

Aus der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Einfluss von Vorhofflimmern auf hämatopoetische  
Progenitorzellen: Neue pathophysiologische Rolle  
des atrialen natriuretischen Peptids?**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität

Magdeburg

vorgelegt von  
aus  
Mittenwalde

Mahmood Agbaria  
Nazareth  
2010

## Dokumentationsblatt

### Bibliographische Beschreibung:

Agbaria, Mahmood:

Einfluss von Vorhofflimmern auf hämatopoetische Progenitorzellen: Neue pathophysiologische Rolle des atrialen natriuretischen Peptids? – 2010. - 72 Bl. : 17 Abb., 2 Tab., 3 Anl., 2 Bilder.

### Kurzreferat:

Es ist bekannt, dass durch Vorhofflimmern (VHF) Stoffwechsel- und strukturelle Änderungen in den Vorhöfen verursacht werden. Es ist jedoch nicht bekannt, ob VHF die hämatopoetische Progenitorzellen (CD34<sup>+</sup>HPCs) beeinflusst.

Das Ziel dieser Studie ist es, die CD34<sup>+</sup>HPCs und CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>HPCS, die SDF-1 $\alpha$ , den VEGF sowie den ANF bei Patienten mit persistierendem VHF und paroxysmalem VHF zu quantifizieren. Zusätzlich wurde die Wirkung von elektrischer Kardioversion auf CD34<sup>+</sup>HPCs und CD34<sup>+</sup>HPCs - Faktoren untersucht. Es wurden 17 Patienten mit persistierendem VHF und 12 Patienten mit paroxysmalem VHF zu der Studie herangezogen. 17 Patienten mit Sinusrhythmus dienten als Kontrollpersonen.

Bei Patienten mit persistierendem VHF wurden Blutproben vor sowie 10 Minuten, 24 Stunden, 48 Stunden und 59 Tagen nach elektrischer Kardioversion entnommen.

Die CD34<sup>+</sup>HPCs, ANF und SDF-1 $\alpha$  waren im Blutspiegel im Laufe des persistierenden VHF erhöht, begannen aber 48h nach erfolgreicher Kardioversion abzusinken. Nach 59 Tagen erreichten sie den Normalspiegel.

**Schlüsselwörter:** Vorhofflimmern, hämatopoetische Progenitorzellen, atriales natriuretisches Peptid, Kardioversion

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	6
1.1	Vorhofflimmern	6
1.1.1	Definition und Klassifikation	6
1.1.2	Häufigkeit und Ätiologie	7
1.1.3	Pathogenese	7
1.1.4	Hämodynamik	10
1.1.5	Prognose des Vorhofflimmerns	10
1.1.6	Klinisches Bild	10
1.1.7	Therapie des Vorhofflimmerns	11
1.2	Stammzellen	13
1.2.1	Hämatopoetische Stammzellen	14
1.2.2	Adulte Stammzellen	14
1.2.3	Embryonale Stammzellen	15
1.2.4	Entwicklung der Stammzelltherapie	16
1.2.5	Gewinnung nichtembryonaler Stammzellen	16
1.2.6	Verfahren zur Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen	17
1.3	Das atriales natriuretisches Peptid (ANP)	18
1.4	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor	18
1.5	Stromal cell derived factor-1 $\alpha$	19
1.6	Ziel dieser Studie	20
2.	Material und Methoden	21
2.1	Patienten	21
2.2	Ausschlusskriterien	21
2.3	Studiendurchführung	23
2.4	Elektrische Kardioversion	23
2.5	Laboranalytik	24
2.5.1	Das atriales natriuretisches Peptid Immunoassays	24
2.5.1.1	Testprinzip	24
2.5.1.2	Reagenzien-, Probenvorbereitung und Testdurchführung	25

2.5.2	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Immunoassay	27
2.5.2.1	Testprinzip	27
2.5.2.2	Reagenzien-Vorbereitung	27
2.5.2.3	Testdurchführung	29
2.5.3	Quantitative Bestimmung menschlichen stromal cell derived factor-1 $\alpha$ Konzentrationen in Plasma	30
2.5.3.1	Testprinzip	30
2.5.3.2	Probe	30
2.5.3.3	Reagenzien-Vorbereitung	30
2.5.3.4	Durchführung	32
2.5.4	CD34 <sup>+</sup> /CD117 <sup>+</sup> HPCs Analyse	33
2.5.4.1	Probenvorbereitung	35
2.5.4.2	Färbung der Zellen	35
2.5.5	Zellkultur und Immunozytologie	35
2.5.5.1	Isolierung der mononuklearen Zellen aus dem entnommen Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation	35
2.5.5.2	Herstellung der Agarkulturen	36
2.5.5.3	Zellkultur und Immunozytologie	37
2.5.5.4	Myocyte enhancer factor-2	37
2.5.5.5	Prinzipien des Verfahrens	37
2.5.5.6	Immunhistochemische Färbung über EnVision <sup>TM</sup> System (Dako)	38
3.	Statistik	38
3.1	Statistische Analyse	38
4.	Ergebnisse	39
4.1	Wirkung von Vorhofflimmern und Elektrischer Kardioversion auf HPCs	39
4.2	SDF-1 $\alpha$ -Spiegel	42
4.3	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor	43
4.4	ANP-Spiegel	44
4.5	Zellkulturen	46

5.	Diskussion	48
6.	Zusammenfassung	56
7.	Literaturverzeichnis	57
8.	Abkürzungsverzeichnis	75

## 1. Einführung

### 1.1 Vorhofflimmern

#### 1.1.1 Definition und Klassifikation

Unorganisierte hochfrequente Vorhofdepolarisationen ohne effektive Vorhofkontraktion werden als Vorhofflimmern (VHF) bezeichnet. Während des VHF werden die irregulären atrialen Impulse (400-600/min) unregelmäßig über den AV-Knoten und die Herzkammer übergeleitet (Arrhythmia absoluta). Auch lassen sich in der isoelektrischen Linie zwischen T-Welle und QRS-Komplex Flimmerwellen feststellen, die ständig in Dauer, Amplitude, Form und Ausschlag variieren. Diese sind häufig sehr klein, gelegentlich sogar so klein, dass sie im Oberflächen-EKG nicht eindeutig erkennbar sind. (Robles et al. 1978, Sandoe et al. 1990).

Die klinische Klassifikation des chronischen VHF basiert auf dem zeitlichen Verlauf und der Therapieentscheidung (Fuster et al. 2001, Gallagher et al. 1998):

- Paroxysmales VHF: Die Dauer der Episoden kann zwischen Minuten, Tagen oder auch Wochen schwanken. Es terminiert spontan.
- Persistierendes VHF: Es handelt sich um ein anhaltendes VHF, ohne spontane Konversion, das durch pharmakologische oder elektrische Methoden in einen Sinusrhythmus überführt werden kann.
- Permanentes VHF: Dieses VHF ist anhaltend. Eine Konversion durch pharmakologische oder elektrische Methoden in einen Sinusrhythmus ist nicht möglich (Abb. 1).

	Paroxysmal	Persistierend	Permanent
zeitlicher Verlauf	Episoden zwischen Minuten und Wochen	Anhaltendes VHF	Anhaltendes VHF
Termination	Spontan	Pharmakologisch Elektrisch	Nicht konvertierbar

Abb.1: Zusammenfassung der klinischen Klassifikation des chronischen VHF

### 1.1.2 Häufigkeit und Ätiologie

VHF ist die häufigste klinisch relevante kardiale Arrhythmie. Jährlich wird bei 720.000 Patienten weltweit VHF diagnostiziert (Go et al. 2001). Die Inzidenz nimmt mit steigendem Lebensalter stetig zu (Furberg et al. 1994, Benjamin et al. 1998). Bei ca. 5% aller Menschen über 60 Jahren können Episoden von VHF nachgewiesen werden. Im Alter von > 85 Jahren sind dies ungefähr 15%.

Ursachen für die Entstehung von VHF sind zu 70% Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems. Die häufigste dieser ist der Bluthochdruck, gefolgt von koronaren Herzerkrankungen, Herzklappenerkrankungen und Herzinsuffizienz sowie dem Wolff-Parkinson-White Syndrom (WPW) (Bauernfeind et al. 1981). Neben den kardialen Ursachen werden die Schilddrüsenüberfunktion (Cappola et al. 2006, Squizzato et al. 2005), einige Systemerkrankungen, Lungenembolie, Perikarditis und Diabetes mellitus (Movahed et al. 2005) mit VHF in Verbindung gebracht.

Schließlich wurde vor einigen Jahren sogar eine familiäre Form des VHF mit autosomal-dominantem Vererbungsmodus entdeckt (Brugada et al. 1997). Auch nach kardiochirurgischen Eingriffen (Almassi et al. 1997, Aranki et al. 1996, Mathew et al. 1996, Siebert et al. 2001, Auer et al. 2005, Cox et al. 1999) und Thoraxoperationen ist das VHF von klinischer Bedeutung (Vaporciyan et al. 2004). 15% der Patienten mit VHF sind idiopatisch (Schotten et al. 2003). Diese trifft auf jüngere Patienten zu, die weniger Symptome und eine bessere Prognose haben (Kopecky et al. 1987).

### 1.1.3 Pathogenese

Als Mechanismus des VHF werden multiple kreisende Erregungswellen (Reentry) nachgewiesen (Baenkler HW: 1999). Anhaltend führten sie zu pathologischen Umbauprozessen (Remodeling), die elektrische, kontraktile und ultrastrukturelle Eigenschaften der Vorhöfe betreffen (Abb. 2).

Folgenden Mechanismen bzw. Faktoren sind am atrialen Remodeling bei VHF beteiligt:

- Verminderter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom: Eine initiale Überladung der Vorhofzellen mit Calcium führt nachfolgend zur Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die atrialen Myozyten und konsekutiv zu einer Verkürzung des Aktionspotenzials (elektrisches Remodeling). Dieser Mechanismus erhöht die Wahrscheinlichkeit

für das Auftreten von kreisenden Erregungen (Van et al. 1999). Die Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms ist durch erhöhte Aktivität von Proteinphosphatasen verursacht, die zur Verringerung des Phosphorylierungsgrades in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalproteinen führt. Dies hat die Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms (Christ et al. 2004) und den Verlust der atrialen Kontraktionskraft (Schotten et al. 2003) zur Folge. Letzterer bleibt für einige Zeit erhalten, wenn das VHF in einen Sinusrhythmus konvertiert werden könnte. Man spricht vom „kontraktilen Remodeling“ (Manning et al. 1994). Der Verlust der atrialen Kontraktionskraft führt zu zunehmender Dehnung, Dilatation und schließlich zur Vergrößerung der Vorhöfe durch erhöhten intraatrialen Druck. Dieser Prozess verursacht strukturelle Umbauprozesse wie zelluläre Hypertrophie und Fibrosierung „strukturelles Remodeling“ (Allessie et al. 2002). Das strukturelle Remodeling führt zum Anstieg der Muskelmasse und Reizleitungsstörungen im Atrium, die die Kreiserregungen erhöhen und das VHF durch einzelne atriale Ektopien begünstigen. Je größer der Vorhof, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten von VHF. Deshalb sind Herzinsuffizienz und Mitralklappenerkrankungen stärker mit dem Entstehen von VHF assoziiert als andere kardiovaskuläre Erkrankungen (Schotten et al. 2006).

- Angiotensin-II-System: Kardialen Erkrankungen, wie beispielsweise die Linksherzinsuffizienz, die als Risikofaktoren für das Auftreten von VHF gelten, aktivieren das atriale Angiotensin-II-System (McEwan et al. 1998). Angiotensin II führt zu einer Stimulierung von Fibroblasten. Daraus resultiert ein verstärkter struktureller Umbauprozess. Angiotensin II induziert in Myozyten eine Zellhypertrophie. Durch diese Wirkung von Angiotensin II auf das Vorhofgewebe wird das Auftreten von VHF begünstigt (Li et al. 1999). Zusätzlich vermehrt Angiotensin II die Häufigkeit der fokalen Ektopie durch Erhöhung der präsynaptischen Katecholaminausschüttung und direkten Effekte auf die  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher (Schotten et al. 2006).
- Genetische Mutationen: Das erste familiäre VHF wurde 1943 durch Wolf beschrieben. Brugada und Mitarbeiter konnten durch klassische Kopplungsuntersuchungen einen ersten genetischen Locus für familiäres VHF identifizieren (Brugada et al. 1997). Wiesfeld und Mitarbeiter haben zwei



weitere Loci und drei kausale Gene identifiziert, die Proteine myokardialer Kaliumkanäle kodieren (Wiesfeld et al. 2005).

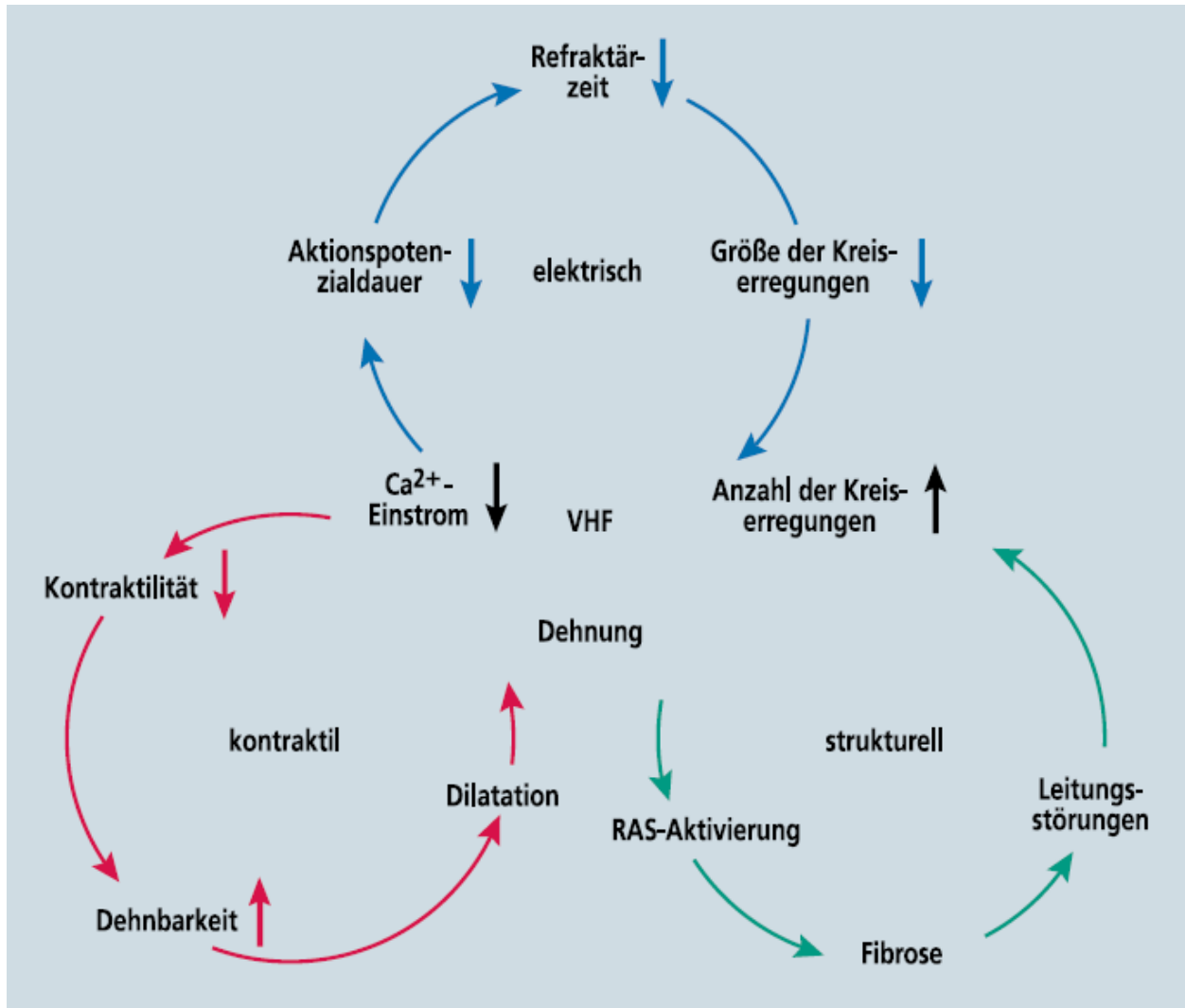


Abb. 2: „Kleeblattstruktur“ pathologische Umbauprozesse bei VHF (Schotten et al. 2006, modifiziert nach Allessie et al. 2002)

### **1.1.4 Hämodynamik**

Ineffektive Vorhofkontraktionen führen zur Störung der präsystemischen Füllung des Ventrikels, die eine Abnahme des Herzminutenvolumens um ca. 20% zur Folge hat. Die Systolendauer bleibt fast unverändert, wobei sich die Diastolendauer bei schneller Überleitung stark verkürzt. Das Füllungsvolumen und die Auswurfraction reduzieren sich. Bei lang anhaltender hoher Kammerfrequenz und verkürzter Diastolendauer kann sich bei herzgesunden Menschen eine Herzinsuffizienz entwickeln (Naito et al. 1983, Maier et al. 1983, Clark et al. 1997).

### **1.1.5 Prognose des Vorhofflimmerns**

Durch die Komplikationen bei Patienten mit VHF, wie zum Beispiel Thromboembolien, steigen die Mortalität und Morbidität um 50% an (Schotten et al. 2006). Das Schlaganfallrisiko bei Patienten mit VHF ist durch Bildung intraatrialer Thromben um das Fünffache erhöht. Ca. 15 % aller zerebralen Insulte sind auf ein VHF zurückzuführen (Laupacis et al. 1996, Ezekowitz et al. 2003). Die arteriellen Embolien aus dem linken Vorhof sind besonders zu Beginn und Ende des VHF's deutlich erhöht (Baenkler et al. 1999). Bei gleichzeitig bestehender valvulärer Herzerkrankung erhöht sich das relative Schlaganfallrisiko um das 18fache. Patienten mit ischämischen Hirninfarkt und VHF haben eine schlechtere Prognose als Schlaganfallpatienten ohne VHF (Lin et al. 1996).

### **1.1.6 Klinisches Bild**

Typische subjektive Symptome, die durch VHF hervorgerufen werden können, sind unter anderem unangenehme Palpitationen, allgemeine Leistungsminderung sowie Schwindelzustände.

Bei vorbestehenden Herzerkrankungen kann es zur kardiopulmonalen Dekompensation während des VHF's kommen, vor allem dann, wenn die irregulären Vorhoferregungen schnell auf die Herzkammern übergeleitet werden. Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung kann VHF zu Synkopen und Angina-pectoris Symptomatik führen (Josephson 1998).

### 1.1.7 Therapie des Vorhofflimmerns

Die angestrebten Therapieziele bei VHF in den vergangenen Jahren sind:

- Kontrolle der Kammerfrequenz („Frequenzkontrolle“)
- Kardioversion des VHF und Erhalt von Sinusrhythmus („Rhythmuskontrolle“)
- Antikoagulation.

Antiarrhythmika sind bei Patienten mit VHF in der Regel der erste Therapieansatz. Die Konversion in einen Sinusrhythmus kann auf pharmakologischem oder elektrischem Wege erfolgen. Die Konversionsrate des VHF in einen stabilen SR mittels einer pharmakologischen Therapie ist niedrig (Fuster et al. 2001). Bei Misserfolg der pharmakologischen Therapie besteht eine Indikation zur Kardioversion. Nach einer Elektrokardioversion ist die Konversionsrate nach drei Tagen 86%, 23% nach einem Jahr und 16% nach zwei Jahren (Tieleman et al. 1998). Eine Elektrokardioversion mit Antiarrhythmika hat nach einem Jahr eine Konversionsrate von 40%, 33% nach zwei Jahren (Raitt et al. 2006). Bei Therapierefraktarität auf verschiedene Antiarrhythmika kann vor allem bei jüngeren Patienten ohne Herzerkrankung das Verfahren der Pulmonalvenenisolation angewendet werden. Dieses Verfahren birgt die Gefahr verschiedener Komplikationen wie der Gefahr der transeptalen Punktion (Perikarderguss, Tamponade mit Risiko unter 1%), Ösophagusperforation und einer Embolie ins arterielle Gefäßsystem (Hsu et al. 2005, Hindricks et al. 2006, Pappone et al. 2004, Cummings et al. 2006, Oral et al. 2002, Cappato et al. 2005).

Eine antithrombotische Therapie sollte bei Patient begonnen werden, die länger als 48 Stunden im VHF sind, weil das Schlaganfallrisiko sich um das Fünffache bis Sechsfache erhöht (Sharif et al. 1998). Haissaguerre und Mitarbeiter konnten erstmals fokales VHF in den proximalen Abschnitten der vier Pulmonalvenen nachweisen, die häufiger in den linken und rechten oberen Pulmonalvenen vorkommen (Haissaguerre et al. 1998). Chirurgische Einsätze mit Ablationsverfahren insbesondere im Bereich der Pulmonalvenen sind neben der Hochfrequenzablation die Mikrowellen-, Ultraschall- und Kryoablation therapeutische Ansätze. Keine Studie konnte bisher die Überlegenheit eines dieser Verfahren beweisen (Khargi et al. 2005, Wisser et al. 2004). Insgesamt ist jedoch die pharmakologische und nicht pharmakologische Therapie des VHF limitiert und die Effektivität beträgt maximal

60-80%.

Aufgrund der Einschränkung der bisher verfügbaren Therapien des VHF wird nach neuen Ansatzpunkten gesucht. Molekulare Veränderungen des Vorhofs im Rahmen des „Strukturellen Remodeling“ könnten hierbei als neue Therapieziele dienen. Ob regenerative Mechanismen helfen könnten, um Remodelingprozesse zu beeinflussen, ist bislang nicht untersucht worden.

## 1.2 Stammzellen

Der menschliche Körper enthält ca. 200 verschiedene Zelltypen. Der Stammbaum dieser Zellen beginnt mit der Zygote. Innerhalb der Embryonalentwicklung entstehen aus undifferenzierten Vorläuferzellen sogenannte Progenitorzellen, die sich zunehmend in spezialisierte Zelltypen teilen (Neuss et al. 2001). Hämatopoetische Stammzellen wurden erstmalig 1909 von Maximow postuliert und seit etwa 35 Jahren bei der Behandlung von Leukämien klinisch genutzt (Maximow 1906, Kasper et al. 2004).

Stammzellen (SZ), d.h. unreife Vorläuferzellen eines Gewebes, deren Entwicklung noch nicht festgelegt ist, sind durch zwei Eigenschaften charakterisiert:

1. die Fähigkeit, in reife Stadien und gegebenenfalls verschiedene Gewebe differenzieren zu können (prospektive Potenz),
2. das Vermögen, sich praktisch unbegrenzt selbst zu erneuern (Self renewal) ohne Differenzierungspotential (dabei Erhaltung ihrer Multipotenz).

Stammzellen können sich unter dem Einfluss verschiedener Faktoren (Wachstumsfaktoren, genetische Faktoren und unbekannte Faktoren) zu vielfältigen Organzellen und Gewebearten differenzieren. Dabei kommt es durch Zunahme der Differenzierung zur Abnahme der Potenz.

Die neuen Untersuchungen zeigen, dass sich die Knochenmarkstammzellen in Herzmuskelzellen, neuronale Zellen usw. entwickeln können, und sich auch umgekehrt von ZNS-Zellen zu Knochenmarkstammzellen umwandeln können (Döhmen et al. 2002).

Die Nutzung adulter Stammzellen lässt sich ethisch und politisch vertreten. Man sollte zwischen totipotenten Zellen (lat. „zu allem fähig“) wie Zygoten, die unter den Embryonenschutz fallen, und pluripotenten Zellen (lat. „zu vielem fähig“) wie embryonalen Stammzellen (ESZ) und multipotenten Zellen ( lat. „zu mehrerem fähig“) wie mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks unterscheiden. Die Forschung mit multipotenten Zellen ist ethisch vertretbar, weil aus diesen Zellen noch kein ganzer Mensch hervorgehen kann.

### **1.2.1 Hämatopoetische Stammzellen**

Die Existenz dieser Zellen (HSZ) wurde in den 1950-er Jahren durch Studien an lethal bestrahlten Mäusen experimentell nachgewiesen (Ford et al. 1956, Nowell et al. 1956). Die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) aus dem Knochenmark sind die bekanntesten adulten Stammzellen (ASZ). Ihre Funktion ist die ständige Regeneration der verschiedenen Blutbestandteile und des Immunsystems. Sie sind die am besten erforschten Stammzellen, die sich bereits seit 27 Jahren im Rahmen der autologen und allogenen Knochenmarktransplantationen klinisch etabliert haben. Sie dienen deshalb als Prototyp für die adulten Stammzellen. Unter geeigneten Bedingungen zeigten sie einen beachtlichen Grad an unerwarteter Differenzierbarkeit (Weissmann et al. 2000; Kuehnle et al. 2002).

Die hämatopoetischen Stammzellen werden anhand von Oberflächenmarkern durch Zellsortierung nach Fluoreszenzmarkern (FACS) oder durch Markierung mit magnetischen Partikeln (magnetobeads) isoliert (Krause et al. 1994, Spangrude et al. 1994). Zur Isolation der HSZ wird das Oberflächenantigen AC133 genutzt (Handgretinger et al. 2003).

### **1.2.2 Adulte Stammzellen**

Adulte Stammzellen (ASZ) sind Zellen, die in einem Organ für die Regeneration dieses Organs zur Verfügung stehen und vom Organismus für diese Aufgabe gehalten werden. Sie wurden bisher als monopotente Zellen angesehen, die nur die Aufgabe haben, ihr Organ regenerationsfähig zu halten. Bei vielen Gewebstypen sind spezifische Vorläuferzellen bekannt, die sich in Ruhephase in ihrer Nische befinden, bis die Mikroumgebung signalisiert, dass ein Nachschub an spezifisch differenzierten Zellen erforderlich ist. Daraufhin setzt die Zellteilung ein (Fuchs et al. 2004). Neue Studien belegen, dass adulte Stammzellen nicht nur monopotent sind, sondern multipotente Eigenschaften besitzen. In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, dass Stammzellen aus dem Knochenmark abgestorbene Muskelzellen nach einem Herzinfarkt ersetzen können (Orlic et al. 2001, Koch et al. 2001, Orlic et al. 2002). In Tierversuchen von Orlic und seine Mitarbeiter wurden bei weiblichen Mäusen durch Unterbindung eines Astes der Herzkranzgefäße ein Herzinfarkt erzeugt. Fünf Stunden später nach dem Herzinfarkt wurden Stammzellen aus dem Knochenmark von männlichen Mäusen in zwei Injektionen in das dem Infarkt benachbarten Herzgewebe injiziert. Gegenüber den nicht behandelten Tieren

ergab sich eine Zunahme des Herzmuskeldurchmessers mit Wiederherstellung der Herzmuskelzellen mit Verbesserung der Herzfunktion. Durch den Nachweis von Y-Chromosomen in dem neuen Herzgewebe der weiblichen Herzen liegt der Beweis, dass die regenerierten Muskelzellen aus den männlichen Stammzellen entstanden sind (Orlic et al. 2001, 2002). Bei Menschen wurden fünf bis sechs Tage nach aufgetretenem Herzinfarkt Knochenmarkstammzellen durch einen Herzkatheter in die zerstörte Muskelregion injiziert. Auch hier zeigte sich ein guter Erfolg (Strauer et al. 2001). Bisher sind außer den HSZ zum Teil auch unreife und multipotente adulte Stammzellen für die Regeneration von zerstörtem Gewebe von Muskeln, Gefäßendothel, Nerven/ZNS, Fett, Knochen, Knorpel, Epithel von Haut und Magen-Darm-Trakt, Leber, Pankreas, Cornea, Retina und Dentin eingesetzt worden (Petersen et al. 2001). Adulte mesenchymale Stammzellen (MSZ) wurden von Friedenstein erstmals als multipotente Stammzellen des Knochenmarkstromas identifiziert (Friedenstein et al. 1966). Die MSZ sind seltene Zellen aus dem Knochenmark (CD34<sup>+</sup>HPCs und CD45<sup>+</sup>HPCs), die sich in anderen Geweben finden. Die adulten mesenchymalen Stammzellen können aus Fett, Blut, Nabelschnurblut, Gelenksynovia und natürlich aus Knochenmark gewonnen werden (Pittenger et al. 2001). Eine weitere Art von Stammzellen sind die adulten neuralen Stammzellen (NSZ). Die adulten neuralen Stammzellen sind überwiegend in dem ventrikulären und subventrikulären Bereich des Gehirns und in der subgranulären des Gyrus dentatus im Hippocampus zu finden (McKay 1997).

### **1.2.3 Embryonale Stammzellen**

Embryonale Stammzellen (ESZ) stammen aus der frühen Entwicklungsphase eines Embryos vor der Nidation aus der inneren Zellmasse der Blastozyste. Die embryonalen Stammzellen sind unreif, vermehrbar und können sich beim Menschen in jede Zellart entwickeln. Die ESZ sind pluripotent (lat. „zu vielem fähig“) aber anders als eine Zygote, können sie sich nicht in komplette Embryos entwickeln. Aus menschlichen ESZ können sich Kardiomyozyten, insulinproduzierende Zellen und Neuronen differenzieren (Marshak et al. 2001).

ESZ sind Fremdzellen. Sie entwickeln während der Differenzierung in reife Gewebe Histokompatibilitätsmerkmale (HLA).

	Embryonale Stammzellen	Adulte Stammzellen
Pro	<ul style="list-style-type: none"> <li>- gut expandierbar</li> <li>- Pluripotent</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- leicht gewinnbar</li> <li>- keine ethischen Bedenken</li> <li>- zum Teil gut expandierbar</li> <li>- multipotent</li> <li>- gut verträglich</li> <li>- autolog und allogene möglich</li> </ul>
Contra	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ethische und rechtliche Bedenken</li> <li>- schwierige Gewinnbarkeit</li> <li>- Gefahr der Abstoßung</li> <li>- Immunsuppression notwendig</li> <li>- Gefahr eines terato-Carcinoms</li> <li>- Mangel an spezifischen Markern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mangel an spezifischen Markern</li> </ul>

Abb. 3: ESZ und ASZ von A.-Rolf Zander, n. Stute, B. Fehse, C. Lange

### 1.2.4 Entwicklung der Stammzelltherapie

Bei ESZ und ASZ sind viele Mechanismen unverstanden. Eine Reihe von Voraussetzungen müssen für den erfolgreichen Einsatz von ASZ und ESZ erfüllt werden:

- die Zahl der übertragenen Zellen muss hoch sein,
- die Reinheit der Zellpräparation,
- die Morphologie, Phänotyp und Genotyp,
- der Nachweis der Funktion im Reagenzglas oder im Organismus, ob Herzmuskelzellen einen Kontakt zum umgebenden Muskelzellgewebe erstellen können und sich dann synchron kontrahieren können. (Blau et al. 2001).

### 1.2.5 Gewinnung nichtembryonaler Stammzellen

1. Die Nabelschnurstammzellen sind pluripotente Stammzellen. Die Gewinnung der Stammzellen kann nach der Geburt als Nabelschnurblut (aus der Nabelschnur und Plazenta) gewonnen und konserviert werden. Wichtig ist,



dass das Nabelschnurblut innerhalb von 24 Stunden präpariert und sachgerecht gelagert wird, weil die Vermehrungsfähigkeit der Stammzellen abnimmt, je länger das Nabelschnurblut in nicht präpariertem Zustand bleibt.

## 2. Adulte Stammzellen

Die Verwendung von Nabelschnurstammzellen ist vorteilhafter gegenüber den adulten Stammzellen, denn das Nabelschnurblut ist durch Viren und maligne transformierte Zellen weniger belastet. (Döhmen et al. 2002).

### **1.2.6 Verfahren zur Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen**

Für die praktische Anwendung bieten sich multipotente hämatopoetische Stammzellen an (CD-34 positive Zellen), weil sie erstens einfach zu gewinnen und zweitens in ausreichender Zahl vermehrbar sind. Mikroskopisch ähneln sich die Oberflächenantigene CD-34 (Clusters of Differentiation) der hämatopoetischen Stammzellen und der Lymphozyten. Die hämatopoetischen Stammzellen werden durch monoklonale Antikörper, die sich an die CD-34 Antigene anheften, mittels Durchflusszytometrie quantitativ bestimmt. Im peripheren Blut befindet sich eine geringe Anzahl hämatopoetischer Stammzellen. Das Verhältnis dieser Stammzellen zu den Lymphozyten beträgt ca. 1:1000. Mittels Stimulationsfaktoren wie Granulozyten-Wachstumsfaktor (G-CSF) kann die Zahl der CD-34 Zellen auf das Tausendfache gesteigert werden. Dann wird ein Sheldon-Katheter oder ein großlumiger ZVK gelegt. Durch Zentrifugation werden dann die CD-34 Zellen aus dem Blut gewonnen, die direkt nach Zellschädigung z.B. bei Herzinfarkt ins Herz oder auch in andere Organe infundiert werden können. Bei indirekter Anwendung von hämatopoetischen Stammzellen werden Zellzahl und Sterilität geprüft. Dann werden sie in speziellen Plastikbeuteln gesammelt und eingefrohren, bis die Reinfusion stattfinden wird (Döhmen et al. 2002).

### **1.3 Das atriales natriuretisches Peptid (ANP)**

ANP wird in den Myozyten der Herzvorhöfe als Prohormon synthetisiert und gespeichert. ANP besteht aus 126 Aminosäuren (de Bold et al. 1981, Miyata et al. 1985). Die erhöhte Wandspannung im Atrium und das Dehnen der Myozytenfibrillen sind ein wichtiger Stimulus zur Freisetzung des Prohormons, das in das biologisch aktive proANP (99-126) gleich Alpha-ANP und den terminalen Teil proANP(1-98) gespalten wird (Globits et al. 1998, Mathisen et al. 1993, Buckley et al. 1990, Sundsfjord et al. 1988). Alpha-ANP hat eine Halbwertszeit von 3-4 Minuten und bindet sich schnell an spezifische Rezeptoren. Für proANP(1-98) gibt es keine bekannten Clearance-Rezeptoren. Deshalb zirkulieren die proANP(1-98) länger als Alpha-ANP im Blut, sodass das proANP(1-98) die Gesamtmenge des sezernierten ANP widerspiegelt (Wie et al. 1993).

Das ausgesprochen stabile proANP kann bis zu 3 Tage bei Raumtemperatur direkt in biologischen Flüssigkeiten bestimmt werden, ohne dass Analyt abgebaut wird (Nelesen et al. 1992).

Die Arbeit von Paquin unterstützt, dass das Oxytocin-ANP-System bei der Kardiomyogenese eine Rolle spielt und dass ANP ein wichtiger Faktor für die Freisetzung der CD34<sup>+</sup>HPCs ist (Paquin et al. 2002). Arbeiten von Röcken haben zudem gezeigt, dass VHF zu einer erheblichen Freisetzung von ANP führt (Röcken et al. 2002).

### **1.4 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor**

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor ist ein homodimerer 34-42 kDa, Heparin-gebundenes Glykoprotein mit potenter angiogenetischer (Ferrara et al. 1989), mitogenetischer und vaskulärer permeabilitätssteigernder Aktivität für endotheliale Zellen.

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor wird in zahlreichen Nagetier- und menschlichen Tumorzellen gefunden (Connolly et al. 1991). In normalen Geweben ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor in Makrophagen (Fava et al. 1994), Keratinozyten (Brown et al. 1992), nierenglomerulärem viszeralem Epithelium und mesangialen Zellen, (Brown et al. 1992, Iijima et al. 1993), Hepatozyten (Monacci et al. 1993), glatten Muskelzellen (Ferrara et al. 1991), Leydig Zellen (Shweiki et al. 1993), embryonalen Fibroblasten und bronchialen und choroid Plexusepithelium (Pertovaara et al. 1994, Breier et al. 1992) gefunden worden. Die VEGF-Expression

steigt bei Hypoxie (Connolly et al. 1991, Senger et al. 1993, Pertovaara et al. 1994). Er fördert den Plasmafibrinogensaustritt ins Gewebe und führt zu Fibrinabsetzung, die den extrazellulären Raum ändert. Der modifizierte extrazelluläre Raum fördert anschließend die Wanderung von Makrophagen, Fibroblasten und endothelialen Zellen. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor spielt eine wichtige Rolle bei der Inflammation und der normalen oder pathologischen Angiogenese.

### **1.5 Stromal cell derived factor-1 $\alpha$**

SDF-1 $\alpha$ -Gens liegt auf Chromosom 10. SDF-1 $\alpha$  ist eine CXC Chemokine. Es gehört zu einer Unterfamilie der Cytokine, welche sekretorische Proteine sind, die chemotaktisch wirken (Shirozu et al. 1995). SDF-1 $\alpha$  wurde von Stromazellen und Lymphknoten produziert. SDF-1 $\alpha$  wird konstitutiv von Knochenmarkstromal-Zellen exprimiert und ist in vielen anderen Geweben vorhanden. (Tashiro et al. 1993, Nagasawa et al. 1994, Bluel et al. 1996).

SDF-1 $\alpha$  ist ein Ligand für den Chemokinrezeptor CXCR4, zieht dendritische Zellen, B-Vorläuferzellen und T-Zellen an und führt zur Wanderung in die Lymphknoten. SDF-1 $\alpha$  hat eher die Funktion der Immunüberwachung als die eines Mediators der inflammatorischen Reaktion (Bluel et al. 1996). Es sieht so aus, dass SDF-1 $\alpha$  die Funktion als Kontroller von Lymphozyten und hämatopoetischen Zellen übernimmt (Aiuti et al. 1996).

Bekannt ist, dass Chemokine wie SDF-1 $\alpha$  und VEGF die Rückkopplung von Stammzellen im Knochenmark modulieren und in vivo die hämatopoetischen Zellen mobilisieren (Dyson et al. 1994).

## 1.6 Ziel dieser Studie

In den vorhergehenden Untersuchungen wurde demonstriert, dass VHF selbst zu einer signifikanten Schädigung von Vorhofmuskelzellen führt, wodurch im Verlauf ausgedehnte Narbenareale in den Vorhofswänden entstehen (Goette et al. 2000, 1996, Ausma et al. 2001).

Bisher ist es unklar, ob eine atriale Myopathie ein ausreichender Stimulus ist, um Die Anzahl von zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen (HPCs) zu beeinflussen. Interessanterweise hat Quaini und Mitarbeiter demonstriert, dass hohe Anteile von Vorläuferzellen besonders in den Vorhofgeweben vorhanden sind. Außerdem ist bekannt, dass Patienten mit VHF Stoffwechsel- und strukturelle Änderungen in den Vorhöfen haben (Leuner et al. 1998). Aber es ist nicht bekannt, ob VHF die HPCs beeinflusst.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss von VHF auf die Anzahl von CD34<sup>+</sup>HPCs und CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>HPCs, die SDF-1 $\alpha$ , auf den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) sowie das atriales natriuretisches Peptid (proANP 1-98) im peripheren Blut, zu bestimmen. Des Weiteren sollte der Einfluss der Wiederherstellung eines normalen Sinusrhythmus durch elektrische Kardioversion auf die Menge von CD34<sup>+</sup>HPCs und HPCs-Faktoren untersucht werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

46 Patienten wurden in die Studie einbezogen:

29 Patienten mit VHF,

17 Patienten mit persistierendem VHF (>3 Monate) mit klinischer Indikation zur elektrischen Kardioversion,

12 Patienten mit paroxysmalem VHF,

17 Patienten waren im Sinusrhythmus (SR) und dienten als Kontrollgruppe (Table 1).

Alle Patienten wurden gemäß der New York Heart Association in Stufe (NYHA) I und II eingestuft. Patienten mit VHF wurden innerhalb eines Zeitraumes von mindestens 4 Wochen mit Phenprocoumon antikoaguliert. Die Behandlung mit Antiarrhythmika wurde 72 Stunden vor der Kardioversion eingeleitet. Die weitere medikamentöse Therapie ist unverändert geblieben (Table 1).

Patienten mit persistierendem VHF wurden während ihres Krankenhausaufenthaltes mittels Telemetrie überwacht.

Das Studien-Protokoll wurde von der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt. Alle Patienten gaben schriftlich ihre Zustimmung zur Teilnahme an der Studie.

### **2.2 Ausschlusskriterien**

- klinisch bedeutsame Anämie
- begleitende hämatologische Erkrankungen bzw. Knochenmarkprozesse
- zytostatische Therapie
- < 18 Jahre
- schwere Funktionsstörungen von Nieren und Leber
- manifeste Herzinsuffizienz (NYHA III und IV)
- akute Koronarischämie
- Notfallkardioversion
- Teilnahme an einer anderen Studie

**Table 1. Patienteneigenschaften**

	SR	persist.VHF	parox. VHF
<b>Probandenzahl</b>	17	17	12
<b>Alter, Jahr</b>	48±18	53±6	60±15
<b>Geschlecht, m/f</b>	12/5	12/5	5/7
<b>VHF-Dauer, Monate</b>	-----	11±6	22±23
<b>KHK, %</b>	12 (2)	18 (3)	25 (3)
<b>MI, %</b>	12 (2)	6 (1)	0 (0)
<b>LVEF, %</b>	56±16	63±8	64±6
<b>LAD, cm</b>	4.3±1.2	4.6±0.4*	3.6±0.5
<b>Hypertonie, %</b>	65 (11)	88 (15)	58 (7)
<b>Diabetes, %</b>	35 (6)	29 (5)	17 (2)
<b>HLP, %</b>	71 (12)	53 (9)	25 (3)
<b>β-Blockers, %</b>	47 (8)	65 (11)	42 (5)
<b>Calcium Antagonisten, %</b>	18 (3)	29 (5)	25 (3)
<b>Klasse I AA, %</b>	-----	29 (5)	25 (3)
<b>Klasse III AA, %</b>	-----	71 (12)	8 (1)
<b>ACE-Hemmer, %</b>	53 (9)	59 (10)	42 (5)

SR=Sinusrhythmus; persist. VHF=persistierendes Vorhofflimmern; parox. VHF=paroxysmales Vorhofflimmern; KHK=Koronar Herzerkrankung; MI=Myokardinfarkt; LVEF=linksventrikuläre Auswurfraction; LAD=linker Vorhof Durchmesser; HLP=Hyperlipidämie; Klasse I/III AA=Antiarrhythmika Klasse I/III; \*p<00.05 persist. VHF gegenüber parox. VHF

### 2.3 Studiendurchführung

A: Bei Patienten mit VHF ist die Analyse von jeweils vier gesondert gewonnenen Blutproben vorgesehen, wobei jeweils ca. 5 ml Vollblut aus einer Unterarmvene entnommen werden:

1. Blutentnahme: Im Rahmen der Routine-Blutentnahme bei der stationären Aufnahme
2. Blutentnahme: 30 min. nach erfolgter Kardioversion
3. Blutentnahme: Im Rahmen der Routine-Gerinnungskontrolle 24h nach Kardioversion
4. Blutentnahme: Im Rahmen der Routine-Gerinnungskontrolle 48h nach Kardioversion

B: Bei gesunden Kontrollpersonen werden jeweils nur einmal ca. 5 ml Vollblut in üblicher Technik aus einer Unterarmvene entnommen.

### 2.4 Elektrische Kardioversion

Elektrische Kardioversion wurde unter Analgosedierung i.v. durchgeführt:

Midazolam (2mg) und  
Etomidate (0.2mg/kg).

Die Patienten wurden mit einem Stromstoß von 360 Joule behandelt (LIFEPAK 10 Physio-Kontrolle, Redmond, USA). Es wurden selbstklebende Hautelektroden (Fast Patch, Physio-Control, Redmond, USA) in einer anterior-posterior Position am Thorax benutzt.

## 2.5 Laboranalytik

Quantifizierung von Zellen, die spezifische Oberflächenmoleküle exprimieren:

- CD34<sup>+</sup>HPCs
- CD117<sup>+</sup>HPCs

Diese Untersuchungen werden unter Verwendung eines etablierten, maschinellen Zellsortierungsverfahrens (FACS) in der Klinik für Hämatologie durchgeführt.

Ebenso wird zur Ermittlung möglicher humoraler Faktoren, die an der Ausschwemmung von CD34<sup>+</sup>HPCs Zellen aus dem Knochenmark beteiligt sind, Serum auf den Gehalt von Cytokinen/Chemokinen (wie stromal cell-derived factor-1, etc.) mittels verschiedener ELISA-Verfahren untersucht. Diese Untersuchungen werden mit Unterstützung durch

das Institut für Experimentelle Innere Medizin durchgeführt.

Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von Markern der Myogenese (MEF-2) werden durch Immunhistochemische Färbung über EnVision™ System (Dako) durchgeführt.

### 2.5.1 Das atriales natriuretisches Peptid Immunoassays

Menschliche SDF-1 $\alpha$ , vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) sowie proANP (1-98) (Biomedica, Wien, Österreich) wurden von kommerziell verfügbaren Immunoassays bestimmt.

#### 2.5.1.1 Testprinzip

Das Kit enthält gereinigte polyklonale Antikörper vom Schaf:

- Erstantikörper sind spezifische Antikörper für proANP(10-19) und an die Mikrotiterplatte gebunden.
- Detektionsantikörper sind spezifisch für proANP(85-90) und mit Biotin markiert.

Als erstes werden die Proben und Detektionsantikörper zusammen in die Wells pipettiert. Das proANP(1-98) in der Probe bindet sich an den Erstantikörper und es entsteht ein „Sandwich“ mit dem Detektionsantikörper. Danach wird ein Waschvorgang zur Entfernung von unspezifischem nicht gebundenem Material durchgeführt. Anschließend wird Streptavidin-Peroxidase zugesetzt und bindet die



Detektionantikörper.

Bei einem weiteren Waschschrift wird das nicht gebundene Konjugate entfernt und anschließend allen Wells Tetramethylbenzidin zugesetzt. Das proANP wird durch eine enzymatische Farbreaktion mit dem Mikrotiterplattenphotom sichtbar. Die Farbentwicklung ist proportional zu der proANP(1-98)-Konzentration.

### **2.5.1.2 Reagenzien-, Probenvorbereitung und Testdurchführung**

- Zur Vorbereitung wurden Leerwert, Standards, Kontrolle und Proben auf dem Protokollblatt eingetragen.
- Alle Reagenzien und Proben wurden auf Raumtemperatur (18-26°C) gebracht.
- Detektionsantikörper (blau) wurden in 13 ml Assaypuffer aufgelöst.
- Waschpufferkonzentrat wurde mit aqua dest. verdünnt, 100 ml Konzentrat wurde zu 900 ml aque dest. zugegeben und gut gemischt.
- Standards wurden in 500 µl aque dest., 15 min. bei Raumtemperatur\* gelöst und gut gemischt.
- Kontrolle (gelbe Schraubkappe) wurde in 500 µl aqua dest., bei Raumtemperatur\* 15 Minuten gelöst und gut gemischt.
- Serumproben 1+4 in Assaypuffer wurden verdünnt ( 10 µl Probe + 40 µl Assaypuffer)
- Je 20 µl Standards, Kontrolle und verdünnte Proben wurden in die entsprechenden Wells pipettiert.
- 100 µl Assaypuffer wurden für den Leerwert in die Wells pipettiert.
- Je 100 µl des Zweitantikörpers (blau) wurde in alle Wells pipettiert (außer Leerwert) und gut geschüttelt.
- Die Strips wurden mit Folie abgedeckt (um Verdunstung zu vermeiden) und bei 37°C 150 min. lang inkubiert.
- Der Inhalt der Wells wurde verworfen und 3x mit je 350 µl verdünntem Waschpulver gewaschen.
- 100 µl Konjugat (rot) wurde in alle Wells pipettiert.
- Die Strips wurden wiederum mit Folie abgedeckt und bei 37°C 1h lang inkubiert.
- Der Inhalt der Wells wurde verworfen und 4x mit je 350 µl verdünntem Waschpulver gewaschen.
- 100 µl Substrat wurden in alle Wells pipettiert und bei Raumtemperatur\* 20

Minuten im Dunkeln inkubiert.

- 50 µl Stopplösung wurde in alle Wells pipettiert und gut geschüttelt.
- Sofort wurde die Extinktion gemessen.

\*Raumtemperatur (18 – 26°C)

## **2.5.2 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Immunoassay**

Eine Methode für die quantitative Bestimmung der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Konzentration im Plasma.

### **2.5.2.1 Testprinzip**

Diese Methode setzt die quantitative Sandwichenzymimmunoassaytechnik ein. Ein monoklonaler Antikörper von der Maus spezifisch für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor ist auf eine Mikroplatte gebunden. Standards und Proben werden in die Wells pipettiert, und jeder vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor wird vom Antikörper gebunden. Nach dem Wegspülen ungebundener Substanzen wird ein für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor spezifischer enzymgebundener polyklonaler Antikörper in die Wells hinzugefügt. Mit dem nächsten Waschvorgang werden ungebundene Antikörperenzyme entfernt. Dann wird eine Substratlösung in die Wells hinzugefügt und die Intensität der Farbe wird gemessen. Die Farbe entwickelt sich proportional zur vaskulären endothelialen Wachstumsfaktormenge (Quantikine).

### **2.5.2.2 Reagenzien-Vorbereitung**

Alle Reagenzien wurden vor der Verwendung auf Zimmertemperatur gebracht.

Waschpuffer:

Zunächst werden durch Vermischen des Konzentrats Kristalle vollständig gelöst. 20 ml des Waschpufferkonzentrats werden mit destilliertem Wasser verdünnt, um 500 ml des Waschpuffers zu erhalten.

Substrate Farblösung:

Reagenzien A und B wurden in gleichem Volumen innerhalb von 15 Minuten vor der Verwendung zusammengemischt. Sie müssen vor Licht geschützt werden. 200 µl der resultierenden Mischung werden pro Well benötigt (Quantikine).

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor Standard:

Um den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor Standard zu rekonstruieren, wurde 1 ml von Calibrator Diluent RD6U verwendet. Dies ergab eine Vorratlösung von 2000 pg/ml. Für Plasma-Proben wurden Polypropylengläser benutzt. 500 µl von Calibrator Diluent RD6U wurden in jedes Glas pipettiert. Die Vorratlösung dient dazu, um eine Verdünnungsreihe zu produzieren (Abb. 4). Vor der nächsten Übertragung jeder Mischung wurde gründlich vermischt. Der unverdünnte Standard war der

höchste Standard (2000 pg/mL). Calibrator Diluent RD6U war der Null-Standard (0 pg/mL) (Quantikine).

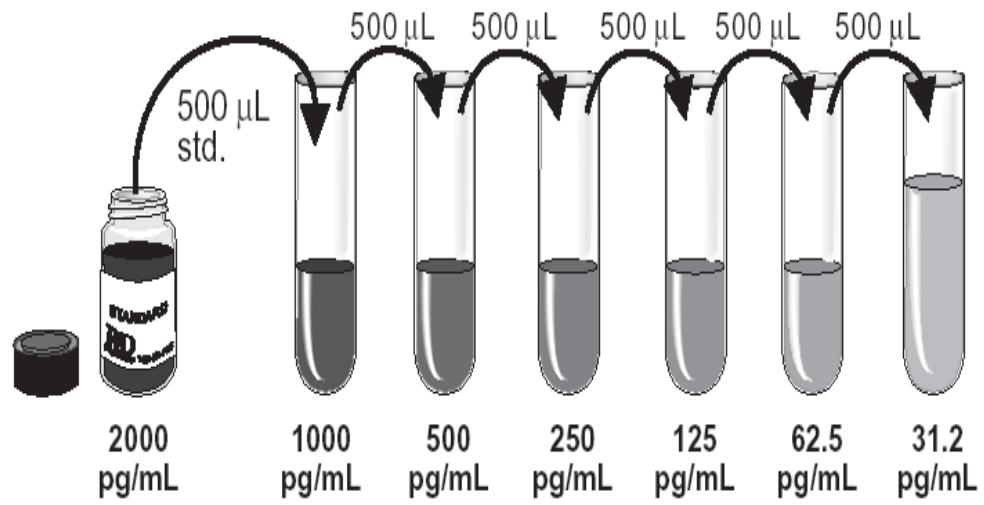


Abb. 4: Verdünnungsreihe, Quelle (Quantikine<sup>®</sup>, Katalog Nr. DVE00.)

### 2.5.2.3 Testdurchführung

Alle Reagenzien und die Proben werden vor der Verwendung auf Zimmertemperatur gebracht.

- Für Plasmaproben wurden 100 µl von der Probenverdünnung RD1W zu jedem Well gegeben.
- Pro Well wurden 100 µl Standardlösung, Kontrolllösung in der Probe hinzugefügt. Nach Abdeckung wurde 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur inkubiert.
- Jeder Well wurde aspiriert und insgesamt dreimal mit Waschpuffer 400 µl gewaschen. Nach der letzten Wäsche werden die übrigen Waschpuffer durch Aspirieren entfernt.
- 200 µl vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Konjugate wurden zu jedem Well hinzugefügt und verschlossen für 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert.
- Aspiration/Waschvorgang werden wiederholt wie oben durchgeführt.
- 200 µl Substratlösung wurden zu jedem Well hinzugefügt. Sie wurden vor Licht geschützt, und für 25 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.
- 50 µl der Stopplösung wurden zu jedem Well hinzugefügt. Wenn Farbänderungen nicht uniform erschienen, wurde sachte geklopft, um gründliches Vermischen sicherzustellen.
- Innerhalb von 30 Minuten wurde die optische Dichte jedes Wells bestimmt (450 nm benutzen).

## **2.5.3 Quantitative Bestimmung des menschlichen stromal cell derived factor-1 $\alpha$ Konzentrationen in Plasma**

### **2.5.3.1 Testprinzip**

Das SDF-1 $\alpha$  im Blut wird mit Hilfe des Sandwichenzym durch Immunoassaytechnik quantitativ bestimmt. Ein monoklonaler Antikörper, spezifisch für SDF-1 $\alpha$ , ist auf einer Mikroplatte vorhanden. Standards und Proben werden in die Wells pipettiert, und jedes präsente SDF-1 $\alpha$  wird von den festliegenden Antikörpern gebunden. Nach dem Wegspülen der ungebunden Substanzen, werden in die Wells enzymbindende polyklonale Antikörper spezifisch für SDF-1 $\alpha$  hinzugefügt. Ein weiterer Waschvorgang erfolgt, um jedes ungebundene Antikörperenzym-Reagenz zu entfernen.

Folgend wird eine Substratlösung in die Wells hinzugefügt. Farbe entwickelt sich proportional zur Menge von SDF-1 $\alpha$  in der anfänglichen Stufe (Quantikine<sup>®</sup> Human SDF-1 $\alpha$  Immunoassay Catalog Number DSA00).

### **2.5.3.2 Probe**

Eisgekühltes EDTA-Blut wurde benutzt, um den humanen SDF-1 $\alpha$  Plasmaspiegel zu bestimmen. Blutproben wurden nach Sammlung bei 1000 x g innerhalb von 30 Minuten zentrifugiert (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) (Quantikine<sup>®</sup> Human SDF-1 $\alpha$  Immunoassay Catalog Number DSA00).

### **2.5.3.3 Reagenzien-Vorbereitung**

Alle Reagenzien werden vor der Verwendung auf Zimmertemperatur gebracht.

Waschpuffer:

Zunächst werden durch Vermischen des Konzentrats Kristalle vollständig gelöst.

Um 500 ml des Waschpuffers vorzubereiten, werden 20 ml Waschpufferkonzentrat mit dest. Wasser verdünnt.

Substratlösung:

Die Farbreagenzien A und B werden in gleichem Volumenverhältnis 15 Minuten vor Verwendung gemischt und vor Licht geschützt aufbewahrt. 200  $\mu$ l der resultierenden Mischung wird pro Well benötigt.

### SDF-1 $\alpha$ Standard:

Eine Stammlösung von 100,000 pg/ml wird durch hinzufügen von 1 ml destilliertem Wasser zu dem SDF-1 $\alpha$  rekonstruiert. Der entstehende Standard wird leicht vermischt

und für 30 Minuten sanfter agitiert.

900  $\mu$ l von Calibrator Diluent RD6Q werden in ein 10,000 pg/ml Röhrchen pipettiert. 500  $\mu$ l von Calibrator Diluent RD6Q werden in die übrigen Röhrchen pipettiert. Die Stammlösung wird benutzt, um eine Verdünnungsfolge zu produzieren (Abb.5). Jedes Röhrchen wird vor der nächsten Übertragung gründlich vermischt. Die 10,000 pg/ml Standardlösung dient als der hohe Standard. Calibrator Diluent RD6Q dient als der Null-Standard (0 pg/ml)(Quantikine<sup>®</sup> Human SDF-1 $\alpha$  Immunoassay Catalog Number DSA00).

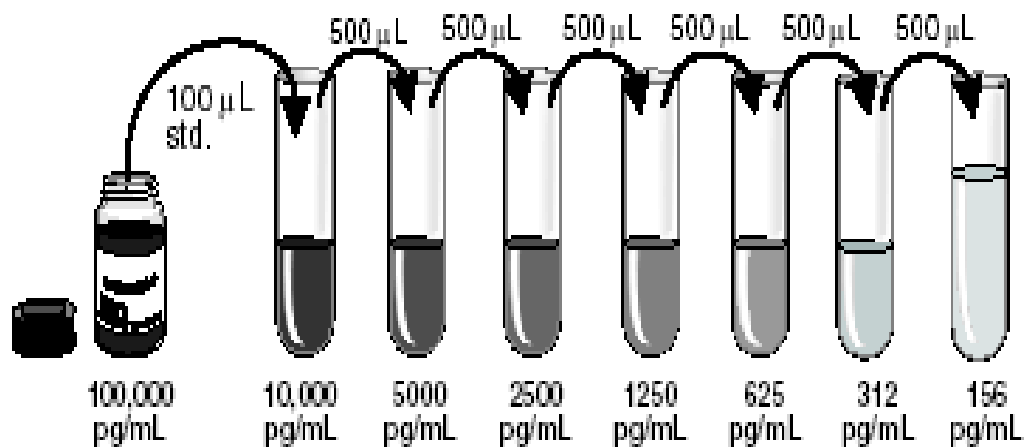


Abb. 5: Verdünnungsreihe, Quelle (Quantikine<sup>®</sup> Human SDF-1 $\alpha$  Immunoassay Catalog Number DSA00)

### 2.5.3.4 Durchführung

Alle Reagenzien und Proben wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Alle Proben und die Standards werden doppelt geprüft.

- Alle Reagenzien, Standards und Proben wurden direkt wie in den vorherigen Sektionen angeordnet vorbereitet.
- 100 µl Probenverdünnungsmittel RD1-55 wurden jedem Well hinzugefügt.
- 100 µl vom Standard oder der Probe wurden pro Well hinzugefügt und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur waagrecht inkubiert.
- Die durch Aspiration gewonnenen Proben wurden in jedem Well mit Waschpuffer (400 µl) gespült. Dieser Prozess wurde drei Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wurde durch Aspirieren jeder übrige Waschpuffer entfernt.
- 200 µl konjugiertes SDF-1 $\alpha$  wurde in jedes Well hinzugefügt und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur im Shaker vermischt.
- Schritt 4 wurde wiederholt.
- 200 µl von der Substratlösung wurden jedem Well hinzugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt inkubiert.
- 50 µl Stopplösung wurden zu jeden Well hinzugefügt und gründlich vermischt.
- Die optische Dichte jedes Wells wurde innerhalb von 30 Minuten ermittelt. (Quantikine® Human SDF-1 $\alpha$  Immunoassay Catalog Number DSA00)



#### 2.5.4 CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>HPCs Analyse

Blutproben (5 ml bis 20 ml) wurden mittels einer 18-Kaliber-Nadel von einer Vena cubitalis abgenommen (Becton Dickinson, BD). Bei Patienten mit persistierendem VHF wurden Blutproben vor sowie 10 Minuten, 24h und 48h nach der Kardioversion entnommen. Bei sieben Patienten wurden Blutproben auch 59+19 Tage nach der Kardioversion entnommen.

Die Analyse von HPCs wurde in verschiedenen Publikationen diskutiert (Leuner et al. 1998): Es wurden 50µl EDTA Blutproben mit einem Nukleinsäure-Farbstoff, CD45 peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Phycoerythrin (PE) (ProCOUNT CD34<sup>+</sup>HPCs Reagenz, Becton Dickinson Immunocytometry Systeme, San Jose, CA) im TRUCOUNT Tube (Becton Dickinson) inkubiert.

Das Kontroll-Reagenz (Nukleinsäure-Farbstoff,  $\gamma$ 1-PE und CD45-PerCP) wurde benutzt, um die Menge unspezifischer Antikörperbindungen zu messen. Nach Lyse der Erythrozyten mit Lyselösung (Becton Dickinson) wurden die Proben durch FACS gemessen. Die absolute Anzahl von CD34<sup>+</sup>HPCs in den Proben wurde durch das Teilen der Anzahl von CD34<sup>+</sup>HPCs Ereignissen durch die Anzahl fluoreszierender Ereignisse und das Multiplizieren mit der fluoreszierenden Ereigniskonzentration bestimmt. Das ProCOUNT Software System (Becton Dickinson) wurde benutzt, um Fakten zu erwerben und zu analysieren.

Für CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>HPCs Quantifikation wurden 50 µl periphere Blutproben mit FITC-CD34 und PE-CD117 (Becton Dickinson) etikettiert. Nach Zell-Lyse wurden Durchflußzytometrieanalysen (Becton Dickinson) durch einen FACS Calibur (Becton Dickinson) durchgeführt. Listenformdaten wurden durch die CellQuest-Software (Becton Dickinson) erworben.

### 2.5.4.1 Probenvorbereitung

- 100 µl Blut wurden für die CD34<sup>+</sup> Zellzahlbestimmung benötigt (50 µl pro Anfärbung/Röhrchen).
- Das antikoagulierte Blut wurde bei Raumtemperatur bis zur Färbung gelagert.

### 2.5.4.2 Färbung der Zellen

- Zwei ProCOUNT™ Röhrchen werden beschriftet:
  - ein Röhrchen mit CD34<sup>+</sup>
  - das andere Röhrchen mit Kontrollen.
- In das CD34<sup>+</sup> markierte Röhrchen wird 20 µl CD34<sup>+</sup> Reagenz gegeben, und 20 µl des Kontroll- Reagenzes in das mit Kontrolle markierte Röhrchen an der Innenseite pipettiert.
- In jedes Röhrchen wurde jeweils 50 µl Blutprobe an der Innenseite pipettiert. Für jedes Röhrchen wurde eine neue Pipettenspitze verwendet.
- Die Röhrchen werden mit Plastikkappen verschlossen, gut gemischt und für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.
- In jedes Röhrchen werden 450 µl 1x FACLyse gegeben (Lyse von Erythrozyten).
- Die Röhrchen werden mit Plastikkappen verschlossen, gut gemischt und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert.
- Die Proben wurden sofort nach der Anfärbung am Durchflusszytometer gemessen.

## 2.5.5 Zellkultur und Immunozytologie

### 2.5.5.1 Isolierung der mononuklearen Zellen aus dem entnommen Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation

Für die Gewinnung aus dem Vollblut und den Erhalt von menschlichen peripheren MNC-Kulturen gibt es eine Anzahl von Methoden. Normalerweise sterben Blutzellen in der Kultur ab. Durch Unterstützung von stimulierenden Mitogenen, die meist aus Pflanzenlectine bestehen, können die MNC über mehrere Teilungsschritte bis 5 mal in der Kultur gehalten werden.

Das Prinzip der Gewinnung der MNC-Kulturen ist die Dichtegradientenzentrifugation, die Trennung der MNC von den Granulozyten und Erythrozyten:

- 3 Blutbild-Röhrchen mit EDTA, die vom Probanden entnommen wurden, werden in Falcon-Röhrchen pipettiert.
- In jedem Falcon-Röhrchen werden 3 ml Ficoll-paque<sup>TM</sup> Plus als Lymphozytentrennmedium pipettiert.
- Alle 3 Falcon-Röhrchen werden in einem sterilen Röhrchen (TPP) gesammelt, 15 ml RPMI 1640 dazu gegeben und gut gemischt.
- 9 ml Blut-RPMI werden 3 ml Ficoll-paque<sup>TM</sup> Plus pipettiert.
- Sie werden für 20 Minuten zentrifugiert (Temperatur 18C°, 1400 Drehung, Bremse auf Null). Es entstehen dabei 4 Phasen: von oben nach unten:
  1. Plasma
  2. ein weißlicher Ring (MNC)
  3. Lymphozytentrennmedium
  4. Erythrozyten und Granulozyten als Pellett.
- Der weißliche Ring mit den MNC wird mittels einer neuen Pasteurpipette abgesaugt, und in ein neues Zentrifugenglas pipettiert.
- Die Probe wird durch 10 ml RPMI 1640 ausgewaschen, und für 5 Minuten zentrifugiert (Temperatur 18C°, 1400 Drehung, Bremse auf Null).

- Der Überstand wird verworfen, wieder 10 ml RPMI 1640 pipettiert und für 5 Minuten zentrifugiert (Temperatur 18°C, 1400 Drehung, Bremse auf Null). Ziel der letzten beiden Schritte ist das Ficoll–Auswaschen. Es dient somit der Aufreinigung der Proben.
- Der Überstand wird entfernt und 250 µl Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium zugefügt.

### 2.5.5.2 Herstellung der Agarkulturen

Nach Dichtegradientenzentrifugation wird das Pellett im Medium resuspendiert und auf eine Zellzahl von 1 Million Zellen /ml eingestellt.

- Nach Bestimmung der Zellzahl werden 300 µl dieser Probe in ein 3 ml Methocult™ gegeben (GF H4434, rh scf \*, rh GM-csf, rh IL-3, Borine serum Albumin, Methylcellulose in Iscove`s MDM, rh erythropoietin, L-Glutamin). Dies wird 2 mal durchgeführt.
- Jeweils 1,1 ml werden in sterile Petrischalen ausplattiert und im Blutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit zum Wachstum kultiviert.
- Nach der Inkubationszeit der Agarkulturen wird mit Hilfe einer Rasterpetrischale unter dem Mikroskop die Anzahl der gewachsenen Kolonien/ml ausgewertet.

### **2.5.5.3 Zellkultur und Immunozytologie**

Das Blut von 8 Patienten (4 persist. VHF, 4 SR) wurde durch Ficoll-Paque<sup>TM</sup>Plus (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) und Zentrifugierung in Zellschichten getrennt. Danach wurde es mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in Iscove`s Dulbecco`s medium mit 2% fetalem Serum (Stem Cell Technologies, Vancouver) und Methylcellulose (MethocultTMGF H4434) kultiviert. Methoden von CFU-GM-Proben wurden schon beschrieben (Ema et al. 1990). Nach 4 Tagen in der Kultur wurden die Zellen Zentrifugierung, in Methanolacetonformalinmischung fixiert und verfärbten sich durch die Bindung an den myocyte enhancer Faktor (MEF-2) (Santa Cruz, Marseille, France), ANP (Penninsula Laboratories, CA) und CD31 (DAKO, Hamburg, Deutschland). Es wurde dazu die APAAP-Methode benutzt (Dako En Vision<sup>TM</sup> System) (Dyson et al. 1994).

### **2.5.5.4 Myocyte enhancer factor-2 (MEF-2)**

MEF-2 ist ein Transkriptionsfaktor. Er ist an der Differenzierung und Entwicklung von Muskelzellen beteiligt und wird in den Zellkernen der Herzmuskulatur exprimiert. Mutationen innerhalb des MEF-2 Gens korrelieren mit einem erhöhten Risiko für Herzgefäßerkrankungen (Wang et al. 2003, Bhagavatula et al. 2004, Gonzalez et al. 2006).

### **2.5.5.5 Prinzipien des Verfahrens**

Die immunohistochemische Färbung kann vorhandene Antigene an Zellen nachweisen. Diese Technik basiert auf der Immuno-Reaktivität. Die Antikörper und die Enzyme oder Enzym-Komplexe reagieren mit farblosem Substrate-Chromogen, um ein farbiges Endprodukt zu produzieren. Das DAKO EnVision<sup>TM</sup> System AP wurde hier benutzt, ein AP etikettiertes Polymer, das zu sekundären Antikörpern konjugiert wird.

Die Proben wurden zuerst inkubiert und mit primären Antikörpern von Kaninchen verdünnt. Nach der Inkubationszeit wurden der markierten Polymer Antikörper zugefügt und für 10 Minuten inkubiert. Nach 5 bis 30 Minute zeigte sich eine Verfärbung. Die Benutzung von rot-farbigem Chromogen beschleunigt die Färbung an der Antigenstelle.

### 2.5.5.6 Immunhistochemische Färbung über EnVision™ System (Dako)

- Fixierung mit Methanol-Aceton-Formalin (19:19:2) bei Raumtemperatur 60sec.
- Spülen mit Aqua dest
- Primärantikörper hinzufügen und bei Raumtemperatur 60 Min. inkubieren
- Spülen mit TBS-Puffer (Wash buffer solution)
- Sekundärantikörper (Labelled Polymer AP) hinzufügen und bei Raumtemperatur 60 Min. inkubieren
- Spülen mit TBS-Puffer
- Substratlösung (Fast Red) hinzufügen und bei Raumtemperatur 25 Min. inkubieren
- Spülen mit Aqua dest
- Gegenfärbung (Hämatoxylin) hinzufügen und 10 Min. inkubieren
- Mit Leitungswasser spülen und 10 Min. inkubieren
- Aquatex ( wässriges Eindeckmedium) hinzufügen

## 3. Statistik

### 3.1 Statistische Analyse

Alle Werte werden als mittlere Standardabweichung (SD) ausgedrückt. Die Varianzanalyse (ANOVA) sowie repeated measure ANOVA wurde benutzt, um Unterschiede zwischen Gruppen und innerhalb der Gruppen zu bewerten. Ein Wert von  $P < 0.05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

## 4. Ergebnisse

Folgende Tabelle bietet einen ersten Überblick der Untersuchungsergebnisse, die in folgenden Kapiteln erörtert werden.

	Persist. VHF	Parox. VHF	48h nach erfolgr. CV
CD34 <sup>+</sup> HPCs	↑	↔	↓
CD34 <sup>+</sup> HPCs/ CD117 <sup>+</sup> HPCs	↔	↔	↔
SDF-1 α	↑	↑	↓
ANP	↑	↔	↓
MEF-2	↑	-	-
VEGF	↔	↔	↑

Tab. 2 : Untersuchungsergebnisse im Überblick

### 4.1 Wirkung von Vorhofflimmern und Elektrischer Kardioversion auf HPCs

Bei Patienten mit persistierendem VHF ist der Ausgangswert des CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel signifikant erhöht (persist. VHF:  $7.0 \pm 2.3 \times 10^3$ /ml gegenüber SR:  $5.0 \pm 1.6 \times 10^3$ /ml;  $P < 0.01$ ). Im Vergleich dazu gab es keinen Unterschied zwischen paroxysmalem VHF und SR (parox VHF:  $3.6 \pm 1.3 \times 10^3$ /ml gegenüber SR:  $5.0 \pm 1.6 \times 10^3$ /ml;  $P = \text{ns}$ ) (Abb. 1A). Der CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>HPCs Spiegel zeigte keine Unterschiede in den verschiedenen Gruppen (persist. VHF:  $0.19 \pm 0.12 \times 10^3$ /ml, parox. VHF:  $0.14 \pm 0.11 \times 10^3$ /ml, SR:  $0.26 \pm 0.21 \times 10^3$ /ml;  $P = \text{ns}$ ) (Abb. 1A). Die reine Gabe der Sedativa Midazolam und Etomidate änderten die CD34<sup>+</sup>HPCs oder CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>HPCs Spiegel nicht.

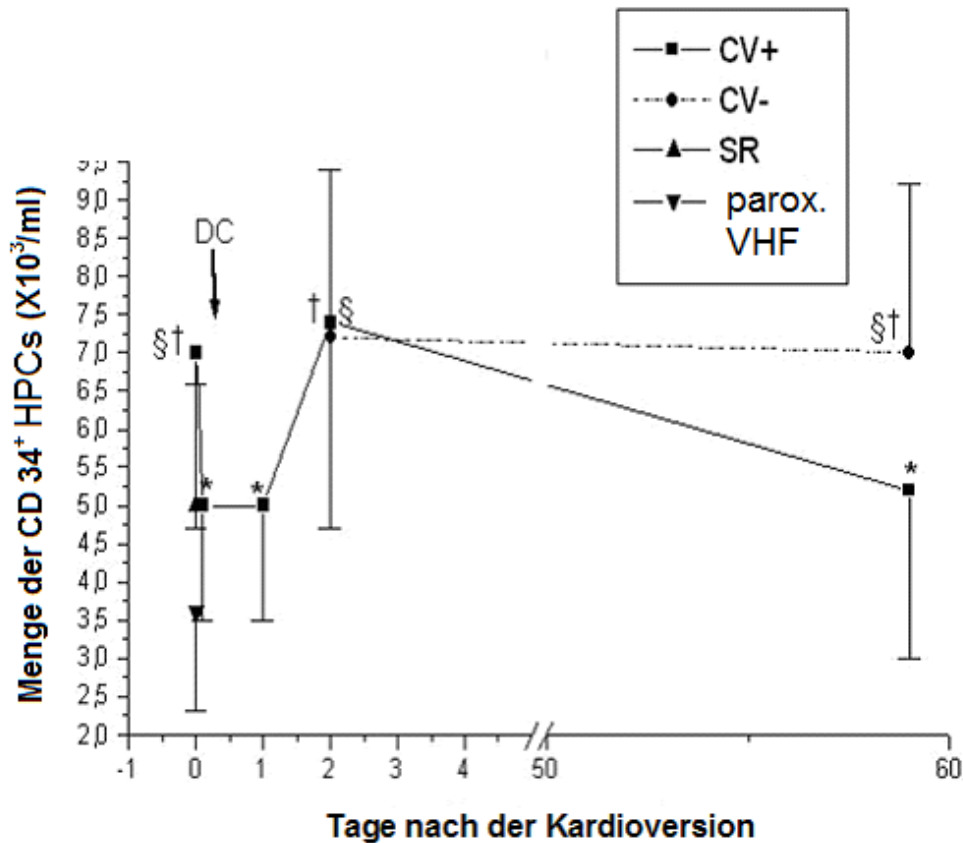


Abb 1A: Änderungen der CD34<sup>+</sup>HPCs bei Patienten mit persistierendem VHF vor und nach der Kardioversion im Vergleich zu Patienten mit SR und paroxysmalem VHF

(\*  $P < 0.01$  vs. Ausgangswert, †  $P < 0.05$  vs. SR, ‡  $P = 0.07$  vs. Ausgangswert, §  $P < 0.05$  vs. Parox. VHF, #  $P = 0.06$  vs. parox. VHF)

14 von 17 Patienten (82%) mit persistierendem VHF wurden erfolgreich in einen SR konvertiert. Die Kardioversion war in den übrigen Fällen (18%) 3 von 17 Patienten erfolglos. Keiner der 14 Patienten mit erfolgreicher Kardioversion hatte während der Nachuntersuchung eine Wiederholung von VHF. Zehn Minuten nach einer Kardioversion (Durchschnitt: 1DC, Reichweite: 1 bis 3 DC; totale mittlere Energie:  $487 \pm 253$ J) nahm die Menge von CD34<sup>+</sup>HPCs bei allen Patienten signifikant ab (Abb. 1A). Reduzierte CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel wurden noch nach 24h festgestellt ( $7.0 \pm 2.3 \times 10^3$ /ml gegenüber 24h:  $5.0 \pm 1.5 \times 10^3$ /ml;  $P < 0.05$ ). Interessanterweise konnte die Abnahme ohne Rücksicht auf das Ergebnis der Kardioversion festgestellt werden (CV(+):  $5.5 \pm 1.7 \times 10^3$ /ml gegenüber CV(-):  $5.0 \pm 0.9 \times 10^3$ /ml;  $P = ns$ ). Die Abnahme an CD34<sup>+</sup>HPCs war bei vier Patienten signifikant, die mehr als einer Kardioversion erhielten (1DC:  $-17 \pm 14\%$  gegenüber  $\geq 2$ DC:  $-45 \pm 24\%$ ;  $P < 0.05$ ). Nach dem vorübergehend abfallenden Spiegel, nahm der CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel innerhalb von 48h (24h:  $5.0 \pm 1.5 \times 10^3$ /ml gegenüber 48h:  $7.4 \pm 2.7 \times 10^3$ /ml;  $P < 0.05$ ) bei allen



Patienten zu. Nach erfolgreicher Kardioversion nahmen die CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel während der Nachuntersuchung ab ( $-32\pm 23\%$ ;  $P<0.05$ ) und erreichten ähnliche Spiegel wie bei dem SR (CV(+):  $5.6\pm 2.2\times 10^3/\text{ml}$  gegenüber SR:  $5.0\pm 1.6\times 10^3/\text{ml}$ ;  $P=\text{ns}$ ). Im Vergleich dazu blieben die CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel nach erfolgloser Kardioversion ( $n=3$ ) erhöht (Abb. 1A). Der Ausgangswert vom CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel beeinflusste den Erfolg der Kardioversion nicht.

Der CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>HPCs Spiegel nahm innerhalb von 48h nach der Kardioversion flüchtig zu ( $0.19\pm 0.12\times 10^3/\text{ml}$  gegenüber 48h:  $0.59\pm 0.39\times 10^3/\text{ml}$ ;  $P<0.01$ ) und fiel während der Nachuntersuchung  $0.16\pm 0.04\times 10^3\text{cells}/\text{ml}$  ab (Abb. 1B). CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>HPCS wurden nicht vom Erfolg der Kardioversion beeinflusst.

Mengen von CD34<sup>+</sup>HPCs korrelierten nicht mit den klinischen Variablen wie Alter, VHF-Dauer, Vorhofgröße, linksventrikulärer Auswurfraction (EF) oder medikamentöse Therapie.

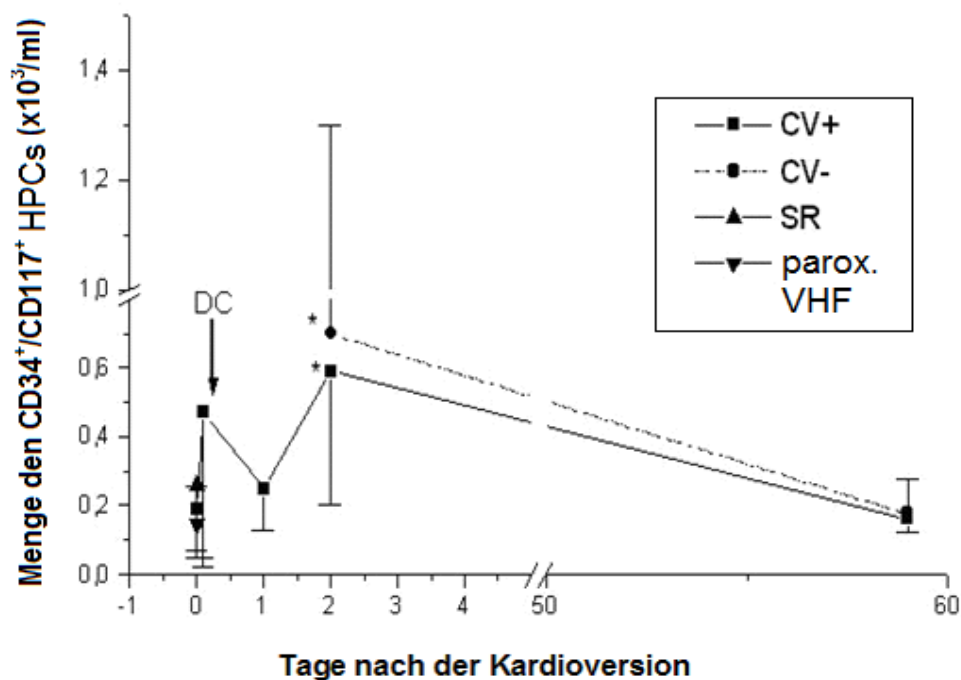


Abb. 1B: Änderung der CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> HPCs bei Patienten mit persistierendem VHF vor und nach der Kardioversion im Vergleich zu SR und paroxysmalem VHF

(\*  $P<0.01$  vs. Ausgangswert, †  $P<0.05$  vs. SR, ‡  $P=0.07$  vs. Ausgangswert, §  $P<0.05$  vs. Parox. VHF, #  $P=0.06$  vs. parox. VHF)

## 4.2 SDF-1 $\alpha$ -Spiegel

Die höchsten Werte des SDF-1 $\alpha$ -Spiegels wurden während des persistierenden VHF gemessen (persist. VHF: 2057.4 $\pm$ 514.9 gegenüber SR: 1439.5 $\pm$ 267.4pg/ml;  $P<0.01$ ). Patienten mit paroxysmalem VHF zeigten intermediäre Spiegel (parox. VHF:1891.1 $\pm$ 341.8 gegenüber SR: 1439.5 $\pm$ 267.4pg/ml;  $P<0.05$ ). SDF-1 $\alpha$ -Spiegel begannen nach erfolgreicher Kardioversion zu sinken (Ausgangswert: 2057.4 $\pm$ 514.9 gegenüber 48h: 1963.7 $\pm$ 172.3pg/ml;  $P<0.05$ ), aber blieben nach frustraner Kardioversion während der Nachuntersuchung erhöht (Abb. 1C).

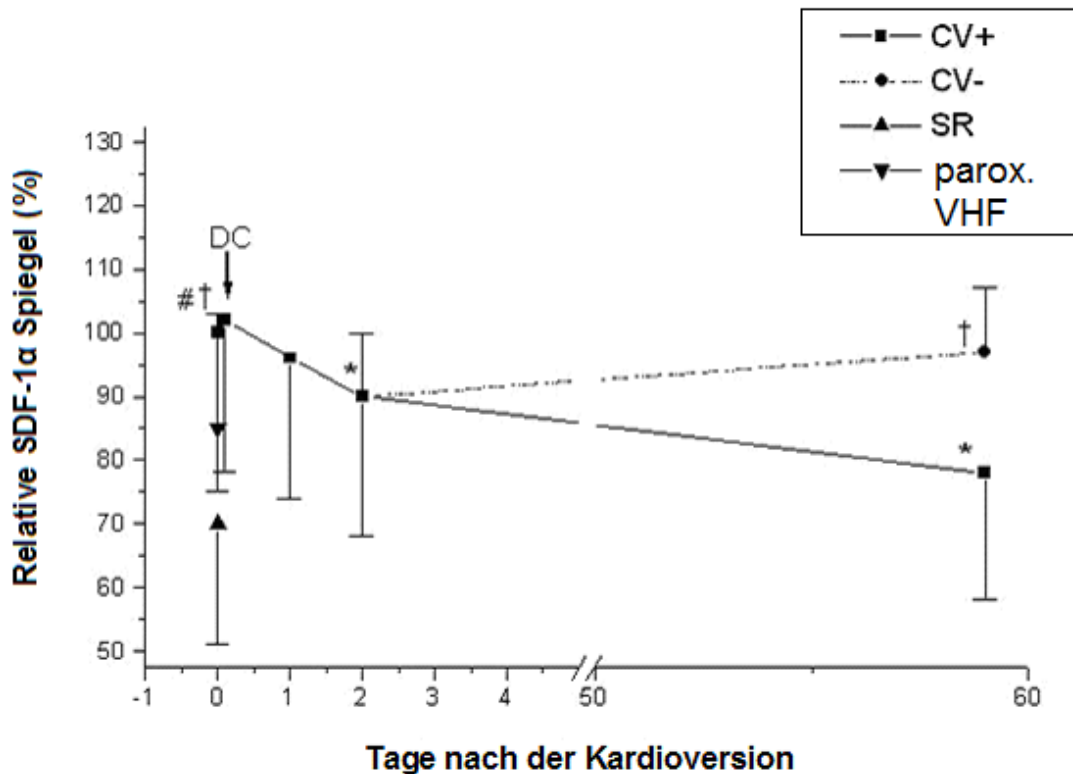


Abb. 1C: Relative Menge von SDF-1 $\alpha$

(\*  $P<0.01$  vs. Ausgangswert, †  $P<0.05$  vs. SR, ‡  $P=0.07$  vs. Ausgangswert, §  $P<0.05$  vs. Parox. VHF, #  $P=0.06$  vs. parox. VHF)

### 4.3 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor

Der VEGF-Spiegel war bei Patienten mit persistierendem VHF nicht signifikant erhöht (persist. VHF:  $27.9 \pm 30.0$  gegenüber SR:  $15.0 \pm 0.5$  pg/ml;  $P=ns$ ). Ähnlich dem Anstieg von  $CD34^+/CD117^+$ HPCs gab es 48h nach Kardioversion einen Trend zur Erhöhung des VEGF-Spiegels (Ausgangswert:  $27.9 \pm 30.0$  gegenüber 48h:  $61.8 \pm 52.0$  pg/ml;  $P=0.07$ ). Innerhalb der Nachuntersuchung fiel der VEGF-Spiegel zum Ausgangswert zurück ( $27.9 \pm 30.0$  gegenüber  $15.2 \pm 1.2$  pg/ml;  $P=ns$ ) (Abb. 1D). Das Ergebnis einer Kardioversion beeinflusst den VEGF-Spiegel nicht signifikant.

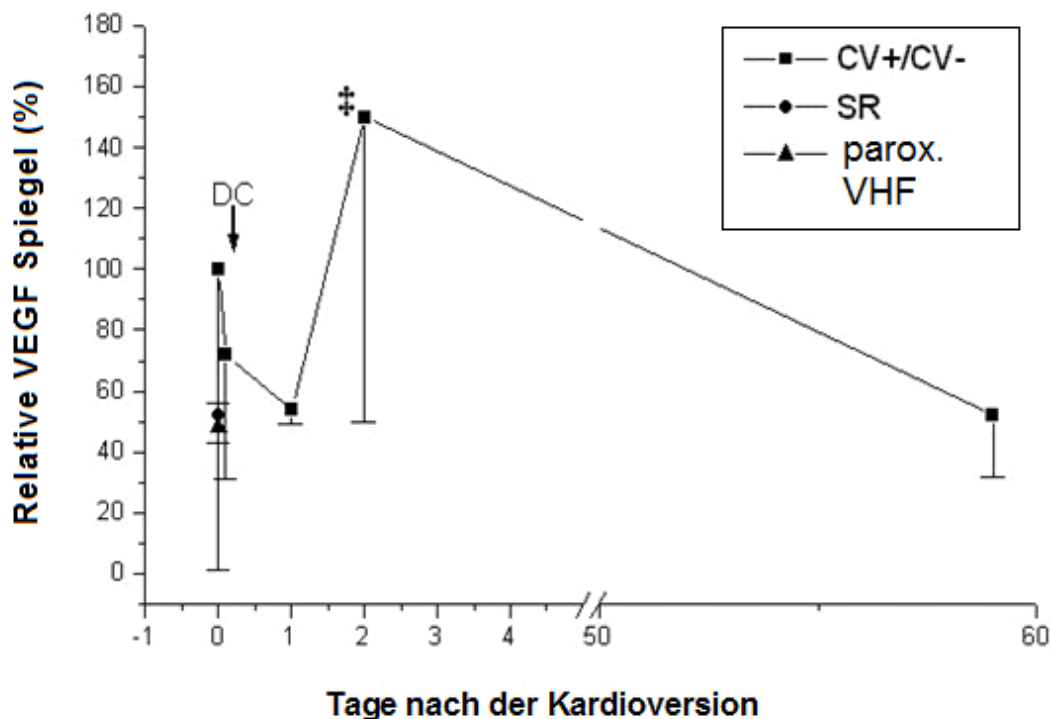


Abb 1D: VEGF bei Patienten mit erfolgreicher Kardioversion , erfolgloser Kardioversion, SR und paroxysmale VHF

(\*  $P < 0.01$  vs. Ausgangswert, †  $P < 0.05$  vs. SR, ‡  $P = 0.07$  vs. Ausgangswert, §  $P < 0.05$  vs. Parox. VHF, #  $P = 0.06$  vs. parox. VHF)

#### 4.4 ANP-Spiegel

Der ANP-Spiegel ist bei Patienten mit persistierendem VHF im Vergleich zu paroxysmalem VHF höher ( $2385.1 \pm 1497$  gegenüber  $1200.8 \pm 450.9$  fmol/ml;  $P < 0.05$ ). Bei paroxysmalem VHF war im Vergleich zu SR kein Unterschied erkennbar ( $1200.8 \pm 450.9$  gegenüber SR:  $883.6 \pm 134.6$  fmol/l;  $P = \text{ns}$ ). Die ANP-Spiegel fielen nach erfolgreicher Kardioversion ab (Ausgangswert:  $2385.1 \pm 1497$  gegenüber 48h:  $1468.2 \pm 508.2$  fmol/ml;  $P < 0.05$ ) (Abb. 1E) und korrelierten mit SDF-1 $\alpha$  ( $r = 0.56$ ;  $P < 0.05$ ) und mit CD34<sup>+</sup>HPCs ( $r = 0.76$ ;  $P < 0.01$ ) (Abb. 1F). Interleukin(IL)-6 und IL-10 waren während des persistierenden VHF in normalen Grenzen (IL-6:  $< 10$  pg/ml; IL-10:  $< 5$  pg/ml;  $n = 5$ ). Eine Kardioversion änderte die IL-6 und IL-10 Spiegel nicht signifikant.

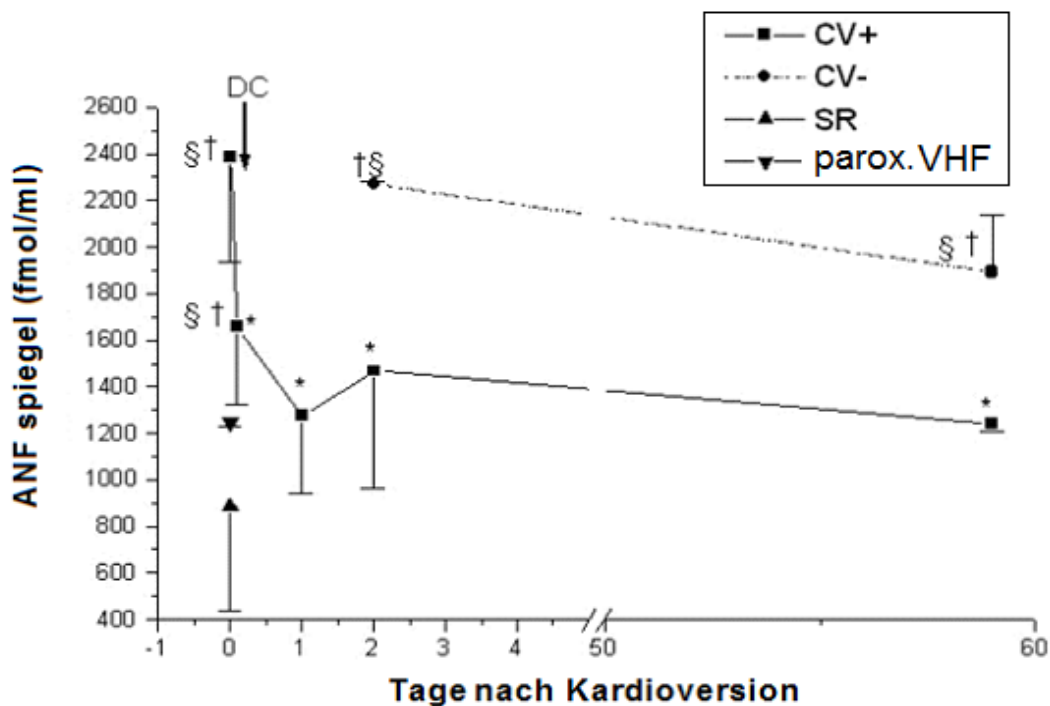


Abb. 1E: ANP (=ANF) bei Patienten mit erfolgreicher Kardioversion, nicht erfolgreicher Kardioversion, SR und paroxysmalem VHF

(\*  $P < 0.01$  vs. Ausgangswert, †  $P < 0.05$  vs. SR, ‡  $P = 0.07$  vs. Ausgangswert, §  $P < 0.05$  vs. Parox. VHF, #  $P = 0.06$  vs. parox. VHF)

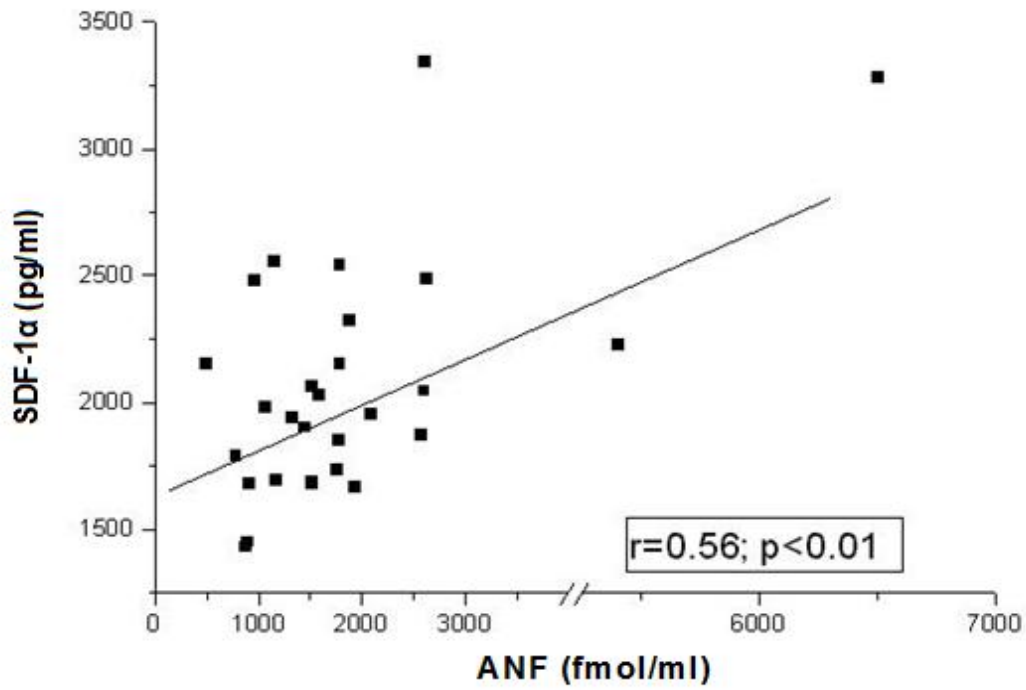


Abb. 1F: Korrelation zwischen SDF-1α und ANP (=ANF) bei VHF (n=29).

(\*  $P < 0.01$  vs. Ausgangswert, †  $P < 0.05$  vs. SR, ‡  $P = 0.07$  vs. Ausgangswert, §  $P < 0.05$  vs. Parox. VHF, #  $P = 0.06$  vs. parox. VHF)

#### 4.5 Zellkulturen

Zellkulturen von Patienten mit VHF zeigten mehr Myocytin enhancer factor-2 (MEF-2) positive Zellen ( $\Delta 85\%$ ; absolute 1.3%) und ANP positive Zellen ( $\Delta 53\%$ ; absolute 2.3%) im Vergleich zu Patienten mit SR (0.7% und 1.5%) (Abb. 2A Stammzellen Histo.). Es gab aber keinen Unterschied in der Anzahl von CD31+Zellen (platelet endothelial cell-adhesion molecule-1; PECAM1) (VHF: absolute 44% gegenüber 42%; n=8). PECAM-1 diente als Marker für Endotheldifferenzierung.

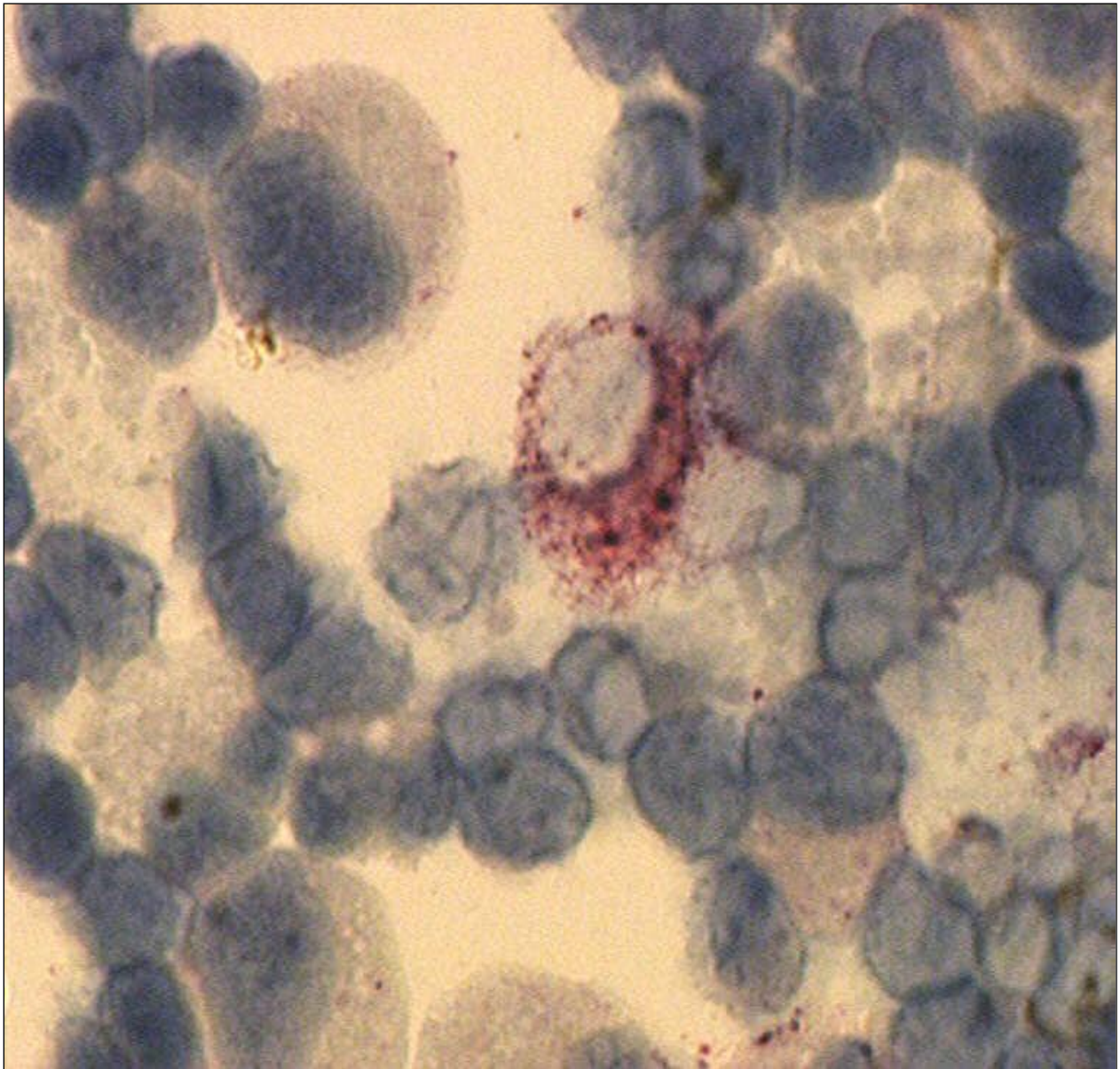


Abb. 2A: Immunofärbung MEF-2 CD34<sup>+</sup>HPCs (zytoplasma rot gefärbt). Vergrößerung 1000 fach

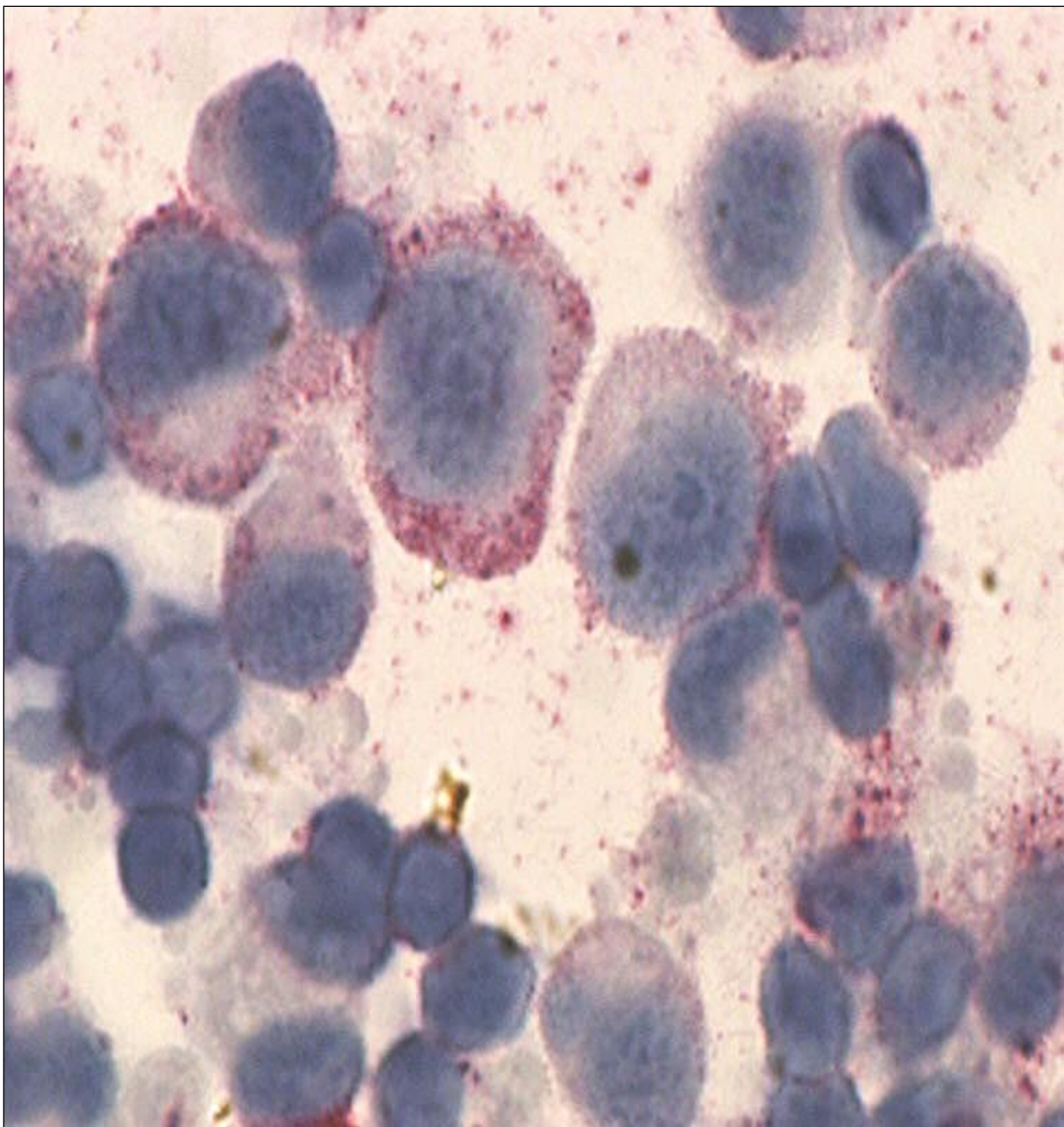


Abb. 2B: ANP CD34<sup>+</sup>HPCs (zytoplasma rot gefärbt). Vergrößerung 1000 fach

## 5. Diskussion

VHF ist weltweit die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung. Etwa eine Millionen Menschen sind derzeit in Deutschland davon betroffen, mit deutlich steigender Tendenz aufgrund der zunehmenden Überalterung unserer Gesellschaft. So wird in den kommenden 30 Jahren eine Verdopplung der Prävalenz erwartet, die derzeit bei einem Prozent liegt. Beunruhigend sind insbesondere die sich in Folge von VHF entwickelnden Thromboembolien, die zu einem Anstieg von Morbidität und Mortalität der Betroffenen um 50% führen und neben den individuellen auch beachtliche sozioökonomische Auswirkungen mit sich bringen (Schotten et al. 2006).

Aufgrund der nur begrenzten Effektivität der bisherigen Therapieoptionen, ist die Identifizierung von Therapiezielen wichtig.

Nachdem in der Onkologie HSZ bereits seit langem erfolgreich therapeutisch eingesetzt werden, gewinnen sie nun zunehmend auch in der Kardiologie an Bedeutung, denn sie sind leicht und ohne ethischen Bedenken zu gewinnen. Nachdem Orlic und seine Mitarbeitern HSZ zunächst im Tierversuch einsetzten, erfolgte die erstmalige intrakoronare Applizierung von humanen CD34<sup>+</sup>HPCs im März 2001 an der Düsseldorfer Universitätsklinik, mit dem Ziel einer Myokardregeneration nach einem Herzinfarkt (Schannwell et al. 2006).

Es folgten mehrere klinische Studien wie die TOPCARE-AMI-Studie, die BOOST-Studie, die ASTAMI-Studie und die REPAIR-AMI-Studie, um mögliche Nutzen der Stammzelltherapie zu erforschen. Die Ergebnisse waren heterogen und zeigten noch keinen klaren Benefit der Stammzelltherapie.

Kronberg zeigte 2004, dass die Mobilisation von CD34<sup>+</sup>HPCs altersabhängig ist. Er entdeckte, dass bei jüngeren Patienten mit akutem Herzinfarkt eine ausgeprägtere Reaktion der CD34<sup>+</sup>HPCs zu beobachten ist als bei den älteren Patienten (Kronberg et al. 2004).

Zwei Jahre später konnte Schannwell eine positive Wirkung der Stammzelltherapie mittels CD34<sup>+</sup>HPCs in der Myokardregeneration bei akuter und chronischer Herzinsuffizienz belegen (Schannwell et al. 2006).

Die MYSTAR-Studie ist die größte und jüngste prospektive-randomisierte Studie.

Sie kombiniert die perkutane intramyokardiale und intrakoronare Applizierung von autologen HSZ bei Patienten mit stark eingeschränkter linksventrikuläre Funktion und akuten myokardialen Infarkt. Das Ergebnis fiel positiv aus. Unter Einsatz der HSZ



trat eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion ein (Gyöngyösi et al. 2009).

Wäre es auch möglich, dass durch den therapeutischen Einsatz von autologen CD34<sup>+</sup>HPCs eine Verminderung oder sogar Beseitigung des VHF erreicht werden könnte?

Um diesem Therapiekonzept zu folgen, müssen zunächst die Zusammenhänge zwischen VHF und CD34<sup>+</sup>HPCs und einer therapeutischen Strategie evaluiert werden.

Dazu konnte vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten, indem sie den Einfluss von VHF auf zirkulierende Stammzellen untersucht.

Bisher war bereits bekannt, dass systemische Blutspiegel von Stammzellen nach Herzschädigung zunehmen (Koch et al. 2001, Quaini et al. 2002) und sich endotheliale sowie myokardiale Vorläuferzellen im Herzen anhäufen (Zahng et al. 2002). Interessanterweise haben Quaini und seine Mitarbeiter demonstriert, dass hohe Anteile von Vorläuferzellen besonders in den Vorhofgeweben vorhanden sind. Ob diese jedoch im Zusammenhang mit VHF stehen, ob VHF sowie eine atriale Myopathie ein ausreichender Stimulus sind, um das Verbreiten von CD34<sup>+</sup>HPCs zu beeinflussen, war bisher unklar. Die vorliegende Studie hat nun erstmalig demonstriert, dass die zirkulierenden CD34<sup>+</sup>HPCs bei persistierendem VHF deutlich erhöht sind. Patienten mit paroxysmalem VHF wiesen dagegen keine signifikanten Veränderungen der Werte auf.

Es lässt sich demnach die Aussage treffen, dass persistierendes VHF die zirkulierenden CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel im Blut ansteigen lässt, paroxysmales VHF dagegen kein ausreichender Stimulus ist.

Weiterhin ist bekannt, dass Patienten mit VHF elektrische, kontraktile und strukturelle Änderungen in den Vorhöfen haben, wie die Grafik von Schotten u.a. zusammenfassend darstellt (Abb. 2) (Leuner et al. 1998, Schotten et al. 2006).

Rostagno und Mitarbeiter zeigten bereits 1996, dass kein signifikanter myokardialer Umbau bei Patienten mit paroxysmalem VHF stattfindet, bei chronischen Arrhythmien dagegen ein myokardialer Umbau zu beobachten ist (Rostagno et al. 1996). Die Ursachen dafür blieben bisher unerforscht.

Die Erkenntnis vorliegender Studie zeigen nun, dass begleitend zu dem

beschriebenen myokardialen Umbau bei persistierendem VHF die Zahl von CD34<sup>+</sup>HPCs im Blut ansteigt (Abb. 6). CD34<sup>+</sup>HPCs könnten demzufolge zur Regeneration der Gewebeschäden bei persistierenden VHF beitragen und eventuell vor der Entwicklung einer atrialen Myopathie schützen.

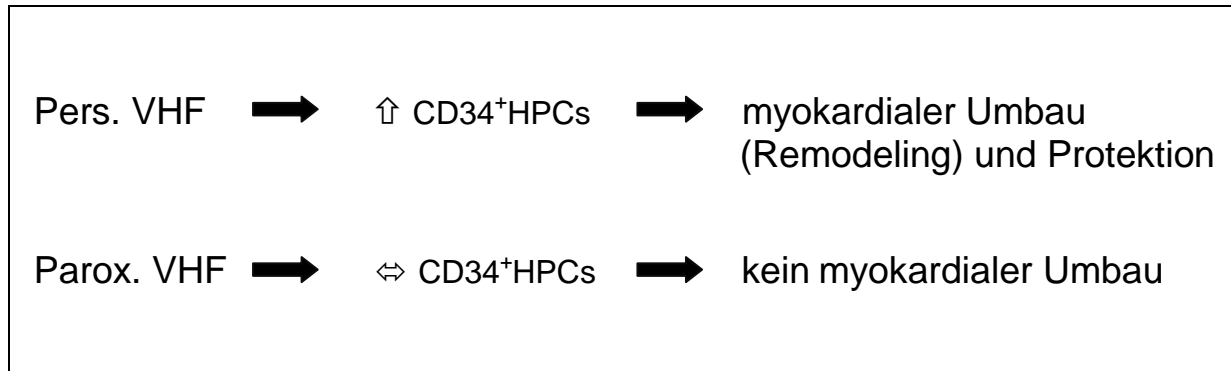


Abb. 6: Umbauprozesse bei VHF

Neben den signifikant erhöhten Werten der CD34<sup>+</sup>HPCs bei Patienten mit persistierendem VHF konnten auch signifikant erhöhte Werte der HPCs-Faktoren, ANP und SDF-1 $\alpha$  im Blut von Patienten mit persistierendem VHF nachgewiesen werden. Zwischen CD34<sup>+</sup>HPCs, SDF-1 $\alpha$  und ANP gab es eine Korrelation ( $r=0,76$ ;  $P<0,01$ ).

Vorhofdehnung bei persistierendem VHF führt zur Ausschüttung von ANP, der vermutlich den SDF-1 $\alpha$  stimuliert und erhöhte CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel im Blut nach sich zieht. Daher ist anzunehmen, dass ANP ein wichtiger Faktor für die Mobilisierung der CD34<sup>+</sup>HPCs bei VHF ist (Abb. 7).

Große Mengen von ANP können zur Entwicklung einer atrialen Amyloidose beitragen (Röcken et al. 2002). Deshalb lässt sich annehmen, dass ANP in Vorhöfen bei VHF zu erhöhten Mengen von MEF-2 beiträgt (Quaini et al. 2002). Auch die Arbeit von Paquin unterstützt, dass das Oxytocin-ANP-System bei der Kardiomyogenese eine Rolle spielt und dass ANP ein wichtiger Faktor für die Freisetzung der CD34<sup>+</sup>HPCs ist (Paquin et al. 2002).

Vorliegende Studie konnte nun erstmals belegen, dass persistierendes VHF die Erhöhung des ANP und SDF-1 $\alpha$  zu stimulieren vermag und mit dem Anstieg der CD34<sup>+</sup>HPCs korreliert.

Damit ist es gelungen erstmalig eine neue pathophysiologische Rolle des ANP zu beschreiben.

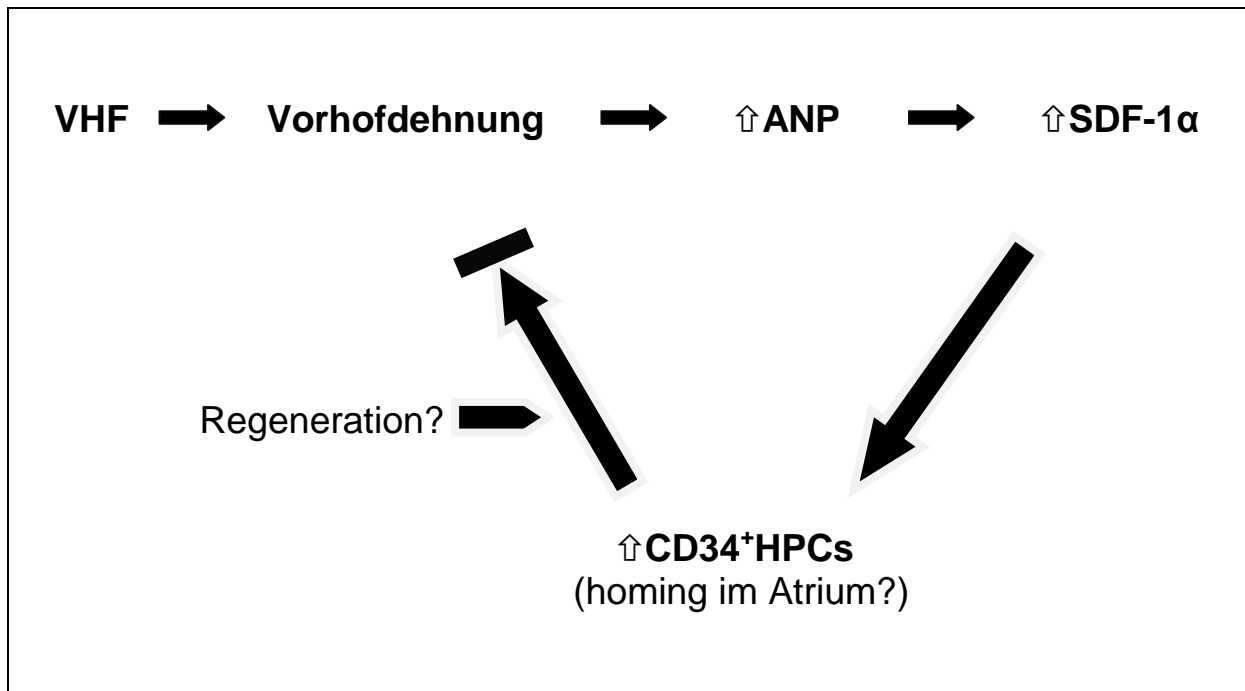


Abb. 7: Wirkung des :ANP und SDF-1α auf CD34<sup>+</sup>HPCs

Wu und seine Mitarbeiter führten 2008 mit unserer Studie identische Untersuchungen durch und kamen dabei zu gleichen Ergebnissen. Auch sie belegten eine signifikante Erhöhung der CD34<sup>+</sup>HPCs, des ANP und SDF-1α bei persistierendem VHF (Wu et al. 2008). Dem folgten neuste Studien von Wang und Mitarbeitern, die ebenso unsere Ergebnisse bestätigten, indem sie eine erhöhte Expression des SDF-1α bei Patienten mit VHF nachgewiesen haben (Wang et al. 2009).

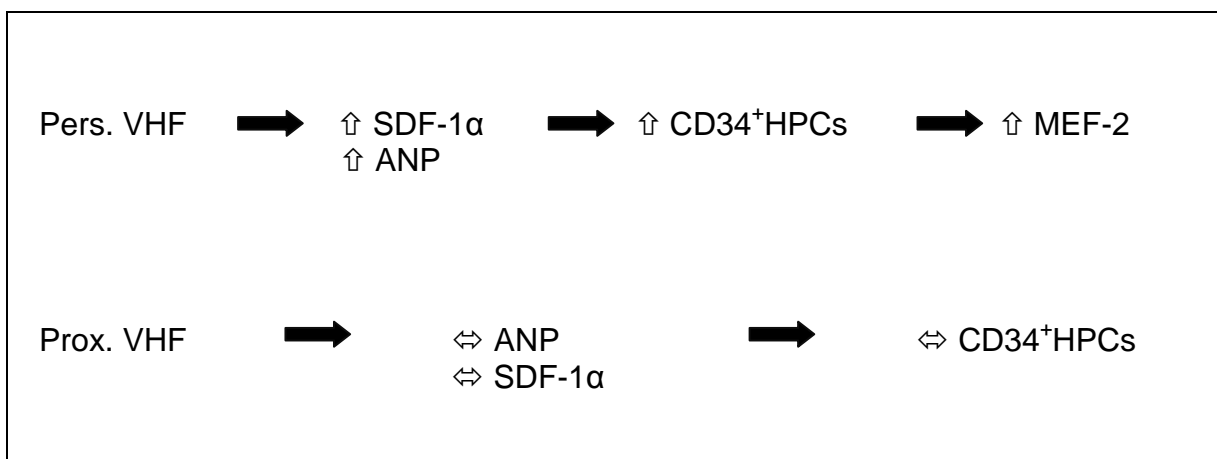


Abb. 8: ANP, SDF-1α, MEF und CD34<sup>+</sup>HPCs bei VHF

Interessanterweise kam es nach Kardioversion unabhängig von ihrem Erfolg kurzzeitig zu einem starkem Abfall der CD34<sup>+</sup>HPCs im Blutspiegel und zur Zunahme von CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>HPCs ohne Bezug zum Herzrhythmus. Bei mehrmaliger

Kardioversion war die Abnahme noch signifikanter, aber ebenso kurzzeitig.

Vermutlich lässt die vaskuläre Wirkung der Kardioversion die Adhäsion von zirkulierenden CD34<sup>+</sup>HPCs am vaskulären Endothelium zunehmen, was die energieabhängige schnelle Senkung von zirkulierenden CD34<sup>+</sup>HPCs nach Kardioversion erklären könnte.

48 Stunden nach Kardioversion war der Abfall rückläufig. Bei erfolgreicher Kardioversion fielen die CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel kontinuierlich ab und erreichten nach Normalisierung des SDF-1 $\alpha$  und ANP Spiegel nach 59+19 Tagen den Normalspiegel.

Letztendlich führte eine erfolgreiche Kardioversion zum SR bei persistierendem VHF langfristig zur Normalisierung des SDF-1 $\alpha$  und ANP Spiegel, gefolgt von der Abnahme der CD34<sup>+</sup>HPCs (Abb.9). Dies zeigt den regulierenden Einfluss von ANP und SDF-1 $\alpha$  auf CD34<sup>+</sup>HPCs bei VHF.

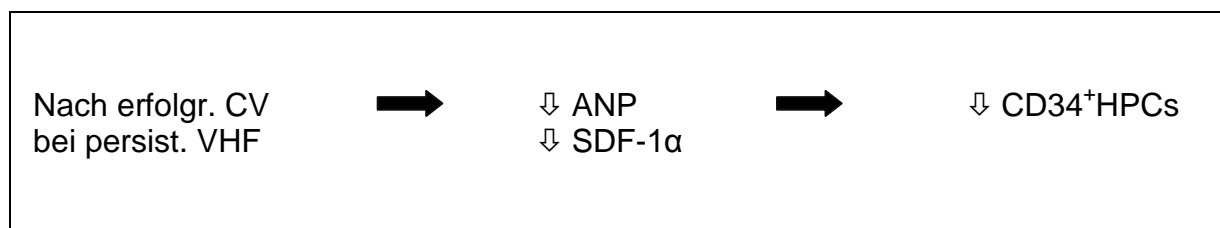


Abb. 9: ANP, SDF-1 $\alpha$  und CD34<sup>+</sup>HPCs nach erfolgreicher Kardioversion

Die VEGF-Werte waren im Gegensatz zu den anderen Faktoren bei VHF konstant geblieben, stiegen aber 48h nach Kardioversion signifikant an, und sanken dann binnen 59 Tage wieder auf den Normalspiegel ab.

Bekannt war bereits, dass erhöhte VEGF Spiegel nach Kardioversion auftreten, welche aus humoralen Reaktionen resultieren, induziert durch die durch Kardioversion ausgelöste endotheliale Schädigung (Gill et al. 2001).

Seko beschrieb erhöhte VEGF-Spiegel bei Patienten mit VHF und vermutete, dass VHF per se die VEGF-Spiegel beeinflussen könnte (Seko et al. 2000). Diese Annahme können die Ergebnisse vorliegender Studie nicht bestätigen.

In unserer Studie wurden erhöhte VEGF-Spiegel in Verbindung mit der Menge von CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>HPCS gebracht, die ihre Zunahme 48h nach Kardioversion erklärt. Eine endotheliale Differenzierung von CD34<sup>+</sup>HPCs wurde jedoch nicht von VHF veranlasst (Abb. 10).

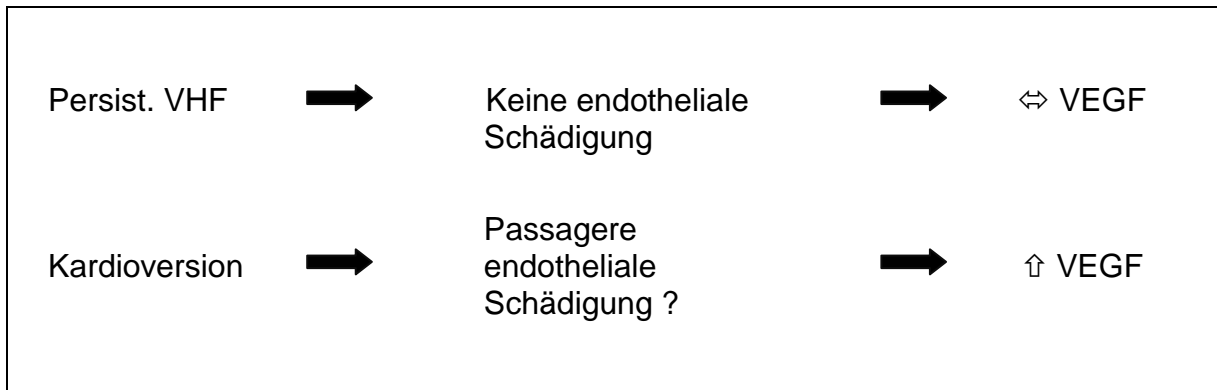


Abb. 10: VEGF-Spiegel bei VHF

Abschließend soll der Frage nachgegangen werden, ob die nachweislich vermehrten CD34<sup>+</sup>HPCs eine Rolle bei der Entstehung des VHF spielen könnten.

Wenn man davon ausgeht, dass geschädigte Kardiomyozyten durch hämatopoetische Stammzellen ersetzt werden, könnte die Zunahme von geschädigten Kardiomyozyten mit zunehmendem Lebensalter zu einer verstärkten Infiltration von CD34<sup>+</sup>HPCs ins Vorhofmyokard führen. Die erhöhten CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel könnten dann für das vermehrte Auftreten von Proarrhythmien verantwortlich sein.

Neuste Studien unterstützen unsere Theorie, dass die CD34<sup>+</sup>HPCs eine Rolle bei der Entstehung von VHF spielen könnten. So konnten Siu und seiner Mitarbeiter nachweisen, dass bei erhöhten CD34<sup>+</sup>HPCs Mengen nach erfolgreicher Kardioversion die Rezidivrate von VHF signifikant höher ist (Siu et al. 2010). Le Menuet und Mitarbeiter zeigten, dass embryonalen Stammzellen die Kontraktilität des Herzens verbessern, aber auch, dass die erhöhte Expression von Mineralocorticoidrezeptoren bei Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen zu vermehrten Arrhythmien beitragen (Le Menuet et al. 2010).

In vitro ist die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung bei humanen Stammzellen um den Faktor 11 langsamer als bei humanen Kardiomyozyten. Außerdem bilden die Stammzellen kein typisches kardiales Aktionspotential (Beeres et al. 2005). Als Folge der Inhomogenität der Erregungsausbreitung zwischen Stammzellen und Kardiomyozyten sind erhöhte Arrhythmien möglich.

Aber andererseits könnte die verzögerte Erregungsausbreitung als Blockade wirken und so für die Therapie von Arrhythmien einsetzbar sein. Auch in der klinischen Praxis zeigte sich unter Therapie mit adulten Stammzellen kein Arrhythmierisiko.

Interessanterweise bilden in Kokultur mit neonatelen Kardiomyozyten alle Stammzellen Gap Junctions aus, mit Ausnahme von den von Satellitenzellen abgeleiteten Myoblasten. Folglich ist die Erregungsausbreitung in Kokulturen von Myoblasten und Kardiomyozyten gestört, was zu kreisenden Erregungen führen kann und die Anfälligkeit zu Arrhythmien bei Applizierung von Myoblasten erhöht wird (Ravens 2006).

Auch hat Zhang bereits 2002 eine Beeinflussung des VHF durch  $CD34^+$ HPCs vermutet und dass sie eventuell eine Rolle bei deren Entstehung spielen könnten (Zhang et al. 2002).

So kann spekuliert werden, dass  $CD34^+$ HPCs bei persistierendem VHF neben einer primär regenerativen und protektiven Wirkung auch proarrhythmische Wirkungen haben (Abb. 11).

In vitro wurde die Entstehung von Arrhythmien bei der Mischung von HPCs und Myocyten von der HPCs-Zahl abhängig gemacht. Bei Mischungen mit 10% HPCs Beteiligung kam es zu Arrhythmien, bei 1% HPCs Beteiligung nicht (Chang et al. 2006).

Es liegt daher nahe, dass es von der Mischkonstellation zwischen  $CD34^+$ HPCs und Gewebezellen abhängig ist, ob eine antiarrhythmische oder proarrhythmische Funktion der  $CD34^+$ HPCs zum tragen kommt. Ob weitere Faktoren hier eine Rolle spielen könnten, ist bisher unklar.

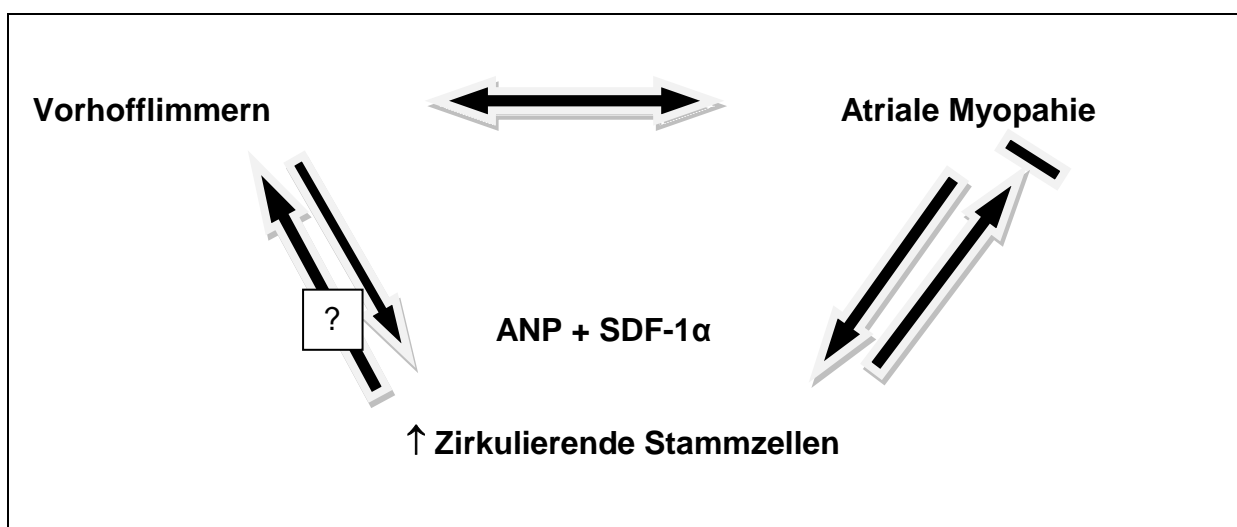


Abb. 11: Wechselseitiges Zusammenspiel zwischen persist. VHF,  $CD34^+$ HPCs und atrialer Myopathie

Wäre es auch möglich, dass durch den therapeutischen Einsatz von autologen CD34<sup>+</sup>HPCs bei VHF eine Verminderung oder sogar Beseitigung des VHF erreicht werden könnte?

Um diesem Therapiekonzept zu folgen, müssen zunächst die Zusammenhänge zwischen VHF und CD34<sup>+</sup>HPCs und einer therapeutischen Strategie evaluiert werden.

## 6. Zusammenfassung

Obwohl VHF als die weltweit häufigste Herzrhythmusstörung gilt, ist es bisher nicht gelungen, dauerhafte Therapieerfolge zu erzielen.

Vorliegende Arbeit will dazu beitragen, mittels Stammzellenforschung die Pathophysiologie des VHF weiter zu entschlüsseln und so neue Therapieoptionen zu erschließen. Durch die Quantifizierung von CD34<sup>+</sup>HPCs, CD117<sup>+</sup>HPCs, dem SDF-1 $\alpha$ , VEGF und ANP liefert sie Einblicke in die pathophysiologischen Zusammenhänge von VHF, CD34<sup>+</sup>HPCs und deren Faktoren sowie die Wirkung von elektrischer Kardioversion.

Es stellte sich heraus, dass bei Patienten mit persistierendem VHF die CD34<sup>+</sup>HPC im Blutspiegel signifikant erhöht waren, im Gegensatz zu Patienten mit paroxysmalem VHF und den Kontrollpersonen.

Der myokardiale Umbau bei Patienten mit persistierendem VHF könnte demnach auf die Differenzierung von CD34<sup>+</sup>HPCs in Kardiomyozyten zurückzuführen sein.

Aber nicht nur die Stammzellen selbst, sondern auch deren Faktoren, der SDF-1 $\alpha$ , MEF-2 und der ANP waren bei Patienten mit persistierendem VHF signifikant erhöht und es zeigte sich eine Korrelation zwischen CD34<sup>+</sup>HPCs, SDF-1 $\alpha$  und ANP.

Damit kann spekuliert werden, dass persistierendes VHF über den Anstieg von ANP konsekutiv über SDF1 $\alpha$  Erhöhung zur Mobilisierung von CD34<sup>+</sup>HPCs führt. In vitro konnte nachfolgend gezeigt werden, dass eine sehr kleine Fraktion der CD34<sup>+</sup>HPCs eine Transdifferenzierung zeigt. Erfolgreiche Kardioversion bei persistierendem VHF führte nach 59+19 Tagen zur Normalisierung der CD34<sup>+</sup>HPCs Spiegel.

Zusammenfassend lässt sich festhalten:

- Persistierendes VHF führt zu signifikantem Anstieg von hämatopoetischen Stammzellen und deren Faktoren im Blut.
- Erfolgreiche Kardioversion führt zu langfristiger Abnahme der hämatopoetischen Stammzellen und deren Faktoren im Blut.
- Der ANP ist vermutlich ein wichtiger Faktor für die Mobilisierung der CD34<sup>+</sup>HPCs.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC:  
The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med.* 185(1). 111-20 (1996)
2. Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA:  
Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature.* 406(6793). 257 (2000)
3. Alessie MA, Lammers WJEP, Bonke FIM, Hollen J:  
Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. Zipes DP, Jalife J, eds. *Cardiac Electrophysiology and arrhythmias.* pp. 265-275. Grune & Stratton. New York. 1985.
4. Alessie M, Ausma J, Schotten U:  
Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 54. 230–246 (2002)
5. Almassi GH, Schowalter T, Nicolosi AC, Aggarwal A, Moritz TE, Henderson WG, Tarazi R, Shroyer AL, Sethi GK, Grover FL, Hammermeister KE:  
Atrial fibrillation after cardiac surgery: a major morbid event? *Ann Surg.* 226(4). 501-513 (1997)
6. Aranki SF, Shaw DP, Adams DH, Rizzo RJ, Couper GS, VanderVliet M, Collins JJ Jr, Cohn LH, Burstin HR:  
Predictors of atrial fibrillation after coronary artery surgery. Current trends and impact on hospital resources. *Circulation.* 94(3), 390-397 (1996)
7. Auer J, Weber T, Berent R, Ng CK, Lamm G, Eber B:  
Risk factors of postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Card Surg.* 20(5). 425-431 (2005)
8. Ausma J, Wijffels M, Van Eys G, Koide M, Ramaekers F, Alessie M, Borgers M:  
Dedifferentiation of atrial cardiomyocytes as a result of chronic atrial fibrillation. *Am J Path.* 152. 985-997 (1997)
9. Beeres SL, Atsma DE, van der Laarse A, Pijnappels DA, van Tuyn J, Fibbe WE, de Vries AA, Ypey DL, van der Wall EE, Schalij MJ:  
Human adult bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental

- conduction block in rat cardiomyocyte cultures. *J Am Coll Cardiol.* 46. 1943-52 (2005)
10. Beier HM:  
Zur Forschung an menschlichen embryonalen Stammzellen und Embryonen. *ReproMed.* 18. 25-31 (2002)
  11. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D:  
Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 98. 946-952 (2001)
  12. Blaauw Y, Gogelein H, Tieleman RG, van Hunnik A, Schotten U, Allessie MA:  
„Early“ class III drugs for the treatment of atrial fibrillation: efficacy and atrial selectivity of AVE0118 in remodeled atria of the goat. *Circulation.* 110. 1717–1724 (2004)
  13. Baenkler HW, Fritze D, Fießl HS, Goeckenjan G, Hamm C, Harenberg J, Hebe J, Hengstmann JH, Hörl WH, Klingmüller D, Köster R, Küchenhoff J, Kuck KH, Ludwig MM, Matzdorf A, Nienaber C, Riede UN, Rudolf G, Schaefer HE, Schuchert A, Schweikert HU, Siebels J, Terres W, Wahl P, Ziegler R:  
Supraventrikuläre Arrhythmien. pp.174-176. *Duale Reihe.* Stuttgart 1999.
  14. Bauernfeind RA, Wyndham CR, Swiryn SP, Palileo EV, Strasberg B, Lam W, Westveer D, Rosen KM:  
Paroxysmal atrial fibrillation in the Wolff-Parkinson-White syndrome. *Am J Cardiol.* 47(3). 562-569 (1981)
  15. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D:  
Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 10. 946-952 (1998)
  16. Bhagavatula MR, Fan C, Shen GQ, Cassano J, Plow EF, Topol EJ, Wang Q:  
Transcription factor MEF2A mutations in patients with coronary artery disease *Hum Mol Genet.* 13(24). 3181-8 (2004)
  17. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM:  
The evolving concept of a stem cell: entity of function? *Cell.* 105. 829-841 (2001)
  18. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA:  
A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* 184. 1101–1109 (1996)

19. Bode F, Sachs F, Franz MR:  
arantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature*. 409(6816). 35-36 (2001)
20. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W:  
Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*. 114(2). 521-32 (1992)
21. Brown, LF, Yeo K, Berse B, Yeo T, Senger DR, Dvorak H, Van De Water L:  
Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J. Exp. Med*. 176. 1375-1379 (1992)
22. Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van De Water L, Senger DR, Dvorak HF, Rosen S:  
Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int*. 42. 1457-1461 (1992)
23. Buckley MG, Sagnella GA, Markandu ND, Singer DR, MacGregor GA:  
Concentrations of N-terminal ProANF in human plasma evidence for ProANF (1–98) as the circulating form. *Clin Chim Acta*. 191. 1-14 (1990)
24. Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, Marian AJ, Iglesias A, Mont L, Brugada J, Girona J, Domingo A, Bachinski LL, Roberts R:  
Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 336(13). 905-911 (1997)
25. Cappato R, Calkins H, Chen SA, Davies W, Iesaka Y, Kalman J, Kim YH, Klein G, Packer D, Skanes A:  
Worldwide survey on the methods, efficacy, and safety of catheter ablation for human atrial fibrillation. *Circulation*. 111(9). 1100-1105 (2005)
26. Cappola AR, Fried LP, Arnold AM, Danese MD, Kuller LH, Burke GL, Tracy RP, Ladenson PW:  
Thyroid status, cardiovascular risk, and mortality in older adults. *JAMA*. 295(9). 1033-1041 (2006)
27. Chang M, Tung L, Sekar R, Chang C, ysyk J, Dong P, Marbán E, Abraham M:  
Proarrhythmic Potential of Mesenchymal Stem Cell Transplantation Revealed in an In Vitro Coculture Model. *Circulation*. 113. 1832-1841 (2006)

28. Christ T, Boknik P, Wohrl S, Wettwer E, Graf EM, Bosch RF, Knaut M, Schmitz W, Ravens U, Dobrev D:  
L-type Ca<sup>2+</sup> current downregulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases. *Circulation*. 110. 2651–2657 (2004)
29. Clark DM, Plumb VJ, Epstein AE, Kay GN:  
Hemodynamic effects of an irregular sequence of ventricular cycle lengths during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*. 30(4). 1039-1045 (1997)
30. Connolly DT, Olander JV, De Larco JD:  
Vascular permeability factor: A unique regulator of blood vessel function. *Journal of Cellular Biochemistry*. 47. 219–223 (1991)
31. Cox JL:  
A perspective on postoperative atrial fibrillation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 11(4). 299-302 (1999)
32. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F:  
Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J*. 16. 6996–7007 (1997)
33. Cummings JE, Schweikert RA, Saliba WI, Burkhardt JD, Kilikaslan F, Saad E, Natale A:  
Brief communication: atrialesophageal fistulas after radiofrequency ablation. *Ann Intern Med*. 144(8). 572-574 (2006)
34. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H:  
A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*. 28(1). 89-94 (1981)
35. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT:  
The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 255(5047). 989-91 (1992)
36. Döhmen G, Reis HE:  
Stammzellen: Forschung im Überblick. *Deutsches Ärzteblatt*. 41. A-2680 / B-2285 / C-2148 (2002)
37. Dyson PG, Ho JQ, Dowse TL, Haylock DN, Juttner CA, To LB:

- The use of the APAAP technique as a rapid indicator of peripheral blood progenitor cell levels. *Pathology*. 26. 296-300 (1994)
38. Ema H, Suda T, Miura Y, Nakauchi H:  
Colony formation of clone-sorted human hematopoietic progenitors. *Blood*. 75(10). 1941-1946 (1990)
  39. Ezekowitz JA, Netrebko PL:  
Antikoagulation in management of atrial fibrillation. *Curr Opin Cardiol*. 18(1). 26-31 (2003)
  40. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Senger DR, Dvorak HF, Brown LF:  
Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF) accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med*. 180(1). 341-346 (1994)
  41. Ferrara N, Henzel WJ:  
Related Articles, Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 161(2). 851-858 (1989)
  42. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW:  
Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*. 13(1). 18-32 (1992)
  43. Ferrara N, Winer J, Burton T:  
Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth factor. *Growth Factors*. 5(2). 141-148 (1991)
  44. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV:  
Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 16. 381-290 (1966)
  45. Furberg CD, Psaty PM, Manolio TA, Gardin JM, Smith VE, Rautaharju PM:  
Prevalence of Atrial Fibrillation in Elderly Subjects, (The Cardiovascular Health Study). *Am J Cardiol*. 74. 236-241 (1994)
  46. Fuster V, Ryden LE, Asinger RW, Cannon DS, Crijns HJ, Frye RL, Halperin JL, Kay GN, Klein WW, Levy S, McNamara RL, Prystowsky EN, Wann LS, Wyse DG, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gregoratos G, Hiratzka LF, Jacobs AK, Russell RO, Smith SC, Klein WW,

- Alonso-Garcia A, Blomstrom-Lundqvist C, De Backer G, Flather M, Hradec J, Oto A, Parkhomenko A, Silber S, Torbicki A:  
American College of Cardiology/American Heart Association/European Society of Cardiology Board. ACC/AHA/ESC guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: executive summary. A Report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines and Policy Conferences (Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in Collaboration With the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *J Am Coll Cardiol.* 38(4). 1231-1266 (2001)
47. Gallagher MM, Camm J:  
Classification of atrial fibrillation. *Am J Cardiol.* 82(8A). 18N-28N (1998)
48. 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.* 88(2). 167-74 (2001)
49. Globits S, Frank H, Pacher B, Huelsmann M, Ogris E, Pacher R:  
Atrial natriuretic peptide release is more dependent on atrial filling volume than on filling pressure in chronic congestive heart failure. *Am Heart J.* 135(4). 592-597 (1998)
50. Go AS, Hylek EM, Phillips KA, Chang Y, Henault LE, Selby JV, Singer DE:  
Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the Anticoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA.* 285(18). 2370-2375 (2001)
51. Goette A, Arndt M, Röcken C, Spiess A, Staack T, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U:  
Regulation of Angiotensin II Receptor Subtypes During Atrial Fibrillation in Humans. *Circulation.* 101. 2678-2781 (2000)
52. Goette A, Staack T, Rocken C, Arndt M, Geller JC, Huth C, Ansorge S, Klein HU, Lendeckel U:  
Increased expression of extracellular signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 35(6). 1669-1677 (2000)
53. Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ:  
Electrical Remodeling in Atrial Fibrillation. Time Course and Mechanisms. *Circulation.* 94. 2968-2974 (1996)

54. González P, García-Castro M, Reguero J, Batalla A, Ordóñez A G, Palop R, I Lozano, Montes M, Álvarez V, Coto E: The Pro279Leu variant in the transcription factor MEF2A is associated with myocardial infarction. *J Med Genet.* 43(2). 167-9 (2006)
55. Gyöngyösi M, Lang I, Dettke M, Beran G, Graf S, Sochor H, Nyolczas N, Charwat S, Hemetsberger R, Christ G, Edes I, Balogh L, Krause KT, Jaquet K, Kuck KH, Benedek I, Hintea T, Kiss R, Préda I, Kotevski V, Pejkov H, Zamini S, Khorsand A, Sodeck G, Kaider A, Maurer G, Glogar D: Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 6. 70–81 (2009).
56. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitoriano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA: Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 97(11). 3354-3360 (2001)
57. Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Metayer P, Clementy J: Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med.* 339(10). 659-666 (1998)
58. Haverkamp W, Breithardt G: *Moderne Herzrhythmustherapie.* Thieme Verlag. 2003.
59. Hindricks G, Kottkamp H: Vorhofflimmern: Wenn Medikamente nicht mehr helfen. *Herz Heute.* 1. 11-16 (2006)
60. Hsu LF, Jais P, Hocini M, Sanders P, Scavee C, Sacher F, Takahashi Y, Rotter M, Pasquie JL, Clementy J, Haissaguerre M: Incidence and prevention of cardiac tamponade complicating ablation for atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 28 (1). 106-109 (2005)
61. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK: Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood.* 97(5). 1227-1231 (2001)

62. Hubl W, Iturraspe J, Martinez GA, Hutcheson CE, Roberts CG, Fisk DD, Sugrue MW, Wingard JR, Braylan RC:  
Measurement of absolute concentration and viability of CD34+ cells in cord blood and cord blood products using fluorescent beads and cyanine nucleic acid dyes. *Cytometry*. 34(3). 121-127 (1998)
63. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA:  
Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 107(11). 1395-1402 (2001)
64. Josephson ME:  
New approaches to the management of atrial fibrillation. The role of the atrial defibrillator. *Circulation*. 98(16). 1594-1596 (1998)
65. Kannel WB, Abbott RD, Savage DD, McNamara PM:  
Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study. *N Engl J Med*. 306(17). 1018-1022 (1982)
66. Kasper C, Sayer HG, Mügge LO, Schilling K, Scholl S, Issa C, Höffken K:  
Combined standard graft-versus-host disease (GvHD) prophylaxis with mycophenolate mofetil (MMF) in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors. *Bone Marrow Transplantation*. 33. 65-69 (2004)
67. Kendall RL, Thomas KA:  
Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90. 10705-10709 (1993)
68. Khargi K, Hutten BA, Lemke B, Deneke T:  
Surgical treatment of atrial fibrillation; asystematic review. *Eur J Cardiothorac Surg*. 27(2). 258-265 (2005)
69. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM:  
Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 18(2). 307-316 (2000)
70. Kopecky SL, Gersh BJ, McGoon MD, Whisnant JP, Holmes DR Jr, Ilstrup DM, Frye RL:  
The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over



- three decades. *N Engl J Med.* 317(11). 669-674 (1987)
71. Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N:  
Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 152(8). 4149-4156 (1994)
  72. 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.* 7(4). 430-436 (2001)
  73. Kondo S, Asano M, Matsuo K, Ohmori I, Suzuki H:  
Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochim Biophys Acta.* 1221(2). 211-214 (1994)
  74. Kronberg K, Gebauer W, Grommes N, Weißmüller T, Reil G:  
Altersabhängige Mobilisation autologer Progenitor Zellen bei akutem Myokardinfarkt. 28. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2004
  75. Kuehnle I, Goodell MA:  
The therapeutic potential of stem cells from adults. *BMJ.* 325. 372-376 (2002)
  76. Laupacis A, Cuddy TE:  
Prognosis of individuals with atrial fibrillation. *Can J Cardiol.* 12. 14A-16A (1996)
  77. Leuner S, Arland M, Kahl C, Jentsch-Ullrich K, Franke A, Hoffkes HG:  
Enumeration of CD34-positive hematopoietic progenitor cells by flow cytometry: comparison of a volumetric assay and the ISHAGE gating strategy. *Bone Marrow Transplant.* 22(7). 699-706 (1998)
  78. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M:  
Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 6. 1229-1234 (2000)
  79. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S:  
Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation.* 100. 87-95 (1999)

80. Lijima K, Yoshikawa N, Connolly DT, Nakamura H:  
Human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells produce vascular permeability factor. *Kidney Int.* 44(5). 959-966 (1993)
81. Lin HJ, Wolf PA, Kelly-Hayes M, Beiser AS, Kase CS, Benjamin EJ, D'Agostino RB:  
Stroke severity in atrial fibrillation. The Framingham Study. *Stroke.* 27(10). 1760-1764 (1996)
82. Lip GY, Lip PL, Zarifis J, Watson RD, Bareford D, Lowe GD, Beevers DG:  
Fibrin D-dimer and beta-thromboglobulin as markers of thrombogenesis and platelet activation in atrial fibrillation. Effects of introducing ultra-low-dose warfarin and aspirin. *Circulation.* 94. 425-431 (1996)
83. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, Del Vecchio S, Lei KJ, Chou JY, Persico MG:  
Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene.* 8(4). 925-931 (1993)
84. Mahe I, Drouet L, Chassany O, Mazoyer E, Simoneau G, Knellwolf AL, Caulin C, Bergmann JF:  
D-dimer: a characteristic of the coagulation state of each patient with chronic atrial fibrillation. *Thromb Res.* 107(1-2). 1-6 (2002)
85. Maier WD, Neuss H, Bilgin Y, Gigler G, Thormann J, Schlepper M:  
Modification of hemodynamics in tachycardiac atrial fibrillation by Metoprolol and Verapamil. *Z Kardiol.* 72(8). 465-470 (1994)
86. Manning WJ, Silverman DI, Katz SE, Riley MF, Come PC, Doherty RM, Munson JT, Douglas PS:  
Impaired left atrial mechanical function after cardioversion: relation to the duration of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 23(7), 1535–1540 (1994)
87. Marshak DR, Gottlieb D, Kiger AA, Fuller MT, Kunath T, Hogan B, Gardner RL, Smith A, Klar AJS, Henrique D, D'Urso G, Datta S, Holliday R, Astle CM, Chen J, Harrison DE, Xix T, Spradling A, Andrews PW, Przyborski SA, Thomson JA, Kunath T, Strumpf D, Rossant J, Tanaka S, Orkin SH, Melchers F, Rolink A, Keller G, Pittenger MF, Marshak DR, Flake AW, Panicker MM, Rao M, Watt FM, Grompe M, Finegold MJ, Kritzik MR, Sarvetnick N, Winton DJ:  
*Stem cell biology.* New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)

88. Mathew JP, Parks R, Savino JS, Friedman AS, Koch C, Mangano DT, Browner WS:  
Atrial fibrillation following coronary artery bypass graft surgery: predictors, outcomes, and resource utilization. MultiCenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *JAMA*. 276(4). 300-306 (1996)
89. Mathisen P, Hall C, Simonsen S:  
Comparative study of atrial peptides ANF (1-98) and ANF (99-126) as diagnostic markers of atrial distension in patients with cardiac disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 53(1). 41-49 (1993)
90. Maximov A:  
Über experimentelle Erzeugung von Knochenmarkgewebe. *Anat Anz*. 28. 607-612 (1906)
91. McEwan PE, Gray GA, Sherry L, Webb DJ, Kenyon CJ:  
Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation*. 98. 2765–2773 (1998)
92. McKay R:  
Stem cells in the central nervous system. *Science*. 276(5309). 66-71 (1997)
93. Midy V, Plouet J:  
Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 199(1). 380-386 (1994)
94. Miyata A, Kangawa K, Toshimori T, Hatoh T, Matsuo H:  
Molecular forms of atrial natriuretic polypeptides in mammalian tissues and plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 129(1). 248-255 (1985)
95. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH:  
Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol*. 264(4 Pt 1). C995-1002 (1993)
96. Movahed MR, Hashemzadeh M, Jamal MM:  
Diabetes mellitus is a strong, independent risk for atrial fibrillation and flutter in addition to other cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 105(3). 315-318 (2005)
97. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T:  
Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(6). 2305-2309 (1994)

98. Naito M, David D, Michelson EL, Schaffenburg M, Dreifus LS:  
The hemodynamic consequences of cardiac arrhythmias: evaluation of the relative roles of abnormal atrioventricular sequencing, irregularity of ventricular rhythm and atrial fibrillation in a canine model. *Am Heart J.* 106(2). 284-291 (1983).
99. Nattel S:  
New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature.* 415. 219-226 (2002)
100. Nelesen RA, Dimsdale JE, Ziegler MG:  
Plasma atrial natriuretic peptide is unstable under most storage conditions. *Circulation.* 86(2). 463-466 (1992)
101. Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi BZ:  
Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res.* 5(1). 89-97 (1994)
102. Oberlin E, Amara A, Bachelierie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B:  
The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature.* 382(6594). 833-835 (1996)
103. Oral H, Knight BP, Tada H, Ozaydin M, Chugh A, Hassan S, Scharf C, Lai SW, Greenstein R, Pelosi F Jr, Strickberger SA, Morady F:  
Pulmonary vein isolation for paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation.* 105(9). 1077-1081 (2002)
104. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P:  
Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(18). 10344-10349 (2001)
105. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P:  
Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 410(6829). 701-705 (2001)
106. Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J:  
Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(14). 9550-9555 (2001)

107. Pappone C, Oral H, Santinelli V, Vicedomini G, Lang CC, Manguso F, Torracca L, Benussi S, Alfieri O, Hong R, Lau W, Hirata K, Shikuma N, Hall B, Morady F:  
Atrio-esophageal fistula as a complication of percutaneous transcatheter ablation of atrial fibrillation. *Circulation*. 109(22). 2724-2726 (2004)
108. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K:  
Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*. 269(9). 6271-6274 (1994)
109. Petersen BE, Terada N:  
Stem cells: a journey into a new frontier. *J Am Soc Nephrol*. 12(8). 1773-1780 (2001)
110. Pittenger MF, Marshak DR:  
Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. *Cold Spring Harbor Laboratory*. 349-374 (2001)
111. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D:  
Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J*. (12). 3801-3806 (1989).
112. Raitt MH, Volgman AS, Zoble RG:  
Prediction of the recurrence of atrial fibrillation after cardioversion in the Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm. Management (AFFIRM) study. *Am Heart J*. 151(2). 390-6 (2006)
113. Ravens U:  
Electrophysiological Properties of stem Cells. *Herz*. 31(2). 123-126 (2006)
114. Robles de Medina EO, Bernard R, Coumel P, Damato AN, Fisch C, Krikler D, Mazur NA, Meijler FL, Mogensen L, Moret P, Pisa Z, Wellens HJ:  
Definition of terms related to cardiac rhythm. *Eur J Cardiol*. 8(2). 127-144 (1978)
115. Rocken C, Peters B, Juenemann G, Saeger W, Klein HU, Huth C, Roessner A, Goette A:  
Atrial amyloidosis: an arrhythmogenic substrate for persistent atrial fibrillation. *Circulation*. 106(16). 2091-2097 (2002)

116. Rosenthal N, Tsao L:  
Helping the heart to heal with stem cells. *Nat Med.* 7(4). 412-413 (2001)
117. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P:  
Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 346(1). 5-15 (2002)
118. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT:  
Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(16). 7533-7537 (1993)
119. Sakurai K, Hirai T, Nakagawa K, Kameyama T, Nozawa T, Asanoi H, Inoue H:  
Left atrial appendage function and abnormal hypercoagulability in patients with atrial flutter. *Chest.*124. 1670-674 (2003)
120. Sandoe E, Sigurd B:  
Klinische Elektrokardiologie der Arrhythmien. pp. 147-148. Bingen 1991.
121. Schannwell C, Ott G, Brehm M, Bartsch T, Strauer B:  
Fünf Jahre autologe intrakoronare Stammzelltransplantation. *Der Internist.* 47. 1087-1092 (2006)
122. Schott RJ, Morrow LA:  
Growth factors and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 27(7). 1155-1161 (1993)
123. Schotten U, Duytschaever M, Ausma J, Eijsbouts S, Neuberger HR, Allessie M:  
Electrical and contractile remodeling during the first days of atrial fibrillation go hand in hand. *Circulation.* 107. 1433–1439 (2003)
124. Schotten U, Lamorgese M, Castel L, Harks E, Goegelein H, Van Wagoner DR:  
The Ito/IKur blocker AVE0118 increases atrial contractility by enhancement of reverse mode Na/Ca exchange. *Heart Rhythm.* 2. 13 (2005)
125. Schotten U; Dobrev D; Kirchhof P; Käbb S; Lewalter T, Goette A:  
Vorhofflimmern: Grundlagenforschung liefert neue Therapieansätze  
Optimising the management of atrial fibrillation—insights from a national expert network. *Deutsches Ärzteblatt.* 103(25). A-1743 / B-1491 / C-1443 (2006)
126. Seko Y, Nishimura H, Takahashi N, Ashida T, Nagai R:

- Serum levels of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in patients with atrial fibrillation undergoing defibrillation therapy. *Jpn Heart J.* 41(1). 27-32 (2000)
127. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 219(4587). 983-985 (1983)
  128. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF : Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 12(3-4). 303-324 (1993)
  129. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD: Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Nat Acad Sci USA.* 95. 13726-13731 (1998)
  130. Sharif MN, Wyse DG: Atrial fibrillation: overview of therapeutic trials. *Can J Cardiol.* 14(10). 1241-1254 (1998)
  131. 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.* 103(23). 2776-2779 (2001)
  132. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T. Honjo T: Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics.* 28(3). 495-500 (1995)
  133. Shweiki D, Itin A, Neufeld C, Gitay-Goren H, Keshet E: Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally-mediated angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 91. 2235-2243 (1993)
  134. Siebert J, Anisimowicz L, Lango R, Rogowski J, Pawlaczyk R, Brzezinski M, Beta S, Narkiewicz M: Atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting: does the type of procedure influence the early postoperative incidence? *Eur J Cardiothorac Surg.* 19(4). 455-459 (2001)

135. Siu CW, Watson T, Lai WH, Lee YK, Chan YH, Ng KM, Lau CP, Lip GY, Tse HF :  
Relationship of circulating endothelial progenitor cells to the recurrence of atrial fibrillation after successful conversion and maintenance of sinus rhythm. *Europace*. 12(4). 517-21 (2010)
136. Somloi M, Tomcsanyi J, Nagy E, Bodo I, Bezzegh A:  
D-dimer determination as a screening tool to exclude atrial thrombi in atrial fibrillation. *Am J Cardiol*. 92. 85-87 (2003)
137. Squizzato A, Gerdes VE, Brandjes DP, Büller HR, Stam J:  
Thyroid diseases and cerebrovascular disease. *Stroke*. 36(10). 2302-2310 (2005)
138. Strauer BE, Brehm M, Zeus T , Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P:  
Intrakoronare, humane autologe Stammzelltransplantation zur Myokardregeneration nach Herzinfarkt. *Dtsch med Wochenschr*. 126. 932-938 (2001)
139. Stewart S, Murphy N, Walker A:  
Cost of an emerging epidemic: an economic analysis of atrial fibrillation in the UK. *Heart*. 90(3). 286-92 (2004)
140. Sundsfjord JA, Thibault G, Larochelle P, Cantin M:  
Identification and plasma concentrations of the N-terminal fragment of proatrial natriuretic factor in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 66(3). 605-610 (1998)
141. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T:  
Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*. 261(5121). 600-603 (1993)
142. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P:  
Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 187(3). 1579-1586 (1992)
143. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS:  
Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*. 31(1). 235-240 (2000)



144. Tieleman RG, Van Gelder IC, Crijns HJ:  
Early recurrences of atrial fibrillation after electrical cardioversion: a result of fibrillation-induced electrical remodelling of the atria? *J. Am Coll Cardiol.* 31(1). 167-73 (1998)
145. Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM:  
Atrial L-type Ca<sup>2+</sup> currents and human atrial fibrillation. *Circ Res.* 85. 428–36 (1999)
146. Vaporciyan AA, Correa AM, Rice DC, Roth JA, Smythe WR, Swisher SG, Walsh GL, Putnam JB Jr:  
Risk factors associated with atrial fibrillation after noncardiac thoracic surgery: analysis of 2588 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 127(3). 779-786 (2004)
147. Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martinez A, Mellado M:  
The chemokine SDF-1 $\alpha$  triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J.* 13(13). 1699-1710 (1999)
148. Warner ED, Dahl CD, Ewy GA:  
Myocardial injury from transthoracic defibrillator countershock. *Arch Pathol.* 99. 55-59 (1975)
149. Weissmann IL:  
Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 100. 157-168 (2000)
150. Wei CM, Heublein DM, Perrella MA, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Edwards WD, Schaff HV, Burnett JC Jr:  
Natriuretic peptide system in human heart failure. *Circulation.* 88(3). 1004-1009 (1993)
151. Wiesfeld AC, Hemels ME, Van Tintelen JP, Van den Berg MP, Van Veldhuisen DJ, Van Gelder IC:  
Genetic aspects of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 67. 414–418 (2005)
152. Wisser W, Khazen C, Deviatko E, Stix G, Binder T, Seitelberger R, Schmidinger H, Wolner E:  
Microwave and radiofrequency ablation yield similar success rates for treatment of chronic atrial fibrillation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 25(6). 1011-1017 (2004)

153. Zander AR, Stute N, Fehse B, Lagasse CL, Connors E, Al Dhalimy H, Reitsma M:  
Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo.  
*Nat Med.* 6. 1229-1234 (2000)
154. Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, Dudley SC Jr:  
Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential.  
*Circulation.* 106. 1294-1299 (2002)
155. Wang L, Fan C, Topol SE, Topol EJ, Wang Q:  
Mutation of MEF2A in an Inherited Disorder with Features of Coronary Artery  
Disease. *Science.* 302 (5650). 1578-81 (2003)
156. Wang XX, Zhang FR, Zhu JH, Xie XD, Chen JZ:  
Up-regulation of CXC chemokine receptor 4 expression in chronic atrial  
fibrillation patients with mitral valve disease may be attenuated by renin-  
angiotensin system blockers. *J Int Med Res.* 37(4).1145-51 (2009)
157. Wisser W, Khazen C, Deviatko E, Stix G, Binder T, Seitelberger R,  
Schmidinger H, Wolner E:  
Microwave and radiofrequency ablation yield similar success rates for  
treatment of chronic atrial fibrillation.  
*Eur J Cardiothorac Surg.* 25(6). 1011-7 (2004)

**Abkürzungsverzeichnis:**

AA	:Antiarrhythmika
ANF	: atrialer natriuretischer Faktor
ANP	: atriales natriuretisches Peptid (ANF = ANP)
ANOVA	: Varianzanalyse, Analysis of variance
AP	: Alkaline Phosphatase
ASZ	: Adulte Stammzellen
CD	: cluster of differentiation
CV	: Kardiversion
CV+	: erfolgreiche Kardioversion
CV-	: erfolglose Kardioversion
DC	: direct current
G-CSF	: granulocyte colony stimulating-factor (Granulozyten-Wachstumsfaktor)
FACS	: fluorescence activated cell sorting
EF	: Auswurffraktion (ejection fraction)
ELISA	: <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
EDTA	: Ethylendiamintetraessigsäure
ESZ	: Embryonale Stammzellen (ESZ)
HLP	:Hyperlipidämie
HSZ	: Hämatopoetische Stammzellen
HPCs	: hämatopoetische Progenitor-Zellen
KHK	:Koronar Herzerkrankung
LAD	:linker Vorhof Diameter
LVEF	:linksventrikuläre Auswurffraktion
MEF-2	: Myocyte enhancer factor -2
MI	:Myokardinfarkt
MSZ	: Adulte mesenchymale Stammzellen
MNC	: Mononukleare Zellen
NYHA	New York Heart Association
NSZ	: adulten neurale Stammzellen
parox	: paroxysmales
persist	: persistierendes
SDF-1 $\alpha$	: stromal cell derived factor-1 $\alpha$

SR : Sinusrhythmus  
Scf : Stammzellfaktor (Zytokine)  
VEGF : vascular endothelium growth factor  
VHF : Vorhofflimmern  
WPW : Parkinson-White Syndrom