichnet. Diese Messung wurde nach 120 Sekunden wiederholt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden anhand dieser Messungen der Diameter des Gefäßes am PC ausgemessen. Die Differenz des Gefäßdiameter zwischen dem Ausgangswert und dem Wert nach Cuffdeflation wurde in der Auswertung in Prozent angegeben. Als Maß für die Endothelfunktion gilt somit das Ausmaß der scherkraftinduzierten prozentualen Zunahme des Gefäßdurchmessers im Vergleich zum Ruhedurchmesser.

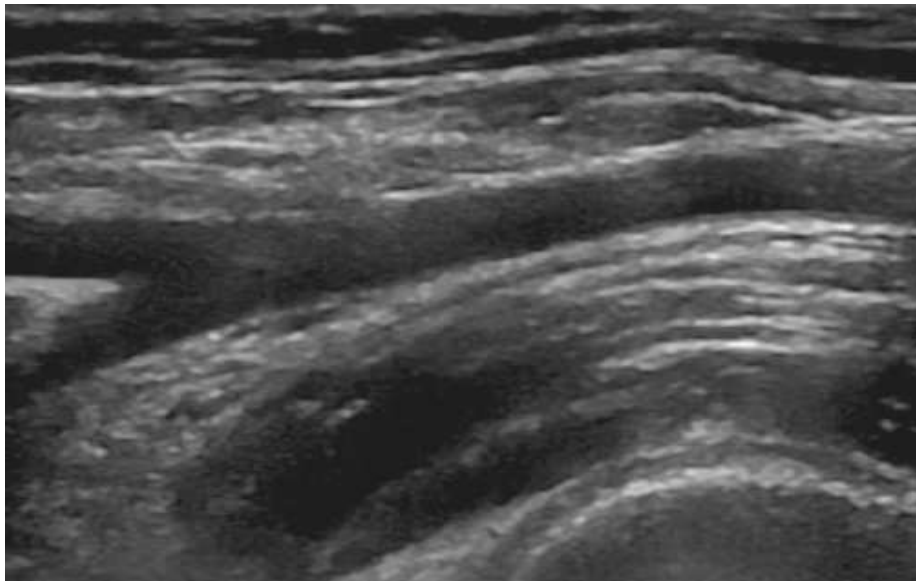


Abb.7: Ultraschallaufnahme

Darstellung der Bifurkation der A. brachialis in A. radialis und A. ulnaris im Längsschnitt

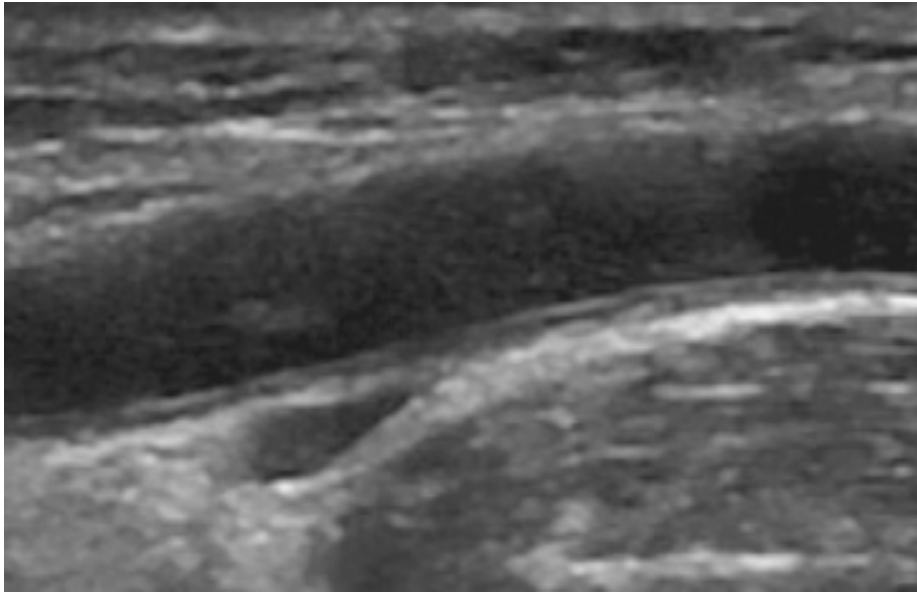


Abb. 8: Ultraschallaufnahme

Darstellung der A. brachialis im Längsschnitt. Gering arteriosklerotisch verändertes Gefäß. Die Intima ist als echoreiche Linie gut abgrenzbar.

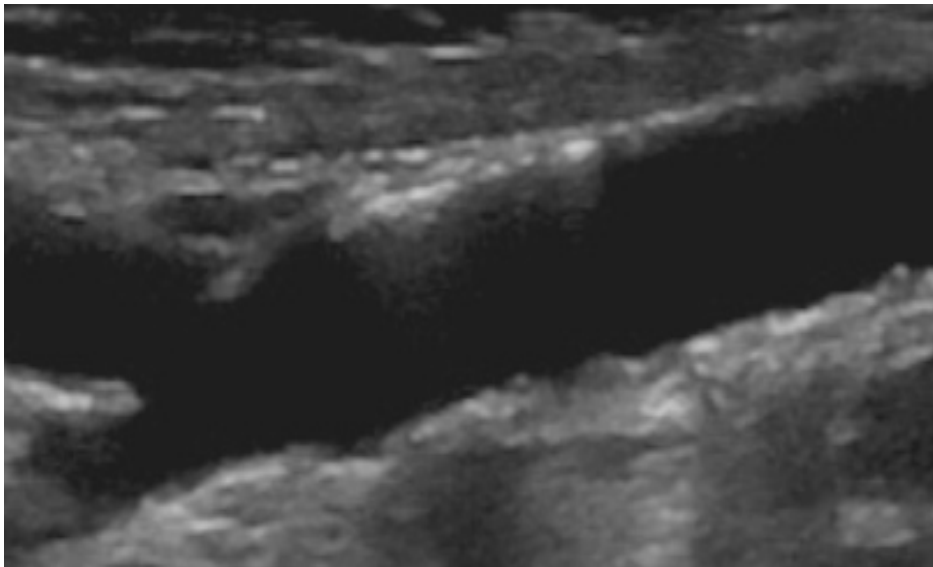


Abb.9: Ultraschallaufnahme

Darstellung der A. brachialis im Längsschnitt. Deutlich arteriosklerotisch verändertes Gefäß. Verkalkungen und Plaque Bildung sind gut erkennbar.

2.4.2. Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-unabhängige Dilatation der Arteria brachialis

Prinzipiell kann einer verminderten FMD neben einer reduzierten NO-Synthese des Endothels auch ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf NO oder ein vermehrter NO-Abbau zu Grunde liegen. Deshalb wurde in einem zweiten Schritt die Endothel-unabhängige Dilatation der A. brachialis getestet. Dazu musste zunächst eine Pause von mindestens 15 Minuten eingehalten werden, um vaskuläre Ausgangsbedingungen für die nächste Messung zu erhalten. Um sicherzustellen, dass erneut vaskuläre Ausgangsbedingungen (Ruhetonus) vorlagen, wurden der Gefäßdurchmesser und der Blutvolumenfluss erhoben und mit den Werten vom Beginn der Untersuchung verglichen. Dann wurde die endothelunabhängige, nitroinduzierte Vasodilatation (NMD) gemessen. Dazu wurde 3 Minuten nach sublingualer Applikation von 0,4mg Glyceroltrinitrat (GTN), entspricht einem Sprühstoß (Nitrolingual akut Spray[®], Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt), die maximal induzierbare endothelunabhängige Dilatation der A. brachialis mittels Ultraschall ermittelt. Hierzu wurden wiederum drei Messungen durchgeführt. Der Proband wurde vor der Messung über mögliche GTN-bedingte Nebenwirkungen wie z.B. Kopfschmerzen aufgeklärt. Sowohl die Endothel-abhängige als auch die Endothel-unabhängige Vasodilatation wurden als prozentuale Zunahme des Durchmessers in Relation zum Ruhedurchmesser angegeben.

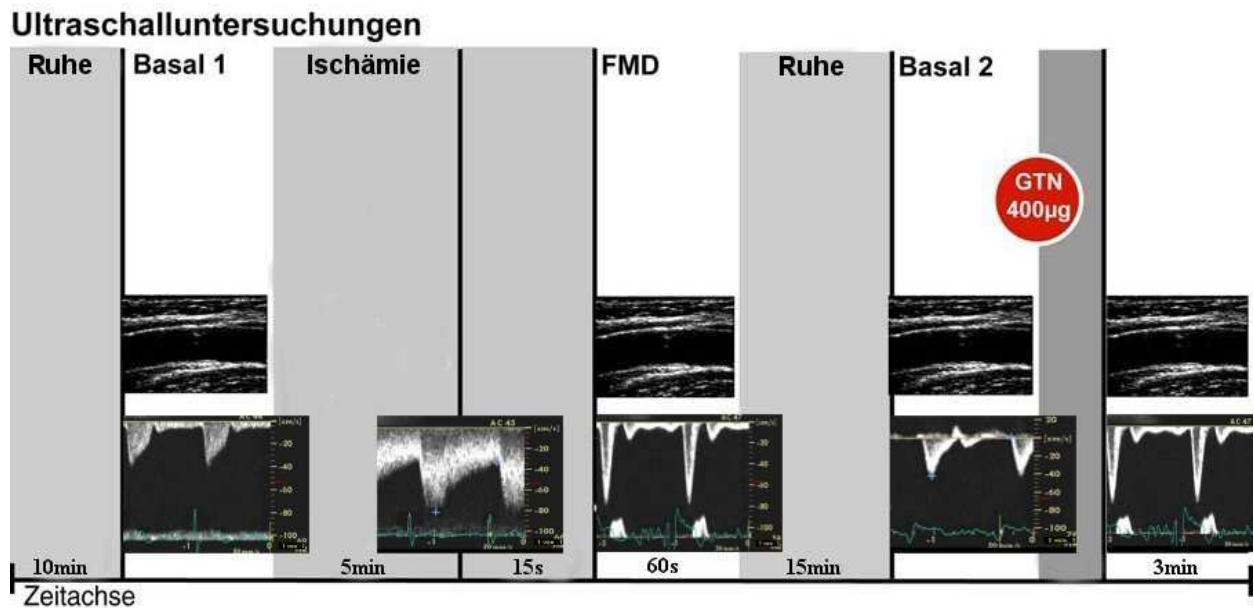


Abb. 10: Untersuchungsablauf

Zeitliche Abfolge des Untersuchungsablaufes. Zuerst 10minütige Ruhephase. Es folgt die Erhebung der Basalparameter. Dann 5 minütige Ischämie Phase. Nach Cuffdeflation wird nach 15 Sekunden ein Gefäßdoppler aufgezeichnet und nach 60 Sekunden erfolgt die Messung des Gefäßdiameters. Erneute 15minütige Pause. Erhebung der zweiten Basalparameter und Verabreichung von 0,4mg GTN. Erneute Diametermessung und Gefäßdoppler 3 Minuten nach GTN-Applikation.

Zu den jeweiligen Messzeitpunkten sind im unteren Teil exemplarisch Originalaufnahmen eingefügt. (Oben: Längsschnitt der A. brachialis; Unten: Flussprofil)

2.4.3. Prinzip der sonographischen Quantifizierung des arteriellen Durchmessers

Die Bestimmung des Durchmessers der A. brachialis im Bereich der Bifurkation erfolgte anhand von Längsschnitten. Diese wurden mit Hilfe eines hochauflösenden 10 MHz Linear Array Schallkopfes (GE Medical Systems Ultrasound AS, Horten, Norwegen) aufgezeichnet. Mittels Cine-Loop wurden im kontinuierlichen 2D-Modus R-Zacken - getriggert drei aufeinanderfolgende RR-Intervalle erfasst. Die Vermessungen des Arterienradius erfolgten somit EKG-gesteuert am Ende der Diastole. Die

erhobenen Bilddaten wurden vom Ultraschallgerät auf den klinikinternen Server übertragen und am PC mit der oben bereits erwähnten Software Philips Xcelera Echo ausgewertet. Als Begrenzung des arteriellen Lumens diente die M-Linie, die den Übergang zwischen der Media und der Adventitia der Gefäßwand darstellt. Die M-Linie stellt sich im Ultraschall als echoarme Linie dar. Für die Bestimmung des Arteriendurchmessers wurde die Distanz zwischen der schallkopfnahen M-Linie und der schallkopffernen M-Linie im rechten Winkel zur Gefäßachse bestimmt (Celermajer, 1998; Coretti et al., 2002). Es erfolgten jeweils drei Messungen je RR-Intervall, also 9 Messwerte je Einstellung. Aus diesen Messungen wurde der Mittelwert festgestellt. Der Mittelwert stellte somit den jeweiligen Arteriendurchmesser dar.

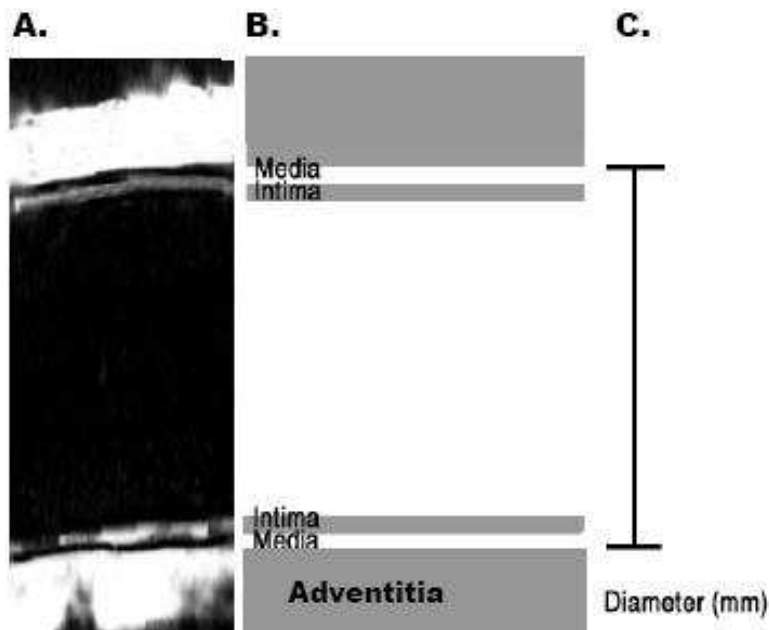


Abb. 11:

Schematische Gegenüberstellung des Ultraschallechos der A. brachialis und des anatomischen Korrelates der wandbildenden Strukturen.

A: Sonographische Darstellung der A. brachialis. Die M-Linie stellt sich echoarm dar.

B: Anatomisches Korrelat der echobildenden Strukturen.

C: Den Durchmesser messungen wurde die Strecke von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie zu Grunde gelegt.

Neben dieser konventionellen Methode wurde der Arterien Durchmesser zusätzlich durch eine speziell dafür entwickelte Software am PC in ein Standard-Bildformat (TIF-Format) konvertiert (Brachial Converter, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA). Die so konvertierten Bildschleifen konnten nachfolgend in die zur Diametermessung verwendete Software (Brachial Analyse, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA) importiert werden.

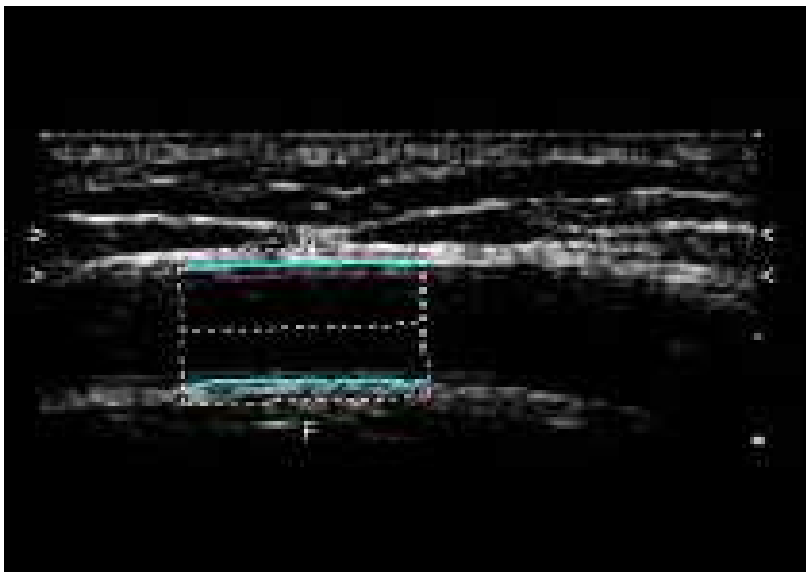


Abb. 12:

PC-gestützte Vermessung des Diameters der A. brachialis. Die Bestimmung des Diameters erfolgte durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen Messpunkten in einem zu definierenden Messabschnitt.

Nachdem das Bildmaterial in die zur Diametermessung verwendete Software importiert war, wurde der zu vermessende Gefäßabschnitt manuell markiert. Dann wurde das Programm anhand von mitgespeicherten Eichmarken kalibriert. Anschließend wurden die Gefäßwände automatisch detektiert und farbig angezeigt. Die farbig markierten Begrenzungen der Gefäßwand wurden auf Übereinstimmung mit dem Ultraschallbild überprüft. Die Bestimmung des Diameters erfolgt R-Zacken synchron durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen Messpunkten im definierten Messabschnitt.

2.4.4. Prinzip der dopplersonographischen Untersuchung des Blutvolumenflusses in der Arteria brachialis

Die Dopplersonographie beruht auf dem Phänomen, dass die Frequenz einer reflektierten Schallwelle höher oder niedriger ist als die des ursprünglichen Impulses, wenn sich das beschallte Objekt, zum Beispiel ein Erythrozyt, auf den Schallkopf zu oder davon weg bewegt. Diese Frequenzveränderung heißt Doppler-Phänomen oder "Doppler-Shift". Es ist direkt abhängig von der Flussrichtung und Geschwindigkeit des Erythrozyten. Dabei bewirken hohe Flussgeschwindigkeiten und eine Distanzabnahme des Erythrozyten zum Schallkopf hin eine Frequenzzunahme. Entgegengesetzt dazu bewirken niedrige Flussgeschwindigkeiten und eine Distanzzunahme eine Frequenzabnahme.

Die Messung der Fließgeschwindigkeit in der A. brachialis erfolgte in der Studie im PW-Doppler Mode. Unter PW-Doppler wird eine gepulste Dopplersonografie (pulsed waved) verstanden. Der dabei verwendete Schallkopf war ein hochauflösender 10 MHz Linear Array Schallkopf. Linear Array bedeutet, dass die Piezokristalle des Sondenkopfes linear, also in einer Reihe, angeordnet sind. Dadurch kommt es zu einer parallelen Schallausbreitung. Es entsteht ein zweidimensionales Bild. Dieser Schallkopf ist besonders gut geeignet, um oberflächliche Strukturen, wie in diesem Fall Gefäße, darzustellen. Beim PW-Doppler Verfahren senden die Piezokristalle des Sondenkopfes intermittierend kurze gepulste Dopplersignale in rascher Folge. Sie werden Pulsrepetitionfrequenzen genannt. Zwischen dem Aussenden dieser Frequenzen empfängt der Schallkopf die reflektierten Signale. Je nach Entfernung des Reflexionsorts haben die Schallwellen eine unterschiedliche Laufzeit. Nun ist es beim PW-Doppler möglich durch einen Zeitfilter die Messtiefe selektiv festzulegen. Der Schallkopf empfängt somit nur die ankommenden Signale eines umschriebenen Bereiches. Alle früher oder später eintreffenden Echosignale werden verworfen. Störende Überlagerungen fallen somit weg. Nun kann die Strömungsgeschwindigkeit in dem umschriebenen Areal nach der Dopplerformel berechnet werden.

Die mathematische Dopplerformel lautet:

$$\Delta f = 2 \frac{f}{c} v \cdot \cos \alpha$$

Δf = Dopplerfrequenz

f = Sendefrequenz der Schallsonde

c = Schallgeschwindigkeit im Weichteilgewebe (ca. 1540 m/s)

v = mittlere Strömungsgeschwindigkeit der reflektierten Erythrozyten

α = Winkel zwischen Gefäßachse und einfallendem Schallstrahl

Wird o.a. Formel nach v umgestellt, lässt sich die Flussgeschwindigkeit des Blutes berechnen.

$$v = \Delta f \frac{2}{2f \cdot \cos \alpha}$$

Da die Strömungsgeschwindigkeit im Zentrum des Gefäßes am höchsten ist, wurde das Messvolumen stets in die Gefäßmitte der A. brachialis gelegt. In die Berechnung der Strömungsgeschwindigkeit mit Hilfe der Dopplerformel geht der Kosinus des Einstrahlungswinkels im Nenner ein. Mit steigendem Winkel von 0° auf 90° wächst der Messfehler und macht die Messung bei 90° unmöglich ($\cos 90^\circ = 0$). Grundsätzlich erfolgten alle Messungen in der Studie bei einem Doppler-Winkel von $< 60^\circ$, da dies als äußerste Grenze für quantitative Flussmessungen erachtet wird. Aus der gemessenen Strömungsgeschwindigkeit und dem Gefäßdurchmesser wurde das Flussvolumen (Q) nach folgender Formel berechnet:

$$Q \text{ (ml/min)} = 60 \cdot \text{mittlere Strömungsgeschwindigkeit (cm/s)} \cdot \text{Querschnittsfläche (cm}^2\text{)}$$

2.5. Blutabnahmen

Die Blutabnahmen erfolgten jeweils morgens. Zur Venenpunktion wurden sterile Butterflykanülen (Safety-Multifly[®]-Set, 0,8x19mm, SARSTEDT, Nümbrecht) verwendet. Alle Blutabnahmen wurden in Aspirationstechnik durchgeführt. An Tag 1 der Studie wurde den Patienten eine rote EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)-S-Monovette[®] (2,7ml, 66x11mm, SARSTEDT, Nümbrecht) abgenommen. Diese diente zur Bestimmung eines kleinen Blutbildes und stichprobenartig der Bestimmung der Retikulozyten. Des Weiteren wurden den Probanden drei braune Serum-S-Monovetten[®] (7,5ml, 92x15mm, SARSTEDT, Nümbrecht) abgenommen. Ein Röhrchen diente zur Bestimmung des aktuellen Kalium- und Kreatininwertes. Die anderen beiden Röhrchen wurden im Labor für molekulare Kardiologie der Universitätsklinik Bonn für eventuelle Nachmessungen eingefroren. Zudem wurden vier grüne Coagulation-S-Monovetten[®] (je 5ml, 92x11mm, SARSTEDT, Nümbrecht) für die Bestimmung der Anzahl an zirkulierenden EPC mittels FACS-Analysen gewonnen. Ebenfalls wurde eine orangene Lithium-Heparin-S-Monovette[®] (2,7ml, 66x11mm, SARSTEDT, Nümbrecht) für das Anzüchten von Colony forming units (CFUS) entnommen. An Tag 8 und an Tag 15 der Studie wurde den Patienten jeweils eine rote EDTA-S-Monovette[®] zum Anfertigen eines kleinen Blutbildes und zur Bestimmung der Retikulozyten-Anzahl abgenommen. Dieses diente der Kontrolle und dem Verlauf des Hb-Wertes. An Tag 22 der Studie wurde den Probanden wie an Tag 1 eine rote EDTA-S-Monovette[®], drei braune Serum-S-Monovetten[®], vier grüne Coagulation-S-Monovetten[®] und eine orangene Lithium-Heparin-S-Monovette[®] entnommen. Die Verwendung von diesem Blut war die gleiche wie an Tag 1.

2.6. Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen

Zur Bestimmung der Anzahl an EPC wurden den Probanden sowohl bei der Einschluss- als auch bei der Abschlussuntersuchung jeweils 20ml Citratblut in vier grünen Coagulation-S-Monovetten[®] abgenommen. Aus diesem Blut wurden zunächst die mononukleären Zellen (MNC) isoliert. Diese wurden für die spätere

Durchflusszytometrie weiter verwendet. Mittels der FACS-Messung wurde die Anzahl der EPC bestimmt.

Die Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorter, FACS) ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften. Zunächst werden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenrezeptoren inkubiert. Um zwischen Oberflächenmolekül positiven und negativen Zellen zu unterscheiden, werden weitere Zellen zur Kontrolle mit unspezifischen Antikörpern des gleichen Isotyps markiert. Die durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit erfolgten mit einem FACSCalibur. In diesem Gerät treffen ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und optional ein Diodenlaser mit der Wellenlänge von 635 nm auf die Zellen. Am Analysepunkt trifft ein monochromatischer Laserstrahl für den Bruchteil einer Sekunde auf die durchströmende Zelle. Die erzeugten Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden von einem optischen Detektionssystem erfasst und in elektrische Signale konvertiert. Dabei wird die Abschwächung des Laserstrahls in seinem geraden Verlauf als „forward scatter“ (FSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Größe einer Zelle. Die Streuung des Laserstrahls beim Durchtritt durch granuläre Zellbestandteile wird als „side scatter“ (SSC) gemessen und steht als Maß für die Dichte und Granularität einer Zelle. Als Antikörper-konjugierte Fluochrome wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mit dem passenden Absorptions- und Emissionsspektren verwendet. In diesem Fall APC (Allophycocyanin) und PE (Phycoerythrin). Für jede Messung wurden 100µl Zellen mit der Software CellQuest analysiert.

Bei der vorliegenden Studie wurden CD34⁺/CD 133⁺ Zellen mittels FACS analysiert.

Humane hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen werden seit langer Zeit durch Expression des Zelloberflächenmarkers CD34 charakterisiert und mittels immunologischer Aufreinigungstechniken isoliert (de Wynter et al., 1995). CD34 wird auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen, auf Endothelzellen und auf embryonalen Fibroblasten exprimiert (Fina et al., 1990). 1997 wurde mit CD133 ein neuer Zelloberflächenmarker für hämatopoetische Stammzellen entdeckt (Yin et al., 1997). CD133 wird von hämatopoetischen Stammzellen und Endothelprogenitorzellen exprimiert (Miraglia et al., 1997).

Die CD34 Antikörper wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff APC und die CD133 Antikörpern mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE konjugiert und analysiert. In der vorliegenden Studie wurde die Zweifarbenfluoreszenzanalyse eingesetzt, um die Koexpression von CD34 und CD133 zu erfassen.

Für die Isolierung der MNC und für die FACS-Analysen wurden folgende Reagenzien benötigt:

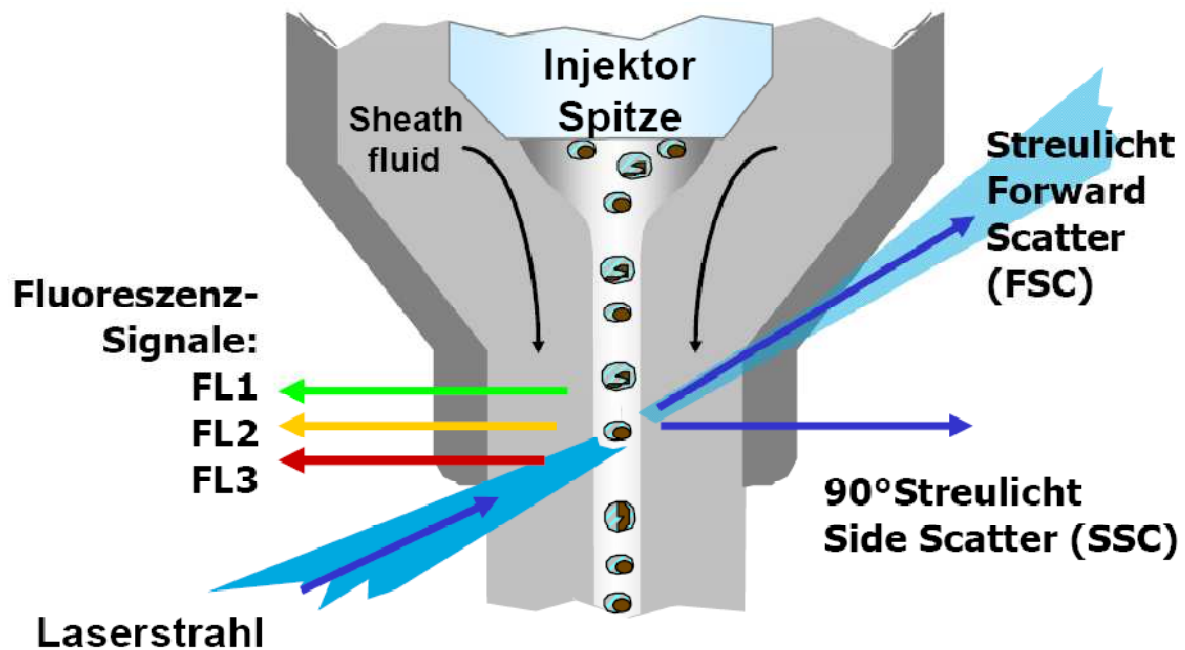
MNC:

- Ficoll (Biocoll Separating Solution, L6113, Biochrom AG, Berlin)
- Endothelial Cell Basal Medium 2 (EBM) (EBM 2, CC-3166, LONZA, Walkersville, MD USA)
- 20 ml Citratblut pro Proband pro Messung
- Phosphat Buffet Solution (PBS)
- 50ml Falcon (greiner bio-one, Schweiz)
- Zentrifuge (Megafuge 1,0, Heraeus, Hanau)
- 5ml Pipette (greiner bio-one, Schweiz)
- 10ml Pipette (greiner bio-one, Schweiz)

FACS:

- 5 ml Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg)
- CellQuest Pro Software (Becton Dickinson, Heidelberg)
- CD34/APC (345804, Becton Dickinson, Heidelberg)
- CD133/PE (130-090-853, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- anti-VEGF R2/KDR (FAB 357 P, R+D systems, Minneapolis)
- PE Mouse IgG1 (555749, Becton Dickinson, Heidelberg)
- APC Mouse IgG1 (555751, Becton Dickinson, Heidelberg)
- FACSCalibur (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)
- CellWash (349524, Becton Dickinson, Heidelberg)
- PFA 2% (AppliChem, Darmstadt)

Durchfluss-Zelle



Aus Schmid JA, Zellbiologische Arbeitsmethoden. Zentrum für Biomolekulare Medizin und Pharmakologie, Medizinische Universität Wien

Abb. 13: Schematische Darstellung des Prinzips der Durchflusszytometrie.

Zu sehen ist, wie die durchströmenden Zellen hintereinander den Analysepunkt des FACS-Gerätes passieren. Hier trifft ein monochromatischer Laserstrahl für den Bruchteil einer Sekunde auf die einzelnen Zellen. Die erzeugten Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden von einem optischen Detektionssystem erfasst und in elektrische Signale konvertiert. Dabei wird die Abschwächung des Laserstrahls in seinem geraden Verlauf als „forward scatter“ (FSC) bezeichnet und gilt als Maß für die Größe einer Zelle. Die Streuung des Laserstrahls beim Durchtritt durch granuläre Zellbestandteile wird als „side scatter“ (SSC) gemessen und steht als Maß für die Dichte und Granularität einer Zelle.

2.7. Statistik

Als primärer Endpunkt der Studie wurde die Zunahme der endothelvermittelten Vasodilatation der A. brachialis gewählt. Als sekundärer Endpunkt wurde die Zunahme der Anzahl an zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen gesehen. Die statistische Datenverarbeitung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des SPSS-Paketes (Statistical package for analysis in social sciences, Version 17,0, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Für alle statistischen Auswertungen wurde ein Konfidenzintervall von 5% gefordert. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Nominale Variablen wurden durch χ^2 - bzw. Fisher-Test verglichen. Der statistische Vergleich der beiden Behandlungsgruppen erfolgte mittels ein- bzw. zweifaktorieller Varianzanalyse, sowie t-Test für abhängige und unabhängige Variablen. Statistische Signifikanz wurde bei $p \leq 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Studienpopulation

3.1.1. Anzahl eingeschlossener Probanden

Im Zeitraum vom 11.03.2008 bis 16.07.2009 wurden insgesamt 20 Patienten in die Studie eingeschlossen, d.h. 10 Patienten für jeden Behandlungsarm. Die Studie wurde am 16.07.2009 nach Behandlung des 20. Patienten beendet.

3.1.2. Basisdaten

Bei allen Ausgangsparametern gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Alle erhobenen Parameter und Daten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Darstellung der Basisdaten.

	Placebo (n=10)	Verum (n=10)	Signifikanz
<u>Klinische Ausgangswerte</u>			
Alter	62, 9±10,35	70±3,59	p=0,065
Männlich/Weiblich	8/2	8/2	p=1
BMI	26,6±4,06	26,75±5,24	p=0,957
Koronarsklerose	1	1	p=1
Ein-Gefäß-KHK	2	1	p=0,557
Zwei-Gefäß-KHK	2	2	p=1
Drei-Gefäß-KHK	5	6	p=0,673
Systolischer RR	132,5±18,89	130,5±13,83	p=0,79
Diastolischer RR	81,5±10,55	75,5±8,32	p=0,176
ACS/Infarkt i.d. Anamnese	6	6	p=1
Z.n. ACB-OP	4	4	p=1
Herzfrequenz	69,1±12,41	60,6±6,54	p=0,076
<u>Kardiale Risikofaktoren</u>			
Diabetes mellitus	3	1	p=0,29
Arterielle Hypertonie	8	8	p=1
Nikotinabusus	7	5	p=0,388
Fettstoffwechselstörung	7	5	p=0,388
Familiäre Disposition	2	3	p=0,628
Hyperurikämie	1	2	p=0,232
<u>Medikamentöse Ausgangsdaten</u>			
β-Blocker	9	8	p=0,557
ASS	9	10	p=0,343
Diuretikum	5	5	p=1
Statin	9	10	p=0,343
ACE/AT1-Antagonist	7	9	p=0,29
Calciumantagonist	1	2	p=0,232
Nitrate	2	1	p=0,557
<u>Laborchemische Ausgangswerte</u>			
Hb bei Einschluss (g/dl)	13,55±0,55	13,16±0,66	p=0,171
Hkt bei Einschluss (%)	39,7±1,34	39,0±1,94	p=0,362
Retikulozyten bei Einschluss (%)	1,64±0,31	1,29±0,29	p=0,068
Leukozyten bei Einschluss (G/l)	6,79±2,12	6,17±1,52	p=0,457
Erythrozyten bei Einschluss (T/l)	4,45±0,31	4,35±0,31	p=0,482

3.2. Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis

Die Endothel-abhängige Dilatation der A. brachialis (FMD) wurde mittels hochauflösendem Ultraschall dopplersonografisch bestimmt. Bei den Patienten, die in die Placebo-Gruppe randomisiert wurden und dreimalig NaCl-Lösung verabreicht bekamen, wurde eine Änderung der FMD um im Mittel $0,26 \pm 2,44\%$ gefunden. Nach der dreiwöchigen Therapie mit Darbepoetin alfa wurde eine Verbesserung der FMD von im Mittel $7,52 \pm 1,64\%$ gemessen. Die gemessenen Werte ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit einem p-Wert von 0,0236 (Abb. 15-17).

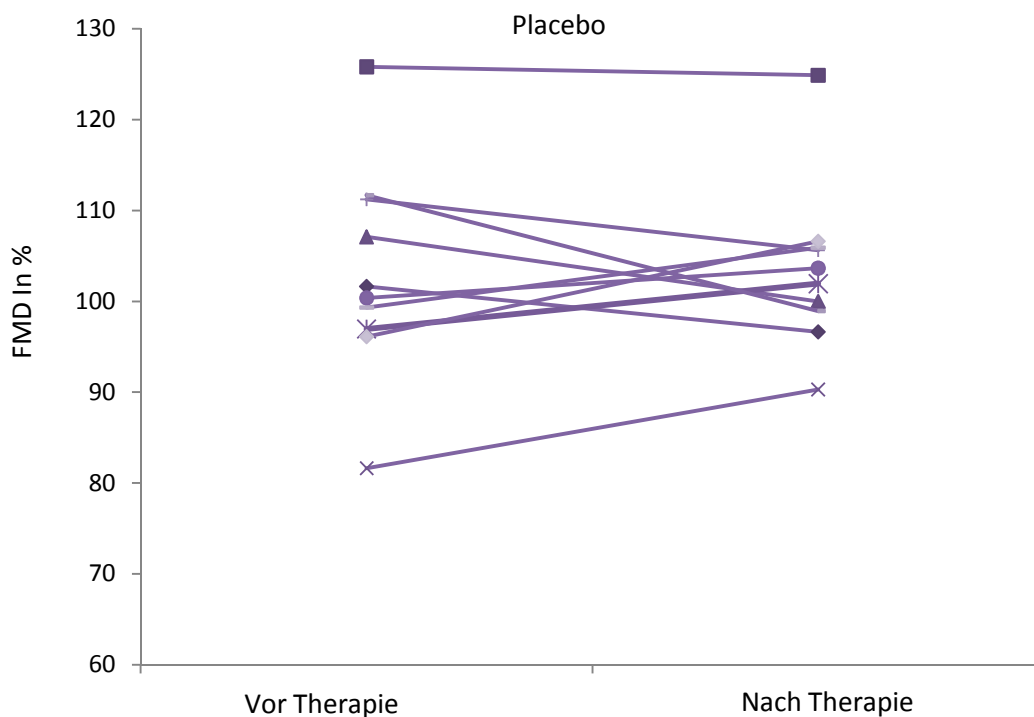
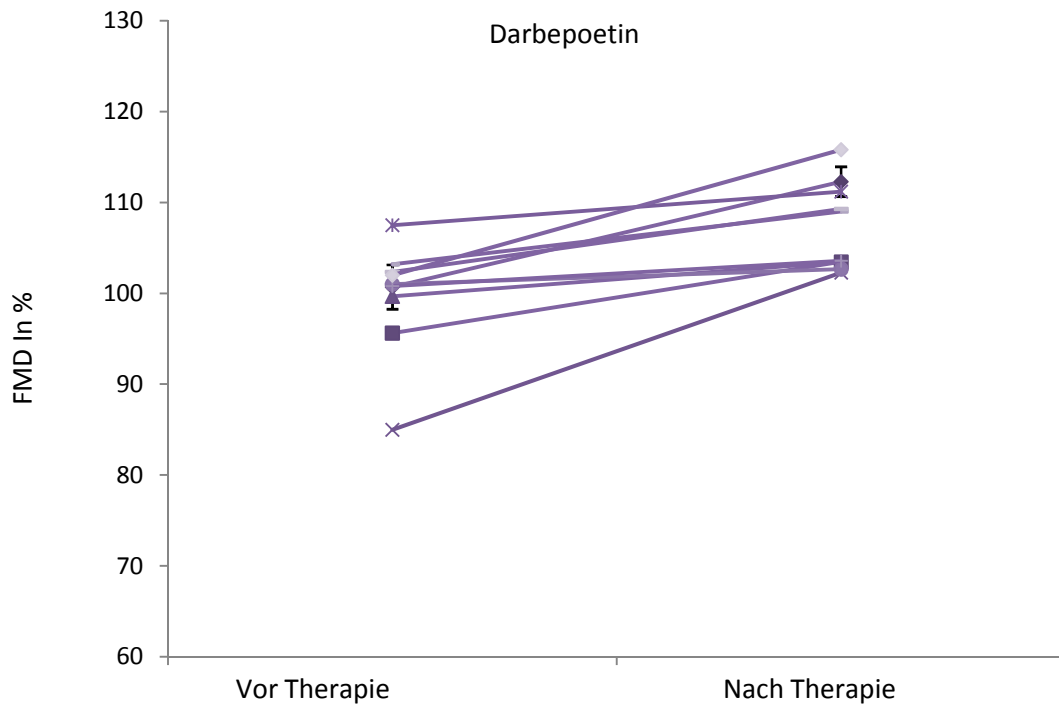


Abb. 15:

Darstellung der Entwicklung der FMD während der Therapie mit Placebo. Links die Messpunkte vor Therapiebeginn. Rechts die Messwerte nach der Therapie. Es ist zu erkennen, dass die FMD in der Placebo-Gruppe bei jedem Patienten weitgehend gleich blieb.

**Abb. 16:**

Darstellung der Entwicklung der FMD während der Therapie mit Darbepoetin alfa. Links die Messpunkte vor Therapiebeginn. Rechts die Messwerte nach der Therapie. Die FMD von den mit Darbepoetin alfa behandelten Patienten stieg bei jedem einzelnen Probanden an.

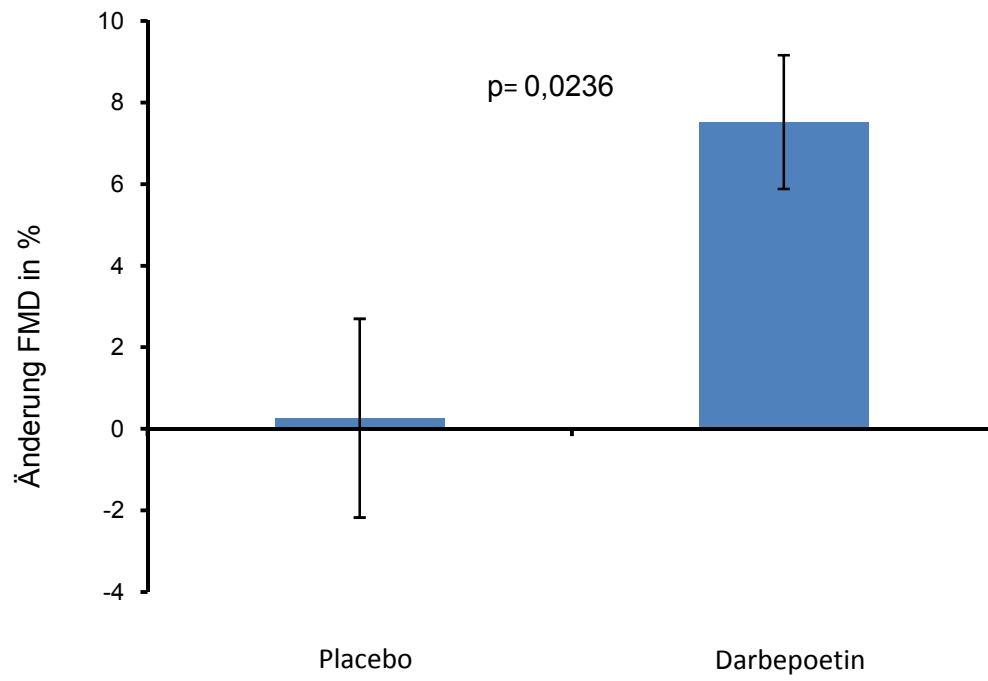


Abb. 17:

Prozentuale Änderung der FMD nach der Therapie mit Placebo oder Darbepoetin alfa

3.3. Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-unabhängigen Dilatation der Arteria brachialis

Die Endothel-unabhängige Dilatation wurde bestimmt, indem den Patienten jeweils 0,4mg Glyceroltrinitrat (GTN) verabreicht wurde. Nach drei Minuten wurde die maximal induzierbare endothelunabhängige Dilatation und der maximale Blutvolumenfluss der A. brachialis mittels Ultraschall ermittelt. Bei diesen Messungen war zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied auszumachen. Der Blutfluss änderte sich in der Placebo-Gruppe im Mittel um $-1,19 \pm 3,10\%$. In der Verum-Gruppe veränderte sich die NMD um $0,49 \pm 3,03\%$. Der p-Wert beträgt 0,6576 (Abb. 18).

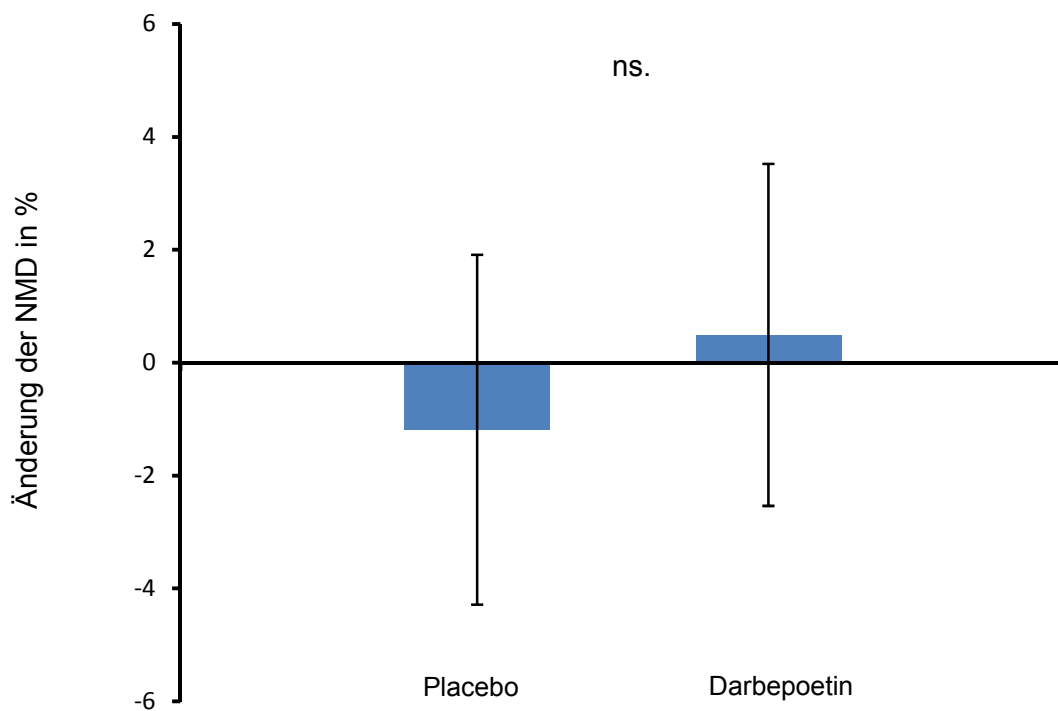


Abb. 18:

Darstellung der Änderung der NMD nach der Therapie mit Placebo oder Darbepoetin alfa

3.4. Dopplersonographische Bestimmung des Blutvolumenflusses in der Arteria brachialis unmittelbar nach Deflation

Der Blutvolumenfluss der A. brachialis wurde 15 Sekunden nach der Deflation des Oberarmcuffs nach fünfminütiger Ischämiezeit mittels Dopplersonographie gemessen. Bei diesen Messungen wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Placebo- und Verum-Gruppe vor und nach der Therapie gefunden. Bei den Patienten der Placebo-Gruppe stieg der postischämische Blutvolumenfluss im Mittel um $1,18 \pm 6,51\%$ an, wohingegen der postischämische Blutvolumenfluss der Patienten nach dreimaliger Gabe von Darbepoetin alfa im Mittel um $63,92 \pm 25,70\%$ anstieg. Diese Werte ergeben einen p-Wert von 0,039 (Abb. 19).

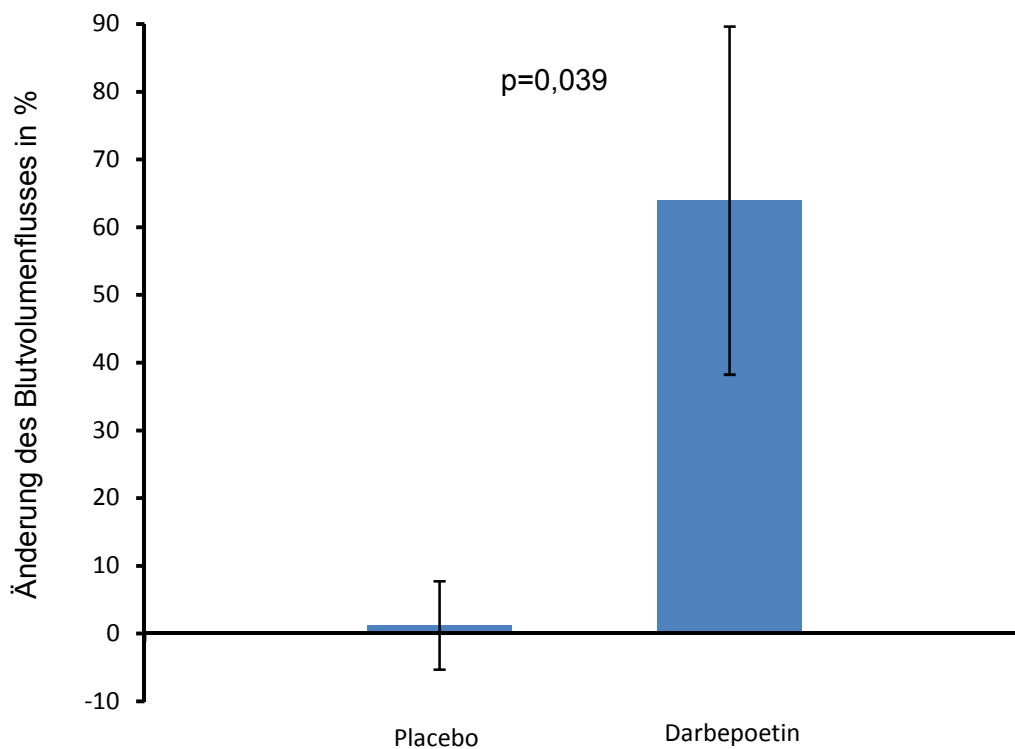


Abb. 19:

Darstellung der Änderung des Blutvolumenflusses nach der Therapie mit Placebo oder Darbepoetin alfa.

3.5. Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen

Die CD34+/CD133+ doppelt positiven Zellen wurden mittels FACS-Analyse bestimmt. Nach der dreiwöchigen Therapie mit Darbepoetin alfa wurden für die frei zirkulierenden EPC im Vergleich zu den vor der Therapie gemessenen Zahlen folgende Werte ermittelt.

In der Placebo-Gruppe wurde eine Reduktion der frei zirkulierenden Zellen um $14,13 \pm 17,20\%$ gefunden. In der Verum-Gruppe wurde eine Steigerung an frei zirkulierenden CD34+/CD133+ Zellen um $50 \pm 24,20\%$ gemessen (Abb. 20-24). Diese Werte ergeben einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit einem p-Wert von 0,015.

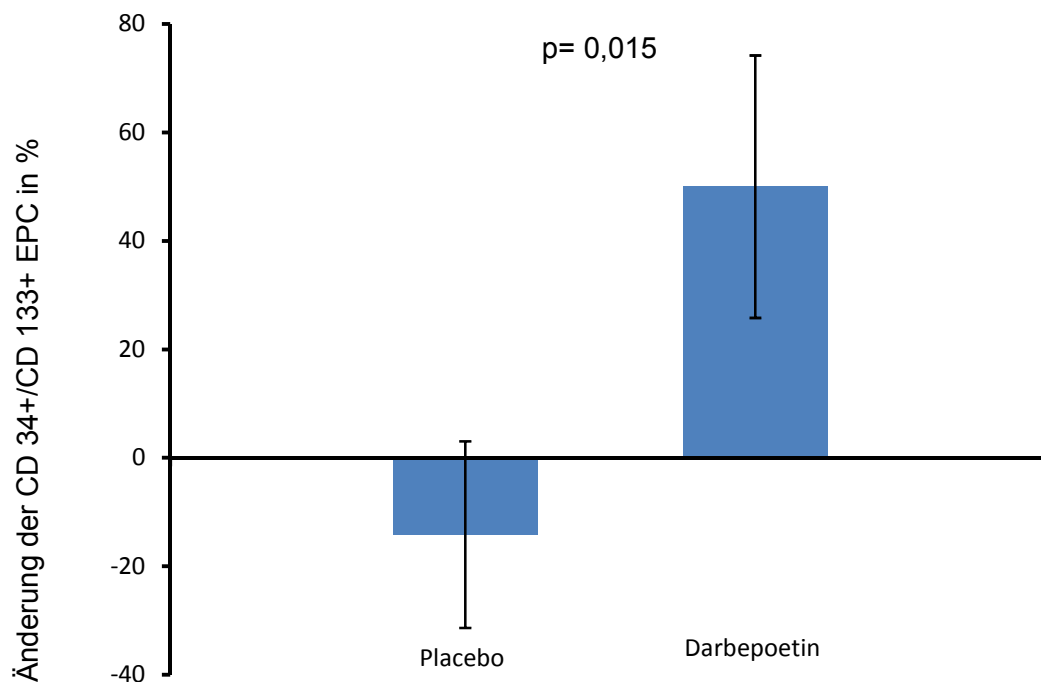
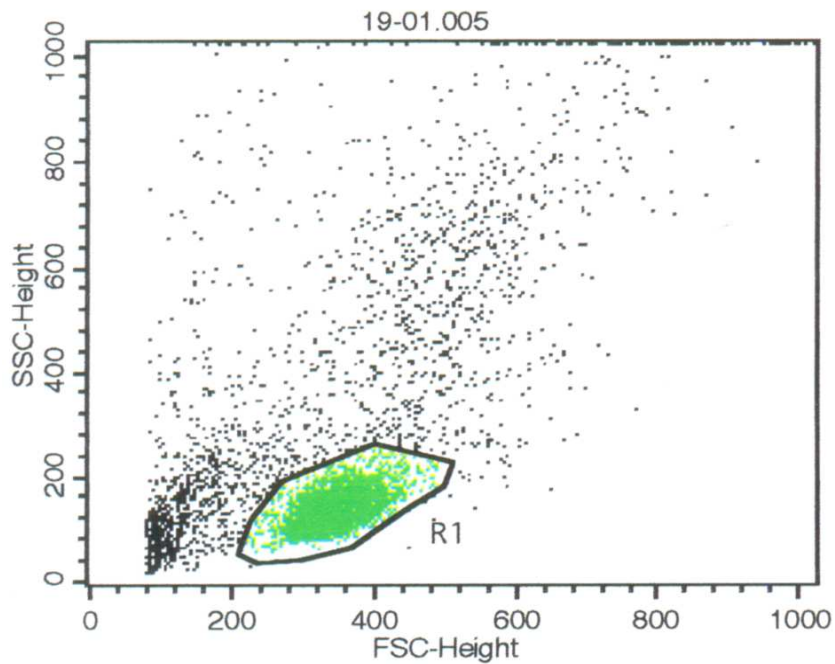
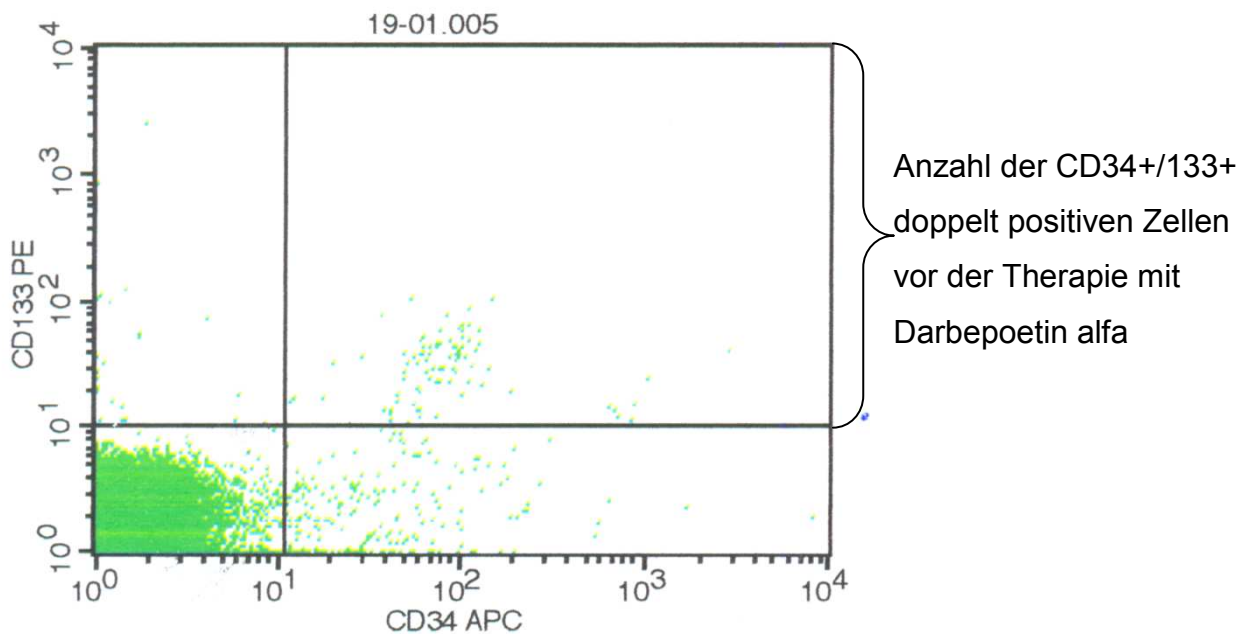


Abb. 20:

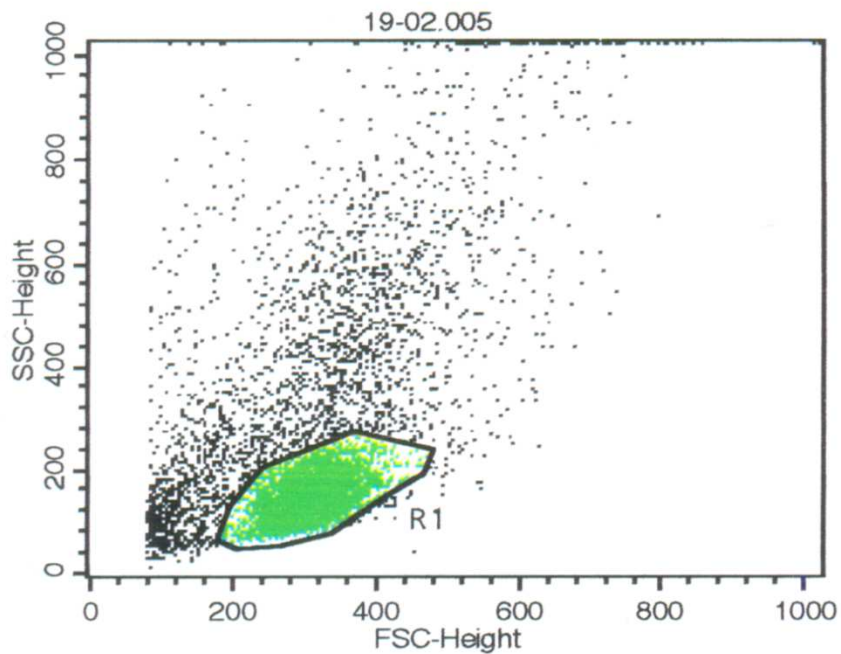
Änderung der Anzahl der frei zirkulierenden CD34+/133+ EPC nach der Therapie mit Darbepoetin alfa oder Placebo

**Abb. 21:**

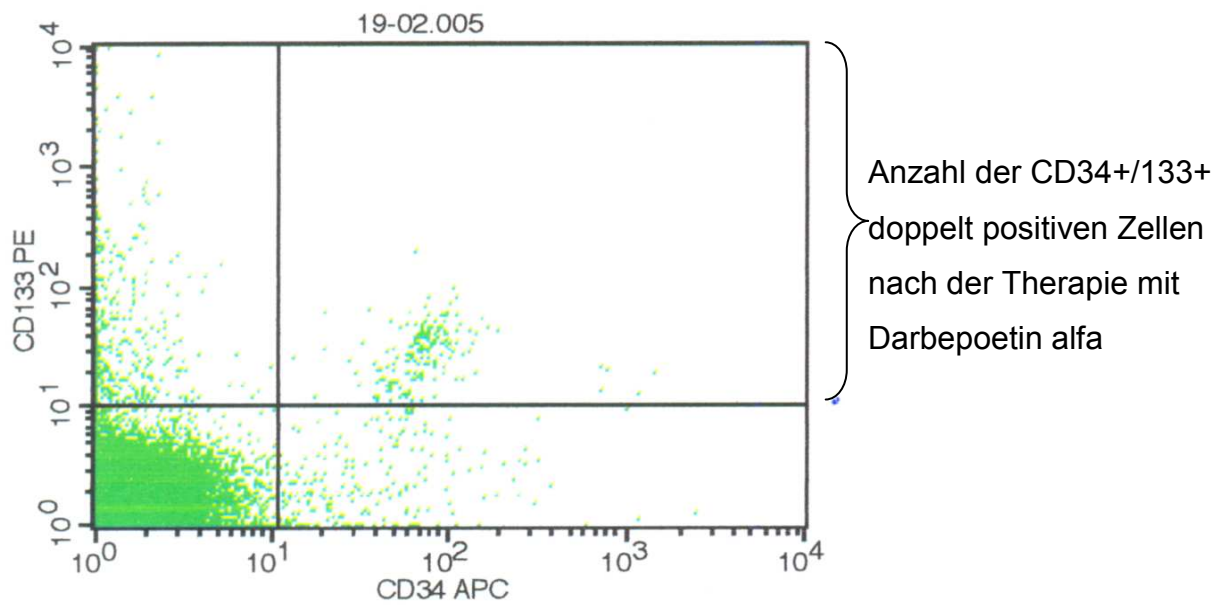
Originalabbildung der Diskriminierung der Lymphozyten innerhalb der mononukleären Zellen vor Beginn der Therapie mit Darbepoetin alfa
 forward scatter: FSC, side scatter: SSC

**Abb. 22:**

Originalabbildung der Bestimmung der CD34+/CD133+ doppelt positiven Zellen vor Beginn der Therapie mit Darbepoetin alfa

**Abb. 23:**

Originalabbildung der Diskriminierung der Lymphozyten innerhalb der mononukleären Zellen nach der Therapie mit Darbepoetin alfa
forward scatter: FSC, side scatter: SSC

**Abb. 24:**

Originalabbildung der Bestimmung der CD34+/CD133+ doppelt positiven Zellen nach Therapie mit Darbepoetin alfa.

3.6. Effekt von Darbepoetin alfa auf den Hämoglobin Wert und die Retikulozyten

Da Darbepoetin alfa ein Medikament ist, das die Erythropese steigert, wurden wöchentliche Hb- und Retikulozyten Kontrollen durchgeführt. Ein Vergleich innerhalb der Verum-Gruppe vor und nach der Therapie zeigte, dass der Hb-Wert und die Retikulozyten ansteigen, aber dass es zu keinem signifikanten Unterschied kommt. Der Hb-Wert der Verum-Gruppe lag bei Einschluss in die Studie im Mittel bei $13,16 \pm 0,66 \text{ g/dl}$ (vs. $13,55 \pm 0,55 \text{ g/dl}$ für die Placebo-Gruppe). Nach dreimaliger Injektion von Darbepoetin alfa stieg der Hb-Wert im Mittel auf $13,74 \pm 0,86 \text{ g/dl}$ (vs. $13,73 \pm 0,52 \text{ g/dl}$). Aus diesen Daten ergibt sich für die Verum-Gruppe eine prozentuale Änderung des Hb-Wertes um $4,43 \pm 0,44\%$ (vs. $1,42 \pm 0,43\%$). Der p-Wert beträgt 0,139 (Abb. 25).

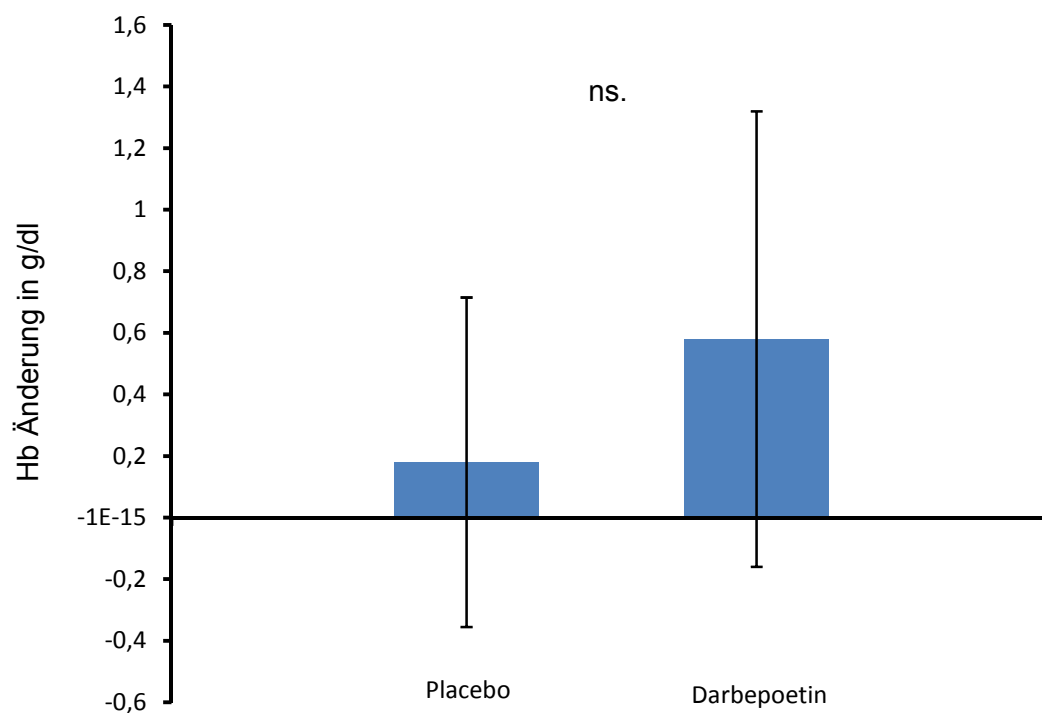


Abb. 25:

Änderung des Hb-Wertes nach der Therapie mit Darbepoetin alfa oder Placebo

Der Retikulozytenanteil betrug vor Beginn der Therapie mit Darbepoetin alfa $1,29 \pm 0,29\%$ (vs. $1,64 \pm 0,31\%$). Die Retikulozyten stiegen nach der Therapie auf $1,65 \pm 0,61\%$ (vs. $1,59 \pm 0,48\%$). Daraus ergibt sich eine prozentuale Änderung um $25,61 \pm 31,67\%$. Der p-Wert beträgt 0,201 (Abb. 26).

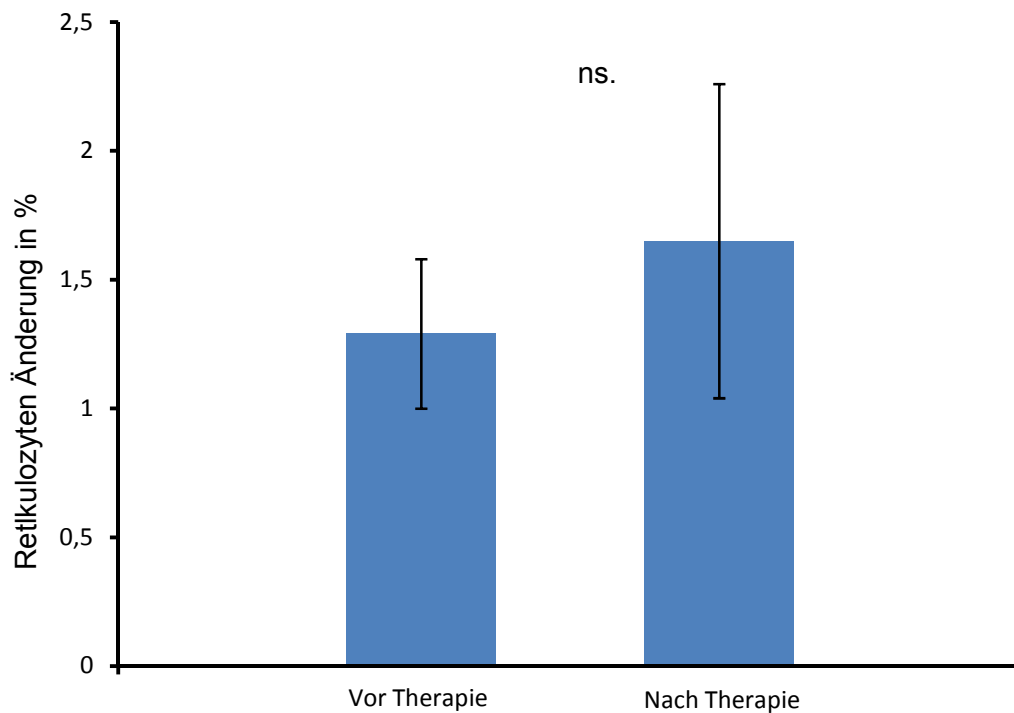


Abb. 26:

Änderung der Retikulozyten nach der Therapie mit Darbepoetin alfa oder Placebo

3.7. Abweichungen vom Prüfplan

Bei drei Patienten der Verum-Gruppe konnte der Prüfplan nicht eingehalten werden. Patient 08 stieg nach der ersten Injektion von Aranesp[®] 60µg mit dem Hb-Wert auf über 15g/dl, so dass keine weitere Injektion durchgeführt werden konnte.

Patient 10 stieg nach der zweiten Injektion von Aranesp[®] 60µg mit dem Hb-Wert auf über 15g/dl, so dass ebenso keine weitere Injektion durchgeführt werden konnte.

Patient 18 stieg zwischen der ersten und dritten Injektion von Aranesp[®] 60µg mit dem Hb-Wert auf über 15g/dl, so dass die zweite Injektion nicht gegeben werden konnte.

Bei keinem der Patienten kam es während der Studie zum Auftreten unerwünschter

Wirkungen. Eine Patientin der Verum-Gruppe erlitt sieben Wochen nach Abschluss der Studie einen kompletten Verlust der Körperbehaarung. Eine Verbindung zur Prüfmedikation konnte nicht belegt werden.

4. Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind wie folgt:

Unter der Therapie mit 180 µg Darbepoetin alfa (Kummulativdosis) kommt es:

- (1) zu einer signifikanten Zunahme der endothel-vermittelten Vasodilatation der A. brachialis;
- (2) zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen;

4.1. Methodenkritik

4.1.1. Quantifizierung der Endothel-abhängigen Dilatation mit Hilfe der FMD-Messung

Bei den meisten Untersuchungsverfahren zur Quantifizierung einer endothelialen Dysfunktion wird die dilatatorische Antwort von Widerstands- und Leitungsarterien auf physikalische Stimuli oder vasoaktive Substanzen untersucht. Die Vasodilatation kann an Leitungsgefäßen direkt angiographisch oder sonographisch dargestellt werden. Untersuchungsprotokolle, die eine pharmakologische Stimulation der endothelialen NO-Bildung voraussetzen, sind nur begrenzt routinemäßig einsetzbar, da die entsprechenden vasoaktiven Substanzen intraarteriell appliziert werden müssen. Im Gegensatz dazu wurde die Endothel-abhängige Dilatation in der vorliegenden Arbeit nicht-invasiv, durch einen physikalischen Stimulus induziert. Durch Insufflation einer Blutdruckmanschette am Oberarm wurde das Versorgungsgebiet der A. brachialis über einen Zeitraum von 5 min vom Blutfluss und damit der Sauerstoffversorgung abgeschnitten. Nach Deflation der Manschette führt dies, über eine ischämische Dilatation der Widerstandsgefäße, zu einem gesteigerten Blutfluss im zuführenden Leitungsgefäß. Mit der resultierenden Steigerung der auf die Endothelzellen einwirkenden Schubspannung kommt es zu einer vermehrten NO-Synthese und

Dilatation der A. brachialis, welche sonographisch quantifiziert wird. Die Bestimmung der FMD stellt seit Jahren ein etabliertes Verfahren zur Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion dar. Neben kardiovaskulären Risikofaktoren einschließlich des Alters sind weitere biologische Einflussfaktoren der Vasomotion bekannt, die die Höhe der FMD beeinflussen können. So weist sie eine zirkadiane Rhythmik mit einem Maximum am späten Nachmittag und eine Abhängigkeit von den Hormonen Östrogen und Progesteron auf (Hashimoto et al., 1995). Außerdem kann die Nahrungsaufnahme die FMD beeinflussen. So kommt es bei akuter Hyperglykämie und nach fettreicher Nahrung zu einer signifikanten Reduktion (Kawano et al., 1999; Vogel et al., 1997). Akuter psychischer Stress und unmittelbares Zigarettenrauchen führen ebenfalls zu einer akuten Verminderung der FMD (Ghiadoni et al., 2000; Lekakis et al., 1997).

Um den Einfluss dieser Faktoren auf die FMD möglichst konstant zu halten, wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit immer zur gleichen Tageszeit zwischen 7:00 und 9:00 Uhr an nüchternen Probanden durchgeführt. Außerdem erfolgten alle Untersuchungen in einem vollklimatisierten, ruhigen Raum in entspannter Körperhaltung nach einer mindestens 10minütigen Ruhephase. Die Herzfrequenz und der Blutdruck, als Parameter einer sympathoadrenergen Stimulation, unterschieden sich nicht signifikant vor den jeweiligen Untersuchungen. Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Altersunterschiede. Als Einschränkung der Untersuchung ist die unterschiedliche Geschlechterverteilung zu nennen. Diese beruht darauf, dass das Vorliegen einer Herz-Kreislaufkrankung bei Männern häufiger zu beobachten ist. So wurden im Jahr 2007 1383366 Männer und 1244560 Frauen aufgrund von Herz-Kreislaufkrankungen vollstationär behandelt. Dabei wurden 459459 Männer und 245143 Frauen aufgrund einer ischämischen Herzerkrankung behandelt (Statistisches Bundesamt, 2009). Zudem ist die fehlende Zyklusanamnese zu erwähnen. Bei einem mittleren Alter der weiblichen Probanden von 71 Jahren kann jedoch zumeist ein postmenopausaler Hormonstatus angenommen werden.

Neben den biologischen Einflussfaktoren der FMD kommen folgende Faktoren als mögliche Quellen methodischer Variabilität in Betracht:

- (1.) die Größe des ischämischen Gebietes,
- (2.) die Ischämiezeit,
- (3.) der Zeitpunkt der Messung nach Beendigung der Ischämie,
- (4.) der Zeitpunkt der Messung innerhalb des Herzzyklus,
- (5.) die technische Ausrüstung,
- (6.) der Untersucher,
- (7.) die Auswertung.

(1.) In vergleichenden Untersuchungen bezüglich der Position der Blutdruckmanschette und somit der Größe des ischämischen Bereichs, zeigte sich in manchen Untersuchungen bei Oberarmokklusion eine größere FMD (Berry et al., 2000; Vogel et al., 2000). In einer anderen Untersuchung war die FMD bei Unterarmokklusion größer (Coretti et al., 1995). Es herrscht kein Konsens darüber, welche Methode besser und zu bevorzugen ist (Berry et al., 2000; Coretti et al., 2002). In der vorliegenden Studie wurde die Blutdruckmanschette proximal der Ellenbeuge angelegt.

(2.) Die Höhe der FMD hängt von der Dauer der Ischämie ab. Erst eine 4,5minütige Ischämie führt zu einer maximalen Dilatation, die auch durch längere Ischämiezeiten nicht signifikant gesteigert werden kann (Coretti et al., 2002). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die noch gut tolerierbare Dauer von 5 Minuten gewählt.

(3.) Über den Zeitpunkt der Messung nach Ischämie herrscht kein Konsensus. Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Zeitpunkt an dem die maximale Dilatation erreicht wird, sowohl bei Kindern, als auch bei Erwachsenen individuell erheblich voneinander abweichen kann (Bressler et al., 2000). Da in der vorliegenden Studie die Messungen nur nach 60s und nach 120s nach Deflation und nicht kontinuierlich durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen, dass in einigen Fällen die gemessene FMD den wahren maximalen Wert unterschätzt.

(4.) Da der Diameter der A. brachialis entsprechend dem Herzzyklus pulsatilen Veränderungen unterworfen ist, wurden alle Messungen EKG getriggert enddiastolisch durchgeführt.

(5.) Als technische Voraussetzung für nicht-invasive Untersuchungen der Endothelfunktion galten zum Zeitpunkt der Untersuchungen lineare Schallköpfe mit Ultraschallfrequenzen von mindestens 7,5MHz mit einer axialen Auflösung von 0,1mm als gegenwärtiger Standard (Celermajer et al., 1998).

(6.) Nur ein gut geschulter Untersucher ist in der Lage, Diameteränderungen von 0,1mm zu erkennen und damit die technischen Voraussetzungen auszuschöpfen (Balletshofer et al., 2001).

(7.) Auch hängt die Bestimmung von peripheren Gefäßdiametern weiterhin von der Art der Bilddatenanalyse ab. Entsprechend den meisten vorliegenden Protokollen, wurden die Diametermessungen von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie, welche dem anatomischen Adventitia-Media-Übergang entspricht, durchgeführt (Bressler et al., 2000; Celermajer et al., 1998; Coretti et al., 2002; Sorensen et al., 1995). Zudem wurde der Arterien Durchmesser zusätzlich durch eine speziell dafür entwickelte Software am PC analysiert.

4.1.2. Bestimmung der Anzahl endothelialer Progenitorzellen mittels FACS-Analyse

Wie bei der FMD-Messung, gibt es auch bei der FACS-Analyse eine Vielzahl an biologischen Faktoren, die die Messergebnisse beeinflussen können. So können zum Teil schwer erfassbare Einflüsse die Monozyten aktivieren und damit die Produktion von Zytokinen beeinflussen. Zu diesen Faktoren gehören zum Teil physiologische Einflussgrößen, wie vorausgegangene Stressreaktionen, Übermüdung und die Ernährung. Aber auch Alkoholkonsum und das Vorliegen von manifesten Erkrankungen spielt eine Rolle. Da es sich bei dem gewählten Patientenkollektiv um Patienten mit einer bestehenden chronischen Grunderkrankung handelte, kann ein gewisser, schwer messbarer Effekt durch die Krankheit auf das Immunsystem und damit verbunden auf die Anzahl an mononukleären Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Neben diesen biologischen Einflussgrößen gibt es auch noch eine Reihe an methodischen Faktoren, die die Ergebnisse der FACS-Analyse beeinflussen können. Dazu gehört zum einen die Aufbewahrung der gewonnenen Vollblutproben. Um Lagerungsartefakte zu vermeiden wurden die Proben unmittelbar nach der Abnahme im Kühlschrank dunkel gelagert und innerhalb von einer Stunde verwendet. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es während dieser Zeit zu Apoptosen unter den Zellen gekommen ist. Zudem lässt sich ein Kontakt der Zellen mit Fremdmaterialien, hier Monovetten, im Rahmen der Probengewinnung und Aufbewahrung nicht vermeiden. Dieses kann zu einer Kontaktaktivierung von Leukozyten führen. Durch eine Adhärenz an Oberflächen können Monozyten für Analysen verloren gehen. Auch eine mögliche Kontamination der Proben mit Erregern kann eine Aktivierung der untersuchten Zellen, und damit Einfluss auf die Produktion der gemessenen Zytokine zur Folge haben. Um dies zu verhindern, wurde stets unter aseptischen Verhältnissen gearbeitet.

4.2. Kritische Betrachtung der Studienergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde in der Verum-Gruppe eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion im Mittel um 7,52% erreicht. Bei der Placebo-Gruppe verbesserte sich die FMD lediglich um 0,26%. Die FMD verbesserte sich bei jedem einzelnen der Patienten der Verum-Gruppe im Laufe der Therapie. Um zu differenzieren, dass es sich bei der Verbesserung der FMD tatsächlich um eine Leistung des Endothels handelt, wurde parallel zu der erhobenen FMD die NMD ermittelt. Dabei stellt die NMD die endothelunabhängige Vasodilatation der A. brachialis dar und gilt als Maß für das Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf exogen appliziertes Glyceroltrinitrat. In der vorliegenden Studie konnte kein signifikanter Unterschied der NMD vor und nach der Therapie gezeigt werden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass sich isoliert die Endothelfunktion verbesserte.

Zudem zeigte sich in der vorliegenden Studie ein signifikanter Unterschied der Anzahl der frei zirkulierenden EPC vor und nach der Therapie mit Darbepoetin alfa. Die Anzahl an CD34+/CD133+ Zellen stieg während der Therapie signifikant an. Dieses Ergebnis

wird von anderen Studien untermauert, die bereits zeigen konnten, dass EPO ein potenter Stimulus ist, um EPC aus dem Knochenmark zu mobilisieren (Heeschen et al., 2003).

Des Weiteren wurde in anderen Studien, in denen Patienten mit einer renal bedingten Anämie bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz rHuEPO erhielten, gesehen, dass sich die Pumpfunktion des Herzens bei den Patienten, die gleichzeitig unter einer Herzinsuffizienz litten, verbesserte (Raddino et al., 2008).

Nun stellt sich die Frage, wie es im Rahmen dieser Studie durch die dreimalige Applikation von Darbepoetin alfa zu dieser signifikanten Verbesserung der Endothelfunktion kam. Ein möglicher Mechanismus ist die vermehrte Mobilisation von EPC, die eine Neovaskularisierung und Reendothelialisierung von geschädigten Endothelbereichen bewirken (Miura et al., 2009; Steiner et al., 2005). Basierend auf der Hypothese, dass EPC am Erhalt bzw. der Regeneration des Endothels beteiligt sind, wurde in mehreren Studien geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Endothelfunktion und der Funktion der EPC besteht (Asahara et al., 1999; Masuda und Asahara, 2003; Werner et al., 2003). Die FMD zeigte neben inversen univariaten Korrelationen mit dem Alter, dem Gesamtcholesterin und der Plasmaglukose eine signifikante Korrelation mit der Migration und mit der Proliferation der EPC.

Durch zahlreiche Studien sind CD34+, CD133+ und CD34+/CD133+ Zellen als endotheliale Vorläuferzellen detektiert worden. Dabei konnte bereits 1990 von Fina et al. gezeigt werden, dass CD34+ auf der Oberfläche von vaskulären Endothelzellen exprimiert werden (Fina et al., 1990). Miraglia et al. fanden 1997 heraus, dass CD133+ Antigene ebenfalls auf der Oberfläche von vaskulären Endothelzellen exprimiert werden (Miraglia et al., 1997). Die vermehrte Anzahl an zirkulierenden EPC im peripheren Blut führt zu einer Stimulation der Vaskulogenese und Angiogenese in den geschädigten Gefäßen und somit zu einer verbesserten Neovaskularisierung. Zugleich wurde in mehreren Studien beschrieben, dass EPO zu einer Induktion der endothelialen NO-Synthase führt (Santhanam et al., 2008). Beide Mechanismen, eine verbesserte Endothelialisierung und eine bessere endotheliale Funktion, sind als relevante Mechanismen für die gefundene Verbesserung der FMD anzusehen. Auch Hill et al. fiel 2003 eine Assoziation zwischen der Anzahl der frei zirkulierenden EPC und der Endothelfunktion auf. In dieser Studie zeigte sich eine signifikante

Korrelation zwischen der Anzahl der zirkulierenden EPC und der FMD in der A. brachialis. Hill beschreibt, dass die Anzahl der frei zirkulierenden EPC ein Marker für die tatsächliche Endothelfunktion darstellt (Hill et al., 2003).

Andere Studien konnten auch eine Korrelation zwischen der Anzahl der frei zirkulierenden EPC und der Endothelfunktion bestätigen. So konnte Steiner et al. zeigen, dass es bei kardiovaskulären Risikopatienten und bei Patienten mit einer manifesten koronaren Herzerkrankung durch regelmäßiges körperliches Training, zu einer signifikanten Verbesserung der Endothelfunktion, gemessen mittels FMD-Methode kommt. Auch bei dieser Studie konnte außer der signifikanten Verbesserung der Endothelfunktion auch gleichzeitig noch ein signifikanter Unterschied der Anzahl an frei zirkulierender EPC vor und nach dem körperlichen Training nachgewiesen werden (Steiner et al., 2005).

Anhand dieser Studien, die zum einen die Funktionen und Aufgaben der EPC erforscht haben und zum anderen anhand der Studien, die eine eindeutige Korrelation zwischen der Endothelfunktion und der Anzahl der frei zirkulierender EPC untersucht haben, liegt es nahe, dass es sich auch in der vorliegenden Studie um denselben Mechanismus handelt. So kam es durch die Applikation von Darbepoetin alfa zu einer vermehrten Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark und somit zu einer signifikanten Erhöhung der freien EPC, die wiederum zu einer Reendothelialisierung der arteriosklerotisch veränderten Gefäße führten. Zudem sorgen die immigrierten EPC für eine Stimulation der Vaskulogenese und Angiogenese in den geschädigten Gefäßarealen.

Ein anderer möglicher Mechanismus, der zu einer Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation der A. brachialis führen könnte, wäre über ein steigendes Sauerstoffangebot zu erklären. Bei Darbepoetin alfa handelt es sich um ein Medikament, das auf die Erythropoese wirkt. Es kommt zu einer Steigerung an erythroiden Vorläuferzellen, wie z.B. Retikulozyten, und zu einer Zunahme der Anzahl an Erythrozyten. Dieser Aspekt hat zur Folge, dass der Hämoglobin Wert ebenfalls steigt, was bedeutet, dass gleichzeitig mehr Sauerstoffträger vorliegen. Deshalb wurde bei der vorliegenden Studie der Hb-Wert und die Zahl der Retikulozyten im peripheren Blut vor und nach der Therapie mit Darbepoetin alfa verglichen. Dabei fiel auf, dass es

zwar, wie es zu erwarten war, zu einer Steigerung sowohl vom Hb-Wert, als auch der Retikulozyten Zahl kam, diese Änderung jedoch nicht signifikant war. Vor der Therapie mit Darbepoetin alfa betrug der Hb-Wert in der Verum-Gruppe im Mittel $13,16 \pm 0,66$ g/dl. Nach der Therapie betrug der Hb-Wert in der Verum-Gruppe im Mittel $13,74 \pm 0,86$ g/dl. Dieses macht eine prozentuale Änderung des Hb-Wertes während der dreiwöchigen Therapie mit Darbepoetin alfa um im Mittel $4,43 \pm 0,44\%$ (vs. $1,42 \pm 0,43\%$ für die Placebo-Gruppe). Der p-Wert für die Änderung des Hb-Wertes beträgt 0,139. Aufgrund des geringen Anstieges vom Hb-Wert ist dieser Mechanismus als Erklärung für die signifikante Änderung der FMD unwahrscheinlich.

Ein weiterer Mechanismus, der die Verbesserung der Endothelfunktion erklären könnte, wäre eine Zunahme des Blutvolumens beim Probanden. Wie bereits oben erwähnt, wirkt Darbepoetin alfa auf die Erythropoese und erhöht die Anzahl an erythroider Vorläuferzellen. Der Hb-Wert steigt. Neben dem Hb-Wert steigt auch der Hämatokrit-Wert an. Bei den durchgeführten Ultraschallmessungen wurde nach fünf Minuten die am proximalen Oberarm angebrachte Staumanschette gelöst. Durch die Deflation kommt es zu einem vermehrten Bluteinstrom in die postischämisch vasodilatierten Armgefäße. Die erhöhte lokale mechanische Krafteinwirkung auf die Gefäßinnenwand in der zuführenden Oberarmarterie führt zu einer scherkraftinduzierten NO-Freisetzung aus den Endothelzellen proximal des ischämischen Gebietes, was konsekutiv zu einer lokalen Vasodilatation führt, die dopplersonografisch dokumentiert wurde (Corson et al., 1996; Dimmeler et al., 1999). Wenn bei der Abschlussuntersuchung ein im Vergleich zu der Eingangsuntersuchung erhöhtes Blutvolumen vorgelegen hat, dann wäre der postischämische Bluteinstrom nach der Deflation der Oberarmmanschette ebenfalls erhöht gewesen. Dieses könnte wiederum zu einer verstärkten lokalen mechanischen Krafteinwirkung geführt haben, was die scherkraftinduzierte NO-Freisetzung aus den proximal des ischämischen Gebietes gelegenen Endothelzellen gesteigert haben könnte.

Dieser Mechanismus wäre eine mögliche Erklärung dafür, warum sich die FMD im Rahmen dieser Studie signifikant verbessert hat. Eine genaue Bestimmung des Blutvolumens ist nichtinvasiv methodisch nicht möglich. Somit bleibt offen, ob es sich bei dem genannten Mechanismus um einen relevanten Erklärungsansatz handelt.

4.3. Kritische Betrachtung von Darbepoetin alfa

EPO ist ein essentieller Wachstums- und Überlebensfaktor für späte erythroide Vorläuferzellen (Eckardt, 1994; Krantz, 1991). Die Bindung von EPO an spezifische Oberflächenrezeptoren dieser Zellen ermöglicht ihre Ausdifferenzierung zu Retikulozyten und Erythrozyten, indem ein frühzeitiger, vorprogrammierter Zelltod (Apoptose) verhindert wird (Fisher, 2003). Darbepoetin alfa weist denselben Wirkmechanismus auf wie EPO. Die Wirkung von Darbepoetin erfolgt über den gleichen Rezeptor wie beim EPO. So wirken beide Moleküle auf die Hämatopoese und bewirken über diesen Mechanismus einen Anstieg der Anzahl an Retikulozyten und Erythrozyten. Dieser Effekt wiederum führt zu einem Anstieg des Hb-Wertes. Ein steigender Hb- und ein steigender Hämatokrit-Wert können thrombembolische Komplikationen mit sich führen. So ist zu beachten, dass der Hb-Wert bei Patienten, die mit rHuEPO behandelt werden, einen kritischen Wert nicht überschreiten darf. In der vorliegenden Studie wurde als Grenzwert für den Hb-Wert 15g/dl gewählt.

Neben den oben beschriebenen thrombembolischen Ereignissen, konnte Strippoli et al. zeigen, dass es bei dem Patientenkollektiv mit einem Hb-Wert >13,3g/dl im Gegensatz zu denen in der Gruppe mit einem Hb-Wert <12g/dl häufiger zu hypertensiven Episoden kam (Strippoli et al., 2006).

Metaanalysen, die die Jahre 1985 bis 2005 bei Patienten mit einer malignen Grunderkrankung untersuchten, kamen zu dem Resultat, dass die Therapie mit EPO oder rHuEPO bei diesem Patientengut ein gesteigertes Risiko an thrombembolischen Ereignissen mit sich führte (Bohlius et al., 2006). Eine andere neue Studie, die retrospektiv Patientendaten auswertete, kam andererseits zu dem Ergebnis, dass es bei Patienten mit malignen Erkrankungen und gleichzeitiger Therapie mit rHuEPO zu keinem signifikanten Unterschied beim Auftreten von thrombembolischen Ereignissen in Korrelation mit dem Hb-Wert kommt (Fullmer und Miller, 2009). Anhand dieser Studien wird deutlich, dass es aktuell keinen eindeutigen Konsensus darüber gibt, inwiefern rHuEPO zu thrombembolischen Ereignissen führt und bei welchem Patientenkollektiv eine Applikation von Darbepoetin alfa kontraindiziert ist. In der vorliegenden Studie wurden Patienten mit einem Hb-Wert <15g/dl eingeschlossen. Dieser Hb-Wert, auch wenn er im Vergleich zu vorangegangenen Studien hoch

erscheint, war gut vertretbar, da es sich bei dem gewählten Patientenkollektiv um Patienten mit KHK handelte, die alle eine stabile medikamentöse Therapie der KHK erhielten. Diese Therapie beinhaltet laut Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung auch die Applikation des Thrombozytenaggregationshemmers Aspirin, was das Auftreten von thrombembolischen Ereignissen durch fehlende Thrombozytenaggregation deutlich reduziert. Lediglich ein Patient der Placebo-Gruppe nahm keinen Thrombozytenaggregationshemmer ein.

Eine weitere, zurzeit lebhaft geführte wissenschaftliche Diskussion um EPO ist ein möglicher Zusammenhang zwischen EPO und der Beeinflussung maligner Erkrankungen. Während Egrie und Browne 2001 noch davon ausgingen, dass rHuEPO weder gewebefremde noch unspezifische Wirkungen aufweist, mehren sich heute Studien, die EPO für den Progress maligner Erkrankungen mitverantwortlich machen. So sagt Sytkowski aus, dass EPO auf das hämatopoetischen Systems wirkt, indem es die Apoptose von hämatopoetischen Vorläuferzellen hemmt und somit zu einer Zellproliferation und Zelldifferenzierung führt. Dabei stellt er sich die Frage, ob sich die EPO Rezeptoren wirklich nur auf den hämatopoetischen Zellen befinden oder ob die Rezeptoren ebenfalls von nicht hämatopoetischen Zellen, wie u.a. von Karzinomzellen, expremiert werden (Sytkowski, 2007).

Eine abschließende Bewertung, ob EPO für den Progress maligner Erkrankungen mitverantwortlich ist, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Basierend auf den Warnungen der „U.S. Food and Drug Administration“ (FDA) vom März 2008 waren Patienten mit einer Tumoranamnese von der vorliegenden Studie ausgeschlossen (U.S. Food and Drug Administration, 2008).

4.4. Klinische Bedeutung und Ausblick

Laut den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung besteht die derzeitige Therapie der KHK aus drei Säulen. Die erste Säule stellt den Komplex aus Risikofaktoren-Management und Prävention, wie Gewichtsreduktion, regelmäßiges körperliches Training und einer zielgerichteten Ernährungsumstellung, dar. Die zweite Säule wird von der medikamentösen Therapie gebildet. Dort stehen derzeit folgende Präparate mit einer gesicherten Wirksamkeit zur Verfügung: Thrombozytenaggregationshemmer, Betarezeptorblocker, Nitrate und andere NO-Donatoren, Calciumkanalblocker, ACE-Hemmer, AT1-Rezeptorantagonisten und cholesterinsenkende Mittel wie z.B. Statine. Die dritte Säule wird von den interventionellen Therapieoptionen gebildet (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufforschung e.V., 2003). Von den genannten medikamentösen Therapieoptionen konnte von Korkmaz und Onalan eine Verbesserung der FMD durch die Therapie mit ACE-Hemmern, AT1-Antagonisten, die späten Generationen von β -Blockern wie Nebivolol und Carvediol und für die Statine nachgewiesen werden (Korkmaz und Onalan, 2008). Bei den Patienten der vorliegenden Studie nahmen bei der Verum-Gruppe acht Patienten einen β -Blocker, neun Patienten einen ACE-Hemmer oder einen AT1-Antagonisten und alle zehn Patienten ein Statin ein. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass rHuEPO noch einen zusätzlichen additiven Effekt auf die Endothelfunktion hat. Trotz der Einnahme von Medikamenten, die nachweislich die FMD erhöhen, verbesserte sich die FMD in dieser Studie bei jedem einzelnen Patienten der Verum-Gruppe unter der zusätzlichen Applikation von Darbepoetin alfa. Dieses würde bedeuten, dass es durch eine Substanz, die seit Jahren für andere Indikationen auf dem deutschen Markt zugelassen und erprobt ist, zu einer zusätzlichen Verbesserung der Endothelfunktion bei Patienten mit einer KHK kommt und somit eine ergänzende Therapieoption darstellen könnte. Ob die Applikation von rHuEPO bei KHK Patienten eine kausale Therapieoption ist, und ob es zu einer Beeinflussung der Mortalität kommt, muss anhand weiterer Studien herausgefunden werden.

5. Zusammenfassung

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine progressive, systemische Erkrankung, die durch ein Dysbalance zwischen Endothel-Untergang und Endothel-Reparatur charakterisiert ist. Bereits durchgeführte tierexperimentelle Studien belegen eine potentielle vaskuloprotektive Rolle von Erythropoeitin (EPO) über die Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark. Bislang wurde dieses Therapieprinzip im Menschen nicht untersucht. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wirkung der Applikation von EPO auf die endotheliale Funktion und die EPC Mobilisierung in Probanden mit bekannter koronarer Herzerkrankung und stabiler Begleitmedikation zu untersuchen. Das Studiendesign entsprach einer monozentrischen, prospektiven, einfachverblindeten, Placebo kontrollierten Studie mit jeweils zehn Patienten pro Gruppe. Die Endothelfunktion wurde mittels flussvermittelten Vasodilatation (FMD) der A. brachialis, einem nicht-invasivem Ultraschallverfahren, quantifiziert. Die Bestimmung der Anzahl der EPC erfolgte mittels FACS Analyse. Die Applikation des Placebos (isotone Kochsalzlösung) oder des rekombinanten EPO-Analogons Darbepoetin alfa (60µg/Spritze) wurde in wöchentlichen Abständen über insgesamt drei Wochen durchgeführt.

Bei den Patienten, die mit Darbepoetin alfa behandelt wurden, konnte bei jedem Probanden eine Verbesserung der Endothelfunktion nach der Therapie nachgewiesen werden. Die FMD nahm bei diesem Kollektiv signifikant ($p=0,0236$) um $7,52\pm 1,64\%$ zu. Zudem war eine signifikante Zunahme ($p=0,015$) der Anzahl von EPC im peripheren Blut um $50\pm 24,20\%$ zu verzeichnen. Bei den Patienten der Placebo-Gruppe lagen keine wesentlichen Änderungen der FMD ($0,26\pm 2,44\%$) oder der EPC Anzahl ($14,13\pm 17,20\%$) vor.

Zusammenfassend bewirkt Darbepoetin alfa zusätzlich zu einer auf den aktuellen Leitlinien basierenden medikamentösen Therapie eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung und deutet somit auf eine vielversprechende atheroprotektive Behandlungsoption hin.

6. Anhang

6.1. Probandeninformation

Patienteninformation

Patienten-Name: Geburtsdatum: Patienten-Nr: Prüfarzt:
--

Effekt von Darbepoetin auf die Endothelfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Einleitung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bei Ihnen besteht eine Herzkranzgefäßverengung, eine sogenannte koronare Herzerkrankung. Hierbei handelt es sich um eine gefährliche Erkrankung, die zu Herzinfarkt, Herzschwäche und Tod führen kann. Daher sind möglichst gute medikamentöse Behandlungsmöglichkeiten notwendig.

Anhand der von Ihnen vorliegenden medizinischen Daten sind Sie für die oben genannte Studie als Studienpatient geeignet. Diese Patienteninformation soll es Ihnen ermöglichen, den Sinn der klinischen Studie zu verstehen und Sie über mögliche Nebenwirkungen und zusätzliche Untersuchungen aufklären. Bitte lesen Sie den folgenden Text aufmerksam durch und besprechen ihn gegebenenfalls auch mit Verwandten, Freunden oder Ihrem Hausarzt. Zögern Sie nicht, uns bei Unklarheiten zu fragen und lassen Sie sich für Ihre Entscheidung Zeit.

Ihre Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können sie ohne Angabe von Gründen ablehnen oder zu jedem Zeitpunkt Ihre Einwilligung zurückziehen, ohne dass Ihnen

dadurch Nachteile in der medizinischen Behandlung entstehen.

Zweck der Studie

Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass Zellen aus dem Knochenmark an der Heilung der erkrankten Herzkranzgefäße beteiligt sein könnten. Diese Stammzellen, die in Ihrem Blut vorhanden sind, werden endotheliale Progenitorzellen genannt. Eine Vermehrung dieser endothelialen Progenitorzellen führt möglicherweise zu einer Verbesserung der Herzkranzgefäßerkrankung, nicht nur zur Verhinderung eines weiteren Fortschreitens der Erkrankung.

Das Medikament Darbepoetin steigert die Zahl dieser endothelialen Progenitorzellen. Daher dürfen wir annehmen, dass die Gabe dieses Medikamentes zu einer Verbesserung und möglicherweise Heilung Ihrer Blutgefäße beitragen kann. Sie tragen durch Ihre Teilnahme an der Studie dazu bei, das Wissen über Ihre Erkrankung zu vertiefen und dadurch zukünftige Behandlungen zu verbessern. Darbepoetin wird seit vielen Jahren an zahlreichen Patienten mit Blutarmut eingesetzt. Es handelt sich daher um ein gut bekanntes Medikament, das nur wenige ernsthafte Nebenwirkungen aufweist.

Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Bonn sowie das Bundesinstitut für Arzneimittelsicherheit und Medizinprodukte haben der Durchführung dieser Studie zugestimmt. Die Untersuchung wurde unter dem Titel „Monozentrische, prospektive, einfachverblindete, Placebo-kontrollierte Studie zur Evaluierung des Effektes von Darbepoetin auf die Endothelfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung“ und der Eudra-CT-Nr 2006-005720-17 in der europäischen Datenbank „European Clinical Trials Database“ angemeldet.

Ablauf der Studie

Diese klinische Studie mit etwa 30 Patienten wird nur in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Sie findet weder im Auftrag noch unter finanzieller oder materieller Unterstützung einer Pharmafirma statt.

Im Rahmen dieser Untersuchung messen wir, ob die Gabe von Darbepoetin die sogenannte endotheliale Funktion verbessern kann. Die gesamte Behandlungs- und Beobachtungszeit beträgt pro Patient nur drei Wochen und es ist kein zusätzlicher stationärer Krankenhausaufenthalt notwendig. Dabei wird Ihnen zu Anfang und am Ende der Studie jeweils etwa 20ml Blut entnommen sowie vor Gabe jeder Injektionen Ihr Blutbild bestimmt, hierfür benötigen wir lediglich 3ml. Im gesamten Verlauf der Untersuchung wird Ihnen also viermal Blut abgenommen. Zudem erfolgt eine ausführliche Anamnese, um Begleiterkrankungen auszuschließen, die eine Gabe von Darbepoetin verbieten. Es werden zu Anfang und Ende der Studie Ultraschalluntersuchungen im Bereich der Unterarmschlagader durchgeführt, dabei wird jeweils eine Blutdruckmanschette für fünf Minuten aufgepumpt, um den Blutfluss zu unterbrechen. Hierdurch sind keinerlei Nebenwirkungen zu erwarten. Zudem wird in niedriger Dosierung sogenanntes Nitrospray verabreicht. Jeder Patient wird nach einer Zufallsauswahl entweder mit dem Medikament Darbepoetin behandelt oder bekommt in gleicher Menge isotonische Kochsalzlösung als Placebo. Die Behandlung erfolgt also entweder mit 60 µg Aranesp (Darbepoetin) subkutan pro Woche oder 0,3ml isotonischer Kochsalzlösung subkutan pro Woche. Diese sogenannte Randomisation und Placebokontrolle ist notwendig, um auftretende Wirkungen unter Darbepoetin vom sogenannten Placeboeffekt abgrenzen zu können. Das bedeutet auch, dass Sie als Patient erst nach der Abschlussmessung erfahren, ob sie Darbepoetin oder Kochsalzlösung erhalten haben.

Die Gabe wird einmal pro Woche über 3 Wochen durchgeführt und erfolgt in das subkutane Fettgewebe des Bauches. Die Messungen von Tag 1 (Blutentnahme und Ultraschall) werden nach 3 Wochen wiederholt. Anschließend ist die Behandlung beendet.

Zusammenfassend werden folgende Untersuchungen durchgeführt:

An Tag 1 der Studie wird Ihnen Blut entnommen und eine Ultraschalluntersuchung der Unterarmschlagader durchgeführt sowie das Medikament oder Kochsalzlösung unter die Haut in die Bauchdecke gespritzt.

An Tag 8 und Tag 15 wird Ihr Blutbild bestimmt und das Medikament oder Kochsalzlösung unter die Haut in die Bauchdecke gespritzt.

An Tag 22 erfolgt eine erneute Blutentnahme und Ultraschalluntersuchung der Unterarmschlagader.

Sollte Ihr Hämoglobingehalt im Blut in den Kontrollen als Folge des Medikamentes zu stark ansteigen, erhalten sie keine weitere Injektion, da andernfalls das Thromboserisiko steigt. Die Abschlussmessung wird unverändert durchgeführt.

Aufklärung des Studienteilnehmers

Es muss darauf hingewiesen werden, dass Darbepoetin bei Patienten mit Blutarmut und Niereninsuffizienz eingesetzt wird. Eine Zulassung für die hier geplante Anwendung besteht für dieses Medikament gegenwärtig noch nicht. Nach Abschluss der Behandlung und Auswertung aller Daten können wir sagen, ob die sogenannten endothelialen Progenitorzellen durch Darbepoetin in Ihrem Blut vermehrt wurden und zu einer Verbesserung der vaskulären Funktion geführt haben.

Änderungen in Ihrer Ernährung in dieser Zeit oder Verzicht auf Nikotin und Alkohol ist nicht notwendig. Ebenso bestehen keine Einschränkungen bei der Teilnahme am Strassenverkehr. Neu auftretende Beschwerden sollten Sie umgehend den Sie betreuenden Prüfvärzten mitteilen, auch um den Versicherungsschutz nicht zu verlieren, siehe Abschnitt „Aufklärung über Versicherungsschutz“. Bei schweren Nebenwirkungen wird die Studie umgehend abgebrochen. Für die Zeit dieser Studie dürfen Sie an keiner anderen Studie teilnehmen.

Eine Kopie dieser Patientenaufklärung wird Ihnen mitgegeben, der Hausarzt wird zusätzlich über die Teilnahme an der Studie informiert, sofern sie dem zustimmen. Ihnen wird zudem ein Studienausweis mit Information zur Studienmedikation und Kontaktdaten der Prüfvärzte mitgereicht.

Mögliche Risiken

Darbepoetin wird bereits seit einigen Jahren bei Patienten mit Niereninsuffizienz oder Tumorerkrankungen als Dauertherapie angewandt und in der Regel gut toleriert. Die genannten Nebenwirkungen treten grossteils bei langfristiger Behandlung auf, im Rahmen dieser Studie erfolgt nur eine kurzzeitige Therapie.

- Schmerzen an der Einstichstelle (bis 5% der Patienten)

- Kopfschmerzen (bis 10% der Patienten)
- Gelenk- und Muskelschmerzen (bis 10% bei Patienten mit bösartigen Tumoren)
- Thromboembolische Ereignisse wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Lungenembolie oder Verschluss anderer Gefäße (unter 10%, dabei vor allem Patienten mit Hämodialyse und hier insbesondere die Dialysesessungen betreffend)
- Erhöhung des Blutdruckes (etwa 10%)
- selten allergische Reaktionen
- selten Übelkeit und Erbrechen

Im Rahmen der venösen Blutentnahme kann es auch bei korrekter Durchführung zu Hämatomen sowie einer lokalen Infektion durch eindringende Hautkeime kommen. Zudem kann in sehr seltenen Fällen ein Hautnerv verletzt werden, was eventuell zu bleibenden Missempfindungen führen kann.

Aufklärung über Versicherungsschutz

Für den Fall, dass Sie als Folge dieser Studie eine Gesundheitsschädigung davontragen, wurde beim

Gerling-Konzern, Allgemeine Versicherungs-AG,
GIS / Liability, Gereonshof 8, 50597 Köln

eine Patientenversicherung mit der Deckungssumme von 500.000,00 € abgeschlossen. Um den Versicherungsschutz nicht zu verlieren, sollten Sie sich einer anderen medizinischen Behandlung nur nach Rücksprache mit den für diese Studie verantwortlichen Ärzten unterziehen. Notfälle sind hiervon natürlich ausgenommen.

Da eine Gesundheitsschädigung, die als Folge dieser klinischen Studie eingetreten sein könnte, der Versicherung unverzüglich anzuzeigen ist, müssen Sie in einem solchen Fall Ihren behandelnden Arzt und die Versicherung sofort informieren und alles Zweckmäßige tun, um die Ursachen festzustellen bzw. den eingetretenen Schaden zu mindern.

Bei Fragen zu Ihrer Versicherung wenden Sie sich bitte unter Nennung der Versicherungsnummer an:

Ecclesia Versicherungsdienst GmbH
Klingenbergstrasse 4, 32758 Detmold
Telefon 05231 / 603- 0
Fax. 05231 / 603-197
Versicherungsschein-Nr 70 – 5633571 – 5

Kontaktmöglichkeiten:

Sie haben die Möglichkeit, jederzeit weitere Fragen zu stellen. Ansprechpartner in der Klinik sind Herr Dr. med. Cornelius Müller und Frau Dr. med. Aylin Yürüktümen, Telefon 0228-287-15507 sowie Prof. Dr. med. Georg Nickenig, Telefon 0228-287-15217. Im Notfall, nachts und am Wochenende wenden Sie sich bitte an die nächste Notaufnahme bzw. die Notaufnahme des Studienkrankenhauses und halten diese Patienteninformation bereit.

Die Anschrift der Kontaktstelle des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte für die von einer klinischen Prüfung betroffene Person, ihren gesetzlichen Vertreter oder einen von ihr Bevollmächtigten gemäß §40 Abs. 5 AMG lautet wie folgt:

Bundesinstitut für Arzneimittel- und Medizinprodukte
Fachgebiet Klinische Prüfung/ Inspektionen
Kurt- Georg- Kiesinger- Allee 3
53175 Bonn
Telefon: 0228/ 207- 4318
Fax: 0228/ 207- 4355
E- Mail: klinpruefung@bfarm.de

Bei schriftlichen Anfragen per Brief wird um den Betreff "Klinische Prüfungen/Inspektionen" gebeten.

Einwilligungserklärung zur klinischen Prüfung

Wenn Sie bereit sind, dass diese Untersuchungen bei Ihnen durchgeführt werden, bitten wir Sie, die folgende Einwilligungserklärung zu unterschreiben. Selbstverständlich können Sie Ihre Einwilligung zu jedem Zeitpunkt ohne Angaben von Gründen widerrufen, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile entstehen. Mit Ihrem Einverständnis werden wir auch Ihren Hausarzt von der Teilnahme an dieser Studie unterrichten, so dass auch ihm alle notwendigen Informationen zur Verfügung stehen. Zusätzlich reichen wir Ihnen einen Studienaussweis mit, der die wichtigsten Punkte der Studie sowie unsere Kontaktdaten enthält.

Sonstige Fragen, die mit dem Versuchsteilnehmer besprochen wurden:

- _____
- _____
- _____
- _____
- _____

Über die o.g. Untersuchung bin ich ausreichend informiert worden und habe den Inhalt und den Ablauf der Untersuchung verstanden. Mir wurde die Möglichkeit zu Rückfragen gegeben, so dass zum jetzigen Zeitpunkt keine weiteren Fragen bestehen. Eine Kopie dieser Patienteninformation sowie ein Studienaussweis wurde mir ausgehändigt.

Ich bin mit der Teilnahme an der o.g. Untersuchung einverstanden und bin informiert worden, dass ich dieses Einverständnis jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus nachteilige Folgen entstehen

Bonn, den

.....

(Unterschrift des Patienten)

.....

Unterschrift des aufklärenden Arztes und Name des Arztes in Druckschrift

.....

Mir ist bekannt, dass bei dieser klinischen Prüfung personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der klinischen Prüfung folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, d.h. ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der klinischen Prüfung teilnehmen.

Einwilligungserklärung zum Datenschutz (Arzneimittelgesetz)

1) Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser klinischen Prüfung erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, in Papierform und auf elektronischen Datenträgern von den beteiligten Prüfarzten aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden:

a) an den Studienleiter oder eine von diesem beauftragte Stelle zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung.

b) im Falle eines Antrags auf Zulassung: an den Antragsteller und die für die Zulassung zuständige Behörde, dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte

c) im Falle unerwünschter Ereignisse: an den Studienleiter, an die jeweils zuständige Ethik-Kommission und die zuständige Bundesoberbehörde (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte), sowie von dieser an die Europäische Datenbank.

2) Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte des Studienleiters sowie die zuständigen inländischen und ausländischen Überwachungsbehörden in meine beim Prüfarzt vorhandenen personenbezogenen Daten, insbesondere meine Gesundheitsdaten, Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfarzt von der ärztlichen Schweigepflicht.

3) Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist unwiderruflich. Ich bin bereits darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der klinischen Prüfung beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden,

dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten ohne Namensnennung weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um

- a) Wirkungen des zu prüfenden Arzneimittels festzustellen,
- b) sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden,
- c) der Pflicht zur Vorlage vollständiger Zulassungsunterlagen zu genügen.

4) Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Prüfung mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden, wie es die Vorschriften über die klinische Prüfung von Arzneimitteln bestimmen. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

5) Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen, die meine personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten für die in Nr. 3 a) bis c) genannten Zwecke noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.

Bonn, den

.....

(Unterschrift des Patienten)

.....

Unterschrift des aufklärenden Arztes und Name des Arztes in Druckschrift

.....

6. 2. Information zur Prüfmediakation

Anw.: Zur Behandl. der symptomat. Anämie bei chron. Niereninsuff. bei erw. u. päd. Pat. Zur Behandl. d. symptomat. Anämie b. erw. Tumorpat. mit nichtmyeloischen malignen Erkrank. die eine Chemother. erhalten.

Gegenanz.: Schwer kontrollierbarer Bluthochdruck.

Anw.-beschränk.: Lebererkrank., Sichelzellanämie, Epilepsie. Vermind. Wirksamk. von Aranesp bei Mangel an Eisen, Vit. B₁₂ od. Folsäure: Korrektur erforderl. In ähnlicher Weise können schwere Aluminiumtoxizität, zwischenzeitl. auftretende Infekt., entzündl. od. traumat. Episoden, okkulten Blutverlust, Hämolyse, hämatolog. Grunderkrank. od. Knochenmarkfibrose das Ansprechen der Erythropoese beeinträcht.

Schwang.: Strenge Ind.-Stellung [Gr 5](#).

Stillz.: Kontraind. [La 1](#).

Nebenw.: Schwerwieg. allerg. Reakt. einschl. anaphylakt. Reakt., Angioödeme, Dyspnoe, Hautröt. u. Urtikaria mögl. Krampfanfälle mögl. Pat. m. chron. Niereninsuff.: Sehr häufig: Bluthochdruck. Häufig: Rash/Erytheme; Im Allg. leichte u. vorübergeh. Schm. an d. Einstichstelle bei s.c. Verabreich. (überwieg. nach der 1. Inj.), diese wurden im Vergleich zu r-HuEPO häufiger beobachtet. Gelegentl.: Thromboembol. Ereign. In Einzelf.: Erythroblastopenie. Tumorpat.: Sehr häufig: Ödeme. Häufig: Rash/Erytheme. Thromboembol. Ereign. einschl. pulmon. Embolien. Schm. an d. Einstichstelle.

Wechselw.: Potentiell: WW m. AM, die stark an Erythrozyten binden, z. B. Ciclosporin u. Tacrolimus (Blutspiegelkontr. u. Anpass. der Dos. dieser AM an steigenden Hämoglobinwert).

Tox.: Die therap. Breite von Aranesp ist sehr groß. Selbst bei sehr hohen Serumspiegeln wurden keine Symptome einer Überdos. beobachtet. Bei Polyglobulie: Aranesp vorübergehend absetzen. Falls klinisch indiziert, kann eine Phlebotomie durchgeführt werden.

Warnhinw.: Bei Nicht-Ansprechen sollte Bestimmung d. Retikulozytenzahl erfolgen. Bei Ausschluss typ. Ursachen eines Nicht-Ansprechens u. vorlieg. Retikulozytopenie sollte Untersuch. des Knochenmarks erfolgen. Falls sich Erythroblastopenie zeigt: Test auf antierythropoet. Antikörper. Pat., bei denen neutral. Antikörper gg. Erythropoetine

vermutet od. bestätigt wurden, sollten nicht auf Aranesp umgestellt werden. Bestimmung des Eisenstatus vor u. während der Behandl. Empfehl. einer zusätzl. Eisengabe bei allen Pat. m. Serumferritinwert $<100 \mu\text{g/l}$ bzw. Transferrinsätt. $<20\%$. Kontr. des Blutdrucks bei allen Pat., v. a. zu Beginn der Aranesp-Ther. Bei schwer kontrollierbarem Blutdruck trotz Einleiten entspr. Maßnahmen: Aranesp-Dosis reduz. od. Aranesp aussetzen. Bei Pat. m. chron. Nierenversagen u. klin. evidenter ischäm. Herzerkrank. od. dekompensierter Herzinsuff.: individuelle Bestimm. des Zielhämoglobinwerts. Bei Hämoglobinwert $>12\text{g/dl}$ Dosisredukt. in Betracht ziehen. Bei weiterem Anstieg, Redukt. um 25-50% bis Hämoglobinwert sinkt. Engmasch. Überwach. um sicherzustellen, dass die niedrigste zugelassene Dosis verwendet wird, um Sympt. der Anämie adäquat zu kontrollieren. Regelm. Überprüf. des Serum-Kalium-Spiegels. Bei Pat. mit soliden Tumoren od. malignen lymphoproliferativen Erkrank. darf der Hämoglobinwert 12g/dl nicht überschreiten, bei Überschreit. eines Hb-Wertes von 12g/dl muss eine Dosisanp. erfolgen. Aussetzen der Behandl. bei Hb-Werten $>13\text{g/dl}$. Die Thrombozytenzahl u. der Hb-Wert sollten regelm. bestimmt werden. Missbräuchl. Anw. bei Gesunden kann zu einem überm. Anstieg des Hämatokrits führen. Dies kann mit lebensbedrohl. Komplikat. des kardiovaskulären Systems verbunden sein. Nadelschutzkappe enth. Latexderiv., welches Allergien verursachen kann.

Hinw.: Weit. Info. s. Fachinfo.

Dos.: Fachinfo beachten. Päd. Pat. mit chron. Niereninsuff.: Behandl. in 2 Phasen: Korrektur- u. Erhaltungsphase: a) Korrekturphase: Bei päd. Pat. ≥ 11 J.: Körpergewichtsbezogene Dos. wie bei Erw. Eine Anleitung zur Hämoglobinkorrektur für päd. Pat. im Alter von 1-10 J. ist nicht verfügbar. b) Erhaltungsphase: Bei päd. Pat. ≥ 11 J.: Dos. so einstellen, dass Hämoglobinwert aufrechterhalten wird. Dos.-intervalle wie bei Erw. Bei päd. Pat. im Alter von 1-18 J.: Die wöchentl./zweiwöchentl. Anfangsdos. von Aranesp ($\mu\text{g/Wo.}$) kann durch Division der wöchentl. Gesamtdos. von r-HuEPO (I.E./Wo.) durch 240 bestimmt werden. Einstell. der optim. Dos. muss individ. erfolgen.

Lag.: Lagerungshinweis!

(Informationen aus Rote Liste online, 2009)

7. Literaturverzeichnis

1. Anderson TJ. Prognostic Significance of Brachial Flow-Mediated Vasodilation. *Circulation* 2007; 115: 2373-2375
2. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228
3. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; 18: 3964-3972
4. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 2004; 103: 921-926
5. Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, Mengel M, Wasielewski R von, Lindschau C, Kirsch T, Groot K de, Laudeley R, Niemczyk E, Güler F, Menne J, Haller H, Fliser D. Low-Dose Therapy With the Long-Acting Erythropoietin Analogue Darbepoetin Alpha Persistently Activates Endothelial Akt and Attenuates Progressive Organ Failure. *Circulation* 2004; 110: 1006-1012
6. Baldassarre D, Amato M, Bondioli A, Sirtori CR, Tremoli E. Carotid artery intima-media thickness measured by ultrasonography in normal clinical practice correlates well with atherosclerosis risk factors. *Stroke* 2000; 31: 2426-2430
7. Balletshofer BM, Goebbel S, Rittig K, Lehn-Stefan A, Renn W, Enderle M, Dietz K, Haring HU. Influence of experience on intra- and interindividual variability in assessing peripheral endothelial dysfunction with high resolution ultrasound. *Ultraschall Med* 2001; 22: 231-235

8. Balletshofer BM, Rittig K, Stock J, Häring HU. Indicators of incipient atherosclerosis: demonstration of endothelial dysfunction with high-resolution ultrasound. *Ultraschall Med* 2003; 24: 153-161
9. Bauters C. Pathophysiology of coronary artery disease. *Rev Prat* 2008; 58: 1523-1526
10. Belonje AM, Voors AA, van Gilst WH, Anker SD, Slart RH, Tio RA, Zijlstra F, van Veldhuisen DJ; HEBE III investigators. Effects of erythropoietin after an acute myocardial infarction: rationale and study design of a prospective, randomized, clinical trial (HEBE III). *Am Heart J* 2008; 155: 817-822
11. Bennet A, Di Angelantonio E, Erqou S, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Woodward M, Rumley A, Lowe GD, Danesh J, Gudnason V. Lipoprotein(a) levels and risk of future coronary heart disease: large-scale prospective data. *Arch Intern Med* 2008; 168: 598-608
12. Berry KL, Skyrme-Jones RA, Meredith IT. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. *Clin Sci (Lond)* 2000; 99: 261-267
13. Bohlius J, Wilson J, Seidenfeld J, Piper M, Schwarzer G, Sandercock J, Trelle S, Weingart O, Bayliss S, Djulbegovic B, Bennett CL, Langensiepen S, Hyde C, Engert A. Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 708-714
14. Bressler B, Chan S, Mancini GB. Temporal response of brachial artery dilation after occlusion and nitroglycerin. *Am J Cardiol* 2000; 85: 396-400
15. Busse R, Fleming I. The endothelial organ. *Current Opinion Cardiol* 1993; 8: 719-727

16. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111–1115
17. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 471-476
18. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1468-1474
19. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 325-333
20. Celermajer DS. Testing endothelial function using ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32: 29-32
21. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol* 1995; 37: 1397-1404
22. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. The Effects of Age and Gender on Brachial Artery Endothelium-Dependent Vasoactivity Are Stimulus-Dependent. *Clin Cardiol* 2000; 18: 471-476
23. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 257-265

24. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79: 984-991
25. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 2000; 83: 361-366
26. Davis PH, Dawson JD, Riley WA, Lauer RM. Carotid intimal-medial thickness is related to cardiovascular risk factors measured from childhood through middle age: The muscatine study. *Circulation* 2001; 104: 2815-2819
27. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V., 2003: Leitlinie zur Diagnose und Behandlung der chronischen koronaren Herzkrankung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung (DGK). http://leitlinien.dgk.org/images/pdf/leitlinien_volltext/2003_03_koronare_herzerkrankung.pdf (Zugriffsdatum 29.11.09)
28. de Wynter EA, Coutinho LH, Pei X, Marsh JC, Hows J, Luft T, Testa NG. Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem Cells* 1995; 13: 524-532
29. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601-605
30. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rütten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108: 391-397

31. Dhindsaa M, Sommerlada SM, DeVana AE, Barnes JN, Sugawara J, Leyb O, Tanaka H. Inter-relationships Among Noninvasive Measures of Postischemic Macro- and Micro- Vascular Reactivity. *J Appl Physiol* 2008; 105:398-399
32. Eckardt KU. Erythropoietin: Oxygen-dependent control of erythropoiesis and its failure in renal disease. *Nephron* 1994; 67: 7-23
33. Egrie J, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 3-13
34. Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: A common mechanism of action. *Exp Hematol* 2008; 36: 1573-1584
35. Enderle MD, Schroeder S, Ossen R, Meisner C, Baumbach A, Haering HU, Karsch KR, Pfohl M. Comparison of peripheral endothelial dysfunction and intima media thickness in patients with suspected coronary artery disease. *Heart* 1998; 80: 349–354
36. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75: 2417-2426
37. Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, Bai A, Carlo E, Cuccovillo I, Doni M, Mengozzi M, Tonelli R, Ghezzi P, Coleman T, Brines M, Cerami A, Latini R. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 2046-2051
38. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 1-14
39. Fliser D, Bahlmann FH. Erythropoietin and the endothelium - a promising link? *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 457-461

40. Fullmer AC, Miller R. Retrospective review of hemoglobin and/or hematocrit levels with occurrence of thrombosis in cancer patients treated with erythropoiesis stimulating agents. *J Oncol Pharm Pract* 2009; 15: 167-173
41. Furchgott RF, Zawadzski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376
42. Furness S, McNagny K. Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunol Res* 2006; 34: 13-32
43. Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2000; 102: 2473-2478
44. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001; 88: 167-174
45. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; 8: 607-612
46. Grant MB, Boulton ME, Ljubimov AV. Erythropoietin: when liability becomes asset in neurovascular repair. *J. Clin. Invest* 2008; 118: 467-470
47. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, Mitchell GF, Sheffy J, Vita JA, Benjamin EJ. Cross- Sectional Relations of Digital Vascular Function to Cardiovascular Risk Factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008; 117: 2467-2474

48. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* 1995; 92: 3431-3435
49. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiological stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102: 1340-1346
50. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593-600
51. Jambrik Z, Venneri L, Varga A, Rigo F, Borges A, Picano E. Peripheral vascular endothelial function testing for the diagnosis of coronary artery disease. *Am Heart J* 2004; 148: 684-689
52. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1961; 55: 33-50
53. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 146-154
54. Kelm M, Strauer BE. Endothelial dysfunction. Therapeutic and prognostic issues. *Internist (Berl)* 1999; 40: 1300-1307
55. Kelm M. Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: 1-5

56. Kerkeni M, Added F, Ben Farhat M, Miled A, Trivin F, Maaroufi K. Hyperhomocysteinaemia and parameters of antioxidative defence in Tunisian patients with coronary heart disease. *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 193-198
57. 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; 7: 430-436
58. Korkmaz H, Onalan O. Evaluation of endothelial dysfunction: flow-mediated dilation. *Endothelium* 2008; 15: 157-163
59. Krantz SB: Erythropoietin. *Blood* 1991; 77: 419-434
60. Lamontagne D, Pohl U, Busse R. Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelium-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. *Circ Res* 1992; 70: 123-130
61. Lekakis J, Papamichael C, Vemmos C, Nanas J, Kontoyannis D, Stamatelopoulos S, Mouloupoulos S. Effect of acute cigarette smoking on endothelium- dependent brachial artery dilation in healthy individuals. *Am J Cardiol* 1997; 79: 529–531
62. Masuda H, Asahara T. Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 390-398
63. Miller-Kasprzak E, Jagodziński PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007; 55: 247-259

64. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five- transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; 90: 5013-5021
65. Miura M, Numaguchi Y, Ishii M, Kubota R, Takeuchi T, Imamura A, Murakami R, Kondo T, Okumura K, Murohara T. Differentiation capacity of endothelial progenitor cells correlates with endothelial function in healthy young men. *Circ J* 2009; 73: 1324-1329
66. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1997; 129: 111–118
67. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997; 95: 1126–1131
68. Overbay DK, Pharm D, Manley HJ, Pharm D. Darbepoetin-alpha: A Review of the Literature. *Pharmacotherapy* 2002; 22: 889-897
69. Park S, Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Baharestani S, Kleinman ME, Pelo CR, Levine JP, Gurtner GC. Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plast Reconstr Surg* 2004; 113: 284-293
70. Patel SR, Mailloux LM, Coppola JT, Mindrescu C, Staniloae CS. Pioglitazone increases adiponectin levels in nondiabetic patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2008; 19: 349-353
71. Peterson TE, Katutsic ZS. EPO tecting the endothelium. *Br J Pharmacol* 2007; 150: 823-825

72. Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, McCoy JP, Read EJ, Khuu HM, Leitman SF, Finkel T, Cannon RO 3rd. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 296-301
73. Raddino R, Robba D, Caretta G, Bonadei I, Teli M, Zanini G, Madureri A, Vizzardi E, Dei Cas L. Erythropoietin: a new perspective in cardiovascular therapy. *Monaldi Arch Chest Dis* 2008; 70: 206-213
74. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med* 2000; 32: 293-304
75. Rosenson RS, Koenig W. Utility of inflammatory markers in the management of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2003; 92: 10–18
76. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126
77. Rote Liste online, 2009. <http://www.rote-liste.de/Online/jumpsearch>. (Zugriffsdatum 05.12.09)
78. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood* 2003; 101: 168-172
79. Santhanam AV, d'Uscio LV, Peterson TE, Katusic ZS. Activation of endothelial nitric oxide synthase is critical for erythropoietin-induced mobilization of progenitor cells. *Peptides*. 2008; 29: 1451-1455
80. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-1906

81. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1210-1221
82. Schröder K, Kohnen A, Aicher A, Liehn EA, Büchse T, Stein S, Weber C, Dimmeler S, Brandes RP. NADPH oxidase Nox2 is required for hypoxia-induced mobilization of endothelial progenitor cells. *Circ Res* 2009; 105: 537-544
83. Selamet Tierney ES, Newburger JW, Gauvreau K, Geva J, Coogan E, Colan SD, de Ferranti SD. Endothelial pulse amplitude testing: feasibility and reproducibility in adolescents. *J Pediatr* 2009; 154:901-905
84. 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; 103: 2776-2779
85. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. *J Clin Invest* 1994; 93: 50-55
86. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995; 74: 247-253
87. 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; 361: 45-46

88. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89: 2462-2478
89. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355-1374
90. Statistisches Bundesamt, 2009: Statistisches Jahrbuch 2009, Kapitel 9 <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/SharedContent/Oeffentlich/Al/IC/Publikationen/Jahrbuch/Gesundheit,property=file.pdf> (Zugriffsdatum 29.11.09)
91. Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005; 181: 305-310
92. Strippoli GF, Navaneethan SD, Craig JC. Haemoglobin and haematocrit targets for the anaemia of chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; CD003967
93. Sytkowski AJ. Does erythropoietin have a dark side? Epo signaling and cancer cells. *Sci STKE*; 2007: 38

94. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-438
95. Tse HF, Yiu KH, Lau CP. Bone Marrow Stem Cell Therapy for Myocardial Angiogenesis. *Current Vascular Pharmacology* 2007; 5: 103-112
96. Tse HF, Thambar S, Kwong YL, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, Thomas P, Bastian B, Chan JKF, Lo G, Ho CL, Chan WS, Kwong RY, Parker A, Hauser TH, Chan J, Fong DY, Lau CP. Prospective Randomized Trial of Direct Endomyocardial Implantation of Bone Marrow Cells for Treatment of Severe Coronary Artery Diseases (PROTECT-CAD Trial). *Eur Heart J* 2007; 28: 2998-3005
97. U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2008. Aranesp (darbepoetin alfa) for Injection. <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyRelatedDrugLabelingChanges/ucm116175.htm> (Zugriffsdatum 11.01.10)
98. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885-2890
99. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1997; 79: 350-354
100. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. A Comparison of Brachial Artery Flow-Mediated Vasodilation Using Upper and Lower Arm Arterial Occlusion in Subjects with and without Coronary Risk Factors. *Clin Cardiol* 2000; 23: 571-575

101. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1567-1572
102. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 2003; 93: 17-24
103. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Schiegl T, Kosiol S, Link A, Walenta K, Nickenig G. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 2007; 102: 565-571
104. Yildiz A, Cakar MA, Baskurt M, Okcun B, Guzelsoy D, Coskun U. The effects of atorvastatin therapy on endothelial function in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Ultrasound* 2007; 5: 51
105. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 5002-5012

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. G. Nickenig danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe das wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen.

Herrn Dr. med. C. Müller danke ich für die gute Betreuung meiner Doktorarbeit. Zudem danke ich ihm für seine fachliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Studie, die anregenden medizinischen Diskussionen, die zahlreichen Anregungen und Tipps, die konstruktive Kritik, sowie seine Hilfe bei der Erstellung der Promotionsarbeit.

Frau Dr. med. A. Yürüktümen danke ich für die zusätzliche Betreuung der vorliegenden Studie und für das ein oder andere aufbauende Wort.

Frau K. Twelker danke ich für die Übernahme der formellen Angelegenheiten, wie das Erstellen und Durchboxen des Ethikantrages oder das Abschließen der Versicherung.

Frau BTA I. Paez-Maletz danke ich für die Hilfe im Labor und für die gute Zusammenarbeit.

Frau K. Reimann danke ich für die gute Koordination im Herzultraschall.

Meinem Schwager Herrn C. Wodack danke ich für die Hilfe und die unendliche Geduld bei der Behebung meiner unzähligen Computerprobleme.

Frau A. Cieslak, Frau S. Jeub und Frau A. Wodack danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Den größten Dank bin ich meiner Familie und meinem Ehemann schuldig. Ich möchte meiner Mutter L. Alberti, meinem Vater Dr. med. H. Alberti, meinem Bruder M. Alberti und meinem Mann O. Wodack für ihre unschätzbare und unvergessliche Unterstützung während meines gesamten Studiums von ganzem Herzen danken.