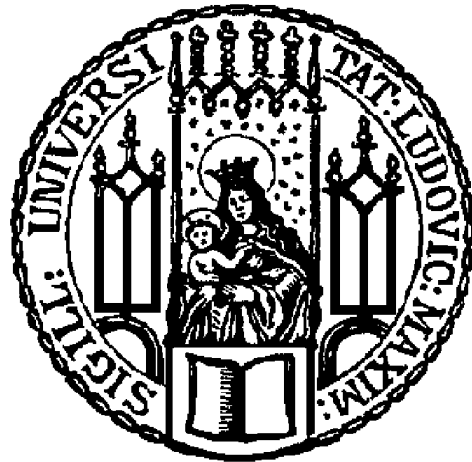

**Charakterisierung des kardioregenerativen Potenzials
adulter humaner endothelialer Progenitorzellen
vom Typ *ECFC* im Infarktmodell der *SCID/Beige*-Maus**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Marcus-André Deutsch

aus Dierdorf

2014

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern
Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Charakterisierung des kardioregenerativen Potenzials
adulter humaner endothelialer Progenitorzellen
vom Typ *ECFC* im Infarktmodell der *SCID/Beige*-Maus

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Marcus-André Deutsch
aus Dierdorf
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christian P. Sommerhoff

Priv.-Doz. Dr. med. Daniel Chappell

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:** Dr. med. Bruno Huber

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian F. Reiser; FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2014

Eidesstattliche Versicherung

Deutsch, Marcus-André

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Charakterisierung des kardioregenerativen Potenzials adulter humaner endothelialer Progenitorzellen vom Typ *ECFC* im Infarktmodell der *SCID/Beige-Maus*“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 13.06.2014

Marcus-André Deutsch

Meinen Eltern, meiner Frau Sabine und meinem Sohn Adrian Linus
in Liebe und Dankbarkeit

„Das Herz hat seine Gründe, die die Vernunft nicht kennt.“

Blaise Pascal (* 1623 - † 1662)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	11
I.1.	Ischämische Herzerkrankungen.....	11
I.1.1.	Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung.....	11
I.1.2.	Ätiopathogenese und Pathophysiologie.....	12
I.1.3.	Therapie und Prognose des Myokardinfarkt.....	15
I.2.	Stamm- und Progenitorzellen zur Therapie ischämischer Herzerkrankungen.....	16
I.2.1.	Rationale zur therapeutischen myokardialen Regeneration.....	16
I.2.2.	Stamm- und progenitorzellbasierte Therapien zur Myokardregeneration.....	17
I.2.3.	Pluripotente Stammzellen.....	19
I.2.3.1.	Embryonale Stammzellen.....	19
I.1.1.1.	Induzierbare pluripotente Stammzellen.....	20
I.1.2.	Zelluläre Reprogrammierung und induzierte Kardiomyozyten.....	20
I.1.3.	Adulte Stammzellen.....	21
I.1.3.1.	Mesenchymale Stammzellen.....	23
I.1.3.2.	Skelettmyoblasten.....	24
I.1.3.3.	Kardial-residente Stammzellen.....	24
I.3.	Endotheliale Progenitorzellen.....	28
I.3.1.	Überblick.....	28
I.3.2.	Definition, Ursprung und Klassifikation.....	30
I.3.3.	Isolation und Charakterisierung unterschiedlicher EPC-Populationen.....	32
I.3.4.	Relative Verteilung unterschiedlicher EPC-Populationen im Blut und im Knochenmark.....	38
I.3.5.	Einflussfaktoren auf die Zahl und Funktionalität von EPCs.....	39
I.3.6.	Einfluss eines Diabetes mellitus auf EPCs und die Endothelhomöostase.....	40
I.3.7.	Präklinische Studien mit EPCs.....	41
I.3.8.	Klinische Studien mit EPCs.....	42
I.4.	Fragestellung und Versuchsaufbau.....	45
II.	MATERIAL UND METHODEN	47
II.1.	Material.....	47
II.1.1.	Allgemeine Chemikalien, Lösungsmittel, Puffer, Medien und Enzyme.....	47
II.1.2.	Versuchstiere.....	48
II.1.3.	Utensilien und Instrumentarium für die operativen Prozeduren.....	48
II.1.4.	Pharmaka.....	48
II.1.5.	Antikörper.....	49
II.1.6.	Histochemische Färbelösungen.....	49
II.1.7.	Geräte und Utensilien anderer Funktion und Verwendung als oben erwähnt.....	49

II.1.8.	Hard- und Software.....	50
II.2.	Methoden.....	51
II.2.1.	Isolation CD34-positiver mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut und ECFC-Generierung.....	51
II.2.2.	Tierversuchsgenehmigung, Versuchstiere und Tierhaltung.....	53
II.2.3.	Chirurgische Infarktinduktion.....	54
II.2.3.1.	Grundlagen der murinen Koronaranatomie.....	54
II.2.3.2.	Anästhesie, Intubation und Narkoseüberwachung.....	55
II.2.3.3.	LAD-Ligation.....	57
II.2.4.	Linksherzkatheterisierung und hämodynamische Messungen.....	60
II.2.4.1.	Grundprinzipien der Conductance-Mikromanometrie.....	62
II.2.4.2.	Aufzeichnung und Messparameter.....	65
II.2.4.3.	Operative Prozedur zur Linksherzkatheterisierung.....	65
II.2.5.	Histomorphologie und Immunhistologie.....	67
II.2.5.1.	Euthanasie, Organentnahme und Anfertigung der histologischen Schnittpräparate.....	67
II.2.5.2.	Hämatoxylin/Eosin (HE).....	68
II.2.5.3.	Masson-Goldner-Trichromfärbung (MT).....	68
II.2.5.4.	Infarktgrößenbestimmung.....	69
II.2.5.5.	Bestimmung der linksventrikulären Wanddicken im Infarktgebiet.....	69
II.2.5.6.	Immunhistologische Zelldetektion.....	70
II.2.5.7.	Neovaskularisation in der Infarktgrenzzone.....	70
II.2.5.8.	Lichtmikroskopische Auswertung.....	71
II.2.6.	Durchflusszytometrie.....	71
II.2.6.1.	Vorbereitung der Myokardproben für die Durchflusszytometrie.....	73
II.2.7.	Statistische Analyse.....	75
III.	ERGEBNISSE.....	76
III.1.	Hämodynamische Funktionsmessungen.....	77
III.2.	Histomorphologie und Immunhistologie.....	78
III.2.1.	Infarktgröße.....	79
III.2.2.	Linksventrikuläre Vorderwand- und Septumdicke.....	79
III.3.	Neovaskularisation.....	82
III.4.	Retention transplantiertter Zellen nach intramyokardialer Injektion.....	84
III.5.	Durchflusszytometrie.....	84
III.5.1.	Myokardiales Homing myelomonozytärer Stammzellen.....	84
III.5.2.	Anzahl CD45-/CD34-/sca1+ bzw. c-kit + kardial-residenter Stammzellen.....	86
III.6.	Subgruppenanalyse: ECFCs von Patienten mit Diabetes mellitus versus ECFCs von Patienten ohne Diabetes mellitus.....	88

III.6.1. Hämodynamik	89
III.6.2. Histomorphologie und Immunhistologie.....	90
III.6.2.1. Infarktgröße.....	90
III.6.2.2. Linksventrikuläre Vorderwand- und Septumdicke.....	91
III.6.3. Neovaskularisation.....	92
III.6.4. Durchflusszytometrie.....	94
III.6.4.1. Myokardiales Homing myelomonozytärer Stammzellen	94
III.6.4.2. Anzahl CD45-/CD34-/sca1+ bzw. c-kit+ kardial-residenter Stammzellen	95
IV. DISKUSSION	96
IV.1. Retention transplantierte Zellen nach intramyokardialer Injektion.....	96
IV.2. Therapeutischer Effekt und Wirkmechanismen endothelialer Progenitorzellen: Parakrine Hypothese.....	98
IV.3. ECFC-spezifische parakrine Mechanismen	102
IV.4. Indirekte zelltherapeutische Stimulation Sca1+ kardial-residenter Stammzellen.....	105
IV.5. Einfluss eines Diabetes mellitus auf die therapeutischen Effekte und die Funktionalität der transplantierten Zellen.....	109
IV.6. Limitationen.....	111
IV.7. Ausblick.....	112
V. ZUSAMMENFASSUNG	114
V.1. Summary/Abstract.....	115
VI. LITERATURREFERENZEN.....	117
VII. DANKSAGUNG	133
VIII. LEBENS LAUF	135
VIII.1. Veröffentlichungen.....	135
IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	136
X. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	139

I. EINLEITUNG

I.1. Ischämische Herzerkrankungen

I.1.1. Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung

Die immense medizinische und sozioökonomische Bedeutung von ischämischen Herzerkrankungen leitet sich von deren Häufigkeit und deren schlechter Prognose ab. Insbesondere in den westlichen Industrienationen repräsentieren sie trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten die weitaus häufigste Todesursache [1, 2]. Hervorgehend aus der Todesursachenstatistik der Weltgesundheitsorganisation für das Jahr 2008 sind etwa 7,25 Millionen Sterbefälle (12,8% aller Todesfälle) weltweit ursächlich auf die Gruppe der ischämischen Herzerkrankungen und eine zugrundeliegende koronare Herzerkrankung (KHK) zurückzuführen [3]. Alleine in Deutschland wurden nach Angaben des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2010 insgesamt 128.275 Todesfälle, entsprechend 15% aller registrierten Todesfälle, durch eine chronisch-ischämische Herzerkrankung (72.734 Fälle/8,5%) bzw. einen akuten Myokardinfarkt (55.541 Fälle/6,5%) verursacht. Weitere 48.306/5,4% erlagen einer Herzinsuffizienz [4].

Aufgrund von Fortschritten in der Prävention, einer kontinuierlichen Verbesserung der interventionellen und kardiochirurgischen Revaskularisationsverfahren sowie einer Optimierung der medikamentösen Postinfarkttherapie konnte die infarktbedingte Primärsterblichkeit bei beiden Geschlechtern seit 1980 deutlich gesenkt werden (Männer:-50%; Frauen:-39%) [5]. Es ist damit zu rechnen, dass die Zahl der Patienten mit überlebtem Herzinfarkt und den daraus resultierenden Folgeerscheinungen (ischämische Kardiomyopathie und chronische Herzinsuffizienz) zunehmen wird. Darüber hinaus muss aufgrund der sich verändernden Altersstruktur der Gesellschaft und der gleichzeitigen, kontinuierlichen Zunahme der Lebenserwartung in den kommenden Jahren mit einer erheblichen Zunahme der Prävalenz und Inzidenz der chronischen, ischämiebedingten Herzinsuffizienz kalkuliert werden [6]. Einer Extrapolation zufolge ergibt sich für Mitbürger im Alter von 65 Jahren und älter eine Steigerung des prozentualen Anteils von Menschen mit manifester Herzinsuffizienz von 12,7% im Jahr 2000, auf 16,5% für das Jahr 2020 sowie eine weitere Erhöhung auf 20,5% im Jahr 2040 [7].

Die epidemiologische Bedeutung von Herzkreislaufleiden spiegelt sich auch in den Krankheitskosten wider: mehr als ein Siebtel der gesamten Ausgaben im deutschen Gesundheitswesen wurde im Jahr 2008 für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen aufgewendet (37 von insgesamt 246 Milliarden Euro). Davon entfielen 6,2 Milliarden Euro auf

ischämische Herzkrankheiten, 1,8 Milliarden Euro auf den akuten Myokardinfarkt sowie weitere 3,2 Milliarden Euro auf die Behandlung der Herzinsuffizienz [8].

Ischämische Herzerkrankungen haben damit weiterhin epidemischen Charakter und stellen eine große gesellschaftliche Herausforderung dar.

I.1.2. Ätiopathogenese und Pathophysiologie

Die Atherosklerose ist eine chronische Inflammation der Gefäßwand. Ihre kardialen Manifestationsformen sind die koronare Herzkrankheit mit ihren Komplikationen: akuter Myokardinfarkt (MI), ischämische Kardiomyopathie sowie chronische Herzinsuffizienz.

Die Entwicklung einer Koronarangiopathie ist ein multifaktorieller, progredienter, stadienhafter, chronisch-inflammatorischer Prozess, bei der es über initiale Endothelläsionen zu einer subendothelialen Lipidakkumulation, zu proliferativen Veränderungen der Gefäßwand und letztlich zu einer Bildung von atherosklerotischen Plaques mit Stenosierung des Koronarlumens kommt [9]. Das Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren (Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, genetische Prädisposition, Hyperhomocysteinämie u.a.) begünstigt eine initiale Schädigung des gefäßauskleidenden Endothels mit der Folge einer endothelialen Dysfunktion. Einzelne Risikofaktoren beeinflussen sich dabei wechselseitig mit z.T. überadditiven Effekten. Der Alteration der Oberflächenmoleküle und der Funktion des Gefäßendothels folgt eine Kaskade inflammatorisch-immunologischer Prozesse mit Steigerung von Adhäsivität und Permeabilität. Vermittelt durch die Expression von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Zytokinen kommt es zur Transmigration von zirkulierenden Monozyten und T-Lymphozyten aus der Blutbahn in die Intima und zu deren Aktivierung. Aktivierte Monozyten/Makrophagen akkumulieren modifiziertes LDL über den Scavenger-Rezeptor und wandeln sich zu sog. Schaumzellen um. Der weitere Verlauf ist charakterisiert durch intimale Proliferation von Fibroblasten und glattmuskulären Zellen. Langsam progrediente Veränderungen führen dabei zu einer protrahierten Reduktion des Gefäßlumens. Bei Verschluss oder kritischer hämodynamischer Relevanz kommt es zu einer koronaren Minderperfusion mit der Konsequenz eines unzureichenden myokardialen Sauerstoff- und Substratangebotes des Herzens [10-13].

Beim akuten MI kommt es entsprechend dem Versorgungsgebiet der okkludierten Koronararterie zur Ausbildung einer ischämiebedingten, myokardialen Koagulationsnekrose. Abhängig von den klinischen Begleitfaktoren, wie dem Vorhandensein einer Kollateralversorgung, einer ischämischen Präkonditionierung bei chronischer KHK oder transienten Reperfusionsepisoden entsteht eine irreversible Nekrose bereits nach etwa 20 Minuten andauernden Gefäßverschluss. Es resultiert primär eine Mischung aus irreversibler Nekrose und reversibler Schädigung

(„*stunned myocardium*“) [14]. Dauert die myokardiale Ischämie weiter an, folgt auch der Zelltod primär nur reversibel geschädigter Kardiomyozyten. Mit weiterer Fortdauer der Ischämie breitet sich die Nekrose von subendokardial nach epikardial aus und erlangt nach etwa 6 Stunden ihre Vollaussprägung (siehe **Abbildung 1A**).

Ischämie und Nekrose sind ein potenter Stimulus für die Expression proinflammatorischer Zytokine, die eine Rekrutierung inflammatorischer Zellen induzieren. Für TNF- α , IL-1 und IL-6 lässt sich eine stark ansteigende Expression bereits innerhalb der ersten Stunden konstatieren [17]. In den ersten Stunden nach einer Reperfusion infiltrieren mobilisierte mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark, allen voran neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, das infarzierte Myokard, welche zur proteolytischen Digestion und Phagozytose des infarzierten Gewebes beitragen (Abräumreaktion). Nach etwa 10 Tagen sinkt die Zahl der Leukozyten wieder und Granulationsgewebe entsteht. Die Formation eines vaskulären Netzwerkes beginnt im humanen Myokard bereits 3 Tage nach MI. Dieses kapilläre Netzwerk kann verschiedenen Ursprungs sein. Zum einen kann es durch endotheliale Zellsprossung aus benachbarten Kapillaren entstehen. Zum anderen trägt auch die endotheliale Differenzierung von mobilisierten Progenitorzellen des Knochenmarks mutmaßlich zur Gefäßneubildung bei. Die Ausweitung von benachbarten Kollateralgefäßen stellt eine weitere Möglichkeit zur Ausbildung eines vaskulären Netzwerkes im infarzierten Gebiet dar [18]. Einer Stimulation gefäßbildender Prozesse (Neoangiogenese) kommt daher erhebliche therapeutische Bedeutung zu. Dieser Prozess setzt sich zusammen mit einer steigenden Kollagenisierung der Infarktzone in den folgenden 4 - 6 Wochen fort. Nach etwa 6 Wochen ist die Infarktzone durch ein festes, zusammenhängendes Narbengewebe ersetzt [19].

Neben den akuten Veränderungen stellt sich eine ganze Serie von funktionellen, strukturellen sowie molekularpathologischen Alterationen ein, die in der Endstrecke in der Entwicklung einer ischämischen Kardiomyopathie und dem klinischen Bild einer Herzinsuffizienz münden. Unmittelbar nach Einsetzen der infarktassozierten, irreversiblen Myokardnekrose beginnen sich Struktur, Größe und Form des betroffenen Ventrikels zu verändern [19]. Die unter dem Begriff des chronischen Postinfarktremodelings zusammengefassten postischämischen myokardialen Umbauprozesse stellen eine pathophysiologische Adaptation zur Erhaltung einer normalen kardialen Funktion dar. Weitere entscheidende Pathomechanismen bei der Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz sind die Aktivierung neuroendokriner Systeme (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, Endothelin, Vasopressin, natriuretische Peptide ANP/BNP), eine vegetative Dysregulation (Sympathikusaktivierung, Katecholaminfreisetzung und Desensitivierung der β -Rezeptoren, Verminderung der inotropen Reserve) und die Aufregulation der Synthese proinflammatorischer, proapoptotischer und fibrosefördernder Zytokine. So sind

EINLEITUNG

unterschiedliche Mediatoren, wie neurohumorale Faktoren (Angiotensin II, Aldosteron, Endothelin I, Norepinephrin), Zytokine (Tumor Nekrose Faktor- (TNF-alpha), Interleukin-6 (IL-6)), Wachstumsfaktoren (*transforming growth factor* (TGF), *fibroblast growth factor* (FGF)) und Enzyme (z. B. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)) am kardialen Remodeling beteiligt [20-23].

Die genannten pathophysiologischen Gegenregulationsmechanismen bewirken eine Aufrechterhaltung des Schlagvolumens trotz abnehmender Ejektionsfraktion und damit eine temporäre Adaptation der Myokardfunktion an die peripheren Bedürfnisse. Die fortwährende Aktivierung dieser sich wechselseitig perpetuierenden Prozesse hat letztlich jedoch eine progrediente Ausschöpfung der kardialen Funktionsreserven zur Folge und trägt wesentlich zur Progredienz der ventrikulären Dysfunktion bei (Maladaptation und Dekompensation).

Abbildung 1B fasst die pathophysiologischen Veränderungen im Gefolge eines MIs bis hin zur Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz zusammen.

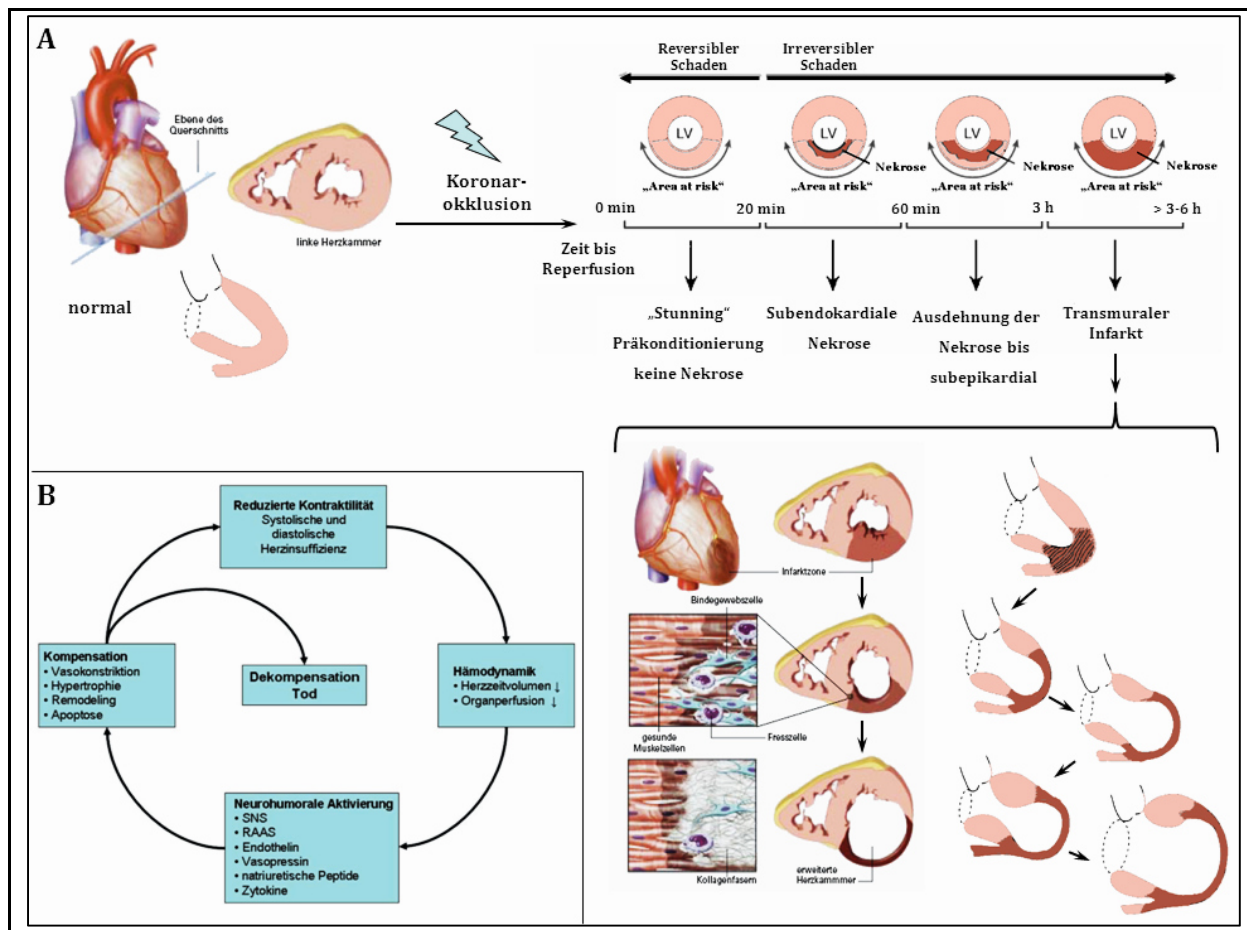


Abbildung 1 A. Pathophysiologie des akuten MIs und der ischämischen Kardiomyopathie. B. Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz. Modifiziert nach [15, 16, 23, 24] und [25].

I.1.3. Therapie und Prognose des Myokardinfarkt

Die primäre interventionelle Wiedereröffnung des Infarktgefäßes durch eine perkutane Koronarintervention ist neben der Lysetherapie die Therapie der Wahl beim akuten MI [26]. Interventionelle und operative Revaskularisationsmaßnahmen sowie Fortschritte in der medikamentösen Behandlung des MIs haben die Prognose quoad vitam und Lebensqualität der Patienten deutlich verbessert [27, 28]. Die aktuellen medikamentösen Therapiestrategien (Beta-Blocker, ACE-Hemmer, Diuretika, Digitalis-Präparate, AT1-Rezeptorantagonisten, Aldosteronantagonisten, Calciumsensitizer) zielen darauf ab, die genannten maladaptiven Pathomechanismen nach MI zu durchbrechen, eine Ökonomisierung der Herzarbeit herbeizuführen, das beschriebene myokardiale Remodeling in positiver Weise zu beeinflussen und damit letztlich der Entwicklung und Progredienz einer Herzinsuffizienz entgegenzuwirken [29-31]. Im Bereich der apparativen Therapieoptionen stehen als therapeutische Möglichkeiten die Implantation eines Cardioverter-Defibrillators (ICD), die kardiale Resynchronisationstherapie (CRT) sowie mechanische Herzunterstützungssysteme zur Verfügung [32-35].

Trotz optimierter Akutbehandlung entwickeln viele Patienten konsekutiv eine progrediente Herzinsuffizienz. Aktuelle Standardtherapien können die Progredienz der Erkrankung zwar verzögern, die Entwicklung einer progredienten Herzinsuffizienz, dessen Prognose außerordentlich ungünstig ist, letztlich jedoch nicht verhindern. Aktuelle Studien rechnen mit einer mittleren Überlebenszeit nach Diagnosestellung von 1,7 Jahren bei Männern und 3,2 Jahren bei Frauen. Die 5-Jahres-Mortalität nach Erstmanifestation einer Herzinsuffizienz liegt bei circa 50%, betrachtet man die Mortalität der Herzinsuffizienz im Endstadium liegt diese sogar bei jährlich 50% und damit beachtlicherweise höher als bei vielen malignen Tumorerkrankungen [7]. Die allogene, orthotope Herztransplantation ist die Therapie der Wahl bei Patienten mit terminaler und einer gegenüber konservativen Therapiemodalitäten refraktären Herzinsuffizienz. Trotz der inzwischen günstigen 1-, 5- und 10 Jahres-Überlebensraten von über 85%, 65% und 50% bleibt diese Option aufgrund der geringen Zahl von Organspendern nur einer sehr kleinen Gruppe von Patienten vorbehalten; in Deutschland sind dies 300 bis 400 Patienten pro Jahr. Limitiert wird das Verfahren vor allem durch den bestehenden Spenderorganmangel. Bei etwa 15.000 Patienten auf der Warteliste können derzeit nur etwa 3000 Organverpflanzungen vorgenommen werden [36]. In Deutschland standen Ende des Jahres 2005 755 noch für eine Herztransplantation gelisteten Patienten nur 396 im Jahresverlauf durchgeführten Organübertragungen gegenüber, gleichzeitig wurden im selben Zeitraum 793 Neuanmeldungen registriert. Die Chance noch auf der Warteliste zu versterben lag im Zeitraum 2001-2009 bei 18,9% [37]. Die Zahl der Patienten auf der Eurotransplant-Warteliste für Herztransplantationen hat sich zwischen 2001 und 2007 mehr als verdoppelt (2001: 424; 2007: 959), während die Zahl

der durchgeführten Organtransplantationen zurückgegangen ist (2001: 596; 2007: 577) [38]. Die Entwicklung einer chronischen Transplantatabstoßung, die sich in Form einer diffusen Koronarvaskulopathie manifestiert, sowie unerwünschte Nebenwirkungen der lebenslang erforderlichen Immunsuppression (Infektionen, Niereninsuffizienz, Tumorerkrankungen, u.a.) stellen weitere Limitationen dar [36, 39].

Aus genannten Gründen kommt der Erforschung alternativer Behandlungsoptionen eine große Bedeutung zu.

I.2. Stamm- und Progenitorzellen zur Therapie ischämischer Herzerkrankungen

I.2.1. Rationale zur therapeutischen myokardialen Regeneration

Obwohl sich sehr frühe Berichte über eine mögliche endogene, myokardiale Regenerationskapazität des Herzens in der Literatur finden [40-42], galt bis unlängst das traditionelle Konzept, das Herzen sei ein Organ ohne intrinsisches Regenerationspotenzial: Demnach sind adulte Kardiomyozyten ausnahmslos terminal differenzierte, postmitotische Zellen; die einzige Antwort des Myokards auf einen erhöhten Funktionsbedarf ist die Hypertrophie. Neuere Arbeiten, die belegen, dass der Herzmuskel unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen einem ständigen Umbau- und Regenerationsprozess unterliegt, haben zu einem grundlegenden Paradigmenwechsel geführt [43-51]. Unmittelbar postnatal scheint bei Säugetieren eine regenerative Antwort auf einen Myokardschaden noch ausgeprägter zu sein, sie nimmt jedoch äußerst rasch mit zunehmendem Alter ab [52, 53]. Eine Studie jüngeren Datums zeigt, dass die Erneuerungsrate von Herzmuskelzellen im Erwachsenenalter durch intrinsische (endogene) Stammzellen (im Lebensalter von 20 Jahren) etwa 1% pro Jahr beträgt und altersabhängig abnimmt. Im Alter von 75 Jahren liegt sie immerhin noch bei 0,4%. Dementsprechend wären im Alter von 50 Jahren rund 50% aller Herzmuskelzellen bereits physiologisch erneuert [51]. Eine andere Studie berichtet sogar von einer weitaus höheren endogenen Regenerationskapazität [46]. Die genauen Mechanismen intrinsischer Regenerationsmechanismen sind jedoch nicht geklärt. Auf der anderen Seite konnten nach Transplantation weiblicher Spenderherzen in männliche Empfänger zwischen 0,02 und 2% Y-Chromosom-positive Kardiomyozyten im transplantierten Organ detektiert werden, was als ein weiterer Beleg für eine Beteiligung auch extrakardialer Stammzellen an einer physiologischen Regeneration des Herzens gilt [54-58].

Die Tatsache, dass ein physiologischer Zellumsatz im Herzen stattfindet ist also mittlerweile weniger strittig diskutiert als die Frage, in welchem Ausmaß und unter welchen pathologischen

Bedingungen eine endogene Regeneration auftritt. Die mitotische Kapazität des adulten, humanen Myokards liegt bei etwa 0,015% im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz, im Rahmen eines Herzinfarktes bei etwa 0,08% [59]. Somit steht fest, dass das Herz im Gegensatz zu anderen Organen – wie Haut, Leber, Darm oder Skelettmuskel - eine nur limitierte intrinsische Kapazität aufweist, auf einen vorangegangenen Schaden mit einer suffizienten Geweberegeneration zu reagieren. Nur einigen niederen Vertebraten (z.B. Zebrafisch und Molch) ist die Fähigkeit zu einer zeitlebenden, signifikanten myokardialen Regeneration vorbehalten [60-63]. Das adulte, menschliche Herz ist mit seiner physiologischerweise vorhandenen Regenerationskapazität nicht in der Lage, den mit einem MI assoziierten massiven, myokardialen Zelluntergang und den damit einhergehenden Verlust an kontraktiver Herzmuskelmasse zu kompensieren. Ein Rechenexempel zur Verdeutlichung: Der linke Ventrikel wiegt etwa 200g und setzt sich aus annähernd 4 Milliarden Kardiomyozyten zusammen. Der infarktbedingte Untergang von etwa 25% Myokardsubstanz führt langfristig zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz, bei mehr als 40% Verlust kontraktiver Myozyten kommt es zumeist bereits akut zur Symptomatik eines kardiogenen Schocks, welcher häufig bereits initial letal verläuft. Für eine adäquate Regeneration müssten demnach also etwa 1 Milliarde Kardiomyozyten regeneriert bzw. substituiert werden [64].

I.2.2. Stamm- und progenitorzellbasierte Therapien zur Myokardregeneration

Das Konzept, stamm- und progenitorzellbasierte Therapieansätze zur Restitution des myokardinfarktassoziierten Gewebeverlustes bei akuter bzw. chronisch-ischämischer Kardiomyopathie zur Wiederherstellung der Myokardfunktion einzusetzen, stellt damit einen logischen, weil kausalen Ansatz dar [65]. Für eine myokardiale Regeneration sind verschiedene Konzepte tierexperimentell und zum Teil auch bereits in ersten klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit hin überprüft worden:

1. Die Transplantation von Stammzellen mit kardiogenem und/oder vaskulärem Differenzierungspotential [65-67].
2. Transplantation von in-vitro generierten Gewebekonstrukten („*tissue engineering*“)[68].
3. Die Reaktivierung und Mobilisierung endogener, knochenmarkständiger respektive kardial-residenter Stammzellpopulationen mit kardiomyogenem und vaskulärem Differenzierungspotenzial [47, 69-72].
4. Neben einer tatsächlichen stammzellbasierten Regeneration beschäftigen sich pharmakotherapeutische Konzepte mit einer Stimulation kardioprotektiver, proangiogenetischer und antiapoptotischer Mechanismen durch Zytokinapplikation [73, 74].
5. Die Reaktivierung der Zellzyklusaktivität von Kardiomyozyten [75, 76].

In tierexperimentellen und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass applizierte Stamm- und Progenitorzellen regenerative und protektive Effekte auf geschädigtes Myokardgewebe ausüben, die Pumpfunktion verbessern und das pathologische Postinfarktremodelling positiv beeinflussen [60, 77]. In den zurückliegenden Jahren wurden Skelettmyoblasten, hämatopoetische, mesenchymale Stammzellen (MSCs), mononukleäre Zellpopulationen aus dem Knochenmark, kardial-residente Stammzellpopulationen sowie die endothelialen Progenitorzellen (EPCs) für die Behandlung der infarktassoziierten ischämischen Kardiomyopathie im Hinblick auf ihr kardiomyoregeneratives Potenzial hin evaluiert. Bislang exklusiv präklinisch in Tiermodellen wurden die embryonalen und induzierbaren pluripotenten Stammzellen untersucht (siehe **Abbildung 2**). Ein neuer, alternativer und sehr vielversprechender Ansatz wird mit der direkten kardiomyozytären Reprogrammierung von infarktnarbenständigen Fibroblasten zu sog. induzierten Kardiomyozyten verfolgt [78-80]. Alle genannten Zelltypen zeichnen sich durch unterschiedliche und spezifische Isolations- und Kulturbedingungen, Oberflächenmarker, Genexpressionsprofile, Differenzierungsverhalten und letztlich unterschiedliches regeneratives Potenzial aus. Ein anderer, stammzellmediierter Mechanismus besteht in der Protektion oder Rekrutierung der nach MI noch vitalen, allerdings dysfunktionellen Kardiomyozyten, beispielsweise durch die Applikation von Zytokinen oder die Stimulation von Angio- und Vaskulogenese.

Während zunächst eine kardiomyozytäre Transdifferenzierung von mononukleären Stammzellen des Blutes und des Knochenmarks nach intramyokardialer Applikation postuliert wurde [82, 83] zeigten mehrere spätere Studien, dass eine kardiomyozytäre Transdifferenzierung der Zellen wohl nicht für die positiven Effekte auf die kardiale Pumpfunktion und das kardiale Remodelling verantwortlich ist [84, 85]. Mittlerweile gilt als akzeptiert, dass in erster Linie parakrine Effekte für die Wirkungsweise adulter Stammzellen verantwortlich sind, welche mit einer Verbesserung der myokardialen Neovaskularisation, einer Inhibition der Apoptose ischämischer Kardiomyozyten sowie einer Steigerung der endogenen Reparaturkapazität über eine Stimulation kardial-residenter Stammzellpopulationen assoziiert sind [86]. Trotz einer Vielzahl von Studien sind die genauen Mechanismen zur Wirkungsweise von transplantierten Zellen ins infarzierte Myokard noch in vielen Belangen ungeklärt.

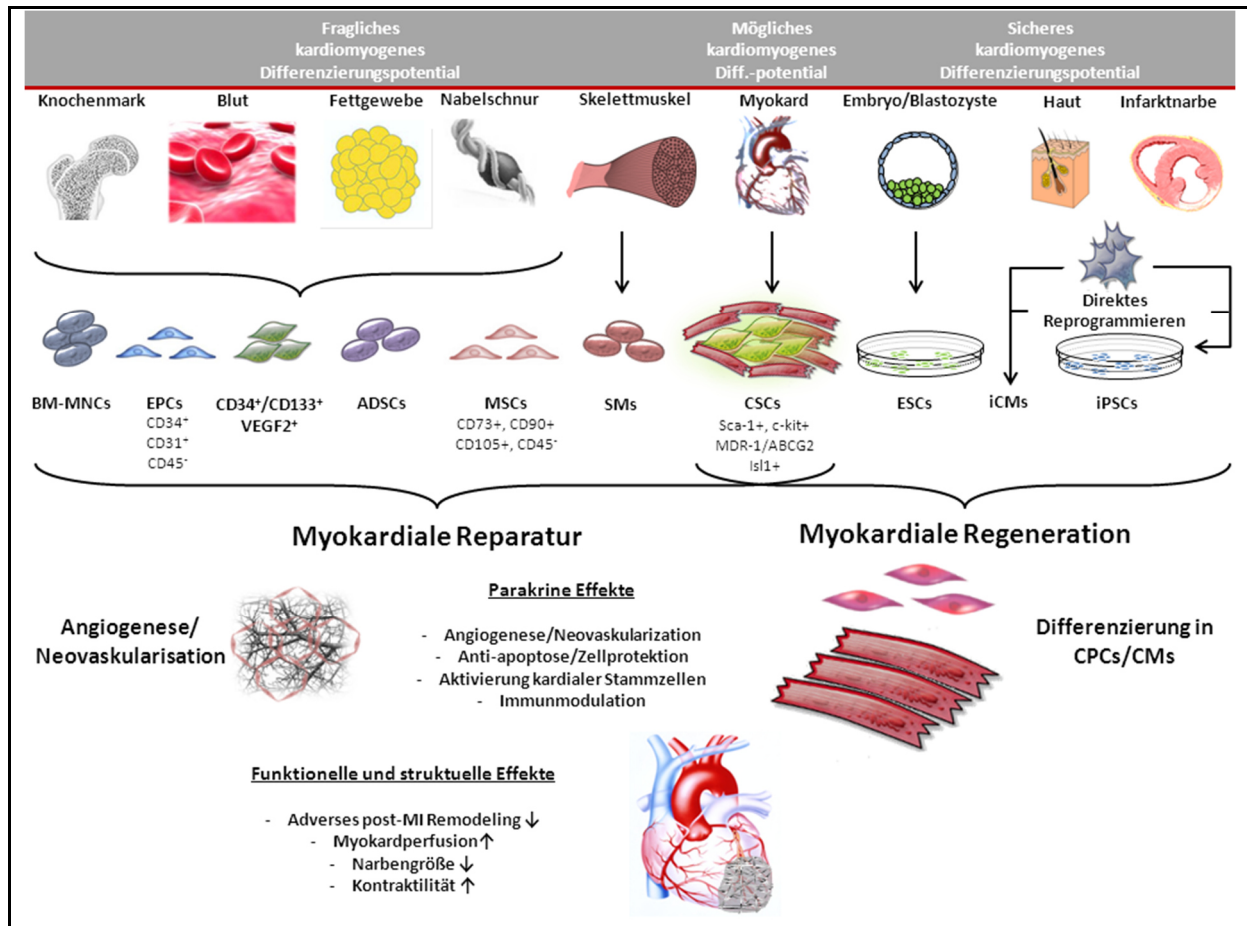


Abbildung 2 Übersicht über die verschiedenen Strategien der zellbasierten kardialen Regeneration und die mutmaßlichen Effekte der unterschiedlichen Stamm- und Progenitorzellpopulationen auf das (post-)ischämische Myokard. Modifiziert nach [81].

I.2.3. Pluripotente Stammzellen

I.2.3.1. Embryonale Stammzellen

Die Isolation embryonaler Stammzellen (ESCs) erfolgt nach Befruchtung der Eizelle aus der sog. inneren Zellmasse (auch Embryoblast genannt) von frühen Präimplantationsembryonen im Blastozystenstadium. ESCs zeichnen sich durch eine Reihe spezifischer Eigenschaften aus, welche sie für die regenerativen Therapieansatz attraktiv machen würden. ESCs sind aufgrund ihrer Eigenschaft der Pluripotenz in vivo und in vitro in der Lage, in Zellen aller drei Keimblätter - Ento-, Ekto- und Mesoderm - sowie in Zellen der Keimbahn und somit in alle der etwa 210 im Körper vorkommenden Zelltypen zu differenzieren [87-89].

Funktionelle, ultrastrukturelle, immunphänotypische Untersuchungen sowie die Analyse des Expressionsprofils unterschiedlicher kardialer Transkriptionsfaktoren (Nkx2.5, GATA-4, MEF2c, Tbx5 und Tbx20) und sarkomerer Strukturproteine (Troponin T, alpha-MHC, Cx43) zeigen eindeutig, dass sich aus ESCs funktionelle Kardiomyozyten für eine Zellersatztherapie gewinnen lassen [90-96]. Im Tiermodell konnte ein therapeutischer Nutzen bereits demonstriert werden,

wonach die transplantierten ESCs kardiomyozytär mit entsprechenden funktionellen Eigenschaften differenzierten und eine Verbesserung der kardialen Pumpleistung bewirkten [97-99]. Ein therapeutischer Einsatz von ESCs zur Regeneration geschädigten Gewebes beim Menschen ist jedoch aufgrund ethisch-rechtlicher, aber auch methodisch-technischer Limitationen in den nächsten Jahren eher fragwürdig [100-106].

I.1.1.1. Induzierbare pluripotente Stammzellen

Ein jüngst entdeckter Zelltypus könnte eine Alternative zu den ESCs repräsentieren, bei dem über die individuelle Gewinnung patienteneigener Zelllinien einige der für ESCs geltenden Bedenken überwinden ließen.

Im Jahre 2006 konnte durch Takahashi und Yamanaka gezeigt werden, dass durch die konstitutive Überexpression der vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, c-myc sowie Klf4 aus murinen embryonalen und adulten Fibroblasten sog. induzierbare pluripotente Stammzellen (iPSCs) generiert werden können. iPSCs entsprechen dabei in Morphologie, dem stadienspezifischen Genexpressionsprofil und im Differenzierungsverhalten dem embryonalen Stammzelltypus. Nach Injektion von iPSCs in immundefiziente Mäuse entstehen Teratome, d.h. Tumore mit Anteilen aller drei embryonalen Keimblätter: Endo-, Meso- und Ektoderm. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich nach Injektion in murine Blastozysten chimäre Tiere entwickeln. Beide Versuche gelten als Beweis für die Eigenschaft der Pluripotenz [107]. Ein weiteres Jahr später reüssierten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander mit der Reprogrammierung humaner Zelllinien. Inzwischen sind unterschiedlichste Ausgangszellpopulationen erfolgreich für die zelluläre Reprogrammierung und Generierung von iPSCs herangezogen worden [108-110].

Aus iPSCs lassen sich funktionell kompetente Kardiomyozyten und Endothelzellen gewinnen [111-113]. MacLellan und Kollegen zeigten, dass murine iPSCs nach Blastozysteninjektion einen kardialen Phänotyp entwickeln. Dabei exprimieren diese sarkomere Proteine wie MHC und Troponin C sowie kardiale Transkriptionsfaktoren wie Nkx2.5, GATA-4, MEF2c sowie ANP und MLC2v [114]. Im Tiermodell lässt sich nach Transplantation der Zellen in infarziertes Myokard eine Pumpfunktionsverbesserung nachweisen [115, 116].

I.1.2. Zelluläre Reprogrammierung und induzierte Kardiomyozyten

Die vor über 25 Jahren von Davis et al. aus der Arbeitsgruppe um Harold Weintraub gemachte Entdeckung, dass eine forcierte Überexpression des Schlüsselregulatorgens MyoD eine Konversion von Fibroblasten in Skelettmuskelzellen zu induzieren vermag, transformierte das Feld der Zell- und Entwicklungsbiologie grundlegend und bildete das Fundament für die heutigen Strategien der zellulären Reprogrammierung [117].

Zwischenzeitlich ist es gelungen, die zelluläre Identität unterschiedlicher Ausgangszellpopulationen durch die forcierte, ektopische Überexpression entsprechender Faktoren ohne den Umweg eines quasi-embryonalen Entwicklungszustand in die gewünschten differenzierten Zielzelltypen, darunter hämatopoetische Zelllinien, endokrine, pankreatische beta-Zellen oder Neuronen, zu verändern (direkte zelluläre Reprogrammierung). Die Möglichkeit der Generierung gewünschter Zellpopulationen durch die Methode des direkten zellulären Reprogrammierens stellt somit einen vielversprechenden Ansatz zur Entwicklung neuer Therapieoptionen in der regenerativen Medizin dar [118]. Der Transfer des Konzeptes der direkten Reprogrammierung zur Generierung funktioneller Kardiomyozyten galt trotz intensiver Bemühungen bis vor kurzem als nicht realisierbar. Jedoch demonstrierten Ieda et al., dass durch eine retroviral vermittelte Überexpression einer Kombination von kardiogenen Transkriptionsfaktoren eine kardiomyozytäre Konversion von neonatalen und adulten Fibroblasten kardialen bzw. dermalen Ursprungs erreicht werden kann [79]. Mit Hilfe eines kardiomyozytenspezifischen alpha-MHC-GFP-Reportersystems wurden 14 ausgewählte kardiogene Faktoren auf ihr reportertransaktivierendes Potenzial getestet. Von allen Kandidatengen war bekannt, dass sie im Rahmen der Kardiogenese eine tragende Rolle spielen. Dabei stellte sich die Kombination der Transkriptionsfaktoren GATA4, Mef2c und Tbx5 (GMT) als die effizienteste heraus. Die so gewonnenen induzierten Kardiomyozyten bzw. kardiomyozytenähnlichen Zellen wiesen dabei ein zu adulten Kardiomyozyten vergleichbares globales Expressionsprofil auf. Bis zu 30% der induzierten Kardiomyozyten zeigten spontane Ca²⁺-Oszillationen. Jedoch nur ein kleiner Prozentsatz der induzierten Zellen kardialen Ursprungs zeigte nach etwa 4-5 Wochen spontane Kontraktionen. Weitere Arbeiten folgten, die von unterschiedlichen Konversionsraten berichten [79, 80, 119-121].

Das direkte kardiomyozytäre Reprogrammieren stellt somit eine attraktive und vielversprechende Strategie für die Entwicklung kardial-regenerativer Therapieansätze dar und könnte die ethischen, immunologischen sowie sicherheitsrelevanten Bedenken im Kontext von embryonalen und induzierbaren pluripotenten Stammzellen umgehbar machen. Die Ergebnisse mehrerer Studien verdeutlichen jedoch die technischen Herausforderungen des kardiomyozytären Reprogrammierens und unterstreichen die Einflüsse, die sich aus der Wahl des Reportersystems, der Faktorenwahl und der Wahl der Ausgangszellpopulation sowie des Reprogrammierungsansatzes (in-vitro vs. in-vivo) ergeben [122-124].

I.1.3. Adulte Stammzellen

Im adulten Organismus existieren Stammzellen, die für einen kontinuierlichen Zellumsatz bzw. eine posttraumatische Regeneration bestimmter Gewebe Sorge tragen. Durch ihre Fähigkeit zur

Selbst-Erneuerung („*self-renewal*“) und zur Differenzierung in spezialisierte Zellen erhalten adulte Stammzellen die Funktionsfähigkeit von Geweben und Organen aufrecht, indem sie die spezialisierten Zellen des Gewebes bilden und beschädigte oder abgestorbene Zellen substituieren [125]. Vornehmlich lassen sie sich in Geweben mit hohem Zellumsatz finden, wie z.B. in den Krypten des Darmepithels, im Knochenmark und in der Haut. Vorteile für eine mögliche therapeutische Applikation von adulten Stammzellen ergeben sich aufgrund ihres autologen Charakters, der damit einhergehenden Vorteile in der Gewinnung sowie ihrer ethischen Unbedenklichkeit gegenüber den pluripotenten Stammzellen. Besondere Bedeutung haben die seit Jahrzehnten bekannten und in der klinischen Praxis erfolgreich eingesetzten Stammzellen des Knochenmarks. Die Existenz von multipotenten adulten Stammzellen für die Blutbildung, den hämatopoetischen Stammzellen, wurde erstmalig durch Alexander Maximov im Jahre 1906 beschrieben [126]. Das Knochenmark gilt mittlerweile als das wohl am besten charakterisierte Reservoir für adulte Stammzellen, die bereits seit mehr als 25 Jahren für die autologe und allogene Knochenmarktransplantation bei hämatologischen Erkrankungen genutzt werden. Hämatopoetische Stammzellen, die in der Lage sind, das blutbildende System von Grund auf zu regenerieren, sind seit den 60er Jahren besser charakterisiert [127, 128]. Im Jahre 1963 beschrieb eine Gruppe um Till und McCulloch erstmals die Existenz klonogener Knochenmarkstammzellen, die nach Transplantation zur Bildung hämatopoetischer Kolonien in der Milz beigetragen hatten. Dabei hatten diese Zellen das Potential zur Selbsterneuerung sowie zur multilinearen Differenzierung [129, 130]. Während der letzten Jahre wurde in zahlreichen Arbeiten berichtet, dass sich adulte Stammzellen unter bestimmten Bedingungen auch in Zelltypen anderer Gewebe entwickeln könnten. Diese mögliche Flexibilität im Entwicklungspotenzial wurde als „Plastizität“ oder „Transdifferenzierungsfähigkeit“ bezeichnet. Im Allgemeinen wird „Plastizität“ adulter Stammzellen definiert als die Fähigkeit, sich in Zelltypen anderer Linien zu differenzieren und damit die entsprechende Phänotypen, Genexpressionsprofile und funktionellen Eigenschaften anzunehmen [131, 132].

Das Knochenmark enthält neben den hämatopoetischen Stammzellen eine Vielzahl unterschiedlicher Stammzellpopulationen, wie die sog. mesenchymalen Stammzellen (MSC), EPCs, die multipotenten, adulten Progenitorzellen (MAPCs) sowie die Very Small Embryonic Stem Cells (VSEs). Darüber hinaus wurden gewebeständige, residente Stammzellen auch in solchen Geweben und Organen identifiziert, die bislang nur in begrenztem Umfang als regenerationsfähig angesehen wurden. Hier sind die skelettalen Myoblasten sowie die kardial-residenten Stammzellen zu nennen. EPCs, die aus dem peripheren Blut sowie aus Nabelschnurblut gewonnenen werden können, gehören ebenfalls zur Gruppe der adulten Stammzellen und

kommen zusammen mit den genannten Zelltypen als Kandidaten für eine Zelltherapie nach MI in Frage [60].

I.1.3.1. Mesenchymale Stammzellen

Pittenger gelang 1999 die Isolation einer einzelnen, pluripotenten, mesenchymalen Stammzelle, die zur Differenzierung in die verschiedenen Bindegewebszelllinien befähigt ist [133]. Es existiert keine klare Definition für die mesenchymale Stammzelle (MSC). Entwicklungsbiologisch handelt es sich dabei um Zellen des pluripotenten embryonalen Bindegewebes. Im adulten Organismus sind MSCs bindegewebige Vorläuferzellen, die sich als Bestandteile des Knochenmarkstromas aus dem Knochenmark isolieren und unter geeigneten Kulturbedingungen *ex vivo* expandieren lassen. Eine akzeptierte Definition für die MSC ist, dass sie das nicht-hämatopoetische Stammzellreservoir im Knochenmark darstellen. Nur etwa 0,001-0,01% aller zellkerntragenden Zellen des unfraktionierten Knochenmarks können als MSCs angesehen werden. MSCs kommen jedoch auch als adulte, multipotente Stammzellen im Fettgewebe und der Nabelschnur vor [134, 135].

Unter der Präsenz des DNA-Demethylans 5-Azacytidin können MSC kardiomyozytäre und vaskuläre Differenzierungsmuster entwickeln [135]. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass diese Zellen zur Neovaskularisation beitragen und myoregenerative bzw. protektive Effekte nach experimentell induziertem MI ausüben. Ein Großteil der Effekte scheint durch das Attribut der Zellen bedingt zu sein, unterschiedliche Wachstumsfaktoren und Zytokine in beachtlicher Menge herstellen und sezernieren zu können. Relevante Wachstumsfaktoren in diesem Zusammenhang sind u.a. SDF-1/CXCL12, IGF-1, bFGF, HIF-1 α , VEGF, Angiopoietin [134, 136].

Der Arbeitsgruppe um Catherine Verfaillie gelang die Identifikation einer multipotenten, adulten Progenitorzelle (MAPC), einer speziellen Subpopulation mesenchymaler Stammzellen, die sich in ektodermale, entodermale und mesodermale Zellen differenzieren ließen. MAPCs wurden aus dem Knochenmark von Maus, Ratte, Primaten, Schwein und Mensch isoliert [137, 138]. Die Entdeckergruppe veröffentlichte 2002 eine weitere Studie, in der die Differenzierung über ein nicht-endotheliales Zwischenstadium (CD34-, Vascular Endothelial Cadherin- (VE-cadherin), c-kit-, $\alpha\beta$ 3-Integrin-, flk-1+, AC133+) zu endothelialen Vorläufern reproduziert werden konnte [139]. Die Zellen differenzierten *in vitro* nach Exposition mit angiogenen Faktoren primär zu Angioblasten (CD34+, flk-1+, VE-cadherin+) und schlussendlich in reife Endothelzellen aus. *In vivo* konnte eine Beteiligung an der Neovaskularisation von Tumoren und der Wundheilung nachgewiesen werden. Ein myogenes (Trans-)Differenzierungspotenzial ist eher fraglich, jedoch scheint eine Transplantation der Zellen direkt und indirekt zu einer therapeutischen Neovaskularisation beizutragen [140, 141]. In einer Arbeit aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte

gezeigt werden, dass nach MI intramyokardial applizierte MAPCs positive Effekte auf Neovaskularisation und Infarktremodeling ausüben [142].

I.1.3.2. Skelettmyoblasten

Die Skelettmuskulatur beherbergt ein Reservoir gewebeständiger, spindelförmiger Vorläuferzellen, sog. Skelettmyoblasten oder Satellitenzellen, die im Ruhezustand unter der Basalmembran der Skelettmuskelfasern lokalisiert sind. [143]. Im Jahre 1993 wurde erstmals über die erfolgreiche Transplantation von Skelettmyoblasten ins Myokard berichtet [144, 145]. In den folgenden Jahren konnte im Rahmen mehrerer tierexperimenteller Studien gezeigt werden, dass transplantierte Myoblasten proliferieren, in vielkernige Muskelzellen differenzieren und einen positiven Effekt auf die linksventrikuläre Kontraktilität und das Remodelling nach Infarkt ausüben [146]. Allerdings ist ein kardiomyozytäres Differenzierungspotenzial äußerst fraglich [147].

Bereits im Jahre 2000 wurde erstmalig eine Transplantation autologer Myoblasten ins Myokard eines Patienten mit ischämischer Herzinsuffizienz, der sich einer revaskularisierenden, koronaren Bypassoperation unterzog, beschrieben [148]. Postoperativ kam es zu einer signifikanten und persistierenden Verbesserung der regionalen und globalen Pumpfunktion. Weitere Studien an kleinen Patientenkollektiven mit positiven Effekten folgten. Die erste randomisierte, kontrollierte, doppelblinde Studie (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy, kurz MAGIC-Studie) konnte jedoch den vorherigen Ergebnissen widersprechend keine signifikanten Verbesserungen herausstellen. Den Vorteilen von Myoblasten als potenzielle Stammzellresource für die Myokardregeneration - ihr autologer Ursprung sowie ihre ausgesprochene Ischämietoleranz - steht die Gefahr des Auftretens gefährlicher ventrikulärer Arrhythmien entgegen, wie sie in der MAGIC-Studie in erhöhter Rate beobachtet werden konnte [149, 150].

I.1.3.3. Kardial-residente Stammzellen

Somatische Stamm- und Progenitorzellpopulationen (Satellitenzellen im Skelettmuskel, hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark, ependymale Zellen im Gehirn etc.) sind in einigen adulten Organen des menschlichen Körpers identifiziert worden [132, 151-153]. Man geht davon aus, dass alle adulten Gewebe eine oder mehrere residente Stamm- und Progenitorpopulationen beherbergen, die für die Homöostase und Regeneration des entsprechenden Gewebes verantwortlich sind. Auch im adulten Herz scheinen multipotente Stamm- und Progenitorzellpopulationen zu existieren [154].

So sind in den zurückliegenden Jahren auch primitive kardial-residente Zellpopulationen mit Stammzeleigenschaften und unterschiedlichem Phänotyp identifiziert und charakterisiert worden, die dem Herzen die Fähigkeit zu einer intrinsischen, wenngleich limitierten Regenerationskapazität verleihen [155-160]. Dabei scheinen sie embryonale Residuen mit physiologischer und pathophysiologischer Bedeutung im adulten Herzen zu sein [43, 53]. Studienergebnisse bei Mäusen, Ratten, Hunden respektive beim Menschen zeigen, dass etwa eine Stammzelle auf 8.000-20.000 Kardiomyozyten bzw. 32.000-80.000 Herzzellen kommt [47]. Auf Einzelzellniveau sind diese Zellen klonogen, selbsterneuernd und weisen ein hohes Proliferationspotenzial auf. Sowohl in vivo als auch in vitro sind sie in der Lage, kardiomyozytär, glattmuskulär und endothelial zu differenzieren. Verschiedene Subtypen kardial-residenter Stammzellpopulationen sind dabei aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften und der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker beschrieben und klassifiziert worden: side population (SP)-Zellen, c-kit, Sca1, Islet-1, SSEA-1 sowie die vom Epikard abstammenden Tbx-18 bzw. WT-1 positiven kardialen Progenitorzellen. Viele der beschriebenen Stammzellpopulationen haben überlappende molekulare und funktionelle Eigenschaften [47, 161].

Das Oberflächenmolekül c-Kit (CD117), ein Tyrosinkinase-Rezeptor für den Stammzell-Faktor (SCF), wurde zunächst zur Isolation hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark verwendet [162]. Die Existenz einer c-kit⁺ Stammzellpopulation im humanen Herzen und bei Nagern wurde erstmals durch Piero Anversa und Kollegen beschrieben. Danach weisen jene Zellen typische Stammzeleigenschaften auf (klonogenes Selbsterneuerungspotenzial, Multipotenz) und differenzieren zu Kardiomyozyten sowie glatten Gefäßmuskel- und Endothelzellen [155]. Etwa 7-10% dieser Zellen exprimieren die kardialen Transkriptionsfaktoren GATA4, Nkx2.5 und MEF2c. Nach in-vitro-Differenzierung, exprimieren sie fernerhin die Proteine alpha-Actinin, Connexin43 und Desmin, die auch von terminal differenzierten Kardiomyozyten exprimiert werden. Weitere Studien konnten inzwischen den therapeutischen Nutzen von c-kit⁺ Zellen bei der Verringerung der Infarktgröße und eine Verbesserung der Herzfunktion in verschiedenen Modellen nach MI nachweisen. Dennoch ist ihr kardiomyozytäres Differenzierungspotenzial weiterhin umstritten [163].

Zellen der *side population*, kurz SP-Zellen, zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, den Farbstoff Hoechst 33342 über das Transmembranprotein ABCG2 (ATP-bindenden Kasette G2) aus der Zelle zu transportieren. Die Zellpopulation wurde in mehreren adulten Geweben gefunden, darunter in Skelettmuskulatur und im Knochenmark [164]. Eine kardiale SP-Zellpopulation, die sensibel für den Calciumantagonisten Verapamil ist, typische Stammzeleigenschaften und kardiales Differenzierungspotenzial aufweist, konnte erstmals im postnatalen murinen Myokard identifiziert werden [165]. Bei Nagetieren wurden kardiale SP-Zellen als CD34⁻, CD31⁻ und CD45⁻

und Sca1+ bzw. c-kit+ Zellen beschrieben, die herzspezifische Transkriptionsfaktoren, wie GATA4, MEF2C und Nkx2.5 und nach Differenzierung in-vitro Sarkomerproteine wie Troponin und α -Aktinin exprimieren [166, 167]. In Bezug auf ihr in-vivo Potential konnte gezeigt werden, dass eine Subpopulation Sca1+/CD31- kardialer SP-Zellen nach intravenöser Applikation an den Ort der Myokardschädigung migriert und zu Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen differenziert [168, 169].

Insgesamt scheint es sich bei den kardialen SP-Zellen um eine sehr heterogene Zellgruppe aus Endothelzellen, glatten Muskelzellen, mesenchymalen Stammzellen und kardiomyogenen Vorläuferzellen zu handeln, welche sich durch die Expression der Marker VE-cadherin, CD31, CD34 and Sca1 identifizieren lässt [170].

Jüngst konnte eine weitere Population Islet-1 (Isl-1) exprimierender Zellen identifiziert werden, die alle Eigenschaften einer kardialen Stammzelle aufweist. Isl-1 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der LIM-Homöodomän-Proteine und wird von Progenitoren des sekundären bzw. anterioren Herzfeldes exprimiert, welche schlussendlich maßgeblich zur Entwicklung des rechten Ventrikels, des rechtsventrikulären Ausflusstraktes sowie der Vorhöfe beitragen. Im Gegensatz zu den anderen kardial-residenten Progenitorzellpopulationen exprimieren diese Zellen weder c-kit, noch Sca1 oder CD31. Nicht lebensfähige Isl1-Knockout-Mäuse zeigen schwere kardiale Malformationen des rechten Ventrikels sowie des rechtsventrikulären Ausflusstraktes und einen partiellen Verlust der Vorhöfe. Im postnatalen Herzen sind diese Zellen mit einer Frequenz von 500-600 Zellen pro Herz ausgesprochen selten zu finden. Dabei exprimieren Isl-1-positive Zellen kardialspezifische Transkriptionsfaktoren, wie Nkx2.5 und GATA4 und haben das Potenzial, zu funktionellen Kardiomyozyten heranzureifen. Im Embryo findet man sie als Zellcluster im Bereich beider Vorhöfe sowie einzeln im Bereich der Ventrikel. Isl-1-positive Zellen, die gleichzeitig Nkx2.5 und Flk-1 exprimieren sind in der Lage, in alle kardiovaskulären Zelllinien zu differenzieren [157, 171, 172].

Das Stammzell-Antigen-1 (Sca1) ist ein für den murinen Organismus beschriebenes 18-kDa großes Glycosyl-Phosphatidylinositol-Protein der sog. Ly6-Genfamilie, welches ursprünglich als ein Antigen aktivierter Lymphozyten bereits vor mehr als 30 Jahren identifiziert und beschrieben wurde. Das cysteinreiche, aus Sphingolipiden und Cholesterin bestehende Protein ist in der Plasmamembran verankert und weist zwei respektive drei Extrazellulardomänen auf. Durch die Regulation der Konzentration von Schlüsselsignalmolekülen, wie der Kinasen der Src-Familie, sowie der Regelung des Recyclings und Abbaus unterschiedlicher Rezeptoren, scheint es dabei eine entscheidende Rolle bei der inter- und intrazellulären Signalübertragung, insbesondere als Koaktivator oder Regulator von Rezeptor-Ligand-Bindung oder anderen Protein-Protein Interaktionen zu spielen. Eine wichtige Rolle von Sca1 bei der Regulation der Proliferation von

hämatopoetischen sowie MSCs ist bereits nachgewiesen worden, z.B. durch Interaktion mit der Proteinkinase Akt. Die genauen molekularen Mechanismen, über die Sca1 in zelluläre Signalkaskaden eingreift, bleiben jedoch nach wie vor weitestgehend unklar [173].

Als Oberflächenmarker wird Sca1 häufig zur Anreicherung adulter hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark herangezogen. Jedoch konnten auch außerhalb des Knochenmarks Sca1+ Zellen mit Stammzeleigenschaften identifiziert werden, so z.B. im Skelettmuskel, in der Brustdrüse, der Prostata, der Haut und der Leber [173]. Auch im Herzen konnten Schneider und Garry und deren Kollegen eine gewebeständige Sca1+ Stammzellpopulation isolieren [158, 174]. Die identifizierten Zellen exprimieren Telomerase, ein Schlüsselenzym für die Eigenschaft der Selbsterneuerung, sowie die frühen kardialen Transkriptionsfaktoren GATA4, MEF2c und TEF-1. Dahingegen exprimieren sie keine kardialen Strukturgene bis eine gerichtete Differenzierung induziert wird. Oft teilen Sca1+ Zellen Eigenschaften der *side population*. Weiterhin koexprimieren sie den Endothelzell-Marker CD31, sind jedoch negativ für die Oberflächenantigene Flt-1 und Flk1 sowie die hämatopoetischen Oberflächenantigene CD45, CD34 oder CD8. Obwohl für Sca1 kein humanes Homolog bekannt ist, gelang die Isolation Sca1+ Stammzellen aus humanen Gewebeproben, die aus fetalen Herzen und atrialen Biopsien stammten. Die aus den humanen Proben isolierten Sca1+ Zellen differenzierten nach Stimulation mit TGF-beta zu funktionellen Kardiomyozyten, ohne das eine häufig erforderliche Kokultur mit neonatalen Kardiomyozyten notwendig gewesen wäre [175].

Abbildung 3 zeigt die putative Differenzierungshierarchie kardial-residenter Stammzellpopulationen.

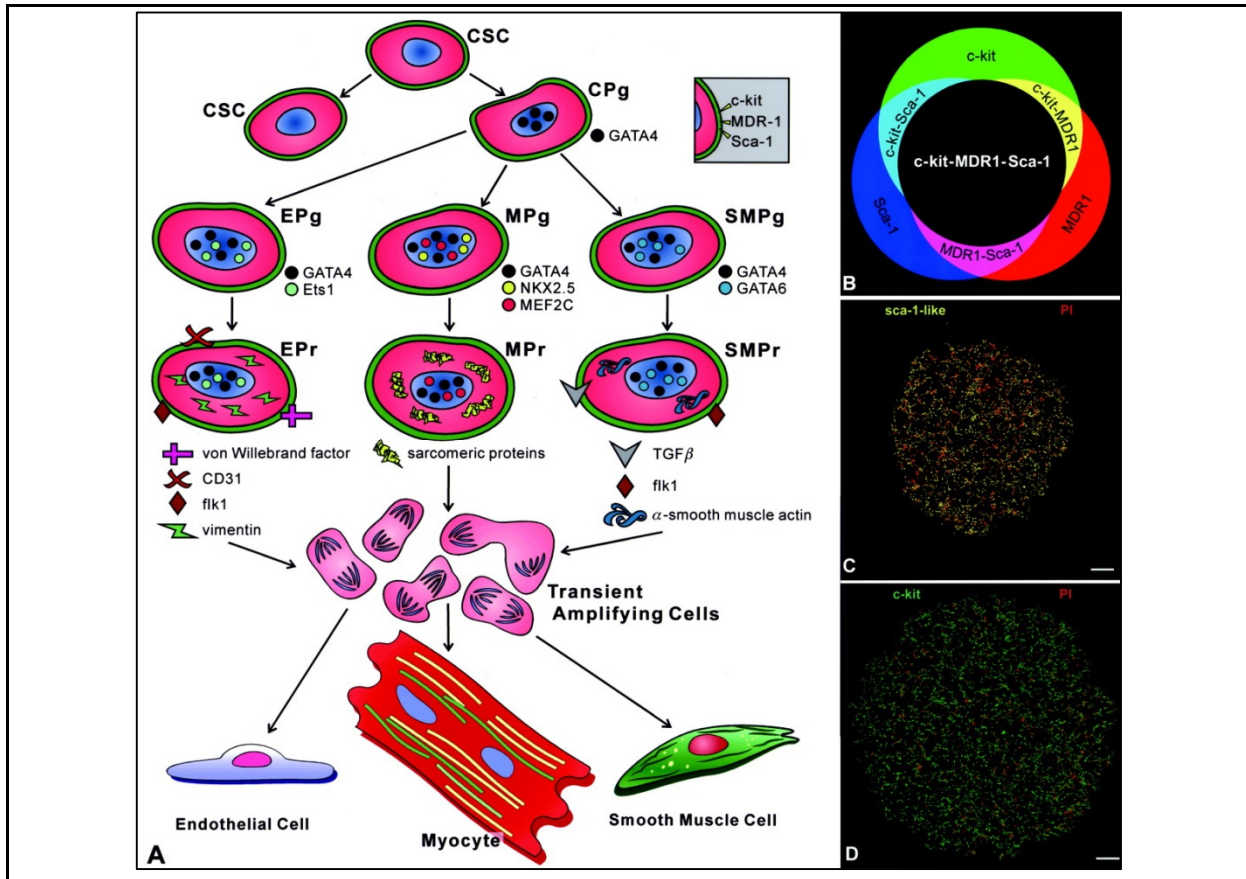


Abbildung 3 Putative Differenzierungshierarchie kardial-residenter Stammzellpopulationen. Übernommen aus [176]. CSC: Cardiac Stem Cell; CPg: Cardiac Progenitor; EPg: Endothelial Progenitor; MPg: Myogenic Progenitor; SMPg: Smooth Muscle Progenitor

Die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse der ersten klinischen Studien CADUCEUS und SCIPIO (CARDiosphere-Derived aUtologous Stem CELls to Reverse ventricUlar dySfunction/Cardiac Stem Cell Infusion in Patients With Ischemic CardiOmyopathy), zeigte die intramyokardiale Applikation von kardialen Stammzellen, die im Vorfeld aus myokardialen Biopsaten isoliert und ex-vivo expandiert wurden, nach stattgehabtem MI durchaus ermutigende Ergebnisse [177, 178].

I.3. Endotheliale Progenitorzellen

I.3.1. Überblick

Bereits im Jahre 1932 beschrieben Hueper und Russel die Bildung kapillarähnlicher Strukturen in Leukozytenkulturen [179, 180]. Ein Jahr später konnte gezeigt werden, dass das periphere Blut eine Subpopulation von Vorläuferzellen beherbergt, die sowohl in vitro als auch in vivo in reife Endothelzellen zu differenzieren in der Lage sind [181]. Mit Beginn der 50er Jahre wurden pathologisch alterierte, größerlumige Gefäßabschnitte durch alloplastische Prothesen ersetzt, die nach späterer Explantation wieder mit einer kohärenten Endothelschicht besetzt waren. Man mutmaßte, dass diese monozelluläre Schicht am ehesten durch Proliferation des Endothels aus

dem Bereich der Anastomose stammte [182]. In einer ersten Pionierarbeit schlossen Stump und Kollegen jedoch erstmals, dass zirkulierende und nach Adhäsion proliferierende Zellen am Reendothelialisierungsprozess isolierter Gefäßprothesen beteiligt sein müssen [183, 184]. Im Jahre 1994 zeigten Scott et al., dass in porcine Aorten eingebrachte Polytetrafluoroethylenfilze 55 Tage nach Implantation mit Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen, Monozyten und kapillarähnlichen Strukturen besiedelt waren. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass zirkulierende Zellen für dieses Phänomen verantwortlich sein könnten [185].

Das lange geltende Paradigma, dass eine endotheliale Regeneration von alteriertem Endothel ausschließlich durch Teilung ortsständiger, ausdifferenzierter Endothelzellen erfolgt, konnte dann durch einige jüngere Pionierarbeiten widerlegt werden. Die in der Zeitschrift Science publizierte Studie von Asahara et al. aus dem Jahre 1997 beschrieb erstmalig eine bis dato unbekannte, im peripheren Blut erwachsener Menschen zirkulierende Subpopulation hämatopoetischer Vorläuferzellen, die auf Basis der Expression der Oberflächenmoleküle CD133, CD34, *fetal liver kinase-1* (flk-1;VEGF-Rezeptors 2) sowie der *tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains-2* (TIE-2) isoliert werden konnten, im Verlaufe einer gerichteten Differenzierung Oberflächencharakteristika von Endothelzellen aufwiesen und sich nach ischämischer Gewebeschädigung in das Endothel neuer Blutgefäße integrierten [186]. Nur wenig später wurde diese Beobachtung in einer Veröffentlichung von Shi et al. bestätigt. Nach Isolation einer Subpopulation CD34+ hämatopoetischer Stammzellen aus unterschiedlichen Ausgangsmaterialien (Knochenmark, Nabelschnurblut, fetales Lebergewebe und peripheres Blut) konnten nach 15-tägiger in-vitro-Kultivierung rasch proliferierende, passagierbare Zellen generiert werden, die mit der Expression des von Willebrand Faktors (vWF) sowie der Aufnahme von acetyliertem LDL typische Charakteristika von Endothelzellen zeigten und nach Knochenmarkübertragung in einem Hundemodell an der Endothelialisierung implantierter Dacronprothesen beteiligt waren [187]. Vor allem diese beiden Arbeiten legten damit erstmals die Existenz zirkulierender Hämangioblasten im peripheren Blut des adulten menschlichen Organismus nahe, welche in der Folgezeit als EPCs bezeichnet wurden, und führten zu einem grundlegenden Paradigmenwechsel. Eine Re-Endothelialisierung denudierter Gefäßareale sowie eine postnatale Neovaskularisation ischämischer Gewebe wird seither nicht mehr nur als das Ergebnis der Proliferation und Migration präexistenter, ausdifferenzierter Endothelzellen verstanden. Vielmehr kann, vermittelt durch zirkulierende Progenitorzellen eine endotheliale Regeneration denudierter Gefäßbereiche sowie eine Revaskularisation ischämischer Gewebeareale stattfinden, welche Ähnlichkeiten mit der embryonalen Gefäßentstehung zeigt. Das Konzept der postnatalen, durch zirkulierende Vorläuferzellen vermittelten Vaskulogenese war geboren [188].

I.3.2. Definition, Ursprung und Klassifikation

Nach einer allgemein akzeptierten Definition handelt es sich bei adulten EPCs um eine mononukleäre, im peripheren Blut zirkulierende Zellpopulation, die vornehmlich aus dem Knochenmark und der Gefäßwand rekrutiert wird, sich phänotypisch und funktionell zum Zeitpunkt der Isolation zwar noch von reifen Endothelzellen unterscheidet, jedoch in vitro zu Endothelzellen auszudifferenzieren vermag, und in vivo, direkt oder indirekt, zur Vaskulogenese und Endothelhomöostase beiträgt [189]. So werden sie heutzutage als integrale Komponente der Endothelhomöostase angesehen und spielen eine wichtige Rolle bei der Reendothelialisierung denudierter Gefäßareale wie z.B. nach intrakoronarer Stentimplantation, bei der Entstehung und Progression atherosklerotischer Plaques, bei der Wundheilung, bei ischämischen Erkrankungen sowie bei der Tumorangio-genese [190, 191].

Prinzipiell muss zwischen embryonalen und adulten Vorläuferzellpopulationen differenziert werden. Während der Embryonalentwicklung geht die Vaskulogenese von sog. Blutinseln des Dottersacks aus. Sie beginnt mit der Differenzierung und Aggregation mesodermaler Progenitoren im Bereich des Dottersackes zu gemeinsamen Vorläuferzellen des Gefäß- und blutbildenden Systems. Die die Blutinseln bildenden Zellkonglomerate differenzieren unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren (u.a. VEGF) zu peripheren Angioblasten und zentral gelegenen hämatopoetischen Stammzellen. Durch die weitere Konglomeration der primordialen Endothelzellen und Entstehung von Interzellularkontakten bilden sich unter weiteren Differenzierungsschritten die Kompartimente des Intravasalraumes. Beide Zellpopulationen stehen dabei nicht nur in einer unmittelbaren räumlichen Beziehung zueinander, sondern weisen darüber hinaus einige gemeinsame Antigen-determinanten auf (VEGFR2/Flk-1/KDR, TIE-2, CD34, CD133), weshalb angenommen wird, dass beide Zelltypen während der Embryonalentwicklung aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle - dem sog. Hämangioblasten - hervorgehen [192, 193].

Im adulten Organismus geht man von mehreren Ursprungszellpopulationen aus. So konnten endotheliale Differenzierungsmuster bei unterschiedlichen Stammzellpopulationen des Knochenmarks, wie hämatopoetischen - insbesondere myeloiden - und MSCs sowie anderen multipotenten, adulten Progenitorzellen des Knochenmarks nachgewiesen werden. Morphologisch und funktionell teilen sie einige Eigenschaften mit Endothelzellen. Es gilt mittlerweile als akzeptiert, dass es sich bei sog. EPCs nicht um eine homogene, sondern um eine vielmehr äußerst heterogene, in unterschiedlichen Stadien der Endothelzellentwicklung befindlichen Zellgruppe - vom Hämangioblasten bis hin zur reifen Endothelzelle - handelt [194, 195]. Die im Knochenmark vorzufindenden unreifen EPCs gleichen in ihren Oberflächenmarkern den hämatopoetischen Stammzellen. In der Tat sind den hämatopoetischen und endothelialen Vorläufern viele Antigene, wie CD133, CD34, c-kit/CD117, VEGF-R2 oder CXCR4 gemeinsam.

EINLEITUNG

Während ihrer Differenzierung verlieren sie die für unreife Vorläuferzellen typischen Oberflächenmarker und exprimieren verstärkt Marker reifer Endothelzellen (z.B. VE-Cadherin, CD31, vWF) [189, 196].

Klassischerweise wurden EPCs als Zellen beschrieben, die eine Kombination der Marker VEGFR2 und CD34 bzw. CD133 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Jedoch weisen neuere Daten darauf hin, dass es sich bei den CD34⁺/CD133⁺/VEGF-R2⁺ Zellen vielmehr um hämatopoetische Stammzellen als um endotheliale Vorläuferzellen handelt [197]. Vor allem aufgrund ihrer engen Relation zu hämatopoetischen Zellpopulationen und den teilweise erheblich überlappenden Markerprofilen, vor allem bei den "frühen" EPCs, ist eine einheitliche EPC-Definition bislang noch nicht gelungen und aktuell Gegenstand kontroverser Diskussionen. **Abbildung 4** zeigt ein ontogenetisches Modell zur Entwicklung der unterschiedlichen EPC-Populationen aus hämatopoetischen Stammzellen bis hin zur reifen Endothelzelle.

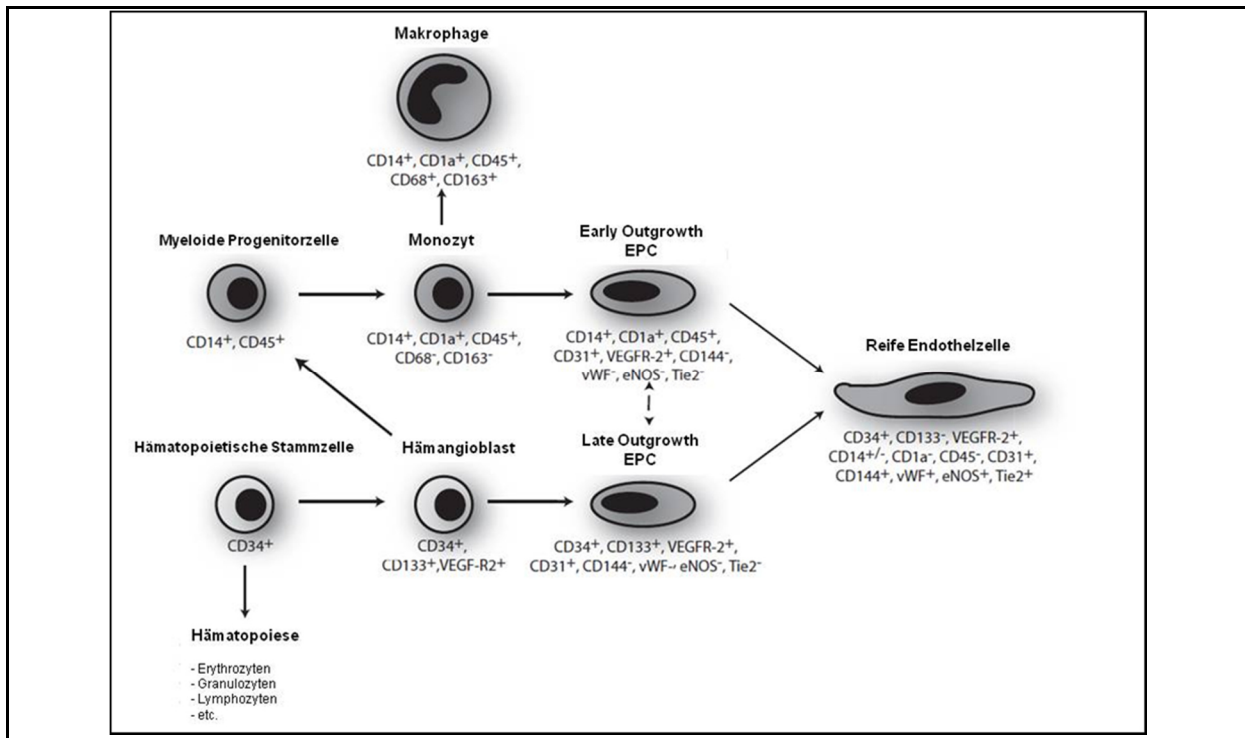


Abbildung 4 Putatives Modell der Ontogenese endothelialer Progenitorzellen. Modifiziert nach [198].

Die Majorität der EPCs ist in endostealen Stammzellnischen des Knochenmarks lokalisiert, wo sie über den *CXC chemokine receptor type-4* (CXCR-4) an den von Endothelzellen und Osteoblasten exprimierten *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) gebunden sind. Nur ein geringer Anteil wird physiologischerweise in die periphere Blutbahn mobilisiert [196]. Als ein weiterer Aufenthaltsort von EPCs wird die Gefäßwand angesehen [199]. Mobilisation, Ausschwemmung in das periphere Blut und das zielgerichtete Einwandern („*homing*“) ins Zielgewebe werden über verschiedene

Zytokine und Hormone wie z.B. VEGF, SDF-1, *Placental Growth Factor* (PlGF) und Östrogen reguliert [196].

I.3.3. Isolation und Charakterisierung unterschiedlicher EPC-Populationen

Die Hauptquellen, aus denen adulte endotheliale Vorläuferzellen zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken isoliert werden können, sind das periphere Blut, das Blut der Nabelschnur sowie das Knochenmark. Bei der Identifikation und Isolation von putativen endothelialen Progenitorzellpopulationen bedient man sich zweier unterschiedlicher methodischer Prinzipien: die Selektion über Oberflächenmoleküle mittels fluoreszenz- oder magnetpartikelgekoppelter Antikörper durch MACS (Magnetic-activated cell sorting; Miltenyi Biotec®) oder FACS (Fluorescence-activated cell sorting; Becton Dickinson®) sowie über ihr unterschiedliches Adhäsions- und Wachstumsverhalten in vitro unter Zellkulturbedingungen. Beide Methoden haben Vor- und Nachteile. Obwohl unterschiedliche direkt oder indirekt über Zellkulturmethoden isolierte Zellpopulationen die Neovaskularisation in Tiermodellen zu verbessern vermögen, so differieren deren Verhalten in vivo und die therapeutischen Wirkungsmechanismen z.T. erheblich [189, 195]. Für die durchflusszytometriegestützte Isolation wurden z.T. sehr variierende Oberflächenmarkerprofile in Verbindung mit endothelialen Vorläuferzellen beschrieben (siehe **Abbildung 5**).

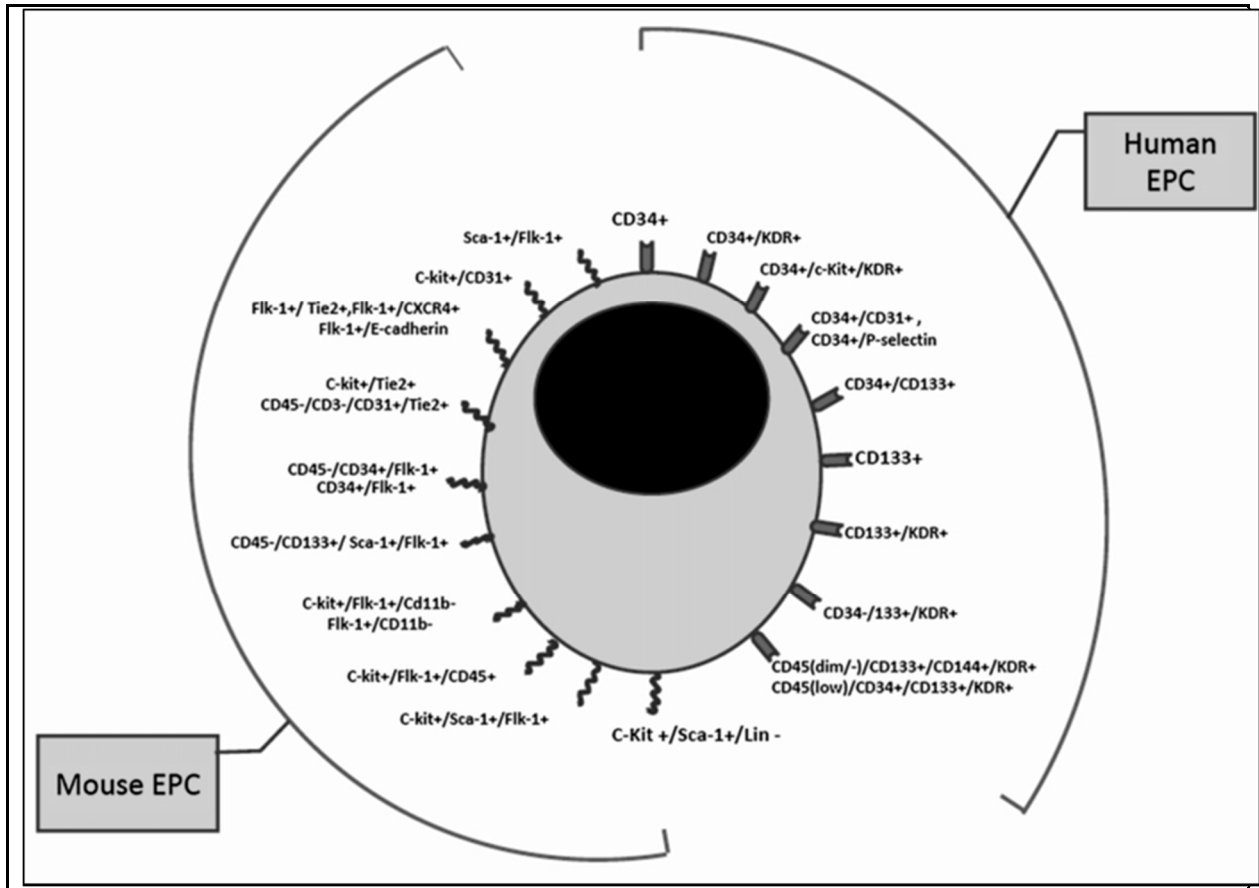


Abbildung 5 Für humane und murine endothelialer Progenitorzellen beschriebene Oberflächenmarker. Übernommen aus [200]

Die heute zumeist gebräuchliche Identifikation von EPC erfolgt über die Expression der Oberflächenmarker CD133, CD34 und vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2). Wie im vorhergehenden Kapitel erläutert existiert nach aktuellem Wissensstand kein distinktes Oberflächenmarkermuster, um EPCs hinreichend von hämatopoetischen Stammzellen abzugrenzen und damit zur eindeutigen Identifikation bei der Isolierung einer homogenen Zellpopulation heranzuziehen [195].

Alternativ können unterschiedliche Subtypen endothelialer Progenitorzellen aufgrund ihres in-vitro Verhaltens in Kultur voneinander unterschieden werden. Dem zweiten Konzept folgend werden nach dem Auftreten unter Kulturbedingungen early von late outgrowth EPCs unterschieden und nach einer neueren Nomenklatur nochmals genauer klassifiziert. Die Zellentität der „early outgrowth“ EPCs lässt sich abermals in colony forming units (CFU Hill) sowie die „circulating angiogenic cells“ (CAC) unterteilen. Early EPC tragen v.a. indirekt über die Sekretion parakriner Faktoren zur Endothelrestauration bei. „Late-outgrowth“ EPC werden auch als endothelial colony-forming cells (ECFC) bezeichnet, weisen ein hohes Proliferationspotential auf und sind v.a. direkt an der Neovaskularisation und Reendothelialisierung beteiligt, sie können

jedoch auch über parakrine Mechanismen an der Regulation angiogenetischer Prozesse mitwirken [189, 195, 201].

Die sogenannten „*colony-forming-units endothelial cells*“ (CFU-ECs Hill) sind historisch gesehen die erste putative endotheliale Progenitorzellpopulation, die beschrieben wurde. Dabei werden aus Blut isolierte mononukleäre Zellen auf fibronectinbeschichteten Kulturschalen ausplattiert. Circa 48 Stunden nach diesem Schritt werden adhärente Makrophagen und Endothelzellen verworfen und die nicht-adhären Zellen auf fibronectinbeschichteten Schalen weiterkultiviert. Nach 5-9 Tagen treten dann spindelförmige Zellkolonien mit peripheren Aussprossungen auf. Mit dieser Methode beschrieben Asahara et al. erstmals einen putativen Vorläufer, der aus dem peripheren Blut isoliert werden konnte [186]. 15,7% der fibronectinadhären Zellen exprimierten CD34, 27% der Zellen waren Flk-1 positiv, lediglich 11% waren positiv für beide Oberflächenmarker. Aus dem Hinzutreten von Tie-2 und E-Selectin nach 7 Tagen in Kultur schlossen die Wissenschaftler auf einen endothelialen Phänotyp. Folgestudien konnten jedoch zeigen, dass die von Asahara beschriebene Zellpopulation äußerst heterogen ist und vielmehr hämatopoetisches als endotheliales Potential aufweist. So zeigen 27,2% der kultivierten Zellen eine persistierende Expression des Panleukozytenmarkers CD45 und 6% der Zellen eine Expression des Hämatopoesemarkers CD68. Neuere Arbeiten belegen, dass die dreifach für die Marker CD34, flk1 und CD133 positiven Zellen eine hoch aufgereinigte Subpopulation hämatopoetischer Vorläuferzellen sind. Mehr als 99% der Zellen exprimieren zudem den Panleukozytenmarker CD45, einen Marker, der von Endothelzellen weder auf Protein noch auf mRNA-Ebene exprimiert wird [197, 202]. CFU-ECs sind mit den sogenannten CFU-Hill identisch. Von Hill et al. wurden die CFU-EC quantifiziert, um die Zahl der zirkulierenden EPCs mit der Suszeptibilität für kardiovaskuläre Ereignisse zu korrelieren. Die Autoren der Arbeit zeigten, dass die Zahl der zirkulierenden EPCs invers mit dem sog. Framingham Risikofaktor-Score assoziiert war. Dabei war die Konzentration der CFU-ECs signifikant vermindert, wenn die Blutfette erhöht waren oder die Risikofaktoren Diabetes mellitus oder Bluthochdruck vorlagen [203].

Zur Isolation sog. circulating angiogenic cells (CACs) werden aus unfraktioniertem Knochenmark oder peripheren Blutproben isolierte mononukleäre Zellen für etwa 4 Tage in einem Endothelzellmedium kultiviert. Nicht-adhären Zellen werden anschließend verworfen. Die resultierenden Zellen zeigen im weiteren Verlauf phänotypische und funktionelle Ähnlichkeiten mit Endothelzellen (siehe **Abbildung 6, Methode B**). Die Zellen binden endothelspezifisches Lectin Ulex Europaeus Agglutinin-1 (UEA-1), und sind in der Lage azetyliertes LDL (acLDL) aufzunehmen. Darüber hinaus exprimieren sie von vWF, CD31, VEGFR-2, vascular endothelial cadherin (VE-cadherin or CD144) sowie Tie-2 und binden Bandeiraea simplicifolia lectin (BS-1) [189].

Das Oberflächenmarkerprofil der CACs ist damit relativ ähnlich zu den beschriebenen CFU-ECs. Sie treten zwar wie die CFU-ECs in spindelförmiger Morphologie auf, zeigen jedoch keine Kolonien in Kultur. CACs können in größerer Zahl aus gleichem Ausgangsmaterial isoliert werden, dabei repräsentieren sie etwa 2% aller mononukleären Zellen. Die Konzentration von CACs wurde ebenfalls in Analogie zu den CFU-ECs bzw. CFU-Hill mit der Präsenz kardiovaskulärer Risikofaktoren in Beziehung gesetzt. So zeigten Vasa et al., dass mit der Zahl der kardiovaskulären Risikofaktoren, darunter zunehmendes Alter, männliches Geschlecht, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, positive Familienanamnese und Cholesterinspiegel, die Zahl der CACs im peripheren Blut sinkt [204]. Rehman und Kollegen zeigten, dass die bislang als EPCs bezeichneten Zellen zur Majorität von monozytären Zellen abstammen und nur geringe direkte vaskulogene Eigenschaften aufwiesen. Er schlug vor diese Zellen „*circulating angiogenic cells*“ (CACs) anstatt „*endothelial progenitor cells*“ (EPCs) zu nennen [205]. CFU-ECs bzw. CACs gehören zur Klasse der sog. early-outgrowth EPCs.

Der dritte unter dem Begriff EPC subsummierte und über das Verhalten unter Kulturbedingungen differenzierte Zellentität wird als endothelial colony-forming cell (ECFC) definiert. Da ECFCs deutlich später in Kultur erscheinen als CFU-ECs und CACs, werden sie auch als „*late-outgrowth*“ EPCs bezeichnet. Die Nomenklatur geht auf Gulati et al. und Hur et al. zurück, die das unterschiedliche Wachstumsverhalten mononukleärer Ausgangszellen in Kultur beschrieben [206, 207]. ECFCs können aus dem Blut der Nabelschnur sowie aus dem peripheren Blut isoliert werden. Dabei werden aus peripherem Blut oder Nabelschnurblut isolierte mononukleäre Zellen in niedriger Dichte auf mit Kollagen Typ I beschichteten Kulturschalen ausplattiert und in endothelspezifischem Kulturmedium kultiviert. Nicht adhärente Zellen werden durch mehrere Waschschrte innerhalb der ersten Tage in Kultur eliminiert. Nach 10-21 Tagen (5-7 bei Nabelschnurblutzellen) erscheinen ECFC-Kolonien mit kopfsteinpflasterartiger Morphologie, wie sie auch typisch für Endothelzellen ist. ECFCs exprimieren die typischen Endothelzellmarker (KDR, CD34, vWF, eNOS, VE-cadherin, u.a.), jedoch keine hämatopoetischen Oberflächenmarker wie CD45, CD133, CD11b oder CD14 [208, 209]. Damit sind sie phänotypisch nicht von Endothelzellen zu unterscheiden, haben jedoch ein deutlich höheres Proliferationspotenzial. Entsprechend hoch ist das Expressionslevel des Enzyms Telomerase. Fernerhin ist nachgewiesen, dass sie acetyliertes LDL inkorporieren und gefäßartige Strukturen in vitro formieren [208]. Im Gegensatz zur EPC-Population vom Typ CFU-Hill und anderen putativen EPC-Populationen formieren ECFCs humane Blutgefäße nach Transplantation in immundefiziente Mäuse und integrieren in die in situ befindlichen murinen Gefäßstrukturen [209]. Damit weisen ECFCs nach aktuellem Wissensstand wohl als einzige der beschriebenen Zellpopulationen alle Charakteristika einer bona fide EPC auf [194, 195]. Mittlerweile ist es gelungen, ECFCs im peripheren Blut über

eine distinkte Kombination der Oberflächenantigene CD34, CD146, CD31 und CD105 in der Fraktion der für den Panleukozytenmarker CD45 negativen Subpopulation mononukleärer Zellen mittels Durchflusszytometrie prospektiv zu isolieren [210]. Im adulten menschlichen Organismus scheinen ECFCs sich unabhängig vom hämatopoetischen System zu entwickeln [209]. Neuere Daten deuten gar darauf hin, dass ihr Ursprung nicht im Knochenmark zu liegen scheint, sondern in der Gefäßwand [211]. Erwähnenswert ist die durch mehrere Studien belegte Tatsache, dass ECFCs nach akutem MI in die periphere Blutzirkulation mobilisiert werden und darüber hinaus protektive Effekte durch Reduktion der mikrovaskulären Obstruktion im Infarktareal ausüben [212-214]. Mit ihrem gegenüber den CFU-ECs bzw. den CACs exzellenten Vermehrungs- und deutlich höheren endothelialen Differenzierungspotenzial stellen ECFCs eine attraktive, relativ einfach über eine Blutabnahme zu gewinnende, sehr proliferative, autologe Zellpopulation für eine stammzellbasierte Therapie ischämischer Herzerkrankungen dar. Allerdings ist sie bislang nur wenig präklinisch und klinisch für den Einsatz nach myokardialer Ischämie charakterisiert.

Die verschiedenen Isolationsschritte sowie die funktionellen und morphologischen Unterschiede der einzelnen Zellpopulationen sind in **Abbildung 6** wiedergegeben.

EINLEITUNG

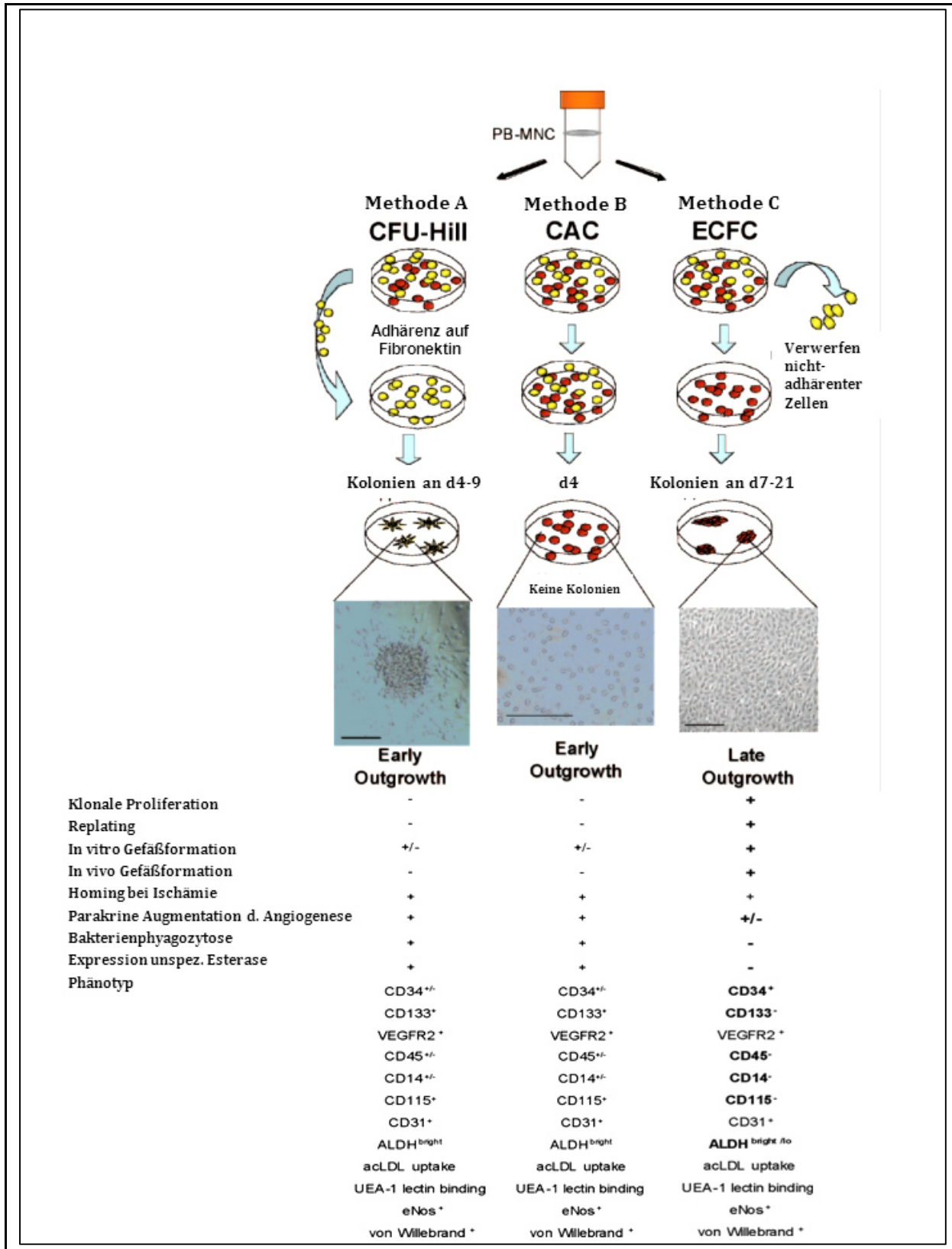


Abbildung 6 Übersicht der verschiedenen, über das unterschiedliche Verhalten in Kultur definierten EPC-Populationen. Modifiziert nach [189].

I.3.4. Relative Verteilung unterschiedlicher EPC-Populationen im Blut und im Knochenmark

Insgesamt treten Zellen mit Eigenschaften, die der oben genannten EPC-Definition entsprechen und aus den erwähnten Geweben isoliert werden können, äußerst selten auf. Fernerhin variiert ihre Zahl in den jeweiligen Geweben stark. Anders als im embryonalen Organismus zirkuliert im peripheren Blut gesunder Erwachsener nur eine äußerst geringe Anzahl an EPCs. Peichev et. al. schätzt ihren Prozentsatz auf 0,002 %; Ingram et al. beziffern ihren Anteil nur auf 0,0001% der mononukleären Blutzellen [234, 235]. Nach Smadja et al. beträgt der Anteil endothelialer Progenitorzellen an der Gesamtzahl der sich im Knochenmark befindenden Zellen etwa 1%, die Zahl der im peripheren adulten Blut zirkulierenden EPCs zwischen 0,001% und 0,01% [236]. Das relative Zahlenverhältnis von EPCs im peripherem Blut, im Nabelschnurblut und im Knochenmark liegt nach anderen Schätzungen in etwa 1:10:15 [237].

Die überwiegende Mehrzahl (>99,99%) CD45+ PBMNCs sind hämatopoetische Elemente. Ein Anteil von etwa 2-5% der unter der Entität EPC subsumierten, zirkulierenden mononukleären Phagozyten wird als Ausgangszellpopulation für die CACs angesehen. Im Gegensatz dazu stellt eine verschwindend geringe Zahl der CD45+ hämatopoetischen Stammzellen das Ausgangsreservoir für die CFU-EC dar, entsprechend einer Zellzahl von etwa 80-800 Zellen/ml Blut. Aufgrund klonaler Differenzierungsanalysen mehren sich die Hinweise dafür, dass CFU-ECs und CACs wohl lediglich hämatopoetische, myeloide Eigenschaften aufweisen, wenngleich sie für die Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität und die Reendothelialisierung von Endothelläsionen von Bedeutung sind [209, 215]. Die Konzentration der Zellen, aus denen die Zellpopulation der ECFCs hervorgehen, wird auf 2-5 Zellen/ml Nabelschnurblut und 0,05-0,2 Zellen/ml peripheres Blut beziffert [208, 216].

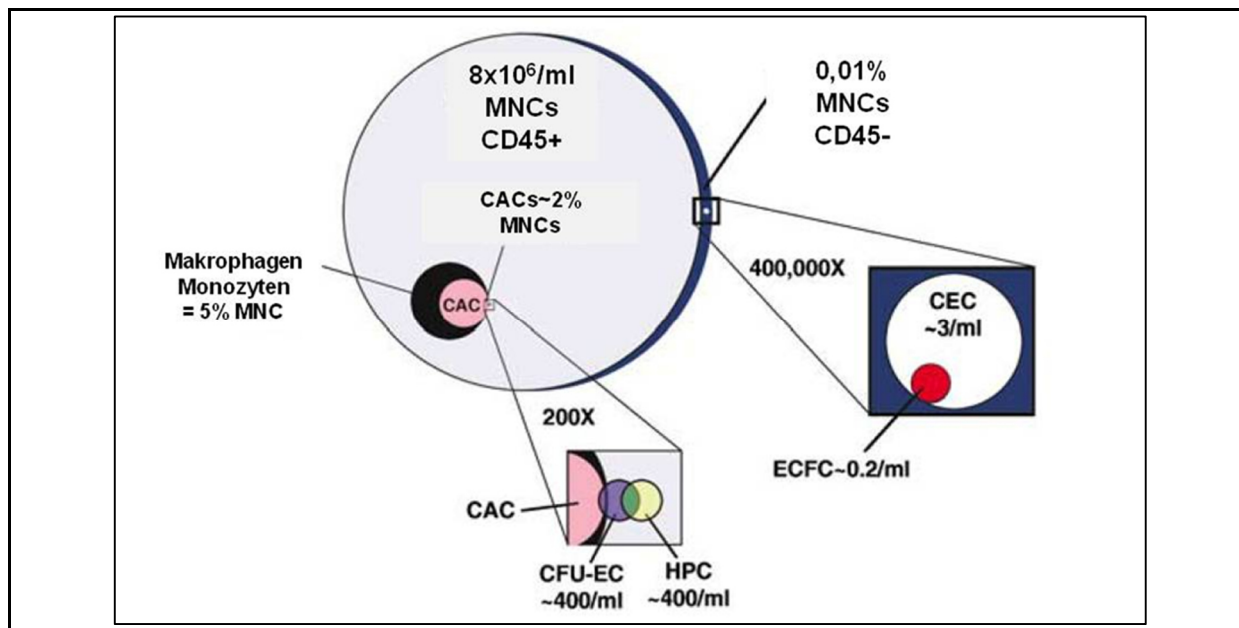


Abbildung 7 Zahlenmäßige Verteilung proangiogenetischer Zellpopulationen im peripheren Blut. Modifiziert nach [194].

I.3.5. Einflussfaktoren auf die Zahl und Funktionalität von EPCs

Mehrere Faktoren konnten identifiziert werden, die sich sowohl auf die Quantität als auch auf die Funktionalität von EPCs auswirken. So konnten verschiedene Studien eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl und der funktionellen Kapazität zirkulierender EPCs und dem Vorliegen sowie der Schwere kardiovaskulärer Risikofaktoren zeigen [69, 204]. Andere Studien konnten zeigen, dass die Zahl der im Blut zirkulierenden EPCs invers mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse korreliert [203, 217, 218]. Damit erscheint eine Verwendung der Information der Zahl der im Blut zirkulierenden EPCs als prognostischer bzw. diagnostischer Surrogatmarker denkbar [219]. Ein negativer Einfluss ist auch bei Vorliegen einer chronisch-ischämischen Herzerkrankung zu beobachten [220]. Umgekehrt wirken sich günstige Modifikationen von Ernährungs- und Lebensgewohnheiten und eine damit einhergehende Verbesserung des kardiovaskulären Risikofaktorprofils positiv auf Quantität und Funktionalität der EPCs aus [221-223]. Letztlich werden EPCs auch direkt und indirekt durch Hormone beeinflusst [224, 225]. Des Weiteren üben pharmakologische Substanzen, die auch bei der Behandlung der Herzinsuffizienz bzw. bei Patienten nach stattgehabtem MI Verwendung finden, positive Effekte aus [226]. So z.B. *angiotensin converting enzyme (ACE)*-Inhibitoren [227], β -Blocker [228], Statine/ *β -hydroxymethyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA)*-Reduktase-Hemmer [229]. Weitere Beispiele sind *granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF)* [230, 231], Erythropoetin [232, 233] oder Parathormon [234, 235]. Auch für die Substanzklassen der DPP-IV-Inhibitoren/Gliptine und PPAR- γ -Rezeptor-Agonisten/Glitazone oder Thiazolidindione, die therapeutisch bei Diabetes mellitus eingesetzt werden, sind positive Effekte auf die Zahl und Funktionalität zirkulierender EPCs nachgewiesen

[236]. Zu den letztgenannten Substanzen zeigten Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe sowohl präklinisch als auch klinisch positive therapeutische Effekte nach MI [237-239].

I.3.6. Einfluss eines Diabetes mellitus auf EPCs und die Endothelhomöostase

Der Diabetes mellitus ist eine chronisch progrediente Erkrankung, die durch Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung charakterisiert ist. Die Relevanz des Typ-2-Diabetes ergibt sich aus der hohen Erkrankungshäufigkeit, den individuellen Belastungen der krankheitsassoziierten Morbidität und den mit der Erkrankung verbundenen Ausgaben im Gesundheitssystem [240]. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus ist einer der Hauptpathogenitätsfaktoren für die Entwicklung der Atherosklerose und somit auch für die Entstehung einer KHK. Die kardiovaskulären Sekundärkomplikationen des Diabetes mellitus, die sich in Form von Mikro- und Makroangiopathien manifestieren, werden letztlich als Kardinalursache für die krankheitsassoziierte Morbidität und Mortalität angesehen [241]. Oft ist die prädiabetische und diabetische Stoffwechsellage mit einer Dyslipidämie, einer arteriellen Hypertonie sowie einer Hyperkoagulabilität vergesellschaftet (metabolisches Syndrom). Alle Faktoren potenzieren sich dabei in ihren negativen Effekten auf die Endothelhomöostase und sind pathogenetisch verantwortlich für die Entstehung und Progression atherosklerotischer Gefäßveränderungen [242]. Nach in den von der AHA herausgegebenen Statistiken *Heart Disease and Stroke Statistics* sterben etwa 68% der über 65 Jahre alten Patienten mit Diabetes mellitus an einer Herzerkrankung [243]. Die Sterblichkeit bei Patienten mit Diabetes mellitus und Herzerkrankung liegen um den Faktor 2 bis 4 höher als bei Patienten ohne Diabetes [244]. Die immense sozioökonomische Bedeutung des Diabetes mellitus lässt sich aus der hohen Prävalenz und den assoziierten, häufig schwerwiegenden Komplikationen ableiten [245]. Im Jahr 2008 litten global etwa 347 Millionen Menschen an einem Diabetes mellitus. Hinzu kommen eine nicht unerhebliche und gleichzeitig schwer schätzbare Zahl von Menschen mit einem metabolischen Syndrom als einer Vorstufe des Diabetes mellitus Typ II. Aufgrund einer erheblichen Anzahl nicht diagnostizierter Fälle kann von einer hohen Dunkelziffer ausgegangen werden. Schätzungen zufolge wird sich die Zahl der Diabetiker in den kommenden Jahrzehnten mehr als verdoppeln [246]. Aktuelle Untersuchungen für die Bundesrepublik Deutschland ergeben eine Prävalenz von 7,2 % der Erwachsenen im Alter von 18–79 Jahren beziehungsweise 4,6 Millionen mit einem bekannten, ärztlich diagnostizierten Diabetes (Männer 7,0 %, Frauen 7,4 %). Die Prävalenz steigt ab dem 50. Lebensjahr deutlich und kontinuierlich bis auf über 20 % in der Altersgruppe 70–79 Jahre an [247]. Der spezifische Einfluss eines Diabetes mellitus auf die Endothelhomöostase sowie die Pathogenese und Progression der Atherosklerose ist bekannt. Fernerhin sind negative Effekte einer diabetischen Stoffwechsellage auf Quantität und Funktionalität zirkulierender EPCs mittlerweile durch mehrere Studien belegt. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus oder einer

Insulinresistenz induziert ein breites Spektrum biochemischer Alterationen. Dabei ist die mit einer diabetischen Stoffwechsellage einhergehende, längerfristig bestehende Hyperglykämie mit der Entstehung nichtenzymatisch glykosylierter Proteine (*advanced glycation end-products (AGE)*) verknüpft. Dies führt u.a. zu einer Steigerung der NADPH-Oxidase-Aktivität mit Produktion reaktiver Sauerstoffmoleküle und gesteigertem oxidativem Stress, reduzierter NO-Bioverfügbarkeit sowie einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren, wie TNF-alpha und Il-6 [248, 249]. Bei Patienten mit Diabetes mellitus lässt sich konsistent eine reduzierte Zahl zirkulierender EPCs feststellen. Wie Kusuyama et al. an Patienten mit neudiagnostiziertem Diabetes mellitus zeigen, korreliert die Zahl der zirkulierenden EPCs dabei mit dem HbA1c-Level und der Schwere der Erkrankung [250]. Funktionell zeigen diabetische EPCs eine reduzierte proliferative und migratorische Kapazität, gesteigerte Apoptoseraten, eine eingeschränkte Adhäsivität sowie ein beeinträchtigtes zielgerichtetes *homing* mit nachfolgend verminderter Inkorporation der Zellen in Bereichen endothelialer Schädigungsorte [251]. Außerdem zeigen EPCs eine reproduzierbare Funktionseinschränkung, wenn sie in vitro erhöhten Glukosespiegeln ausgesetzt werden [252]. Fernerhin scheint die Ausdifferenzierung diabetischer EPCs in reife Endothelzellen defizient zu sein. Endresultat aller funktionellen Veränderungen ist letztlich eine geringere Neovaskularisations- und Reendothelialisierungskapazität [253]. Damit ist das Vorliegen eines Diabetes mellitus für zelltherapeutische Ansätze bei Patienten mit myokardialer Schädigung von relevanter Bedeutung.

I.3.7. Präklinische Studien mit EPCs

Eine therapeutische Applikation von Stammzellpopulationen des Knochenmarks und EPCs wurde in zahlreichen tierexperimentellen Studien untersucht. Dabei trugen EPCs maßgeblich zur Regeneration von durch Ischämie kompromittierten Gefäßen und Geweben bei. So konnte der Effekt einer verbesserten Neovaskularisation nach Gabe von EPCs bei MI beobachtet werden [254, 255]. Auch in Hinterlaufischämie modellen zeigte sich eine verbesserte Reperfusion und Regeneration des ischämisch geschädigten Gewebes [230]. Das anfänglich vermutete ausgeprägte kardiale Transdifferenzierungspotenzial von Stammzellpopulationen aus dem Knochenmark wurde nach initialen Berichten [82, 83] bereits früh angezweifelt und wird seither äußerst kontrovers diskutiert [84, 85, 256]. Als Grund möglicher Fehlinterpretationen werden u.a. Fusionseffekte zwischen nativen Kardiomyozyten und applizierten Stammzellen sowie methodische Artefakte vermutet [257]. In der Folge konnten weitere, mehrere voneinander unabhängige tierexperimentelle Studien in Modellen einer akuten bzw. chronischen Myokardischämie positive Effekte durch intrakoronar respektive intramyokardial transplantierte Knochenmarkstammzellen sowie EPCs dokumentieren [258-260]. Als mehr oder minder akzeptiert gilt mittlerweile, dass der Mechanismus eines kardiomyozytären

Transdifferenzierungspotentials adulter Stammzellen, im Gegensatz zu den pluripotenten Stammzellen, wohl keine wesentliche Rolle für die beobachteten positiven Effekte auf die kardiale Funktion spielt. Vielmehr scheinen parakrine Mechanismen, die insbesondere günstigen Einfluss auf Kardioprotektion, Apoptose, Remodeling und Neovaskularisation ausüben, für die Funktionsverbesserungen verantwortlich zu sein [86, 261].

In einem kürzlich veröffentlichten Übersichtsartikel zeigte sich in der Meta-Analyse von insgesamt 52 Studien mit 888 Großtieren (23 Studien mit einem kardialen Ischämie/Reperusionsmodell und 29 Studien mit dem Modell einer chronischen Koronarokklusion), dass sich das Ausmaß der positiven Effekte bei Großtieren weitestgehend mit denen beim Patienten beobachteten Effekten deckt (siehe nächstes Kapitel/Einleitung). Im Endpunkt LVEF ließ sich ein Unterschied von 7,5% gegenüber der Kontrollgruppe konstatieren (95% Konfidenzintervall, 6,2-8,9%; $P < 0.001$). Nach 8 Wochen reduziert sich der Effekt auf die Pumpfunktion auf 6%. Als signifikante Prädiktoren für eine Verbesserung der LVEF konnten u.a. Lokalisation des Infarktes (LAD 8,0% vs. LCX 5,8%; $p=0,045$) identifiziert werden. In der Sensitivitätsanalyse zeigt sich ein Trend für eine höher ausfallende Pumpfunktionsverbesserung bei einer Transplantation höherer Zellzahlen, in Modellen einer chronischen Ischämie sowie bei späteren Injektionen (>1 Woche nach Infarkt) [262].

I.3.8. Klinische Studien mit EPCs

Adulte, mononukleäre Stamm- und Progenitorzellen sind nach den ersten vielversprechenden Ergebnissen tierexperimenteller Studien bereits früh in klinischen Studien für eine zellbasierte Therapie der ischämischen Kardiomyopathie untersucht worden. Mittlerweile dokumentieren die Daten mehrerer Metaanalysen insbesondere die Durchführbarkeit und Sicherheit der Therapie mit Knochenmarkzellen in der Behandlung des akuten MIs (siehe Tabelle). Bezüglich einer Verringerung kardialer Ereignisse zeigte eine Metaanalyse bei den mit Knochenmarkzellen behandelten Patienten keine vermehrten unerwünschten Ereignisse und sogar einen Trend zu einer Reduktion der Reinfarktrate. In der REPAIR-AMI-Studie (Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction) mit 204 Patienten wurde eine signifikante Reduktion der Mortalität, Rehospitalisierung wegen Herzinsuffizienz und wiederholter Revaskularisationen dokumentiert [94, 95]. Hinsichtlich der therapeutischen Effekte lässt sich in allen bisher durchgeführten Metanalysen eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion konstatieren. Gegenüber den jeweils unbehandelten Kontrollgruppen findet sich eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) von ca. 3-4%. Korrelierend dazu kann eine Reduktion der Infarktgröße sowie eine Reduktion der endsystolischen und enddiastolischen Ventrikelvolumina festgestellt werden. Regressionsanalysen weisen zudem

darauf hin, dass gerade die Subgruppe der Patienten mit ausgedehnteren Infarkten und initial gravierenderer Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion (LVEF <45%) von der Zelltherapie zu profitieren scheint. Ebenso korrelierte die Anzahl der injizierten Zellen mit dem Ausmaß der Pumpfunktionsverbesserung [263-268]. Die Transplantation von Knochenmarkzellen hat nachgewiesenermaßen positive Einflüsse auf die koronare Flussreserve [269]. Kritisch ist anzumerken, dass in 3 Studien entweder kein oder ein lediglich vorübergehender, nicht über die ersten 6 Monate persistierender Effekt auf die LVEF, beobachtet werden konnte [270-272]. **Tabelle 1** zeigt die Ergebnisse größerer Metanalysen der relevanten klinischen Studien im Überblick.

Zusammenfassend lässt sich trotz kontroverser Diskussionslage festhalten, dass aktuell weitestgehend Konsensus in der Wissenschaftsgemeinde darüber besteht, dass das Sicherheitsprofil der myokardialen Stammzelltherapie mit adulten Stammzellpopulationen prinzipiell günstig ist. Die myokardiale Zelltherapie ist mit positiven Effekten assoziiert, welche insgesamt jedoch als moderat und inkonsistent einzustufen sind. Dabei bleiben die in klinischen Studien beobachteten Funktionsverbesserungen hinter den durch tierexperimentelle Studien geweckten Erwartungen zurück. Die Dauerhaftigkeit der günstigen Effekte im Langzeitverlauf erscheint fernhin immer noch fraglich [273]. Limitiert wird eine schlüssige Interpretation der Studienergebnisse angesichts der Tatsache, dass es sich bei den eingesetzten Zellpräparationen um sehr heterogene (unterscheidliche Zellzahl und Zelltypen, unterschiedliche Aufarbeitung) und zumeist um unfraktionierte/unselektionierte Zellpopulationen gehandelt hat, was einen direkten Vergleich der Studienergebnisse erschwert.

EINLEITUNG

	Lipinski et al. 2007 [263]	Martin-Rendon et al. 2008 [264]	Abdel-Latif et al. 2007 [265]	Zimmet et al. 2012 [266]	Jeevananthan et al. 2012 [267]
Klinisches Szenario	AMI	AMI	AMI/ICM	AMI	AMI/ICM
Zelltypen	BM-MNC, PB-MNC	BM-MNC	BM-MNC, PB-MNC, EPC, MSC	BM-MNC	BM-MNC, EPC, MSC
Anzahl d. Studien	10	13	18	23	50
Studiendesign	RCT	RCT	RCT/Kohorte	RCT	RCT/Kohorten
Anzahl d. Patienten	698	811	999	1830	2625
Follow-up-Dauer	3-18 Monate	3-6 Monate	3-18 Monate	3-18 Monate	3-48 Monate
Zellzahl	3,8x10 ⁷ - 2,46x10 ⁹	1x10 ⁷ - 2,46x10 ⁹	2x10 ⁶ - 2,9x10 ⁸	1,25x10 ⁷ - 2,46x10 ⁹	5x10 ⁶ - 2,46x10 ⁹
Applikation	IC	IC	IC, IM	IC	IC, IM
Δ LVEF [%] (Therapie vs. Kontrolle)	+3% 95% CI: +1,9;+4,2 p<0,001	+2,99% 95% CI: +1,26;+4,72 p=0,0007	+3,66% 95% CI: +1,93;+5,40 p<0,001	+2,70% (3-6 Monate) 95%CI: +4,48;+3,92 p<0,001 +3,31 (12-18 Mo.) 95% CI: +1,87;+4,75 p<0,001	+3,96% 95% CI: +2,90;+5,02 p<0,00001
Δ Infarktgröße [%] (Therapie vs. Kontrolle)	-5,6% 95%CI: -8,7;+2,5 p<0,001	-3,51% 95%CI: -5,91;+1,1 p=0,004	-5,49% 95% CI: - 9,10;+1,88 p=0,003	NR	-4,03% 95% CI: -5,47;- 2,59; p<0,00001
Δ LVESV [ml] (Therapie vs. Kontrolle)	-7,4ml 95% CI: -12,2;+2,7ml p=0,002	-4,74ml 95% CI: -7,84;+1,64 p=0,003	-4,80ml 95% CI: -8,20;-1,41 p=0,006	-3,31ml (3-6 Monate) 95% CI: -5,98;-1,04 p=0,005 -4,61ml (12-18 Mo.) 95% CI: -8,33;-0,89 p=0,015	-8,91ml 95% CI: -11,57;-6,25 p<0,00001
Δ LVEDV [ml] (Therapie vs. Kontrolle)	-4,6ml 95% CI: -10,4;+1,1 p=0,11	-2,47ml 95% CI: -5,6;+0,7 p=0,13	-1,92ml 95% CI: -6,31;+2,47 p=0,39	-3,39ml (3-6 Monate) 95% CI: - 5,92;-0,86 p=0,009 -5,49ml (12-18 Mo.) 95% CI: -14,1;+2,22 p=0,15	-5,23ml 95% CI: -7,60;2,86 p<0,00001

Tabelle 1 Zusammenfassende Übersicht systematischer Reviews und Meta-Analysen zur Stammzelltherapie bei Myokardinfarkt. AMI: akuter Myokardinfarkt; BM-MNC: Knochenmarkstammzellen; CI: Konfidenzintervall; EPC: Endotheliale Progenitorzellen; IC: intrakoronar; IM: intramyokardial; MSC: mesenchymale Stammzellen; PB-MNC: zirkulierende, mononukleäre Zellen; RCT: randomisierte, kontrollierte Studie.

I.4. Fragestellung und Versuchsaufbau

Die bislang in klinisch eingesetzten, aus peripherem Blut und Knochenmarkspirat isolierten Zellen entsprechen den sog. CFU-ECs bzw. CACs, von denen man mittlerweile weiß, dass sie ihre therapeutischen Effekte durch parakrine Beeinflussung des Infarktmodelings und der Angiogenese entfalten. Bei der überwiegenden Mehrzahl der bis dato durchgeführten Studien kam dabei unfraktioniertes Knochenmark zum Einsatz. Eine nähere Charakterisierung homogener Zellpopulationen sowie der für die positiven Effekte verantwortlichen Mechanismen in präklinischen Modellen erscheint daher sinnvoll. ECFCs liefern eine sehr homogene Zellpopulation und gelten aktuell als einzige Stammzellpopulation, die der Definition einer bona fide EPC entsprechen. Bislang wurden sie noch wenig zum Zwecke der kardialen Regeneration charakterisiert. Da es sich bei den typischen Zielpatienten um Individuen mit reduzierten zirkulierenden Vorläuferzellzahlen handelt, wäre eine Zellart, die sich in Kultur auf eine Vielfaches expandieren ließe, wie es bei den ECFCs der Fall ist, wünschenswert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die kardioregenerativen Effekte einer intramyokardialen Transplantation von humanen EPCs vom Typ ECFC in einem murinen Infarktmodell evaluiert. Durch Verwendung eines xenogenen (Mensch auf Maus) und gleichzeitig immunsupprimierten Mausmodells sollen Mechanismen der Wirkungsweise humaner Zellen im Tiermodell untersucht werden. Im Fokus lagen dabei die Effekte auf hämodynamische Parameter sowie Einflüsse auf das kardiale Postinfarktremodeling und die Stimulation kardial-residenter Stammzellpopulationen.

Im Einzelnen sollte auf folgende Fragestellungen eingegangen werden:

1. Hat die Transplantation von EPCs vom Typ ECFC im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe einen positiven Effekt auf die hämodynamische Funktion nach Myokardinfarkt.
2. Effekte der transplantierten Zellen auf das myokardiale Infarktremodelling sowie die Neovaskularisation im Infarkttrandbereich
3. Kommt es nach Zelltransplantation zu einer Zunahme der Zahl gewebeständiger Stammzellen im Herzen und zu einem gesteigerten Einwandern („Homing“) zirkulierender Vorläuferzellen ins postischämische Myokard
4. Können im Rahmen einer Subgruppenanalyse Unterschiede in den Therapieeffekten zwischen Zellen, die entweder von Typ-II-Diabetikern oder von nicht an Typ-II-Diabetes erkrankten Patienten stammen, eruiert werden.

Abbildung 8 zeigt das gewählte Versuchsdesign.

EINLEITUNG

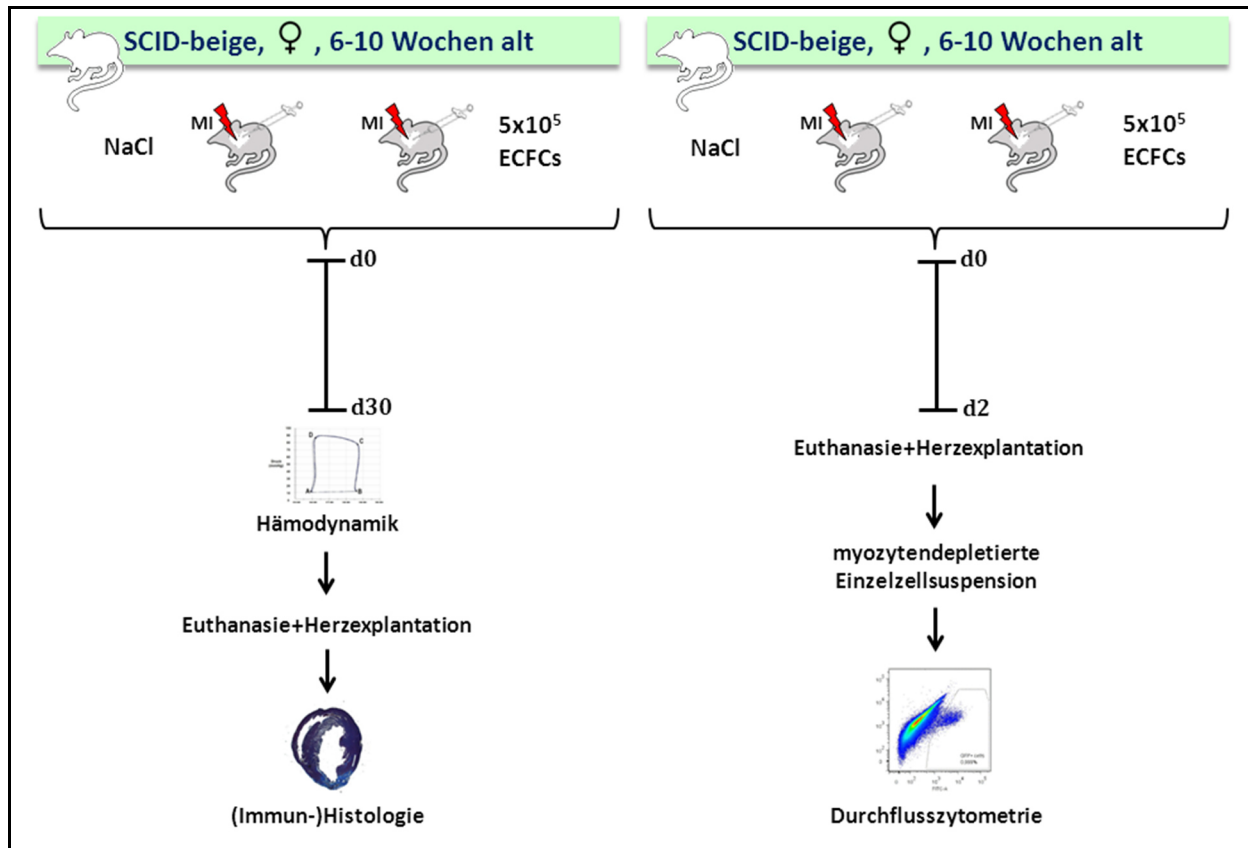


Abbildung 8 Zweiarmer Versuchsaufbau mit den Endpunkten Hämodynamik und Histologie an Tag 30 bzw. Durchflusszytometrie an Tag 2 nach Infarktinduktion zur Quantifizierung möglicher Therapieeffekte durch Zellbehandlung.

II. MATERIAL UND METHODEN

II.1. Material

II.1.1. Allgemeine Chemikalien, Lösungsmittel, Puffer, Medien und Enzyme

- Aqua ad injectabilia (B Braun, Melsungen, Deutschland)
- Bovines Serumalbumin/BSA (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Cellpack (Sysmex Deutschland, Norderstedt, Deutschland)
- Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Clenz-Lösung (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
- EDTA/Ethylendiamintetraacetat (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Eisessig, Acetic acid glacial (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Endothelial Basal Medium, EBM2 (Cambrex, Walkersville, USA)
- Ethanol 96 %, vergällt (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fibronektin (5 µg/cm², Cell Systems Biotechnologie, St. Katharinen)
- Ficoll-Paque PLUS (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Uppsala, Schweden)
- Formalin/Formaldehyd 4 % (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- H₂O dest. (Millipore, Billerica, USA)
- H₂O₂, 7,5% (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Isopropanol/2-Propanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Isotone Natrium-Chlorid-Lösung (B Braun, Melsungen, Deutschland)
- Kaiser's Gelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Kollagenase Typ IV 0,1% (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- PBS/Phosphate Buffered Saline (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Sheath-Fluid (Beckmann Coulter, Fullerton, USA)
- TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- TBS/TRIS-buffered Saline (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- 7-Aminoactinomycin D (5 µl/ml 7-AAD, BD Bioscience, USA)
- Trypsin-EDTA 0,25%/0,35g/L (Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in pro-Analysis-Qualität (von höchstem Reinheitsgrad) bezogen.

II.1.2. Versuchstiere

Für alle Versuche wurden weibliche Mäuse der Linie Fox Chase SCID beige in einem Alter von 6-10 Wochen und einem Gewicht von 15-20g verwendet. Die Tiere wurden entweder über die Firma Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) beschafft oder in der institutseigenen Tierzucht in Isolation gezüchtet.

II.1.3. Utensilien und Instrumentarium für die operativen Prozeduren

- 3M™ Durapore™, Silkpflaster 1.25cm x 9.1m (3M, Neuss, Deutschland)
- BD Microlance™ 3 ®-Einmal-Injektions-Kanülen (0,9 x 40mm und 0,3 x 13 mm) (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- BD plastipak™, Spritzen, 1 ml (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Braunol®- Lösung, Haut-Schleimhautantiseptikum (B Braun, Melsungen, Deutschland)
- Chirurgisches Nahtmaterial (Ethicon, Norderstedt, Deutschland):
 - Ethibond excel® 5-0
 - Prolene® 8-0
- Chirurgisches Operationsbesteck (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- Elca® med, Enthaarungscreme (Asid Bonz, Herrenberg, Deutschland)
- Feather disposable Scalpel No. 11 (Feather safety razor Osaka, Japan)
- Hamilton-Injektionsspritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz)
- Haushaltsfaden cotton (Gütermann, Gutach, Deutschland)
- Infrarotleuchte IR10 (WMF Consumer Electric, Burgau, Deutschland)
- Pagasling®, Tupfer steril (Hartmann, Heidelberg, Deutschland)
- Raucotupf®, Saugtupfer steril (Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland)
- Sempercare®, Schutzhandschuhe unsteril (Semperit, Wien, Österreich)
- SUGI®, dreieckige Saugtupfer unsteril (Kettenbach Medical, Eschenburg, Deutschland)
- Zelletten®, Zellstoff- Tupfer (Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Deutschland)

II.1.4. Pharmaka

- Cefuroxim-Na/Cefuroxim® 250 mg (Curasan, Kleinostheim, Deutschland)
- Dexpanthenol/Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- Heparin-Na/Heparin-Na® 25000 iE (B Braun, Melsungen, Deutschland)
- Ketaminhydrochlorid/Ketamin-Inresa®5% (Inresa, Freiburg, Deutschland)
- Buprenorphin/Temgesic® (Essex Pharma, München, Deutschland)
- Xylazinhydrochlorid/Rompun® 2% (Bayer, Leverkusen, Deutschland)

II.1.5. Antikörper

- Avidin-Biotinylated enzymeComplex-Goat IgG (Vector, Burlingame, USA)
- CD31/PECAM-1, PE-konjugiert, anti-mouse (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- CD31, Biotin-konjugiert, anti-mouse (Sigma, St. Louis, USA)
- CD34, FITC-konjugiert, anti-mouse (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- CD34, rat anti- mouse (Linaris, Wertheim, Deutschland)
- CD34 MicroBeads, mouse anti-human IgG (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland)
- CD45, PerCP-konjugiert, anti-mouse (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- CD45, rat anti- mouse (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- CD309/VEGFR2, Flk-1, KDR, PE, anti-mouse (BD Pharmingen, Heidelberg)
- c-kit, PE, anti-mouse (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- CxCr4, CD184; PE, anti-mouse (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- FITC, Rat IgG2a k, isotyp control (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- HLA, mouse anti-human HLA-A, B, C (WAK-Chemie, Steinbach, Germany)
- Iso A, PE IgG2a k BD (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Iso B, PE IgG2B k BD (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- LFA-1, beta2-Integrin, PE, anti-mouse (BD Pharmingen, Heidelberg)
- PerCP, Rat igG2b k, isotyp control (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Sca-1, PE, anti-mouse (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Vimentin, mouse anti-human (Dako, Glostrup, Denmark)
- VLA-4, Integrin-alpha4-beta1, PE, anti-mouse (BD Pharmingen, Heidelberg)

II.1.6. Histochemische Färbelösungen

- Accustain Trichrom Farbstoff (Sigma, St. Louis, USA)
- Antigen-Retrieval-Lösung (Dako, Glostrup, Denmark)
- Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Methode („ABC“, Vektor, Burlingame, USA)

Mayers Hematoxylin Solution und Eosin Solution (Sigma, St.Louis, USA)

II.1.7. Geräte und Utensilien anderer Funktion und Verwendung als oben erwähnt

- Eppendorfbehälter 1,5 ml/2ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Certomat K, Rundschüttler (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Coulter Epics XLMCL Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
- FACS-Röhrchen (5 ml Sarstedt, Numbrecht, Deutschland)
- Falcon Flask T12,5/25/75 (BD Bioscience, Bedford, USA)

MATERIAL UND METHODEN

- Finnpipette (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Finntip Stepper 5,0ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Gefrierschrank Hera freeze -80°C (Heraeus Holding, Hanau, Deutschland)
- Intraoperatives Tierbewärmungssystem IOW-3703 (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland), bestehend aus Temperaturmeßfühler Pt-100 und Temperatur-Kontrollmodul TKM-0902
- Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500 LCD (Opto, Gräfelfing, Deutschland)
- Kühl-/Gefrierschrankkombination Premium (Liebherr, Biberach, Deutschland)
- MACS Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland)
- Mouse-Ventilator Minivent® 845 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- Mikroskop Axiovert 200 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Mikroskop-Photokamera Axio Cam HRc (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Mikrowelle Microwave 800 (Severin Elektrogerate, Sundern, Deutschland)
- Millar Aria Pressure-Volume-Conductance System (Millar Instruments, Houston, TX, USA)
- Millar Tip-Katheter (1.4 French) (Millar Instruments, Houston, TX, USA)
- Multipipette (20-200µl) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Neubauer-Zählkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- OP- Mikroskop Stemi® 2000 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Pipetten 2,5/20/200/1000µl + Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Schüttelgerät Polymax 10/40 (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland)
- Ultraschallhomogenisator Sonopuls (Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland)
- Vortex-Genie Mixer (Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA)
- Waage Scout Pro (Ohaus, Giessen, Deutschland)
- Wasserbad W12 (Medingen, Freital, Deutschland)
- Zentrifuge Biofuge fresco (Heraeus Holding, Hanau, Deutschland)
- Zentrifugen BR 4 Mikro 20® Jouan (Unterhachingen Hettich, Bäch, Schweiz)
- Zentrifuge Centrifuge 5415 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge Multifuge 3 L-R (Heraeus Holding, Hanau, Deutschland)

II.1.8. Hard- und Software

- Adobe Photoshop, Version 9.0 (Adobe, San Jose, CA, USA)
- Axio Vision, Version 4.3 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Dell Desktop PC Optiplex GX 260 (Dell, Round Rock, TX, USA)
- Endnote, Version X6 (Thompson Reuters, Carlsbad, CA, USA)
- Excel/Word/Powerpoint; Office Professional 2010 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA)

- HSE Isoheart (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- MPCU2PV.exe (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- PVAN 2.9. (Millar Instruments, Houston, TX, USA)
- SPSS Statistics, Version 21 (IBM, Armonk, NY, USA)

II.2. Methoden

II.2.1. Isolation CD34-positiver mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut und ECFC-Generierung

Die Gewinnung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen wurde von unserem Kooperationspartner (Arbeitsgruppe um Frau Prof. Ilka Ott) vorgenommen. Dabei wurden nach vorheriger Aufklärung und Einwilligung zur Studienteilnahme insgesamt 100ml Blut aus einer peripheren Vene von Patienten entnommen, die wegen einer KHK (stabile, instabile Angina pectoris oder akuter MI (>2 Tage nach MI)) an der Klinik für Herz-Kreislaufkrankungen des Deutschen Herzzentrum München im Zeitraum Juli 2006 und Juli 2007 behandelt wurden. Personen, die an einer akuten oder chronisch entzündlichen Erkrankung (insbesondere HIV und Hepatitis), an einer aktiven Tumorerkrankung oder einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz (NYHA Stadium III-IV) litten, wurden von der Studie ausgeschlossen. ECFCs einzelner Patienten wurden z.T. für mehrere Versuchstiere verwendet.

Die entnommene Blutprobe wurde innerhalb von 4 h nach ihrer Gewinnung verarbeitet und zur Separation der PBMCs einer Ficoll-Dichtezentrifugation unterzogen. Von dem Blut werden je 10 ml mit 10 ml PBS gemischt. 15 ml Ficoll-Lösung werden mit 15 ml des mit PBS verdünnten Blutes überschichtet und dann für 30 min bei 1700 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Die sedimentierte, aus Erythrozyten und Granulozyten bestehende Phase wird verworfen, der verbleibende Überstand mit den mononukleären Zellen (PBMNCs) abgenommen, mit HF-Puffer gemischt und erneut zentrifugiert (**Abbildung 9**).

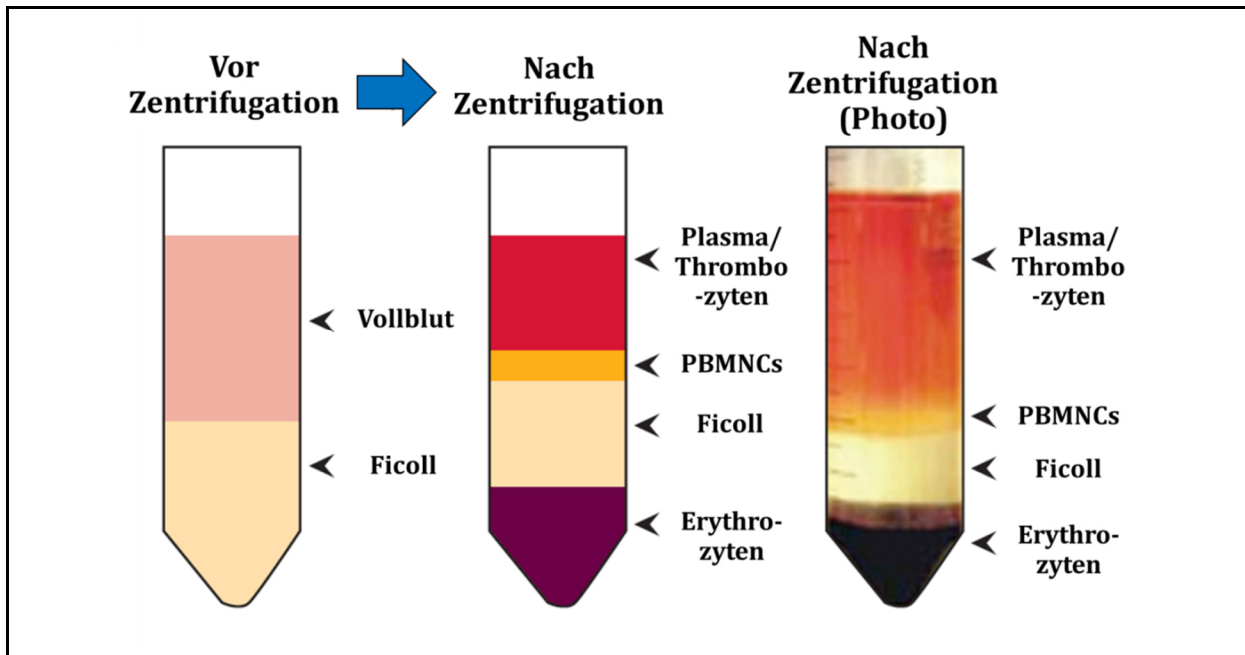


Abbildung 9 Schematische Darstellung des Prinzips der Ficoll-Dichtezentrifugation und der resultierenden Sedimentationsphasen. Modifiziert nach [274].

Zur Isolierung der CD34+ Zellen werden die resuspendierten Zellen des Pellets mit immunomagnetischen anti-CD34-Antikörpern gemischt und bei 4°C im Kühlschrank für 30 min inkubiert. Um die benötigten Zellen von den restlichen Leukozyten zu trennen, wird eine *Magnetic Cell Sorting* Säule (MACS Säule, Miltenyi Biotec) verwendet. Die mit Hilfe der *magnetic beads* markierten CD34+ Zellen adhäreren an der MACS Säule. Nachdem die Säule mehrmals mit HF-Puffer gespült wurde, wird diese aus dem Magneten entfernt und erneut mit 5 ml HF-Puffer gespült, um die sich noch in der Säule befindlichen CD34+ Zellen zu entfernen. Zum Erreichen einer höheren Zellausbeute wird dieser Vorgang idem wiederholt. Nun wird berechnet, in welchem Volumen der Suspension sich 200.000 Zellen befinden und die entsprechende Menge zum Wachstum in eine mit dem Nährmedium EBM 2 (Endothelial Basal Medium, Cambrex, Walkersville, USA, bestehend aus 20 ml FBS, 4 ml hFGF-B, 1 ml GA-1000, 1 ml hEGF, 1 ml Ascorbinsäure, 1 ml R³-IGF, 1 ml VEGF, 1 ml Heparin und 0,4 ml Hydrocortison pro 1000 ml) gefüllte und mit Fibronectin (5 µg/cm², Cell Systems Biotechnologie, St. Katharinen) beschichtete T12,5 Flasche (Falcon Flask, BD Bioscience, Bedford, USA) ausgesät (Beschichtung der Flasche vorher über 30 Minuten bei 37°C). Das Nährmedium wird dreimal pro Woche gewechselt, wobei bei jedem Wechsel kontrolliert wird, ob die Zellen adhäreren, konfluieren oder Zellhaufen bilden. Konfluieren die Zellen ausreichend, so werden sie mit Hilfe von Trypsin aus der Flasche abgelöst und mit PBS gewaschen. Ab einer Dichte von etwa 70% werden die Zellen passagiert, d.h. auf mehrere mit Kulturmedium gefüllte und mit Fibronectin beschichtete Flaschen aufgeteilt, in denen sie bis zur Transplantation verweilen.

Unmittelbar vor intramyokardialer Transplantation in das infarzierte Mausherz werden die Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst, zentrifugiert, der Überstand verworfen und 5×10^5 Zellen in 15 μ l NaCl ohne weitere Zusätze resuspendiert.

II.2.2. Tierversuchsgenehmigung, Versuchstiere und Tierhaltung

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden Tierexperimente an der Maus entsprechend den Vorschriften des Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt und im Vorfeld von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchsantrag AZ: 209.1/211-2531-117/02). Die Unterbringung der Tiere sowie alle nachfolgend beschriebenen Versuche erfolgten am Institut für Chirurgische Forschung (jetzt: Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin) der Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Grosshadern. Alle verwendeten Versuchstiere gehören dem Mausstamm Fox Chase SCID/beige mit der genetischen Nomenklatur C.B.17/B6-Prkdcscid Lyst bg/Crl an. Die phänotypisch albinotische Maus trägt die beiden homozygoten, autosomal rezessiven Mutationen scid (Prkdc scid, severe combined immunodeficiency) und beige (Lyst bg, Lysosomal Trafficking Regulator Gen).

Die Mauslinie wurde von Croy et al. an der Universität zu Guelph durch eine Kreuzung von CB17 Cg Prkdcscid und C57BL/6 Lyst bg generiert. Die Scid-Mutation wurde durch Bosma et al. am Fox Chase Cancer Center in der Inzuchtlinie C.B.17/lcr entdeckt und in der Folge weiter charakterisiert. Das in der SCID Beige Maus homozygot mutierte Gen Scid kodiert dabei für eine katalytische Untereinheit einer DNA-abhängigen Proteinkinase, die zur Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen gehört und maßgeblich an der sog. V(D)J-Rekombination, einem genetischen Umlagerungsprozess beteiligt ist, der für die Variabilität von Antikörpern, B- sowie T-Zell-Rezeptoren von entscheidender Bedeutung ist. Folglich ist die Differenzierung funktioneller B- und T-Lymphozyten massiv gestört respektive aufgehoben. Somit sind sowohl humorale als auch zelluläre Immunität defizient, die lymphatischen Organe sind unterentwickelt, es kommt zu einer Lymphopenie und einer Hypoimmunoglobulinämie [275-277]. Die murine, homozygote Mutation *beige*, die beim Menschen homolog zu einem Chediak-Higashi-Syndrom führt, bedingt eine Defizienz natürlicher Killerzellen und eine gestörte zytotoxische T-Zell-Antwort sowie einen partiellen okulären und kutanen Albinismus [278, 279]. Zwar prädisponiert das Vorliegen beider Mutationen und die daraus resultierende Immunsuppression die Tiere für opportunistische Infektionen, jedoch eignet sich die SCID/beige-Mauslinie hervorragend für Experimente mit heterologen Zell- und Gewebetransplantaten [280]. Durch das Vorliegen der gesteigerten Infektanfälligkeit müssen spezielle Haltungsbedingungen eingehalten werden, um die Tiere vor mikrobiellen Kontaminationen zu schützen. Die Unterbringung der Tiere vor Durchführung der Versuche erfolgt in Makrolon-Standardboxen zu je maximal 5 Tieren pro Box.

Für den gesamten postoperativen Zeitraum werden die Tiere einzeln untergebracht. Die Tierboxen befinden sich dabei in einem IVC-Regal („Individual Ventilated Cages“) mit individuell belüfteten Käfigeinschüben, in denen die Tiere mit gefilterter Frischluft versorgt werden und worin sie durch einen unidirektional-horizontalen, laminaren Luftstrom vor potentiell kontaminierter Raumluft geschützt sind. Die Raumtemperatur betrug konstant um etwa 24°C, die Luftfeuchtigkeit etwa 50%. Neben autoklaviertem Trinkwasser stand ihnen bestrahltes Standardfutter für Nager (sniff® Standarddiät für Ratten/Mäuse: 120 mg Vitamin E, 18 000 IU Vitamin A/kg) ad libitum zur Verfügung. Unter den beschriebenen Bedingungen werden die Tiere in einem 12-stündig alternierenden Tag- und Nachtrhythmus gehalten. Durch regelmäßiges und standardisiertes Hygienemonitoring innerhalb des Zuchtbetriebes und mikrobiologische Qualitätskontrollen wird eine Infektfreiheit der Tiere garantiert.

II.2.3. Chirurgische Infarktinduktion

II.2.3.1. Grundlagen der murinen Koronaranatomie

Beim Menschen stellt der Vorderwandinfarkt die am häufigsten auftretende Infarktform dar. Ein etabliertes Tiermodell zur Simulierung des Vorderwandinfarkts beim Menschen stellt die Induktion einer myokardialen Ischämie durch Fadenligatur des Ramus interventricularis anterior (oder „*left anterior descending*“, kurz LAD) im Mausmodell dar [281-283]. Die nach MI auftretenden akuten pathophysiologischen Veränderungen bis hin zur Entwicklung einer ischämischen Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz am Nagerherzen sind mit denen am humanen Herzen vergleichbar. Bis auf wenige geringe Unterschiede ist die Anatomie der Koronargefäße der Maus mit der des Menschen identisch. Diese Unterschiede sollten jedoch kurz umrissen werden. Bei der Maus verläuft die linke Koronararterie an der linken Fläche des Herzens bis zum Apex und gibt im Verlauf bis zu vier Äste ab und versorgt den linken Ventrikel. Die rechte Koronararterie hingegen teilt sich kurz nach ihrem Ursprung in einen an der rechten Oberfläche verlaufenden Ast zur Versorgung des rechten Ventrikels auf und gibt einen Ast zur Versorgung der septalen Myokardabschnitte ab [284, 285](siehe **Abbildung 10**). Durch die beschriebenen Eigenheiten der murinen Koronaranatomie bleibt das Septum von direkten Remodelierungsprozessen der durch Ischämie bedingten myozytären Nekrose und Inflammation verschont. Begünstigt durch die spärliche Kollateralisierung sind gut standardisierte Infarkte des Vorderwandmyokards durch die Ligatur der LAD reproduzierbar [286].

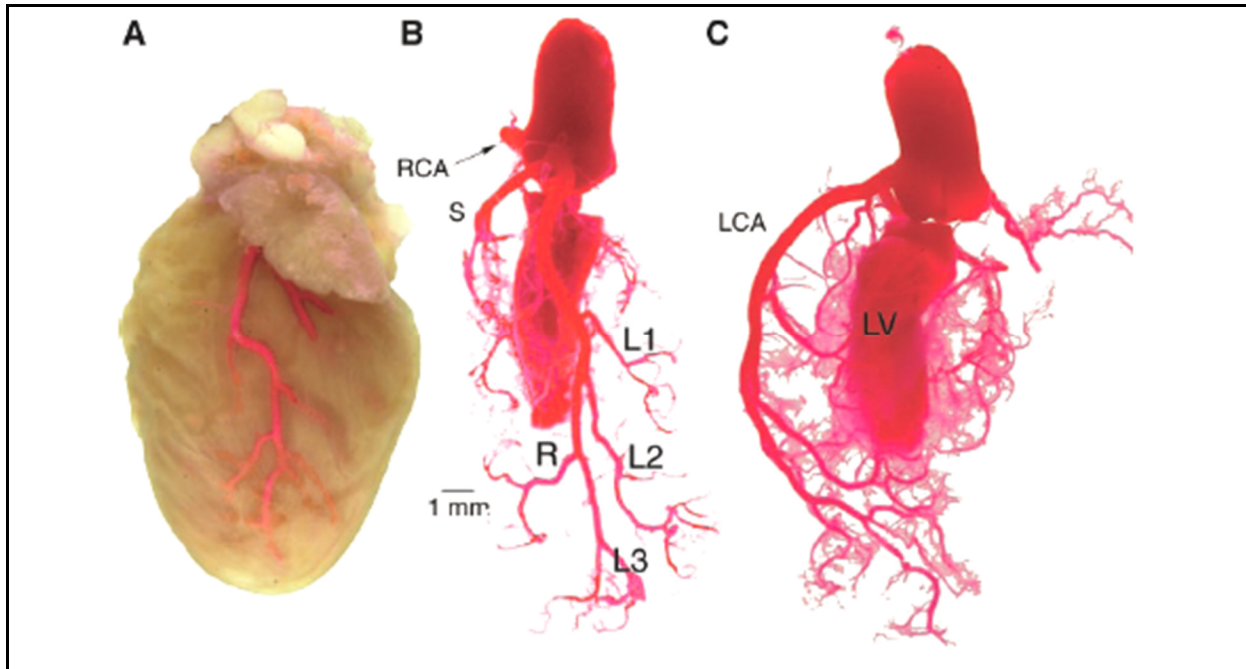


Abbildung 10 Anatomie des murinen Koronarsystems. Übernommen [286].

Abbildung 11 zeigt das typische Postinfarktremodeling eines murinen Herzens nach experimentell, durch LAD-Ligation induzierter akuter Myokardischämie.

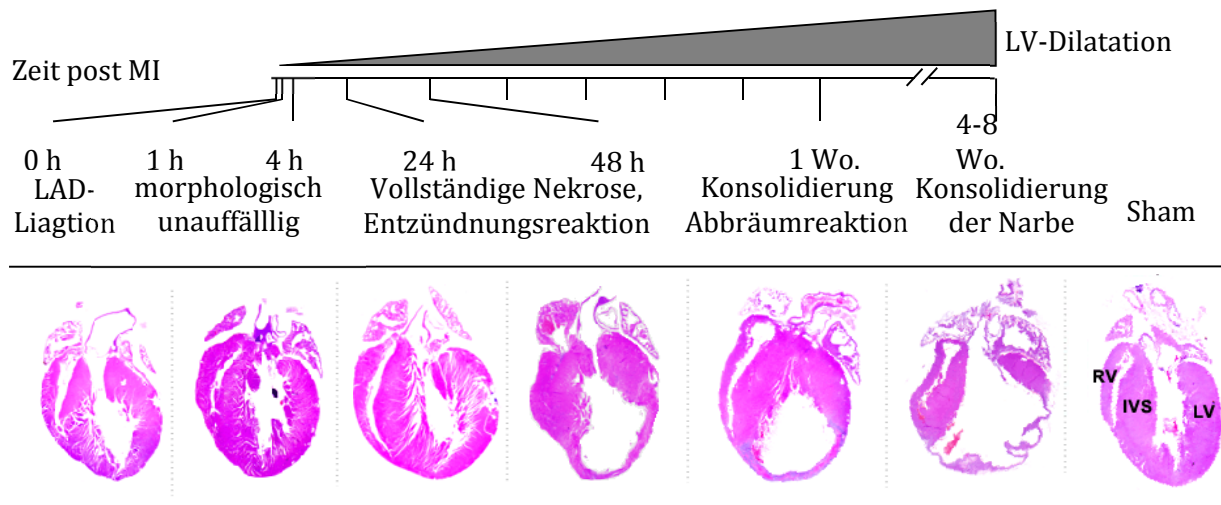


Abbildung 11 Zeitlicher Verlauf des Postinfarktremodellings in der Maus. Modifiziert nach [287]. ([www.http://cardiogenomics.med.harvard.edu/groups/proj1/pages/mi_hist.html](http://cardiogenomics.med.harvard.edu/groups/proj1/pages/mi_hist.html))

II.2.3.2. Anästhesie, Intubation und Narkoseüberwachung

Einleitung und Aufrechterhaltung der Anästhesie und Narkose der Tiere für die Dauer des operativen Eingriffs erfolgt durch intraperitoneale Injektion einer gewichtsadaptierten Dosis einer Kombination der Anästhetika Ketamin (Ketamin-Inresa®5%, 100mg/kg KG) und Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, 5mg/kg KG). Das Cyclohexanonderivat Ketamin zählt zu den

MATERIAL UND METHODEN

dissoziativen Anästhetika. Xylazin ist ein Thiazinderivat mit agonistischen Effekten am α_2 -Adrenozeptor mit kombiniert sedativer, muskelrelaxierender und analgetischer Wirkung. Xylazin potenziert dabei die anästhetischen Eigenschaften des Ketamins. Dies äußert sich in einer deutlichen Verminderung der kardialen Hämodynamik und Leistung aufgrund einer Hemmung der Sympathikus-Aktivität, sowie der myokardialen Kontraktilität, hervorgerufen durch die negativ ino- und chronotrope Wirkung des α_2 -Adrenozeptor-Agonisten Xylazin [288-290].

Nach Einsetzen einer annähernd kompletten Muskelrelaxation tritt die Phase der chirurgischen Toleranz nach weiteren 5-10 Minuten ein. Nach Wirkungseintritt der Narkose wird die Maus in Rückenlage auf eine selbstregulierende Wärmeplatte verbracht und die Extremitäten des Versuchstieres mit Klebestreifen auf dieser fixiert. Der Oberkiefer wird hinter den beiden Schneidezähnen mit einem um die Platte gespannten Gummiband retendiert. Zur Überwachung und Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wird eine Temperatursonde peranal platziert. Ein Rückkopplungssystem trägt Sorge dafür, dass die Körpertemperatur der Maus während der gesamten Operationsdauer sowie in der anschließenden perioperativen Erholungsphase bis zur schlussendlichen Extubation um physiologische 37,5°C weitestgehend konstant gehalten wird. Nach Erlöschen des Lidschlussreflexes wird zur Verhinderung einer kornealen Austrocknung Bepanthen® Augen- und Nasensalbe aufgetragen.



Abbildung 12 Die beiden Abbildungen zeigen den vorbereiteten Arbeitsplatz sowie das verwendete OP-Instrumentarium

Zur sicheren trachealen Intubation und der Verhinderung einer ösophagealen Fehlintubation wird die Halshaut auf einer Länge von etwa 0,5cm longitudinal in der Medianebene über der Trachea mit Hilfe einer Schere eröffnet. Sodann erfolgt die Darstellung des Larynx und der Trachea in ihrem Verlauf durch stumpfe Präparation des darüberliegenden Weichteilgewebes, bei dem es sich im Wesentlichen um Speicheldrüsengewebe handelt (siehe **Abbildung 13**).



Abbildung 13 Schnittführung und Präparation der prätrachealen Weichteile zur Sichtkontrolle bei der endotrachealen Intubation

Sodann wird der Unterkiefer angehoben und die Trachea unter Sicht mit einer stumpfen Metallkanüle (1.1mm Außendurchmesser) intubiert. Die korrekte Lage des Tubus kann durch die transparente Trachealwand kontrolliert werden (siehe **Abbildung 13**). Die korrekte Intubation wird durch Heben und Senken des Thorax und suffiziente Sauerstoffversorgung der Maus validiert. Das kraniale Ende der Kanüle wird über einen Gummischlauch mit einem volumengesteuertem Beatmungsgerät (Minivent 845; HugoSachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) verbunden. Je nach Größe des Tieres wurde die Maus initial mit einem Volumen von etwa 200 μ l und einer Frequenz von 150 Zügen pro Minute beatmet. Von Beginn der Beatmung an wurde der Frischluft über den Inspirationsschenkel 100%-iger Sauerstoff zugemischt. Nach erfolgreicher Intubation werden Tubus und Beatmungsschläuche sorgfältig mittels Klebestreifen fixiert. Abschließend wird der zervikale Hautschnitt über der Trachea mittels fortlaufend-überwendlicher Naht der Fadenstärke 5-0 verschlossen.

II.2.3.3. LAD-Ligation

Sorgfältig wird anschließend eine Enthaarungscreme über dem linksthorakalen Operationsgebiet aufgetragen. Nach ausreichender Einwirkzeit erfolgt die gründliche Entfernung aller Haare sowie eine rückstandsfreie Entfernung der Enthaarungscreme über dem Operationsgebiet der linksanterolateralen Thorakotomie sowie eine zweimalige Hautdesinfektion mit 70%-igem Ethanol und Povidon-Jod. Sodann wird die Maus mitsamt selbstregulierender Wärmeplatte unter das Operations-Mikroskop positioniert. Perioperativ erhalten die Tiere eine intraperitoneale Cefuroxim Injektion zur Infektionsprophylaxe (Cefuroxim 40mg/kg KG).

Konsekutiv wird die Haut linksanterolateral bogenförmig, parallel zum Verlauf der Rippen des linksseitigen, dritten Interkostalraumes auf einer Länge von etwa 10mm eröffnet. Im nächsten Schritt werden auch die darunter liegende Muskelschichten, namentlich Mm. pectorales major und minor, durchtrennt. Ventrale Anteile des Musculus latissimus dorsi und des Musculus serratus ventralis werden lateral ebenfalls durchtrennt und die Rippen freigelegt. Für eine

bessere Übersicht und um nach Abschluss der Operation eine gute Adaptation der im Verlauf der OP retrahierenden kutanen Schnittränder zu ermöglichen, werden diese stumpf mit Hilfe zweier Pinzetten nach kaudal und kranial hin mobilisiert. Der Thorax wird durch vorsichtige Durchtrennung der Interkostalmuskulatur unter unbedingter Schonung der medialseitig, parasternal verlaufenden A. mammaria interna mit Hilfe einer Mikroschere eröffnet.

Es besteht nun eine weitestgehend freie Aufsicht auf die Vorderwand des Herzens. Eine verbesserte Exposition der Ligationsstelle im Bereich des Ramus interventricularis anterior kann durch Umlagerung des Tieres von der Rücken- in eine leichte Rechtsseitenlage erreicht werden. Durch eine doppelte Umstechung mit einem geflochtenen Ethibond-Faden der Stärke 5-0 und das Aufspreizen des eröffneten Interkostalraums wird die Exposition des Herzens für die Ligation und die anschließende Injektion optimiert. Die jeweiligen Enden der Haltnähte werden mittels Klebestreifen unter Zug nach seitlich kaudal und kranial hin fixiert. Durch eine Justierung der kostalen Umstechungsfäden wird die Thorakotomie über dem Gebiet der Ligations- und der myokardialen Injektionsstelle zentriert und das dort zum Liegen kommende transparente Perikard unter Schonung der lateral liegenden Lunge eröffnet. Sodann erfolgt die nicht immer einfache Identifikation des Ramus interventricularis anterior, der zwischen der kaudalen Spitze des linken Vorhofes und des Apex liegt. Bei intramuralem Verlauf des Ramus interventricularis anterior und entsprechenden Schwierigkeiten beim Auffinden desselben kann der Verlauf durch die Darstellung des Abgangs der linken Koronararterie aus der Aorta nach Anheben des linken Herzohres abgeschätzt/extrapoliert werden. Anschließend erfolgt die Umstechung der LAD auf Höhe des ersten Drittels der Strecke zwischen kaudaler Spitze des linken Atriums und Apex mit einem nicht resorbierbaren Prolene-Faden der Stärke 8-0. Bei der Ligatur wird darauf geachtet, dass das Myokard nicht zu oberflächlich, aber auch nicht zu tief durchstoßen wird. Eine Perforation des Cavums muss wegen der Möglichkeit fataler Blutungen unbedingt vermieden werden. Nach sorgfältiger Lagekontrolle des Fadens wird das Gefäß durch mehrmaliges, vorsichtiges Knoten okkludiert. Bei korrekter Position der Ligatur zeigt sich unmittelbar nach Sistieren der Perfusion eine Abblassung des ischämischen Myokardareals im Bereich der Vorderwand, entsprechend dem Versorgungsgebiet des okkludierten Gefäßes. **Abbildung 14** zeigt Bilder vom OP-Situs im chronologischen Verlauf.

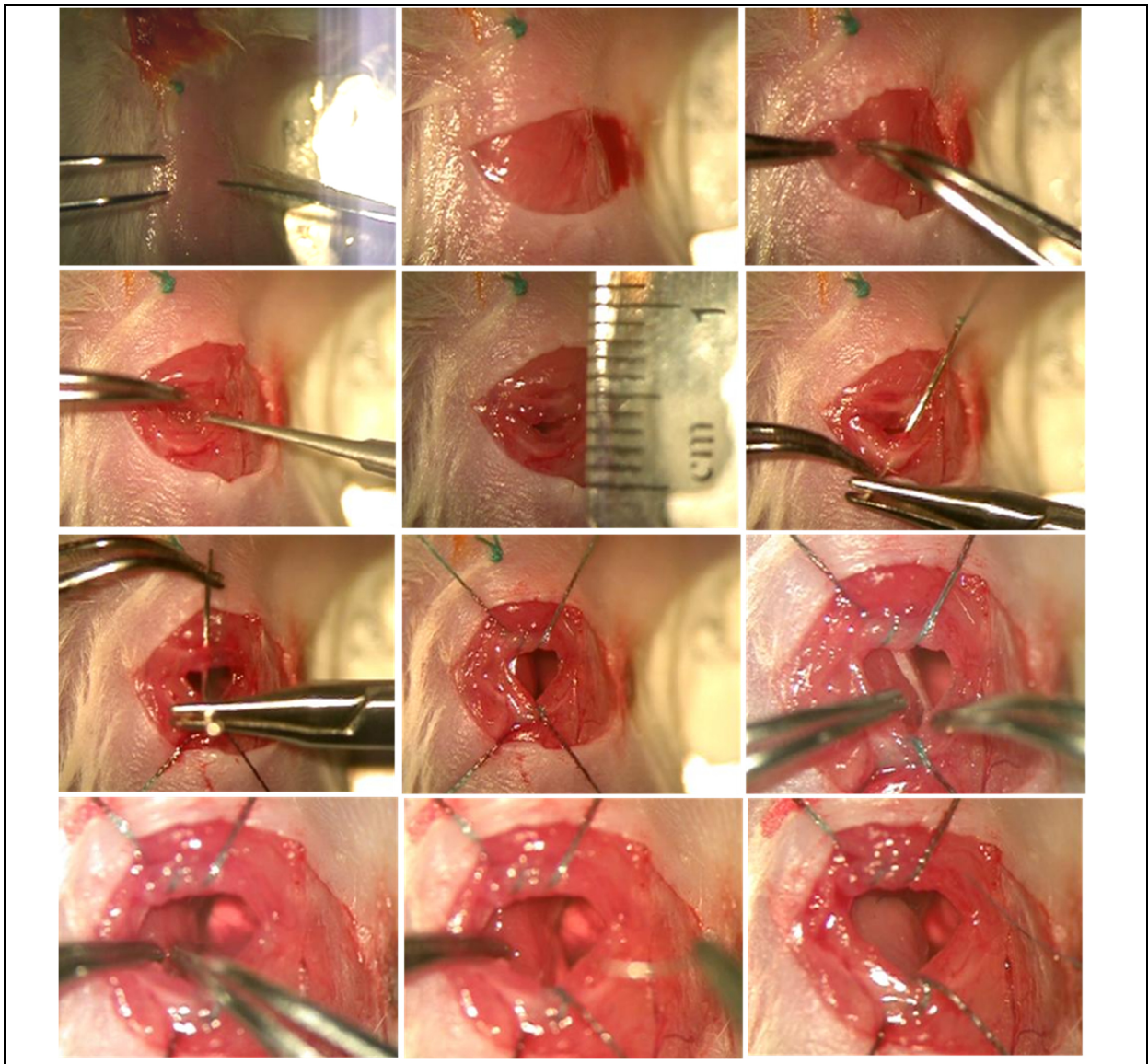


Abbildung 14 Anbringen der kostalen Haltenähte, Eröffnen des Perikards, Identifikation und Ligation der LAD mit deutlich erkennbarer myokardialer Abblassung im Bereich der Vorderwand.

Unmittelbar nach erfolgreicher Infarktinduktion wird die Injektion der Zellen (5×10^5) respektive der Kontrolllösung vorbereitet. Es erfolgen jeweils zwei Injektionen à $9 \mu\text{l}$ ins Periinfarktareal jeweils links und rechts, kaudal der der Ligationstelle. Die Injektionen werden mit Hilfe einer, speziell für die Injektion im Mikroliterbereich präparierten Spritze ($10 \mu\text{l}$, zementierte Nadel, 32G, ID $0,1 \text{ mm}$, AD $0,24 \text{ mm}$; Hamilton, Bonaduz, Schweiz) vorgenommen (siehe **Abbildung 15**). Auch hier ist darauf zu achten, dass die Injektion streng intramural erfolgt. Als wichtige visuelle Erfolgskontrolle dient dabei die Entstehung eines intramyokardialen Injektionsdepots, das sich ebenfalls, im Vergleich zum restlichen Myokard, als helleres Areal darstellt. Die zu oberflächliche Injektion führt zum Zellverlust in die Thoraxhöhle, eine versehentliche intrakavitäre Injektion ist nicht nur wegen des Zellverlustes zu vermeiden, sondern auch wegen der Gefahr embolischer

Ereignisse. Myokardiales Abblassen und intramyokardiales Injektionsdepot waren unabdingbare Kriterien für den Einschluss der Tiere in die jeweilige Gruppe.



Abbildung 15 Hamilton-Spritze (32G) zur intramyokardialen Transplantation

Unmittelbar nach erfolgreicher Injektion werden die Haltenähte zum Aufspreizen des Thorax entfernt. Anschließend erfolgt ein schichtweiser Wundverschluss. Die Thoraxhöhle wird durch Adaptation von Interkostalmuskulatur und M. pectoralis minor und Anbringen zweier Einzelknopfnähte mit Hilfe eines geflochtenen, nicht-resorbierbaren Ethibond®-Faden der Stärke 5-0 verschlossen. Der M. pectoralis major wird mit zwei Einzelknopfnähten gleichen Fadenmaterials adaptiert. Abschließend wird ebenfalls mit gleichem Fadenmaterial die Haut in fortlaufend-überwendlicher Technik verschlossen. Im Anschluss erhalten die Tiere das Morphinderivat Buprenorphin/Temgesic® in einer Dosierung von 0,05-0,1 mg/kg KG zur perioperativen Analgesie und postoperativen Schmerzprophylaxe. Die postoperative Analgesie wird durch eine Applikation von Buprenorphin s. c. gewährleistet. Die Medikamentengabe erfolgt im 8-12 Stundenintervall. Die erste Temgesic-Applikation erfolgt in etwa 20 Minuten vor Narkoseende, damit eine ausreichende Analgesie nach Aufwachen der Tiere aus der Narkose gewährleistet ist. Nach Einsetzen der Schutzreflexe wird die Maus sobald als möglich extubiert und in einen mit Zellstoff ausgelegten Makrolonkäfig gelegt. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wird der Käfig unter eine Wärmelampe positioniert. Bis zum Einsetzen erster Laufversuche wird Sauerstoff in die Tierbox insuffliert. Die Gesamtdauer der Operation von der In- bis zur Extubation beträgt in etwa 30-45 Minuten.

II.2.4. Linksherzkatheterisierung und hämodynamische Messungen

Die hämodynamische Funktion des Herzens lässt sich anhand von systolischen und diastolischen Parametern beurteilen. Während der Systole wird ein gewisser Volumenanteil der enddiastolischen Füllung des linken Ventrikels (LVEDV) als Schlagvolumen (SV) ausgeworfen, welches als Ejektionsfraktion (EF) ausgedrückt wird. Unter der Voraussetzung, dass das LVEDV mit dem enddiastolischen linksventrikulären Druck (LVEDP) - der Vorlast - korreliert, wird die Leistungskraft des linken Ventrikels definiert. Eine weitere wichtige Einflussgröße für die Herzleistung ist die Kontraktilität, d.h. die Fähigkeit der Herzmuskelfasern, sich in einer bestimmten Zeit zusammenzuziehen und dadurch einen bestimmten Druck aufzubauen. Gemäß

dem Frank-Starling-Mechanismus steigt mit zunehmender Vorlast bzw. zunehmendem linksventrikulärem, enddiastolischem Füllungsdruckdruck (LVEDP) die Kontraktionskraft und damit die Auswurfleistung des linken Ventrikels. So lässt sich die Kontraktilität anhand der nachlastabhängigen Ejektionsfraktion sowie der vorlastabhängigen maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit ($\Delta P/\Delta t_{\max}$) beschreiben. Ein weiterer von der Vorlast und Nachlast unabhängiger Parameter ist die sogenannte Schlagarbeit des linken Ventrikels („stroke work“). Dieser Parameter setzt die Registrierung von Druck-Volumen-Kurven („pressure-volume-loops“, P-V-Loops) voraus: Trägt man den Druck des linken Ventrikels während der Herzaktion gegen das Ventrikelvolumen grafisch auf, entsteht ein Druck-Volumen-Diagramm, in dem die einzelnen Phasen des Herzzyklus abgelesen werden können (siehe **Abbildung 16**).

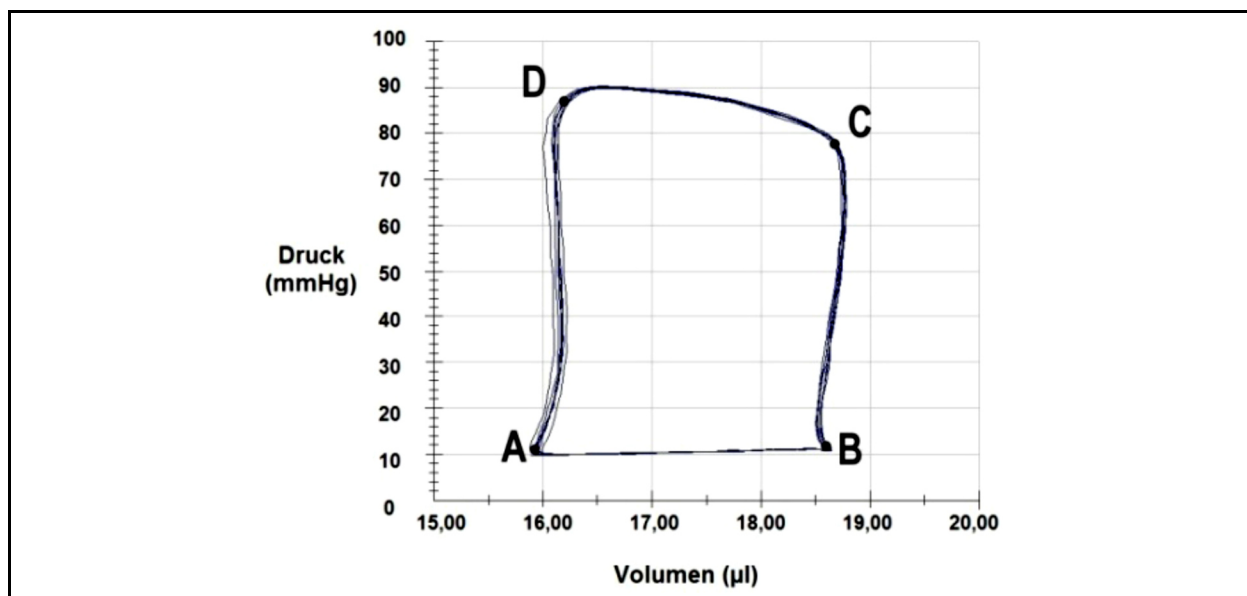


Abbildung 16 Druck-Volumen-Diagramm des Herzens; (A: Öffnung der Mitralklappe; B: Schluss der Mitralklappe; C: Öffnung der Aortenklappe; D: Schluss der Aortenklappe).

Dabei bezeichnet die Strecke AB die Füllphase des Herzzyklus. Die Strecke BC stellt die sich anschließende isovolumetrische Anspannungsphase dar. Hier steigt der Ventrikeldruck so lange an, bis er den diastolischen Aortendruck übersteigt und sich die Aortenklappe öffnet. Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit während der isovolumetrischen Anspannungsphase ($\Delta P/\Delta t_{\max}$) und die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit während der isovolumetrischen Entspannungsphase ($-\Delta P/\Delta t_{\max}$) sind exakte globale Kontraktilitätsparameter des linken Ventrikels. Während der auxotonen Austreibungsphase (Abschnitt CD) wird das Schlagvolumen (SV) ausgeworfen. Anschließend fällt der Druck im Ventrikel stark ab während ein geringes Restvolumen in der Enddiastole verbleibt, gekennzeichnet durch die Strecke DA (isovolumetrische Erschlaffungsphase). Die von den Punkten A, B, C und D umschriebene Fläche entspricht der vom Herzen geleisteten Schlagarbeit bzw. der Energie, die während der Kontraktion mit dem Blut weitergegeben wird (siehe **Abbildung 16**).

II.2.4.1. Grundprinzipien der Conductance-Mikromanometrie

Baan und Kollegen gehörten zu den Pionieren der intrakardialen Messtechnik sowie der Entwicklung der Conductance-Methode zur Bestimmung absoluter intrakardialer Volumina. Primär etabliert für größere Tiermodelle und menschliche Herzen, fand die Applikation in miniaturisierter Version in der Folge auch Anwendung bei Kleintieren wie Hasen, der Ratte und in der Maus. Die Conductance-Mikromanometrie dient der Echtzeit-Ableitung von linksventrikulärem Druck und linksventrikulärem Volumen. Damit lassen sich simultan zur Ventrikelaktion Druck-Volumen-Schleifen darstellen. In der vorliegenden Arbeit kam ein Millar-Tip Mikromanometrie- und Conductance-Kathetersystem zum Einsatz. Der Katheter besteht aus zwei Platinelektrodenpaaren, die eine Länge von 0,5mm besitzen und mit einem Abstand von etwa 5mm positioniert sind. Zwischen diesen ist ein Mikromanometer integriert. Der Katheter hat einen Außendurchmesser von 0,44mm und nimmt während der transaortal-transvalvulären Messung 20% der Aortenklappenöffnungsfläche ein und macht etwa 0,76 μ l des linksventrikulären Volumens aus. Der über die rechte Arteria carotis und Aorta retrograd in den linken Ventrikel eingeführte Conductance-Katheter wird so eingebracht, dass die distale Elektrode in der Herzspitze und die proximale Elektrode direkt unterhalb der Aortenklappe zum Liegen kommt (siehe **Abbildung 17**). Die Druckmessung erfolgt über das Mikromanometer, über das die intrakardialen Drücke fortlaufend in elektrische Signale umwandelt werden (siehe **Abbildung 18**). Die Volumenbestimmung basiert auf der Messung der sich im Herzzyklus ändernden elektrischen Leitfähigkeit des intrakavitären Blutes. Dabei wird zwischen den beiden äußeren Elektrodenpaaren ein hochfrequenter Niedrigampere-Wechselstrom angelegt. Die mit der Herzaktion einhergehende Änderung des intraluminalen Blutvolumens $V(t)$ hat eine Änderung der gemessenen Spannung zur Folge, welche von den beiden inneren Elektroden registriert wird. Diese Spannung ist invers proportional zur Konduktivität $G(t)$ und somit zum intrakavitären Blutvolumen. Jedoch erhält man primär relative Volumeneinheiten, da sich das umliegende Myokard unter isotonen Bedingungen nicht von der Blutleitfähigkeit unterscheidet. Somit muss für die absolute Volumenquantifizierung die sog. Parallelkonduktivität $G(p)$ umliegender Strukturen als Korrekturfaktor errechnet und von der Gesamtkonduktivität $G(t)$ subtrahiert werden. Durch die Injektion einer hypertonen 4,5%-igen Kochsalzlösung wird die Leitfähigkeit des intrakavitären Blutes selektiv ohne Einbeziehung des Myokards angehoben, wodurch sich $G(p)$ errechnen lässt. Die Injektion einer definierten Menge (10 μ l) hypertonen 4,5%-igen Kochsalzlösung wird jeweils am Ende jeder Messung über einen Jugularis-Katheter durchgeführt. Zur gleichen Zeit wurden die sich dadurch verändernden Ventrikelvolumina im Verlauf mehrerer Herzaktionen aufgezeichnet. Mit folgender Gleichung wird aus der Leitfähigkeit das linksventrikuläre Volumen $V(t)$ berechnet:

$$V(t) = (1/\alpha) \times (L^2/\sigma b) \times (G(t) - G(p))$$

V(t): zeitabhängiges ventrikuläres Volumen

α : Korrekturfaktor: (Schlagvolumen Conductance)/ Schlagvolumen Referenzmethode

L: Elektrodendistanz

σb : spezifische Leitfähigkeit des Blutes

G(t): Gesamtleitfähigkeit

G(p): Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes (parallele Conductance)

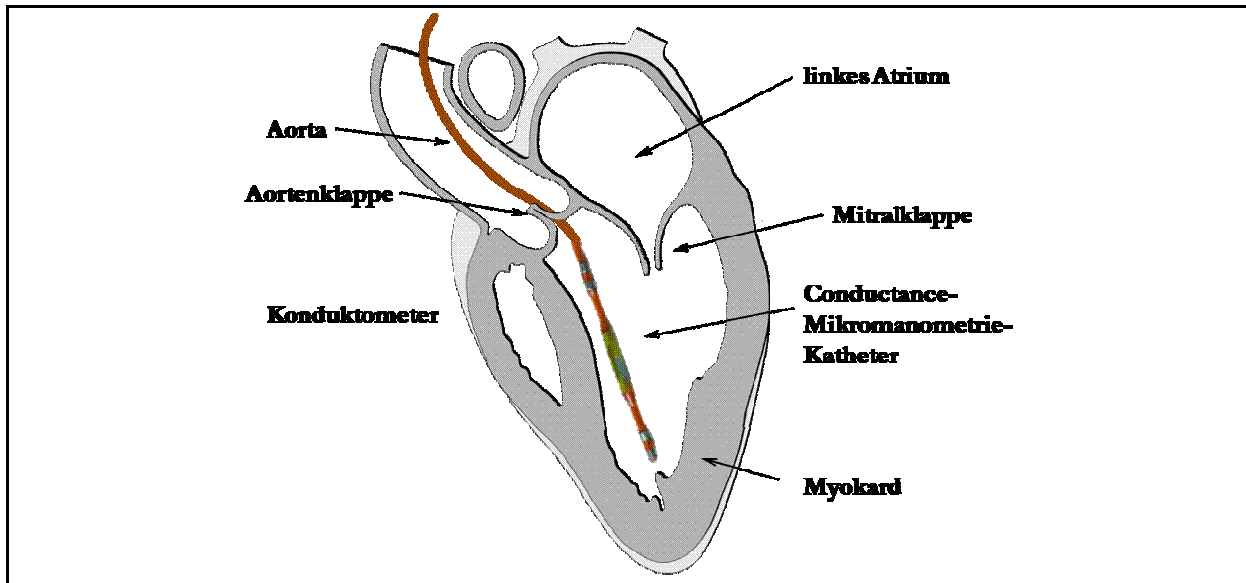


Abbildung 17 Anatomische Lage des Mikromanometrie-Conductance Katheters im Cavum des linken Ventrikels.

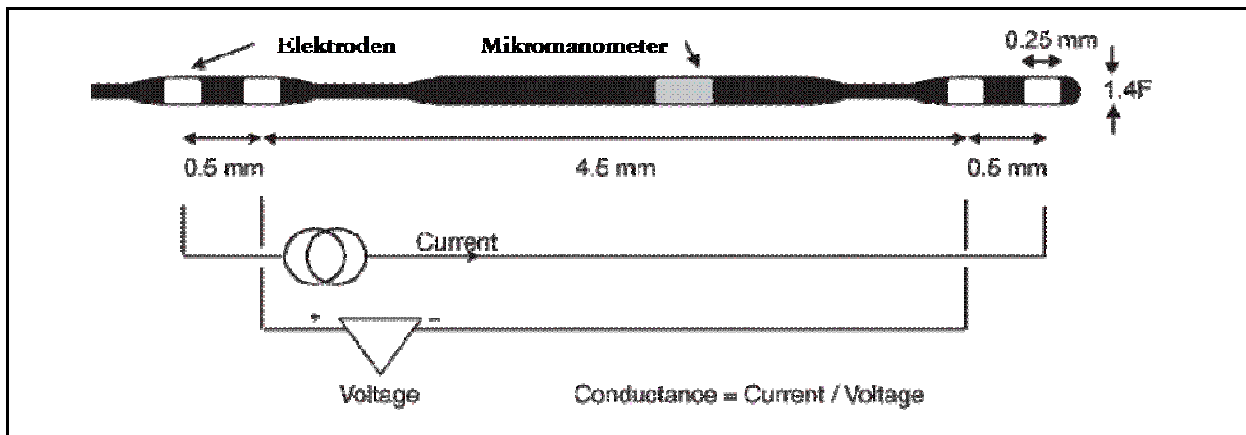


Abbildung 18 Schematischer Aufbau der Katheterspitze. Modifiziert nach [291].

Zur gleichen Zeit wurden die sich dadurch verändernden Ventrikelvolumina im Verlauf mehrerer Herzaktionen aufgezeichnet (siehe **Abbildung 19**). Ziel der Injektion ist es idealerweise, die Leitfähigkeit des Blutes zu ändern, ohne dabei Druck oder Volumen im Ventrikel zu beeinflussen. Das Volumen des umliegenden Gewebes $V(p)$ kann nun berechnet werden durch den Schnitt

zweier Geraden (siehe **Abbildung 20**). Die erste Gerade wird gebildet aus den Werten der hypersalinen Injektion, die zweite Gerade ist die Abbildung der Gleichung:

$$\text{Enddiastolisches Volumen}(V_{ed}) = \text{Endsystolisches Volumen} (V_{es})$$

Diese Linie stellt den Zustand einer leeren Herzkammer dar, da dort $V_{ed} = V_{es}$ ist. Nun kann man vom Schnittpunkt dieser zwei Geraden an der y-Achse den Wert des zusätzlich gemessenen Volumens $V(p)$ ablesen.

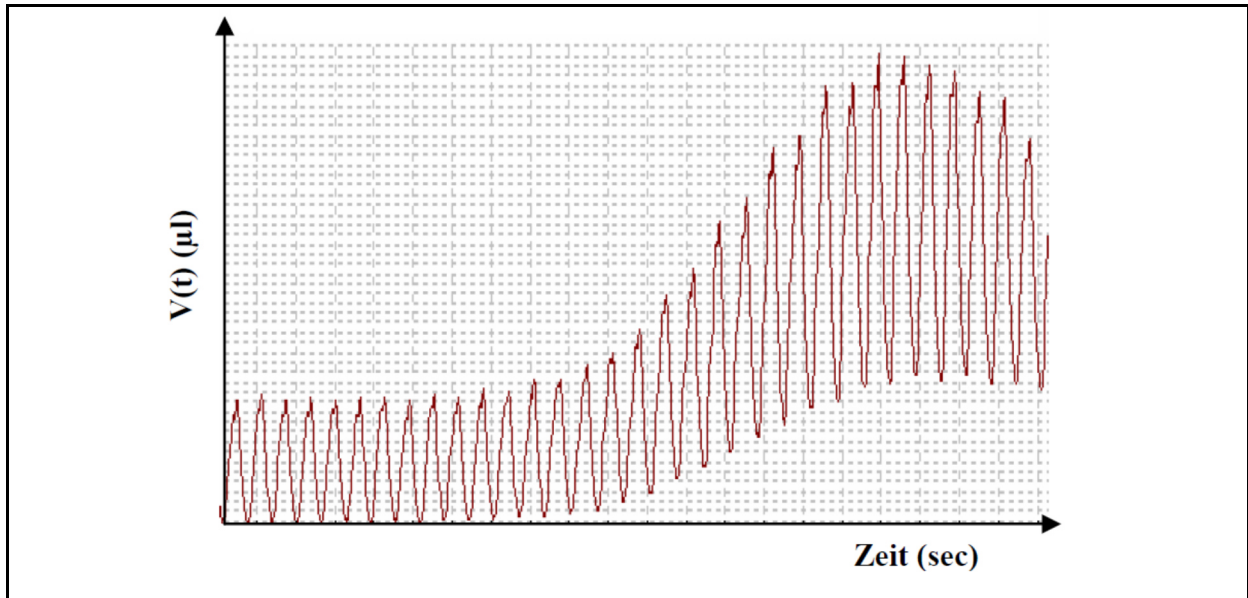


Abbildung 19 Änderung von $V(t)$ nach Injektion von $10 \mu\text{l}$ NaCl (4,5%)

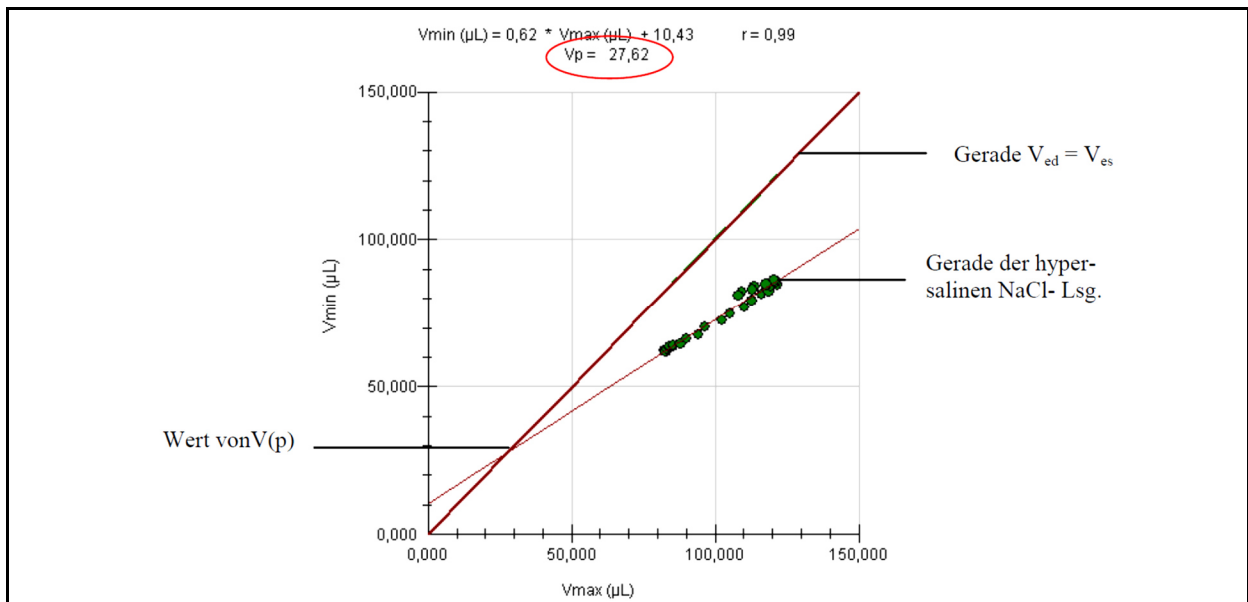


Abbildung 20 Regressionsgerade zur Berechnung der parallelen Conductance

II.2.4.2. Aufzeichnung und Messparameter

Die Druck-Leitfähigkeitssonde ist über eine Druckleitung mit einem Druckaufnehmer verbunden. Der Conductance-Katheter (Millar Tip-Katheter 1.4 French) ist über eine Druckleitung mit einem Druckaufnehmer (Millar ARIA) verbunden. Dessen Signale wurden über einen Zwei-Kanal-Brückenverstärker (HSE) in die Computermessapparatur (Dell) eingespeist. Die Signale wurden kontinuierlich mittels des Programms „HSE Isoheart“ aufgezeichnet und mithilfe der Software „Millar PVAN 2.9“ ausgewertet. Dabei werden folgende Parameter direkt und indirekt quantifiziert:

- Herzfrequenz (HF) in 1/min
- Endsystolisches Volumen (ESV) in μl
- Enddiastolisches Volumen (EDV) in μl
- Endsystolischer Druck (ESP) in mmHg
- Enddiastolischer Druck (EDP) in mmHg
- Maximaler systolischer Druck (LVP) in mmHg
- Schlagvolumen (SV) = $\text{EDV} - \text{ESV}$ in μl
- Ejektionsfraktion (EF) = $(\text{EDV} - \text{ESV}) / \text{EDV} \times 100$ in %
- Herzzeitvolumen (HZV; cardiac output (CO)) = $\text{HF} \times \text{SV}$ in $\mu\text{l}/\text{min}$
- Schlagarbeit (SA) in $\text{mmHg} \times \mu\text{l}$
- Maximale Volumenanstiegsgeschwindigkeit ($\Delta P / \Delta t_{\text{max}}$) in mmHg/sec
- Maximale Volumenabfallgeschwindigkeit ($\Delta P / \Delta t_{\text{min}}$) in mmHg/sec
- Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ($\Delta P / d\Delta t_{\text{max}}$) in mmHg/sec
- Maximale Druckabfallgeschwindigkeit ($\Delta P / \Delta t_{\text{min}}$) in mmHg/sec
- Max. Leistung in mWatt

II.2.4.3. Operative Prozedur zur Linksherzkatheterisierung

Jeweils an Tag 30 nach Infarktinduktion wurden hämodynamische Messungen zur Quantifizierung der Herzfunktion per Linksherzkatheteruntersuchung vorgenommen. Das für die Infarktinduktion verabfolgte Narkose- und Anästhesieregime wurde auch für die Vorbereitung auf die Prozedur der Linksherzkatheterisierung verwendet. Die nach Eintreten der chirurgischen Toleranz vorgenommene Intubation und Beatmung sowie die perioperative Überwachungsmassnahmen erfolgen in analoger Art und Weise (siehe **Kapitel II.2.3.2**).

Die für die sichere Intubation notwendige, in der Medianen des kaudoventralen Halsbeugenabschnittes erfolgte Weichteilpräparation wird unter Zuhilfenahme des OP-Mikroskops nach lateral rechts in stumpfer Präparationstechnik fortgesetzt. Durch stumpfe

Weichteilpräparation von prä- und paratraachealem Speicheldrüsengewebe der Glandula mandibularis werden die Musculi sternohyoidei und sternocleidomastoidei dargestellt.

Der Trachea unmittelbar anliegend zwischen diesen beiden Muskeln verläuft die A. carotis communis dextra. Es folgt nun die zirkuläre Freilegung der Arterie aus dem umliegenden Bindegewebe. Bei der Präparation ist insbesondere auf eine Schonung des rechtsseitigen, der A. carotis communis adherenten Truncus vagosympathicus zu achten, um hämodynamische Artefakte zu vermeiden. Zur weiteren Optimierung der Gefäßdarstellung wird der kraniale Gefäßabschnitt mit einem handelsüblichen Baumwollfaden umschlungen, ligiert und unter kranial gerichtetem Zug durch Anbringen von Pflasterstreifen auf der Wärmeplatte fixiert. Das kaudale Ende der freigelegten A. carotis communis wird mit einem Faden umschlungen und ein Knoten vorgelegt. Durch vorsichtiges Spannen wird eine vorübergehende Blutleere im Gefäß erreicht, die den Blutaustritt bei der anschließenden Punktion minimiert. Sodann wird zur Stabilisierung des Gefäßes und der Vereinfachung der Katheterinsertion eine modifizierte Büroklammer unter die ACC gebracht. Im Intervall erfolgt während der gesamten Prozedur ein Beträufeln der ACC mit NaCl, um Läsionen durch Austrocknung und Schrumpfung zu verhindern und einem Einreißen des Gefäßes durch Elastizitätsverlust bei Insertion des Katheters entgegenzuwirken. Nach beschriebenem Aufspannen wurde das Gefäß konsekutiv möglichst weit distal mit einer 30G-Punktionsnadel punktiert. Die Insertion des Katheters (1,4F/0,47mm Aussendurchmesser) erfolgte mit einer armierten Pinzette sowie mit Hilfe einer modifizierten Kanüle, die im Bereich der Spitze schuhartig umgebogen wurde (siehe **Abbildung 21**). Unmittelbar nach erfolgreicher Katheterinsertion und Entfernung der Büroklammer wird der proximal vorgelegte Knoten angezogen, um Blutungen proximal der Punktionsstelle zu verhindern. Unter ständiger visueller Kontrolle der kontinuierlich aufgezeichneten Druckkurve am Monitor wird der Katheter sodann retrograd durch die ACC sowie die Aorta ascendens bis an die Aortenklappe und nach Überwinden eines durch das Klappenmaterial bedingten Widerstandes in den linken Ventrikel vorgeschoben. Unmittelbar nach erfolgreicher Platzierung des Katheters im Cavum des linken Ventrikels und einer Feinjustierung seiner Position für die bestmögliche Qualität der Druck-Volumen-Schleifen wird der Katheter durch weiteres Anziehen des proximal vorgelegten Fadens in seiner Lage fixiert.

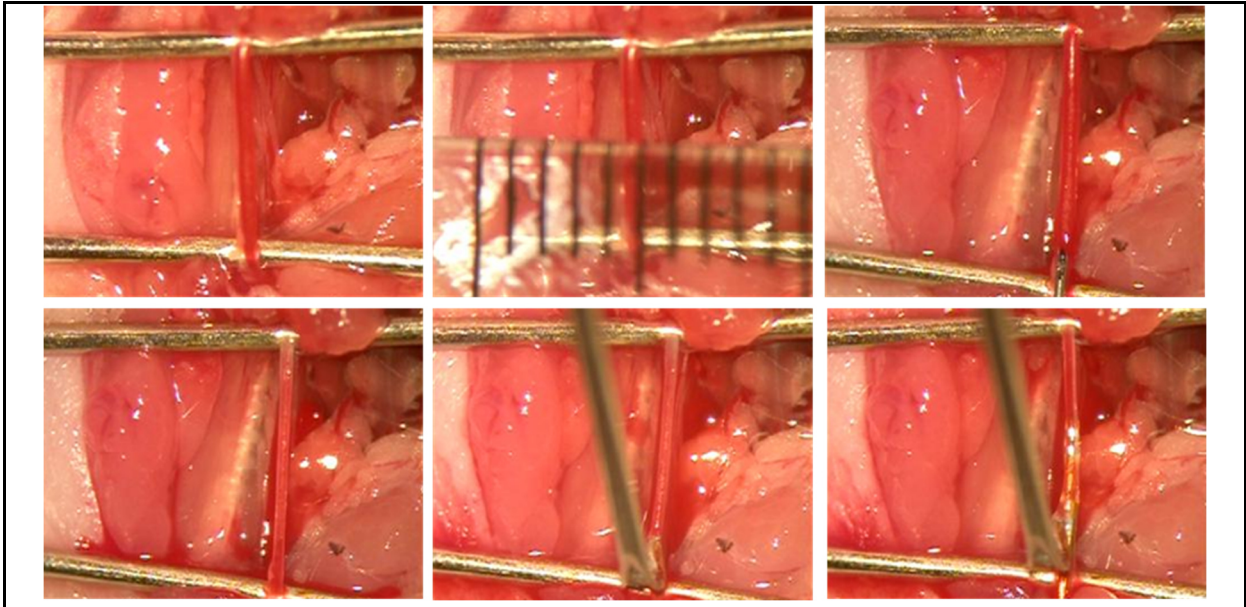


Abbildung 21 Operations situs der Carotispräparation und retrograde Insertion des Mikromanometrikatheters

Nach Stabilisierung der Hämodynamik über einige Minuten werden die Grundwerte (Basalwerte) der Herzleistung aufgezeichnet. Zur späteren Bestimmung des Realvolumens muss jeweils am Ende der Messung noch eine Salineinjektion vorgenommen werden. Zu diesem Zweck wurde die linke Vena jugularis interna freipräpariert und ein Katheter platziert. Durch diesen Katheter wurde ein Bolus (10 μ l) einer hypersalinen Kochsalzlösung (4,5% NaCl-Lösung) injiziert. Diese Prozedur wurde mehrmals wiederholt und aufgezeichnet.

II.2.5. Histomorphologie und Immunhistologie

II.2.5.1. Euthanasie, Organentnahme und Anfertigung der histologischen Schnittpräparate

Die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen führten wir durch, um Aussagen über das Schicksal der transplantierten Zellen, die Infarktmorphologie (Infarktgröße, Wanddicken) sowie den Grad der Neovaskularisation im Infarkttrandbereich zu treffen. Alle Arbeiten zur Anfertigung und Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. J. Müller-Höcker am Pathologischen Institut der LMU München (Leitung Prof. Dr. T. Kirchner).

Nach Tötung eines Tieres durch eine intraperitoneal verabfolgte Anästhetikaüberdosis wurde der Thorax eröffnet und das Herz nach Durchtrennung der zu- und abführenden Gefäße herausgenommen, retrograd über die Aorta mit physiologischer NaCl-Lösung durchspült und für 12-24 Stunden in 3,7%iger Formaldehydlösung fixiert. Am Folgetag wurden die Präparate per aufsteigender Alkoholreihe entwässert (70% \rightarrow 90% \rightarrow 96% \rightarrow 100% \rightarrow 100% Ethanol, jeweils zwei

Stunden; Xylol I, Xylol II, jeweils 20 Minuten) und schlussendlich in Paraffin eingebettet (Paraffin I, Paraffin II, jeweils zwei Stunden). Nach Einbettung des Herzens in Paraffin wurden die Präparate mit einem Mikrotom in 4 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einem gläsernen Objektträger platziert. Zur Anfertigung der (immun-)histologischen Färbungen wurden die Schnitte in einem auf 37 °C temperierten Brutschrank verbracht, mittels Xylol entparaffinisiert, sodann durch Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert und schließlich in den jeweiligen Färbelösungen gefärbt. Für die vorliegende Arbeit wurden standardmäßig die Färbungen Hämatoxylin/Eosin (HE) und Masson-Trichrom (MT) verwendet.

II.2.5.2. Hämatoxylin/Eosin (HE)

Die Hämatoxylin/Eosin-(HE)-Färbung ist die klassische Übersichtsfärbung in der Histologie. Das basische Hämalan markiert die Zellkerne blau, während das saure Eosin sich mit Zytoplasma und extrazellulären Fasern verbindet und diese rot färbt. Für die HE-Färbungen wurde Mayers Hämatoxylin Solution und Eosin Solution (Sigma, St. Louis, USA) verwendet. Die Paraffinschnitte wurden zunächst zehn Minuten im Xylolbad und anschließend für jeweils 15 Sekunden in einer absteigenden Alkoholreihe (100%→96%→70%) entparaffinisiert. Nach einer kurzen Waschung in Aqua dest. werden die Präparate für zwei Minuten in Hämalanlösung nach Mayer inkubiert. Überschüssige Färbelösung wurde im Wasserbad entfernt. Die Schnitte wurden anschließend für fünf Sekunden in Eosin verbracht. Abschließend werden die gefärbten Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 15 Sekunden fixiert und eine Minute in Xylol belassen, bevor sie mit einem Deckgläschen versehen wurden.

II.2.5.3. Masson-Goldner-Trichromfärbung (MT)

Bei der sog. MT-Färbung erfolgt nach der Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert eine Anfärbung der Gewebeschnitte mit drei weiteren dispersen Farbstoffen. Im Resultat lässt sich mikroskopisch gesundes Myokard von vernarbten Bereichen abgrenzen. Das im Bereich der Infarkt Narbe vorhandene Bindegewebe kommt bläulich zur Darstellung, Zellkerne erscheinen braunschwarz, das übrige Myokard stellt sich in Rottönen dar. Für die MT-Färbung wurde Accustain Trichrom Farbstoff (Sigma, St. Louis, USA) verwendet. Je ein Schnitt der in die Auswertung eingehenden vier Ebenen wurde entparaffinisiert und in vorgewärmter Bouins-Lösung 15 Minuten bei 56 °C oder bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die Abkühlung erfolgte in Leitungswasser (18–26 °C) in einer Coplin-Küvette. Nach erneutem Waschen der Objektträger unter fließendem Leitungswasser folgten Inkubations- und Färbeschritte mit Weigerts Eisen-Hämatoxylin, Bieberich-Scharlachrot, Phosphorwolfram/Phosphormolybdänsäure-Gemisch und Anilinblau (alle Sigma, St. Louis, USA).

Nach Einlegen in 1%iger Essigsäure wurden die Objektträger gespült, mit Alkohol dehydriert, in Xylol geklärt und fixiert.

II.2.5.4. Infarktgrößenbestimmung

Die Infarktgröße wurde planimetrisch erhoben. Pro Herz wurden mikroskopisch jeweils vier Herzschnitte im Abstand von 2mm von basal bis apikal ausgewertet. Der prozentuale Infarktanteil für jeden der vier Schnitte ergab sich aus dem Quotienten von infarzierter Fläche und Gesamtfläche des linken Ventrikels inklusive Septum. Zur Berücksichtigung der Längsausdehnung des Infarktes wurde ein Quotient aus Längsausdehnung der Infarktfläche und der Gesamtlänge des linken Ventrikels berechnet. Dieser Wert wurde mit dem Mittelwert der vier prozentualen Infarktanteile multipliziert, woraus sich schlussendlich die Infarktgröße als prozentualer Anteil an der Gesamtfläche des linken Ventrikels ergab.

II.2.5.5. Bestimmung der linksventrikulären Wanddicken im Infarktgebiet

Die Auswertung der Wanddicken erfolgte unter dem Mikroskop mit 15-facher Vergrößerung. Diese wurden in der zweiten oder dritten Scheibe, je nach Lage der Papillarmuskelebene, gemessen. Dazu wurden im Infarktgebiet die Grenzen des infarzierten Areals festgelegt und der Mittelpunkt des linken Ventrikels mit den zwei Infarktgrenzen verbunden (sogenannte Grenzradien). Der Winkel zwischen den Grenzradien wurde in fünf winkelgleiche Segmente eingeteilt. In allen fünf Segmenten wurde jeweils die Stelle mit der geringsten Wanddicke in Anlotung auf die Innenwand bestimmt. Der Mittelwert der fünf Distanzen ergab die durchschnittliche Wanddicke im Infarktgebiet (in mm). Zudem wurde die Dicke des interventrikulären Septums – als Maß einer möglichen reaktiven Hypertrophie – nach der gleichen Methode (Mittelwert der fünf kleinsten Wanddicken in fünf gleichwinkligen Segmenten) bestimmt (siehe **Abbildung 22**).

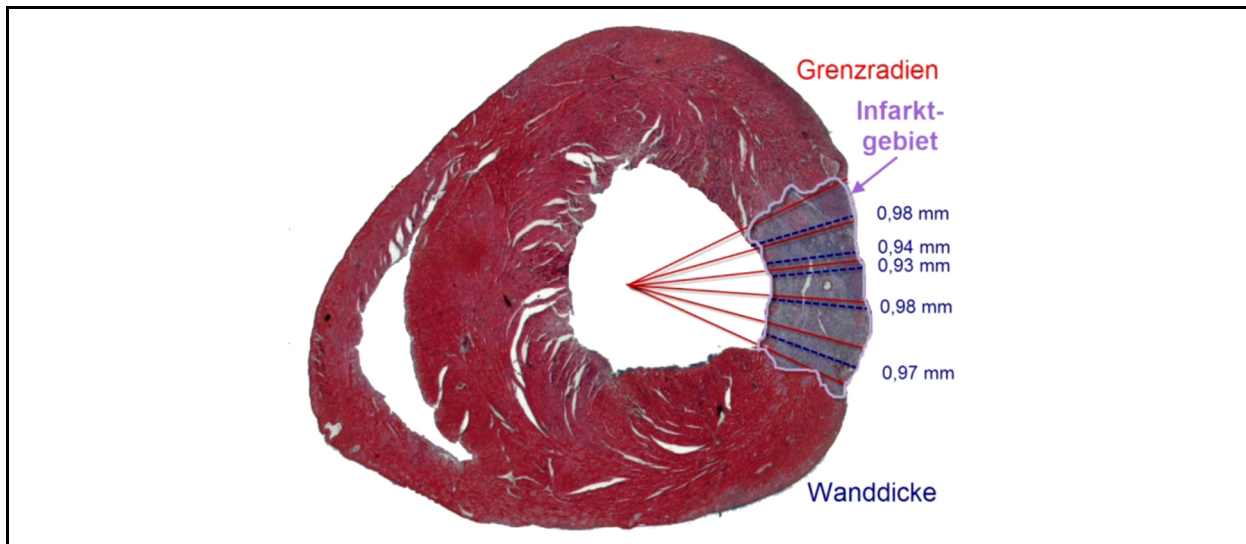


Abbildung 22 Bestimmung der mittleren Vorderwanddicke im Infarktgebiet.

II.2.5.6. Immunhistologische Zelldetektion

Zur immunhistologischen Evaluation einer möglichen Inkorporation der humanen Zellen nach intramyokardialer Transplantation wurden die Schnitte mittels humanspezifischer Antikörper auf die Präsenz der humanen Antigene Vimentin und HLA gefärbt.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst zehn Minuten im Xylolbad (3×5min) und anschließend für jeweils 2x5min in einer absteigenden Alkoholreihe (100% -> 96% -> 70%) entparaffinisiert. Die sich anschließende Behandlung mit 7,5%-igem Wasserstoffperoxid für ebenfalls 10 Minuten sorgte für die notwendige Inaktivierung der endogenen Peroxidase. Sodann wurden die Schnitte 10min in Aqua dest. gewässert und für 3min in TRIS-Puffer (pH 7,5) gespült und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit den Primärantikörpern (Vimentin und HLA) inkubiert. Eine antigendemaskierende Vorbehandlung in der Mikrowelle bei 750W mit Zitratpuffer (10 mM, pH 6.0) bzw. einer *antigen retrieval* Lösung (Dako) wurde für 30min durchgeführt. Zur abschließenden Farbreaktion wurden die Systeme REAL® für Vimentin bzw. APAAP® für HLA (beide Dako) benutzt. Nach Spülung der Zellen unter fließendem Wasser wurden sie mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt und mit Gelatine eingedeckelt.

II.2.5.7. Neovaskularisation in der Infarktgrenzzone

Zur Beurteilung der Neovaskularisation hat sich die CD31-Färbung etabliert. Bei CD31 (auch PECAM-1, *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*) handelt es sich um ein Epitop, welches in hoher Dichte als Adhäsionsmolekül in den interzellulären Verbindungen von Endothelzellen vorkommt. Somit lassen sich Rückschlüsse auf die Vaskularisationsdichte in der Grenzzone des Infarktes ziehen.

Die präparierten Schnitte werden zur Entfernung des Paraffins für 3 mal 5 Minuten in Xylol gewaschen und in der oben erwähnten Alkoholreihe, dieses Mal aber in absteigender Form (100%, 96%, 70%), für jeweils 10 Minuten rehydriert. Die sich anschließende Behandlung mit 7,5%-igem Wasserstoffperoxid für ebenfalls 10 Minuten sorgte für die notwendige Inaktivierung der endogenen Peroxidase. Es erfolgten mehrere Waschschrte mit Aqua bidest (1x10min, 3x5min). Die Inkubation mit dem biotinylierten Primärantikörper (10µg einer Stockkonzentration von 0,2mg/ml) fand für 60min bei Raumtemperatur statt. Der nächste Schritt besteht in dreimaligem Waschen mit TBS/TRIS (pH 7,5) und der Inkubation mit dem Sekundärantikörper, einem Streptavidin-Peroxidase gekoppeltem IgG-Komplex (1µg einer Stockkonzentration von 20µg/ml). Dabei erkennt Streptavidin das auf dem ersten Antikörper enthaltene Biotin und bildet mit ihm einen Komplex. Zuletzt wurde der Farbstoff Aminoethylcarbazol verwendet (10-minütige Inkubation), wodurch die lichtmikroskopisch bräunliche Färbung sichtbar wird. Nach Spülung der Zellen unter fließendem Wasser wurden sie mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt und mit Gelatine eingedeckelt.

II.2.5.8. Lichtmikroskopische Auswertung

Alle mikroskopischen Auswertungen der Gewebeschnitte (Morphometrie, Vaskularisationsdichte) wurden mit dem Mikroskop „Axiovert 200“ und der Digitalkamera „Axio Cam HRC“ sowie der Software „Axiovision“ (alle von Carl Zeiss, Jena) durchgeführt.

Die planimetrischen Untersuchungen zur Infarktmorphometrie wurden unter zehnfacher Vergrößerung vorgenommen. Hier dienten die mit Hämatoxylin/Eosin gefärbten Schnitte der Übersichtsverschaffung, die Infarkt- und Wanddicken wurden in Masson Trichrom gefärbten Scheiben gemessen. Die Anzahl CD31-positiver Kapillaren wurden bei 400-facher Vergrößerung in jeweils vier Gesichtfeldern („*High Power Fields*“ (HPF)) quantifiziert.

II.2.6. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, syn. auch *fluorescence activated cell sorting* (FACS) genannt, bezeichnet ein Messverfahren zur Differenzierung von Zelleigenschaften, das auf dem Prinzip der Emission optischer Signale seitens einer zu analysierenden Zelle basiert, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Somit lassen sich distinkte Zellpopulationen voneinander differenzieren, die sich in der Expression verschiedener Oberflächenproteine unterscheiden. Die Zelle wird dabei durch das spezifische Binden eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff primär oder sekundär markierten Antikörpers an die entsprechenden Epitope dieser Proteine bei der Passage des Laserstrahls zur Lichtemission angeregt.

Die drei Hauptkomponenten des Zytometers stellen das Flüssigkeitssystem, die Optik und das elektronische System dar. Im Flüssigkeitssystem wird die mit Fluoreszenzantikörpern inkubierte Zellsuspension über eine Strahlkapillare in einem Mantelzellstrom mit Überdruck in den Messbereich des Zytometers überführt, wo die Zellen nacheinander vom Laserstrahl getroffen werden. Die Optik besteht aus einem Argonlaser und den Detektoren für Streulicht und Fluoreszenzen. Das durch die Zellen in charakteristischer Weise abgelenkte Licht wird mittels Spiegel- und Filtersystemen auf verschiedene Photoverstärker geleitet, wo es durch entsprechende Detektoren messtechnisch erfasst wird.

Die in einer Einzelzellsuspension befindlichen Zellen werden mit hoher Geschwindigkeit aus den Probenröhrchen in eine Stahlkapillare gesaugt, passieren eine Kanüle, werden durch einen Mantelstrom hydrodynamisch fokussiert und treten durch eine Kapillare (250 μm x 250 μm) einer Flusszelle aus Quarzglas (**Abbildung 23**). Die hohe Ansauggeschwindigkeit sowie ein in Verbindung mit der Trägerflüssigkeit erzeugter laminarer Hüllstrom tragen Sorge dafür, dass die Zellen die Sensoreinheit einzeln erreichen (hydrodynamische Fokussierung). Durch die hydrodynamische Fokussierung wird der Durchmesser des Probenstroms, in dem sich die Blutzellen befinden, auf etwa 5 μm reduziert. Am Analysepunkt werden die Zellen von einem Argonlaserstrahl der Wellenlänge 488 nm zur Emission einer für den jeweiligen am Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoff spezifischen Wellenlänge angeregt. Unterschiedliche Photodetektoren messen nun Fluoreszenzintensität und den Grad der Lichtstreuung (*scatter*). Die Lichtstreuung liefert Informationen zum Volumen und zur Granularität der Zellen. Das sog. Vorwärtsstreulicht (Streuung von 0-10° (*forward scatter/FSC*)) ist ein Maß für die Beugung des im flachen Winkel einfallenden Lichtes und ist mit dem Volumen der Zelle assoziiert. Das Seitwärtsstreulicht (Streuung von 90° (*sideward scatte/SSC*)) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel und hängt mit der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle zusammen. Beispielsweise streuen granulozytäre Zellen, die eine raue Oberfläche und in ihrem Inneren viele Vesikel aufweisen, deutlich mehr Licht als eher glatte T-Lymphozyten. Anhand dieser beiden Messungen kann auf Identität und Vitalität der einzelnen Zellpopulationen zurückgeschlossen werden. Die Stärke der Lichtemission der Fluoreszenzfarbstoffe ist proportional zur Zahl der auf der Zelloberfläche gebundenen markierten Antikörper und somit auch zur Anzahl der Oberflächenmoleküle. Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der verwendeten Farbstoffe teilweise überlappen. Mit Hilfe von Isotypen, d.h. unspezifisch bindender Antikörper mit jeweils identischer Fluoreszenzfarbstoff, kann die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Oberflächenmerkmalen qualitativ und quantitativ unterscheiden und

vergleichen lassen. Die verwendeten fluoreszierenden Farbstoffe (FITC (Fluorescein-Isothiocyanat); PE (Phycoerythin); PerCP (Peridinin Chlorophyll-A-Protein)) werden durch den Lichtstrahl angeregt und emittieren kurzwelligere Lichtspektren (in den genannten Beispielen also für PE: 575nm, für PerCP: 675nm und für FITC:494nm), welche von Photomultipliern verstärkt werden und schließlich von Photodetektoren gemessen werden. Bei gleichzeitiger Verwendung mehrerer Fluorochrome ist aufgrund der Überlappung der Emissionsspektren auf eine korrekte Kompensation in der Auswertung zu achten, da es sonst zu fehlerhaften Messergebnissen kommen kann.

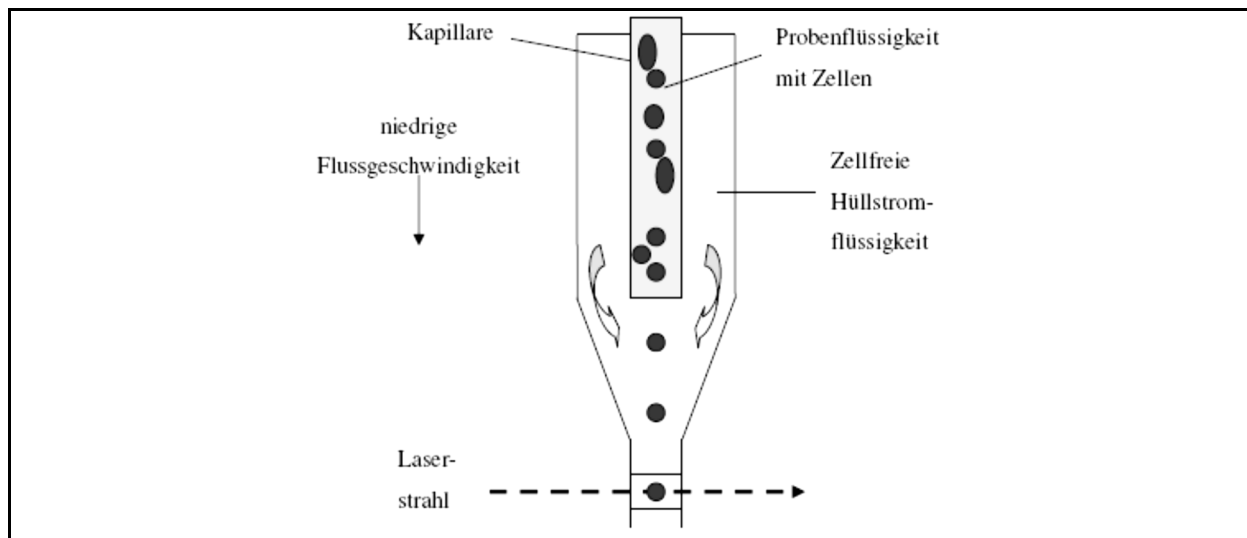


Abbildung 23 Prinzip der Durchflusszytometrie. Übernommen aus [292].

II.2.6.1. Vorbereitung der Myokardproben für die Durchflusszytometrie

Nach Euthanasie und Entnahme des Herzens wurde zunächst eine mehrmalige ante- und retrograde Spülung mit isotoner Kochsalzlösung vorgenommen, um noch verbliebene Blutzellen möglichst vollständig aus den Kavitäten zu entfernen. Anschließend wurde das Herz in einer Petrischale mit Hilfe eines Skalpells in kleine Stücke zerteilt. Zur durchflusszytometrischen Analyse der unterschiedlichen putativen kardialen Stammzellpopulationen wurde das entnommene Herz in eine myozytendepletierte Einzelzellsuspension überführt, wobei als Medium PBS + 10% fetales Kälberserum (BSA) diente. Anschließend wurde das kardiale Gewebe mit einem Ultraschall-Homogenisator fragmentiert und bei 37°C für 30 Minuten in 6 ml einer 0,1-%igen Kollagenase IV-Lösung (0,1% bei 37°C) inkubiert. Anschließend wurde die Suspension fünf Minuten lang mit einer 1000µl-Pipette resuspendiert und, zur Elimination größerer Gewebefragmente, durch ein 70µm-Netz in ein 50ml Röhrchen filtriert. Die gefilterte Suspension wurde sodann in ein Gefäß auf Histopaque® pipettiert und zentrifugiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Inkubation mit Antikörpern gegen die Epitope CD34, CD45, CD31, c-kit, Sca-1, CXCR4, Flk-1, sowie LFA-1 und VLA-4 (in Dunkelheit bei 4 Grad Celsius für 60 Minuten).

MATERIAL UND METHODEN

Die Konzentration der einzelnen Antikörper betrug 2,5-3,0µg/10⁶ Zellen (Stockkonzentration 0,5mg/ml). Überschüssige Antikörperlösung wurde durch weitere Waschschriffe entfernt.

Die methodische Vorbereitung der myokardialen Proben für die Durchflusszytometrie ist im Folgenden stichpunktartig aufgeführt:

- Zentrifugation des Zellmaterials (Bremse 1; Umdrehungen 1100/Minute; Zeit 30 Minuten)
- Aufnahme der mononukleären Zellphase
- Resuspension der mononukleären Zellen in 6 ml PBS
- Zweimalige Zentrifugation (Bremse 3, Umdrehungen 800/Minute, Zeit 10 Minuten) mit Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Zellsedimentes in 6ml PBS/BSA
- Vorlegen der Zellsuspensionen in Eppendorfbehälter
- Vortexen im Rundschüttler
- Inkubation der Proben mit den Antikörpern für 45-90 Minuten bei 4° C im Kühlschrank
- Zweifache Zentrifugation (Umdrehungen 2000 /Minute, Zeit 5 Minuten), mit Verwerfen des Überstandes und Auffüllen der Proben mit 100 µl PBS/BSA
- Füllung der FACS-Röhrchen mit 400 µl PBS, Zugabe antikörpergefärbter Zellsuspensionen

Die Probenzusammensetzung zeigt **Tabelle 2**.

Parameter	IsoA	CD31	c-kit	Sca-1	CxCr4	Flk-1	LFA-1	VLA-4
PBS+BSA 2%	20	30	30	30	30	30	30	30
Iso A-PE	10							
Iso A-FITC	10							
Iso A-PerCP	10							
CD45 (PerCP)		10	10	10	10	10	10	10
CD34 (FITC)		1	1	1	1	1	1	1
CD31 (PE)		10						
c-kit (PE)			10					
Sca-1 (PE)				10				
CxCr4 (PE)					10			
Flk-1 (PE)						10		
LFA-1 (PE)							10	
VLA-4 (PE)								10
Probe	50	50	50	50	50	50	50	50

Tabelle 2 Pipettierschema für die Vorbereitung der Myokardproben auf die durchflusszytometrische Analyse. Angabe in µl.

Die Zellpräparationen wurden im Durchflusszytometer (Beckman Coulter Epics XL, Fullerton, USA) analysiert und mit der Software „Expo32“ ausgewertet. Bei jeder Messung wurden 30.000 Ereignisse registriert. Um unspezifische Antikörperbindungen von spezifischen Bindungen unterscheiden zu können, wurden Isotypen (jeweils PE-, FITC- und PerCP-markiert) eingesetzt.

II.2.7. Statistische Analyse

Die hämodynamischen, histologischen und durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden als Einzelwerte oder in ihrer Gesamtheit als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben. Die Mittelwertunterschiede wurden entsprechend den Anforderungen mit einem Student's t-Test für unabhängige Stichproben auf ihr Signifikanzniveau getestet. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistische Signifikanz angesehen und in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SPSS Software, Version 21 (SPSS Inc., Chicago, USA).

III. ERGEBNISSE

Die für die tierexperimentellen Untersuchungen verwendeten Zellen wurden aus peripheren Blutproben von Patienten mit KHK wie unter dem in Kapitel II.2.1. beschriebenen Protokoll isoliert. Insgesamt 17 Patienten stellten sich für eine Blutspende zur Verfügung. Die Spenderpatienten waren im Mittel 63 Jahre alt und wiesen das typische Profil an kardiovaskulären Risikofaktoren auf. Die Nicht-Diabetiker waren im Schnitt signifikant jünger und standen unter weniger medikamentösen Begleittherapien als die Patienten mit Diabetes mellitus. Die Charakteristika der Spenderpatienten sind in **Tabelle 3** zusammengefasst.

	Gesamt [n=17]	ohne Diabetes [n=8]	mit Diabetes [n=9]	p-Wert (t-Test/X²)
Alter	63,12±3,3	51,88±2,7	73,11±3,0	<0,001
weiblich	10/43,5%	5/62,5%	5/55,6%	n.s.
Gewicht	81,59±3,4	83,63±5,5	79,78±4,4	n.s.
Größe	165,88±1,7	164,50±1,6	167,11±2,8	<0,001
Art. Hypertonie	14/60,9%	5/62,5%	9/100%	<0,05
LDL	90,2±6,3	106,4±9,2	75,9±5,2	<0,01
HDL	53,5±2,8	56,6±4,6	50,7±3,3	n.s.
Nikotinabusus	5/21,7%	1/12,5%	4/44,4%	n.s.
HbA1c			7,5±0,3	-
Medikation				
ACE-Hemmer	14/60,9%	5/62,5%	9/100%	<0,05
Beta-Blocker	12/52,2%	3/37,5%	9/100%	<0,05
Statine	14/60,9%	5/62,5%	9/100%	<0,05
Glitazone	2/8,7%	0/0%	2/22,2%	n.s.
Insulin	4/17,4%	0/0%	4/44,4%	<0,05

Tabelle 3 Charakteristika der sich für die Blutentnahmen und die Generierung der ECFCs zur Verfügung stellenden Patienten (n=17); Werte als MW±SEM oder n/%.

Die expandierten Zellen besitzen einen endothelialen Phänotyp und wurden nach Kulturpassage 2 oder 3 für die Transplantation im Tiermodell verwendet (siehe **Abbildung 24A**). Unmittelbar nach erfolgreicher Infarktinduktion erfolgte die Injektion von insgesamt 5×10^5 Zellen respektive einer 0,9%igen Natriumchloridlösung (Kontrolle) mit Hilfe zweier Injektionen a 9µl ins Perinfarktareal.

ERGEBNISSE

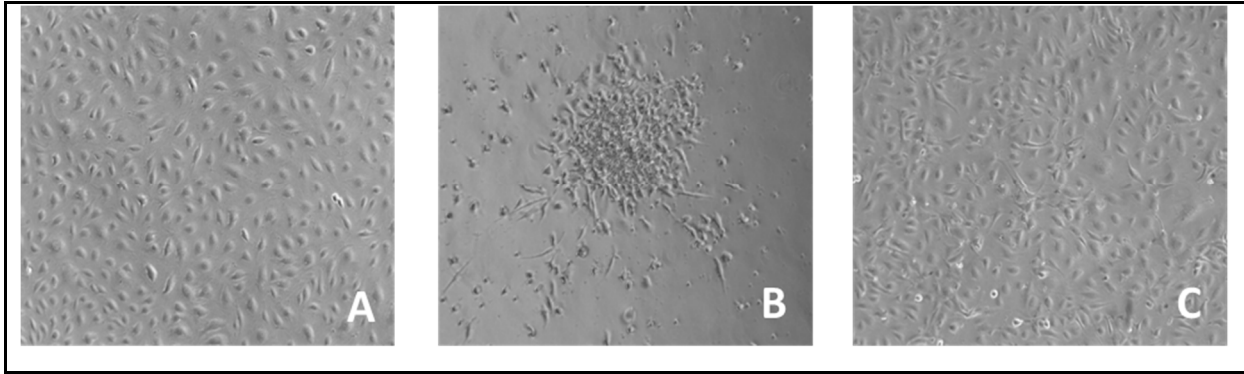


Abbildung 24 Vergleichende Gegenüberstellung der Morphologie unterschiedlicher endothelialer Stammzellpopulationen in vitro. A: ECFCs nach 5 Passagen mit charakteristischer kopfsteinpflasterähnlicher Morphologie; B: Angiogene Zellen/CAC nach 3 Tagen mit spindelförmiger Morphologie; C: HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) nach 9 Passagen mit kopfsteinpflasterähnlicher Morphologie. Aufnahme der Zellen in 100-facher Vergrößerung (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Ilka Ott/Dr. med. E. Weidl.)

III.1. Häodynamische Funktionsmessungen

Zur Bestimmung des therapeutischen Effektes einer ECFC-Applikation wurde eine invasive Quantifizierung der kardialen Funktion der behandelten Tiere 30 Tage nach MI mittels Millar-Tip-Katheter-Messungen vorgenommen und der unbehandelten Kontrollgruppe gegenübergestellt. An Tag 30 wird die Infarktheilungsphase für abgeschlossen erachtet.

Parameter	MI+NaCl n=10	MI+5x10 ⁵ ECFCs n=15	p-Wert (t-Test)
Herzfrequenz [n/min]	427 ± 20	414 ± 18	n.s.
ESV [µl]	17,27 ± 1,39	21,55 ± 1,83	n.s.
EDV [µl]	20,18 ± 1,7	27,48 ± 2,36	0,03
Pmax syst. [mmHg]	67,27 ± 6,17	82,86 ± 2,38	0,01
ESP [mmHg]	65,14 ± 5,96	79,83 ± 2,63	0,02
EDP [mmHg]	7,55 ± 0,73	7,76 ± 1,36	n.s.
SV [µl]	4,73 ± 0,55	8,47 ± 0,62	<0,001
EF [%]	22,61 ± 1,73	30,43 ± 1,20	<0,001
HZV [µl/min]	2006,71 ± 243,18	3470,70 ± 254,44	<0,001
SA [mmHg x µl]	206,17 ± 39,65	508,94 ± 35,71	<0,001
ΔV/Δt max [µl/sec]	169,34 ± 19,50	272,01 ± 21,39	0,002
ΔV/Δt min [µl/sec]	-157,97 ± 14,70	-268,23 ± 25,70	0,002
ΔP/Δt max [mmHg/sec]	3896,24 ± 534,95	5202,28 ± 316,68	0,03

ERGEBNISSE

$\Delta P/\Delta t$ min [mmHg/sec]	$-3222,60 \pm 388,67$	$-4553,01 \pm 218,40$	0,004
Max. Leistung (mWatt)	$1,32 \pm 0,18$	$2,72 \pm 0,23$	<0,001

Tabelle 4 Vergleichende Gegenüberstellung der hämodynamischen Funktionsparameter der Tiere aus Kontroll- und Behandlungsgruppe 30 Tage nach MI. n.s.: $p > 0,05$.

Abbildung 25 zeigt eine jeweils für die Gruppe repräsentative Druck-Volumen-Kurve mehrerer Herzzyklen, wie sie während der Herzkathetermessungen standardmäßig aufgezeichnet wurde.

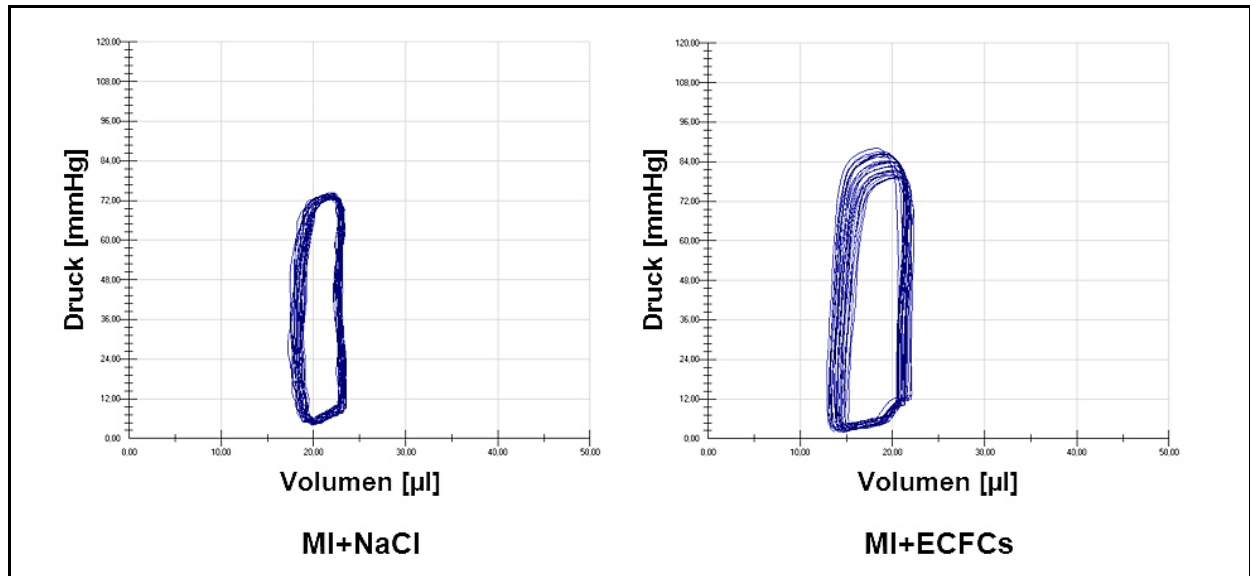


Abbildung 25 Exemplarische Druck-Volumenschleife einer hämodynamischen Funktionsmessung eines Versuchstieres aus der Kontroll- sowie der Behandlungsgruppe

An Tag 30 nach Infarktinduktion zeigte sich in den mit ECFCs behandelten Tieren im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion. Die Ejektionsfraktion lag mit $30,4 \pm 1,2\%$ bei den mit Zellen behandelten Tieren nach Zellbehandlung signifikant, um knapp 8% höher als bei den Kontrolltieren ($22,6 \pm 1,7\%$; $p < 0,001$). Entsprechend lag auch das Herzzeitvolumen in der Behandlungsgruppe signifikant höher als in der Gruppe der Kontrolltiere ($3470,70 \pm 254,44 \mu\text{l}/\text{min}$ vs. $2006,71 \pm 243,18 \mu\text{l}/\text{min}$; $p < 0,001$). Auch der Kontraktilitätsindex $\Delta P/\Delta t$ max ($5202,28 \pm 316,68 \text{ mmHg}/\text{s}$ vs. $3896,24 \pm 534,95 \text{ mmHg}/\text{s}$; $p < 0,05$) sowie der diastolische Relaxationsparameter $\Delta P/\Delta t$ min ($-4553,01 \pm 218,40 \text{ mmHg}/\text{s}$ vs. $-3222,60 \pm 388,67$; $p = 0,004$) waren nach Zellbehandlung signifikant besser als bei den unbehandelten Kontrolltieren. **Tabelle 4** zeigt die Übersicht der zusätzlich bestimmten Parameter im Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe.

III.2. Histomorphologie und Immunhistologie

Nach Beendigung der invasiven Kathetermessungen wurden die Tiere euthanasiert und die Herzen der Versuchstiere für die histologischen Endpunkte aufgearbeitet. Im Vordergrund

standen bei der Auswertung der histologischen Schnitte die Parameter Infarktgröße, Wanddicken (Vorderwand, Septum), Neovaskularisationsdichte im Bereich der Infarktgrenzzone sowie das Schicksal der transplantierten Zellen 30 Tage nach Infarktinduktion und Zelltransplantation.

III.2.1. Infarktgröße

Die hämodynamischen Funktionsparameter wurden den histomorphologischen Veränderungen im Folgenden in Beziehung gesetzt. Die Infarktgröße wurde planimetrisch aus histologischen Schnitten erhoben. Pro Herz wurden mikroskopisch jeweils vier Herzschnitte im Abstand von 2mm von basal bis apikal ausgewertet und prozentual als Anteil der freien Fläche des linken Ventrikels angegeben (siehe II.2.5.4. Infarktgrößenbestimmung).

An Tag 30 nach Infarkt konnte bei den mit ECFCs behandelten Versuchstieren eine im Vergleich zur mit isotonischer Natriumchloridlösung behandelten Kontrollgruppe eine statistisch signifikante, im Mittel um 15,8% reduzierte linksventrikuläre Infarkttnarbe beobachtet werden (MI+NaCl 66,1%±4,3 vs. ECFCs 50,3%±4,5; $p < 0,05$), wie in **Abbildung 26** graphisch dargestellt.

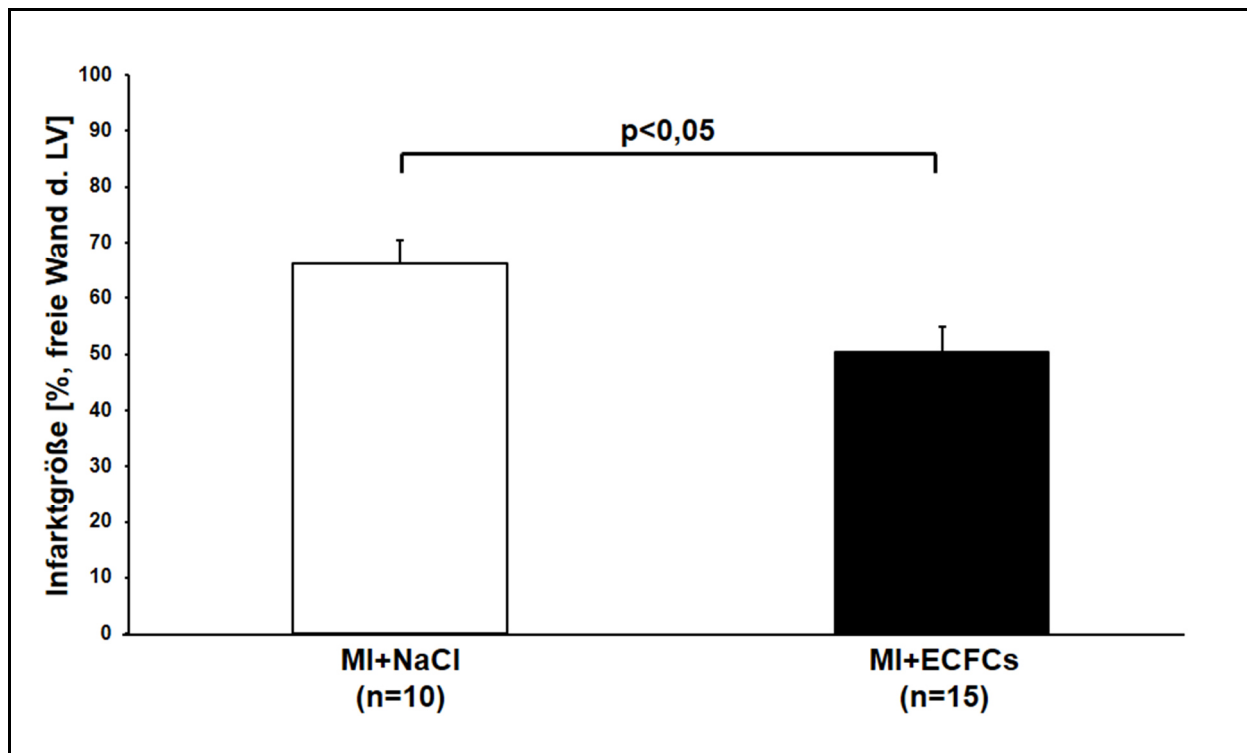


Abbildung 26 Vergleich der histologisch quantifizierten Infarktgrößen in der Kontroll- und den Behandlungsgruppen 30 Tage nach Infarktinduktion.

III.2.2. Linksventrikuläre Vorderwand- und Septumdicke

Korrelierend zur Infarktgröße zeigt sich in der mit ECFCs behandelten Versuchstiergruppe eine tendenziell, wenngleich statistisch nicht signifikante, geringfügig größere Vorderwanddicke. Zwar lässt sich in der Tendenz ein Unterschied in der Vorderwanddicke zwischen Behandlungs- und

ERGEBNISSE

Kontrollgruppe (MI+NaCl $0,20 \pm 0,04$ mm vs. MI+ECFCs $0,28 \pm 0,08$ mm; nicht signifikant) beobachten, die Differenz erreicht jedoch nicht das Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Die Septumdicke imponiert vergleichsweise unbeeinflusst (MI+NaCl $1,13 \pm 0,09$ mm vs. MI+ECFCs $1,19 \pm 0,07$ mm, nicht signifikant). Linksventrikuläre Vorderwand- und Septumthicken sind graphisch in den **Abbildungen 27** und **28** dargestellt.

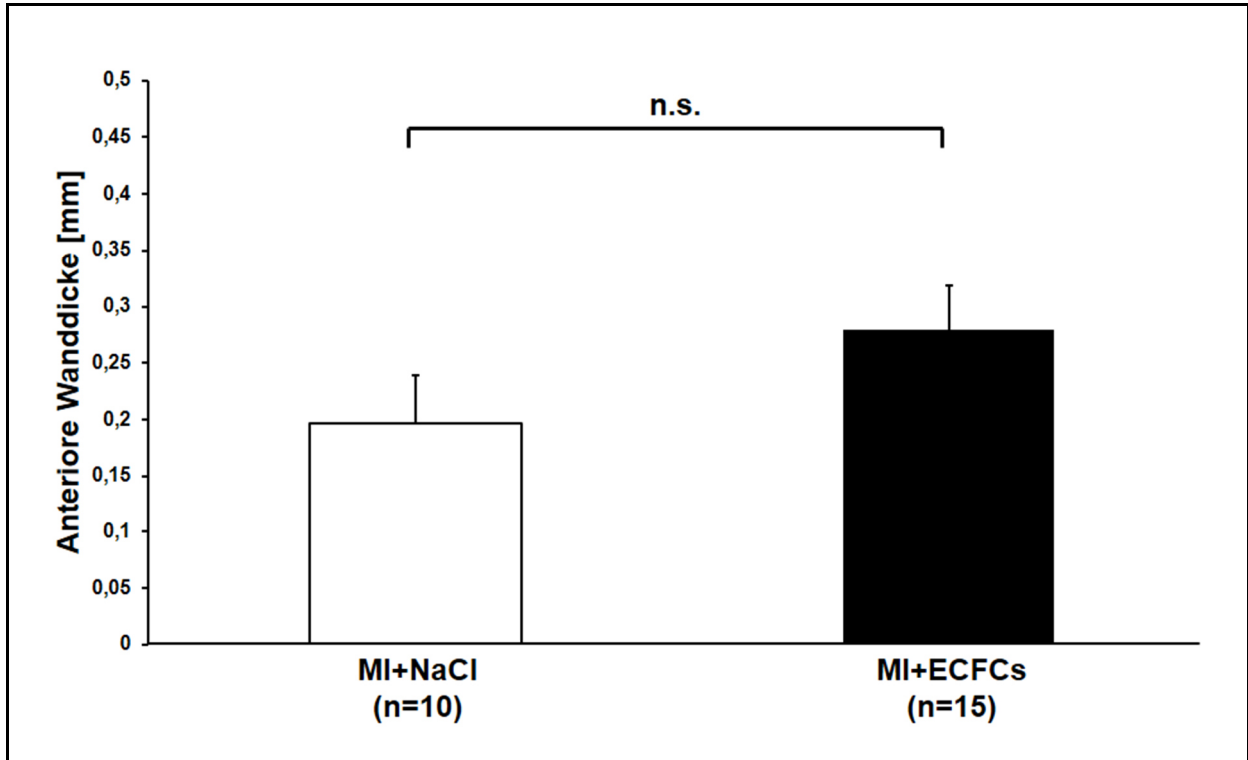


Abbildung 27 Vergleich der histologisch quantifizierten Vorderwanddicke in der Kontroll- und den Behandlungsgruppen 30 Tage nach Infarktinduktion, n.s.: $p > 0,05$.

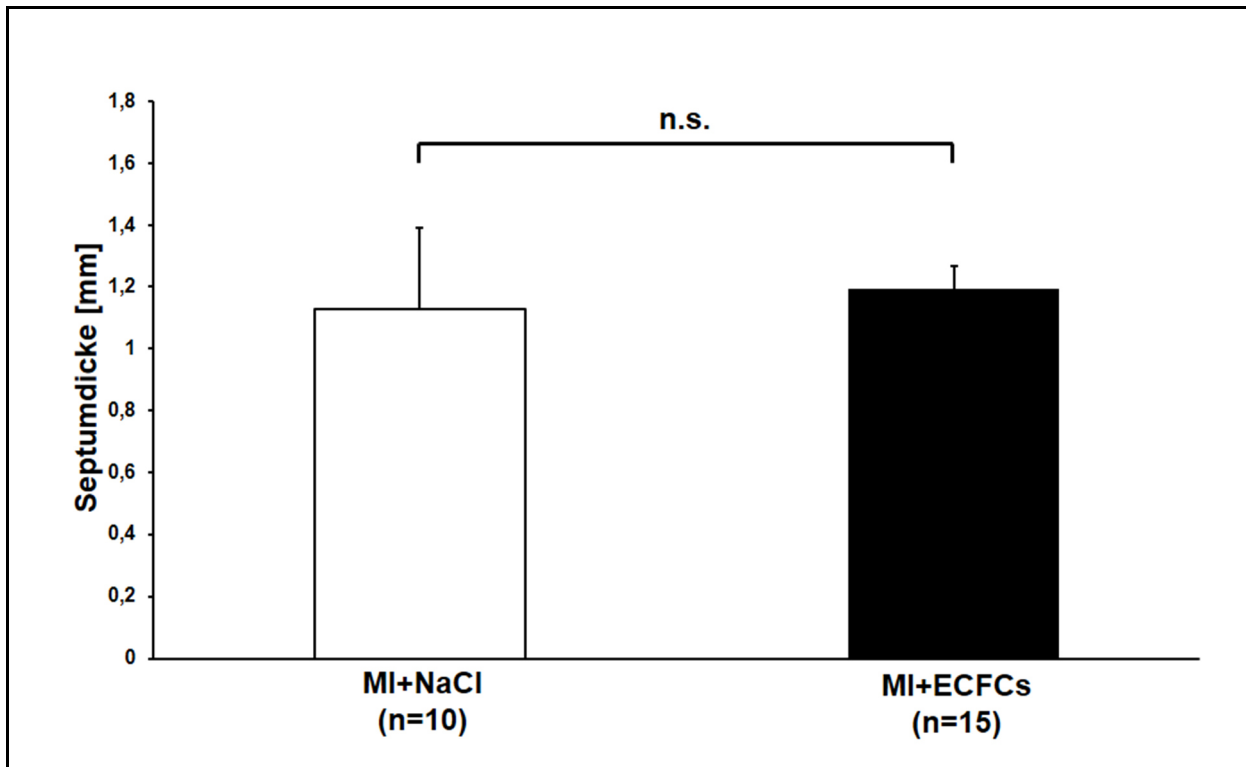


Abbildung 28 Vergleich der histologisch quantifizierten Septumdicke in der Kontroll- und den Behandlungsgruppen 30 Tage nach Infarktinduktion; n.s.: $p > 0,05$.

In **Abbildung 29** gezeigt ist ein jeweils für die Gruppe der unbehandelten Kontrolltiere sowie für die Gruppe der mit ECFCs behandelten Tiere exemplarischer, transversaler Schnitt in Höhe der Papillarmuskeln, der für die histomorphologische Auswertung herangezogen wurde.

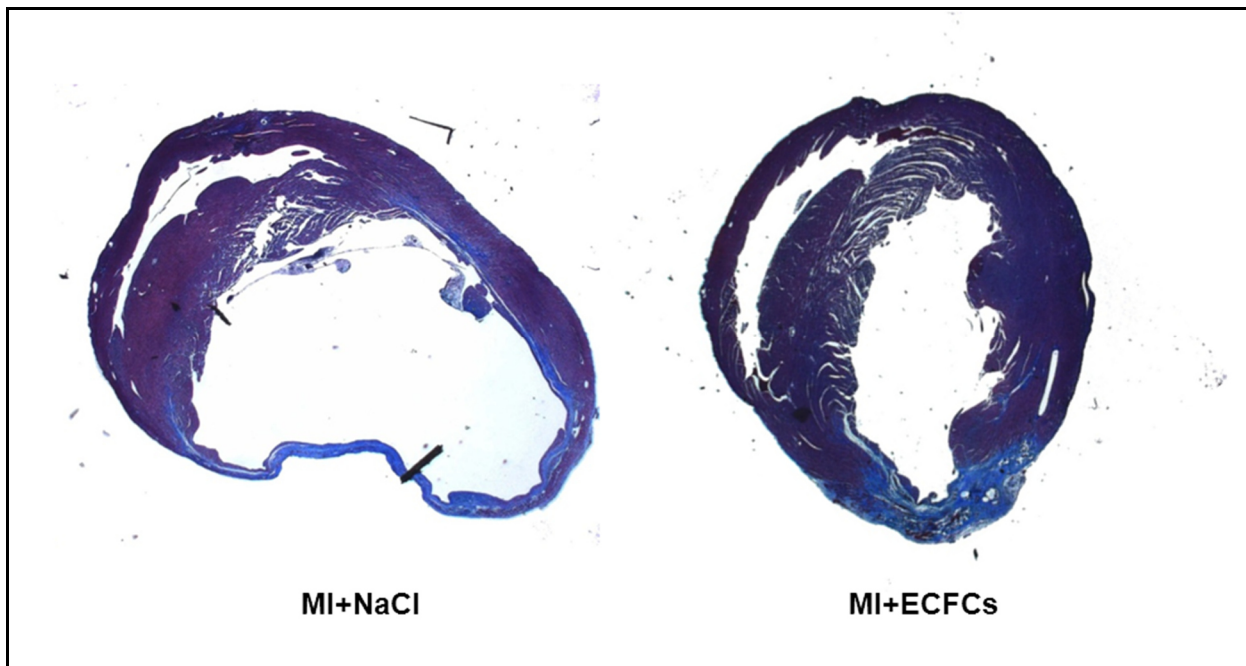


Abbildung 29 Exemplarischer histologischer (Masson-Trichrom) Kurzachsenschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln.

III.3. Neovaskularisation

Ein bekannter zelltherapeutischer Effekt liegt in einer Verbesserung der myokardialen Perfusion durch Steigerung der Neovaskularisation. Da EPCs als Träger angiogenetischer Wachstumsfaktoren bekannt sind, untersuchten wir den Grad der Neovaskularisierung der Grenzzone des Infarktes zum unbeschädigten Myokard. Zur immunhistologischen Quantifizierung der Vaskularisationsdichte wurde eine antikörperbasierte Darstellung (CD31+) der Kapillaren herangezogen.

Dabei zeigt sich in der Behandlungsgruppe im Infarkttrandbereich eine signifikant höhere Kapillardichte pro Gesichtsfeld im Vergleich zur Kontrollgruppe (MI+NaCl $6,2 \pm 0,5$ vs. MI+ECFCs $8,6 \pm 0,4$, $p < 0,001$; siehe **Abbildung 30**). Über die planimetrische Bestimmung der Fläche der einzelnen Kapillaren lässt sich darüber hinaus konstatieren, dass CD31+ Kapillaren im Infarkttrandbereich von behandelten Tieren ein signifikant größeres Lumen aufweisen (MI+NaCl $2,1 \pm 0,23 \text{mm}^2$ (n=10) vs. MI+ECFCs $3,4 \pm 0,23 \text{mm}^2$ (n=15), $p < 0,001$; siehe **Abbildung 31**).

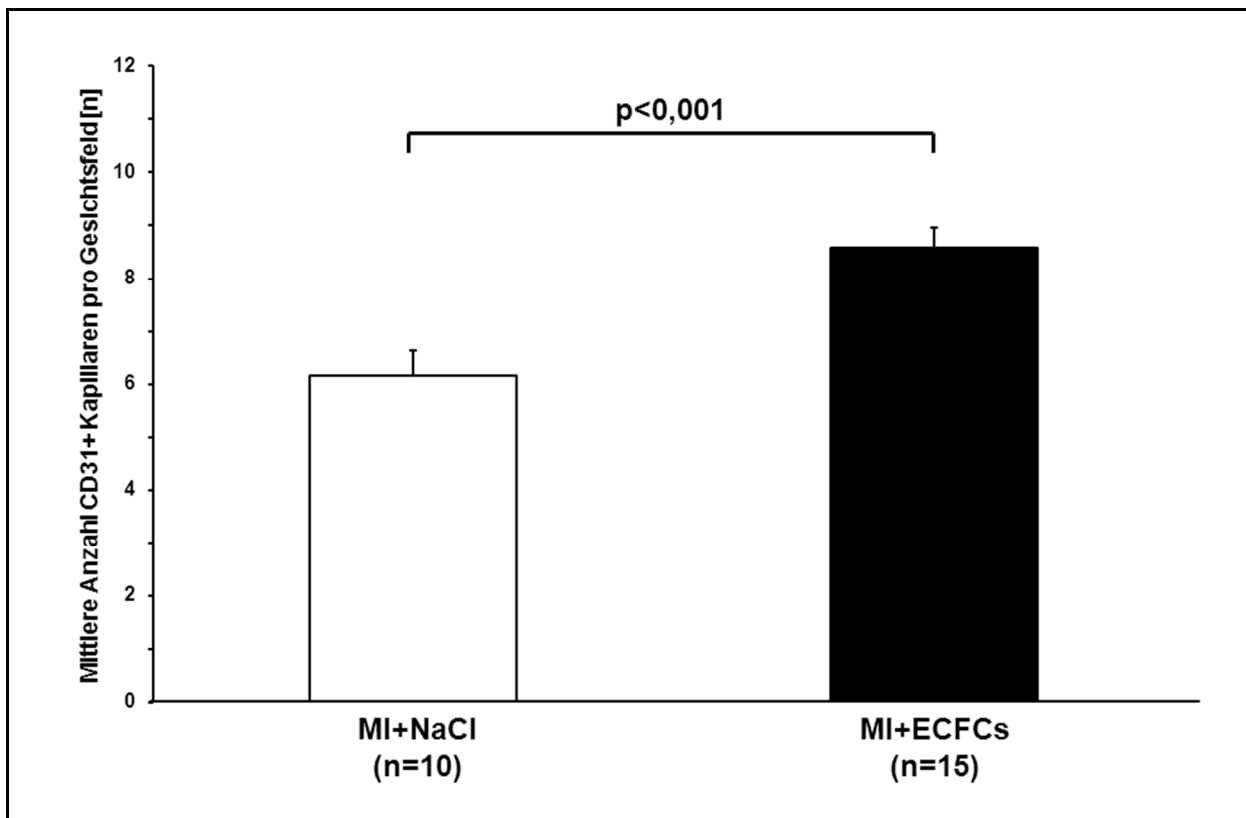


Abbildung 30 Mittlere Anzahl der CD31-positiver Kapillaren pro mikroskopischem Gesichtsfeld.

ERGEBNISSE

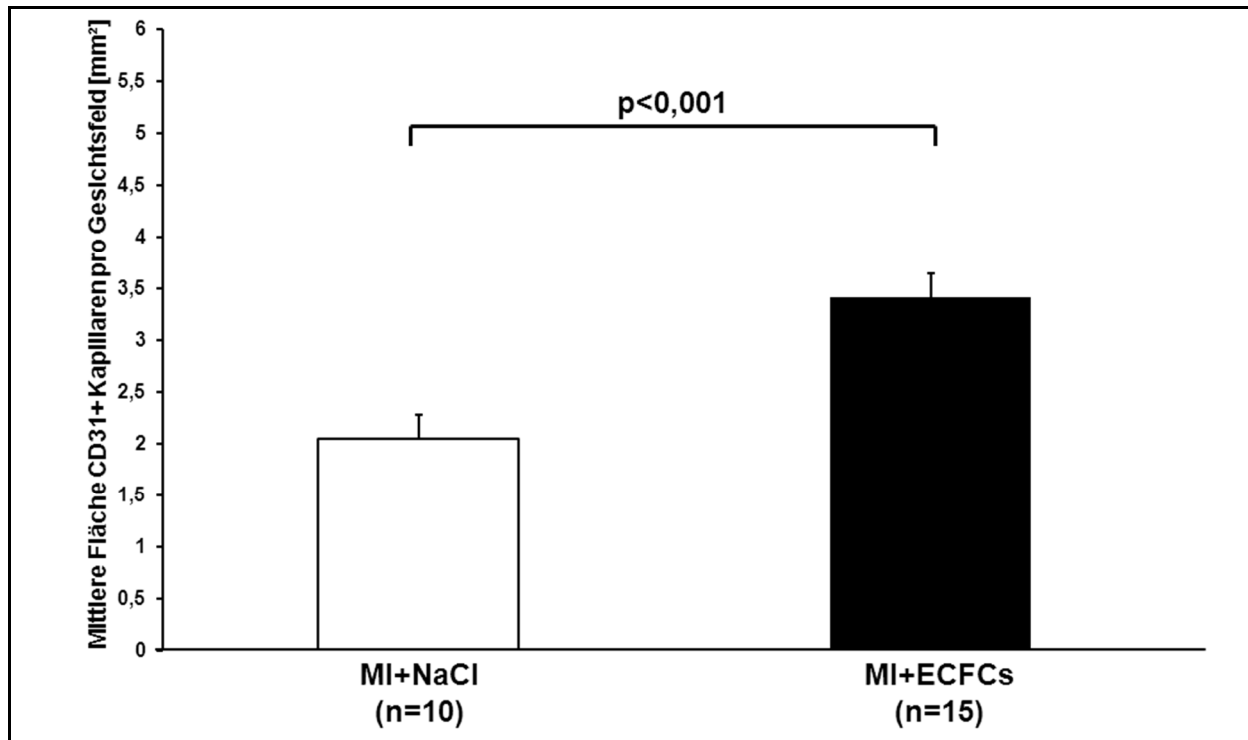


Abbildung 31 Mittlere Fläche der CD31-positiver Kapillaren pro mikroskopischem Gesichtsfeld in mm².

Abbildung 32 zeigt eine repräsentative Immunhistologie, wie sie für die Quantifizierung der Vaskularisationsdichte herangezogen wurde.

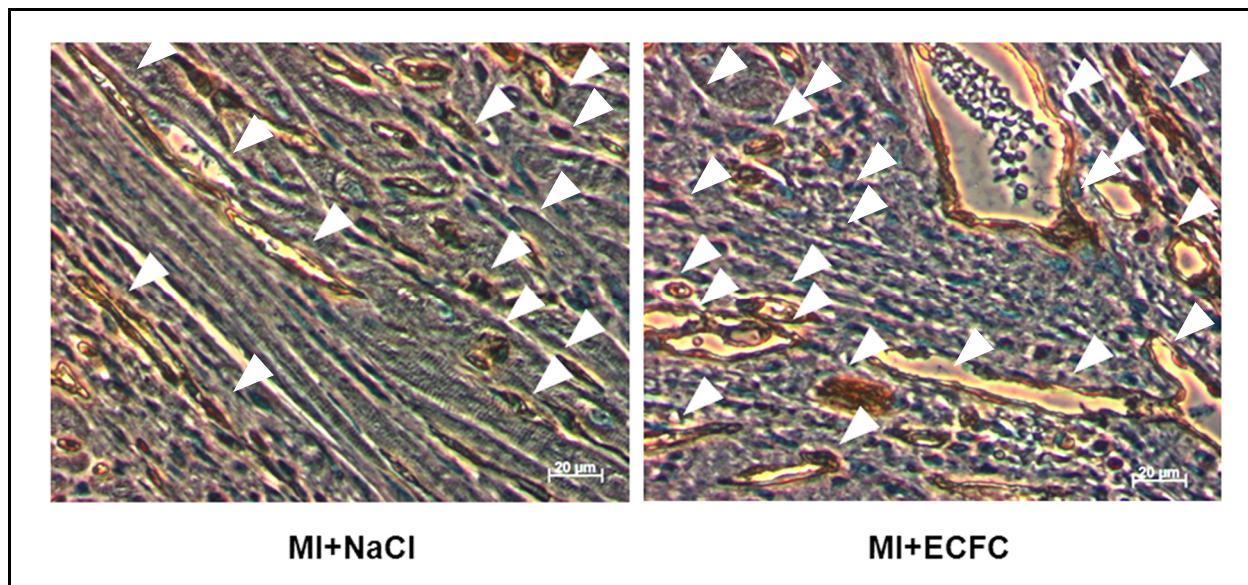


Abbildung 32 Exemplarische Immunhistologie für die anti-CD31 Färbung. Die weißen Pfeile markieren CD31+ Kapillaren.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine zelltherapeutische Behandlung 30 Tage nach MI zu einer Verkleinerung des Infarktreaus führt und es zu einer Verbesserung der Herzfunktion kommt. Der immunhistologisch nachweisbare Anstieg der Anzahl von CD31+ Zellen

in der Grenzzone des Infarktes in der Behandlungsgruppe weist in diesem Zusammenhang auf eine vermehrte Neovaskularisierung hin.

III.4. Retention transplanteder Zellen nach intramyokardialer Injektion

Zur immunhistologischen Detektion des Überlebens und einer Integration der intramyokardial verabfolgten Zellen an Tag 30 post-MI wurden humanspezifische Antikörper gegen HLA und Vimentin verwendet. In keinem der untersuchten Schnitte fanden sich positiv markierte Zellen. Eine Darstellung exemplarischer Schnitte erübrigt sich damit. Eine immunhistologische Untersuchung von Schnitten zur Untersuchung einer Überlebenskinetik zu früheren Zeitpunkten wurde in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen.

III.5. Durchflusszytometrie

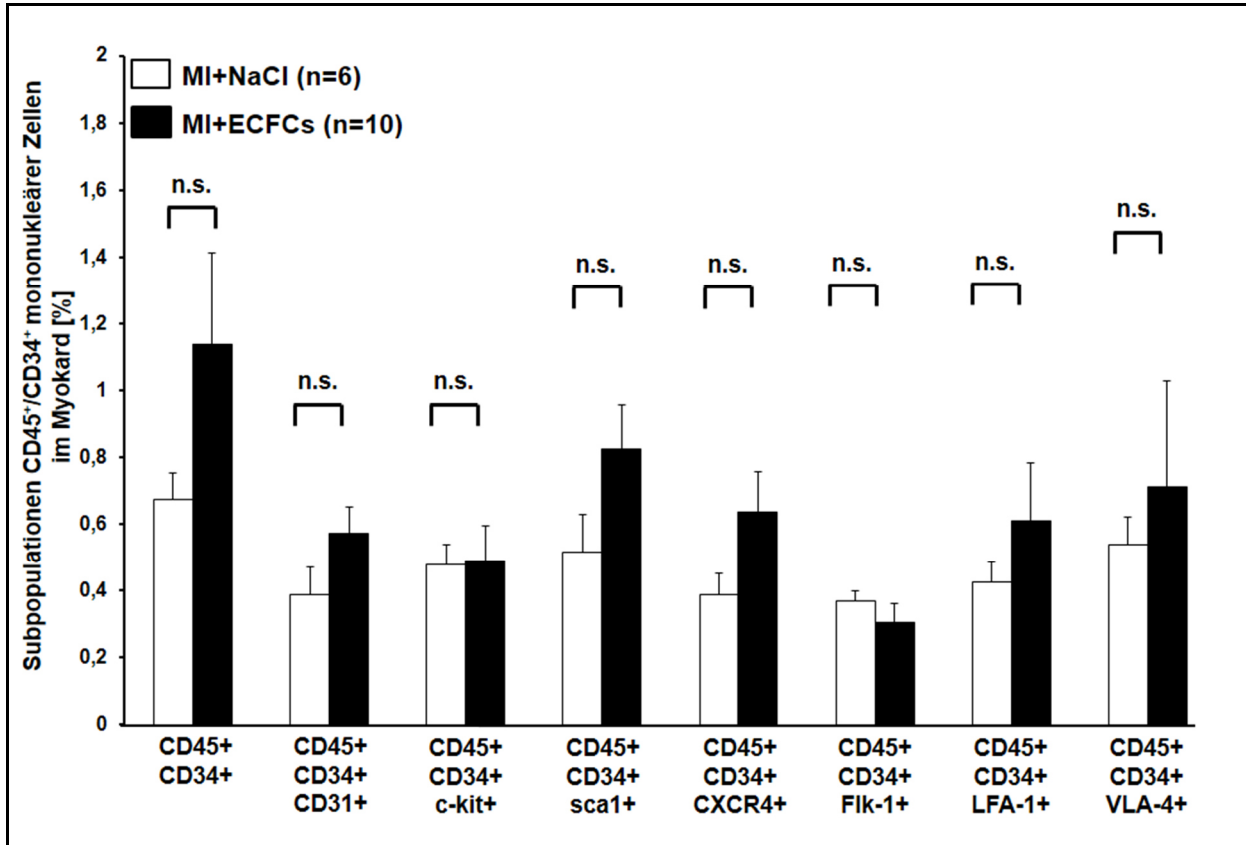
III.5.1. Myokardiales Homing myelomonocytyärer Stammzellen

Ischämie und infarktinduzierte Nekrose sind ein potenter Stimulus für die Expression proinflammatorischer Zytokine, die eine Rekrutierung inflammatorischer Zellen aus der Blutzirkulation hervorruft. Bereits in den ersten Stunden nach Infarkt ereignis infiltrieren mobilisierte mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark, allen voran neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, das infarzierte Myokardareal. Diese Zellen tragen zur proteolytischen Digestion und Phagozytose des infarzierten Gewebes bei. Insbesondere Zirkulierende CD34+ Stammzellen werden als potente Induktoren der Neovaskularisation angesehen.

Zwei Tage nach chirurgisch, durch LAD-Ligation induziertem MI wurden die Versuchstiere euthanasiert, die Herzen entnommen und gemäß Protokoll für die durchflusszytometrische Untersuchung aufbereitet. Untersucht wurde eine myozyten-depletierte Einzelzellsuspension um eine Anreicherung verschiedener Stammzellpopulationen im Myokard zu evaluieren. Über diverse Oberflächenmarker wurden sekundär über die Blutzirkulation eingewanderte monomyelozytäre Stammzellen und kardial-residente, also primär ortsständige Stammzellen unterschieden. Zur genauen Differenzierung wurden die myokardialen Zellpopulationen mit Antikörpern gegen den Panleukozytenmarker CD45 und den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 markiert. Die CD45+/CD34+ Zellpopulation umfasst mononukleäre Zellen monomyelozytären Phänotyps, die im Rahmen der infarktinduzierten Inflammation sekundär über die Zirkulation ins geschädigte Myokard einwandern. Kardial-residente Stammzellpopulationen exprimieren weder CD45 noch CD34. Darüber hinaus wurden durch Markierung mit einem dritten Antikörper (CD31, c-kit, Sca1, CXCR4, Flk-1, LFA-1, VLA4) Informationen über den quantitativen Anteil einzelner Subpopulationen gewonnen.

ERGEBNISSE

Zwar scheinen im graphischen Trend mehr Zellen ins Myokard von mit ECFCs behandelten Tieren einzuwandern, jedoch erweisen sich die Unterschiede sowohl für die Gesamtpopulation der CD45+/CD34+ Zellen als auch deren Subpopulationen insgesamt als statistisch nicht signifikant (siehe **Abbildung 33** und **Tabelle 5**). **Abbildung 34** zeigt einen exemplarischen FACS-Plot.



	CD45+ CD34+	CD45+ CD34+ CD31+	CD45+ CD34+ c-kit+	CD45+ CD34+ sca1+	CD45+ CD34+ CXCR4+	CD45+ CD34+ Flk-1+	CD45+ CD34+ LFA-1+	CD45+ CD34+ VLA-4+
Kontrolle	0,7±0,1%	0,4±0,1%	0,5±0,1%	0,5±0,1%	0,4±0,1%	0,4±0,1%	0,4±0,1%	0,5±0,1%
ECFCs	1,1±0,3%	0,6±0,1%	0,5±0,1%	0,8±0,1%	0,6±0,1%	0,3±0,1%	0,6±0,2%	0,7±0,3%

Abbildung 33 und **Tabelle 5** (unten). Durchflusszytometrisch bestimmte relative Anzahl der CD45+/CD34+ mononukleären Zellen sowie deren Subpopulationen im Myokard 2 Tage nach Infarktinduktion mit und ohne Zellbehandlung. n.s.: p>0,05.

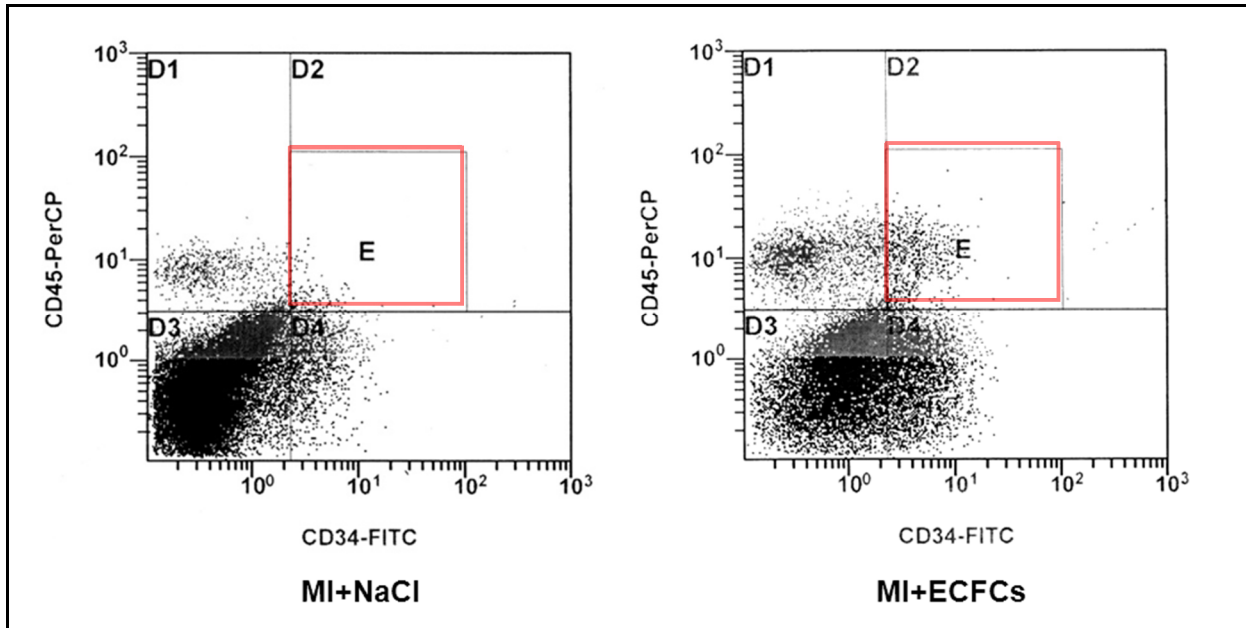


Abbildung 34 Exemplarischer durchflusszytometrischer Analyseplot für die Gesamtpopulation der CD34⁺/CD45⁺ Zellen.

III.5.2. Anzahl CD45⁻/CD34⁻/sca1⁺ bzw. c-kit⁺ + kardial-residenter Stammzellen

Eine indirekte, durch die Behandlung induzierte Stimulation kardial-residenter Stammzellpopulationen stellt einen akzeptierten Erklärungsansatz für positive Therapieeffekte nach Zytokin- oder Stammzelltransplantation dar. Um einen solchen indirekten Mechanismus für der Erklärung der gesehenen Therapieeffekte zu beleuchten, wurde eine mögliche Beeinflussung der Zahl endogener, kardial-residenter Stammzellpopulationen durch die Zelltransplantation evaluiert. Über den Ausschluss von CD45⁺/CD34⁺ Zellen werden sekundär ins Myokard im Rahmen der Inflammationsphase aus der Zirkulation immigrierende hämatopoetische und inflammatorische Zellen exkludiert. Eine Kombination der Oberflächenmarker CD45⁻/CD34⁻/sca-1⁺ bzw. CD45⁻/CD34⁻/c-kit⁺ wird als typisches Epitoprofil für kardial-residente Stammzellen angesehen.

Die Auswertung ergab, dass sich im Myokard der mit ECFCs behandelten Tiere eine deutlich, etwa 2,5-fach höhere Anzahl von kardial-residenten, CD34⁻/CD45⁻/sca-1⁺ Stammzellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (MI+NaCl 4,47±1,71 (n=6) vs. MI+ECFCs 11,70±1,67 (n=10), p<0,05)(**Abbildung 35**). Ein exemplarischer durchflusszytometrischer Analyseplot für die jeweilige Versuchsgruppe ist in **Abbildung 36** wiedergegeben.

ERGEBNISSE

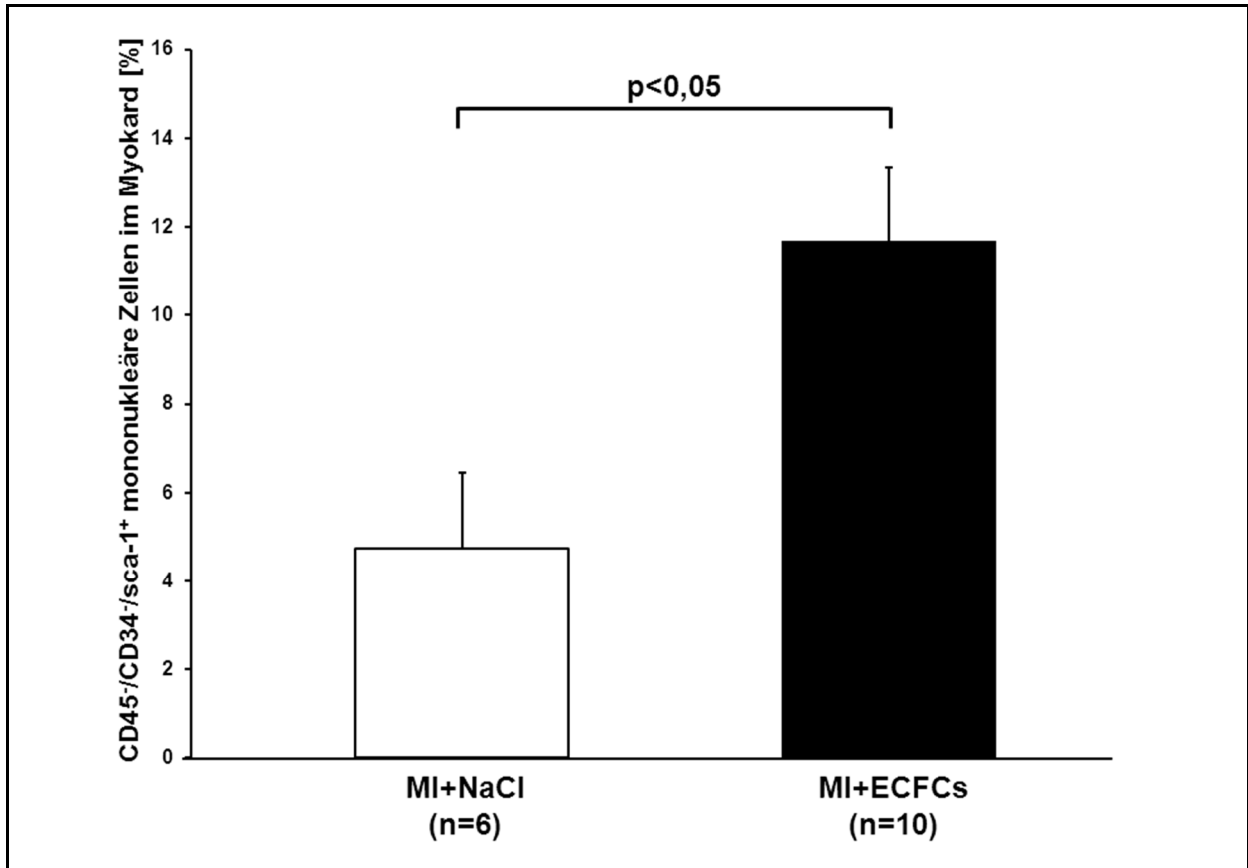


Abbildung 35 Durchflusszytometrisch bestimmte relative Zahl der kardial-residenten CD45-/CD34-/Sca-1+ Zellen im Myokard 2 Tage nach Infarktinduktion bei Tieren mit und ohne Zellbehandlung.

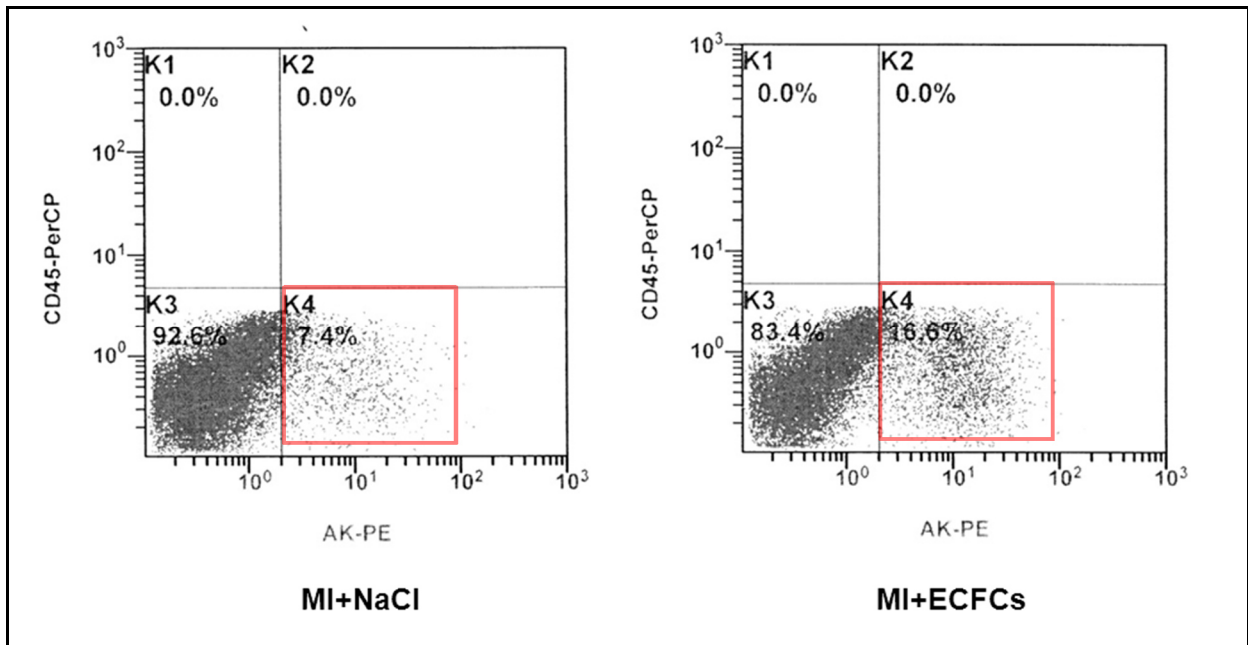


Abbildung 36 Exemplarischer durchflusszytometrischer Analyseplot bei der Bestimmung der Anzahl kardial-residenter CD34-/CD45-/Sca-1+ Zellen.

Dahingegen konnte für die Population der CD34-/CD45-/c-kit+ Zellen im Vergleich zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied (MI+NaCl $0,40 \pm 0,06$ (n=6) vs. MI+ECFCs $0,33 \pm 0,11$ (n=10), nicht signifikant) beobachtet werden (siehe **Abbildung 37**).

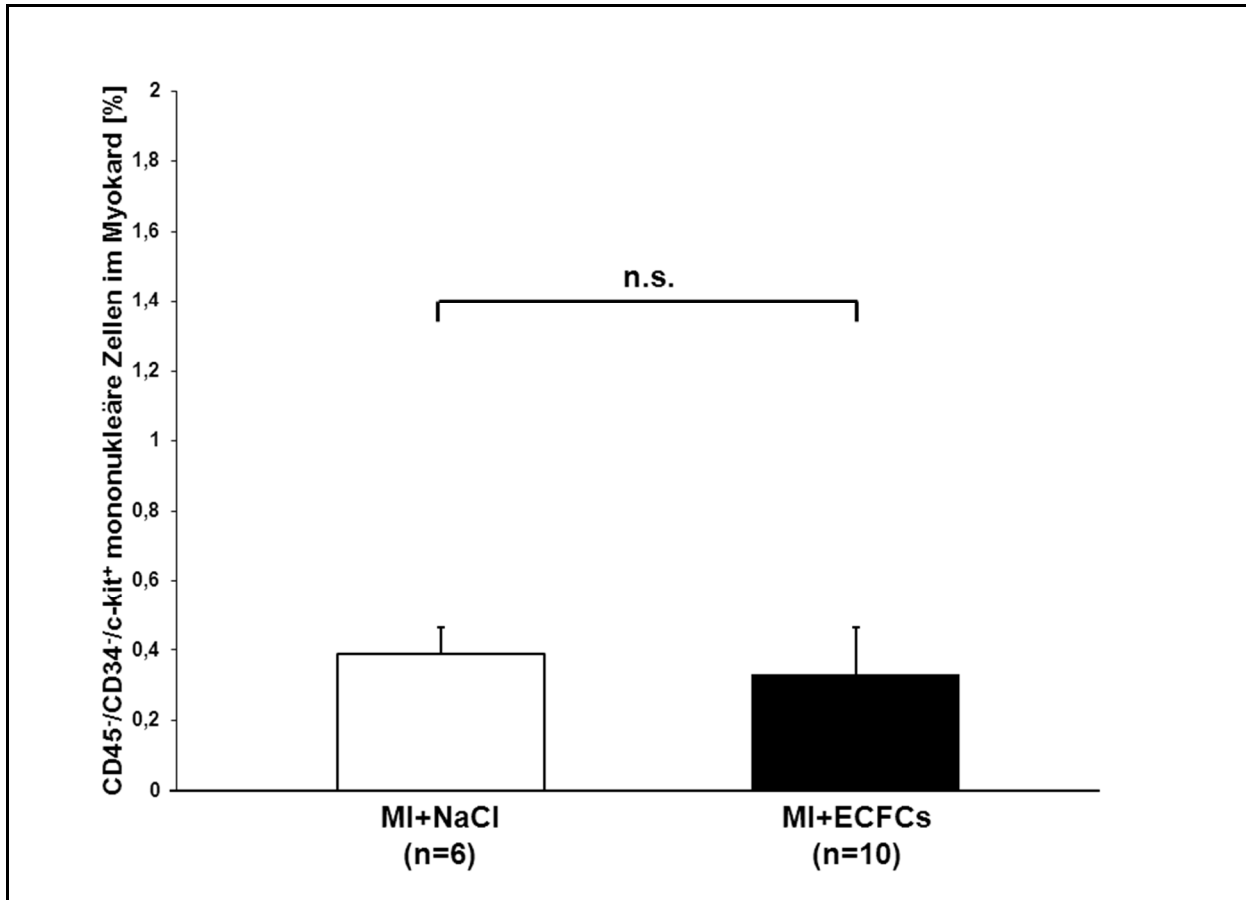


Abbildung 37 Zahl der kardial-residenten CD45-/CD34-/c-kit+ Zellen im Myokard 2 Tage nach Infarktinduktion mit und ohne Zellbehandlung. n.s.: $p > 0,05$.

III.6. Subgruppenanalyse: ECFCs von Patienten mit Diabetes mellitus versus ECFCs von Patienten ohne Diabetes mellitus

Wie in **Kapitel I.3.5** erläutert sind mehrere Faktoren beschrieben, die sich sowohl auf die Quantität als auch auf die Funktionalität von EPCs auswirken. So konnten verschiedene Studien eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl und der funktionellen Kapazität zirkulierender EPCs und dem Vorliegen sowie der Schwere kardiovaskulärer Risikofaktoren dokumentieren. In einer Subgruppenanalyse wurde daher ein möglicher Einfluss eines bei den Spenderpatienten bestehenden Diabetes mellitus auf die Funktionalität der ECFCs und deren Effekte nach Transplantation untersucht. Entsprechend der Abbildungen im vorhergehenden Ergebnisteil sind im Folgenden die Ergebnisse für den Vergleich der Gruppen von ECFCs von Patienten mit respektive ohne Diabetes mellitus gezeigt. Für keinen der analysierten Endpunkte (Hämodynamik: **Tabelle 6**, Histomorphometrie: **Abbildungen 38-40**, Neovaskularisation:

ERGEBNISSE

Abbildung 41 und 42, mononukleäre Zellen mit Stammzeleigenschaften im Myokard: Abbildungen 43 und 44 sowie Tabelle 6 und 7) zeigten sich nennenswerte signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

III.6.1. Hämodynamik

Parameter	MI+NaCl n=10	MI + non-diab. ECFCs n=6	MI + diab. ECFCs n=9	p-Wert (t-Test)
Herzfrequenz [n/min]	427 ± 20	454 ± 26	388 ± 21	0,06
ESV [µl]	17,27 ± 1,39	20,37 ± 1,81	22,34 ± 2,87	0,62
EDV [µl]	20,18 ± 1,7	25,96 ± 1,86	28,50 ± 3,85	0,62
Pmax syst. [mmHg]	67,27 ± 6,17	77,13 ± 2,95	86,68 ± 2,88	0,04
ESP [mmHg]	65,14 ± 5,96	73,40 ± 3,38	84,12 ± 3,12	0,04
EDP [mmHg]	7,55 ± 0,73	4,54 ± 0,61	9,92 ± 1,94	0,05
SV [µl]	4,73 ± 0,55	8,46 ± 0,48	8,49 ± 1,02	0,98
EF [%]	22,61 ± 1,73	31,81 ± 2,11	29,51 ± 1,44	0,37
HZV [µl/min]	2006,71 ± 243,18	3821,92 ± 238,14	3236,54 ± 384,78	0,28
SA [mmHg x µl]	206,17 ± 39,65	509,40 ± 148,5	508,63 ± 56,72	0,99
ΔV/Δt max [µl/sec]	169,34 ± 19,50	267,37 ± 18,83	275,10 ± 34,41	0,87
ΔV/Δt min [µl/sec]	-157,97 ± 14,70	-264,84 ± 20,89	-270,49 ± 41,75	0,92
ΔP/Δt max [mmHg/sec]	3896,24 ± 534,95	5154,65 ± 469,37	5240,02 ± 447,51	0,89
ΔP/Δt min [mmHg/sec]	-3222,60 ± 388,67	-4611,82 ± 346,89	-4513,80 ± 297,49	0,84
Max. Leistung (mWatt)	1,32 ± 0,18	2,79 ± 0,37	2,60 ± 0,2	0,71

Tabelle 6 Vergleichende Gegenüberstellung der hämodynamischen Funktionsparameter der Tiere aus Kontroll- und Behandlungsgruppe 30 Tage nach Myokardinfarkt. Differenziert wird zwischen Tieren, welche Zellen von diabetischen bzw. nicht-diabetischen Spenderpatienten erhielten. n.s.: p>0,05.

III.6.2. Histomorphologie und Immunhistologie

III.6.2.1. Infarktgröße

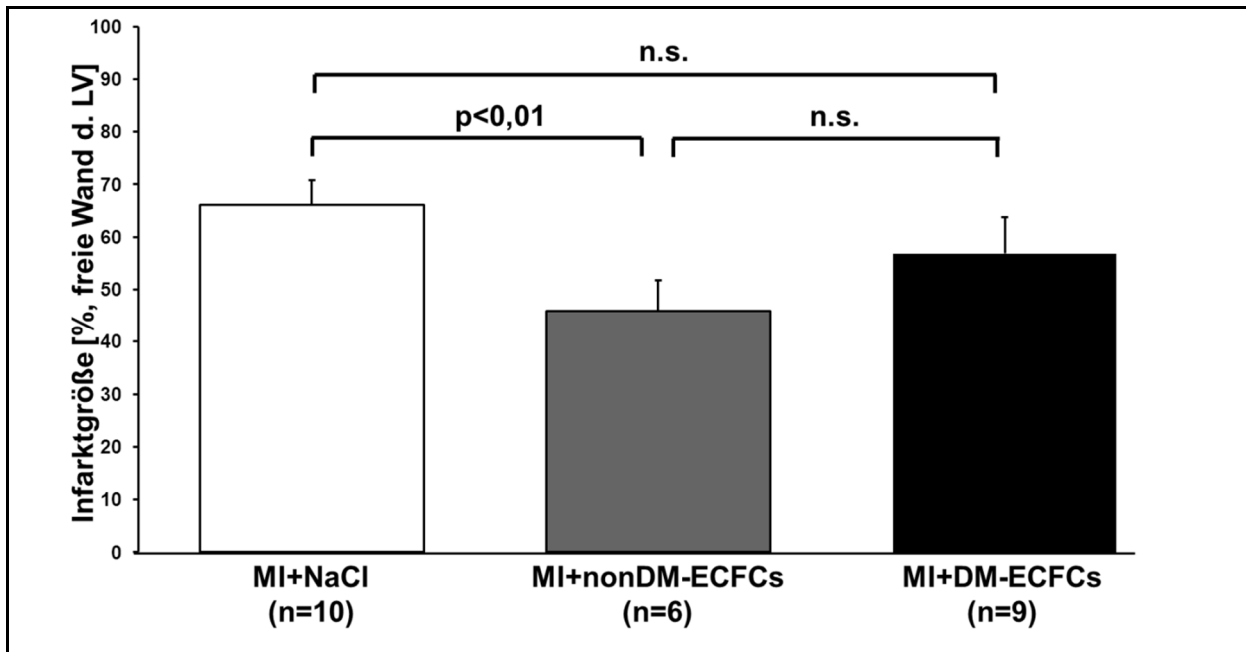


Abbildung 38 Vergleich der histologisch quantifizierten Infarktgrößen in der Kontroll- und den Behandlungsgruppen 30 Tage nach Infarktinduktion; differenziert wurde zwischen Tieren, welche Zellen von diabetischen bzw. nicht-diabetischen Spenderpatienten erhielten; n.s.: $p > 0,05$.

III.6.2.2. Linksventrikuläre Vorderwand- und Septumdicke

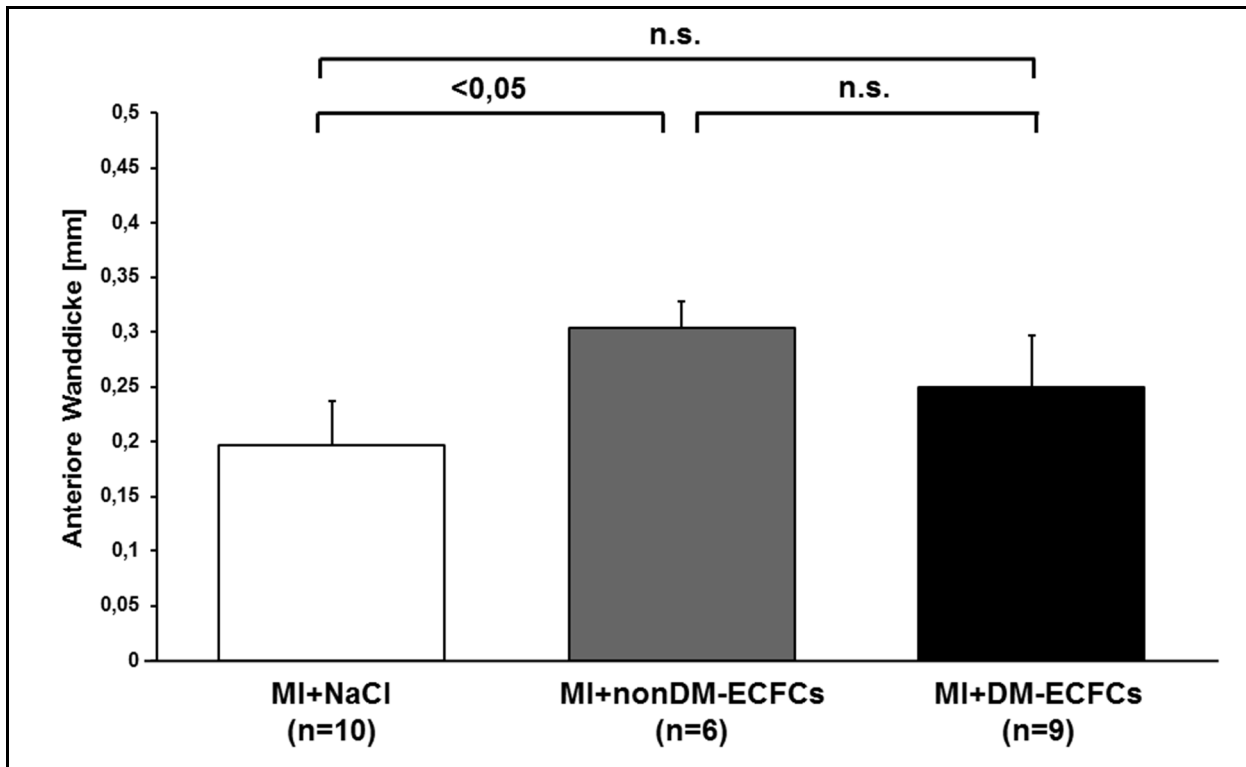


Abbildung 39 Vergleich der histologisch quantifizierten Vorderwanddicke in der Kontroll- und den Behandlungsgruppe(n) 30 Tage nach Infarktinduktion; n.s.: $p > 0,05$.

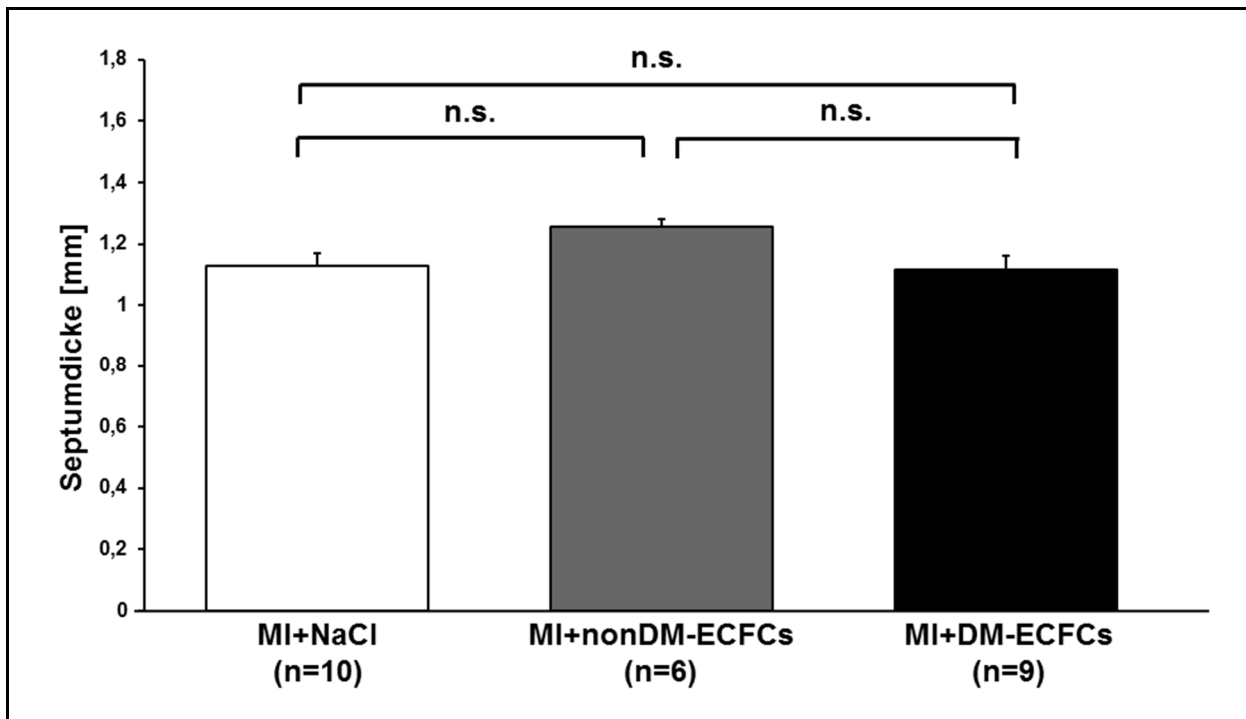


Abbildung 40 Vergleich der histologisch quantifizierten Septumdicke in der Kontroll- und den Behandlungsgruppe(n) 30 Tage nach Infarktinduktion; n.s.: $p > 0,05$.

III.6.3. Neovaskularisation

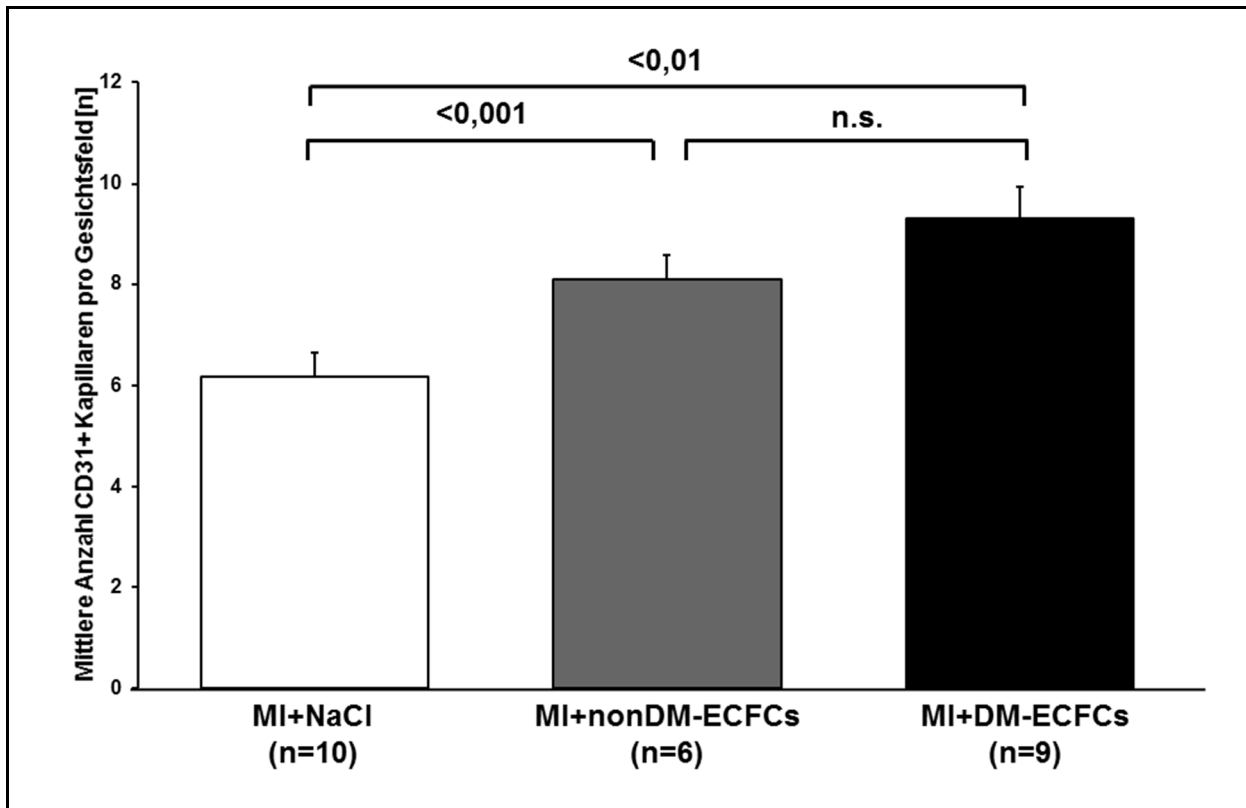


Abbildung 41 Mittlere Anzahl der CD31-positiver Kapillaren pro mikroskopischem Gesichtsfeld; n.s.: $p > 0,05$.

ERGEBNISSE

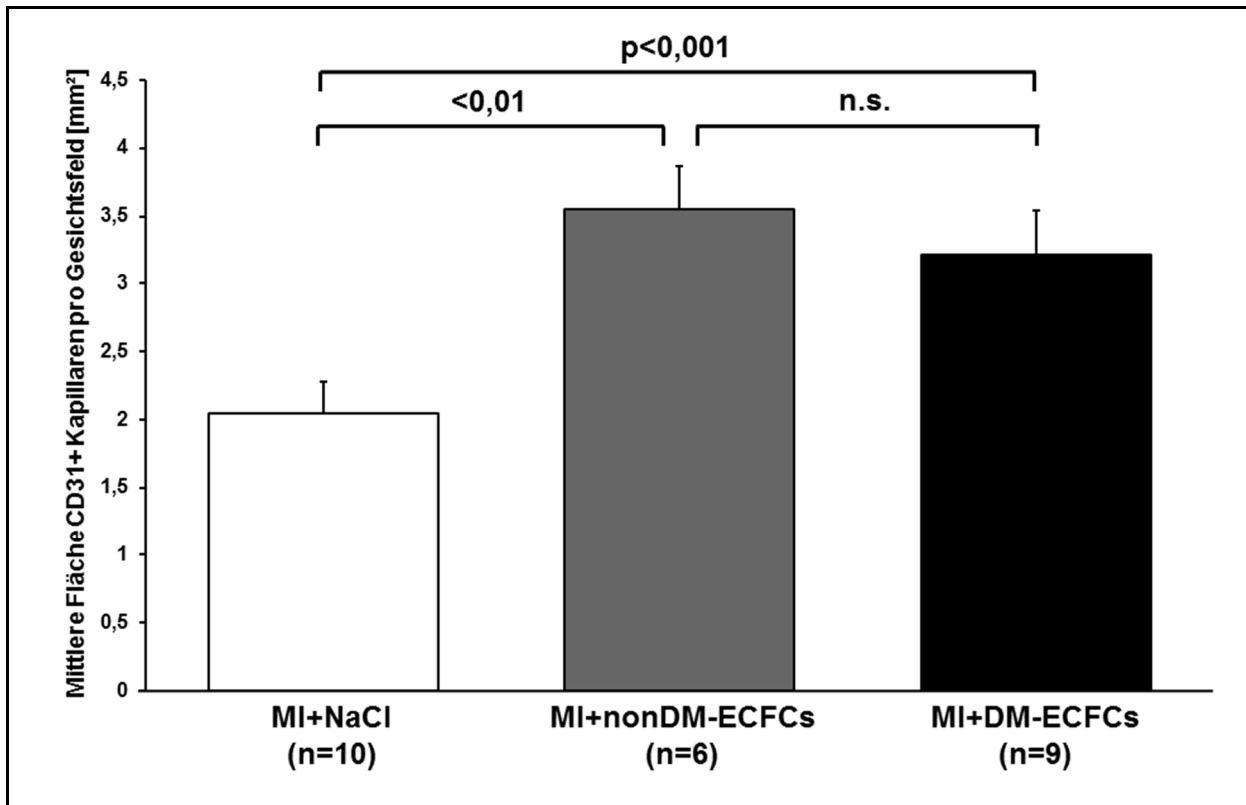
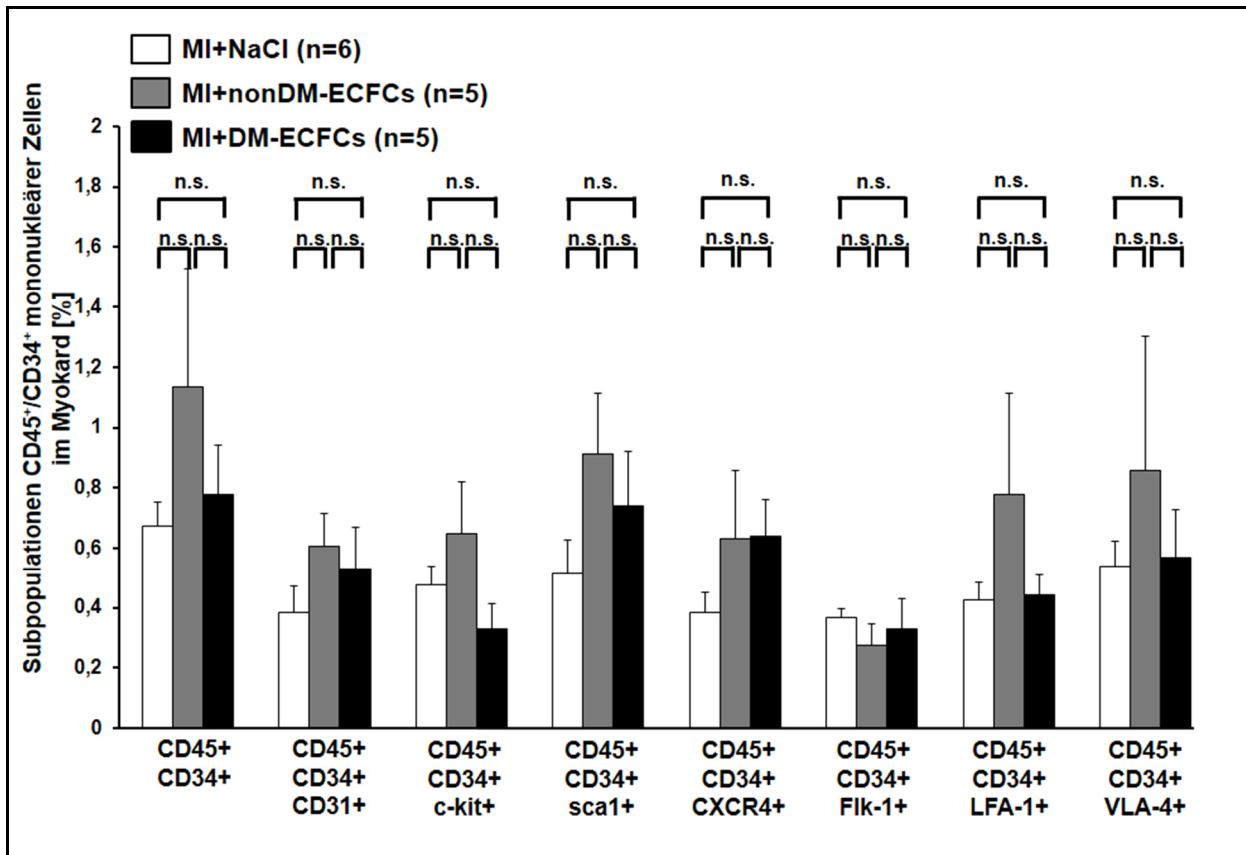


Abbildung 42 Mittlere Fläche der CD31-positiver Kapillaren pro mikroskopischem Gesichtsfeld in mm²; n.s.: $p > 0,05$.

III.6.4. Durchflusszytometrie

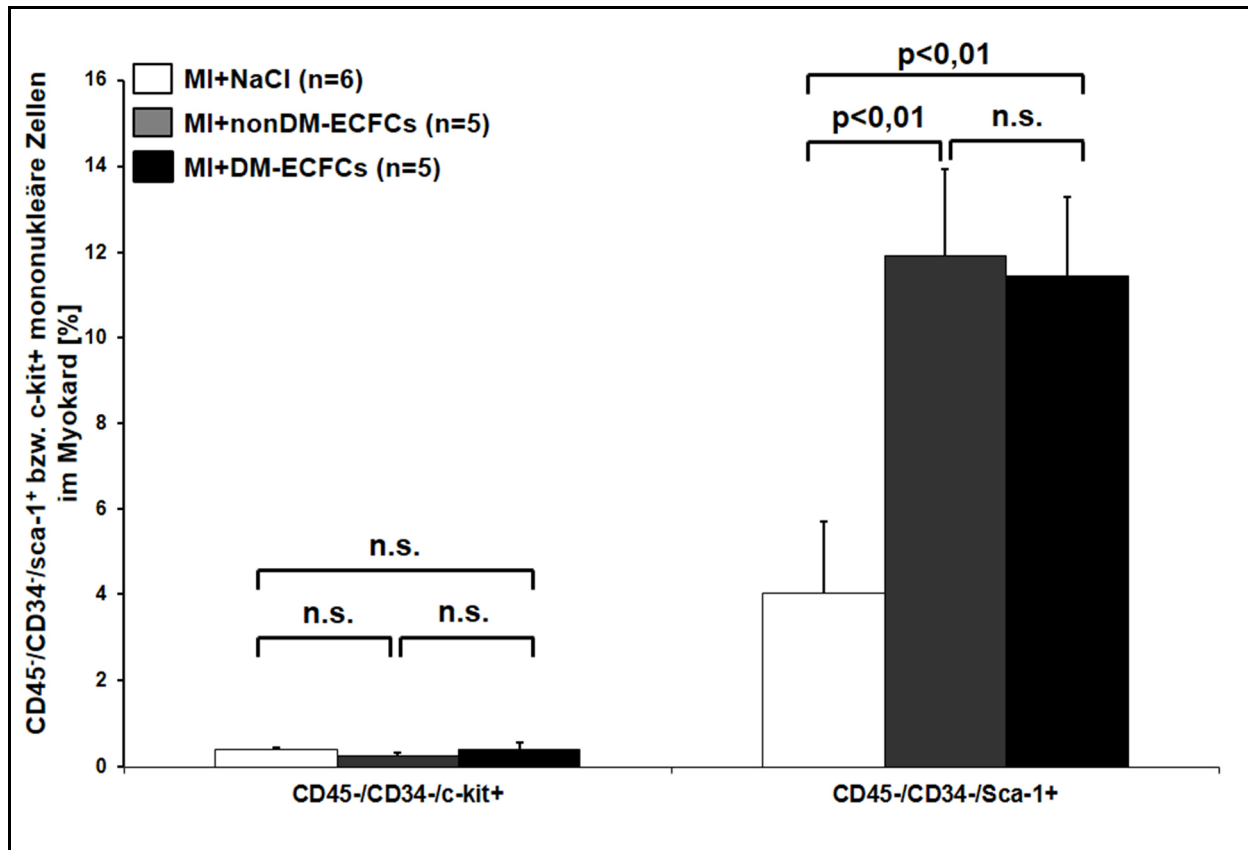
III.6.4.1. Myokardiales Homing myelomonzytärer Stammzellen



	CD45+ CD34+	CD45+ CD34+ CD31+	CD45+ CD34+ c-kit+	CD45+ CD34+ sca1+	CD45+ CD34+ CXCR4+	CD45+ CD34+ Flk-1+	CD45+ CD34+ LFA-1+	CD45+ CD34+ VLA-4+
Kontrolle	0,7±0,1%	0,4±0,1%	0,5±0,1%	0,5±0,1%	0,4±0,1%	0,4±0,1%	0,4±0,1%	0,5±0,1%
nonDM- ECFCs	1,1±0,4%	0,6±0,1%	0,6±0,2%	0,9±0,2%	0,6±0,2%	0,3±0,1%	0,8±0,4%	0,9±0,4%
DM- ECFCs	0,8±0,2%	0,5±0,1%	0,3±0,1%	0,7±0,2%	0,6±0,2%	0,3±0,1%	0,4±0,1%	0,6±0,2%

Abbildung 43 und Tabelle 7. Gesamtpopulation der CD45+/CD34+ mononukleären Zellen sowie deren Subpopulationen im Myokard 2 Tage nach Infarktinduktion mit und ohne Zellbehandlung. Differenziert wird zwischen Tieren, welche Zellen von diabetischen bzw. nicht-diabetischen Spenderpatienten erhielten. n.s.: p>0,05.

III.6.4.2. Anzahl CD45-/CD34-/sca1+ bzw. c-kit+ kardial-residenter Stammzellen



	CD45- CD34- c-kit+	CD45- CD34- Sca-1+
Kontrolle	0,4±0,1%	4,0±1,7%
nonDM- ECFCs	0,3±0,1%	11,9±2,0%
DM- ECFCs	0,4±0,2%	11,5±1,8%

Abbildung 44 und Tabelle 8. Durchflusszytometrisch bestimmte relative Zahl der kardial-residenten CD45-/CD34- /Sca-1+ bzw. c-kit+ Zellen im Myokard 2 Tage nach Infarktinduktion mit und ohne Zellbehandlung. Differenziert wird zwischen Tieren, welche Zellen von diabetischen bzw. nicht-diabetischen Spenderpatienten erhielten. n.s.: p>0,05.

IV. DISKUSSION

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss einer Transplantation von humanen ECFCs auf die zellulären Reparaturmechanismen nach experimentell induziertem MI im Mausmodell zu untersuchen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte die intramyokardiale Transplantation von ECFCs zu einer signifikanten Verbesserung der hämodynamischen Funktionsparameter, insbesondere der linksventrikulären Auswurfraction, sowie einer günstigen Beeinflussung des postischämischen kardialen Remodelings, die sich in geringeren Infarktgrößen bei den behandelten Tieren widerspiegelte. Eine direkte Beteiligung der Zellen an der Neoangiogenese oder eine myokardiale Differenzierung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine deutliche Verbesserung der Vaskularisationsdichte nach Zelltransplantation. In der durchflusszytometrischen Analyse der myoztendepletierten Zellfraktionen der Herzen der Versuchstiere 2 Tage nach Infarktinduktion und Zelltransplantation konnte eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe deutliche Steigerung der Zahl an CD45-/CD34-/Sca-1+ kardial-residenten Stammzellen im Herzen nachgewiesen werden. In der Subgruppenanalyse scheint die diabetische Stoffwechsellage der Spenderpatienten die Effektivität der EPC-Transplantation nicht zu limitieren.

IV.1. Retention transplantierte Zellen nach intramyokardialer Injektion

Obwohl in der vorliegenden Arbeit ein immunkompromittiertes Mausmodell verwendet wurde, welches eine immunvermittelte Abstoßung der humanen Zellen durch den murinen Empfänger unterbindet, konnten mit den verwendeten immunhistochemischen Zelldetektionsmethoden (humanes HLA und Vimentin) 30 Tage nach Infarktinduktion und Zelltransplantation keine verbliebenen Transplantatzellen mehr in den Herzen der behandelten Tiere nachgewiesen werden. Damit ist ein Beitrag der transplantierten Zellen zu einer direkten Neovaskularisation durch endotheliale Differenzierung unwahrscheinlich, wenngleich die Sensitivität der regulären Histologie bei der Detektion der transplantierten Zellen ungleich geringer ausfällt als bei anderen Zelldetektionsmethoden (FISH, Konfokalmikroskopie, PCR) [257]. Die Überlebenskinetik der transplantierten Zellen an früheren postoperativen Zeitpunkten wurde in der vorliegenden Arbeit histologisch nicht weiter untersucht und wäre das Ziel künftiger Arbeiten.

Das geringe Überleben und *Engraftment* der Transplantatzellen ist ein bekanntes Phänomen und wird, wie einleitend beschrieben, als einer der hauptverantwortlichen Gründe erachtet, warum die positiven Effekte nach Zellapplikation noch nicht in vollem Umfang ausgeschöpft werden können [293]. In einer aktuellen Studie, welche die in vivo Überlebenskinetik sowie die

Genexpression von transplantierten Knochenmarkstammzellen zum Inhalt hatte, zeigte sich, dass das Biolumineszenzsignal vom Zeitpunkt der Transplantation in ischämisches und nicht-ischämisches Myokard in exponentieller Weise abnimmt. Gerade einmal weniger als 1% der Zellen ließen sich 6 Wochen post transplantationem noch detektieren [294].

In einer Studie von Higuchi et al. kommen die Autoren zu einem ähnlichen Ergebnis. EPCs humanen Ursprungs wurden mit Eisenpartikeln bzw. einem NIS (Natrium-Jodid-Symporter) System markiert, wodurch eine Detektion entweder mittels MRT oder PET ermöglicht wurde. Zwar ließ sich an den Tagen 1 und 3 nach Transplantation von dual markierten Zellen (insgesamt 4×10^6) in das Myokard von immunkompromittierten Nacktratten sowohl in der MRT als auch in der PET-Untersuchung ein Signal detektieren, jedoch kommt es zwischen den beiden Zeiträumen zu einer raschen und drastischen Abnahme der Signalstärke. An Tag 7 war schließlich kein Signal mehr nachweisbar. Die Ergebnisse korrelierten mit den Ergebnissen der histologischen Zelnachweismethoden (humanes CD31 und CD68). Eine histologische Färbung mit dem Apoptosemarker TUNEL (terminal uridine-triphosphate nick-end labeling) zeigte korrelierend dazu ausgedehnte Apoptoseareale an der Stelle im Myokard, wo die ursprüngliche Zellapplikation vorgenommen wurde [295]. Ähnliches konnte in einer Arbeit von Li et al. gezeigt werden, in der die Zellretention nach Verabreichung der Zellen über unterschiedliche Zellapplikationswege (intramyokardial, intrakoronar, systemisch-venös, intraaortal) in einem Rattenmodell miteinander verglichen wurde. Mit Hilfe einer Biolumineszenzbildgebung sowie einer Detektion der Zellen mittels PCR zeigen die Autoren, dass die Zellretention nach intramyokardialer im Vergleich zu den anderen Applikationswegen zwar noch am besten ausfiel, es jedoch letztlich unabhängig vom Applikationsweg innerhalb der ersten 48 Stunden nach Verabfolgung zu einem raschen Verlust der Transplantatzellen kommt [296]. Eine Studie von Vrtovec et al. kommt ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine transendokardiale Applikation von Stammzellen zu höheren intramyokardialen Zellzahlen führt als eine transkoronare Applikation [297]. In einer Studie von Müller-Ehmsen wurde das Überleben und die Organverteilung von transplantierten mononukleären oder mesenchymalen Knochenmarkstammzellen mit speziellem Hinblick auf die applizierte Zellzahl und den Zeitpunkt der Verabreichung analysiert. Dabei wurden die Zellen männlicher Fischer-344-Ratten in die Infarktgrenzzone syngener, weiblicher Versuchstiere entweder unmittelbar oder 7 Tage nach LAD-Ligation (jeweils 1×10^5 oder 1×10^6 Zellen in $50 \mu\text{l}$) injiziert. An unterschiedlichen Zeitpunkten nach Zelinjektion (0h, 48h, 5 Tage, 3 Wochen und 6 Wochen) wurde die DNA von Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Blut, Knochenmark, Gehirn und Skelettmuskel isoliert und die Zahl der Spender-Zellen durch quantitative Echtzeit-PCR mit Y-Chromosom-spezifischen Primern bestimmt. Die Autoren argumentierten, dass der Anteil der transplantierten Zellen im Herzen unabhängig vom Zelltyp, Zellanzahl und Zeitpunkt der

Verabreichung bereits früh sehr rasch abnimmt und nach 6 Wochen bei lediglich noch 0,3-3,5% liegt. Ein großer Anteil der Zellen konnte in Lunge und Milz detektiert werden [298]. In einer weiteren Studie injizierten Sondergaard und Kollegen humane CD34+ Zellen, die zuvor mit fluoreszierenden *Microbeads* markiert wurden, in die Infarktgrenzzone athymischer Nacktratten. 14 Tage nach Infarktinduktion und intramyokardialer Zelltransplantation konnten immunhistologisch ebenfalls keine Zellen mehr nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen, die den zeitlichen Verlauf des Überlebens der Transplantatzellen zum Inhalt hatten, zeigten, dass nach nur 96 Stunden keinerlei Zellen mehr detektierbar waren [299]. Bei der Zellapplikation am Menschen zeigt sich ein ähnliches Bild. Penicka und Kollegen verwendeten das radioaktive Isotop ^{99m}Techne- tium, um den Verbleib von intrakoronar applizierten Knochenmarkstammzellen ($27,4 \times 10^8$ Zellen, davon $1,45 \times 10^7$ CD34+) bei einem 57-jährigen Patienten nach MI im zeitlichen Verlauf nachzuverfolgen. Lediglich 5% und 1% der Zellen ließen sich nach 2 bzw. 18 Stunden nach Verabreichung noch detektieren [300].

So bestätigen die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen bezüglich des *Engraftments* der transplantierten Zellen Befunde anderer Studien und verdeutlichen, dass zukünftig weitere Maßnahmen zur Steigerung des permanenten *Engraftments* getroffen werden müssen, um eine optimale Ausschöpfung der zelltransplantationsassoziierten Effekte zu erreichen. Ein interessanter Ansatz besteht darin, die Zellen während eines kardioplegischen Herzstillstandes zu applizieren. Während 1 Stunde nach Applikation von Zellen in kontrahierendes Myokard nur noch weniger als 20% der Transplantatzellen nachgewiesen werden konnten (Detektion durch Positronen-Emissions-Tomographie Bildgebung), erhöhte sich der Anteil auf über 75%, wenn das Herz vor Zellapplikation zum Stillstand gebracht wurde [301-303]. Andere erfolgreiche Ansätze zur Steigerung der Zellretention wurden mit der Präkonditionierung der Zellen vor Transplantation durch vorherige Inkubation mit Wachstumsfaktoren (EPO, HGF, VEGF, BMP-2, IGF-1, IGF-2) oder genetischen Modifikationen (Überexpression der antiapoptotischen Faktoren Bcl-2 oder Akt, Hämoxygenase-1) beschrieben [304, 305].

IV.2. Therapeutischer Effekt und Wirkmechanismen endothelialer Progenitorzellen: Parakrine Hypothese

In Übereinstimmung mit den in vorhergehenden präklinischen und klinischen Studien beschriebenen Effekten (Kapitel I.3.7. und I.3.8.) konnte nach intramyokardialer Transplantation von ECFCs eine Verbesserung der kardialen Funktion festgestellt werden, die sich vor allem als Ausdruck einer gesteigerten Neovaskularisation in der Infarktgrenzzone interpretieren lässt. Wie

nun lassen sich die beobachteten therapeutischen Effekte erklären, wenn sich das Gros der transplantierten Zellen schon nach kurzer Zeit nicht mehr detektieren lässt?

EPCs, die aus dem Knochenmark über die Blutzirkulation in das ischämische Areal rekrutiert werden, induzieren angiogenetische und kardioprotektive Prozesse durch Sekretion zytoprotektiver Zytokine und Wachstumsfaktoren, die wiederum die Proliferation und Migration ortsständiger Endothelzellen stimulieren und damit entscheidend an einer postischämischen Neovaskularisation mitwirken können. EPCs sezernieren eine ganze Reihe von Faktoren, die für die positiven Effekte verantwortlich gemacht werden, darunter unter anderem VEGF, HGF, Angiopoietin-1, eNOS, iNOS, SDF-1 α sowie IGF-1. Sowohl VEGF als auch HGF induzieren die Endothelzellproliferation und damit die Angiogenese, Angiopoietin-1 stabilisiert unreife Neogefäße im Ischämieareal. Stickstoffmonoxid-Synthasen – in der induzierbaren bzw. endothelialen Form iNOS oder eNOS – regulieren die Gewebepfusion durch unterschiedliche Mechanismen und sind ebenfalls an der weiteren Mobilisation von EPCs beteiligt. Dabei ist die zusätzlich von transplantierten und mobilisierten EPCs eingetragene eNOS womöglich an einer positiven Modulation des frühen Ischämieschadens beteiligt [70]. Urbich et al. zeigten, dass EPCs im Vergleich zur Kontrollzellpopulation mehrfach erhöhte mRNA-Level der proangiogenen Zytokine VEGF-A, VEGF-B, SDF-1, and IGF-1 exprimieren. Entsprechend konnten diese Zytokine in größerer Menge im Überstand des Zellkulturmediums nachgewiesen werden. In vivo evoziert von EPCs konditioniertes Medium eine starke migratorische Reaktion maturer Endothelzellen – eine entscheidende Voraussetzung für neoangiogenetische Prozesse. Diese Reaktion konnte durch VEGF und SDF-1-neutralisierende Antikörper inhibiert werden, was den entscheidenden Einfluss beider Faktoren auf die Migration von Endothelzellen unterstreicht. In einem Hinterlaufischämiemodell kolokalisieren die genannten Wachstumsfaktoren nach einer Injektion von EPCs im Injektionsareal in Bereichen, in denen EPCs integrieren. Eine ebenfalls starke migratorische Antwort konnte in Bezug auf kardial-residente Progenitorzellen in vitro gezeigt werden. Auch hier zeigte sich die deutlichste Stimulation durch das von EPCs konditionierte Medium im Vergleich der unterschiedlichen Medien der Vergleichszellpopulationen [306]. In einer sehr umfassenden Studie untersuchten Cho et al. die Herkunft endogener und exogener humoraler Faktoren nach Transplantation von EPCs und deren Wirkungen auf ischämisches Myokard. Dabei wurden 5×10^5 humane EPCs unmittelbar in die Periinfarktzone transplantiert. Die Kontrolltiere erhielten entweder PBS oder reife Endothelzellen. Dabei wurde der zeitliche Verlauf sowohl der von den Transplantatzellen freigesetzten Zytokine als auch die vom Empfängermyokard im Bereich der Infarkt- und Transplantatzone produzierten humoralen Faktoren evaluiert. Obwohl das Gros der Transplantatzellen nach etwa einer Woche nicht mehr nachweisbar war und das Level der transplantatzellassozierten humanen Zytokine rasch

abgefallen war, konnte eine anhaltende vom Empfängermyokard ausgehende Aufregulation muriner, kardioprotektiver Zytokine festgestellt werden. Mit einem Höhepunkt an Tag 1 und einem raschen Abfall bis Tag 7 waren die humanen, also unmittelbar transplantatzellassozierten Zytokine VEGF-A, FGF-2, Ang-1, Ang-2, PIGF, HGF, IGF-1 und PDGF-B sowie SDF-1 heraufreguliert. Die vom murinen Empfängermyokard nach Zellapplikation produzierten Zytokine waren bereits am ersten Tag heraufreguliert und können bis über Tag 14 hinaus in signifikanter, gegenüber den Kontrollherzen erhöhter Menge, nachgewiesen werden. Korrelierend konnte in einem TUNEL-Assay eine gegenüber den Kontrollen dreifach reduzierte Apoptoserate von Kardiomyozyten im Perinfarktbereich konstatiert werden. Des Weiteren ließ sich in einer Ki67-Färbung eine 10-fach höhere zelluläre Proliferationsrate feststellen. In einer FACS-Analyse zeigte sich bei den mit EPCs behandelten Tieren eine deutlich erhöhte Zahl mobilisierter Knochenmarkstammzellen im peripheren Blut. In einer mit GFP-positiven Knochenmarkstammzellen nach subletaler Bestrahlung rekonstituierten Maus konnte nach Zellbehandlung zudem eine erhöhte Rekrutierung von zirkulierenden, GFP-positiven Knochenmarkstammzellen in das infarzierte Myokard festgestellt werden. Histologisch war die Behandlung mit EPCs mit geringeren Infarktgrößen, einem insgesamt verbesserten Postinfarktremodeling und einer erhöhten Kapillardichte verbunden. Hämodynamisch verbesserten sich sowohl Pumpfunktion als auch die linksendsystolischen und linksenddiastolischen Diameter in der Gruppe der behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren [307]. Eine weitere Studie von Yang und Kollegen zeigt einen weiteren positiven Einfluss nach Transplantation von EPCs im Sinne der parakrinen Hypothese. Dabei zeigten Nabelschnurendothelzellen (HUVECs), die mit von EPCs konditionierten Medienüberständen behandelt wurden, signifikant niedrigere oxidative Stresslevel und Apoptoseraten im Vergleich zur Kontrolle. Korrelierend dazu fand sich eine signifikant höhere Expression der anti-oxidativen Enzyme Katalase, Cu/Zn-Superoxiddismutase und Mn-Superoxiddismutase sowie des Antiapoptosefaktors Bcl-2/Bax. Im konditionierten Medienüberstand fanden sich insbesondere die Zytokine VEGF, HGF, IL-8 und MMP-9 wieder. Die Autoren folgerten, dass EPCs einen deutlichen zytoprotektiven Effekt auf reife Endothelzellen ausüben, insbesondere dann, wenn sie oxidativem Stress ausgesetzt werden [308].

Wie beschrieben verbleibt nur ein geringer Teil der transplantierten Zellen im Empfängermyokard während der größere Teil vor allem durch apoptotische Prozesse verlorengelht. Die geringe Adhärenz und das sehr geringe Überleben von in das postischämische Myokard transplantierten Zellen könnten sich einer interessanten Hypothese zur Wirkungsweise einer Zelltherapie bei Myokardischämie zufolge auch indirekt positiv auswirken. Die positiven Effekte, die im Gefolge einer Zelltransplantation nach MI beobachtet werden, sind dieser im Jahre 2005 postulierten Hypothese zufolge mutmaßlich auf immunmodulatorische Effekte

zurückzuführen, die durch (prä-) apoptotische Transplantatzellen mediiert werden. Die Viabilität von Zellen, die nach Infarkt ins Myokard appliziert werden, liegt Studien zufolge bei 75-90%, d.h. ein gewisser Teil der Transplantatzellen befindet sich bereits zum Zeitpunkt der Injektion in einem (prä-) apoptotischen Stadium. Ein weiterer, nicht unerheblicher Anteil der in das ischämische Myokard verabfolgten Zellen unterliegt im weiteren zeitlichen Verlauf dem apoptotischen Zelltod aufgrund der hypoxischen, zytotoxischen und damit letztlich proapoptotischen Umgebungsbedingungen im infarzierten Empfängergewebe [309]. Die im Prozess der Apoptose befindlichen Zellen scheinen dabei in der Lage zu sein, immunmodulatorische Effekte zu induzieren, indem sie die angeborene und adaptive Immunantwort durch Deaktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen herunterregulieren und regulatorische T-Zellen aktivieren. Bekannt ist beispielsweise, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen die Expression anti-apoptotischer Zytokine wie Interleukin 10 und TGF-beta induziert, welche ihrerseits wiederum die Expression proinflammatorischer Mediatoren wie TNF-alpha, Interleukin-1-beta und Interleukin-6 supprimieren [310]. Gestützt wird die Hypothese von einer Arbeit, in der die Verabreichung apoptotischer Zellen in einem akuten Lungenentzündungsmodell über eine vermehrte TGF-beta Sekretion zu einer schnelleren Auflösung der Entzündungsreaktion führte [311]. Um zu verifizieren, ob diese Vorgänge auch im Rahmen postischämischer Prozesse nach MI eine Rolle spielen, setzte eine Forschungsgruppe um Ankersmit et al. ein akutes Herzinfarktmodell der Ratte ein. Hierfür wurden stammgleichen Ratten Leukozyten entnommen, und diese Zellen zur Apoptoseinduktion mit 60 Gray bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen für bis zu 24 Stunden in Zellkulturmedium inkubiert. Die Apoptoserate der Leukozyten lag nach diesem Protokoll bei über 80%. Nach Induktion des Herzinfarkts wurden stamm- und geschlechtsidentischen Tieren Suspensionen von bestrahlten, apoptotischen Leukozyten einerseits intravenös, andererseits mittels intramyokardialer Injektion in das Infarkttrandgebiet verabreicht. Als Kontrollen fungierten die Verabreichung von nicht-apoptotischen Zellen, von frischem Zellkulturmedium sowie eine Versuchsgruppe mit Sham-Operation. Sechs Wochen nach Infarkt zeigte sich, dass die Verabreichung von apoptotischen Zellen, sowohl intravenös als auch intramyokardial, die Infarktgröße signifikant reduzieren konnte [312]. Die Analyse des kardialen Narbengewebes zeigte eine Akkumulation elastischer Fasern in der Behandlungsgruppe. Des Weiteren wurden auch Auswertungen mittels Echokardiografie durchgeführt, die zeigen konnten, dass Ratten, denen apoptotische Zellen verabreicht wurden, eine signifikante Verbesserung der kardialen Funktion aufwiesen. In der Folgearbeit zeigte sich, dass vor allem parakrine Effekte hierfür verantwortlich sind. Die von den verabfolgten apoptotischen Zellen sezernierten parakrinen Faktoren induzierten eine signifikante Hochregulierung von anti-apoptischen und zytoprotektiven Signalmediatoren im postischämischen Myokard. Versuchstiere, denen aus

Zellkulturen apoptotischer Zellen gewonnene Faktoren intravenös verabreicht wurden, zeigten eine signifikante Reduktion des Infarktschadens sowie eine fast wiederhergestellte linksventrikuläre Pumpfunktion. Die immunhistologische Aufarbeitung der mit apoptotischen Zellsuspensionen behandelten Herzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte, dass es früher zum Abklingen der postischämischen Inflammation und parallel dazu zu einem früheren, verstärkten Einwandern proangiogenetischer Zellpopulationen mit resultierender Verbesserung der myokardialen Neovaskularisation kommt [313, 314].

IV.3. ECFC-spezifische parakrine Mechanismen

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten ECFCs wurden ebenfalls einige spezifische parakrine Effekte dokumentiert. So charakterisierten Dubois et al. das kardioregenerative Potenzial von ECFCs in einer geblindeten, randomisierten Studie in einem Infarktmodell am Schwein. Eine Woche nach akutem MI wurden in jeweils unterschiedlichen Gruppen autologe ECFCs (CD29 und 31-positiv, n=10), allogene GFP-positive mesenchymale Stammzellen (positiv für die Oberflächenmarker CD 29/44/90; n=11) und ein Kontrollvehikel (n=10) in den Ramus circumflexus der linken Koronararterie infundiert. Nach einer Woche respektive sieben Wochen wurden systolische Funktion, enddiastolische und endsystolische Volumina und Infarktgrößen per MRT quantifiziert. Post mortem wurden histologisch darüber hinaus Zellintegration und Kapillardichte evaluiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die globale, linksventrikuläre Pumpfunktion zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich war, jedoch ließ sich ein deutlich verbessertes Remodeling in der Gruppe der mit ECFCs behandelten Tiere feststellen. Dabei waren endsystolische und enddiastolische Diameter in der Gruppe der mit MSCs behandelten Tiere sowie in der Kontrollgruppe signifikant gegenüber der EPC-Gruppe angestiegen. In der EPC-Gruppe konnte sogar ein leichter Rückgang der endsystolischen und enddiastolischen Volumina konstatiert werden. Die Infarktgröße ging in der Gruppe der mit ECFCs behandelten Tiere in Segmenten mit mehr als 50% Transmuralität deutlich im Vergleich zu den anderen Gruppen zurück. In der EPC-Gruppe ließ sich in jenen Arealen eine im Vergleich zu den übrigen Gruppen höhere Kapillardichte feststellen (ECFCs vs. MSCs vs. Kontrolle 34%, 20% und 15% in Bezug auf die Gesamtzellzahl des mikroskopisch betrachteten Gesichtsfeldes). Bei den Versuchstieren, bei denen LacZ-markierte EPCs verabfolgt wurden, zeigte sich 6 Wochen nach Transplantation eine Inkorporation einiger weniger Zellen im Infarkttrandbereich. In der MSC-Gruppe ließen sich im Gegensatz dazu keine Zellen nachweisen. Die integrierten Zellen koexprimierten vWF und fanden sich im Bereich naszierender Kapillargefäße, die zugleich für glattmuskuläres alpha-Aktin positiv waren. Die Expression der Matrixmetalloproteinase MMP-2, ein extrazelluläre Matrix degradierendes Enzym, welches das Postinfarktremodeling negativ beeinflusst, war in der Gruppe der mit EPCs behandelten Tiere am deutlichsten reduziert.

Fernerhin fand sich das anti-apoptotische Gen BCL-XL in der Gruppe der mit EPC behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe und den mit MSCs behandelten Tieren signifikant höher exprimiert. Korrelierend ließ sich eine besser organisierte Infarkt Narbe bei diesen Tieren dokumentieren. Ebenfalls korrelierend zum verbesserten linksventrikulären Remodeling wurden niedrigere ANP- und BNP-Werte als Ausdruck einer reduzierten neurohumoralen Aktivierung in der Infarktgrenzzone bei den mit EPCs behandelten Tieren gemessen. Zudem konnte eine erhöhte Konzentration des proangiogenen Zytokins PlGF (*placental growth factor*) im von den ECFCs konditionierten Medium gemessen werden. Die Autoren konkludieren, dass die intrakoronar applizierten ECFCs nicht unmittelbar kardial transdifferenzieren, jedoch das maladaptive linksventrikuläre Postinfarktremodeling über parakrine und proangiogene Mechanismen positiv beeinflussen [315]. Für das VEGF-R1 selektive VEGF-Homolog PlGF wurde in früheren Studien gezeigt, dass der Faktor eine myokardiale Regeneration respektive Protektion über eine verstärkte Arteriogenese und die Entwicklung einer verbesserten Kollateralperfusion induziert [316, 317]. In einem zerebralen Ischämie Modell konnten Moubarik et al. zeigen, dass die Transplantation von ECFCs mit positiven Effekten auf das vom Infarkt betroffene Areal assoziiert war. Dabei wurden 4×10^6 ECFCs 24 Stunden nach experimentellem Mediainfarkt intravenös verabfolgt und die Effekte mit der Transplantation von humanen Nabelschnurendothelzellen und HDMECs verglichen. So konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutlich vermehrte Kapillardichte, eine reduzierte Apoptoserate, eine verminderte reaktive Astroglie sowie eine Stimulation der endogenen Neurogenese konstatiert werden. Dabei zirkulierten überproportional viele Zellen ins Ischämieareal. Die positiven Effekte wurden auch in dieser Arbeit auf parakrine Einflüsse zurückgeführt, nachdem bereits nach kurzer Zeit keine transplantierten Zellen mehr im Infarktareal bzw. in den neovaskularisierten Arealen detektierbar waren. Im Überstand der kultivierten Zellen fanden sich zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren, die für die positiven Effekte verantwortlich gemacht werden (TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, MMP-9, EGF, MCP-1, PDGF-BB, ANG-2, VEGF und IGF-1). Im Western-Blot konnten VEGF und IGF-1 in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. In einer funktionellen neurologischen Testung konnten die gezeigten Effekte mit einer signifikanten Verbesserung bei den mit ECFCs behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren korreliert werden [318].

In einer Studie von He et al., die sich der Klärung der Frage widmete, ob und in welchem Ausmaß EPCs einen mitogenen Effekt auf reife Endothelzellen im Empfängergewebe ausüben, wurden im Vergleich zu Nabelschnur- und Koronarendothelzellen signifikant höhere sezernierte Spiegel des potenten endothelialen Mitogens Interleukin-8 (IL-8) im konditionierten Medium von kultivierten EPCs identifiziert. So konnte in einem weiteren Assay eine deutliche Stimulation der Proliferation von koronaren Endothelzellen sowie Endothelzellen aus der Nabelschnur, welche

mit dem von EPCs konditionierten Medium inkubiert wurden, konstatiert werden, wobei sich der Effekt durch die Zugabe eines IL-8 neutralisierenden Antikörpers zumindest partiell aufheben ließ. In einer arraybasierten Analyse des konditionierten Mediums konnten zudem TGF-beta2 sowie MCP-1 nachgewiesen werden, die ebenfalls für die beobachteten Effekte verantwortlich gemacht werden [319]. In einer weiteren Studie von Rignault-Clerc et al., in der ECFCs aus peripheren Blutproben von Verbrennungsoffern isoliert und nachfolgend in einem Hinterlaufischämie-Modell am Tier auf ihre Neovaskularisationskapazität evaluiert wurden, konnten als maßgeblich verantwortliche Zytokine IL-8, SDF-1 und VEGF identifiziert werden [320]. Smadja et al. demonstrierten mit ihrer Studie, in der die Eigenschaften von „*early-outgrowth*“-/CFU-Hill-EPCs, CFU-EC und ECFCs miteinander verglichen wurden, dass die Faktoren BMP2 und 4 exklusiv von ECFCs exprimiert werden und über nachgeschaltete Signalwege maßgeblich an einer postnatalen Neovaskularisation beteiligt sind [321]. Dabei konnten hohe mRNA-Level für die Proteine BMP2 und 4 in kultivierten ECFCs detektiert werden. Die Höhe der Expression war mit dem bei embryonalen Stammzellen detektierbaren Level vergleichbar. In EPCs vom Typus CFU-Hill konnte für BMP2 und 4 dahingegen keine Expression auf mRNA-Niveau nachgewiesen werden. Dabei sind auch die entsprechenden Rezeptoren BMPR-1A, -1B sowie BMPR-2 auf über 90% der aus der Kultur hervorgehenden ECFCs detektierbar und im Vergleich der Zellpopulationen – proliferierende Endothelzellen bzw. „*early-outgrowth*“,/CFU-Hill - ausschließlich auf ECFCs exprimiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BMP2 und 4 maßgeblich an der Regulation von Proliferation, Migration und der Stärke der Formation gefäßartiger Strukturen von ECFCs beteiligt sind. Das Angiogenesepotential der Zellen konnte mit Noggin, einem Inhibitor BMP-vermittelter TGF-beta Signalkaskaden, unterbunden werden. Zusätzlich wurde die Angiogenesekapazität von ECFCs in einem murinen Hinterlaufischämie-Modell getestet. Sieben Tage post injectionem konnte ein verbesserter Kollateralfluss festgestellt werden. Nach zusätzlicher Stimulation der Zellen mit BMP2 und 4 zeigte sich eine zusätzliche Verbesserung der Neovaskularisation im Vergleich zu unstimulierten Zellen. An Tag 7 nach Zellinjektion konnte eine 25% bessere Beinperfusion in einer lasergestützten Doppler-Untersuchung festgestellt werden [321]. Von beiden Faktoren ist bekannt, dass ihnen eine entscheidende Rolle bei angio- und vaskulogenetischen Prozessen während der Embryonalentwicklung, aber auch im Rahmen der Tumorangio-genese zukommt [322-324].

Die durch unseren Kooperationspartner (AG Prof. Dr. med. I. Ott, unpublizierte Daten) erarbeiteten Expressionsdaten proangiogener Zytokine in vitro und die bereits in der Literatur beschriebenen Beobachtungen machen einen parakrinen Beitrag der in der vorliegenden Arbeit

eingesetzten Zellen sehr wahrscheinlich, wenngleich eine Messung der effektiven, myokardial vorliegenden Zytokinspiegel in vivo nicht erfolgte.

IV.4. Indirekte zelltherapeutische Stimulation Sca1+ kardial-residenter Stammzellen

Ein Einfluss transplanteder EPCs auf kardial-residente Stammzellpopulation wird als ein weiterer hauptverantwortlicher Mechanismus für die positiven Behandlungseffekte erachtet.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch durchflusszytometrische Analyse der myoztendepletierten Einzelzellsuspension 2 Tage nach Infarktinduktion und Zelltransplantation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung der Zahl CD45-/CD34-/Sca1+ im Herzen nachgewiesen werden, während die Zahl der c-kit+ Zellen unverändert bleibt. Dies könnte auf einen proliferativen Effekt der transplantierten Zellen auf residente kardiale Progenitorzellen hinweisen. Dieser indirekte und bislang für ECFCs in der Literatur nicht beschriebene Effekt könnte mechanistisch, neben parakrinen Einflüssen, hauptverantwortlich für die beobachteten positiven Effekte auf Hämodynamik und Remodeling sein. Die stimulierten ortsständigen Zellen konnten wiederum positive Effekte auf das ischämisch geschädigte Myokard ausüben, zum einen durch tatsächliche Regeneration untergegangener Kardiomyozyten und zum anderen über eine Ausschüttung parakriner Faktoren. Mehrere kontextverwandte Studien stützen diese These. Einigen Arbeitsgruppen ist es gelungen, das kardiomyogene Potenzial von aus dem murinen Herzen isolierten Sca1+ Zellen nachzuweisen. Die Zellen exprimieren kardial-spezifische Transkriptionsfaktoren (GATA4, MEF2c, myocardin, Nkx2.5) sowie darüber hinaus kardiale Strukturproteine (α -Actinin, α -myosin heavy chain (MHC), myosin light chain (MLC) 2a, MLC-2v und cardiac troponin T), sind zur spontanen Kontraktion fähig und zeigen herzmuskeltypische Calcium-Ströme [158, 161, 167, 168, 325]. Eine neuere in vitro-Studie von Lam et al. an aus murinen ESCs differenzierten Kardiomyozyten belegt nun, dass sich eine Subpopulation Sca1+ Vorläuferzellen im Herzen primär ortsständig aus embryonalen Vorläufern rekrutiert. Der Studie nach macht diese Zellpopulation etwa 4% der frühen Kardiomyozyten aus. Nach Differenzierung von Sca1+ Zellaggregaten konnten Kontraktionen in 100% der Aggregate beobachtet werden. In der quantitativen RT-PCR zeigte sich, dass diese Zellen kardial-spezifische Transkriptionsfaktoren sowie Strukturgene differenzierter Herzmuskelzellen exprimieren [326]. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit zeigten Uchida et al. unter Zuhilfenahme transgener Versuchstiere, die mit einem Sca1-spezifischen Reportersystems ausgestattet waren, dass durch Ischämie oder Drucküberlastung induzierte Sca1+ Zellen einen relevanten Beitrag zur myokardialen Regeneration durch kardiomyozytäre Differenzierung liefern [327]. In einer kürzlich erschienenen Studie konnten Takamiya et al., dass vorher isolierte und kultivierte Sca1+

DISKUSSION

kardiale Progenitorzellen nach MI im Mausmodell das Potenzial zur kardiomyozytären Differenzierung aufweisen und die Transplantation sowohl mit einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion als auch mit einer Abnahme der Infarktgröße nach 4 Wochen verbunden war [328]. Das kardiomyogene Differenzierungspotenzial Sca1⁺ Zellen wird durch eine weitere aktuelle Studie unterstützt, die die vergleichende Gegenüberstellung des globalen Genexpressionsprofils unterschiedlicher kardialer sowie extrakardialer Stammzellpopulationen mittels Microarrayanalyse zum Inhalt hatte. Dabei wurden zum einen kardial-residente c-kit⁺ und zum anderen Sca1⁺/CD45⁻/CD31⁻ Zellen, SP-Zellen sowie zwei Knochenmarkstammzellpopulationen (c-kit⁺, MSCs) miteinander verglichen. Im Hinblick auf die molekulargenetische Hierarchie der analysierten kardial-residenten und extrakardialen Stammzellpopulationen zeigte sich, dass die Sca1⁺ Progenitoren aufgrund der Expression kardialer Gene (z.B. MEF2C, HAND2, Kv2.2, Myh10, TNNT3 und ACTA2) adulten Kardiomyozyten am nächsten stehen und damit möglicherweise als die kommittiertesten Progenitoren angesehen werden können [329]. Wang und Kollegen konnten zeigen, dass diese Zellen nach Isolation unter der Präsenz von DKK-1, DMSO, BMP2, FGF4, FGF-8 sowie 5-Azacytidin im Differenzierungsmedium die kardialen Transkriptionsfaktoren GATA-4 und Nkx2.5 exprimieren. Nach Kokultivierung mit LacZ-positiven Rattenkardiomyozyten lassen sich darüber hinaus das kardiomyofibrilläre Strukturprotein Troponin T sowie Phospholamban nachweisen. Aus dieser Beobachtung zogen die Autoren den Schluss, dass die Population der Sca1⁺/CD31⁻ Zellen eine Rolle bei intrinsischen Regenerationsprozessen nach MI spielen und eine Transplantation Sca1⁺ Stammzellen therapeutisch relevante Effekte haben könnte. So zeigen infarzierte Herzen 2 bzw. 3 Wochen nach Infarkt und Transplantation LacZ-markierter Sca1⁺ Stammzellen ein günstigeres Postinfarktremodelling mit signifikant besseren Werten für die linksventrikuläre Pumpfunktion sowie die Parameter LVEDD, LVESD im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwei Wochen post transplantationem kann zwar nur noch eine marginale Zahl beta-Galaktosidase-positiver Zellen identifiziert werden, jedoch zeigt sich in der Perinfarktzone in einer Immunhistologie auf den Endothelzellmarker vWF eine deutlich verbesserte endogene Neovaskularisation im Sinne einer höheren Kapillardichte. Eine weitere Schlüsselbeobachtung der Studie war, dass die Zelltransplantation mit einer besser erhaltenen Expression von Enzymen des Energiestoffwechsels, einer Verbesserung der PCr/ATP-Quotienten und damit einer günstigen Beeinflussung des myokardialen Energiehaushaltes assoziiert ist. Interessanterweise konnten Wang und Kollegen durch durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass die Zahl Sca1⁺ Zellen nach Infarkt im Bereich der Perinfarktzone sowie im Infarktareal per se natürlicherweise heraufreguliert wird. Immunfluoreszenzhistologisch zeigt sich demnach an Tag 7 nach experimenteller Myokardinfarktinduktion eine Verdopplung des Anteils Sca1⁺/CD31⁻ Zellen in infarzierten im Vergleich zum Anteil in nichtinfarzierten Herzen. Nach etwa 14 Tagen

normalisiert sich die erhöhte Zellzahl wieder auf Kontrollniveau [330]. Die allein durch die myokardiale Ischämie bedingte Aufregulation Sca1⁺ Zellen lässt sich in der vorliegenden Arbeit nicht überprüfen, da eine „sham“-Gruppe fehlt. Tateishi et al. zeigten, dass Sca1 einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion, die Proliferation und das Überleben kardial-residenter Stammzellen hat. Sca1 reguliert dabei die Expression parakriner Faktoren (hier HGF, VEGF), die einen günstigen Einfluss auf neoangiogenetische und apoptotische Prozesse ausüben. Tiere nach Infarkt zeigten nach Transplantation von Sca1-defizienten Stammzellen im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe, die Sca1⁺ Stammzellen erhielten, eine reduzierte Kapillardichte, höhere Apoptoseraten und konsekutiv ein deutlich schlechteres Remodelling [331]. Ein weiterer Mechanismus, der eine Rolle von Sca1⁺ einschließt und damit eine wichtige Rolle bei einer positiven Beeinflussung Sca1 vermittelter Effekte haben könnte, wird in einer Studie von Kafadar et al. gezeigt. So demonstriert diese Studie, dass eine Sca1-Expression unmittelbar wichtig für den Remodellingprozess nach Infarkt ist. Sca1 reguliert – direkt oder indirekt – die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen, von denen bekannt ist, dass sie durch Beeinflussung der Extrazellulärmatrix entscheidend am Remodellingprozess nach Infarkt beteiligt sind. So zeigen die Forscher in einem transgenen Mausmodell, dass die Unfähigkeit zur Hochregulation von Sca1 nach Muskelverletzung zu einer reduzierten Matrixmetalloproteinasenaktivität und nachfolgend zu einem signifikant höheren Fibroseindex durch vermehrte Kollagen- und Fibronektindeposition in der Extrazellulärmatrix führt [332].

Aus der vorliegenden Arbeit geht schlussendlich nicht hervor, ob es sich bei der heraufregulierten Sca1⁺ Zellpopulation um primär ortsständige Zellen oder erst sekundär über die Zirkulation ins Herzen eingewanderte Zellen handelt. Die in der Gruppe der mit Zellen behandelten Tieren gefundene Erhöhung Sca1⁺ Zellen könnte durch eine transplantatzellvermittelte, parakrine Stimulation myokardialer Homingmechanismen und ein konsekutives Einwandern von zirkulierenden Knochenmarkstammzellen bedingt sein. Dabei dokumentieren neuere Arbeiten die Existenz einer seltenen (0.8–1.3 cells/ μ L, ~0,01%), primitiven CD45⁻/Sca1⁺ Stammzellpopulation im Knochenmark, die Eigenschaften der Pluripotenz und ein ausgeprägtes Differenzierungspotential aufweisen. Diese Zellen werden als sog. very-small embryonic like stem cells (VSEs) bezeichnet [333]. Dabei sind VSEs in vitro expandierbar und können in Zellen aller 3 Keimblätter differenzieren. Sie besitzen die Morphologie primitiver pluripotenter Stammzellen (kleine Größe (<6 μ m), prominentes Chromatin, großer Kern, schmaler Plasmasaum) und exprimieren zudem die Marker pluripotenter Stammzellen (Oct-4, Nanog, SSEA-1, Rex1, Dppa3, Rif-1). Auf Grund ihrer Größe und der Oberflächenmarker CXCR4, CD133, CD34 lassen sie sich durchflusszytometrisch isolieren [334]. Arbeiten mehrerer Arbeitsgruppen zeigen, dass nach akutem MI eine rasche Freisetzung von nicht-hämatopoetischen Sca1⁺/Lin⁻/CD45⁻ Zellen ins

periphere Blut stattfindet. Diese Zellen exprimieren dann vermehrt Marker pluripotenter Stammzellen, kardiale Transkriptionsfaktoren wie GATA4, Nkx2.5 und MEF2C sowie Proteine endothelialer Zelllinien wie VE-Cadherin und vWF [335-337]. Wahrscheinlich sind VSEs Vorläuferzellen aus dem Epiblasten, die in der Embryonalphase ins Knochenmark einwandern. Im Ruhezustand befinden sie sich auch im adulten Knochenmark und in einigen Organen. Sie könnten eine Art periphere Reserve für organ-residente Stammzellen darstellen [338]. Im murinen Ischämie-Reperfusion-Modell führte die intramyokardiale Injektion von frisch isolierten VSEs zu einer Verbesserung der globalen und regionalen linksventrikulären Kontraktilität sowie einer reduzierten reaktiven Myokardhypertrophie in nicht-ischämischen Arealen. Die günstigen Effekte waren auch dann noch nachweisbar, wenn eine 10-fach geringe Zahl von Zellen (10000 Zellen) injiziert wurde. In der Kontrollgruppe, die hämatopoetische Stammzellen erhielt, waren keine günstigen Effekte auf das linksventrikuläre Postinfarktremodeling nachweisbar [339]. In einer weiteren experimentellen Studie der gleichen Arbeitsgruppe erhielten Versuchstiere 48 Stunden nach halbstündiger Ischämie und anschließender Reperfusion eine intramyokardiale Injektion von 1×10^5 EGFP-markierten, unbehandelten VSEs oder 1×10^5 mit EGFP markierte VSEs, die zuvor in einem kardiogenen Medium inkubiert wurden. 35 Tage nach Infarkt konnte bei Mäusen, die mit vorbehandelten Stammzellen therapiert worden waren, eine signifikante Verbesserung der globalen und regionalen systolisch-linksventrikulären Funktion nachgewiesen werden. Lediglich in der Gruppe der mit vorbehandelten VSEs konnten immunhistologisch einzelne EGFP-positive Zellen, die zusätzlich positiv für sarkomeres α -Aktin, PECAM-1, oder vWF waren, identifiziert werden. Die Autoren schlossen daraus, dass der Haupteffekt der transplantierten Zellen auf parakrinen Mechanismen zu basieren scheint [340].

Wie aus dem Geschilderten hervorgeht, scheint sich sowohl die exogene Transplantation als auch die endogene Stimulation von Sca1+ Stammzellen günstig auf das Postinfarktremodeling auszuwirken. Weder in-vitro noch in in-vivo wurde in der vorliegenden Arbeit eine nähere Charakterisierung des kardiomyogenen Potentials der gezeigten Heraufregulation der Sca1+ Zellpopulation vorgenommen. Transgene Tiermodelle, welche ein sogenanntes „Lineage Tracing“ zulassen, könnten hier weitere wichtige Einblicke für die Beantwortung dieser Frage gewähren. Ob die erhöhte Anzahl Sca1+/CD45- Stammzellen an Tag 2, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit herausgestellt werden konnte, aus einem Pool proliferierender kardial-residenter Stammzellen stammt oder die Zellen aus dem Knochenmark exogen über die Blutzirkulation myokardial „homen“ oder beide Mechanismen gleichzeitig eine Rolle spielen, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Allerdings konnten Ye et al. in einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der „letal“ bestrahlte Wildtypmäuse der Linie C57Bl6 mit GFP-

positivem Knochenmark rekonstituiert und nachfolgend einer Infarktinduktion unterzogen wurden, aufzeigen, dass myokardiale Sca1+/CD45- Zellen keinerlei GFP exprimieren. Dies kann als deutlicher Hinweis dafür gewertet werden, dass es sich bei den Zellen nicht um migrierte mononukleäre Zellen des Knochenmarks und der Blutbahn, sondern um eine primär kardial-residente Stammzellpopulation handelt [341].

Abbildung 45 zeigt eine Synopsis der positiven Effekte, die sowohl durch die eigenen Ergebnisse gestützt werden und darüber hinaus in der Literatur beschrieben worden sind und mechanistisch für die positive Beeinflussung des Myokards nach Infarkt verantwortlich gemacht werden können.

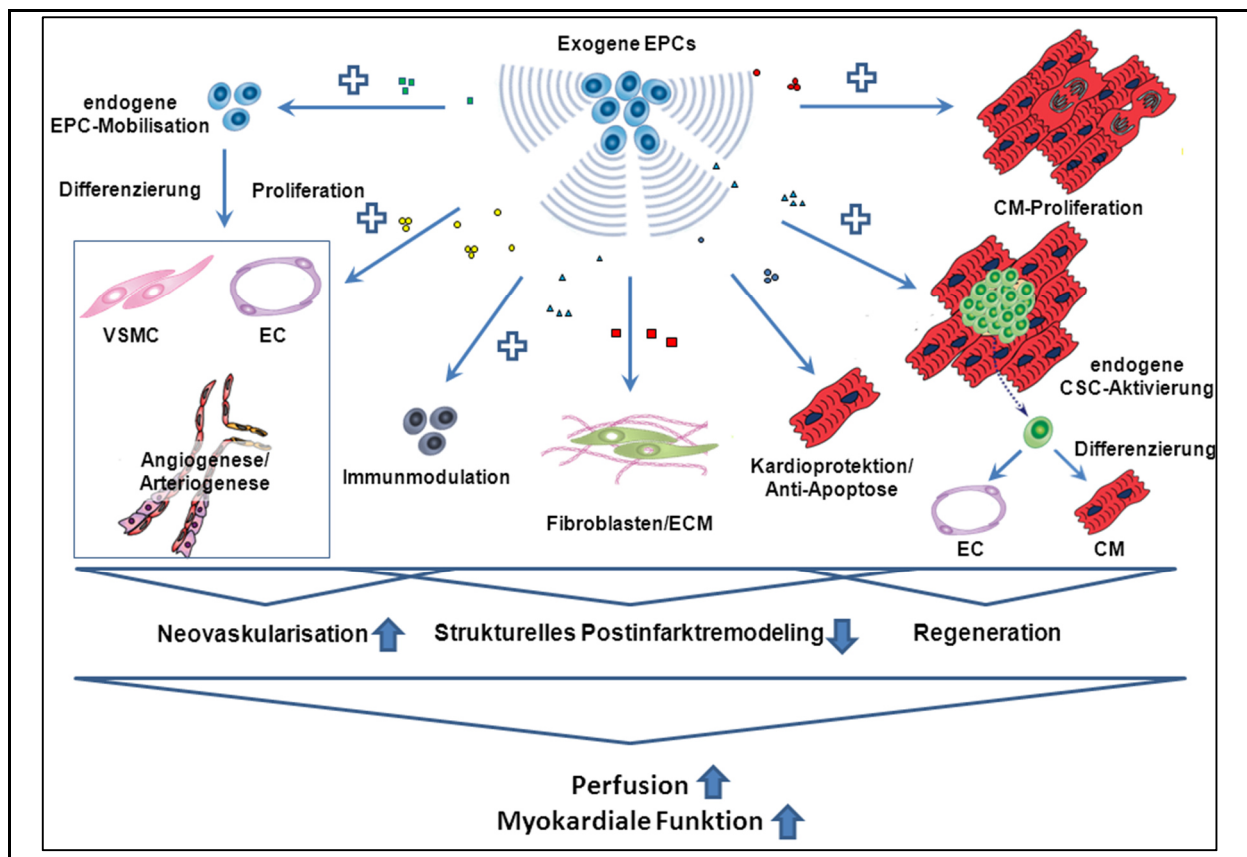


Abbildung 45 Synopsis der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen sowie der in der Literatur beschriebenen positiven Effekte und Mechanismen einer Transplantation von EPCs auf postischämisches Myokard. Abbildung modifiziert nach [342] und [77].

IV.5. Einfluss eines Diabetes mellitus auf die therapeutischen Effekte und die Funktionalität der transplantierten Zellen

Wie einleitend in Kapitel I.3.6. beschrieben, ist der spezifische Einfluss einer diabetischen Stoffwechsellaage auf Quantität und Funktionalität zirkulierender EPCs mittlerweile durch mehrere Studien belegt. Dabei korrelieren die Zahl und der Grad der Funktionseinschränkung (Migration, Adhäsivität, Reendothelialisierungskapazität) mit der Höhe des HbA1c-Wertes und damit mit

dem Schweregrad eines Diabetes mellitus sowie der Effizienz einer antidiabetischen Behandlung [253, 343]. Eine *in vitro* Studie von Li et al. zeigt darüber hinaus den spezifischen negativen Einfluss von nichtenzymatisch glykosylierten Proteinen (*advanced glycation end-products (AGE)*), wie sie bei diabetischer Stoffwechsellage entstehen, auf die Funktionalität von ECFCs. Mit steigenden AGE-Konzentrationen ließen sich reduzierte Expressionslevel für die Faktoren SDF-1, Stickstoffmonoxid, t-PA, Prostaglandin I₂ und Superoxiddismutase feststellen. Funktionell ließ sich eine verminderte migratorische Kapazität und Adhesivität der Zellen dokumentieren [344].

Tan und Kollegen verglichen die funktionellen Eigenschaften von diabetischen und nicht-diabetischen ECFCs *in vitro* sowie in einem chronischen Koronarischämiemodell *in vivo*. Dabei zeigte sich in der quantitativen RT-PCR, dass die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF in der Gruppe der nicht-diabetischen EPCs signifikant gegenüber den Diabetiker-EPCs heraufreguliert waren. Die genannten Faktoren konnten auf Proteinebene in gleicher Konstellation in konditionierten Medienüberständen nachgewiesen werden. Die Autoren konkludierten, dass das Vorliegen eines Diabetes mellitus die funktionellen Kapazitäten von ECFCs hinsichtlich der Sekretion proangiogener Faktoren sowie die Differenzierung zu gefäßähnlichen Strukturen signifikant beeinträchtigt. *In vivo* ließ sich zeigen, dass die Transplantation von nicht-diabetischen ECFCs ins ischämische Myokard diabetischer Tiere zu einer signifikanten Verbesserung der Herzfunktion führte. Diese Verbesserung der Pumpfunktion konnte mit einer Zunahme der Kapillardichte und einer Reduktion der Fibrosereaktion im Rahmen der Infarktheilung korreliert werden. Die Autoren machen indirekte, parakrine Effekte für die positive Beeinflussung der Infarktheilungsphase verantwortlich. Dahingegen waren diabetische ECFCs nicht in der Lage, ischämisches Myokard im diabetischen Tier in ähnlich positiver Weise zu beeinflussen [345]. Das Vorliegen eines Diabetes mellitus der Spenderpatienten in der vorliegenden Arbeit scheint die Effektivität der EPC-Transplantation – zumindest in diesem Modell - nicht limitiert zu haben. Ein direkter Vergleich der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse erscheint jedoch nur äußerst eingeschränkt zulässig, da es sich bei den Empfängertieren in der Studie von Tan et al. um Tiere mit einem schweren, genetisch-determinierten Diabetes ohne entsprechende Therapie handelte und die ECFCs in die gleichen diabetischen Versuchstiere appliziert wurden (autologe Therapie). Zum anderen könnte ein diabetisches Umgebungsmilieu des Empfängergewebes einen relevanten Einfluss auf die zelltherapeutischen Effekte haben. Für eine autologe Stammzelltherapie ist dies von wichtiger Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit konnten in der Subgruppenanalyse keine signifikanten Unterschiede in den beobachteten therapeutischen Effekten im Vergleich zwischen den ECFCs von Spendern mit und ohne Diabetes gezeigt werden. Mehrere Gründe könnten hierfür verantwortlich sein. Das Kollektiv der Spenderpatienten war nicht sehr homogen (siehe Tabelle 3, Seite 61), insbesondere

was Alter und Komedikation betrifft. Die diabetischen Spenderpatienten für die hier verwendeten ECFCs erhielten bereits eine antidiabetische Therapie. Mehrere Studien belegen in diesem Kontext, dass eine strikte Kontrolle der Blutzuckerspiegel einen positiven Einfluss auf die EPC-Funktionalität hat [346-348]. Der mittlere HbA1c-Wert - ein Maß für den mittleren Blutzuckerwert der letzten acht Wochen (mittleres Alter der Erythrozyten), daher auch Langzeit-Blutzucker - im Kollektiv der Spenderpatienten lag bei 7,5%, was auf eine relativ gute langfristige Kontrolle des Blutzuckerspiegels schließen lässt. Lediglich 44% der diabetischen Patienten benötigten eine Insulintherapie. Weitere Studien zeigen, dass die Co-Medikation der Patienten (Statine, Glitazone) darüber hinaus einen zusätzlich positiven Effekt auf die Funktionalität der EPCs auszuüben vermag [349, 350]. Im Kollektiv der sich für diese Arbeit zur Verfügung stellenden Spender hatten unterschiedliche Anteile der Patienten eine Co-Medikation mit Glitazonen und/oder Statinen, was einen nivellierenden Einfluss auf die potenziellen Unterschiede zwischen diabetischen und nicht-diabetischen ECFCs gehabt haben könnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Dysfunktionalität der Zellen von diabetischen Spendern durch kontrollierte Kulturbedingungen bis auf Kontrollniveau minimiert werden kann [351]. Die kontrollierten Bedingungen der mehrwöchigen Kultur der in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz gekommenen ECFCs könnte die mit dem Diabetes mellitus einhergehenden dysfunktionellen Veränderungen nivelliert bzw. egalisiert haben. In zukünftigen Studien mit klarer definierten Einschlusskriterien und Versuchsbedingungen muss der spezifische Einfluss eines Diabetes mellitus, einerseits, und der Einfluss einer diabetischen Umgebung des Empfängergewebes auf die Funktionalität von endothelialen Progenitorzellen, andererseits, untersucht werden, um optimale Bedingungen für eine autologe Stammzelltherapie zu eruieren.

IV.6. Limitationen

Bei der Interpretation der Ergebnisse und ihrer klinische Relevanz sind einige Limitationen zu berücksichtigen.

In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich Zellen des Typs ECFC eingesetzt und keine anderen Zellpopulationen zum Vergleich herangezogen. Inwieweit ECFCs anderen adulten Zellpopulation in der Therapie der ischämischen Herzerkrankung überlegen bzw. unterlegen sind, müssen weitere Studien zeigen. Des Weiteren wurden Zellen von Spendern mit manifester KHK verwendet. Gerade bei Patienten mit bereits manifester KHK und bei Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und Hypercholesterinämie scheinen Anzahl und Funktionalität zirkulierender Progenitorzellen reduziert zu sein. Inwiefern sich ECFCs, die von typischen Patienten in der Klinik stammen, von denen gesunder Spender unterscheiden, kann also hier nicht beantwortet werden.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchstiere waren vergleichsweise jung (8-10 Wochen alt), ausschließlich weiblich und hatten darüber hinaus keinerlei Komorbiditäten (insbesondere keinen Diabetes mellitus) oder medikamentöse Begleittherapien. Komorbiditäten und Begleitmedikation können im Mausmodell, insbesondere in der individuellen Kombination, nicht oder zumindest nur schwer simuliert werden. Gerade das Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellege beim Empfänger scheint sich, wie im vergangenen Kapitel erörtert, relevant auf die Effekte einer Zelltherapie auszuwirken. Bei den zu therapierenden Patienten handelt es sich aber eben meist um ältere Menschen mit multiplen Komorbiditäten, die eine Vielzahl unterschiedlicher Medikamente erhalten. Gerade für das Ziel einer autologen Stammzelltherapie ist der Einfluss von Komorbiditäten und Medikation nicht zu unterschätzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein permanentes Okklusionsmodell zur Induktion der myokardialen Ischämie verwendet, welches nur bedingt die klinische Realität widerspiegelt, da Patienten mit laufender Myokardischämie in den meisten Fällen einer zeitigen Revaskularisation durch kathetergestützte Intervention, intrakoronarer Lyse oder Bypassoperation zugeführt werden können. Inwieweit die erhobenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die Situation eines Ischämie-Reperfusionsschadens übertragen werden können ist daher zukünftigen Studien vorbehalten. Jedoch bietet das permanente Okklusionsmodell die Möglichkeit, reproduzierbare und damit standardisierte Versuchsbedingungen zu simulieren.

IV.7. Ausblick

Trotz einer Vielzahl durchgeführter präklinischer und klinischer Studien zur kardialen Stamm- und Progenitorzelltherapie nach MI gibt es nach wie vor eine Vielzahl noch ungelöster Fragen. So existiert kein Konsens zur benötigten Zellzahl und zum Funktionszustand der verwendeten Zellen für das Erzielen einer optimalen regenerativen Wirkung. Gleiches gilt für den Zeitpunkt der Applikation sowie die günstigste Applikationsroute.

Eine der Hauptlimitationen der kardialen Zelltherapie ist die niedrige myokardiale Einwanderungsrate der Zellen nach intrakoronarer Applikation und das eingeschränkte Zellüberleben nach intramyokardialer Injektion, wie dies auch in der vorliegenden Studie zu beobachten war [12, 116, 117]. Innovative Ansätze müssen entwickelt werden, um das Überleben der transplantierten Zellen zur Maximierung der Therapieeffekte zu steigern.

Da sich die nützlichen Effekte nach einer Verabfolgung adulter Stammzellpopulationen weniger durch eine myokardiale oder vaskuläre Transdifferenzierung der Zellen erklären lassen, als vielmehr durch parakrin medierte Mechanismen, könnte die Imitation der proangiogenen, zelltherapieassoziierten Effekte eine Applikation von Stammzellen ins Infarktgebiet mit all ihren Limitationen erübrigen [352]. Eine Arbeit von Krenning et al., in der VEGFa, bFGF, HGF, MCP-1

und IL-8 als Hauptakteure der zellassozierten, parakrinen Effekte identifiziert werden konnten, zeigt, dass durch die Applikation dieser Zytokine mithilfe von „*slow-release*“ Depots Effekte, wie sie nach Zelltransplantation von EPCs beobachtet wurden, imitiert werden können [353].

Die Verwendung von potenteren Stammzellpopulationen mit hohem kardiomyogenem Differenzierungspotenzial (z.B. (induzierbare) pluripotente Stammzellen) und unmittelbarer Regenerationskapazität sowie Strategien zur Verbesserung des zielgerichteten Einwanderns und Überlebens versprechen weitere Fortschritte auf dem Weg zu einer kompletten funktionellen Restitution des Herzmuskels nach MI. Welche Relevanz die direkte kardiomyozytäre Reprogrammierung als Alternative für zukünftige klinische Anwendungen spielen wird, bleibt abzuwarten. Trotz wachsenden Verständnisses für die Limitationen und Wirkmechanismen der myokardialen Stammzelltherapie bleibt also noch viel Raum für methodische Optimierungen zur Maximierung der positiven Effekte [354].

V. ZUSAMMENFASSUNG

Akute und chronische Myokardischämien ziehen einen irreversiblen Verlust an funktionellem Myokard nach sich und sind mit weitreichenden strukturellen Umbauprozessen am verbleibenden Myokard assoziiert. Häufig entwickelt sich eine progrediente Herzinsuffizienz. Aus Ermangelung an kurativen Behandlungsmöglichkeiten, der schlechten Prognose sowie der immensen sozioökonomischen Bedeutung leitet sich die dringliche Notwendigkeit für die Entwicklung neuer, alternativer Therapiestrategien ab. Vielversprechend erscheint das innovative therapeutische Konzept der zellbasierten myokardialen Regeneration, das zum Ziel hat, über eine Applikation von Stamm- und Progenitorzellen irreversibel verlorengangene Herzmuskelzellen funktionell zu ersetzen bzw. die Formation neuer Gefäße im geschädigten Herzmuskel zu bewirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde das kardioregenerative Potenzial von ECFCs, einer neuartigen, bisher im myoregenerativen Kontext wenig charakterisierten endothelialen Progenitorzellpopulation, die aus dem peripheren Blut von KHK-Patienten isoliert wurde, in einem murinen Myokardinfarktmodell untersucht. Unmittelbar nach experimenteller, durch LAD-Ligation realisierter Infarktinduktion wurden 5×10^5 ECFCs in die Infarkttrandzone verabreicht. Versuchstiere der Kontrollgruppe erhielten eine Injektion mit isotoner Kochsalzlösung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte die intramyokardiale Transplantation von ECFCs zu einer signifikanten Verbesserung der hämodynamischen Funktionsparameter, insbesondere der linksventrikulären Auswurfraction, sowie einer günstigen Beeinflussung des postischämischen kardialen Remodelings, die sich in geringeren Infarktgrößen bei den behandelten Tieren widerspiegelte. Eine direkte Beteiligung der Zellen an der Neoangiogenese oder eine myokardiale Differenzierung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dennoch zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine deutliche Verbesserung der Vaskularisationsdichte nach Zelltransplantation. In der durchflusszytometrischen Analyse der myoztendepletierten Zellfraktionen der Herzen der Versuchstiere 2 Tage nach Infarktinduktion und Zelltransplantation konnte eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe deutliche Steigerung der Zahl von CD45-/CD34-/Sca1+ kardial-residenten Stammzellen im Herzen nachgewiesen werden. Dieser indirekte und bislang in der Literatur nicht beschriebene Mechanismus könnte, neben anderen parakrinen Effekten, hauptverantwortlich für die beobachteten positiven Effekte auf Hämodynamik und Remodeling sein. In der Zusammenschau können die beobachteten Effekte am ehesten als Folge sekundär eingewanderter (pro-) angiogener Zellen sowie über positive parakrine Einflüsse auf kardial-residente Stammzellen und ortsständige Endothelzellen mit dem Resultat einer verbesserten postischämischen

Neovaskularisation interpretiert werden. In der Subgruppenanalyse scheint die diabetische Stoffwechsellage der Spenderpatienten die zelltherapeutischen Effekte im Tiermodell nicht zu limitieren.

Die gemachten Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass von der Transplantation von ECFCs nach Myokardischämie ein relevantes therapeutisches Potenzial ausgeht. Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen bezüglich des *Engraftments* der transplantierten Zellen bestätigen die Befunde in der Literatur und verdeutlichen, dass zukünftig weitere Maßnahmen zur Steigerung des permanenten *Engraftments* ergriffen werden müssen, um die Effekte der Zelltherapie zu maximieren. Weitere Studien müssen detailliertere Einblicke in die genauen Mechanismen der Wirkungsweise von ECFCs bei der Therapie des akuten MIs und den Einfluss von kardiovaskulären Risikofaktoren auf die Funktionalität der zu transplantierenden Zellen erbringen.

V.1. Summary/Abstract

Objective: The potential therapeutic role of EPCs in ischemic heart disease is subject to intense investigation. It has been shown that the transplantation of unfractionated bone marrow stem cells after myocardial infarction (MI) is moderately effective. Selected stem cell populations may further optimize treatment. The aim of the study was to investigate the pro-regenerative potential of human endothelial colony-forming cells (ECFCs), a very homogenous and highly proliferative endothelial progenitor cell subpopulation, in a murine MI model.

Methods: CD34⁺ peripheral blood mononuclear cells were isolated from patient blood samples using immunomagnetic beads. For generating ECFCs, CD34⁺ cells were plated on fibronectin-coated dishes and were expanded by culture in endothelial-specific cell medium. Either human ECFCs (5×10^5) or control medium were injected into the peri-infarct region after surgical MI induction in SCID/beige mice. Hemodynamic function was assessed invasively 30 days post-MI. Hearts were analyzed immunohistochemically to assess cell fate, infarct size and neovascularization (ECFCs n=15 vs. control n=10). Flow-cytometric analysis of enzymatically digested whole heart tissue was used to analyze different subsets of migrated CD34⁺/CD45⁺ peripheral mononuclear cells as well as CD34⁻/CD45⁻ cardiac resident stem cells 2 days post-MI (ECFCs n= 10 vs. control n=6).

Results: Transplantation of human ECFCs after MI improved hemodynamic function at day 30 post-MI (EF: $30.43 \pm 1.20\%$ vs. $22.61 \pm 1.73\%$, $p < 0.001$; $\Delta P/\Delta T_{max}$ $5202.28 \pm 316.68 \text{ mmHg/sec}$ vs. $3896.24 \pm 534.95 \text{ mmHg/sec}$, $p < 0.05$) when compared to controls. In addition, a significantly reduced infarct size ($50.3 \pm 4.5\%$ vs. $66.1 \pm 4.3\%$, $p < 0.05$) was seen in ECFC treated animals compared to controls. Immunohistochemistry failed to show integration and survival of

transplanted cells. However, anti-CD31 immunohistochemistry demonstrated an increased vascular density within the infarct border zone (8.6 ± 0.4 per HPF vs. 6.2 ± 0.5 per HPF, $p < 0.001$). Flow cytometry at day 2 post-MI showed a trend towards increased myocardial homing of CD45+/CD34+ mononuclear cells ($1.1\pm 0.3\%$ vs. $0.7\pm 0.1\%$, $p=0.2$). Interestingly, we detected a significant increase in CD34-/CD45-/Sca1+ cardiac resident stem cells ($11.7\pm 1.7\%$ vs. $4.7\pm 1.7\%$, $p < 0.01$). In a subgroup analysis no significant differences were seen in the effects of ECFCs derived from diabetic- or non-diabetic patients.

Conclusions: In a murine MI model, transplantation of human ECFCs ameliorates myocardial function by attenuation of adverse post-MI remodeling, presumably mainly through paracrine effects. Cardiac repair is enhanced by increasing myocardial neovascularization and the pool of Sca1+ cardiac resident stem cells. The use of human ECFCs for treating ischemic heart disease warrants further investigation.

Die im Rahmen der Arbeit generierten Daten wurden im Rahmen eines Vortrages auf der 43. Jahrestagung der Gesellschaft für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie vorgestellt:

Deutsch MA, Huber B, Assmann G, Müller-Höcker J, Ott I, Franz WM. Human endothelial-colony forming cells enhance cardiac repair by increasing neovascularization and the pool of Sca1+ cardiac resident stem cells after myocardial infarction in SCID/beige mice.

Thorac cardiovasc Surg 2014; Ausgabe S 01 Volume 62 – OP127;

DOI: 10.1055/s-0034-1367201 (Abstract)

Weitere innerhalb der Arbeitsgruppe im Rahmen der Dissertation - jedoch außerhalb der in dieser Arbeit dargestellten Thematik - entstandene Veröffentlichungen:

Dimomeletis I, Deindl E, Gröbner M, Zaruba MM, Kostin S, **Deutsch MA**, Assmann G, Müller-Höcker J, Franz WM. P1125 – Stem cell transplantation and cardiac regeneration after myocardial infarction in SCID mice: Human MAPCs are effective and safe.

Clin Res Cardiol 2008; 97 Suppl. 1; DOI 10.1007/s00392-008-1101-7 (Abstract)

Groebner M, Deindl L, Dimomeletis I, Zaruba MM, Kostin S, **Deutsch MA**, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Feuring-Buske M, Franz WM.

J Stem Cells Regen Med. 2007; 2: 205–206. (Abstract)

Dimomeletis I, Deindl E, Zaruba M, Groebner M, Zahler S, Laslo SM, David R, Kostin S, **Deutsch MA**, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Feuring-Buske M, Franz WM. Assessment of human MAPCs for stem cell transplantation and cardiac regeneration after myocardial infarction in SCID mice.

Exp Hematol. 2010; 38:1105-14. (Originalarbeit)

VI. LITERATURREFERENZEN

1. Roger, V.L., et al., *Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2012. **125**(1): p. e2-e220.
2. Keil, U., [The Worldwide WHO MONICA Project: results and perspectives]. Gesundheitswesen, 2005. **67 Suppl 1**: p. S38-45.
3. WHO. *The 10 leading causes of death by broad income group/factsheet #310 2008*; Available from: <http://www.who.int>.
4. Bundesamt, S. *Sterbefälle insgesamt 2010 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)*. 2010; Available from: www.gbe-bund.de.
5. Muller-Riemenschneider, F., F. Andersohn, and S.N. Willich, *Trends in age-standardised and age-specific mortality from ischaemic heart disease in Germany*. Clin Res Cardiol, 2010. **99**(9): p. 545-51.
6. Bonow, R.O., et al., *World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic*. Circulation, 2002. **106**(13): p. 1602-5.
7. Redfield, M.M., *Heart failure--an epidemic of uncertain proportions*. N Engl J Med, 2002. **347**(18): p. 1442-4.
8. Bundesamt/Robert-Koch-Institut, S. *Krankheitskosten [Gesundheitsberichterstattung - Themenhefte, Dezember 2009]*. 2009 [cited Heft 48; Available from: <http://www.gbe-bund.de>].
9. Crea, F. and G. Liuzzo, *Pathogenesis of Acute Coronary Syndromes*. J Am Coll Cardiol, 2012.
10. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 508-19.
11. Libby, P., et al., *Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(23): p. 2129-38.
12. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
13. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
14. Bolli, R. and E. Marban, *Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning*. Physiol Rev, 1999. **79**(2): p. 609-34.
15. Kloner, R.A. and R.B. Jennings, *Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2*. Circulation, 2001. **104**(25): p. 3158-67.
16. Kloner, R.A. and R.B. Jennings, *Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1*. Circulation, 2001. **104**(24): p. 2981-9.
17. Nian, M., et al., *Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling*. Circ Res, 2004. **94**(12): p. 1543-53.
18. Sun, Y., et al., *Infarct scar as living tissue*. Basic Res Cardiol, 2002. **97**(5): p. 343-7.
19. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 215-62.
20. Mann, D.L. and M.R. Bristow, *Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond*. Circulation, 2005. **111**(21): p. 2837-49.
21. Jugdutt, B.I., *Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough?* Circulation, 2003. **108**(11): p. 1395-403.
22. Opie, L.H., et al., *Controversies in ventricular remodelling*. Lancet, 2006. **367**(9507): p. 356-67.
23. Weil, J. and H. Schunkert, [Pathophysiology of chronic heart failure]. Clin Res Cardiol, 2006. **95 Suppl 4**: p. 1-15; quiz 16-7.
24. Dor, V. and M. Di Donato, *Ventricular remodeling in coronary artery disease*. Curr Opin Cardiol, 1997. **12**(6): p. 533-7.

25. Smadar Cohen, J.L., *Muskelaersatz aus dem Labor*. Spektrum der Wissenschaft, 2005: p. 48-55.
26. Levine, G.N., et al., *2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions*. Circulation, 2011. **124**(23): p. e574-651.
27. Fox, K.A., et al., *Decline in rates of death and heart failure in acute coronary syndromes, 1999-2006*. JAMA, 2007. **297**(17): p. 1892-900.
28. Daemen, J., et al., *Long-term safety and efficacy of percutaneous coronary intervention with stenting and coronary artery bypass surgery for multivessel coronary artery disease: a meta-analysis with 5-year patient-level data from the ARTS, ERACI-II, MASS-II, and SoS trials*. Circulation, 2008. **118**(11): p. 1146-54.
29. Hunt, S.A., et al., *2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(15): p. e1-e90.
30. McMurray, J.J. and M.A. Pfeffer, *Heart failure*. Lancet, 2005. **365**(9474): p. 1877-89.
31. Krum, H. and J.R. Teerlink, *Medical therapy for chronic heart failure*. Lancet, 2011. **378**(9792): p. 713-21.
32. Krishnamani, R., D. DeNofrio, and M.A. Konstam, *Emerging ventricular assist devices for long-term cardiac support*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(2): p. 71-6.
33. Holzmeister, J. and C. Leclercq, *Implantable cardioverter defibrillators and cardiac resynchronisation therapy*. Lancet, 2011. **378**(9792): p. 722-30.
34. Stewart, G.C. and M.M. Givertz, *Mechanical circulatory support for advanced heart failure: patients and technology in evolution*. Circulation, 2012. **125**(10): p. 1304-15.
35. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur Heart J, 2012. **33**(14): p. 1787-847.
36. Stehlik, J., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Heart Transplant Report--2011*. J Heart Lung Transplant, 2011. **30**(10): p. 1078-94.
37. Smits, J.M., et al., *Considerations for patients awaiting heart transplantation*. Thorac Cardiovasc Surg, 2010. **58 Suppl 2**: p. S179-84.
38. Bader, M., *Organmangel und Organverteilung: Das Allokationsdilemma der Transplantationsmedizin aus juristischer Sicht*. 2010: Mohr Siebeck GmbH KG.
39. Schmauss, D. and M. Weis, *Cardiac allograft vasculopathy: recent developments*. Circulation, 2008. **117**(16): p. 2131-41.
40. Heller, A., *Über die Regeneration des Herzmuskels*. Anat. u. z. allg. Path., 1913/14. **57**: p. 223-231.
41. Karsner, H.T. and J.E. Dwyer, *Studies in Infarction: IV. Experimental bland Infarction of the Myocardium, Myocardial Regeneration and Cicatrization*. J Med Res, 1916. **34**(1): p. 21-40 3.
42. Macmahon, H.E., *Hyperplasia and Regeneration of the Myocardium in Infants and in Children*. Am J Pathol, 1937. **13**(5): p. 845-854 5.
43. Waring, C.D., et al., *The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation*. Eur Heart J, 2012.
44. Soonpaa, M.H. and L.J. Field, *Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 2): p. H220-6.
45. Simpson, D.L., et al., *A strong regenerative ability of cardiac stem cells derived from neonatal hearts*. Circulation, 2012. **126**(11 Suppl 1): p. S46-53.

LITERATURREFERENZEN

46. Kajstura, J., et al., *Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart*. *Circulation*, 2012. **126**(15): p. 1869-81.
47. Leri, A., J. Kajstura, and P. Anversa, *Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology*. *Circ Res*, 2011. **109**(8): p. 941-61.
48. Urbanek, K., et al., *Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(24): p. 8692-7.
49. Beltrami, A.P., et al., *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(23): p. 1750-7.
50. Smart, N., et al., *De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury*. *Nature*, 2011. **474**(7353): p. 640-4.
51. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. *Science*, 2009. **324**(5923): p. 98-102.
52. Porrello, E.R., et al., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. *Science*, 2011. **331**(6020): p. 1078-80.
53. Amir, G., et al., *Dynamics of human myocardial progenitor cell populations in the neonatal period*. *Ann Thorac Surg*, 2008. **86**(4): p. 1311-9.
54. Quaini, F., et al., *Chimerism of the transplanted heart*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(1): p. 5-15.
55. Bayes-Genis, A., et al., *Host cell-derived cardiomyocytes in sex-mismatch cardiac allografts*. *Cardiovasc Res*, 2002. **56**(3): p. 404-10.
56. Muller, P., et al., *Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts*. *Circulation*, 2002. **106**(1): p. 31-5.
57. Laflamme, M.A., et al., *Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts*. *Circ Res*, 2002. **90**(6): p. 634-40.
58. Rupp, S., et al., *Characterization of long-term endogenous cardiac repair in children after heart transplantation*. *Eur Heart J*, 2008. **29**(15): p. 1867-72.
59. Engelmann, M.G. and W.M. Franz, *Stem cell therapy after myocardial infarction: ready for clinical application?* *Curr Opin Mol Ther*, 2006. **8**(5): p. 396-414.
60. Laflamme, M.A. and C.E. Murry, *Heart regeneration*. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 326-35.
61. Poss, K.D., L.G. Wilson, and M.T. Keating, *Heart regeneration in zebrafish*. *Science*, 2002. **298**(5601): p. 2188-90.
62. Jopling, C., et al., *Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation*. *Nature*, 2010. **464**(7288): p. 606-9.
63. Becker, R.O., S. Chapin, and R. Sherry, *Regeneration of the ventricular myocardium in amphibians*. *Nature*, 1974. **248**(444): p. 145-7.
64. Murry, C.E., H. Reinecke, and L.M. Pabon, *Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **47**(9): p. 1777-85.
65. Brenner, C. and W.M. Franz, *The use of stem cells for the repair of cardiac tissue in ischemic heart disease*. *Expert Rev Med Devices*, 2011. **8**(2): p. 209-25.
66. Karantalis, V., et al., *Cell-based therapy for prevention and reversal of myocardial remodeling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **303**(3): p. H256-70.
67. Templin, C., T.F. Luscher, and U. Landmesser, *Cell-based cardiovascular repair and regeneration in acute myocardial infarction and chronic ischemic cardiomyopathy-current status and future developments*. *Int J Dev Biol*, 2011. **55**(4-5): p. 407-17.
68. Eschenhagen, T., et al., *Physiological aspects of cardiac tissue engineering*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **303**(2): p. H133-43.
69. Brunner, S., M.G. Engelmann, and W.M. Franz, *Stem cell mobilisation for myocardial repair*. *Expert Opin Biol Ther*, 2008. **8**(11): p. 1675-90.
70. Leri, A., J. Kajstura, and P. Anversa, *Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(4): p. 1373-416.
71. Brunner, S., et al., *Migration of bone marrow-derived cells and improved perfusion after treatment with erythropoietin in a murine model of myocardial infarction*. *J Cell Mol Med*, 2012. **16**(1): p. 152-9.

LITERATURREFERENZEN

72. Theiss, H.D., et al., *Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis*. Stem Cell Res, 2011. **7**(3): p. 244-55.
73. Liehn, E.A., et al., *Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(23): p. 2357-62.
74. Sanganalath, S.K., et al., *Hematopoietic cytokines for cardiac repair: mobilization of bone marrow cells and beyond*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(5): p. 709-33.
75. Ahuja, P., P. Sdek, and W.R. MacLellan, *Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 521-44.
76. Zhu, W., et al., *Cell-cycle-based strategies to drive myocardial repair*. Pediatr Cardiol, 2009. **30**(5): p. 710-5.
77. Steinhauser, M.L. and R.T. Lee, *Regeneration of the heart*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(12): p. 701-12.
78. Bruneau, B.G., *Direct reprogramming for cardiac regeneration: from dream to reality*. Circ Res, 2012. **110**(11): p. 1392-4.
79. Ieda, M., et al., *Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors*. Cell, 2010. **142**(3): p. 375-86.
80. Hansson, E.M. and K.R. Chien, *Reprogramming a broken heart*. Cell Stem Cell, 2012. **11**(1): p. 3-4.
81. Templin, C., T.F. Luscher, and U. Landmesser, *[Stem and progenitor cell-based therapy approaches: current developments on treatment of acute myocardial infarction and chronic ischemic cardiomyopathy]*. Herz, 2010. **35**(7): p. 445-56.
82. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature, 2001. **410**(6829): p. 701-5.
83. Jackson, K.A., et al., *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells*. J Clin Invest, 2001. **107**(11): p. 1395-402.
84. Murry, C.E., et al., *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature, 2004. **428**(6983): p. 664-8.
85. Balsam, L.B., et al., *Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium*. Nature, 2004. **428**(6983): p. 668-73.
86. Gneocchi, M., et al., *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy*. Circ Res, 2008. **103**(11): p. 1204-19.
87. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
88. Groebner, M., R. David, and W.M. Franz, *[Embryonic stem cells. Future perspectives]*. Internist (Berl), 2006. **47**(5): p. 502, 504-8.
89. Conley, B.J., et al., *Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 555-67.
90. David, R., et al., *Forward programming of pluripotent stem cells towards distinct cardiovascular cell types*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 263-72.
91. David, R., et al., *MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(3): p. 338-45.
92. David, R. and W.M. Franz, *From pluripotency to distinct cardiomyocyte subtypes*. Physiology (Bethesda), 2012. **27**(3): p. 119-29.
93. Burridge, P.W., et al., *Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(1): p. 16-28.
94. Mummery, C., et al., *Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells*. J Anat, 2002. **200**(Pt 3): p. 233-42.
95. Mummery, C.L., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview*. Circ Res, 2012. **111**(3): p. 344-58.
96. Fukuda, K. and S. Yuasa, *Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes*. Circ Res, 2006. **98**(8): p. 1002-13.

97. Klug, M.G., et al., *Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 216-24.
98. Kehat, I., et al., *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 407-14.
99. Shiba, Y., et al., *Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 322-5.
100. Robertson, J.A., *Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(1): p. 74-8.
101. Kaiser, P., H.L. Günther, and J. Taupitz, *Embryonenschutzgesetz: Juristischer Kommentar mit medizinisch-naturwissenschaftlichen Einführungen*. 2008: Kohlhammer W.
102. Nussbaum, J., et al., *Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response*. FASEB J, 2007. **21**(7): p. 1345-57.
103. Swijnenburg, R.J., et al., *Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium*. Circulation, 2005. **112**(9 Suppl): p. 1166-72.
104. Liu, Y. and H.F. Tse, *The proarrhythmic risk of cell therapy for cardiovascular diseases*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2011. **9**(12): p. 1593-601.
105. Charron, D., C. Suberbielle-Boissel, and R. Al-Daccak, *Immunogenicity and allogenicity: a challenge of stem cell therapy*. J Cardiovasc Transl Res, 2009. **2**(1): p. 130-8.
106. Kofidis, T., et al., *They are not stealthy in the heart: embryonic stem cells trigger cell infiltration, humoral and T-lymphocyte-based host immune response*. Eur J Cardiothorac Surg, 2005. **28**(3): p. 461-6.
107. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
108. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
109. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
110. Plath, K. and W.E. Lowry, *Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(4): p. 253-65.
111. Narazaki, G., et al., *Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells*. Circulation, 2008. **118**(5): p. 498-506.
112. Nelson, T.J., A. Martinez-Fernandez, and A. Terzic, *Induced pluripotent stem cells: developmental biology to regenerative medicine*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(12): p. 700-10.
113. Yoshida, Y. and S. Yamanaka, *iPS cells: a source of cardiac regeneration*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 327-32.
114. Schenke-Layland, K., et al., *Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages*. Stem Cells, 2008. **26**(6): p. 1537-46.
115. Mauritz, C., et al., *Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived Flk-1 progenitor cells engraft, differentiate, and improve heart function in a mouse model of acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2011. **32**(21): p. 2634-41.
116. Templin, C., et al., *Transplantation and tracking of human-induced pluripotent stem cells in a pig model of myocardial infarction: assessment of cell survival, engraftment, and distribution by hybrid single photon emission computed tomography/computed tomography of sodium iodide symporter transgene expression*. Circulation, 2012. **126**(4): p. 430-9.
117. Davis, R.L., H. Weintraub, and A.B. Lassar, *Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts*. Cell, 1987. **51**(6): p. 987-1000.
118. Chambers, S.M. and L. Studer, *Cell fate plug and play: direct reprogramming and induced pluripotency*. Cell, 2011. **145**(6): p. 827-30.
119. Protze, S., et al., *A new approach to transcription factor screening for reprogramming of fibroblasts to cardiomyocyte-like cells*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **53**(3): p. 323-32.
120. Song, K., et al., *Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors*. Nature, 2012. **485**(7400): p. 599-604.

LITERATURREFERENZEN

121. Qian, L., et al., *In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes*. Nature, 2012. **485**(7400): p. 593-8.
122. Chen, J.X., et al., *Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using Gata4, Mef2c, and Tbx5*. Circ Res, 2012. **111**(1): p. 50-5.
123. Srivastava, D. and M. Ieda, *Critical factors for cardiac reprogramming*. Circ Res, 2012. **111**(1): p. 5-8.
124. Yoshida, Y. and S. Yamanaka, *Labor pains of new technology: direct cardiac reprogramming*. Circ Res, 2012. **111**(1): p. 3-4.
125. Forbes, S.J., et al., *Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible*. Clin Sci (Lond), 2002. **103**(4): p. 355-69.
126. Maximov, A.A., *Über die experimentelle Erzeugung von Knochenmarks-Gewebe*. Anat. Anz., 1906(28): p. 24-38.
127. Thomas, E.D., et al., *Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy*. N Engl J Med, 1957. **257**(11): p. 491-6.
128. Mc, G.J., Jr., et al., *Treatment of terminal leukemic relapse by total-body irradiation and intravenous infusion of stored autologous bone marrow obtained during remission*. N Engl J Med, 1959. **260**(14): p. 675-83.
129. Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. **197**: p. 452-4.
130. Pillow, R.P., et al., *Treatment of bone-marrow failure by isogeneic marrow infusion*. N Engl J Med, 1966. **275**(2): p. 94-7.
131. Goodell, M.A., et al., *Stem cell plasticity in muscle and bone marrow*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **938**: p. 208-18; discussion 218-20.
132. Wagers, A.J. and I.L. Weissman, *Plasticity of adult stem cells*. Cell, 2004. **116**(5): p. 639-48.
133. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
134. Psaltis, P.J., et al., *Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair*. Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2201-10.
135. Williams, A.R. and J.M. Hare, *Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease*. Circ Res, 2011. **109**(8): p. 923-40.
136. Ranganath, S.H., et al., *Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(3): p. 244-58.
137. Jahagirdar, B.N. and C.M. Verfaillie, *Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity*. Stem Cell Rev, 2005. **1**(1): p. 53-9.
138. Reyes, M. and C.M. Verfaillie, *Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **938**: p. 231-3; discussion 233-5.
139. Jiang, Y., et al., *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain*. Exp Hematol, 2002. **30**(8): p. 896-904.
140. Reyes, M., et al., *Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2615-25.
141. Reyes, M., et al., *Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow*. J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 337-46.
142. Dimomeletis, I., et al., *Assessment of human MAPCs for stem cell transplantation and cardiac regeneration after myocardial infarction in SCID mice*. Exp Hematol, 2010. **38**(11): p. 1105-14.
143. Charge, S.B. and M.A. Rudnicki, *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. Physiol Rev, 2004. **84**(1): p. 209-38.
144. Koh, G.Y., et al., *Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1548-54.
145. Taylor, D.A., et al., *Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation*. Nat Med, 1998. **4**(8): p. 929-33.

LITERATURREFERENZEN

146. Menasche, P., *Skeletal myoblasts and cardiac repair*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(4): p. 545-53.
147. Reinecke, H., V. Poppa, and C.E. Murry, *Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(2): p. 241-9.
148. Menasche, P., et al., *Myoblast transplantation for heart failure*. Lancet, 2001. **357**(9252): p. 279-80.
149. Menasche, P., et al., *The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation*. Circulation, 2008. **117**(9): p. 1189-200.
150. Coppen, S.R., et al., *A factor underlying late-phase arrhythmogenicity after cell therapy to the heart: global downregulation of connexin43 in the host myocardium after skeletal myoblast transplantation*. Circulation, 2008. **118**(14 Suppl): p. S138-44.
151. Fuchs, E. and J.A. Segre, *Stem cells: a new lease on life*. Cell, 2000. **100**(1): p. 143-55.
152. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
153. Hawke, T.J. and D.J. Garry, *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol, 2001. **91**(2): p. 534-51.
154. Latif, S., A. Masino, and D.J. Garry, *Transcriptional pathways direct cardiac development and regeneration*. Trends Cardiovasc Med, 2006. **16**(7): p. 234-40.
155. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell, 2003. **114**(6): p. 763-76.
156. Martin-Puig, S., Z. Wang, and K.R. Chien, *Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(4): p. 320-31.
157. Moretti, A., et al., *Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification*. Cell, 2006. **127**(6): p. 1151-65.
158. Oh, H., et al., *Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12313-8.
159. Wu, S.M., K.R. Chien, and C. Mummery, *Origins and fates of cardiovascular progenitor cells*. Cell, 2008. **132**(4): p. 537-43.
160. Messina, E., et al., *Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart*. Circ Res, 2004. **95**(9): p. 911-21.
161. Bollini, S., N. Smart, and P.R. Riley, *Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 296-303.
162. Lyman, S.D. and S.E. Jacobsen, *c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities*. Blood, 1998. **91**(4): p. 1101-34.
163. Zaruba, M.M., et al., *Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts*. Circulation, 2010. **121**(18): p. 1992-2000.
164. Zhou, S., et al., *The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1028-34.
165. Hierlihy, A.M., et al., *The post-natal heart contains a myocardial stem cell population*. FEBS Lett, 2002. **530**(1-3): p. 239-43.
166. Martin, C.M., et al., *Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart*. Dev Biol, 2004. **265**(1): p. 262-75.
167. Pfister, O., et al., *CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation*. Circ Res, 2005. **97**(1): p. 52-61.
168. Oyama, T., et al., *Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo*. J Cell Biol, 2007. **176**(3): p. 329-41.
169. Liang, S.X., et al., *Differentiation and migration of Sca1+/CD31- cardiac side population cells in a murine myocardial ischemic model*. Int J Cardiol, 2010. **138**(1): p. 40-9.
170. Yamahara, K., et al., *Heterogeneous nature of adult cardiac side population cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(4): p. 615-20.

LITERATURREFERENZEN

171. Cai, C.L., et al., *Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart*. Dev Cell, 2003. **5**(6): p. 877-89.
172. Laugwitz, K.L., et al., *Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages*. Nature, 2005. **433**(7026): p. 647-53.
173. Holmes, C. and W.L. Stanford, *Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma*. Stem Cells, 2007. **25**(6): p. 1339-47.
174. Oh, H., et al., *Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1015**: p. 182-9.
175. Goumans, M.J., et al., *TGF-beta1 induces efficient differentiation of human cardiomyocyte progenitor cells into functional cardiomyocytes in vitro*. Stem Cell Res, 2007. **1**(2): p. 138-49.
176. Anversa, P., et al., *Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology*. Circulation, 2006. **113**(11): p. 1451-63.
177. Makkar, R.R., et al., *Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial*. Lancet, 2012. **379**(9819): p. 895-904.
178. Bolli, R., et al., *Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial*. Lancet, 2011. **378**(9806): p. 1847-57.
179. Ribatti, D., *The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review*. Leuk Res, 2007. **31**(4): p. 439-44.
180. Hueper, W.C., Russell, M.A., *Capillary-like formations in tissue cultures of leukocytes*. Arch. Exp. Zellforsch. , 1932. **12**: p. 407-24.
181. Parker, R.C., *The Development of Organized Vessels in Cultures of Blood Cells*. Science, 1933. **77**(2005): p. 544-6.
182. Mackenzie, D.C. and J. Loewenthal, *Endothelial growth in nylon vascular grafts*. Br J Surg, 1960. **48**: p. 212-7.
183. Stump, M.M., et al., *The endothelial lining of homografts and dacron prostheses in the canine aorta*. Am J Pathol, 1962. **40**: p. 487-91.
184. Stump, M.M., et al., *Endothelium Grown from Circulating Blood on Isolated Intravascular Dacron Hub*. Am J Pathol, 1963. **43**: p. 361-7.
185. Scott, S.M., et al., *The role of circulating cells in the healing of vascular prostheses*. J Vasc Surg, 1994. **19**(4): p. 585-93.
186. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
187. Shi, Q., et al., *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells*. Blood, 1998. **92**(2): p. 362-7.
188. Rafii, S. and D. Lyden, *Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 702-12.
189. Hirschi, K.K., D.A. Ingram, and M.C. Yoder, *Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(9): p. 1584-95.
190. Wassmann, S., et al., *Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells*. Circ Res, 2006. **99**(8): p. e74-83.
191. Melero-Martin, J.M. and A.C. Dudley, *Concise review: Vascular stem cells and tumor angiogenesis*. Stem Cells, 2011. **29**(2): p. 163-8.
192. Mikkola, H.K. and S.H. Orkin, *The search for the hemangioblast*. J Hematother Stem Cell Res, 2002. **11**(1): p. 9-17.
193. Bailey, A.S. and W.H. Fleming, *Converging roads: evidence for an adult hemangioblast*. Exp Hematol, 2003. **31**(11): p. 987-93.
194. Prater, D.N., et al., *Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells*. Leukemia, 2007. **21**(6): p. 1141-9.
195. Fadini, G.P., D. Losordo, and S. Dimmeler, *Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use*. Circ Res, 2012. **110**(4): p. 624-37.

LITERATURREFERENZEN

196. Zaruba, M.M. and W.M. Franz, *Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy*. *Expert Opin Biol Ther*, 2010. **10**(3): p. 321-35.
197. Case, J., et al., *Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors*. *Exp Hematol*, 2007. **35**(7): p. 1109-18.
198. Krenning, G., et al., *Generating new blood flow: integrating developmental biology and tissue engineering*. *Trends Cardiovasc Med*, 2008. **18**(8): p. 312-23.
199. Psaltis, P.J., et al., *Resident vascular progenitor cells--diverse origins, phenotype, and function*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2011. **4**(2): p. 161-76.
200. Alaiti, M.A., M. Ishikawa, and M.A. Costa, *Bone marrow and circulating stem/progenitor cells for regenerative cardiovascular therapy*. *Transl Res*, 2010. **156**(3): p. 112-29.
201. Sieveking, D.P., et al., *Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **51**(6): p. 660-8.
202. Timmermans, F., et al., *Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(7): p. 1572-9.
203. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(7): p. 593-600.
204. Vasa, M., et al., *Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease*. *Circ Res*, 2001. **89**(1): p. E1-7.
205. Rehman, J., et al., *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors*. *Circulation*, 2003. **107**(8): p. 1164-9.
206. Gulati, R., et al., *Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood*. *Circ Res*, 2003. **93**(11): p. 1023-5.
207. Hur, J., et al., *Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(2): p. 288-93.
208. Ingram, D.A., et al., *Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood*. *Blood*, 2004. **104**(9): p. 2752-60.
209. Yoder, M.C., et al., *Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals*. *Blood*, 2007. **109**(5): p. 1801-9.
210. Mund, J.A., et al., *Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(4): p. 1045-53.
211. Tura, O., et al., *Late outgrowth endothelial cells resemble mature endothelial cells and are not derived from bone marrow*. *Stem Cells*, 2013. **31**(2): p. 338-48.
212. Huang, L., et al., *Acute myocardial infarction in swine rapidly and selectively releases highly proliferative endothelial colony forming cells (ECFCs) into circulation*. *Cell Transplant*, 2007. **16**(9): p. 887-97.
213. Massa, M., et al., *Rapid and large increase of the frequency of circulating endothelial colony-forming cells (ECFCs) generating late outgrowth endothelial cells in patients with acute myocardial infarction*. *Exp Hematol*, 2009. **37**(1): p. 8-9.
214. Meneveau, N., et al., *Presence of endothelial colony-forming cells is associated with reduced microvascular obstruction limiting infarct size and left ventricular remodelling in patients with acute myocardial infarction*. *Basic Res Cardiol*, 2011. **106**(6): p. 1397-410.
215. Gunsilius, E., et al., *Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells*. *Lancet*, 2000. **355**(9216): p. 1688-91.
216. Woywodt, A., et al., *Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(3): p. 671-7.

LITERATURREFERENZEN

217. Schmidt-Lucke, C., et al., *Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair*. *Circulation*, 2005. **111**(22): p. 2981-7.
218. Werner, N., et al., *Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(10): p. 999-1007.
219. Rosenzweig, A., *Circulating endothelial progenitors--cells as biomarkers*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(10): p. 1055-7.
220. Heeschen, C., et al., *Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease*. *Circulation*, 2004. **109**(13): p. 1615-22.
221. Muller-Ehmsen, J., et al., *Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: beneficial effects of weight reduction*. *Eur Heart J*, 2008. **29**(12): p. 1560-8.
222. Steiner, S., et al., *Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease*. *Atherosclerosis*, 2005. **181**(2): p. 305-10.
223. Van Craenenbroeck, E.M., et al., *Exercise acutely reverses dysfunction of circulating angiogenic cells in chronic heart failure*. *Eur Heart J*, 2010. **31**(15): p. 1924-34.
224. Durik, M., B. Seva Pessoa, and A.J. Roks, *The renin-angiotensin system, bone marrow and progenitor cells*. *Clin Sci (Lond)*, 2012. **123**(4): p. 205-23.
225. Ray, R., et al., *Sex steroids and stem cell function*. *Mol Med*, 2008. **14**(7-8): p. 493-501.
226. Besler, C., et al., *Pharmacological approaches to improve endothelial repair mechanisms*. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008. **6**(8): p. 1071-82.
227. Muller, P., et al., *ACE inhibition promotes upregulation of endothelial progenitor cells and neoangiogenesis in cardiac pressure overload*. *Cardiovasc Res*, 2009. **83**(1): p. 106-14.
228. Sorrentino, S.A., et al., *Nebivolol exerts beneficial effects on endothelial function, early endothelial progenitor cells, myocardial neovascularization, and left ventricular dysfunction early after myocardial infarction beyond conventional beta1-blockade*. *J Am Coll Cardiol*, 2011. **57**(5): p. 601-11.
229. Wang, W., et al., *Statins enhance clonal growth of late outgrowth endothelial progenitors and increase myocardial capillary density in the chronically ischemic heart*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e24868.
230. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. *Nat Med*, 1999. **5**(4): p. 434-8.
231. Engelmann, M.G., et al., *Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(8): p. 1712-21.
232. Heeschen, C., et al., *Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization*. *Blood*, 2003. **102**(4): p. 1340-6.
233. Brunner, S., et al., *Erythropoietin administration after myocardial infarction in mice attenuates ischemic cardiomyopathy associated with enhanced homing of bone marrow-derived progenitor cells via the CXCR-4/SDF-1 axis*. *FASEB J*, 2009. **23**(2): p. 351-61.
234. Zaruba, M.M., et al., *Parathyroid hormone treatment after myocardial infarction promotes cardiac repair by enhanced neovascularization and cell survival*. *Cardiovasc Res*, 2008. **77**(4): p. 722-31.
235. Huber, B.C., et al., *Parathyroid hormone is a DPP-IV inhibitor and increases SDF-1-driven homing of CXCR4(+) stem cells into the ischaemic heart*. *Cardiovasc Res*, 2011. **90**(3): p. 529-37.
236. Werner, C., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone increases number and function of endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease and normal glucose tolerance*. *Diabetes*, 2007. **56**(10): p. 2609-15.

LITERATURREFERENZEN

237. Zaruba, M.M., et al., *Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(4): p. 313-23.
238. Theiss, H.D., et al., *Safety and efficacy of SITAgliptin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial)--rationale, design and first interim analysis*. Int J Cardiol, 2010. **145**(2): p. 282-4.
239. Huang, C.Y., et al., *Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improves neovascularization by increasing circulating endothelial progenitor cells*. Br J Pharmacol, 2012. **167**(7): p. 1506-19.
240. Rathmann, W., et al., *Type 2 diabetes: prevalence and relevance of genetic and acquired factors for its prediction*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(19): p. 331-7.
241. Mazzone, T., A. Chait, and J. Plutzky, *Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies*. Lancet, 2008. **371**(9626): p. 1800-9.
242. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9468): p. 1415-28.
243. Go, A.S., et al., *Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2013. **127**(1): p. e6-e245.
244. Cubbon, R.M., et al., *Temporal trends in mortality of patients with diabetes mellitus suffering acute myocardial infarction: a comparison of over 3000 patients between 1995 and 2003*. Eur Heart J, 2007. **28**(5): p. 540-5.
245. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
246. Danaei, G., et al., *National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants*. Lancet, 2011. **378**(9785): p. 31-40.
247. Hauner, H., I. Koster, and L. von Ferber, *[Prevalence of diabetes mellitus in Germany 1998-2001. Secondary data analysis of a health insurance sample of the AOK in Hesse/KV in Hesse]*. Dtsch Med Wochenschr, 2003. **128**(50): p. 2632-7.
248. Cubbon, R.M., A. Rajwani, and S.B. Wheatcroft, *The impact of insulin resistance on endothelial function, progenitor cells and repair*. Diab Vasc Dis Res, 2007. **4**(2): p. 103-11.
249. Cubbon, R.M., et al., *Importance of insulin resistance to vascular repair and regeneration*. Free Radic Biol Med, 2013. **60**: p. 246-63.
250. Kusuyama, T., et al., *Effects of treatment for diabetes mellitus on circulating vascular progenitor cells*. J Pharmacol Sci, 2006. **102**(1): p. 96-102.
251. Tepper, O.M., et al., *Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2781-6.
252. Ingram, D.A., et al., *In vitro hyperglycemia or a diabetic intrauterine environment reduces neonatal endothelial colony-forming cell numbers and function*. Diabetes, 2008. **57**(3): p. 724-31.
253. Jarajapu, Y.P. and M.B. Grant, *The promise of cell-based therapies for diabetic complications: challenges and solutions*. Circ Res, 2010. **106**(5): p. 854-69.
254. Kalka, C., et al., *Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects*. Circ Res, 2000. **86**(12): p. 1198-202.
255. Kawamoto, A., et al., *Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia*. Circulation, 2001. **103**(5): p. 634-7.
256. Wagers, A.J., et al., *Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells*. Science, 2002. **297**(5590): p. 2256-9.
257. Anversa, P., et al., *Concise review: stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts*. Stem Cells, 2007. **25**(3): p. 589-601.
258. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. Circ Res, 1999. **85**(3): p. 221-8.

LITERATURREFERENZEN

259. Kocher, A.A., et al., *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 430-6.
260. Botta, R., et al., *Heart infarct in NOD-SCID mice: therapeutic vasculogenesis by transplantation of human CD34+ cells and low dose CD34+KDR+ cells*. FASEB J, 2004. **18**(12): p. 1392-4.
261. Mirotsov, M., et al., *Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 280-9.
262. van der Spoel, T.I., et al., *Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease*. Cardiovasc Res, 2011. **91**(4): p. 649-58.
263. Lipinski, M.J., et al., *Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(18): p. 1761-7.
264. Martin-Rendon, E., et al., *Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review*. Eur Heart J, 2008. **29**(15): p. 1807-18.
265. Abdel-Latif, A., et al., *Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis*. Arch Intern Med, 2007. **167**(10): p. 989-97.
266. Zimmet, H., et al., *Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials*. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(1): p. 91-105.
267. Jeevanantham, V., et al., *Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis*. Circulation, 2012. **126**(5): p. 551-68.
268. Clifford, D.M., et al., *Stem cell treatment for acute myocardial infarction*. Cochrane Database Syst Rev, 2012. **2**: p. CD006536.
269. Erbs, S., et al., *Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial*. Circulation, 2007. **116**(4): p. 366-74.
270. Meyer, G.P., et al., *Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial*. Circulation, 2006. **113**(10): p. 1287-94.
271. Lunde, K., et al., *Anterior myocardial infarction with acute percutaneous coronary intervention and intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: safety, clinical outcome, and serial changes in left ventricular function during 12-months' follow-up*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(6): p. 674-6.
272. Tendera, M., et al., *Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial*. Eur Heart J, 2009. **30**(11): p. 1313-21.
273. Malliaras, K. and E. Marban, *Cardiac cell therapy: where we've been, where we are, and where we should be headed*. Br Med Bull, 2011. **98**: p. 161-85.
274. EMD Millipore, D., Germany, *Human PBMC Isolation*. 2011.
275. Bosma, G.C., R.P. Custer, and M.J. Bosma, *A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse*. Nature, 1983. **301**(5900): p. 527-30.
276. Blunt, T., et al., *Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation*. Cell, 1995. **80**(5): p. 813-23.

LITERATURREFERENZEN

277. Danska, J.S., et al., *Biochemical and genetic defects in the DNA-dependent protein kinase in murine scid lymphocytes*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5507-17.
278. Saxena, R.K., Q.B. Saxena, and W.H. Adler, *Defective T-cell response in beige mutant mice*. Nature, 1982. **295**(5846): p. 240-1.
279. Perou, C.M., et al., *The Beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic protein*. J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29790-4.
280. Shibata, S., et al., *SCID-bg mice as xenograft recipients*. Lab Anim, 1997. **31**(2): p. 163-8.
281. Kolk, M.V., et al., *LAD-ligation: a murine model of myocardial infarction*. J Vis Exp, 2009(32).
282. Tarnavski, O., et al., *Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies*. Physiol Genomics, 2004. **16**(3): p. 349-60.
283. Tarnavski, O., *Mouse surgical models in cardiovascular research*. Methods Mol Biol, 2009. **573**: p. 115-37.
284. Icardo, J.M. and E. Colvee, *Origin and course of the coronary arteries in normal mice and in iv/iv mice*. J Anat, 2001. **199**(Pt 4): p. 473-82.
285. Salto-Tellez, M., et al., *Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model*. Cardiovasc Pathol, 2004. **13**(2): p. 91-7.
286. Ahn, D., et al., *Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(3): p. H1201-7.
287. Tarnavski, O., *A Mouse Model of Myocardial Infarction*. 2004.
288. Yang, X.P., et al., *Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice*. Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 2): p. H1967-74.
289. Chaves, A.A., D.M. Weinstein, and J.A. Bauer, *Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen*. Life Sci, 2001. **69**(2): p. 213-22.
290. Roth, D.M., et al., *Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2134-40.
291. Winter, E.M., et al., *Left ventricular function in the post-infarct failing mouse heart by magnetic resonance imaging and conductance catheter: a comparative analysis*. Acta Physiol (Oxf), 2008. **194**(2): p. 111-22.
292. Thews, A., *Einführung in die Durchflusszytometrie und ihre Anwendungen*. Coulter-Immuntotech Diagnostics Durchflusszytometrie, 2001: p. 15.
293. Wu, K.H., et al., *Stem cell engraftment and survival in the ischemic heart*. Ann Thorac Surg, 2011. **92**(5): p. 1917-25.
294. Sheikh, A.Y., et al., *In vivo functional and transcriptional profiling of bone marrow stem cells after transplantation into ischemic myocardium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(1): p. 92-102.
295. Higuchi, T., et al., *Combined reporter gene PET and iron oxide MRI for monitoring survival and localization of transplanted cells in the rat heart*. J Nucl Med, 2009. **50**(7): p. 1088-94.
296. Li, S.H., et al., *Tracking cardiac engraftment and distribution of implanted bone marrow cells: Comparing intra-aortic, intravenous, and intramyocardial delivery*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(5): p. 1225-33 e1.
297. Vrtovec, B., et al., *Comparison of transendocardial and intracoronary CD34+ cell transplantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy*. Circulation, 2013. **128**(11 Suppl 1): p. S42-9.
298. Muller-Ehmsen, J., et al., *Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(5): p. 876-84.
299. Sondergaard, C.S., et al., *Minimal engraftment of human CD34+ cells mobilized from healthy donors in the infarcted heart of athymic nude rats*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(6): p. 845-56.
300. Penicka, M., et al., *Images in cardiovascular medicine. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcatheter transplantation in a patient with acute myocardial infarction*. Circulation, 2005. **112**(4): p. e63-5.

LITERATURREFERENZEN

301. Terrovitis, J., et al., *Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(17): p. 1619-26.
302. Teng, C.J., et al., *Massive mechanical loss of microspheres with direct intramyocardial injection in the beating heart: implications for cellular cardiomyoplasty*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **132**(3): p. 628-32.
303. Dow, J., et al., *Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(2): p. 301-7.
304. Terrovitis, J.V., R.R. Smith, and E. Marban, *Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart*. Circ Res, 2010. **106**(3): p. 479-94.
305. Mohsin, S., et al., *Empowering adult stem cells for myocardial regeneration*. Circ Res, 2011. **109**(12): p. 1415-28.
306. Urbich, C., et al., *Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(5): p. 733-42.
307. Cho, H.J., et al., *Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart*. J Exp Med, 2007. **204**(13): p. 3257-69.
308. Yang, Z., et al., *Paracrine factors secreted by endothelial progenitor cells prevent oxidative stress-induced apoptosis of mature endothelial cells*. Atherosclerosis, 2010. **211**(1): p. 103-9.
309. Thum, T., et al., *The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(10): p. 1799-802.
310. Maderna, P. and C. Godson, *Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1639**(3): p. 141-51.
311. Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson, *Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 41-50.
312. Ankersmit, H.J., et al., *Irradiated cultured apoptotic peripheral blood mononuclear cells regenerate infarcted myocardium*. Eur J Clin Invest, 2009. **39**(6): p. 445-56.
313. Lichtenauer, M., et al., *Secretome of apoptotic peripheral blood cells (APOSEC) confers cytoprotection to cardiomyocytes and inhibits tissue remodelling after acute myocardial infarction: a preclinical study*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(6): p. 1283-97.
314. Lichtenauer, M., et al., *Intravenous and intramyocardial injection of apoptotic white blood cell suspensions prevents ventricular remodelling by increasing elastin expression in cardiac scar tissue after myocardial infarction*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(4): p. 645-55.
315. Dubois, C., et al., *Differential effects of progenitor cell populations on left ventricular remodeling and myocardial neovascularization after myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(20): p. 2232-43.
316. Pipp, F., et al., *VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism*. Circ Res, 2003. **92**(4): p. 378-85.
317. Roncal, C., et al., *Beneficial effects of prolonged systemic administration of PlGF on late outcome of post-ischaemic myocardial performance*. J Pathol, 2008. **216**(2): p. 236-44.
318. Moubarik, C., et al., *Transplanted late outgrowth endothelial progenitor cells as cell therapy product for stroke*. Stem Cell Rev, 2011. **7**(1): p. 208-20.
319. He, T., T.E. Peterson, and Z.S. Katusic, *Paracrine mitogenic effect of human endothelial progenitor cells: role of interleukin-8*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(2): p. H968-72.
320. Rignault-Clerc, S., et al., *Functional late outgrowth endothelial progenitors isolated from peripheral blood of burned patients*. Burns, 2013. **39**(4): p. 694-704.
321. Smadja, D.M., et al., *Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(12): p. 2137-43.
322. Towler, D.A., *Bone morphogenetic proteins*. Blood, 2009. **114**(10): p. 2012-3.

LITERATURREFERENZEN

323. Langenfeld, E.M. and J. Langenfeld, *Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(3): p. 141-9.
324. Rothhammer, T., et al., *Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma*. Oncogene, 2007. **26**(28): p. 4158-70.
325. Matsuura, K., et al., *Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(12): p. 11384-91.
326. Lam, M.L., S.I. Hashem, and W.C. Claycomb, *Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes harbor a subpopulation of niche-forming Sca-1+ progenitor cells*. Mol Cell Biochem, 2011. **349**(1-2): p. 69-76.
327. Uchida, S., et al., *Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart*. Stem Cell Reports, 2013. **1**(5): p. 397-410.
328. Takamiya, M., K.H. Haider, and M. Ashraf, *Identification and characterization of a novel multipotent sub-population of Sca-1(+) cardiac progenitor cells for myocardial regeneration*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25265.
329. Dey, D., et al., *Dissecting the molecular relationship among various cardiogenic progenitor cells*. Circ Res, 2013. **112**(9): p. 1253-62.
330. Wang, X., et al., *The role of the sca-1+/CD31- cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling*. Stem Cells, 2006. **24**(7): p. 1779-88.
331. Tateishi, K., et al., *Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 10): p. 1791-800.
332. Kafadar, K.A., et al., *Sca-1 expression is required for efficient remodeling of the extracellular matrix during skeletal muscle regeneration*. Dev Biol, 2009. **326**(1): p. 47-59.
333. Tang, X.L., et al., *Cardiac progenitor cells and bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells for cardiac repair after myocardial infarction*. Circ J, 2010. **74**(3): p. 390-404.
334. Wojakowski, W., et al., *Very small embryonic-like stem cells in cardiovascular repair*. Pharmacol Ther, 2011. **129**(1): p. 21-8.
335. Kucia, M., et al., *Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction*. Circ Res, 2004. **95**(12): p. 1191-9.
336. Massa, M., et al., *Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction*. Blood, 2005. **105**(1): p. 199-206.
337. Wojakowski, W., et al., *Mobilization of bone marrow-derived Oct-4+ SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(1): p. 1-9.
338. Shin, D.M., et al., *Novel epigenetic mechanisms that control pluripotency and quiescence of adult bone marrow-derived Oct4(+) very small embryonic-like stem cells*. Leukemia, 2009. **23**(11): p. 2042-51.
339. Dawn, B., et al., *Transplantation of bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells attenuates left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction*. Stem Cells, 2008. **26**(6): p. 1646-55.
340. Zuba-Surma, E.K. and M.Z. Ratajczak, *Overview of very small embryonic-like stem cells (VSELs) and methodology of their identification and isolation by flow cytometric methods*. Curr Protoc Cytom, 2010. **Chapter 9**: p. Unit9 29.
341. Ye, J., et al., *Sca-1+ cardiosphere-derived cells are enriched for Isl1-expressing cardiac precursors and improve cardiac function after myocardial injury*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30329.
342. Jujo, K., M. Ii, and D.W. Losordo, *Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(4): p. 530-44.
343. Cubbon, R.M., M.B. Kahn, and S.B. Wheatcroft, *Effects of insulin resistance on endothelial progenitor cells and vascular repair*. Clin Sci (Lond), 2009. **117**(5): p. 173-90.
344. Li, H., et al., *Advanced glycation end products impair the migration, adhesion and secretion potentials of late endothelial progenitor cells*. Cardiovasc Diabetol, 2012. **11**: p. 46.

LITERATURREFERENZEN

345. Tan, Q., et al., *Transplantation of healthy but not diabetic outgrowth endothelial cells could rescue ischemic myocardium in diabetic rabbits*. Scand J Clin Lab Invest, 2010. **70**(5): p. 313-21.
346. Yue, W.S., et al., *Impact of glycemic control on circulating endothelial progenitor cells and arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus*. Cardiovasc Diabetol, 2011. **10**: p. 113.
347. Lev, E.I., et al., *Effect of intensive glycaemic control on endothelial progenitor cells in patients with long-standing uncontrolled type 2 diabetes*. Eur J Prev Cardiol, 2013.
348. Churdchomjan, W., et al., *Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control*. BMC Endocr Disord, 2010. **10**: p. 5.
349. Liu, Y., et al., *Beneficial effects of statins on endothelial progenitor cells*. Am J Med Sci, 2012. **344**(3): p. 220-6.
350. Spigoni, V., et al., *Pioglitazone improves in vitro viability and function of endothelial progenitor cells from individuals with impaired glucose tolerance*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48283.
351. Tanaka, R., et al., *Quality-control culture system restores diabetic endothelial progenitor cell vasculogenesis and accelerates wound closure*. Diabetes, 2013. **62**(9): p. 3207-17.
352. Vandervelde, S., et al., *Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(2): p. 363-76.
353. Krenning, G., et al., *Combined implantation of CD34(+) and CD14(+) cells increases neovascularization through amplified paracrine signalling*. J Tissue Eng Regen Med, 2013. **7**(2): p. 118-28.
354. Deutsch, M.A., A. Sturzu, and S.M. Wu, *At a crossroad: cell therapy for cardiac repair*. Circ Res, 2013. **112**(6): p. 884-90.

VII. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiengangs „Molekulare Medizin-Förderung von Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU München“ in der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. S. Massberg) in der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz, Oberarzt der Klinik, und in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. med. Ilka Ott, Oberärztin an der Klinik für Herz- und Gefäßerkrankungen am Deutschen Herzzentrum München (Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert), angefertigt. Mein Dank gilt allen, die mich im Laufe der Jahre bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz danke ich ganz herzlich für die Aufnahme in sein Team, die Überlassung des spannenden Themas und für das in den vergangenen Jahren in mich gesetzte Vertrauen. Für seine bis zuletzt fortwährende Unterstützung danke ich ihm sehr. Es war ein ausgesprochenes Privileg in seiner Arbeitsgruppe arbeiten zu dürfen. Durch die Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe durfte ich wesentliche Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens erlernen, wovon ich bis heute profitiere. Das Forschungsthema der myokardialen Regeneration hat mich bis heute nicht losgelassen. Herrn Dr. med. Bruno Huber danke ich sehr für die freundschaftliche, fachlich exzellente Zusammenarbeit und die stets hervorragende Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Sein persönliches Engagement, der jederzeit währende Rückhalt und seine fachlichen Ratschläge haben wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen. Den technischen Assistentinnen unserer Arbeitsgruppe, Frau Barbara Markieton, Frau Judith Arcifa sowie bei Frau Christiane Groß, gilt für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung und Vorbereitung der labortechnischen Untersuchungen ein besonderer Dank. Bei den zahlreichen anderen, hier namentlich nicht explizit genannten Kollegen, möchte ich für die konstruktiven Diskussionen während der langen Stunden im Labor danken. Herrn Prof. Dr. med. J. Müller-Höcker, Frau Sendlhofert sowie Herrn Dr. med. Gerald Assmann danke ich sehr für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der histologischen Arbeiten. Frau Prof. Dr. med. Ilka Ott und den Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Christina Bauer, danke ich für die mir im Rahmen der Kooperation zuteil gewordene Unterstützung. Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Heesemann danke ich für die Organisation des Promotionsstudienganges „Molekulare und Systembiologische Medizin“ des Förderprogrammes für Forschung und Lehre an der LMU.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Lange sehr für die Unterstützung und weitere Förderung meiner wissenschaftlichen und klinischen Laufbahn danken.

Ein ganz außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern, Hans-Henning und Christa, meiner Frau Sabine sowie meinen engsten Freunden. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung und den

DANKSAGUNG

fortwährenden Rückhalt meiner Familie und meinen Freunde wäre die Fertigstellung dieser Arbeit undenkbar gewesen. Ihnen danke ich aus tiefstem Herzen.

VIII. LEBENS LAUF

VIII.1. Veröffentlichungen

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	A. Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes und der ischämischen Kardiomyopathie. B. Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz.....	14
Abbildung 2	Übersicht über die verschiedenen Strategien der zellbasierten kardialen Regeneration und die mutmaßlichen Effekte der unterschiedlichen Stamm- und Progenitorzellpopulationen auf das (post-)ischämische Myokard.	19
Abbildung 3	Putative Differenzierungshierarchie kardial-residenter Stammzellpopulationen	28
Abbildung 4	Putatives Model der Ontogenese endothelialer Progenitorzellen.....	31
Abbildung 5	Für humane und murine endothelialer Progenitorzellen beschriebene Oberflächenmarker.	33
Abbildung 6	Übersicht der verschiedenen, über das unterschiedliche Verhalten in Kultur definierten EPC-Populationen.....	37
Abbildung 7	Zahlenmäßige Verteilung proangiogenetischer Zellpopulationen im peripheren Blut.....	39
Abbildung 8	Zweiarmliger Versuchsaufbau mit den Endpunkten Hämodynamik und Histologie an Tag 30 bzw. Durchflusszytometrie an Tag 2 nach Infarktinduktion.....	46
Abbildung 9	Schematische Darstellung des Prinzips der Ficoll-Dichte-zentrifugation und der resultierenden Sedimentationsphasen.....	52
Abbildung 10	Anatomie des murinen Koronarsystems.	55
Abbildung 11	Zeitlicher Verlauf des Postinfarktremodellings in der Maus.....	55
Abbildung 12	Die beiden Abbildungen zeigen den vorbereiteten Arbeitsplatz sowie das verwendete OP-Instrumentarium	56
Abbildung 13	Schnittführung und Präparation der prätrachealen Weichteile zur Sichtkontrolle bei der endotrachealen Intubation.....	57
Abbildung 14	Anbringen der kostalen Haltenähte, Eröffnen des Perikards, Identifikation und Ligation der LAD mit deutlich erkennbarer myokardialer Abblassung im Bereich der Vorderwand.	59
Abbildung 15	Hamilton-Spritze (32G) zur intramyokardialen Transplantation.....	60
Abbildung 16	Druck-Volumen-Diagramm des Herzens.	61
Abbildung 17	Anatomische Lage des Mikromanometrie-Conductance Katheters im Cavum des linken Ventrikels.....	63
Abbildung 18	Schematischer Aufbau der Katheterspitze.....	63
Abbildung 19	Änderung von V(t) nach Injektion von 10 µl NaCl (4,5%).....	64
Abbildung 20	Regressionsgerade zur Berechnung der parallelen Conductance.....	64
Abbildung 21	Operationssitus der Carotispräparation und retrograde Insertion des Mikromanometrikatheters.....	67
Abbildung 22	Bestimmung der mittleren Vorderwanddicke im Infarktgebiet.	70

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 23	Prinzip der Durchflusszytometrie.	73
Abbildung 24	Vergleichende Gegenüberstellung der Morphologie unterschiedlicher endothelialer Stammzellpopulationen in vitro.	77
Abbildung 25	Exemplarische Druck-Volumenschleife einer hämodynamischen Funktionsmessung eines Versuchstieres aus der Kontroll- sowie der Behandlungsgruppe.....	78
Abbildung 26	Vergleich der histologisch quantifizierten Infarktgrößen in der Kontroll- und den Behandlungsgruppen 30 Tage nach Infarktinduktion.....	79
Abbildung 27	Vergleich der histologisch quantifizierten Vorderwanddicke in der Kontroll- und den Behandlungsgruppen 30 Tage nach Infarktinduktion.....	80
Abbildung 28	Vergleich der histologisch quantifizierten Septumdicke in der Kontroll- und den Behandlungsgruppen 30 Tage nach Infarktinduktion.....	81
Abbildung 29	Exemplarischer histologischer Kurzachsenschnittes auf Höhe der Papillarmuskeln.....	81
Abbildung 30	Mittlere Anzahl der CD31-positiver Kapillaren pro mikroskopischem Gesichtsfeld.	82
Abbildung 31	Mittlere Fläche der CD31-positiver Kapillaren pro mikroskopischem Gesichtsfeld in mm ²	83
Abbildung 32	Exemplarische Immunhistologie für die anti-CD31 Färbung. Die weißen Pfeile markieren CD31+ Kapillaren.....	83
Abbildung 33	Durchflusszytometrisch bestimmte relative Anzahl der CD45+/CD34+ mononukleären Zellen sowie deren Subpopulationen im Myokard 2 Tage nach Infarktinduktion mit und ohne Zellbehandlung.	85
Abbildung 34	Exemplarischer durchflusszytometrischer Analyseplot für die Gesamtpopulation der CD34+/CD45+ Zellen.	86
Abbildung 35	Durchflusszytometrisch bestimmte relative Zahl der kardial-residenten CD45-/CD34- /Sca1+ Zellen im Myokard 2 Tage nach Infarktinduktion bei Tieren mit und ohne Zellbehandlung.	87
Abbildung 36	Exemplarischer durchflusszytometrischer Analyseplot bei der Bestimmung der Anzahl kardial-residenter CD34-/CD45-/Sca1+ Zellen.....	87
Abbildung 37	Zahl der kardial-residenten CD45-/CD34- /c-kit+ Zellen im Myokard 2 Tage nach Infarktinduktion mit und ohne Zellbehandlung.....	88
Abbildung 38	Vergleich der histologisch quantifizierten Infarktgrößen in der Kontroll- und den Behandlungsgruppen 30 Tage nach Infarktinduktion; differenziert wurde zwischen Tieren, welche Zellen von diabetischen bzw. nicht-diabetischen Spenderpatienten erhielten.....	90
Abbildung 39	Vergleich der histologisch quantifizierten Vorderwanddicke in der Kontroll- und den Behandlungsgruppe(n) 30 Tage nach Infarktinduktion.....	91

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 40	Vergleich der histologisch quantifizierten Septumdicke in der Kontroll- und den Behandlungsgruppe(n) 30 Tage nach Infarktinduktion.....	91
Abbildung 41	Mittlere Anzahl der CD31-positiver Kapillaren pro mikroskopischem Gesichtsfeld.....	92
Abbildung 42	Mittlere Fläche der CD31-positiver Kapillaren pro mikroskopischem Gesichtsfeld in mm ²	93
Abbildung 43	Synopsis der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen sowie der in der Literatur beschriebenen positiven Effekte und Mechanismen einer Transplantation von EPCs auf posischämisches Myokard.	109

X. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACC	Arteria carotis comunis
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CAC(s)	<i>circulating angiogenic cell(s)</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CxCr4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, auch SDF-1-Rezeptor
ECFC(s)	endothelial-colony forming cell(s)
EDP	Enddiastolischer Druck
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
EPC(s)	endotheliale Progenitorzelle(n)
ESP	Endsystolischer Druck
ESV	Endsystolisches Volumen
ESC(s)	embryonale Stammzelle(n)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Flk-1	<i>fetal liver kinase 1</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HZV	Herzzeitvolumen; engl. <i>cardiac output (CO)</i>
iPSC(s)	induzierte pluripotente Stammzelle(n)
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzerkrankung
LAD	left anterior descending = Ramus interventricularis anterior
LFA-1	<i>leukocyte function-associated antigen-1</i>
LVP	linksventrikulärer Druck
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MAPC(s)	multipotente adulte Progenitorzelle(n)
MI	Myokardinfarkt
MSC(s)	mesenchymale Stammzelle(n)
NaCl	Natriumchlorid
n.s.	nicht signifikant
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PerCP	Peridinin Chlorophyll-A-Protein
PE	Phycoerythin
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SV	Schlagvolumen
VLA-4	<i>very late antigen-4</i> = alpha4beta1 integrin
VSEL(s)	<i>very small embryonic-like stem cell(s)</i>