Asklepios Klinik St. Georg

Abteilung für Kardiologie

Chefarzt Professor Dr. med. Karl – Heinz Kuck

Autologe Stammzelltransplantation bei `end-stage heart failure´

Dissertation

Zum Erlangen des Grades eines Doktors der Medizin
Der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Patricia Andrea Fäßler
aus Bonn

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 17.04.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Professor Dr. K.-H. Kuck

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in: PD Dr. M. Blessmann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **4**

Einleitung **6**
Herz-Kreislauferkrankungen und das Gesundheitswesen 6
Aktueller Stand der Stammzellforschung am Herzen 7

Material und Methoden **15**
Stammzellgewinnung 15
Zellmarkierung 15
Versuchstiere und Haltung 17
Anästhesie, Intubation und Tiervorbereitung 18
Operation, Generierung des Infarktareals, Zellinjektion 20
Nachsorge 23
Organentnahme/Materialgewinnung 23
Materialaufbereitung 24
Immunhistochemie 25
Auswertung 26

Ergebnisse **27**
Zellmarkierung 27
Effekte der Stammzellinjektion auf die Größe des Infarktareals 28
Immunhistochemie 31

Diskussion **34**
Überlegungen zum Zelltyp: MSC und myogene Regeneration 34
Versuchskonstellation 35
Klinische Aspekte: Von der Zellapplikation bis zur Auswertung funktioneller Veränderungen 38
Bestimmung der Anzahl der Blutgefäße 45

Zusammenfassung **46**

Literaturverzeichnis **48**

Lebenslauf **57**

Danksagung **58**

Eidesstattliche Erklärung **59**

Abkürzungsverzeichnis

ADSC	adipose derived stem cells
ANP	Atriales natriuretisches Peptid, herzspezifisches Hormon
5-Aza	5- Azacytidine
BNP	brain natriuretic peptide, herzspezifisches Hormon
BOOST	Patientenstudie: Bone marrow Transfer to Enhance ST-Elevation
BRDU	Bromdesoxyuridin (= chem. Analogon des Nukleosids Thymin)
CD34	Cluster of Differentiation (= Oberflächenmarker), 34+ ist spezifisch für haematopoetische Stammzellen
CFDA, SE	Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester
CO_2	Kohlenstoffdioxid
G-CSF	Granulocyte - Colony stimulating factor
DAPI	Diamidino Phenylindole Dihydrochloride Hydrate
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
eGFP	green fluorescent proteine
HE	Haematoxylin-Eosin
HSC	haematopoetische Stammzellen
i.c.	intrakoronar
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IMDM	Iscove`s modified Dulbecco`s medium
MAPC	multipotent adult progenitor cells
MHC	myosin heavy chain

MLC	myosin light chain
MSC	Mesenchymale Stammzellen
rMSC	Mesenchymale Stammzellen der Ratte
MYSTAR	Patientenstudie Myocardial Stem Cell administration after acute myocardial infarction
NaOH	Natriumhypoxid
NOGA	3D endokardiales Mapping mittels NOGA Katheter
PBS	Phosphate buffered saline (Puffer)
PDS	Polydioxanon (Nahtmaterial)
RIA/LAD	Left anterior descending, Hauptgefäß des Herzens
SCF	Stromal cell-derived factor
SMA	smooth muscle actin
SP	Side Population
TOPCARE AMI	Patientenstudie nach Herzinfarkt mit Vergleich der Gabe von Knochenmark und zirkulierenden Vorläuferzellen

Einleitung

Herz-Kreislauferkrankungen und das Gesundheitswesen

Mit 43% waren Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems im Jahr 2009 laut Statistischem Bundesamt die häufigste Todesursache in Deutschland (**1**).
Bei steigender Lebenserwartung und stetig steigenden Kosten im Gesundheitssystem gilt es, neue Behandlungsmöglichkeiten für diese Volkskrankheit zu finden.
Dies betrifft zwei unterschiedliche Patientengruppen:
Patienten die akut erkranken, im Sinne eines Koronarsyndroms (Herzinfarkt)- und chronisch erkrankte Patienten, bei denen eine Schädigung des Herzmuskels schon über längere Zeit besteht. Die Folge ist häufig eine Verschlechterung der Herzfunktion, deren chronischer Verlauf in eine Herzinsuffizienz mündet. In der Europäischen Union sind von diesem Krankheitsbild ca. 10 Millionen Patienten betroffen (**2**).

Neue Strategien sollen die Lebensqualität der Patienten verbessern und dabei gleichzeitig die langfristig entstehenden Behandlungskosten für das Gesundheitssystem senken. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob durch die Gabe von mesenchymalen Knochenmarkstammzellen (MSC) eine Reparatur von geschädigtem Herzmuskelgewebe möglich ist. Eine Transplantation von MSCs könnte eine Neubildung von Herzmuskelgewebe begünstigen. Damit besteht die Hoffnung, nicht nur eine Verbesserung der Herzleistung, sondern durch die Minderung der Schwere der Erkrankung auch eine Verbesserung der Lebensqualität der Patienten zu erreichen. Mögliche Langzeiteffekte einer erfolgreichen Stammzelltherapie könnten z.B. eine geringere Mortalität, eine verminderte Morbidität verbunden mit einer geringeren Behandlungsbedürftigkeit sein, sowie eine Absenkung der Medikamenteneinnahme.
Zielsetzung dieser Arbeit ist es, den Wirkmechanismus der Stammzellen vor Ort im Herzen bzw. die Interaktion der mesenchymalen Stammzellen mit den Herzmuskelzellen näher zu beleuchten. Darüber hinaus könnten die Ergebnisse in Bezug auf eine Optimierung der zelltherapeutischen Behandlung der Patienten von erheblichem Nutzen sein.

Neben der für die Patienten wichtigsten Frage, ob die Stammzelltherapie eine neue Behandlungsoption darstellt, welche zu einer Verbesserung der Lebensqualität führt, gibt es auch wissenschaftliche Detailfragen. Von großem Interesse ist dabei u.a. welches der optimale Zeitpunkt/-fenster der Zellinjektion ist, welcher Zelltyp in Bezug auf die Myokard-Regeneration den größten `Benefit´ hat und ob die Art und Weise, mit der die Zellen in das Herz eingebracht werden (peripher, intra-venös, intra-koronar oder intra-myokardial), eine Rolle spielt.

Aktueller Stand der Stammzellforschung

Patienten, die mit einem akuten Koronarsyndrom in ein Krankenhaus eingeliefert werden, sollten innerhalb kürzester Zeit kardiologisch untersucht und - sofern möglich - sofort interventionell behandelt werden. Goldstandard bei der Behandlung des Herzinfarktes, der durch den Verschluss eines oder mehrerer Herzkranzgefäße entstanden ist, ist die Aufdehnung der Verschluss- bzw. Engstellen mittels Ballondilatation sowie das Einsetzen eines Stents. Dabei handelt es sich um ein dünnes Drahtgeflecht, welches in die aufgeweitete Koronargefäßengstelle eingebracht wird und diese offen halten soll. Damit ist der Blutfluss wieder gewährleistet. Allerdings ist dies nicht bei allen Patienten möglich. Bei langstreckigen, diffusen Veränderungen oder Abgangsstenosen, kann ein Stent nur bedingt einsetzbar bzw. sinnvoll sein. Stents haben zudem keine unbegrenzte „Haltbarkeit“; es können Restenosen auftreten, so dass der Blutfluss erneut eingeschränkt wird und bei einem Verschluss ein erneuter Herzinfarkt resultieren kann. Durch die Entwicklung von Medikamenten-beschichteten Stents wird versucht, die Restenoserate zu reduzieren. Besonders bei Patienten mit weiteren Risikofaktoren wie Diabetes mellitus sind Restenosen häufiger (**10**). Ist bei komplizierten Gefäßverhältnissen eine Stentversorgung nicht möglich, so ist eine Bypass-Operation indiziert, in der die Engstelle des Koronargefäßes mit einem Gefäßersatz überbrückt wird. Die Langzeitüberlebensrate bei Mehrgefäßerkrankungen ist dann besser als bei der alleinigen Stentversorgung (**25**).

In den ersten Tagen nach einem Infarkt scheint unser Organismus zu versuchen, Selbstreparaturmechanismen zu aktivieren. Durch bestimmte Signalstoffe werden dabei körpereigene Zellen zum Herzen gelockt. Vermutlich handelt es sich um sogenannte Vorläufer- oder Progenitorzellen, die infolge der Organischämie aus dem Knochenmark

freigesetzt werden. Diese gelangen über das Blutkreislaufsystem ins Herz. Es gibt Befunde, dass sich die Zellen nach der Migration zum Herzen in Muskelzellen differenzieren (**8, 36**), Gefäßneubildungen konnten ebenfalls beobachtet werden (**18, 37**). Möglicherweise beteiligen sich an dieser Reparatur auch die adulten kardialen Progenitorzellen (**54**), die im Herzen ortstämmig sind- und Charaktereigenschaften sowohl von Stammzellen als auch von Herzmuskelzellen besitzen. Jedoch ist über die genaue Aufgabe und den möglichen Aktivierungs- und Wirkungsmechanismus der kardial endogenen Stammzellen im Herzen bisher wenig bekannt.

Hinweise für die Existenz körpereigener Selbstreparaturmechanismen ergaben sich nach Herztransplantationen, bei denen ein weibliches Herz in einen männlichen Empfängerorganismus verpflanzt wurde. Bei diesen Versuchen konnten im Spenderorgan sowohl im Herzmuskelgewebe, als auch innerhalb der Gefäßwände Zellen gefunden werden, die positiv für das männliche Y-Chromosom waren. Dieser Befund deutet zweifelsfrei darauf hin, dass Zellen aus dem männlichen Organismus in das weibliche Spenderorgan eingewandert sind (**13**).
Allerdings reichen diese körpereigenen Reparaturversuche für eine erfolgreiche Selbstheilung nicht aus (**67**).

In den letzten Jahren sind zahlreiche klinische Studien, die sich mit der „Sicherheit und Machbarkeit“ sowie der Wirkung von Stammzellen auf die Herzfunktion befassen, am Patienten durchgeführt worden (**31,62**).
In den Studien MYSTAR (**24, 53**) BOOST (**86**), TOPCARE AMI (**9, 66**) u.a., wurden Infarktpatienten, die zunächst interventionell und medikamentös nach dem aktuellen Stand der Medizin behandelt wurden, zusätzlich Stammzellen verabreicht. Die Patienten erhielten Ihre eigenen (autologen; Spender=Empfänger) Knochenmarkzellen im Rahmen der Herz-Operation oder minimal-invasiv mittels Kathetertechnik. Obwohl die Studienbedingungen ähnlich sind, werden die Follow-Up-Daten insbesondere in Bezug auf den erhofften positiven Effekt auf die Herzleistung unterschiedlich eingeschätzt und daher kontrovers diskutiert (**15, 80, 81, 87**).
Trotz vielfältiger Grundlagenforschung im Labor und in Tierversuchen gibt es immer noch viele unbeantwortete Fragen, zum Beispiel welche Zellen gegeben werden sollten, zu welchem Zeitpunkt (**76**) und auf welche Art und Weise (- über einen Katheter in die Koronargefäße, - über einen Katheter in den Herzmuskel (von endokardial), oder

chirurgisch in den Herzmuskel (von epikardial)). Auch die genaue Zellzahl variiert in den klinischen Studien und auch ein Hinweis auf eine „Mindestdosis“ fehlt bislang (**85**).
In den klinischen Zelltherapiestudien am Herzen wurde die weitaus größte Anzahl an Patienten über die intra-myokardiale Zellinjektionsroute mittels Kathetertechnik behandelt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass durch die direkte intra-myokardiale Zellinjektion die Auswaschung der Zellen aus dem Zielgebiet deutlich geringer ist und durch die längere Verweildauer eine bessere Wirkung erzielt werden kann. Zumindest deuten Tierversuche darauf hin, dass mit Zellen, die direkt in den Herzmuskel injiziert wurden, im Vergleich zu der intra-koronaren Applikation bessere Ergebnisse erzielt werden können (**38**).
Unklar ist desweiteren, welche Zellen am besten geeignet sind und ob eine undifferenzierte Stammzelle eine vollständige Differenzierung bis hin zu einer spezialisierten Muskelzelle durchlaufen kann. Auch muss geklärt werden, ob das Einbringen von Zellen direkt zur Verbesserung der Herzfunktion führt, oder indirekt die Ausschüttung von Signalstoffen die Selbstreparaturmechanismen unterstützen.

Noch schwieriger ist die Situation bei den Patienten mit einer Herzinsuffizienz. Hier sind die Umbauvorgänge abgeschlossen, und die Pumpfunktion des Herzmuskels ist durch den vorausgegangenen Schaden eingeschränkt. Die parakrinen Mechanismen (Signalstoffe, die von den Zellen ausgeschüttet werden) sind andersartig als nach einem akuten Ereignis, wie dem Herzinfarkt. Dies wirft die Frage auf, ob beide Patientengruppen gleichermaßen von einer Stammzelltherapie profitieren würden. Die Anzahl an Studien, in denen herzinsuffiziente Patienten mit einer Zelltherapie behandelt wurden, ist im Vergleich zu der großen Gruppe mit akutem Herzinfarkt sehr viel geringer. Perin et al. (**58**) haben bei einem herzinsuffizienten Patienten Stammzellen auf die vordere Seite der Narbe, welche nach zwei länger zurückliegenden Herzinfarkten entstanden war, injiziert. Elf Monate nach der Injektion verstarb der Patient. In der Obduktion wurde das Herz untersucht, und es zeigte sich eine signifikante Erhöhung von Kapillaren an der Injektionsseite. Auch myogen differenzierte Zellen wurden gesehen. Kastrup et al. (**23**) konnten aktuell Ergebnisse veröffentlichen, die einen positiven Effekt bei Patienten mit chronischer KHK und intra-myokardialer MSC-Gabe (über das NOGA-Kathetersystem) bestätigen. Allerdings wurde diese Untersuchung ohne eine Kontrollgruppe durchgeführt.

Hinweise auf einen möglichen Nutzen der Stammzelltherapie sind somit auch für herzinsuffiziente Patienten gegeben, weitere Studien und höhere Patientenzahlen sind jedoch notwendig, um den tatsächlichen `Benefit´ der Prozedur zu belegen.
Eine weitere, noch ungeklärte Frage ist, welcher Zelltyp am besten für die zelluläre Kardiomyoplastie geeignet ist.

Embryonale Stammzellen

Die embryonalen Stammzellen haben das größte Differenzierungspotential, da aus ihnen alle Zellarten und Gewebetypen hervorgehen können, sie sind pluripotent. Aufgrund dieser Eigenschaft schreibt man den embryonalen Stammzellen das größte regenerative Potential zu. Die Verwendung dieser Zellen ist jedoch nicht nur aus ethischen Gründen problematisch. Nach Transplantationsversuchen mit embryonalen Stammzellen wurde u.a. eine erhöhte Inzidenz von Teratokarzinomen festgestellt (**20, 73**).
Zudem muss bei der Verwendung von embryonalen Stammzellen zwangsläufig eine Immunsuppression erfolgen, da diese Zellen körperfremde Zellen sind und eine Abstoßungsreaktion wie z.B. nach einer Organtransplantation sehr wahrscheinlich ist. Da es trotz Immunsuppression zu Abstoßungsreaktionen kommen kann und die Medikation darüber hinaus nicht ohne Nebenwirkungen ist, besteht das Risiko, dass embryonale Stammzellen dem Patienten mehr schaden als nutzen.
Das Verbot einer intensiven Forschung an diesen Zellen ist kritisch zu sehen, denn Erkenntnisse, die an diesen Zellen gewonnen werden, könnten für das Verständnis des Wirkmechanismus von adulten Stammzellen von erheblicher Bedeutung sein. Die Forschung an embryonalen Stammzellen ist in Deutschland momentan nur sehr eingeschränkt möglich.
Adulte Stromazellen, die dedifferenziert werden können und dann den Eigenschaften der embryonalen Stammzellen bzgl. ihrer Pluripotenz ähneln, sind die „induced pluripotent stem cells“ (IPC). Auch hier traten Teratokarzinome auf, so dass an einen Einsatz dieser Zellen in einem „klinischen Setting“ gegenwärtig nicht zu denken ist (**51, 62**).

ADSCs, skeletale Myoblasten, kardiale und zirkulierende Progenitorzellen

Durch ihre Fähigkeit zur Kontraktion wurden die aus dem menschlichen Muskelgewebe stammenden skeletalen Myoblasten (Satellitenzellen) schon relativ früh zur Herz-Regeneration in klinischen Studien eingesetzt (**22, 37, 45, 46, 70**). Allerdings kam es

dabei teilweise zu schwerwiegenden Herzrhythmusstörungen (**47, 72**), die eine Implantation von Cardioverter-Defibrillatoren (ICD) notwendig machten (**4**). Mittlerweile ist auch der Grund für die rhythmologische Problematik bekannt. Den skeletalen Myoblasten fehlt das Membranprotein Connexin-43, welches für die Weiterleitung der elektrischen Erregung von einer Herzmuskelzelle zur anderen notwendig ist (**12**).

Positive Effekte wurden bei der Verwendung von kardialen Stamm- und Progenitorzellen (**54, 79**) und ADSCs, aus Fettgewebe isolierten Stammzellen, (**82**) beobachtet, Patientenstudien fehlen jedoch noch.

Die im Blutkreislauf zirkulierenden Progenitorzellen werden ebenfalls durch bestimmte Signalstoffe ins Herz gelockt (**75**). Es wird vermutet, dass diese Zellen für Reparaturen zur Verfügung stehen, jedoch eher für kleinere Schäden. Für ein akutes Ereignis ist die Zellzahl und Kapazität dieser Zellen nicht ausreichend (**69**).

Adulte Stammzellen

Das menschliche Knochenmark besitzt eine Vielzahl unterschiedlicher Vorläuferzellen, deren Funktion, bei Umsiedlung in ein anderes Gewebe, z.B. das Herz, noch nicht vollständig bekannt ist.

Jackson et al. (**30**) führten Knochenmarkstransplantationen mit markierten Zellen und anschließender Ligatur der LAD, dem Hauptkoronargefäß, welches den linken Ventrikel versorgt, durch. Die markierten Zellen konnten im Myokard nachgewiesen werden und zwar bei allen Tieren, bei denen die Ligatur durchgeführt wurde. Nicht jedoch in der Placebogruppe. Dies lässt vermuten, dass ausgelöst durch die Ischämie, bestimmte Signale oder Botenstoffe freigesetzt werden, welche die Stammzellen mobilisieren und zum Herzen leiten. Nur so ist erklärbar, dass in der Infarktgruppe Zellen im Herzen wieder gefunden werden konnten und bei der „gesunden Gruppe“ nicht (**11, 16**).

Die adulten Stammzellen lassen sich zahlreiche Untergruppen einteilen:

Die zwei wichtigsten Gruppen sind die HSC (haematopoetische Stammzellen) und MSC (mesenchymale Stammzellen). Der Vorteil bei der Verwendung von adulten Stammzellen im Vergleich zu embryonalen ist, dass es keine Einschränkungen durch den Gesetzgeber gibt. Adulte Stammzellen sind zudem einfach zu beschaffen. Bei der Verwendung von autologen Zellen ist keine Immunsuppression notwendig. Größter Nachteil ist das eingeschränkte Differenzierungspotential der adulten Stammzellen im Vergleich zu den

embryonalen Stammzellen, die pluripotent sind. Somit gehört die Identifikation des geeigneten Zelltyps zu den zentralen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Therapie mit adulten Stammzellen. In Bezug auf die Auswahl der optimalen Zelle bei den adulten Stammzellen gibt es zweifelsohne mehr Variablen als bei den embryonalen Zellen.

HSC (hämatopoetische Stammzellen)

Nach der Transplantation adulter hämatopoetischer Stammzellen (CD34+) mit dem Ziel deren Differenzierungskapazität zu überprüfen, wurde eine erhöhte Anzahl von Kapillargefäßen festgestellt. Die resultierende bessere Durchblutung wurde als Grund für den positiven Effekt auf die Herzfunktion gewertet (**37**). Es konnte kein Nachweis erbracht werden, dass die HSCs auch zur Myogenese beitragen (**18, 50, 65, 82**). Orlic et al. (**57**) behaupten Gegenteiliges, und sehen eine Beteiligung der HSCs auch an der Herzmuskelzellneubildung. Dadurch, dass die Zellen in diesen Versuchen nicht markiert waren, fehlt allerdings ein eindeutiger Beweis, dass die HSC für die Verbesserung der Herzfunktion verantwortlich sind. Vereinfacht gesagt vermutet man derzeit, dass sich hämatopoetische Stammzellen (HSC) an der Gefäß- und mesenchymale Stammzellen (MSC) an der Herzmuskel-Neubildung beteiligen (**49, 59, 74**).

Mesenchymale Stammzellen und ihre Differenzierung

MSC sind relativ einfach aus einem Knochenmarkpunktat zu isolieren und lassen sich unter geeigneten Bedingungen problemlos über mehrere Passagen kultivieren. Neuere Befunde deuten darauf hin, dass es sich bei den mesenchymalen Stammzellen um keine einheitliche Population handelt. So scheint es innerhalb der MSC Subpopulationen zu geben wie die MAPCs (**34, 66**), oder SP (side population) Zellen (**30, 67**), die durch jeweils andere Oberflächenmarker unterschieden werden können. Die Heterogenität macht natürlich ein gezieltes Dirigieren der MSC mit Signal- und Botenstoffen in eine bestimmte Differenzierungsrichtung extrem schwierig. Seit langem wird diskutiert, ob es den sogenannten „homing effect“ tatsächlich gibt, also ein „Mikromilieu“ innerhalb des Herzmuskelgewebes, welches eine Transdifferenzierung unreifer Vorläuferzellen in Kardiomyozyten bewirken kann. Fraglich ist, ob es ein Zeitfenster für die Differenzierung von Stammzellen gibt. Und, welche Stammzellen sich möglicherweise für eine Angio- und/oder Myogenese-Induktion eignen. Die Kontaktaufnahmemöglichkeiten zwischen Zellen sind von erheblicher Komplexität, so dass bis heute nur schemenhafte

Vorstellungen über die hier relevanten Signalkaskaden existieren, was die Schwierigkeit einer gezielten Stammzelltherapie vergrößert. Ein genaueres Verständnis der Mechanismen, wie eine Vorläuferzelle z.B. myogen differenziert, ist Grundvoraussetzung für eine effektive Stammzelltherapie am menschlichen Herzen. Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie sich Zellen entwickeln, wenn Sie ins Herz transplantiert werden:

1. Bei der Transdifferenzierung wandeln sich unreife Vorläuferzellen (z.B. mesenchymale Stammzellen) in eine reife (=ausdifferenzierte) Zielzelle (z.B. Kardiomyozyten) um.
2. Bei einer Zellfusion handelt es sich um eine Verschmelzung zweier unterschiedlicher Zelltypen, wobei die neu entstehende Zelle die Eigenschaften beider Ausgangzellen besitzt. Auf diese Weise könnte z.B. eine adulte Herzmuskelzelle eine wesentliche Eigenschaft von Stammzellen- nämlich die Teilungsfähigkeit- zurückerhalten, so dass die Entstehung neuen Herzmuskelgewebes und damit eine Funktionsverbesserung denkbar wären.
3. Über `parakrine Mechanismen´ könnten z.B. Stammzellen aus dem Knochenmark angelockt und deren Umwandlung in Herzmuskelzellen unterstützt werden. Ob und wenn ja welche Signalstoffe möglicherweise von injizierten Stammzellen (oder stimulierten Kardiomyozyten) ausgeschüttet werden, ist noch Gegenstand der Forschung.

Die aufgeführten Probleme und sich daraus ergebenden Fragen lassen sich nur durch eine umfassende Grundlagenforschung lösen. Die Ergebnisse aus klinischen Studien an mittlerweile über 10000 Herzpatienten, die mit Stammzellen behandelt wurden, geben aufgrund der unterschiedlichen Daten zur Herzfunktionssteigerung (von 0-10%) Anlass zu andauernden Diskussionen. Auch unterscheiden sich die klinischen Studien in wichtigen Aspekten. So werden unterschiedliche Zelltypen über unterschiedliche Applikationsrouten (intra-venös, peripher, intra-koronar oder intra-myokardial) zu unterschiedlichen Zeitpunkten verabreicht. Somit gibt es bislang keine einheitliche Behandlungsstrategie, die eine Grundlage für eine Vergleichbarkeit des Behandlungserfolgs wäre. Somit ist eine zielorientierte Optimierung der Zelltherapie am menschlichen Herzen gegenwärtig nur schwer möglich.

Diese Arbeit hat das Ziel im Zusammenhang mit der Stammzelltherapie einige wesentliche Fragen näher zu beleuchten.

Welche Zellmarkierung ermöglicht eine effektive Identifizierung der Stammzellen im Herzgewebe auch 10 Wochen nach der Injektion?

Eignen sich auch die leicht isolier- und vermehrbaren MSC für die Zelltherapie nach einem kardialen Ereignis?

Können Stammzellen neues Herzmuskelgewebe generieren und kann dadurch letztlich eine Verbesserung der Herzleistung erzielt werden?

Material und Methoden

Stammzellgewinnung

Die für unsere Versuche benötigten Stammzellen wurden in einer ersten Versuchsreihe aus dem Knochenmark der Femuren von 10 männlichen Wistar-Ratten entnommen. Bei einer Transplantation in weibliche Empfängertiere können die übertragenen Zellen dann ggf. über ihr Y-Chromosom nachgewiesen werden. Hierfür wurden die Ratten mit Kohlenstoffdioxid (CO_2) getötet. Femur und Tibia wurden mit eiskaltem IMDM ((Iscove`s modified Dulbecco`s medium (Gibco, BRL, Karlsruhe, Deutschland)), einem Zellkulturmedium dem 10% FCS (fetal calf serum, Gibco) zugesetzt wurde, mehrmals durchgespült. Nach Zentrifugation wurden die Zellen resuspendiert in DMEM/Ham`s F12 (Biochrom, Berlin, Deutschland) + 20% FCS (Biochrom) + 1% Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin (beides Gibco). Die Knochenmarkzellen wurden in eine Kulturflasche mit 75cm² (T75) überführt und bei 37ºC mit 5% CO_2 kultiviert. Nach drei Tagen wurden die nicht adhärenten Zellen ausgewaschen. Die adhärenten Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert. Für weitere Zellvermehrungen wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA (Gibco) gelöst und zu 100-500 Zellen/ cm² neu aufgetragen. Diese Zellen wurden teils eingefroren, teils direkt zur Erprobung der Zellmarkierung benutzt.

Zellmarkierung

Nach Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen galt es eine Markierungsmethode für die Stammzellen zu finden, welche auch nach 10 Wochen noch so intensiv war, dass man sie unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennen konnte. Man musste beachten, dass die Zellen sich teilen und dabei der Farbstoff auch an die Tochterzellen, nicht jedoch an die Zellen des umliegenden Gewebes, abgegeben werden sollte.

eGFP (green fluorescent proteine)

Für die virale Transduktion, wurde ein 6-well plate benutzt und je well mit $1x10^3$ Zellen bestückt. Am nächsten Tag wurde ecotrophe eGFP Vektorpartikel hinzugegeben, die Zellen 1h bei 20°C inkubiert und anschließend mit 1000Xg zentrifugiert. Am nächsten Tag wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit Wachstumsmedium kultiviert.

Die erfolgreiche Transfektion bestand in dem Nachweis einer grün fluoreszierenden eGFP-positiven Zellpopulation mittels FACScan (Becton Dickinson) und CellQuest (eine spezielle Software zur zytometrischen Analyse). Das FACScan beruht auf dem Prinzip, dass Zellen, welche von einem Laser angestrahlt werden, eine Lichtemission abgeben. Jeder Zelltyp, also auch die eGFP markierte Stammzelle, besitzt eine spezifische Emission, so dass Zellen an Hand dieser unterschieden werden können.

Zum Klonieren, wurden die Zellen gelöst und 0,3 Zellen pro well eines 96-well plates ausgesät. Die Platten wurden inkubiert, bis ein einzelner Klon sichtbar wurde. Wells mit eGFP positiven Zellen wurden mit einem Fluoreszensmikroskop (Olympus IX81) identifiziert. Positive Klone wurden in eine Kulturflasche mit 25 cm^2 (T25) transferiert, kultiviert und in flüssigen Stickstoff eingefroren.

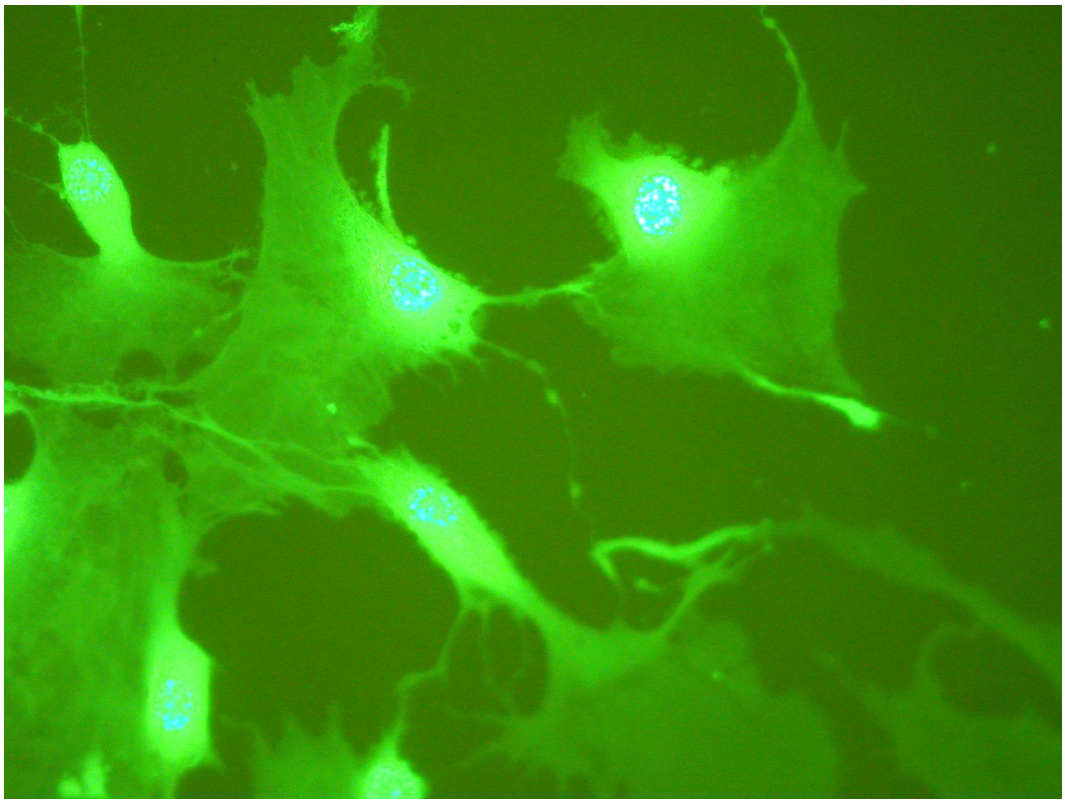

Abb. 1: eGFP markierte MSC (fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung x800)

CFDA, SE

Zuerst erfolgte die Herstellung einer 10mM Stammlösung. Dafür wurden 90µl Gemisch der Komponenten A und B sowie 35.91ml PBS benötigt. Aus dieser Stammlösung wurden nun Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt -15, 20 und 25µM- um die optimale Darstellung der Zellen auch nach 10 Wochen zu finden.

Bei ausreichender Konfluenz der Zellen in der Kulturflasche wurden diese vom Boden mittels Trypsin gelöst und anschließend zentrifugiert, bis sich ein Pellet bildete. Der Überstand wurde verworfen. Es erfolgte die Resuspension der Zellen mit vorgewärmtem PBS (37°C), welches die Probe enthielt, und die Inkubation für 15 min bei 37°C. Diese Vorgehensweise der Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und Resuspendierung mit frischem vorgewärmten Medium wurde noch zweimal wiederholt. Zellen, die mit der Konzentrationen 20 und 25µM CFDA,SE gefärbt waren, wurden für die Langzeitversuche verwendet.

Die Zellen wurden kultiviert und im Abstand von jeweils einer Woche unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

DAPI

Die Zellen wurden von der Zellkulturflasche gelöst, zentrifugiert und resuspendiert. Zum Anfärben mit DAPI (Sigma) wurden die Zellen mit 3ml IMDM in ein 10ml Röhrchen gegeben. Es wurden 50µl DAPI / ml Medium hinzugegeben, 20 Minuten bei 37ºC inkubiert, zentrifugiert und in der 25cm² Kulturflasche T25 zur Kultivierung ausgebracht.

Endorem®

Zusätzlich wurden rMSCs mit superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln (Endorem®. Guerbet, Sulzbach, Deutschland) markiert. Endorem® wurde wie in der Gebrauchsanweisung beschrieben vorbereitet. Vor der Transplantation wurde das Zellmedium mit 112µg Endorem® / ml versetzt und für 36 Stunden inkubiert.

Versuchstiere und Haltung

Die Untersuchungen wurden an einer Ratteninzuchtlinie (Wistar-Ratten; Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland); genehmigt durch die Freie Hansestadt

Hamburg, Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Nr.:12/2) durchgeführt. Alle Versuchstiere wurden unter vergleichbaren Bedingungen im Tierstall des Universitätskrankenhauses Eppendorf bei einer durchschnittlichen Temperatur von 22 ± 2ºC gehalten. Die Beleuchtung betrug 16 Stunden (6:00 – 22:00 Uhr).
Die Wistar-Ratten wurden in Kunststoffkäfigen gehalten und mit einer Trockenfuttermischung, bestehend aus Pressfutter (Pellets) gefüttert. Trinkwasser stand den Tieren ad libidum zur Verfügung und wurde alle 2 Tage gewechselt. Insgesamt wurden jeweils 5 Ratten (5♀ oder 5♂ Ratten) in einem Käfig zusammen gehalten. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von 346,03 ± 34,66g. Zum Zeitpunkt der Operation betrug das durchschnittliche Alter ca. 10 Monaten.

Die eigentliche Versuchsreihe wurde an 15 weiblichen Tieren durchgeführt. Während zehn Tiere der zelltherapeutischen Behandlungsgruppe zugeordnet wurden, bildeten fünf weitere Tiere die Kontrollgruppe. Während die Behandlungsgruppe die eGFP markierten Zellen erhielt, wurde das Nährmedium (ohne Zellen) in die Kontroll-(Placebo-) Tiere injiziert. In allen Fällen erfolgte die Applikation mittels direkter intra-myokardialer Injektion (1ml Injektionsspritze).

Anästhesie, Intubation und Tiervorbereitung

Zu Versuchsbeginn erfolgte zunächst die Gewichtsbestimmung des Versuchstieres. Danach wurde die Ratte in einen Glaszylinder gesetzt, der vorher mit CO_2/O_2 (80:20) begast wurde. Nachdem das Tier das Bewusstsein verloren hatte, wurde es aus dem Glaszylinder genommen und auf den Rücken gelegt. Es wurde auf beiden Seiten die Spina iliaca anterior superior aufgesucht. In der Mitte der beiden Spinae konnte nun das Narkosemittel intraperitoneal appliziert werden, wobei mit der Nadel senkrecht eingestochen wurde. Die Aspirationskontrolle war unerlässlich zum Ausschluss von Verletzungen oder Punktion der Bauchorgane oder einer intravesikulären Lage.
Das Narkosemittel bestand aus einer Mischung von Rompun® (0,05ml, wobei 1ml=23,32mg Xylazinhydrochlorid) und Ketavet® (0,4ml, wobei 1ml=100mg Ketaminhydrochlorid).
Nach der raschen Applikation wurde die Ratte in ihren Käfig zurückgelegt und 5-10 Minuten abgewartet, bis das Narkosemittel über die intraperitoneal gelegenen Gefäße

resorbiert worden war und eine anhaltende Bewusstlosigkeit bei dem Tier eingetreten war. Bei ausreichender Analgesie reagierte die Ratte weder auf Bestreichen der Barthaare (Reflex), noch auf den leicht auslösbaren Schmerzreiz mittels eines spitzen Gegenstandes (leichter Reiz, keine Verletzung der Ratte) zwischen den Zehen an den Pfoten. Bei geringster Reaktion der Ratte wurde eine zusätzliche Dosis des Narkosemittels verabreicht (zwischen 0.1-0.2ml Ketavet® und ggf. weitere 0.05ml Rompun®). Schmerzreiz und Reflex wurden regelmäßig während der Versuchsdurchführung kontrolliert um, falls erforderlich, eine weitere Dosis zu verabreichen. Dies war jedoch selten notwendig.
Nun wurde die Ratte auf dem Rücken gelagert und das Operationsfeld rasiert:
der Thorax rechts bis zur Medioklavikularlinie, links bis zur Medioaxillarlinie, linken Rippenbogen und der linke Axillarbeuge.
Zur Intubation wurde die Ratte an den Vorderzähnen des Oberkiefers aufgehängt und gleichzeitig von einer zweiten Person gehalten, damit das Gewicht des Tieres nicht „an dem Oberkiefer hing“. Dieses Vorgehen gewährleistete einen Aspirationsschutz, sowie eine leichte Fixation des Tieres, welches bei der Intubation erforderlich war. Mit einem Otoskop, welches unter Sicht vorsichtig in den geöffneten Mund vorgeschoben wurde, um Verletzungen im Rachen zu vermeiden, wurde die Epiglottis aufgesucht und eingestellt. Wichtig war hierbei, die Zunge vorher aus dem Rachenraum zu ziehen, da sonst das Blickfeld stark eingeschränkt war. Die Zunge war ein guter Kontrollparameter für den Sauerstoffgehalt des Tieres. Optimaler Weise war die Zunge rosig, bei Sauerstoffmangel färbte sich die Zunge lila.

Je nach Empfindlichkeit der Ratte im Rachenraum, welche sich durch Schluckbewegungen oder reaktive Hypersalivation zeigte, wurde ein lokales Rachenanästhetikum (ein Hub Xylonest®) über das Otoskop gegeben. Bei diesem Vorgang wurde sorgsam darauf geachtet, das Rachenanästhetikum gut zu vernebeln, damit es nicht zu einer massiven Flüssigkeitsaspiration kam. Anschließend wurde das Otoskop zurückgezogen und ca. eine halbe Minute abgewartet, damit das Rachenanästhetikum wirken konnte. Nach dieser Zeit, wurde das Otoskop erneut eingebracht.
Nachdem die Epiglottis gut eingestellt und die Stimmbänder klar identifiziert wurden, konnte nach „Seldinger-Technik“ intubiert werden.
Bei diesem Verfahren, wurde ein dünner flexibler, an beiden Enden abgerundeter und markierter Draht, an den Stimmbändern vorbei eingeführt und damit in die Trachea unter Sicht eingebracht. Dieser Draht wurde ca. 4 cm ab Zahnreihe der Ratte in dem Körper des

Tieres belassen. Hierbei war wichtig, dass der Draht nicht zu weit in das Bronchialsystem eingeführt wurde, da es sonst zu einer Verletzung des Respirationstraktes kommen konnte. Diese Problematik stellte sich bei den allerersten Versuchen, woraufhin die anatomischen Verhältnisse bzw. Länge und Lage des Drahtes an einer bereits toten Ratte überprüft wurden. Dort erfolgte die Markierung des Drahtes an derjenigen Stelle, wo dieser kurz unterhalb der Stimmbänder zum Liegen kam.

Das Otoskop wurde unter Fixation des Drahtes herausgezogen wobei der Draht in der Trachea verblieb. Nun wurde ein Schlauch über den Draht geschoben und an diesem entlang in die Trachea der Ratte eingebracht. Bei dem Einbringen des Schlauches kam es manchmal zu einem Widerstand, der durch vorsichtiges Drehen, um Verletzungen der Stimmbänder zu vermeiden, überwunden werden konnte. Die Kontrolle der richtigen Lage des Schlauches wurde über das Otoskop gewährleistet. Bei richtiger Lage des Schlauches, wurde die Ratte abgehängt und an das Beatmungsgerät angeschlossen.

Hier erfolgte die endgültige Kontrolle, ob der Schlauch in der Trachea lag. Die spontane Atemfrequenz der Ratte adaptierte sich an das Beatmungsgerät bei richtigem Sitz des Schlauches. Ebenso wurde auf ein gleichmäßiges und gleichförmiges Heben und Senken des Brustkorbes geachtet. Bei ungleichmäßiger Bewegung wurde die Lage des Schlauches durch vorsichtiges Zurückziehen korrigiert.

Die Tiere wurden mit 2ml Hubvolumen und einer Frequenz von 110/Minute beatmet. Hierfür wurde ein spezielles Beatmungsgerät für Kleintiere verwendet (Columbus Instruments Ohio). Die Lagerung erfolgte auf einer vorgewärmten Gelmatte um Auskühlung und Druckstellenbildung zu vermeiden.

Bei dieser Art der Narkose bestand eine chirurgische Toleranz von über 60 Minuten.

Operation, Generierung einer Kryoverletzung (Infarktareal) und Zellinjektion

Die Hautdesinfektion erfolgte mittels zweimaliger Auftragung von gefärbtem Sterillium®, welches je 5 Minuten einwirkte. Das Operationsgebiet wurde mit sterilen Tüchern abgedeckt.

Nach vorheriger Überprüfung der Anästhesie, erfolgte der Hautschnitt ca. 1,6 cm unterhalb der linken Axilla. Von parasternal bis zur Medioaxillarlinie wurde eine ca. 2,5-3 cm große Hautinzision vorgenommen.

Vorsichtige Präparation und Durchtrennung der präkostalen Muskulatur, bis zum Rippenzwischenraum. Die interkostale Muskulatur wurde mittig durchtrennt bis zum parietalen Blatt der Pleura. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die
A. thoracica interna nicht verletzt wurde. Die Pleura wurde mit zwei Pinzetten angehoben und mit einer Schere vorsichtig eingeschnitten und durchtrennt. Anschließend erfolgte das Einbringen eines Rippenspreizers und die Aufdehnung des Rippenzwischenraumes. Der linke Lungenflügel wurde über Einlagen von klein geschnittenen sterilen Kompressen nach dorsal gedrückt, um einen freien Blick auf das Herz zu bekommen.
Das Perikard wurde, wenn möglich, mit einer Pinzette angehoben, durchtrennt und zur Seite geschoben. Nach diesem Schritt wurde der linke Ventrikel identifiziert und die Hautinzision gegebenenfalls vergrößert, falls der Kryostempel in der immer durchgeführten Versuchssimulation nicht eingeführt werden konnte oder hakte.
Die Kryoverletzung erfolgte mit einem Metallstempel (3 x 6 mm), welcher durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff auf -193°C vorher abgekühlt wurde. Der Kühlprozess des Stempels wurde durchgeführt, indem der Stempel solange in den flüssigen Stickstoff eingetaucht wurde, bis keine Bläschen mehr aufstiegen. Direkt im Anschluss wurde der Stempel vorsichtig am Rippenspreizer vorbei in die Thoraxhöhle eingeführt und in Längsrichtung auf das Herz sanft aufgedrückt. Die erfolgreiche Kryoverletzung zeigte sich durch eine Weißfärbung der Ventrikeloberfläche, welche sich anfänglich rasch zurückbildete, mit jeder neuen Applikation weniger bis sie schließlich ein definiertes Feld darstellte. Insgesamt wurde der Vorgang der Stempelapplikation 10mal 30sec durchgeführt. Nach fünf Kryostempelapplikationen wurde eine Pause eingelegt, die je nach Herzschlag und Färbung des Ventrikels variierte. Hatte sich der Herzschlag zu stark verlangsamt, war die Pause länger und wurde nach Ermessen des Operateurs festgelegt.
Die Zellinjektion erfolgte im Anschluss an die Kryoverletzung:
Die Nadel wurde durch den Infarktbereich selber soweit vorgeschoben, dass die schräge Nadelöffnung vollständig im Myokard verschwand und somit der Applikationsort im Periinfarktbereich lokalisiert war.

Es wurden 50µl Zelllösung an fünf vorher festgelegten Stellen intramyokardial appliziert. Die gleichmäßige Verteilung der Zellen in der 1ml Spritze wurde durch erneutes Mischen der Lösung unmittelbar vor der Injektion gewährleistet. Die erste Injektion erfolgte in der Nähe der Herzspitze, die weiteren erfolgten symmetrisch aufsteigend. Nach sorgfältiger Inspektion der Thoraxhöhle wurde der Rippenspreizer entfernt. Die Tücher, welche

abgezählt waren, wurden entfernt. Die interkostale und präthorakale Muskulatur wurde mit Mersilene® (Ethicon®, FS-1, 3-0, 3/8c) in Einzelknopfnaht adaptiert. Die Hautadaptation erfolgte durch PDSII (Ethicon®, 4/0, FS-1) ebenfalls in Einzelknopfnaht. Die Wundränder wurden nochmals mit gefärbten Sterillium® abgewischt.

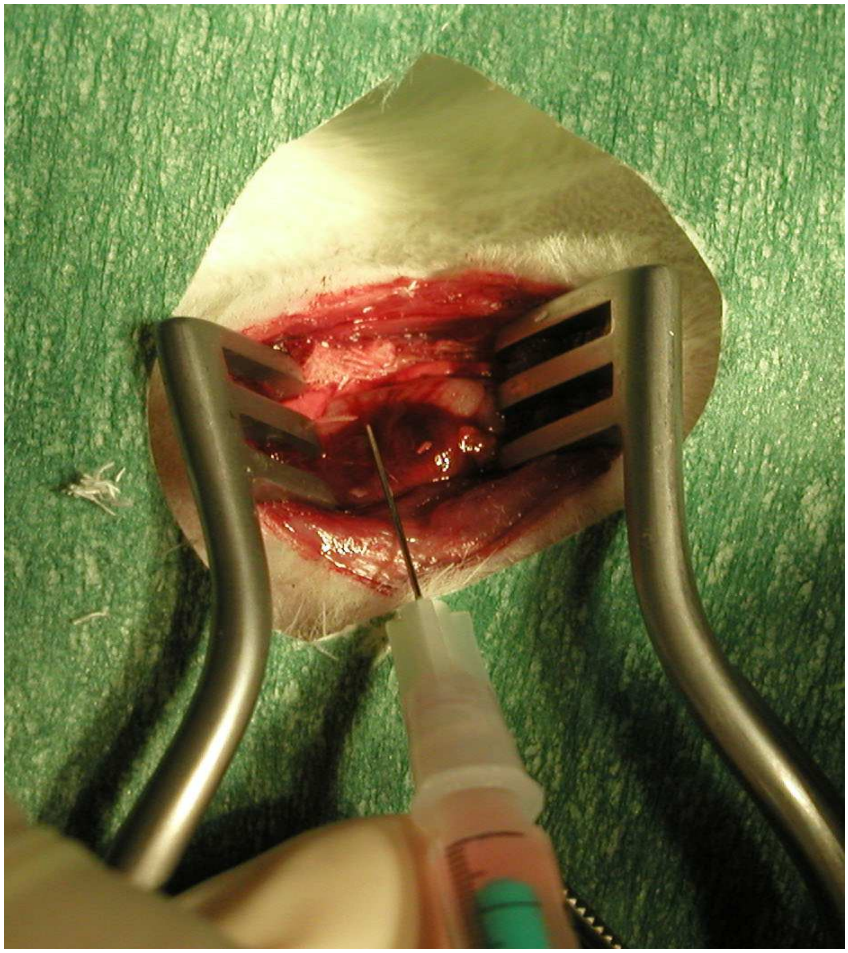

Abb. 2: Direkte intra-myokardiale Injektion der eGFP markierten rMSC in den Randbereich der Kryoläsion (ovales dunkelrotes Areal)

Nach Trocknen des Sterilliums® wurde ein steriler Wundverband aufgelegt und das Tier auf die operierte Seite gelegt, um der nicht betroffenen Lunge das Atmen zu erleichtern. Nach Einschätzung der Anästhesie wurde bei noch liegendem Tubus die Maschine abgestellt. Zeigte das Tier eine ausreichende und gleichmäßige Spontanatmung, wurde der Beatmungsschlauch entfernt. Bei insuffizienter Atmung wurde das Gerät wieder eingestellt und nach fünf bis zehn Minuten ein erneuter Abschaltversuch durchgeführt.
Der Wundverband wurde durch das Tier selber entfernt.

Nachsorge

Postoperativ, jedoch noch in Narkose, erfolgte eine einmalige Injektion von Novalgin® (100mg + 0,5ml NaCl), durch Punktion einer Schwanzvene.
Als Schmerzmittel bekamen alle Tiere 30 Tropfen (ca. 1g.) Novalminsulfon-ratiopharm® ins Trinkwasser, welches alle zwei Tage erneuert wurde und ad libidum zur Verfügung stand. Diese Basisanalgesie erfolgte in der erste Woche und wurde dann eingestellt.
Die Tiere wurden nach der Operation für 10 Wochen einzeln in einem Käfig gehalten, wobei der Wundheilungsprozess sowie Allgemeinzustand der Tiere regelmäßig mindestens 2x pro Woche überprüft wurde.

Organentnahme/Materialgewinnung

Zehn Wochen +/- 2 Tage nach dem Operationstermin erfolgte die Entnahme des Herzens zur weiteren Untersuchung. Dazu wurde das entsprechende Versuchstier zunächst in eine spezielle Begasungskammer gesetzt, in die vorher CO_2/O_2 im Verhältnis 80%/20% eingeleitet worden war. Nach Eintreten der Bewusstlosigkeit, wurde die Begasung auf reines CO_2 umgestellt und das Tier für mindestens 10 Minuten in der Kammer belassen. Ein sicheres Todeszeichen war das Erblassen der sonst roten Augen des Tieres. Darüber hinaus wurde die Reaktion auf Schmerzreize erneut getestet. Danach wurde das Tier aus dem Behälter genommen und auf dem Rücken gelagert. Es folgte die Thorakotomie, das Sternum wurde unter der ersten Rippe und oberhalb der 6. Rippe durchtrennt. Nachdem die 2.-5. Rippe beidseits in der Medioklavikularlinie durchtrennt wurde, konnte das Sternum entfernt werden. Das Herz wurde nach Absetzen der großen Gefäße entnommen. Außer dem Herzen wurde in einigen Fällen, eine Niere, ein Lungenlappen, ein Leberlappen, ein Stück quergestreifte Muskulatur aus dem M. quadriceps femoris und Knochenmark aus dem Femur entnommen.

Materialaufbereitung

Fixation / Pathologie

Die Gewebefixation erfolgte anfänglich über die Kryokonservierung und später mit Hilfe der Formalinfixation.

Kryokonservierung

Die Kryokonservierung erfolgte in einer 4% Paraformaldehydlösung. Ein entnommenes Herz wurde in 20 ml der Lösung über Nacht bei 4ºC gelagert. Die Paraformaldehydlösung besteht aus 0,8g Paraformaldehyd, 18 ml Aquadest, 2 ml 10XPBS und 4µl 10M NaOH. Die Lösung wurde bei 65ºC gemischt und einen pH-Wert von 7,5 eingestellt. Das Gewebe wurde am folgenden Tag in 3 gleichmäßige Stücke geschnitten und in flüssigen Stickstoff überführt. Nachdem das Gewebe vollständig erstarrt war, wurde es bei -80ºC aufbewahrt. Mit Hilfe eines Kryomikrotoms wurden Schnittpräparate angefertigt, die dann auf Objektträger aufgezogen wurden.

Formalin

Die Präparate wurden in einer 3.5% Formaldehydlösung fixiert. Zur vollständigen Durchdringung musste das Gewebe für 24 Stunden in der Lösung belassen werden. Im Anschluss erfolgte die Zerteilung des Gewebes in 3 gleichgroße Stücke und die Einbettung in modifiziertes Paraffin. Zur Einbettung wurde das Gewebe nach Fixation in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach der Entfernung des Alkohols mittels Xylol wurde das Präparat mit durch Erwärmung verflüssigtem Paraffin durchtränkt. Anschließend wurde das Gewebe mit einer Gießform in einen Paraffinwachsblock eingegossen, der nach Erkaltung aushärtete. Mittels eines Mikrotoms wurden anschließend Schnitte (3-6 µm) hergestellt, die in einem warmen Wasserbad auf Objektträger aufgezogen wurden.

Histologische Färbung

Die Herzen wurden in drei Teile geschnitten, wobei das Infarktareal immer möglichst mittig durchschnitten wurde.

In der Aufbereitung wurde das Gewebe in dünnen Schnitten auf Objektträger aufgetragen und routinemäßig Haematoxylin-Eosin (HE) gefärbt.
Zur Ermittlung von Länge, Breite und Tiefe des Narbenbereiches am Lichtmikroskop wurden diese Schnitte mit der Elastica van Gieson Färbung gefärbt. Die Messungen wurden von einem Kollegen durchgeführt, der keine Kenntnisse über die Behandlungsart des jeweiligen Tieres besaß, um möglichst objektive Daten zu erhalten.

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie besteht im Prinzip aus zwei Schritten. In einem ersten Schritt wird der primäre Antikörper eingesetzt, der sich spezifisch an das Epitop eines gesuchten Antigens im Gewebe oder in der Zelle bindet, wodurch sich der Antigen-Antikörper-Komplex bildet. Nach Entparaffinierung der Gewebeschnitte wurde auf die Objektträger der Proteinblock aufgetragen und der Objektträger für mindestens 20 Minuten bei 37ºC aufbewahrt. Um die Austrocknung zu vermeiden wurden die Objektträger während der Wartezeit in einem geschlossenen Gefäß gelagert, welches vorher auf 37ºC erwärmt worden war. Die Objektträger wurden aus dem Gefäß entnommen, der Proteinblock wurde entfernt, der primäre Antikörper vorsichtig aufgeträufelt und für mindestens 2 Stunden bei 37ºC inkubiert.
Im folgenden Arbeitsschritt wurde der primäre Antikörper abgekippt und der Träger wurde in Tris-Puffer gespült. Es folgte das Auftragen des sekundären Antikörpers und Inkubation bei 37ºC an. Nach 30 min wurde der sekundäre Antikörper abgekippt, mit Tris-Puffer gespült und dasselbe Prozedere mit dem tertiären Antikörper durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen StreptABKomplex/AP (Verdünnung: auf 1000µl 10µlA und 10µlB).
Dieser wurde ebenfalls für 30 Minuten bei 37ºC auf dem Objektträger belassen.
In der Zwischenzeit wurde das Sigma fast red (die alkalische Phosphatase), strikt nach Empfehlung des Herstellers vorbereitet.
Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Objektträger aus dem Bad entnommen, und in ein- zwischen jedem Waschschritt jeweils erneuerten- Tris-Wasch-Puffer überführt.
„Sigma Fast Red“ wurde nun für 10 Minuten auf dem Glasträger belassen und anschließend in ein Wasserbad für mindestens 4 Minuten gestellt.
Alle Schnitte wurden nach der Prozedur mit einem Deckgläschen geschützt.

Die Immunhistochemie wurde mit den monoklonalen Primärantikörpern SMA, MHC, Desmin und Troponin T durchgeführt nach o.g. Vorgehen.

Auswertung

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte mittels eines Olympus IX71 Invertoskops sowie dem Olympus Mikroskop BX-40 (beide Olympus, Deutschland), welches mit einem Kamerasystem und der analySIS Software Version 3.2 (Soft Imaging Systems GmbH, Münster, Deutschland) ausgestattet war. Diese Ausrüstung erlaubt die Gewinnung objektiver Messdaten z.B. über die Länge, Breite und Tiefe des Infarktareals oder die Anzahl kleinster Blutgefäße im Untersuchungsareal. Es wurden zwischen 5 und 18 beliebige Abschnitten eines Präparates eingestellt und jeweils 5 wiederum beliebig ausgewählte Bezirke analysiert.

Ergebnisse

Zellmarkierung

CFDA,SE

Die Markierung der Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFDA,SE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) zeigte initial eine starke Intensität unter dem Fluoreszenzmikroskop, wobei die einzelne Zelle sehr gut zu identifizieren war. Vor allem die Zellen, welche mit den Konzentrationen 20 und 25µM angefärbt waren zeigten eine starke Intensität, so dass mit diesen Konzentrationen die Langzeitversuche begonnen wurden. Allerdings konnte bereits nach drei Wochen keine Fluoreszenz mehr nachgewiesen werden. Mehrere Kontrollversuche bestätigten dieses Ergebnis, so dass die Zellmarkierung mittels CFDA, SE abgebrochen wurde.

BRDU und DAPI

Weitere Markierungsmethoden mit fluoreszierenden Farbstoffen wie BRDU und DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) zeigten ebenfalls eine gute initiale Anfärbbarkeit der Zellen mit vergleichbarem Ergebnis wie bei CFDA,SE. Nach 10 Wochen zeigten Zellen, die unter Verwendung dieser beiden Farbstoffe gefärbt wurden, keine Fluoreszenz mehr.

Endorem®

Endorem® wird häufig bei MRT-Untersuchungen als Kontrastmittel verwendet. Es handelt sich um nicht fluoreszierende superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel, die in die Zelle aufgenommen werden. Endorem® eignet sich auch zur histologischen Auswertung, da die Zellen gut angefärbt und nach 10 Wochen unter dem Lichtmikroskop identifizierbar waren. Endorem® wurde erst zu Versuchsende getestet, da initial ein Fluoreszenzfarbstoff gesucht wurde, so dass Ergebnisse nur für ein Tier vorliegen.

eGFP

Der Versuch, männliche rMSC anhand ihres Y-Chromosoms vor dem Gewebshintergrund der weiblichen Empfängerherzen nachzuweisen, misslang. Die von humanen Sequenzen abgeleiteten Primer konnten bei Ratten nicht angewendet werden und die Generierung von funktionierenden Ratten-spezifischen PCR-Primer scheiterte. Diese Methode hätte zumindest den eindeutigen Beweis der Existenz (männlicher) Stammzellen im weiblichen Herzmuskelgewebe ermöglicht.

Aus diesem Grund wurden eGFP-markierte mesenchymale Stammzellen eingesetzt. Diese speziell mit eGFP-transfizierten Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. B. Fehse, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, Forschungsabteilung Zell- und Gentherapie, zur Verfügung gestellt. Die Zellen fluoreszierten auch nach über 10 Wochen noch so intensiv, dass eine Detektion im nicht-fluoreszierenden Empfängergewebe problemlos möglich schien. Die Identifizierung der MSCs sollte zunächst unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Durch die starke Autofluoreszenz des Narbengewebes war die Identifizierung einzelner Zellen jedoch nicht möglich, da das Narbenareal stärker fluoreszierte als einzelne Zellen. Die Änderung der Gewebefixierung von Kryokonservierung auf Formalin erbrachte keine Veränderung der Problematik.

Effekte der Stammzellinjektion auf die Größe des Infarktareals

Von den Zellversuchstieren (n=10) starb ein Tier unmittelbar intraoperativ, ein weiteres starb innerhalb von 24 Stunden postoperativ. Bei allen anderen Tieren zeigten sich keine Komplikationen, die in irgendeiner Weise mit dem Eingriff assoziiert gewesen wären (z.B. Wunde am Hinterlauf bei einem Tier).

Nach Aufbereitung der Proben wurde die Vermessung unter dem Lichtmikroskop von einem unabhängigen Untersucher durchgeführt. (Tab. 1)

Es zeigte sich eine Reduktion sowohl in der Flächenausdehnung des Infarktareals als auch bei der Tiefe der Infarktnarbe. Hierbei konnte eine statistische Signifikanz bei der Flächenausdehnung ($p= 0.028$), nicht jedoch bei der Reduktion der Tiefe der Infarktnarbe ($p= 0.053$) festgestellt werden. (siehe Abb. 4, 5) Der Vergleich der Myokarddicke zeigte bei den transplantierten Ratten ein größerer Durchmesser; dieser war jedoch statistisch nicht relevant ($p= 0.1$).

	Kontrollgruppe (n=5)	eGFP-Gruppe (n=8)
Flächenausdehnung des Infarktareals	**7.634 +/- 1.826 µm** (mittlere Standardabweichung, Konfidenzintervall 95: 5.367; 9901)	**5.246 +/- 1.557µm** (mittlere Standardabweichung, Konfidenzintervall 95: 3.945; 6.548
Tiefe der Infarktnarbe	**390 +/- 164 µm** (mittlere Standardabweichung, Konfidenzintervall 95: 186; 594)	**237 +/- 94 µm** (mittlere Standardabweichung, Konfidenzintervall 95: 158: 315)
Dicke des Myokards (Durchmesser an der größten linearen Ausbreitung des Infarkrareals)	**1.869 +/- 289 µm** (mittlere Standardabweichung, Konfidenzintervall 95: 1.510; 2.227)	**2.269 +/- 439 µm** (mittlere Standardabweichung, Konfidenzintervall 95: 1.901; 2.636)

Tab.1: Gegenüberstellung der Messdaten über die Größenausdehnung der Infarktareale (Länge, Tiefe, Dicke) von Kontrollgruppe vs. eGFP-Gruppe (computergestützte Messung mit Soft Imaging analySIS- Software an Olympus BX-40 Mikroskop)

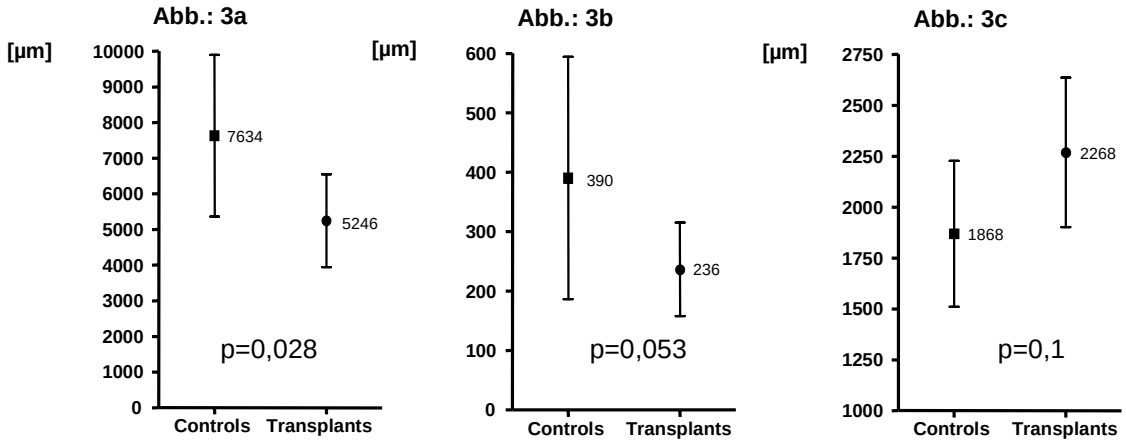

Abb.3: Grafische Darstellung des Effekts der direkten intra-myokardialen Injektion von mesenchymalen Knochenmarkstammzellen auf die Größe der Infarktnarbe bei transplantierten Tieren vs. Medium-behandelter Kontrolltiere: (a) Flächenausdehnung des Infarktareals, (b) Tiefe der Infarktnarbe, (c) Dicke (Durchmesser) Myokard

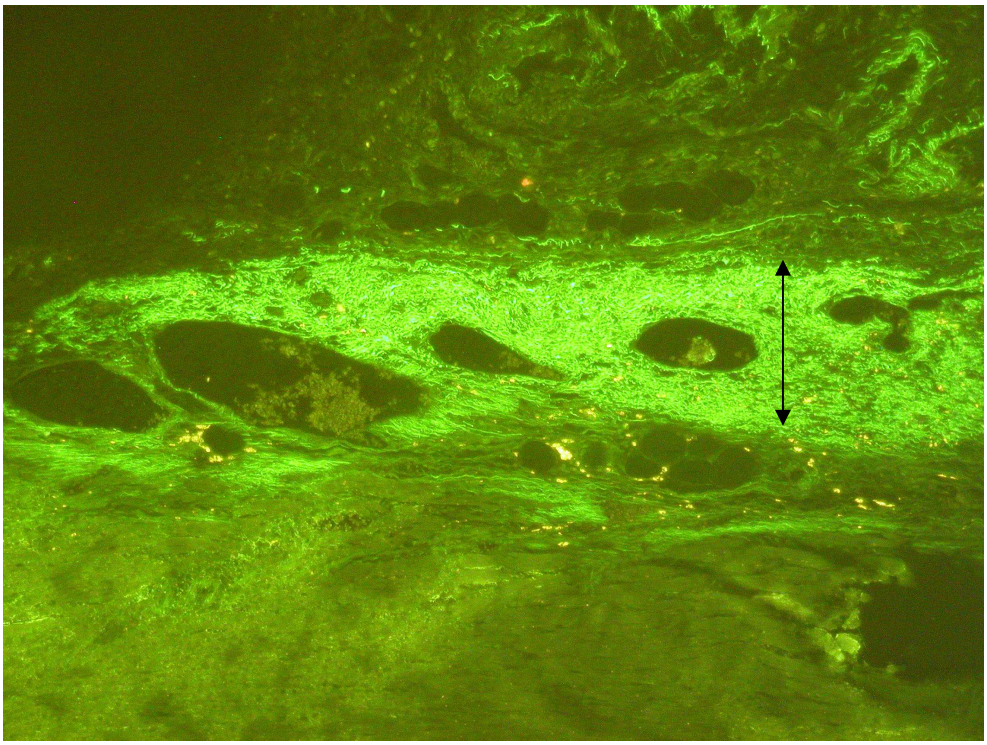

Abb.4: Normales (gesundes) Myokard (dunkelgrün) und Narbenareal (hellgrün) eines Tieres aus der Kontrollgruppe (fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung x400)

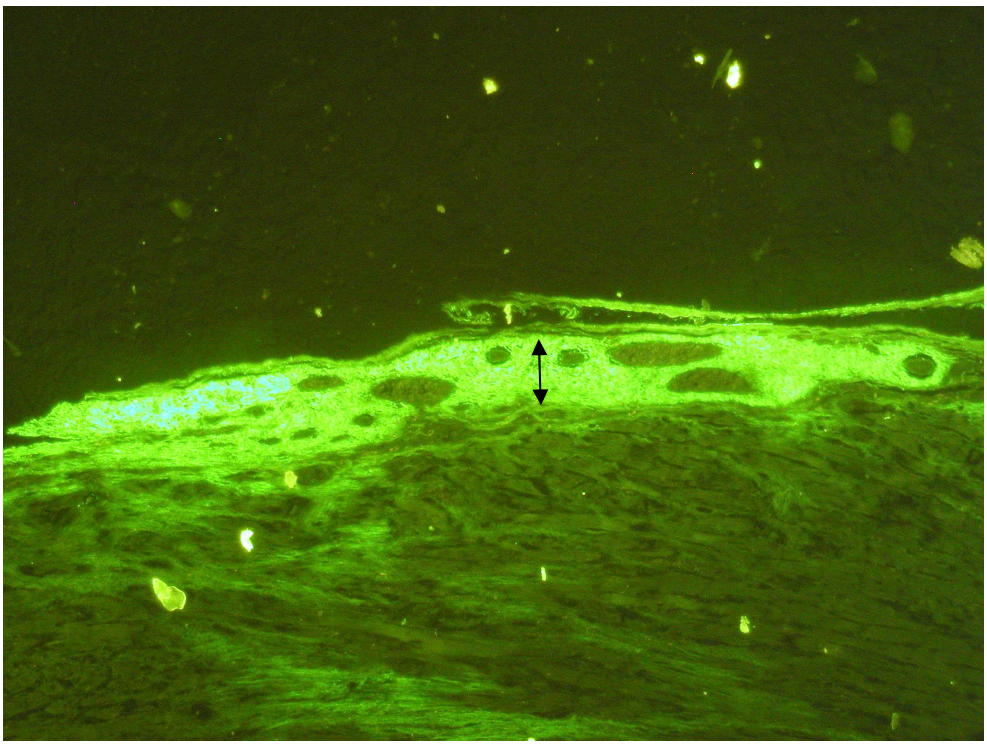

Abb. 5: Normales (gesundes) Myokard (dunkelgrün) und Narbenareal (hellgrün) eines transplantierten Tieres (fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung x400)

Immunhistochemie

Zur Klärung der Frage inwieweit der ´homing effect´ bzw. das Mikromilieu innerhalb des Herzens in der Lage ist, die eingebrachten MSC in Richtung einer „myogenen“ Differenzierung zu beeinflussen, wurden immunhistochemische Analysen mit den muskulären Markern MHC (myosin heavy chain), SMA (smooth muscle actin) und Desmin durchgeführt.

Die meisten in der Immunhistochemie eingesetzten monoklonalen Antikörper sind spezifisch für den Menschen. Da Mensch und Ratte nur eine geringe Artverwandtschaft verbindet, funktionieren nur wenige human spezifische mAbs an Rattengewebe.

So gelang es innerhalb von eGFP positiven Transplantationsareale eine Expression früher myogener Strukturproteine wie Desmin und SMA nachzuweisen (Abb. 6-8) nicht jedoch für MHC. Die starke Autofluoreszenz des Narbenareals behinderte eine einwandfreie Auswertung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie z.T. erheblich. So war z.B. die Auswertung einer parallelen Markierung der mesenchymalen Stammzellen mit SMA oder Desmin neben der eGFP-Fluoreszenz als Nachweis der extrakorporalen Herkunft der Zellen leider unmöglich.

Der Nachweis von Troponin-T und T-C, deren Expression auf einen funktionierenden Kontraktionsapparat hindeuten würde, gelang nur bei Azacytidin-induzierten MSC in der Zellkultur. Somit muss davon ausgegangen werden, dass weder unter Zellkulturbedingungen noch durch den „homing effect“ innerhalb des Herzmuskelgewebes eine Transdifferenzierung von der unreifen Vorläuferzelle (MSC) in einen kontraktionsfähigen Kardiomyozyten stattfindet. Allerdings deuten die in-vitro Ergebnisse auch darauf hin, dass besondere Kulturbedingungen eine myogene Differenzierungsrichtung induzieren können, die allerdings auf einer frühen Stufe stoppt.

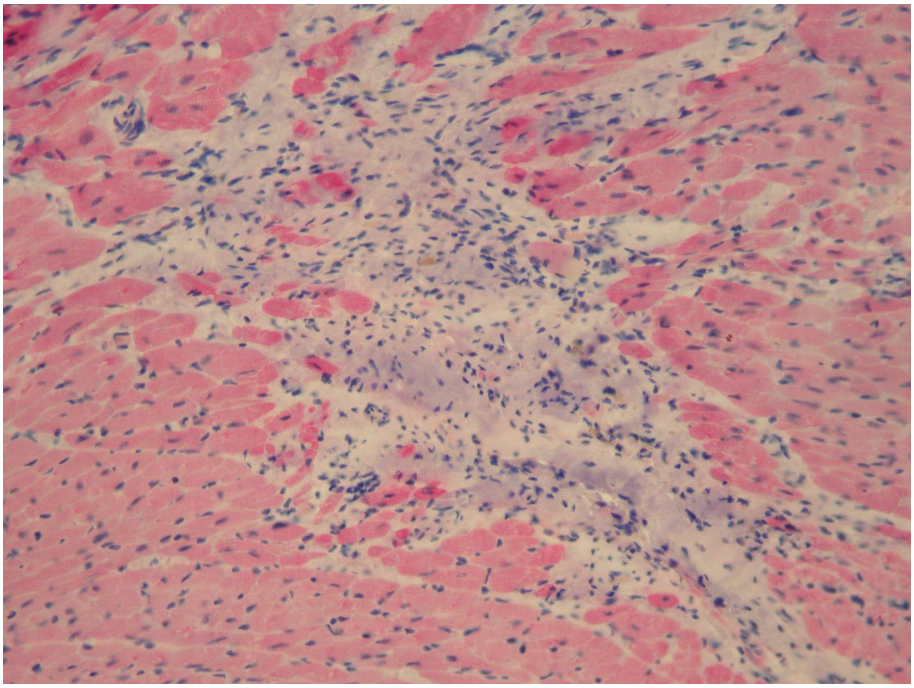

Abb. 6: Immunhistochemie mit MHC (myosin heavy chain) an einem eGFP positiven Zellnest (Vergrößerung x400)

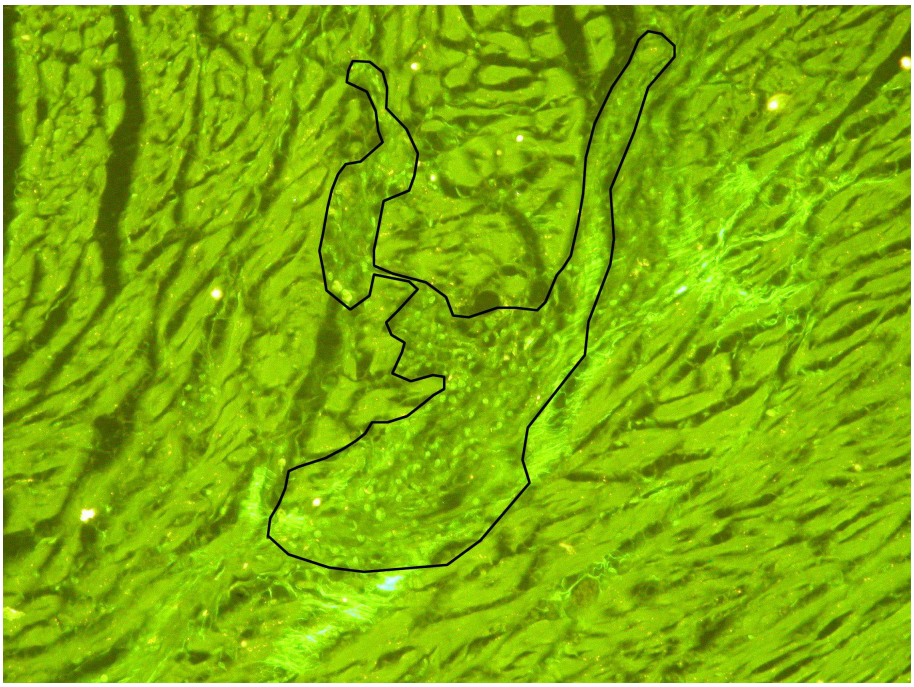

Abb. 7: eGFP positive Zellen im Myokard eines transplantierten Tieres (fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, Vergößerung x400)

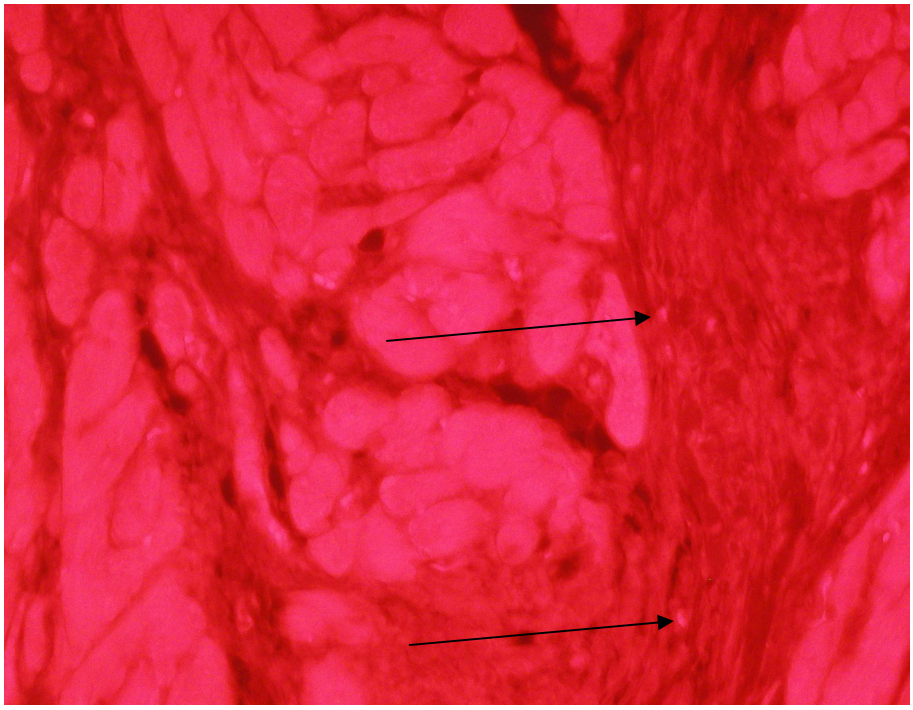

Abb.8: Ausschnitt aus Abb. 7; eGFP positives Areal mit einzelnen fluoreszenz-optisch für Desmin positiven MSC (Vergrößerung x200)

Diskussion

Überlegungen zum Zelltyp: MSC und myogene Regeneration

Zum Zeitpunkt der Themenstellung dieser Dissertation gab es lediglich Untersuchungen über das regenerative Potential von „unaufgereinigtem Knochenmark“ einerseits und der hämatopoetischen Subpopulation des Knochenmarks andererseits. Über die andere große Subpopulation - nämlich die mesenchymalen Knochenmarkstammzellen (MSCs = CD34-) waren nur sehr spärliche Daten vorhanden. Auch deuteten die an den erstgenannten Zellgruppen gewonnenen Befunde eher auf den Wirkmechanismus einer gesteigerten Angiogenese hin. Von den MSC war beschrieben, dass sie in-vitro in Osteo-, Chondro- sowie Adipozyten differenzieren können. Auch war die Expression myogener Marker unter bestimmten Kulturbedingungen möglich (**32, 62**). Im Gegensatz zu den HSCs gelang bei den MSCs der Nachweis der Integration auf zellulärer Ebene (**37, 55, 57, 83**). Darüber hinaus beobachteten Rasmusson et al. (**63**) stark abgeschwächte graft vs. host Reaktionen (Abwehrreaktion des Körpers gegenüber fremden Zellen oder Geweben). Diese Beobachtung ist von großem Interesse, weil damit unter gewissen Umständen ein therapeutischer Einsatz körperfremder Zellen mit reduzierter (oder gar ganz ohne) Immunsuppression, denkbar wäre.

Bei in-vitro Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass MSC bei der Wahl geeigneter Kulturbedingungen in unterschiedliche Zelltypen wie Knochen-, Knorpel-, Fett- und sogar in Herzmuskelzellen differenzieren können (**26, 37, 55, 59, 67**). Auch die Expression von „atrial natriuretic peptide“ (ANP), „brain natriuretic peptide“ (BNP), „myosin heavy chain“ (MHC) sowie „myosin light chain“ (MLC) konnte in mehreren Studien reproduziert werden und lässt auf eine myogene Differenzierung schließen (**62**). Trotz vielfacher Versuche in anderen Laboratorien ist die Anzüchtung von funktionsfähigen Kardiomyozyten nur Tomita et al. (**77**) gelungen. Die Versuchsergebnisse von Tomita müssen angezweifelt werden, denn die in-vitro Differenzierung von Kardiomyozyten aus MSC erscheint zumindest auf die beschriebene Art und Weise nicht durchführbar. Möglicherweise ist der Mechanismus über den Stammzellen ihre Wirkung entfalten ein anderer. So könnte der enge Kontakt zwischen Stammzelle und Herzmuskelzelle oder die Produktion von Botenstoffen durch die Stammzellen (oder angeregten Kardiomyozyten) eine myogene Differenzierung der Stammzellen induzieren (**11**).

Insbesondere die Frage ob MSC im Mikromilieu des Herzgewebes („homing effect“) in der Lage sind in Kardiomyozyten zu transdifferenzieren oder auf eine andere Art die Neubildung von Herzgewebe induzieren können, führte zu dem Entschluss, die mesenchymalen Stammzellen (MSC) als Studienobjekt auszuwählen.

Versuchskonstellation

Vordifferenzierung der MSC: Komplexität der Signalkaskaden noch nicht entschlüsselt

Es scheint „Myokard-interne“ Signale zu geben, die der Differenzierung einer Stammzelle eine Richtung (vor)geben könnten (**26**). Die Entschlüsselung dieser Signale hätte einen großen therapeutischen Nutzen, wenn es z.B. gelänge funktionsfähige Kardiomyozyten in-vitro zu Transplantationszwecken in beliebiger Menge zu züchten. Hiervon allerdings ist man momentan noch weit entfernt. Die blosse Ko-Kultivierung von MSC mit Kardiomyozyten reicht jedenfalls bei weitem nicht aus, um das Herz-Mikromilieu zu simulieren. Ob Zellen durch die Kultivierung mit z.B. Kardiomyozyten auch Eigenschaften verlieren, wie z.B. die Empfänglichkeit für die körpereigenen Signalstoffe, konnte bisher auch noch nicht ausgeschlossen werden. Da insgesamt noch zu wenig Wissen über die benötigten Signale/Zellen vorherrscht, ist eine Vordifferenzierung erst sinnvoll, wenn klar ist, welche Zellen oder Zelltypen für eine effektive Regeneration/Reparatur des geschädigten Herzgewebes notwendig sind.

Mittels Immunhistochemie konnten in dieser Arbeit Daten erhoben werden, die darauf hindeuten, dass mesenchymale Stammzellen (MSC) unter bestimmten Kulturbedingungen myogene Eigenschaften entwickeln können. Die Transplantation dieser MSC in das geschädigte Myokard eines Versuchstieres (Ratte), hatte eine signifikante Reduktion der Ausdehnung der Infarktfläche zur Folge. Auch Tomita et al. (**77, 78**) applizierten Zellen, welche mit 5-Aza vorbehandelt wurden, einer Substanz, die eine myogene Differenzierung fördert. Positive Effekte in Bezug auf die Herzfunktion wurden bei der 5-Aza-Gruppe festgestellt, nicht jedoch bei der Stammzellgruppe ohne 5-Aza. Im Gegensatz zu unseren Versuchen wurden die Zellen jedoch erst vier Wochen nach dem Infarkt appliziert. Zu diesem Zeitpunkt sind die parakrinen Signalstoffe andersartig als direkt nach dem Infarkt. Somit ist es möglich, dass unbehandelte, potente Zellen bei früher

Applikation positive Effekte auf das Herz haben, nicht jedoch, wenn die Umbauprozesse schon im fortgeschrittenen Stadium sind.

Tomita et al. fanden nach der Inkubation von MSC mit 5-Aza nicht nur Troponin I positive Zellen, sondern beschrieben sogar spontan kontrahierende Kardiomyozyten. Allerdings wurde in zahlreichen Labors versucht, dieses Ergebnis zu reproduzieren. Bis heute sind alle Versuche gescheitert, so dass bezweifelt werden darf, dass die alleinige Gabe von 5-Aza ausreicht, um MSC zu reifen Kardiomyozyten zu differenzieren. Wie bereits erwähnt sind die Signale umliegender oder auch weit entfernt liegender Zellen wichtig für die Differenzierung von Vorläuferzellen (**17**). Durch die Kokultivierung mit Kardiomyozyten bilden Stammzellen eine homogene Population (homing effect) und zeigen frühe myogene Entwicklungsstufen. In keinem Fall ist es allerdings bisher gelungen, mit Hilfe einer Kokultivierung und/oder parakrinen Signalen (**32**) aus undifferenzierten oder prä-differenzierten Knochenmarkstammzellen funktionsfähige Kardiomyozyten zu generieren.

Zellisolierung, Lagerung und Qualitätskontrollen

Um in Bezug auf die Terminierung der Herz-OP bei den Ratten (Anästhesie und Mini-Thorakotomie) ein Höchstmaß an Flexibilität zu haben, wurde zunächst Knochenmark aus den Femuren genetisch zu nahezu 100% gleicher Spendertiere isoliert und präpariert. Anschließend erfolgte eine selektive Expansion der MSC in der Zellkultur über 2-3 Wochen sowie die Transfektion mit eGFP zu Markierungszwecken. Sobald ausreichend eGFP-MSC vorhanden waren, wurde die Kultur abgebrochen, die Zellen eingefroren und bis zum OP-Termin in flüssigem Stickstoff gelagert. Proliferationsanalysen, Vitabilitätstests, FACS-Analysen sowie die Immunhistochemie der MSC bezüglich myogener Marker zeigten, dass weder das Einfrieren die Zellen negativ beeinflusst, noch ihre Differenzierungskapazität verloren geht, wie Rombouts et al. postulieren (**64**). Die eGFP-Transfektion sowie Tests an den MSCs wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. B. Fehse und Frau PD Dr. C. Lange, UKE, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, durchgeführt.

Infarktmodell: „Kryoverletzung vs LAD-Ligatur“

Unzweifelhaft wäre für die Simulation eines Infarktereignisses in der Ratte eine Ligatur der LAD die physiologischste Lösung gewesen. Diese Vorgehensweise hätte jedoch zwei

wesentliche Nachteile gehabt. Erstens die schwierige Durchführung der Ligatur im Rahmen eines mikrochirurgischen Eingriffs (verknüpft mit wahrscheinlich höheren Verlustraten) und zweitens die unterschiedlichen Infarktgrößen, bedingt durch das von Tier zu Tier variierende Versorgungsgebiet der LAD. Bei den Gruppen, die bei Ratten eine Ligatur der LAD durchgeführt haben (**29, 33, 36**) fehlt der Nachweis, wie groß das ursprüngliche Infarktgebiet (bzw. das LAD-Versorgungsgebiet) war. Bei mini-pigs konnte die Infarktgröße mittels MRT, also unter erhöhtem technischen Aufwand, nachvollzogen werden (**5**). Die Versuchskonstellation ähnelt den Bedingungen in der Klinik und ermöglicht die Erhebung von klinischen Daten mit anschließender histologischer Begutachtung. Dies war in unseren Kleintierversuchen nicht möglich.

Für den angestrebten Vergleich der zelltherapeutische behandelten gegenüber den Placebo-Tieren war die Generierung möglichst gleich großer und damit vergleichbarer Defektgrößen essentiell. Aus genannten Gründen wurde daher der Kryoläsion der Vorzug gegeben, obwohl man hier, in Bezug auf die Abläufe, die schlussendlich zum Myokardinfarkt führen, sicher nicht von einer exakten Simulation des Infarktgeschehens sprechen kann.

Durch den Einsatz des 3x6mm großen Stempels konnte so bei allen Tieren (zellbehandelten wie Kontrolltieren) eine Läsion vergleichbarer Größe gesetzt werden. Dies ist die Grundvoraussetzung für eine objektive Beurteilung der Auswirkungen der unterschiedlichen Behandlungsarten auf die Defektgröße.

Überdies wurden Tiere vergleichbaren Alters verwendet, so dass die Unterschiede in der Herzgröße der Ratten keine entscheidende Rolle spielten. In Patientenstudien ist die Verteilung durchaus heterogener. Darüber hinaus treten hier die Gefäßverschlüsse an ganz unterschiedlichen Stellen im Koronarsystem auf. Ein Verschluss im Abgangsbereich (=vorderer Anteil) des Gefäßes richtet einen größeren Schaden an, als ein Verschluss im peripheren (=hinteren) Anteil des Gefäßes. Hier bestehen in der Ausdehnung der Infarktgebiete erhebliche Diskrepanzen. In der Phase nach dem Infarkt kann eine Genesung des Patienten, der z.B. weiter raucht, schlechter sein als bei einem Nichtraucher, gleiches gilt für Diabetiker oder Patienten mit Übergewicht. Zwangsläufig sind die Ergebnisse der Nachkontrolle somit auch von diesen Faktoren beeinflusst und erschweren die Beurteilung des Effekts der Stammzellgabe.

Versuchsdauer

In den verschiedenen Publikationen differiert der Beobachtungszeitraum zwischen Zellgabe und Abbruch der Versuche zum Teil erheblich. Orlic et al. (**56**) beschreiben eine

Besiedlung des Infarktareals mit neu gebildeten Muskelzellen innerhalb von 9 Tagen. Auch dieses Ergebnis konnte so nicht reproduziert werden. Bei Wang et al. (**83**) zeigte sich, dass ein Mindestbeobachtungszeitraum von vier Wochen unerlässlich ist. Mit einigem zeitlichen Puffer wurde unser „Follow-up“ auf einen Zeitraum von 10 Wochen festgelegt. Nach Ablauf dieser Zeitspanne erfolgte die Organentnahme mit einer genauen Begutachtung des Kryoinfarktareals. In den hier vorliegenden Untersuchungen konnte am Ende des Versuchszeitraums weder eine „Bedeckung“ des Infarktareals mit Muskelzellen, noch die kardiale Differenzierung der injizierten Zellen beobachtet werden. Allerdings konnten nach 10 Wochen lokal begrenzte Areale gefunden werden, in denen sich eGFP positive Zellgruppen in das Myokard integriert hatten. Zudem gelang der Nachweis von myogenen Markern bei diesen Zellen. Hinweise auf eine Differenzierung von MSC in funktionsfähige Herzmuskelzellen konnten jedoch trotz aller Bemühungen nicht gefunden werden. Bei den Patientenstudien ist ein wesentlich längerer Nachbeobachtungszeitraum realisierbar. Auch müssen hier andere Endpunkte festgelegt werden, als in den Tierversuchen.

Klinische Aspekte: Von der Zellapplikation bis zur Auswertung funktioneller Veränderungen

Zeitpunkt der Zellapplikation

Unmittelbar nach einem Myokardinfarkt beginnen im Herzgewebe bereits Umbauvorgänge. In der ersten Stunde bildet sich ein Myokardfaserödem aus und nach vier Stunden kommt es zur Koagulationsnekrose. Nach 24 Stunden bildet sich der leukozytäre Randsaum (**3**). Ob und wenn ja wann welche Signale ausgeschüttet werden, um körpereigene Reparaturzellen zu mobilisieren, ist nicht bekannt. Es gibt die Hypothese, dass im Falle eines Gewebeschadens im Herzen „Selbstreparaturmechanismen“ wirksam werden, die aber beim Menschen nur noch rudimentär vorhanden sind. Unter der Voraussetzung, dass daran auch Stammzellen aus dem Knochenmark beteiligt sind, entstand die Vorstellung die zu Reparaturzwecken benötigten Zellen aus dem Knochenmark zu isolieren und direkt in das ischämische Areal zu transplantieren, um damit die organeigenen Selbstreparaturmechanismen zu unterstützen.

Von nicht unerheblicher Bedeutung ist der Zeitpunkt der Zellapplikation. Pittenger et al. (**60**) haben intravenös fünf Millionen MSCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten appliziert und die Anreicherung im Myokard verglichen. Bei der ersten Gruppe von Versuchstieren erfolgte die Zellgabe in der unmittelbaren Reperfusionsphase, bei der zweiten Gruppe zwei Wochen nach dem Myokardinfarkt. Eine Anreicherung der Zellen im Myokard zeigte sich nur in der ersten Gruppe. Auch wenn bei unseren Versuchen keine spätere Zellapplikation verglichen wurde, so zeigte sich bei unmittelbarer Applikation nach dem Infarkt eine (dauerhafte) Anreicherung von Zellen im Myokard. Forrester et al. (**22**) injizierten unbehandelte MSCs nach vier Wochen, dort zeigte sich eine Stabilisierung der Herzfunktion, jedoch keine Verbesserung. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass in dieser Untersuchung zwar MSCs benutzt wurden, zu diesem Zeitpunkt aber die zusätzlich notwendigen körpereigenen Signalstoffe nicht mehr (in ausreichender Menge) gebildet werden.

Eine zeitnahe Applikation der Zellen erscheint aus dem Grunde sinnvoll, weil die Umbauvorgänge am Herzen nach einem Infarkt und die Narbenbildung zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen sind. Es gibt Hinweise, dass eine rasche Zelltherapie das Remodeling erheblich bremsen (**29, 76**) und damit einer Vergrößerung des ischämischen Areals entgegen wirken kann (**85**). Bei mehreren Versuchen zeigte sich, dass SDF-1 vor allem am ersten Tag nach Infarkt bei Ratten im Myokard gebildet wird. SDF-1 spielt eine wichtige Rolle in der Chemotaxis der Stammzellen, so dass die Wahrscheinlichkeit der zellulären Integration ins Myokard wahrscheinlicher ist, solange SDF-1 exprimiert wird (**7, 43**). Unterschiedliche Ergebnisse zeigten sich bei i.v und i.m. Gabe der Zellen. Bei der i.v. Gabe scheint die SDF-1 Expression besonders wichtig zu sein, denn hier zeigten sich die besten Ergebnisse bei Applikation am ersten Tag, bei Vergleichen von i.m. Zellgaben wurden die besten Ergebnisse erzielt, wenn die Zellen 1 Woche nach einem Herzinfarkt gegeben wurden (**29, 33**). Schächinger et al. (**68**) stellten eine signifikante Verbesserung von klinischen Parametern bei den Patienten fest, die Knochenmarkzellen ab dem fünften Tag nach Reperfusion erhalten haben. Bei Menschen differiert die Expression von SDF-1, VEGF und FGF (letztere für Angiogenese zuständig) im Vergleich zum Tier, hier befindet sich der Zeitpunkt der maximalen Expression zwischen drei bis vier Wochen nach einem Infarkt und könnte mit den Beobachtungen der besseren Ergebnisse nach verzögerter Zellinjektion korrelieren (**76, 84**).

Application route: Abwägung zwischen invasiver OP und medikamentöser Stammzellmobilisation

Für das Einbringen von Stammzellen ins Herz gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine der elegantesten Arten (und am wenigsten invasiven Methoden) ist die Mobilisierung von Knochenmarkstammzellen durch G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor) (**36, 55, 58**). Durch die Gabe von G-CSF werden Stammzellen im Knochenmark zur Proliferation angeregt und gelangen über das Blutgefäßsystem u.a. zum Zielort Herz. Es zeigte sich jedoch, dass G-CSF die Bildung von Thromben, bzw. eine Destabilisierung von Plaques in Gefäßen verursacht, dies erhöht sowohl das Herzinfarkt- als auch das Schlaganfallrisiko beträchtlich. Damit erscheint hier das Risiko größer als der Nutzen einer G-CSF-Mobilisierung, insbesondere bei solchen Patienten, die bereits vorbestehende Gefäßveränderungen zeigen (**35**). Zudem zeigt sich bei der Zytokintherapie mit G-CSF das Phänomen der Zellfusion von Stammzellen mit Kardiomyozyten, wenn auch die Fusionsrate an sich gering ist (**52**). Diese Zellen besitzen jedoch den vierfachen Chromosomensatz und sind somit als atypisch anzusehen. Selbst wenn diese Zellen keine direkten negativen Auswirkungen zu haben scheinen, ist es doch sehr fraglich, ob diese abnormen Zellen sich an einer Verbesserung der Herzleistung beteiligen können.

Zur Erzielung des möglichst sicheren Verbleibs der Zellen im Myokard, infarktnah und mit geringen Zellverlusten, erfolgt das Einbringen von Stammzellen ins Herz in den meisten Tierversuchen auf direktem Weg. Dabei gibt es drei Varianten: die intra-muskuläre (i.m.) Injektion und zwar von epikardial (mittels Spritze während einer Herz-OP), die intra-koronare (i.c.) Infusion über einen Herzkatheter in das wiedereröffnete Herzkranzgefäß oder die i.m. Injektion mit Hilfe des NOGA-System (Biologics Delivery Systems, USA). Bei einer intra-koronaren Injektion sind weniger Zellen im Zielgewebe zu erwarten als bei der gezielten Injektion ins Myokard. Allerdings ist für den Patienten die direkte Injektion ins Herzmuskelgewebe über eine Thorakotomie, die Eröffnung des Brustkorbes, so wie sie hier im Tierversuch durchgeführt wurde, weitaus belastender als die Applikation mittels des NOGA Kathetersystem, mit dem von endo-kardial aus intra-myokardial appliziert werden kann. Diese Methode wird bei Patientenstudien genutzt, um die Zellen nach einer exakten computer-gestützten Kartierung des Infarktareals gezielt zu platzieren (**5, 38**).

Bei der intra-koronaren Applikation werden die Zellen distal der aufgeweiteten Gefäßengstelle infundiert. Während der Infusion wird das Gefäß kurzzeitig blockiert, um einen „Reflow“ zu vermeiden. Auf diese Art und Weise gelangen die Zellen in den Bereich des ischämischen Areals und haben die Chance, am Ende der feinsten Kapillaren

in das Gewebe überzutreten und sich dort zu integrieren. Auch ist die Gefahr, dass die Zellen aufgrund mangelnder Blutversorgung absterben, minimal. Bei vielen Patienten gibt es allerdings in den feinen Aufästelungen des Gefäßbaums weitere Engstellen, die Katheter-technisch nicht mehr behandelbar sind. So besteht eine beträchtliche Gefahr, dass die Zellen vor Erreichen des eigentlichen Zielgebietes nicht mehr weiterkommen, weil infolge der hoch viskösen Zellsuspensionen Mikro-Gefäßverschlüsse entstanden sind (**42**).

In den meisten Patientenstudien wurden die Zellen über die intra-koronare Applikationsroute verabreicht (**53, 54, 66, 86**). Im Rahmen von klinischen Studien konnte schließlich auch nachgewiesen werden, dass intra-koronar applizierte Zellen aus dem Koronargefäßsystem in den Infarktbereich einwandern (**27**). Daten aus klinischen Studien mit intra-koronarer Zellapplikation konnten zeigen, dass nur eine geringe Anzahl von Zellen überhaupt im Myokard verbleiben (**21, 28, 42**). Daher muss man die Frage stellen, ob die intra-koronare Applikation für die erhöhte Auswaschung von Zellen aus dem Herzen verantwortlich sein kann und ob im Gegensatz dazu die intra-myokardiale Applikation eine höhere Rate an Zellen in der Infarktregion ermöglicht.

Eine wesentlich invasivere Methode ist die Verabreichung der Zellen über eine i.m. Injektion mittels Spritze von der Herzaußenseite (epikardial) in das Myokard. Beim Patienten findet dies im Rahmen einer Herz-OP statt. Im Klein- und Großtiermodell verschafft man sich über eine laterale Mini-Thorakotomie Zugang zum Herzen. Im hier vorgestellten Kleintiermodell der Ratte ist es durch die Größenverhältnisse auch die einzige Applikationsmöglichkeit. Darüber hinaus bestand die Erwartung bezüglich des „Schicksals der Zellen“ im Myokard so viele Daten wie möglich zu sammeln. Die Vorstellung war, die Zellen möglichst in der Infarktrandzone zu injizieren, und nicht direkt in das ischämische Myokard, um ein Absterben durch mangelnde Blut- und Nährstoffversorgung zu verhindern (**14**). Somit sind die Zellen nicht gänzlich „vom Nachschub abgeschnitten“. Im Falle des Einwanderns in das eigentliche Infarktareal wäre zudem nur eine kurze Wegstrecke zurückzulegen.

Aufgrund der beschriebenen Problematik der Detektion der eGFP-markierten MSC vor dem Hintergrund der starken Autofluoreszenz des Narbengewebes, wurde ein weiterer Markierungsversuch mittels Endorem® (Roche, Deutschland) unternommen. Bei diesem Reagenz handelt es sich um Eisenoxidpartikel, die im Rahmen einer Zellkulturpassage von den Zellen aufgenommen wurden. Auf diese Art und Weise konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass Endorem® markierte Zellen, die ursprünglich in das Periinfarktareal

injiziert wurden, tatsächlich selbst auch in den Bereich der Kryoläsion einwandern. Möglicherweise ist dies der Grund, warum die intra-myokardiale Injektion insbesondere der intra-koronaren Applikationroute überlegen ist und zudem signifikante Unterschiede zwischen transplantierten und Placebo-Tieren feststellbar waren. Die Neubesiedlung des Infarktareals mit kontraktionsfähigen Zellen wurde nicht beobachtet. Jedoch konnten fluoreszierende Zellen eines frühen myogenen Differenzierungsstadiums identifiziert werden. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die MSC im Gegensatz zu den HSC (hämatopoetischen Stammzellen) (**50**), ein eher myogenes Differenzierungspotential besitzen.

Identifizierung und Schicksal der dauerhaft verbliebenen Zellen im Herzen

Um den Verbleib, eine Migration der Zellen, sowie auch mögliche Differenzierungsvorgänge nachvollziehen zu können, erschien eine dauerhafte Markierung der Zellen zur eindeutigen Identifizierung im Gewebeschnitt sinnvoll. Anfängliche Versuche mit fluoreszenten Zellmarkierungsfarbstoffen wie DAPI oder BRDU erwiesen sich als ungeeignet für unsere Zwecke, da nach 10 Wochen keine Fluoreszenz mehr nachweisbar war. Einige Gruppen (**29, 83**) haben Ihre Zellen zwar mit DAPI markiert, die Versuchsdauer betrug aber auch „nur“ vier Wochen. Amado et al. (**5**) haben MSCs mit DAPI markiert und konnten diese anscheinend sogar nach acht Wochen noch detektieren. Dieses Ergebnis ist aufgrund der hier vorliegenden Untersuchung nicht nachvollziehbar. Gemein haben die Versuche, bei denen DAPI verwendet wurde, dass fortgeschrittene myogene Differenzierungen beobachtet wurden, u.a. positive Ergebnisse für Troponin T, welches sich in unserer Arbeit nicht nachweisen ließ. Denkbar wäre, dass hier ein mögliches „leakage“ stattgefunden hat, d.h. DAPI wurde an ortsstämmige Zellen abgegeben und diese fälschlich als myogen differenzierte MSCs gewertet. Beide Fluoreszenzfarbstoffe (DAPI und BRDU) stehen zudem unter Verdacht, durch Ihre Interaktion mit der Zell-DNA zellschädigende Effekte zu verursachen (**39**).

Pro Tier wurden insgesamt ca. 1,4 Mill MSC in fünf unterschiedliche Injektionsorte in die Randzone rund um die Infarktnarbe verabreicht. Problematisch war die Bestimmung der tatsächlich im Myokard verbliebenen Zellen, da es zu mehreren Zeitpunkten Zellverluste gibt:

Unsere eigenen Untersuchungen haben ergeben, dass unter ungünstigen Bedingungen bei einer intramyokardialen Injektion direkt in das schlagende Herz bis zu 50% der Zellen während der Systole wieder aus dem Einstichkanal herausgepresst werden, bzw. weiß man

heute, dass unter ungünstigen Umständen innerhalb weniger Stunden über 60% der Zellen aus dem Myokard verschwunden sind (**61**). Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass durch mangelnde Blutversorgung und fehlende Integration in das Zielgewebe innerhalb der ersten Tage nach Zellapplikation weitere Zellen verloren gehen. Nach einem Zeitraum von acht Wochen konnten bei den Versuchen mit Endorem®-markierten MSCs ein Verbleib im Myokard von 42,4%+/-15 festgestellt werden (**5**).

Die Beobachtung, dass nur ein kleiner Teil der ursprünglich injizierten Zellen im Transplantationsareal verbleibt, führt zu folgenden Überlegungen:

1. Da es bisher noch nicht gelungen ist eine ausreichende Menge an Zellen dauerhaft im Herzen zu deponieren, konnte noch keine entscheidende Verbesserung der Herzleistung herbeigeführt werden.
2. Die letztlich geringe Anzahl an injizierten Zellen steht in keinem Verhältnis zu der tatsächlich erzielten Verminderung der Infarktfläche oder der in tierexperimentellen Untersuchungen sowie Patientenstudien festgestellten Funktionsverbesserung des Herzens (**18**).

Wenn die Verbesserung/Veränderung der Herzfunktion nicht von der Zellzahl abhängig ist, dann müssen an der ursprünglich angenommenen Hypothese, dass die Zellen sich in Herzmuskelzellen umwandeln, bzw. dass Funktionsverbesserungen direkt proportional sind mit der Menge an injizierten Zellen, Zweifel angemeldet werden. Allerdings ist auch ein alternativer indirekter Wirkmechanismus denkbar. So könnte z.B. die Ausschüttung von Signalstoffen (parakrine Mechanismen) die ortsstämmigen Zellen in ihren Reparaturaufgaben unterstützen (**17, 44**). Zielprozesse sind auch hier die Mechanismen, die dem Herzen helfen sich zu regenerieren wie z.B. die Steigerung der Neovaskularisation (**29**) und die Reduzierung oder Verhinderung des Remodeling (**71**).

Funktionsmessung

Die Beurteilung der Herzfunktion erfolgt bei Patientenstudien in der Regel mit Hilfe der Herzultraschalluntersuchung (Echokardiographie) oder im Rahmen einer Koronarangiographie. In beiden Untersuchungen ist die Herzauswurfleistung (EF=ejection fraction) der Messparameter. Modernere bildgebende Verfahren zur Bestimmung der EF sind z.B. das kardio-MRT oder das MFI (Magnetfeld-Imaging). Die Ergebnisse bezüglich der Herzfunktion bei den Patientenstudien zeigen eine große Varianz. Bei der ASTAMI-Studie (**41**) zeigt sich eine Verbesserung bei Belastungszeit und Herzfrequenzrate, jedoch keine Verbesserung der Symptome der Herzinsuffizienz. Schächinger et al. (**67, 68**) geben

in Ihrer Studie nach vier Monaten eine signifikante Verbesserung der LV-Funktion an, allerdings fehlt die Vergleichsgruppe, die keine Zellen erhalten hat. Beim follow-up im Boost-Trial (Injektion von gereinigten Knochenmarkzellen) konnte im Vergleich zur konventionell behandelten Patientengruppe, nach sechs Monaten eine signifikante Verbesserung der EF mittels Kardio-MRT nachgewiesen werden (**19**), 18 Monate später waren diese signifikanten Unterschiede zwischen der Zell- und Placebogruppe nicht mehr nachweisbar (**48**).

Im Gegensatz zu echokardiographisch gewonnen Ergebnissen ist die mikroskopische Vermessung des Infarktareals besser objektivierbar, da die Echokardiographie selbst eine Untersucher-abhängige Interpretation der Messdaten zulässt. Somit muss hier für eine möglichst verblindete Beurteilung durch echokardiographisch erfahrene Ärzte gesorgt werden.

Die Funktionsmessung mittels Echokardiographie in unseren Tierversuchen wurde nach mehreren frustranen Versuchen verworfen. Es konnten keine aussagefähigen Bilder erhoben werden, da die verwendeten Schallköpfe zu groß für Ratten waren. In dieser Arbeit war es nicht möglich eine Korrelation zwischen der Herzfunktion und Infarktgröße herzustellen. Da in der Immunhistochemie nur frühe myogene Marker positiv waren, ist von einer Verbesserung der EF - zumindest aufgrund neu gebildeter Kardiomyozyten - nicht auszugehen. Gruppen wie Orlic (**55**) gelang im Kleintiermodell die Erhebung von echokardiographischen Daten. Diese zeigten eine Verbesserung des enddiastolischen Drucks im linken Ventrikel.

Exakte und vor allem objektive Daten über den Effekt sowie Hinweise über einen möglichen Wirkmechanismus von Vorläuferzellen im Herzen, konnten mittels Computer-gestützter Morphometrie am Mikroskop erhoben werden (Olympus BX-40 mit Software analySIS, Ver. 2.0). Dabei stand die Bestimmung der Ausdehnung der Infarktfläche und –tiefe im Vordergrund. Zwei unabhängige Untersucher führten die lichtmikroskopische Vermessung an gefärbten Gewebeschnitten durch, ohne Kenntnis darüber, welches Präparat zu welchem Behandlungsarm gehört. Im Vergleich zu einem Befund im Herzultraschall unterliegen die histologischen Präparate keiner weiteren Veränderung mehr. Allerdings kann aus den Messdaten weder eine Aussage über das Befinden (des „Patienten“) noch eine tatsächliche Funktionsverbesserung abgeleitet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis einer signifikante Reduktion der Flächenausdehnung des Infarktareals ($p=0.028$) bei den zelltransplantierten Tieren erbracht werden. Die Tiefe der Infarktnarbe ($p=0,053$) sowie die Dicke (Durchmesser) des

Myokards (p=0.1) am Punkt der größten Infarktausdehnung zeigten ebenfalls bessere Werte für die transplantierten Tiere, ohne allerdings statistische Relevanz zu erreichen. Damit konnte diese Arbeit Daten liefern, die zeigen, dass mesenchymale Stammzellen (MSC) den Prozess des „Remodelings“ vermindern und die Herzregeneration unterstützen. Darüber hinaus scheinen die Zellen ihre Reparatureigenschaften durch die Kultivierung nicht zu verlieren. Allerdings misslang es eindeutige Hinweise auf den Wirkmechanismus der MSC zu erarbeiten.

Bestimmung der Anzahl der Blutgefäße

Bei der Auszählung der Gefäße innerhalb der transplantierten Herzareale zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Myokardregionen im Bereich der Injektionsstellen in etwa eine Verdoppelung der Gefäßanzahl. Allerdings traf dies sowohl auf die Tiere zu, die zelltherapeutisch behandelt wurden, als auch auf diejenigen, die lediglich Zellkulturmedium (Placebo) erhielten. Das legt den Schluss nahe, dass nicht etwa die transplantierten MSC für die drastische Vermehrung der Gefäße verantwortlich waren, sondern die Myokardverletzung durch Einstich und Injektion scheint hier der „Trigger“ gewesen zu sein.
Ein ähnliches Ergebnis konnten Askari et al. (**6**) zeigen, hier wurden allerdings statt MSC skeletale Myoblasten verwendet. Kontroll- und Myoblastengruppe zeigten beide erhöhte Gefäßneubildungen unter VEGF, nur in der Myoblastengruppe konnte eine Funktionsverbesserung festgestellt werden. Eine Schlussfolgerung hieraus ist, dass eine Funktionsverbesserung beziehungsweise eine Minderung der Infarktgröße nur durch die Injektion von Zellen erzielt werden kann. Positive Effekte durch die alleinige Stimulation der Angiogenese sind hierfür nicht ausreichend (**40**).

Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt sich, dass trotz vieler in-vitro und in-vivo Untersuchungen sowie auch einer steigenden Anzahl klinischer Studien, das Wissen über adulte Stammzellen und ihr Nutzen für die Therapie bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung noch in den Anfängen steckt.

In dieser Arbeit konnte durch die Untersuchungen am Kleintiermodell gezeigt werden, dass die Injektion mesenchymaler Stammzellen direkt in die Randzone des kryoverletzten Myokards zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Infarktausdehnung führen. Viele Aspekte sind jedoch weiterhin völlig unklar. Insbesondere konnte der Mechanismus über den die Zellen das „Remodeling“ stoppen bzw. stark vermindern nicht geklärt werden. Allerdings scheint der Befund, dass unreife Vorläuferzellen unter dem Einfluss des Mikromilieus bzw. des „homing effects“ des Herzens in funktionsfähige Kardiomyozyten transdifferenzieren nicht länger haltbar zu sein. Am wahrscheinlichsten ist, dass durch die Zellapplikation parakrine Mechanismen angekurbelt werden, die eine Verbesserung der kardialen Situation bewirken. Somit würden die injizierten Zellen nur indirekt für den positiven Effekt verantwortlich sein. Es ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt fraglich, ob die Zellen tatsächlich eine Funktionsverbesserung bewirken können. Aber selbst wenn bei einem schwerkranken Herzpatienten eine Verschlechterung der Herzleistung verhindert werden könnte, so wäre dies ein großer Fortschritt. Ob überhaupt und wenn ja bei welchen kardiologischen Krankheitsbildern eine Stammzelltherapie den größten Nutzen erbringt, müssen weitere Studien zeigen. Zumindest wurden bisher im Rahmen der unterschiedlichen Stammzelltherapiearten keine Nebenwirkungen für den Patienten beschrieben, so dass diese Behandlungsstrategie zum gegenwärtigen Zeitpunkt allgemein als sicher gilt. Langzeituntersuchungen über 5 Jahre müssen zeigen, ob sich Auswirkungen auf Messparameter wie Medikamentenverbrauch, Frequenz der Krankenhaus/Arztbesuche, Morbidität oder Mortalität demonstrieren lassen.

Darüber hinaus sollten im Rahmen der Grundlagenforschung die zellulären Wirkmechanismen in den Fokus genommen werden, da Studien direkt am Patienten dies nicht leisten können. Auch muss an dieser Stelle erneut die Problematik des Verbots der Forschung an embryonalen Stammzellen erwähnt werden. Unter allen Zellarten haben embryonale Stammzellen das größte Differenzierungspotential und eignen sich daher wie kein anderer Zelltyp für Studien in Bezug auf die Reifung einer Stammzelle zu einer ausdifferenzierten und spezialisierten Körperzelle (z.B. Kardiomyozyt). Die Optimierung

der Stammzelltherapie hängt in entscheidender Weise von neuen Erkenntnissen aus der Grundlagenforschung ab. Möglicher Weise ist die Aufschlüsselung maßgeblicher Faktoren, die in der jeweiligen Differenzierungskaskade eine Rolle spielen ohne das Studienobjekt `embryonale Stammzelle´ gar nicht durchführbar. Sicher ist nur, dass eine Lockerung der Umgangsgenehmigung und die damit verbundenen Erleichterungen in der Erforschung der speziellen Eigenschaften dieser Zellen der Entwicklung neuer Therapiestrategien mit adulten Stammzellen einen erheblichen Geschwindigkeitsschub verleihen würden.

Trotz der erwähnten Problematiken und Schwächen steckt in der Stammzelltherapie ein beträchtliches regeneratives Potential. Allerdings mehren sich die Hinweise, das der Mechanismus über den die Stammzellen wirken von erheblicher Komplexität ist und viele Einzelfaktoren eine Rolle spielen. Erst wenn der richtige Zelltyp gefunden ist und die wesentlichen Signalkaskaden zwischen transplantierten Zellen und Zielgewebe besser verstanden sind, wird sich die Herzleistung und damit auch die Lebensqualität der Patienten signifikant verbessern.

Reference List

1. http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content100/EckdatenTU,templateId=renderPrint.psml; Stand November 2010

2. http://www.kup.at/kup/pdf/8413.pdf , Journal für Kardiologie – Austrian Journal of Cardiology 2009; 16(11-12), 429-439 Stand November 2009

3. C.Thomas, 2001, Histopathologie, Lehrbuch und Atlas zur Allgemeinen und speziellen Pathologie, 13.Auflage, Schattauerverlag S. 109

4. Abraham M.R., Henrikson C.A., Tung L., Chang M.G., Aon M., Xue T., Li R.A., O' Rourke B., and Marban E. (2005) Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ. Res.* 97, 159-167.

5. Amado L.C., Saliaris A.P., Schuleri K.H., St John M., Xie J.S., Cattaneo S., Durand D.J., Fitton T., Kuang J.Q., Stewart G., Lehrke S., Baumgartner W.W., Martin B.J., Heldman A.W., and Hare J.M. (2005) Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 11474-11479.

6. Askari A., Unzek S., Goldman C.K., Ellis S.G., Thomas J.D., DiCorleto P.E., Topol E.J., and Penn M.S. (2004) Cellular, but not direct, adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor results in improved left ventricular function and neovascularization in dilated ischemic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 43, 1908-1914.

7. Askari A.T., Unzek S., Popovic Z.B., Goldman C.K., Forudi F., Kiedrowski M., Rovner A., Ellis S.G., Thomas J.D., DiCorleto P.E., Topol E.J., and Penn M.S. (2003) Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 362, 697-703.

8. Badorff C., Brandes R.P., Popp R., Rupp S., Urbich C., Aicher A., Fleming I., Busse R., Zeiher A.M., and Dimmeler S. (2003) Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 107, 1024-1032.

9. Britten M.B., Abolmaali N.D., Assmus B., Lehmann R., Honold J., Schmitt J., Vogl T.J., Martin H., Schachinger V., Dimmeler S., and Zeiher A.M. (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, 2212-2218.

10. Carrozza J.P., Jr., Kuntz R.E., Fishman R.F., and Baim D.S. (1993) Restenosis after arterial injury caused by coronary stenting in patients with diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 118, 344-349.

11. Ciulla M.M., Lazzari L., Pacchiana R., Esposito A., Bosari S., Ferrero S., Gianelli U., Paliotti R., Busca G., Giorgetti A., Magrini F., and Rebulla P. (2003) Homing

of peripherally injected bone marrow cells in rat after experimental myocardial injury. *Haematologica* 88, 614-621.

12. Coppen S.R., Fukushima S., Shintani Y., Takahashi K., Varela-Carver A., Salem H., Yashiro K., Yacoub M.H., and Suzuki K. (2008) A factor underlying late-phase arrhythmogenicity after cell therapy to the heart: global downregulation of connexin43 in the host myocardium after skeletal myoblast transplantation. *Circulation* 118, S138-S144.

13. Deb A., Wang S., Skelding K.A., Miller D., Simper D., and Caplice N.M. (2003) Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 107, 1247-1249.

14. Devine S.M., Cobbs C., Jennings M., Bartholomew A., and Hoffman R. (2003) Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 101, 2999-3001.

15. Dill T., Schachinger V., Rolf A., Mollmann S., Thiele H., Tillmanns H., Assmus B., Dimmeler S., Zeiher A.M., and Hamm C. (2009) Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am. Heart J.* 157, 541-547.

16. Dimarakis I., Habib N.A., and Gordon M.Y. (2005) Adult bone marrow-derived stem cells and the injured heart: just the beginning? *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 28, 665-676.

17. Dimmeler S., Burchfield J., and Zeiher A.M. (2008) Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 208-216.

18. Dimmeler S., Zeiher A.M., and Schneider M.D. (2005) Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J. Clin. Invest* 115, 572-583.

19. Drexler H., Meyer G.P., and Wollert K.C. (2006) Bone-marrow-derived cell transfer after ST-elevation myocardial infarction: lessons from the BOOST trial. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3 Suppl 1, S65-S68.

20. Erdo F., Buhrle C., Blunk J., Hoehn M., Xia Y., Fleischmann B., Focking M., Kustermann E., Kolossov E., Hescheler J., Hossmann K.A., and Trapp T. (2003) Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 23, 780-785.

21. Forest V.F., Tirouvanziam A.M., Perigaud C., Fernandes S., Fusellier M.S., Desfontis J.C., Toquet C.S., Heymann M.F., Crochet D.P., and Lemarchand P.F. (2010) Cell distribution after intracoronary bone marrow stem cell delivery in damaged and undamaged myocardium: implications for clinical trials. *Stem Cell Res. Ther.* 1, 4.

22. Forrester J.S., Price M.J., and Makkar R.R. (2003) Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians. *Circulation* 108, 1139-1145.

23. Friis T, Haack-Sorensen M, Mathiasen AB, et al: Mesenchymal stromal cell derived endothelial progenitor treatment in patients with refractory angina. Scand.Cardiovasc.J. 45:161-168, 2011

24. Gyongyosi M., Lang I., Dettke M., Beran G., Graf S., Sochor H., Nyolczas N., Charwat S., Hemetsberger R., Christ G., Edes I., Balogh L., Krause K.T., Jaquet K., Kuck K.H., Benedek I., Hintea T., Kiss R., Preda I., Kotevski V., Pejkov H., Zamini S., Khorsand A., Sodeck G., Kaider A., Maurer G., and Glogar D. (2009) Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 6, 70-81.

25. Hannan E.L., Racz M.J., Walford G., Jones R.H., Ryan T.J., Bennett E., Culliford A.T., Isom O.W., Gold J.P., and Rose E.A. (2005) Long-term outcomes of coronary-artery bypass grafting versus stent implantation. *N. Engl. J. Med.* 352, 2174-2183.

26. Herzog E.L., Chai L., and Krause D.S. (2003) Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493.

27. Hofmann M., Wollert K.C., Meyer G.P., Menke A., Arseniev L., Hertenstein B., Ganser A., Knapp W.H., and Drexler H. (2005) Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 111, 2198-2202.

28. Hou D., Youssef E.A., Brinton T.J., Zhang P., Rogers P., Price E.T., Yeung A.C., Johnstone B.H., Yock P.G., and March K.L. (2005) Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation* 112, I150-I156.

29. Hu X., Wang J., Chen J., Luo R., He A., Xie X., and Li J. (2007) Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 31, 438-443.

30. Jackson K.A., Majka S.M., Wang H., Pocius J., Hartley C.J., Majesky M.W., Entman M.L., Michael L.H., Hirschi K.K., and Goodell M.A. (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest* 107, 1395-1402.

31. Janssens S., Dubois C., Bogaert J., Theunissen K., Deroose C., Desmet W., Kalantzi M., Herbots L., Sinnaeve P., Dens J., Maertens J., Rademakers F., Dymarkowski S., Gheysens O., Van Cleemput J., Bormans G., Nuyts J., Belmans A., Mortelmans L., Boogaerts M., and Van de W.F. (2006) Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367, 113-121.

32. Jaquet K., Krause K.T., Denschel J., Faessler P., Nauerz M., Geidel S., Boczor S., Lange C., Stute N., Zander A., and Kuck K.H. (2005) Reduction of myocardial

scar size after implantation of mesenchymal stem cells in rats: what is the mechanism? *Stem Cells Dev.* 14, 299-309.

33. Jiang C.Y., Gui C., He A.N., Hu X.Y., Chen J., Jiang Y., and Wang J.A. (2008) Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction. *J. Zhejiang. Univ Sci. B* 9, 630-637.

34. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., and Verfaillie C.M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.

35. Kang H.J., Kim H.S., Zhang S.Y., Park K.W., Cho H.J., Koo B.K., Kim Y.J., Soo L.D., Sohn D.W., Han K.S., Oh B.H., Lee M.M., and Park Y.B. (2004) Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 363, 751-756.

36. Kawada H., Fujita J., Kinjo K., Matsuzaki Y., Tsuma M., Miyatake H., Muguruma Y., Tsuboi K., Itabashi Y., Ikeda Y., Ogawa S., Okano H., Hotta T., Ando K., and Fukuda K. (2004) Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 104, 3581-3587.

37. Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N.M., and Itescu S. (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.* 7, 430-436.

38. Krause K., Jaquet K., Schneider C., Haupt S., Lioznov M.V., Otte K.M., and Kuck K.H. (2009) Percutaneous intramyocardial stem cell injection in patients with acute myocardial infarction: first-in-man study. *Heart* 95, 1145-1152.

39. Leiker M., Suzuki G., Iyer V.S., Canty J.M., Jr., and Lee T. (2008) Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 17, 911-922.

40. Li Z., Guo J., Chang Q., and Zhang A. (2009) Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1343-1346.

41. Lunde K., Solheim S., Aakhus S., Arnesen H., Moum T., Abdelnoor M., Egeland T., Endresen K., Ilebekk A., Mangschau A., and Forfang K. (2007) Exercise capacity and quality of life after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: results from the Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI) randomized controlled trial. *Am. Heart J.* 154, 710-718.

42. Ly H.Q., Hoshino K., Pomerantseva I., Kawase Y., Yoneyama R., Takewa Y., Fortier A., Gibbs-Strauss S.L., Vooght C., Frangioni J.V., and Hajjar R.J. (2009) In vivo myocardial distribution of multipotent progenitor cells following

intracoronary delivery in a swine model of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 30, 2861-2868.

43. Ma J., Ge J., Zhang S., Sun A., Shen J., Chen L., Wang K., and Zou Y. (2005) Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 100, 217-223.

44. Martin-Rendon E., Sweeney D., Lu F., Girdlestone J., Navarrete C., and Watt S.M. (2008) 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sang.* 95, 137-148.

45. Menasche P., Alfieri O., Janssens S., McKenna W., Reichenspurner H., Trinquart L., Vilquin J.T., Marolleau J.P., Seymour B., Larghero J., Lake S., Chatellier G., Solomon S., Desnos M., and Hagege A.A. (2008) The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 117, 1189-1200.

46. Menasche P., Hagege A.A., Scorsin M., Pouzet B., Desnos M., Duboc D., Schwartz K., Vilquin J.T., and Marolleau J.P. (2001) Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357, 279-280.

47. Menasche P., Hagege A.A., Vilquin J.T., Desnos M., Abergel E., Pouzet B., Bel A., Sarateanu S., Scorsin M., Schwartz K., Bruneval P., Benbunan M., Marolleau J.P., and Duboc D. (2003) Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41, 1078-1083.

48. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al: Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial1. *Circulation* 113:1287-1294, 2006

49. Muraglia A., Cancedda R., and Quarto R. (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 7), 1161-1166.

50. Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H.O., Rubart M., Pasumarthi K.B., Virag J.I., Bartelmez S.H., Poppa V., Bradford G., Dowell J.D., Williams D.A., and Field L.J. (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-668.

51. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N., and Yamanaka S. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101-106.

52. Nygren J.M., Jovinge S., Breitbach M., Sawen P., Roll W., Hescheler J., Taneera J., Fleischmann B.K., and Jacobsen S.E. (2004) Bone marrow-derived

hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat. Med.* 10, 494-501.

53. Nyolczas N., Gyongyosi M., Beran G., Dettke M., Graf S., Sochor H., Christ G., Edes I., Balogh L., Krause K.T., Jaquet K., Kuck K.H., Benedek I., Hintea T., Kiss R., Preda I., Kotevski V., Pejkov H., Dudek D., Heba G., Sylven C., Charwat S., Jacob R., Maurer G., Lang I., and Glogar D. (2007) Design and rationale for the Myocardial Stem Cell Administration After Acute Myocardial Infarction (MYSTAR) Study: a multicenter, prospective, randomized, single-blind trial comparing early and late intracoronary or combined (percutaneous intramyocardial and intracoronary) administration of nonselected autologous bone marrow cells to patients after acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 153, 212-217.

54. Oh H., Bradfute S.B., Gallardo T.D., Nakamura T., Gaussin V., Mishina Y., Pocius J., Michael L.H., Behringer R.R., Garry D.J., Entman M.L., and Schneider M.D. (2003) Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 12313-12318.

55. Orlic D. (2003) Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 996, 152-157.

56. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Bodine D.M., Leri A., and Anversa P. (2003) Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr. Transplant.* 7 Suppl 3, 86-88.

57. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Limana F., Jakoniuk I., Quaini F., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., and Anversa P. (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 10344-10349.

58. Perin E.C., Dohmann H.F., Borojevic R., Silva S.A., Sousa A.L., Mesquita C.T., Rossi M.I., Carvalho A.C., Dutra H.S., Dohmann H.J., Silva G.V., Belem L., Vivacqua R., Rangel F.O., Esporcatte R., Geng Y.J., Vaughn W.K., Assad J.A., Mesquita E.T., and Willerson J.T. (2003) Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 107, 2294-2302.

59. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., and Marshak D.R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

60. Pittenger M.F. and Martin B.J. (2004) Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* 95, 9-20.

61. Qiao H., Surti S., Choi S.R., Raju K., Zhang H., Ponde D.E., Kung H.F., Karp J., and Zhou R. (2009) Death and proliferation time course of stem cells transplanted in the myocardium. *Mol. Imaging Biol.* 11, 408-414.

62. Rangappa S., Makkar R., and Forrester J. (2010) Review article: current status of myocardial regeneration: new cell sources and new strategies. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 15, 338-343.

63. Rasmusson I., Ringden O., Sundberg B., and Le Blanc K. (2003) Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76, 1208-1213.

64. Rombouts W.J. and Ploemacher R.E. (2003) Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 17, 160-170.

65. Rosenthal N. and Tsao L. (2001) Helping the heart to heal with stem cells. *Nat. Med.* 7, 412-413.

66. Schachinger V., Assmus B., Britten M.B., Honold J., Lehmann R., Teupe C., Abolmaali N.D., Vogl T.J., Hofmann W.K., Martin H., Dimmeler S., and Zeiher A.M. (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, 1690-1699.

67. Schachinger V., Dimmeler S., and Zeiher A.M. (2006) [Stem cells after myocardial infarction]. *Herz* 31, 127-136.

68. Schachinger V., Erbs S., Elsasser A., Haberbosch W., Hambrecht R., Holschermann H., Yu J., Corti R., Mathey D.G., Hamm C.W., Suselbeck T., Assmus B., Tonn T., Dimmeler S., and Zeiher A.M. (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 355, 1210-1221.

69. Schachinger V. and Zeiher A.M. (2005) Stem cells and cardiovascular and renal disease: today and tomorrow. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 Suppl 1, S2-S6.

70. Shake J.G., Gruber P.J., Baumgartner W.A., Senechal G., Meyers J., Redmond J.M., Pittenger M.F., and Martin B.J. (2002) Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann. Thorac. Surg.* 73, 1919-1925.

71. Siu C.W., Liao S.Y., Liu Y., Lian Q., and Tse H.F. (2010) Stem cells for myocardial repair. *Thromb. Haemost.* 104.

72. Smits P.C., van Geuns R.J., Poldermans D., Bountioukos M., Onderwater E.E., Lee C.H., Maat A.P., and Serruys P.W. (2003) Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42, 2063-2069.

73. Solter D. (2006) From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat. Rev. Genet.* 7, 319-327.

74. Sottile V., Halleux C., Bassilana F., Keller H., and Seuwen K. (2002) Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 30, 699-704.

75. Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., Magner M., Isner J.M., and Asahara T. (1999) Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 5, 434-438.

76. ter Horst K.W. (2010) Stem cell therapy for myocardial infarction: are we missing time? *Cardiology* 117, 1-10.

77. Tomita S., Li R.K., Weisel R.D., Mickle D.A., Kim E.J., Sakai T., and Jia Z.Q. (1999) Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100, II247-II256.

78. Tomita S., Mickle D.A., Weisel R.D., Jia Z.Q., Tumiati L.C., Allidina Y., Liu P., and Li R.K. (2002) Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 123, 1132-1140.

79. Torella D., Ellison G.M., Mendez-Ferrer S., Ibanez B., and Nadal-Ginard B. (2006) Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and potential for myocardial regeneration. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3 Suppl 1, S8-13.

80. Traverse J.H., Henry T.D., Vaughan D.E., Ellis S.G., Pepine C.J., Willerson J.T., Zhao D.X., Piller L.B., Penn M.S., Byrne B.J., Perin E.C., Gee A.P., Hatzopoulos A.K., McKenna D.H., Forder J.R., Taylor D.A., Cogle C.R., Olson R.E., Jorgenson B.C., Sayre S.L., Vojvodic R.W., Gordon D.J., Skarlatos S.I., Moye' L.A., and Simari R.D. (2009) Rationale and design for TIME: A phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial evaluating the safety and effect of timing of administration of bone marrow mononuclear cells after acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 158, 356-363.

81. Traverse J.H., Henry T.D., Vaughan D.E., Ellis S.G., Pepine C.J., Willerson J.T., Zhao D.X., Simpson L.M., Penn M.S., Byrne B.J., Perin E.C., Gee A.P., Hatzopoulos A.K., McKenna D.H., Forder J.R., Taylor D.A., Cogle C.R., Baraniuk S., Olson R.E., Jorgenson B.C., Sayre S.L., Vojvodic R.W., Gordon D.J., Skarlatos S.I., Moye L.A., and Simari R.D. (2010) LateTIME: a phase-II, randomized, double-blinded, placebo-controlled, pilot trial evaluating the safety and effect of administration of bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks after acute myocardial infarction. *Tex. Heart Inst. J.* 37, 412-420.

82. Valina C., Pinkernell K., Song Y.H., Bai X., Sadat S., Campeau R.J., Le Jemtel T.H., and Alt E. (2007) Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 28, 2667-2677.

83. Wang J.S., Shum-Tim D., Galipeau J., Chedrawy E., Eliopoulos N., and Chiu R.C. (2000) Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 120, 999-1005.

84. Wang Y., Johnsen H.E., Mortensen S., Bindslev L., Ripa R.S., Haack-Sorensen M., Jorgensen E., Fang W., and Kastrup J. (2006) Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart* 92, 768-774.

85. Wei H.M., Wong P., Hsu L.F., and Shim W. (2009) Human bone marrow-derived adult stem cells for post-myocardial infarction cardiac repair: current status and future directions. *Singapore Med. J.* 50, 935-942.

86. Wollert K.C., Meyer G.P., Lotz J., Ringes-Lichtenberg S., Lippolt P., Breidenbach C., Fichtner S., Korte T., Hornig B., Messinger D., Arseniev L., Hertenstein B., Ganser A., and Drexler H. (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364, 141-148.

87. Zhang S., Sun A., Xu D., Yao K., Huang Z., Jin H., Wang K., Zou Y., and Ge J. (2009) Impact of timing on efficacy and safetyof intracoronary autologous bone marrow stem cells transplantation in acute myocardial infarction: a pooled subgroup analysis of randomized controlled trials. Clin. Cardiol. 32, 458-466.

Curriculum Vitae

Name	Patricia Andrea Fäßler
Kontakt	patriciafaessler@hotmail.com
Geburtsort	Bonn
Geburtstag	2.September 1979

Ausbildung

2005 - 2011	Studium der Zahnmedizin, *Universität Hamburg* Abschluss: Staatsexamen
1999 - 2005	Studium der Humanmedizin, *Universität Hamburg* Abschluss: Staatsexamen
1989 - 1998	(1996-1998) *Stormarnschule*, Ahrensburg, (1995) *Walthamstow Hall* in Sevenoaks, Kent, England und (1989-1995) *Siebengebirgsgymnasium*, Bad Honnef Abschluss: Abitur
1985 - 1989	Grundschule *St. Martinus* in Bad Honnef und Grundschule *Colegio Aleman*, Madrid, Spanien

Arbeitsverhältnisse

12/2007 - 12/2010	Ärztliche Mitarbeiterin im Cardiologicum Wandsbek, Bereich Sprechstunde und Studienbüro
04/2006 - 10/2007	Assistenzärztin in der HNO, Klinikum Minden, Chefarzt Professor Schrader

Sprachen

Englisch, Spanisch, Französisch

Hamburg, 25.08.2011

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Dr. rer. nat. Kai Jaquet unendlich danken, denn ohne seine langjährige Unterstützung und Betreuung wäre diese Arbeit niemals fertig geworden. Er hat sich trotz mancher Durchhänger meinerseits immer wieder mit der Thematik beschäftigt und mich weiter nach vorne gebracht.

Professor Dr. K.H. Kuck möchte ich danken, dass er sich weiterhin mit außergewöhnlichen Engagement auf dem Gebiet der Kardiologie beschäftigt und immer aktuellste wissenschaftliche Forschungen unterstützt und betreibt.

Joachim Denschel und Mona Nauerz waren ebenfalls für den Erfolg dieser Arbeit von enormer Bedeutung, vor allem in Bezug auf die praktischen Belange (Tierversuche und Zellkulturlinien). Ohne die Unterstützung von Frau PD Dr. C Lange und Professor Dr. B. Fehse (Universiätsklinikum Eppendorf, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation) wären unsere Zellmarkierungsversuche mit erheblichen Problemen behaftet gewesen!

Frau Dr. M. Möbius möchte ich unendlich danken für die moralische Unterstützung, danke Marie!!!

Fiona Weigel danke ich für unsere vier wöchige Intensivzeit in der ÄZB, ohne die dieses Projekt jetzt wahrscheinlich immer noch nicht fertig wäre und Georg Schumacher für die Unterstützung beim Layout.

Und zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die immer für mich da war und ist!

Eidesstattliche Versicherung:
Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....Patricia Fäßler.....