

Aus der
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff



**Die intrakardiale Wirkung von Erythropoietin
nach künstlicher Induktion eines Myokardinfarkts
im Rattenmodell**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Klopsch, Christian
Geb. am 03.04.1983 in Neubrandenburg, Rostock

Rostock, 04.11.2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0013-8

Dekan: Prof. Dr. med. habil. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Teile dieses Forschungsprojektes wurden/werden veröffentlicht:

Veröffentlichte Originalarbeit:

Furlani D, **Klopsch C**, Gäbel R, Ugurlucan M, Pittermann E, Klee D, Wagner K, Li W, Wang W, Ong LL, Nizze H, Titze U, Lützow K, Lendlein A, Steinhoff G, Ma N. Intracardiac erythropoietin injection reveals antiinflammatory potential and improved cardiac functions detected by forced swim test. *Transplant Proc.* 2008;40:962-966

Zur Veröffentlichung akzeptierte Originalarbeiten („im Druck“):

Klopsch C*, Furlani D*, Gäbel R, Wagner K, Li W, Ugurlucan M, Kundt G, Zingler C, Titze U, Wang W, Ong LL, Pittermann E, Li RK, Ma N*, Steinhoff G*. Intracardiac injection of Erythropoietin induces stem cell recruitment and improves cardiac functions in a rat myocardial infarction model. *The Journal of Cellular and Molecular Medicine*

Furlani D*, Li W*, Pittermann E, **Klopsch C**, Wang L, Knopp A, Jungebluth P, Thedinga E, Havenstein C, Westien I, Ugurlucan M, Li RK, Ma N*, Steinhoff G*. A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart. *Cell Transplantation*

Originalarbeit im „Review“-Prozess:

Gäbel R*, **Klopsch C***, Furlani D*, Yerebakan C, Li W, Ugurlucan M, Ma N, Steinhoff G. Intramyocardial administration of Erythropoietin promotes early cardiac proliferation and restores cardiac performance after myocardial infarction in rats.

* Autoren trugen gleichermaßen zur Arbeit bei.

Gewinn eines international anerkannten Forschungspreises:

EACTS Young Investigator Award (*Bereich Erwachsenenherzchirurgie*), verliehen an **C. Klopsch** am 16. September 2008 während des 22. Jahrestreffen der Europäischen Gesellschaft für Cardio-Thorax Chirurgie (EACTS), Lissabon, Portugal (siehe Anlage): Intramyocardial injection of Erythropoietin augments stem cell recruitment and restores cardiac functions in a rat myocardial infarction model.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	04
1.1 Pathophysiologische Hintergründe	05
1.1.1 Diagnose: Myokardinfarkt; begrenzte Therapiemöglichkeiten im Klinikalltag ...	05
1.1.2 Zeitlicher Verlauf der Myokardinfarktheilung im Kleintier (Maus/Ratte)	06
1.1.3 Entzündungsreaktion nach akutem Myokardinfarkt	07
1.1.4 Der pathologische Remodeling-Prozess	11
1.2 Forschungsrichtungen der regenerativen Medizin und Erythropoietin	13
1.2.1 Kardioprotektion und Erythropoietin	13
1.2.2 Die Stammzell-basierte Forschung und Erythropoietin	16
1.2.3 Der Wiedereintritt in den Zellzyklus und Erythropoietin	19
1.3 Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Hardware	21
2.2 Software	21
2.3 Standard- und Pufferlösungen	22
2.4 Tiere, Tierhaltung und Operationen	22
2.4.1 Tiere und Tierhaltung	22
2.4.2 Materialien	23
2.4.3 Medikamente	24
2.4.4 Vorbereitung und Durchführung der Erstoperation	24
2.4.5 Vorbereitung und Durchführung von Folge-Operationen	26
2.4.5.1 Blutdruckmessung im Arcus aortae und Analyse von Blutparametern	26
2.4.5.2 Aufnahme von Druck-Volumen-Kurven im linken und rechten Ventrikel.....	29
2.5 Forcierter Schwimm-Test („Forced swim test“)	33
2.6 Semi-quantitative RT-PCR	34
2.7 Histologische Untersuchungen	36
2.7.1 Materialien	36
2.7.2 Immunhistologie	37
2.7.2.1 Herstellen der Gewebeschnitte („Formalin-fixed“ & „Paraffin embedded“)	37
2.7.2.2 Herstellen der Gewebeschnitte („Cryo-preserved“)	37
2.7.2.3 Immunfärbung der Gewebeschnitte	37

2.7.2.4 Auswertung der Gewebeschnitte	39
2.7.3 Gewebefärbung	40
2.7.3.1 Herstellen der Gewebeschnitte („Formalin-fixed“ & „Paraffin embedded“)	40
2.7.3.2 Herstellen der Gewebeschnitte („Cryo-preserved“)	40
2.7.3.3 Färbung der Gewebeschnitte	40
2.7.3.4 Auswertung der Gewebeschnitte	41
2.8 Statistische Analysen	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Postoperative Therapie-assoziierte Überlebensraten nach Myokardinfarkt	43
3.2 Herzfunktion 6 Wochen nach akutem Myokardinfarkt	44
3.2.1 Die systolische Funktion des LV	47
3.2.2 Die diastolische Funktion des LV	48
3.2.3 Druckbelastung im RV	49
3.3 Flucht-orientierte Aktivität im Verlauf der Infarktheilung	50
3.4 Infarktgrößenauswertung	51
3.5 Myokardiales Remodeling	52
3.5.1 Hypertrophieindices & interstitielle Fibrose	52
3.5.2 Apoptose von Kardiomyozyten während Inter- und Spätphase der Abheilung	54
3.6 Gewebeprotektive Effekte	55
3.6.1 Akutphase (24 h und 48 h) nach Myokardinfarkt	55
3.6.1.1 Expressionsverlauf von eNOS, Akt und TNF- α	55
3.6.1.2 Ausmaß zirkulierender Leukozyten	57
3.6.1.3 Plasmaspiegel der Infarktmarker	57
3.6.1.4 Blutdruckverhalten	58
3.6.2 Postakutphase (7 Tage und 14 Tage) nach Myokardinfarkt	59
3.6.2.1 mRNA-Expression von TNF- α und CD18 7 Tage post operativ	59
3.6.2.2 Ausmaß zirkulierender Leukozyten 14 Tage post operativ	60
3.6.2.3 Plasmaspiegel der Infarktmarker 14 Tage nach Erstoperation	61
3.6.2.4 Blutdruckverhalten 14 Tage nach Erstoperation	61
3.7 Angiogenetische Effekte	62
3.8 Beeinflussung der myokardialen Proliferation in der Akutphase	64
3.9 Stammzell-assoziierte Effekte in der Akutphase	65
3.9.1 mRNA-Expressionsverlauf von chemoattraktiven Molekülen	65

3.9.2	mRNA-Expressionsverlauf von Vorläuferzellmarkern	66
3.10	Rezeptor- und Zellantwortverhalten im Herzgewebe	67
3.11	Risiken der EPO Therapie und pathologische Gesichtspunkte	69
3.11.1	Thrombogenität	69
3.11.2	Histopathologie 6 Wochen nach Myokardinfarkt	72
4.	Diskussion	73
4.1	Funktion und Überleben	73
4.2	Aktivität	74
4.3	Risiken der EPO Behandlung und Vergleich zur systemischen Applikation	75
4.4	Modifikationen im Infarktheilungsprozess induziert durch lokale EPO Therapie .	76
4.4.1	EPO vermittelte Angiogenese	76
4.4.2	EPO vermittelte Stammzellmigration	77
4.4.3	EPO vermittelte Kardioprotektion	78
4.4.4	EPO vermittelte kardiale Proliferation	80
4.4.5	EPO begrenzt pathologisches Remodeling	81
4.5	Residente kardiale Stammzellen	81
4.6	Regulation der EPO Signalübertragung auf die Zelle	82
4.7	Grenzen der Studie und Anmerkungen	83
4.8	Ausblick	85
5.	Zusammenfassung	86
6.	Literaturverzeichnis	88
	Anhang	98

1. Einleitung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) gehört zu den häufigsten Gründen einer Hospitalisierung im Rahmen eines Notfallgeschehens und trägt in bedeutendstem Ausmaß zu Morbidität und Mortalität in den industrialisierten Ländern bei [1]. Der Myokardinfarkt (MI) wird begleitet von einem massiven Gewebsverlust, einer intensiven Entzündung, dem pathologischen Umbauprozess (= Remodeling) sowie der Aktivierung von Reparationsvorgängen [2]. Forschungsergebnisse verdeutlichen, dass Wachstumsfaktoren [3] und verschiedene Zellarten, einschließlich Stammzellen des Knochenmarks (KM) und kardiale Stammzellen (CSC) [4], wenn sie in das erkrankte Herz transplantiert werden, zu Regenerationsvorgängen des Myokards nach MI beitragen und die Organfunktion verbessern können.

Erythropoietin (EPO) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 30.4 kDa. Es wurde 1985 entdeckt. Dessen Rezeptor Erythropoietin-Rezeptor (EPO-R) wurde vier Jahre später, 1989, gefunden [5]. EPO wird vornehmlich in der Niere des Erwachsenen nach Stimulation durch Hypoxie produziert und fördert die Teilung und Differenzierung von Vorläuferzellen der Erythropoese im KM [6]. Die Jahre des klinischen Gebrauchs von EPO in Patienten mit Anämie oder chronischer Nierenerkrankung attestierten die systemische EPO-Therapie als sicher und von den Patienten gut toleriert [7].

Neueste Erkenntnisse über EPO und dessen Rezeptor geben Anlass zur Annahme, dass ihre Interaktionen auch von hoher Bedeutung in Geweben außerhalb des hämatopoetischen Systems sind. Diese Entdeckung hat das Interesse für den Gebrauch von EPO als neuen zellprotektiven Agonisten in der KHK beflügelt [8][9][10][11][12][13]. Pionierstudien zeigten außerdem, dass EPO zu einer erhöhten Proliferation von nicht hämatopoetischen KM-Stammzellen, einer gesteigerten Mobilisierung endothelialer Progenitor Zellen (EPC) und einer Induktion der Gefäßneubildung führt [14]. Dazu im Kontrast steht die Feststellung, dass höhere EPO Plasmaspiegel mit erhöhter Schwere der Erkrankung und einer schlechteren Prognose in Patienten mit Herzversagen assoziiert sind [15].

In dieser Arbeit werden die therapeutische Effizienz sowie die lokalen Wirkungen und Chemokin-Interaktionen bewertet, die durch eine einzige Applikation von EPO ins Infarkttherz induziert werden.

1.1 Pathophysiologische Hintergründe

1.1.1 Diagnose: Myokardinfarkt; begrenzte Therapiemöglichkeiten im Klinikalltag

Der MI als Akutstadium der KHK, insbesondere der transmurale MI, ist ein akuter Verschluss eines Herzkranzgefäßes, wodurch im abhängigen Versorgungsbereich des Gefäßes eine absolute Ischämie auftritt. Sie ist gekennzeichnet durch eine fehlende Versorgung dieses Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff, was sowohl mit dem Leben der betreffenden Zellen als auch häufig mit dem Leben des Gesamtorganismus nicht vereinbar ist. Komplikationen, die zu dieser Mortalität beitragen, können akut und zeitverzögert auftreten. Arrhythmien und der kardiogene Schock tragen den Hauptanteil an der hohen Sterblichkeitsrate während der ersten Stunden. Wandausdünnung und Gewebeverlust während der Infarktheilung können zum Aneurysma der Herzwand, zu Klappenfehlern durch Papillarmuskelabriß, zu Dilatation, Dekompensation und Herzversagen/Herzinsuffizienz begleitet von Lungenödemen und pulmonaler Hypertension führen. Patienten mit Herzversagen haben aufgrund ihrer schlechten Herzfunktion verringerte Kompensationsmöglichkeiten gegenüber körperlichem Stress wie normalen Alltagsbewegungen (NYHA III & IV). Teilweise leiden Sie bereits unter Ruhebedingungen an Atemnot oder Schwindelsymptomen (NYHA IV). Die pathophysiologischen Veränderungen im Herzen nach einem fulminanten MI führen häufig zu einer verringerten Lebensqualität mit stark eingeschränkter Prognose des Patienten [16].

Das therapeutische Fenster ist sehr eng und zielt auf die Wiedereröffnung der erkrankten Koronararterie. Die Rekanalisation der okkludierten Koronararterie mittels interventioneller perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) mit oder ohne Stentimplantation oder koronararterieller „Bypass Graft“ (CABG) Operation ist jedoch nur in den ersten Stunden post infarktem am ehesten effektiv. Im Rahmen der Reperfusion, insbesondere wenn deren Durchführung mehr als 6 Stunden nach dem Primäreignis erfolgt, kann es sowohl durch eine hämorrhagische Infarzierung als auch durch eine heftige Entzündungsreaktion, der sogenannte Ischämie-Reperfusionsschaden, zu einer starken zusätzlichen Gewebeschädigung kommen. Die weiterführende medikamentöse Behandlung zielt auf die Verringerung des Re-Infarkttrisikos mittels Thrombozytenaggregationshemmern, Antikoagulantien, ACE-Inhibitoren, ATII-Rezeptor-Antagonisten, Aldosteronantagonisten, Statinen und anderen Lipidsenkern. Auch die Veränderung sogenannter „Life-Style“ Parameter tragen in bemerkenswertem Ausmaß zur Prävention eines Zweitereignisses bei [16].

Diese lediglich supportiven Behandlungsoptionen ermöglichen jedoch keine „Restitutio ad Integrum“. Aus diesem Grund suchen die experimentelle sowie die klinische Forschung nach neuen Therapiemöglichkeiten zur Regeneration von funktionstüchtigem Herzgewebe.

1.1.2 Zeitlicher Verlauf der Myokardinfarktheilung im Kleintier (Maus/Ratte)

Der MI bedeutet akut (Tag 1-4) massive Nekrose von Kardiomyozyten im Bereich der absoluten Ischämie und zeitversoben Ablauf eines Remodelingprozesses im Gebiet des überlebenden Myokards. Im Randbezirk der absoluten Ischämie gibt es eine Zone der relativen Ischämie durch teilweise Überlappung der Gefäßversorgungsgebiete. Hier kommt es ebenfalls während der ersten Tage zu einem massiven Zellverlust, indem Zellen unter hypoxischen Bedingungen in die Apoptose eintreten [14].

Die Entzündungsreaktion im Infarktbereich (Granulationsphase), die sich an die Nekrotisierung des Areals anschließt, setzt durch eine proinflammatorische Zytokinkaskade ein. Die Freisetzung von TNF- α , IL-1 β , IL-6 führt zur Induktion der Zellinfiltration nach MI mit einem Maximum der Immigration an Tag 4, wobei die Neutrophilen die schnellsten immigrierenden Zellen sind. Zellinfiltrate, bestehend aus Makrophagen, Neutrophilen und Mastzellen, führen zum Abbau extrazellulärer Matrix sowie von Detritus (abgestorbene Zellen bzw. totes Myokard) und zum Teil beschädigter und unbeschädigter Zellen. Es folgt die Bildung von Granulationsgewebe (Tag 4-7) bestehend aus Neovaskularisation, Makrophagen, Neutrophilen und Myofibroblasten in einer Matrix, reich an Proteoglykanen und Matrixproteinen wie Osteopontin und Fibronectin [17].

Im weiteren Verlauf der Heilung (Organisationsphase) bilden Myofibroblasten im Infarktbereich ein Kollagenetzwerk (Tag 14). Weiterhin laufen Gefäßneubildung und die Abräumung von geschädigten Zellen und Zelltrümmern ab. Die Matrix wird nun resorbiert und es finden Apoptosevorgänge im Granulationsgewebe statt. Dieser Reparationsvorgang des ischämisch entstandenen Defekts führt zur Bildung einer hypozellulären Narbe (Tag 28), die durch den erheblichen Gewebeerlust stark ausgedünnt ist, während sich das intraventrikuläre Volumen teilweise bis auf das Vierfache ausdehnen kann (= Dilatation) [17]. Im Vergleich verläuft die Heilung des MI bei Mäusen und Ratten etwa gleich schnell ab und ist nach etwa drei bis vier Wochen abgeschlossen. Der MI des Menschen ist erst nach etwa 8 Wochen abgeheilt [17].

Virag und Murry verdeutlichen außerdem, dass sowohl die Größe des Infarkts als auch der Übergang von Nekrose zur Bildung des Granulationsgewebes entscheidend für den Verlauf der Heilung sind. Sie erläutern, dass eine frühe Reperfusion nach MI den Eintritt von Inflammationszellen ins Infarktgewebe beschleunigt und den Schaden des Organs unabhängig von der Größe des Infarktgebietes verringert [18]. Demnach könnten Faktoren, die die Bildung von Granulationsgewebe beschleunigen, das Herzversagen verhindern.

1.1.3 Entzündungsreaktion nach akutem Myokardinfarkt

Die Myokardnekrose aktiviert das Komplementsystem, führt zur Bildung freier Radikale und löst eine Zytokinkaskade, ausgehend von einer TNF- α Freisetzung, aus. IL-8 Synthese und C5a Aktivierung triggern die Neutrophilenrekrutierung in ischämisches Gewebe. Die Neutrophileninfiltration wird durch komplexe molekulare Mechanismen rund um Integrine und Selektine gesteuert. Die eingewanderten Neutrophilen haben cytotoxischen Effekt durch Freisetzung proteolytischer Enzyme und Bindung an Kardiomyozyten über ICAM-1. Makrophagen, ausdifferenziert aus Monozyten, und Mastzellen setzen Zytokine und Wachstumsfaktoren zur Fibroblastenproliferation und Neoangiogenese frei. Die Entzündungsreaktion trägt wesentlich zum Ausmaß des Gewebeverlustes und zur Funktionsschädigung des Herzens bei MI bei. Sowohl eine Steigerung als auch eine Verringerung der Entzündungsreaktion können das Ausmaß des Schadens erheblich erhöhen. Das Verständnis der Entzündungsreaktion nach MI ist daher unbedingt notwendig [19].

Die folgende Darstellung ablaufender Entzündungsprozesse wird in zwei Teilbereiche (a, b) gegliedert. Dabei soll besondere Aufmerksamkeit auf die Prozesse der Initiation der Entzündungsreaktion sowie auf die Chemoattraktion der Entzündungszellen, insbesondere der zytotoxischen Neutrophilen, gerichtet werden.

a) Die humorale Entzündungsantwort (= Initiation, s. Abb. 1.1):

Ein Teilbereich der humoralen Entzündungsantwort (HEA) ist die Komplementaktivierung. Die Myokardnekrose führt zur Freisetzung subzellulärer Membranbestandteile, insbesondere von Mitochondrien, die die Komplementaktivierung auslösen (C1, C2, C3, C4). Alle Komplementfaktoren im Infarktgewebe sind hochreguliert und spielen eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen (Anaphylatoxine). Auch die post ischämische kardiale Lymphe hat hohe chemotaktische Aktivität [19].

Ein weiterer Teilbereich der HEA ist die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Metaboliten (ROS) in Mitochondrien. Dies sind Sauerstoffmoleküle mit unpaarigen Elektronen in der Außenhülle. Sie können direkt Kardiomyozyten und Endothelzellen schädigen und spielen eine wichtige Rolle in der Leukozytenchemotaxis [19].

Von erheblicher Bedeutung bei Betrachtung der HEA ist die ablaufende Zytokinkaskade, eine koordinierte Aktivierung von Zytokin- und Adhäsionsmolekülgene, die die Entzündungsreaktionen im Gewebe steuern. Die Zytokinkaskade selbst wird insbesondere durch vorgebildetes TNF- α in kardialen Mastzellen initiiert. Die schnelle Freisetzung von Histamin und TNF- α durch Mastzelldegranulation im ischämischen Myokard findet wahrscheinlich in Abhängigkeit von C5a, Adenosin und ROS statt [19].

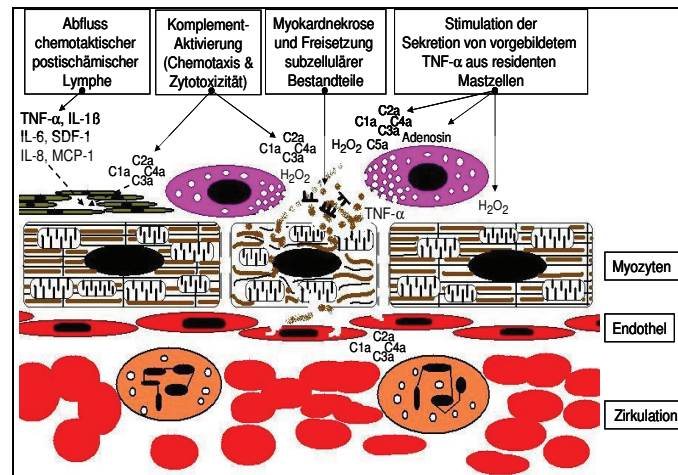


Abb. 1.1 Humorale Entzündungsantwort

b) Die zellulär gesteuerte Entzündungsantwort – Schwerpunkt Chemoattraktion:

Ein wichtiger Gesichtspunkt der zellulären Entzündungsantwort (ZEA) ist das Verhalten der neutrophilen Leukozyten (Neutrophile). Die Reduktion der Neutrophileninfiltration ins Infarktgewebe führt zur Verringerung der Infarktgröße, denn Neutrophile sezernieren Oxide und Proteasen sowie Mediatoren zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen [19].

Die Neutrophilen - Endothel - Interaktion und die transendotheliale Wanderung der Neutrophilen sollen besonders betrachtet werden (s. Abb. 1.2). Die Selektin-Adhäsionsmoleküle (Selektin Familie) steuern den initialen Anzug/Fang von Leukozyten aus dem schnellen Blutstrom, das Neutrophilen-„Rolling“. Zu diesen Selektinen gehören das L-Selektin (CD62L), das E-Selektin (CD62E) und das P-Selektin (CD62P). Die Mehrzahl der zirkulierenden Neutrophilen, Monozyten, Eosinophilen, T-Zellen und B-Zellen exprimieren L-Selektin. Nach Aktivierung wird es schnell von der Zelloberfläche abgespalten, was wichtig für die Leukozytenrekrutierung ist. E-Selektin wird durch Endothelzellen nur nach deren Aktivierung durch Zytokine wie TNF- α und IL-1 β oder durch bakterielles Endotoxin exprimiert. P-Selektin wird konstitutiv in Weibel-Palade Körpern von Endothelzellen und in α -Granula von Thrombozyten exprimiert. Während weniger Minuten nach Aktivierung durch thrombogene oder inflammatorische Botenstoffe wird P-Selektin an die Zelloberfläche mobilisiert, ohne dass eine Proteinneusynthese notwendig wird. E- und P-Selektin sind insbesondere verantwortlich für die Rekrutierung, das „Rolling“ und die Anbindung von Neutrophilen am Endothel post-kapillärer Venolen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle 3 Selektine am Übertritt der Leukozyten ins Gewebe beteiligt sind [19].

Das Selektin-abhängige „Rolling“ führt aber nicht zu einer festen Bindung. Für eine feste Adhäsion von Neutrophilen ist eine Aktivierung von β 2-Integrinen notwendig. Die in Leukozyten gebildeten β 2-Integrine bestehen aus CD18 und entweder CD11a (LFA-1) oder

CD11b (Mac-1) oder CD11c. Die Aktivierung von $\beta 2$ -Integrinen führt zur Bindung von Neutrophilen an interzelluläre Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1. An der luminalen Endothelseite festgehaltene Neutrophile nehmen eine typische bipolare Konfiguration beweglicher Zellen an. Es folgt die transendotheliale Migration und Infiltration ins Inflammationsgewebe. CD11a/b/c haben überlappende Funktionen in der Adhäsion. LFA-1 ist ein entscheidender Faktor für die Neutrophilenextravasation bei Inflammation. Mac-1 Aktivierung dient der Bindung von Neutrophilen an ICAM-1. Experimentelle Studien mit Hemmung von CD-18 zeigten eine Verringerung der Neutrophileninfiltration, eine reduzierte Infarktgröße und erhaltene linksventrikuläre Funktion nach MI [19].

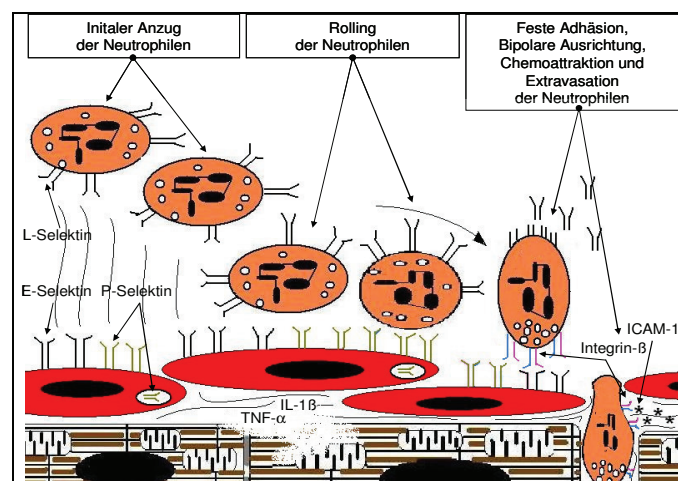


Abb. 1.2 Neutrophilen - Endothel - Interaktion und transendotheliale Wanderung von Neutrophilen

Auf die Chemotaxis der Neutrophilen soll nun eingegangen werden. Diese Chemokine bzw. chemoattraktiven Zytokine lassen sich morphologisch in CXC- und CC-Chemokine einteilen. Die CXC-Chemokine binden wie die CC-Chemokine an G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Beide Gruppen lassen sich in konstitutiv exprimierte und induzierbare Chemokine unterteilen. Induzierbare Zytokine werden als Antwort auf die Bildung freier Radikaler, Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$, Komplementaktivierung, Anwesenheit von ROS und zelluläre Nekrose zeitweise stark hochreguliert. Sie haben entscheidende Funktion in der Leukozytenrekrutierung und Neoangiogenese. Außerdem vermitteln sie Leukozytenaktivierung, -adhäsion, -genexpression sowie -mitose und -apoptose [20].

Unter den CXC-Chemokinen sind IL-8 (CXCL-8) und stromal cell derived factor-1 (SDF-1, CXCL12) als bedeutende Vertreter zu nennen. IL-8 wird vermehrt von Endothelzellen bei Entzündungsreiz sezerniert, wirkt chemoattraktiv auf Neutrophile und sorgt für erhöhte Adhäsion von Neutrophilen an Kardiomyozyten. SDF-1 ist entscheidend für die kardiovaskuläre Entwicklung, was sowohl die Angiogenese als auch die Gefäßarchitektur umfasst. Es wirkt insbesondere auf EPC chemoattraktiv [20].

Unter den CC-Chemokinen ist das MCP-1 (CCL-2) im Verlauf eines MI besonders zu betrachten. Es ist chemoattraktiv für Monozyten, T-Zellen und NK-Zellen, wobei die Hauptaufgabe der Monozyten-/Makrophagenrekrutierung zukommt. Außerdem erhöht MCP-1 die Gewebeexpression von TNF- α , IL-1 β , TGF- β und IL-10 und vermittelt den Ersatz von verletzten Kardiomyozyten durch Granulationsgewebe [20].

Die durch Neutrophile gesteuerte Verletzung des Myokards (s. Abb. 1.3) im Infarktgewebe ist eine direkte Schädigung von Parenchymgewebe durch die Freisetzung toxischer Stoffe wie proteolytischer Enzyme und ROS. Eine Ligand spezifische Adhäsion von Neutrophilen an Kardiomyozyten ist entscheidend für den durch Ischämie induzierten Schaden. Hauptfaktoren innerhalb dieser Interaktion der adhäsionsabhängigen Zytotoxizität sind Integrin- β und ICAM-1. Die Bindung von Integrin- β der Neutrophilen an ICAM-1 auf dem Sarkolemm entzündungsinduzierter Kardiomyozyten führt zur zytotoxischen Wirkung auf die Kardiomyozyten. Die ICAM-1 Induktion in Kardiomyozyten kann durch TNF- α , IL-1 β und IL-6 bewirkt werden, wobei die Gebiete mit der stärksten Induktion die höchste Infiltration von Neutrophilen aufweisen. In Neutrophilen wird Mac-1 durch C5a, Platelet activating factor (PAF) und IL-8 aktiviert. Die Zytotoxizität der adhärenenten Neutrophilen zeigt sich in einer verlängerten Kontraktion von Kardiomyozyten, irreversiblen Kontraktionen und einer eisenabhängigen, oxidativen Muskelzellschädigung [19].

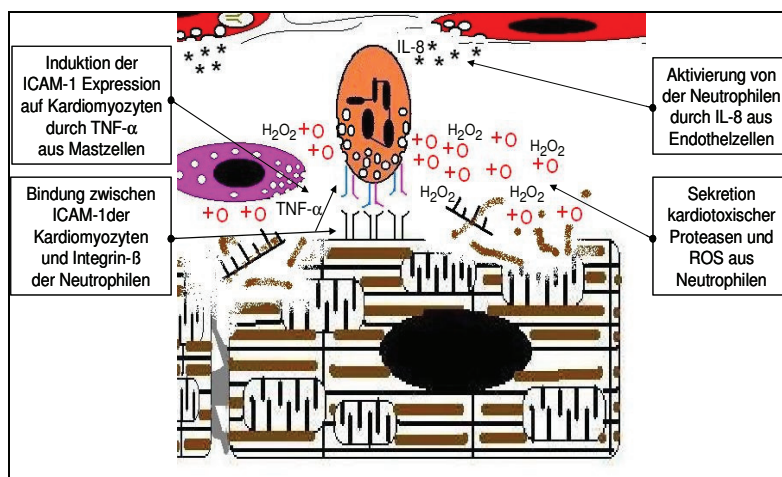


Abb. 1.3 Neutrophilen gesteuerte Verletzung des Myokards im Infarktgewebe (direkte Zytotoxizität)

Betrachtet man alle obigen Ausführungen zur Entzündungsreaktion nach akutem MI so nimmt demnach TNF- α eine zentrale Position während der Initiation und Steuerung des Entzündungsgeschehens sowie der Vermittlung des direkten Parenchymschadens durch Entzündungszellen ein. Serumkonzentrationen dieses pro-inflammatorischen Zytokins und dessen Gegenspielers IL-10 werden auch klinisch genutzt. Das Serumspiegelverhältnis IL-10/TNF- α dient der Prognoseeinschätzung von Patienten mit Herzversagen nach MI [21][22].

1.1.4 Der pathologische Remodeling-Prozess

Ursache des pathologischen Remodelings des Herzens nach MI ist das Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -verbrauch der Kardiomyozyten. Beim akuten MI des linken Ventrikels (LV) kommt es zu einem massiven plötzlichen Gewebeausfall durch Zellverlust in Folge von Nekrose und Apoptose, welcher nur unzureichend durch Granulationsgewebe und Narbenbildung gedeckt werden kann. Das überlebende, kontrahierende Herzgewebe im Nichtinfarktgebiet ist gezwungen die Arbeit des ausgefallenen, nicht kontrahierenden, untergehenden Gewebes mitzuleisten. Es kommt zur kompensatorischen Hypertrophie (s. Abb. 1.4). Der sich vergrößernde Einzelzellquerschnitt und das unzureichend mitwachsende Kapillarnetz führen zu einer verringerten Gefäßdichte. Es verlängert sich der Diffusionsweg für Sauerstoff und Nährstoffe, so dass sich das Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf, der unter Hypertrophie des LV ansteigt, und Sauerstoffangebot manifestiert [23][24][25].

Der massiven Zytokinexpression nach akutem MI ist besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Permanent erhöhte Zytokinspiegel führen zu Kollagendeposition, progressiver Apoptose und Hypertrophie der Kardiomyozyten, Kontraktilitätsdefizit und Entzündungsverstärkung. TNF- α , IL-1 β und IL-6 sind nicht nur im Infarkt- und Übergangsbereich, sondern auch im Nichtinfarktgebiet hochreguliert. Handelt es sich um einen großen MI, bleibt die Entzündungsantwort im Nichtinfarktgebiet aufrecht erhalten und kann hier sogar in eine zweite Welle der Entzündung übergehen. Während die TNF- α Produktion im Infarktgebiet innerhalb der ersten Tage Maximalwerte erreicht, ist die TNF- α Konzentration im Nichtinfarktgebiet erst nach Wochen maximal angestiegen [23].

Desweiteren ist der mechanische Stress insbesondere im Infarktgebiet ein potenter Trigger für die myokardiale Produktion von TNF- α . Letzteres erreicht seine Wirkungen über zwei Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2. TNF-R1 gehört zur Familie der „Todes-Rezeptoren“ und initiiert bei Bindung von TNF- α die Apoptose. Im Kontrast dazu wirkt TNF- α auch zytoprotektiv durch Aktivierung von Genen, die Hypertrophie und Überleben fördern [23].

TNF- α entfaltet zusätzlich einen negativ inotropen Effekt in Kardiomyozyten. Es behindert deren Kontraktilität durch Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration über Funktionseinschränkung des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und Minderung der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente [23].

Andere Faktoren, die Hypertrophie und Apoptose aktivieren können, sind chronisch mechanische Überlastung, Hypoxie und neurohormonale Dauerstimulation als extrinsische Faktoren sowie intrinsisch ROS und eine verschobene Balance zwischen Wachstumsfaktoren und Zytokinen [24].

ICAM-1 und MCP-1 Induktion des Endothels führen zur Makrophageninfiltration. Makrophagen aktivieren die Kaskade der myokardialen Fibrose. Ein gewisser Grad an Fibrose schützt vor ventrikulärer Deformation durch erhöhte Belastung und sichert die Kraftübertragung von den Muskelzellen auf den gesamten Ventrikel. Zunächst findet die Fibrose nur perivaskulär, dann ausbreitend auf das Interstitium zwischen den Muskelzellen statt (reaktive Fibrose). Chronische Überlastung führt aber zu massiver Kollageneinlagerung und Matrixproduktion mit Ersatz von Muskelzellen durch Bindegewebe (= Ersatzfibrose). Die Fibrose spielt eine zentrale Rolle bei der Verschlechterung der diastolischen Funktion. Die aktive Entspannung während der isovolumetrischen Relaxationsphase und frühen Füllungsphase ist reduziert. Sie wird kontrolliert vom energieabhängigen Ca^{2+} -Stoffwechsel der Muskelzelle insbesondere durch die Ca^{2+} -Aufnahme ins SR. Insgesamt laufen alle ATP abhängigen Prozesse des Ca^{2+} -Stoffwechsels der hypertrophierten Muskelzelle verzögert ab. Die zusätzlich verringerte diastolische Compliance (Dehnbarkeit) ist eine direkte Konsequenz der erhöhten Gewebesteifheit infolge Wandverdickung und myokardialer Fibrose [25].

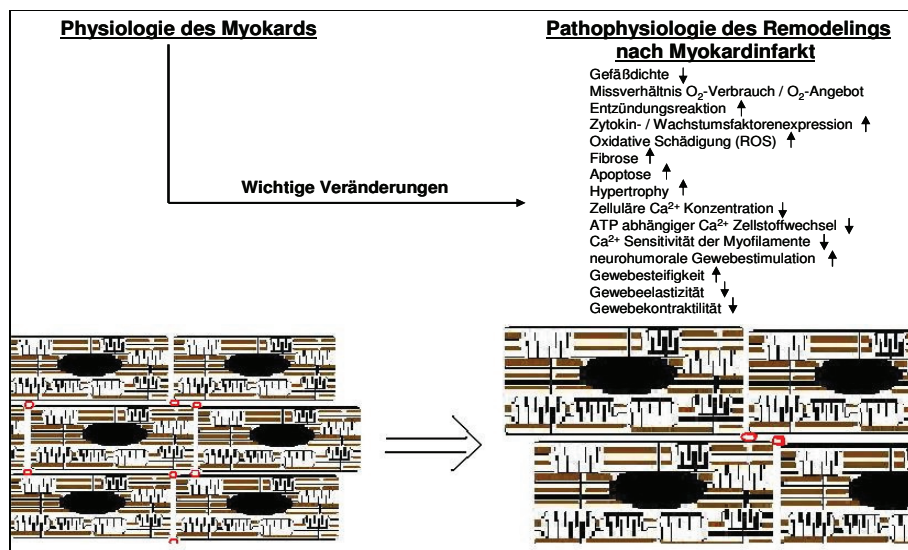


Abb. 1.4

Pathophysiologie des Remodelings nach Myokardinfarkt

Der progressive Verlust systolischer Kontraktilität sowie diastolischer Elastizität führt im klinischen Alltag häufig zu Herzversagen. Symptome sind neben pulmonalen und Leber-Stauungszeichen ein erhöhtes end-diastolisches Volumen im LV, eine stark reduzierte Auswurfraction des LV, eine Hypertrophie des rechten Ventrikels (RV) und eine hohe Komorbidität. Begrenzte therapeutische Möglichkeiten mittels ACE-Hemmern, β -Blockern und anderen Mitteln haben durch Senkung der mechanischen Belastung des LV zumindest eine kardioprotektive Wirkung erzielt. Zurückblickend lässt sich jedoch zusammenfassen, dass zukünftige Therapieansätze sowohl kardioprotektiv als auch regenerativ sein müssen, um eine suffiziente Herzfunktion auch nach größerem Primärschaden aufrecht zu erhalten.

1.2 Forschungsrichtungen der regenerativen Medizin und Erythropoietin

Der Behandlung des akuten MI sind im gegenwärtigen klinischen Alltag Grenzen gesetzt. Die Beeinflussung der Geweberegeneration des erkrankten Herzens ist bislang unbefriedigend. Das einmal untergegangene adulte Herzgewebe ist nach heutigem Stand der Medizin nicht in gleicher Qualität und Quantität zu regenerieren („Restitutio ad Integrum“). Aus diesem Grund suchen experimentelle und klinische Forschung nach neuen Therapiemöglichkeiten zur Regeneration von funktionstüchtigem Herzgewebe.

Die Kardioprotektion versucht Möglichkeiten zur Verringerung des Zellverlusts zu beschreiben. Die Stammzell-basierte-Forschung verfolgt die Untersuchung der Isolierung, des Einsatzes (Transplantation), der Mobilisierung und der Aktivierung von Stammzellen. Der Wiedereintritt von adulten Zellen des Herzgewebes, insbesondere von Herzmuskelzellen und Endothelzellen, in den Zellzyklus (= „cell cycle re-entry“) spielt ebenso eine bedeutungsvolle Rolle. Letztlich seien Studien zur künstlichen Herstellung von Gewebe („Tissue Engineering“) erwähnt. Im Folgenden soll unter Bezug auf den jeweiligen Kenntnisstand zum Protein EPO auf die ersten drei Richtungen näher eingegangen werden.

1.2.1 Kardioprotektion und Erythropoietin

Die Kardioprotektion befasst sich mit Mechanismen zur Hemmung von Nekrose- und Apoptosevorgängen, zur Reduktion von Entzündung und Fibrose und zur Verbesserung der Gewebeperfusion durch Förderung angiogenetischer Prozesse.

Die Wirkungen von EPO sind abhängig von der Anwesenheit des EPO-R. Es ist ein Zytokinrezeptor, bestehend aus zwei Monomeren mit je einer Janus-Kinase 2 (JAK 2). JAK 2 Homodimere phosphorylieren STAT-Proteine, Ras-Proteine und die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase). Phosphorylierte STAT-Proteine aktivieren die Transkription von Genen. Aktivierte Ras-Proteine (kleine G-Proteine) wirken mitogen [26].

Die Frage nach der Lokalisation des EPO-R ist noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Nach Entwicklung sensitiverer Methoden ist zumindest eindeutig, dass der EPO-R weit verbreitet im Körper vorkommt. Er ist außer im KM bereits in Zellen der Niere und Leber, im Gehirn, in der Retina, im Herz (im peri- und epikardialen Endothel, in glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten), im Skelettmuskel und in Endothelzellen von Gefäßen entdeckt worden. Extraerythropoetische, -hämatopoetische Effekte von EPO sind in der Folge beschrieben worden. Rossert et al. erläutern zelluläre Mechanismen, die zu einer EPO vermittelten Inhibition der Apoptose als Gewebeschutz nach MI beitragen können [26].

Die verbesserte Funktionalität des LV, mit verbesserter Kontraktilität und Elastizität und die verringerte Infarktgröße wurden von Moon et al. ebenfalls auf eine anti-apoptotische Wirkung nach systemischer EPO-Applikation zurückgeführt. Moon et al. [10] und Calvillo et al. [27] fanden eine um die Hälfte reduzierte Apoptoserate in der „Area At Risk“ (AAR = relative Hypoxie) zum Zeitpunkt 24 Stunden post infarktem unter EPO-Therapie. Die AAR umgibt einen zentralen Nekrosebereich, in dem die Zellen jedoch durch absolute Hypoxie bzw. Anoxie unwiderruflich zerstört werden (s. Abb. 1.5 und 1.6). Calvillo et al. [27] konnten die Beteiligung von EPO an einem endogenen Schutzsystem [28] bestätigen. Parsa et al. zeigten, dass die Hemmung von Akt durch den PI3-Kinase-Inhibitor „Wortmannin“ den zellprotektiven Effekt von EPO aufhebt [29].

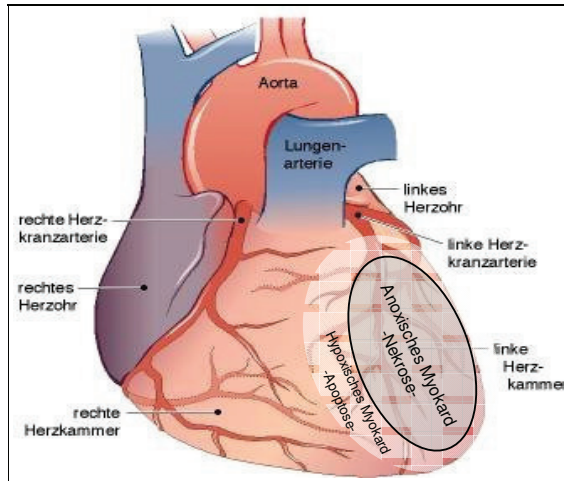


Abb. 1.5 Ischämieareale nach RIVA Occlusion, Herzabbildung nach Günther RW, Aachen

Die entzündungshemmende Wirkung einer systemischen EPO-Therapie (s. Abb. 1.6) wurde verdeutlicht durch eine verringerte Expression von MCP-1 [30], TNF- α , IL-6, ICAM-1 [9] und IL-1 β [12]. IL-10 zeigte sich vermehrt exprimiert und auch die Infiltration von Neutrophilen in das erkrankte Herz wurde reduziert [9]. Die anti-fibrotische Wirkung zeigte sich in gesenkter Expression von Kollagen Typ 1 und 3 [30] und TGF- β [12]. Außerdem verringert EPO die oxidative DNA-Schädigung in überlebenden Herzmuskelzellen [31] und erhöht akut nach MI das Gewebe-c-AMP im Herzen, was für einen positiv inotropen Effekt spricht [32]. Auch konnte die Entwicklung des Herzversagens durch späte (6 Wochen post infarktem) wöchentliche, systemische Gaben von EPO vermindert werden [12]. Das angiogenetische Potenzial wurde durch Urao et al. dokumentiert. Die Mehrproduktion von NO über Aktivierung von Akt und der endothelialen NO-Synthase (eNOS) sowie die Erhöhung zirkulierender VEGF-Rezeptor-2 positiver (VEGFR-2, Flk-1/Kdr) EPC konnten u.a. dafür verantwortlich gemacht werden [33]. Die Hochregulierung von eNOS durch EPO nach MI konnte zusätzlich als Faktor mit anti-apoptotischer Wirkung auf Kardiomyozyten nachgewiesen werden [34]. VEGFR-2 ist insbesondere auf Endothelzellen exprimiert. Auf die Bindung seiner Liganden VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D aktiviert der VEGFR-2 angiogenetische Signalkaskaden, die zur Förderung des Überlebens und der Proliferation von Endothelzellen führen [35][36].

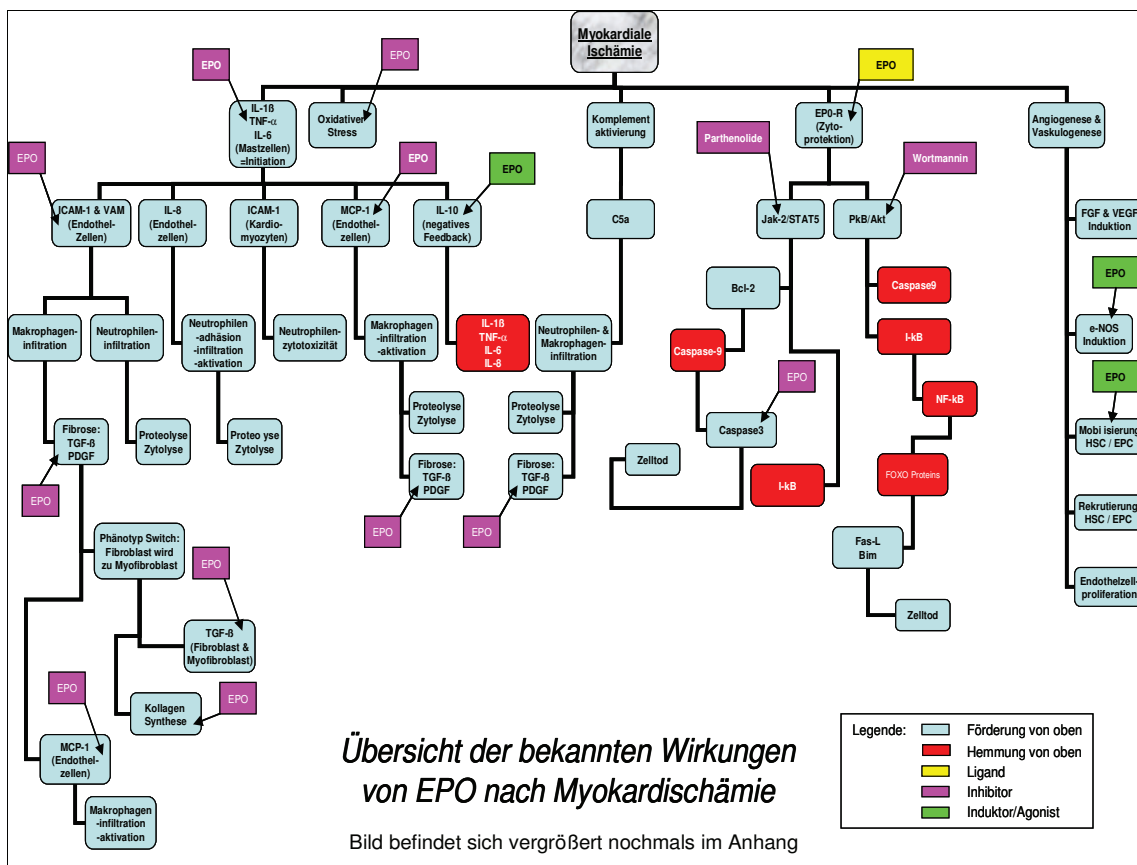


Abb. 1.6

Bekannte Wirkungen von EPO nach Myokardischämie -kein Anspruch auf Vollständigkeit-

Beschattet werden die positiven Effekte des EPO von der Uneinigkeit der Auswirkungen auf Thromboseinzidenz und den systemischen Blutdruck. EPO wird bereits seit längerer Zeit in der Klinik zur Behandlung von Anämien, die u.a. in Zusammenhang mit Operationen, Krebs, HIV-Infektionen, chronischem Nierenversagen auftreten, eingesetzt. Die Erfahrungen im klinischen Alltag haben recht unterschiedliche Ergebnisse gezeigt, wobei der Therapeut sich dem Risiko einer erhöhten Thrombosegefahr bei steigendem Hämatokrit ausgesetzt sieht [7]. Von einer direkten Induktion von Thrombosen ist jedoch nicht unbedingt auszugehen. In Tiermodellen, in denen es zu einer Überproduktion von EPO unabhängig vom Partialdruck des Sauerstoffs im Blut kommt, konnte demonstriert werden, dass erhöhte EPO Serumspiegel nicht zu einer Thromboseinduktion führen. Die plasmatische Gerinnung wie auch die Thrombusbildung zeigten sich im Gegenteil gehemmt bzw. verlangsamt [37]. Eher scheint die teilweise festgestellte Erhöhung der Thromboseinzidenz ein multifaktorielles Problem zu sein. In diese Faktoren ist neben dem erhöhten Hämatokrit in jedem Fall die Grunderkrankung mit einzubeziehen, die bereits ihrerseits pathogenetisch mit einem erhöhten Thromboserisiko vergesellschaftet sein kann [38][39]

1.2.2 Die Stammzell-basierte Forschung und Erythropoietin

Die Grundlage bzw. den Beginn der Stammzellforschung brachte ursprünglich die Entdeckung, dass hämatopoetische Stammzellen (HSC) des KM andere Zelllinien hervorbringen können als die des Herkunftsorgans. Dies war eine wissenschaftliche Revolution, denn dadurch galt das Dogma der embryonalen Spezifizierung und Festlegung der Differenzierungsrichtung als überholt [40].

Blickt man zunächst jedoch auf das geschädigte Organ an sich, hängt dessen regenerative Kapazität entscheidend ab von Alter des Organs, Erhaltung der Einzelgewebe, Intensität von Narbenbildung und Entzündungsprozess und dem Besitz residenter Stammzellen [40].

Die seit 1970 in der Kardiologie vorherrschende Auffassung, das Herz sei ein postmitotisches Organ und dessen Anzahl an Herzmuskelzellen sei nach der Geburt unwiderruflich festgelegt, scheint überholt. Nach großen Anstrengungen zur Verbesserung des Verständnisses der Biologie sind Myozytenreplikation, Zell- und Kernbewegungen und spontane fokale Regenerationsherde im humanen adulten Herzen sowie Zellteilungen, Telomerverkürzung und Apoptose im alternden und insuffizienten Herzen beobachtet worden. Es ist davon auszugehen, dass das Herz über eine Klasse von kleinen Parenchymzellen verfügt, die sich vermehren, ausdifferenzieren, altern und letztlich sterben. Diese kleinen Myozytenvorläufer, auch CSC genannt (positiv für die Oberflächenmarker Sca-1, c-Kit und/oder MDR1), befinden sich in sogenannten Stammzellnischen [41].

Die Biologie des Herzens sei also hoch dynamisch. Im physiologischen Zustand halten sich Herzmuskelzellverlust und -neubildung die Waage, so dass sich die Herzzellpopulation etwa alle 4,5 Jahre erneuert und nicht, wie bisher angenommen, einmalig angelegt, während der gesamten Lebenszeit erhalten bleibt [41]. Anders verhält es sich bei massivem Verlust von Herzgewebe nach einem MI. CSC wie auch das Parenchym im Infarktgebiet sterben durch Hypoxie. Im Nichtinfarktgebiet ist eine erhöhte Proliferation von CSC auszumachen. Die Proliferation ist hier bis zu 70 mal höher als unter physiologischen Umständen. Der akute Zellverlust durch den MI kann jedoch nicht vollständig kompensiert werden. Außerdem tritt der Zellverlust plötzlich auf, während der Ersatz der Zellen längere Zeit benötigt [41].

Die Isolation therapeutisch einsetzbarer Mengen autologer CSC erscheint schwer. Dieser Ansatz besitzt jedoch große Potenz das kranke Herzgewebe zu ersetzen, da diese Zellen bereits vordifferenziert sind und sich definitiv integrieren und in funktionierendes Herzgewebe umwandeln können. Auch die Wirkung der Wachstumsfaktoren (wie EPO) wird überprüft, da sie lokal zu einer Aktivierung der regenerativen Zellen beitragen könnten. Jedoch sind diese Mechanismen bisher weitgehend unbekannt [41].

Das regenerative Potenzial exogener Stamm- und Progenitorzellen bei Therapie des akuten MI soll anhand der HSC des KM erläutert werden. Blutzellen stammen vom Mesoderm ab. HSC bzw. hämatopoetische Progenitorzellen (HPC) akkumulieren zunächst in Blutinseln der frühen Somiten, wandern dann in die fetale Leber und erreichen letztlich das Knochenmark. Innerhalb der $c\text{-Kit}^+$ HSC lassen sich die $\text{CD}34^+$ und/oder $\text{CD}133^+$ EPC abgrenzen [40].

In vitro und in vivo Versuche haben gezeigt, dass unausgereifte $c\text{-Kit}^+$ HSC der fetalen Leber und des KM Kardiomyozyten, Muskelfasern und Koronargefäße bilden können. Neugebildetes Myokard nach MI zeigte sich als kontraktile, funktionell kompetent, elektrisch angekoppelt und oxigeniert. Dennoch herrscht Uneinigkeit über die Fähigkeit der HSC eine reife Sarkomerorganisation hervorzubringen [40].

Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen EPO und HSC (s. Abb. 1.7). EPO führt zu einer erhöhten Proliferation von Stammzellen des KM (KMSC) und erhöht die Mobilisierung von EPC [14]. Eine wesentliche Frage, mit der sich diese Arbeit beschäftigt hat, ist, ob EPO diese vermehrt mobilisierten Stammzellen zum Ort eines Gewebeschadens rekrutieren kann.

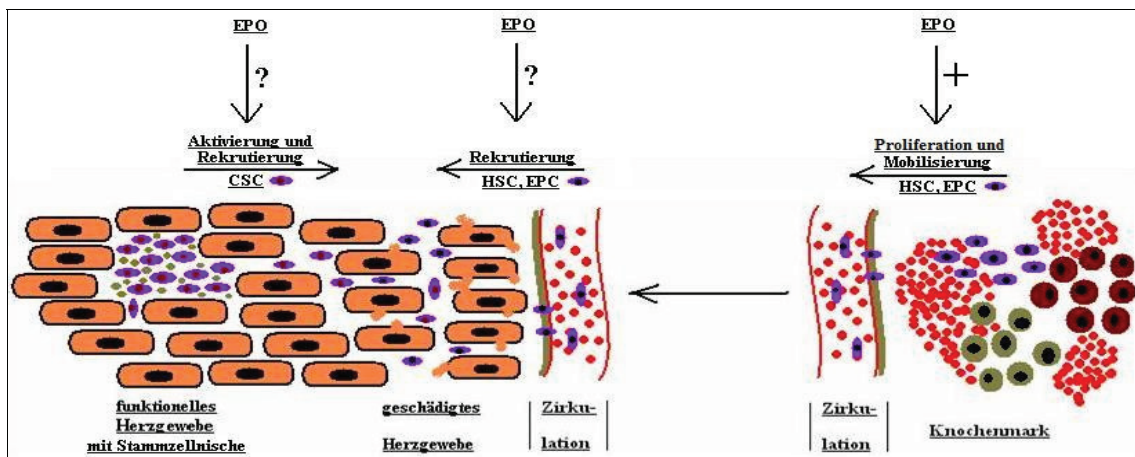


Abb. 1.7 Bekannte und unbekannte Wirkungen von EPO auf CSC und KMSC

Früher wurde angenommen, dass die Gefäßneubildung im Erwachsenen beschränkt auf die Wanderung und Proliferation von reifen Endothelzellen sei (Angiogenese). Heute bestehen neue Beweise, dass Stammzellen nach ischämischer Gewebeschädigung in der Peripherie aus dem KM in die Zirkulation mobilisiert werden, sich hier zu EPC differenzieren und gerichtet zum betroffenen Gebiet wandern, um an der Gefäßneubildung teilzunehmen (Vaskulogenese). Bedeutende Faktoren, die die Serumspiegel von zirkulierenden EPC erhöhen, sind VEGF, SDF-1, GM-CSF, G-CSF und EPO. Insbesondere G-CSF unterhält jedoch eine Entzündungsreaktion, die essentiell für die Progression von Atherosklerose und Entwicklung von rezidivierenden Gefäßstenosen ist, Unsicherheitsfaktoren für die klinische Applikation von G-CSF bei MI. EPO-Serum Spiegel hingegen korrelieren mit der Gesamtzellzahl von $\text{CD}34^+/\text{VEGFR}-2^+$ EPC bei gleichzeitig anti-inflammatorischer Wirkung [42].

Für die EPC Mobilisierung ist die Stammzellnische von entscheidender Relevanz. Diese Nische des KM besteht aus Fibroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen und KMSC. Zytokine (siehe Kapitel 1.1.3) werden am Ort des peripheren ischämischen Schadens sezerniert und induzieren die Freisetzung der Proteinase Elastase und Cathepsin G und/oder die Expression von eNOS im KM (s. Abb. 1.8). Hier spalten die Proteinase auch SDF-1, das von KM-Stromazellen gebildet wird. Von Stromazellen (Endothelzellen) des ischämisch geschädigten Organs wird SDF-1 gesteigert sezerniert, so dass die Konzentration des zirkulierenden SDF-1 steigt während dessen Konzentration im KM sinkt. In der Folge dreht sich der SDF-1 Gradient entlang der KM-Grenze um, was zum verstärkten Austreten CXCR-4⁺ KMSC über das sinusoidale Endothel führt. eNOS steigert die Expression von MMP-9, die Freisetzung von SCF und so die Mobilisation von KMSC. Für die gerichtete Chemoattraktion zum Ort ischämischer Gewebeschädigung sind die Signalkaskaden der SDF-1/CXCR-4 Achse von höchster Wichtigkeit. SDF-1 wirkt dabei sowohl auf CXCR-4⁺ KMSC als auch auf CXCR-4⁺ nicht hämatopoetische gewebe- bzw. organspezifische Stamm- und Progenitor-Zellen (tissue committed stem- and progenitor cells, TCSC) rekrutierend. Darüber hinaus ist die Sensitivität des Antwortverhaltens von CXCR-4⁺ Zellen auf SDF-1 Gradienten beeinflussbar [42][43].

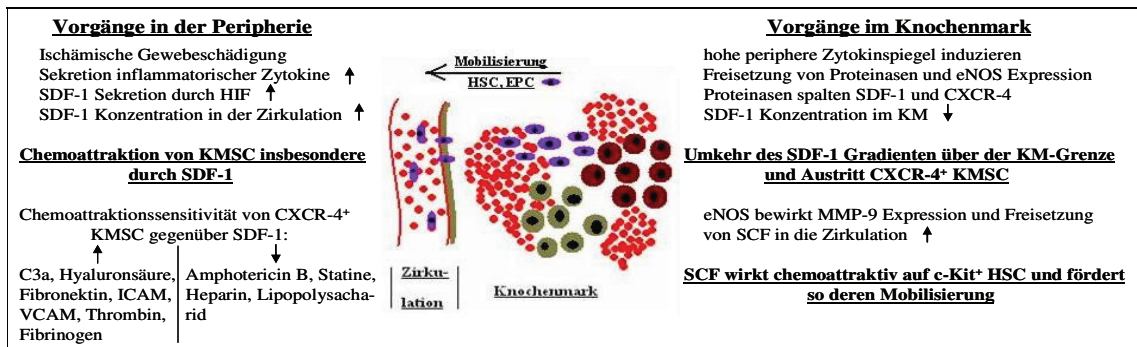


Abb. 1.8 Molekulare Mechanismen zur Mobilisierung und Chemoattraktion von KMSC

Schwierigkeiten bereitet die genaue Bestimmung der Herkunft der Stammzellen, die an der Regeneration eines Gewebeschadens teilnehmen. Neben den HSC aus der fetalen Leber werden auch CXCR-4⁺ TCSC während der Ontogenese SDF-1 abhängig ins KM rekrutiert. Letztere sind positiv für spezifische Gewebemarker (z.B. wie die CSC des Herzmuskels für Nkx 2.5, GATA4 und MEF2C). Das KM ist demnach nicht nur Zuhause von HSC und MSC, sondern auch kleiner Populationen von CXCR-4⁺ TCSC. Darüber hinaus exprimieren auch mononukleäre Zellen des zirkulierenden peripheren Bluts unter physiologischen Bedingungen zu einem geringen Grad spezifische Gewebemarker [41][43].

Die Prozesse der Stammzell-basierten Regeneration nach Myokardinfarkt sind also sehr komplex und noch lange nicht vollständig geklärt. Jedoch scheinen zum Teil sehr ermutigende Resultate das Interesse in diese Forschungsrichtung zu bekräftigen.

1.2.3 Der Wiedereintritt in den Zellzyklus und Erythropoietin

Der MI führt zu unausgeglichen starkem Gewebeverlust. Daher verfolgen neue Strategien die Wiederanschaltung des Zellzyklus im post-mitotischen Myokard.

Wachstumsfaktoren, die den Replikationsprozess stimulieren könnten, stehen der intrinschen Kontrolle des Zellzyklus gegenüber, der entscheidet, ob Zellen bereit sind sich zu teilen [44].

Der Zellzyklus gliedert sich in eine Mitose-Phase (M-Phase) und eine Interphase (s. Abb. 1.9). Während der M-Phase kommt es zur Kern- und Zellteilung. Die Interphase unterteilt sich in die Phasen Gap 1 (G1), Synthese (S) und Gap 2 (G2). Nach der G1-Phase kann eine Go-Phase zwischengeschaltet sein. Die Go-Phase ist eine Ruhephase der Zelle, wenn sie in keinen weiteren Teilungsvorgang eintritt. Die Länge der Go-Phase variiert zwischen Tagen und Jahren. Beendet die Zelle diese, tritt sie wieder über die G1-Phase in die S-Phase ein [44]. Das Fortschreiten des Zellzyklus ist abhängig von einem komplexen Proteinsystem, das die Cycline beinhaltet. Die Cycline sind regulatorische Untereinheiten, die für die Aktivität der Cyclin abhängigen Kinasen (CdK) notwendig sind. Wachstumsfaktoren wie EPO induzieren die Synthese von D-Typ Cyclinen über einen G-Protein (Ras) gekoppelten Signalweg von MAP-Kinasen, den Ras/Raf/MEK/ERK Signalweg. Komplexe aus D-Typ Cyclinen mit Cdk4 und Cdk6 spielen eine entscheidende Rolle am Übergang der Zelle von der Go- zur G1-Phase [14][44][45][46].

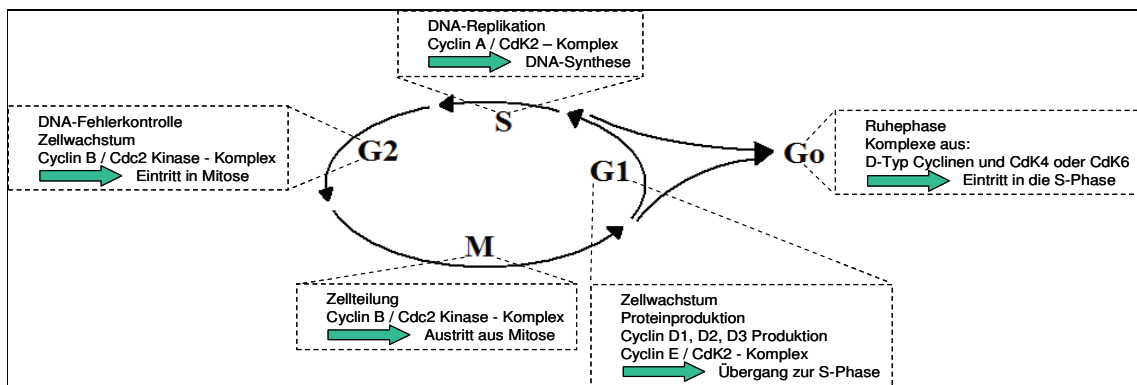


Abb. 1.9 Übersicht zum Zellzyklus und zu hauptverantwortlichen mitogen wirkenden Cdk/Cyclin-Komplexen

Im Herzen verlassen Kardiomyozyten den Zellzyklus um die Zeit der Geburt, d.h. etwa 3 bis 6 Monate nach der Geburt beim Menschen und etwa 3 bis 4 Tage nach der Geburt bei Ratten.

Die Herzmuskelzellen des erwachsenen Menschen befinden sich demnach in der Go-Phase. Außerdem herrschen hohe Level von Cdk Inhibitoren und ein Mangel an Zellzyklus vorantreibenden Cyclinen und CdK [44]. Ähnliches gilt für adulte ausdifferenzierte Endothelzellen. Der Wiedereintritt in den Zellzyklus durch letzteren Zelltyp stellt eine wichtige Quelle der Angiogenese dar [47]. Ein möglicher Einfluss von EPO auf den Wiedereintritt adulter Zellen in den Zellzyklus ist bisher unzureichend untersucht worden.

1.3 Zielsetzung

Die zytoprotektiven und -regenerativen Effekte von EPO sind erst seit jüngster Zeit in das Interesse der experimentellen Forschung gerückt. Dementsprechend sind die zugrunde liegenden Interaktionen des Wachstumsfaktors mit seinem Rezeptor innerhalb der MI-Heilung bislang unzureichend geklärt. Das Ziel dieser Arbeit soll deshalb sein, die therapeutische Effizienz sowie die lokalen Wirkungen und Chemokin-Interaktionen zu bewerten, die durch eine einzige Applikation von EPO ins Infarkttherz induziert werden. Wir untersuchten insbesondere die Hypothese, ob EPO die Stammzellrekrutierung moduliert und zu einer Regeneration des Herzens nach MI beiträgt.

2. Material und Methoden

2.1 Hardware

<u>Hardware</u>	<u>Typ</u>	<u>Firma</u>
Kleintierbeatmungsgerät	SAR-830P	IITC-Life Science
Operationstisch	HI 1220	Leica
Operationsmikroskop	OPM 241 F	Carl Zeiss
Druck-Volumen-Katheter	Millar SPR-838	emka Technologies
Druck-Volumen-Übersetzer	Millar MPCU 200	emka Technologies
	PowerLab data acquisition	
Wasserbad	Aquarium, Art. 89251/3	Tier + Glück
	60 cm x 30 cm x 50 cm (BxTxH)	Heimtiernahrung
Kamera für Aktivitätstests	Lumix DMC LS2	Panasonic
Gefrierröhrchen	Cryo tubes	Nunc A/S
Zentrifuge	Multifuge 1 SR	Heraeus
Mikroskop	DM LB	Leica
Confocal Mikroskop	SP2 Confocal Microscope	Leica
Digitalkamera	DC 200	Leica
Kryo-Mikrotom	CM 1850	Leica
Rotations-Mikrotom	RM 2165	Leica
Paraffineinbettstation	EG 1150 H	Leica
Laminar Luftstrombank	Uni protect	Ehret
Erhitzer und Rührgerät	MR 3001 K	Heidolph
Schüttler	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Computer	Acer Extensa 3002 WLMi	Acer
Elektrokardiogramm	Vicom SM	Marquette Hellige

2.2 Software

<u>Software</u>	<u>Typ</u>	<u>Firma</u>
Bildbearbeitungssoftware:	IM 50, V. 1.20	Leica
	Release 19	
Bildbearbeitungssoftware:	Adobe Photoshop CS 8.0.1	Adobe Systems Inc.
Herzfunktionsaufnahme- software:	IOX 1.8.3.20	emka Technologies
Gelbandenanalysesoftware:	Quantity One® 1-D	BIO-RAD
Primer-Design Software:	Lasergene PrimerSelect	DNASTAR
Planimetriesoftware	Zeiss Axio Vision LE Rel. 4.5	Zeiss
Statistik-Software	SigmaStat 3.0	SPSS
Statistik-Software	SigmaPlot 9.0	SPSS

2.3 Standard- und Pufferlösungen

Puffer / Lösung	Inhalte
PBS:	70 mM NaCl 1,5 mM KCl 4 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 1 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 (aus der Zentralapotheke Universitäts-Klinikum Rostock; UKR)
PBS/EDTA:	PBS (s.o.) 0,4% 0,5 M EDTA (Life Technologies) pH 8,0

2.4 Tiere, Tierhaltung und Operationen

2.4.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Durchführung der Versuche wurden 249 männliche Lewis Ratten der Firma Charles River verwendet. Die Tiere hatten ein Gewicht von 289,5 +/- 9,0 g (Mittelwert ± Standardabweichung) bei einem durchschnittlichen Alter von etwa 12 Wochen. Es handelt sich bei der Lewis Ratte um eine Inzucht-Ratte, wodurch gewährleistet wird, dass der genetische Hintergrund der Tiere sehr ähnlich ist. Sie wurden unter konstanten Temperatur-, Luftfeuchtigkeits- und Luftdruckverhältnissen bis zur Operation unter Gabe von Futter und Wasser gehalten. Vor einer Versuchsreihe wurden die Tiere nach Anlieferung zirka 1 Woche unter oben genannten Bedingungen gehalten. Die Haltung wurde nach der Erstoperation gleichermaßen bis zum Erreichen des jeweiligen Auswertungszeitpunktes fortgeführt.

Dieses Projekt wurde am 30.05.2006 beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern eingereicht und am 29.09.2006 von der Tierschutzkommission genehmigt.

2.4.2 Materialien

Operationsbesteck, bestehend aus:

- Mikroskopierpinzetten; gebogen; 130 mm; AESCULAP
- 1 Mikroknüpfpinzette mit Rundgriff; gebogen; 150 mm; AESCULAP
- 1 feine Schere, Modell La Grange; gezähnt; 110 mm; AESCULAP
- 1 Mikrofederschere mit Flachgriff, Modell NOYES; 125 mm; AESCULAP
- 1 Mikrofederschere mit Flachgriff, Modell VANNAS; 85 mm; AESCULAP
- 1 Nadelhalter, Modell Masing; 130 mm; AESCULAP
- 1 Wundspretzer , Modell Logan; 50 mm; AESCULAP
- 1 chirurgische Schere, Standard Modell; 145 mm; AESCULAP
- 1 6-0 Prolene (Polypropylene) Naht; nicht resorbierbar; Ethicon
- 1 2-0 PDS II Naht; resorbierbar; Ethicon
- 1 5-0 Safil (Polyglykolsäure) Naht; resorbierbar; Braun
- 1 5-0 Vicryl Fäden; resorbierbar; Ethicon
- 1 4-0 Supramid, schwarz; nicht resorbierbar; 100 m; Heiland
- 1 Venenverweilkanüle; 17 Gauge; zur Intubation
- 1 Mikroliterspritze; Modell RN; Hamilton
- 1 Mikrokanüle; 33 Gauge; Modell RN; Hamilton
- 1 Kanüle; 25 Gauge; Becton Dickinson Microlance
- 1 Kanüle; 18 Gauge; Becton Dickinson Microlance
- mehrere 2 ml Spritzen; Becton Dickinson Discardit
- mehrere 1 ml Spritzen; Typ Omnifix; Braun
- 1 10 ml Spritze; Becton Dickinson Discardit
- mehrere Kanülen; 26 Gauge; BD Microlance
- 1 Schlauchkatheter, ca. 15 cm Länge; Typ Polythene Tubing; 0,28 mm Innendurchmesser; 0,61 mm Außendurchmesser; SIMS Portex
- 1 Schlauchkatheter, ca. 3 cm Länge; Typ Polythene Tubing; 0,58 mm Innendurchmesser; 0,96 mm Außendurchmesser; SIMS Portex
- 1 Steril-Skalpell; 160 mm; Dahlhausen
- 1 EDTA-Blut Monovette; 2,7 ml; Sarstedt

2.4.3 Medikamente

Medikament	Firma
Diethyläther	J.T. Baker
Buprenorphine-Hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie
Pentobarbital	Sigma-Aldrich Chemie
Lidocain-Hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie
Heparin-Lösung (Liquemin N 25.000)	Hofmann La Roche AG
Isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %)	B. Braun Melsungen AG
Sauerstoff (99,5 %) für medizinische Zwecke	Messer Griesheim
Druckluft für medizinische Zwecke	Messer Griesheim
Erythropoietin (Erypo/Epoetin alpha)	Ortho Biotech
Kalium Chlorid (99,5%)	Merck
Natrium Chlorid (99,5%)	Carl Roth
Aqua dest.	Baxter S.A.
Metamizol-Tropfen	Ratiopharm®
Dobutamin	Sigma-Aldrich

2.4.4 Vorbereitung und Durchführung der Erstoperation

Die Ratten wurden in drei Gruppen Sham (n=55), MI behandelt mit EPO (MI-EPO, n=99) und unbehandelte MI Kontrollgruppe (MIC, n=95) aufgeteilt. Vor Beginn der Operation wurden die Ratten in einem Äthertopf narkotisiert. Anschließend wurde jedem Tier eine Pentobarbital-Natrium Injektion (50 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere auf einem 38 °C temperierten Arbeitsplatz auf dem Rücken liegend fixiert und mit einer 17 Gauge Venenverweilkanüle intubiert (s. Abb. 2.1). Danach wurden die Tiere mittels eines speziellen Kleintierbeatmungsgerätes druckkontrolliert (bei 14 cm H₂O) mit reinem Sauerstoff beatmet. Die Atemfrequenz betrug 90/min. Zur Überwachung der Herz-Kreislauffunktion wurde ein EKG angeschlossen.

Die Operation begann mit der Rasur der linken oberen Thoraxhälfte. Nach einem linksanterioren Hautschnitt in Höhe des 5. Interkostalraum (ICR), Eröffnung der Muskelfaszie und Isolation sowie transversaler Durchtrennung der Mm. Pectorales gelang der Zugang zum Herzen über eine linksanteriore Thorakotomie. Die Durchtrennung der Interkostalmuskulatur erfolgte im 5. ICR. Die Einsicht in den eröffneten Thoraxraum wurde durch den Einsatz eines Rippenspreizers freigegeben. Alle folgenden Schritte erfolgten unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes mit einer 16 – 100fachen Vergrößerung. Das Perikard wurde eröffnet. Der Rhamus interventricularis anterior (RIVA) wurde 2 mm distal des Ursprungs aus der linken Koronararterie mittels einer 6-0 Prolene Naht permanent ligiert (s. Abb. 2.2).

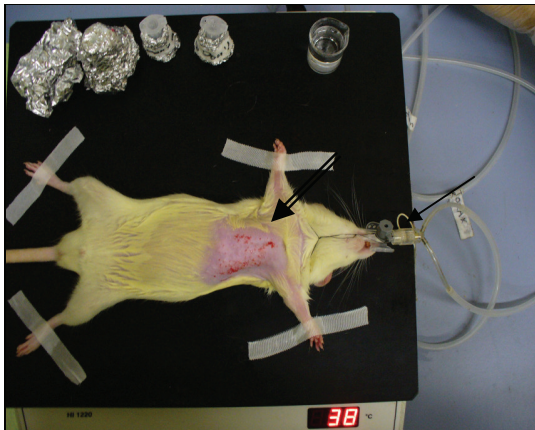


Abb. 2.1 Lagerung der intubierten und beatmeten Ratte auf dem Operationstisch
Pfeil: Tubus;
Doppelpfeil: rasierte linksanteriore Thorakhälfte

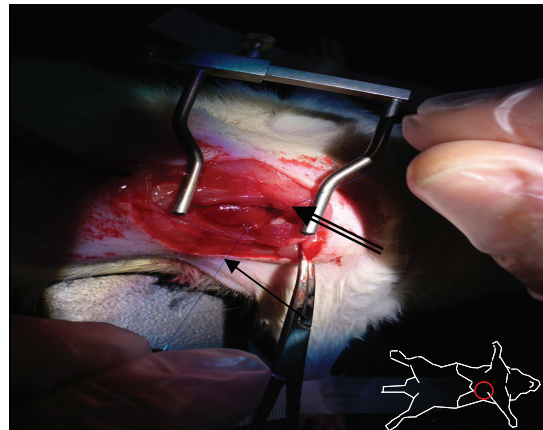


Abb. 2.2 Fadenführung zur Ligation der RIVA distal des Ursprungs
Pfeil: eintretender Faden
Doppelpfeil: austretender Faden

Zur Kontrolle des MI dienten typische Veränderungen im EKG und die Abblassung des Gewebes im abhängigen Stromgebiet der RIVA. Innerhalb der ersten 5 Minuten nach Ligation des Gefäßes erhielten die Ratten 4 intramyokardiale Injektionen à 25 µl mit entweder rekombinantem, humanem EPO in einer totalen Dosis von 3000U/kg Körpergewicht (MI-EPO) oder physiologischer Kochsalzlösung (MIC) entlang der Grenze des ausgeblichenen Gewebes (s. Abb. 2.3). Die Injektionen erfolgten mit einer speziellen Mikroliterspritze, deren 33 Gauge Kanüle mit einem epikardialen Stopper (Ummantelung der Kanüle mit einer 25 Gauge Kanüle) ausgerüstet wurde (s. Abb. 2.4).

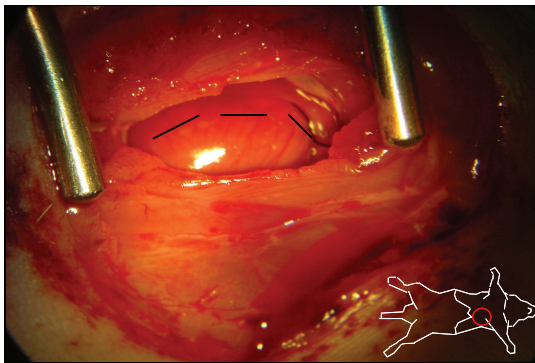


Abb. 2.3 Abblassung des ischämischen Infarktgewebes
- Infarktgrenze schwarz unterbrochen markiert

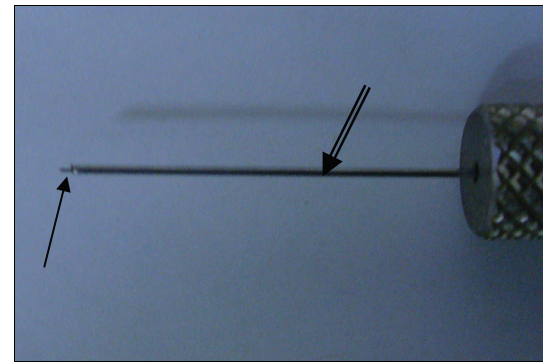


Abb. 2.4 Injektionskanüle mit epikardialen Stopper
Pfeil: 33 Gauge Hamilton Kanüle
Doppelpfeil: 25 Gauge Kanüle

Der epikardiale Stopper verhindert die Perforation der Herzwand und ermöglicht einen sicheren Halt während der Injektion. Anschließend wurden die Qualitätszeichen der Injektion, wie Anschwellung und Abblassung des Gewebes, sicherer Kanülenhalt, temporäres Verschwinden der epikardialen Gefäße und Blutungszeichen nach Injektion, notiert (s. Abb.

2.5 und 2.6). Ratten der Sham Gruppe wurden derselben Operation unterzogen, ohne Induktion eines MI, aber mit intramyokardialer Applikation physiologischer Kochsalzlösung.

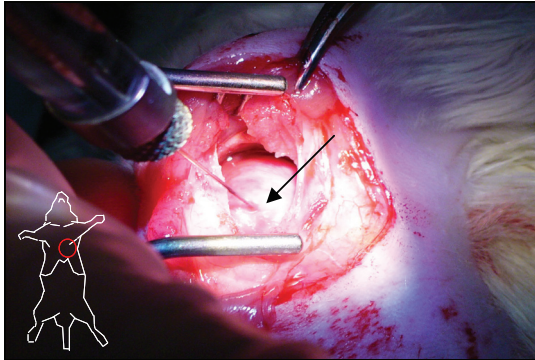


Abb. 2.5 Zustand vor der intramyokardialen Injektion, mit leichter Eindellung an der Injektionsstelle
Pfeil: Injektionsstelle

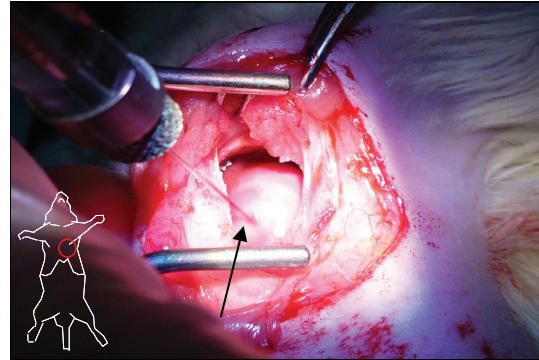


Abb. 2.6 Zustand nach der intramyokardialen Injektion, mit verschwundener Eindellung an der Injektionsstelle und Gewebeabblassung
Pfeil: Injektionsstelle

Anschließend wurde die Pleurahöhle durch Überdruckbeatmung der Lungenflügel entlüftet und der Thorax mit einer 2-0 PDS Naht geschlossen. Die Brustmuskulatur sowie die darüberliegende Haut wurden mit einer 5-0 Safil Naht unter konstantem Vorgehen vernäht. Nach Abschluss der Operation wurden die Ratten vom Beatmungsgerät entwöhnt und erhielten eine s.c. Applikation von Buprenorphin (0,05 mg/kg). Nach dem Erwachen der Tiere wurden sie in entsprechende Käfige umgelagert und für 24 Stunden in Einzelhaltung beobachtet. Während der ersten 7 Tage erhielten sie zusätzlich 10 Tropfen Metamizol ins Trinkwasser (300 ml).

2.4.5 Vorbereitung und Durchführung von Folge-Operationen

2.4.5.1 Blutdruckmessung im Arcus aortae und Analyse von Blutparametern

Die Tiere der Gruppen MIC (n=7 nach 24 h, n=7 nach 48 h, n=5 nach 14 Tagen) und MI-EPO (n=7 nach 24 h, n=7 nach 48 h, n=5 nach 14 Tagen) wurden nach der Erstoperation zur Messung des Blutdrucks im Arcus aortae erneut für eine Operation vorbereitet. Vor Beginn der Operation wurden die Ratten in einem Äthertopf narkotisiert. Anschließend wurde jedem Tier eine Pentobarbital-Natrium Injektion (50 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere auf einem 38 °C temperierten Arbeitsplatz auf dem Rücken liegend fixiert. Zur Überwachung der Herz-Kreislauffunktion wurde ein EKG angeschlossen.

Die Operation begann mit der Rasur im anterioren Halsbereich. Nach einem transversalen Hautschnitt auf Höhe der Schilddrüse wurde die A. carotis communis unter dem M. sternocleidomastoideus präpariert. Alle folgenden Schritte erfolgten unter Zuhilfenahme des Operationsmikroskopes.

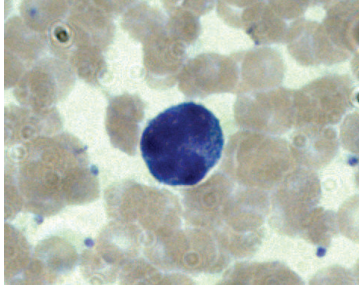
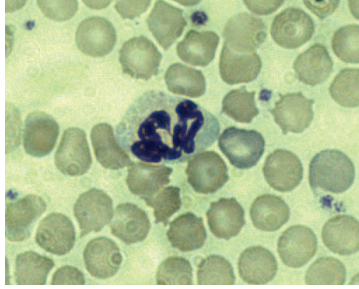
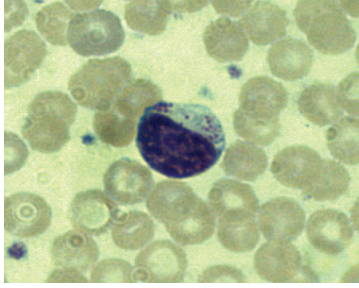
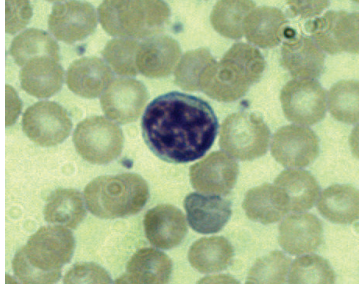
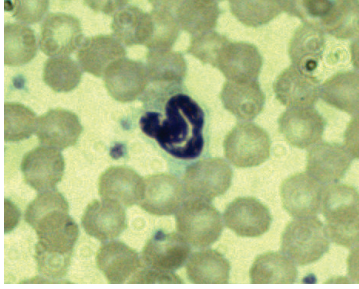
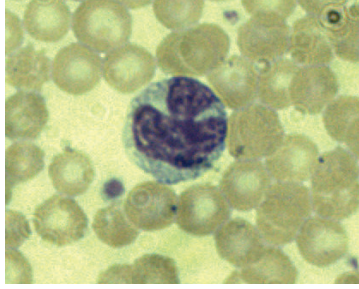
Die Arterie wurde nach distal mit einem 5-0 Vicryl Faden permanent ligiert. Nach proximal wurde der Blutfluss temporär unterbrochen und die Arterie eröffnet. Daraufhin wurde ein Druck-Volumen-Katheter eingeführt und retrograd in den Arcus aortae vorgeschoben. Hier erfolgte die Aufnahme der Druckpulskurve über einen Zeitraum von einer Minute mit einer entsprechenden Herzfunktionsaufnahme-Software. Danach wurde der Druckvolumenkatheter entfernt und die Arterie auch nach proximal mit einem 5-0 Vicryl Faden permanent ligiert. Es folgte die Öffnung des Thorax mittels einer chirurgischen Schere. Über eine heparinisierte 10 ml Spritze wurde das gesamte Blut des Tieres rasch aus der rechten Herzkammer gewonnen, was zum Tod des Tieres führte. 1 ml des gewonnenen Bluts wurde in eine EDTA-Blut Monovette überführt und bei 4 °C gekühlt. Vom restlichen Blut wurde das Plasma mittels einer Ultrazentrifuge (4 °C, 1000x10 m/s², 10 min) abgetrennt und bei -20 °C gelagert. Während dessen wurden Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Milz und Niere aus entsprechenden Körperhöhlen entnommen, in PBS/EDTA (0 °C) gewaschen, in flüssigen Stickstoff überführt und bei -80 °C gelagert. Die kernhaltige zelluläre Fraktion des heparinisierten plasmaarmen Bluts wurde von einem wissenschaftlichen Angestellten des FKGO mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Analyse aufgetrennt und auf die Konzentration der c-Kit⁺ und CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen untersucht. Das EDTA-Blut und das Heparin-Plasma wurden in das Labor des Instituts für klinische Chemie der Universität Rostock eingeschickt. Eine Übersicht zur Untersuchung der Bluteigenschaften vermittelt Tabelle 2.1.

Tab. 2.1 Analyse der Bluteigenschaften

Analytname	Einheit	Analysegerät	Messprinzip
Hämoglobin	mmol/l	Sysmec XE-2100	Photometrie
Hämatokrit	%	Sysmec XE-2100	Widerstandmessprinzip
Erythrozytenzahl	x10 ¹² /l	Sysmec XE-2100	Widerstandmessprinzip
MCV	fl	Sysmec XE-2100	Widerstandmessprinzip
MCH	fmol	Sysmec XE-2100	Widerstandmessprinzip
MCHC	mmol/l	Sysmec XE-2100	Widerstandmessprinzip
Leukozytenzahl	x10 ⁹ /l	Sysmec XE-2100	Widerstandmessprinzip
Thrombozytenzahl	x10 ⁹ /l	Sysmec XE-2100	Widerstandmessprinzip
Retikulozyten, rel.	%	Sysmec XE-2100	Durchflusszytometrische Zellzahlbestimmung
Retikulozyten, abs.	x10 ¹⁰ /l	Sysmec XE-2100	Durchflusszytometrische Zellzahlbestimmung
Blutausstrich		Mikroskop	Färbung nach Pappenheim, Auszählung

Die Beurteilungen verliefen einfach geblindet. Die Ergebnisse sowie die Blutausstriche wurden anschließend zur Verfügung gestellt. Die Blutausstriche wurden mit dem Mikroskop bei 1000facher Vergrößerung (Objektiv 100 fach; Okular 10 fach) unter Verwendung von Immersionsöl (Leica) ausgewertet. Bei mäanderförmigem Fortschreiten der Gesichtsfelder wurden 100 Leukozyten ausgezählt und den verschiedenen Subpopulationen (s. Tab. 2.2) zugeordnet.

Tab. 2.2 Auswertung des Differentialblutbildes

Basophile Granulozyten		Neutrophile Granulozyten (segmentkernig)	
Eosinophile Granulozyten		Lymphozyten	
Neutrophile Granulozyten (stabkernig)		Monozyten	

Eine Übersicht zur Untersuchung der Plasmaeigenschaften ist in Tabelle 2.3 dargestellt. Die Beurteilungen verliefen wiederum einfach geblindet und die Ergebnisse wurden anschließend zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.3 Analyse der Plasmaeigenschaften

Analytname	Einheit	Analysegerät	Messprinzip
Erythropoietin	mU/ml	Immolute Fa.DPC	Festphasen – Chemilumineszenz - Enzymimmunoassay
Creatinkinase	U/l	Synchron LX 20	Spaltung von Creatinphosphat, kinetisch bei 37 °C
Creatinkinase-MB Masse	ng/ml	Elecsys 2010	ElektroChemiLumineszenzImmunoAssay
Kardiales Troponin T (cTnT)	ng/ml	Elecsys 2010	ElektroChemiLumineszenzImmunoAssay

2.4.5.2 Aufnahme von Druck-Volumen-Kurven im linken und rechten Ventrikel

(P/V-Loop)

Unter Verwendung des Protokolls von CardioDynamics BV (Pump Performance of the heart assessed by the conductance method; CD Leycom) wurde die Herzfunktionsmessung durchgeführt. Sechs Wochen nach der Erstopoperation wurden die Ratten (Sham n=11, MIC n=14, MI-EPO n=11) erneut für eine Operation vorbereitet. Vor Beginn der Operation wurden die Ratten in einem Äthertopf narkotisiert. Anschließend wurde jedem Tier eine Pentobarbital-Natrium Injektion (50 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere auf einem 38 °C temperierten Arbeitsplatz auf dem Rücken liegend fixiert und mit einer 17 Gauge Venenverweilkanüle intubiert (s. Abb. 2.1). Danach wurden die Tiere mittels eines speziellen Kleintierbeatmungsgerätes druckkontrolliert (bei 14 cm H₂O) mit Druckluft beatmet. Die Atemfrequenz betrug 90/min. Zur Überwachung der Herz-Kreislauffunktion wurde ein EKG angeschlossen.

Die Operation begann mit der Rasur im Bereich des anterioren Halses und der rechten oberen Thoraxhälfte. Nach einem transversalen Hautschnitt auf Höhe der Schilddrüse wurde zunächst die Vena jugularis externa isoliert und zur Prophylaxe einer Thrombusbildung wurde Heparin (500 IE/kg KG) intravenös appliziert (s. Abb. 2.7). Die Kalibrierung des Druck-Volumen Übersetzers erfolgte über die Angleichung von festgelegten minimalen und maximalen Spannungswerten des Messsystems mit minimalen und maximalen Druckwerten und Blutvolumina der Zirkulation. Anschließend wurde die A. carotis communis unter dem M. sternocleidomastoideus präpariert (s. Abb. 2.8). Die folgenden Schritte erfolgten unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes mit einer 16 - 100fachen Vergrößerung.

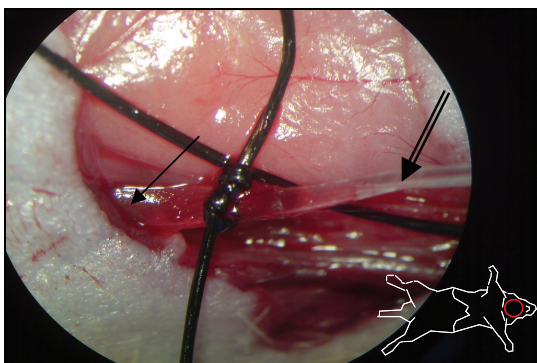


Abb. 2.7 Intravenöser Zugang zur Vena jugularis externa
Pfeil: Vena jugularis externa
Doppelpfeil: Schlauchkatheter

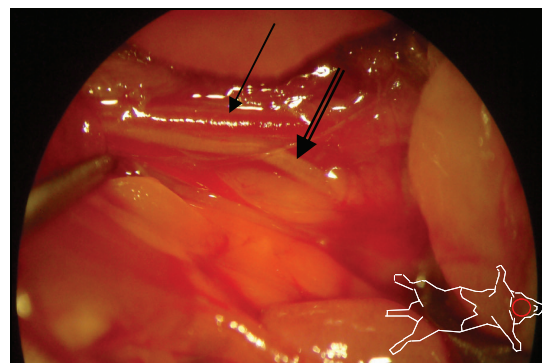


Abb. 2.8 Präparation der Arteria carotis
Pfeil: Arteria carotis
Doppelpfeil: Nervus vagus

Die Arterie wurde nach distal mit einem 4-0 Supramid Faden permanent ligiert. Nach proximal wurde der Blutfluss temporär unterbrochen und die Arterie eröffnet. Daraufhin wurde ein Druck-Volumen-Katheter eingeführt (s. Abb. 2.9) und retrograd in den LV vorgeschoben. Das Volumensignal wurde danach durch Feststellung des Parallelvolumens (V_p) nach intravenöser Gabe hypertoner Kochsalzlösung (5 %) korrigiert. Dann erfolgte die Aufnahme der Druck-Volumen-Kurven unter Normalbedingungen (= Baseline) und unter Stressbedingungen bei intravenöser Applikation von Dobutamin ($10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) jeweils über einen Zeitraum von drei Minuten mit einer entsprechenden Herzfunktionsaufnahmesoftware (s. Abb. 2.10, 2.11, 2.12). Danach wurde der Druckvolumenkatheter entfernt und die Arterie auch nach proximal mit einem 4-0 Supramid Faden permanent ligiert.

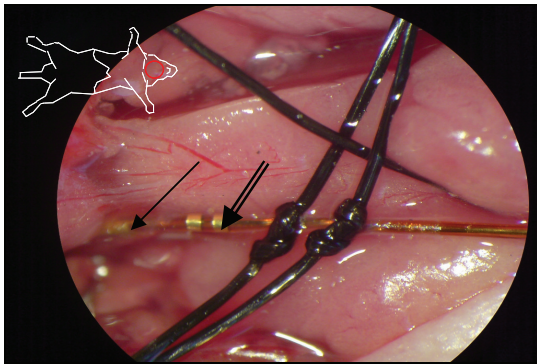


Abb. 2.9 Intrarterielle Lage des Druck-Volumen-Katheters

Pfeil: Druckelektrode

Doppelpfeil: Volumenelektrode

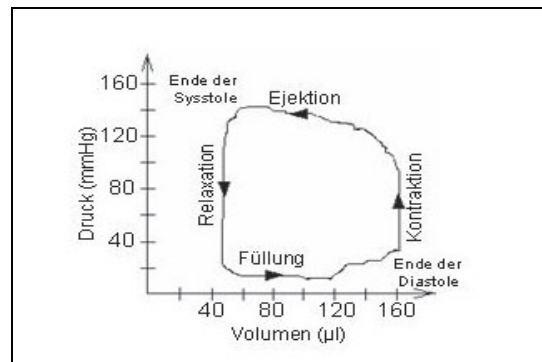


Abb. 2.10 Schematische Darstellung einer Druck-Volumen-Kurve

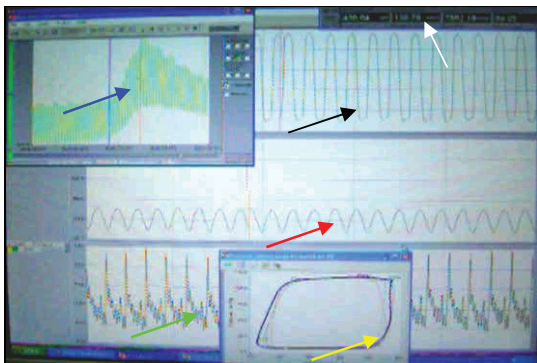


Abb. 2.11 Digitale on-line Aufzeichnung von Druck-Volumen Kurven im LV am Computer

Pfeile: schwarz, Druckkurve; rot, Volumenkurve; grün, EKG Ableitung; gelb, Druck-Volumen Kurven; blau, Messung der Wandleitfähigkeit; weiß, Überwachung wichtiger Alarmgrenzen

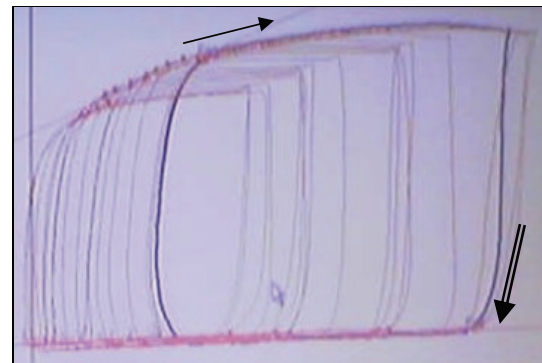


Abb. 2.12 Darstellung einer Salve von on-line Druck-Volumen-Kurven

Pfeil: Gerade durch die end-systolischen Punkte aller Druck-Volumen-Kurven

Doppelpfeil: Gerade durch die end-diastolischen Punkte aller Druck-Volumen-Kurven

Die Durchführung der Messung der Druck-Volumen-Kurven im rechten Ventrikel (RV) erwies sich als sinnvoll nach ersten Ergebnissen der Funktionsmessung im LV. Die Funktion des RV wurde deshalb in die Methodik aufgenommen und bei den entsprechenden Tieren (Sham n=5, MIC n=8, MI-EPO n=8) im Anschluss an die linksventrikuläre Messung durchgeführt. Daher ergaben sich für die Herzfunktionsmessung und Folgeuntersuchungen mitunter unterschiedliche Anzahlen der Tiere pro Gruppe.

Nach einem rechtsanterioren Hautschnitt in Höhe des 6. ICR, Eröffnung der Muskelfaszie und Isolation sowie transversaler Durchtrennung der Mm. Pectorales gelang der Zugang zum Herzen über eine rechtsanteriore Thorakotomie. Die Durchtrennung der Interkostalmuskulatur erfolgte im 6. ICR. Die Einsicht in den eröffneten Thoraxraum wurde durch den Einsatz eines Rippenspreizers freigegeben. Die folgenden Schritte erfolgten wieder unter Zuhilfenahme des Operationsmikroskopes.

Das Perikard wurde eröffnet. Mit Hilfe einer 6-0 Prolene Naht wurde der spätere Zugang zum RV umstochen und eine Tabaksbeutelnaht angelegt (s. Abb. 2.13). Nach Punktion der Wand des RV mit einer 18 Gauge Kanüle wurde der Druck-Volumen-Katheter durch die Ventrikelwand eingeführt. Durch Zug an der Prolene Naht wurde die Kammerwand verschlossen (s. Abb. 2.14). Druck-Volumen-Kurven wurden unter Normalbedingungen über 2 min mit der entsprechenden Herzfunktionsaufnahmesoftware aufgenommen. Danach wurde der Druck-Volumen-Katheter entfernt und hypertone Kaliumchlorid Lösung (5 %) intravenös appliziert, was zum Tod des Tieres führte. Es folgte die vollständige Öffnung des Thorax mittels einer chirurgischen Schere. Das Herz wurde in seiner Gesamtheit entfernt. Letzlich wurden Gehirn, Lunge, Leber, Milz und Niere aus entsprechenden Körperhöhlen entnommen.

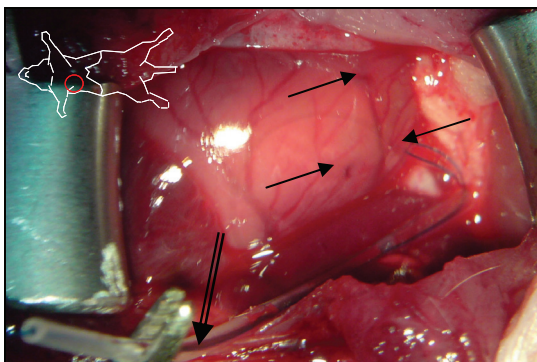


Abb. 2.13 Anlage einer Tabaksbeutelnaht in der Wand des RV
Pfeile: Umstechung des Zugangs mittels 6-0 Prolene Naht
Doppelpfeil: Schlauchkatheter

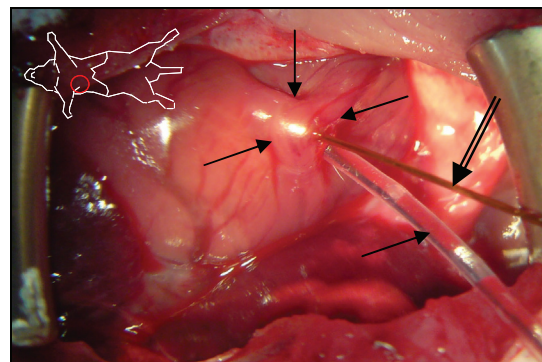


Abb. 2.14 Transmurale Katheterisierung des RV bei geöffnetem Thorax über eine Tabaksbeutelnaht
Pfeile: System der Tabaksbeutelnaht mit Kompression des Gewebes
Doppelpfeil: Druck-Volumen-Katheter

Die entnommenen Herzen wurden folgendermaßen aufbereitet:

Für Histomorphologie (Sham n=6, MIC n=8, MI-Epo n=6): Nach Entnahme der Organe wurden sie 2 mal kurz in PBS/EDTA (0 °C) gewaschen. Vorhöfe, Aorta ascendens und Truncus pulmonalis wurden vom Herz entfernt (s. Abb. 2.15). Die freie Wand des RV wurde vom Restherz getrennt und die Gewichte beider Organportionen ermittelt. Danach wurde der LV sowie die anderen gewaschenen Organe in Formalin (4%) fixiert und für 4 Tage gelagert. Der LV wurde anschließend mit einem sterilen Skalpell in 8 transversale Ebenen von je 1,5 mm Durchmesser unterteilt. Ebenso wurden von den fixierten Organen Gewebeportionen von je 3,0 mm Stärke hergestellt. Für Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR; Sham n=5, MIC n=6, MI-EPO n=5): Nach Entnahme der Herzen wurden sie 2 mal kurz in PBS/EDTA (0 °C) gewaschen. Vorhöfe, Aorta ascendens und Truncus pulmonalis wurden entfernt. Die freie Wand des RV wurde vom Restherz getrennt und die Gewichte beider Organportionen ermittelt. Je eine Portion der Infarktzone (IZ) und Nichtinfarktzone (NIZ) des LV wurden mit einem sterilen Skalpell isoliert und in 2 Kryo-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für 30 Minuten aufbewahrt. Anschließend wurden die Röhrchen bei - 80 °C bis zur Durchführung der RT-PCR gelagert.

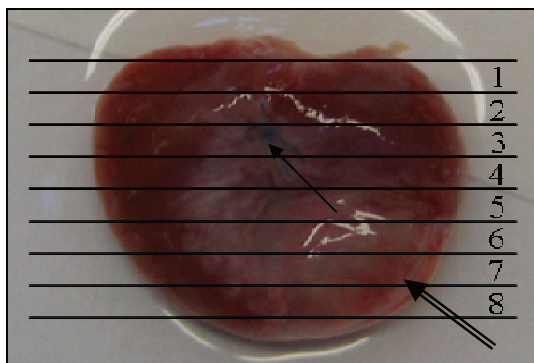


Abb. 2.15 Aufsicht auf die Herzkammern 6 Wochen nach Erstoperation und Schema der Unterteilung in 8 transversale Ebenen
Pfeil: Ligationsstelle
Doppelpfeil : Infarktnarbe

2.5 Forcierter Schwimm-Test („Forced swim test“)

Die Tiere der Gruppen MIC (n=7 nach 24 h, n=7 nach 48 h, n=7 nach 96 h, n=7 nach 7 Tagen, n=6 nach 6 Wochen), MI-EPO (n=6 nach 24 h, n=7 nach 48 h, n=7 nach 96 h, n=7 nach 7 Tagen, n=8 nach 6 Wochen) und Sham (n=7 nach 24 h, n=7 nach 48 h, n=7 nach 96 h, n=7 nach 7 Tagen, n=7 nach 6 Wochen) wurden in ein 22,5 +/- 0,5 °C temperiertes Wasserbad (60 cm x 30 cm x 50 cm; BxTxH) gesetzt. Die Wasserhöhe betrug 16 cm (24 h, 48 h, 96 h, 7 Tage nach Erstoperation) oder 18 cm (6 Wochen nach Erstoperation). Die Ratten hatten die Möglichkeit zu schwimmen und den Boden mit den Füßen und dem Schwanz zu erreichen, um auszuruhen oder sich auf den nächsten Sprung vorzubereiten. Während der letzten 240 s von insgesamt 6 min wurde ihre Aktivität auf Video aufgenommen. Ein unabhängiger Untersucher, der in Bezug auf die Untersuchungsbedingungen blind war, ermittelte die Zeit der Flucht-orientierten Aktivität. Die Flucht-orientierte Aktivität wurde zuvor definiert als Springen, Klettern, Schwimmen, Tauchen und Suchen. Separat wurden sowohl die Gesamtanzahl an Sprüngen als auch die Anzahl von Sprüngen, die zuvor als „hohe Sprünge“ definiert wurden, während der Untersuchungszeit gezählt. Als „hohe Sprünge“ galten solche, die eine Höhe von 30 cm überschritten, eine in Vorversuchen ermittelte Höhe, die auf der Videoaufnahme gekennzeichnet war. Da die körperliche Aktivität vielfältigen tageszeitabhängigen Einflüssen wie Körpertemperatur, Herzfrequenz, Blutdruck, Kortisolspiegel, Adrenalin- und Noradrenalinspiegel sowie Blutglucosespiegel unterliegt [48], wurde der „Forced swim test“ tageszeitabhängig durchgeführt. Die Tiere des Auswertungszeitpunktes 24 h nach MI wurden in allen Gruppen nur zwischen 18.00 und 24.00 Uhr, des Zeitpunktes 48 h zwischen 06.00 und 12.00 Uhr, 96 h zwischen 12.00 und 18.00 Uhr, 7 Tage zwischen 00.00 und 06.00 Uhr und 6 Wochen zwischen 12.00 und 18.00 Uhr ausgewertet. Dementsprechend wurden auch die Erstoperationen der genannten Auswertungszeitpunkte zu den entsprechenden Zeiten durchgeführt.

Nach der Videoaufnahme wurden die Ratten in einem Äthertopf narkotisiert. Es folgte die Öffnung des Thorax mittels einer chirurgischen Schere. Bei den Tieren des Zeitpunktes 6 Wochen nach Erstoperation wurde hypertone Kaliumchlorid Lösung (5 %) direkt in den rechten Ventrikel injiziert, was zum Tod des Tieres führte. Bei den Tieren der anderen Auswertungszeitpunkte wurde das schlagende Herz entnommen, was zum Tod des Tieres führte.

Die entnommenen Herzen wurden folgendermaßen aufbereitet:

Für Histomorphologie: Nach Entnahme der Herzen wurden sie 2 mal kurz in PBS/EDTA (0 °C) gewaschen. Vorhöfe, Aorta ascendens und Truncus pulmonalis wurden entfernt. Im Bereich des Infarktes distal der Ligation der Koronararterie wurden mittels eines sterilen Skalpells zwei transversale Schnitte im Abstand von 3 mm durch die Herzkammerwände unternommen. Die dazwischen liegende Herzgewebeportion (Querschnitt) wurde anschließend auf einen Gewebblock aufgebracht, in Aluminiumfolie verpackt und in flüssigem Stickstoff für 30 Minuten aufbewahrt. Anschließend wurden die Gewebelöcke bei - 80 °C bis zur Herstellung von 5 µm dicken Gewebeschnitten mittels Kryo-Mikrotom gelagert.

Für RT-PCR: Je eine Gewebeportion der IZ und NIZ in Herzspitzennähe des LV wurden mit einem sterilen Skalpell isoliert und in 2 Kryo-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für 30 Minuten aufbewahrt. Anschließend wurden die Röhrchen bei - 80 °C bis zur Durchführung der RT-PCR gelagert.

2.6 Semi-quantitative RT-PCR

Die RT-PCR diente der Untersuchung der durch EPO induzierten Regulationsmoleküle und -mechanismen im Herzgewebe nach künstlicher Herbeiführung des MI. Zur Analyse der mRNA von ausgewählten Molekülen (induzierte Gene) wurden entsprechende Primer (s. Tab. 2.4) mit der Lasergene PrimerSelect Software entworfen („designed“).

Die methodische Durchführung der RT-PCR mit „Primer Design“, der RNA Isolierung, der reversen Transkription, der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und der elektrophoretischen Auftrennung amplifizierter Gensequenzen erfolgte durch einen wissenschaftlichen Angestellten des Forschungslabors für kardialen Gewebe-und Organersatz (FKGO). Dieser stellte Fotografien von gefärbten Gensequenzen zur Auswertung zur Verfügung.

Tab. 2.4 DNA-Primer Sequenzen und deren Basenpaar-Länge

Gen-bezeichnung	Primer-Sequenzen	Produktgröße
GAPDH	upper primer: 5'- CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG -3' lower primer: 5'- GAG GGG CCA TCC ACA GTC TTC -3'	357 bp
SDF-1 α	upper primer: 5'- CTTTGAGAGCCATGTCGCCAGAG -3' lower primer: 5'- GGATCCACTTTAATTTTCGGGTCAA -3'	137 bp
CXCR-4	upper primer: 5'- GACCGCCTTTACCCCGACAGC -3' lower primer: 5'- CCCCAGGAAGGCGTAGAGGAT -3'	361 bp
Akt	upper primer: 5'- GCCGCCTGCCCTTCTAC -3' lower primer: 5'- GGCCTCCGTTCACTGTCC -3'	367 bp
TNF- α	upper primer: 5'- CCACGTCTAGCAAAACCACCAA -3' lower primer: 5'- GGCGGAGAGGAGGCTGACTTTC -3'	244 bp
CD18	upper primer: 5'- ACCTACGTCTTCTGTGCCGAGTG -3' lower primer: 5'- CCAGATGACCAGGAGGAGGACA -3'	297 bp
eNOS	upper primer: 5'- CCTGGCAGCCCTAAGACCTATGTG -3' lower primer: 5'- GTGCGCAATGTGAGTCCGAAAATG -3'	257 bp
VEGF-R2	upper primer: 5'- AGCCGGCCAGTGAGTGTA AAAAC -3' lower primer: 5'- AGGAGATGAGCGCAGTGTGGTC -3'	348 bp
c-Kit	upper primer: 5'- TGGCACCGGAGAGCATTTTCA -3' lower primer: 5'- CACGGGGTTCTCTGGGTTGG -3'	344 bp
CD34	upper primer: 5'- GTTAGGCCCGAGTGTGTTGCTGATG -3' lower primer: 5'- GCCGGTCCC GTTCTCCTGA -3'	384 bp
SOCS1	upper primer: 5'- CGGCTCCGGGCGACTC -3' lower primer: 5'- TGGAAGGGGAAGGA ACTCAGGTAG -3'	487 bp
SOCS3	upper primer: 5'- CCCGCGGCACCTTTCTTA -3' lower primer: 5'- AGGCAGCTGGGTCACCTTTCTCATA -3'	444 bp
CdK4	upper primer: 5'- CGCCTGTGGTTGTACGCTCTG -3' lower primer: 5'- CACTCCGGGTCACCTTTCCTCCTT -3'	397 bp

Die GAPDH cDNA diente als sogenannte Haushalts-Gen-Sequenz (= house-keeping gene) zum Abgleich der eingesetzten RNA-Menge und Validisierung der Ergebnisse. Die Amplifizierung der GAPDH cDNA wurde serienmäßig für alle Proben und analysierten mRNA Moleküle durchgeführt.

Die densitometrische, semi-quantitative Analyse der Photographien erfolgte mit Hilfe der Quantity One® 1-D Analysis Software (BIO-RAD). Die Beurteilung wurde einfach geblindet durchgeführt.

2.7 Histologische Untersuchungen

2.7.1 Materialien

Material	Typ	Firma
Formalin	Formafix 4% (enthält Methanal)	Grimm Med. Logistik
Paraffin	Roti-Plast Paraffin	Roth
Objekträger	Objekträger (50 Stück)	Marienfeld
Pipetten	Pasteurpipetten	Roth
	Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf
Xylol	Xylene	J.T. Baker
Ethanol	100% Ethanol	UKR
Zitronensäurepuffer	Zitronensäure	Sigma
	Aqua dest.	Baxter S.A.
	Natrium Zitrat	Sigma
	pH 6,0	
Peroxidase Block Puffer	Peroxidase Blocking Reagent Buffer	Dako
Antigen Retrieving Puffer	2 M HCL	UKR
Protein Block Puffer	Protein Block Serum-Free Reagent	Dako
Antikörper- Verdünnungspuffer	Antibody Diluent	Dako
Kernfärbung	DAPI	Molecular Probes
		Calbiochem
Floureszenzschutzreagens	FluorSave Reagent	Calbiochem
Waschpuffer	PBS	UKR
	1% Human-Albumin Kabi	Octapharma
	0,5% Tween 20	SERVA
Arbeitslösung („Sirius Red“)	Siriusred F3BA	Division Chroma
	1% Pikrinsäure	UKR
	1% Essigsäure	J.T.Baker
Arbeitslösung („Fast Green“)	Fast Green FCF	Sigma
	1% Pikrinsäure	UKR
	1% Essigsäure	J.T.Baker
Eindeckmittel	Aquatex	Merck

2.7.2 Immunhistologie

2.7.2.1 Herstellen der Gewebeschnitte („Formalin-fixed“ & „Paraffin-embedded“)

- Herzentnahme 6 Wochen nach Erstoperation -

Die transversalen Querschnitte aller Ebenen des LV (1,5 mm) vom Auswertungszeitpunkt 6 Wochen nach Erstoperation wurden mit einer Paraffineinbettstation in Paraffin gebettet. Aus in Paraffinblöcken aufbereiteten Querschnitten der Ebene vier wurden mittels eines Rotationsmikrotoms 5 µm dicke Schnitte gefertigt und auf Objektträger überführt.

2.7.2.2 Herstellen der Gewebeschnitte („Cryo-preserved“)

- Herzentnahme 24 Stunden, 48 Stunden und 1 Woche nach Erstoperation -

Die bei - 80 °C gelagerten Gewebeblöcke des LV wurden mittels eines Kryo-Mikrotoms zur Herstellung von 5 µm dicken Gewebeschnitten weiterbearbeitet. Wiederum wurde das Gewebe auf Objektträger überführt.

2.7.2.3 Immunfärbung der Gewebeschnitte

Die immunhistologischen Färbungen für c-Kit und CD34 wurden durch einen wissenschaftlichen Angestellten des FKGO durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse findet daher Erwähnung im Diskussionsteil (Abschnitt 4.4.2). Weitere Immunfärbungen werden in der Folge detailliert besprochen.

Färbung	Antikörper	Bezeichnung	Firma	Zeitpunkt	Verdünnung
1.)	Anti-CD 31	PECAM-1 (M-20)	Santa Cruz	1 Woche	1:25
Kapillar- Dichte (Einfach- färbung)	Primärantikörper <i>Sekundär- Antikörper</i>	Polyclonal goat anti-CD31 antibody <i>Alexa Fluor 568 donkey anti-goat antibody</i>	<i>Molecular Probes</i>	(n=6, 6; MIC, MI-EPO);	<i>1:200</i>
	<u>Kern- Färbung</u>	<u>DAPI</u>	<u>Sigma</u>	6 Wochen (n=6, 8, 6; Sham, MIC, MI-EPO)	<u>1:500</u>
2.)	Anti-Ki-67	Monoclonal mouse anti-Ki-67 antibody	Dako	24 Stunden 48 Stunden	1:25
Proliferation (Einfach- färbung)	Primärantikörper <i>Sekundär- antikörper</i>	<i>Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse antibody</i>	<i>Molecular Probes</i>	(jeweils n=6, 6; MIC, MI-EPO)	<i>1:200</i>
	<u>Kern- Färbung</u>	<u>TOPRO3</u>	<u>Molecular Probes</u>		<u>1:200</u>

Färbung	Antikörper	Bezeichnung	Firma	Zeitpunkt	Verdünnung
3.) eNOS (Einfach- färbung)	Anti-eNOS Primärantikörper <i>Sekundär- antikörper</i>	Monoclonal mouse anti-eNOS antibody <i>Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse antibody</i>	Becton Dickinson <i>Molecular Probes</i>	24 Stunden (n=6, 6; MIC, MI-EPO)	1:25 <i>1:200</i>
	<u>Kern- Färbung</u>	<u>TOPRO3</u>	<u>Molecular Probes</u>		<u>1:200</u>
4.) Kardio- myozyten- apoptose (Doppel- färbung)	TUNEL Färbung <i>- gefolgt von -</i> Anti-Myosin Primärantikörper <i>Sekundär- antikörper</i>	In situ cell death detection kit, Fluorescein Monoclonal mouse anti-cardiac Myosin <i>Alexa Fluor 568 goat anti-mouse antibody</i>	Roche Millipore <i>Molecular Probes</i>	1 Woche (n=6, 6; MIC, MI-EPO); 6 Wochen (n=6, 6, 6; Sham, MIC, MI-EPO)	1:5 <i>1:200</i> <u>1:200</u>
	<u>Kern- Färbung</u>	<u>TOPRO3</u>	<u>Molecular Probes</u>		<u>1:200</u>

Die bei Raumtemperatur (RTemp) gelagerten Paraffin-Gewebeschnitte mussten zunächst deparaffinisiert werden. Es erfolgte eine Erhitzung der Objektträger auf 70 °C für 30 min. Anschließend wurde das Gewebe bei RTemp in einer absteigenden alkoholischen Reihe von Xylol bis 80 %igen Ethanol vom Paraffin befreit. Danach folgte ein erster „Antigen-Retrieving“ Schritt. Das Gewebe wurde 10 min im Zitronensäurepuffer gekocht. Danach wurde bei RTemp mit PBS gewaschen. Nach diesem Schritt konnten die entparaffinisierten Gewebeschnitte und die Gewebeschnitte nach Kryo-Konservation gleichermaßen behandelt werden. Zunächst wurden die Gewebe 10 Minuten in 4%igem Aceton fixiert. Im Folgenden wurde die endogene Peroxidase blockiert. Daraufhin wurde ein zweiter „Antigen-Retrieving“ Schritt in 2M HCl unternommen. Nach einer Proteinblockierung von 10 Minuten Dauer, schloss sich für die Einfachfärbungen (s.o.) die Inkubation des Schnittes mit 80 µl Primärantikörper (Verdünnung s.o.) über Nacht bei 4 °C an. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, die nur mit Verdünnungspuffer inkubiert wurden. Danach wurde der Sekundärantikörper (Verdünnung s.o.) dem Schnitt für 120 min bei 37 °C und anschließend 60 min bei RTemp zugesetzt. Es folgte die Kernfärbung der Schnitte (Verdünnung s.o.). Nach Eindeckung der Schnitte mit FlourSave und Trocknung wurden sie luftdicht versiegelt und in Dunkelheit kurzzeitig gelagert. Bei der Doppelfärbung für Kardiomyozytenapoptose (s.o.) wurde eine Inkubation des Schnittes mit 50 µl der Reaktionslösung des „In situ cell death detection kit, fluorescein“ über Nacht bei 4 °C vor dem Wirken des Primärantikörpers zwischengeschaltet. Das weitere Vorgehen entsprach den Einfachfärbungen.

2.7.2.4 Auswertung der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden fluoreszenzmikroskopisch bei 100-, 200-, 400- und 630facher Vergrößerung hinsichtlich der Qualität der Färbungen beurteilt. Alle Zählungen und Beurteilungen wurden einfach geblindet durchgeführt.

Färbung 1.) Kapillardichte

Die CD 31 markierten Kapillaren mit einem Durchmesser zwischen 5 und 20 μm wurden mittels eines Rasters (s. Abb. 2.16), bestehend aus 32 Feldern $\hat{=}$ 0,216 mm^2 , bei 400facher Vergrößerung des Mikroskops ausgezählt.

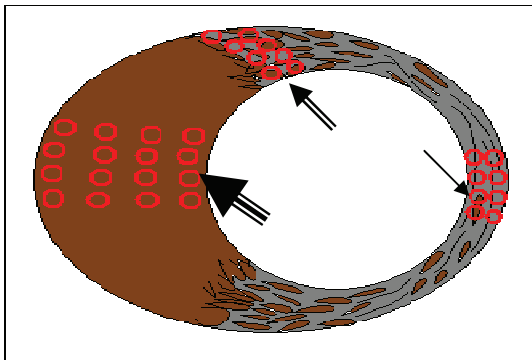


Abb. 2.16 Schematische Darstellung des Auswertungsrasters der CD31 gefärbten Gewebeschnitte des LV
Pfeil: Infarktbereich
Doppelpfeil: Grenzbereich
Dreifachpfeil: Nichtinfarktbereich
Roter Kreis: Gesichtsfeld

Im Nichtinfarktbereich sowie im Grenzbereich wurde die Gefäßdichte ($1/\text{mm}^2$) festgestellt. Im Infarktbereich ist es unüblich, von Gefäßdichte zu sprechen, da sich insbesondere 6 Wochen nach MI in der abgeheilten Narbe in erster Linie Kollagenfasern und wenig zelluläres Gewebe befinden. Hier wurden die Gefäßmorphologie sowie die Gefäßarchitektur beurteilt.

Färbung 2.) Proliferation

Die Ki-67 markierten Zellen wurden in 32 zufällig ausgewählten Feldern (16 Felder im Nichtinfarktbereich und 16 Felder im Infarktbereich inklusive Grenzbereich) $\hat{=}$ 0,137 mm^2 bei 630facher Vergrößerung des Confocal Mikroskops ausgezählt. Die Ergebnisse wurden als Anzahl Ki-67⁺ Zellen pro Gesichtsfeld dargestellt.

Färbung 3.) eNOS

Die Quantität der eNOS Expression wurde nach ordinalen Gesichtspunkten (mehr/weniger) für die Gruppen MIC und MI-EPO spezifisch für Nichtinfarktbereich, Infarktbereich und Grenzbereich bei 630facher Vergrößerung des Confocal Mikroskops ausgewertet.

Färbung 4.) Kardiomyozytenapoptose

Die TUNEL/Myosin gekennzeichneten Kardiomyozyten wurden in 32 zufällig ausgewählten Feldern (16 Felder im Nichtinfarktbereich und 16 Felder im Grenzbereich) $\hat{=}$ 0,137 mm^2 bei 630facher Vergrößerung des Confocal Mikroskops ausgezählt. Gleichzeitig wurde jeweils die Anzahl der Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld ermittelt. Der Quotient aus beiden Werten wurde berechnet und das Verhältnis der Apoptose in Kardiomyozyten dargestellt.

2.7.3 Gewebefärbung

2.7.3.1 Herstellen der Gewebeschnitte („Formalin-fixed“ & „Paraffin-embedded“)

- Organentnahme 6 Wochen nach Erstoperation –

Die transversalen Querschnitte aller Ebenen des LV (1,5 mm) und die Organportionen von Lunge, Leber, Niere, Milz und Gehirn (3,0 mm) vom Auswertungszeitpunkt 6 Wochen nach Erstoperation wurden mit einer Paraffineinbettstation in Paraffin gebettet. Die in Paraffinblöcken aufbereiteten transversalen Querschnitte aller Ebenen des LV sowie aller anderen Organe vom Auswertungszeitpunkt 6 Wochen nach Erstoperation (s.o.) wurden mittels des Rotationsmikrotoms in 5 µm dicke Schnitte aufbereitet und auf Objektträger überführt.

2.7.3.2 Herstellen der Gewebeschnitte („Cryo-preserved“)

- Organentnahme 24 Stunden, 48 Stunden und 2 Wochen nach Erstoperation -

Die bei - 80 °C gelagerten Gewebeblöcke von Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Gehirn wurden mittels eines Kryo-Mikrotoms zur Herstellung von 5 µm dicken Gewebeschnitten weiterbearbeitet und auf Objektträger überführt.

2.7.3.3 Färbung der Gewebeschnitte

Färbungsreagenz	Gefärbtes Gewebe	Firma
Sirius Red	Kollagen (Rotfärbung)	Division Chroma
Fast Green	Myokard (Grünfärbung)	Sigma
Hämalaun	Kerne (Färbung ist blau bis schwarz)	Merck
Eosin G	Zytoplasma / Kollagen (Rotfärbung)	Merck

Die bei Raumtemperatur (RTemp) gelagerten Paraffin-Gewebeschnitte mussten zunächst deparaffinisiert werden. Wie oben beschrieben erfolgte eine Erhitzung der Gewebe und anschließend eine Behandlung mit einer absteigenden alkoholischen Reihe. Nach Abschluss der Färbung wurden diese Gewebeschnitte mit einer aufsteigenden alkoholischen Reihe von 70%igem Ethanol bis Xylol behandelt.

a) „Sirius Red / Fast Green“ – Färbung (nur in Herzen 6 Wochen nach MI):

Nach Abschluss der absteigenden alkoholischen Reihe wurde das Gewebe bei RTemp mit Aqua dest. gespült und für 3 min in der „Sirius Red“ Arbeitslösung inkubiert. Danach wurde das Gewebe über 30 min in der „Fast Green“ Arbeitslösung inkubiert. Letztlich wurde der histologische Schnitt mit Aquatex eingedeckt und nach Trocknung luftdicht versiegelt.

b) Hämalaun/Eosin G – Färbung (HE-Färbung):

Das Gewebe wurde bei RTemp mit Aqua dest. gespült und für 8 min in gefiltertem Hämalaun inkubiert. Unter seicht fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte über 20 min gebläut und für 2 min in gefiltertes Eosin G getaucht. Danach wurde das Gewebe kurz unter Aqua dest. gewaschen. Zuletzt wurde der Schnitt wie oben beschrieben eingedeckt und versiegelt.

2.7.3.4 Auswertung der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch bei 100-, 200- und 400facher Vergrößerung hinsichtlich der Qualität der Färbungen beurteilt. Alle Ausmessungen wurden von 2 wissenschaftlichen Mitarbeitern des FKGO einfach geblindet durchgeführt.

a) Infarktgröße / interstitielle Fibrose / Kardiomyozytenhypertrophie (6 Wochen nach MI):

Je ein „Sirius Red / Fast Green“ gefärbter Schnitt pro Transversalebene des LV wurde unter 10facher Vergrößerung analysiert. Die „Sirius Red“ positiven Bereiche definierten das Infarktareal (s. Abb. 2.17), während die „Fast Green“ positiven Bereiche das überlebende Myokard darstellten. Die Oberfläche des Infarktareals sowie der Gesamtfläche des Schnitts wurden mittels digitaler Planimetrie am Computer ermittelt und so die relative Infarktgröße jeder Transversalebene berechnet [49]. Durch Bildung des Mittelwerts aus drei Messungen pro Herz (Transversalebene 4 bis 6; n=8, 6; MIC, MI-EPO) wurde die relative Infarktgröße des LV bestimmt. Desweiteren wurde endokardnah im myokardialen Nichtinfarktbereich die Oberfläche des „Sirius Red“ gefärbten Anteils in 10 zufällig gewählten Gesichtsfeldern pro Herz (n=6, pro Gruppe) bei 200facher Vergrößerung mittels Planimetrie analysiert. Das Verhältnis der Kollagenfläche zur Myokardfläche repräsentierte die interstitielle Fibrose (= Kollagendichte). Die Größe von „Fast Green“ positiven Kardiomyozyten wurde bei 400facher Vergrößerung bestimmt. Einhundert Myozyten pro Herz (n=6, pro Gruppe) wurden endokardnah zufällig gewählt und ausgemessen durch Planimetrie. Der Mittelwert für Myozytengröße in den untersuchten Herzen wurde in μm^2 angegeben.

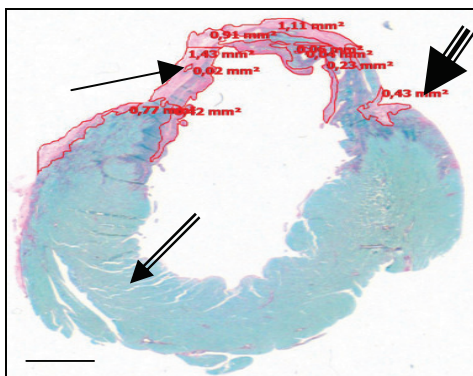


Abb. 2.17 „Sirius Red / Fast Green“ gefärbter Schnitt der Ebene 5

Pfeil: Infarktbereich

Doppelpfeil: Nichtinfarktbereich

Dreifachpfeil: Flächenbestimmung eines „Sirius Red“ gefärbten Areal

Maßstab: Strecke = 2 mm

b) Areal des akuten myokardialen Schadens (48 Stunden nach MI):

Der Gesamtquerschnitt HE gefärbter Schnitte von Herzen (n=7, pro Gruppe), entnommen 48 Stunden nach MI, wurde fotografiert. Die Schadensgrenze (bei 100facher Vergrößerung) und das rel. LV Myokardschadensareal wurden mittels Planimetrie definiert (s. Abb. 2.18).

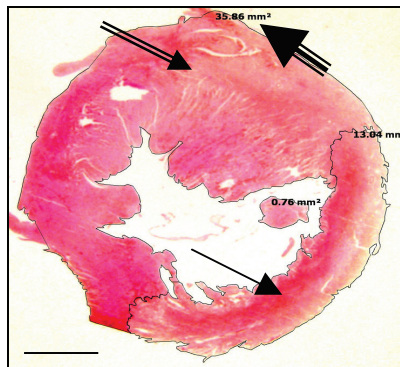


Abb. 2.18 HE gefärbter Schnitt des Herzens
 Pfeil: Areal des myokardialen Schadens
 Doppelpfeil: Nichtinfarktbereich des LV
 Dreifachpfeil: Flächenbestimmung
 eines HE gefärbten Areals
 Maßstab: Strecke = 2 mm

c) pathologische Begutachtung:

Die Herzen des Auswertungszeitpunkt 6 Wochen nach MI wurden nach pathologischen Veränderungen hinsichtlich intramuraler Thrombosierung, Verkalkungen und sonstiger Auffälligkeiten untersucht. HE gefärbte Schnitte der Transversalebene 4 und 6 wurden herangezogen. Selbige Gesichtspunkte wurden in HE gefärbten Herzen 24 Stunden, 48 Stunden und 2 Wochen nach MI sowie in den HE gefärbten Organen Lunge, Leber, Niere, Milz und Gehirn aller Auswertungszeitpunkte begutachtet.

Die pathologischen Beurteilungen wurden einfach geblindet von 2 unabhängigen Untersuchern des Instituts für Pathologie der Universität Rostock bestätigt bzw. ergänzt.

2.8 Statistische Analysen

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden folgende statistische Parameter verwendet:

Angabe der Mittelwerte (MW) und Standardfehler (SEM) mit 2 Nachkommastellen.

Berechnung von Signifikanzen mittels Ein-Weg ANOVA. ANOVA verwendete je nach benutzter Datenmenge den parametrischen Holm-Sidak-Test sowie den nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test (bei Nichtnormalverteilung) oder Dunn´s-Test.

Berechnung von Signifikanzen beim Vergleich der Überlebenskurven mittels Kaplan-Meier Analyse. Kaplan-Meier Analyse verwendete Log Rank Test.

Alle Berechnungen von Signifikanzen wurden zur Kontrolle im Institut für medizinische Informatik und Biometrie eingereicht.

P Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Grafische Darstellung der Parameter in Balken-, Punkt- und Liniendiagrammen.

In Balken- und Punktdiagrammen wurden die Werte dargestellt in Form $MW \pm SEM$.

3. Ergebnisse

3.1 Postoperative Therapie-assoziierte Überlebensraten nach Myokardinfarkt

Von den 249 verwendeten männlichen Lewis Ratten wurden 18 Tiere aufgrund von Abweichungen von der Standardprozedur während der Durchführung der Erstoperation von der postoperativen Therapie-assoziierten Überlebensrate ausgeschlossen. In der Gruppe Sham wurden von 55 Tieren 2 Tiere ausgeschlossen. Ein Tier starb aufgrund von Narkoseintoleranz vor Beginn der Operation, ein weiteres Tier aufgrund einer unbeherrschbaren intrathorakalen Blutung. In der Gruppe MIC wurden von 95 Tieren 6 Tiere ausgeschlossen. Drei Tiere erhielten qualitativ unzureichende Injektionen, ein Tier starb infolge einer intrathorakalen Blutung, ein Tier starb durch technisches Versagen des Beatmungsgeräts und ein Tier musste wegen Riss des Ligaturfadens mit nachfolgender Blutung und Gewebsschädigung ausgeschlossen werden. In der Gruppe MI-EPO wurden von 99 Tieren 10 Tiere ausgeschlossen. Sechs Tiere erhielten qualitativ unzureichende Injektionen. Bei einem Tier wurde eine eitrige Fremdkörperreaktion distal der Ligationsstelle festgestellt. Ein Tier starb aufgrund von Narkoseintoleranz vor der Erstoperation, ein weiteres infolge einer intrathorakalen Blutung und ein Tier starb durch technisches Versagen des Beatmungsgeräts. Die restlichen Tiere (Sham n=53, MIC n=89, MI-EPO n=89) überlebten die Narkoseeinleitung und die antero-laterale Thorakotomie unbeschadet und konnten problemlos der Abklemm-Prozedur des RIVA (MIC, MI-EPO) bzw. der Scheinoperation (Sham) unterzogen werden. Zum Teil konnten die Tiere jedoch nicht den gesamten Auswertungszeitraum überleben. Mit Bezug auf die jeweilige Methodik und Therapie in den drei Gruppen zeigt Abbildung 3.1 die Therapie-assoziierte Überlebensrate in den Experimentgruppen. Zwischen den Gruppen MIC mit einer Überlebensrate von 75.28 % und MI-EPO mit einer Überlebensrate von 77.53 % gab es während des Auswertungszeitraums von 6 Wochen nach Erstoperation keinen signifikanten Unterschied in den Überlebenskurven ($P=0.120$). In Sham lag die Überlebenswahrscheinlichkeit bei 98.11 %. Die meisten Tiere in MIC und MI-EPO starben am ersten postoperativen Tag. In MIC starben nach den ersten 24 Stunden 4 Tiere, davon zwei am zweiten postoperativen Tag. Höchst bemerkenswert starb in MI-EPO keine Ratte am zweiten postoperativen Tag und nur ein Tier spät nach MI. Die post mortem Untersuchungen aller Tiere, die nach 48 Stunden nach MI starben, zeigten massive Myokardinfarzierung, Pleuraerguss und rechtsventrikuläre Hypertrophie. Die lokale EPO Therapie nach MI ergab somit keinen Überlebensvorteil gegenüber Kontrollinjektionen während des Beobachtungszeitraumes von 6 Wochen nach akutem MI.

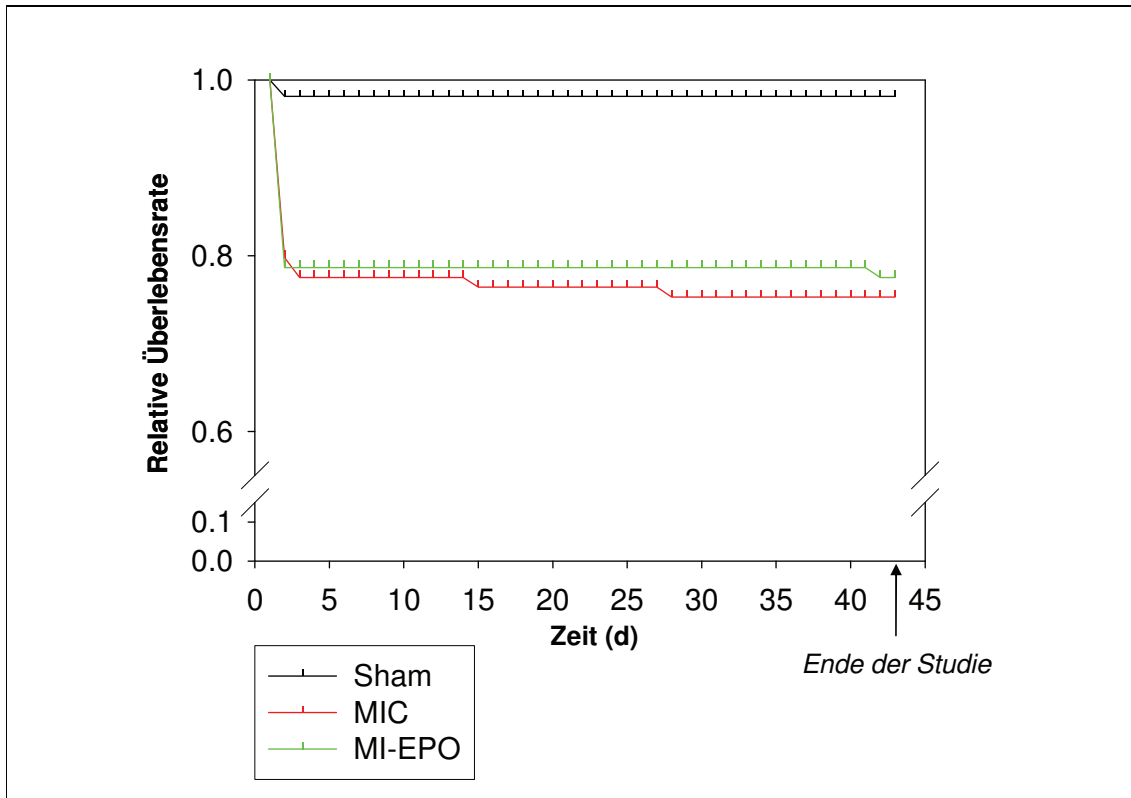


Abb. 3.1 Therapie-bezogene Überlebensrate in den Experimentgruppen

3.2 Herzfunktion 6 Wochen nach akutem Myokardinfarkt

Die lokale Applikation von EPO verbesserte sowohl systolische als auch diastolische Eigenschaften des LV unter Normal- und Stressbedingungen. Eine vollständige Auflistung der hämodynamischen Parameter findet sich in Tabelle 3.1 und 3.2. Das Antwortverhalten der Herzen aus der Gruppe MI-EPO auf den durch Dobutamin (= Katecholamin) induzierten Stress zeigte einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz gegenüber den unbehandelten Herzen von MIC. Darüber hinaus fand sich eine 71 %ige Steigerung des Herzzeitvolumens, eine Verdopplung der Herzarbeit und ein 61 %iger Anstieg des Schlagvolumens (s. Abb. 3.2). (Prozentangaben sind bezogen auf die Messung unter Stressbedingungen.)

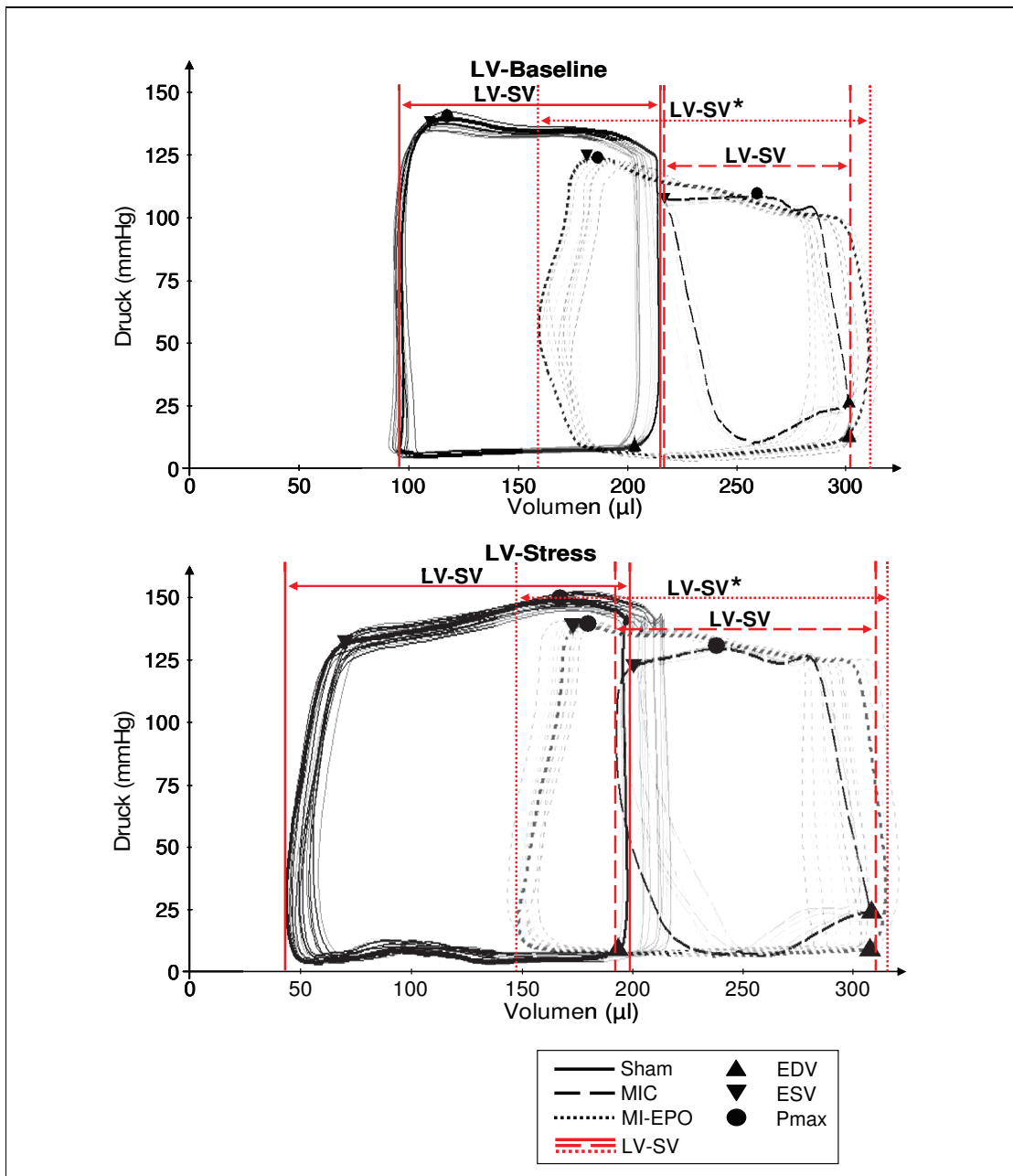


Abb. 3.2 Repräsentative Druck-Volumen Kurven, erhalten von Herzen der Gruppen Sham (durchgängige Linie), MIC (unterbrochene Linie) und MI-EPO (gepunktete Linie) legten eine deutliche Verbesserung des LV Schlagvolumens (LV-SV) in MI-EPO verglichen mit MIC unter Normalbedingungen (Baseline -oben) and Stressbedingungen (unten) offen. EDV, enddiastolische Volumen; ESV, endsystolisches Volumen; Pmax, Maximaldruck; MW±SEM; * $P < 0.05$

Tab. 3.1 Hämodynamische Parameter der LV Herzfunktion unter Normalbedingungen

Parameter	Sham (n=11)	MIC (n=14)	MI-EPO (n=11)	P*
Pmax (mmHg)	147.74 ± 3.36	114.95 ± 6.94	126.70 ± 7.12	0.255
EDP (mmHg)	6.57 ± 1.91	21.38 ± 3.19	10.54 ± 2.27	0.015
dPdt max (mmHg/s)	10942.50 ± 276.37	5815.23 ± 335.97	7374.84 ± 525.45	0.016
dPdt min (mmHg/s)	-10137.44 ± 281.57	-3453.68 ± 121.38	-4743.93 ± 480.98	0.007
Relaxationszeit (msec)	8.05 ± 1.53	19.74 ± 1.40	13.07 ± 1.37	0.003
EDV (µl)	211.30 ± 14.62	312.44 ± 27.98	313.56 ± 23.52	0.784
ESV (µl)	103.24 ± 5.96	225.36 ± 20.04	187.49 ± 15.60	0.101
SV (µl)	108.06 ± 10.31	87.11 ± 11.52	126.07 ± 12.18	0.031
HZV (µl/min)	44883.95 ± 4218.50	31083.60 ± 4272.36	51331.77 ± 4843.92	0.005
AF (%)	50.45 ± 2.08	27.12 ± 1.78	40.05 ± 2.42	<0.001
HA (µl×mmHg)	13124.94 ± 1694.95	6166.67 ± 846.91	11742.17 ± 1352.87	0.001
HR (1/min)	418.16 ± 10.19	359.61 ± 19.73	409.09 ± 11.32	0.055

Tab. 3.2 Hämodynamische Parameter der LV Herzfunktion unter Stressbedingungen

Parameter	Sham (n=11)	MIC (n=14)	MI-EPO (n=11)	P*
Pmax (mmHg)	144.54 ± 3.74	124.08 ± 3.34	131.05 ± 4.37	0.209
EDP (mmHg)	4.82 ± 1.06	17.02 ± 2.99	8.06 ± 2.30	0.033
dPdt max (mmHg/s)	18962.22 ± 358.66	9529.60 ± 490.22	12456.81 ± 726.55	0.002
dPdt min (mmHg/s)	-9418.62 ± 349.47	-5421.46 ± 355.71	-6741.31 ± 538.93	0.045
Relaxationszeit (msec)	5.95 ± 1.04	13.76 ± 1,51	8.92 ± 1.13	0.022
EDV (µl)	186.24 ± 14.14	299.74 ± 30.16	315.01 ± 16.06	0.684
ESV (µl)	48.08 ± 5.23	203.67 ± 21.44	160.20 ± 16.02	0.136
SV (µl)	138.06 ± 10.06	96.13 ± 13.37	154.77 ± 20.15	0.019
HZV (µl/min)	65518.22 ± 5096.70	41678.97 ± 6206.30	71148.18 ± 8995.16	0.011
AF (%)	74.44 ± 1.54	31.61 ± 2.25	48.39 ± 5.01	0.003
HA (µl×mmHg)	16336.62 ± 1334.16	7428.62 ± 1050.69	14937.78 ± 1971.47	0.004
HF (1/min)	474.30 ± 10.06	429.92 ± 8.29	459.30 ± 7.85	0.019

* MIC vs. MI-EPO. Die Werte wurden dargestellt in Form MW ± SEM. Pmax heißt Maximaldruck; EDP beinhaltet enddiastolischer Druck; dPdt, maximale Geschwindigkeit des Druckanstiegs während der Kontraktion (dPdt max) und des Druckabfalls während der Relaxation (dPdt min); EDV, enddiastolisches Volumen; ESV, endsystolisches Volumen; SV, Schlagvolumen; HZV, Herzzeitvolumen; AF, Auswurffraktion; HA, Herzarbeit; und HF, Herzfrequenz.

3.2.1 Die systolische Funktion des LV

Während der Systole wird das Blut in die Aorta ausgeworfen. Sie besteht aus einer Kontraktions- und einer Ejektionsphase (s.o.). Die Messung der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit während der Kontraktionsphase ergibt den Wert für dPdt max. Dieser Index steht in direkter Beziehung zur Stärke der Kontraktion und der Belastbarkeit des Herzens. Jedoch ist dPdt max auch vom enddiastolischen Volumen (EDV = Vorlast) abhängig [50]. Hier kann die Vorlast jedoch vernachlässigt werden, da die Werte für EDV in den Gruppen MIC und MI-EPO nicht differieren (s. Tab. 3.1 und 3.2). Der Kontraktilitätsindex dPdt max verbesserte sich in der Gruppe MI-EPO gegenüber MIC um 31 % (s. Abb. 3.3A). Auch die Auswurfraction stieg um 53 % (s. Abb. 3.3B).

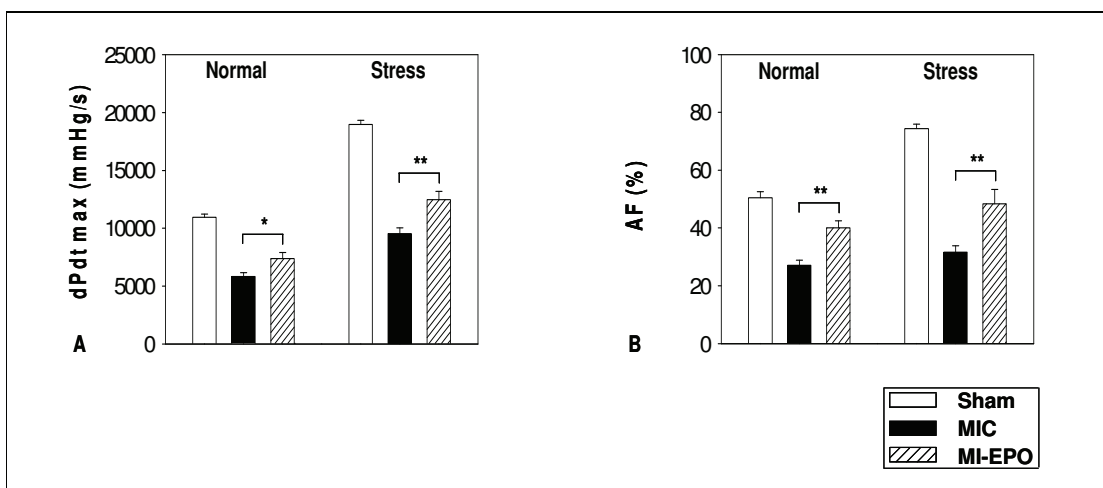


Abb. 3.3 LV systolische Herzfunktion unter Normal- und Stressbedingungen; MW±SEM; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

A: dPdt max, maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit; B: AF, Auswurfraction

3.2.2 Die diastolische Funktion des LV

Während der Diastole wird das Herz mit Blut gefüllt. Sie besteht aus einer Relaxations- und Füllungsphase. Die Messung der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit während der Relaxationsphase ergibt den Wert für dPdt min. Der Betrag dieses Wertes steht in direkter Beziehung zur Fähigkeit des Herzmuskels zu aktiver Entspannung. Umgekehrt steht die Relaxationszeit in indirekter Beziehung zur aktiven Entspannung. In der nachfolgenden Füllungsphase, die erst beginnt, sobald der Druck im LV unter dem des linken Vorhofs ist, füllt sich der LV wieder mit Blut. Um so länger die Relaxationszeit, desto kürzer ist die Zeit für den passiven Bluteinstrom vom Vorhof in den LV. Darüber hinaus wirken die zunehmende Steifigkeit (verringerte Compliance) eines hypertrophierten LV sowie das Kollagengewebe der Infarktnarbe dem passiven Einstrom entgegen. Der Hauptkompensationsmechanismus ist ein Anstieg des Füllungsdrucks am Ende der Diastole (= enddiastolischer Druck, EDP) [50]. In MI-EPO konnte ein 24 %iger Anstieg in dPdt min (s. Abb. 3.4A) und eine 35 %ige Verringerung der Relaxationszeit (s. Abb. 3.4B) ermittelt werden. Der EDP sank auf weniger als die Hälfte (s. Abb. 3.4C).

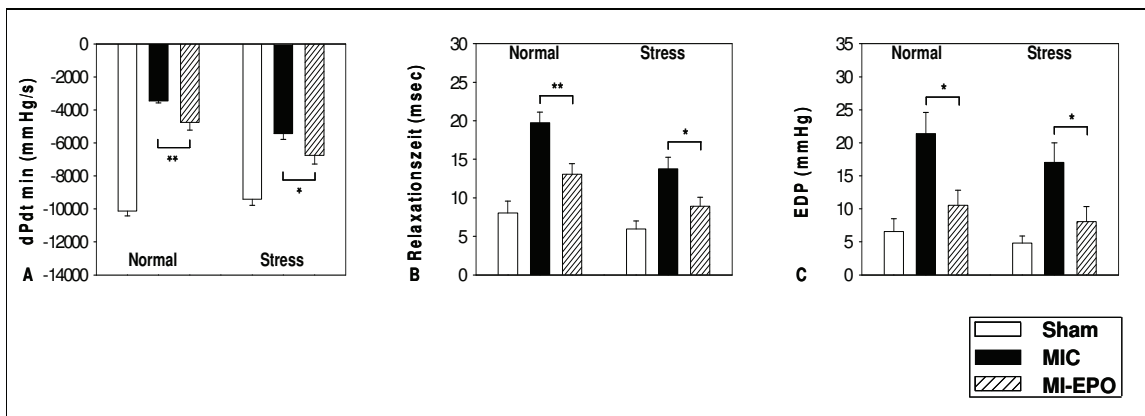


Abb. 3.4 LV diastolische Herzfunktion unter Normal- und Stressbedingungen; MW±SEM; * P<0.05, ** P<0.01

A: dPdt min, maximale Druckabfallgeschwindigkeit; B: Relaxationszeit; C: EDP, enddiastolischer Druck

3.2.3 Druckbelastung im RV

Ist der infarzierte LV durch zunehmende Remodelingvorgänge nicht mehr in der Lage eine ausreichende Kontraktilität, Elastizität und Compliance aufrecht zu halten, um das anflutende venöse Blut des Lungenkreislaufs aufzunehmen und den Körper ausreichend mit sauerstoffreichem, arteriellem Blut zu versorgen, kommt es zur Dekompensation. Das Blut staut sich in der Lungenstrombahn zurück bis in den RV. Dadurch wird der RV stärker belastet, was sich in einer pulmonalen Hypertonie, einer Drucksteigerung im RV und einer Hypertrophie des RV äußert [51]. Interessanterweise fand sich eine 30%ige Reduktion im RV Maximaldruck (Pmax, s. Abb. 3.5) und eine 32%ige Reduktion des endsystolischen Drucks (ESP, s. Abb. 3.5) in MI-EPO verglichen mit MIC. Der Kontraktilitätsindex dPdt max des RV war zwischen den beiden Gruppen mit MI-Induktion nicht signifikant verschieden ($P=0.199$, s. Tab. 3.3). Zusammengefasst zeigen die Resultate eine Verbesserung der globalen Herzfunktion mit verringerter Druckbelastung im RV durch die lokale Applikation von EPO nach künstlicher MI Induktion.

Tab. 3.3 Hämodynamische Parameter der RV Herzfunktion unter Normalbedingungen

Parameter	Sham (n=5)	MIC (n=8)	MI-EPO (n=8)	P*
Pmax (mmHg)	20.19 ± 1.40	32.69 ± 2.29	23.08 ± 1.45	0.005
ESP (mmHg)	18.95 ± 1.37	30.02 ± 2.23	20.56 ± 1.16	0.003
dPdt max (mmHg/s)	911.90 ± 50.27	1254.17 ± 116.19	1059.39 ± 85.90	0.199

* MIC vs. MI-EPO. Die Werte wurden dargestellt in Form MW ± SEM. Pmax, Maximaldruck; ESP, endsystolischer Druck; dPdt max, maximale Geschwindigkeit des Druckanstiegs bei Kontraktion.

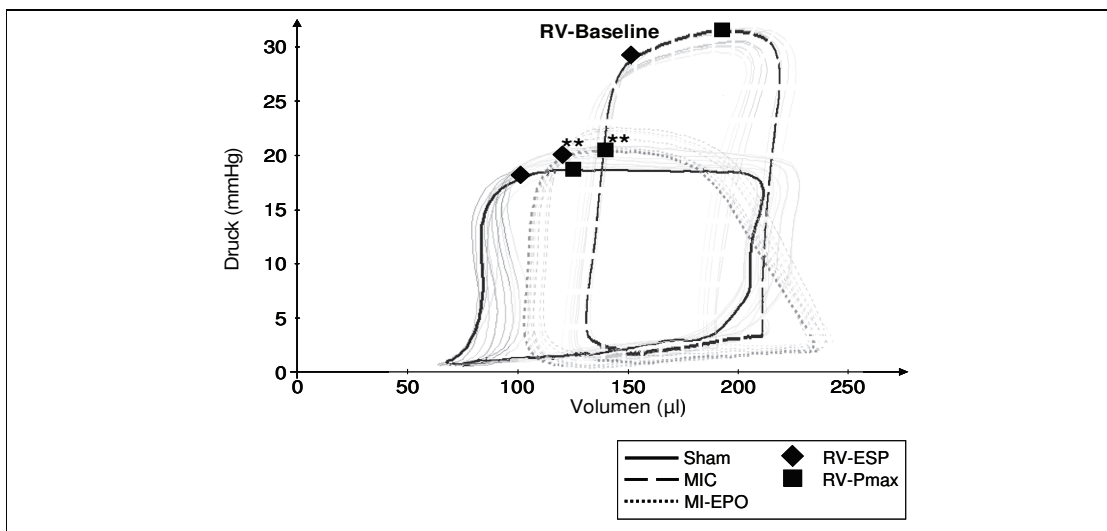


Abb. 3.5 Repräsentative Druck-Volumen Kurven, erhalten vom RV der Gruppen Sham (durchgängige Linie), MIC (unterbrochene Linie) und MI-EPO (gepunktete Linie) zeigten Reduktionen des RV endsystolischen Drucks (RV-ESP) und des RV Maximaldrucks (RV-Pmax) in MI-EPO verglichen mit MIC unter Normalbedingungen (Baseline); MW±SEM; ** $P<0.01$

3.3 Flucht-orientierte Aktivität im Verlauf der Infarktheilung

Die Fähigkeit der Ratten zur Flucht-orientierten Aktivität wurde mittels „Forced swim test“ untersucht. Die Gesamtzeit der Flucht-orientierten Aktivität unterschied sich dabei zwischen den drei experimentellen Gruppen zu keinem Zeitpunkt (s. Abb. 3.6A). 24 Stunden nach MI war jedoch die Intensität dieser Aktivität, gemessen sowohl an der Anzahl der Sprünge (s. Abb. 3.6B) als auch an der Anzahl „hoher Sprünge“ (s. Abb. 3.6C), in der Gruppe MI-EPO höher als die Aktivitätsintensität der MIC Tiere (Sprünge, MI-EPO: 25.33 ± 5.31 , MIC: 12.14 ± 1.44 , $P=0.026$; „hohe Sprünge“, MI-EPO: 10.33 ± 2.47 , MIC: 4.14 ± 0.77 , $P=0.035$) und vergleichbar mit der Aktivitätsintensität der Sham Tiere ohne MI (Sprünge, $P=0.590$; „hohe Sprünge“, $P=0.988$). Zum Zeitpunkt 6 Wochen nach MI war die Aktivitätsintensität (10.50 ± 4.27 Sprünge) in MI-EPO sogar 7mal höher als die in MIC (1.50 ± 0.56 Sprünge, $P=0.008$) und ebenfalls vergleichbar mit Sham ($P=0.281$). Diese Daten verdeutlichen, dass sich die physische Kondition der Ratten mit intrakardialer Injektion von EPO nach MI verbesserte.

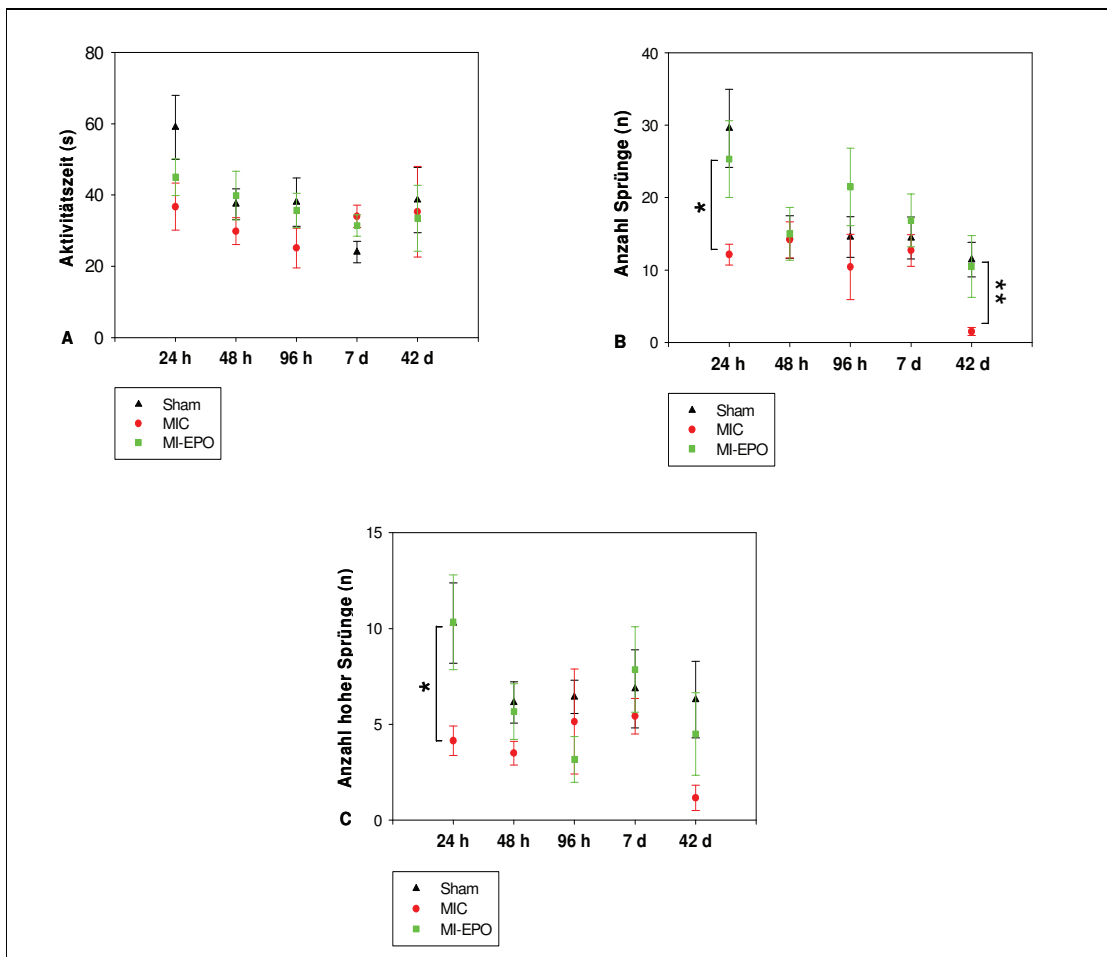


Abb. 3.6 Flucht-orientierte Aktivität im Verlauf der Infarktheilung; MW±SEM; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

A: Aktivitätszeit während 240 s Videoaufnahme; B: Anzahl der Sprünge;

C: Anzahl der „hohen Sprünge“

3.4 Infarktgrößenauswertung

Die digitale Planimetrie ermittelte bei der Auswertung der transversalen „Sirius Red / Fast Green“ gefärbten Herzgewebeschnitte der Ebenen 4-6 eine Reduktion der Fläche des Narbengewebes 6 Wochen nach permanenter Ligation des RIVA in MI-EPO (s. Abb. 3.7A-C). Die mittlere Infarktgröße wurde verringert von 27.76 ± 1.20 % in MIC auf 20.11 ± 1.13 % in MI-EPO ($P < 0.001$, s. Abb. 3.7C). Im Vergleich dazu zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Areal des akuten Myokardschadens (HE gefärbt) 48 Stunden nach LAD Ligation in beiden Gruppen (MIC: 41.88 ± 2.00 %, MI-EPO: 38.23 ± 3.17 %, $P = 0.350$; Abb. 3.7D-F). Dieser Nachweis erlaubt das Ziehen der Konsequenz, dass Unterschiede im MI Heilungsprozess zwischen den Gruppen MIC und MI-EPO (z.B. die Reduktion der Infarktgröße 6 Wochen post infarktem) abhängig von der intramyokardialen EPO Applikation und unabhängig vom Ausmaß des Areals der akuten Myokardschädigung sein mögen.

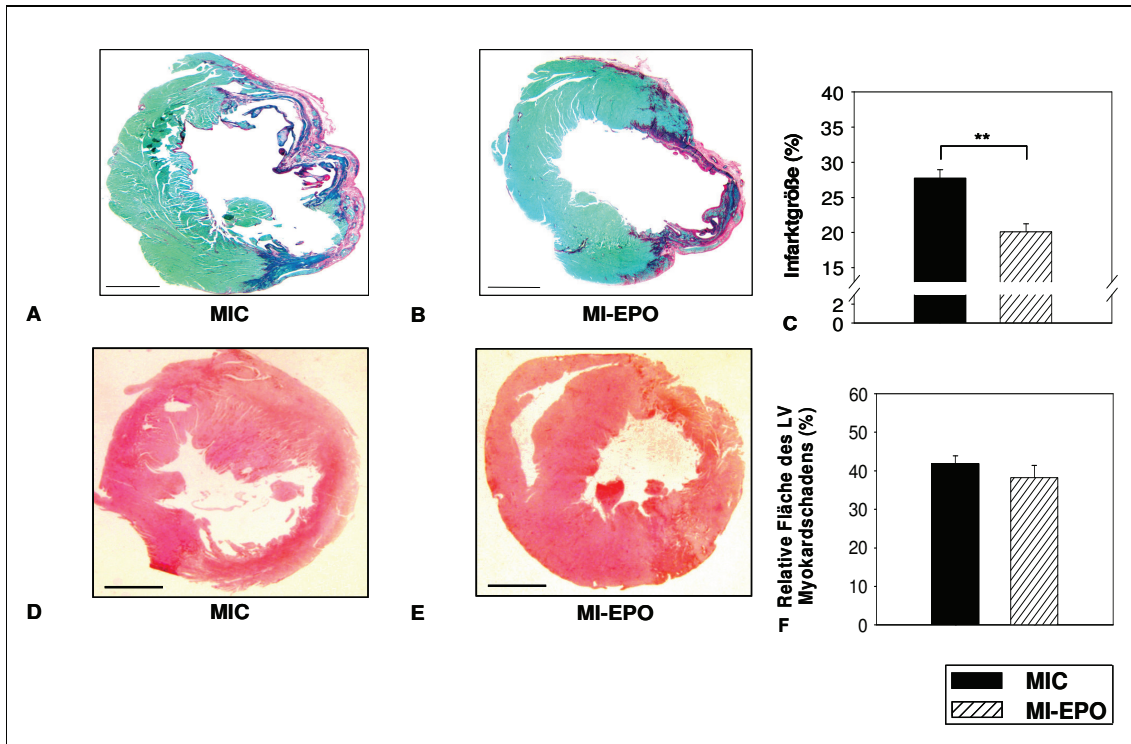


Abb. 3.7 Infarktgrößen in MIC und MI-EPO; MW \pm SEM; ** $P < 0.01$

A: Transversalschnitt (Sirius Red = rot, Fast Green = grün) eines MIC Herzen; B: Transversalschnitt (Sirius Red = rot, Fast Green = grün) eines MI-EPO Herzen; C: Vergleich der relativen Infarktgrößen; D: Transversalschnitt (Eosin = rot, Hämalaun = blau) eines MIC Herzen; E: Transversalschnitt (Eosin = rot, Hämalaun = blau) eines MI-EPO Herzen; F: Vergleich der relativen Fläche des LV Myokardschadens; Maßstab: Strecke = 2 mm

3.5 Myokardiales Remodeling

3.5.1 Hypertrophieindices & interstitielle Fibrose

Bei der Untersuchung der Herz-zu-Körper-Gewicht Relationen 6 Wochen nach MI, konnte in den EPO behandelten Herzen (n=11) eine 12 %ige Reduktion gegenüber den unbehandelten Herzen der Gruppe MIC (n=14) im Verhältnis Herzgewicht zum Körpergewicht (HW/BW) ermittelt werden ($P=0.003$, s. Abb. 3.8A). HW/BW ist ein häufig genutzter Index für die Feststellung einer kardialen Hypertrophie. Darüber hinaus zeigte sich eine 26 %ige Reduktion im Verhältnis Gewicht der rechtsventrikulären freien Wand zum Körpergewicht (RVW/BW; $P=0.041$, s. Abb. 3.8B). Eine Steigerung im RVW/BW ist als Zeichen rechtsventrikulärer Hypertrophie infolge venösem Rückstau nach Dekompensation des LV zu verstehen. Die Reduktion von HW/BW und RVW/BW in MI-EPO implizieren demnach eine durch lokale EPO Therapie begrenzte Hypertrophie des Herzens und Dekompensation des LV nach MI. Die Reduktion im Verhältnis Gewicht des LV zum Körpergewicht (LVW/BW) in MI-EPO erreichte keine statistische Signifikanz gegenüber MIC ($P=0.061$, s. Abb. 3.8C). Unterdessen gab es keinen signifikanten Unterschied im Körpergewicht zwischen allen Experimentgruppen. Weiterhin zeigte sich bei der Untersuchung der Gewebe im Nichtinfarktbereich des LV zum Zeitpunkt 6 Wochen nach MI eine reduzierte Zellgröße der Kardiomyozyten in MI-EPO ($765.21 \pm 13.74 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zu MIC ($882.98 \pm 36.91 \mu\text{m}^2$, $P=0.015$, s. Abb. 3.8D). Dies bestätigte eine verringerte Hypertrophie im überlebenden Myokard des LV von EPO behandelten MI Herzen. Die Myozytengröße in der Gruppe Sham blieb jedoch für beide MI Gruppen außer Reichweite ($557.96 \pm 23.18 \mu\text{m}^2$, beide $P < 0.001$). Betrachtet man die interstitielle Fibrose 6 Wochen nach Erstoperation, ergibt sich ein ähnlicher Befund für die experimentellen Gruppen. Das Verhältnis des „Sirius Red“ positiven Kollagenareals zum Gesamtmyokardareal reduzierte sich von $12.36 \pm 0.20 \%$ in MIC auf $9.53 \pm 0.13 \%$ in MI-EPO ($P < 0.001$, s. Abb. 3.8E), wobei die Kollagendichte von Sham Herzen weit geringer ausfiel ($4.93 \pm 0.23 \%$, beide $P < 0.001$). Abbildung 3.8F-H verdeutlicht anschaulich die Potenz einer sofortigen intramyokardialen EPO Applikation nach MI zur Reduktion des myokardialen Remodeling in der Spätphase der MI Heilung.

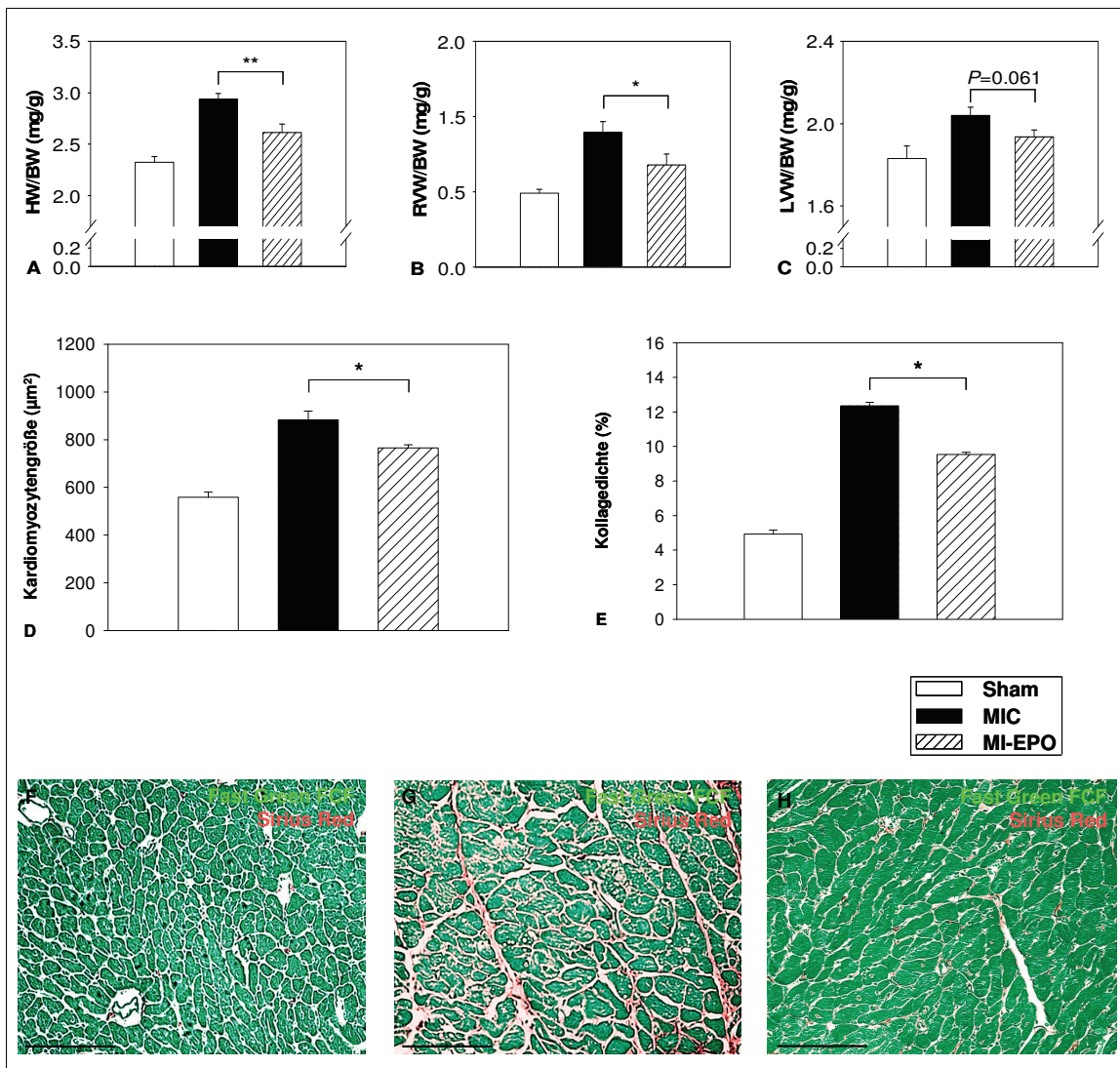


Abb. 3.8 Hypertrophie Indices & interstielle Fibrose; MW±SEM; MW±SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: HW/BW, Herzgewicht / Körpergewicht; B: RVW/BW, Gewicht der RV freien Wand / Körpergewicht; C: LVW/BW, Gewicht des LV / Körpergewicht; D: Kardiomyozytengröße; E: Kollagedichte; F-H: repräsentative Abbildungen des Nichtinfarktbereichs in Sham (F), MIC (G) und MI-EPO (H) nach „Fast Green / Sirius Red“ Färbung von Herzen 6 Wochen nach MI; Maßstab: Strecke = 150 µm

3.5.2 Apoptose von Kardiomyozyten während Inter- und Spätphase der Abheilung

MI-EPO Herzen legten eine signifikant verringerte Apoptoserate in Kardiomyozyten im Grenzbereich des Infarkts eine Woche nach MI verglichen mit MIC offen (MIC: 1.82 ± 0.14 %, MI-EPO: 1.08 ± 0.09 ; $P=0.001$, s. Abb. 3.9A). Nach 6 Wochen Beobachtungszeit zeigten die MI Gruppen in beiden Bereichen, Nichtinfarktbereich und Grenzbereich, signifikante Unterschiede (s. Abb. 3.9B-D). Die intramyokardiale EPO Injektion reduzierte die Kardiomyozytenapoptoserate von 0.19 ± 0.02 % (MIC) auf 0.12 ± 0.01 % (MI-EPO, $P=0.023$) im Nichtinfarktbereich und von 0.42 ± 0.03 % (MIC group) auf 0.27 ± 0.03 % (MI-EPO, $P=0.005$) im Grenzbereich. Verglichen mit Sham 6 Wochen nach Erstoperation wiesen beide Gruppen, MIC und MI-EPO, höhere Apoptoseraten in Kardiomyozyten im Nichtinfarktbereich auf (Sham: 0.05 ± 0.01 %, beide $P < 0.001$).

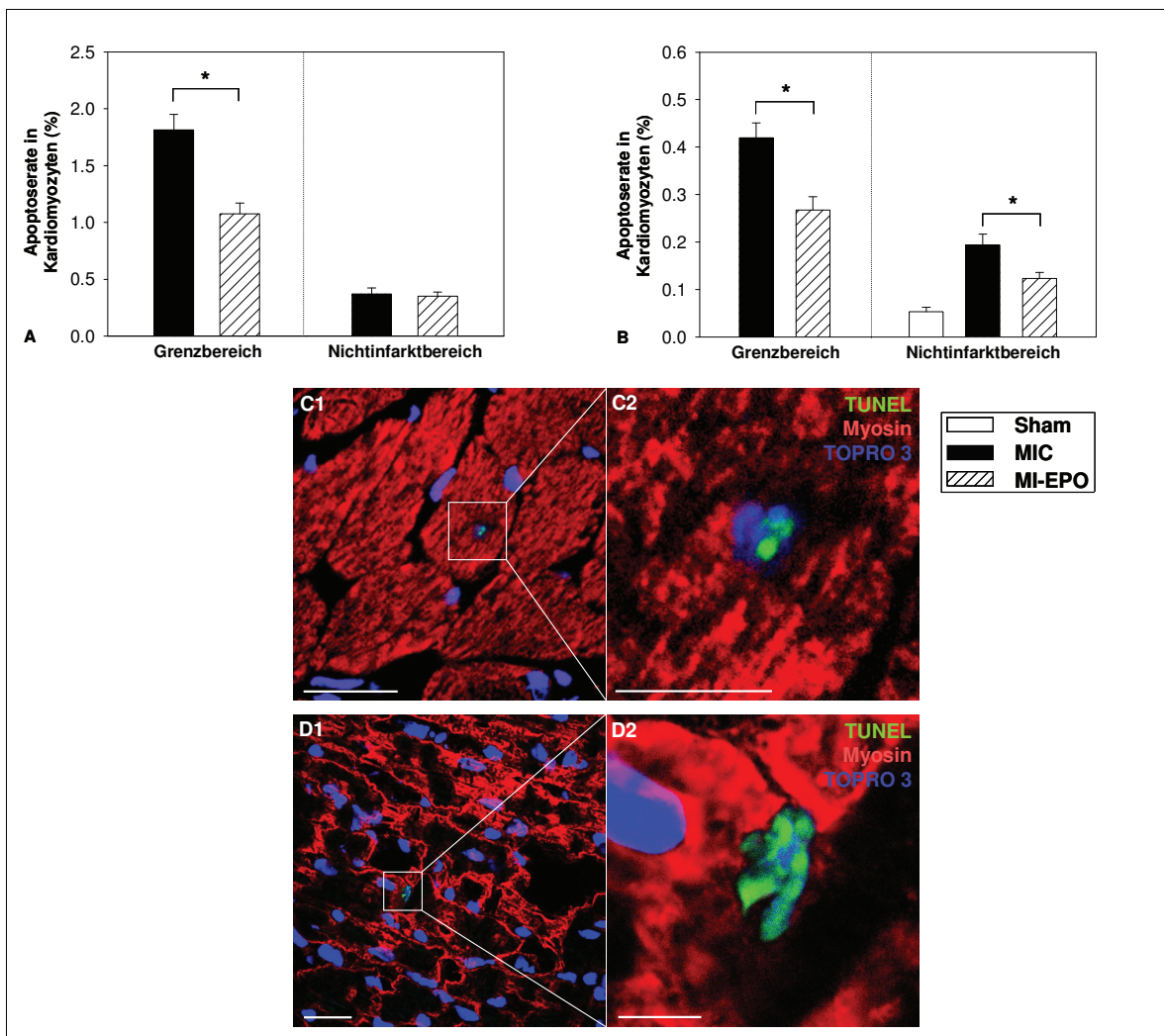


Abb. 3.9 Apoptose von Kardiomyozyten; MW \pm SEM; MW \pm SEM; * $P < 0.05$

A: Kardiomyozytenapoptoserate 1 Woche nach MI ; B: Kardiomyozytenapoptoserate 6 Wochen nach MI ; C, D: repräsentative Doppelfärbung TUNEL (grün) / Myosin (rot) im Nichtinfarktgebiet (C) und im Grenzbereich (D) 6 Wochen nach MI in einem MIC Herz; Maßstab: Strecke = 25 μ m in C1, D1; Strecke = 5 μ m in C2, D2

3.6 Gewebeprotektive Effekte

3.6.1 Akutphase (24 h und 48 h) nach Myokardinfarkt

In der Akutphase nach MI kommt es zu zahlreichen Nekrose-, Apoptose-, Entzündungs- und Angiogenesevorgängen im geschädigten Gewebeareal [19][20][21][22][23]. Aber auch im nicht infarzierten Herzgewebe, das entfernt vom eigentlichen ischämischen Areal liegt, finden Reaktionen statt [52].

3.6.1.1 Expressionsverlauf von eNOS, Akt und TNF- α

Die entzündungshemmende Wirkung von EPO ist in vielen Arbeiten mit systemischer Applikation gezeigt worden [10][27][29][30][31][32]. Um diesen Effekt zu attestieren, analysierten wir die Produktion der mRNA von TNF- α . Sowohl in der IZ als auch in der NIZ konnte ein suppressiver Effekt in MI-EPO gegenüber MIC festgestellt werden ($P < 0.05$, s. Abb. 3.10). Desweiteren wurde die mRNA von eNOS und Akt, Faktoren, die in zahlreiche Signalkaskaden der Entzündungshemmung, der Anti-Apoptose und des Herzmuskelzellüberlebens involviert sind, analysiert. Wie in Abbildung 3.10 gezeigt wird, war die mRNA von eNOS zum Zeitpunkt 24 Stunden nach MI sowohl in der IZ als auch der NIZ in MI-EPO Tieren 1,2mal bzw. 1,9mal so hoch exprimiert wie in MIC ($P < 0.05$). Die Immunhistochemie bestätigte die verstärkte Expression von eNOS in MI-EPO 24 Stunden nach MI, am deutlichsten erkennbar im Infarktgrenzbereich sowie im Nichtinfarktbereich. Abbildung 3.10D-E verdeutlicht das Expressionsmuster von eNOS in MI-EPO Herzen (fast alle Kapillaren des Nichtinfarktbereichs werden reflektiert, Abb. 3.10D) gegenüber MIC Herzen mit reduziertem Expressionsniveau (Abb. 3.10E). Akt zeigte eine signifikante Hochregulierung der mRNA nach 24 Stunden in der NIZ in MI-EPO gegenüber MIC und blieb unverändert in der IZ. Die lokale Injektion von EPO supprimiert dementsprechend die Expression von TNF- α und kann gewebeprotektive Faktoren wie eNOS und Akt induzieren.

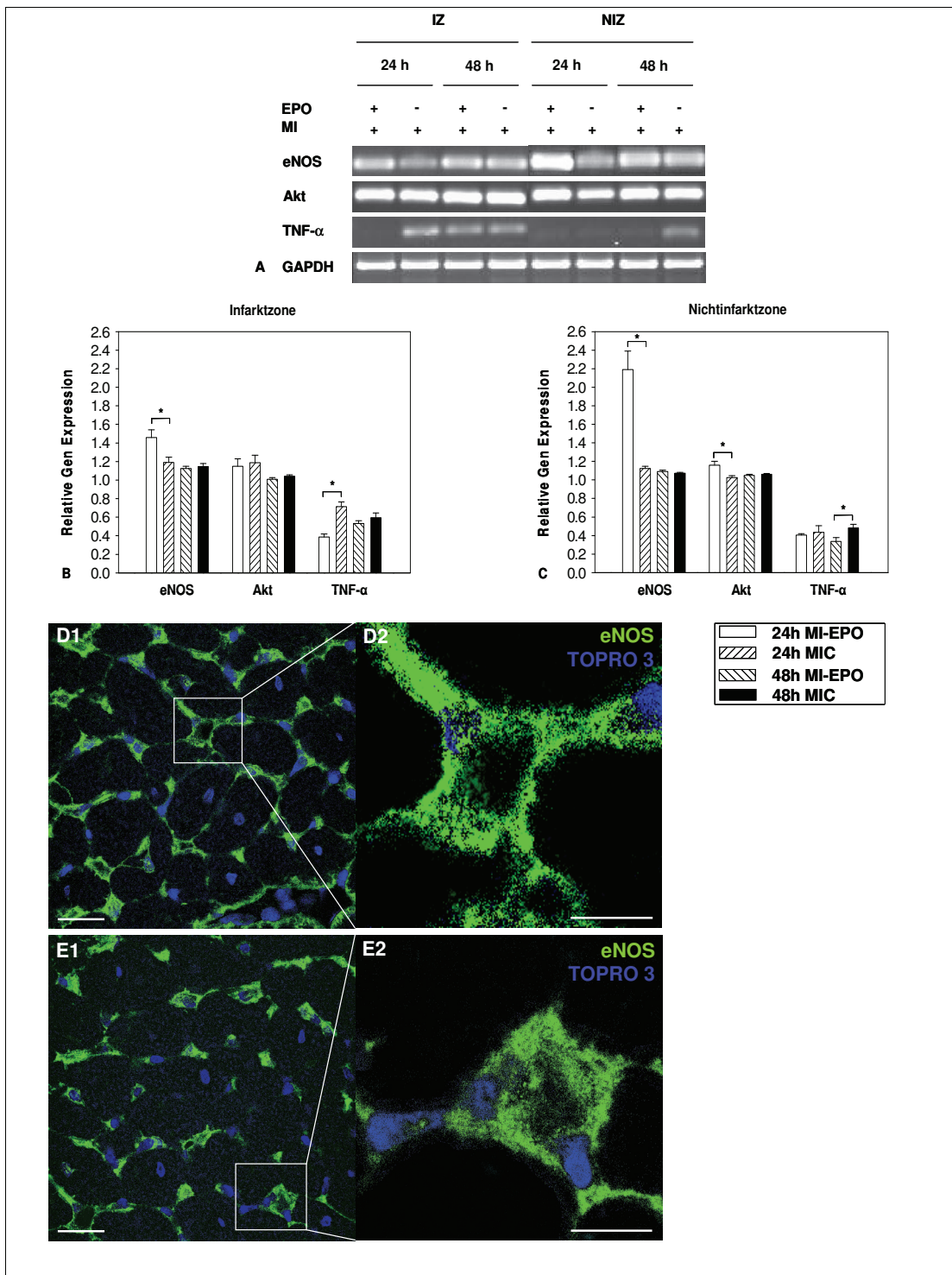


Abb. 3.10 Gewebeprotektive Effekte (Akutphase); MW±SEM; * $P < 0.05$

A: Fotografien repräsentativer RT-PCR Banden auf Agarosegel; B: Densitometrische Analyse der mRNA von eNOS, Akt, TNF- α in der Infarktzone (in Relation zur mRNA von GAPDH); C: Densitometrische Analyse der mRNA von eNOS, Akt, TNF- α in der Nichtinfarktzone; D: repräsentative Einfachfärbung eNOS (grün) im Nichtinfarktgebiet 24 Stunden nach MI in einem MI-EPO Herz; E: repräsentative Einfachfärbung eNOS (grün) im Nichtinfarktgebiet 24 Stunden nach MI in einem MIC Herz; Maßstab: Strecke = 25 μ m in D1, E1; Strecke = 10 μ m in D2, E2

3.6.1.2 Ausmaß zirkulierender Leukozyten

Auch das Ausmaß zirkulierender Leukozyten, insbesondere der Neutrophilen, gibt Auskunft über die Entzündungssituation des Gesamtorganismus nach akutem MI [19][20]. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Erstoperation war der Gesamtgehalt zirkulierender Leukozyten in den Gruppen MI-EPO und MIC indifferent. Nach Untersuchung des Differentialblutbildes im Blutausschrieb konnte jedoch eine signifikante Verringerung der Zahl zirkulierender segmentkerniger Neutrophiler in MI-EPO gegenüber MIC festgestellt werden ($P=0.026$, s. Tab. 3.3). Zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Erstoperation zeigte sich eine Erhöhung der Gesamtanzahl zirkulierender Leukozyten ($P=0.023$) in MI-EPO gegenüber MIC. Diese Erhöhung konnte nach Auswertung des Differentialblutbildes jedoch nicht den Neutrophilen sondern den mononukleären Leukozytenpopulationen, Monozyten ($P=0.002$) und Lymphozyten ($P=0.019$), zugeteilt werden. Die lokale Injektion von EPO verzögert dementsprechend kurzzeitig die Mobilisierung von Neutrophilen und fördert die Mobilisation von mononukleären Zellen in der Akutphase nach Myokardinfarkt.

Tab. 3.3 Anzahl zirkulierender Leukozyten in der Akutphase und Verteilung im Differentialblutbild

Parameter	24h		48h	
	MIC (n=7)	MI-EPO (n=7)	MIC (n=7)	MI-EPO (n=7)
Leuko. ($\times 10^9/l$)	6.52 ± 1.41	4.17 ± 0.34	5.73 ± 0.73	7.88 ± 0.40*
Baso. ($\times 10^9/l$)	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Eosino. ($\times 10^9/l$)	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.03
Neutro/segm. ($\times 10^9/l$)	3.04 ± 0.80	1.62 ± 0.09*	2.08 ± 0.37	2.45 ± 2.01
Neutro/stab. ($\times 10^9/l$)	0.44 ± 0.12	0.29 ± 0.05	0.24 ± 0.07	0.17 ± 0.03
Lympho. ($\times 10^9/l$)	2.48 ± 0.43	1.89 ± 0.22	2.77 ± 0.26	4.01 ± 0.37*
Mono. ($\times 10^9/l$)	0.41 ± 0.14	0.26 ± 0.05	0.52 ± 0.09	1.09 ± 0.12*

* $P < 0.05$ vs. MIC. Die Werte wurden dargestellt in Form MW ± SEM. Leuko. heißt Leukozytenzahl; Baso, beinhaltet Basophilenzahl; Eosino, Eosinophilenzahl. Neutro/segm, Zahl der segmentkernigen Neutrophilen; Neutro/stab, Zahl stabkerniger Neutrophiler; Lympho, Lymphozytenzahl; Mono, Monozytenzahl.

3.6.1.3 Plasmaspiegel der Infarktmarker

Bei der Untersuchung der Herzenzyme Creatinkinase (CK), Creatinkinase-MB (CKMB) und cTnT konnten in der Akutphase nach MI keine Unterschiede in der Plasmakonzentration zwischen den Gruppen MIC und MI-EPO ausgemacht werden. Beide Gruppen zeigten einen starken Anstieg der Herzenzyme, insbesondere von cTnT, im Vergleich zu in gesunden, unbehandelten Ratten gleicher Rasse und gleichen Alters erhobenen Daten (s. Tab. 3.4, Vergleichswerte zum Gesunden nicht gezeigt; Daten einer anderen Studie).

Tab. 3.4 Plasmakonzentrationen der Herzenzyme in der Akutphase

Parameter	24h		48h	
	MIC (n=7)	MI-EPO (n=7)	MIC (n=7)	MI-EPO (n=7)
CK (U/l)	990.85 ± 251.52	1380.44 ± 190.22	1182.69 ± 305.84	1126.26 ± 204.20
CKMB (ng/ml)	1.84 ± 0.31	1.25 ± 0.11	2.72 ± 0.80	1.70 ± 0.23
cTnT (ng/ml)	9.96 ± 1.18	12.23 ± 0.61	13.28 ± 2.52	11.32 ± 1.13

Die Werte wurden dargestellt in Form MW ± SEM. CK heißt Creatinkinase; CKMB beinhaltet das herzspezifische Isoenzym der Creatinkinase; und cTnT, kardiales Troponin T.

3.6.1.4 Blutdruckverhalten

Der systemische arterielle Blutdruck ist sowohl von der Herzarbeit, insbesondere dessen Inotropie, als auch von vielen Variablen im peripheren Gefäßsystem abhängig [53]. Die Untersuchung der intraaortalen Blutdrücke in der Akutphase nach MI ergab eine moderate Steigerung des systemischen systolischen, diastolischen und mittleren Blutdrucks zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Erstoperoperation in MI-EPO Tieren gegenüber MIC Tieren ($P=0.037$, $P=0.035$, $P=0.032$; s. Tab. 3.5). Die lokale EPO Applikation führte nicht zu abnorm gesteigerten arteriellen Druckwerten, zeigte jedoch eine signifikante Steigerung des Blutdrucks nach dem zweiten postoperativen Tag.

Tab. 3.5 Intraaortal (blutig) gemessene Blutdruckwerte im Arcus aortae in der Akutphase

Parameter	24h		48h	
	MIC (n=7)	MI-EPO (n=7)	MIC (n=7)	MI-EPO (n=7)
Psys	89.85 ± 3.78	90.26 ± 3.67	85.51 ± 3.03	93.11 ± 1.15*
Pdia	69.54 ± 3.14	74.19 ± 3.37	64.03 ± 3.42	72.71 ± 1.27*
Pmean	76.31 ± 3.32	79.55 ± 3.43	71.19 ± 3.23	79.51 ± 1.17*

* $P<0.05$ vs. MIC. Die Werte wurden dargestellt in Form MW ± SEM. Psys heißt systolischer Druck; Pdia beinhaltet diastolischer Druck; und Pmean, arterieller Mitteldruck.

3.6.2 Postakutphase (7 Tage und 14 Tage) nach Myokardinfarkt

In der Postakutphase kommt es weniger zu Nekrose- und Apoptosevorgängen im geschädigten Herzgewebeareal. Hier befindet sich das Herz in der Organisationsphase, die wie oben beschrieben, eher durch entzündliche Umbauprozesse mit Ersatz des funktionellen Herzgewebes durch Granulationsgewebe und später kollagenes Narbengewebe gekennzeichnet ist [19][20][21][22][23].

3.6.2.1 mRNA-Expression von TNF- α und CD18 7 Tage post operativ

Zum Zeitpunkt 7 Tage nach Erstoperation untersuchten wir die Expression der mRNA von TNF- α und zusätzlich CD18. CD18, die konstante Komponente von Integrin- β , ist für die feste Adhäsion von Neutrophilen an Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 verantwortlich. Die Bindung führt einerseits zur Extravasation der Neutrophilen am Endothel oder andererseits zur zytotoxischen Wirkung gegenüber Kardiomyozyten [19]. Die mRNA von TNF- α war in der IZ von Herzen in MI-EPO gegenüber MIC um 28% reduziert exprimiert ($P < 0.05$, s. Abb. 3.11). Die mRNA von CD18 war in MI-EPO gegenüber MIC in der NIZ um 26% herunterreguliert ($P < 0.05$, s. Abb. 3.11). Die lokale EPO Applikation verringert folgerichtig die lokale Entzündungsaktivität im Herzen 7 Tage nach MI.

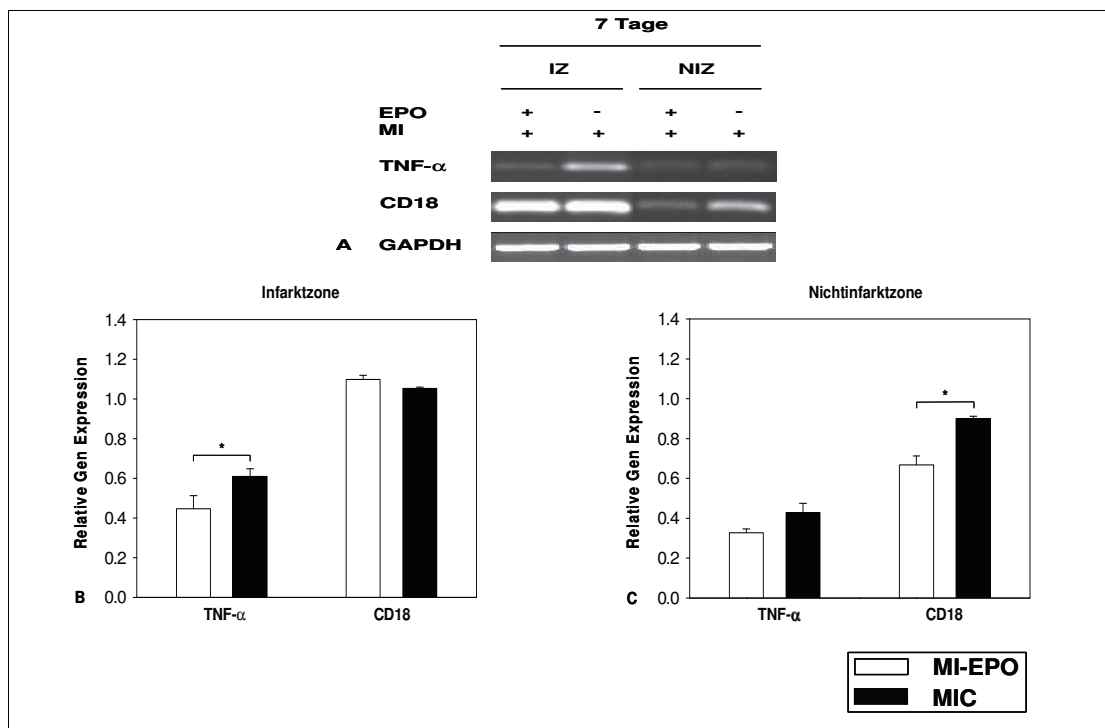


Abb. 3.11 Gewebeprotektive Effekte (Postakutphase); MW \pm SEM; * $P < 0.05$

A: Fotografien repräsentativer RT-PCR Banden auf Agarosegel; B: Densitometrische Analyse der mRNA von TNF- α und CD18 in der Infarktzone (in Relation zur mRNA von GAPDH); C: Densitometrische Analyse der mRNA von TNF- α und CD18 in der Nichtinfarktzone

3.6.2.2 Ausmaß zirkulierender Leukozyten 14 Tage post operativ

Wie oben beschrieben, gibt das Ausmaß zirkulierender Leukozyten Auskunft über die Entzündungssituation des Gesamtorganismus nach akutem MI. Zum Zeitpunkt 14 Tage nach Erstoperation war der Gesamtgehalt zirkulierender Leukozyten in den Gruppen MI-EPO und MIC indifferent, jedoch zeigten beide Gruppen eine deutliche Steigerung gegenüber dem ersten postoperativen Tag (s. Abb. 3.12). Auch nach Analyse des Differentialblutbildes ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen mit Infarktinduktion (s. Tab. 3.6). Die lokale EPO Injektion direkt nach MI hat also 14 Tage nach Injektion sowohl keinen Einfluss mehr auf die Gesamtleukozytenzahl als auch auf das Differentialblutbild.

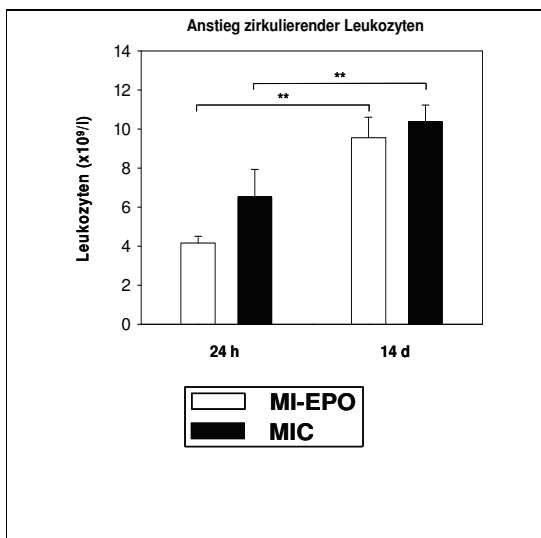


Abb. 3.12 Leukozytenzahl im peripheren Blut 24 Stunden und 14 Tage nach MI, MW±SEM; ** $P < 0.01$

Parameter	14 d	
	MIC (n=5)	MI-EPO (n=5)
Leuko. (x10 ⁹ /l)	10.38 ± 0.84	9.56 ± 1.04
Baso. (x10 ⁹ /l)	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.02
Eosino. (x10 ⁹ /l)	0.16 ± 0.09	0.14 ± 0.06
Neutro/segm. (x10 ⁹ /l)	5.64 ± 0.74	5.40 ± 0.75
Neutro/stab. (x10 ⁹ /l)	0.73 ± 0.07	0.62 ± 0.10
Lympho. (x10 ⁹ /l)	2.77 ± 0.37	2.33 ± 0.26
Mono. (x10 ⁹ /l)	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.21

Tab. 3.6 Verteilung im Differentialblutbild 14 Tage post operativ.

Die Werte wurden dargestellt in Form MW ± SEM. Leuko, heißt Leukozytenzahl; Baso, beinhaltet Basophilenzahl; Eosino, Eosinophilenzahl. Neutro/segm, Zahl der segmentkernigen Neutrophilen; Neutro/stab, Zahl stabkerniger Neutrophiler; Lympho, Lymphozytenzahl; Mono, Monozytenzahl.

3.6.2.3 Plasmaspiegel der Infarktmarker 14 Tage nach Erstoperation

Die Untersuchung der Herzenzyme CK und CKMB zeigte wie in der Akutphase nach MI keine Unterschiede in der Plasmakonzentration zwischen den Gruppen MIC und MI-EPO (s. Tab. 3.7). Interessanterweise war jedoch 14 Tage nach MI die Plasmakonzentration von cTnT, ein unabhängiger Indikator myokardialer Schädigung, der in Beziehung zum Risiko der Langzeitmortalität durch kardiale Ursachen steht [54], in der unbehandelten Gruppe MIC fast dreifach höher als in MI-EPO ($P=0.006$, s. Tab. 3.7)

Tab. 3.7 Plasmakonzentrationen der Herzenzyme 14 Tage nach MI

Parameter	14 d	
	MIC (n=5)	MI-EPO (n=5)
CK (U/l)	968.39 ± 174.05	732.13 ± 67.31
CKMB (ng/ml)	1.80 ± 0.31	1.15 ± 0.21
cTnT (ng/ml)	10.06 ± 0.96	3.48 ± 1.49**

** $P<0.01$ vs. MIC. Die Werte wurden dargestellt in Form MW ± SEM. CK heißt Creatinkinase; CKMB beinhaltet das herzspezifische Isoenzym der Creatinkinase; und cTnT, kardiales Troponin T.

3.6.2.4 Blutdruckverhalten 14 Tage nach Erstoperation

Die Untersuchung der intraortalen Blutdrücke in der Postakutphase nach MI ergab keine Unterschiede des systemischen systolischen, diastolischen und mittleren Blutdrucks in MI-EPO Tieren gegenüber MIC Tieren (s. Tab. 3.8). Die lokale EPO Applikation führte demnach nicht zu langfristig gesteigerten arteriellen Druckwerten.

Tab. 3.8 Intraortal (blutig) gemessene Blutdruckwerte im Arcus aortae in der Postakutphase

Parameter	14 d	
	MIC (n=5)	MI-EPO (n=5)
Psys	110.54 ± 7.14	103.70 ± 16.42
Pdia	82.55 ± 7.14	75.25 ± 10.20
Pmean	91.88 ± 7.01	84.74 ± 12.22

Die Werte wurden dargestellt in Form MW ± SEM. Psys heißt systolischer Druck; Pdia beinhaltet diastolischer Druck; und Pmean, arterieller Mitteldruck.

3.7 Angiogenetische Effekte

Wie bereits beschrieben, ist die Kapillardichte insbesondere im Areal noch lebender Kardiomyozyten wesentlich für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Herzparenchyms [23]. Die Kapillardichte wurde mittels Immunhistochemie mit einem Anti-CD31 Antikörper durchgeführt (s. Abb. 3.13).

Die Kapillardichte 6 Wochen nach MI war sowohl im Nichtinfarktbereich als auch im Grenzbereich des Infarkts erhöht für Herzen in MI-EPO gegenüber MIC (Grenzbereich: $P < 0.001$, Nichtinfarktbereich: $P = 0.009$). Im Infarktgebiet der Wand des LV der EPO behandelten Herzen konnte eine komplexere Gefäßarchitektur mit regulär geformten Gefäßen aufgefunden werden, die in MIC Herzen nicht zu finden war.

Die entscheidenden Mechanismen zur Verbesserung der Kapillardichte 6 Wochen nach MI, fanden aber höchstwahrscheinlich bereits während der ersten 24 Stunden nach MI statt. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten, dass die mRNA sowohl von eNOS in IZ und NIZ (s. Abb. 3.10) als auch von VEGFR-2 in NIZ ($P = 0.002$; s. Abb. 3.13D) zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Erstoperation in MI-EPO gegenüber MIC höher exprimiert war. Interessanterweise war auch die Kapillardichte schon 1 Woche nach MI im Grenzbereich des Infarkts von MI-EPO Herzen (706.30 ± 17.72 per mm^2) um 17 % höher als in MIC Herzen (605.92 ± 12.67 per mm^2 , $P < 0.001$, s. Abb. 3.13E-F). Die lokale EPO Applikation führte demnach zur frühen Hochregulierung der Gene zentraler angiogenetischer Faktoren, was sich in einer schnellen Angiogenese post infarktem und erhöhter Gefäßdichte und Verbesserung der Gefäßarchitektur nach Abheilung des MI äußerte.

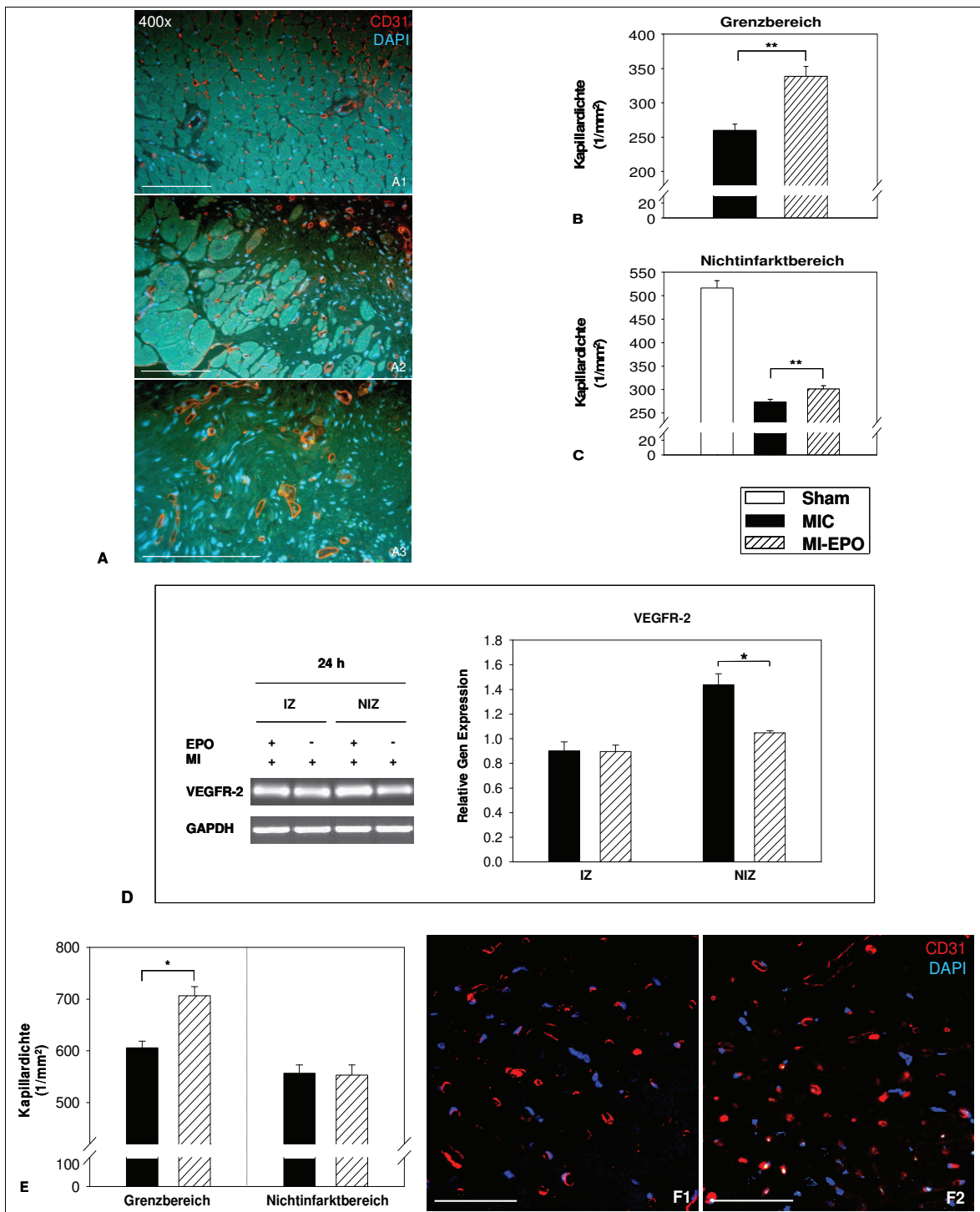


Abb. 3.13

Kapillardichte 6 Wochen nach MI und angiogenetische Mechanismen; MW±SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: Gefäßarchitektur im Gewebe von MI-EPO Herzen 6 Wochen nach MI, Maßstab: Strecke = 100 μ m, A1 = NIZ, A2 = Grenzbereich, A3 = IZ; B: Kapillardichte im Grenzbereich des Infarkts 6 Wochen nach MI; C: Kapillardichte im Nichtinfarktgebiet 6 Wochen nach MI; D: Fotografien repräsentativer RT-PCR Banden auf Agarosegel und densitometrische Analyse der mRNA von VEGFR-2 in der Infarktzone (IZ) und Nichtinfarktzone (NIZ) 24 Stunden nach MI; E: Kapillardichte im Grenzbereich (links) und Nichtinfarktgebiet (rechts) 1 Woche nach MI; F: Repräsentative Färbungen zeigen höhere Gefäßdichte im Grenzbereich von MI-EPO (F2) gegenüber MIC (F1) 1 Woche nach MI, Maßstab: Strecke = 50 μ m

3.8 Beeinflussung der myokardialen Proliferation in der Akutphase

Komplexe aus D-Typ Cyclinen mit CdK4 spielen eine entscheidende Rolle für den Zell-Zyklus-Wiedereintritt von adulten Zellen [44]. Abbildung 3.14 veranschaulicht, dass 24 Stunden nach MI in MI-EPO eine Hochregulierung der mRNA von CdK4 gegenüber MIC in der NIZ ($P=0.003$) stattfand. Darüber hinaus offenbarte die Immunhistochemie 48 Stunden nach MI eine 45 %ige Erhöhung der Anwesenheit Ki-67⁺ Zellen im Infarktgebiet von MI-EPO Herzen (25.99 ± 0.86 Zellen pro Gesichtsfeld) gegenüber MIC Herzen (17.97 ± 0.79 Zellen pro Gesichtsfeld, $P=0.001$, s. Abb. 3.14). Dabei waren die proliferierenden Zellen (Ki-67 ist ein Zellkernmarker für Zellen, die sich aktiv im Zellzyklus befinden) überwiegend im Grenzbereich des Infarkts lokalisiert waren. Die lokale EPO-Therapie zeigte folgerichtig induzierenden Einfluss auf die kardiale Proliferation im geschädigten Myokard und den Wiedereintritt adulter Zellen in den Zell-Zyklus im nicht ischämisch geschädigten Gewebe.

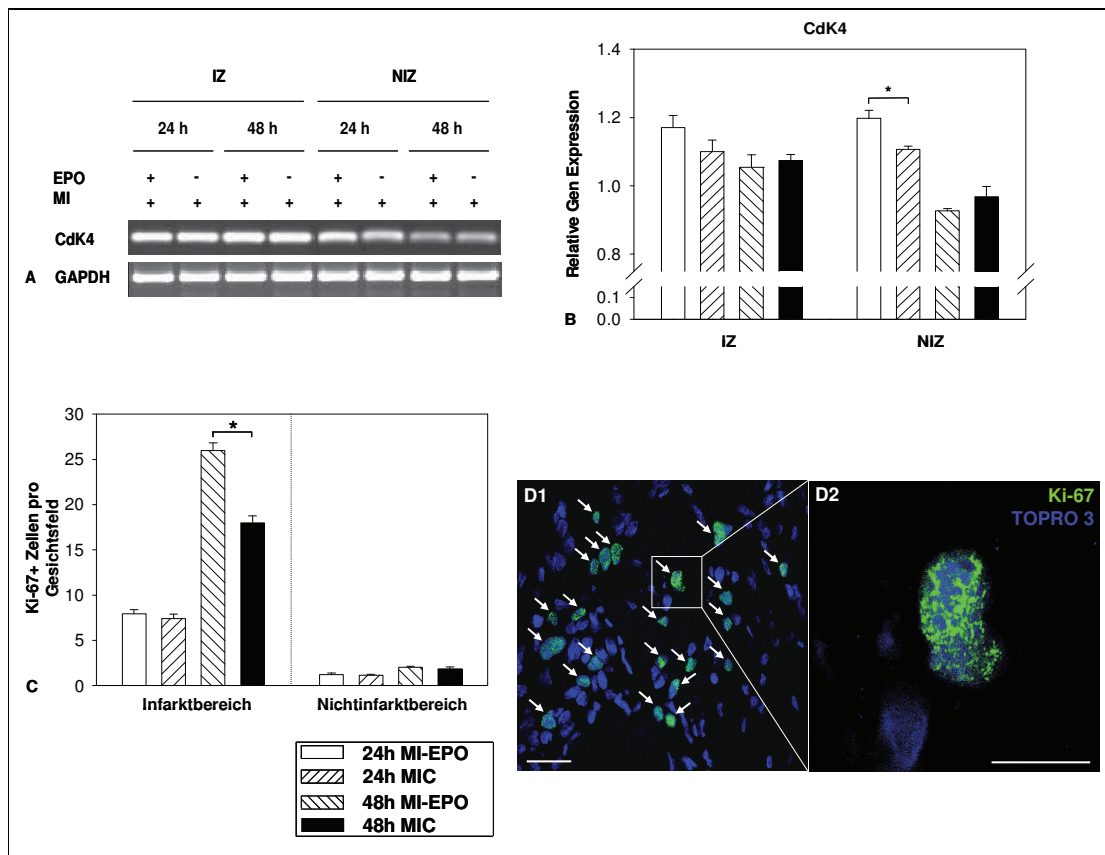


Abb. 3.14 Myokardiale Proliferation (Akutphase); MW \pm SEM; * $P < 0.05$

A: Fotografien repräsentativer RT-PCR Banden auf Agarosegel; B: Densitometrische Analyse der mRNA von CdK4 in der Infarktzone (IZ) und Nichtinfarktzone (NIZ) in Relation zur mRNA von GAPDH; C: Auszählung Ki-67⁺ Zellen im Infarktgebiet (links) und Nichtinfarktgebiet (rechts) nach 24 und 48 Stunden in MIC und MI-EPO Herzen; D: repräsentative Einfachfärbung Ki-67 (grün, weißer Pfeil) im Grenzbereich des Infarktgebietes 48 Stunden nach MI in einem MI-EPO Herz; Maßstab: Strecke = 25 μ m in D1; Strecke = 10 μ m in D2

3.9 Stammzell-assoziierte Effekte in der Akutphase

Zur Untersuchung des Einflusses von EPO auf Stamm- und Progenitorzellen, insbesondere deren Chemoattraktion zum Herzgewebe, wurden grundlegende Mechanismen mit RT-PCR nachverfolgt. Immunhistologische Untersuchungen und FACS Analyse, durchgeführt von einem wissenschaftlichen Angestellten des FKGO (wie oben beschrieben), dienten der Bestätigung und der näheren Darstellung der Vorgänge *in vivo*. Die Ergebnisse aus Immunhistologie und FACS sollen deshalb im Diskussionsteil einbezogen werden.

3.9.1 mRNA-Expressionsverlauf von chemoattraktiven Molekülen

Das SDF-1/CXCR-4 Ligand/Rezeptor-Paar ist von höchster Bedeutung sowohl für die Mobilisierung von HSC und EPC als auch für deren Chemoattraktion zum Ort eines ischämischen Schadens [43]. Die mRNA des chemoattraktiven SDF-1 α und dessen Rezeptor CXCR-4, war zum Zeitpunkt 24 Stunden nach MI in MI-EPO gegenüber MIC hochreguliert ($P < 0.05$, s. Abb. 3.15). Die lokale EPO Therapie verursachte dementsprechend die frühe Hochregulierung eines zentralen Ligand/Rezeptor-Paares zur Stammzell Chemoattraktion.

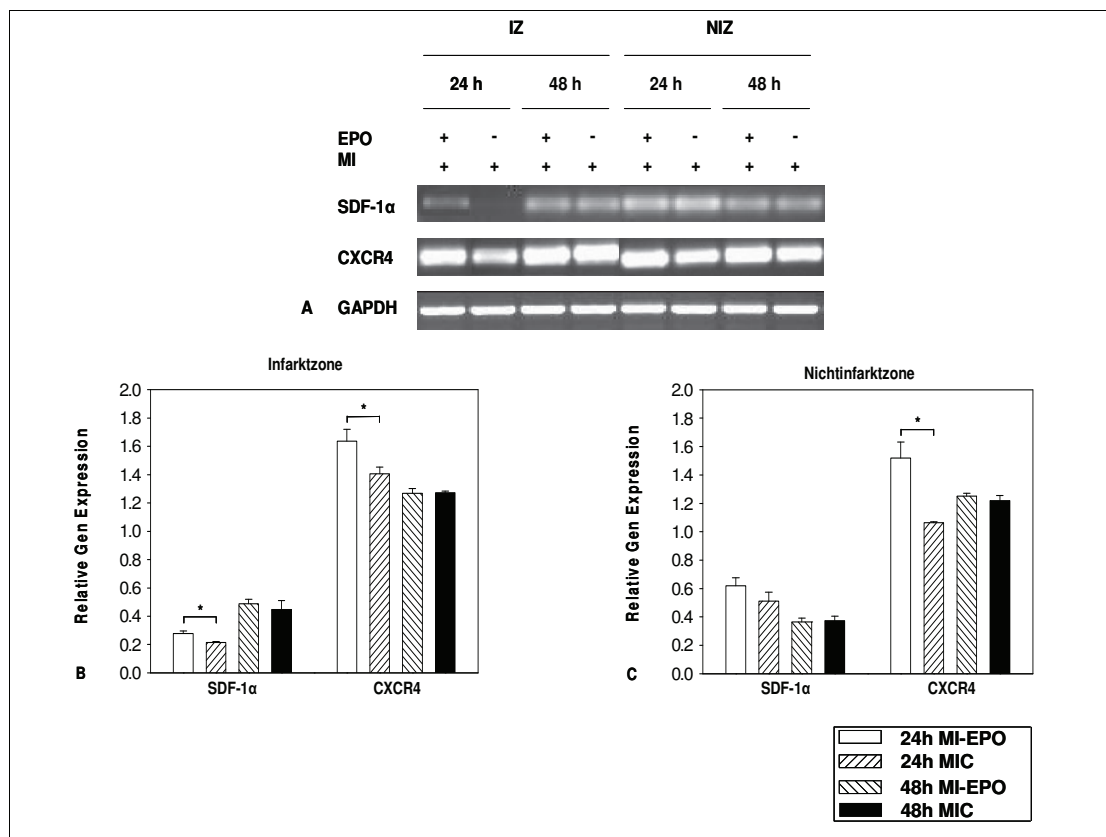


Abb. 3.15 Effekte auf die Stammzellchemoattraktion (Akutphase); MW \pm SEM; * $P < 0.05$

A: Fotografien repräsentativer RT-PCR Banden auf Agarosegel; B: Densitometrische Analyse der mRNA von SDF-1 α und CXCR4 in der Infarktzone (in Relation zur mRNA von GAPDH); C: Densitometrische Analyse der mRNA von SDF-1 α und CXCR4 in der Nichtinfarktzone

3.9.2 mRNA-Expressionsverlauf von Vorläuferzellmarkern

Forschungsergebnisse verdeutlichen zunehmend, dass c-Kit⁺ oder CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen in geschädigtes Herzgewebe einwandern und zur Regeneration des Organs beitragen [40][41][42][43]. Aus diesem Grund wurde die Expression der mRNA dieser Oberflächenmarker untersucht. Zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MI war die mRNA von c-Kit in der IZ von MI-EPO Herzen um 50% höher exprimiert als in MIC Herzen zum selben Zeitpunkt ($P=0.004$, s. Abb. 3.16) und 3,1mal so hoch exprimiert im Vergleich zu MI-EPO Herzen zum Zeitpunkt 24 Stunden ($P=0.001$, s. Abb. 3.16). Innerhalb MIC blieb die c-Kit mRNA Expression während der Akutphase konstant. Ebenso verhielt es sich mit der mRNA von CD34 innerhalb MIC während der Akutphase. Innerhalb MI-EPO zeigte sich zum Zeitpunkt 48 Stunden gegenüber 24 Stunden eine 80%ige und eine 50%ige Hochregulierung der mRNA von CD34 in der IZ und in der NIZ ($P<0.001$, $P=0.001$, s. Abb. 3.16). Im Vergleich beider Gruppen wurde CD34 sowohl in der IZ als auch in der NIZ von MI-EPO Herzen um 40% stärker exprimiert als in MIC Herzen ($P=0.026$, $P=0.026$, s. Abb. 3.16). EPO könnte demnach regulatorische Aufgaben zur Stammzellrekrutierung nach MI verantworten.

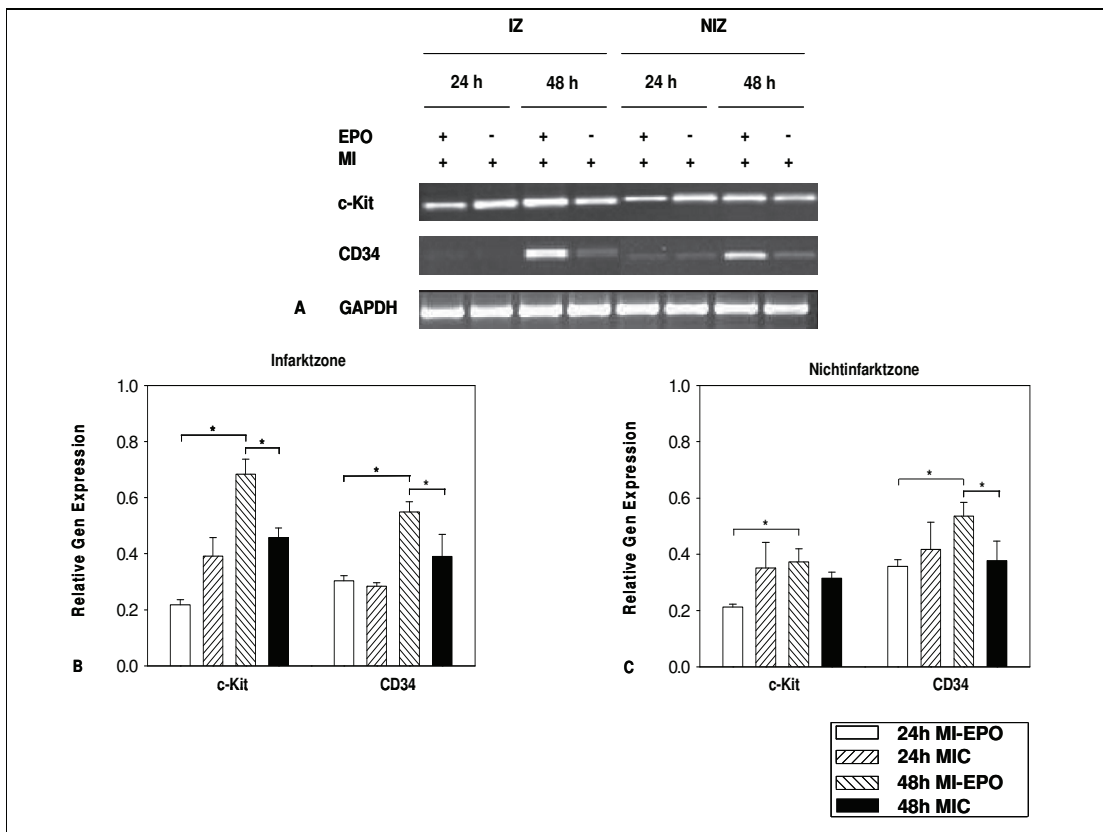


Abb. 3.16 Effekte auf die Stammzellchemoattraktion (Akutphase); MW \pm SEM; * $P<0.05$

A: Fotografien repräsentativer RT-PCR Banden auf Agarosegel; B: Densitometrische Analyse der mRNA von c-Kit und CD34 in der Infarktzone (in Relation zur mRNA von GAPDH); C: Densitometrische Analyse der mRNA von c-Kit und CD34 in der Nichtinfarktzone

3.10 Rezeptor- und Zellantwortverhalten im Herzgewebe (mRNA-Expressionsverlauf von SOCS1 und SOCS3)

Die Aktivierung eines Rezeptors durch seinen Liganden kann über Kaskaden zur Signalübertragung vom Zelläußeren bis in den Zellkern führen und letztlich die Transkription von Genen bewirken. Starke oder langzeitige Aktivierung eines solchen Rezeptors und dessen nachgeschalteten Kaskaden können hingegen einen Mechanismus der negativen Rückkopplung anschalten [55]. Ein wie hier beschriebener selbstlimitierender Effekt der zellulären EPO Wirkung wurde bereits bei der Erythropoese nach systemischer EPO Applikation beschrieben. Solche inhibitorischen Mechanismen sind die Desensitivierung und Inaktivierung des EPO-R, die Hemmung der EPO-R Neubildung, ein erhöhter lysosomaler und proteasomaler Abbau des EPO-R sowie die Hochregulierung von SOCS1 und SOCS3 [56][57][58][59][60][61][62][63][64]. Im Gegensatz dazu ist von Überexpression des EPO-R im Herz nach systemischer EPO Therapie des MI berichtet worden [12]. Aus diesem Grund untersuchten wir beispielhaft die mRNA von SOCS1 und SOCS3, zwei die EPO vermittelte Signalübertragung in das Zellinnere inhibierende Moleküle. Bemerkenswert fand sich in MI-EPO Herzen gegenüber MIC Herzen eine verringerte Expression der mRNA von SOCS1 und SOCS3 in beiden Gewebearealen, IZ und NIZ, zum Zeitpunkt 48 Stunden nach MI ($P < 0.05$, s. Abb. 3.17A-C). Desweiteren blieb die Expression der mRNA von SOCS1 und SOCS3 in der IZ und in der NIZ auch während der Postakutphase eine Woche nach MI in MI-EPO geringer als in MIC ($P < 0.05$, s. Abb. 3.17D-F). Die lokale EPO Applikation führte im Herzen in der Akutphase wie in der Postakutphase nach MI demnach zu einer gehemmten Expression EPO Signalübertragung inhibierender Moleküle.

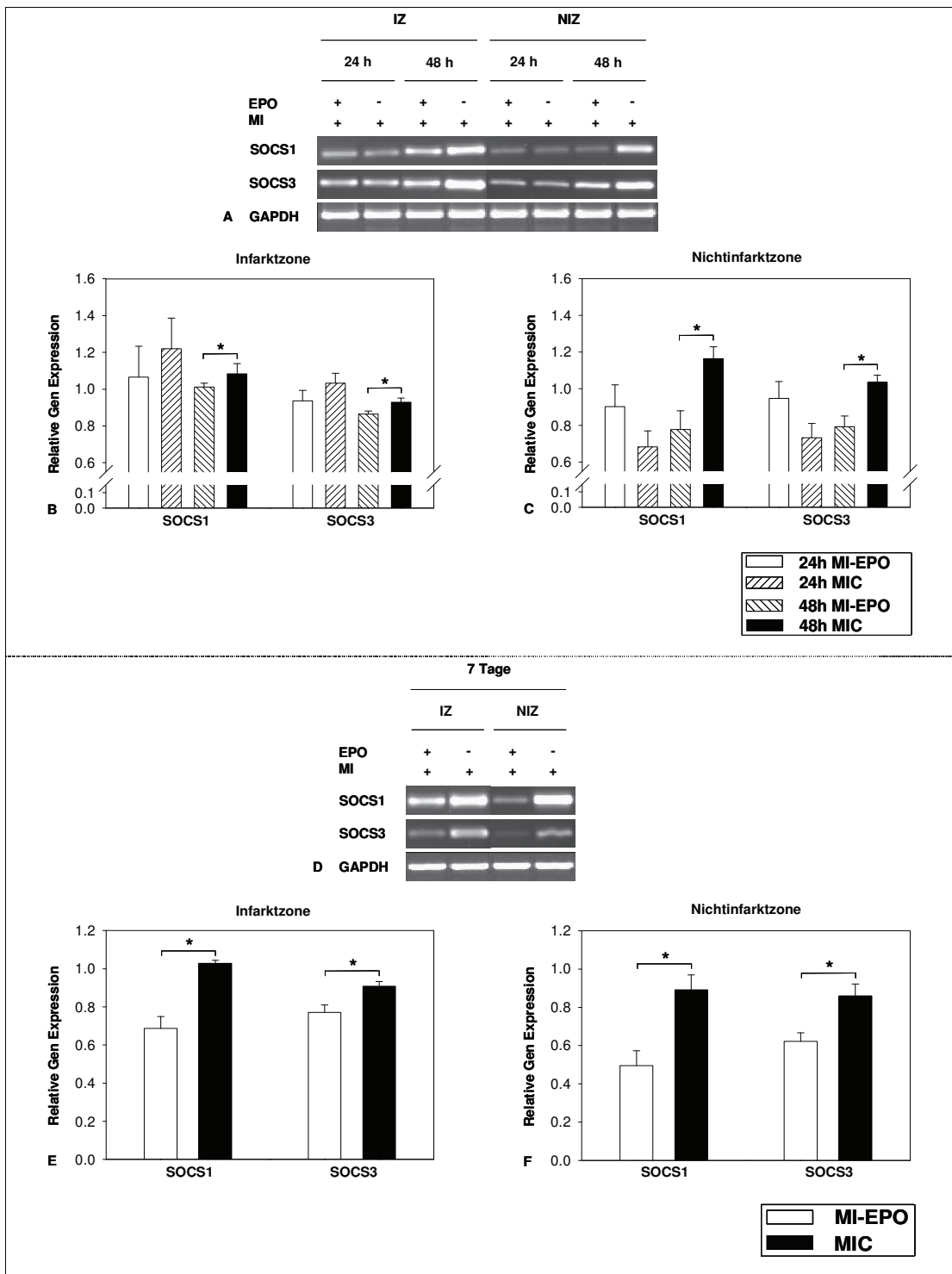


Abb. 3.17 Regulation des Rezeptor- und Zellantwortverhaltens (Akut- und Postakutphase); MW±SEM; * $P < 0.05$

A: Fotografien repräsentativer RT-PCR Banden auf Agarosegel; B: Densitometrische Analyse der mRNA von SOCS1 und SOCS3 in der Infarktzone 24 und 48 Stunden nach MI (in Relation zur mRNA von GAPDH); C: Densitometrische Analyse der mRNA von SOCS1 und SOCS3 in der Nichtinfarktzone 24 und 48 Stunden nach MI; D: Fotografien repräsentativer RT-PCR Banden auf Agarosegel; E: Densitometrische Analyse der mRNA von SOCS1 und SOCS3 in der Infarktzone 1 Woche nach MI; F: Densitometrische Analyse der mRNA von SOCS1 und SOCS3 in der Nichtinfarktzone 1 Woche nach MI;

3.11 Risiken der EPO Therapie und Pathologische Gesichtspunkte

Wie oben beschrieben kommt es infolge erhöhter plasmatischer EPO Konzentrationen im Blutkreislauf zu stimulierender Wirkung auf die Hämatopoese, insbesondere die Erythropoese, mit erhöhtem Hämatokrit des Blutes. Bei über normal gesteigertem Hämatokrit und Vorliegen einer Grunderkrankung mit erhöhter Inzidenz für vaskuläre Gerinnungskomplikationen können eben diese Komplikationen induziert werden [7][37][38][39].

3.11.1 Thrombogenität

Auch kardial appliziertes EPO gelangt über den Lymphabfluss sowie den venösen Abfluss in die Systemzirkulation, so dass sowohl die Eigenschaften des Blutes als auch vaskuläre Gerinnungskomplikationen kontrolliert wurden.

In der Akutphase nach MI zeigten sich bereits die ersten Veränderungen der hämatologischen und biochemischen Bluteigenschaften in den Tieren von MI-EPO gegenüber MIC. In MI-EPO stieg erwartungsgemäß die EPO Plasmakonzentration innerhalb der ersten 24 Stunden massiv an ($P=0.003$, s. Tab. 3.9), sank am zweiten postoperativen Tag wieder ab, aber blieb deutlich über der Konzentration in MIC ($P=0.004$). Bereits nach dem ersten Tag deuteten die leichten Erhöhungen in der absoluten und relativen Retikulozytenzahl ($P=0.026$, $P=0.026$) auf ein sich veränderndes Blutbild in MI-EPO gegenüber MIC hin. Nach dem zweiten Tag zeigte sich eine 9,4%ige Steigerung des Hämatokrit in MI-EPO gegenüber MIC ($P=0.004$). Außerdem waren sowohl Hämoglobin, Erythrozytenzahl und Retikulozytenzahl als auch die Zahl zirkulierender Thrombozyten in MI-EPO gegenüber MIC erhöht ($P<0.05$).

Tab. 3.9 Hämatologische und biochemische Analyse des peripheren Blutes in der Akutphase

Parameter	24h		48h	
	MIC (n=7)	MI-EPO (n=7)	MIC (n=7)	MI-EPO (n=7)
Hb (mmol/l)	9.13 ± 0.29	9.59 ± 0.14	9.39 ± 0.11	9.99 ± 0.20*
Hkt	0.44 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.50 ± 0.01*
Ery. ($\times 10^{12}/l$)	8.45 ± 0.23	8.87 ± 0.13	8.67 ± 0.16	9.25 ± 0.10*
Ret. abs. ($\times 10^{10}/l$)	31.74 ± 7.81	34.51 ± 1.09*	18.76 ± 1.32	40.43 ± 4.08*
Ret. rel. (%)	3.40 ± 0.89	3.89 ± 0.11*	2.16 ± 0.13	4.38 ± 0.46*
Thrombozyten ($\times 10^9/l$)	563.14 ± 49.55	586.00 ± 42.13	546.29 ± 23.68	649.43 ± 21.53*
EPO-K (mU/ml)	5.81 ± 1.58	282.39 ± 25.11*	4.35 ± 1.74	35.93 ± 13.04*

* $P<0.05$ vs. MIC. Die Werte wurden dargestellt in Form MW ± SEM. Hb heißt Hämoglobin; Hkt beinhaltet Hämatokrit; Ery., Erythrozytenzahl; Ret., absolute and relative Retikulozytenzahl; und EPO-K, Erythropoietin Plasmakonzentration.

In der Postakutphase 14 Tage nach Erstoperation konnten bzgl. der oben genannten Bluteigenschaften keine Unterschiede zwischen MI-EPO und MIC festgestellt werden (s. Tab. 3.10.). Auch die Plasmakonzentration von EPO sank auf Normalwerte (s. Abb. 3.18, Normalwerte hier nicht gezeigt, Daten einer anderen Studie).

Tab. 3.10 Hämatologische und biochemische Analyse des peripheren Blutes in der Postakutphase

Parameter	14 d	
	MIC (n=5)	MI-EPO (n=5)
Hb (mmol/l)	8.86 ± 0.19	8.80 ± 0.18
Hkt	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01
Ery. (x10 ¹² /l)	8.47 ± 0.18	8.45 ± 0.16
Ret. abs. (x10 ¹⁰ /l)	29.88 ± 0.83	21.84 ± 4.01
Ret. rel. (%)	3.54 ± 0.14	2.55 ± 0.44
Thrombozyten (x10 ⁹ /l)	550.00 ± 24.34	521.20 ± 45.53
EPO-K (mU/ml)	3.28 ± 1.18	1.70 ± 0.20

Die Werte wurden dargestellt in Form MW ± SEM. Hb heißt Hämoglobin; Hkt beinhaltet Hämatokrit; Ery., Erythrozytenzahl; Ret., absolute and relative Retikulozytenzahl; und EPO-K, Erythropoietin Plasmakonzentration.

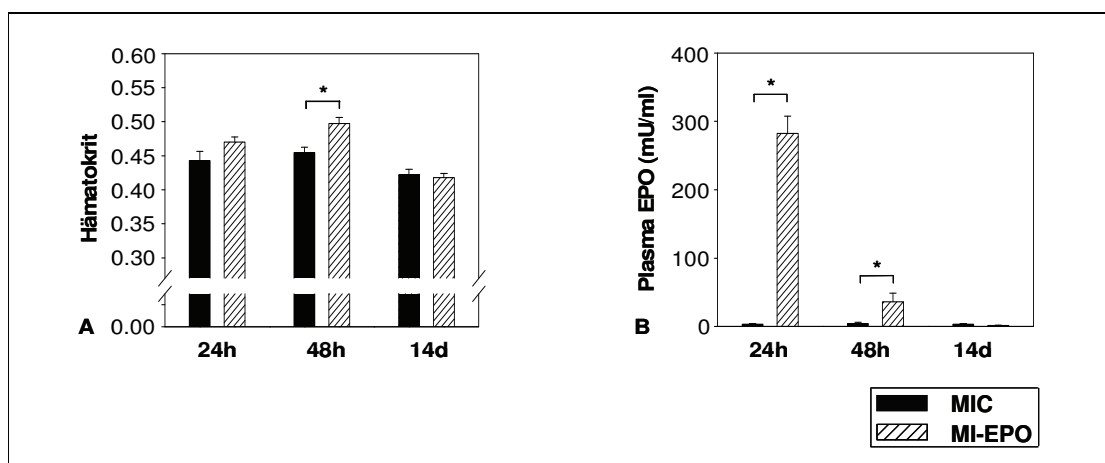


Abb. 3.18 Transiente Veränderungen der Bluteigenschaften in MI-EPO gegenüber MIC; MW±SEM; * $P < 0.05$

A: Hämatokrit des Blutes; B: EPO Plasmakonzentration

Zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden, 2 Wochen und 6 Wochen nach MI wurden Gehirn, Leber, Lunge, Niere, Milz und Herz von MIC und MI-EPO Tieren auf stattfindende Thrombosierungsprozesse untersucht. Keines der untersuchten Gewebe wies eine sichtbare Thrombenbildung, die auf eine mögliche direkte Thromboseinduktion durch lokal appliziertes EPO hätte schließen lassen, in den Gefäßen des Organstromas auf (s. Abb. 3.19). Die lokale EPO Applikation induzierte demnach kurzzeitig fast die gesamte Hämatopoese. In der Folge konnten während der gesamten Beobachtungszeit jedoch keine thrombotischen Prozesse in 6 wichtigen Organen beobachtet werden.

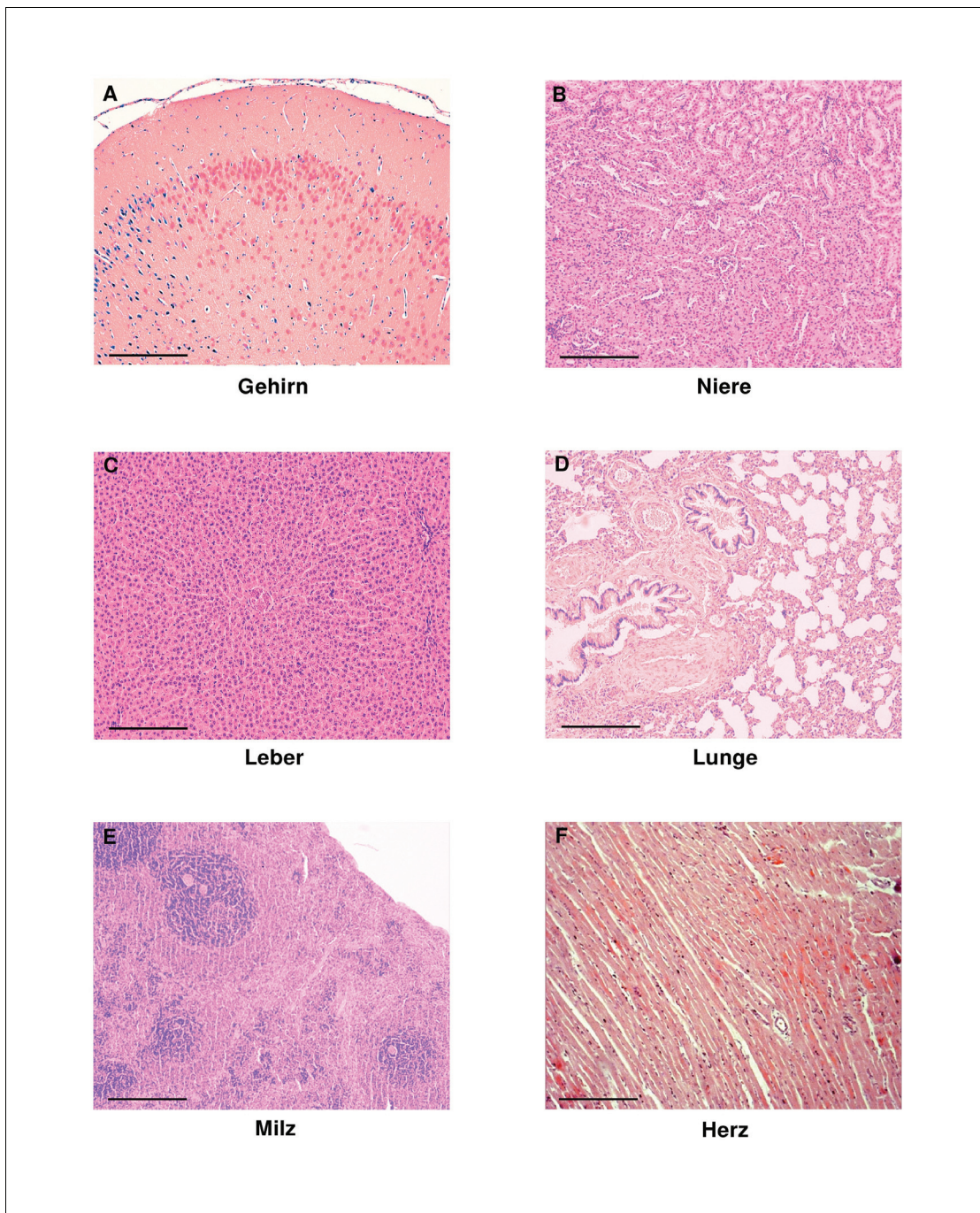


Abb. 3.19 Kontrolle von Thrombosierungsprozessen

A-F: Representative HE Gewebefärbungen für Gehirn (A), Niere (B), Leber (C), Lunge (D), Milz (E), und Herz (F) von MI-EPO Tieren 48 Stunden nach MI; Maßstab: Strecke = 200 μ m

3.11.2 Histopathologie 6 Wochen nach Myokardinfarkt

In der histopathologischen Begutachtung 6 Wochen nach MI, wurde gezielt nach möglichen pathologischen Ereignissen geschaut, die durch die direkte, lokale EPO Applikation hätten induziert werden können. Es konnten zwischen den Gruppen MI-EPO und MIC keine Unterschiede festgestellt werden. In allen Herzen der beiden Gruppen wurde eine ausgeheilte hypozelluläre Infarktnarbe bei Zustand nach transmuralem Myokardinfarkt des LV beschrieben. Es konnten keine zusätzlichen pathologischen Substrate innerhalb des Gewebes des LV von MI-EPO gegenüber MIC gefunden werden. Wie oben beschrieben, konnten keine Thromben festgestellt werden. In beiden Gruppen, MIC und MI-EPO, bestanden Mikrokalzifikationen. In MIC zeigten alle Herzen 6 Wochen nach MI Mikrokalk. In MI-EPO legten 4 von 6 Herzen Mikrokalk offen. Auffällig und aus pathologischer Sicht sehr interessant offenbarte die Gewebefärbung darüber hinaus die Generierung multipler Knorpelfoci an der Innenseite des LV im Bereich der Infarktnarbe von MIC Herzen (7 von 8, s. Abb. 3.20) und MI-EPO Herzen (3 von 6). Die Inzidenz von Kalzifikationen ist in seltenen Fällen bei Kindern mit MI ohne kardiovaskuläre Grunderkrankung berichtet worden. Auch andere wissenschaftliche Arbeiten im Rattenmodell mit großem MI konnten die Formierung von Knochen- und Knorpelgebilde im kollagenreichen Narbenbezirk histologisch nachweisen [65]. Die anfänglich bestehende Hypothese, Knochen- und Knorpelbildung im infarzierten Rattenherz sei auf die Transplantation von KM Stammzellen zurückzuführen, wurde dadurch widerlegt, da ebenfalls Versuche ohne Zelltransplantation wie auch der unsere diese ektopische Gewebsbildung im Narbenbereich darstellen. Die lokale EPO Therapie führte demnach nicht zu einer Induktion zusätzlicher pathologischer Prozesse.

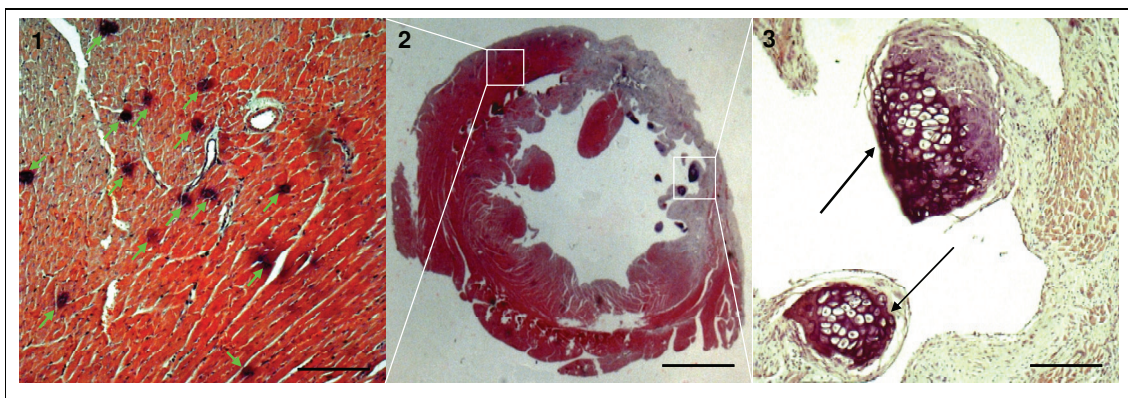


Abb. 3.20

Histopathologie 6 Wochen nach MI

Representative HE Gewebefärbung eines Herzen der Gruppe MIC 6 Wochen nach MI (Überblick des Querschnitts in 2) offenbart Mikrokalzifikationen im Myokard (grüne Pfeile in 1) und fokale kartilaginöse Gebilde an der Innenseite der LV Infarktnarbe (schwarze Pfeile in 3); Maßstab: Strecke = 200 μ m in 1 und 3; Strecke = 2 mm in 2

4. Diskussion

Die durchgeführte Studie demonstriert erstmals, dass eine einmalige intrakardiale Applikation von EPO nach MI zu einer signifikanten Hochregulierung des Stammzell-chemoattraktiven Faktors SDF-1 und zu einer zeitlich darauffolgenden stärkeren Expression der Stamm- und Progenitorzellmarker c-Kit und CD34 führt. Darüber hinaus ist zu betonen, dass die lokale EPO Gabe die Anwesenheit proliferierender Zellen im geschädigten Myokard erhöhte, eine Neoangiogenese bewirkte, die Infarktgröße verkleinerte, das pathologische Remodeling bremste und die Herzfunktion massiv verbesserte ohne zusätzliche pathologische Auswirkungen zu induzieren. Außerdem sind verringerte cTnT Plasmakonzentrationen, geringere Druckbelastungen im RV und erhöhte körperliche Leistungsintensität von EPO behandelten Tieren gezeigt worden. Die Ergebnisse könnten eine bessere Lebensqualität und eine möglicherweise reduzierte Mortalität bei verlängerter Beobachtungsdauer andeuten [54].

4.1 Funktion und Überleben

Das Experiment verdeutlicht, dass die lokale EPO Therapie nach MI sowohl die Funktion des LV als auch die des RV verbessert. Auffällig ist die Konstellation, dass bei vergleichbarem enddiastolischem Volumen des LV in beiden MI Gruppen unter EPO Behandlung ein höheres Schlagvolumen und somit eine verbesserte Auswurfraction generiert wurde. Da die Infarktgröße im EPO behandelten LV verringert war, mag die größere Menge an lebendem Myokard in MI-EPO insbesondere eine Zunahme der Kontraktionskraft mit erhöhtem dPdt max erzielt haben. Dieser Leistungsvorteil der EPO behandelten Herzen könnte die LV Dekompensation mit venösem Rückstau über den Lungenkreislauf in den RV, die Entwicklung von pulmonaler Hypertonie und Lungenödem sowie die Entwicklung der gezeigten RV Hypertrophie in unbehandelten MI Herzen verhindert haben [66]. Diese Argumentation wird gestützt durch die aktuellen Resultate von Palazzuoli et al.. Eine Behandlung von Patienten mit Herzinsuffizienz bei kardiorenalem Anämiesyndrom mit β -Erythropoietin (ein EPO-Analog) zeigte eine verbesserte LV Auswurfraction des Herzens bevor sich die enddiastolische Ausdehnung und der pulmonalarterielle Druck besserten [67].

Die Aufrechterhaltung der LV Funktion durch systemisch verabreichtes EPO wurde auch in anderen Arbeiten verdeutlicht [9][10][11][12][13]. Diese tierexperimentellen Arbeiten konnten ebenso keinen Überlebensvorteil durch die EPO Therapie während des Beobachtungszeitraumes feststellen. Dennoch bleibt es erwähnenswert, dass in unserem Experiment im gesamten Beobachtungsrahmen nur ein einziges Tier unter EPO Behandlung

nach dem ersten postoperativen Tag starb. Die Studie verweist darüber hinaus auf die frühzeitige Reduktion der Plasmakonzentration von cTnT, Marker für myokardialen Schaden und erhöhtes Langzeitmortalitätsrisiko aufgrund kardialer Ursachen [54], sowie auf die Wiederherstellung der Kontraktilität und Elastizität des LV, die Verbesserung der Belastungsbedingungen im RV und ein begrenztes pathologisches Remodeling nach lokaler EPO Behandlung. Eine Studie mit verlängerter Beobachtungszeit könnte die Reduktion der Langzeitmortalität des MI durch frühe lokale EPO Therapie infolge verringerten sekundären Herzversagens aufzeigen.

4.2 Aktivität

In gewisser Beziehung zur globalen Herzfunktion steht die physische Aktivität des Tieres. Verschlechtert sich die Auswurfleistung des Herzens so verringert sich die Oxygenierung aller durchblutungsabhängigen Organe des Körpers. Der „Forced swim test“ findet vielfach Anwendung in Kleintierstudien. Anhand Aktivitätsunterschiede von Versuchstieren wird die Wirkung anti-depressiver Wirkstoffe erforscht [68]. Dieser Test wurde an die experimentellen Bedingungen angepasst, da in diesem Versuch medikamenten oder genetisch induzierte psychotische Störungen weder verursacht noch kontrolliert werden sollten. Wir konzentrierten unsere Aufmerksamkeit auf die Intensität der Aktivität, d.h. auf die Anzzahl der vom Tier unternommenen Sprünge sowie auf die Höhe dieser Sprünge während einer Zeiteinheit.

Auffällig ist der kontinuierliche Rückgang der Aktivität und Sprunganzahl in allen Gruppen, sowie die Indifferenz in der Aktivität zwischen allen Gruppen zu den Zeitpunkten 48 Stunden, 96 Stunden und 7 Tage post infarktem. Diese Phänomene mögen an zwei Dingen liegen. Zum einen könnte die permanente Käfighaltung zu einer kontinuierlichen Abnahme der Aktivitätsbereitschaft geführt haben. Zum anderen muss die Halbwertszeit des Analgetikums Buprenorphin (2-5 Stunden) in Betracht gezogen werden [69]. Die Erstoperation beinhaltete in allen Gruppen (auch in Sham) eine Thorakotomie, die zu schweren Schmerzen postoperativ führt. Während der ersten 24 Stunden wird die Analgesie mit dem Opiodderivat ausreichend gewesen sein, doch während der Wundheilung in den nachfolgenden Tagen konnte der Schmerz möglicherweise nicht ausreichend mit Metamizol unterdrückt werden. Das an Schmerzen leidende Tier könnte mit Sicherheit nicht seine volle Leistungsfähigkeit am zweiten, vierten und siebten postoperativen Tag entwickeln. Dennoch konnte die lokale EPO Therapie 6 Wochen nach Erstoperation eine Verbesserung der physischen Leistungsfähigkeit bei den Ratten mit MI aufzeigen. Dies führt zu der Annahme, dass möglicherweise die gesamte Körperperfusion durch die lokale EPO Therapie verbessert wurde.

Zur Steigerung der körperlichen Aktivität in MI-EPO Tieren zum Zeitpunkt 24 Stunden post infarktem können nur Spekulationen angestellt werden. Zunächst sei erwähnt, dass die Aktivität dieser Tiere bereits im Käfig augenscheinlich deutlich besser war als die Aktivität der MIC Tiere. Eine mögliche Ursache könnte die erwähnte antiapoptotische Wirkung von EPO sein [26][27][28][29]. Diese bewirkt innerhalb der ersten 24 Stunden nach MI eine erhebliche Reduktion des Zellverlusts im Herzen. Dafür spricht auch, dass am zweiten Tag postoperativ in der Gruppe MI-EPO kein Tier verstarb. Desweiteren führt die Induktion von eNOS nach EPO Applikation, wie oben dargestellt, zur Produktion von NO. NO ist ein Vasodilatator. In unserem Modell ist von einem systemischen Effekt von EPO aufgrund des hohen Plasmaspiegels auszugehen. Es ist denkbar, dass eine Mehrperfusion der Muskulatur eine Leistungserhöhung ermöglichte. Dennoch bleibt dieses Resultat diskussionswürdig.

4.3 Risiken der EPO Behandlung und Vergleich zur systemischen Applikation

Kürzlich zeigten zwei unabhängigen Studien, dass die EPO vermittelte Kardioprotektion möglicherweise dosisabhängig ist, wobei höhere Dosen von Darbepoetin- α , ein EPO-Analog, bessere Protektion gegen LV Wandausdünnung und Funktionsversagen bieten als niedere Dosen [70][71]. Dem gegenüber kann eine längere EPO Anwendung unerwünschte Wirkungen auf den Hkt haben, was zur Beeinträchtigung der Blutflusseigenschaften durch Polyglobulie führt. Dies kann eine vaskuläre Thrombosierung verursachen und zu mitunter erhöhter Mortalität beitragen [7][72]. Unsere Studie dokumentierte die Zellmobilisierung von fast allen hämatopoetischen Zelllinien 48 Stunden nach EPO Applikation. Dieses hämatopoetische Potenzial von EPO muss gesondert betrachtet werden, wenn es Patienten über einen verlängerten Zeitraum verordnet wird. Daher betont unsere Arbeit, dass die einmalige lokale EPO Applikation weder zu zeitweiliger Hypertension, noch zu langfristig gesteigertem Anteil des zellulären Blutkompartiments, noch zu vaskulärer Thrombosierung in Gehirn, Niere, Lunge, Leber, Milz und Herz führte. Nicht zu vergessen bleibt jedoch der Unterschied zwischen Mensch und Ratte und, dass dem MI keine Grunderkrankung voranging (= Tiermodell), wie es durch die ektopische Formierung von Mikrokalk und Knorpelgebilden widerspiegelt wurde [65]. Dem MI des meist älteren Menschen geht fast immer die KHK voran, eine Grunderkrankung, deren vaskuläre Gerinnungskomplikation den eigentlichen MI verursacht. Dennoch könnte die intrakardiale Applikation von EPO alternativ zur systemischen Gabe empfohlen werden, da die Wirkdosis für eine effektive Kardioprotektion möglicherweise reduziert werden könnte und so Nebenwirkungen durch langfristige systemische Gaben möglicherweise reduziert würden.

4.4 Modifikationen im Infarktheilungsprozess induziert durch lokale EPO Therapie

Die zugrunde liegenden Mechanismen, durch die die intrakardiale Injektion von EPO zur Verbesserung der Herzfunktion nach MI geführt hat, konnten nicht vollständig aufgeklärt werden. Es gibt mehrere Faktoren, die beigetragen haben können: (1) Die erhöhte Kapillardichte könnte einen Teil des Myokards vor dem Untergang bzw. dem Remodeling bewahrt haben; (2) Die Mobilisierung und Rekrutierung von c-Kit⁺ und CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen war verstärkt; (3) Die SDF-1 α Hochregulierung 24 Stunden nach MI induzierte die frühe Rekrutierung von Stamm- und Progenitorzellen zum Infarkt Herzen, was zumindest teilweise zur kardialen Regeneration beigetragen haben könnte; (4) Zusätzlich haben EPO vermittelte proliferative, entzündungshemmende und protektive Prozesse wahrscheinlich den myokardialen Schaden, das pathologische Remodeling und die Infarkt Narbenbildung begrenzt.

4.4.1 EPO vermittelte Angiogenese

Angiogenese, vermittelt durch systemische EPO Applikation, konnte in Studien gezeigt werden [30][33]. Auch die lokale EPO Therapie zeigt angiogenetischen Effekt. Sowohl im Grenzbereich des Infarkts 1 Woche nach MI als auch im Grenzbereich und im von der Narbe entfernt gelegenen Gewebe des interventrikulären Septums 6 Wochen nach MI war die Gefäßdichte erhöht. Die zugrunde liegenden Prozesse mögen zum einen in einem verringerten Remodeling mit verringerter Hypertrophie zum anderen in der direkt angiogenetischen Wirkung von EPO begründet sein. Sowohl die Bildung von eNOS als auch von VEGFR-2 wurde bereits in der Akutphase nach MI durch EPO induziert. eNOS und VEGFR-2 sind essenziell für das Überleben und die Proliferation von Endothelzellen [33][35][36]. Darüber hinaus war die mRNA des Zellzyklus Wiedereintrittsmarkers Cdk4 ebenfalls 24 Stunden nach MI durch lokale EPO Therapie induziert worden. Der Wiedereintritt in den Zellzyklus durch Endothelzellen stellt eine wichtige Quelle der Angiogenese dar [47]. Auffällig ist, dass die mRNA von VEGFR-2 und Cdk4 nur zum Zeitpunkt 24 Stunden und nur in der NIZ hochreguliert waren und auch eNOS zum Zeitpunkt 24 Stunden in der NIZ am stärksten exprimiert wurde. Weitere Untersuchungen sind notwendig um den Einfluss von EPO auf den Wiedereintritt adulter Zellen, insbesondere von Endothelzellen, in den Zellzyklus deutlicher darzustellen. Nicht zu vergessen ist die unter lokaler EPO Therapie stattgefundenene erhöhte Mobilisierung mononukleärer Zellen in der Akutphase. EPC können sowohl aus CD34⁺ und/oder CD133⁺ HSC als auch aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes und CD14⁺ Monozyten hervorgehen und sich an der Vaskulogenese beteiligen [42].

4.4.2 EPO vermittelte Stammzellmigration

Die EPO vermittelte gerichtete Wanderung von Stamm- und Progenitorzellen war in besonderer Weise wichtig für diese Studie. Das SDF-1/CXCR4 Ligand/Rezeptor Paar spielt eine entscheidende Rolle innerhalb der Prozesse der Stammzellmigration [73][74]. Während der Ontogenese verbleiben frühe CXCR4⁺ TCSC im normalen Knochenmark. CXCR4⁺ HSC, auch positiv für c-Kit oder CD34, und TCSC des KM können einem SDF-1 Gradienten folgen, werden in das periphere Blut mobilisiert und nehmen an Angiogenese und Wiederherstellung der kardialen Funktion teil [44][75][76][77]. Darüber hinaus konnte eine weitreichende Überlappung in der Expression hämatopoetischer und endothelialer Marker gezeigt werden, was auf eine enge Entwicklungsverwandtschaft zwischen HSC und EPC zurückschließen lässt [78][79][80][81]. Solche Stamm- und Progenitorzellen des KM sowie der Zirkulation können bei Transplantation in ischämisches Myokard aktiv an Vorgängen der Neovaskularisation teilnehmen [82][83][84][85]. Einige aktuelle Arbeiten demonstrieren, dass EPO EPC des KM mobilisieren [86][87][88] und die adhäsiven Eigenschaften zirkulierender EPC erhöhen kann [89]. Ob EPO eine zielgerichtete Rekrutierung zum Ort der ischämischen Schädigung zu induzieren vermag, ist bislang unzureichend geklärt. Diese Studie zeigt erstmalig einen starken Beweis für eine frühzeitige, zeitlich begrenzte Hochregulierung von SDF-1 in EPO behandelten Infarkt Herzen. Die FACS Analyse sowie die immunhistologischen Untersuchungen erbrachten weitere Beweise für eine EPO vermittelte frühe Mobilisierung von c-Kit⁺ und CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen in das periphere Blut am ersten postoperativen Tag und eine signifikante Erhöhung der Zelldichte c-Kit⁺ und CD34⁺ Zellen im Infarktgewebe am zweiten postoperativen Tag. Die Ergebnisse und Bilder können neben weiteren Resultaten in den zur Studie gehörigen Veröffentlichungen nachgeschaut werden (siehe vorn: „Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht“). Demzufolge zeigte die SDF-1 Hochregulierung eine enge Beziehung zur Mobilisierung ins periphere Blut und zur Anwesenheit im Infarktgewebe von c-Kit⁺ und CD34⁺ Stamm- und Progenitorzellen. Aus diesem Grund liegt nahe, dass intrakardial appliziertes EPO eine zum geschädigten Herzen zielgerichtete Stammzellmobilisation induzieren könnte, wo eine erhöhte Anzahl von Stammzellen durch biologische und biochemische Prozesse zum Erhalt und Wiederaufbau von funktionellem Herzgewebe beiträgt.

4.4.3 EPO vermittelte Kardioprotektion

Die molekularen Mechanismen, die mit der EPO vermittelten Kardioprotektion assoziiert sind, konnten nicht zufrieden stellend analysiert werden. Die beobachteten Anstiege in der Expression der mRNA des pro-survival Gens Akt und dessen untergeordneten Zielgens eNOS 24 Stunden nach MI in EPO behandelten Tieren könnten möglicherweise eng assoziiert mit den protektiven Effekten des Glykoproteins sein. Diese Ergebnisse sind auch in Übereinstimmung mit älteren Veröffentlichungen, in denen EPO die PI3-Kinase und die Akt Signalkaskade aktiviert [90], sowie mit kürzlichen Veröffentlichung, in denen beschrieben wird, dass eNOS von großer Wichtigkeit für sowohl Zellprotektion [34] als auch die SDF-1 vermittelte Chemoattraktion von c-Kit⁺ Stammzellen ist [91].

Darüber hinaus zeigten sich sowohl die systemische Entzündungssituation zum Zeitpunkt 24 Stunden nach MI in EPO behandelten Tieren als auch die lokale Entzündungssituation sowohl akut als auch postakut im EPO behandelten Infarkt Herzen gehemmt. Die verringerte Zahl zirkulierender Neutrophiler früh nach MI und die verringerte Expression von TNF- α akut und postakut und von CD18 postakut im kardialen Gewebe verdeutlichen den protektiven Charakter von EPO.

Daneben wies eine deutliche Reduktion der Plasmakonzentration von Infarktmarker cTnT zwei Wochen nach MI in EPO behandelten Tieren, bei sonst gleicher Konstellation der Infarktmarker CK und CKMB in den Infarkt Tieren, auf eine langfristig verringerte myokardiale Schädigung in den EPO behandelten Tieren hin. cTnT ist ein Marker, der in positiver Korrelation zum Myokardschaden steht [54]. Die Funktionsverbesserungen des LV und RV 6 Wochen nach MI sind möglicherweise Ausdruck der frühzeitigen Verringerung des Myokardschadens sowie einer langfristig zu erwartenden verbesserten Herzfunktion mit möglicherweise verbessertem Langzeitüberleben des Gesamtorganismus durch lokale EPO Therapie.

Ein besonderes Problem stellt die gehäuft mit der EPO Applikation auftretende Hypertension im Systemkreislauf dar [7]. Der systemische arterielle Blutdruck ist sowohl von der Inotropie des Herzens als auch von Variablen im peripheren Gefäßsystem abhängig. Während in der Peripherie die Empfindlichkeit des arteriellen Netzwerks bei der Regulation des Blutdrucks gegenüber lokalen metabolischen Einflüssen und rezeptorabhängigen Agonisten (Noradrenalin, Histamin, Vasopressin u.a.), dem lokalen schubspannungsabhängigen Mechanismus sowie dem lokalen Mechanismus der myogenen Antwort ansteigt, ist der Aortendruck stärker von anderen Faktoren abhängig. Der Blutdruck wird hier eher vom Gefäßtonus, der sich aus basalem und neurogenem Tonus zusammensetzt, und von der

Auswurfleistung des Herzens bestimmt, wobei man aber auch hier obengenannte Faktoren der peripheren Durchblutungsregulation nicht außer Acht lassen kann. Das periphere Gefäßnetz, insbesondere der arterielle Schenkel, ist maßgeblich beteiligt an der Regulation des gesamten Gefäßwiderstandes. Darüber hinaus spielt auch der venöse Schenkel, mit den Hohlvenen im Besonderen, eine wesentliche Rolle für das Ausmaß der Vorlast des Herzens, welches nach Starling wiederum die Höhe des Schlagvolumens beeinflusst [53]. Die in dieser Studie gefundene Erhöhung des systemischen Blutdrucks in der EPO behandelten Gruppe war keineswegs abnormal. Es handelte sich um eine moderate Steigerung des Blutdrucks am zweiten postoperativen Tag unterhalb der Blutdruckwerte von gesunden Ratten (P_{mean} liegt hier bei $101,83 \pm 3,18$ mmHg; erhoben in gesunden, unbehandelten Ratten gleicher Rasse und gleichen Alters; Daten einer anderen Studie). Diese Abweichung des systemischen Blutdrucks nach oben in den EPO behandelten Tieren kann vielfältige Ursachen haben. Ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg des Hkt von 45 % ohne EPO Behandlung auf 50 % mit EPO Behandlung und dem Anstieg des systemischen Blutdrucks in sonst normotensiven Ratten ist nicht auszuschließen, doch andere Studien zeigen, doch zu meist erst stärkere Hkt Anstiege hämodynamisch wirksam werden [92][93][94]. Eher kann an eine positiv inotrope Wirkung von EPO gedacht werden, da eine Steigerung des Gewebe-c-AMP im Herzmuskel nach systemischer EPO Gabe bereits beschrieben wurde [32]. Daneben entfaltet TNF- α eine negativ inotrope Wirkung [23]. Die auffällige Konstellation eines gesteigerten systemischen Blutdrucks im Arcus aortae und die verringerte Expression von TNF- α speziell lokalisiert im muskulären Nichtinfarktbereich des Herzens 48 Stunden nach MI lässt an eine EPO vermittelte Hemmung des negativ inotrop wirksamen Effekts von TNF- α denken. Weitere Untersuchungen sind notwendig um dieses Phänomen ursächlich erklären zu können.

4.4.4 EPO vermittelte kardiale Proliferation

Ein weiteres zentrales Resultat unseres experimentellen „Set-Up“ hebt die erhöhte Anwesenheit Ki-67⁺ Zellen im Grenzbereich des Infarkts früh nach lokaler EPO Therapie hervor. Parallel fand sich eine Hochregulierung der mRNA von Proliferationsmarker Cdk4 im Nichtinfarktgebiet. Weiterführende Real-Time PCR Analysen von wissenschaftlichen Angestellten des FKGO zeigten gleichzeitig induzierte Gene von Cyclin D1 und die Cdc2 Kinase im Infarktgebiet von EPO behandelten Tieren.

Die vermehrt proliferierenden Zelltypen konnten in dieser Studie nicht eruiert werden. Fibroblasten, Endothelzellen, Entzündungszellen sowie Stamm- und Progenitorzellen proliferieren hauptsächlich während der Tage 2 bis 14 nach MI im Bereich der ischämischen Schädigung in Kleintieren [17]. Die Daten unseres Laboratoriums indizieren eine durch lokale EPO Therapie induzierte gesteigerte Mobilisation von c-Kit⁺ und CD34⁺ Zellen ins periphere Blut sowie deren vermehrte Rekrutierung zum infarzierten Herz. Ergebnisse anderer wissenschaftlicher Gruppen dokumentierten, dass EPO die proliferativen Eigenschaften solcher zirkulierender EPC steigert [89] und die ERK im Myokard aktiviert [95]. Desweiteren vermittelt EPO die endotheliale Zellproliferation in einer VEGF abhängigen Weise [96]. Die hier beschriebene EPO vermittelte Neoangiogenese eine Woche nach MI impliziert eine frühe Proliferation von Endothelzellen oder die Proliferation und Differenzierung von endothelialen Vorläufern [71]. Es lässt sich daher spekulieren, dass Endothelzellen oder ihre Vorläufer eine der Hauptpopulationen sind, die zur erhöhten intrakardialen Proliferation beigetragen haben könnten. Auch die Überexpression von eNOS, provoziert durch direkte EPO Gabe, könnte teilweise zur deutlichen, schnellen Angiogenese im Myokard beigetragen haben [97].

Darüber hinaus scheint EPO fähig zu sein die Proliferation und Differenzierung von Myoblasten zu regulieren [98] und den Grad der Proliferation in embryonalen Kardiomyozyten zu heben [99]. Ähnliche Effekte von EPO auf residente kardiale Stammzellen und adulte Kardiomyozyten sind denkbar, konnten jedoch noch nicht gezeigt werden. Außerdem muss im Hinblick auf die kardiale Morphogenese der essentiellen Rolle von EPO als Proliferation regulierendes Hormon besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden [100]. Das Glykoprotein EPO ist demnach möglicherweise ein potenter Induktor von Proliferationskaskaden im ischämisch geschädigten Herz. Mit Bezug zum ähnlichen Ausmaß der myokardialen Schädigung in beiden MI Gruppen 48 Stunden nach MI trug die durch lokale EPO Therapie vermittelte kardiale Proliferation vielleicht zu beschleunigter kardialer Regeneration und verbesserter Aufrechterhaltung der kardialen Gewebestruktur bei.

4.4.5 EPO begrenzt pathologisches Remodeling

Das durch die intramyokardiale Injektion von EPO induzierte verbesserte kardiale Remodeling war ein weiterer Hauptfokus dieser Arbeit. Von hoher Bedeutung ist, dass die einmalige lokale EPO Applikation direkt nach MI die Apoptoserate der Kardiomyozyten spät nach MI-Abheilung im gesamten Myokard reduziert. Ähnliche zytoprotektive Effekte konnten für verschiedene therapeutische Agenten wie ACE Inhibitoren, ATII Rezeptor Antagonisten oder Kallikrein berichtet werden [101][102][103][104]. Die Signalwege der EPO vermittelten Zytoprotektion sind, soweit verstanden, bereits beschrieben worden. Die frühe Begrenzung von Kardiomyozytenapoptose nach systemischer EPO Gabe bei MI ist bekannt [10][29][70][71]. Weiterhin deutet die verminderte Anzahl apoptotischer Kerne im Myokard spät nach MI, gefunden von Nishiya et al., auf einen anhaltenden Effekt von EPO gegen Kardiomyozytenverlust hin [30]. Desweiteren konnten wir eine verringerte Hypertrophie und interstitielle Fibrose des LV sowie eine reduzierte Hypertrophie des RV, als Zeichen verringerter Dekompensation des LV, nach lokaler EPO Therapie dokumentieren. Zusammengefasst reflektieren diese Resultate, dass die intramyokardiale EPO Administration möglicherweise sofort Kaskaden zur Protektion des Myokards induziert und das regenerative Potenzial des Herzens aktiviert. Die dadurch bewirkten positiven Effekte mögen ein vorteilhafteres Remodeling nach MI gefördert haben.

4.5 Residente kardiale Stammzellen

Ungeachtet der gefundenen Ergebnisse, kann weder die exakte Rolle von EPO auf endogene residente CSC erklärt werden, noch können die Ergebnisse bzgl. der Chemoattraktion exogener Stamm- und Progenitorzellen vollständig von dieser Rolle abgegrenzt werden. EPO hat gezeigt, Proliferation und Differenzierung von embryonalen und adulten neuronalen Stammzellen regulieren zu können [105]. Sowohl exogene Stammzellen als auch adulte CSC können positiv für c-Kit und gewebespezifische Marker sein [43]. Beide Stammzellpopulationen sind multipotent und unterstützen die myokardiale Regeneration [40][41][42][43][106]. Demnach scheint es nachvollziehbar, dass intrakardial appliziertes EPO auch die Proliferation und Differenzierung von CSC induzieren könnte. Weitere Studien sind notwendig um diese Hypothese zu stützen.

4.6 Regulation der EPO Signalübertragung auf die Zelle

Interessanterweise war die mRNA von SOCS1 und SOCS3, Immunregulatoren die die EPO vermittelte intrazelluläre Signalkaskade hemmen, in den EPO therapierten Herzen kurz nach MI reduziert exprimiert. Dieses Ergebnis setzte sich bis in die Postakutphase fort. In Übereinstimmung mit anderen Studien der systemischer EPO Administration bei MI [12] konnten quantitative Real-Time PCR Analysen eine Hochregulierung des EPO-R auch in unserem Versuchsaufbau sofort nach MI nachweisen. Li et al. gehen davon aus, dass die EPO-R Expression unabhängig von der gewählten Applikationsform des EPO ist. Die in unserer Studie wahrscheinlich relativ hohe lokale Konzentration von EPO hatte daher anscheinend keinen gegenregulatorischen Effekt auf die de-novo Synthese des EPO-R. Mögliche Mechanismen einer negativen Rückkopplung sind bereits beschrieben worden [56][57][58][59][60][61][62][63][64]. Jegalian et al. erklären, SOCS1 und SOCS3 sind Immunregulatoren, werden in den Zellen der Hämatopoese nach Stimulation durch EPO hochreguliert und hemmen die EPO vermittelte intrazelluläre Signalübertragung durch Hemmung der Jak 2 Kinase Aktivität und Hemmung von STAT5. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch eine deutliche Reduktion der intrakardialen mRNA Expression von SOCS1 und SOCS3 ab dem zweiten postoperativen Tag durch lokale EPO Therapie. Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass EPO im Herz die Antagonisten der eigenen Informationsübertragung selbst hemmt und es in der Folge zur Hochregulierung des EPO-R kommt. Wie dem auch sei, die Regulation der Expression des EPO-R sowie der EPO vermittelten Signalübermittlung in das Zellinnere im Herz und in anderen Geweben scheint sich von der im hämatopoetischen System zu unterscheiden [12][107]. Es bedarf auch hier weiterer Untersuchungen zur Klärung der Regulatoren, die möglicherweise EPO selbst neben Hypoxie- und Entzündungsmarkern beinhalten.

4.7 Grenzen der Studie und Anmerkungen

Zunächst sei erwähnt, dass diese Studie keineswegs den Anspruch auf Vollständigkeit in den Ausführungen zur intrakardialen Wirkung von EPO nach künstlicher Induktion eines MI verfolgt. Vielmehr wirft diese Arbeit neue Fragen auf und gibt Anlass zur detaillierteren Aufklärung molekularer Mechanismen von EPO.

Desweiteren ist ein entscheidender limitierender methodischer Faktor ersichtlich. Im obigen Versuchsaufbau wurde EPO einmalig lokal, hochdosiert (stets 3000U/kg) appliziert, ohne auf mögliche Unterschiede bzgl. dosisabhängiger Wirkungsveränderungen einzugehen. Diese Studie wurde derartig konzipiert, da davon auszugehen ist, dass erhöhte Dosen von EPO zu dessen Wirkungsverbesserung nach ischämischem Schaden beitragen könnten [70][71]. Darüber hinaus erlaubte das Design die Kontrolle der Hypothese, ob EPO zu einer direkten Thromboseinduktion führt. Nach obigen Ergebnissen kann in der gesunden Ratte mit isoliertem Myokardinfarkt ohne vaskuläre Grunderkrankung eine direkte Tromboseinduktion in den Gefäßen von 6 wichtigen Organen ausgeschlossen werden.

Letztere Feststellung verdeutlicht eine weitere Limitation. Dem künstlich induzierten MI ging keine arteriosklerotische Grunderkrankung voran, weshalb die Ergebnisse und auch die Übertragbarkeit dieser auf den erkrankten Patienten grundsätzlich in Frage gestellt werden müssen. Dennoch ist dieses Modell geeignet, wesentliche Prozesse nach akuter myokardialer Ischämie näher zu betrachten und mögliche Beeinflussungsmechanismen durch Chemokine aufzudecken [108][109].

Darüber hinaus wird aufgefallen sein, dass die Ergebnisse der mRNA Analysen des Zeitpunktes 6 Wochen nach Erstoperation nicht präsentiert wurden. Mechanismen, die die Infarktheilung wesentlich beeinflussen, laufen insbesondere während der ersten Woche post infarktem ab [19][20]. Sind das ischämische Gewebe verloren und das Granulationsgewebe gebildet, wird das erkrankte Areal durch eine akinetische Narbenregion ersetzt. Moleküle und Methoden, die den Verlust von funktionellem Gewebe verringern und die Heilung beschleunigen, könnten den Gesamtheilungsprozess positiv beeinflussen [17][18]. Aus diesem Grund konzentrierte die aktuelle Studie das Interesse auf die Frühphase nach MI. Davon entfernt sei erklärt, dass die Ergebnisse für alle analysierten mRNA Moleküle so präsentiert wurden, dass Unterschiede zwischen den Gruppen mit MI möglichst nachvollziehbar waren und Schlussfolgerungen dem Grundsatz der Eindeutigkeit folgten. Folglich blieben einzelne Ergebnisse zugunsten der Verständlichkeit der Gesamtarbeit unerwähnt.

Zuletzt sei ein sehr wichtiger Sachverhalt beschrieben. In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der mRNA Analysen von Tieren der Gruppe Sham nicht gezeigt. Zum einen führt dies zur Verbesserung der Übersichtlichkeit und zur Verdeutlichung der Unterschiede im Infarktgeschehen. Zum anderen ist die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen mit MI und Sham nur eingeschränkt gegeben. Sobald zwischen zwei zu untersuchenden Gruppen zwei oder mehr methodische Unterschiede bestehen, ist nicht mehr eindeutig nachzuvollziehen auf welchen methodischen Unterschied Ergebnisunterschiede zwischen den Gruppen beruhen. Die Gruppen Sham (kein MI; 0,9% NaCl Injektion) und MI-EPO (MI; EPO Injektion) unterschieden sich in zwei methodischen Variablen. Aus diesem Grund haben wir in Ergänzungsversuchen den Effekt der intramyokardialen Injektion zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Erstoperation in gesunden Ratten anhand des Moleküls TNF- α untersucht (s. Abb. 4.1). Es ist ersichtlich, dass sowohl die Kombination MI und intramyokardiale Injektion als auch die intramyokardiale Injektion isoliert zur de-novo Synthese TNF- α führen. Die intramyokardiale Injektion physiologischer Kochsalzlösung in der gesunden Ratte induziert demnach im Herzgewebe eine Entzündungsreaktion, dessen Auswirkungen noch nicht verstanden sind. An diesem Beispiel wird klar, dass die Ergebnisse der mRNA Analysen in MIC nicht eindeutig dem Infarktgeschehen zugeordnet werden können. Um die Wirkungen von EPO im Infarktgeschehen eindeutig interpretieren zu können, müssen die Ergebnisse aus der Gruppe MI-EPO allein mit den Ergebnissen in MIC verglichen werden, da sich diese Gruppen nur im Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein des EPO in der Injektion unterscheiden.

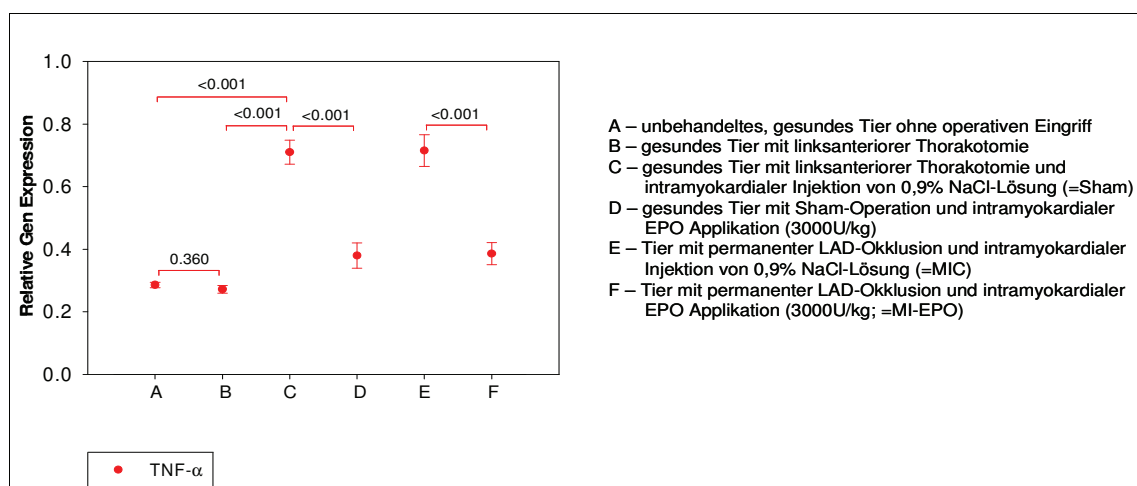


Abb. 4.1

Effekte der intramyokardialen Injektion und Auswirkungen auf die Vergleichbarkeit

4.8 Ausblick

Zahlreiche Studien verdeutlichen, dass die Myokardnekrose während der ersten 6 Stunden nach MI rapide fortschreitet [110][111] und eine schnelle Reperfusion innerhalb dieses engen Zeitfensters die frühe Mortalität signifikant zu senken vermag [112]. Die sofortige systemische Applikation von EPO innerhalb dieses therapeutischen Fensters reduziert die Infarktgröße und verbessert die Herzfunktion [113][114]. Erste klinische Studien der Phase II beginnen bereits unter Verwendung der systemischen Applikation von EPO nach akutem Koronarsyndrom. Daher könnten die transepikardiale intramyokardiale Injektion während einer Notfall-CABG Operation oder die transendokardiale intramyokardiale Administration während einer PTCA Intervention nach akutem MI optimale präklinische Experimente für die lokale EPO Therapie darstellen. Darüber hinaus könnte deren kardioregeneratives und zytoprotektives Potenzial vorteilhaft während oder nach kardiovaskulären chirurgischen Eingriffen sein, die mit entzündlicher oder ischämischer Myokardschädigung, mit Zeitintervallen unter Herzlungenmaschine oder mit Herzstillstand einhergehen. Davon entfernt könnten die Daten dieser Arbeit kontroverse Diskussionen über das Potenzial einer Revaskularisierung des Myokards in Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie mittels intramyokardialer EPO Therapie generieren.

Die frühe Rekanalisation der okkludierten Koronararterie mittels interventioneller PTCA und Stentimplantation oder operativer CABG bei Hauptstammstenose der linken Koronararterie, proximaler RIVA Stenose oder der symptomatischen Drei- und Zweigefäßerkrankung ist momentan die beste klinische Möglichkeit der Behandlung eines akuten MI. Die klinische Bedeutung dieser Studie steht in Beziehung zur Tatsache, dass effektive pharmakologische Agenten wie EPO, die während Koronarinterventionen oder Herzoperationen verabreicht werden könnten um Herzgewebe zu schützen und Stammzellen zu aktivieren, äußerst wünschenswert sind. Aus diesem Grund haben die Ergebnisse dieser Arbeit offensichtliche translationelle Ansatzpunkte für die interventionelle und operative Versorgung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom oder ischämischer Myokardschädigung.

5. Zusammenfassung

Aktuelle Berichte weisen darauf hin, dass EPO das Myokard vor ischämischer Schädigung beschützt und zur Induktion von kardialen Heilungsprozessen führt. Diese Studie untersuchte die therapeutische Effizienz einer einmaligen intramyokardialen EPO Injektion und die durch EPO vermittelten Prozesse, die zur Verbesserung der Herzfunktion nach akutem MI beitragen. In einem Ratten Modell konzentrierte sich das Interesse auf die Stammzellrekrutierung ins Herz, die intrakardiale Zellproliferation, das myokardiale Remodeling sowie die kardiale Protektion und Regeneration. Gleichzeitig wurden Nebenwirkungen, die infolge einer EPO Therapie auftreten können, kontrolliert.

Nach künstlicher Induktion eines permanenten MI erfolgte die transepikardiale intramyokardiale Applikation von EPO (3000 U/kg; Gruppe MI-EPO) oder physiologischer Kochsalzlösung (Gruppe MIC) entlang der Infarktgrenze. In einer Scheinoperation-Gruppe (Sham) wurde physiologische Kochsalzlösung gleichermaßen intramyokardial injiziert ohne Induktion eines MI. Die Katheterisierung (Conductance Catheter Method) des LV und RV sechs Wochen nach MI legte eine Verbesserung der LV Funktion und eine Senkung der RV Druckbelastung offen. Zum gleichen Zeitpunkt verdeutlichten makroskopische und mikroskopische Gewebeanalysen, dass die intramyokardiale EPO Therapie eine Verringerung der Infarktgröße, eine Erhöhung der Gefäßdichte, eine Senkung der Kardiomyozytenapoptose sowie die Begrenzung der myokardialen Hypertrophie und Fibrose verursachte. Der zur Dokumentation der physischen Aktivität herangezogene „Forced swim test“, adaptiert an die experimentellen Bedingungen, offenbarte eine Steigerung in der Intensität der Aktivität der EPO behandelten MI-geschädigten Tiere 24 Stunden und 6 Wochen nach MI.

Während der ersten zwei post-operativen Wochen wurden Blut- und Gewebeproben mittels verschiedener Methoden auf durch EPO induzierte pathophysiologische Mechanismen untersucht. Die RT-PCR Analyse zeigte eine intrakardiale Hochregulierung der Gene des zentralen Moleküls für Stammzellchemoattraktion SDF-1 und dessen Rezeptor CXCR4 24 Stunden nach MI. Die Gene der Stammzellmarker c-Kit sowie CD34 waren zeitlich vergleichbar induziert. Parallel konnte im Zusammenhang mit dieser Studie eine durch EPO provozierte vermehrte Anwesenheit von c-Kit⁺ und CD34⁺ Zellen im ischämischen Myokard detektiert werden.

Weiterhin zeigten sich früh sowohl eine intrakardiale Hochregulierung von Genen des Zellzyklus durch RT-PCR als auch eine deutliche Zunahme von proliferierenden kardialen Zellen im ischämischen Myokard durch Immunhistochemie. Letztere legte außerdem eine frühe Angiogenese im ischämischen Randbereich sieben Tage nach MI offen. Die intramyokardiale EPO Therapie unterstrich zudem das kardioprotektive Potenzial des Wachstumshormons. Die RT-PCR Untersuchungen zeigten intrakardiale Reduktionen von TNF- α und CD18 sowie Induktionen von eNOS und Akt. Blutuntersuchungen verdeutlichten einen verringerten Blutdruckabfall 48 Stunden nach MI sowie eine Senkung der Plasmakonzentration des Myokardschadenmarkers cTnT 14 Tage nach MI. Obwohl die Überlebensraten beider Gruppen mit MI keinen statistisch gesicherten Unterschied aufweisen, geben die erhaltene LV und RV Funktion in der EPO behandelten Gruppe Anlass zur Vermutung, dass in einem verlängerten Beobachtungsintervall die Langzeitmortalität des MI durch frühe lokale EPO Therapie infolge verringerten sekundären Herzversagens reduziert sein könnte.

Bei der RT-PCR Untersuchung von Molekülen mit Einfluss auf die zelluläre EPO Signalübertragung ergaben sich Hinweise darauf, dass EPO im Herz die Antagonisten der eigenen Signalkaskade (SOCS1, SOCS3) selbst hemmt und es in der Folge zur Hochregulierung des EPO-R kommt, wie in der Literatur häufig beschrieben. Letztlich konnte dargelegt werden, dass trotz hämatopoetischer Wirkung der lokalen hochdosierten EPO Therapie mit hohen Plasma-EPO Konzentrationen keine erkennbaren gesundheitsgefährdenden Nebenwirkungen (wie Thrombosen) in den analysierten Organen, Herz, Lunge, Leber, Niere, Gehirn und Milz, induziert wurden.

Die intramyokardiale Applikation von EPO verbessert demzufolge die myokardiale Funktion nach MI, was verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen zugeschrieben werden kann. Der verbesserten Rekrutierung von c-Kit⁺ und CD34⁺ Stammzellen ins ischämische Herzgewebe nach Mehrexpression von SDF-1 ist in dieser Arbeit besonderes Interesse gewidmet worden. Weitere Studien zu diesem Konzept werden aufzeigen, ob diese ermutigenden Ergebnisse in die klinische Anwendung umgesetzt werden können und ob das regenerative Potenzial von EPO in ischämisch geschädigtem menschlichem Myokard bestätigt werden kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Dorner T, Rieder A. Epidemiologie der koronaren Herzerkrankung und Bedeutung für die Prävention: *J Kardiol.* 2005;12:13-15.
2. Ren G, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:71-79.
3. Hao X, Silva EA, Månsson-Broberg A, Grinnemo KH, Siddiqui AJ, Dellgren G, Wårdell E, Brodin LA, Mooney DJ, Sylvén C. Angiogenetic effects of sequential release of VEGF-A165 and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2007;75:178-185.
4. Anversa P, Rota M, Urbanek K, Hosoda T, Sonnenblick EH, Leri A, Kajstura J, Bolli R. Myocardial aging—a stem cell problem. *Basic Res Cardiol.* 2005;100:482-293.
5. Richmond TD, Chohan M, Barbar DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol.* 2005;15:146-155.
6. Koury MJ. Erythropoietin: the story of hypoxia and a finely regulated hematopoietic hormone. *Exp Hematol.* 2005; 33:1263-1270.
7. Henry DH, Bowers P, Romano MT, Provenzano R. Epoetin alfa. Clinical evolution of a pleiotropic cytokine. *Arch Intern Med.* 2004;164:262-276.
8. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation.* 2002;106:2973-2979.
9. Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia Z, Li W, Xu J. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci.* 2006;78:2255-2264.
10. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:11612-11617.
11. Asaumi Y, Kagaya Y, Takeda M, Yamaguchi N, Tada H, Ito K, Ohta J, Shiroto T, Shirato K, Minegishi N, Shimokawa H. Protective role of endogenous erythropoietin system in nonhematopoietic cells against pressure overload-induced left ventricular dysfunction in mice. *Circulation.* 2007;115:2022-2032.
12. Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higushi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res.* 2006;71:684-694.

13. Van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:125-133.
14. Vandervelde S, van Luyn MJ, Tiu RA, Harmsen MC. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:363-376.
15. Van der Meer P, Voors AA, Lipsic E, Smilde TD, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Prognostic value of plasma erythropoietin on mortality in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:63-67.
16. Herold G. *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung.* Gerd Herold und Mitarbeiter. 2007
17. Virag JJ, Murry CE. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarction. *Am J Pathol.* 2003;163:2433-2440.
18. Miura T, Shizukuda Y, Ogawa S, Ishimoto R, Iimura O. Effects of early and later reperfusion on healing speed of experimental myocardial infarct. *Can J Cardiol.* 1991;7:146-154.
19. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002;53:31-47.
20. Frangogiannis NG, Entman ML. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med.* 2005;15:163-169.
21. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, Zeiher AM. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;29:2109-2114.
22. Yamaoka M, Yamaguchi S, Okuyama M, Tomoike H. Anti-inflammatory cytokine profile in human heart failure - behavior of interleukin 10 in association with tumor necrosis factor-alpha. *Jpn Circ J.* 1999;63:951-956.
23. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 2004;94:1543-1553.
24. Fortuno MA, Ravassa S, Fortuno A, Zalba G, Diez J. Cardiomyocyte Apoptotic Cell Death in Arterial Hypertension: Mechanism and Potential Management. *Hypertension.* 2001;38:1406-1412.
25. Kai H, Kuwahara F, Tokuda K, Imaizumi T. Diastolic Dysfunction in Hypertensive Hearts: Roles of Perivascular Inflammation and Reactive Myocardial Fibrosis. *Hypertens Res.* 2005;28:483-490.
26. Rossert J, Eckardt KU. Erythropoietin receptors: their role beyond erythropoiesis. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20:1025-1028.

27. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;15:4802-4806.
28. Nandagopal K, Dawson TM, Dawson VL. Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther*. 201;297:474-478.
29. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest*. 2003;112:999-1007.
30. Nishiya D, Omura T, Shimada K, Matsumoto R, Kusuyama T, Enomoto S, Iwao H, Takeushi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci*. 2006;101:31-39.
31. Tada H, Kagava Y, Takeda M, Ohta J, Asaumi Y, Satoh K, Ito K, Karibe A, Shirato K, Minegishi N, Shimokawa H. Endogenous erythropoietin system in non-hematopoietic lineage cells plays a protective role in myocardial ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Res*. 2006;71:466-477.
32. Kaygisiz Z, Erkasap N, Yazihan N, Sayar K, Ataoglu H, Oyar R, Ikizler M. Erythropoietin changes contractility, cAMP, and nitrite levels of isolated rat hearts, *The J Physiol Sci*. 2006;56:247-251.
33. Urao N, Okigaki M, Yamada H, Aadachi, Matsuno K, Matsui A, Matsunaga S, Tateishi, K, Nomura T, Takahashi T, Tatsumi T, Matsubara H. Erythropoietin-mobilized endothelial progenitors enhance reendothelialization via Akt-endothelial nitric oxide synthase activation and prevent neointimal hyperplasia. *Circ Res*. 2006;98:1405-1413.
34. Burger D, Lei M, Geoghegan-Morphet N, Lu X, Xenocostas A, Feng Q. Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc. Res*. 2006;72:51-59.
35. Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci*. 2006;11:818-829.
36. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407:242-248.
37. Shibata J, Hasegawa J, Siemens HJ, Wolber E, Dibbelt L, Li D, Katschinski DM, Fandrey J, Jelkmann W, Gassmann M, Wenger RH, Wagner KF. Hemostasis and coagulation at a hematocrit level of 0.85: functional consequences of erythrocytosis. *Blood*. 2003;101:4416-4422.
38. Fusté B, Diaz-Ricart M, Cases A, López-Pedret J, Ordinas A, Escolar G. Erythropoietin does not modify

- the prothrombotic effect induced by uremic media on endothelial cells. *Haematologica*. 2002;87:1006-1008.
39. Stasi R, Amadori S, Littlewood TJ, Terzoli E, Newland AC, Provan D. Management of cancer-related anemia with erythropoetic agents: doubts, certainties and concerns. *Oncologist*. 2005;10:539-554.
 40. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*. 2005;85:1373-1416.
 41. Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation*. 2006;113:1451-1463.
 42. Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005;45:321-325.
 43. Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanism: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*. 2005;23:879-894.
 44. Regula KM, Rzeszutek MJ, Baetz D, Seneviratne C, Kirshenbaum LA. Therapeutic opportunities for cell-cycle reentry and cardiac regeneration. *Cardiovasc. Res*. 2004;64:395-401.
 45. Richmond TD, Chohan M, Barbar DL. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol*. 2005;15:146-155.
 46. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J*. 2000;351:289-305.
 47. Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol*. 2004;85:233-248.
 48. Trine MR, Morgan WP. Influence of time of day on psychological responses to exercise. A review. *Sports Med*. 1995;20:328-337.
 49. Takagawa J, Zhang Y, Wong ML, Sievers RE, Kapasi NK, Wang Y, Yeghiazarians Y, Lee RJ, Grossman W, and Springer ML. Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area- and length-based approaches. *J Appl Physiol*. 2007;102:2104-2111.
 50. Dekker ALAJ, Barenbrug PJC, van der Veen FH, Roekaerts P, Mochtar B, Maesson JG. Pressure-volume loops in patients with aortic stenosis. *J Heart Valve Dis*. 2003;12:325-332.
 51. Møller JE, Hillis GS, Oh JK, Pellikka PA. Prognostic importance of secondary pulmonary hypertension after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2005;96:199-203.
 52. Vandervelde S, van Luyn MJ, Rozenbaum MH, Peterson AH, Tio RA, Harmsen MC. Stem cell related

- cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2007;73:783-793.
53. Schmidt RF, Thews G. *Physiologie des Menschen.* 26. Auflage. Springer Verlag. 1995;498-561.
 54. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. N Engl J Med.* 2000; 343:1139-1147.
 55. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie.* 8. Auflage. Springer Verlag. 2006
 56. Taniguchi S, Dai CH, Price JO, Krantz SB. Interferon gamma downregulates stem cell factor and erythropoietin receptors but not insulin-like growth factor-I receptors in human erythroid colony-forming cells. *Blood.* 1997;90:2244-2252.
 57. Jegalian AG, Wu H. Differential roles of SOCS family members in EPO-R Signal Transduction. *J Inteferon Cytokine Res.* 2002;22:853-860.
 58. Sasaki A, Yasukawa H, Shoda T, Kitamura T, Dikic I, Yoshimura A. CIS3/SOCS3 Suppresses EPO Signalling by binding the EPO Receptor and JAK2. *J Biol Chem.* 2000;275:29338-29347.
 59. Yoshimura A, Naka T, Masato K. SOCS proteins, cytokine signaling and immune regulation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:454-465.
 60. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci.* 2000;113:2813-2819.
 61. Klingmüller U, Lorenz U, Cantley LC, Neel BG, Lodish HF. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell.* 1995;80:729-738.
 62. Cohen J, Oren-Young L, Klingmuller U, Neumann D. Prtein tyrosine phosphatase 1B participates in the down-regulation of erythropoietin receptor signaling. *Biochem J.* 2004;377:517-524.
 63. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood.* 2005;105:600-608.
 64. Meyer L, Deau B, Forejtníková H, Duménil D, Margottin-Goguet F, Lacombe C, Mayeux P, Verdier F. beta-Trcp mediates ubiquitination and degradation of the erythropoietin receptor and controls cell proliferation. *Blood.* 2007;109:5215-5222.
 65. Ribeiro KC, Mattos EC, Werneck-de-castro JP, Ribiero VP, Costa-e-Sousa RH, Miranda A, Olivares EL, Farina M, Mill JG, Goldenberg JR, Masuda MO, de Carvalho AC. Ectopic ossification in the scar tissue of rats with myocardial infarction. *Cell Transplant.* 2006;15:389-397.
 66. Møller JE, Hillis GS, Oh JK, Pellikka PA. Prognostic importance of secondary pulmonary hypertension

- after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2005; 96:199-203.
67. Palazzuoli A, Silverberg DS, Iovine F, Calabrò A, Campagna MS, Gallotta M, Nuti R. Effects of beta-erythropoietin treatment on left ventricular remodeling, systolic function, and B-type natriuretic peptide levels in patients with the cardiorenal anemia syndrome. *Am Heart J.* 2007;154:645.
68. Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl).* 2005;177: 245-255.
69. Giacomuzzi SM, Riemer Y, Vigl A. Drei Jahre Substitutionserfahrung mit Buprenorphin (Subutex®): Das Substitutionsmodell der Universitätsklinik Innsbruck und Umstellung von hochdosiertem Methadon auf Buprenorphin (Subutex®). *Suchtmed.* 2002;4:267-268.
70. Gao E, Boucher M, Chuprun JK, Zhou RH, Eckhart AD, Koch WJ. Darbepoetin alfa, a long-acting erythropoietin analog, offers novel and delayed cardioprotection for the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293:60-68.
71. Prunier F, Pfister O, Hadri L, Liang L, Del Monte F, Liao R, Hajjar RJ. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292:522-529.
72. Besarab A, Bolton WK, Browne JK, Egrie JC, Nissenson AR, Okamoto DM, Schwab SJ, Goodkin DA. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N Engl J Med.* 1998; 339:584-590.
73. Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W, Kleine HD, Muller-Hilke B, Zhang L, Ladilov Y, Egger D, Steinhoff G. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res.* 2005;66:45-54.
74. Elmadbouh I, Haider H, Jiang S, Idris NM, Lu G, Ashraf M. Ex vivo delivered stromal cell-derived factor-1alpha promotes stem cell homing and induces angiomyogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42:792-803.
75. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation.* 2007; 115:3165-3172.
76. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA,

- Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003; 361:45-46.
77. Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia*. 2004; 18:29-40.
78. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-228.
79. Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res*. 2000;87:728-730.
80. Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2000;106:571-578.
81. Jaffredo T, Nottingham W, Liddiard K, Bollerot K, Pouget C, de Bruijn M. From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp Hematol*. 2005;33:1029-1040.
82. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3422-3427.
83. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-438.
84. Edelberg JM, Tang L, Hattori K, Lyden D, Rafii S. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res*. 2002;90:89-93.
85. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103:634-637.
86. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003;102:1340-1346.
87. Bahlmann FH, DeGroot K, Duckert T, Niemczyk E, Bahlmann E, Boehm SM, Haller H, Fliser D. Endothelial progenitor cell proliferation and differentiation is regulated by erythropoietin. *Kidney Int*.

- 2003;64:1648-1652.
88. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, Boehm SM, Menne J, Haller H, Fliser D. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004;103:921-926.
 89. George J, Goldstein E, Abashidze A, Wexler D, Hamed S, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, Roth A. Erythropoietin promotes endothelial progenitor cell proliferative and adhesive properties in a PI 3-kinase-dependent manner. *Cardiovasc Res*. 2005;68:299-306.
 90. Bouscary D, Pene F, Claessens YE, Muller O, Chrétien S, Fontenay-Roupie M, Gisselbrecht S, Mayeux P, Lacombe C. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood*. 2003;101:3436-3443.
 91. Kaminski A, Ma N, Donndorf P, Lindenblatt N, Feldmeier G, Ong LL, Furlani D, A Skrabal C, Liebold A, Vollmar B, Steinhoff G. Endothelial NOS is required for SDF-1alpha/CXCR4-mediated peripheral endothelial adhesion of c-kit(+) bone marrow stem cells. *Lab Invest*. 2008;88:58-69.
 92. Loyke HF. Hematological and blood pressure studies in the CCl4 treated rats. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1986;7:1-8.
 93. Lindenfeld J, Weil JV, Travis VL, Horwitz LD. Hemodynamic response to normovolemic polycythemia at rest and during exercise in dogs. *Circ Res*. 1985;56:793-800.
 94. Weiss BM, Atanassoff PG. Cyanotic congenital heart disease and pregnancy: natural selection, pulmonary hypertension, and anesthesia. *J Clin Anesth*. 1993;54:332-341.
 95. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ. Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004;279:20655-20662.
 96. Alvarez Arroyo MV, Castilla MA, Gonzalez Pacheco FR, Tan D, Riesco A, Casado S, Caramelo C. Role of vascular endothelial growth factor on erythropoietin-related endothelial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:1998-2004.
 97. Kupatt C, Hinkel R, von Brühl ML, Pohl T, Horstkotte J, Raake P, El Aouni C, Thein E, Dimmeler S, Feron O, Boekstegers P. Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1575-1584.
 98. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido SM, Liu C, Ruegg UT, Noguchi CT. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*. 2000;275:39754-39761.
 99. Stuckmann I, Lassar AB. Erythropoietin and retinoic acid signaling in the epicardium is required for

- cardiac myocyte proliferation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2002;67:45-48.
100. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development.* 1999;126:3597-3605.
101. Lapointe N, Tsoporis JN, Parker TG, Blais C Jr, Adam A, Rouleau D, Slaughter G, Clément R, Deschepper CE, Rouleau JL. Comparative effects of a vasopeptidase inhibitor vs. an angiotensin converting enzyme inhibitor on cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure. *Mol Cell Biochem.* 2003;254:235-245.
102. Soga M, Kamal FA, Watanabe K, Ma M, Palaniyandi S, Prakash P, Veeraveedu P, Mito S, Kunisaki M, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Effects of angiotensin II receptor blocker (candesartan) in daunorubicin-induced cardiomyopathic rats. *Int J Cardiol.* 2006;110:378-385.
103. Fedak PW, Verma S, Weisel RD, Li RK. Cardiac remodeling and failure: from molecules to man (Part I). *Cardiovasc Pathol.* 2005;14:1-11.
104. Agata J, Chao L, Chao J. Kallikrein gene delivery improves cardiac reserve and attenuates remodeling after myocardial infarction. *Hypertension.* 2002;40:653-659.
105. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 2001;21:9733-9743.
106. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114:763-776.
107. Dunlop EA, Maxwell AP, Lappin TR. Impaired downregulation following erythropoietin receptor activation in non-small cell lung carcinoma. *Stem Cells.* 2007;25:380-384.
108. Staab RJ, de Paul Lynch V, Lau-Cam C, Barletta M. Small animal model for myocardial infarction. *J Pharm Sci.* 1977;66:1483-1485.
109. Schwartz PJ. Do animal models have clinical value? *Am J Cardiol.* 1998;81:14D-20D.
110. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* 1977;56:786-794.
111. Hirayama A, Adachi T, Asada S, Mishima M, Nanto S, Kusuoka H, Yamamoto K, Matsumura Y, Hori M, Inoue M. Late reperfusion for acute myocardial infarction limits the dilatation of left ventricle without the reduction of infarct size. *Circulation.* 1993;88:2565-2574.
112. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM,

-
- Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001;7:430-436.
113. Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44:473-479.
114. Hirata A, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Wakeno M, Myoishi M, Tsukamoto O, Okada K, Koyama H, Komamura K, Takashima S, Shinozaki Y, Mori H, Shiraga M, Kitakaze M, Hori M. Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:176-184.

Anhang

Abkürzungen

A.	Arteria
AAR	Area at risk
abs.	absolut
ACE	Angiotensin converting enzyme
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATII	Angiotensin 2
ATP	Adenosinriphosphat
Bcl	B-cell lymphoma
bp	Base pairs
BxTxH	Breite x Tiefe x Höhe
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungweise
C1-C5	Komplementfaktoren
ca.	zirka
CABG	koronararterieller „Bypass Graft“
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ion
c-AMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
C(X)C	Cystein-(Aminosäure X)-Cystein
CD	Cluster of differentiation
Cdc2	Cell division cycle 2
CdK	Cyclin dependent Kinase
c-Kit	CD117 (siehe CD)
CK	Creatin kinase
CSC	Cardiac stem sells
cTnT	Kardiales Troponin-T
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Anhang

cDNA	Produkt der reversen Transkription
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
ERK	Extracellular signal regulated kinase
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietin Rezeptor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FasL	Fas Ligand
FKGO	Forschungslabor für kardialen Gewebe- und Organersatz
FOXO	Forkhead box class O
G-Phase	Gap Phase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GATA4	GATA-binding protein 4
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimlierende Faktor
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimlierender Faktor
HE	Hämalaun & Eosin G
HEA	Humorale Entzündungsantwort
HIF	Hypoxia inducible factor
Hkt	Hämatokrit
HPC	Hämatopoetische Progenitorzellen
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
HW/BW	Verhältnis Herzgewicht zum Körpergewicht
ICAM-1	Interstitial cell adhesion molecule-1
ICR	Interkostalraum
IFN	Interferon
I-kB	Inhibitor-kB
IL	Interleukin
IZ	Infarktzone
JAK	Janus Kinase
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Knochenmark
KMSC	Knochenmarksstammzellen
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1

Anhang

LT	Leukotrien
LV	Linker Ventrikel / linksventrikulär
LVW/BW	Verhältnis linksventrikuläres Gewicht zu Körpergewicht
M	molar
M.	Musculus
M-Phase	Mitose Phase
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MAP	Mitogen-activated protein
M-CSF	Macrophage-Colony stimulating factor
MCP-1	Monocyte chemoattractant factor-1
MDR1	Multidrug resistance gene 1
MEF2C	Myocyte enhancer factor 2C
MEK	MAP kinase ERK kinase
MI	Myokardinfarkt
MIC	Myokardinfarkt Kontroll-Gruppe
MI-EPO	Myokardinfarkt Erythropoietin-Gruppe
Min	Minute
Mm.	Musculi
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger – Ribonukleinsäure
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
NF-kB	Nuclear factor-kB
NIZ	Nichtinfarktzone
Nkx2.5	NK2 transcription factor related, locus 5
NO	Sickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphat buffered saline
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule - 1
PG	Prostaglandin
PI3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PTCA	Perkutane transluminare Koronarangioplastie
Ras	Reticular activating system

Anhang

rel.	Relative
Real-Time PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RIVA	Rhamus interventrikularis anterior
ROS	Reactive oxygen species
RTemp	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
RV	Rechter Ventrikel / rechtsventrikulär
RVW/BW	Verhältnis rechtsventrikuläres Gewicht zu Körpergewicht
s	Sekunde
s. Abb.	siehe Abbildung
s.c.	Subkutan
Sca-1	Stem cell antigen-1
SCF	Stem cell factor (löslicher Kit Ligand = sKitL)
SDF-1	Stromal cell derived factor 1
SEM	Standard error of mean (Standardfehler des Mittelwerts)
Sham	Scheinoperation-Gruppe
s.o.	siehe oben
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
S-Phase	Synthese Phase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TCSC	Tissue committed stem- and progenitor cells
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TNF-R	Tumor necrosis factor- Receptor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick endlabelling assay
u.a.	Unter anderem
UKR	Universitäts-Klinikum Rostock
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZEA	Zelluläre Entzündungsantwort

Ferner gelten die allgemeinen SI-Einheiten und die chemischen Elementsymbole.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlichst bei Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff für die Überlassung dieses äußerst interessanten Themas, die oft weitreichenden wissenschaftlichen Diskussionen, die immer währende Hilfestellung in wichtigen Entscheidungssituationen sowie im Besonderen für sein persönliches Interesse an der Förderung junger Studenten während ihrer akademischen Ausbildung.

Dr. phil. Nan Ma möchte ich danken für ihre Supervision, ihre Wertschätzung meiner Arbeit, für die langen und intensiven Diskussionen und für die Hilfe während des Veröffentlichungsprozesses unserer Arbeit.

Ralf Gäbel danke ich für die großartige Zusammenarbeit in diesem umfangreichen Gebiet, für die gegenseitige Dankbarkeit sowie für die Entstehung einer echten Freundschaft.

Ich danke weiter dem Klinik- sowie dem Laborteam, Dr. med. Murat Ugurlucan, Dr. med. Can Yerebakan, Dr. med. Alexander Kaminski, Dario Furlani, Dr. phil. Lee-Lee Ong, Dr. phil. Wenzhong Li, Stephanie Prietz, Weiwei Wang, Katrin Höfer und ganz besonders Margit Fritsche, der aus meiner Sicht besten medizinisch technischen Assistentin für das FKGO.

Desweiteren danke ich für die ausgezeichneten Zuarbeiten von Miriam Nickel, Daniela Kurzhals, Erik Pittermann, Sarah Bullert, Stefan Hinz und Jörg Kammrath.

Ein besonderer Dank gilt Dr. med. Klaus Wagner und seiner wissenschaftlichen Assistentin Ann Katrin Hellberg für ihr großes Engagement, das freundschaftliche Verhältnis und das Einbringen ihres Erfahrungsschatzes in wichtigen wissenschaftlichen Diskussionen sowie auf dem Gebiet der Immunhistochemie.

Großer Dank gebührt weiterhin Prof. Dr. med. Günther Kundt für seine exzellente Beratung und Qualitätssicherung in allen statistischen Belangen.

Dr. med. Ulf Titze und Prof. Dr. med. Horst Nitze danke ich für die aufschlussreiche Kooperation und die wertvollen Analysen pathologischer Kernuntersuchungen.

Dr. rer. nat. Christiana Zingler sowie dem Kollegium des Instituts für klinische Chemie danke ich für die stets währende Hilfsbereitschaft und die präzise, adäquate Bearbeitung hämatologischer sowie biochemischer Fragestellungen.

Prof. Dr. med. Matthias Peuster, Dr. rer. nat. Andreas Drynda, Nicole Deinet und Nicole Braun von der Arbeitsgruppe des Labors der Klinik für pediatriische Kardiologie gilt besonderer Dank für die Kooperation und die Bereitstellung valider methodischer Hardware.

Dr. phil. Yuri Ladilov danke ich für die exzellente Hilfe und Beratung beim sogenannten „Trouble-Shooting“ während Etablierung und Durchführung funktioneller Analysen.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 04.11.2008

Christian Klopsch

Curriculum vitae

Familienname: KLOPSCH
Vorname: Christian Robert
Geburtsdatum: 03.04.1983
Geburtsort: Neubrandenburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Stephan Karl Klopsch und Birgit Klopsch geb. Becker
Korrespondenz: Niklotstraße 2, 18057 Rostock, Deutschland
Telefon: +49 381 2068378
Mobil: +49 176 21069383
e-mail: christian.klopsch@med.uni-rostock.de



Schulbildung:

1989 - 1994 17. Grundschule Neubrandenburg
1994 - 2002 Sportgymnasium Neubrandenburg
07/2002 Abitur (1,1)

Zivildienst:

09/2002 - 06/2003 Steg Neubrandenburg e.V.

Krankenpflegedienst:

08/2003 Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg (Onkologie)
09/2003 Südstadt Klinikum Rostock (Kardiologie)
09/2004 Südstadt Klinikum Rostock (Gefäßzentrum)

Studium:

seit 10/2003 Medizinstudium an der Universität Rostock
08/2005 Abschluss des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung (1,5)

Famulaturen:

03/2007	Klinik für Herzchirurgie, Universität Rostock, Rostock
08/2007	Klinik für Herzchirurgie, Universität Rostock, Rostock
09/2007	Allgemeinmedizin, Frau Dr. med. Hillusch Lenz, praktische Ärztin für Sportmedizin / Chirotherapie, Rostock
03/2008	Universitäres Herzzentrum Hamburg, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg

Praktisches Jahr:

08/2008 – 12/2008	Chirurgische Universitätsklinik, Universität Rostock, Rostock
12/2008 – 04/2009	Klinik für Herzchirurgie, Universität Rostock, Rostock
04/2009 – 08/2009	Klinik für Innere Medizin, Südstadt Klinikum Rostock, Rostock

Promotion:

seit 11/2005	Forschungslabor für kardialen Gewebe- und Organersatz der Klinik für Herzchirurgie an der Universität Rostock, Thema: Die intrakardiale Wirkung von Erythropoietin nach künstlicher Induktion eines Myokardinfarkts im Rattenmodell
--------------	--

Arbeitsverhältnisse:

06/2006 - 12/2007,	wissenschaftlicher Assistent der Universität Rostock, <u>Aufgaben:</u>
seit 08/2008	<ul style="list-style-type: none">- künstliche Induktion eines Myokardinfarkts in Ratte und Maus- künstliche Induktion einer Lungenembolie in Ratten- künstliche Induktion einer Aorta descendens Stenose in Ratten- Aortoortale „Bypass Graft“ Operation in Kaninchen- „Conductance-Catheter“ Technik in Ratte, Maus, Kaninchen und Schaf (unter anderem on-line Herzfunktionsanalysen)- Intramyokardiale Injektionen in Ratte, Maus, Kaninchen und Schaf- Operationsdurchführung und -assistenz in Operationen am Schaf- <i>des weiteren:</i> Projektplanung, Modelletablierung, Gewebeanalysen, Auswertung, Präsentation und Publikationsarbeit

Referenzen:

Gustav STEINHOFF, Prof. Dr. med.
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Universität Rostock, Schillingalle 35, 18055 Rostock
Telefon: + 49 381 4946101

Nan MA, Dr. med. Dr. phil.
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Forschungslabor für kardialen Gewebe- und Organersatz
Universität Rostock, Schillingalle 69, 18055 Rostock
Telefon: + 49 381 4946105

Sonstiges:

- 03.04.2001 lizensierter Tennistrainer (Lizenz-Nummer: MV 107) des
Deutschen Tennisbunds
- 08/2001 Mannschaftskapitän der Juniorennationalmannschaft und
5 maliges Mannschaftsgold bei den Juniorenweltmeisterschaften
im Drachenboot in Philadelphia, USA
- Seit 01/2008 Mitgliedschaft in der Deutschen TransplantationsGesellschaft

Rostock, den 04.11.2008

Christian Klopsch

Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

1. Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, **Klopsch C**, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Mobius JM, Luzow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK, Steinhoff G: Bcl-2-engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells*. 2007; 25(8):2118-2127
2. Furlani D, **Klopsch C**, Gäbel R, Ugurlucan M, Pittermann E, Klee D, Wagner K, Li W, Wang W, Ong LL, Nizze H, Titze U, Lützwow K, Lendlein A, Steinhoff G, Ma N. Intracardiac erythropoietin injection reveals antiinflammatory potential and improved cardiac functions detected by forced swim test. *Transplant Proc*. 2008 May;40(4):962-966.

Kommentare:

1. Ugurlucan M, Furlani D, **Klopsch C**, Steinhoff G. eComment: left ventricular catheterization for pressure-volume loop measurements in small laboratory animals. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2008 Oct;7(5):927

Zur Veröffentlichung akzeptierte Originalarbeiten („im Druck“):

1. **Klopsch C***, Furlani D*, Gäbel R, Wagner K, Li W, Ugurlucan M, Kundt G, Zingler C, Titze U, Wang W, Ong LL, Pittermann E, Li RK, Ma N*, Steinhoff G*. Intracardiac injection of Erythropoietin induces stem cell recruitment and improves cardiac functions in a rat myocardial infarction model. *The Journal of Cellular and Molecular Medicine*
2. Furlani D*, Li W*, Pittermann E, **Klopsch C**, Wang L, Knopp A, Jungebluth P, Thedinga E, Havenstein C, Westien I, Ugurlucan M, Li RK, Ma N*, Steinhoff G*. A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart. *Cell Transplantation*

Originalarbeiten in „Review“-Prozessen:

1. Gäbel R*, **Klopsch C***, Furlani D*, Yerebakan C, Li W, Ugurlucan M, Ma N, Steinhoff G. Intramyocardial administration of Erythropoietin promotes early cardiac proliferation and restores cardiac performance after myocardial infarction in rats.
2. Yerebakan C, Sandica E, Prietz S, **Klopsch C**, Ugurlucan M, Kaminski A, Abdija S, Lorenzen B, Boltze J, Nitzsche B, Egger D, Barten M, Furlani D, Ma N, Vollmar B, Liebold A, Steinhoff G. Autologous umbilical cord blood mononuclear cell transplantation preserves right ventricular function in a novel model of chronic right ventricular volume overload.
3. Yerebakan C*, **Klopsch C***, Prietz S, Ugurlucan M, , Kaminski A, Lorenzen B, Boltze J, Vollmar B, Liebold A, Steinhoff G, Sandica E. Pressure-volume loops: feasible for the evaluation of right ventricular function in an experimental model of acute pulmonary regurgitation?

* Autoren trugen gleichermaßen zur Arbeit bei.

Vortrag Präsentationen:

1. Scientific Sessions 2007, American Heart Association, 4.-7. November 2007, Orlando, Florida, USA:
Klopsch C, Furlani D, Gäbel R, Wagner K, Wang W, Ong LL, Li W, Nizze H, Titze U, Lendlein A, Lützow K, Li RK, Ma N, Steinhoff G. Intracardiac injection of Epoetin- α upregulates stem cell chemoattractant gene expression in a rat myocardial infarction model.
2. 36. Rostocker Gespräche über kardiovaskuläre Funktion und Hypertonie, 9. Juni 2007, Rostock, Deutschland:
Klopsch C, Furlani D, Gäbel R, Wagner K, Wang W, Ong LL, Li W, Nizze H, Titze U, Peuster M, Steinhoff G, Ma N. Intramyokardiale Injektion von Epoetin- α beeinflusst den Heilungsprozess nach akutem Herzinfarkt in Ratten, verbessert Herzfunktion und verringert pulmonale Hypertension.

3. 16. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, 11.-13. Oktober 2007, Mainz, Deutschland:
Klopsch C, Furlani D, Gäbel R, Wagner K, Wang W, Ong LL, Li W, Nizze H, Titze U, Lendlein A, Lützow K, Li RK, Ma N, Steinhoff G. Intrakardiale Injektion von Epoetin- α induziert Hochregulierung von Genen chemoattraktiver Moleküle zur Rekrutierung von Stammzellen nach akutem Myokardinfarkt in Ratten.
4. 37. Rostocker Gespräche über kardiovaskuläre Funktion und Hypertonie, 31. Mai 2008, Rostock, Deutschland:
Gaebel R, **Klopsch C**, Furlani D, Li W, Ugurlucan M, Ong LL, Ma N, Steinhoff G. Intramyokardiale Erythropoietin-Injektion vermittelt die Rekrutierung von Stammzellen und regeneriert kardiale Funktionen nach Myokardinfarkt im Rattenmodell.
5. 22nd EACTS Annual Meeting, 13.-17. September 2008, Lissabon, Portugal:
Klopsch C, Furlani D, Gaebel R, Li W, Ugurlucan M, Ong LL, Ma N, Steinhoff G. Intramyocardial injection of Erythropoietin augments stem cell recruitment and restores cardiac functions in a rat myocardial infarction model.

Poster Präsentationen:

1. 2nd Congress of the German Society for Stem Cell Research, 4.-6. Oktober 2007, Würzburg, Deutschland:
Klopsch C, Furlani D, Gäbel R, Wagner K, Wang W, Ong LL, Li W, Nizze H, Titze U, Lendlein A, Lützow K, Li RK, Ma N, Steinhoff G. Stem cell chemoattractant gene expression was up-regulated by intramyocardial injection of Epoetin- α in a rat myocardial infarction model.
2. 18th Annual Meeting of the SSRCTS, 7.-9. Februar 2008, Geilo, Norwegen:
Klopsch C, Yerebakan C, Sandica E, Prietz S, Kaminski A, Urgulucan M, Steinhoff G. A novel experimental model on chronic right ventricular volume overload.
3. Scientific Sessions 2008, American Heart Association, 8.-12. November 2008, New Orleans, Louisiana, USA:
Gäbel R, **Klopsch C**, Furlani D, Li W, Yerebakan C, Wang W, Pittermann E, Drynda A, Lenz S, Li RK, Ma N, Steinhoff G. Intramyocardial administration of Erythropoietin promotes cell proliferation, induces early angiogenesis and attenuates cardiac remodeling.

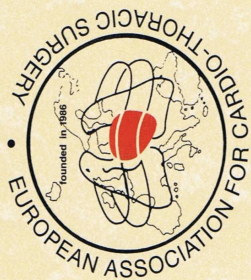
Preise:

1. EACTS Young Investigator Award (Bereich Erwachsenenherzchirurgie) am 16. September 2008 während des 22. Jahrestreffen der Europäischen Gesellschaft für Cardio-Thorax Chirurgie, Lissabon, Portugal
2. Travel-Award zur 16. Jahrestagung der Deutschen TransplantationsGesellschaft, 11.-13. Oktober 2007, Mainz, Deutschland

Sonstiges:

1. Einladung zur 5. Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizer Gesellschaften für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, 17.-20. Februar 2008, Innsbruck, Östereich

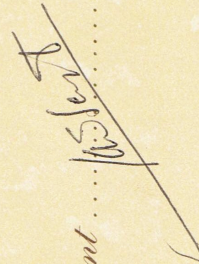
THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CARDIO-THORACIC SURGERY




By action of its Officers and Council certifies that

C. Klopsch
.....
has been awarded the Young Investigator's Award,

..... 16. September 2008

President




Secretary


Thesen

Untersuchungsziel der vorliegenden Arbeit ist die Bewertung der therapeutischen Effizienz sowie der lokalen Wirkungen und Chemokin-Interaktionen, die durch eine einzeitige lokale Applikation von EPO ins Infarkttherz induziert werden. Wir untersuchten insbesondere die Hypothese, ob EPO die Stammzellrekrutierung moduliert, die kardiale Proliferation induziert und zu einer Regeneration des Herzens nach MI beiträgt.

Der MI führt zu massivem Verlust von Funktionalität und Vitalität des Herzorgans. Eine positive Beeinflussung der pathologischen Prozesse um Nekrose, Apoptose, Fibrose, Entzündung und Remodeling kann zum Erhalt der Herzfunktion nach Ausheilung des Infarkts beitragen. Darüber hinaus können Angiogenese, Vaskulogenese, Proliferation und Stammzell-assoziierte Rekonstruktion von Herzgewebe die Organperformance zusätzlich verbessern.

Die Aufnahme von Druck-Volumen-Kurven durch Katheterisierung des LV und RV nach ausgeheiltem MI gibt detaillierte Auskunft über die systolische und diastolische Funktionalität des Herzens und eignet sich in besonderem Maße zur strengen Evaluierung der Effektivität von Myokardinfarkttherapien. Die lokale EPO Therapie nach MI hat gezeigt sowohl Kontraktilität und Elastizität des LV zu bewahren als auch die Druckbelastungen im RV zu minimieren.

Entfernt vom experimentellen Gebrauch sind kontroverse Diskussionen bzgl. der Effektivität und Sicherheit der systemischen Applikation von EPO aufgekommen. Die Kontrolle von für EPO typischen Nebenwirkungen durch Blutdruckmessung sowie biochemische und histologische Untersuchungen ergab keine Bestätigung zusätzlicher durch EPO induzierter pathologischer Ereignisse. Eher kann eine mögliche Reduktion von systemischen Nebenwirkungen bei erhaltener Wirkpotenz nach lokaler, einmaliger Gabe von EPO im Vergleich zur mehrmaligen, systemischen Gabe vermutet werden.

Die semi-quantitativen Untersuchungen der Genexpression mittels RT-PCR geben Aufschlüsse über wesentliche molekulare Prozesse im untersuchten Gewebe. Die lokale EPO Therapie zeigte eine Vielfalt von Beeinflussungen (kardioprotektive, entzündungshemmende, proliferative, angiogenetische, stammzell-chemoattraktive) auf pathophysiologische Kaskaden nach Induktion des MI.

Makroskopische und histologische Untersuchungen verdeutlichten terminierend den positiven Effekt von lokal appliziertem EPO auf Hypertrophie, Fibrose, Herzmuskelzellapoptose, Dekompensation, Infarktgröße und Gefäßdichte nach akutem MI.

Die Durchführung des „Forced swim tests“ zur Beurteilung der Aktivität der Tiere zu definierten Zeitpunkten nach Erstoperation legte offen, dass die Verbesserung der Funktionalität des Herzens in EPO behandelten Tieren mit einer Erhöhung der physischen Aktivität einherging.

