

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Intrakoronare Applikation von autologen adulten Stammzellen aus dem
Knochenmark: Erste Erfahrungen mit einem Infarktmodell beim Schwein**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Vitalij Zyba

aus

Charkow/Ukraine

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- | | |
|--------------------------------|---|
| I. Berichtstatter: | Prof. Dr. med. G. Hasenfuß |
| II. Berichtstatter/in: | Prof. Dr. med. Zimmermann |
| III. Berichtstatter/in: | Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Crozier |

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2012

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 5 |
| Abbildungs- und Tabellenverzeichnis..... | 7 |
| 1. Einleitung | 8 |
| 1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen | 8 |
| 1.2 Stammzellen | 10 |
| 1.2.1 Embryonale Stammzellen | 10 |
| 1.2.2 Adulte Stammzellen..... | 11 |
| 1.3 Die Rolle adulter Stammzellen bei der Herzregeneration | 14 |
| 1.3.1 Herzstammzellen..... | 14 |
| 1.3.2 Skelettmyoblasten | 16 |
| 1.3.3 Knochenmarkstammzellen..... | 18 |
| 1.3.4 Andere adulte Stammzellen | 22 |
| 1.4 Ziel der Dissertation | 24 |
| 2. Material und Methoden | 25 |
| 2.1 Tiere und Tierhaltung | 25 |
| 2.2 Materialien..... | 25 |
| 2.2.1 Materialien für die Durchführung operativer Eingriffe | 25 |
| 2.2.2 Medikamente für die Durchführung operativer Eingriffe..... | 26 |
| 2.2.3 Medien und Substanzen für die Zellkultur..... | 26 |
| 2.3 Methoden | 27 |
| 2.3.1 Knochenmarkpunktion..... | 27 |
| 2.3.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark ... | 28 |
| 2.3.3 Kultivierung von MNCs und MSCs | 29 |
| 2.3.4 Zellmarkierung..... | 30 |
| 2.3.5 Induktion der Myokardischämie und Zelltransplantation..... | 31 |
| 2.3.5.1 Versuchsprotokoll | 31 |
| 2.3.5.2 Induktion einer akuten Myokardischämie..... | 32 |
| 2.3.5.3 Intrakoronare Zellinjektion..... | 34 |
| 2.3.6 Organentnahme, Einbettung der Gewebeproben und Hämatoxylin- Eosin-Färbung..... | 34 |
| 2.3.7 β -Galaktosidase-Immunfärbung | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.8 Fluoreszenzanalyse | 36 |
| 2.3.9 Statistische Auswertungen | 36 |
| 3. Ergebnisse | 38 |
| 3.1 Etablierung eines Ischämie-Reperfusionmodells des Minischweins | 38 |
| 3.2 Optimierung der Zellmarkierung und Kathetertechnik für die Zelltransplantation | 43 |
| 3.3 Zeitpunkt der Zelltransplantation und Überlebensfähigkeit der Zellen | 49 |
| 3.4 Zelltyp für die Zelltransplantation | 51 |
| 3.5 Verteilung der transplantierten Zellen im Herzgewebe..... | 53 |
| 4. Diskussion..... | 58 |
| 4.1 Das Schwein als Infarktmodell..... | 58 |
| 4.2 Die Identifikation der Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> | 63 |
| 4.3 Zeitpunkt der Zelltransplantation | 66 |
| 4.4 Zellapplikationsmethoden | 68 |
| 4.5 Zelltyp für die Zelltransplantation und die Verteilung der applizierten Zellen im Herzgewebe | 70 |
| 5. Zusammenfassung | 77 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 79 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| ABCG2 | ABC-Transporter G2 (<i>ATP-Binding Cassette G2</i>) |
| ACE | <i>Angiotensin Converting Enzyme</i> |
| ASTAMI | <i>Autologous Stem Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction</i> |
| bFGF | <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> |
| β-ME | β-Mercaptoethanol |
| BOOST | <i>BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration</i> |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> |
| CDCs | von Kardiosphären abgeleitete Zellen (<i>Cardiospheres Derived Cells</i>) |
| CM-DiI | Chloromethylbenzamid-1,1'-Dioctadecyl-1-3,3,3',3'- Tetramethylindocarbocyaninperchlorat |
| CMV-β-Gal | <i>cytomegalovirus-β-galactosidase</i> |
| CY3 | <i>carbocyanin 3</i> |
| D 1 / 2 | <i>Ramus diagonalis 1 / 2</i> |
| DAPI | 4',6 -Diamidin-2-Phenylindol |
| DMEM | Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylendiamintetraacetat</i>) |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| eNOS | <i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i> |
| EPCs | endotheliale Vorläuferzellen (<i>Endothelial Progenitor Cells</i>) |
| ESCs | embryonale Stammzellen (<i>Embryonic Stem Cells</i>) |
| FITC | <i>fluoresceinisothiocyanat</i> |
| FKS | fötales Kälberserum |
| HE-Färbung | Hämatoxylin-Eosin-Färbung |
| HSCs | hämatopoetische Stammzellen (<i>hematopoetic Stem Cells</i>) |
| KG | Körpergewicht |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| KM | Knochenmark |
| LacZ | Z-Untereinheit der β-Galaktosidase |
| maGSCs | multipotente adulte Keimbahnstammzellen (<i>multipotent adult Germ-line Stem Cells</i>) |

| | |
|----------------------|--|
| MAPCs | multipotente adulte Vorläuferzellen <i>(Multipotent Adult Progenitor Cells)</i> |
| MI | Myokardinfarkt |
| MNCs | mononukleäre Zellen <i>(Mononuclear Cells)</i> |
| MSCs | mesenchymale Stammzellen <i>(Mesenchymal Stem Cells)</i> |
| MOI | <i>Multiplicity Of Infection</i> |
| NEAA | Nicht-essenzielle Aminosäuren |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| Pen / Strep | Penicillin / Streptomycin |
| QBI-Adeno-GFP | <i>Quantum Biotechnology-Adeno-Green Fluoreszenz Protein</i> |
| RCX | <i>Ramus circumflexus</i> |
| REPAIR-AMI | <i>Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction</i> |
| RIVA | <i>Ramus interventricularis anterior</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| Sca-1 | Stammzellantigen 1 <i>(Stem cell antigen 1)</i> |
| SCs | Stammzellen <i>(Stem Cells)</i> |
| SDF-1 | <i>Stromal cell Derived Factor-1</i> |
| Spoc | <i>Skeletal-based precursors of cardiomyocytes</i> |
| SP-Zellen | <i>Side-Population-Zellen</i> |
| SSCs | spermatogoniale Stammzellen <i>(Spermatogonial Stem Cells)</i> |
| TBS | <i>Tris Buffered Saline</i> |
| TOPCARE-AMI | <i>Transplantation Of Progenitor Cells And Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction</i> |
| VEGFR | <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> |
| vWF | von-Willebrand-Faktor <i>(von Willebrand Factor)</i> |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation <i>(World Health Organization)</i> |
| X-Gal | <i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactosidase</i> |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Plastizität adulter Stammzellen..... | 12 |
| Abbildung 2: Differenzierung adulter Stammzellen..... | 13 |
| Abbildung 3: Knochenmarkpunktion bei Göttinger Minischwein | 28 |
| Abbildung 4: Dichtegradientenzentrifugation für die Isolierung von MNCs..... | 29 |
| Abbildung 5: Induktion eines akuten Myokardinfarktes und intrakoronare autologe Zelltransplantation mithilfe einer selektiven Herzkathetertechnik..... | 33 |
| Abbildung 6: Induktion eines akuten Myokardinfarktes | 39 |
| Abbildung 7: EKG vor der Operation im Vergleich zum EKG nach dem Herzinfarkt..... | 40 |
| Abbildung 8: Schweineherz zwei Wochen nach einem akuten Myokardinfarkt..... | 41 |
| Abbildung 9: HE-Färbung der Herzgewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem akuten ischämischen Ereignis | 43 |
| Abbildung 10: Morphologie von MSCs <i>in vitro</i> | 44 |
| Abbildung 11: β -Galaktosidasefärbung im infarzierten Herzgewebe nach Transplantation von mit dem adenoviralen Vektor CMV- β -Gal transduzierten MSCs..... | 45 |
| Abbildung 12: Die QBI-Adeno-GFP-transduzierten MSCs im Vergleich zur Autofluoreszenz des ischämischen Myokards | 47 |
| Abbildung 13: Zellmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen CM-DiI und DAPI <i>in vitro</i> | 48 |
| Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Herzgewebeproben nach der Applikation der mit CM-DiI- und DAPI-Farbstoff markierten Zellen..... | 48 |
| Abbildung 15: Fluoreszenzanalyse der Herzgewebeproben aus MI-Region nach einer frühen und einer späten intrakoronaren Transplantation von autologen MNCs | 51 |
| Abbildung 16: Fluoreszenzanalyse der Herzgewebeproben aus der Infarktregion in Abhängigkeit vom eingesetzten Zelltyp (MNCs, MSCs)..... | 53 |
| Abbildung 17: Detektion der CM-DiI- und DAPI-positiven Zellen nach einer intrakoronaren Zelltransplantation ins Schweineherz im Gewebe und in den Gefäßen | 54 |
| Abbildung 18: Verteilung der transplantierten MNCs im Infarktgewebe (Protokoll I) | 55 |
| Abbildung 19: Verteilung der transplantierten MSCs im Infarktgewebe (Protokoll III) | 56 |
| Abbildung 20: Verteilung der transplantierten MNCs im Infarktgewebe (Protokoll II) | 57 |
| Tabelle 1: Protokoll für die Durchführung der Zelltransplantation. | 32 |
| Tabelle 2: Verteilung der transplantierten Zellen der Infarktregion | 54 |

1. Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen spielen zurzeit sowohl im medizinischen als auch im wirtschaftlichen Bereich eine sehr große Rolle. Allein in den USA sind bereits über 5 Millionen Menschen erkrankt, bei 400.000 Neufällen pro Jahr. Circa 1,1 Millionen US-Amerikaner erleiden jedes Jahr einen Herzinfarkt. Für die meisten Betroffenen endet die Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems tödlich (Kessler und Byrne, 1999). Eine immer weiter wachsende Lebenserwartung, Bewegungsmangel sowie eine fettreiche Ernährung vor allem bei jungen Leuten versprechen einen weiteren Anstieg der Fälle mit der Diagnose einer kardiovaskulären Erkrankung. Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit (KHK), Herzinsuffizienz und Herzinfarkt sind nur wenige Beispiele aus diesem Gebiet. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) rechnet damit, dass Herz-Kreislauf-Erkrankungen bis zum Jahr 2015 weltweit die meisten Todesfälle verursachen und die bisher konkurrenzlos führenden Infektionskrankheiten von Platz eins verdrängen werden. Nach Schätzungen der WHO kosten kardiovaskuläre Erkrankungen bereits jetzt zwölf Millionen Menschen jedes Jahr das Leben (Weltgesundheitsorganisation, 2001). Risikofaktoren, die die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen begünstigen, sind ungünstige Blutfettwerte, Bluthochdruck, Rauchen, Diabetes, Bewegungsmangel, Übergewicht und Stress (Life Sciences Portal Baden-Württemberg, 2008).

Als KHK werden alle Herzerkrankungen bezeichnet, die durch eine Einengung oder den Verschluss von Herzkranzgefäßen entstehen. Diese Stenosen vermindern die Durchblutung des Myokards und reduzieren seine Energie- und Sauerstoffversorgung. Die KHK kann sich als Angina pectoris, als Herzinfarkt oder als Linksherzinsuffizienz äußern. Sie kann lange Zeit ohne Symptome verlaufen, obwohl eine Durchblutungsstörung schon ausgebildet ist.

Die Arteriosklerose oder Arterienverkalkung spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen. Die schwerwiegendsten und häufigsten Komplikationen der Arteriosklerose sind Herzinfarkt, Schlaganfall, arterielle Verschlusskrankheit sowie die Bildung von Aneurysmen, die zu lebensgefährlichen Blutungen führen können. Inzwischen glaubt man, dass die Arteriosklerose sich in mehreren Schritten entwickelt und von Beginn an von Entzündungsprozessen begleitet ist. Zuerst reichern sich überschüssige Fettpartikel aus dem Blut in der Innenwand der Arterie an. Dort werden sie oxidiert, was dazu führt, dass das Immunsystem alarmiert wird. Monozyten und T-Lymphozyten dringen in die

Gefäßwand ein; letztere begünstigen Entzündungen. In der Gefäßwand reifen die Monozyten zu Makrophagen heran, die die Fettpartikel aufnehmen. Die Makrophagen reichern in ihrem Inneren mehr und mehr Fetttröpfchen an, bis sie sich in Schaumzellen verwandelt haben. Diese Ansammlung aus Schaumzellen, Entzündungszellen, Fett und zerstörtem Gewebe wird dann von Bindegewebe überdeckt und abgeschlossen. Man bezeichnet diese Ausstülpung als Plaque, an der das Blut aber oftmals noch Jahre ungehindert vorbeifließen kann. Gefährlich wird es, wenn die Plaque instabil, also beschädigt wird. Dann nämlich kommt die Gerinnungskaskade in Gang, und es bildet sich ein Thrombus. Wird er zu groß oder nicht rechtzeitig wieder aufgelöst, auf natürlichem Weg oder mit Medikamenten, so stoppt er den Blutstrom. Geschieht das in einem Herzkranzgefäß, kommt es zum Herzinfarkt.

Die große Herausforderung der kommenden Jahrzehnte ist nach Meinung der Experten die Herzinsuffizienz. In den Industrienationen ist sie die einzige Herzerkrankung mit steigender Häufigkeit. Der Herzmuskel ist bei einer Herzinsuffizienz so geschwächt, dass seine Kraft nicht mehr ausreicht, um die Blutmenge zu befördern, die für die Versorgung des Körpers notwendig ist. In der Mehrzahl der Fälle ist ein Herzinfarkt die Ursache für eine Herzschwäche, aber auch eine über längere Zeit bestehende arterielle Hypertonie, die dem Herzen ständig eine zu hohe Pumpleistung abverlangt, sowie Herzklappenschäden oder eine Virusinfektion können die Erkrankung auslösen. Wird eine Herzinsuffizienz nicht rechtzeitig erkannt, ist die Prognose für die Patienten schlecht. Innerhalb von vier Jahren stirbt die Hälfte der betroffenen Kranken. Im fortgeschrittenen Stadium überleben weniger als 50% länger als ein Jahr.

Die medikamentöse Therapie mit *Angiotensin-Converting-Enzyme*-Hemmern (ACE-Hemmern), Betablockern, Diuretika sowie Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten hat die Situation der Patienten in den vergangenen 20 Jahren deutlich verbessert. Leider wird dieser Therapieansatz nur als eine Vorbeugung bzw. Verlangsamung des Fortschreitens der o.g. Erkrankungen eingesetzt. Die zugrunde gegangenen Kardiomyozyten, die glatten Muskelzellen und Endothelzellen können zum jetzigen Zeitpunkt keine Medikamente heilen. Eine Herztransplantation ist für viele Patienten die letzte Möglichkeit zum Weiterleben. Viele von ihnen sterben leider infolge der Knappheit der Spenderorgane. Aufgrund der Organknappheit steht eine Herztransplantation nur Patienten unter 65 Jahren zur Verfügung. Schließlich wurde nach alternativen Methoden der Behandlung von Herzkreislaufkrankungen gesucht. Im Vergleich zur Gentherapie erwies sich die Anwendung von Stammzellen zur Wiederherstellung des Herzgewebes und der Herzkranzgefäße als erfolgversprechend.

1.2 Stammzellen

Der menschliche Körper besteht aus ca. 200 unterschiedlichen Zelltypen. Ihr Ursprung liegt in der Zygote. Die undifferenzierten Vorläuferzellen (Progenitorzellen) gewinnen mit jeder Teilung an Spezialisierung. Am Ende entstehen die hochdifferenzierten und spezialisierten Zellen des erwachsenen Körpers. Die Zellen, die sich während der Entwicklung autoreproduzieren können bzw. die Entscheidung treffen, sich an einem bestimmten Zeitpunkt auszdifferenzieren, nennt man Stammzellen (*stem cells*, SCs). Allgemein unterscheidet man zwischen 1. totipotenten Zellen (wie der Zygote), aus denen alle Gewebe einschließlich der Plazenta entstehen und die sich zu einem selbständigen Organismus entwickeln können, und 2. pluripotenten Zellen, aus denen nur die Zellen der drei embryonalen Keimblätter Ekto-, Meso- und Entoderm entstehen können, jedoch kein Trophoblast, 3. multipotenten Zellen, wie den hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs) des Knochenmarks, aus denen sich verschiedene Blutzelltypen differenzieren können, und 4. unipotenten Zellen, die sich lediglich in eine Zelllinie entwickeln können. Je nach Herkunft unterscheidet man embryonale (*embryonic stem cells*, ESCs) und adulte Stammzellen.

1.2.1 Embryonale Stammzellen

ESCs sind pluripotente Zellen, die die Fähigkeit besitzen, jede Zellart und jedes Gewebe mit Ausnahme der Plazenta zu bilden. Zum ersten Mal wurden ESCs aus der Maus im Jahr 1981 isoliert und *in vitro* kultiviert (Evans und Kaufman, 1981; Manin, 1981). Schließlich wurden 1998 erste Versuche an menschlichen ESCs durchgeführt (Thomson et al., 1998). Die Isolierung menschlicher embryonaler Stammzellen ist ethisch sehr umstritten und in Deutschland durch das Embryonenschutzgesetz vom 13. Dezember 1990 verboten. In Ausnahmefällen erlaubt das Stammzellgesetz von April 2002 den Import von menschlichen ESCs, die vor dem Stichtag 1. Januar 2002 gewonnen wurden. Erst vor Kurzem wurde das Gesetz gelockert, wodurch Forscher jetzt menschliche ESCs importieren dürfen, die vor dem 1. Mai 2007 gewonnen wurden. Durch ihre hohe Telomeraseaktivität können sich die ESCs unbegrenzt teilen. Die Differenzierung kann durch den Zusatz von mehreren Wachstumsfaktoren in die angestrebte Richtung gelenkt werden (Schuldiner et al., 2001). Neben den zahlreichen Vorteilen der ESCs sollten auch die Gefahren bei der Nutzung undifferenzierter Zellen beachtet werden. Einerseits können die transplantierten, von den ESCs abgeleiteten Zellen jedes Gewebe im Körper ersetzen, andererseits können sich

Teratome oder sogar Teratokarzinome wegen eines unkontrollierten Wachstums dieser Zellen bilden (Andrews, 1998; Kleinsmith und Pierce, 1964).

1.2.2 Adulte Stammzellen

Als adulte Stammzellen werden ausschließlich Zellen aus adulten Organen mit der Fähigkeit zur unbeschränkten Selbsterneuerung und zur Differenzierung bezeichnet. Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen können die adulten Stammzellen unbegrenzt gewonnen und in der Forschung eingesetzt werden. Diese Vorteile nutzen die Mediziner aus, um autologe Stammzelltransplantationen, bei denen man keine immunsuppressive Therapie benötigt, durchzuführen. Der Nachteil der adulten Stammzellen besteht in ihrem beschränkten Proliferations- und Differenzierungspotenzial im Vergleich zu den ESCs, das auf eine verminderte Telomeraseaktivität zurückgeführt werden kann. Die seit langer Zeit herrschende Meinung, wonach sich die gewebespezifischen Stammzellen ausschließlich in die Zellen des Herkunftsgewebes differenzieren können, wurde zuletzt infrage gestellt, da zahlreiche Studien beweisen konnten, dass sich die adulten Stammzellen auch zu anderen Zelllinien entwickeln können. Diese Eigenschaft wurde als Plastizität bzw. Transdifferenzierung bezeichnet. In den letzten Jahren wurden adulten Stammzellen weitere Fähigkeiten zugeschrieben, nämlich die Differenzierung der Knochenmarkstammzellen zu Osteoblasten, Chondroblasten (Pittenger et al. 1999), Myoblasten bzw. Kardiomyozyten (Makino et al., 1999; Wakitani et al., 1995), stromalen Fibroblasten (Caplan, 1991; Dexter und Testa, 1976; Majumdar et al., 1998), Tendoblasten (Caplan et al., 1993), Adipozyten (Dennis und Caplan, 1996), allen Blutzellen (Ferrari et al., 1998) sowie Astrozyten und Neuronen (Kopen et al., 1999; Woodbury et al., 2000; Beresford, 1989) (Abbildung 1).

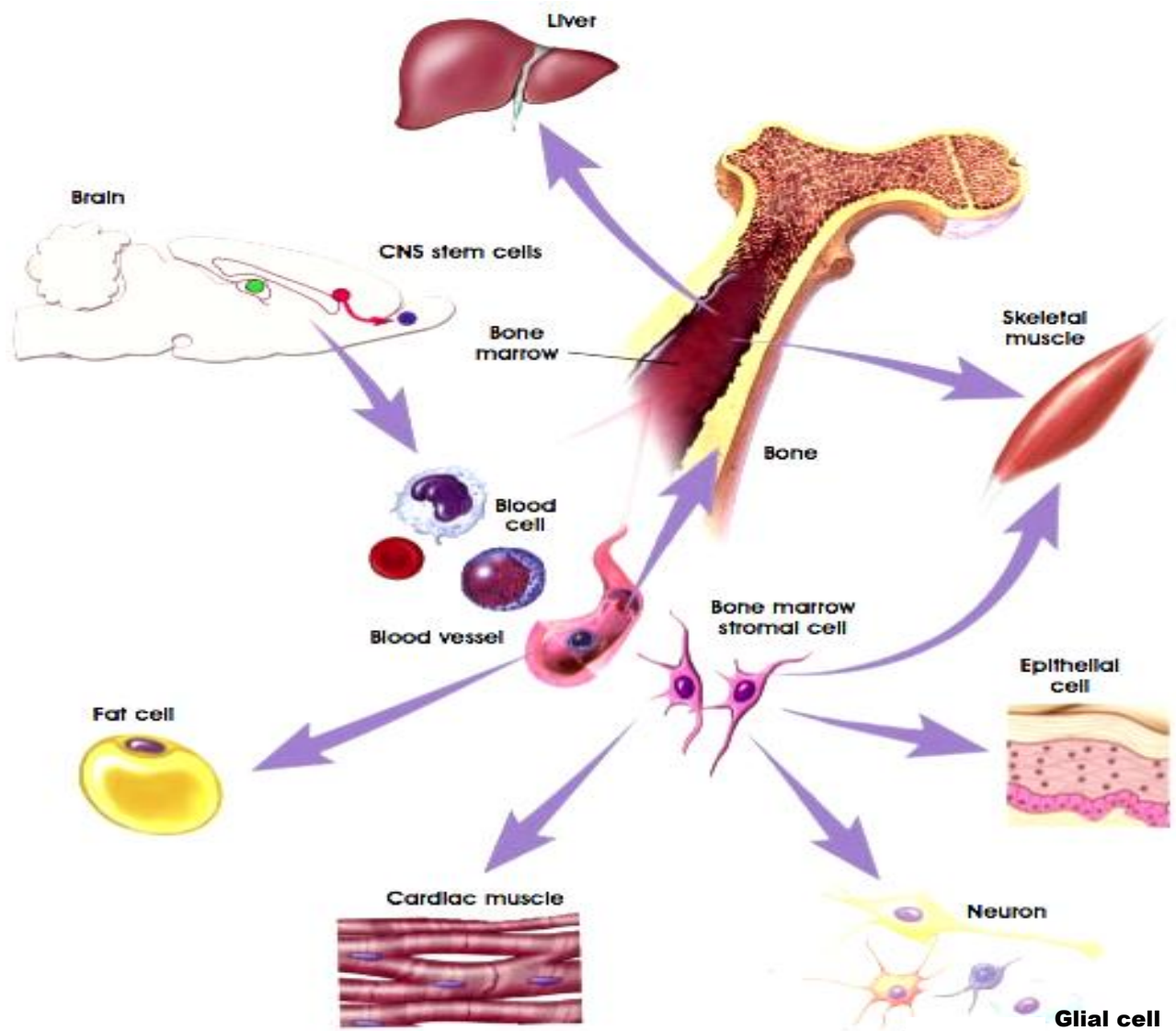


Abbildung 1: Plastizität adulter Stammzellen

Die Fähigkeit, sich unabhängig von der eigenen Herkunft zu ganz unterschiedlichen Gewebezelltypen entwickeln zu können, bezeichnet man als Plastizität. So können die Knochenmarkstammzellen sich zu Leber- bzw. Muskelzellen differenzieren. Die Stromazellen aus dem Knochenmark sind im stande Epithel-, Nerven- und Herzmuskelzellen zu bilden. Die Hirnstammzellen besitzen die Fähigkeit, sich zu Blutzellen zu entwickeln, die sich ihrerseits zu Osteozyten und Adipozyten differenzieren können (Winslow und Kibluk, 2005, S. 88).

Die wichtigste Eigenschaft der adulten Stammzellen für die therapeutische Anwendung ist ihr hoher Plastizitätsgrad, das heißt die Fähigkeit der Zellen aus einem Gewebe, sich zu den verschiedenen Zelltypen der anderen Gewebe zu entwickeln. Es gibt die Hypothese, dass die Stammzellen von ihrer unmittelbaren Umgebung (Nische) in ihrer Entwicklung beeinflusst werden können, sodass sie entweder in einer Arrestphase verbleiben oder sich zu Progenitorzellen und schließlich zu verschiedenen Geweben differenzieren (Watt und Hogan, 2000) (Abbildung 2).

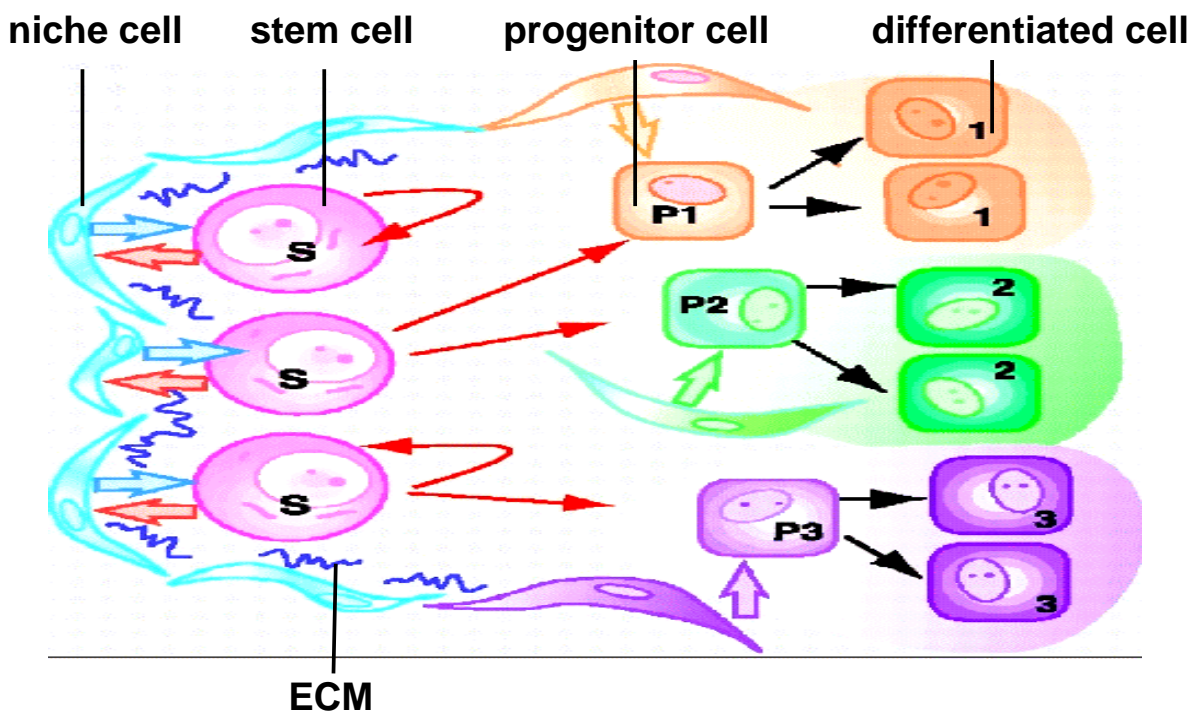


Abbildung 2: Differenzierung adulter Stammzellen

Der menschliche Körper ist ein komplexer Mechanismus aus unterschiedlichen Gewebearten. Jedes Gewebe ist von Stammzellen besiedelt, die dafür verantwortlich sind, dass so verschiedene Strukturen, wie Muskelzellen, Drüsen-, Knochen- und Bindegewebe sowie Nerven- und Epithelzellen, gebildet und regeneriert werden. Um dies zu gewährleisten, müssen die Tochterzellen der Stammzellen ganz unterschiedliche Differenzierungswege einschlagen können. Die Entscheidung der Zelle, sich entlang eines bestimmten Differenzierungsweges zu entwickeln, wird dabei im Wesentlichen durch Signalgebung aus der unmittelbaren Umgebung (Nische) bestimmt. Die Stammzellen (S) können sich durch Teilung zu den Vorläuferzellen unterschiedlichster Gewebearten, so genannten Progenitorzellen (P), entwickeln. Progenitorzellen besitzen eine geringere Proliferationskapazität und ein begrenztes Differenzierungspotenzial im Vergleich zu den Stammzellen. Sie stehen aber genauso unter dem Einfluss der unmittelbaren Umgebung, die ihre weiteren Differenzierungswege bestimmt. Die Potenz der Progenitorzellen geht mit jeder Teilung ein Stück weit verloren, sodass die ausdifferenzierten Zellen nur eine bestimmte Gewebeart bilden können. ECM = Extrazelluläre Matrix. (Watt und Hogan, 2000, S. 1427).

1.3 Die Rolle adulter Stammzellen bei der Herzregeneration

Adulte Stammzellen eignen sich für eine autologe Transplantation ins Herzgewebe nach einem akuten ischämischen Ereignis. Dabei können sowohl die Entstehung von Tumoren als Folge einer unkontrollierten Zellentartung als auch Autoimmunreaktionen des Körpers gegen das Transplantat weitgehend vermieden werden. Der Nachteil einer solchen Transplantation besteht im limitierten Differenzierungspotenzial der adulten Stammzellen. Im Folgenden werden verschiedene Zelltypen im Hinblick auf die Herzregeneration *in vivo* dargestellt.

1.3.1 Herzstammzellen

Früher herrschte die Meinung vor, dass das erwachsene Säugertierherz keine intrinsischen Kapazitäten für eine Selbsterneuerung oder Reparatur besitze. Allerdings hat in den letzten Jahren eine Reihe von Studien gezeigt, dass im Herzgewebe mehrere Zellpopulationen vorhanden sind, die die Fähigkeit, sich zu erneuern, besitzen und die sich zu Herzmuskelzellen, glatten Muskelzellen oder Endothelzellen differenzieren können (Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003; Messina et al., 2004; Martin et al., 2004; Linke et al., 2005; Laugwitz et al., 2005; Moretti et al., 2006).

Beltrami et al. isolierten 2003 einige Herzstammzellen aus erwachsenen Rattenherzen, indem sie einen Antikörper gegen den Oberflächenmarker c-Kit verwendeten. Die isolierten c-Kit-positiven Zellen waren negativ für die Marker der hämatopoetischen Zelllinien und für die spezifischen Proteine der Myozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten; sie exprimierten aber zum Teil die typischen Herztranskriptionsfaktoren Nkx2.5, GATA4 und MEF2. Die c-Kit-positiven Herzstammzellen waren klonierbar, multipotent und fähig zur Selbsterneuerung. Sie waren in der Lage, sich zu Myozyten, Endothelzellen oder glatten Muskelzellen *in vitro* zu differenzieren. Bei einer Transplantation in ein ischämisches Herz konnten diese Zellen bzw. die von ihnen abgeleiteten Zelllinien das infarzierte Herzgewebe wiederherstellen, die zugrunde gegangenen Blutgefäße neu zu bilden und sich ohne Zellfusion zu jungen Kardiomyozyten zu entwickeln. Infolgedessen war die ventrikuläre Herzfunktion erheblich verbessert (Beltrami et al., 2003).

Eine zweite Population der Progenitorzellen im Herzgewebe wurde mithilfe von Antikörpern gegen den Oberflächenmarker Sca-1 isoliert (Oh et al., 2003). Diese Zellen exprimieren das Oberflächenantigen CD31, aber nicht c-Kit, CD45, CD34, Flt-1 oder Flk-1. Sie unterscheiden sich von HSCs, endothelialen Progenitorzellen (*endothelial progenitor cells*, EPCs) und Muskel-Satelliten-Zellen. Darüber hinaus besitzen sie die Eigenschaft der „*side population*“-

Zellen (SP-Zellen), den Hoechst-Farbstoff 33342 zu extrudieren. Nach der Behandlung mit *Cytosin-Analog-5-Azacytidine* differenzieren sie sich zu Zellen, die imstande sind, kardiale Marker *in vitro* zu exprimieren. Bei einer intravenösen Zellapplikation in infarzierte Maus Herzen sind die SP-Zellen in der Lage, zu dem geschädigten Herzgewebe zu wandern und sich zu Kardiomyozyten sowohl mit als auch ohne Zellfusion zu entwickeln.

Die SP-Zellen im Knochenmark wurden zunächst durch ihre Fähigkeit, den Hoechst-Farbstoff 33342 zu extrudieren, entdeckt (Goodell et al., 1996). Diese Eigenschaft ist mit der Expression von *ATP-binding Cassette Transporter G2* (ABCG2) und MDR1 verbunden. Martin et al. isolierten ABCG2-exprimierende SP-Zellen sowohl aus embryonalen als auch aus adulten Maus Herzen (Martin et al., 2004). Diese SP-Zellen sind hoch positiv für das Stammzellantigen 1 (*stem cell antigen 1*, Sca-1), aber schwach positiv für c-Kit, CD34 und CD45. Die SP-Zellen unterscheiden sich von den Zellen, die Oh et al. beschrieben haben, da sie negativ für CD31 waren (Oh et al., 2003). Diese Zellen sind in der Lage, sich in einer Ko-Kultur mit den Herzmuskelzellen zu Kardiomyozyten zu differenzieren (Pfister et al., 2005). Die Transplantation von Sca-1-positiven und CD31-negativen Zellen in Maus Herzen führte nach einem akuten ischämischen Ereignis zu einem deutlichen Anstieg der Gefäßneubildung in dem infarzierten Herzgewebe, zu einer Regeneration von Kardiomyozyten und zur Verbesserung der Herzfunktion (Wang X et al., 2006).

Eine weitere Population von kardialen Vorläuferzellen wurde aus neonatalen Maus Herzen anhand des Transkriptionsfaktors Islet-1 isoliert (Laugwitz et al., 2005; Moretti et al., 2006). Die Islet-1-positiven Zellen unterscheiden sich von den anderen Herzstammzellen, indem sie keinen Hoechst-Farbstoff 33342 extrudieren und keine Oberflächenmarker, wie c-Kit und Sca-1, exprimieren. Bei der Ko-Kultivierung mit den neonatalen Kardiomyozyten *in vitro* konnten sich diese Zellen vollständig zu Herzmuskelzellen ausdifferenzieren. Laut Moretti et al. sind die Islet-1-positiven Zellen multipotent und in der Lage, sich zu Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen zu entwickeln (Moretti et al., 2006). Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Zellen mit den gleichen Merkmalen aus dem Herzen eines Erwachsenen isoliert werden können. Darüber hinaus konnte auch nicht nachgewiesen werden, dass die Islet-1-positiven Zellen das ischämisch geschädigte Herzgewebe regenerieren können.

Messina et al. haben die Zellen aus der Subkultur humaner Biopsieproben von Vorhof- und Ventrikelgewebe bzw. aus murinen Herzen isoliert (Messina et al., 2004). Die Zellen wuchsen *in vitro* als selbstadhärenter Cluster, sogenannte Kardiosphären. Kardiosphären bestehen aus klonal gewonnenen Zellen, die einerseits aus proliferierenden c-Kit-positiven Zellen bestehen,

die sich überwiegend im Kern befinden (diese Zellen exprimieren Sca-1, KDR/Flk-1 und CD31), und andererseits aus differenzierten Zellen, die Kardial- bzw. Endothelzellmarker exprimieren und die Peripherie bilden. Darüber hinaus sind die von den Kardiosphären abgeleiteten Zellen (*cardiospheres derived cells*, CDCs) positiv für CD105, c-Kit, CD90, CD34 und CD31, aber weitgehend negativ für MDR1, CD133 und CD45 bzw. für die meisten hämatopoetischen Marker (Smith et al., 2007). Dies zeigt, dass sich CDCs phänotypisch sowohl von humanen Herzstammzellen (c-Kit-positiv, MDR1-positiv) (Urbanek et al., 2003) als auch von Knochenmarkstammzellen bzw. von EPCs (CD133-, CD34-, CD45-positiv) unterscheiden. CDCs enthalten Zellen, die phänotypisch den mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSCs), Fibroblasten (CD105-, CD90-positiv) bzw. Endothelzellen (CD34-, CD31-positiv) ähneln; die Unterschiede zwischen den c-Kit-positiven und den CD90-/CD31-positiven CDCs sind aber zum Teil sehr groß. Die CDCs sind in der Lage, sich in einer Ko-Kultur mit neonatalen ventrikulären Kardiomyozyten aus den Rattenherzen zu den elektrisch funktionellen Herzmuskelzellen *in vitro* zu differenzieren. Nach einer Injektion von CDCs in infarzierte Maus Herzen fördern diese Zellen die kardiale Regeneration und führen zur Verbesserung der Herzfunktion (Smith et al., 2007).

Trotz der Existenz dieser Zellpopulationen und ihrer Fähigkeit, das infarzierte Herzgewebe zu regenerieren, sind diese Mechanismen für eine komplette Wiederherstellung der Herzfunktion *in vivo* unzureichend. Limitierender Faktor ist ein sehr beschränktes Wissen in Bezug auf die molekularen Netzwerke, die die Proliferation, die Selbsterneuerung und die Differenzierung der Zellen regeln. Darüber hinaus ist nicht klar, warum die von mehreren Arbeitsgruppen beschriebenen Herzstammzellen verschiedene Merkmale aufweisen und wie das Zusammenspiel von diesen Zellpopulationen untereinander funktioniert. Dennoch bieten diese Zellen eine potenziell attraktive Quelle für die Regeneration von Herzgewebe.

1.3.2 Skelettmyoblasten

Die ersten klinischen Tests für die Herzzellersatztherapie wurden mit Skelettmyoblasten durchgeführt (Menasche et al., 2001; Menasche, 2005). Die Satellitenzellen liegen als Vorläuferzellen von Skelettmuskelzellen in der Regel in einem Ruhezustand unter der Basalmembran der Skelettmuskelfasern und proliferieren nur bei den Verletzungen. In diesem Stadium sind sie zwar Myoblasten, ihre Entwicklung ist aber aufgrund der fortgeschrittenen Differenzierung auf die myogene Zelllinie beschränkt. Für die klinischen Studien sind die Skelettmyoblasten, ihren nicht-kardialen Ursprung ausgenommen, ein idealer Spenderzelltyp.

Sie können bei einer Muskelbiopsie des Erkrankten isoliert, rasch *in vitro* vermehrt und, ohne das Risiko einer Tumorentstehung, direkt in das geschädigte Herzgewebe transplantiert werden. Dabei besitzen die Skelettmyoblasten eine hohe Resistenz gegen Ischämie. Obwohl die ersten Studien unter Einsatz von Skelettmyoblasten vielversprechend waren, sind die Langzeitergebnisse aufgrund der fehlenden elektrischen Koppelung der injizierten Zellen mit dem restlichen Myokard und der Unterschiede in der Kontraktilität beider Zelltypen unbefriedigend (Reinecke et al., 2000). Die tierexperimentellen Studien zeigten, dass sich implantierte Skelettmyoblasten zu multinukleären Muskelfasern differenzieren. Diese Muskelfasern zeichneten sich zwar durch ein kurzes Aktionspotenzial aus, die elektrophysiologische Koppelung an die lokalen Herzmuskelzellen jedoch fehlte, da sie keine Adhäsions- und „*gap junction*“-Proteine exprimierten (Reinecke et al., 2000). Trotz dieser fehlenden Eigenschaften haben mehrere Studien in Tiermodellen die positiven Auswirkungen der Transplantation von Myoblasten auf die ventrikuläre Leistung des Herzens nachgewiesen (Taylor et al., 1998; Scorsin et al., 2000).

Schließlich wurden die ersten Transplantationen von Skelettmyoblasten in klinischen Studien an Menschen durchgeführt. Diese Studien stellten fest, dass die Transplantation technisch durchführbar und risikoarm ist, gleichzeitig wurde die Differenzierung der Skelettmyoblasten zu Muskelfasern bestätigt. Einige klinische Studien mit Myoblasten berichten über eine hohe Rate von ventrikulären Arrhythmien und plötzliche kardiale Todesfälle, die möglicherweise durch die *Re-entry*-Schaltungen zwischen den transplantierten Myoblasten und den ortansässigen Herzmuskelzellen mit ihrer Heterogenität der elektrischen Eigenschaften der Zellmembran erklärt werden könnten (Leobon et al., 2003; Abraham et al., 2005). Die oben beschriebenen klinischen Studien waren nicht randomisiert, Placebo-kontrolliert oder Doppelblindstudien. Die Mechanismen, durch die Skelettmyoblasten angelockt werden und die zur Verbesserung der Herzfunktion führen, sind nach wie vor unklar.

Im Jahr 2005 wurde von Winitsky et al. über eine neue Population von Nicht-Satelliten-Zellen in der adulten Skelettmuskulatur von Mäusen berichtet (Winilsky et al., 2005). Diese Zellen haben die Eigenschaft, sich in der Zellkultur zu den autonom schlagenden skelettmuskelbasierten Vorläuferzellen der Herzmuskelzellen (*skeletal-based precursors of cardiomyocytes*, Spoc) zu entwickeln. Nach einer systemischen Applikation dieser Zellen in akut infarzierte Mauserzen wanderten sie zur ischämischen Herzregion und differenzierten sich zu Kardimyozyten, ohne den Weg der Zellfusion einzuschlagen. Die Spoc könnten ein neuer Weg in der Herzforschung und bei der Entwicklung neuartiger Therapiestrategien für

Herzerkrankungen sein. Es gibt jedoch noch keine Anhaltspunkte dafür, dass Spoc in den menschlichen Skelettmuskeln existieren.

1.3.3 Knochenmarkstammzellen

Die Hauptquelle adulter Stammzellen ist das Knochenmark (KM), das verschiedene Stammzelltypen, wie HSCs, SP-Zellen, EPCs, MSCs sowie die multipotenten adulten Vorläuferzellen (*multipotent adult progenitor cells*, MAPCs), beinhaltet. Die Versuche der transgeschlechtlichen Herztransplantationen bei Menschen haben gezeigt, dass weibliche Herzen in einem männlichen Organempfänger eine beträchtliche Anzahl von den Y-Chromosom-positiven Herzmuskelzellen, Gefäßendothelzellen und glatten Muskelzellen aufwiesen, was darauf hindeutet, dass die zirkulierenden Vorläuferzellen die Fähigkeit besitzen, sich in das Myokard zu integrieren (Quaini et al., 2002). Eine Reihe von Studien hat nachgewiesen, dass adulte Knochenmarkstammzellen imstande sind, sich zu Skelettmuskelzellen (Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999; LaBarge und Blau, 2002), Leberzellen (Lagasse et al., 2000), Nervenzellen (Kopen et al., 1999; Mezey et al., 2000; Brazelton et al., 2000), Herzmuskelzellen (Orlic et al., 2001a; Jackson KA, 2001), Gefäßendothelzellen (Orlic et al., 2001a; Jackson KA, 2001; Asahara et al., 1997) und Epithelzellen der Haut, Lunge und des Darms (Krause et al., 2001) zu differenzieren.

Die HSCs sind ein Bestandteil des Knochenmarks und verantwortlich für die ständige Regeneration von Blutzellen. Diese Zellen sind selten: Auf eine HSC kommen ca. 10.000 bis 15.000 Knochenmarkzellen. Im Jahr 2001 haben Orlic et al. berichtet, dass sich die c-Kit-positiven HSCs aus dem Knochenmark nach der Injektion in die Grenzzone der infarzierten Mausherzen zu Kardiomyozyten, Gefäßendothelzellen und glatten Muskelzellen differenzierten und zu einer schnellen Regeneration von mehr als 60% des infarzierten Ventrikels und zu einer deutlich verbesserten Herzfunktion führten (Orlic et al., 2001a). Jackson isolierte die SP-Zellen aus dem Knochenmark durch ihre Fähigkeit den Hoechst-Farbstoff zu extrudieren. Er transplantierte diese Zellen in die bestrahlten Mäuse und induzierte anschließend eine Koronarischämie. Die injizierten SP-Zellen (CD34-negativ, c-Kit-positiv, Sca-1-positiv) wanderten in die Ischämiezone, differenzierten sich zu Kardiomyozyten und Endothelzellen und induzierten die Bildung neuer Funktionseinheiten in dem geschädigten Herzgewebe (Jackson KA, 2001). Eine andere Studie berichtete über die Differenzierung der c-Kit-positiven HSCs im infarzierten Herzgewebe zu Kardiomyozyten und Endothelzellen, ohne dass sich diese zu hämatopoetischen Zelllinien entwickelten. Die

neuen Herzstrukturen wurden ohne Zellfusion gebildet (Kajstura et al., 2005). Diese Studien weisen auf ein vielseitiges Transdifferenzierungspotenzial von Knochenmarkstammzellen hin. Jedoch haben einige Untersuchungen zur Differenzierung von HSCs in infarzierten Herzen gezeigt, dass sich die transplantierten HSCs zu hämatopoetischen Zelllinien entwickelten und keinen kardialen Phänotyp annahmen (Murry et al., 2004; Balsam et al., 2004; Nygren et al., 2004). Stattdessen wurde eine Zellfusion als eine alternative Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse diskutiert. Laut dieser These haben die Stammzellen nur deswegen die Funktion von Herzmuskelzellen übernommen, weil sie mit den ortansässigen Kardiomyozyten fusioniert sind (Oh et al., 2003; Nygren et al., 2004; Alvarez-Dolado et al., 2003). In den vergangenen Jahren haben mehrere Untersuchungen mit den unterschiedlichen Stammzellarten gezeigt, dass die Transdifferenzierung der Stammzellen zu den Zellen der verschiedenen Organsysteme einschließlich des Herzens wenn überhaupt, dann nur selten eintritt (Oh et al., 2003; Alvarez-Dolado et al., 2003). Derzeit ist der Mechanismus der Fusion von Stammzellen von besonderem Interesse. Die Frage, ob die Fusion von solchen Stammzellen die Regeneration eines ischämisch geschädigten Herzens positiv beeinflussen könnte, ist noch nicht geklärt.

Eine weitere Population im Knochenmark bilden die MSCs. MSCs sind Vorläuferzellen für die Zellen des mesenchymalen Ursprungs, wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten. Die menschlichen MSCs aus dem Knochenmark können *in vitro* kultiviert werden und sich zu den verschiedenen Körperzellen differenzieren (Pittenger et al., 1999). Die Behandlung mit der DNA-Demethylierungsagens *5-Azacytidine* lenkt die Differenzierung dieser Zellen *in vitro* in Richtung Herzmuskelzellen (Makino et al., 1999). Obwohl die differenzierten Zellen eine Reihe von kardialen Markern exprimieren, ähneln diese Zellen morphologisch stärker den Skelettmuskelzellen (Makino et al., 1999). Mehrere Studien zeigten im Tiermodell nach einem akuten Myokardinfarkt und der anschließenden Behandlung mit Knochenmark-MSCs eine deutliche Regeneration von geschädigtem Herzgewebe und eine Verbesserung der Herzfunktion. Eine Studie von Tomita et al. an infarzierten Rattenherzen ergab, dass nur die mit *5-Azacytidine* vorbehandelten MSCs in der Lage waren, sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren und somit die Herzfunktion zu verbessern (Tomita et al., 1999). Zwei weitere Studien verwendeten MSCs ohne Vorbehandlung mit *5-Azacytidine* für eine direkte Transplantation in nicht infarziertes Herzgewebe. Diese Zellen entwickelten sich zu Herzmuskelzellen und exprimierten kardiale Marker (Toma et al., 2002; Wang JS et al., 2000). Trotz der großen Anzahl von MSCs bei den Transplantationen war die Anzahl der zu Kardiomyozyten differenzierten Zellen in beiden Studien extrem niedrig. Obwohl der Einsatz

von autologen MSCs für die Behandlung einer akuten Herzischämie im Schweinmodell zu einer Verbesserung der kardialen Funktion führte (Shake et al., 2002), verursachte die intrakoronare Applikation der MSCs in die gesunden Hundeherzen eine akute Myokardischämie bzw. einen subakuten Herzinfarkt (Vulliet et al., 2004). Eine weitere Studie berichtete über erhebliche intramyokardiale Verkalkungen nach einer MSCs-Transplantation in die infarzierten Herzen (Yoon et al., 2004). Ein großes Differenzierungspotenzial von MSCs zu den verschiedenen Zelllinien, wie Knochen-, Knorpel-, Fett- und Bindegewebszellen, könnte die Erklärung für die Ergebnisse dieser Studien sein.

EPCs können aus dem Knochenmark mobilisiert werden. Sie induzieren nach einer Ausschwemmung in den Blutkreislauf die Gefäßneubildung in adulten Tieren (Asahara et al., 1999) und reagieren mit einer Zellzahlerhöhung auf eine Gewebeischämie (Takahashi et al., 1999). EPCs können aus menschlichem Nabelschnur-, Knochenmark- oder Peripherblut isoliert werden (Asahara et al., 1997 und 1999; Gehling et al., 2000; Urbich et al., 2003; Murohara et al., 2000; Shi et al., 1998). Obwohl EPCs aus verschiedenen Quellen stammen können, exprimieren sie alle endothelialen Markerproteine, wie VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), von-Willebrand-Faktor (vWF) und eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*). Bei einer Applikation von EPCs über ein peripheres Gefäß oder bei einer Transplantation direkt ins infarzierte Myokard wandern die Zellen zum geschädigten Gewebe, induzieren die Gefäßneubildung und verringern somit die Infarktgröße (Kocher et al., 2001; Kawamoto et al., 2001 und 2003). Eine vor Kurzem durchgeführte Studie zeigte, dass die Verbesserung der Herzfunktion nach einer intramyokardialen Injektion von humanen CD34-positiven Progenitorzellen in das infarzierte Herzgewebe auf eine kardiale Differenzierung der applizierten Zellen zurückzuführen ist (Iwasaki et al., 2006). Bemerkenswert ist, dass die Injektion von reifen Endothelzellen oder Endothelzellen aus menschlichem Nabelschnurblut in die infarzierten adulten Mauserherzen die Differenzierung dieser Zellen zu Kardiomyozyten bewirkt (Condorelli et al., 2001). Einige *In-vitro*-Studien zeigten die Transdifferenzierung der humanen EPCs in einer Ko-Kultur mit Rattenkardiomyozyten zu funktionell aktiven Herzmuskelzellen (Badorff et al., 2003; Koyanagi et al., 2005). Allerdings konnten Gruh et al. in ihrer Studie diese Ergebnisse nicht belegen (Gruh et al., 2006).

Eine weitere Stammzellpopulation im Knochenmark sind die MAPCs. Sie sind primitiver als MSCs und EPCs und können sich bei einer Injektion in die Blastozyste zu den meisten somatischen Geweben einschließlich Herzmuskel entwickeln. Allerdings differenzieren sich die MAPCs nach einer Transplantation *in vivo* nicht zu Kardiomyozyten (Jiang et al., 2002).

Aus diesem Grund wurden die MAPCs in keinem Tiermodell für Herz-Kreislauf-Erkrankungen zur Therapieentwicklung bzw. Bestimmung ihres Differenzierungspotenzials geprüft. Im Jahr 2005 wurde eine neue humane Knochenmarkstammzelle beschrieben (Yoon et al., 2005). Basierend auf der Oberflächenmarkerexpression, gehört diese klonal expandierende Zellart, die von den humanen multipotenten Knochenmarkstammzellen abgeleitet ist, zu keiner zuvor beschriebenen Knochenmarkstammzellpopulation. Eine intramyokardiale Transplantation dieser Zellen nach einem akuten Herzinfarkt führte zu einer Gefäßneubildung und zur Differenzierung zu Kardiomyozyten. Außerdem wurde eine Proliferation der ortansässigen Zellen in den transplantierten Herzen beobachtet. In der Ko-Kultur wurden Veränderungen des Phänotyps dieser Zellen beobachtet, die einerseits auf die Differenzierung der MAPCs und andererseits auf die Zellfusion zurückzuführen sind (Yoon et al., 2005).

Obwohl mehrere experimentelle Studien die kontroversen Schlussfolgerungen in Bezug auf eine kardiale Transdifferenzierung und Reparatur des geschädigten Herzgewebes durch die Transplantation der Knochenmarkstammzellen nach einem akuten Myokardinfarkt dargelegt haben, stellt die Injektion der Knochenmarkstammzellen für die Behandlung des ischämischen Herzgewebes eine potenzielle Therapiemöglichkeit dar (Cleland et al., 2006; Wollert et al., 2004). In den meisten klinischen Myokardinfarkt-Studien wurden die Knochenmarkstammzellen oder aus peripherem Blut gewonnene EPCs bei den Patienten durch eine intrakoronare Zellinjektion transplantiert (Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002 und 2006; Fernandez-Aviles et al., 2004; Wollert et al., 2004; Lunde et al., 2005; Meyer et al., 2006; Janssens et al., 2006; Zohnhofer et al., 2006; Schachinger et al., 2006). In anderen Studien wurden die Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz entweder durch eine direkte intramyokardiale Injektion (Stamm et al., 2003; Patel et al., 2005) oder mittels einer katheterbasierten intrakoronaren Applikation von Knochenmarkstammzellen behandelt (Assmus et al., 2006; Fuchs JR et al., 2003; Perm et al., 2003; Tse et al., 2003). Obwohl die ersten klinischen Studien die Sicherheit und die relativ leichte Durchführung von Knochenmarkstammzelltransplantationen bei Herzinfarkt-Patienten belegen (Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002; Fernandez-Aviles et al., 2004; Wollert et al., 2004), sind die Ergebnisse von fünf getrennten, randomisierten placebokontrollierten Doppelblind-Studien nicht eindeutig ausgefallen. Die REPAIR-AMI (*Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodelling in Acute Myocardial Infarction*)- und die TOPCARE-CHD-Studie (*Transplantation Of Progenitor Cells And Recovery of left ventricular function in patients with Chronic ischemic Heart Disease*) beschreiben eine nur sehr geringe Verbesserung der

Auswurffraktion im Vergleich zu den Kontrollen von lediglich 3 bis 5% (Schachinger et al., 2006; Assmus et al., 2006). Die Untersuchung der Größen und der Revaskularisierung von Myokardinfarkten deutet darauf hin, dass die Patienten nach einer Stammzelltherapie nach 12 Monaten deutlich bessere Ergebnisse aufweisen (Schachinger et al., 2006). Außerdem haben Patienten mit einer geringeren ventrikulären Funktion einen deutlich größeren Nutzen von dieser Therapieart als Patienten mit vergleichsweise weniger geschädigten Herzen (Schachinger et al., 2006). Die BOOST-II-Studie (*BOne MarrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration*) ergab eine signifikante Verbesserung der Auswurffraktion nach vier Monaten, aber keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und behandelten Personen nach 18 Monaten (Meyer et al., 2006). Die STEMI (*ST-Elevation acute Myocardial Infarction*)- und die ASTAMI (*Autologous Stem Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction*)-Studie zeigten, was die Gesamtfunktion des Herzens betrifft, keine Verbesserung (Lunde et al., 2005 und 2006; Janssens et al., 2006).

Eine Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark stellt ein alternatives Verfahren zur direkten intrakoronaren oder intramyokardialen Stammzellapplikation dar. Obwohl die früheren tierexperimentellen Studien nach der Verabreichung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren für die Mobilisierung der HSCs von einer deutlichen Verbesserung der Herzfunktion und einer Regeneration des geschädigten Gewebes nach einem Myokardinfarkt berichteten (Orlic et al., 2001a), waren die Ergebnisse der groß angelegten klinischen REVIVAL-2-Studie (*Regenerate Vital Myocardium by Vigorous Activation of Bone Marrow Stem Cells*) zur Prüfung dieses Konzepts negativ (Zohlhofer et al., 2006).

1.3.4 Andere adulte Stammzellen

Spermatogoniale Stammzellen (*spermatogonial stem cells*, SSCs) können aus adulten Maushoden isoliert und kultiviert werden (Guan et al., 2006). Diese Zellen wurden als multipotente adulte Keimbahnstammzellen (*multipotent adult Germ-line stem cells*, maGSCs) identifiziert. Ähnlich wie ESCs sind sie in der Lage, sich zu den Zellen aller drei Keimblätter einschließlich der Kardiomyozyten zu differenzieren. Die gewonnenen Herzmuskelzellen zeigten die typischen Merkmale von Herzmuskelzellen in frühen Stadien der kardialen Entwicklung (Guan et al., 2007). Die Studie von Skutella (2008) berichtete über eine erfolgreiche Entwicklung der humanen adulten Keimbahnstammzellen aus spermatogonialen Zellen des humanen adulten Hodens. Die zelluläre und molekulare Charakterisierung dieser

Zellen ergab viele Ähnlichkeiten mit menschlichen embryonalen Stammzellen. Nach einer Transplantation in immundefiziente Mäuse verursachen die Keimbahnstammzellen das Wachstum von Teratomen. Bei einer Kultivierung humaner adulter Keimbahnstammzellen unter den Bedingungen, die für die Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen angewendet werden, entwickeln sie sich zu verschiedenen Arten von somatischen Zellen aller drei Keimblätter. Der Einsatz von humanen adulten Keimbahnstammzellen aus dem menschlichen Hoden würde die Durchführung der zellbasierten Therapien ohne die ethischen und immunologischen Probleme, die im Zusammenhang mit menschlichen embryonalen Stammzellen bestehen, erlauben. Die mögliche Entartung dieser Zellen schränkt die Anwendung von maGSCs ein. Um die maGSCs-Transplantation nach einem Herzinfarkt im klinischen Alltag zu etablieren, werden noch viele weitere Studien nötig sein, durch die die Teratomentstehung besser verstanden werden soll.

Stammzelltherapien sind bei den Forschern schon längst bekannt. Ob es um Knochen-, Binde- oder Muskelgewebe geht, wurden *in vitro* und in den Tierversuchen unzählige Experimente durchgeführt, die viele außergewöhnliche Eigenschaften der Stammzellen, wie ihr starkes Proliferationspotenzial, ihre hohe Plastizität und Immunkompatibilität, nachgewiesen haben. Trotz der unbestrittenen Erfolge auf dem Gebiet der Stammzelltransplantation beim Menschen stellt sich jedoch die Frage, inwieweit die injizierten Stammzellen für die Verbesserung der Herzfunktion bzw. die Reparatur des geschädigten Gewebes verantwortlich sind.

1.4 Ziel der Dissertation

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines Ischämie-Reperfusionmodells, möglichst analog zur Situation beim Menschen, und die Untersuchung der Überlebensfähigkeit und Verteilung der transplantierten Knochenmarkszellen im ischämischen Herzen. Die Arbeit hatte folgende Untersuchungspunkte:

1. Etablierung eines Ischämie-Reperfusionmodells eines Großtiers (Göttinger Minischwein)
2. Etablierung der geeigneten Zellmarkierungsmethode für die Zellenverfolgung *in vivo*
3. Untersuchung einer einfachen Kathetertechnik für die Zelltransplantation in das Herzmuskelgewebe
4. Bestimmung des optimalen Zeitpunkts für die Zelltransplantation nach einem akuten Herzinfarkt
5. Untersuchung der Überlebensfähigkeit und Verteilung der MNCs und MSCs im ischämischen Herzgewebe.

2. Material und Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltung

Im experimentellen Teil der Arbeit fanden ein bis zwei Jahre alte und 33 bis 60 kg Körpergewicht (KG) schwere Göttinger Minischweine Verwendung. Alle Tiere wurden im Versuchstiergut Relliehausen gezüchtet und unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Tiere wurden vor den geplanten Versuchen für eine Eingewöhnungszeit von drei bis fünf Tagen in die tierexperimentelle Einrichtung der Universitätsklinik Göttingen transportiert und in einer Barrierenanlage mit einer Besatzdichte von ein bis zwei Tieren pro Käfig gehalten. Die Raumtemperatur betrug 19 ± 2 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60%. Die Minischweine wurden nach einer postoperativen Phase von zwei Tagen für das versuchsfreie Intervall wieder ins Versuchstiergut Relliehausen gebracht. Die Tierversuche wurden von der Bezirksregierung Braunschweig gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt (509.42502/01–07.01.).

2.2 Materialien

2.2.1 Materialien für die Durchführung operativer Eingriffe

ACS HI-Torque Ruler™ (Guidant Advanced Cardiovascular Systems, Inc.): 0,014 inch, Länge 190 cm mit flexibler Spitze (DOC®)

Angiographiekatheter Jography (JOMED catheter Inc.): 5F, 0,038 inch, Länge 1 m

AVANTI® Introducer (Cordis Corporation): REF 504-605A; 5F und 7F, Länge 11 cm, 0,038 inch

Cavafix® MT (B.Braun Melsungen AG): Zentraler Venenkatheter, 20G, Länge 32 cm

Führungskatheter-Guiding catheter Zuma™ (Medtronic Inc.): 7F, JR 4.0, Innendurchmesser 2,06 mm, Außendurchmesser 2,39 mm, Länge 1 m

Hochdruckhahn (DeRoyal Europe Ltd.): 1050 PSI

Merit Angioplastiepack™ (Merit Medical Ireland Ltd.): Ypsilon und Torque

PTCA Dilatation Catheter Maverick™ (Boston Scientific SCIMED, Inc.): Ballon 2,0 mm x 20 mm

Supramid (Serag Wiessner): Chirurgisches Nahtmaterial EP 3,5

Trachealtubus (SIMS Portex Limited): Größe 6,5 - 7 mm

Vesselloops® (Maxxim Medical): Elastisches Band

2.2.2 Medikamente für die Durchführung operativer Eingriffe

Aspisol[®] (DL-Lysinmono-acetylsalicylat, Bayer Vital GmbH): Endkonzentration 200 mg/ml

ASS-ratiopharm[®] **100 TAH** (Acetylsalicylsäure, Ratiopharm GmbH): 100 mg/Tablette

Braunol[®] (Providon-Jod, B.Braun Melsungen AG): Desinfektion des OP-Gebiets

Cordarex[®] (Amiodaron, Sanofi-Syhelabo GmbH): Endkonzentration 3 mg/ml

Dipidolor[®] (Piritramid, Janssen-Cilag GmbH): Endkonzentration 0,3 mg/ml

Forene[®] (Isofluran, Abbott GmbH & Co.KG): nur bei Narkoseeinleitung bzw. bei Knochenmarkpunktion

Hostaket[®] (Ketamin, Intervet Deutschland GmbH): Endkonzentration 10 mg/ml

Liquemin[®] (Heparin, Hoffman-La Roche AG): Endkonzentration 5.000 I.E./ml

NaCl (Natriumchlorid, B.Braun Melsungen AG): 0,9%

Stresnil[®] (Azaperon, Janssen-Cilag GmbH): Endkonzentration 40 mg/ml

Tardomyocel[®] (Penicillin/ Streptomycin Depot, Bayer Vital GmbH): 1 ml enthält 82,6 mg Benzyl-penicillin-Benzathin, 24,8 mg Benzyl-penicillin-Procaïn, 156,3 mg Dihydrostreptomycinsulfat, 1,5 mg Methyl-4-hydroxybenzoat, 0,2 mg Propyl-4-hydroxy-benzoate

Trapanal[®] (Thiopental-Natrium, BYK Gulden): Endkonzentration 25 mg/ml

Ultravist[®] **-370** (Iopromid, Schering AG)

Xylocain[®] **2%** (Lidocain, Astra Zeneca GmbH): Enkonzentration 20 mg/ml

2.2.3 Medien und Substanzen für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium; Invitrogen): 4,5 g/l Glucose, L-Glutamine

FKS (Fötale Kälberserum; Sigma-Aldrich): bei -20 °C aufbewahrt, vor Benutzung aufgetaut, 30 min. im Wasserbad bei 56°C inaktiviert und bei 4 °C gelagert

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung): NaCl 10 g/l, KCl 0,25 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l und KH₂PO₄ x 2H₂O 0,25 g/l

Trypsinlösung: 0,2% Trypsin 1:250 (Invitrogen) in PBS

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) **-Lösung**: 0,02% EDTA (Sigma-Aldrich) in PBS

Trypsin/EDTA-Lösung: Trypsin:EDTA = 1:1 zur Ablösung der Zellen

β-ME (β-Mercaptoethanol; Promega) **-Stammlösung** (100x): 7 µl β-ME in 10 ml PBS, steril filtriert, bei 4 °C für höchstens sieben Tage gelagert

NEAA (Nicht-essenzielle Aminosäuren; Invitrogen) **-Stammlösung** (100x)

Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin; Invitrogen) **-Stammlösung** (100x)

bFGF (*basic fibroblast growth factor*; ReproTech Inc.): 10 µg bFGF in 200 µl 5mM Tris, pH 7,6 gelöst (50 µg/ml), aliquotiert und bei -20 °C gelagert, 20 µl Aliquots mit 180 µl 0,1% BSA zu 5 µg/ml verdünnt und höchstens sieben Tage bei 4 °C gelagert

Kulturmedium: DMEM mit 15% FKS, 1x NEAA, 1x β-ME, 1x Pen/Strep und bFGF (5 ng/ml Medium), zur Kultivierung von mononukleären Zellen (*mononuclear cells*, MNCs) und MSCs

Lymphozyten-Separationslösung: Ficoll, 1,077 g/ml (PAA Laboratories)

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, Sigma-Aldrich) **-Stammlösung:** 1 mg/ml im Wasser

CM-DiI (Chloromethylbenzamid-1,1'-Diocetadecyl-1-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin-perchlorat; Molecular Probes) **-Stammlösung:** 0,25 mg/ml im DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich)

Entellan: Medium für Abdeckung der Paraffinschnitte nach HE-Färbung (Merck)

2.3 Methoden

2.3.1 Knochenmarkpunktion

Das Knochenmarkblut wurde zwei Wochen vor der autologen intrakoronaren Zelltransplantation punktiert. Die Tiere wurden dabei nach 24 Stunden Nahrungskarenz durch eine intramuskuläre Injektion von Azaperon (10 – 12 ml/50 kg KG) sediert, orotracheal mit einem 6,5 bzw. 7,0 Tubus intubiert und für die Dauer des Eingriffs mittels Isofluran narkotisiert. Ein 2 bis 3 cm langer Schnitt wurde nach Eintreten der Toleranzphase in Bauchlage über den Beckenkamm gelegt und 20 bis 30 ml Knochenmarkblut wurden durch Unterdruck entnommen (Abbildung 3a und b). Sogleich wurde das entnommene Material mit Heparin (100 E.I./ml) im Verhältnis 1:9 verdünnt. Anschließend erfolgten die Desinfektion der Wunde mit einer Providon-Jod-Lösung und der Wundverschluss. Der Eingriff wurde nach einer intramuskulären Injektion von Pen/Strep Depot (3 ml/50 kg KG) und dem Aufwachen der Tiere beendet.

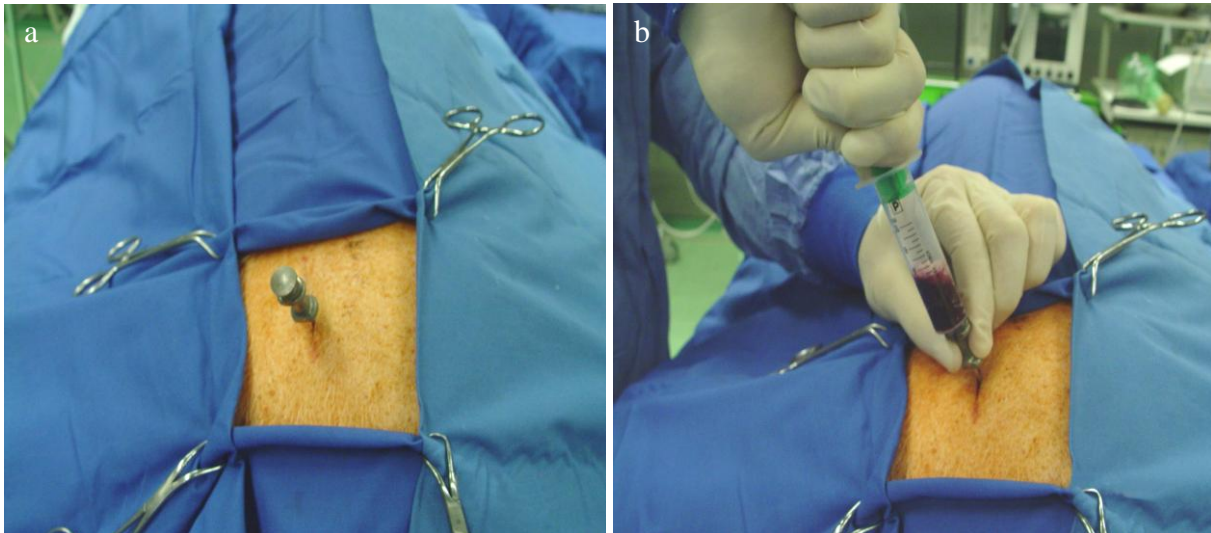


Abbildung 3: Knochenmarkpunktion bei Göttinger Minischwein

Die Spina iliaca posterior superior wurde nach einer gründlichen Desinfektion der Operationsfläche über den gelegten Hautschnitt manuell aufgesucht und das Knochenmark mit einer Punktionskanüle anpunktiert (a). 20 bis 30 ml Knochenmarkblut wurden mit den nacheinander aufgesetzten Spritzen durch Unterdruck kurz und kräftig aspiriert und mit Heparin verdünnt (b). Anschließend wurde das entnommene Material innerhalb weniger Minuten mittels Dichtegradientenzentrifugation weiterverarbeitet.

2.3.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark

Die Methode der Dichtegradientenzentrifugation erlaubte die Separation der mononukleären Zellen von den übrigen Bestandteilen des Knochenmarks. Das mit dem Gerinnungshemmer Heparin versetzte Knochenmark wurde innerhalb weniger Minuten nach der Punktion weiterverarbeitet. Die entnommenen Knochenmarkproben wurden zuerst mit DMEM im Verhältnis 1:3 gemischt. Anschließend wurden 20 ml Lymphozyten-Separationslösung mit 20 ml Knochenmarksuspension in einem Proberöhrchen überschichtet und bei Raumtemperatur (RT) und 805 $\times g$ 15 Minuten ohne Bremsfunktion zentrifugiert. Die MNCs sammeln sich bei dieser Art der Dichtegradientenzentrifugation in der Interphase an, während Knochenstückchen, Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens sedimentieren (Abbildung 4). Die MNCs wurden anschließend mit einer Pasteurpipette aus der Interphase sauber abgenommen. Die Zellen der Interphase wurden dabei mit basal DMEM mindestens 1:2 verdünnt und bei 445 $\times g$ 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend in Kulturmedium resuspendiert und in der Konzentration von 2×10^6 Zellen/10 cm Kulturschale (Nunc) gegeben. Die gleichmäßige Verteilung der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert.

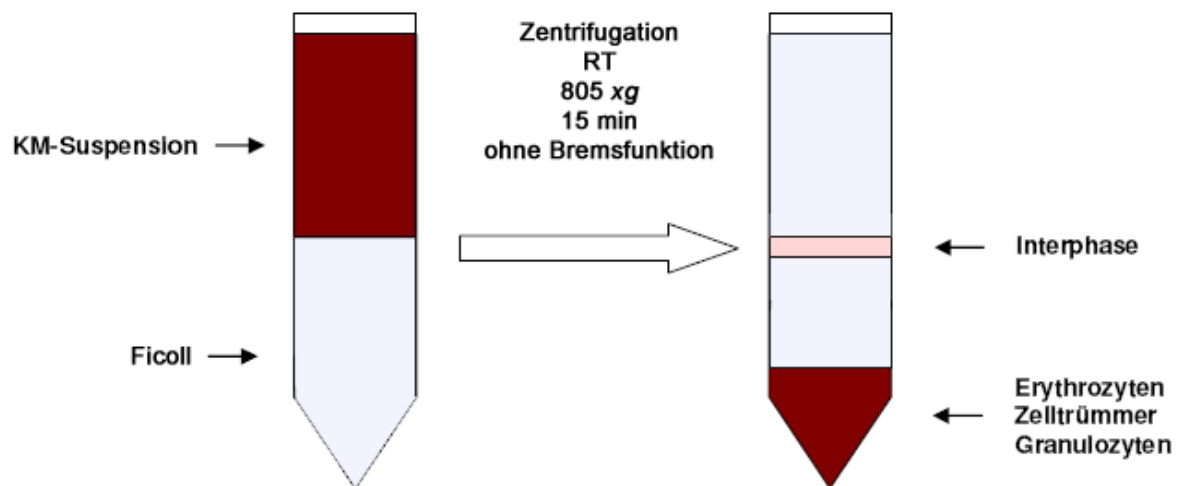


Abbildung 4: Dichtegradientenzentrifugation für die Isolierung von MNCs

Der Dichtegradient wurde mit Knochenmarkssuspension überschichtet und ohne Bremsfunktion abzentrifugiert. Die Fraktion der mononukleären Zellen positioniert sich in der Interphase oberhalb des Dichtegradienten, während Partikel mit höherer Dichte am Boden des Gefäßes sedimentieren.

2.3.3 Kultivierung von MNCs und MSCs

Die Anzahl der gewonnenen Zellen konnte mithilfe der Zellkultur vielfach vergrößert werden, sodass zum operativen Eingriff eine ausreichend große Menge an autologen Zellen aus dem Knochenmark für die geplante intrakoronare Transplantation vorhanden war. Die Kultivierung der MNCs und MSCs fand in Brutschränken bei 37 °C in einer 5-prozentigen CO₂-Atmosphäre statt. 10 ml Kulturmedium wurden für eine Zellkulturschale von 10 cm Durchmesser verwendet. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

Die Isolierung der MSCs beruhte auf der Selektion durch ihre Plastikadhärenz. Die nicht adhären Zellen wurden beim Mediumwechsel entfernt.

Die Passagierung der MSCs erfolgte, sobald sie konfluent gewachsen waren (ca. 7 – 9 Tage). Die Zellkulturschale wurde nach Entfernung des alten Kulturmediums mit PBS gespült, um alle Mediumreste abzuwaschen. Die abgelösten Zellen konnten nach Zugabe von Trypsin/EDTA und nach Inkubation bei 37 °C für ein bis zwei Minuten aus der Zellkulturschale abgenommen werden. Die Menge des dabei verwendeten Trypsin/EDTA betrug 6 ml pro eine 10-cm-Zellkulturschale. Die Zellen wurden vor der Resuspendierung in der entsprechend größeren Menge des frischen Kulturmediums zweimal mit PBS gewaschen; hierbei folgte der Zentrifugation (445 xg, 5 Minuten, RT) jeweils das erneute Auflösen des Zellpellets in PBS. Die Zellen wurden 1:3 – 1:5 umgesetzt. Bei den Versuchen wurden die Zellen der 1. und 2. Passage benutzt.

2.3.4 Zellmarkierung

Um die Zellen nach der autologen Transplantation ins Herzgewebe wieder zu finden, wurden die kultivierten MNCs und MSCs am Tag vor der Transplantation markiert. Als erste Markierungsmethode wurde die Transduktion der Zellen mit Adenovirus CMV- β -Gal (*cytomegalovirus- β -galactosidase*, MOI 500 (Multiplicity Of Infection 500)) bzw. QBI-Adeno-GFP (*quantum biotechnology-adeno-green fluoreszenz protein*, MOI 500) durchgeführt (Key und Devine, 2003). Im ersten Fall lässt sich die Expression des vom *LacZ* (Z-Untereinheit der β -Galaktosidase) -Reporter gen kodierte Genprodukts (in diesem Fall β -Galaktosidase) histochemisch nachweisen. Das Reporterprotein β -Galaktosidase, das in tierischen Zellen nativ nicht vorkommt, kann durch eine chromogene Reaktion sichtbar gemacht werden. Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase bildet aus dem Substrat X-Gal (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid*) einen Indigofarbstoff, der in Reporter gen exprimierenden Geweben als blauer Niederschlag detektiert werden kann. Im anderen Fall wurde stattdessen das GFP-Reporter gen für die Expression von grün fluoreszierendem Reporterprotein bei der Anfärbung der Zellen verwendet. Dieser biologische Marker kann fluoreszieren und hat einen einzigen Anregungshöhepunkt (*excitation*) bei ca. 488 nm mit einem Emission-Peak bei einer Wellenlänge von ca. 515 nm.

Als eine weitere Markierungsmethode für autologe Zelltransplantationen fand eine kombinierte Färbung der Zellen mit den Fluorochromen CM-DiI und DAPI statt. Der lipophile Membranfarbstoff CM-DiI beinhaltet einen thiol-reaktiven Chloromethyl-Anteil, der eine kovalente Bindung an zelluläre Thiole ermöglicht. Dadurch ist er stark rot fluoreszierend und photostabil, wenn er in Membran inkorporiert worden ist. Ein Vorteil dieses Farbstoffs besteht in seiner schwachen Toxizität und der Möglichkeit, ihn direkt im Zellkulturmedium einzusetzen. Die Zellen wurden für die Färbung von der Kulturschale abgelöst und zweimal in PBS gewaschen. Die Inkubation mit der CM-DiI-Stammlösung (10 μ l Farbstoff CM-DiI für 10^7 Zellen/ml) erfolgte 5 Minuten bei 37 °C und anschließend 15 Minuten bei 4 °C. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils 10 ml DMEM, um den überschüssigen Farbstoff vollständig zu entfernen.

Die Fähigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI mit der Desoxyribonukleinsäure (DNS) zu interkalieren, wurde bei der indirekten DNS-Färbmethode ausgenutzt. Der Farbstoff lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNS an und fluoresziert bei Anregung (*excitation/emission*: ca. 358/451 nm) im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe. Die Kerne der Zellen wurden mit dieser Methode angefärbt, während im Zytoplasma

und außerhalb der Zellen keinerlei DAPI-Fluoreszenz zu sehen war. Die MNCs und MSCs wurden nach der CM-DiI-Färbung mit DAPI-Stammlösung (20 µl DAPI-Stammlösung für 10^7 Zellen/ml) für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend dreimal mit DMEM gewaschen. Die Markierungen wurden fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert, und die Zellsuspension für die Transplantation heparinisiert.

2.3.5 Induktion der Myokardischämie und Zelltransplantation

2.3.5.1 Versuchsprotokoll

Die Versuchstiere wurden zur Darstellung der Unterschiede zwischen einer Transplantation von MNCs und MSCs und zur Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Zelltransplantation nach drei verschiedenen Protokollen behandelt (Tabelle 1). Zu Beginn der Versuche wurde bei jedem Tier eine Knochenmarkpunktion durchgeführt und zeitlich versetzt eine akute Ischämie mittels einer selektiven Kathetertechnik im Bereich der Herzvorderwand induziert. Die drei unterschiedlichen Versuchsabläufe wurden wie folgt durchgeführt:

Protokoll I:

Die Göttinger Minischweine wurden nach dem akuten Myokardinfarkt (MI) sowie nach zehn Minuten Reperfusionzeit der Koronargefäße mit den autologen MNCs behandelt und, abhängig von der Versuchsdauer, in drei Gruppen zu je drei Tieren aufgeteilt ($n = 9$). Die Versuche wurden jeweils eine Stunde, zwei Tage oder zwei Wochen nach der Zelltransplantation beendet.

Protokoll II:

Protokoll II entsprach in weiten Teilen Protokoll I ($n = 9$). Der einzige Unterschied bestand in der Dauer der Reperfusionzeit zwischen dem akuten Ereignis und einer Behandlung des ischämischen Gewebes mit autologen MNCs. Die Transplantation erfolgte zehn Tage nach der Induktion eines akuten Vorderwandinfarktes.

Protokoll III:

Die Tiere des Protokolls III ($n = 14$) wurden nach einer Stunde akuter Ischämie und zehn Minuten Reperfusionzeit mit den autologen MSCs behandelt. Der Unterschied zu den Versuchen nach Protokoll I lag allein in der bei der Transplantation verwendeten Zellart. Bei den vier Minischweinen wurde die Organentnahme eine Stunde später in derselben Narkose durchgeführt ($n = 4$). Die anderen Versuche wurden nach zwei Tagen ($n = 5$) bzw. zwei Wochen ($n = 5$) beendet.

Die Versuchstiere nach Myokardischämie (n = 4) bzw. ohne das akute Ereignis (n = 3), bei denen keine Zelltransplantation durchgeführt wurde dienten als Kontrolltiere (n = 7).

Tabelle 1: Protokoll für die Durchführung der Zelltransplantation.

| Zellart | MNCs | | | | | | | | MSCs | | | |
|--|--------------------------------|----------|--------|----------|-------------------------------|----------|--------|----------|----------------------------------|----------|--------|----------|
| Applikationsprotokoll / Reperfusionzeit | Protokoll I Nach 10 Minuten | | | | Protokoll II Nach 10 Tagen | | | | Protokoll III Nach 10 Minuten | | | |
| Gruppe | Kontrolle | 1 Stunde | 2 Tage | 2 Wochen | Kontrolle | 1 Stunde | 2 Tage | 2 Wochen | Kontrolle | 1 Stunde | 2 Tage | 2 Wochen |
| Anzahl der Versuchstiere (n) | 7 | 3 | 3 | 3 | 7 | 3 | 3 | 3 | 7 | 4 | 5 | 5 |

2.3.5.2 Induktion einer akuten Myokardischämie

Eine akute Ischämie im Bereich der abgehenden Äste des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) wurde bei allen Versuchstieren mithilfe einer selektiven Herzkathetertechnik zwecks einer akuten Gewebeschädigung und einer anschließenden Stammzellbehandlung durchgeführt (Abbildung 5). Die Minischweine wurden mit Azaperon (10 – 12 ml/50 kg KG) sediert, mit Isofluran narkotisiert und mit einer Thiopental-Natrium-Injektion (3 – 5 ml/50 kg KG) über einen zentralen Ohrvenenkatheter betäubt. Anschließend wurden die Versuchstiere orotracheal intubiert und mit einem Sauerstoff-Isofluran-Gemisch (5% : 2,5%) beatmet. Die Operation wurde in Rückenlage durchgeführt. Die isotonische Kochsalzlösung (300 ml/Stunde), Piritramid (8 – 9 ml/Stunde) und Ketamin (8 – 9 ml/Stunde) wurden den Minischweinen kontinuierlich per Infusionspumpe verabreicht. Die Herz- und Atemfrequenz, die Sauerstoffsättigung des Blutes und der Blutdruck wurden während der gesamten Operation überwacht. Das Elektrokardiogramm (EKG) wurde ständig mit mindestens drei Ableitungen registriert.

Die *Arteria carotis communis* und die *Vena jugularis* wurden über einen medianen Hautschnitt präpariert. Ein Bollus von DL-Lysinmonoacetylsalicylat (5 ml/50 kg KG), Heparin (100 E.I./kg KG) und Amiodaron (3 ml/50 kg KG) wurde anschließend durch den zentralen Ohrvenenkatheter appliziert. Die Gefäße konnten mit zwei elastischen Bändern

angehoben werden. Die Arterie wurde mit 7-F-Schleusen, die Vene mit 5-F-Schleusen versorgt. Die *Vena jugularis* wurde proximal der Eingangsstelle mit einer Ligatur unterbunden. Ein 7-F-Führungskatheter wurde durch die Carotis-Schleuse bis zur *Aorta ascendens* eingeführt, und die linke Koronararterie wurde unter Röntgenkontrolle mithilfe einer Kontrastmittelinjektion aufgesucht. Ein Ballonkatheter mit einem Führungsdraht konnte mittels eines Ypsilon eingeführt und im *Ramus diagonalis 1* bzw. 2 (D1 bzw. 2) des RIVA platziert werden. Der Ballon wurde für 60 Minuten entfaltet und sorgte für den 100-prozentigen Verschluss des Koronargefäßes. Die Ischämieinduktion wurde mittels EKG kontrolliert und aufgezeichnet. Der Ballon wurde nach einer Stunde entleert, und das vorher geschlossene Gefäß wurde reperfundiert.

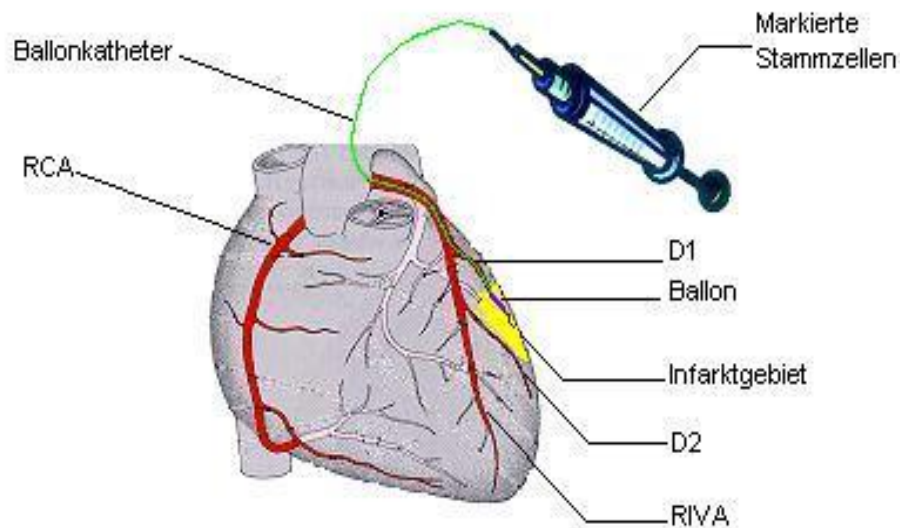


Abbildung 5: Induktion eines akuten Myokardinfarktes und intrakoronare autologe Zelltransplantation mithilfe einer selektiven Herzkathetertechnik

Ein Führungsdraht mit einem zweilumigen Ballonkatheter wurde nach einer Koronarangiographie der linken Herzkranzarterie in den *Ramus diagonalis 1* des RIVA eingeführt und im distalen Abschnitt des Gefäßes positioniert. Die akute Ischämie im Versorgungsgebiet des betroffenen Gefäßes konnte durch das Entfalten des Ballons induziert werden. Die Blutzirkulation im D1 konnte nach einer Stunde mit dem Entleeren des Ballons wiederhergestellt werden. Die *in vitro* markierten Stammzellen ($1 - 3 \times 10^7$ Zellen) wurden durch den Ballonkatheter in den D1, entweder nach der Induktion der akuten Ischämie in derselben Narkose oder nach der Entfernung von Kathetern, Wundverschluss und nach Wiedererwachen der Tiere, zehn Tage später in einer erneuten Narkose, injiziert.

2.3.5.3 Intrakoronare Zellinjektion

Das ischämisch geschädigte Gewebe wurde mittels selektiver Herzkathetertechnik mit autologen Zellen aus dem Knochenmark behandelt. Die intrakoronare Zelltransplantation erfolgte zehn Minuten (Protokoll I und III) bzw. zehn Tage (Protokoll II) nach einem akuten Infarktereignis im Rahmen einer Re-Koronarangiografie. Das Infarktgefäß, d.h. *Ramus diagonalis 1* bzw. 2, war koronarangiografisch offen. Nach Positionierung eines 7-F-Führungskatheters konnte ein zweilumiger Ballonkatheter innerhalb des Infarktgefäßes positioniert werden, sodass die Ballonkatheterspitze ca. 5 mm vor dem Beginn der Infarktzone lag. Der Ballon wurde anschließend für kurze Zeit aufgedehnt, und die gesamte Zellsuspension ($1 - 3 \times 10^7$ Zellen) über ca. 30 bis 60 Sekunden mit Überdruck distal des Ballons injiziert. Die *Arteria carotis communis* sowie die Halswunde wurden verschlossen, und die Narkose nach der intramuskulären Applikation von Pen/Strep Depot (3 ml/50 kg KG) beendet. Die Tiere bekamen täglich nach dem Eingriff Acetylsalicylsäure (100 mg/50 kg KG) mit dem Futter.

2.3.6 Organentnahme, Einbettung der Gewebeproben und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Organproben wurden bei den Versuchstieren für die Bewertung des Erfolges einer intrakoronaren Zelltransplantation nach einem akuten Myokardinfarkt in der Narkose entnommen. Eine Allgemeinanästhesie wurde bei den Göttinger Minischweinen am Ende der erforderlichen Beobachtungszeit, wie unter 2.3.1 beschrieben, eingeleitet, und das Herz wurde durch eine mediane Thorakotomie aus dem Situs herauspräpariert. Alle Proben wurden mit 0,9% NaCl gespült und in Stücke geschnitten. Jede Herzgewebeprobe umfasste alle Wandschichten, wobei auf makroskopische Anzeichen einer Myokardinfarzierung besonders geachtet wurde. Die Gewebestücke wurden anschließend auf einem Schüttler (Uetze-Henigsen) 5 bis 10 Minuten in isotonischer Kochsalzlösung gespült.

Alle Proben kamen dabei direkt nach der Entnahme und dem Spülvorgang in ein Fixiermedium. Die Präparate wurden in frisch hergestelltem 4-prozentigem gepuffertem Formaldehyd (Merk) für 4 bis 5 Stunden bei RT auf dem Schüttler oder über Nacht bei 4 °C fixiert. Die entnommenen Gewebeproben wurden für die Lagerung und Auswertung in Paraffin eingebettet.

Die Einbettung in Paraffin (Sherwood) erfolgte nach Auswaschung des Fixans in einer automatischen Einbettvorrichtung TP 1020 (Leica).

Die Gewebeprobe konnten anschließend an einer Paraffinausgießstation (Leica) in Würfel gegossen werden. Die Schnitte von 4 µm Dicke wurden nach Abkühlen der Paraffinwürfel mit einem Mikrotom RM 2165 (Leica) hergestellt. Diese Schnitte wurden zum Strecken in ein 37 °C warmes Wasserbad gebracht, anschließend mit einem Pinsel auf einen Objektträger (Menzel) aufgezogen und dann auf einer Wärmebank getrocknet.

Um die Architektur des Gewebes und um pathologische Veränderungen beurteilen zu können, wurde eine Übersichtsfärbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Eosin angefertigt. Mit ihr gelingt eine gute Darstellung des Gewebes, wobei Zellkerne blau-violett und Zytoplasma rosa erscheinen. Die interzellulären Substanzen färben sich ebenfalls an. Im ersten Schritt wurden die Schnitte mithilfe von Dimethylbenzen (Xylol) entparaffiniert. Darauf folgte eine Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe und *Aqua dest.* Nach erfolgter Rehydrierung wurden die Präparate 4 Minuten mit Hämalaun gefärbt und weitere 16 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Die gewaschenen Präparate wurden im Anschluss über einen Zeitraum von 7 Minuten in Eosin gefärbt und danach in *Aqua dest.* gewaschen. Nach dem Färben folgte eine Dehydrierung der Präparate unter Zuhilfenahme einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol. Im letzten Schritt wurden die Präparate mit dem Abdeckmedium Entellan und mit Deckgläsern gedeckt.

2.3.7 β-Galaktosidase-Immunfärbung

Bei den Paraffinschnitten wurde eine β-Galaktosidase-Immunfärbung für die Markierung der CMV-β-Gal-transfizierten MNCs in verschiedenen Gewebeprobe anhand ihres histochemischen Markers, des *LacZ*-Gens, durchgeführt. Die deparaffinierten Schnitte wurden 10 Minuten mit 5 ml 30-prozentiger Wasserstoffperoxid-Lösung (Merck) in 45 ml Methanol (Merck) inkubiert und gewaschen. Die Objektträger wurden nach einer 10-minütigen Behandlung der Schnitte in der Mikrowelle mit 5 ml Citratpuffer-Lösung (BioGenex) in 45 ml Wasser abgekühlt und anschließend mit Wasser und *tris buffered saline* (TBS, Ambion) gespült. Im Folgenden wurden die Schnitte mit dem *Blocking*-Reagenz (Lösung A) aus Histostain-Plus Kit (Zymed) bedeckt und für 20 Minuten bei 37 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Schnitte wurden mit *mouse-monoklonal*-Antikörper gegen β-Galaktosidase (Sigma-Aldrich) in den Konzentrationen 1:400, 1:500, 1:1000 und 1:2000 in einer Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Negativkontrollen wurden nur mit TBS und 4% *bovine serum albumin* (BSA) behandelt. Die zweite Antikörperlösung (Lösung B, *Goat-anti-mouse*) wurde nach dem Waschen der Objektträger mit TBS für 20 Minuten bei RT

aufgetragen. Anschließend konnten die mit TBS gespülten Schnitte für 10 Minuten bei RT mit Enzym-Konjugat (Lösung C) behandelt und nach dem Waschen mit AEC-Farbreagenz (Lösung D) für ca. 4 bis 7 Minuten unter einer mikroskopischen Kontrolle angefärbt werden. Das Anfärben der Schnitte wurde bei der gewünschten Farbintensität durch mehrmaliges Waschen mit TBS gestoppt.

Die Schnitte wurden mit Mayer`s Hämatoxylin Lösung (Sigma-Aldrich) für ca. 20 Sekunden angefärbt, mit Entellanmedium behandelt und mit einem Deckglas abgedeckt.

2.3.8 Fluoreszenzanalyse

Die transplantierten MNCs und MSCs wurden mithilfe der Fluoreszenz der CM-DiI- und DAPI-Farbstoffe sichtbar gemacht. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 200 (Zeiss). Die markierten Zellen wurden bei verschiedenen Filtern (*fluoresceinisothiocyanat* (FITC), *carbocyanin 3* (CY3) und DAPI) untersucht, digital aufgenommen und mit dem Programm AxioVision LE 3.1 ausgewertet. Die Größe des Paraffinschnittes bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung entspricht ungefähr den 20 Blickfeldern bei 10-facher Objektivvergrößerung. Jeder Schnitt wurde zunächst in 20 Blickfelder unterteilt. Die Gewebeproben aus dem rechten Ventrikel dienten als Kontrolle. Zuerst wurde die Gesamtzellzahl in 20 Blickfeldern mit HE-Färbung bestimmt. Anschließend wurden die CM-DiI/DAPI-positiven Zellen optisch unter oben beschriebenen Filtern identifiziert und manuell gezählt, indem die 20 Blickfelder nacheinander ausgewertet wurden. Die Zellen wurden nach ihrer Lage in *intravasal* und *extravasal* unterschieden. Die Anzahl der CM-DiI/DAPI-positiven Zellen wurde in Prozent, gemessen an der Gesamtzellzahl, angegeben. Da bei der Zelltransplantation unterschiedliche Zellzahlen appliziert wurden ($1 - 3 \times 10^7$ Zellen), wurden die Ergebnisse aller Versuche auf 10^7 Zellen korrigiert, sodass schließlich die Anzahl der CM-DiI/DAPI-positiven Zellen in Prozent pro 10^7 transplantierte Zellen angegeben und die Zellzahlen untereinander verglichen werden konnten.

2.3.9 Statistische Auswertungen

Alle Versuchstiere wurden auf die Gruppen randomisiert verteilt. Das operative Vorgehen bei allen Experimenten wurde standardisiert durchgeführt. Die erhobenen Daten wurden als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern angegeben. Die statistische Signifikanzanalyse erfolgte mit einem *Student's t-Test* für abhängige Stichproben unter

Angabe der p-Werte. Die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms SigmaPlot.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Ischämie-Reperfusionmodells des Minischweins

Die Induktion eines Myokardinfarktes bei Göttinger Minischweinen erfolgte mit einer selektiven Herzkathetertechnik (Abbildung 6). Die Herzkranzgefäße wurden im Rahmen einer Koronarangiografie dargestellt (Abbildung 6a). Die konstante anatomische Lage der Herzkranzgefäße bei den Minischweinen erlaubte eine eindeutige Identifizierung des Gefäßes. Durch das Einführen des Führungsdrahtes mit einem Ballonkatheter in D1 des RIVA (Abbildung 6b) wurde bei mehreren Tieren eine Herzrhythmusstörung im Sinne einer Tachyarrhythmie hervorgerufen. Allerdings konnte diese Herzrhythmusstörung durch das rechtzeitige Zurückziehen des Katheters vermieden werden. Mit dem Entfalten des Ballons im D1 für eine Stunde erfolgte die Induktion eines akuten Vorderwandinfarktes (Abbildung 6c). Die Blutzirkulation im *Ramus diagonalis 1* konnte mit dem Entleeren des Ballons wiederhergestellt werden.

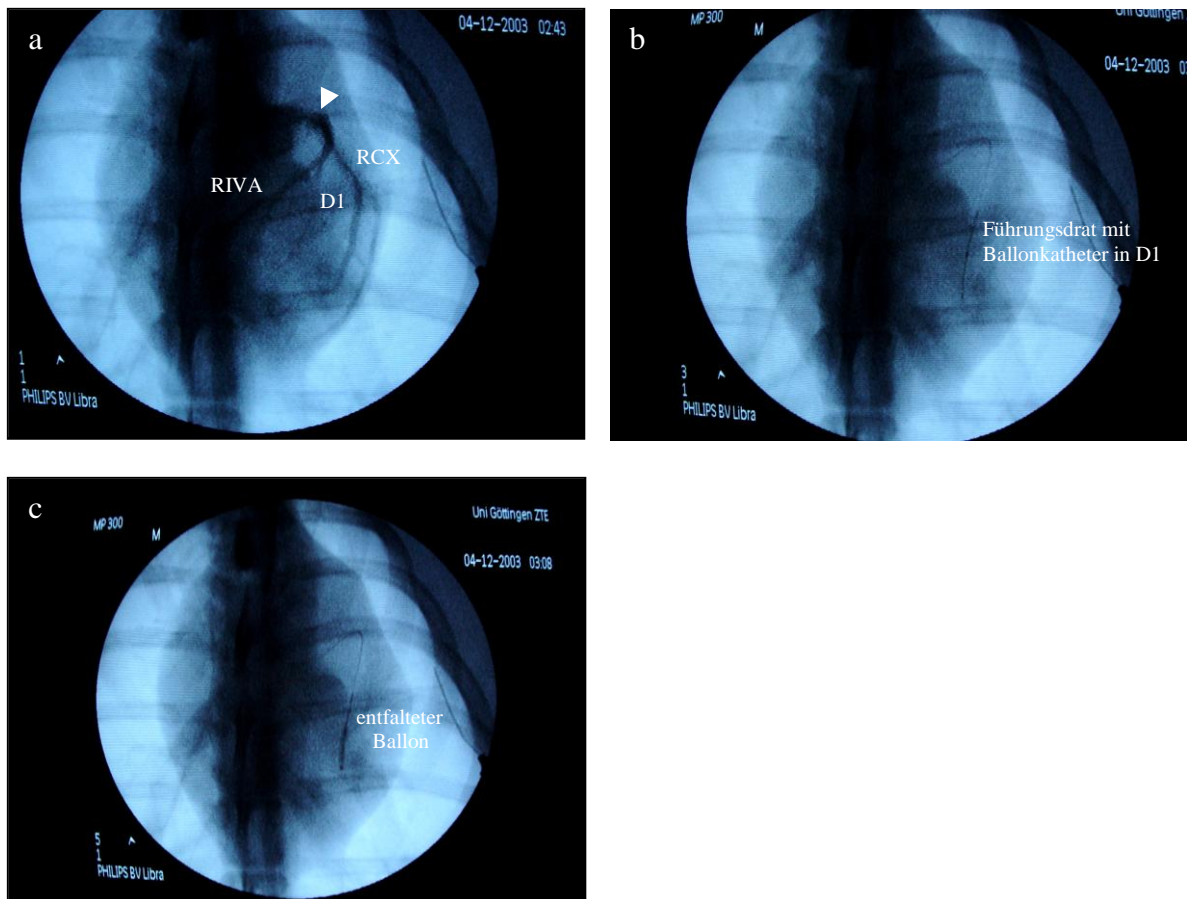


Abbildung 6: Induktion eines akuten Myokardinfarktes

Ein Führungsdrat mit einem zweilumigen Ballonkatheter wurde nach einer Koronarangiografie der linken Herzkranzarterie (a, Pfeil) in den *Ramus diagonalis 1* des RIVA eingeführt und im distalen Abschnitt des Gefäßes positioniert (b). Die akute Ischämie im Versorgungsgebiet des betroffenen Gefäßes konnte durch das Entfalten des Ballons induziert werden (c). RCX: *Ramus circumflexus*.

Die hämodynamischen Daten wurden zu Beginn der Versuche, zum Zeitpunkt der Ischämie und zu definierten Zeitpunkten während der Reperfusionphase aufgezeichnet. Diese Aufzeichnungen wurden bei jedem operativen Eingriff bis zum kompletten Aufwachen der Tiere aus der Narkose durchgeführt. Der Verlauf der Myokardischämie im Bereich des RIVA und seiner Äste wurde mittels EKG dokumentiert und ausgewertet. Abweichungen von der Norm und Veränderungen im Verlauf sind in Abbildung 7 aufgeführt. Das EKG zeigte im Vergleich zum nicht pathologischen EKG vor dem Eingriff (Abbildung 7a) während des akuten Ereignisses typische Veränderungen (Abbildung 7b) in der elektrischen Aktivität des Herzens der Extremitätenableitungen. In den ersten Minuten bis Stunden ist als Ausdruck der subendokardialen Ischämie eine flüchtige Überhöhung von T-Welle, ein sogenanntes Erstickungs-T, aufgetreten. Als Folge der lokalen Ischämie entsteht in diesem anoxischen Bezirk ein „Verletzungsstrom“. Beim transmuralen Infarkt kam es daher zur ST-Elevation mit

positiver T-Welle und erhaltener R-Zacke (monophasische Deformierung des QRS-Komplexes). Durch die Ausbildung einer Muskelnekrose entwickelte sich eine pathologische Q-Zacke und gleichzeitig eine Reduktion der R-Zacke. Im Verlauf kam es zur Rückbildung der ST-Hebung und zur Ausbildung von terminal negativen T-Wellen.

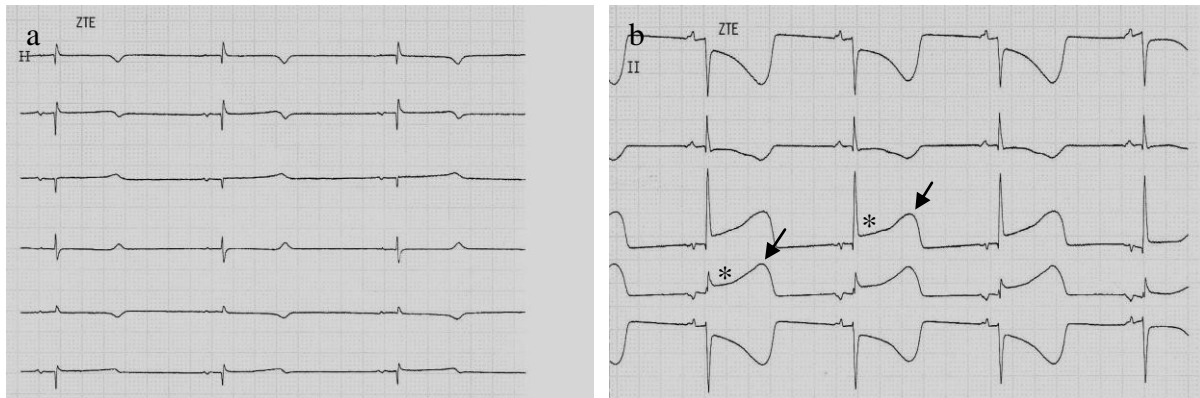


Abbildung 7: EKG vor der Operation im Vergleich zum EKG nach der Induktion einer akuten Ischämie

Im Vergleich zum nicht pathologischen EKG vor der Operation (a) waren die Veränderungen in der elektrischen Aktivität des Herzens eine Stunde nach der Induktion einer akuten Ischämie im Bereich des *Ramus diagonalis 1* des RIVA eindeutig zu sehen. Die kurzfristigen Überhöhungen der T-Wellen (Pfeil) und der ST-Strecken-Hebungen (Stern) mit unmittelbarem Übergang in die T-Wellen traten initial im Akutstadium des Myokardinfarktes auf (b, 60 Minuten Ischämie).

Insgesamt wurde bei 36 Tieren eine akute Myokardischämie mittels selektiver Kathertertechnik induziert. Davon haben 31 der Göttinger Minischweine überlebt, was eine Überlebensrate von 86,12% bedeutet. Die Induktion des akuten Herzinfarktes verlief bei allen Versuchstieren erfolgreich. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen, wie Verklebungen, Flüssigkeitsansammlungen oder hyperämische Bereiche waren bei der Beurteilung der Brusthöhle bei keinem der Minischweine zu erkennen. Alle Versuchstiere, die mit einer selektiven Kathertertechnik behandelt wurden, wiesen makroskopisch sichtbare Befunde am Herzen auf. In Eine-Stunde-Versuchen war ausschließlich das infarzierte Gefäß, der *Ramus diagonalis 1* bzw. 2, makroskopisch verändert. Eine deutlich sichtbare weißlich-bläuliche Verhärtung im Bereich der Ballonokklusion und distal dieser Stelle wies auf die davor stattgefundene Intervention hin. Das ischämische Gebiet sah eine Stunde nach dem akuten Ereignis makroskopisch unauffällig aus. Zwei Tage nach der Ischämieinduktion erschien das Infarktareal abgeblasst mit einer randlichen Hyperämie. Der D1 nahm eine weißlich-glasige Farbe an. Nach einer Erweichungsphase um den 3. bis 7. Tag wurde das Einsinken der ischämischen Gewebe zwei Wochen nach dem Infarkt beobachtet (Abbildung

8a und b). Die beginnende Fibrosierung der Infarktregion zwei Wochen nach der Ischämieinduktion ging im weiteren Verlauf in eine narbige Umwandlung des geschädigten Gewebes über. Das Nekrosegebiet war bei den Versuchstieren zwei Wochen nach dem akuten Infarkt von einem Granulationsgewebe umsäumt. Das Infarktzentrum erschien makroskopisch gelb und war von einem roten Randsaum aus Granulationsgewebe umgeben (Abbildung 8b). Die entnommenen Herzgewebeproben zeigten die oben beschriebenen pathologischen Befunde im Bereich der linken Kammervorderwand und des Septums. Die Farbveränderung umfasste alle Wandschichten von subendo- bis subepikardial. Die beschriebenen Bezirke waren durch eine leichte Verminderung der Wanddicke auffällig. Die Veränderungen im Bereich der Herzvorderwand und des Septums lagen im Versorgungsgebiet des *Ramus diagonalis 1* bzw. 2.

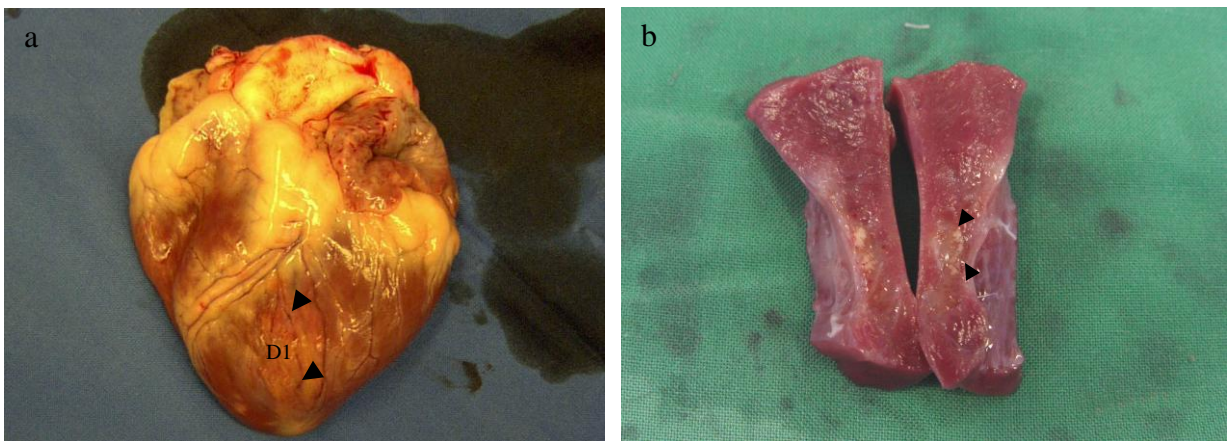


Abbildung 8: Schweineherz zwei Wochen nach einem akuten Myokardinfarkt

Die makroskopischen Veränderungen der Myokardgewebe waren zwei Wochen nach einem akuten ischämischen Ereignis im Versorgungsgebiet des *Ramus diagonalis 1* des RIVA als ein gelbes, abgeblasstes, raues Herzmuskelgewebe zu identifizieren. In der Mitte lag ein dünner, zum Teil unterbrochener *Ramus diagonalis 1* (a, Pfeile). Die gelbe Nekrosezone in der Herzvorderwand (b, Pfeile) war von allen Seiten durch ein Granulationsgewebe von dem nicht betroffenen Myokard abgegrenzt. Der deutliche Unterschied zwischen Infarktgewebe und gesundem Myokard wies auf ein akutes Geschehen im oben genannten Versorgungsgebiet hin. Die transversale Ausdehnung des Infarktes war auf einem Längsschnitt durch die Herzvorderwand feststellbar (b). Die Ischämie betraf alle Herzwandschichten (= transmuraler Infarkt). Die Wanddicke war in diesem Bereich deutlich vermindert, und das nekrotische Gewebe war schon zum Teil durch eine derbe weißliche Bindegewebsschwiele ersetzt.

Um die mikroskopischen Veränderungen des Herzgewebes nach einem akuten Myokardinfarkt zu untersuchen, wurden die Paraffinschnitte von den Herzproben der Versuchstiere eine Stunde, 2 Tage und 2 Wochen nach dem ischämischen Ereignis angefertigt und mit HE-Lösung gefärbt (Abbildung 9). Dies diente der besseren Darstellung der anatomischen Strukturen und der Unterscheidung des ischämischen Gewebes von den nicht betroffenen Herzabschnitten.

Die ersten Zeichen des ischämischen Gewebes konnten schon nach einer Stunde lichtmikroskopisch festgestellt werden (Abbildung 9, 1 Stunde). Die Kardiomyozyten fielen histologisch in diesem Bezirk durch eine verstärkte Zytoplasm eosinophilie, einen vergrößerten Zellumfang sowie eine wellige Anordnung der Muskelzellen auf. Die Z-Bänder und die Glanzstreifen blieben zunächst erhalten. Allmählich wanderten einige Granulozyten in die Nekrosezone ein. Zwei Tage nach dem akuten Myokardinfarkt waren die Zellkerne verloren gegangen (Abbildung 9, 2 Tage). Das ischämische Gebiet war aufgelockert. Die Kardiomyozyten waren schollig zerfallen. Der Rand der Infarktzone war entzündlich verändert und wies zahlreiche Granulozyten auf. Zwei Wochen altes Infarktgewebe hatte ein graues Kolorit und war durch Granulationsgewebe umgebaut (Abbildung 9, 2 Wochen).

Die Daten deuten auf einen erfolgreich induzierten transmuralen Myokardinfarkt hin, der im Verlauf typische Zeichen und Veränderungen des ischämisch geschädigten Gewebes aufweist.

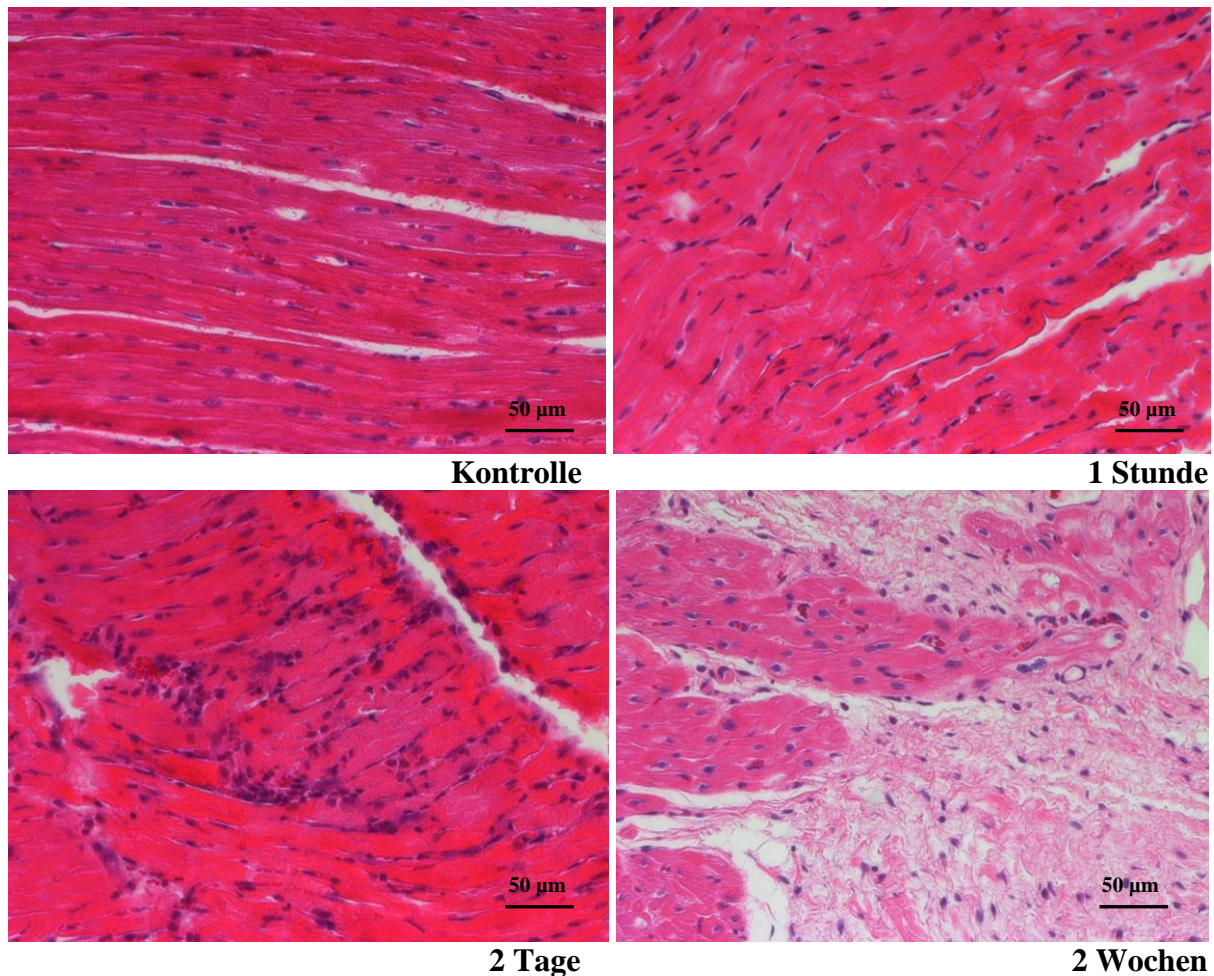


Abbildung 9: HE-Färbung der Herzgewebe zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem akuten ischämischen Ereignis

Die lichtmikroskopischen Veränderungen im ischämischen Herzgewebe waren schon nach einer Stunde bemerkbar. Die Gewebestruktur blieb in diesem Stadium der Ischämie zwar noch erhalten, die Herzmuskelzellen wiesen schon die verstärkte Zytoplasmæosinophilie und eine wellige Deformation auf. Die Einwanderung der Entzündungszellen sorgte für eine Auflockerung der Gewebe im Infarktgebiet. Die große Anzahl der Granulozyten und Makrophagen am Rande der Infarktzone deutete zwei Tage später auf eine entzündliche Reaktion in dem ischämischen Gebiet sowie auf eine vorangegangene Schädigung hin. Die normale Herzgewebestruktur ging zwei Wochen nach dem akuten Ereignis vollständig verloren und wurde durch derbes Granulationsgewebe mit zahlreichen eingeschlossenen Entzündungszellen ersetzt.

3.2 Optimierung der Zellmarkierung und Kathetertechnik für die Zelltransplantation

Die Durchführung einer autologen Zelltransplantation erfordert die vorherige Isolierung der körpereigenen Stammzellen aus dem Knochenmark und deren Kultivierung und Vermehrung *in vitro*. Es ist bekannt, dass das Knochenmark über mehrere Stammzellpopulationen verfügt. Circa 0,5 bis 1×10^8 MNCs konnten aus der Knochenmarkprobe von 20 bis 30 ml isoliert werden.

Die MSCs haben die Eigenschaft, am Kulturschalenboden zu adhären. 3 bis 5 Tage nach der Isolierung bildeten die MSCs mehrere Kolonien am Schalenboden. Die nicht adhärenen Zellen wurden bei dem Mediumwechsel entfernt. Die verbleibenden adhärenen MSCs wurden weiter kultiviert (Abbildung 10). Aus 20 bis 30 ml Knochenmarkblut konnten nach 10 Tagen Kultivierung ca. 1 bis 3 x 10⁷ MSCs gewonnen werden. Die MSCs vom Schwein zeigten eine spindelförmige fibroblastenähnliche Morphologie *in vitro* (Abbildung 10a und b). Für die Transplantation aller MSCs des Knochenmarks wurden sowohl adhärenente als auch nicht adhärenente Zellen kultiviert. Bei den Versuchen wurden ausschließlich die Zellen der 1. bis 2. Passage verwendet.

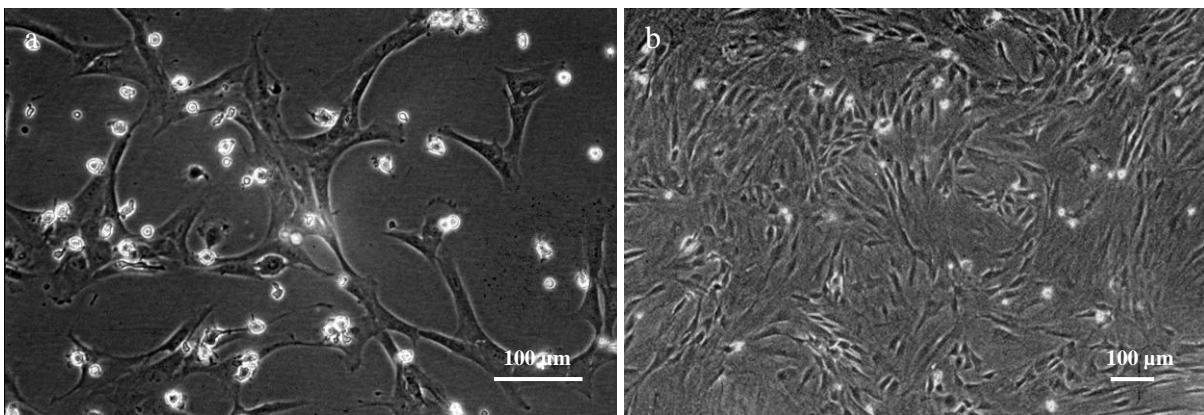


Abbildung 10: Morphologie von MSCs *in vitro*

Die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks weisen eine fibroblastenähnliche Morphologie auf. Die spindelförmigen Zellen wachsen adhären *in vitro* und behalten ihre Morphologie im Laufe der ersten Passagen. Die bedeutende Zunahme der Zellzahl vom 7. (a) bis zum 10. Tag (b) nach der Isolierung ermöglichte eine frühe autologe Transplantation der MSCs.

Zur Identifizierung im Herzgewebe nach der Transplantation wurden die Zellen markiert. Die Markierung spielte die entscheidende Rolle bei der späteren Auswertung der Herzgewebeproben. Zunächst wurden die Zellen mittels des adenoviralen Vektors CMV-β-Gal einen Tag vor der geplanten Injektion transduziert.

Das *LacZ*-Gen aus *Escherichia coli*, das eine β-Galaktosidase codiert, ist ein klassisches Reporter-gen. Die Zellen wurden mit dem Adenovirus CMV-β-Gal transduziert, was zur Expression der bakteriellen β-Galaktosidase unter Kontrolle des CMV-Promotors führt (Abbildung 11a).

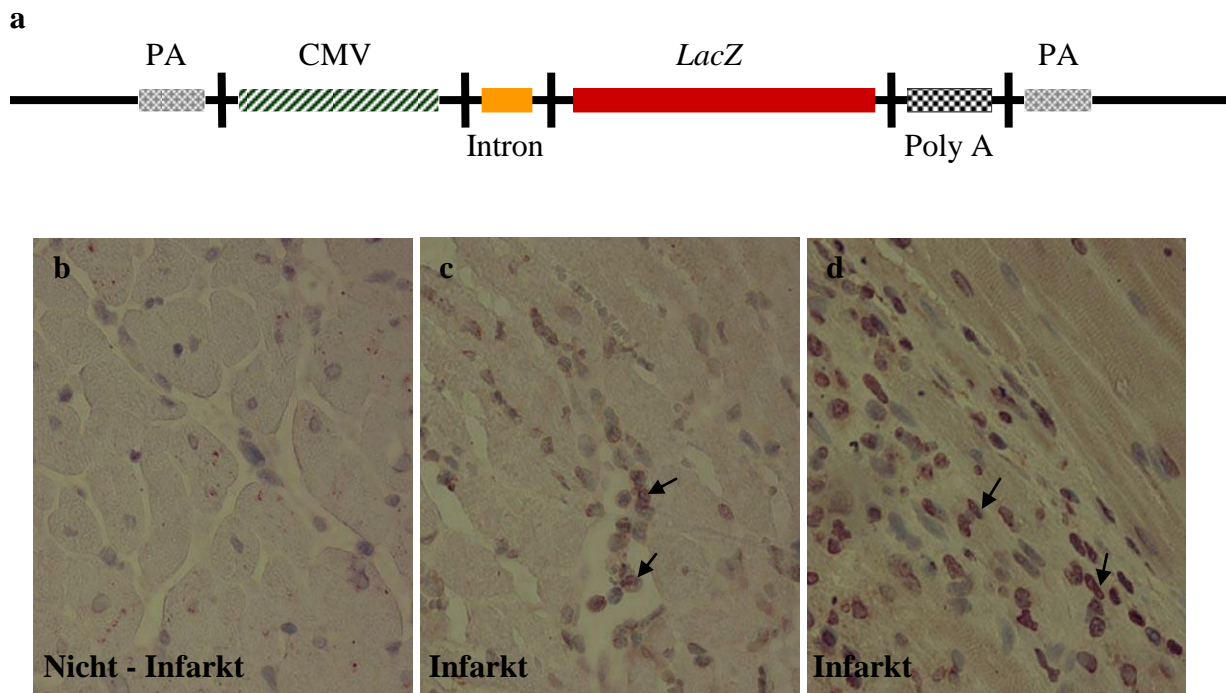


Abbildung 11: β-Galaktosidasefärbung im infarzierten Herzgewebe nach Transplantation von mit dem adenoviralen Vektor CMV-β-Gal transduzierten MSCs

Bei den Versuchen wurde der adenovirale Vektor CMV-β-Gal mit einer *LacZ* Gen-Kodierung für die β-Galaktosidase unter einem konstitutiven Zytomegalievirus-Promotor verwendet (a). Der Nachweis von *LacZ*-Gen gelang in den Herzgewebeproben sowohl nach einer autologen Transplantation von CMV-β-Gal transduzierten MSCs (b und c) als auch bei den Versuchstieren nach einem MI ohne Einsatz der markierten Zellen (d). Die β-Galaktosidase-Aktivität konnte keinen eindeutigen Hinweis auf die Präsenz der transplantierten MSCs im Infarktgewebe der Versuchstiere geben (Pfeile = β-Galaktosidase-Aktivität).

Die MSCs wurden mit verschiedenen Konzentrationen des Virus (100 MOI, 500 MOI, 1000 MOI und 2000 MOI) zur Darstellung der Effizienz bzw. der minimalen Virusdosis für eine erfolgreiche Transduktion behandelt. 500 MOI führten zu einer Transduktionseffizienz von 95%. Die markierten Zellen wurden für eine autologe intrakoronare Zelltransplantation verwendet. Die selektive Kathetertechnik erlaubte eine einfache Identifizierung der Koronargefäße, eine exakte Positionierung des Katheters im infarzierten Gefäß und eine direkte Applikation der transduzierten Zellen in Infarktgebiet. Dank dieser Technik konnten die injizierten Zellen das ischämisch geschädigte Gewebe erreichen.

Eine immunhistochemische Analyse von Herzgewebeproben, die auf der Identifizierung der β-Galaktosidase-Aktivität basierte, folgte im Anschluss an eine autologe Transplantation von MSCs, die mit CMV-β-Gal transduziert wurden. Die Zellen mit β-Galaktosidase-Aktivität wurden sowohl in den Proben aus dem Ischämiegebiet als auch im nicht infarzierten Gewebe nachgewiesen (Abbildung 11b und c). Die Herzgewebeproben von Versuchstieren nach einem MI ohne den Einsatz von markierten Zellen dienten als Kontrollgewebe für den

histochemischen Nachweis des *LacZ*-Reportergens. Die Kontrollproben wiesen ebenfalls Zellen mit β -Galaktosidase-Aktivität auf, sodass die Identifizierung der transplantierten MSCs im Infarktgebiet erschwert war (Abbildung 11d).

Diese Daten weisen darauf hin, dass die *LacZ*-Markierung für die Detektion der intrakoronar transplantierten Zellen im Herzgewebe nicht geeignet ist.

Als Nächstes wurden die MSCs mit dem adenoviralen Vektor QBI-Adeno-GFP transduziert (Abbildung 12). QBI ist ein Adenovirus der ersten Generation, das GFP-Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert (Abbildung 12a). Wie beim adenoviralen Vektor CMV- β -Gal führte MOI 500 vom adenoviralen Vektor QBI-Adeno-GFP zu einer Transduktionseffizienz von 95%. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Gefrierschnitte von den Tieren, welche die QBI-Adeno-GFP-transduzierten Zellen erhalten hatten, wies viele multiple punktförmige Fluoreszenzen, vor allem in der Infarktregion, auf (Abbildung 12b und c). Die fluoreszierenden Signale wurden jedoch auch bei Kontrolltieren nach einem MI, bei denen keine Zelltransplantation durchgeführt wurde, vorgefunden (Abbildung 12d). Somit konnte zwischen der Autofluoreszenz des infarzierten Myokards und einer realen Fluoreszenz injizierter MSCs im ischämischen Herzgewebe nur schwer oder gar nicht unterschieden werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die GFP-Markierungsmethode für die Identifikation der transplantierten Zellen im ischämischen Myokard nicht geeignet ist.

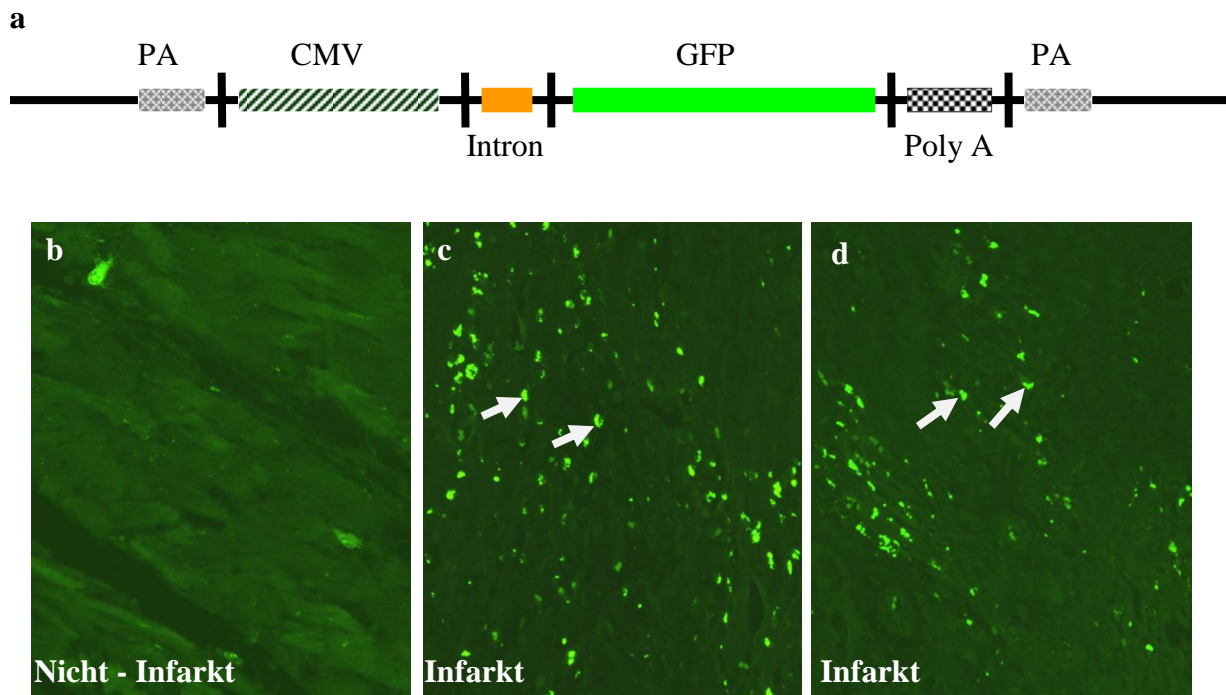


Abbildung 12: Die QBI-Adeno-GFP-transduzierten MSCs im Vergleich zur Autofluoreszenz des ischämischen Myokards

Der adenovirale Vektor QBI-Adeno-GFP, der ein grün fluoreszierendes Protein kodiert und unter der Steuerung des CMV-Promotors steht, wurde bei der Transfektion von MSCs angewendet (a). Die präzise Differenzierung zwischen der Fluoreszenz der markierten Stammzellen und der Autofluoreszenz des infarzierten Gewebes war nach einer autologen Transplantation der GFP-positiven Zellen in den ischämischen Bereich des Myokards erschwert (c und d). Die Fluoreszenz des Herzgewebes stand nicht im Zusammenhang mit der Applikation der markierten Stammzellen, sondern war von der Schädigung des Gewebes abhängig (b und c) (Pfeile = grün fluoreszierendes Signal).

Als Nächstes wurden zwei unterschiedliche Fluoreszenzfärbungen der Zellen für eine direkte Visualisierung der transplantierten Zellen nach einem Herzinfarkt erforscht. Während der fluoreszierende Farbstoff CM-DiI die Zellmembran der Zellen markiert, färbt der Farbstoff DAPI die Zellkerne der Zellen an. Auf diese Weise wurden über 95% der Zellen mit beiden Farbstoffen markiert. Jede rot fluoreszierende CM-DiI-positive Zelle hatte *in vitro* (Abbildung 13a-c) einen eindeutig DAPI-gefärbten Zellkern. Zwei Wochen nach der Transplantation *in vivo* konnten die markierten Zellen im Herzgewebe identifiziert werden (Abbildung 14a-e). Die auf diese Weise markierten Zellen konnten sowohl in der Infarktzone als auch in der Nicht-Infarkt-Region vorgefunden werden (Abbildung 14d-e). Bei den Kontrollproben ohne Zelltransplantation wurden keine CM-DiI- bzw. DAPI-Signale detektiert.

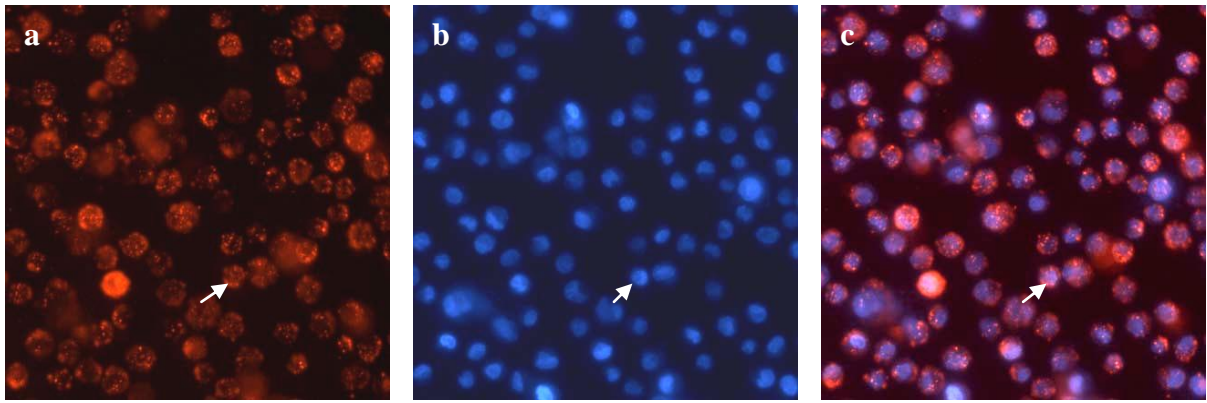


Abbildung 13: Zellmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen CM-DiI und DAPI *in vitro*

Der rot fluoreszierende Farbstoff CM-DiI färbt die Zellmembran der MNCs an (a). Die Zellkerne wurden *in vitro* durch die weitere Markierung mit dem DAPI-Farbstoff mit dem Ziel, die applizierten Zellen *in vivo* leicht zu bestimmen, sichtbar gemacht (b). Die mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen konnten eindeutig identifiziert werden. Die Pfeile zeigen auf die entsprechenden CM-DiI/DAPI-positiven Zellen.

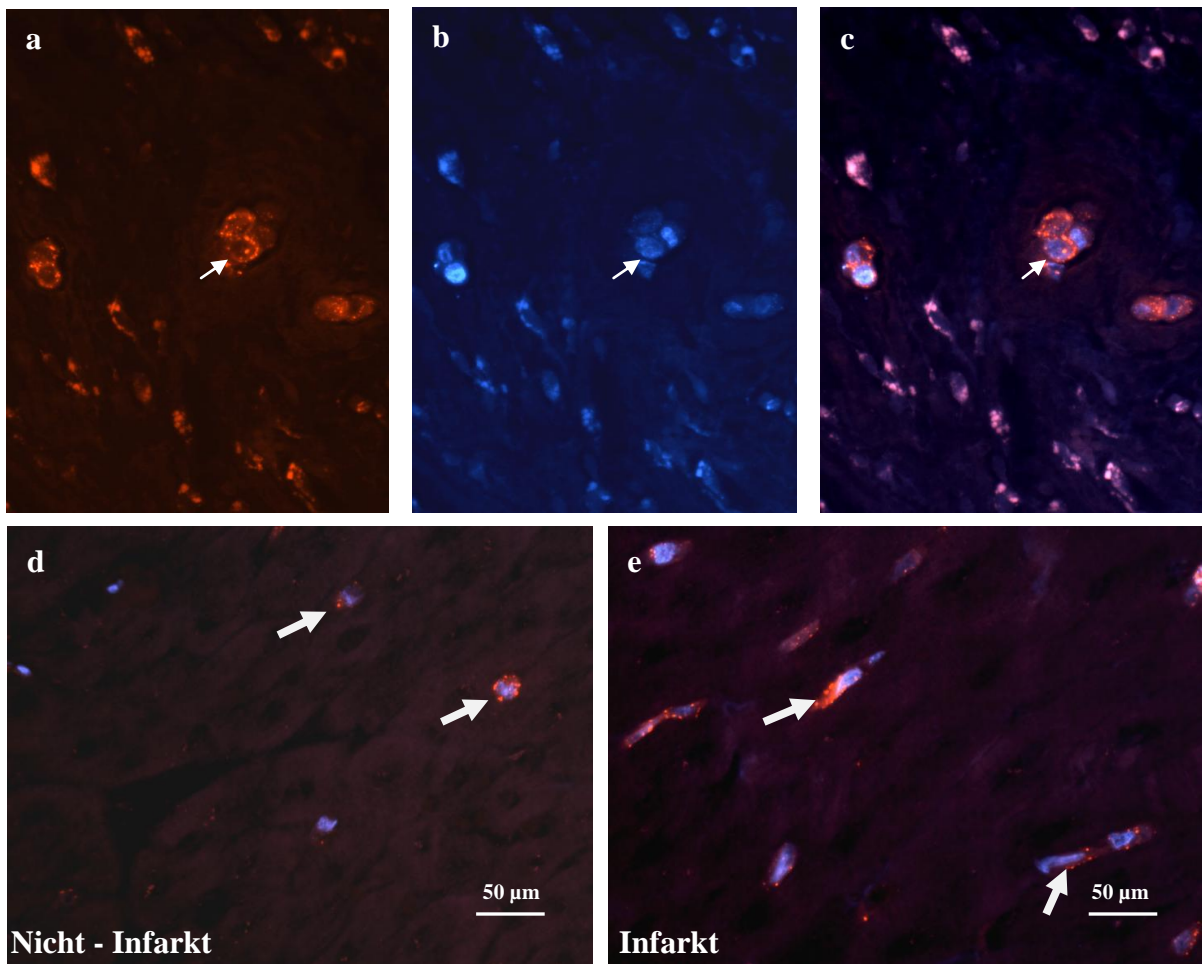


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Herzgewebeproben nach der Applikation der mit CM-DiI- und DAPI-Farbstoff markierten Zellen

Die transplantierten MNCs waren im Myokard durch ein rotes Signal der Zellmembran (a und c) und eine blaue Färbung des Zellkerns (b und c) zu identifizieren (Pfeile). Die markierten Zellen konnten sowohl in der Infarktregion (e) als auch im nicht von Ischämie betroffenen Herzgewebe nachgewiesen werden (d).

Die mit CM-DiI und DAPI gefärbten Zellen konnten im Gegensatz zu den β -Gal- oder GFP-markierten Zellen verlässlich und eindeutig durch Fluoreszenzmikroskopie der Herzgewebe identifiziert werden. Für die intrakoronare Zelltransplantation in das ischämische Myokard wurde die selektive Kathetertechnik angewendet. Die markierten Zellen wurden dabei mithilfe eines Katheters in das Infarktgebiet appliziert. Die nachfolgenden Versuche wurden ausschließlich mit den durch CM-DiI- und DAPI-Fluoreszenzfarbstoffen markierten MNCs und MSCs durchgeführt.

3.3 Zeitpunkt der Zelltransplantation und Überlebensfähigkeit der Zellen

Des Weiteren wurde der Frage nach dem optimalen Zeitpunkt für eine autologe Transplantation nach einem akuten Ischämieereignis mit dem Ziel der Steigerung der Effektivität einer Zelltherapie nachgegangen. Unter Berücksichtigung der Studien von Wang JS et al. (2001) und Li RK et al. (2001) über den erheblichen Einfluss der unmittelbaren Umgebung der Stammzellen auf ihre Entwicklung und Differenzierung wurden die Applikationsprotokolle in der vorgeliegenden Studie so gestaltet, dass ein Teil der Versuchstiere möglichst rasch nach dem akuten Ereignis und ein anderer Teil nach dem Abklingen der entzündlichen Phase mit den autologen Zellen aus dem Knochenmark behandelt wurde. Die Protokolle I und II wurden weitgehend identisch gestaltet (Tabelle 1). Sie unterschieden sich lediglich im Zeitpunkt der Zelltransplantation. Die Göttinger Minischweine wurden in Protokoll I 10 Minuten nach der Wiedereröffnung des *Ramus diagonalis 1* und in Protokoll II 10 Tage nach dem akuten Ereignis mit den autologen MNCs behandelt. Die Entnahme der Gewebeproben und die fluoreszenzmikroskopische Auszählung der gleichzeitig mit CM-DiI- und DAPI-Farbstoffen markierten Zellen in der Infarktregion erfolgten eine Stunde, 2 Tage sowie 2 Wochen nach der Zelltransplantation.

Im Protokoll I wurden $0,214 \pm 0,029\%$ der Zellen nach einer Stunde gefunden. Nach 2 Tagen bzw. 2 Wochen wurden signifikant mehr Zellen ($0,580 \pm 0,101\%$, $p < 0,01$ bzw. $0,533 \pm 0,119\%$, $p < 0,05$) identifiziert (Abbildung 15). Die 2-Wochen-Versuche wiesen eine unveränderte Zellzahl ($p > 0,05$) im Vergleich zu den 2-Tage-Versuchen auf. Weiterhin waren bei den 2-Tage- und bei den 2-Wochen-Versuchen mehr Zellen als bei den Eine-Stunde-Versuchen vorhanden, was auf das Überleben bzw. die Proliferation der transplantierten Zellen in der Infarktregion hindeuten kann.

Im Protokoll II konnten $0,239 \pm 0,057\%$ der Zellen nach einer Stunde wiedergefunden werden. Bei den 2-Tage-Versuchen ($0,344 \pm 0,065\%$, $p > 0,05$) und bei den 2-Wochen-Versuchen ($0,363 \pm 0,100\%$, $p > 0,05$) wurden mehr Zellen im Vergleich zu den Eine-Stunde-Versuchen gefunden; die Ergebnisse wiesen aber keine Signifikanz auf (Abbildung 15).

Die Anzahl der markierten Zellen eine Stunde nach der Transplantation in das Infarktgebiet der operierten Tiere des Protokolls I ($0,214 \pm 0,029\%$) und des Protokolls II ($0,239 \pm 0,057\%$) unterschied sich nicht wesentlich voneinander ($p > 0,05$, Abbildung 15).

Wesentlich deutlichere Effekte der Zelltransplantation konnten in den 2-Tage-Versuchen beobachtet werden. Die signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Stammzellapplikation konnten beim Vergleich von Infarktproben beider Protokolle festgestellt werden ($p < 0,05$, Abbildung 15). Während im Protokoll I $0,580 \pm 0,101\%$ der eingesetzten Zellen identifiziert werden konnten, waren im Protokoll II $0,344 \pm 0,065\%$ der markierten Zellen vorhanden.

Bei den 2-Wochen-Versuchen wurden im Protokoll I ($0,533 \pm 0,119\%$) mehr Zellen als im Protokoll II ($0,363 \pm 0,100\%$) gefunden. Der Unterschied war aber nicht signifikant ($p > 0,05$, Abbildung 15).

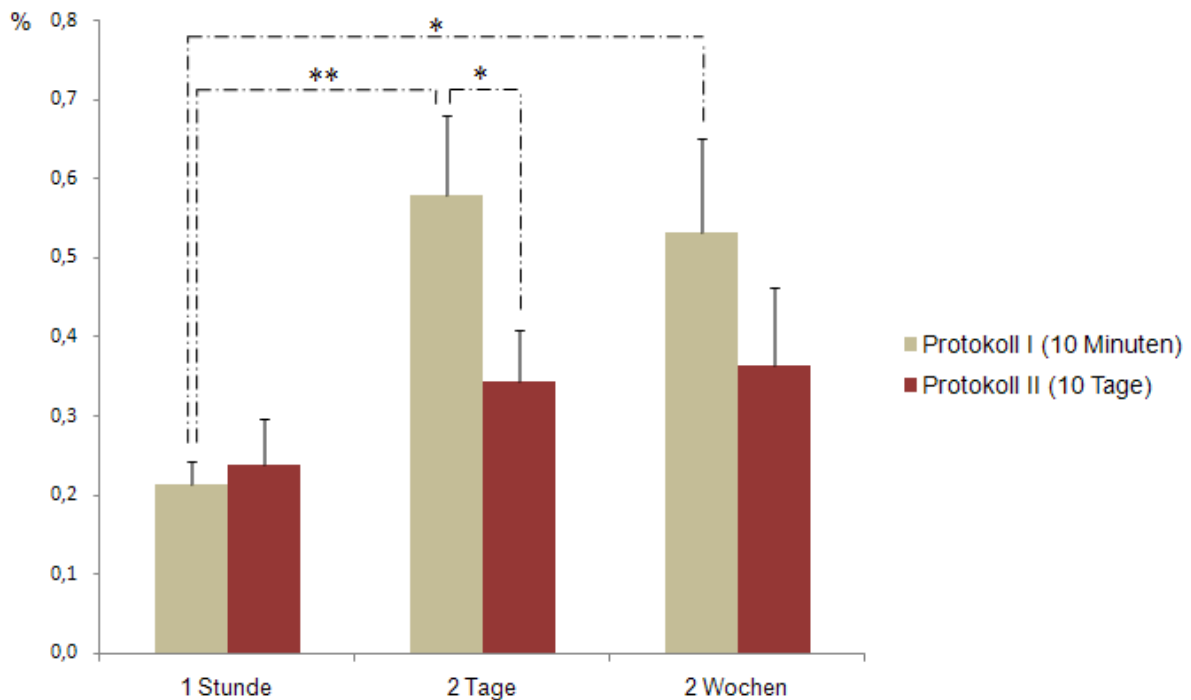


Abbildung 15: Fluoreszenzanalyse der Herzgewebeproben aus der Infarktregion nach einer frühen (Protokoll I, 10 Minuten) und einer späten (Protokoll II, 10 Tage) intrakoronaren Transplantation von autologen MNCs

Nach einer 10-minütigen Reperfusion und einer anschließenden Transplantation von MNCs ins ischämische Herzgewebe der 2-Tage-Versuche waren signifikant mehr MNCs in der Infarktregion vorhanden (Protokoll I) als nach einer Zelltransplantation 10 Tage nach dem akuten Ereignis (Protokoll II). Die Ergebnisse der Eine-Stunde- bzw. 2-Wochen-Versuche wiesen dagegen keine Signifikanz beim Vergleich beider Protokolle auf. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Herzgewebeproben erfolgte anhand der Markierung der zu applizierenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die Darstellung der Zellzahl erfolgte als absoluter Anteil in Prozent, bezogen auf die 10^7 transplantierten Zellen \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede sind mit (***) für $p < 0,001$, (**) für $p < 0,01$ und (*) für $p < 0,05$ markiert.

Diese Daten sprechen für eine frühe Zelltransplantation, wie sie im Protokoll I der durchgeführten Studie dargestellt ist.

3.4 Zelltyp für die Zelltransplantation

Die Unterschiede zwischen der alleinigen Transplantation von mesenchymalen Stammzellen und der Applikation von allen mononukleären Zellen des Knochenmarks sollten in der vorgeliegenden Studie miteinander verglichen werden.

Die Applikationsprotokolle I und III waren so gestaltet, dass sie sich nur im verwendeten Zelltyp bei der intrakoronaren Transplantation unterschieden (Tabelle 1). Während im Protokoll I die Gesamtheit der aus dem Knochenmark isolierten autologen mononukleären

Zellen transplantiert wurde, wurden die Göttinger Minischweine im Protokoll III nur mit den mesenchymalen Stammzellen behandelt.

Im Protokoll III konnten $0,269 \pm 0,035\%$ der Zellen nach einer Stunde wiedergefunden werden. Bei den 2-Tage-Versuchen waren signifikant mehr Zellen ($0,422 \pm 0,040\%$, $p < 0,05$) im Vergleich zu den Eine-Stunde-Versuchen vorhanden. Die 2-Wochen-Versuche wiesen signifikant noch mehr Zellen ($0,750 \pm 0,174\%$, $p < 0,05$) im Vergleich zu den 2-Tage-Ergebnissen auf. Die Daten der beiden Protokolle deuten auf das Überleben bzw. die Proliferation der transplantierten Zellen in der Infarktregion hin.

Die Anzahl der markierten Zellen eine Stunde nach der Transplantation ins Infarktgebiet der operierten Tiere des Protokolls I ($0,214 \pm 0,029\%$) und des Protokolls III ($0,269 \pm 0,035\%$) wies keinen signifikanten Unterschied auf ($p > 0,05$, Abbildung 16).

Die Ergebnisse der 2-Tage-Versuche ließen genau wie die Ergebnisse der 2-Wochen-Versuche auch keinen signifikanten Einfluss des eingesetzten Zelltyps bei der Transplantation auf die Anzahl der applizierten Zellen im Infarktgewebe erkennen ($p > 0,05$, Abbildung 16). Während bei der Transplantation der MSCs $0,422 \pm 0,040\%$ in 2-Tage-Versuchen und $0,750 \pm 0,174\%$ der injizierten Zellen in 2-Wochen-Versuchen im ischämischen Gewebe vorhanden waren, wurden beim Einsatz der MNCs entsprechend $0,580 \pm 0,101\%$ und $0,533 \pm 0,119\%$ der Zellen identifiziert.

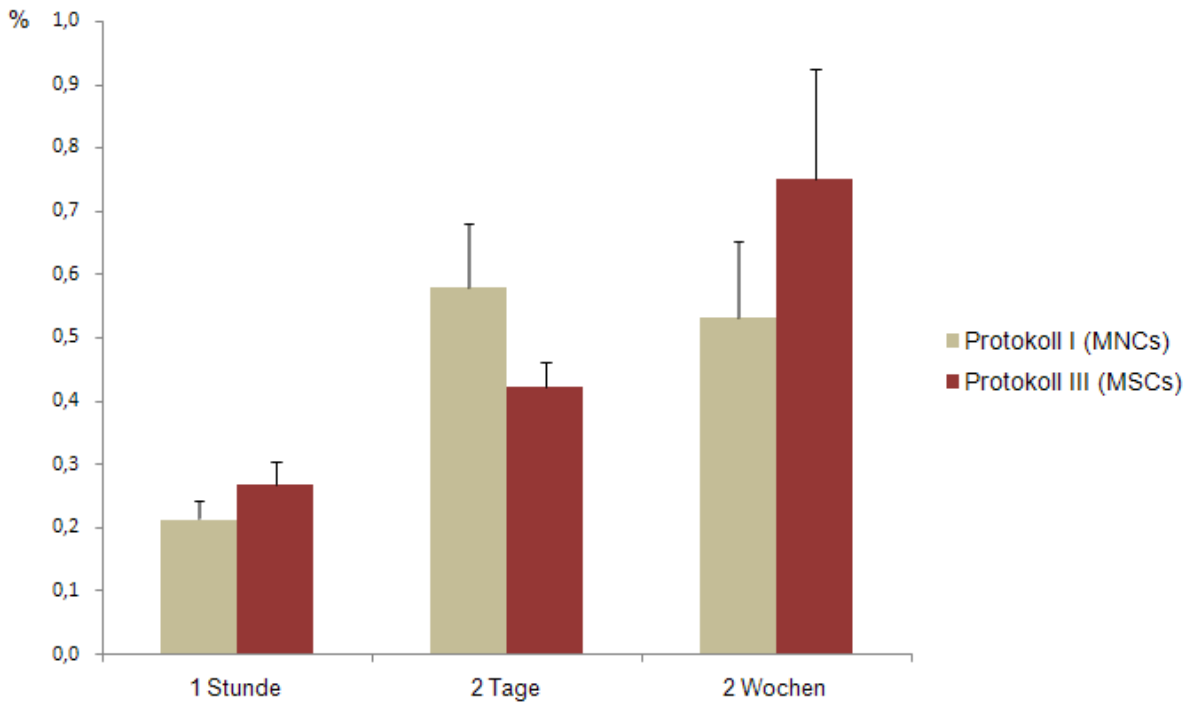


Abbildung 16: Fluoreszenzanalyse der Herzgewebeproben aus der Infarktregion in Abhängigkeit vom eingesetzten Zelltyp (Protokoll I, MNCs; Protokoll III, MSCs)

Die Auswertung der Verteilung der transplantierten Zellen im Infarktgebiet in beiden Protokollen wies keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Einsatz von MNCs und MSCs auf. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Herzgewebeproben erfolgte anhand der Markierung der zu applizierenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die Darstellung der Zellzahl erfolgte als absoluter Anteil in Prozent, bezogen auf die 10^7 transplantierten Zellen \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede sind mit (***) für $p < 0,001$, (**) für $p < 0,01$ und (*) für $p < 0,05$ markiert.

Aus den Ergebnissen der Fluoreszenzanalyse ist abzuleiten, dass die Anwendung aller mononukleären Zellen des Knochenmarks im Vergleich zum Einsatz der mesenchymalen Stammzellen allein für die Regeneration des Herzgewebes nach einem akuten ischämischen Ereignis keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der transplantierten Zellen in Infarktgewebe hat.

3.5 Verteilung der transplantierten Zellen im Herzgewebe

Um die Verteilung der transplantierten Zellen im Herzgewebe zu untersuchen, wurden die Proben aus der Infarktregion (Infarktgewebe und „border zone“) im Vergleich zu den Kontrollen (Nicht-Infarktgewebe aus dem rechten Ventrikel) analysiert.

Bei allen Gruppen der Protokolle I bis III war eine signifikante Mehrpräsenz der injizierten Zellen in der Infarktregion im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verteilung der transplantierten Zellen der Infarktregion im Vergleich zu den Kontrollproben

| Protokoll | Zeitpunkt | Infarktregion (%) | Kontrolle (%) | Signifikanz (p) |
|------------|-----------|-------------------|---------------|-----------------|
| I | 1 Stunde | 0,214 ± 0,029 | 0,046 ± 0,013 | < 0,001 |
| | 2 Tage | 0,580 ± 0,101 | 0,064 ± 0,035 | < 0,001 |
| | 2 Wochen | 0,533 ± 0,119 | 0,105 ± 0,030 | < 0,01 |
| II | 1 Stunde | 0,239 ± 0,057 | 0,033 ± 0,018 | < 0,001 |
| | 2 Tage | 0,344 ± 0,065 | 0,163 ± 0,033 | < 0,01 |
| | 2 Wochen | 0,363 ± 0,100 | 0,026 ± 0,009 | < 0,01 |
| III | 1 Stunde | 0,269 ± 0,035 | 0,093 ± 0,024 | < 0,01 |
| | 2 Tage | 0,422 ± 0,040 | 0,035 ± 0,011 | < 0,001 |
| | 2 Wochen | 0,750 ± 0,174 | 0,006 ± 0,004 | < 0,001 |

Weiterhin wurden die CM-DiI- und DAPI-positiven Zellen je nach ihrer Lage im Infarktgebiet nach extravasal (Abbildung 17a) und intravasal (Abbildung 17b) gelegen differenziert. Diese Unterscheidung sollte einerseits die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Analyse detaillierter darstellen, andererseits die eventuelle Veränderung der Lage der injizierten Zellen im Laufe der Zeit nach einem akuten ischämischen Ereignis im Herzen dokumentieren.

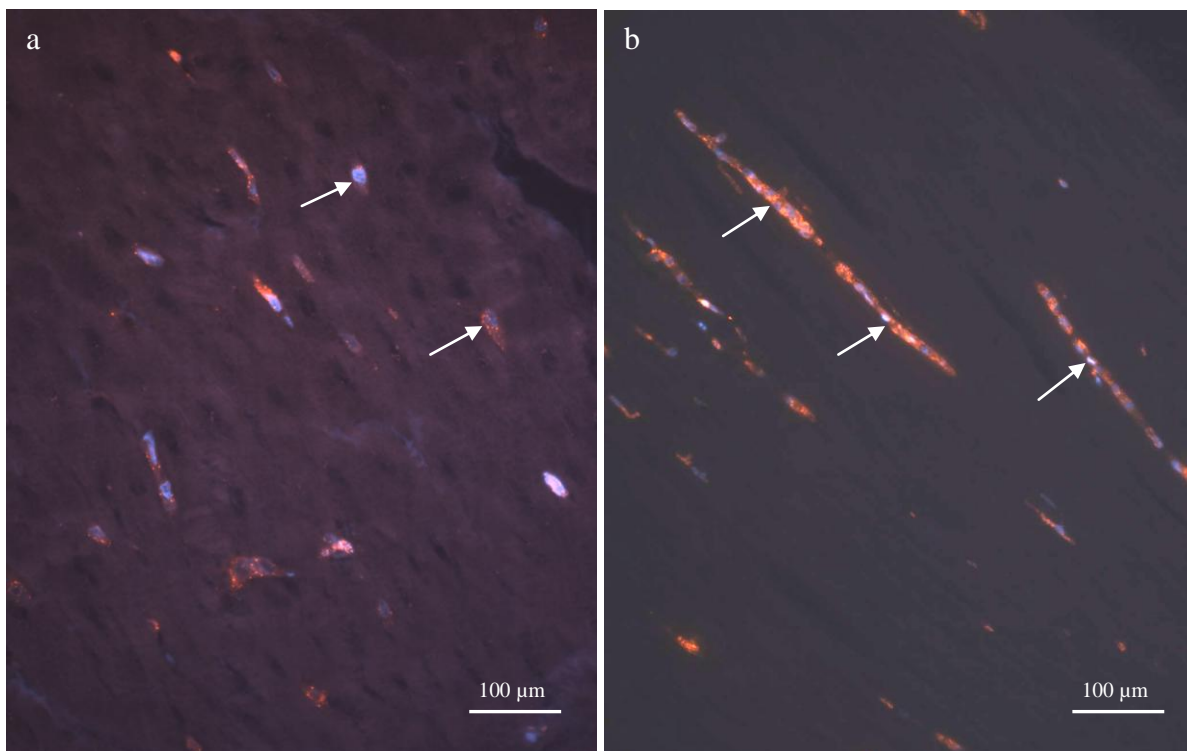


Abbildung 17: Detektion der CM-DiI- und DAPI-positiven Zellen nach einer intrakoronaren Zelltransplantation ins Schweineherz im Gewebe und in den Gefäßen

Die Verteilung der Zellen im Herzgewebe wurde nach ihrer Lage nach intravasal und extravasal bei der Auswertung der Herzschnitte unterschieden. Die injizierten Zellen in einem Blutgefäß waren in einer Linie angeordnet, wobei die CM-DiI- und DAPI-positiven Zellen vom übrigen Gewebe durch die Gefäßwände deutlich abgegrenzt waren (b, Pfeile). Wenn die Zellen nicht durch eine Gefäßwand umhüllt waren, wurden sie als extravasal gelegen bezeichnet (a, Pfeile).

Die Infarktgrenzen bei den Eine-Stunde-Versuchen des Protokolls I und III (Tabelle 1) konnten nicht eindeutig identifiziert werden, da nach einer Stunde die mikroskopischen Veränderungen im ischämisch geschädigten Gewebe nur minimal vorhanden waren, sodass die entsprechenden Proben auf die Lage der transplantierten Zellen im Herzgewebe nicht untersucht wurden. Bei den 2-Tage- und den 2-Wochen-Versuchen konnte dagegen die Infarktregion eindeutig identifiziert werden. Bei allen Gruppen beider Protokolle war eine überwiegend intravasale Lage der transplantierten Zellen festzustellen.

Im Infarktgewebe der 2-Tage-Versuche des Protokolls I (Abbildung 18) waren $0,152 \pm 0,054\%$ im Gewebe und $0,428 \pm 0,116\%$ der applizierten MNCs in Gefäßen vorhanden. Die markierten Zellen wiesen in den 2-Wochen-Versuchen entsprechend zu $0,196 \pm 0,062\%$ eine extravasale und zu $0,337 \pm 0,100\%$ eine intravasale Lage auf. Die Unterschiede waren in beiden Versuchsreihen signifikant ($p < 0,05$).

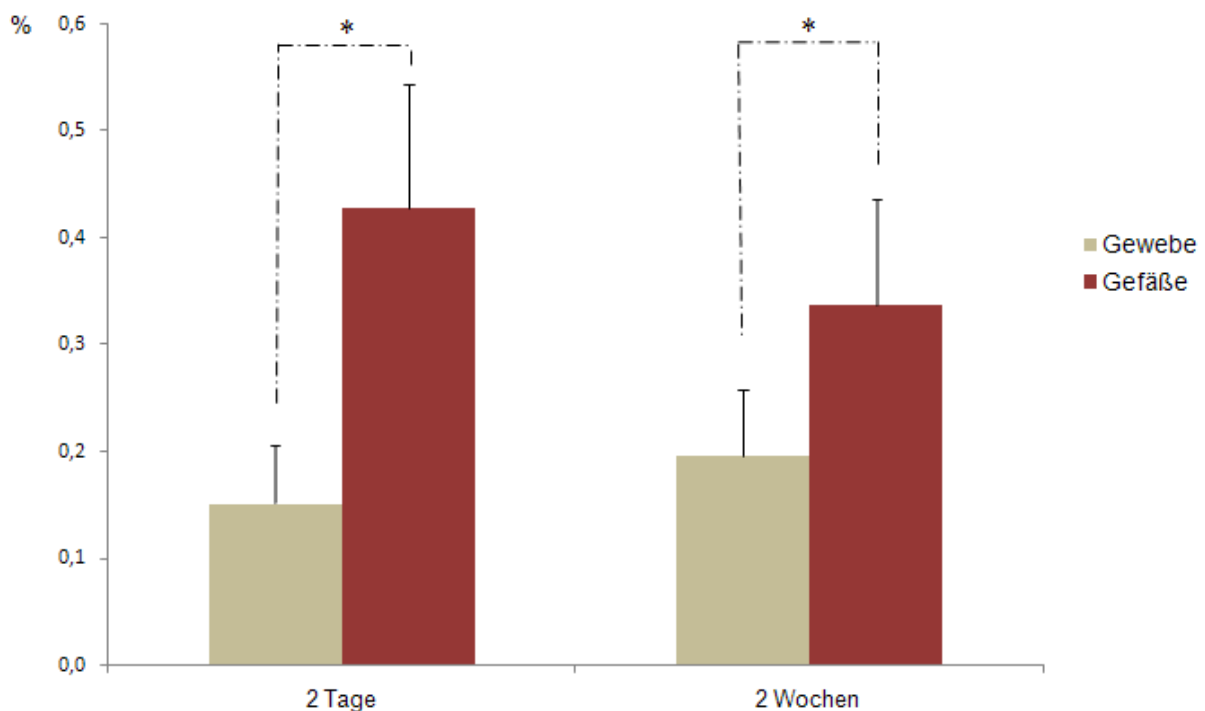


Abbildung 18: Verteilung der transplantierten MNCs im Infarktgewebe (Protokoll I)

Die 10 Minuten nach einem akuten Myokardinfarkt transplantierten MNCs wiesen in beiden Gruppen überwiegend eine intravasale Lage auf. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Herzgewebeprobe erfolgte anhand der Markierung der zu applizierenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die Darstellung der Zellzahl erfolgte als absoluter Anteil in Prozent, bezogen auf die 10^7 transplantierten Zellen \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede sind mit (***) für $p < 0,001$, (**) für $p < 0,01$ und (*) für $p < 0,05$ markiert.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei den entsprechenden Versuchen des Protokolls III mit den mesenchymalen Stammzellen erzielt (Abbildung 19). Bei der Auswertung der Infarktgewebeproben wurden folgende Unterschiede in der Verteilung der applizierten Zellen festgestellt. Bei den 2-Tage-Versuchen konnte eine signifikant höhere Anzahl an transplantierten Zellen intravasal beobachtet werden ($p < 0,001$). Die Lage der Zellen in der Infarktregion der 2-Wochen-Versuche unterschied sich nicht wesentlich von einander ($p > 0,05$). Während $0,093 \pm 0,016\%$ der CM-DiI- und DAPI-positiven Zellen extravasal und $0,329 \pm 0,052\%$ intravasal zwei Tage nach der Transplantation vorhanden waren, wies die Infarktregion bei den 2-Wochen-Versuchen $0,293 \pm 0,088\%$ der injizierten Zellen im Gewebe und $0,457 \pm 0,118\%$ in Gefäßen auf.

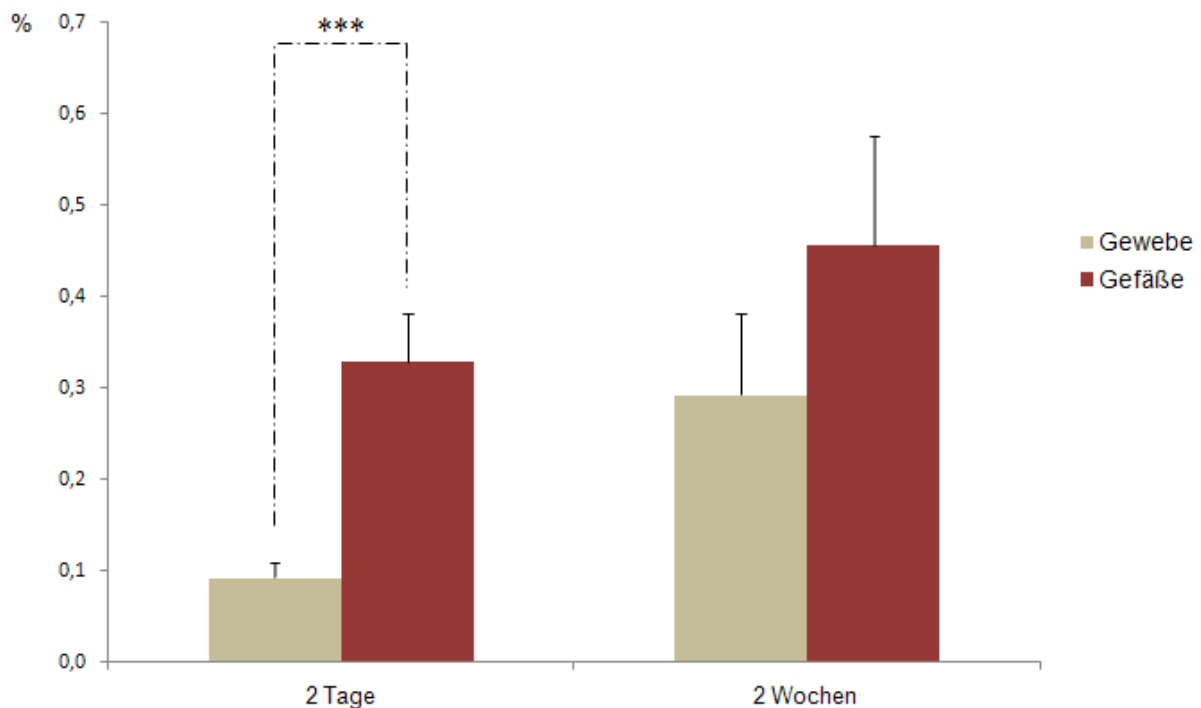


Abbildung 19: Verteilung der transplantierten MSCs im Infarktgewebe (Protokoll III)

Die 10 Minuten nach einem akuten Myokardinfarkt transplantierten MSCs wiesen sowohl nach zwei Tagen als auch nach zwei Wochen eine überwiegend intravasale Lage auf. Im Gegensatz zu den 2-Wochen-Versuchen war bei den 2-Tage-Versuchen ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Zellen festzustellen. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Herzgewebeproben erfolgte anhand der Markierung der zu applizierenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die Darstellung der Zellzahl erfolgte als absoluter Anteil in Prozent, bezogen auf die 10^7 transplantierten Zellen \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede sind mit (***) für $p < 0,001$, (**) für $p < 0,01$ und (*) für $p < 0,05$ markiert.

Die Verteilung der applizierten Zellen des Protokolls II nach ihrer Lage in intra- und extravasal gelegen ließ eine Stunde bzw. zwei Wochen nach der Zelltransplantation keinen deutlichen Unterschied erkennen ($p > 0,05$). Bei den 2-Tage-Versuchen konnte dagegen eine

signifikante Verteilung der Zellen nach intravasal beobachtet werden ($p < 0,05$). Im Infarktgewebe der Eine-Stunde-Versuche konnten $0,123 \pm 0,046\%$ der MNCs extravasal und $0,116 \pm 0,026\%$ der Zellen intravasal identifiziert werden. Während bei den 2-Tage-Versuchen $0,096 \pm 0,032\%$ extravasal und $0,248 \pm 0,058\%$ der Zellen intravasal identifiziert werden konnte, wiesen die Infarktgewebeproben der 2-Wochen-Versuche $0,137 \pm 0,046\%$ der injizierten Zellen im Gewebe und $0,226 \pm 0,074\%$ der MNCs in Gefäßen auf.

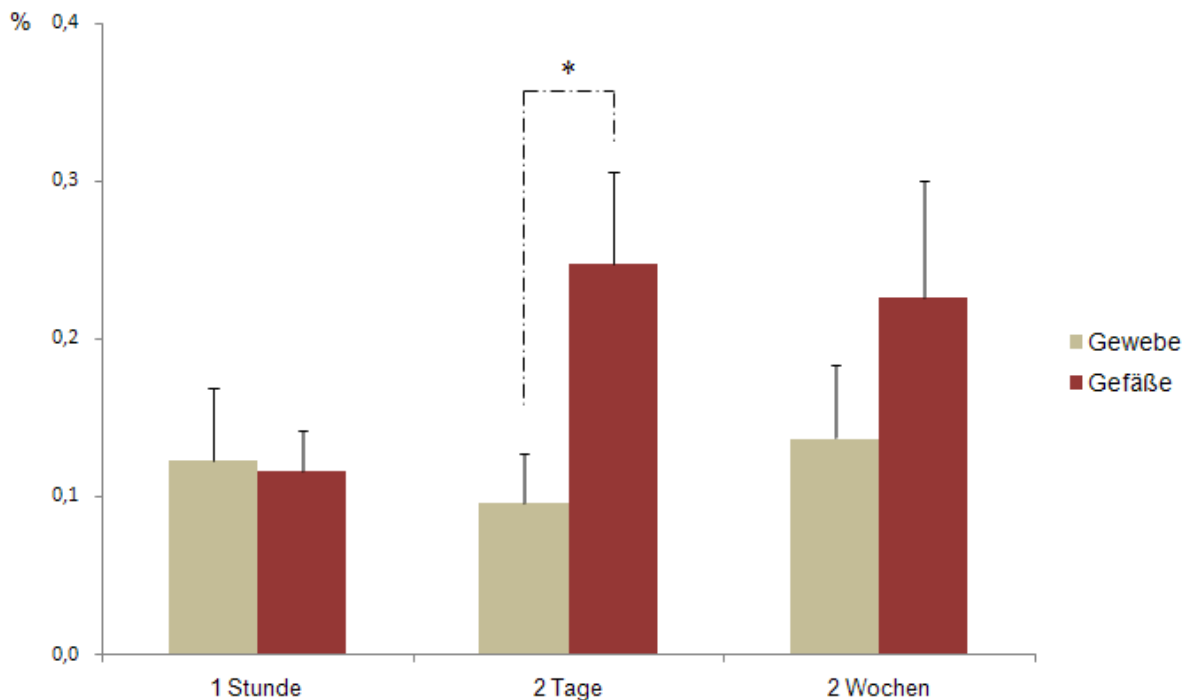


Abbildung 20: Verteilung der transplantierten MNCs im Infarktgewebe (Protokoll II)

Die Unterscheidung nach der intra- bzw. extravasalen Lage der Zellen in Eine-Stunde- und 2-Wochen-Versuchen wies keine Signifikanz auf. Die 2-Tage-Versuche ließen eine signifikant größere Anzahl an applizierten MNCs intravasal erkennen. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Herzgewebeproben erfolgte anhand der Markierung der zu applizierenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die Darstellung der Zellzahl erfolgte als absoluter Anteil in Prozent, bezogen auf die 10^7 transplantierten Zellen \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede sind mit (***) für $p < 0,001$, (**) für $p < 0,01$ und (*) für $p < 0,05$ markiert.

Die Ergebnissen der Verteilung der transplantierten Zellen im Herzen lassen darauf schließen, dass ein größerer Teil der injizierten Zellen bei allen Protokollen unabhängig von der Versuchsdauer, dem Zelltyp und dem Zeitpunkt der Transplantation sich intravasal befand.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Knochenmarkpunktions- und Myokardinfarktmodell am Minischwein etabliert. Die mononukleären Zellen und die mesenchymalen Stammzellen wurden aus Knochenmarkblut isoliert und *in vitro* kultiviert.

Die Induktion eines akuten Myokardinfarktes mittels selektiver Kathetertechnik verlief bei allen Tieren erfolgreich. Die Ischämie im Versorgungsgebiet des *Ramus diagonalis 1* des RIVA ließ sich mittels EKG und später auch makroskopisch und mikroskopisch bestätigen. Die Zellen konnten *in vitro* erfolgreich mit den Fluoreszenzfarbstoffen CM-DiI und DAPI markiert und *in vivo* eindeutig identifiziert werden. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass sich die Knochenmarkzellen nach einer direkten Transplantation in infarzierte Schweineherzen vermehren und im Laufe der 2 Wochen nach der Zelltransplantation dauerhaft präsent bleiben. Eine frühe intrakoronare Applikation der Zellen nach einem akuten Myokardinfarkt wies einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu einer späten Transplantation auf. Der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen im Vergleich zu der Injektion aller MNCs des Knochenmarkes wies keine signifikanten Unterschiede auf. Die überwiegend intravasale Lage der Zellen konnte bei allen Versuchen belegt werden.

4.1 Das Schwein als Infarktmodell

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Großtiermodell für einen akuten Myokardinfarkt *in vivo* als Ischämie-Reperusionsmodell etabliert. Die Notwendigkeit der Entwicklung neuer pharmakologischer Behandlungen und therapeutischer Interventionen ist für den Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz von größter Bedeutung. Der Weg von der Entdeckung über das Verständnis hin zur klinischen Anwendung der biologischen Grundlagen von Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz kann nur unter dem Einsatz von Großtiermodellen, die diesen klinischen Phänotyp rekapitulieren können, begangen werden.

Bis jetzt werden sowohl aus Unterbringungs- als auch nicht zuletzt aus finanziellen Gründen in zahlreichen Laboratorien Kleintiere favorisiert. Mausmodelle haben sich in der Erforschung humaner Erkrankungen bewährt. Dies liegt zum einen daran, dass die Erfassung von Daten aufgrund des kurzen Entwicklungszyklus dieser Tieren sehr schnell geht, zum anderen daran, dass Mäuse in ihrer genetischen Ausstattung dem Menschen sehr ähneln, was die Größe des Genoms und Anzahl der Gene angeht. Die operative Ligierung des RIVA an Mäuseherzen gehört mittlerweile zu den üblichen standardisierten Verfahren zur

Untersuchung morphologischer und biochemischer Folgen eines Myokardinfarktes (Li B et al., 1997; Patten et al., 1998). Wie bei jedem Tiermodell, so liegt das Augenmerk auch hierbei darauf, zu beweisen, dass sich als Folge dieser Operation bei Tieren ähnliche pathologische Veränderungen ergeben wie beim Menschen. Auch das Rattenmodell hat bezüglich der Pathophysiologie nach einem Myokardinfarkt viele Gemeinsamkeiten mit der Pathophysiologie des Menschen, wie z.B. das linksventrikuläre Remodelling oder neurohumorale und molekulare Veränderungen (Hort et al., 1964).

Allerdings bestehen erhebliche Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen in Bezug auf bestimmte Herzmerkmale, wie Herzfrequenz, Sauerstoffaufnahme, Adrenozeptor-Verhältnisse und die Reaktion auf den Verlust von regulatorischen Proteinen (Haghighi et al., 2003; Ginis et al., 2004). Außerdem scheint die kontraktile Proteinexpression, die von entscheidender Bedeutung für die Anregung, die Kontraktion und den Kopplungsprozess ist, bei beiden Arten unterschiedlich zu sein, vor allem hinsichtlich der Expression ihrer unterschiedlichen vorherrschenden Myosinisoform (Haghighi et al., 2003). Folglich sind die Interpretation und der Vergleich der Ergebnisse der Kleintiermodellstudien, insbesondere nach Induktion von Herz-Kreislauf-Stress, in Bezug auf die menschliche Herzinfarkt- und Herzinsuffizienz-Pathophysiologie problematisch. Daher sind die Ischämie-Reperfusion-Großtiermodelle, die sich viel mehr an die menschliche Physiologie, Funktion und Anatomie angleichen, wesentlich wichtiger für die Entwicklung der klinischen Therapien und Interventionen bei der Herzinfarktbehandlung.

Historisch gesehen war das adulte Kaninchen-Modell das primäre Modell für die Untersuchung der Auswirkungen von Ischämie und Myokardinfarkt. Das Kaninchen-Ischämie-Reperfusion-Modell wurde in den vergangenen Jahren in zahlreichen Studien für die Erforschung des myokardialen Remodelling nach einem Herzinfarkt und die Entwicklung neuer pharmakologischer Therapiekonzepte in der Behandlung akuter und chronischer Ischämiefolgen verwendet (Reimer und Jennings, 1979; Jackson BM et al., 2002; Erlebacher et al., 1989; Jugdutt und Menon 2004; White et al., 1986; Sabbah et al., 1991, 2003 und 2007). Der Nachteil dieses Modells ist das Vorhandensein zahlreicher Kollateralkreisläufe des Kaninchenmyokards (White et al., 1986), was die Induktion konstanter, gleich großer Ischämiebezirke und folglich die Vergleichbarkeit des Krankheitsverlaufes nach einem ischämischen Ereignis erschwert.

Aus diesem Grund wurde nach alternativen Tiermodellen der Myokardischämie, darunter das Schaf- und Schwein-Ischämie-Reperfusion-Modell, gesucht (Jackson BM et al., 2002; Weaver et al., 1986; Mukherjee et al., 2003; Zeng et al., 2007; Zhang H et al., 2007; Lu et al.,

2007; Gorman et al., 1998; Markovitz et al., 1989; Blom et al., 2005). Dank der konstanten Anatomie der Koronargefäße, wenig bzw. gering ausgebildeter Kollateralkreisläufe und folglich der Möglichkeit, Infarkte vorhersehbarer Größe und Lage zu induzieren, sind sowohl Schafe als auch Schweine für die Erforschung der Myokardischämie und das Postinfarktremodeling geeignet (Weaver et al., 1986; Gorman et al., 1998). Die Einschränkungen bei der Arbeit mit dem Schaf-Modell sind mit den zoonotischen Erkrankungen der Tiere verbunden. Schafe sind Wiederkäuer und erlauben wegen der Anatomie ihres Magen-Darm-Traktes und ihrer Brustwirbelsäule die Anwendung von bildgebenden Verfahren (z.B. Sonografie) nur begrenzt, was ein invasives Vorgehen zur transthorakalen Bildgebung erforderlich macht (Jackson BM et al., 2002; Gorman et al., 1998).

Mehrere Studien führten die Induktion des Myokardinfarktes mit nachfolgender Herzinsuffizienz im Schwein-Ischämie-Modell mittels Okklusion eines Koronargefäßes durch (White et al., 1986). Dabei wurde eine Zunahme der linksventrikulären Dysfunktion mit dem steigenden Grad der Einengung des Herzkranzgefäßes beobachtet. Schweineherzen haben eine dem Menschen sehr ähnliche Anatomie der Koronargefäße bzw. der groben anatomischen Strukturen, sodass sich das Schwein-Ischämie-Reperfusionmodell sehr gut zum Vergleich mit dem Menschen eignet (Weaver et al., 1986; Mukherjee et al., 2003; Zeng et al., 2007; Zhang H et al., 2007; Lu et al., 2007).

Durch die Verwendung von Göttinger Minischweinen, die unter standardisierten Bedingungen aufwuchsen und gehalten wurden, konnten die Versuche unter streng kontrollierten Bedingungen stattfinden. Ihre Ausprägung des Koronarsystems ist dem Menschen insbesondere in der Entwicklung und im Verlauf der linken Koronararterie mit RIVA und RCX sehr ähnlich (Schummer et al., 1984; Winkhard, 2005; Swindle, 1984; Swindle et al., 1986 und 1988).

Das Kollateralsystem ist sowohl beim Menschen als auch bei Schweinen weniger stark entwickelt (White et al., 1986; Maxwell et al., 1987; Schaper et al., 1967). Ihr intrakoronarer Verlauf, ihre verminderte Anzahl, die schwache Entwicklung ihrer Wanddickenstärke und ihre Größe, die nicht die normalen Arteriolenstärke erreicht, haben zur Folge, dass das betroffene Myokard bei Verschluss des RIVA nicht wieder im gleichen Umfang durchblutet werden kann. Folglich kommt es zum Absterben von Gewebe. Die Inzidenz und Größe eines Infarktes ist dadurch beim Schwein viel stärker als beim Hund. Dieser hat ein viel besser entwickeltes Kollateralsystem; die Auslösbarkeit eines Infarktes ist daher bei ihm umso schwieriger (Weaver et al., 1986).

Ein weiterer Vorteil des Schweinmodells ist die anatomische Größe der Tiere bzw. des Schweineherzens gegenüber Kleinsäugerherzen, wobei die Präparation, insbesondere die Katheterisierung der Koronararterien, einfacher durchzuführen ist. Das Verhältnis Herzgewicht / Körpergewicht stimmt mit 0,5% bei 25 bis 30 kg schweren Schweinen mit dem Verhältnis beim Menschen überein. Sind die Schweine schwerer, stimmt das Größenverhältnis nicht mehr; weiterhin gibt es bei diesen Tieren sowohl intraoperativ als auch postoperativ mehr Komplikationen. Sie zeigen verstärkt Arrhythmien, die zu Kammerflimmern und zum plötzlichen Herztod führen. Außerdem ist die Behandlung kleiner Tiere gegenüber einem 130 kg schweren Farmschwein einfach handlicher und sicherer, was den ganzen Versuchsaufbau erheblich erleichtert. In der vorliegenden Arbeit wurden Göttinger Minischweine mit 33 bis 60 kg KG verwendet.

Ein myokardialer Infarkt in Tiermodellen wurde bisher meist in Thorakotomien gezeigt, wobei der Infarkt unter Sicht durch Ligation des RIVA gelegt wurde (Litvak et al., 1957; Fuchs S et al., 2001; Liu et al., 2004). Die Überlegung eines Infarktmodells mittels selektiver Kathertertechnik hat gegenüber einer Thorakotomie entscheidende Vorteile. Das chirurgische Trauma ist bei einer Thorakotomie viel größer als bei der Induktion mittels Ballon. Die damit verbundenen Komplikationen sind größer und bedingen eine höhere Mortalitätsrate. Da der Infarkt selber schon eine starke Beeinträchtigung für das Tier darstellt, ist es sinnvoll, zusätzliche Belastungen so gering wie möglich zu halten. Der Eingriff bei der Balloninfarktlegung ist dagegen ein minimalinvasiver Eingriff, der sich nur auf den Gefäßzugang bezieht (Kraitichman et al., 2000; Naslund et al., 1992).

Außerdem haben Erfahrungen gezeigt, dass die Thorakotomie hinsichtlich der Größe selber Einfluss sowohl auf die kardiale Funktion nach einem Infarkt als auch auf den Infarkt zeigt. Weiterhin sind Artefakte bei der myokardialen Szintigrafie beobachtet worden, diese treten bei diesen Methoden häufiger auf als bei geschlossenen Modellen. Die kardiale Funktion, insbesondere das Herzminutenvolumen, wird außerdem durch einen höheren Einsatz von Anästhesie und Analgesie, die bei so einem großen chirurgischen Einsatz wie der Thorakotomie notwendig ist, beeinträchtigt, und die Belastung ist für das Tier erheblich größer.

Weiterhin erlaubt der Verschluss des Gefäßes mittels Ballon eine weitgehende Kontrolle der Lokalisation und Länge der Ischämie. In anderen Studien, die mit Injektion von thrombogenen Materialien gearbeitet haben, ist die Ischämiedauer nur schwer kontrollierbar, und das Risiko für weitere nicht vorhersehbare Thrombosen durch Abschwemmen dieser

Materialien in weitere Gefäßabschnitte ist erhöht (Dogne et al., 2005; Suzuki et al., 1999; Herr et al., 1988).

Die Anwendung von Kathetern und Ballon ist im klinischen Bereich bereits standardisiert. Die Vorbereitung ist hier einfacher und schneller in ihrem Ablauf. Nach eingeleiteter Anästhesie und erfolgtem Gefäßzugang kann die Katheterisierung des RIVA und die Platzierung des Ballons bereits in 10 Minuten vollzogen werden. Lokalisation und Zeitdauer sind exakt kontrollierbar, und eine sofortige Reperfusion ist möglich (Reffellmann et al., 2004; Krombach et al., 2005).

In der durchgeführten Studie konnten wir bei allen Tieren einen Infarkt auslösen, der sich neben den klinischen Parametern auch in den pathologischen Ergebnissen bestätigen ließ. Aussehen und Konsistenz des infarzierten Gewebes veränderten sich makroskopisch in Abhängigkeit von der vergangenen Zeit nach dem akuten ischämischen Ereignis. Die Überlebensrate war mit 86,12% sehr hoch.

Die Katheterisierung der Koronargefäße bringt neben vielen Vorteilen auch einige kardiogen bedingte Komplikationen mit sich: Kammerflimmern und ventrikuläre Tachykardien sind als Komplikationen nach einem Infarkt bekannt und mit einer relativen hohen Mortalität verbunden (Kraitchman et al., 2000). Als Ursache kommen Irritationen und kleine Verletzungen infrage, die durch die Intervention mit Katheter, Führungsdrähten und durch das Aufblasen des Ballons hervorgerufen werden. Diese bewirken eine Reizung des Erregungsleitungssystems, was zu diesen schweren Arrhythmien führen kann. Besonders Schweine sind prädisponierter als andere Tierspezies (Dogne et al., 2005; Kraitchman et al., 2000; Naslund et al., 1992). Durch die prophylaktische Gabe von β -Blockern, Cordarex[®], Magnesium und Nitroglycerin kann die Gefahr von Arrhythmien gemindert werden. In vorliegender Studie konnte dies durch die Verabreichung von Amiodaron im Verlauf der Operation beobachtet werden; die Anzahl von schweren Arrhythmien konnte gesenkt werden. Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass die Überlebensrate höher ist, wenn die Möglichkeit einer sofortigen Defibrillation gegeben ist. Dadurch konnte auch bei unseren Versuchstieren die Sterblichkeit durch Kammerflimmern intraoperativ minimiert werden. Andere Ursachen sind Gefäßverschlüsse, die durch Thromben, Spasmen und durch die injizierten Zellen hervorgerufen werden. Nach zwei Wochen konnte bei den meisten Tieren die Entwicklung einer Stenose des infarzierten Gefäßes festgestellt werden. Als Ursache kommt eine durch Überdehnung des Ballons ausgelöste Endothelverletzung mit folgender Plaquebildung infrage. Trotz der aufgeführten möglichen Komplikationen, ist die Induktion einer Myokardischämie und die Applikation der Zellen in das Infarktgebiet mittels selektiver

Kathetertechnik eine minimalinvasive Methode, die nicht nur risikoarm ist, sondern auch effektiv und die jederzeit kontrollierbar im klinischen Alltag angewendet werden kann.

4.2 Die Identifikation der Zellen *in vitro* und *in vivo*

Bei den therapeutischen Anwendungen autologer Zellen erscheint es notwendig, den Verbleib der transplantierten Zellen nachzuweisen und den Zeitraum ihres Überlebens zu bestimmen. Insofern wird eine Methode benötigt, um die Zellen zu markieren und *in vivo* nachzuverfolgen. Hierbei muss der Marker jedoch mehrere Kriterien erfüllen: Er muss einfach zu detektieren sein, über längere Zeit stabil exprimiert werden, durch die Zellteilung nicht verdünnt werden, in unmarkierten Zellen nicht vorhanden sein, keinen Einfluss auf die Zellaktivitäten haben (Xia et al., 2005, Xu et al., 2005) und nach der Differenzierung noch nachweisbar sein. Wichtig bei der Anwendung gentherapeutischer Verfahren ist ferner, dass erfolgreich transfizierte Zellen einfach zu identifizieren sind. Gegenwärtig sind zu diesem Zweck verschiedene Markergene in Gebrauch (Günzburg und Salmons, 1997; Norton und Coffin, 1985; Sawamura, 2001; Slama et al., 1995).

Drei verschiedene Möglichkeiten der Zellmarkierung *in vitro* vor der autologen Transplantation ins Versuchstier wurden miteinander verglichen. Bei allen drei Methoden konnten die Zellen mit sehr hoher Effektivität markiert werden. Allerdings waren der Einsatz des β -Gal-Gens mit dem Genprodukt β -Galaktosidase und die Markierung der Zellen mit dem GFP im Herzgewebe nach dem MI ungeeignet. Die kombinierte Färbung mit CM-DiI und DAPI eignete sich besser für die Identifizierung der transplantierten Zellen *in vivo*.

Die Markierung der Zellen mit dem *LacZ*-Gen, dessen Produkt die β -Galaktosidase ist, bietet eine Möglichkeit bei der Verfolgung der transplantierten Zellen *in vivo* (Xu et al., 2005). Die transduzierten Zellen können mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase sichtbar gemacht werden. Es ist bekannt, dass die Transfektionseffizienz des β -Gal-Genes generell niedrig ist. Selbst nach viralem Transfer von β -Gal werden Transfektionseffizienzen von kleiner als 10% beschrieben (Norton und Coffin, 1985). In der vorgeliegenden Studie konnte die Transfektionseffizienz für CMV- β -Gal (MOI 500) bis zu 95% erreicht werden. Es konnte festgestellt werden, dass nicht nur die transplantierten Zellen, sondern auch die Kardiomyozyten sowohl im Infarktareal als auch im nicht geschädigten Gewebe positiv für die immunhistologische Färbung mit β -Gal-Antikörpern sind. Diese Tatsache erlaubte uns keine eindeutige Unterscheidung zwischen den eingesetzten und den orteinsässigen Zellen,

sodass diese Markierungsmethode für die Identifizierung der transplantierten Zellen im Herzgewebe nach einem Myokardinfarkt als ungeeignet bewertet wurde.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit GFP als genetischer Zellmarker verwendet. Die Transduktion der MNCs aus dem Knochenmark mit dem adenoviralen Vektor QBI-Adeno-GFP sollte helfen, die Integration der Zellen im Gewebe mikroskopisch in Gefrierschnitten direkt zu belegen, wodurch Artefakte aufgrund sekundärer Nachweismethoden vermieden werden sollten. GFP kann ohne weitere Hilfsstoffe mit blauem Licht (475 nm) zur grünen Fluoreszenzemission (515 nm) angeregt werden (Reichel et al., 1996). Die Detektion ist denkbar einfach, ohne vorherige Fixierung der Zellen oder Substratzugabe (Reichel et al., 1996; Jatsch, 2001). Da GFP viele Vorteile in sich vereint, schien es im Rahmen einer nicht toxischen Dosierung der ideale Marker zur genetischen Markierung von MNCs zu sein (Xue et al., 2010). Doch wies die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Gefrierschnitte in unserer Studie eine sehr starke Autofluoreszenz des infarzierten Gewebes auf, sodass die Differenzierung zwischen der Fluoreszenz der injizierten Zellen und der Autofluoreszenz des ischämisch geschädigten Herzgewebes erschwert und in vielen Fällen unpräzise war. Aufgrund der Autofluoreszenz des Myokards (Limbourg und Drexler, 2005), die sich im gleichen Wellenspektrum wie die GFP-positiven Zellen befindet, konnte nur schwer zwischen Artefakt und GFP-positiven Zelle unterschieden werden. Die eingebrachten Knochenmarkszellen können sich im Herzen gewebespezifisch zu Kardiomyozyten differenzieren (Orlic et al., 2001a und b). Dieser Befund stützte sich jedoch ausschließlich auf indirekte Nachweismethoden mittels Immunfluoreszenz. Das birgt gerade in Geweben mit sehr hoher Autofluoreszenz, wie dem Skelett- oder Herzmuskel, die Gefahr einer Fehlinterpretation von Fluoreszenzsignalen in sich (Jackson KA et al., 2004). Zudem kann es im nekrotischen Infarktareal zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz kommen, was auch in der vorliegenden Studie bei den GFP-Versuchen beobachtet wurde.

Eine verbreitete Strategie zur Identifikation der transplantierten Zellen im Gewebe ist die *In-vitro*-Markierung der Zellen mit Fluorochromen (Tilkorn et al., 2010; Kikkawa und Pawlowski, 2007). Nach der Transplantation können die fluoreszenzmarkierten Zellen im Gewebe anhand der spezifischen Anregungswellenlänge der verwendeten Fluorochrome identifiziert werden. Allerdings können hierbei leicht falsch-positive Aussagen getroffen werden. Sterben fluoreszenzmarkierte Zellen nach der Transplantation im Gewebe, können deren Fluorochrome auch von Zellen des Wirtes aufgenommen werden. Beim Bewerten der Fluoreszenz sind Wirtszellen, die das Fluorochrom aus sterbenden Zellen aufgenommen haben, nicht von transplantierten fluoreszenzmarkierten Zellen zu unterscheiden. Die

eindeutige Identifikation der transplantierten Zellen kann mit einer weiteren Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne der zu applizierenden Zellen durchgeführt werden. Wird zur Detektion der injizierten Zellen ein anderes Fluorochrom verwendet, kann durch eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen von positivem Kern und positiver *In-vitro*-Markierung eindeutig eine transplantierte Zelle identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fluorochrome zur *In-vitro*-Markierung der Zellen vor der Transplantation verglichen. Diese Marker sind der Kernfarbstoff DAPI und der Membranfarbstoff CM-DiI.

Die Fähigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI, mit der DNS zu interkalieren, wurde bei der indirekten DNS-Färbemethode ausgenutzt. Dabei fluoresziert der Farbstoff bei Anregung mit UV-Licht (Exzitation 358 nm, Emission 451 nm) im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe. Durch die Anlagerung des DAPI-Farbstoffes an die DNS der Zellkerne ließen sich nach Transplantation bereits in Gefrierschnitten unter Fluoreszenzanregung deutlich erkennen.

Der lipophile Membranfarbstoff CM-DiI hat gegenüber anderen Membranfarbstoffen den Vorteil, dass er für die Formalin-Fixierung und die Paraffin-Einbettung verwendet werden kann, ohne ausgewaschen zu werden. Auch mit CM-DiI lassen sich paraffinisierte Schnitte und Gefrierschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit grünem Licht (Exzitation 553 nm, Emission 574 nm) auf die charakteristische Rotfluoreszenz hin untersuchen.

Zur Identifikation der transplantierten Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit eine kombinierte Färbung aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen verwendet. Durch Überlegen der entstandenen Fluoreszenzaufnahmen konnten die transplantierten Knochenmarkzellen im Herzgewebe eindeutig identifiziert werden. Durch die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Gewebeschnitte konnten die applizierten Knochenmarkzellen auch nach zwei Wochen Versuchszeit eindeutig detektiert werden. Mithilfe der CM-DiI- und DAPI-Zellmarkierung ist es somit möglich, bereits in Gewebeschnitten die injizierten Zellen zu identifizieren und ihre Anzahl und Lage zu bestimmen. Durch die in dieser Arbeit etablierte Methode der Zellmarkierung hat man die Möglichkeit, die autologen MNCs und MSCs aus dem Knochenmark *in vivo* weiter zu verfolgen. Man muss dabei beachten, dass der Farbstoff infolge der Zellteilung *in vivo* verdünnt werden kann, sodass die Verfolgung der transplantierten Zellen für längere Zeit erschwert werden könnte. In unserer Studie war der Farbstoff im Laufe der zwei Wochen *in vivo* stabil, sodass die Zellen eindeutig identifiziert werden konnten.

4.3 Zeitpunkt der Zelltransplantation

Nach einem Herzinfarkt wird in dem betroffenen Gebiet eine Reihe zellulärer und molekularer Mechanismen in Gang gesetzt, um die bestmögliche Funktionalität des Organs zu erhalten. Die Infarktheilung unterteilt sich in drei zeitlich nicht voneinander abgrenzbare Stadien: die inflammatorische, die proliferative und die Reifungsphase (Frangiogiannis, 2006). All diese Umbauvorgänge am geschädigten Herzen werden als Remodeling bezeichnet. Im zeitlichen Verlauf unterscheidet man das frühe und das späte Remodeling, wobei sich Ersteres in den ersten drei Tagen nach Infarkt abspielt und vor allem den Infarkt selbst und die umgebende Perinfarktzone, auch Border Zone genannt, betrifft. Das späte Remodeling setzt ab dem dritten Tag ein und beinhaltet Prozesse, die den gesamten Herzmuskel betreffen (Tiyagura und Pinney, 2006), wie die kompensatorische Hypertrophie kardialer Zellen sowie die Dilatation des linken Ventrikels infolge verminderter Kontraktilität und Auswurfleistung des Herzens. Ein entscheidender Faktor des Remodelings ist dabei die Stabilisierung des Infarktareals, die hauptsächlich durch den Umbau der extrazellulären Matrix gewährleistet wird (Jugdutt et al., 1996; Lutgens et al., 1999). Die Aktivierung dieses Prozesses geschieht durch die Freisetzung verschiedener Botenstoffe und durch inflammatorische Reaktionen, an denen vor allem die myeloiden Blutzellen maßgeblich beteiligt sind (Ren et al., 2003; Nian et al., 2004). Die Aktivierung inflammatorischer Prozesse beginnt augenblicklich mit dem Einsetzen der Gewebeschädigung. Studien haben gezeigt, dass der im Zuge des Remodelings abspielende Entzündungsprozess durch Reperfusion des Infarktes verstärkt wird (Entmann und Smith, 1994).

Die schwerwiegendste und lebensbedrohlichste Komplikation nach einem akuten Herzinfarkt ist die Herzinsuffizienz. Bei der sich entwickelnden Herzinsuffizienz kann das geschwächte Herz das benötigte Blutvolumen nicht befördern. Daraus resultiert eine Unterversorgung der Koronarien und folglich auch des Herzmuskels, was sich besonders bei Belastung bemerkbar macht. Klinisch resultiert daraus eine Lungenstauung oder eine arterielle Hypotonie. Durch frühzeitige Reperforationsmaßnahmen lässt sich die akute Sterberate nach einem MI reduzieren, im Laufe der Zeit entwickelt sich als Spätkomplikation in 42% der Fälle die chronische Herzinsuffizienz (Velazquez et al., 2004). Die Sterblichkeitsrate und die enormen Kosten bei der Nachsorge solcher Patienten sind dabei deutlich erhöht. Eine weitere Komplikation nach einem akuten MI ist die Entstehung von Herzrhythmusstörungen. Besonders ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern stellen lebensbedrohliche Komplikationen in den ersten 48 Stunden nach dem Infarkt dar. 20% der Patienten entwickeln ein Herzkammeraneurysma, das zu einer Perforation des Ventrikels führen kann. Aus diesem

Grund ist die Entwicklung neuer Therapiemethoden für die Behandlung von Infarktpatienten im Akutstadium und zur Vorbeugung der späterer Komplikationen von großer Bedeutung; eine davon ist die intrakoronare Applikation der Knochenmarkzellen nach dem akuten MI.

Die Arbeit von Li RK et al. (2001) zeigte, dass die Entzündungsreaktionen am Herzen in der ersten Woche nach dem Infarkt am stärksten sind und dass daher während dieser Zeitspanne transplantierte Zellen nicht in der Lage sind, an den Ort ihrer Bestimmung, in diesem Fall den Herzmuskel, zu gelangen beziehungsweise sich dort anzusiedeln. Strauer et al. (2002) diskutierte den optimalen Zeitpunkt der Zellinjektion und kam gleichfalls zu dem Schluss, dass eine Verabreichung zwischen Tag 7 und 14 sowohl am vielversprechendsten als auch für die klinische Therapie umsetzbar erscheint. In der vorliegenden Studie wurden die Zeitpunkte der Zelltransplantation absichtlich in zwei unterschiedliche Remodellingsphasen gelegt. Auf diese Weise sollte der Unterschied zwischen einer frühen Zelltransplantation direkt nach einem akuten Ereignis (10 Minuten) und einer späteren Zellbehandlung nach dem Abklingen der Entzündungsphase (10 Tage) dargestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine frühe Zelltransplantation nach einem akuten Myokardinfarkt. Die Ergebnisse der 2-Tage-Versuche unterscheiden sich signifikant voneinander.

Janssens et al. (2006) beschreiben in ihrer randomisierter Studie, dass aufgrund des vorhandenen interstitiellen kardialen Ödems in den ersten 24 Stunden nach einem akuten MI die intrakoronare Zelltransplantation nicht sinnvoll ist. Trotz alledem sprechen die ansteigende mikrovaskuläre Obstruktion innerhalb der ersten 48 Stunden nach der Rekanalisation des Infarktgefäßes und das begrenzte Homing der transplantierten Zellen innerhalb der ersten fünf Tage, für eine frühe intrakoronare Applikation der Zellen.

Strauer und Kornowski (2003) geben den optimalen Zeitpunkt für eine Zelltransplantation mit dem 5. bis 7. Tag nach dem akuten MI an. In diesem Zeitraum sind die Anzahl der im Blut zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen und die Konzentration endothelialer Wachstumsfaktoren am größten. Dabei ist die Entzündungsphase nach einem akuten MI weitgehend abgeschlossen.

Die unterschiedliche Versuchsdauer sollte zusätzlich das Verhalten der Zellen im Infarktgebiet klären. Die Entnahme und Untersuchung der Herzen eine Stunde, 2 Tage bzw. 2 Wochen nach der Operation zeigte, dass die Menge der transplantierten Zellen in den Infarktregionen im Laufe dieser Zeit konstant blieb. In Gegensatz zu unserer Studie wurde die Abnahme der Zellzahl nach der Transplantation in einer Studie an Schafen berichtet, in der

Knochenmarkzellen ins Infarktgebiet injiziert und zwei Monate später die Herzen analysiert wurden (Bel et al., 2003).

Bei einer zeitnahen Zelltherapie nach einem akuten Myokardinfarkt wäre es denkbar, dass die ins Infarktgebiet transplantierten Knochenmarkzellen inflammatorischer Natur sein könnten und an den natürlichen Entzündungs- und Heilungsprozessen des geschädigten Herzens mitwirken. Das würde die überwiegende Präsenz der eingebrachten Zellen im Infarktareal, jedoch nicht die Konstanz der Zellzahl über zwei Wochen nach der Transplantation erklären.

Die hauptsächliche Lokalisation der CM-DiI- und DAPI-positiven Zellen im geschädigten Gewebe wurde wahrscheinlich durch die Freisetzung von spezifischen Botenstoffen induziert, die auch für die Aktivierung der inflammatorischen Zellen verantwortlich sind. Die Expression solcher Zytokine, wie des *stromal cell derived factor 1* (SDF-1), wird nach einer Gewebeläsion kurzfristig hochreguliert und sorgt für ein zielgerichtetes Einwandern der Zellen in die erforderlichen Areale (Askari et al., 2003; Penn et al., 2004). Die Ausschüttung schädlicher Stoffwechselprodukte nekrotischer Zellen und die mangelnde Nährstoffversorgung im Infarktareal direkt nach der Ischämiezeit, die zum Absterben der eingebrachten Zellen führen kann, sprechen für eine späte Zelltransplantation. Die Injektion neonataler Kardiomyozyten in infarzierte Rattenherzen hat gezeigt, dass etwa 90% der transplantierten Herzzellen, hauptsächlich verursacht durch die ischämischen Bedingungen im Infarkt, in Apoptose gehen und sterben (Zhang M et al., 2001). Diese Vorgänge sind nach vier bis sieben Tagen abgeschlossen. Die zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführte Stammzelltherapie würde den inflammatorischen Charakter transplantierte Zellen weitgehend ausschließen. Eine konstante Präsenz der transplantierten Zellen im Infarktareal auch nach zwei Wochen legt den Schluss nahe, dass bei der Regeneration des geschädigten Herzgewebes nicht nur die entzündlichen, sondern auch viele weitere Prozesse beteiligt sind, die die Stammzellen in ihrer Anlockung, Differenzierung und Funktion beeinflussen, sodass die Frage nach einem optimalen Transplantationszeitpunkt zunächst offen bleibt und weitere Untersuchungen zur Klärung der molekularen Mechanismen in der Signalkaskade nach einem akuten Herzinfarkt notwendig sind.

4.4 Zellapplikationsmethoden

Das Ziel jeglicher Zellapplikationsstrategien besteht darin, eine hohe Konzentration an Zellen in das Bestimmungsgewebe zu bringen, um protektive bzw. regenerative Effekte zu erzielen. Dabei sollte der Abtransport der transplantierten Zellen in den peripheren Blutkreislauf

verhindert werden. Aus kardiologischer Sicht ist eine intrakoronare, transendokardiale/transepikardiale, intravenöse und intramuskuläre Applikation von Zellen möglich.

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit etablierte Applikationsmethode mittels selektiven Kathetertechnik ist minimalinvasiv und stellt einen guten Kompromiss zwischen Praxisnähe und Machbarkeit dar. Dank einem intrakoronar platzierten Katheter konnten die Knochenmarkzellen effizient und sicher im ischämisch geschädigten Gewebe angereichert werden. Auf diese Weise können die Zellen das Infarktareal in sehr hoher Konzentration erreichen. Dabei passieren die Zellen das Infarktgebiet während der ersten koronaren Zellpassage, was die maximale Zellkonzentration am Bestimmungsort erklärt (Strauer und Kornowski, 2003). Aufgrund des Durchmessers des Katheters blieb der Abtransport über den RIVA den intraarteriell applizierten Zellen größtenteils verschlossen, sodass ein relativ hoher Prozentsatz an Zellen in den Herzkranzgefäßen verblieb. In humanen Studien wurde hierbei der intrakoronar liegende Ballonkatheter abwechselnd aufgepumpt und entleert, um ein Gleichgewicht zwischen der Zellapplikation mit einer ausreichend langen Retentionszeit für die injizierten Zellen und der nötigen Reperfusion für das betroffene Myokardgewebe zu bewerkstelligen (Strauer et al., 2001; Wollert et al., 2004; Hofmann et al., 2005).

Nach Entfernen des Katheters und der daraufhin erfolgenden Wiederaufnahme des Blutstromes über den R1 des RIVA wurden einige Stammzellen in den Körperkreislauf abtransportiert. Ein Großteil der applizierten Zellen gelangte aber über das nutritielle Blutsystem in kleinere Gefäße und letztendlich ins Myokardgewebe (und somit auch ins infarzierte Myokardgewebe). Diese Annäherung ähnelt der eher klinischen Vorgehensweise der Zelltherapie durch transkoronare Applikation bei Patienten mit akutem MI und könnte folglich als gutes Modell zur Behandlungsoptimierung für diese Patienten dienen (Assmus et al., 2002; Strauer et al., 2002; Britten et al., 2003; Chen SL et al., 2004; Fernandez-Aviles et al., 2004; Kuethe et al., 2004; Schachinger et al., 2004; Wollert et al., 2004).

Die transendokardiale bzw. transepikardiale Zellapplikationsmethode wurde bereits sowohl bei Schweinen als auch bei Menschen angewendet (Fuchs S et al., 2002). Bei dieser Technik werden die Zellen mithilfe eines Katheters durch das Endokard bzw. Epikard direkt ins Herzgewebe injiziert. Diese Applikationsmethode ist risikoreich. Bei Manipulationen am Herzen können Schäden am Endokard, Myokard und Epikard sowie schwer behershbare Herzrhythmusstörungen auftreten.

Die intraveöse Zellapplikation ist die am wenigsten invasive Methode, die seit Jahren in der Hämatologie zur Stammzelltransplantation angewendet wird. Dabei erreichen nur wenige

injizierte Zellen das Herzgewebe, da lediglich ca. 3% des normalen Herzzeitvolumens während der ersten Passage durch die linke Herzkammer fließt und die Zellen einem beträchtlichen *First-pass*-Effekt bei der Passage der Lunge, Milz und Leber unterliegen. Eine intravenöse Zelinjektion mag angesichts der erstmaligen Passage der bis zu 30µm großen Zellen durch die 14 bis 16µm engen Lungenkapillaren von Nachteil sein (Gao et al., 2001). Verglichen mit der intravenösen Injektion, verbesserte die transkoronare Applikation von Stammzellen deutlich das Homingpotenzial der applizierten Zellen.

Die bisher oft angewandte Form der intramyokardialen Injektion (Orlic et al., 2001a; Murry et al., 2004) erwies sich bei einer hohen Herzfrequenz und einer geringen Ventrikelwanddicke rund um den Infarkt als nur schwer durchführbar (Balsam et al., 2004). Somit konnte das sichere Injizieren der Zellen in den Herzmuskel nicht jederzeit garantiert werden. Die transkoronare Zellapplikation resultiert in einer signifikant höheren Anzahl intramyokardial gelegenen Zellen als die intravenöse Injektion. Selbst bei optimaler intravenöser Applikation wurden nur wenige injizierten Zellen über einen längeren Zeitraum im Myokard vorgefunden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete intrakoronare Zellapplikationsmethode mittels selektiver Kathetertechnik erwies sich als eine sichere und gut steuerbare Methode, um die maximale Anzahl der Zellen an den Bestimmungsort zu bringen und kontrolliert zu applizieren.

4.5 Zelltyp für die Zelltransplantation und die Verteilung der applizierten Zellen im Herzgewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden MNCs und MSCs für die autologe intrakoronare Zelltransplantation verwendet. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass MSCs in der Lage sind, sich zu den mesodermalen Zelltypen, wie Knochen-, Knorpel-, Fett-, Endothel- und Muskelzellen, zu differenzieren (Caplan, 1991; Bruder et al., 1994; Majumdar et al., 2000; Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999; Phinney et al., 1999; Oswald et al., 2004). Ferner gibt es auch Hinweise darauf, dass die MSCs zu Zellen anderer Keimblätter, wie Astrozyten (Kopen et al., 1999) und Neuronen (Woodbury et al., 2000), reifen können. Ein großer Vorteil der MSCs liegt darin, dass sie leicht aus dem Knochenmark zu isolieren und anzureichern sind, sodass die für klinische Studien nötigen hohen Zellzahlen keine Einschränkung ihrer Anwendbarkeit darstellen (Bruder et al., 1997; Pittenger und Martin, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden MSC-Populationen aus Schweinen aufgereinigt und in Kultur genommen. Die Wachstumseigenschaften und die Morphologie der Zellen waren dabei gut

reproduzierbar und deckten sich mit den in der Literatur beschriebenen Daten (Conget und Minguell, 1999; Tropel et al., 2004). Die MSCs exprimieren eine Vielzahl unterschiedlicher Oberflächenproteine, ein individueller Marker für die MSCs ist jedoch nicht bekannt. Die Reinheit der Stammzellpopulationen wurde durch ihre Adhärenz definiert. Dabei waren die Zellen zu 99% positiv für CD105, CD73 und Vimentin. Wie die durchflusszytometrischen Untersuchungen der Zellen gezeigt haben, waren alle MSC-Populationen nach ein bis zwei Passagen frei von Blutzellen und exprimierten ein typisches Set von Oberflächenantigenen (Conget und Minguell, 1999; Deans und Moseley, 2000; Minguell et al., 2001).

Es ist bekannt, dass die MSCs im Laufe der Zeit ihre verschiedenen Differenzierungsmöglichkeiten einbüßen (Digirolamo et al., 1999; Minguell et al., 2001; Baksh et al., 2004). Die schlechte Reproduzierbarkeit der Differenzierung von MSCs zu mesodermalen Gewebetypen, wie Muskeln, Sehnen oder Endothel, und zu ektodermalen Zellen des Nervensystems könnte dadurch zu erklären sein, dass diese Entwicklungspotenziale dabei vergleichsweise früh verloren gehen. Andererseits wurden die meisten dieser Phänomene nur auf Basis phänotypischer Kriterien oder der Expression bestimmter Gene belegt; funktionelle Kriterien der differenzierten Zelltypen wurden nicht untersucht. Das könnte auch zu Fehlinterpretationen in Bezug auf das Stammzellpotenzial geführt haben, wie es bei der Entwicklung neuronaler Zellen gezeigt wurde (Bertani et al., 2005).

Die Studien mit MSCs geben viele Anhaltspunkte dafür, dass durch die Anreicherung der Zellen *in vitro* bestimmte Eigenschaften, unter anderem auch ihr Differenzierungspotenzial, verändert werden. Auch andere für therapeutische Zwecke wichtige Merkmale können durch die Kultivierung beeinflusst werden, wie das Einwandern und Anwachsen in dem geschädigten Gewebe (Rombouts und Ploemacher, 2003; Vacanti et al., 2005). Um den Verlust dieser Eigenschaften möglichst niedrig zu halten, wurden in unserer Studie ausschließlich die MSC-Populationen der ersten zwei Passagen eingesetzt. Um die für die klinische Verwendung der MSCs ausreichenden Zellzahlen zu erhalten, ist es jedoch unabdingbar, die Zellen *in vitro* zu expandieren. Daher ist es in Zukunft dringend erforderlich, das Verhalten und die Veränderung der MSCs *in vitro* genauer zu untersuchen und Aufreinigungs- und Kultivierungsprotokolle zu entwickeln, die eine Anreicherung möglichst undifferenzierter Stammzellen ermöglichen.

Die Transdifferenzierung der MSCs zu Herz- (Wang JS et al., 2000; Tomita et al., 2002) und Endothelzellen (Chen J et al., 2003; Davani et al., 2003) nach einer Transplantation in infarzierten Herzen wurde durch unterschiedliche Studien belegt. In einem Teil dieser

Arbeiten wurden die Zellen vor der Transplantation allerdings mit 5-Azacytidin und/oder Amphotericin kultiviert, wodurch eine Konditionierung bewirkt worden sein könnte. Das wurde in einer Studie mit unbehandelten bzw. mit 5-Azacytidin-behandelten MSCs bestätigt, in der nur die vorbehandelten Stammzellen Kardiomyozyten gebildet hatten (Bittira et al., 2002). Der Einsatz dieser epigenetisch wirksamen Substanz in klinischen Studien ist jedoch problematisch, da die Demethylierung der DNS auch eine Aktivierung von Tumorgenen zur Folge haben könnte, die eine Transformation der Zellen verursacht (Rainier und Feinberg, 1988). Zudem wurde in keiner der Studien untersucht, ob die stammzellabgeleiteten Herzzellen durch Fusion entstanden waren oder ob tatsächlich eine Differenzierung der MSCs stattgefunden hatte. Darüber hinaus zeigten die transplantierten Zellen oftmals zwar die Expression bestimmter Muskelmarker, erinnerten morphologisch jedoch mehr an glatte Muskelzellen oder Fibroblasten. Ausgereifte Kardiomyozyten mit vollständiger Organisation der Sarkomerstruktur und mit Glanzstreifen konnten dagegen nicht nachgewiesen werden (Wang JS et al., 2001; Shake et al., 2002; Nagaya et al., 2004).

Da die mesenchymalen Stammzellen nur eine Subpopulation des Knochenmarks bilden, wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Versuche mit der Gesamtheit aller mononukleären Zellen aus dem Knochenmark durchgeführt. Die Ergebnisse weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Einsatz der MSCs allein und dem aller MNCs des Knochenmarks auf.

Strauer et al. (2001) führten die erste intakoronare Knochenmarkzelltransplantation nach einem akuten MI bei Menschen durch und erreichten damit eine deutliche Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion und eine Reduktion des ventrikulären Remodelings.

Die TOPCARE-AMI-Studie belegte weiterhin die positive Auswirkung der Zelltransplantation auf ischämisch geschwächtes Herzgewebe nach dem Einsatz von autologen Knochenmarkzellen und zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (Assmus et al., 2002).

Die BOOST-Studie beschreibt die Verbesserung der linksventrikulären Funktion innerhalb der sechs Monate nach der Transplantation von Knochenmarkprogenitorzellen in infarziertes Myokard (Wollert et al., 2004). Die Kontrolluntersuchung nach 18 Monaten wies wiederum keinen Unterschied zwischen der Zelltransplantations- und der Kontrollgruppe auf (Meyer et al., 2006). Diese Studien zeigten, dass die intrakoronare Zelltransplantation nur innerhalb der ersten sechs Monate eine positive Auswirkung auf die Herzfunktion hat und langfristig keinen Schaden bei den Patienten verursacht.

Die REPAIR-AMI-Studie unterstützte die Ergebnisse der BOOST-Studie und verzeichnete einen deutlichen positiven Effekt der Zelltransplantation (MNCs) innerhalb des ersten Jahres. Besonders die Patienten mit einem sehr schweren Herzinfarkt und einer Ejektionsfraktion unter 25% profitierten von einer Zellbehandlung (Schachinger et al., 2006).

Die ASTAMI-Studie wiederum wies keine Verbesserung der Herzfunktion nach einer Transplantation von MNCs im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Allerdings wurde in dieser Studie nur eine geringe Anzahl von MNCs transplantiert (Lunde et al., 2006).

In der durchgeführten Studie wiesen die Herzabschnitte nach einem akuten ischämischen Ereignis und einer anschließenden Transplantation der mit den Fluoreszenzfarbstoffen markierten MSCs eine deutliche Präsenz der transplantierten Zellen im Infarktgebiet im Vergleich zu Nicht-Infarktarealen auf. Die Versuche mit allen mononukleären Zellen bestätigten dieses Ergebnis. Weiterhin wies unsere Studie in allen Versuchen signifikante Unterschiede in der Verteilung der applizierten Zellen zwischen ischämischem Gewebe und Kontrollproben auf.

Während Orlic et al. bereits nach neun Tagen eine Transdifferenzierung der eingebrachten Zellen zu Kardiomyozyten nachgewiesen hatten (Orlic et al., 2001a), konnte aufgrund der hier gezeigten Versuche eine solche Entwicklung der Knochenmarkzellen nach einer direkten Transplantation in infarzierte Schweineherzen ausgeschlossen werden, da diese zum größten Teil eine intravasale Lage aufwiesen. Die Menge der applizierten Zellen in den Infarktarealen blieb über die ganze Zeit konstant.

Neuere Studien deuten darauf hin, dass die mit mesenchymalen Stammzellen transplantierten Herzen zwar eine Funktionsverbesserung zeigen, dass diese jedoch wie auch bei den hämatopoetischen Vorläuferzellen durch andere Mechanismen als durch Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten hervorgerufen wird. Die beschriebene Neovaskularisierung der infarzierten Herzen scheint eher durch parakrine Effekte begründet zu sein als durch eine aktive Teilnahme der MSCs an der Bildung neuer Gefäße (Chen J et al., 2003; Nagaya et al., 2005; Gnechi et al., 2005). Es ist bekannt, dass MSCs in der Lage sind, eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zu generieren (Haynesworth et al., 1996; Majumdar et al., 1998). Genexpressionsanalysen von MSCs und entsprechende Proteinnachweise haben die Produktion einer Reihe unterschiedlich wirkender gefäßbildender Substanzen belegt, die unter hypoxischen Bedingungen zum Teil noch deutlich gesteigert wurde (Kinnaird et al., 2004). Die daraus resultierende angiogene Wirkung wurde außerdem noch in einem Ischämie-Modell an den Hinterbeinen von Mäusen bestätigt. Auch der Umbau des Infarktgewebes könnte durch die im Herzen angewachsenen MSCs positiv beeinflusst werden (Tomita et al.,

2002; Shake et al., 2002). Wie andere Studien gezeigt haben, führt der verminderte Einbau von Kollagenfasern in das geschädigte Gewebe nach Transplantation von MSCs zu einer weniger steifen Narbe und damit zu einer besseren Dehnbarkeit und Funktionalität des Ventrikels (Mangi et al., 2003; Xu et al., 2005).

Die ursprüngliche Annahme und Grundlage der klinischen Studien ist die Transdifferenzierung der in den Infarkt eingebrachten Zellen zu Kardiomyozyten. Die fehlende Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse und die teilweise unzureichenden Nachweismethoden führten jedoch zu kontroversen Diskussionen über die vermeintliche Plastizität der Stammzellen. Um die Transdifferenzierung eines Zelltyps zu einem anderen sicher zu belegen, müsste die Ausgangspopulation klar definiert und im besten Fall klonaler Natur sein, eine Veränderung der Zelleigenschaften aufgrund einer vorangegangenen Kultivierung ausgeschlossen werden, die Umformung in einer signifikanten Zahl der Zellen stattfinden und der Phänotyp der konvertierten Zellen auch auf funktioneller Ebene demonstriert werden (Anderson et al., 2001). Mehrere Studien haben gezeigt, dass vielen der durch Differenzierung erklärten Phänomene auch ein anderer Mechanismus zugrunde liegen könnte, wie beispielsweise die Fusion der transplantierten Zellen mit nativen Zellen (Wagers und Weissman, 2004). Zellfusionen sind an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen in Säugetieren beteiligt (Chen EH und Olson, 2005). Das Potenzial von Knochenmarkzellen, mit somatischen Zellen zu fusionieren, wurde auch in anderen Geweben beobachtet. An leberkranken Mäusen wurde nachgewiesen, dass transplantierte Knochenmarkzellen keine neuen Leberzellen durch Transdifferenzierung bildeten, sondern mit bestehenden Hepatozyten fusionierten (Vassilopoulos et al., 2003; Wang X et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Transplantation von HSCs in Toxin-geschädigte Skelettmuskeln (Camargo et al., 2003). Dabei wurde gezeigt, dass die von den Knochenmarkstammzellen abgeleiteten Muskelzellen durch Fusion inflammatorischer myeloider Zellen mit regenerierenden Fasern entstanden waren. Diese Resultate wiesen darauf hin, dass dieser Vorgang einen natürlichen Prozess im Rahmen einer physiologischen oder pathologischen Gewebeerneuerung nach Schädigung darstellte.

Die Verbesserung der ventrikulären Funktionsparameter nach Applikation von Knochenmarkzellen wurde sowohl im Tiermodell (Kocher et al., 2001; Orlic et al., 2001a und b) als auch in klinischen Studien an Patienten berichtet (Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002; Stamm et al., 2003; Wollert et al., 2004). Angesichts der überwiegend intravasalen Lage der transplantierten Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit keine Transdifferenzierung von Knochenmarkzellen zu Kardiomyozyten gesehen werden. Die transplantierten Zellen

können dennoch eine Verbesserung der Herzfunktion durch indirekte Mechanismen bewirken. Die bessere Erhaltung der den Infarkt umgebenden Zellen und der veränderte Umbau des geschädigten Gewebes und der extrazellulären Matrix durch inflammatorisch wirksame Zellen könnten zu einer verminderten Infarktgröße beitragen, wie es von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Kocher et al., 2001; Orlic et al., 2001b; Strauer et al., 2002). Die Bewertung der Infarktgrößen ist bei Kleintieren allerdings schwierig, da das geschädigte Areal je nach Beschaffenheit des Herzens und dem Ausmaß der Ischämie innerhalb der untersuchten Gruppen und Kontrollgruppen sehr großen Schwankungen unterworfen ist. Vor allem mit dem in Nagern verwendeten Ligaturmodell der linken Koronararterie variiert die Größe des betroffenen Bereichs erheblich und ist daher schlecht vergleichbar. Die Göttinger Minischweine weisen dagegen eine konstante Anatomie der Herzkranzgefäße auf, sodass die infarzierten Areale in ihrer Größe und Ausdehnung konstant reproduzierbar waren. Eine weitere mögliche Ursache einer verbesserten Herzfunktion nach Transplantation oder Mobilisierung von Knochenmarkzellen ist die Freisetzung parakriner Mediatoren, die zu einer verstärkten Aktivierung anderer Zellen, wie kardialer (Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003; Laugwitz et al., 2005) oder endothelialer (Takahashi et al., 1999; Shintani et al., 2001) Vorläuferzellen, führen. Ein wichtiger Aspekt zukünftiger Forschung wird daher die weitere Untersuchung der einer Funktionsverbesserung zugrunde liegenden Mechanismen darstellen.

Der Einsatz von Stammzellen bei der Infarkttherapie birgt durch ihre nicht vollständig geklärten Differenzierungswege und den unbekanntem Einfluss unterschiedlicher Zellen auf ihre Entwicklung und Plastizität einige Risiken. Ein Zwischenfall wurde nach intrakoronarer Applikation von MSCs in gesunde Herzen von Hunden beschrieben, die eine Woche nach der Injektion Mikroinfarkte mit fibrotischen Veränderungen des Gewebes und infiltrierenden Makrophagen in den Arealen mit angewachsenen Zellen zeigten (Vulliamis et al., 2004). Das könnte allerdings auf die Größe und die starke Adhäsionsfähigkeit der Zellen zurückzuführen sein, die zu einer Verstopfung der kleinen Kapillaren geführt haben könnten (Gao et al., 2001; Barbash et al., 2003). Die mesenchymalen Stammzellen führten bei wenigen Versuchen zu Verknöcherungen im Myokard. Diese potenziell schädlichen Strukturen könnten Arrhythmien und unter Umständen sogar Perforationen der Herzwand induzieren. In dem geschädigten Gewebe werden Stoffe freigesetzt, die die MSCs zu einer Knochendifferenzierung anregen. Diese Faktoren können direkt durch nekrotische Herzzellen oder indirekt durch inflammatorische Zellen sezerniert werden, und auch eine direkte Interaktion mit den MSCs

könnte eine Rolle spielen. Die molekularen Mechanismen, die eine Differenzierung der MSCs regulieren, sind komplex und nur unvollständig geklärt.

Die überwiegend intravasale Lage der transplantierten Zellen in der durchgeführten Studie kann durch die intrakoronare Applikationsmethode erklärt werden. Der geringere Anteil der Zellen außerhalb der Gefäße könnte darauf hinweisen, dass nur wenige Zellen die Gefäßwände passieren bzw. über die geschädigten Kapillaren das Herzgewebe erreichen. In beiden Fällen waren die Zellen eindeutig zu identifizieren. Die konstante Anzahl der injizierten Zellen über zwei Wochen im geschädigten Herzgewebe deutet auf das Überleben nach der Transplantation *in vivo* hin. Dabei wurde keine Fusion oder Transdifferenzierung der Zellen zu Kardiomyozyten beobachtet. Die Funktion der transplantierten Zellen und ihre Rolle bei der Myokardregeneration sind noch nicht vollständig geklärt und benötigen weitere Untersuchungen.

Weiter ist es notwendig, die Komponenten der Reparaturmechanismen zu untersuchen und zu verstehen. Es gilt näher zu untersuchen, welche Boten- und Signalstoffe vom ischämischen Herzen produziert werden und zur Chemoattraktion der Stammzellen führen. Durch ein besseres Verständnis dieser Mechanismen (Mobilisation, Homing, Differenzierung) können die Differenzierungsfähigkeit und Funktionalität der Zellen nach der Transplantation optimiert werden.

5. Zusammenfassung

Die Transplantation von mononukleären autologen Knochenmarkszellen ist ein vielversprechender Ansatz für die Regeneration nach einem Myokardinfarkt. Es war das Ziel dieser Studie, ein Infarktmodell beim Schwein zu etablieren sowie die Verteilung der transplantierten autologen MNCs und MSCs aus dem Knochenmark im Schweinherzen nach einem Infarkt zu untersuchen. Weiterhin sollten die am besten geeignete Zellmarkierungsmethode sowie der optimale Zeitpunkt für die Zelltransplantation *in vivo* entwickelt werden.

In 32 Schweinen (33-60 kg, Infarkttiere mit Zellinjektion n=32, Kontrolle n=7) wurde ein Infarkt durch Verschluss des *Ramus diagonalis 1* des RIVA mittels eines angioplastischen Ballons über eine Stunde induziert. Es konnte bei allen Tieren ein Infarkt induziert werden, der sich durch Veränderungen im EKG und später auch makroskopisch und mikroskopisch bestätigen ließ. Unseren Ergebnissen zufolge konnten wir ein Infarktmodell am Schwein mittels einer minimal invasiven Methode entwickeln. Die hohe Inzidenz von ventrikulären Tachykardien und Kammerflimmern sind die häufigsten Komplikationen nach einem Myokardinfarkt und mit einer hohen Mortalität verbunden. Durch prophylaktische Gabe von Antiarrhythmika und Antikoagulanzen sowie die Optimierung des Versuchablaufs konnten diese Probleme minimiert werden. Dieses Modell eignet sich durch optimale Kontrolle der Lokalisation und Dauer des Infarktes für Myokardischämie-Studien und erlaubt im Bereich der Stammzellforschung neue Möglichkeiten. Nach der 10-Minuten- bzw. 10-Tage-Reperfusion wurden die MNCs und MSCs in einer Zellsuspension ($1 - 3 \times 10^7$ autologe Zellen/Versuchstier) durch den Ballon direkt in das Infarktgebiet injiziert. Zuvor wurden diese Zellen aus dem Knochenmark gewonnen, *in vitro* kultiviert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die zu transplantierenden Zellen *in vitro* mittels Fluoreszenzfarbstoffen CM-DiI und DAPI markiert und *in vivo* eindeutig identifiziert werden konnten. Die Markierung der Zellen mithilfe der adenoviralen Vektoren CMV- β -Gal und QBI-Adeno-GFP war nicht optimal, da die Kardiomyozyten selbst eine β -Galaktosidase-Aktivität aufwiesen bzw. die Autofluoreszenz des infarzierten Herzgewebes die Identifizierung der transplantierten Zellen erschwerte. Eine frühe intrakoronare Applikation (nach 10 Minuten) der Zellen nach einem akuten Myokardinfarkt wies bei den 2-Tage-Versuchen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu einer späten Transplantation (nach 10 Tagen) auf. Die Applikation der isolierten Population der MSCs im Vergleich zur Injektion aller MNCs des Knochenmarkes wies keine signifikanten

Unterschiede auf. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass die transplantierten Zellen aus dem Knochenmark über zwei Wochen im infarzierten Gewebe bleiben. Die injizierten Zellen befanden sich überwiegend im infarzierten Gewebe. Die Verteilung der Zellen im Herzen war sowohl im Infarkt- als auch im Nicht-Infarkt-Gebiet intravasal signifikant größer als im Gewebe.

6. Literaturverzeichnis

- Abraham MR, Henrikson CA, Tung L, Chang MG, Aon M, Xue T (2005): Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res* 97, 159-67.
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A (2003): Fusion of bone-marrowderived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-73.
- Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL (2001): Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 7, 393-5.
- Andrews PW (1998): Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. *APMIS* 106, 158-68.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Siher an der Zee R, Li T (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-7.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM (1999): VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18, 3964-72.
- Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS (2003): Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 362, 697-703.
- Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM (2002): Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106, 3009-17.
- Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R (2006): Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, 1222-32.
- Badorff C, Brandes RR, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A (2003): Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 107, 1024-32.
- Baksh D, Song L, Tuan RS (2004): Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8(3), 301-16.

- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman L, Robbins RC (2004): Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-73.
- Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J (2003): Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108, 863-8.
- Bel A, Messas E, Agbulut O, Richard P, Samuel JL, Bruneval P, Hagege AA, Menasche P (2003): Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation* 108, 247-52.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P (2003): Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-76.
- Beresford JN (1989): Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop* 12, 270-80.
- Bertani N, Malatesta P, Volpi G, Sonogo P, Perris R (2005): Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. *J Cell Sci* 118, 3925-36.
- Bittira B, Kuang JQ, Al-Khalidi A, Shum-Tim D, Chiu RC (2002): In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg* 74, 1154-9.
- Blom AS, Mukherjee R, Pilla JJ, Lowry AS, Yarbrough WM, Mingoia JT, Hendrick JW, Stroud RE, McLean JE, Affuso J, Gorman RC, Gorman JH, Acker MA, Spinale FG (2005): Cardiac support device modifies left ventricular geometry and myocardial structure after myocardial infarction. *Circulation* 112, 1274-83.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet G, Blau HM (2000): From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-9.
- Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM (2003): Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 108, 2212-8.
- Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI (1994): Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 56, 283-94.

- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997): Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64, 278-94.
- Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA (2003): Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* 9, 1520-7.
- Caplan AI (1991): Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-50.
- Caplan AI, Fink DJ, Linton AE, Young RG, Wakitani S, Goldberg VM, Haynesworth SE: The anterior cruciate ligament: current and future concepts. *Mesenchymal stem cells and tissue repair*. Raven Press Ltd. New York 1993, 405-17.
- Chen EH, Olson EN (2005): Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* 308, 369-73.
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, Lu M, Zhu Z, Chopp M (2003): Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 92, 692-9.
- Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP (2004): Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 94, 92-5.
- Cleland JG, Freemantle N, Coletta AP, Clark AL (2006): Clinical trials update from the American Heart Association: REPAIR-AMI, ASTAMI, JELIS, MEGA, REYTVÉ-H, SURVIVE and PROACTIVE. *Eur J Heart Fail* 8, 105-10.
- Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Colena M (2001): Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10733-8.
- Conget PA, Minguell JJ (1999): Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181, 67-73.
- Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P, Etievent JP, Kantelip JP (2003): Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 108, 253-8.
- Deans RJ, Moseley AB (2000): Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28, 875-84.

- Dennis JE, Caplan AI (1996): Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *J Cell Physiol* 167(3), 523-38.
- Dexter TM, Testa NG (1976): Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture. *Methods Cell Biol* 14, 387-405.
- Digirolamo CM, Stockes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ (1999): Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 107, 275-81.
- Dogne JM, Rolin S, Petein M, Tchana-Sato V, Ghuysen A, Lambermont B, Hanson J, Magis D, Segers P, Pirotte B, Masereel B, Drion P, D'Orio V, Kolh P (2005): Characterization of an original model of myocardial infarction provoked by coronary artery thrombosis induced by ferric chloride in pig. *Thromb Res* 116, 431-42.
- Entmann ML, Smith CW (1994): Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 9, 1301-11.
- Erlebacher JA, Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH (1989): Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. *J Am Coll Cardiol* 4, 201-8.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-6.
- Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, Gomez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez O, Sanchez PL, Hernandez C, Sanz R, Garcia-Sancho J, Sanchez A (2004): Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 95, 742-8.
- Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998): Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-30.
- Frangiannis NG (2006): The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal* 8, 1907-39.
- Fuchs JR, Hannouche D, Terada S, Vacanti JP, Fauza DO (2003): Fetal tracheal augmentation with cartilage engineered from bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Pediatr Surg* 38, 984-7.

- Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, Weissman NJ, Leon MB, Epstein SE, Kornowski R (2001): Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 37, 1726-32.
- Fuchs S, Weisz G, Kornowski R (2002): Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility and safety study. *Circulation* 106, 655-6.
- Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI (2001): The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169, 12-20.
- Gehling IM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, One M (2000): In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106-12.
- Ginis I, Luo Y, Miura T, Thies S, Brandenberger R, Gerecht-Nir S, Amit M, Hoke A, Carpenter MK, Itskovitz-Eldor J, Rao MS (2004): Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 269, 360–80.
- Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ (2005): Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 11, 367-8.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996): Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183, 1797-806.
- Gorman JH, Gorman RC, Plappert T, Jackson BM, Hiramatsu Y, John-Sutton MG, Edmunds LH (1998): Infarct size and location determine development of mitral regurgitation in the sheep model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115, 615–22.
- Gruh I, Beilner J, Blomer U, Schmiedl A, Schmidt-Richter I, Kruse ML (2006): No evidence of transdifferentiation of human endothelial progenitor cells into cardiomyocytes after coculture with neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* 113, 1326-34.
- Guan K, Nayem K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH (2006): Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440, 1199-203.
- Guan K, Wagner S, Unsold B, Maier LS, Kaiser D, Hemmerlein B (2007): Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* 100, 1615-25.

- Günzburg WH, Salmons B: Gentransfer in Säugetierzellen. Hrsg Spektrum Akadem. Verlag, Heidelberg Berlin 1997, 11-32, 185-94.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF (1999): Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-4.
- Haghighi K, Kolokathis F, Pater L, Lynch RA, Asahi M, Gramolini AO, Fan GC, Tsiapras D, Hahn HS, Adamopoulos S, Liggett SB, Dorn GW II, MacLennan DH, Kremastinos DT, Kranias EG (2003): Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest* 111, 869-76.
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1996): Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 166, 585-92.
- Herr MD, McInerney JJ, Copenhaver GL, Morris DL (1988): Coronary artery embolization in closed-chest canines using flexible radiopaque plugs. *J Appl Physiol* 64, 2236-9.
- Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev A, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H (2005): Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 111, 2198-202.
- Hort W, da Canalis S, Just H (1964): Untersuchungen bei chronischem experimentellen Herzinfarkt der Ratte. *Basic Res Cardiol* 44, 288-99.
- Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyarrada A, Nishimura H (2006): Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation* 113, 1311-25.
- Jackson BM, Gorman JH, Moainie SL, Guy TS, Narula N, Narula J, John-Sutton MG, Edmunds LH, Gorman RC (2002): Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 40, 1160-7.
- Jackson KA: Stem cells: Scientific progress and future research directions. National institutes of health / Department of health and human services, New York 2001.
- Jackson KA, Snyder DS, Goodell MA (2004): Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence: potential for stem cell engraftment artifacts. *Stem Cells* 22, 180-7.
- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W (2006): Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367, 113-21.

- Jatsch L: Green Fluorescent Protein (GFP), ein Molekül mit Eigenfluoreszenz zur Etablierung eines *in vivo* Reporters für zell- und molekularbiologische Untersuchungen. Med Diss Heidelberg 2001.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-9.
- Jugdutt BI, Menon V (2004): Valsartan-induced cardioprotection involves angiotensin II type 2 receptor upregulation in dog and rat models of *in vivo* reperfused myocardial infarction. *J Card Fail* 10, 74–82.
- Jugdutt BI, Joljart MJ, Khan MI (1996): Rate of collagen deposition during healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in rat and dog models. *Circulation* 94, 94-101.
- Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C (2005): Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res* 96, 127-37.
- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H (2001): Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103, 634-7.
- Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C (2003): Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 107, 461-8.
- Kessler PD, Byrne BJ (1999): Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol* 61, 219-42.
- Key B, Devine CA (2003): Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies. *Methods Cell Sci* 25, 1-6.
- Kikkawa YS, Pawlowski KS (2007): Cochlear neuronal tracing for frequency mapping with DiI, NeuroVue, and Golgi methods. *Acta Otolaryngol Suppl* 559, 19-23.
- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE (2004): Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109, 1543-9.
- Kleinsmith LJ, Pierce GB Jr (1964): Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 24, 1544-51.

- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S (2001): Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodelling and improves cardiac function. *Nat Med* 7, 430-6.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999): Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10711-6.
- Koyanagi M, Urbich C, Chavakis E, Hoffmann J, Rupp S, Badorff C (2005): Differentiation of circulating endothelial progenitor cells to a cardiomyogenic phenotype depends on E-cadherin. *FEBS Lett* 579, 6060-6.
- Kraitchman DL, Bluemke DA, Chin BB, Heldman AW, Heldman AW (2000): A minimally invasive method for creating coronary stenosis in a swine model for MRI and SPECT imaging. *Invest Radiol* 35, 445-51.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R (2001): Multiorgan, multilineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-77.
- Krombach GA, Kinzel S, Mahnken AH, Gunther RW, Buecker A (2005): Minimally invasive close-chest method for creating reperfused or occlusive myocardial infarction in swine. *Invest Radiol* 40, 14-8.
- Kueth F, Richartz BM, Sayer HG, Kasper C, Werner GS, Hoffken H, Figulla HR (2004): Lack of regeneration of myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans with large anterior myocardial infarctions. *Int J Cardiol* 97, 123-7.
- LaBarge MA, Blau HM (2002): Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 111, 589-601.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L (2000): Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-34.
- Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR (2005): Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433, 647-53.
- Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S (2003): Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7808-11.

- Li B, Li Q, Wang X, Jana KP, Redaelli G, Kajstura J (1997): Coronary constriction impairs Cardiac function and induces myocardial damage and ventricular remodeling in mice. *Am J Physiol* 273, 2508-19.
- Li RK, Mickle DAG, Weisel RD (2001): Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Ann Thorac Surg* 72, 1957-63.
- Life Sciences Portal Baden-Württemberg (2008): www.life-sciences-portal-baden-wuerttemberg.de
- Limboung FP, Drexler H (2005): Bone marrow stem cells for myocardial infarction: effector or mediator? *Circ Res* 96, 6-8.
- Linke A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A (2005): Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8966-71.
- Litvak J, Siderides LE, Vineberg AM (1957): The experimental production of coronary artery insufficiency and occlusion. *Am Heart J* 53, 505-18.
- Liu J, Hu Q, Wang Z, Xu C, Wang X, Gong JG, Mansoor A, Lee J, Hou M, Zeng L, Zhang R, Jerosch-Herold M, Guo T, Bache RJ, Zhang J (2004): Autologous stem cell transplantation for myocardial repair. *AJP - Heart* 287, 501-11.
- Lu H, Xu X, Zhang M, Cao R, Bråkenhielm E, Li C, Lin H, Yao G, Sun H, Qi L, Tang M, Dai H, Zhang Y, Su R, Bi Y, Zhang Y, Cao Y (2007): Combinatorial protein therapy of angiogenic and arteriogenic factors remarkably improves collateralogenesis and cardiac function in pigs. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12140-5.
- Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Amesen H, Abdelnoor M, Forfang K (2005): Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAM1 randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc* 39, 150-8.
- Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Amesen H, Abdelnoor M, Egeland T (2006): Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, 1199-209.
- Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P, Smits JF (1999): Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* 41, 586-93.

- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL (1998): Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176, 57-66.
- Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA (2000): Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 185, 98-106.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S (1999): Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103, 697-705.
- Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ (2003): Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 9, 1195-201.
- Manin GR (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-8.
- Markovitz LJ, Savage EB, Ratcliffe MB, Bavaria JE, Kreiner G, Iozzo RV, Hargrove WC, Bogen DK, Edmunds LH (1989): Large animal model of left ventricular aneurysm. *Ann Thorac Surg* 48, 838-45.
- Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S (2004): Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter. *Abcg2*. identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 265, 262-75.
- Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM (1987): Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 21, 737-46.
- Menasche P (2005): Skeletal myoblast for cell therapy. *Coron Artery Dis* 16, 105-10.
- Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D (2001): Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357, 279-80.
- Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F (2004): Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 95, 911-21.
- Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S (2006): 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* 113, 1287-94.

- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000): Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-82.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001): Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 226, 507-20.
- Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, Qyang Y, Bu L, Sasaki M, Martin-Puig S, Sun Y, Evans SM, Laugwitz KL, Chien KR (2006): Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127, 1151-65.
- Mukherjee R, Brinsa TA, Dowdy KB, Scott AA, Baskin JM, Deschamps AM, Lowry AS, Escobar GP, Lucas DG, Yarbrough WM, Zile MR, Spinale FG (2003): Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation* 107, 618-25.
- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi II (2000): Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105, 1527-36.
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Ruban M (2004): Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-8.
- Nagaya N, Fujii T, Iwase T (2004): Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 17, 56-8.
- Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S (2005): Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112, 1128-35.
- Naslund U, Haggmark S, Johansson G, Marklund SL, Reiz S (1992): A closed-chest myocardial occlusion-reperfusion model in the pig: techniques, morbidity and mortality. *Eur Heart J* 13, 1282-9.
- Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P (2004): Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 94, 1543-53.
- Norton PA, Coffin JM (1985): Bacterial β -galactosidase as a marker of rous sarcoma virus gene expression and replication. *Mol Cell Biol* 5, 281-90.

- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE (2004): Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 10, 494-501.
- Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD (2003): Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 12313-8.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001a): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-5.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001b): Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10344-9.
- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C (2004): Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22, 377-84.
- Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel Jr HC, Kormos R (2005): Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130, 1631-8.
- Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ (1998): Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol* 274, 1812-20.
- Penn MS, Zhang M, Deglurkar I, Topol EJ (2004): Role of stem cell homing in myocardial regeneration. *Int J Cardiol* 95, 23-5.
- Perm EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT (2003): Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 107, 2294-302.
- Pfister O, Mouquet F, Jain M, Summer R, Helmes M, Fine A (2005): CD31⁻ but Not CD31⁺ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res* 97, 52-61.
- Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ (1999): Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 72, 570-85.

- Pittenger MF, Martin BJ (2004): Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95(1), 9-20.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswa, RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-7.
- Prockop DJ (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-4.
- Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P (2002): Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 346, 5-15.
- Rainier S, Feinberg AP (1988): Capture and characterization of 5-aza-2'-deoxycytidine-treated C3H/10T1/2 cells prior to transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 6384-8.
- Reffelmann T, Sensebat O, Birnbaum Y, Stroemer E, Hanrath P, Uretsky BF, Schwarz ER (2004): A novel minimal-invasive model of chronic myocardial infarction in swine. *Coron Artery Dis* 15, 7-12.
- Reichel C, Mathur J, Eckes P, Langenkemper K, Koncz C, Schell J, Reiss B, Maas C (1996): Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea Victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5888-93.
- Reimer KA, Jennings RB (1979): The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death, II Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 40, 633-44.
- Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE (2000): Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 149, 731-40.
- Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG (2003): Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2, 242-56.
- Rombouts WJ, Ploemacher RE (2003): Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 17, 160-70.
- Sabbah HN, Stein PD, Kono T, Gheorghide M, Levine TB, Jafri S, Hawkins ET, Goldstein S (1991): A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 260, 1379-84.

- Sabbah HN, Sharov VG, Gupta RC, Rastogi S, Undrovinas AI, Chaudhry PA, Todor A, Mishima T, Tanhehco EJ, Suzuki G (2003): Reversal of chronic molecular and cellular abnormalities due to heart failure by passive mechanical ventricular containment. *Circ Res* 93, 1095–101.
- Sabbah HN, Imai M, Cowart D, Zhang D, Amato A, Carminati P, Gheorghide M (2007): Hemodynamic properties of a new-generation positive inotropic agent for the treatment of advanced heart failure. *Am J Cardiol* 99, 41–6.
- Sawamura D: Keratinocyte gene therapy using cytokine genes. In: *The skin and gene therapy*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 2001, 155-73.
- Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM (2004): Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 44, 1690-9.
- Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H (2006): Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355, 1210-2.
- Schaper W, Jageneau A, Xhonneux R (1967): The development of collateral circulation in the pig and dog heart. *Cardiologia* 51, 321-35.
- Schuldiner M, Eiges R, Eden A (2001): Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 913, 201-5.
- Schummer A, Habermehl KH, Nickel R, Schummer A, Seiferle E: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere (Bd III)*, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1984.
- Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL (2000): Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119, 1169-75.
- Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ (2002): Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 73, 1919-25.
- Shi Q, Rafti S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A (1998): Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92, 362-7.
- Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T (2001): Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103, 2776-9.

- Skutella G (2008): Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456, 344-9.
- Slama J, Andree C, Winkler T, Swain WF, Eriksson E (1995): Gene transfer. *Ann Plast Surg* 35, 429-39.
- Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E (2007): Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 115, 896-908.
- Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G (2003): Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361, 45-6.
- Strauer BE, Kornowski R (2003): Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 107, 929-34.
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2001): Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr* 126, 932-8.
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2002): Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106, 1913-8.
- Suzuki M, Asano H, Tanaka H, Usuda S (1999): Development and evaluation of a new canine myocardial infarction model using a closed-chest injection of thrombogenic material. *Jpn Circ J* 63, 900-5.
- Swindle MM (1984): Swine as replacements for dogs in the surgical teaching and research laboratory. *Lab Anim Sci* 34, 383-5.
- Swindle MM, Horneffer PJ, Gardner TJ, Gott VL, Hall TS, Stuart RS, Baumgartner WA, Borkon AM, Galloway E, Reitz BA (1986): Anatomic and anesthetic considerations in experimental cardiopulmonary surgery in swine. *Lab Anim Sci* 36, 357-61.
- Swindle MM, Smith AC, Hepburn BJ (1988): Swine as models in experimental surgery. *J Invest Surg* 1, 65-79.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T (1999): Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5, 434-8.
- Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA (1998): Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 4, 929-33.

- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-7.
- Tilkorn DJ, Bedogni A, Keramidaris E, Han X, Palmer JA, Dingle AM, Cowling BS, Williams MD, McKay SM, Pepe L, Deftereos A, Morrison WA, Penington AJ, Mitchell GM (2010): Implanted myoblast survival is dependent on the degree of vascularization in a novel delayed implantation/prevascularization tissue engineering model. *Tissue Eng Part A* 16, 165-78.
- Tiyyagura SR, Pinney SP (2006): Left ventricular remodelling after myocardial infarction: past, present, and future. *Mt Sinai J Med* 73, 840-51.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD (2002): Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93-8.
- Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T (1999): Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100, 11247-56.
- Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiaty LC, Allidina Y, Liu P, Li RK (2002): Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123, 1132-40.
- Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F (2004): Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 295, 395-406.
- Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP (2003): Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361, 47-9.
- Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B (2003): Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10440-5.
- Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dembach E, Zeiher AM, Dimmeler S (2003): Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 108, 2511-6.
- Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T (2005): Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol* 205, 194-201.

- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW (2003): Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422, 901-4.
- Velazquez EJ, Francis GS, Armstrong PW (2004): An international perspective on heart failure and left ventricular systolic dysfunction complicating myocardial infarction: the VALIANT Registry. *Eur Heart J* 25, 1911-9.
- Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD (2004): Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 363, 783-4.
- Wagers AJ, Weissman IL (2004): Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639-48.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995): Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18, 1417-26.
- Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC (2000): Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120, 999-1005.
- Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E (2001): The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: Pathophysiological and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122, 699-705.
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M (2003): Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422, 897-901.
- Wang X, Hu Q, Nakamura Y, Lee J, Zhang G, From AH (2006): The role of the sea-1-CD31-cardiac progenitor cell population in postinfarction left ventricular remodeling. *Stem Cells* 24, 1779-88.
- Watt FM, Hogan J (2000): Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. *Science* 287, 1427.
- Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD (1986): A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res* 20, 907-17.
- Weltgesundheitsorganisation (2001): Report, 23-35.
- White FC, Roth DM, Bloor CM (1986): The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. *Lab Anim Sci* 36, 351-6.
- Winilsky SO, Gopal TV, Hassanzadeh S, Takahashi H, Gryder D, Rogawski MA (2005): Adult murine skeletal muscle contains cells that can differentiate into beating cardiomyocytes in vitro. *PLoS Biol* 3, 87.

- Winkhard M: Das Herzkatheterlabor Einführung in die Aufgabenbereiche des kardiologischen Assistenzpersonals. Steinkopffverlag, Darmstadt 2005.
- Winslow T, Kibluk L: Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Can Stem Cells Repair a Damaged Heart? National Institutes of Health / Department of Health and Human Services, New York 2005, 87-91.
- Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2004): Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364, 141-8.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000): Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61, 364-70.
- Xia Z, Ye H, Locklin RM, Ferguson DJP, Cui Z, Triffitt JT (2005): Efficient characterisation of human cell-bioceramic interactions in vitro and in vivo by using enhanced GFP-labelled mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26, 5790-800.
- Xu X, Xu Z, Xu Y, Cui G (2005): Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis* 16, 245-55.
- Xue J, Peng J, Zhang L, Liu S, Chen J, Wang A, Yuan M, Xu W, Lu S (2010): Construction of recombinant adenovirus vector pAdxsi-green fluorescent protein-homo sapiens NEL-like 1 and transfected into rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 24, 606-12.
- Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW (2004): Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow-cells in acute myocardial infarction. *Circulation* 109, 3154-7.
- Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K (2005): Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 115, 326-38.
- Zeng L, Hu Q, Wang X, Mansoor A, Lee J, Feygin J, Zhang G, Suntharalingam P, Boozar S, Mhashilkar A, Panetta CJ, Swingen C, Deans R, From AH, Bache RJ, Verfaillie CM, Zhang J (2007): Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation* 115, 1866-75.
- Zhang H, Song P, Tang Y, Zhang XL, Zhao SH, Wei YJ, Hu SS (2007): Injection of bone marrow mesenchymal stem cells in the borderline area of infarcted myocardium: heart status and cell distribution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 134, 1234-40.

- Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE (2001): Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 33, 907-21.
- Zohlhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T (2006): Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 295, 1003-10.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben, bedanken.

Ich danke herzlich Herrn Professor Dr. med. G. Hasenfuß für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie zu schreiben, für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, für die organisatorische Unterstützung und seine konstruktive Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Kaomei Guan-Schmidt für die Betreuung der Arbeit. Ich danke ihr für die Aufmerksamkeit, die Sie der Arbeit entgegengebracht hat, für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Planung und Durchführung der vorliegenden Dissertation, sowie für zahlreiche unersetzliche Ratschläge, Geduld und die überaus angenehme Zusammenarbeit.

Ich möchte Anke Cierpka, Astrid Steen und Susanne Burkhardt für die Einführung in die Methodik und ihre große Hilfe danken. Sie waren jederzeit mit Rat und Tat zur Stelle und sorgten mit ihrer ausgeglichenen, freundschaftlichen Art dafür, dass das Arbeiten Spaß gemacht hat.

Allen Mitarbeitern des Stammzell-Labors und der Tierexperimentellen Einrichtung danke ich für die Unterstützung, kollegiale Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und für das immer freundliche und herzliche Arbeitsklima.

Lebenslauf

Ich wurde am 5. Februar 1978 als ältester Sohn der Bauzeichnerin Elvira Zyba, geb. Reinke, und des Dipl.-Ingenieurs Vasilij Zyba in Charkow (Ukraine) geboren. Mein Bruder Alexander Zyba ist 28 Jahre alt. Seit 2003 bin ich mit Valentina Zyba, geb. Ponomarjow, verheiratet. Im April 2008 wurde unserer Sohn Kyrill und im März 2010 unsere Tochter Emma geboren.

Von 1985 bis 1995 besuchte ich die Mittelschule und von 1990 bis 1995 die Musikschule in Satschepilowka (Ukraine). Im Wintersemester 1995/1996 begann ich mit dem Studium an der Fakultät für Fremdsprachen der Staatlichen Pädagogischen Universität in Charkow und absolvierte bis zur Ausreise nach Deutschland 1996 das zweite Semester. Nach einem intensiven Sprachkurs in Hannover 1997 war ich Stipendiat des „Göttinger Institutes“ und des Studienkollegs Hamburg, wo ich mein deutsches Abitur nachholte. Im Sommersemester 2000 fing ich mein Humanmedizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen an. Ab April 2002 arbeitete ich im Stammzelllabor der Abteilung Kardiologie und Pneumologie, wo die vorliegende Arbeit entstand. Im November 2006 absolvierte ich die Ärztliche Prüfung in Humanmedizin und erhielt die Approbation als Arzt. Im April 2006 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Gleichzeitig war ich als wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Kardiologie und Pneumologie tätig. Seit August 2008 bin ich ein Doktorand in der Abteilung Parodontologie an der Georg-August-Universität Göttingen. Mit bestandenem Staatsexamen der Zahnmedizin erhielt ich im Oktober 2009 die Approbation als Zahnarzt. Seit Januar 2010 bin ich als Assistenzarzt in der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Plastische Operationen und Spezielle Schmerztherapie im Klinikum Bremen-Mitte tätig.