

Universität Hamburg

Asklepios Klinik St. Georg - Hamburg

Herz-, Gefäß- und Diabeteszentrum
Kardiologische Abteilung

Ltd. Arzt Prof. Dr. med. Dr. h.c. K.-H. Kuck

Elektrophysiologische Effekte nach intramyokardialer Injektion mononuklearer und mesenchymaler Stammzellen bei ischämischer Herzkrankheit: Untersuchungen an Tiermodell und bei Patienten in der Frühphase nach Myokardinfarkt

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Ahmed Salhi
aus Palästina/ Gaza

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am : 12.02.2013

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: der Vorsitzende: PD Dr. K. Krause

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. F. Wagner

Inhaltverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Arbeitshypothese.....	6
2 Einleitung	7
2.1 Linksventrikuläres Remodelling nach akutem Myokardinfarkt.....	8
2.2 Stammzelltherapie	8
2.3 Stammzellen - Allgemeines.....	10
2.3.1 Potenzialität der Stammzellen.....	11
2.3.2 Physiologische Rolle von Stammzellen	11
2.3.3 Welche Stammzellen stehen für den therapeutischen Einsatz zur Verfügung? ..	12
2.4 Embryonale Stammzellen.....	13
2.5 Adulte Stammzellen	13
2.5.1 Knochenmark-abgeleitete mononukleäre Zellen (MNC).....	13
2.5.2 Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	14
2.5.3 Skelettale Myoblasten	15
2.5.4 Weitere Vorläuferzellen	15
2.6 Applikationsart	16
2.7 Herzrhythmusstörungen.....	17
2.7.1 Die häufigsten Formen der ventrikulären Arrhythmien:.....	17
2.7.2 Ätiologie der ventrikulären Arrhythmien.....	18
2.7.3 Pathophysiologie: Mechanismen der Entstehung der ventrikulären Arrhythmien	19
2.7.4 Herzrhythmusstörung nach Implantation embryonaler Stammzellen:.....	22
2.7.5 Herzrhythmusstörung nach Implantation adulter Stammzellen:	22
2.8 Elektromechanisches Mapping.....	24
3 Methode	26
3.1.1 Das Schwein als Tiermodell.....	26
3.1.2 Koronarangiographie.....	26
3.1.3 Ameroid Konstriktor zur Simulation einer Koronarstenose	27
3.1.4 Drei-dimensionales elektromechanisches Mapping.....	28
3.1.5 Langzeit-EKG (LZ-EKG)	37
3.2 Eigene Untersuchungen	39
3.2.1 Zielsetzung	39
3.3 Experimentelles Tiermodell	40
3.3.1 Versuchstiere	40
3.3.2 Versuchsplan und Gruppeneinteilung	40
3.3.3 Isolation der Knochenmarkszellen.....	41
3.3.4 Phase 1: Implantation des Ameroid Konstriktors	42
3.3.5 Phase 2: Kardiologische Untersuchung/Verlaufskontrolle und Zellinjektion....	44
3.3.6 Phase 3: Follow-up Kontrolle nach 6 Wochen.....	47
3.3.7 Euthanasie, Sektion und Probenentnahme	47
3.3.8 Histologische Untersuchungen	48
3.4 Klinischer Teil	49
3.5 Statistik	50
4 Ergebnisse.....	51
4.1 Experimentelles Tiermodell	51

4.1.1	Überlebensrate.....	51
4.1.2	Konstriktoren.....	51
4.1.3	Elektromechanisches Mapping (EMM)	51
4.1.4	Bestimmung des ischämischen Myokardareals mittels EMM	55
4.1.5	Histologie	57
4.2	Klinischer Teil	58
4.2.1	Elektromechanisches Mapping	59
4.2.2	Ergebnisse des Langzeit-EKG	63
5	<i>Diskussion.....</i>	64
5.1	Überlegung zum Versuchsaufbau des experimentellen Teils der Arbeit	64
5.1.1	Wahl des Tiermodells.....	64
5.1.2	Konstriktormodell und Verlustrate.....	64
5.1.3	Limitationen, Vor- und Nachteile des NOGA-Systems.....	65
5.1.4	Vergleich der verschiedenen Stammzellen	66
5.1.5	Gewebeschäden.....	66
5.2	Arrhythmogenität und Sicherheit	67
5.2.1	Ursachen der Herzrhythmusstörungen nach Zellinjektion.....	68
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick	71
6	<i>Zusammenfassung.....</i>	72
	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	73
	<i>Danksagung.....</i>	87
	<i>Lebenslauf</i>	88
	<i>Eidesstattliche Erklärung.....</i>	89

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACVB	Aorto-Coronarer-Venen-Bypass
BV	Bipolare voltage
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EMM	Elektromechanisches Mapping
ERP	Effective refraktorische Peroide
ES	Embryonale Stammzellen
FI	Fragmentation-Index
G-CSF	Kolonie stimulierender Faktor
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
ICD	Implantierbarer Cardioverter Defibrillator
KHK	Koronare Herzkrankheit
LLS	Linear local shortening, lineare lokale Verkürzung
LVEF	Linksventrikuläre Ejektion-Fraktion
LZ-EKG	Langzeit-Elektrokardiogramm
MI	Myokardinfarkt
Mio.	Million
MNC	mononuclear stem cells (Mononukleare Stammzellen)
MSC	mesenchymal stem cells (Mesenchymale Stammzellen)
MW	Mittelwert
PTCA	Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie
RCX	Ramus circumflexus
SDF-1	Stromacell-Derived-Factor-1
STABW	Standardabweichung
SZ	Stammzellen
Tab.	Tabelle
UV	Unipolare voltage
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

1 Arbeitshypothese

Die bisherigen medikamentösen und interventionellen Therapiekonzepte der Herzinsuffizienz als Folge eines Herzinfarkts verfolgen vor allem das Ziel, die bestehende Herzfunktion zu erhalten bzw. eine Verschlechterung der Herzfunktion zu verhindern oder zu verlangsamen. Dies stellt jedoch keine kausale Therapie im Sinne einer Wiederherstellung des infarktgeschädigten Myokards dar.

Die Regeneration von Herzmuskelgewebe durch eine Zelltherapie stellt dagegen ein im Ansatz völlig neuartiges Therapieverfahren dar. Die Grundlage einer solchen Therapie besteht darin, untergegangene Herzmuskelzellen durch das Einbringen neuer Zellen zu ersetzen und dadurch die Myokardfunktion zu verbessern. Zu diesem Zweck wurden sowohl in experimentellen als auch in klinischen Studien verschiedene Zelltypen auf verschiedene Arten in erkrankte Herzen injiziert.

Obwohl sich durch die Stammzelltherapie teilweise positive Effekte zeigten und Verbesserungen der kardialen Funktion in Metaanalysen bestätigten, ist die langanhaltende Wirksamkeit der derzeit angewendete Stammzelltherapie nicht gesichert.

Darüber hinaus ist die Existenz potentieller Risiken oder Komplikationen nach Stammzell-Implantation insbesondere Herzrhythmusstörungen, aufgrund der kleinen Fallzahlen der Studien bisher nicht sicher abzuschätzen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Frage zu beantworten, ob elektrophysiologische Effekte nach intramyokardialer Injektion mononuklearer Knochenmarkzellen und mesenchymaler Stammzellen bei ischämischer Herzkrankheit entstehen. Die Untersuchung wurde an ischämischen Tiermodellen und bei Patienten in der Frühphase nach Myokardinfarkt durchgeführt.

Unter Anwendung eines drei-dimensionalen elektromechanischen Mapping-Systems (EMM) wurde ein lokales endokardiales Elektrokardiogramm sowie bei Patienten mehrfach Langzeit-EKG's aufgezeichnet. Die Analyse dieser Elektrogramme, vor und nach Stammzellinjektion soll hinsichtlich eines potentiellen arrhythmogenen Substrats beurteilt werden. Dies ist für die Sicherheit der degenerativen Therapiestrategien von Bedeutung.

2 Einleitung

Die koronare Herzkrankheit und die sich daraus ergebenden Komplikationen stellten im Jahr 2008 mit 7,25 Millionen Todesfällen weltweit die häufigsten Todesursachen dar. Weltweit starben somit ca. 3,8 Mio. Männer und 3,4 Mio. Frauen durch KHK und ihre Folgen. Die KHK nahm Platz eins vor Schlaganfall (6,15 Mio.) und Infektionen der unteren Atemwege (3,46 Mio.) in der Liste der 10 häufigsten Todesursachen im Jahr 2008 weltweit ein. (WHO 2011). Wegen der weltweit steigenden Lebenserwartung rechnet die UN-Organisation mit einer weiteren Zunahme kardiovaskulär bedingter Todesfälle um mehr als ein Drittel (37 Prozent) im Jahr 2030 (WHO 2004).

Im Jahr 2007 verstarben allein in Deutschland 58.000 Menschen an den Folgen eines akuten Herzinfarktes (Statistisches Bundesamt Deutschland Todesursachen-Statistik 2007).

Risikofaktoren wie Hyperlipoproteinämie, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Adipositas und Diabetes mellitus sowie familiäre Disposition führen zur Koronarsklerose. Durch chronische Endothelschädigung kommt es zu endothelialer Dysfunktion. Subendotheliale Lipidablagerungen resultieren in Bildung und Wachstum arteriosklerotischer Plaques in den Koronargefäßen. Durch zunehmende Einengung des Gefäßlumens kommt es zu einer Koronarinsuffizienz, einem Missverhältnis zwischen Versorgung und Bedarf des Herzmuskels, welche zunächst nur unter Belastung bei erhöhtem Sauerstoffbedarf des Herzmuskels in einer Myokardischämie resultiert (Saurbier et al. 2007). Klinische Äußerung ist die belastungsabhängige Angina pectoris. Im Falle einer Plaqueruptur mit gefäßverschießender Thrombenbildung kommt es zum Myokardinfarkt. Als Folge oder Komplikation können Herzinsuffizienz, Arrhythmien, linksventrikuläre Thrombenbildung, Herzwandaneurysmen und plötzlicher Herztod auftreten.

Die Herzinsuffizienz mit ihren Komplikationen, am häufigsten als Folge eines akuten Myokardinfarkts mit irreversiblen Verlust von kontraktilen Myokardgewebe, ist die führende Todesursache in den westlichen Industrienationen. Trotz großer therapeutischer Fortschritte mit rascher und vollständiger Reperfusion des verschlossenen Herzkranzgefäßes (perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) und Bypass-Operation) sowie optimierter medikamentöser Postinfarkttherapie, kann die Herzinsuffizienz infolge des myokardialen Remodelings bisher nur unzureichend verhindert werden (Pfeffer et al. 2003, Pitt et al 2003).

2.1 Linksventrikuläres Remodelling nach akutem Myokardinfarkt

Beim akuten transmuralen Myokardinfarkt geht kontraktiles Myokardgewebe verloren. Durch nachfolgende Umbauprozesse im Herzen (Remodeling) entsteht schließlich die klinische Manifestation einer Herzinsuffizienz mit erhöhter Morbidität und Mortalität. Eine Regeneration durch teilungsfähige Vorläuferzellen findet nur bedingt statt (Beltrami et al. 2003). Die Infarktzone ist zentral nekrotisch, avital und vernarbt. In Abhängigkeit von der initialen Infarktgröße entwickelt sich ein struktureller Umbau des Ventrikels (Remodeling), das heißt, es kommt zur Ventrikeldilatation und zur weiteren Abnahme der Ventrikelfunktion (Bolognese et al. 1997). Durch den rechtzeitigen Einsatz von pharmakologischen und mechanischen Therapieverfahren lässt sich die Größe der sich entwickelnden Infarktzone begrenzen (Califf et al. 1994 und Antoniucci et al. 1998). Die Rückbildung einer bereits entstandenen Myokardnekrose ist dadurch nicht möglich.

In einer Metaanalyse von etwa 14.000 Patienten, die nach Herzinfarkt an einer linksventrikulären Funktionsstörung litten, lag bei allen Patienten die 1-Jahres-Mortalität trotz leitliniengerechter medikamentöser Therapie bei 13% (Pfeffer et al. 2003). Die 5-Jahres-Mortalität bei Herzinsuffizienz in epidemiologischen Studien liegt weiterhin über 50% (Owan et al. 2006). Der Grad der Herzinsuffizienz ist ein Prädiktor des rhythmogenen Herztodes, aber vor allem auch der Gesamtmortalität. Während Rhythmusereignisse durch Implantation von internen automatischen Defibrillatoren (ICD) adäquat therapiert werden können und die Mortalität gesenkt werden kann (Moss 2003), muss zur weiteren Senkung der Mortalität vor allem die Verbesserung der Herzinsuffizienz Therapieziel sein.

Eine Neogenese an Herzmuskelzellen im Sinne einer Myoneogenese sowie, in begrenztem Umfang, eine Neogenese der Gefäße im Sinne einer Angiogeneogenese könnte entsprechend einer Kausaltherapie eine Verbesserung der Funktion und einen Schutz vor Remodeling bewirken. Dadurch könnte die zentralnekrotische, avitale und vernarbte Infarktzone erneut durchblutet und mit kontraktionsfähiger Substanz regeneriert werden. Experimentelle Daten weisen darauf hin, dass dies mit autologen Knochenmarkzellen möglich ist (Orlic et al. 2001 und Kocher et al. 2001).

2.2 Stammzelltherapie

Die alte Erkenntnis und die Faszination von Regenerationsprozessen im Körper erhalten durch die rasch wachsenden Erkenntnisse aus der Entwicklungsbiologie und Stammzellforschung eine neue Aktualität. Die molekulare Einsicht in biologische Prozesse auf der Basis von Stammzellen, tierexperimentelle

Ergebnisse und klinische Beobachtungen schaffen Hoffnung und haben Visionskraft für das neue Forschungsfeld der „Regenerativen Medizin“. Von besonderem Interesse und klinischer Relevanz ist die Regenerationsfähigkeit des Herzens. Die traditionelle Lehrmeinung, dass das Herz keine regenerative Kapazität aufweist wurde durch neue Erkenntnisse der Stammzellforschung in den letzten Jahren mehrfach in Frage gestellt (Laflamme MA und Murry CE 2005, Leri et al. 2005).

Es wurden Hinweise dafür gefunden, dass Kardiomyozyten mitotisches Potential besitzen (Beltrami et al. 2003, Leri et al. 2005, Oh et al. 2003). Bergmann et. al. konnten mittels der Radiokarbonmethode in postmortalem humanem Herzgewebe eine endogene regenerative Kapazität beim Menschen aufzeigen (Bergmann et al. 2009). Auch die physiologische Mobilisation von Knochenmarkstammzellen in die Zirkulation und die vermehrte Präsenz von Zytokinen wie z.B. VEGF (Vascular endothelial growth factor) sprechen zumindest für eine gewisse kardiale Regenerationsfähigkeit.

Bei Tierexperimenten, in denen die Transdifferenzierung von Knochenmarkvorläuferzellen zu Kardiomyozyten in einem induziertem Myokardinfarkt-Areal bei Nagern beschrieben wurde, konnte die Regenerationsfähigkeit des Myokards gezeigt werden (Orlic et al. 2001 und Kocher et al. 2001). Mittels grün-fluoreszierendem Protein (GFP) exprimierenden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wurde nach intravenöser und auch intramyokardialer Injektion neben der Transdifferenzierung auch ein signifikant positiver Effekt auf Myokardkontraktion, Verkleinerung der Infarktnarbe und Regeneration, sowie Senkung der Mortalität demonstriert (Laflamme und Murry 2005). Ähnlich positive Effekte wurden auch durch Mobilisierung der Vorläuferzellen aus dem Knochenmark durch Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF) erzielt (Orlic et al. 2001).

Es wurde außerdem nachgewiesen, dass zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (Progenitorzellen) nach In-vitro-Kultivierung und erneuter Injektion neue Gefäße im ischämischen Gewebe gebildet werden konnten (Asahara et al. 1997). Es wurden auch nach Gewebeischämie vermehrt endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisiert (Sandri et al. 2005). Diese Hinweise stützen das Konzept, dass die Mobilisation von Vorläuferzellen einem physiologischen Reparaturmechanismus dient.

Außerdem gilt der Nachweis der Integration von Kohlenstoff-14-Isotopen in menschlicher DNS von Kardiomyozyten nach Nukleartests während der Lebensperiode als Zeichen der Erneuerung von Kardiomyozyten im Verlauf des Lebens (ca. 1% jährlich im Alter von 25 Jahren) (Bergmann et al. 2009). Hierbei konnte naturgemäß nicht bewiesen werden, woher die neuen Kardiomyozyten stammen. Darüber hinaus wurden vereinzelt in transplantierten weiblichen Spenderherzen bei männlichen Empfängern Y-Chromosomen nachgewiesen (in Myozyten und Endothelzellen), was auf eine extrakardiale Zelleinwanderung schließen lässt; ergänzend fanden sich bei weiblichen Patienten, die eine Knochenmarktransplantation von Männern erhielten, Y-Chromosom-positive Herzmuskelzellen, was auf neue Kardiomyozyten aus dem Knochenmark schließen lässt (Deb et al. 2003, Bayes-Genis 2007 und Quaini et al. 2002).

Allerdings ist der Nachweis der Transdifferenzierung von Knochenmarkzellen zu Kardiomyozyten und somit das Konzept der dadurch initiierten Regeneration durch Studien in Frage gestellt worden, die in ähnlichen experimentellen Modellen keine Transdifferenzierung, sondern eine Zellfusion zeigten (Murry et al. 2004, Nygren et al. 2004 und Balsam et al. 2004). Inzwischen werden daher statt des Konzeptes der Regeneration, kardioprotektive und reparative Effekte untersucht, die für den positiven Einfluss von verschiedenen Vorläuferzellen verantwortlich sind: parakrine Effekte durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, Antiapoptose, Angiogenese, Antiinflammation und der Einfluss auf die extrazelluläre Matrix (Korf-Klingebiel et al. 2008 und Gnecci et al. 2008). Diese parakrinen Effekte wirken kardioprotektiv indem sie das linksventrikuläre Remodelling reduzieren (Murry et al. 2006 und Laflamme et al. 2005). Relevanten myokardialen Zellersatz leistet nur der Ansatz des „tissue engineering“ (Zimmermann et al. 2006) oder die Herztransplantation.

Aufgrund der präklinischen Ergebnisse sind inzwischen zahlreiche klinische Studien mit überwiegend knochenmark-abgeleiteten Zellen durchgeführt worden, die uneinheitliche Ergebnisse hinsichtlich einer Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion aufzeigen (Wollert 2010). Diese Studien wurden nach akutem Myokardinfarkt bisher vorwiegend mittels intrakoronarer Zellinjektionen durchgeführt. In den präklinischen Arbeiten wurden hingegen überwiegend intramyokardiale Applikationen verwendet, die auch hinsichtlich der Effektivität methodisch Vorteile aufweisen (Hou et al. 2005 und Freyman et al. 2006). In Hinblick auf eine perkutane intramyokardiale Applikation am Menschen bietet sich das elektromechanische Mapping mit mapping-gesteuerter Injektion an.

2.3 Stammzellen - Allgemeines

Stammzellen sind Zellen, die sich gegenüber anderen Zelltypen durch drei Eigenschaften auszeichnen (Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) 2001; National Institutes of Health 2001):

- Sie sind nicht endgültig differenziert.
- Sie haben die Fähigkeit zur fortgesetzten Selbsterneuerung, indem sie sich durch Zellteilungen über lange Zeiten in einem relativ undifferenzierten Zustand erneuern und auch vermehren können.
- Sie haben die Fähigkeit, sich unter geeigneten Bedingungen bzw. unter dem Einfluss geeigneter Signale zu Zellen unterschiedlicher Spezialisierung zu entwickeln (d. h. zu differenzieren), so z. B. zu Herz-, Nerven-, Haut- oder Muskelzellen.

Wenn sich eine Stammzelle teilt, bestehen somit für die Tochterzellen zwei Möglichkeiten: die Tochterzelle kann, wie die Mutterzelle, eine Stammzelle bleiben und damit zur fortgesetzten Selbsterneuerung beitragen. Alternativ kann die Tochterzelle einen Pfad einschlagen, der zu ihrer endgültigen Differenzierung führt. Aufgabe der Stammzellen ist es, zum einen die ungefähr

zweihundert verschiedenen Zelltypen hervorzubringen, die erwachsene Säugetiere einschließlich des Menschen aufweisen. Zum anderen erfüllen sie Aufgaben bei der Geweberegeneration und -reparatur, indem sie differenzierte Zellen nachliefern, um die Funktionsfähigkeit von Geweben und Organen dauerhaft aufrecht zu erhalten und um beschädigte oder abgestorbene Zellen zu ersetzen.

2.3.1 Potenzialität der Stammzellen

Mit der Potenzialität wird die Entwicklungsbefähigung einer biologischen Einheit charakterisiert, wobei es sich bei dieser biologischen Einheit um einen Zellkern, eine einzelne Zelle oder einen Gewebeverband handeln kann. Diese Entwicklungsbefähigung kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein und reicht im embryologisch-klassischen Sinne von der Befähigung zur Ausbildung eines vollständigen Individuums (Totipotenz) über die Befähigung zur Ausbildung sämtlicher Zell- und Gewebetypen, die ein Individuum ausmachen (Pluripotenz) bis zur Befähigung, nur noch eine begrenzte Anzahl von Zelltypen (Multipotenz) oder nur noch einen bestimmten Zelltyp (Unipotenz) hervorzubringen.

Die Potenzialität von Stammzellen spielt in der Stammzelldebatte eine wesentliche Rolle, da für die ethische und rechtliche Beurteilung von großer Bedeutung ist, ob diese Zellen als totipotent oder pluripotent einzustufen sind.

2.3.2 Physiologische Rolle von Stammzellen

Stamm- und Progenitorzellen, die vom Knochenmark in die Blutbahn freigesetzt werden, sind ein von der Natur angelegtes Reparatursystem für Schädigungen der Organe (Sandri et al. 2005). Im Rahmen einer Ischämie kommt es zur Bildung von Botenstoffen, welche in die Blutbahn freigesetzt werden und die Mobilisation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark fördern.

Ischämisches Gewebe (z. B. Myokardgewebe nach Herzinfarkt) exprimiert dabei Rezeptoren und bildet Botenstoffe (z. B. Stromacell-Derived-Factor-1, [SDF-1]), die Adhäsion, Migration und Differenzierung der Progenitorzellen steuern. Die Differenzierung in bestimmte Parenchymzellen erfolgt wahrscheinlich über Zell-Zell-Kontakte mit den vor Ort bereits vorhandenen, differenzierten Zellen. Die Kapazität dieses physiologischen Reparatursystems ist jedoch lediglich für eine geringfügige, langsame Reparatur, möglicherweise als Gegengewicht zur Alterung der Organe oder

geringer Verletzungen, ausgelegt. Bei einem "Massenunfall" wie dem akuten Myokardinfarkt ist diese physiologische Reparaturfähigkeit offensichtlich bei weitem überfordert (Assmus et al. 2002).

2.3.3 Welche Stammzellen stehen für den therapeutischen Einsatz zur Verfügung?

Mögliche Quellen für eine stammzellbasierte Therapie sind neben Knochenmark und Blut die Skelettmuskulatur, das Fettgewebe sowie embryonale Stammzellen (Abb. 1). Letztere weisen zum Einen eine sehr hohe Plastizität auf, die Differenzierung kann aber auf der anderen Seite auch schlecht kontrolliert werden. Aus diesen sowie auch ethischen Gründen ist eine klinische Anwendung derzeit noch nicht absehbar (s. 2.4.). Im Fettgewebe wurde eine hohe Anzahl von Progenitorzellen gefunden, die zukünftig eine Quelle für Therapien darstellen könnten. Klinisch eingesetzt wurden bisher Progenitorzellen aus dem Knochenmark, zirkulierende Progenitorzellen, Fettgewebe und Skelettmyoblasten. Letztere können wegen ihrer Größe nicht, wie Knochenmark- oder zirkulierende Progenitorzellen intravasal appliziert werden, sondern werden im Rahmen einer Herzoperation oder perkutan vom linken Ventrikel oder Koronarvenensinus aus direkt in den Herzmuskel injiziert.

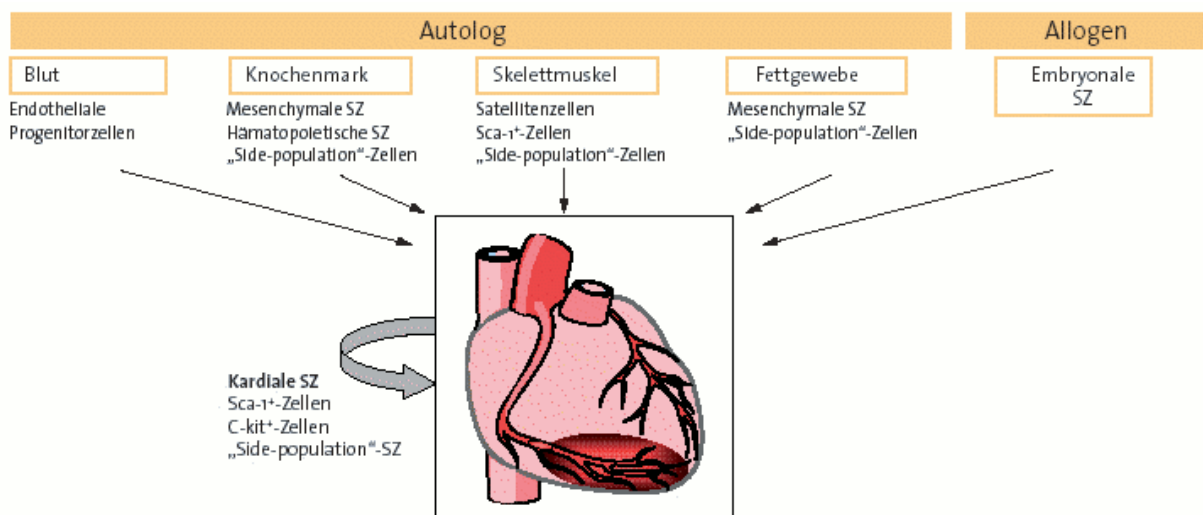


Abb. 1: Potenzielle Quellen zur Stammzellgewinnung für die kardiale Regeneration, SZ: Stammzellen (Dimmeler et al. 2005)

2.4 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen sind in den frühen Teilungsphasen totipotent, das bedeutet, dass aus einer einzigen Zelle ein vollständiger Organismus entstehen kann. Ab dem Stadium der Blastozyste findet man pluripotente Zellen, diese können sich zu allen Zellen des Organismus weiter entwickeln, aber keinen vollständigen Organismus mehr bilden. Obwohl experimentelle Studien ein großes Potenzial für embryonale Stammzellen zur Regeneration von Herzmuskelgewebe und zur Verbesserung der Herzfunktion zeigten (Sakai et al. 1999), ist die Verwendung dieser Zellen jedoch aufgrund ethischer Bedenken umstritten. Zudem müsste eine Immunsuppression durchgeführt werden und es besteht die Gefahr der malignen Entartung (Körbling et al. 2003 und Wormer et al. 2002).

2.5 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind multipotente Zellen. Die Verwendung autologer adulter Zellen bringt keine ethischen Bedenken mit sich. Da es sich um körpereigene Zellen handelt, muss auch keine Immunsuppression durchgeführt werden. Zusätzlich sind durch die seit langem etablierten Transplantationen von Knochenmark bei Leukämie und anderen Krebserkrankungen und bei erblichen Blut- und Immunerkrankungen Erfahrungen mit hämatopoetischen Stammzellen vorhanden. Lange Zeit herrschte die Meinung, dass sich nur embryonale Stammzellen in alle Gewebe differenzieren können und adulte Stammzellen auf bestimmte Zellreihen beschränkt waren. Studien zeigen aber, dass auch adulte Stammzellen sich in mehrere Gewebe weiter entwickeln können (Blau et al. 2001 und Lovell et al. 2004). Malouf et al. (2001) konnten beispielsweise zeigen, dass aus der Leber entnommene Stammzellen sich nach Injektion in das Herz zu ausgereiften Kardiomyozyten differenzierten.

Die Klassifizierung von Stammzellen befindet sich noch in der Entwicklung. Inzwischen sind einige Oberflächenmarker bekannt, welche eine Stammzelle kennzeichnen.

2.5.1 Knochenmark-abgeleitete mononukleäre Zellen (MNC)

Die 2001 von Orlic et al. veröffentlichten Daten zeigten nach intramyokardialer Injektion von MNC eine Verbesserung der LVEF durch eine quantitativ und funktionell bedeutsame Transdifferenzierung

dieser MNCs zu Kardiomyozyten im Sinne einer genuin regenerativen Therapie. Allerdings konnte eine Transdifferenzierung einer relevanten Anzahl injizierter Zellen in vivo von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden, sondern eine Fusion der fluoreszenzmarkierten Zellen mit bestehenden Kardiomyozyten (Murry et al. 2004 und Ziegelhoeffer et al. 2004).

Im Folgenden wurden zahlreiche klinische Studien durchgeführt, die knochenmarkabgeleitete mononukleäre Zellen nicht intramyokardial, sondern intrakoronar applizierten. Die Ergebnisse sind bisher kontrovers: Die TOPCARE-AMI, REPAIR und IACT-Studien zeigten einen Anstieg der LVEF im Verlauf von ca. 3% (Assmus et al. 2002, Bartunek et al. 2005 und Strauer et al. 2005), während andere Studien wie LEUVEN (Janssens et al. 2006), ASTAMI (Lunde et al. 2006) und die BOOST-Studie (Anstieg der LVEF in der Zellgruppe um 5%, in der Kontrollgruppe um 3% nach 18 Monaten) (Meyer et al. 2006) diese signifikanten Ergebnisse nicht reproduzieren konnten. In der BOOST-Studie ergab sich auch nach 61 Monaten kein Vorteil insgesamt; allerdings profitierten Patienten mit nahezu transmuralen Infarkten (Meyer et al. 2009). Die REGENT-Studie, die 160 Patienten mit einer LVEF<40% einschloss, ergab keinen signifikanten Vorteil hinsichtlich einer Verbesserung der LVEF bei der mit selektierten CD34(+)CXCR4(+) Zellen behandelten Patienten (Tendera et al. 2009).

Die Vergleichbarkeit der Studien ist eingeschränkt aufgrund unterschiedlicher bildgebender Verfahren in der LVEF-Messung, der unterschiedlichen Zeitpunkte der Injektion nach Myokardinfarkt (von drei bis zu zwölf Tage), verschiedener Zellisolierungs- und selektionstechniken. In einer Metaanalyse von zehn kontrollierten Studien mit 698 Patienten wurde eine kurzfristige LVEF-Verbesserung von 2,97% aufgezeigt (Lipinski et al. 2007). In einer anderen Meta-Analyse, die 660 Patienten aus sieben randomisierten, kontrollierten Studien einschloss, wurde eine signifikante Verbesserung der LVEF von 4,63%, eine Reduzierung der endsystolischen LV-Diameter, eine Reduzierung von Revaskularisierungen und weniger kumulative Ereignisse an Tod und Re-Infarkten aufgezeigt (Zhang et al 2009). Dies galt allerdings nur für die Patienten, die MNC vier bis sieben Tage nach Myokardinfarkt erhielten und nicht innerhalb 24 Stunden.

2.5.2 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

MSC sind multipotente stromale Knochenmarkzellen, die in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten differenzieren können (Pittenger 1999). Auch Kardiomyozyten konnten aus MSC in vitro durch Demethylierung mit 5-Azacytidin erzeugt werden (Hakuno et al. 2002). Allerdings sind in der Anwendung im ischämischen Tiermodell zunehmend angiogene und parakrine Effekte, wie die Sekretion von VEGF beschrieben worden (Kinnaird et al. 2004). Dabei konnten im ischämischen Herzen linksventrikuläres Remodelling durch allogene MSC abgeschwächt werden (Caplan et al. 2007).

und Amado et al. 2005). MSC sind auch als Immuntoleranz-induzierend beschrieben worden, und können somit eine Graft-versus-Host-Reaktion und eine Abstoßungsreaktion abschwächen und eine Entzündungsreaktion modulieren (Aggarwal et al. 2005).

2.5.3 Skelettale Myoblasten

Skelettmyoblasten (Synonym: Satellitenzellen) stellen Vorläuferzellen von Skelettmuskelzellen dar und werden durch periphere Muskelbiopsien gewonnen. 2001 berichteten Menasche et al. erstmals über die Implantation autologer Skelettmyoblasten in ein akinetisches Infarktareal bei einem Patienten im Rahmen einer aortokoronaren Bypass-Operation. Postoperativ kam es zu einer signifikanten und persistierenden Verbesserung der regionalen und globalen Pumpfunktion. Angesichts der simultanen Bypass-Operation ist jedoch der Effekt der Zelltransplantation schwer zu beurteilen. Bei Patienten ohne gleichzeitige Revaskularisationstherapie reduzierten die per Katheter in alte Infarktnarben injizierten Myoblasten zwar die Symptome der Herzinsuffizienz, verbesserten jedoch die globale linksventrikuläre Pumpfunktion nicht (Smits et al. 2003).

Obwohl es in den vorausgegangenen umfangreichen Tierexperimenten keinen Hinweis auf eine arrhythmogene Wirkung der Skelettmyoblastentransplantation gegeben hatte, entwickelten Patienten nach Myoblasteninjektion ventrikuläre Arrhythmien, die zu Todesfällen führten (Menasche et al. 2003).

2.5.4 Weitere Vorläuferzellen

Die MNC und MSC sind die am häufigsten klinisch eingesetzten Zellen in der kardiovaskulären Medizin. Pilotstudien mit endothelialen *CD133*⁺- *Progenitor-Zellen*, die aus dem Knochenmark oder aus dem peripheren Blut nach Leukapherese gewonnen werden und zur Neoangiogenese beitragen sollen, kamen sowohl intrakoronar als auch intramyokardial zum Einsatz (Stamm et al. 2003 und Manginas 2007).

Präklinisch sind zahlreiche weitere interessante zelltherapeutische Ansätze beschrieben, die genuin regeneratives Potential besitzen. Hierbei sind vor allem die *residenten myokardialen Vorläuferzellen* zu nennen (Beltrami et al. 2003), die auch aus menschlichen Myokard-Biopsien gewonnen werden können und im Nagetier- und Schweinmodell nach In-vitro Expansion und Applikation die LVEF verbessern konnten (Smith et al. 2007). Unter diesen myokardialen Progenitorzellen sind „Side-Population“ (SP)-Zellen (Oyama et al. 2007), c-Kit⁺-Zellen (Bearzi et al. 2007) und Sca-1⁺/c-Kit⁻-Zellen beschrieben worden (Oh et al. 2003).

2.6 Applikationsart

Stammzellen werden über verschiedene Applikationstechniken intrakardial transplantiert. Grundsätzlich werden intravaskuläre und intramyokardiale Techniken unterschieden. Intravaskulär werden Injektionen von Zellen entweder in das periphere Venensystem oder intrakoronar nach Ballonokklusion in die Koronararterien oder -venen vorgenommen. Intrakardial können Stammzellen via Thorakotomie bei Herzoperationen oder über den Katheter perkutan in den Herzmuskel appliziert werden.

In der Mehrzahl der bisher veröffentlichten klinischen Studien wurden Stammzellen intrakoronar infundiert. Die intrakoronare Injektion, als einfach zu praktizierende Applikationsart, wurde in vielen Studien aufgrund ihrer leichten Handhabung und der relativ sicheren Einschwemmung der Stammzellen verwendet. Sie wurde mit Knochenmarkstammzellen in der TOPCARE-AMI Studie am Menschen mit Erfolg und ohne relevanten unerwünschten Wirkungen eingesetzt (Assmus et al. 2002; Britten et al. 2003). Dabei erreichen die Zellen das noch durchblutete Periinfarktgebiet während der ersten Passage, jedoch wird das nicht mehr perfundierte Gewebe ausgespart (Strauer et al. 2003). Zudem muss bei der intraarteriellen Gabe die Adhäsion und Transmigration der Zellen durch das Endothel gewährleistet werden, um eine möglichst große Anzahl an Zellen im Infarktgebiet zu retinieren (Wollert et al. 2005).

Eine klinische Studie zeigte schlechtere Ergebnisse bei transvenöser Applikation der Stammzellen. Eine Anreicherung transvenös transplanteder Stammzellen im Infarktareal konnte hier nicht gesehen werden (Hofmann et al. 2005). Die Zellen müssen nach dem first-pass durch die Lunge rezirkulieren, um die Infarktregion zu erreichen, wobei sie in dieser Rezirkulationsphase auch in anderen Organen aufgrund von verschiedenen Reizen und Homingfaktoren festgehalten werden können (Brehm et al. 2002).

Das eigentliche Infarktareal wird nur durch die intramuskuläre, also entweder transendokardiale oder transepikardiale Injektion (während Bypasschirurgie oder durch Injektionskatheter (z.B. NOGA Myo-Star Katheter) erreicht. Verschiedene tierexperimentelle und klinischen Studien zeigten, dass die perkutane kathetergestützte transendokardiale Injektion von autologen Zellen realisierbar, praktikabel und zuverlässig ist (Fuchs et al. 2001; Perin et al. 2003; Tse et al. 2003). Dabei wird unter Erstellung einer dreidimensionalen elektromechanischen Karte des linken Ventrikels das infarzierte Areal des Herzens lokalisiert, so dass Injektionen direkt in das Infarkt- und Periinfarktgebiet durchgeführt werden können. Der Injektionskatheter kann ventrikuläre Extrasystolen, Tachykardien und Kammerflimmern verursachen bzw. den Ventrikel traumatisieren und sogar perforieren.

Losordo et al. beschrieben bei insgesamt 114 kathetergestützten Injektionen keine Komplikationen im Sinne von Arrhythmien, systemischer Embolisierung oder schwerwiegender myokardialer Traumatisierung (Losordo et al. 2002). Die Verletzung des Herzens durch das Ausfahren der Nadel des Injektionskatheters wird im Allgemeinen als minimal beschrieben. Trotzdem kann jedoch eine zu tiefe Injektion (bei langer Nadel) die Wand perforieren. In dieser Studie haben wir die Nadellänge auf 6 mm begrenzt, um diese Komplikation zu vermeiden.

2.7 Herzrhythmusstörungen

Zu den potentiellen Komplikationen, die nach myokardialer SZ-Transplantation entstehen könnten, sind Herzrhythmusstörungen. In den meisten Zelltherapiestudien mit Knochenmarks-Stammzellen traten zwar bisher keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf, doch geben einige präklinische Studien klare Indizien dafür, dass adulte Stammzellen grundsätzlich arrhythmogenes Potenzial besitzen können. Die Heterogenität der Aktionspotenziale implantierter Zellen kann potentiell arrhythmogen wirken. Dabei sind Reentry, Ektopie und Automatizität von Bedeutung. Dies bezüglich soll diese Doktorarbeit die Frage beantworten bzw. behandeln ob elektrophysiologische Effekte nach intramyokardialer Injektion mononuklearer und mesenchymaler Knochenmark-Stammzellen (SZ) bei ischämischer Herzkrankheit entstehen. Die Untersuchung wurde an ischämischen Tiermodellen und bei Patienten mit akutem Herzinfarkt durchgeführt.

2.7.1 Die häufigsten Formen der ventrikulären Arrhythmien:

Ventrikuläre Extrasystolen

Ventrikuläre Extrasystolen (VES) nehmen ihren Ursprung im Arbeitsmyokard sowie selten im spezifischen Reizleitungssystem (Tawara-Schenkel, Purkinje-Fasern). VES führen im EKG zu verbreiterten (Dauer > 120ms) und aufgesplitterten QRS-Komplexen (Siebels und Kuck 2001). Ventrikuläre Rhythmusstörungen wurden früher anhand der Klassifikation nach Lown eingeteilt. Dies ist insofern von klinischer Bedeutung, als dass das Risiko für das Auftreten lebensbedrohlicher Arrhythmien mit zunehmendem Grade der Lown-Klassifikation ansteigt.

Tabelle 1: Klassifikation der VES nach Lown:

	Grad	
Einfache VES	0	Keine VES
	I	Monomorphe VES (<30/h)
	II	Monomorphe VES (>30/h)
Komplexe VES	IIIa	Polymorphe VES
	IIIb	Ventrikulärer Bigeminus
	IVa	Couplets (2 VES hintereinander)
	IVb	Salven (≥ 3 VES hintereinander)
	V	Früh einfallende R/T-VES (R auf TPhänomen)

Inzwischen konnten Hallstrom et al. allerdings zeigen, dass bereits das Auftreten von mehr als zehn VES pro Stunde bei KHK-Patienten mit einem deutlich erhöhten Risiko einhergeht (Hallstrom et al. 1992).

Ventrikuläre Tachykardie

Arrhythmien, die aus drei oder mehr Extrasystolen bestehen und eine Frequenz über 100 pro Minute aufweisen, werden als Tachykardien definiert. Sie treten häufiger bei (morphologisch fassbaren) Herzerkrankungen auf als in normalen Herzen. Die meisten ventrikulären Tachykardien beruhen auf Reentry-Mechanismen. Eine asymptomatische, langsame ($\leq 120/\text{min}$) ventrikuläre Tachykardie wird als idioventrikuläre Tachykardie bezeichnet. Von einer anhaltenden ventrikulären Tachykardie wird gesprochen, wenn eine Tachykardie mehr als 30 Sekunden anhält oder aus hämodynamischen Gründen eine Unterbrechung erfordert.

2.7.2 Ätiologie der ventrikulären Arrhythmien

Ventrikuläre Arrhythmien treten meist in Folge einer chronischen ischämischen Herzerkrankung (z.B. als Folgezustand eines Myokardinfarktes) auf. Seltener werden sie bei nichtischämischen Kardiomyopathien, metabolischen Störungen, Medikamentenintoxikation, angeborenen oder erworbenen Herzfehlern oder beim Syndrom der langen QT-Zeit beobachtet. In seltenen Fällen tritt eine ventrikuläre Arrhythmie bei Patienten ohne nachweisbare Herzerkrankung auf (Siebels und Kuck 2001).

2.7.3 Pathophysiologie: Mechanismen der Entstehung der ventrikulären Arrhythmien

Arrhythmien und insbesondere Kammertachykardien entstehen auf Grund von Störungen der Erregungsbildung, der Erregungsleitung oder Erregungsrückbildung (Borchardt U, Hafner 2000).

Mechanismus	Störungen
Automatie	Erregungsbildung
Getriggerte Aktivität	Erregungsrückbildung
Reentry(kreisende Erregungen)	Erregungsleitung

Bei komplexen Herzerkrankungen (z.B. nach Myokardinfarkt, bei Kardiomyopathien oder Herzinsuffizienz) liegen diese Störungen oft in Kombination vor (Haverkamp und Breithardt 2003).

Automatie

Eine Reizbildung beruht auf Abnahme der diastolischen intrazellulären Membranpotentials bis zu einem Schwellenwert, an dem ein Aktionspotential ausgelöst wird. Man unterscheidet gesteigerte und abnorme Automatie.

- ***Gesteigerte Automatie:***

Hierbei handelt es sich um eine Steigerung des physiologischen Prozesses der diastolischen Depolarisation, vorwiegend im Sinusknoten sowie in Purkinje-Fasern. Dieser Prozess wird durch den Einfluss von Katecholaminen oder erhöhter Temperatur beschleunigt und durch Azetylcholin verlangsamt. Daran beteiligt sind die normalen Ionenmechanismen der Impulsbildung und der Azetylcholin-sensitive Kaliumkanal ($I_{K(Ach)}$, in ventrikulärem Myokard nicht vorhanden). Klinische Beispiele sind eine inadäquate Sinustachykardie oder ein akzelerierter idioventrikulärer Rhythmus (Steinbeck et al. 2000).

- ***Abnorme Automatie:***

Eine abnorme Automatie ist eine Verminderung des Ruhemembranpotential auf -40 bis -50mV durch Schädigung nicht reizbildender Myokardfasern, so dass diastolische Depolarisation und damit Aktionspotentiale erzeugt werden können.

Hierbei kommt es in Arealen, die üblicherweise nicht zur Impulsbildung befähigt sind, zum Auftreten fortgeleitet elektrischer Aktivität. Über eine (partielle) Depolarisation des Membranpotentials kann in den meisten Myokardzellen eine repetitive elektrische Aktivität erzeugt werden.

Eine abnorme Automatie kann sowohl im atrialen als auch im ventrikulären Arbeitstmyokard auftreten. Häufig tritt eine abnorme Automatie bei Ischämie auf, wenn das normale Ruhemembranpotential in Purkinjezellen oder im Arbeitstmyokard nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Typischerweise nimmt das Membranpotential auf Werte um -50 mV ab. Ohne dass eine vollständige Repolarisation der Zellmembran erreicht wird, erfolgt bereits die nächste Depolarisation, in erster Linie getragen durch einen Kalziumeinwärtsstrom (Steinbeck et al.).

Getriggerte Aktivität:

Getriggerte Aktivität beruht auf Nachpotentialen in der späten Repolarisationsphase oder nach vollständiger Repolarisation eines obligat vorangegangenen Aktionspotentials. Unter bestimmten Umständen können diese Nachpotentiale die Schwelle zu einer fortgeleiteten Erregung erreichen und somit eine oder eine ganze Serie von hochfrequenten Zusatzaktionen auslösen. Der von Cranefield, Wit u. Hoffman geprägte Begriff „getriggerte Aktivität“ weist darauf hin, dass das Nachpotential nur die Folge, d.h. getriggert ist durch das vorangegangene Aktionspotential. Mit abnehmendem Kopplungsintervall einer vorzeitigen Stimulation kommt es zu einer Größenzunahme des folgenden Nachpotentials, das in der mittleren Registrierung die Schwelle zu einer fortgeleiteten Erregung erreicht und eine anhaltende Tachykardie auslöst. Ebenso wie diese getriggerte Aktivität durch vorzeitige Stimulation ausgelöst wird, so kann sie auch durch vorzeitige Stimulation unterbrochen werden (Steinbeck et al. 2000).

Reentry-Mechanismus:

Der Reentry-Mechanismus ist der häufigste Mechanismus einer ventrikulären Arrhythmie und kann bei allen Formen einer strukturellen Herzerkrankung vorkommen. Ein Reentry-Kreislauf bedeutet „Wiedereintritt“ einer Erregungsfront der durch die Einbeziehung von Zonen mit unterschiedlichen Leitungskapazitäten in Kreiserregung ermöglicht wird.

Grundlage für die Entstehung kreisender Erregung ist das Vorhandensein eines Myokardareals, das

1. im Vergleich zu anderen Myokardbereichen eine langsamere Erregungsleitung aufweist,
2. das Auftreten unidirektionaler Erregung ermöglicht und
3. durch Wiederholung nach ursprünglichem Block einen Wiedereintritt der Erregung erlaubt (Haverkamp und Breithardt 2003).

Besonders Randbezirke einer Narbe nach Myokardinfarkt weisen sehr heterogene Leitungseigenschaften auf. Diese Heterogenitäten treten auch transversal von endo- nach epikardial auf und bedingen unidirektionale Leitungsblockierungen, die als fixes anatomisches Substrat das Auftreten von Reentry-Arrhythmien begünstigen (im Gegensatz zum funktionellen Reentry, der ohne anatomisch fixiertes Hindernis kreisen kann).

Neben Infarktnarben können auch chirurgische Narben, fibrotische Veränderungen bei DCM, ARVC oder anderen Herzerkrankungen das ventrikuläre Substrat für Reentry –Arrhythmien darstellen (Erdmann et al. 2000).

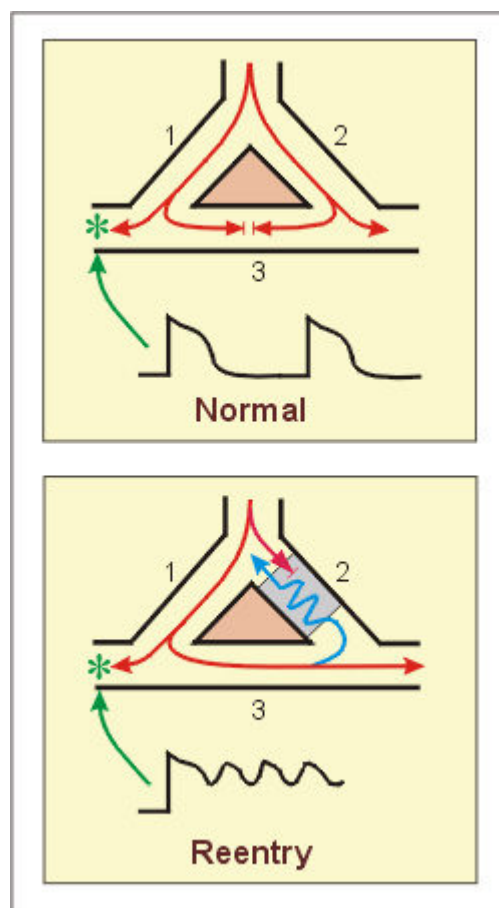


Abb. 2: Das Reentry-Mechanismus (Richard und Klabunde 2011)

2.7.4 Herzrhythmusstörung nach Implatation embryonaler Stammzellen:

Die Entwicklung von Arrhythmien nach einer Transplantation muriner ES in infarziertes Myokard ist bislang nicht beschrieben worden (Hodgson et al.2004). Befürchtungen hinsichtlich des arrhythmogenen Potential basieren lediglich auf einer In-vitro-Untersuchung an murinen ES (Zhang et al.2002). Über die Verwendung humaner ES zur Therapie des Myokardinfarkts liegen bislang lediglich eine tierexperimentelle Studie vor (Kofidis et al.2006), in der die funktionelle Integration der applizierten Zellen sowie das Auftreten von Arrhythmien nicht untersucht wurden.

Die ES wurden sogar zur Behandlung der Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Zur Zellersatztherapie bradykarder Arrhythmien mittels humaner ES liegen zwei tierexperimentelle Studien vor (Kehat et al. 2004; Xue et al 2005). Durch eine In-vivo-Implantation humaner ES in die Ventrikelwand adulter Herzen des Schweins bzw. Meerschweinchens mit komplettem AV-Block konnte in beiden Studien ein vom Implantationsort ausgehender Ersatzrhythmus erzeugt werden. Ob humane ES unter den von diesem experimentellen Ansatz stark abweichenden Bedingungen einer Applikation in infarziertes Gewebe, bei der die atrioventrikuläre Überleitung intakt wäre und die ES einer Fremderregung durch das umliegende Ventrikelmyokard unterlägen, ebenfalls ektope Erregungen hervorrufen könnten, kann anhand dieser Studien nicht beurteilt werden. Außerdem konnte nicht geklärt werden, ob die transplantierten humanen ES eine elektrische Kopplung mit den adulten Kardiomyozyten des Ventrikelmyokards eingingen und selbst einen neuen Schrittmacher bildeten, oder ob die angrenzenden adulten Kardiomyozyten, z.B. durch parakrine Effekte, zur Ausübung der Schrittmacherfunktion angeregt wurden.

2.7.5 Herzrhythmusstörung nach Implatation adulter Stammzellen:

Die Ergebnisse der In-vitro-Modelle von Beeres et al. und Chang et al. zeigten, dass die Leitgeschwindigkeit durch die MSC deutlich reduziert wird. Dies könnte auf ein proarrhythmisches Potential der MSC hindeuten (Beeres et al. 2005, Chang et al. 2006).

Chen et al. haben in einem Kaninchen-Modell beschrieben, dass MSC lokale Aktivierungszeit verlängern (Chen et al. 2006).

Darüber hinaus wurde in einem Großtiermodell gezeigt, dass die MSC die elektrophysiologischen Zelleigenschaften ändern (Price et al. 2006).

Die gefährlichsten Herzrhythmusstörungen sind nach der Implantation Skelettmuskelzellen entstanden. Menasché et al. (2001) implantierten bei einem Patienten mit schwerer ischämischer Herzinsuffizienz in einer Bypassoperation Skelettmyoblasten in mehreren vernarbten Regionen.

Fünf Monate später konnte eine Zunahme der Vitalität und der Kontraktilität in den vernarbten Gebieten beobachtet werden (Menasche et al. 2001). Daraufhin wurde diese Methode bei zehn weiteren Patienten nach einem Myokardinfarkt durchgeführt, welche eine Ejektionsfraktion von unter 35% aufwiesen. Auch diesmal konnte nach 11 Monaten eine Verbesserung der Kontraktilität, der Ejektionsfraktion und der Symptome der Herzinsuffizienz beobachtet werden. Aufgrund von eingetretenen ventrikulären Tachykardien musste bei vier Patienten ein automatischer Defibrillator (ICD) implantiert werden (Menasche et al. 2003).

Mehrere darauf folgende kleine Studien zur Transplantation von Myoblasten bestätigten das gehäufte Auftreten von Arrhythmien (Wollert u. Drexler 2005). Befürworter der Zelltherapie mit Myoblasten verweisen darauf, dass alle bislang durchgeführten kleinen Studien aufgrund des Studiendesigns nicht klar belegen konnten, dass die aufgetretenen Arrhythmien durch die Transplantation der Myoblasten verursacht wurden und nicht durch die vorhandene Grunderkrankung der Patienten (Menasche 2005). Die weltweit größte klinische Phase II Studie mit dem Akronym MAGIC („*Myoblast Autologous Graft in Ischemic Cardiomyopathy*“) zeigte keine Verbesserung der Herzfunktion bei Infarktpatienten. Vielmehr zeigte sich in der Zellimplantationsgruppe eine Häufung ventrikulärer Arrhythmien (Smith et al. 2008). Interessanterweise konnte in einer neueren Studie im Tiermodell gezeigt werden, dass genetisch modifizierte Connexin-43 (Cx43) über exprimierende Muskelzellen elektromechanisch mit dem Myokard koppeln. Das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien nach Transplantation dieser Zellen konnte somit verhindert werden (Roell et al. 2007).

In den vor Beginn klinischer Studien durchgeführten tierexperimentellen Studien waren keine lebensgefährlichen Arrhythmien beobachtet worden (Smits 2004). Eine funktionelle Integration von Myoblasten in das Empfängermyokard findet nicht statt.

Intrazelluläre Ableitung in infarzierten Rattenventrikeln nach In-vivo-Transplantation von Myoblasten bestätigten die fehlende Kopplung zwischen Myoblasten und Empfängermyokard (Leobon et al. 2003). Da Skelettmuskelzellen, also die physiologischen „Nachkommen“ der Myoblasten, keine Gap junctions besitzen und eine Erregungsausbreitung zwischen Skelettmuskelfasern nicht stattfindet, sondern jede Muskelfaser separat neuronal erregt wird, überraschen diese Ergebnisse nicht.

Insgesamt haben nur wenige experimentelle und klinische Studien gezeigt dass die Implantation von Stammzellen ins Myokard elektrophysiologische Veränderungen verursachen kann. Aber das Auftreten von tödlichen ventrikulären Tachykardien in den klinischen Studien nach der Injektion von Skelettmyoblasten in das chronisch ischämische Myokard haben Besorgnis und Bedenken über die Sicherheit von Stammzellimplantation verursacht.

Daher ist es auch sinnvoll, die elektrophysiologischen Veränderungen nach der Injektion mononuklearer und mesenchymaler Stammzellen bei ischämischer Herzkrankheit zu untersuchen, um weitere Komplikationen zu vermeiden.

2.8 Elektromechanisches Mapping

Für die Untersuchung möglicher Herzrhythmusstörungen ist das elektromechanische Mapping (EMM) und das Langzeit-Elektrokardiogramm (LZ-EKG) verwendet worden.

Das nichtfluoroskopische endokardiale perkutane elektromechanische Mappingsystem (EMM), durch welches elektrische, anatomische und mechanische Informationen des Endokards in Echtzeit als dreidimensionale Karten geliefert werden, wurde in klinischen und tierexperimentellen Studien ausführlich untersucht. Zuerst wies Gepstein et al. auf die Genauigkeit der örtlichen Lagebestimmung des Katheters sowie der volumetrischen Berechnungen hin (Gepstein et al. 1997). Weitere Studien untersuchten mittels elektromechanischem Mapping die elektrische und mechanische Aktivität des Herzens sowie den therapeutischen Nutzen bei verschiedenen Arrhythmien (Gepstein et al. 1998; Natale et al. 1998). Kornowski et al. verglichen erstmals endokardiale Elektrogrammamplituden vor und nach koronarer Okklusion bei Hunden und zeigten, dass sich die uni- und bipolaren Elektrogramm-Amplituden um die Hälfte verringerten. Ebenso reduzierte sich die lokale endokardiale Verkürzung nach 24 Stunden um 88% (Kornowski et al. 1998). Ferner wurde festgestellt, dass die Größe der elektromechanisch ermittelten Infarktareale mit den histologisch, pathologisch und echokardiographisch ermittelten Größen übereinstimmen und dass sogar die Transmuralität eines Infarktes bestimmt werden kann (Lessick et al. 2000; Wolf et al. 2001). Das elektromechanische Mapping (EEM) hat sich als eine sensitive Technik erwiesen, um mechanische Veränderungen des linken Ventrikels darzustellen (Koch et al. 2001; Lessick et al. 2002; Jorgensen et al. 2005). Andere Studien verglichen das NOGA-System mit nuklear-medizinischen bildgebenden metabolischen Verfahren, wie z.B. PET oder SPECT, und wiesen auf den Stellenwert des elektromechanischen Mappings in der kardiologischen Vitalitätsdiagnostik hin (Koch et al. 2000; Koch et al. 2001). Die zahlreichen Studien, welche sich mit dem EEM beschäftigt haben, deuten auf die therapeutischen Möglichkeiten hin, die das Mappingsystem insbesondere in Kombination mit der kathetergestützten transendokardialen Injektion hat. Hierbei können Substanzen direkt in das durch elektrische, anatomische und mechanische Informationen charakterisierte Gewebe appliziert werden (Smits et al. 2002; Kawamoto et al. 2003). Zu erwähnen ist, dass das endokardiale Mappingsystem hohes manuelles Geschick erfordert. Das Trauma, das bei der Injektion entsteht, wird im Allgemeinen

als nicht relevant und die Methode der transendokardialen Applikation als sicher und unbedenklich beschrieben (Fuchs et al. 2006). Denkbar ist, dass die injizierte Flüssigkeit bei zu großem Injektionsvolumen durch osmotische Effekte ein Ödem auslösen könnte. Ebenso kann eine zu große Injektionstiefe durch eine lange Nadel zu perikardialen Injektionen führen mit der Folge eines Perikardergusses oder einer Perikarditis.

Für die Anwendung des NOGA-Systems benötigt man speziell geschultes Untersuchungspersonal, um zuverlässige Werte zu erhalten. Mit Erfahrung des Untersuchers verkürzt sich die Untersuchungszeit auf ein moderates Maß, anfangs ist allerdings mit wesentlich längeren Zeiten zu rechnen. Hinzu kommen hohe Kosten für die Geräte sowie die Ausbildung des Personals (Ben-Haim et al. 1996).

3 Methode

3.1.1 Das Schwein als Tiermodell

Die Publikationen mit dem Schwein als Tiermodell in der kardiovaskulären Forschung nehmen immer weiter zu (Hughes 1986). Mensch und Schwein haben eine fast identische Koronaranatomie, sowie ähnliche Verhältnisse bei der Kollateralenversorgung des Herzens (Schaper et al. 1967; White et al. 1986). Die Versorgung des menschlichen Myokards über die Koronararterien erfolgt mit ca. 5% des Herzminutenvolumens (Böcker et al. 2001), die des Schweins mit etwa 5 bis 10% (Scheunert und Trautmann 1987).

Die Herzphysiologie von Mensch und Schwein sind ebenfalls ähnlich: Der Mensch hat eine Ruhefrequenz von ungefähr 75 Schlägen/min, das Schwein eine von ungefähr 80 Schlägen/min (Engelhardt und Breves 2000). Der mittlere arterielle Blutdruck des Schweins liegt bei 70 bis 90 mm Hg (Scheunert und Trautmann 1987). Beim Menschen liegt er zwischen 75 und 95 mm Hg (Schmidt und Thews 2000). Weitere Vorteile des Schweinmodells ist die gute Verfügbarkeit der Versuchstiere, sowie die im Vergleich zu anderen Spezies niedrigen Anschaffungs- und Haltungskosten.

Fallavollita et al. (2001) halten Schweine mit implantierten Ameroid Konstriktoren ideal für pharmakologische und mechanische Interventionen im hibernierendem Myokard. Eine graduelle koronare Okklusion mit Hilfe eines Ameroid Konstriktors um den Ramus circumflexus der linken Koronararterie ruft nur eine geringgradige Kollateralenentwicklung hervor (Roth et al. 1987). Von Vorteil ist weiter, dass sich Schweine relativ schnell von intrathorakalen Eingriffen erholen (Horneffer et al. 1986). Nachteil dieser Spezies ist die Anfälligkeit, spontan oder induziert Kammerflimmern zu entwickeln (Verdouw et al. 1983).

3.1.2 Koronarangiographie

Mit der Koronarangiographie können die Herzkranzgefäße und deren Kollateralen bildlich dargestellt werden. Die Stenosen und andere Koronaranomalien können sicher, detailliert und reproduzierbar festgestellt werden (Höfling 1991). Im klinischen Alltag wird diese Untersuchung im Zusammenhang mit den kardiologischen Funktionsprüfungen und der klinischen Symptomatik zur Entscheidung über den einzuschlagenden Therapieweg herangezogen.

Im Rahmen des experimentellen Teils dieser Studie wird die Koronarangiographie für die Dokumentation des Verschlusses des Ameroid-Konstriktors am Schweinmodell genutzt. Im

klinischen Teil dieser Studie wurden die Patienten nach dem Herzinfarkt koronarangiographiert und mit PTCA und Stentimplantation versorgt.

3.1.3 Ameroid Konstriktor zur Simulation einer Koronarstenose

Ameroid Konstriktoren bestehen aus Kasein und einem Stahlring, der dieses hygroskopische Material umgibt (Abb. 3).



Abb. 3: Ameroid Konstriktor (Aufnahme aus vorliegender Studie)

Bei Implantation des Konstriktors um eine Arterie kommt es zu Wasseraufnahme durch das Kasein, so dass der Konstriktor an- und zuschwillt. (Elzinga 1969). Dieser Vorgang führt dazu, dass das Gefäß innerhalb von 14 bis 30 Tagen (selten länger) zunächst graduell und schließlich vollständig verschlossen wird (Elzinga 1969). Die dadurch hervorgerufene Ischämie kann bis zu 16 Wochen andauern (Bloor et al. 1992). Üblicherweise wird im Schweinemodell eher eine chronische Ischämie als ein Infarkt hervorgerufen (Kornowski et al. 2000). Der graduelle Verschluss der Koronararterien durch einen Ameroid-Konstriktor induziert im Versorgungsgebiet der Arterie hibernierendes Myokard, besonders in Tieren mit reduzierter Kollateralenbildung (Bolukoglu et al. 1992), (Abb. 4). Durch den ischämischen Zustand wird die Ausbildung von Kollateralen induziert (Bloor et al. 1992).

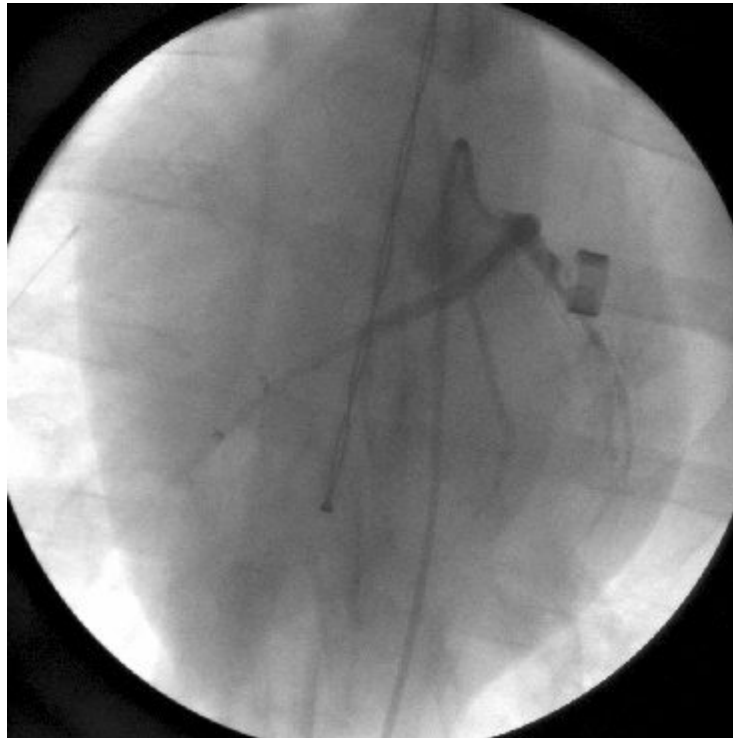


Abb. 4: Koronarangiographie der linken Koronararterie, LAO 30°-Projektion. Die LCX ist durch den Konstriktor verschlossen. Von antegrad ist eine Kollateralisierung von Grad 1 sichtbar.

3.1.4 Drei-dimensionales elektromechanisches Mapping

Unter Anwendung von zwei Miniaturmagnetsensoren an der Katheterspitze und drei extrakorporalen Magnetfeldgeneratoren kann die aktuelle Position und Orientierung des Katheters im Raum bestimmt werden. Die emittierten Magnetfelder besitzen bekannte räumliche und zeitliche Merkmale, die jeden einzeln abgetasteten Punkt in einer drei-dimensionalen Karte durch ihre Koordinaten beschreiben kann. Aus diesen Punkten wird die endokardiale Oberfläche des linken Ventrikels erstellt und nach Berechnung in Echtzeit graphisch drei-dimensional virtuell rekonstruiert (Ben-Haim et al. 1996 und Gepstein et al. 1997). Neben dem lokalen endokardialen Elektrokardiogramm werden uni (UV)- und bipolare (BV) Potenziale des linken Ventrikels aufgezeichnet, die farblich kodiert dargestellt werden. Regionen mit niedrigem Potential oder reduzierter Kontraktilität als Zeichen myokardialer Schädigung können so präzise detektiert werden. Die Lokalisation der Schädigung kann bis auf wenige Millimeter genau eingegrenzt werden (Ben-Haim et al. 1996).

Aufbau des Systems und Funktion seiner Komponenten

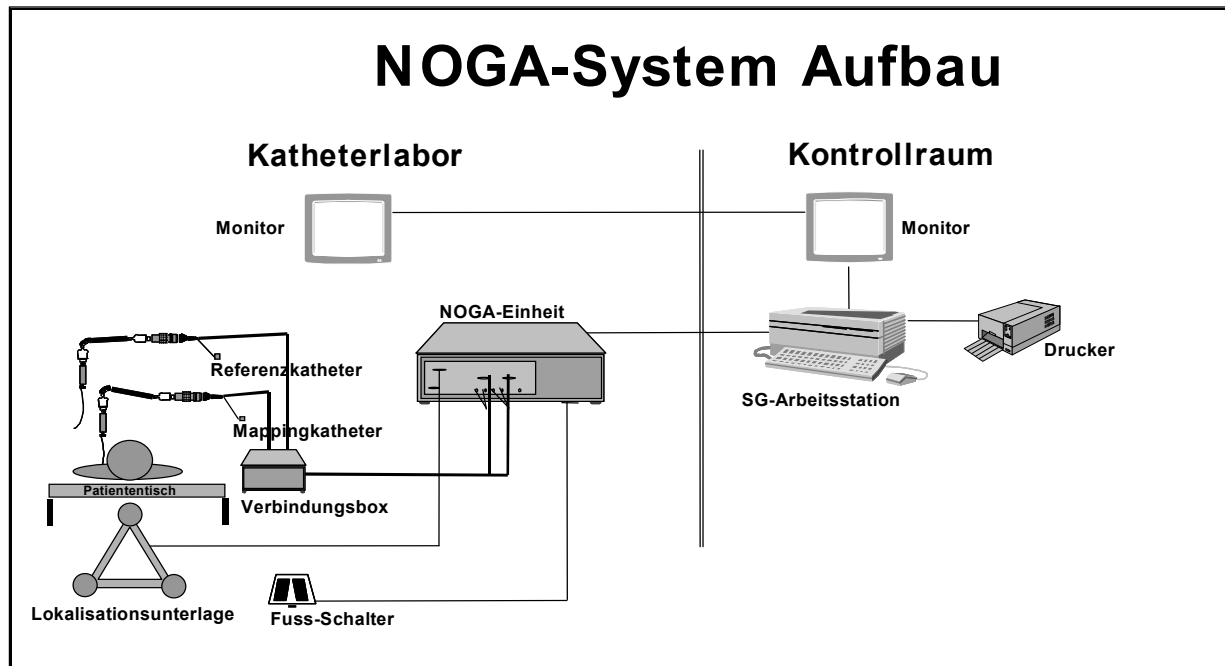


Abb. 5: Aufbau des NOGA-Systems (aus NOGA-Trainingsmaterials 2003, Biosense Webster Inc., Diamond Bar, Kalifornien, USA)

Das System für das elektromechanische Mapping (NOGA-Mapping) besteht aus folgenden Komponenten (Abb. 5):

Mappingkatheter:

Am distalen Ende des Katheters befindet sich eine Spitzenelektrode. Proximal von ihr sind ein Lokalisationssensor sowie eine weitere, ringförmige Elektrode in den Katheterschaft integriert. Die Signale werden in der NOGA Unit verarbeitet. Die Spitze des Katheters lässt sich durch Vorschieben des Daumenknaufts biegen (Abb. 6).

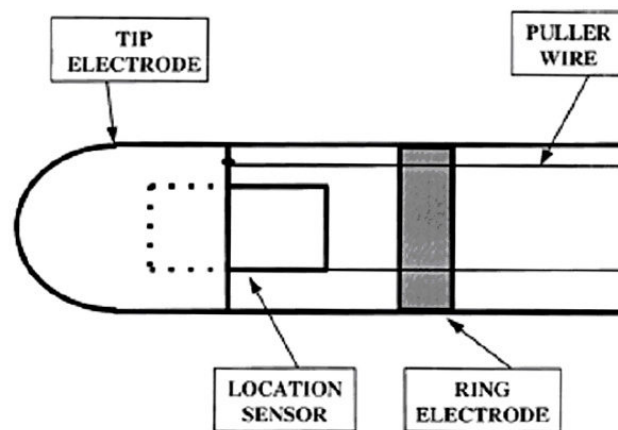


Abb. 6: Spitzenbereich des Mappingkatheters (nach Gepstein 1997)

Reference Patch:

Dieser Referenzkatheter wird unter Röntgenkontrolle unterhalb der Herzsilhouette auf den Rücken geklebt und ist wie der Mappingkatheter mit einem kleinen Spitzensensor ausgestattet (Abb. 7). Es ermöglicht die Korrektur der Katheterlokalisierung, Bewegungsartefakte beispielsweise durch die Atmung können korrigiert werden, da das Reference Patch diesen Bewegungen entsprechend folgt und so eine Berechnung der Abweichung von der eigentlichen Lokalisation des Katheters möglich macht.



Abb. 7: Reference Patch (NOGA-Trainingsmaterial, Fa. Cordis)

Junction Box:

Der Mappingkatheter und das Reference Patch werden über die Junction Box mit dem NOGA-Unit verbunden.

Location Pad:

Das Location Pad wird in Höhe des Herzens unter dem OP-Tisch angebracht. Es besteht aus drei Spulen (D1, D2, D3) mit 1, 2 bzw. 3 kHz, die jeweils ein schwaches, unterschiedlich großes magnetisches Energiefeld von 5×10^{-6} bis 5×10^{-5} Tesla emittieren (Abb. 8).

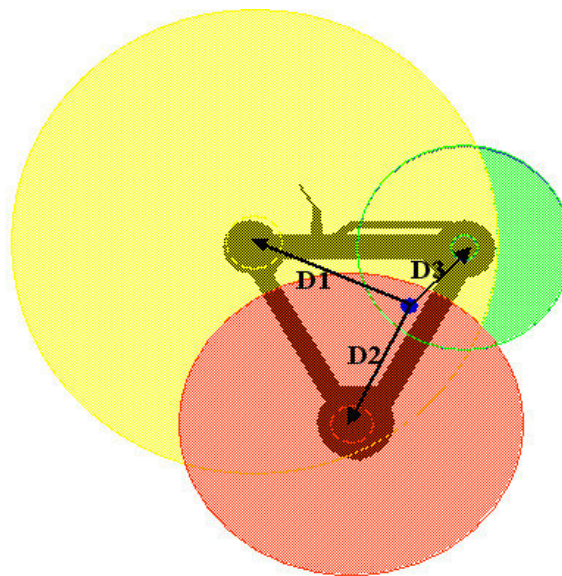


Abb. 8: Elektromagnetische Felder des Location Pad (NOGA-Trainingsmaterial, Fa. Cordis)

Der Lokalisationssensor an der Katheterspitze mißt die Stärke der magnetischen Felde und somit die Distanz zu jeder Spule (Abb. 9). Hierdurch wird die Lokalisation der Katheterspitze bestimmt.

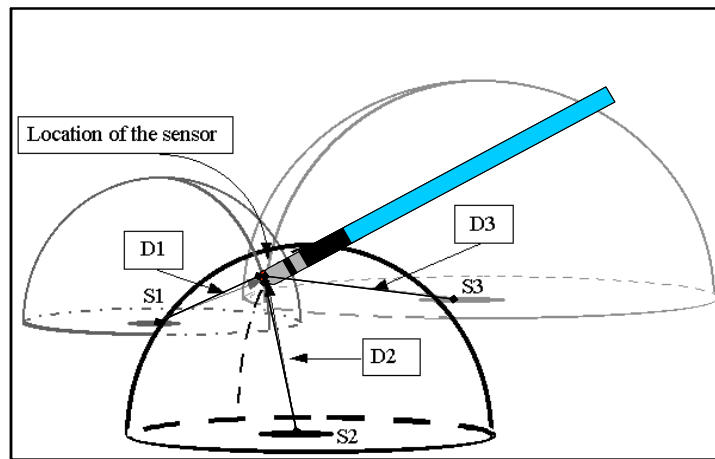


Abb. 9: Lokalisation des Katheters (NOGA-Trainingsmaterial, Fa. Cordis)

NOGA Unit:

Die vom Katheter aufgenommenen Signale werden hier gespeichert, verarbeitet, und mit ihnen Berechnungen für die Erstellung von Maps durchgeführt.

Workstation:

Mit der Workstation erfolgt die Darstellung eines dreidimensionalen Bildes (Map) und der Position des Katheters im Ventrikel über zwei Monitore. Am Monitor verfolgt man die Mapping-Prozeduren mit und eliminiert gegebenenfalls fehlerhafte Signalregistrierungen.

Die Kartierungsprozedur (Mapping)

Der Mappingkatheter wird perkutan durch die Schleuse in die Arteria femoralis eingeführt, unter röntgenologischer Kontrolle in der Aorta herzwärts und mit abgewinkelter Spitze um den Aortenbogen und durch die Aortenklappe bis zur Apex des linken Ventrikels vorgeschoben. Dort relaxiert man die Katheterspitze und zieht sie gleichzeitig zurück, bis sie in gestreckter Form in die Herzspitze fällt. Unter Röntgenkontrolle wird hier der erste von drei initialen Punkten vom NOGA-System registriert. Um den zweiten initialen Punkt aufzusuchen, biegt man die Katheterspitze wieder und rotiert den Katheter während des Zurückziehens im Uhrzeigersinn. Im Bereich der Austreibungsbahn unterhalb der Aortenklappe kann nun der zweite initiale Punkt vom Computer gespeichert werden. Der Katheter wird gegen den Uhrzeigersinn gedreht und in der Einstromungsbahn unterhalb des Mitral-Anulus der dritte Initialpunkt definiert. Damit sind die Grenzen der linken Herzkammer markiert. Für das Hinzufügen weiterer Punkte benötigt man keine röntgenologische Kontrolle mehr, da ein Abbild des Katheters und ein Strichmännchen auf dem Computerbildschirm eine ausreichende Orientierung gestatten. Um den linken Ventrikel möglichst gleichmäßig zu erfassen, wird der Mappingkatheter zur

Herzspitze geführt und von dort Richtung Herzbasis zurückgezogen und dabei in kleinen Abständen Signale gemessen. Danach kehrt man wieder zur Apex zurück, rotiert den Katheter ein kleines Stück und untersucht wiederum entlang der Ventrikelwand wiederum in Richtung Herzbasis.

Die Registrierungen der elektrischen und mechanischen Funktionen (lokales endokardiales EKG und Katheterspitzenlokalisierung) sind an einen bestimmten Zeitpunkt des Herzzyklus, die R-Zacke, also an das Ende der Diastole gebunden. Die Punkte werden nur in das Map aufgenommen, wenn die Katheterspitze stabil am Endokard liegt und dies aus der Stabilität der lokalen Aktivierungszeit, Lokalisationsstabilität, Zykluslängenstabilität (Abb. 10), Schleifenstabilität (Abb. 10) und Übereinstimmung des endokardialen mit dem Körperoberflächen-EKG (Abb. 11) ableitbar ist. Sind die Kriterien erfüllt, so bestätigt man den Punkt per Fußpedal und damit die Integration in das Map.

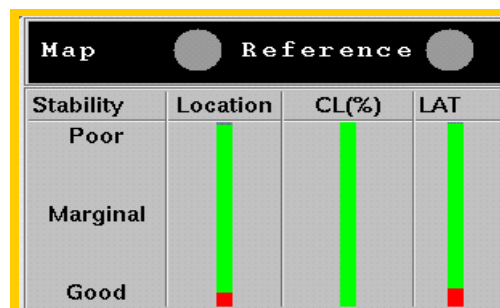


Abb. 10: Stabilitätskriterien Lokalisation, Zykluslänge und lokale Aktivierungszeit, Ausschnitt des Monitorbildes (NOGA-Trainingsmaterial, Fa. Cordis). Die Balken sollen möglichst grün sein, d.h. den Bereich guter Stabilität anzeigen

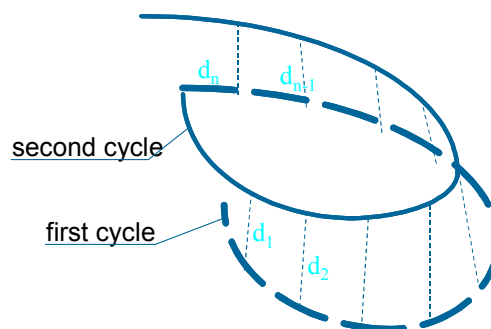


Abb. 11: Stabilitätskriterium Schleifenstabilität (NOGA-Trainingsmaterial, Fa. Cordis)

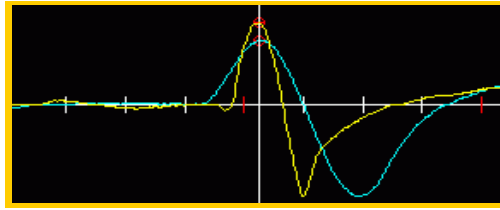


Abb. 12: Stabilitätskriterium EKG-Übereinstimmung, Ausschnitt des Monitorbildes (NOGA-Trainingsmaterial, Fa. Cordis)

Mit Hilfe der registrierten Signale werden von der NOGA-Unit dreidimensionale Maps erstellt: Das Unipolar Voltage (UV) Map und das Linear Local Shortening (LLS) Map. Auch globale mechanische Funktionen wie das enddiastolische Volumen, das endsystolische Volumen und die Ejektionsfraktion berechnet das NOGA-System automatisch.

Alle Maps sind mit einer regenbogenfarbenen Skala kodiert: Von Rot für die niedrigsten Werte über Grün und Gelb zu Violett mit den höchsten Werten.

Auswertung und Analyse der elektrischen und mechanischen Daten

Das NOGA-System bietet verschiedene Möglichkeiten die gesammelten Daten als 3D-Bild darzustellen. Alle Kartenarten sind farbcodiert, wobei die Farben je nach elektrischer bzw. mechanischer Aktivität von rot (minimale Aktivität) bis hin zu violett (maximale Aktivität) variieren.

- **QRS (QRS-Dauer und Fragmentation)**

Zur Beurteilung der lokalen elektrischen Aktivierung in den mittels EMM aufgezeichneten Elektrogrammen wurde die bipolare Amplitude als „peak-to-peak“-Differenz des Elektrogramms gemessen. Die lokale Elektrogrammdauer wurde in ms gemessen und die Amplituden in mV.

Wir haben zwei verschiedene Methoden für die Beurteilung der Fragmentierung verwendet. Zuerst wurde der Grad der Fragmentierung quantitativ durch die Anzahl der positiven Elektrogramm-Ablenkungen, die sich von der T-Welle unterscheiden. Zweitens haben wir den Fragmentation-Index-Algorithmus, der von der NOGA-Software zur Verfügung gestellt wurde. Der FI ist unabhängig von der Signal-Amplitude und ist lediglich abhängig von der Anzahl und der relativen Amplitude der Fragmente. Für ein unfragmentiertes Signal, $FI = 1$, die minimal möglichen Werte. Ein $FI > 1$ entspricht einem fragmentierten Signal. Für zwei gleiche Fragmente, wird der Wert 2, usw. Ein Beispiel für FI-Karten ist in Abbildung 20. Cut-off-Werte für normale Elektrogramme wurden $<40ms$

für die Dauer, $> 1.5\text{mV}$ für BV, $> 6.9\text{mV}$ für UV, Zur Unterscheidung zwischen dem EKG eines normalen Gewebes und dem EKG eines ischämischen Gewebes siehe die Abb. 13.

Abb. 13a zeigt normale Elektrogramm Morphologie aus einem nicht ischämischen Myokardgewebe.

Abb. 13b-c zeigt zwei Beispiele für Fragmentierung Grad drei mit jeweils unterschiedlichen Amplituden und bipolare Voltage bei Elektrogrammen in einem ischämischen Gewebe.

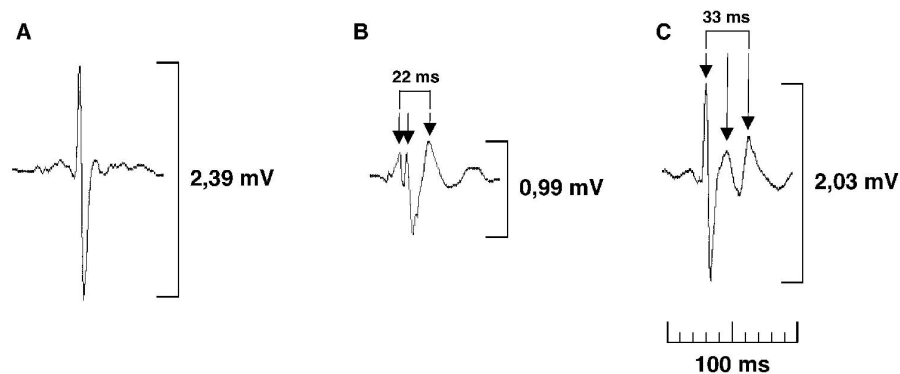


Abb. 13: Messung der Dauer des Elektrogramms bzw. der Amplitude (a) und der Fragmentierung (b). Die Messeinheiten bei Verstärkung von 1mV/cm bei 200mm/s .

- **Unipolar Voltage (UV) und bipolare Voltage (BV)**

Neben dem lokalen endokardialen Elektrokardiogramm werden uni (UV)- und bipolare (BV) Potenziale des linken Ventrikels aufgezeichnet, die farblich kodiert dargestellt werden. Regionen mit niedrigem Potential oder reduzierter Kontraktilität als Zeichen myokardialer Schädigung können so präzise detektiert werden. Die Lokalisation der Schädigung kann bis auf wenige Millimeter genau eingegrenzt werden (Ben-Haim et al. 1996).

Aufgrund der BV und der UV können sowohl Rückschlüsse auf den Grad der Fibrosierung in dem entsprechenden Myokardareal (basierend auf histo-morphologischen Untersuchungen) als auch auf seine funktionelle Aktivität (basierend auf Radionuklid-Untersuchungen am Menschen) geschlossen werden. Es gelten folgende Grenzwerte (Gepstein et al. 1997, Bötter et al. 2001, Marchlinski et al. 2000, und Keck et al. und Wiggers et al. 2003).

	Unipolare Voltage (UV)	Bipolare Voltage (BV)
Intaktes Myokard	>7mV	>1,5mV
Geschädigtes Myokard	5-7mV	0,5-1,5mV
Narbe	<5mV	0,1-0,5mV

Es besteht aufgrund der Fernfeld-Wahrnehmung eine interindividuelle Variabilität insbesondere bei den unipolaren Potenzialen, die durch Richtungsabhängigkeit der Erregungsausbreitung verursacht sind. Bötter et al. empfehlen aufgrund höherer Spezifität und Sensitivität eine Normierung der unipolaren Signale auf die Signalstärke gesunder Areale (Bötter et al. 2001).

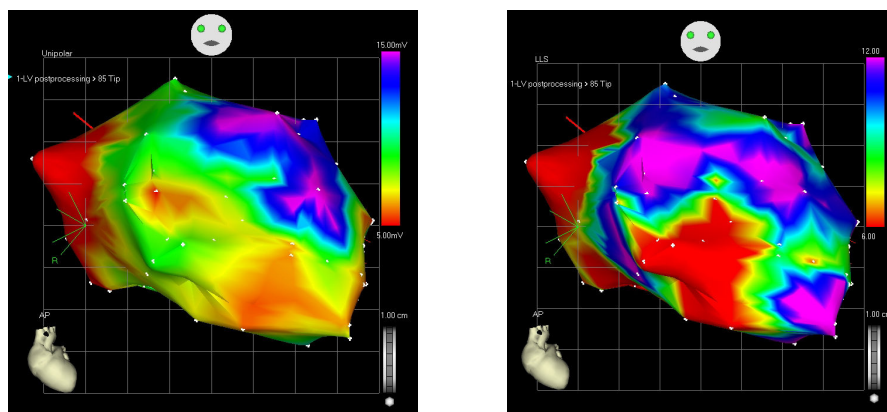


Abb. 14:

NOGA-Map eines linken Ventrikels nach stattgehabtem Myokardinfarkt (links). Die Farbkodierung (Skala rechts oben) zeigt gesunde Myokardareale blauviolett (UV bis 15mV) an. Stark geschädigtes Myokard (UV<6mV) ist rot dargestellt, die geschädigten Regionen entsprechend der UV gelb, grün und blau. Analog sind im Map der Myokardbewegung (LLS, Local Linear Shortening) rechts akinetische Areale (LLS<6%) rot koloriert (rechts).

- **Linear Local Shortening (LLS)**

Bei der Anwendung des elektromechanischen NOGA™-Mapping wird zusätzlich die Katheterbewegung an der endokardialen Oberfläche während der Systole und Diastole berechnet (Ben-Haim et al. 1996, Gepstein et al. 1997). Die Abstandsverkürzung zwischen den endsystolischen Mapping-Punkten wird als „local linear shortening“ (LLS) berechnet und in Prozent ausgedrückt. LLS wird als Algorithmus als abstandsgewichtete Mittelung der Verkürzung zwischen einem Indexpunkt und den benachbarten Mapping-Punkten berechnet (Kornowski et al. 2001).

Die Aufzeichnung der Amplituden, des lokalen Elektrokardiogramms sowie der Wandbewegung erfordert eine Lagestabilität des Mapping-Katheters am Endokard, die durch verschiedene Kriterien während der Untersuchung geprüft wird:

Positionsstabilität (Abweichung der enddiastolischen Position von $>5\text{mm}$ bei zwei aufeinander folgenden Schlägen), Bewegungsschleifenstabilität (Abweichung des mittleren Abstandes zweier Punkte innerhalb aufeinander folgender Bewegungsschleifen $>5\text{mm}$), Abweichung der Zykluslänge $>10\%$ von der medianen Zykluslänge; Abweichung der Morphologie des endokardialen Elektrogramms zwischen zwei aufeinander folgenden Schlägen, Abweichung in der lokalen Aktivierungszeit (LAT) $>5\text{ms}$ zwischen zwei aufeinander folgenden Schlägen, Aufzeichnungen bei Extrasystolie oder nach Extrasystolie.

Als Referenzwerte verwendet man die Werte von Champagne et al. (2003). Hiernach zeichnet sich ischämisches Myokard durch LLS-Werte von $6,4 \pm 5,4\%$ aus. Nicht-ischämisches Gewebe zeigt $17,9 \pm 3,0\%$.

3.1.5 Langzeit-EKG (LZ-EKG)

Das Langzeit-EKG ist ein häufig verwendetes nicht-invasives kardiologisch diagnostisches Untersuchungsverfahren. Zum Einsatz kommen kontinuierlich und diskontinuierlich registrierende Systeme in Frage (Bethge u. Gonska, 1988; Steinbeck 1994). Eine kontinuierliche EKG-Aufzeichnung wird durchgehend über mindestens 24 Stunden durchgeführt, um eine hohe diagnostische Sensitivität zu erreichen (Andresen et al., 1982; Steinbeck 1994). Die Aufnahmegeräte sind klein und leicht, so dass der Patient sie während der gesamten Aufnahme am Körper tragen kann. Die Aufzeichnung erfolgt dabei mit einem Bandrekorder auf Magnetkassette oder digitale Festspeicher. Im Anschluss werden die Daten im Auswertungscomputer gespeichert und ausgedruckt. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, müssen die Ergebnisse der computerisierten Auswertung jedoch visuell überprüft werden. Dazu werden die vollständigen („full disclosure“) Ergebnisse überprüft. Von einer vollautomatischen Arrhythmieanalyse kann also nicht gesprochen werden (Bethge u. Gonska, 1985; Bethge u. Gonska, 1988).

Das LZ-EKG wurde nur bei der klinischen Studie verwendet, und zwar bei jedem Patienten während der baseline-Phase und follow-up-Phase.

Folgende Parameter wurden durch LZ-EKG ermittelt und anschließend in den beiden Phasen verglichen:

Rhythmus	Sinusrhythmus oder Arrhythmia absoluta (z.B.: Vorhofflimmern)
Herz-Frequenz	Tachykardie oder Bradykardie
Extrasystolen (ES)	Isolierte ES, Couplets, Salven
Sonstige Herzrhythmusstörungen	z.B.: Ventrikuläre Tachykardien

3.2 Eigene Untersuchungen

3.2.1 Zielsetzung

Diese Doktorarbeit soll die Frage behandeln, ob elektrophysiologische Effekte nach intramyokardialer Injektion mononuklearer Knochenmarkzellen und mesenchymaler Stammzellen bei ischämischer Herzkrankheit entstehen.

Die Untersuchung wurde an ischämischen Tiermodellen und bei Patienten mit akutem Herzinfarkt durchgeführt.

Bei dem experimentellen Tiermodell wurde am RCX- Gefäß ein Konstriktor eingesetzt und nach zwei Wochen wurden die Stammzellen in das RCX-Versorgungsgebiet injiziert und ein elektromechanisches Mapping (EMM) durchgeführt. Nach weiteren vier Wochen wurde ein EMM wiederholt.

Bei dem klinischen Teil handelt es sich um Patienten mit Zustand nach einem akuten Myokardinfarkt und Stentimplantation. Nach 5 bis 15 Tagen wurde eine Stammzelleninjektion in das Infarktgebiet und ein EMM vorgenommen. Nach 6 Monaten wurde ein Kontroll-EMM durchgeführt.

Die elektrophysiologischen Effekte wurden hinsichtlich der QRS- Breite, Fragmentierung, unipolare Voltage (UV) und bipolare Voltage (BV) von den Tieren und Patienten analysiert.

Im Rahmen der klinischen Studie wurden zusätzlich LZ-EKG's nach 6 Monaten durchgeführt.

Vermehrte Fragmentierung und erniedrigte UV sind bekannte Prediktoren für Arrhythmien. Diese Arbeit soll untersuchen, ob Veränderungen dieser Prediktor-Werte und damit Arrhythmien durch Stammzelleninjektion hervorgerufen werden.

3.3 Experimentelles Tiermodell

3.3.1 Versuchstiere

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Abs.1 des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Tierschutzgesetz vom 25. Mai 1998 In: BGBl. I vom 25.05.1998, S. 1105).

Die Untersuchungen werden an 25 inländischen klinisch gesunden Schweinen durchgeführt. Bei Ankunft im Institut einige Tage vor Studienbeginn beträgt ihr Gewicht durchschnittlich 32 kg (Schwankungsbreite: 27-39 kg). Die Tiere stammen aus einem Ferkelaufzuchtbetrieb.

Drei Schweine starben nach Implantation des Ameroid-Konstriktor und vor der Implantation der Stammzellen aufgrund plötzlichen Herztodes. Ein Schwein starb nach der Operation im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten (septica Prozess). Diese Tiere wurden nicht in die Studie einbezogen.

3.3.2 Versuchsplan und Gruppeneinteilung

Der Versuch findet in 3 Phasen statt. Gruppen von jeweils drei bis vier Tieren werden 3 mal im Abstand von je 3 Wochen verschiedenen Operationen und Untersuchungen unterzogen. Die Tiere werden 24 Stunden vor der Operation unter Nahrungskarenz gehalten, wobei Wasser ad libitum zur Verfügung steht. In der präoperativen Phase werden die Tiere klinisch untersucht, um den Gesundheitszustand zu überprüfen und die Operationstauglichkeit sicherzustellen.

In der ersten Phase platziert man bei allen Tieren einer Gruppe ein Ameroidkonstriktor - ein offener Metallring mit einem Kaseinkern (SS-9x4-CS, Type Pie-shaped, Research Instruments, SW, Escondido, California, USA) - auf dem R. circumflexus der linken Koronararterie (A. coronaria sin.). Dies erfolgt durch eine Minithorakotomie im 4. Interkostalraum. Der Konstriktor soll einen langsamen Verschluss des Gefäßes bewirken und somit eine künstliche, begrenzte Ischämie hervorrufen.

In der zweiten Phase, nach 2 Wochen wird eine Schleuse in die rechte Leistenarterie (A. femoralis dextra) gelegt, um mehrere diagnostische Verfahren durchzuführen. Man erstellt eine Koronarangiographie, um zu kontrollieren ob der Konstriktor komplett oder nur teilweise verschlossen ist. Danach werden im Ischämiebereich die Stammzellen implantiert.

Danach erfolgt eine NOGA-Untersuchung. Die Schleuse wird anschließend entfernt, die Wunde vernäht und das Tier wird postoperativ versorgt.

In der dritten Phase erfolgen erneut sämtliche Untersuchungen aus Phase zwei (Koronarangiographie und EMM). Nach abschließender Mikrosphärenmessung werden die Tiere noch während der Narkose euthanasiert.

Tab. 2: Versuchsablauf (Tiermodell)

Tag	Vorgenommene Eingriffe
Erste Phase: Tag 0	Konstriktorimplantation Punktion des Beckens und Isolation der SZ
Zweite Phase: nach 2 Wochen (baseline)	Koronarangiographie
	SZ-Implantation
	NOGA-Mapping
Dritte Phase: nach 6 Wochen (Follow-up)	Koronarangiographie
	NOGA-Mapping
	Anschließende Euthanasie

3.3.3 Isolation der Knochenmarkzellen

Nach der Punktion von 30ml Knochenmark vom Becken wurde die punktierte Substanz aspiriert. Die Knochenmarkaspirate wurden zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Anschließend wurden die gewonnenen MNC kultiviert und nach zwei Wochen injiziert. Die Entnahme der MSC aus dem Knochenmark erfolgte während Ameroid-Konstriktor-Implantation in der ersten Woche wie zuvor beschrieben wurde. Kurz nach der Durchführung der Dichtegradientenzentrifugation wurden die MNC bei 37°C inkubiert und mit 5% CO₂ und 10% fetalen Kalbserum vermischt. Adhärente Zellen wurden nach Kultivierung bis etwa 90% entfernt. Die Anzahl der injizierten Zellen betrug $1,7 \pm 0,8 \times 10^7$ für die MNC- Gruppe und $2,4 \pm 12 \times 10^7$ für die MSC-Gruppe an 20 Punkten (100µl auf jeden Punkt) für jedes Tier.

3.3.4 Phase 1: Implantation des Ameroid Konstriktors

Anästhesie und perioperative Versorgung der Schweine

Für die Prämedikation verwendet man Ketaminhydrochlorid (20 mg/kg KGW), Xylazinhydrochlorid (2 mg/kg KGW) und Atropinsulfat (1 mg/kg KGW), die in einer Mischspritze aufgezogen und dem Tier intramuskulär in die laterale Nackenmuskulatur appliziert werden. Nach Verlust des Stellreflexes werden die Tiere rasiert, gewaschen, abgetrocknet und intubiert. In den Ösophagus platziert man für die Dauer der Operation eine Temperatursonde. In die Vena auricularis magna wird ein Verweilkatheter gelegt. Die Schweine werden in rechts-dorsolateraler Lage auf einem Operationstisch ausgebunden.

Im OP-Raum erfolgt der Anschluss an ein Narkosegerät. Die Beatmung erfolgt mit 2,0 Vol% Isofluran, 35% Sauerstoff und 63% Lachgas. Für das Monitoring während der OP kommen EKG, Pulsoximeter, Kapnometer und Blutdruckmanschette zur Anwendung. Über den Venenverweilkatheter erhält das Tier zur Flüssigkeitsversorgung Infusionen isotoner Kochsalzlösung. Zur Prophylaxe von Schmerzen und Infektionen bekommt die Schweine bereits vor der Operation Carprofen (125 mg/Tier i.v.) und Florfenicol (15 mg/kg KGW i.v.) verabreicht. Die Antibiose wird durchgehend drei bis vier Tage über die Phase 2 hinaus fortgesetzt.

Chirurgische Implantation des Konstriktors

Nach sterilem Abwaschen und Abdecken des Tieres wird mit einem Skalpell auf der linken Thoraxseite, 2 bis 3 cm lateral des Sternums, etwa 15 cm kaudal des kranialen Sternumendes im 3. Interkostalraum ein 7 bis 8 cm langer Hautschnitt angebracht. In gleicher Länge wird der Schnitt durch die Pectoralis- und Zwischenrippenmuskulatur fortgesetzt und schließlich Pleurahöhle eröffnet. Ein eingesetzter Thoraxspreizer hält das Operationsfeld auf. Nach Eröffnung des Perikards wird auf einer Länge von 5 cm die linke Koronararterie im Bereich des Ramus circumflexus freipräpariert. Zur Prophylaxe von Thrombenbildung bekommt das Tier zu diesem Zeitpunkt intravenös Heparin (5000 IE/10 kg KGW) verabreicht. Um den Ramus circumflexus legt man einen Ameroid Konstriktor (je nach Länge des frei präparierbaren Gefäßabschnitts Größe 2,0 mm, 2,75 mm oder 4,0 mm, Typ Pie-Shaped, Fa. Research Instruments SW, Escondido, Kalifornien, USA) (Abb. 15).

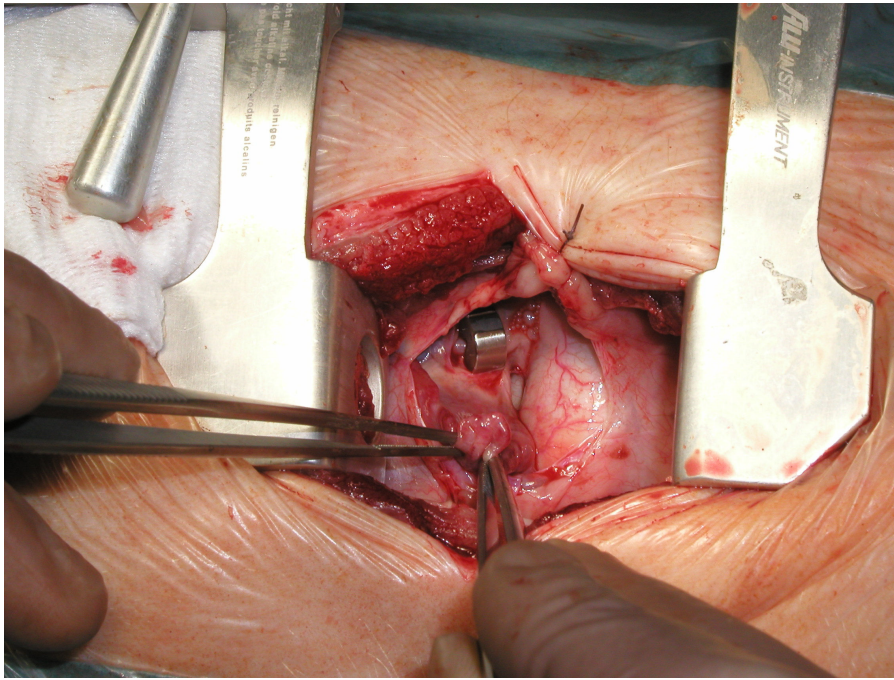


Abb. 15: Implantierter Ameroid Konstriktor um den Ramus circumflexus (Aufnahme aus vorliegender Studie)

Der Zugang wird nach Blutstillung und Anlage einer Perikard-Drainge wie folgt verschlossen: Das Perikard lässt man zur Vermeidung von Perikardtamponaden offen. Mit Einzelfäden aus resorbierbarem Material adaptiert man Muskelfaszie, einen Teil der Rippen sowie die Pectoralis- und Zwischenrippenmuskulatur. Im nächsten Schritt werden auf gleiche Weise die Pectoralismuskulatur und die Subkutis genäht. Für die subkutane als auch intrakutane fortlaufende Naht verwendet man resorbierbaren Faden. Zur Unterstützung der Adaptation wird ein topischer Hautkleber auf die Wunde aufgetragen und kurzfristig ein Kompressenverband angelegt.

Nach Schluss der Operation beendet man die Narkosegaszufuhr, beatmet zunächst manuell weiter und verabreicht zur Schmerzprophylaxe Buprenorphinhydrochlorid (0,162 mg/30 kg i.m). Die Tiere bleiben bis zum Einsetzen der selbständigen Atmung im OP-Raum unter Beobachtung. Im Stall werden die Tiere in Einzelboxen untergebracht und unter eine Rotlichtlampe gelegt. Nach Einsetzen des Schluckreflexes wird extubiert, und der Venenverweilkatheter entfernt. Die Tiere wachen unter Aufsicht auf.

3.3.5 Phase 2: Kardiologische Untersuchung/Verlaufskontrolle und Zellinjektion

Anästhesie und perioperative Versorgung der Schweine

Für die Phase 2 wird im Vergleich zu Phase 1 eine herz- und kreislaufschonendere Injektionsnarkose gewählt, um die Belastung des Tieres während und nach der kardiologischen Untersuchung weitmöglichst zu minimieren. Die Anästhesie und die perioperative Versorgung der Tiere verlaufen größtenteils wie in Phase 1. Die bereits zum Zeitpunkt der Phase 1 begonnene Antibiose wird noch drei bis vier Tage fortgesetzt.

Chirurgische Platzierung der arteriellen Einführschleuse

Die Haut des Innenschenkels der Beckengliedmaße wird großflächig desinfiziert. Mit Einmaltüchern deckt man das Tier so ab, dass nur noch der Innenschenkel freiliegt. Proximal im Schenkelkanal wird mit einem Einmalskalpell ein ca. 6 cm langer Hautschnitt gemacht. Zwischen den Muskelbäuchen der Musculi sartorius und gracilis präpariert man stumpf in die Tiefe und stellt die Arteria femoralis dar. Es werden zwei Fadenschlingen um das Gefäß gelegt. Mit einem der beiden Fäden wird das Gefäß distal ligiert und mit einer Gefäßschere das Gefäß proximal dieser Ligatur angeschnitten und eine 8French-Einführschleuse herzwärts in dem Gefäß platziert. Nach Entfernung des Dilatators aus der Schleuse führt man durch einen Führungsdraht in das Gefäß vor, über den man dann die Schleuse kontrolliert vorschiebt. Überprüfung des Sitzes und der Durchgängigkeit der Schleuse erfolgen durch Spülen mit wenigen Millilitern Heparin-Kochsalzlösung (Verdünnung 5000 IE auf 200 ml). Der Dilator wird kurzfristig wieder eingeführt, um den zweiten Faden zur Fixierung der Schleuse proximal um das Gefäß zu knoten, ohne dabei die Schleuse zu komprimieren. Nach erneuter Entfernung des Dilatators fixiert man beide Fäden an der Öse der Schleuse deckt den Zugang erneut steril ab.

Um Embolien durch die Manipulation des Katheters in der Blutbahn zu vermeiden erhält das Tier einen Bolus Heparin (5000 IE/10 kg KGW i. v.)

Kardiologische Untersuchung

Koronarangiographie

Mit Hilfe der Koronarangiographie soll der Verschluss des Ameroid Konstriktors und eine eventuelle Kollateralenbildung dokumentiert werden.

Man führt mit Hilfe eines Führungsdrahts einen Angiographie-Katheter durch die Schleuse in die Arteria iliaca ein und platziert ihn in den Anfangsteil der linken Koronararterie. In die Koronararterie wird über diesen Katheter ein Kontrastmittel injiziert, so dass sich das Gefäß mit seinen Aufzweigungen röntgenologisch darstellt. Zusätzlich führt man mit dem gleichen Katheter eine Koronarangiographie der rechten Koronararterie durch, um eine mögliche Kollateralenbildung ausgehend von diesem Gefäß feststellen zu können.

Lävoventrikulographie

Die linksventrikulären Funktion, insbesondere die Wandbewegungsstörungen lassen sich mit der Lävoventrrikulographie dokumentieren. Dazu wird ein nach rechts gebogener Pigtail-Katheter mit einem Führungsdraht in die Schleuse eingeführt und retrograd durch die Aortenklappe im linken Ventrikel platziert. Bei röntgenkinematographischer Aufzeichnung werden mit Hilfe einer Hochdruck-Injektionspumpe mehrfach 30 ml Iomeprol-Kontrastmittel mit einer Geschwindigkeit von 120 ml pro Minute appliziert. Das Kontrastmittel füllt den linken Ventrikel und ermöglicht während der Kontraktion die Beurteilung der Wandbewegungen. Die Injektionsphase wird am Monitor verfolgt und auf einem DVD-Medium gespeichert. Man dokumentiert Aufnahmen in der LAO-30°- sowie der AP-Projektionsebene.

Durchführung des EMM und intramyokardiale Injektion der Stammzellen

Die Injektionen erfolgen unmittelbar nach dem Mapping. Für die Injektionsprozedur verwendet man einen modifizierten Mappingkatheter (Injection Cardiology Catheter, 8 F, Länge 115 cm, Kurventyp B oder D, 27G-Nadel, Volumen 0,1 ml, Biosense Webster Inc., Diamond Bar, Kalifornien, USA) (Abb. 16, 17) Um eine ausreichende Einstichtiefe zu gewährleisten, und der Gefahr von Perforationen zu begegnen wird vor der Injektionsprozedur die Länge der ausgefahrenen Kanüle sowohl bei geradem Katheterschaft als auch in gebogener Stellung gemessen. Durch Drehen einer Rändelschraube stellt man die Länge der Kanüle auf ca. 4 mm ein.

Auf das Ende des Katheterhandgriffs schraubt man eine 2 ml-Luer-Spritze (Omnifix®, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen) auf (Abb. 16). Anschließend wird das Kanülenlumen mit SZ gefüllt. Der Katheter wird, wie vorher der Mappingkatheter, im linken Ventrikel plaziert. Im Bereich der "area of interest" appliziert man intramyokardial 20 Injektionen von jeweils 100 µl SZ. Für die Injektion muss die Katheterspitze im rechten Winkel auf das Endokard gerichtet sein. Der Sitz der Katheterspitze wird unter Röntgendurchleuchtung und anhand der Stabilitätskriterien kontrolliert. Stimmt die Katheterposition, so sticht man die Nadel durch Betätigung eines Daumenknaufts am Katheterhandgriff schnell ins Myokard ein. In diesem Augenblick sollen im EKG eine Extrasystole und eine Unterbrechung der ST-Strecken-Hebung sichtbar sein. Der korrekte Sitz des Katheters ist außerdem noch einmal unter Röntgendurchleuchtung zu kontrollieren. Nun wird über einen Zeitraum von 15 Sekunden die Injektion vorgenommen. Die Injektionsstellen erscheinen im NOGA-Map als rosafarbene Markierung.



Abb. 16: Injektionskatheter mit aufgeschraubter Luer-Spritze (NOGA-Trainingsmaterial, Fa. Cordis)



Abb.17: Spitze des Injektionskatheters mit ausgeführter Nadel (NOGA-Trainingsmaterial, Fa. Cordis)

Entfernung der Einführschleuse

Die Einführschleuse wird aus der Arteria femoralis gezogen und das Gefäß sofort mit einem Faden ligiert. Die Muskeln mit der dazugehörigen Faszie sowie das subkutane Gewebe werden jeweils mit Einzelheften adaptiert. Die Haut verschließt man mit einer intrakutanen, fortlaufenden Naht und trägt zur Unterstützung der Adaptation einen topischen Hautkleber auf die Wunde auf.

3.3.6 Phase 3: Follow-up Kontrolle nach 6 Wochen

Anästhesie, prä- und intraoperative Tierversorgung, die chirurgische Platzierung der arteriellen Einführschleuse sowie die kardiologische Untersuchung und EMM werden wie in Phase 2 durchgeführt.

3.3.7 Euthanasie, Sektion und Probenentnahme

Nach Beendigung der kardiologischen Untersuchungen euthanasiert man die Tiere in Narkose. Der Thorax wird beidseits im Bereich der Rippenknorpelgrenze eröffnet und das Herz nach Durchtrennung der Gefäße entnommen. Nach Spülung des Herzens mit Kochsalzlösung werden die Konstriktoren aus dem Herzgewebe präpariert, um deren vollständigen Verschluss noch einmal zu überprüfen (Abb. 18). Anschließend legt man das Herz zur Fixierung für die histologischen Untersuchungen in 3,5%ige Formalinlösung.



Abb. 18: Explantierte Konstriktoren (Aufnahme aus der vorliegenden Studie)

3.3.8 Histologische Untersuchungen

Aus dem Myokardgewebe schneidet man zwei Blöcke (jeweils 1,5 cm x 1,5 cm):

- einen aus dem ischämischen Gebiet (LCX-Versorgungsgebiet, posterolateral proximal) und
- einen aus einem nicht-ischämischen Gebiet (linker Ventrikel septumnah, LAD- oder RCA-Versorgungsgebiet), Kontrollschnitt.

Es soll festgestellt werden, ob sich das Ausmaß von Veränderungen der beiden Tiergruppen unterscheidet und ob es sich um akute oder abgeschlossene Prozesse handelt (Rundzellinfiltrate, Fibrosen, weitere degenerative Veränderungen). Für die Dokumentation wurden digitale Photographien angefertigt.

Um das betroffene Gebiet post mortem besser wiederzufinden, ist bei den letzten Versuchstieren unmittelbar vor der Euthanasie mit einem Injektionskatheter intramyokardial grüne Tusche um den betroffenen Bereich injiziert worden (Abb. 19)

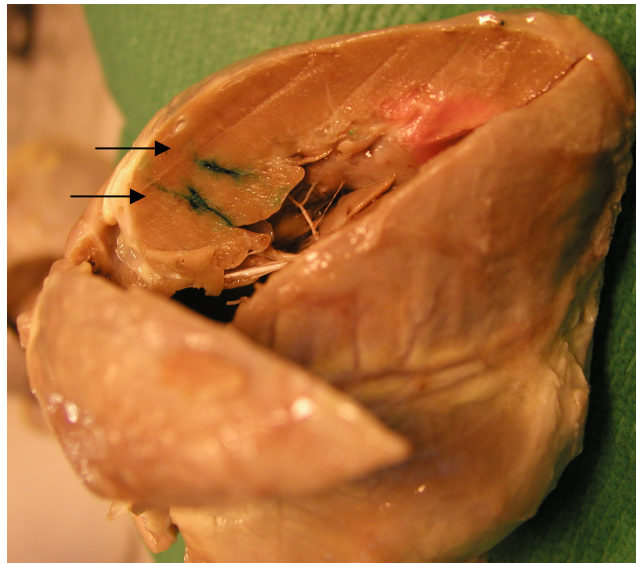


Abb. 19: Intramyokardiale Injektion von grüner Tusche (Pfeile) (Aufnahme aus vorliegender Studie)

3.4 Klinischer Teil

Die tierexperimentellen Daten der Zell-Injektion wurden partiell in eine klinische Studie umgesetzt.

Dabei wurde an 17 Patienten ($60,4 \pm 11,4$ Jahre alt) $10,5 \pm 5$ Tage nach akutem Myokardinfarkt und Revaskularisation (18 Koronarverschlüsse der linken und zwei Verschlüsse der rechten Herzkranzarterie) in die Infarktregion und deren Randbereich ($>5\text{mV}$ UV als Zeichen der Vitalität) durch einen mapping-gesteuerten Katheter aus dem Knochenmark entnommene MNC injiziert (baseline). Nach 6 Monaten wurde ein Kontroll-EMM (follow-up) durchgeführt.

Bei dem EMM wurden bei jedem Patienten ungefähr 42 ± 9 endokardiale Punkte gespeichert und in die Wertung einbezogen. Die Mittelwerte der baseline-Phase wurden mit den Mittelwerten der follow-up-Phase verglichen. Bei der klinischen Studie gibt es keine Kontroll-Gruppe

An der Studie nahmen 17 Patienten teil, davon eine Frau. In der baseline-Phase haben alle Patienten an der Studie teilgenommen. In der follow-up-Phase haben 15 Patienten teilgenommen.

Bei 15 Patienten wurde nach sechs Monaten das EMM wiederholt. Bei allen Patienten wurden sowohl in der baseline- als auch in der follow-up Langzeit-EKG und Echokardiografien durchgeführt.

Tab. 3: Einzelne Schritte der klinischen Studie:

Tag	Vorgenommene Diagnostik und Procedure
Erste Phase: Tag 0	PTCA/Stentimplantation ber betroffenen Herzgefäße nach dem Myokardinfarkt
Zweite Phase: nach 5-15 Tagen (baseline)	Koronarangiographie
	SZ-Implantation
	NOGA-Mapping
	LZ-EKG und Echokardiographie
Dritte Phase: nach 3 Monate	Allgemeine Diagnostik wie TTE und LZ-EKG
Vierte Phase: nach 6 Monaten (Follow-up)	Koronarangiographie
	NOGA-Mapping
	LZ-EKG und Echokardiographie

3.5 Statistik

Die Ergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert $\pm$ STABW (Standardabweichung vom Mittelwert) dargestellt. Einzelne Datenreihen der baseline- und follow-up-Ergebnisse für die SZ- und Kontrollgruppe beurteilt man zusätzlich anhand des Student-T-Tests. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% galt als signifikant (p-Wert $<0,05$). Die Daten werden graphisch als Boxplots präsentiert.

Die Daten werden in Microsoft© Excel 2003 gesammelt. Die statistische Analyse erfolgt mit dem Software Paket SPSS® (SPSS für Windows Version 11.5, Inc. 1989-2002, Chicago, Illinois, USA) und Sigmaplot/SPW10.0.

4 Ergebnisse

4.1 Experimentelles Tiermodell

4.1.1 Überlebensrate

Die Gesamtzahl der im Versuch verwendeten Tiere beläuft sich auf 21. Drei Schweine starben vor der Bewertung nach der Implantation des Ameroid-Konstriktor und vor der Implantation der Stammzellen aufgrund plötzlichen Herztodes. Ein Schwein starb nach der Operation im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten (septischer Prozess). Diese Tiere wurden nicht in die Studie eingenommen. Kein Tier starb im Zusammenhang mit der Katheterisierung und Injektionsverfahren. Kein Tier starb nach der Injektion der Stammzellen und vor Beendigung des Experiments.

4.1.2 Konstriktoren

Bei allen Tieren sind die Konstriktoren zum Zeitpunkt der Entnahme vollständig verschlossen. Zur Überprüfung des Verschlusszeitraumes der Konstriktoren werden vor der ersten OP 5 Konstriktoren in vitro getestet. Sie werden zu diesem Zweck in körperwarmer NaCl-Lösung inkubiert und täglich überprüft. Nach 10 +/- 2 Tagen sind alle 5 Konstriktoren komplett verschlossen.

4.1.3 Elektromechanisches Mapping (EMM)

Bei 21 Schweinen wurde ein Ameroid-Konstriktor um das RCX-Koronargefäß platziert. Nach zwei Wochen wurde bei neun Schweinen mesenchymale Stammzellen (MSC, n = 9) injiziert, bei sechs Schweinen mononukleäre Stammzellen (MNC, n = 6). Die übrigen sechs Schweine dienten als Kontrollgruppe, bei denen keine Stammzellen injiziert wurden (n = 6).

Das EMM wurde zwei Wochen (baseline) sowie sechs Wochen (follow-up) nach Infarktinduktion durchgeführt. Sowohl bei der baseline-Untersuchung als auch bei der follow-up-Untersuchung wurden ungefähr 68 ± 18 endokardiale Punkte pro Tier gespeichert und in die Wertung einbezogen (kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen).

Die Fragmentation, QRS-Dauer, UV und BV wurden durch die Workstation des Systems zu den beiden Zeitpunkten (baseline, follow-up) in den jeweiligen Injektionszonen berechnet.

Die elektrophysiologische Effekte wurden hinsichtlich der QRS-Breite, Fragmentierung, unipolare Voltage (UV), bipolare Voltage (BV) und lokale Kontraktion des lokalen EKG's von allen Tieren analysiert.

a

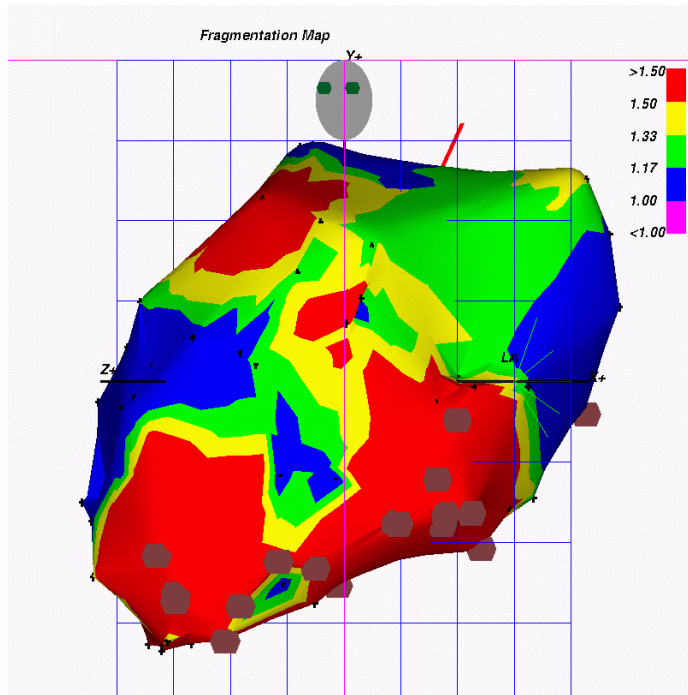
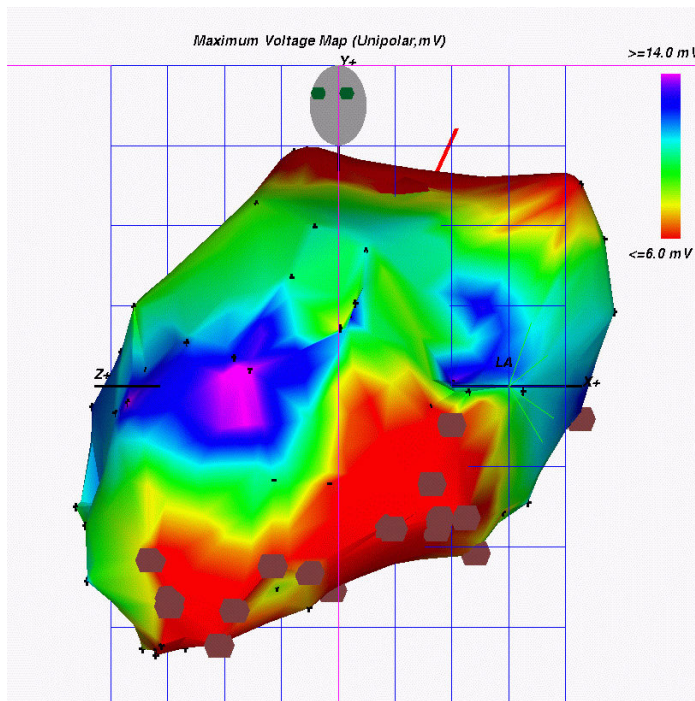


Abb.20:

Fragmentation Index (FI) Karte des linken Ventrikels (a). Zeitpunkt der Injektion von mesenchymalen Stammzellen in der zweiten Woche und die diesbezügliche unipolare Spannung (UV) Karte (b). Die rote Zone zeigt $FI > 1,5$ (a) oder UV von 6mV (b). Die braunen Punkte stellen die Zellinjektions-Punkte dar, die als Mapping-Daten gelten und bewertet werden.

b



Für jedes Tier wurde von allen bewerteten Punkten ein Mittelwert für jede bestimmte Messung (z.B. Fragmentation) ermittelt, dann wurde von allen Mittelwerten aller Tiere der gleichen Messung sowohl in der baseline- als auch follow-up-Phase ein Mittelwert berechnet. Daraufhin wurden die Mittelwerte in den beiden Phasen miteinander verglichen. Außerdem kann man die drei untersuchten Gruppen miteinander vergleichen und die Ergebnisse analysieren (Tab. 4 -7).

Sechs Wochen nach der Injektion von MSC bzw. MNC ergaben die EEM keine Zunahme der Fragmentierung (MSC-Gruppe: $1,4 \pm 0,3$ vs. $1,3 \pm 0,2$; MNC-Gruppe $1,4 \pm 0,2$ vs. $1,3 \pm 0,2$; $p=NS$).

Bei der Kontrollgruppe zeigte sich eine Zunahme der Fragmentierung (Kontrollgruppe $1,4 \pm 3$ vs. $1,5 \pm 2$; $p=NS$), die aber auch nicht signifikant war.

Das EMM zeigte keine Verlängerung der Dauer des QRS-Komplexes (MSC-Gruppe: $27,1 \pm 7ms$ vs. $23,7 \pm 2ms$; MNC-Gruppe $27,8 \pm 3ms$ vs. $26,8 \pm 5,6ms$; $p = NS$).

Bei der Kontrollgruppe zeigte sich eine Verlängerung der Dauer des QRS-Komplexes (Kontrollgruppe $26,8 \pm 6ms$ vs. $23,6 \pm 5ms$; $p=NS$).

Das EMM zeigte eine leichte Zunahme der bipolaren Voltage bei der MSC-Gruppe und eine Abnahme der bipolare Voltage bei der MNC. (MSC-Gruppe: $2,7 \pm 0,9mV$ vs. $2,8 \pm 1,0mV$; MNC-Gruppe $2,0 \pm 1,0mV$ vs. $1,7 \pm 0,4mV$; $p=NS$)

Bei der Kontrollgruppe zeigte sich fast gleiche Endergebnisse in der baseline- und follow-up-Phase (Kontrollgruppe $2,3 \pm 1$ vs. $2,3 \pm 0,6$; $p=NS$).

Tab. 4: EMM: Fragmentation

MSC-, MNC- und Kontrollgruppe nach 2 (baseline) und 6 Wochen (follow-up)

		Baseline	follow-up
MSC	MW	1,45	1,3
	STABW	0,29	0,16
	P	0,148	
MNC	MW	1,39	1,33
	STABW	0,2	0,18
	P	0,53	
Kontrollgruppe	MW	1,43	1,48
	STABW	0,28	0,18
	P	0,340	

MW= Mittelwert, STABW = Standardabweichung

Tab. 5: EMM: Fragmentation Index

MSC-, MNC- und Kontrollgruppe nach 2 (baseline) und 6 Wochen (follow-up)

		Baseline	follow-up
MSC	MW	1,44	1,38
	STABW	0,19	0,10
	P	0,148	
MNC	MW	1,44	1,44
	STABW	0,20	0,20
	P	0,84	
Kontrollgruppe	MW	1,40	1,61
	STABW	0,18	0,43
	P	0,43	

MW= Mittelwert, STABW = Standardabweichung

Tab. 6: EMM: QRS -Dauer (ms)

MSC-, MNC- und Kontrollgruppe nach 2 (baseline) und 6 Wochen (follow-up)

		Baseline	follow-up
MSC	MW	27,1ms	23,7ms
	STABW	7,8	2,0
	P	0,313	
MNC	MW	27,8ms	26,8ms
	STABW	3,5	5,6
	P	0,84	
Kontrollgruppe	MW	26,8ms	30,6ms
	STABW	5,8	5,1
	P	0,0506	

MW= Mittelwert, STABW = Standardabweichung

Tab. 7: EMM: Bipolare Voltage BV (mV)

MSC-, MNC- und Kontrollgruppe nach 2 (baseline) und 6 Wochen (follow-up)

		Baseline	follow-up
MSC	MW	2,7mV	2,8mV
	STABW	0,9	1,0
	P	0,1414	
MNC	MW	2,0mV	1,7mV
	STABW	1	0,4
	P	0,134	
Kontrollgruppe	MW	2,36mV	2,35mV
	STABW	1,02	0,63
	P	0,999	

MW= Mittelwert, STABW = Standardabweichung

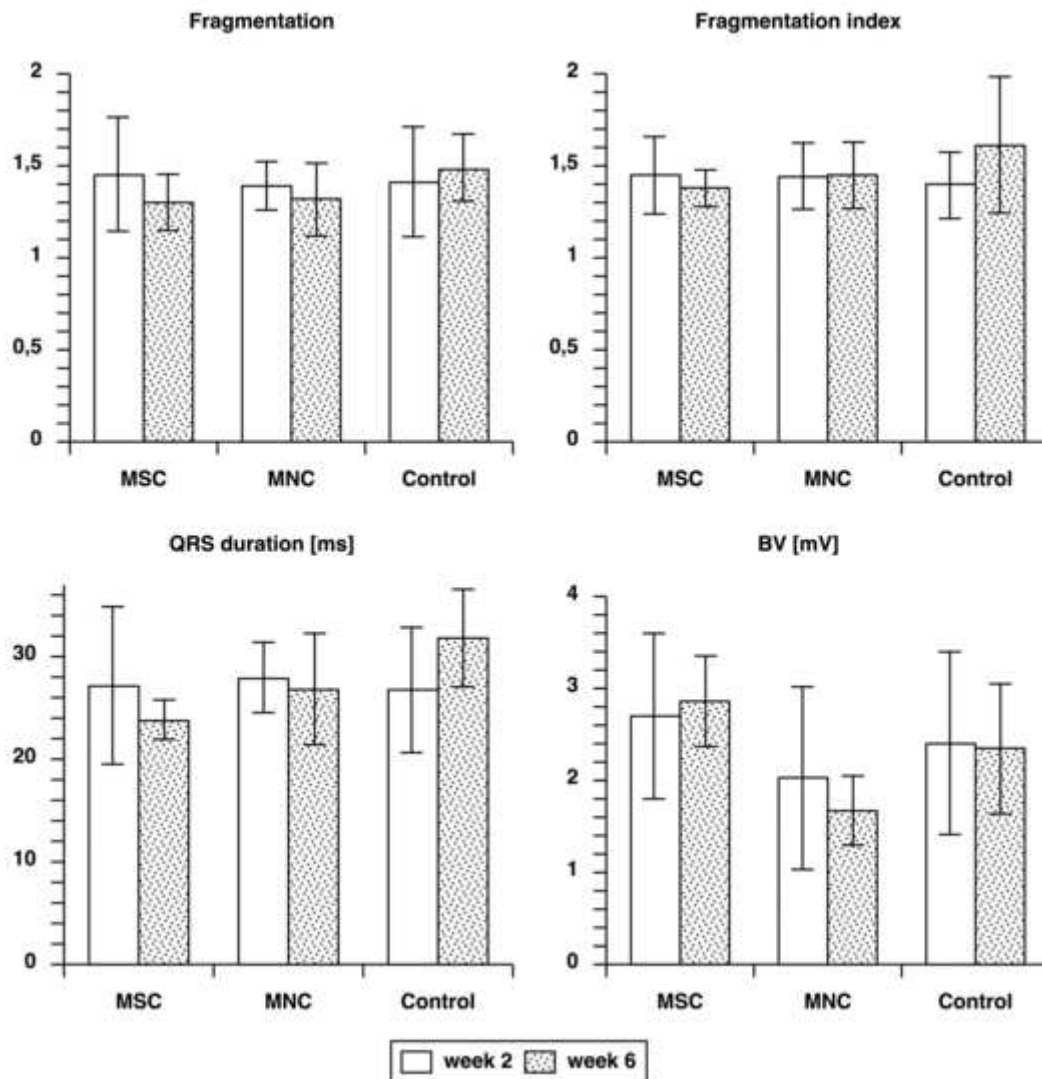


Abb. 21: Gesamtvergleich der baseline- und follow-up-Werte des experimentellen Tiermodells

4.1.4 Bestimmung des ischämischen Myokardareals mittels EMM

Das endokardiale elektromechanische Mapping (EMM) zeigte in der sechsten Woche eine signifikant reduzierte ischämische endokardiale Oberfläche bei den Tieren, die mit MSC behandelt wurden im Vergleich zu den MNC-behandelten und den Kontrollgruppen-Tieren. Die Kontrollgruppe zeigte im Verlauf eine vergrößerte ischämische endokardiale Oberfläche. Die Ergebnisse werden in Abbildung 5 wiedergegeben. Die nominalen und normalisierten Werte der UV nahmen in den ischämischen Arealen der mit MSC und MNC injizierten Tieren zu: in der allogenen MSC-Gruppe von $35,0 \pm 5,9\%$ auf $44,0 \pm 2,5\%$ ($p=0.008$), der autologen MSC-Gruppe von $45,0 \pm 4,7\%$ auf $61,0 \pm 6,8$ ($p=0.004$), der

MNC-Gruppe von $55,5 \pm 8,9\%$ auf $56,0 \pm 10,1\%$ ($p=n.s.$), während in der Kontrollgruppe die normalisierte UV von $53,0 \pm 8,4\%$ auf $37,0 \pm 4,8\%$ um 16% abnahm. Die individuelle Differenz der nominalen UV von der zweiten Woche (Zeitpunkt der Injektionen) bis zur sechsten Woche war: Kontrollgruppe: $-1,2\text{mV}$ vs. MNC-Gruppe $+1,5\text{mV}$ ($p=0,002$) vs. autologe MSC-Gruppe $+0,4\text{mV}$ ($p=0,03$) vs. allogene MSC-Gruppe $+0,75\text{mV}$ ($p=0,01$). Somit zeigen die Ergebnisse des elektromechanischen Mappings im Verlauf einen positiven Effekt von mesenchymalen Stammzellen auf die Größe des geschädigten Myokardareals, während Zellinjektionen mononukleärer Knochenmarkszellen das linksventrikuläre Remodelling, wie es in der Kontrollgruppe auftrat, aufhalten.

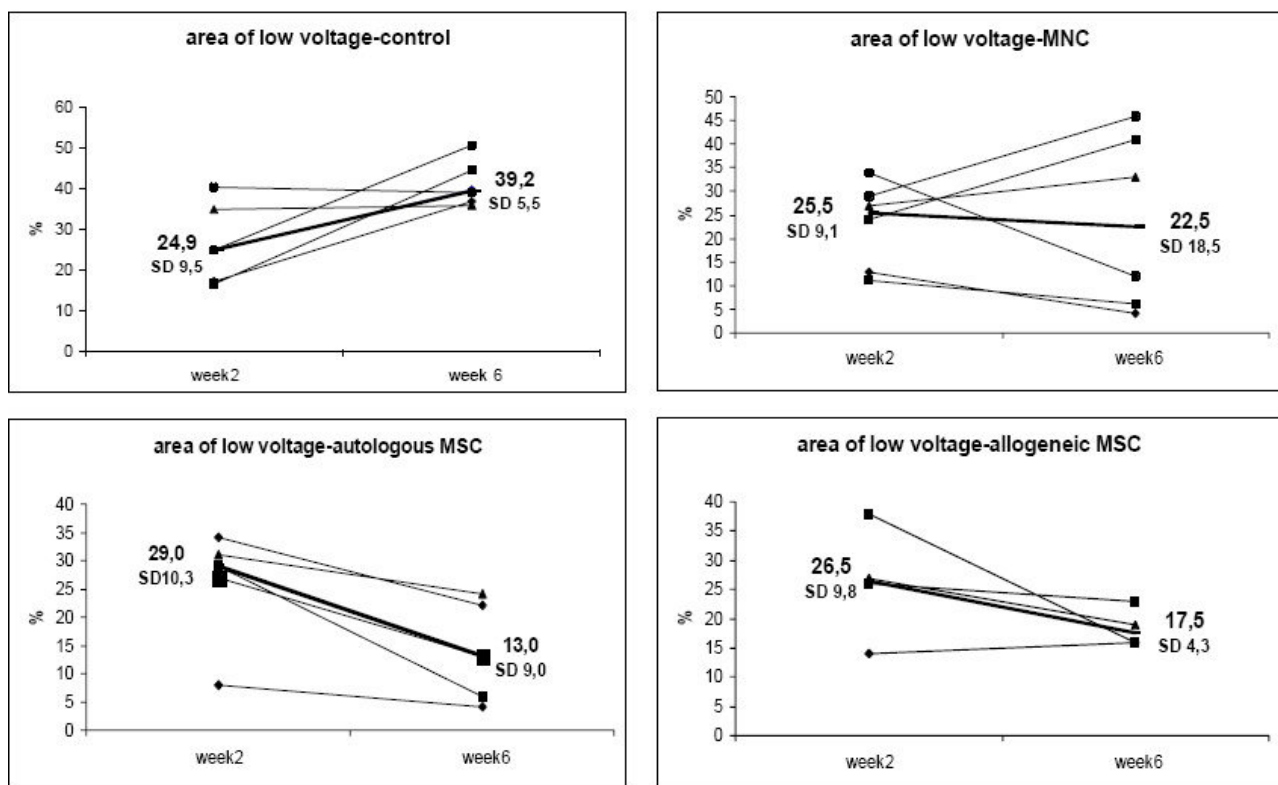


Abb. 21: Die Differenz der ischämischen endokardialen Oberfläche war signifikant reduziert in den Gruppen mit autologer MSC Injektion ($p=0,004$) sowie allogener MSC Injektion ($p=0,008$). Die Gruppe mit MNC-Injektionen zeigte keinen signifikanten Unterschied bei großer Standardabweichung, während die Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme des ischämischen Areals aufwies im Sinne eines linksventrikulären Remodelling.

4.1.5 Histologie

Die quantitative morphometrische Post-mortem-Analyse der ischämischen Regionen ergab einen signifikant geringeren Grad an interstitieller Fibrose in den mit Zellen behandelten Gruppen. Es zeigte sich $13,6 \pm 3,7\%$ interstitiale Fibrose in der MSC-Gruppe vs. $17,6 \pm 5,0\%$ in der MNC-Gruppe vs. $28,7 \pm 10,2\%$ in der Kontroll-Gruppe. Die Differenz zwischen MSC-Gruppe und Kontrollgruppe war signifikant ($p=0,01$) wie auch die zwischen MNC-Gruppe und Kontrollgruppe ($p=0,038$). Zwischen den Zellgruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 9).

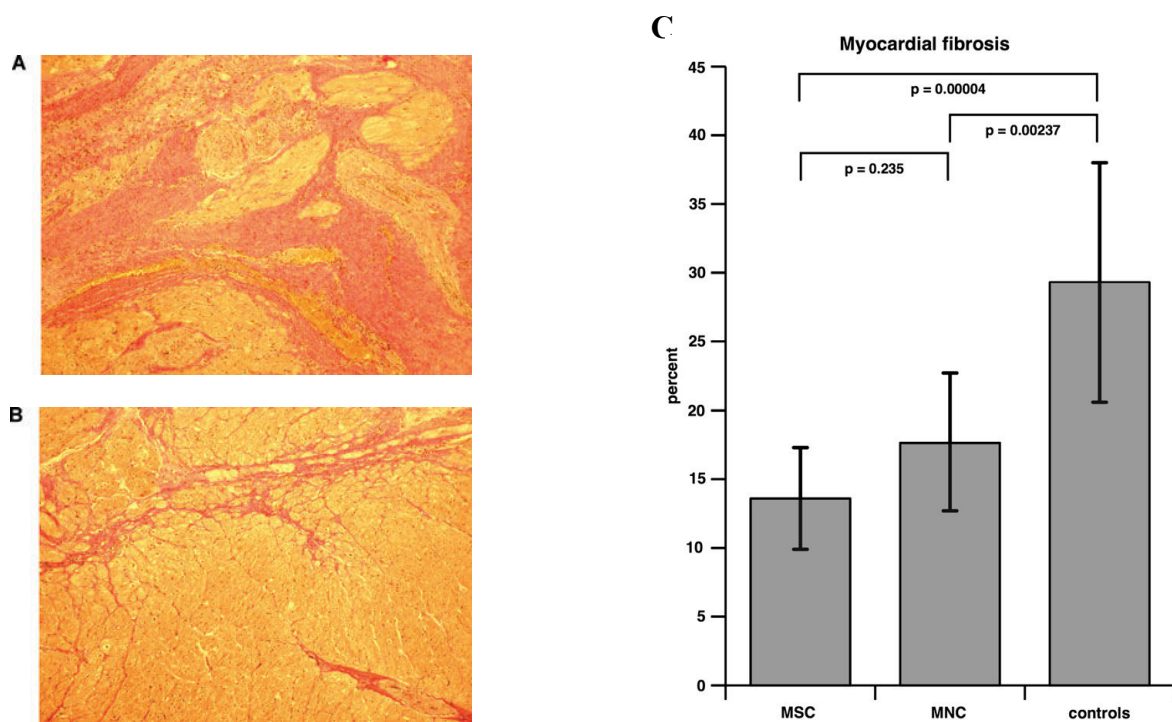


Abb. 22:

A zeigt eine repräsentative Histologie aus dem Ischämiegebiet der Kontrollgruppe (Elastica-van-Gieson-Färbung) mit höherem Grad an interstitieller Fibrosierung (rot gefärbte Areale) im Vergleich zu B (Histologie aus der MSC-Gruppe). C zeigt die Unterschiede der myokardialen Fibrosierung nach morphometrischer Analyse.

4.2 Klinischer Teil

Bei dem klinischen Teil handelt es sich um 15 Patienten mit Zustand nach einem akuten Myokardinfarkt und Stentimplantation. Nach 5 bis 15 Tagen wurde eine Stammzelleninjektion in das Infarktgebiet und ein EMM vorgenommen. Nach 6 Monaten wurde ein Kontroll-EMM durchgeführt.

Während der Prozeduren kam es in keinem Fall zu anhaltenden ventrikulären Tachykardien oder Kammerflimmern. Periprozedural kam es bei keinem Patienten zu einem Perikarderguss, Perikardtamponade, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Infektion, Myokarditis, Endokarditis oder Tod. Nach zwölf Monaten Beobachtung verstarb keiner der Patienten. In der Nachbeobachtung von zwölf Monaten traten echokardiografisch keine nachweisbaren Kalzifizierungen oder Tumorformationen auf. Es war keine Neudiagnose von malignen Erkrankungen zu beobachten. Eine Patientin wurde wegen chronischen Unterbein-Ulcera hospitalisiert und ein Patient erhielt nach acht Monaten einen femoropoplitealen Bypass am linken (nicht bei der Studie punktierten) Bein aufgrund einer zuvor vorliegenden pAVK. Nach sechs Monaten Beobachtung traten in der Kontroll-Koronarangiografie bei sechs Patienten (30%) Restenosen der jeweils unbeschichteten Stents (BMS) auf. Vier dieser Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung symptomfrei. Fünf Patienten erhielten einen medikamenten-eluierenden Stent in die Restenose-Läsion, ein Patient erhielt eine ACVB-Operation aufgrund neu aufgetretener Stenosen der Nicht-Infarkt-Gefäße. Kein Patient zeigte eine Verschlechterung in der NYHA-Klassifizierung im Verlauf. Drei Patienten wurde aufgrund einer primärprophylaktischen Indikation ein ICD implantiert.

4.2.1 Elektromechanisches Mapping

• Fragmentation

Sechs Monate nach MNC-Implantation zeigte sich im EMM keine Erhöhung der Fragmentation in der Injektionszone: baseline: $3,1 \pm 0,3$, follow-up $2,9 \pm 0,3$; $p=NS$.

Tab. 8: Vergleich der Fragmentierung in der baseline-Phase mit der Fragmentierung in der follow-up-Phase

Pat.	Baseline	Follow-up
1	3	2,94
2	2,92	2,78
3	2,77	2,75
4	3,63	3,45
5	2,65	2,38
6	2,6	2,55
7	2,89	2,6
8	3,08	3,05
9	3,31	3,19
10	3,18	3,09
11	3,35	3,0
12	3,44	3,36
13	3,1	2,95
14	3,3	3,2
15	3,31	3,09
MW	3,10	2,95
STABW	0,29	0,30
P	0,20	

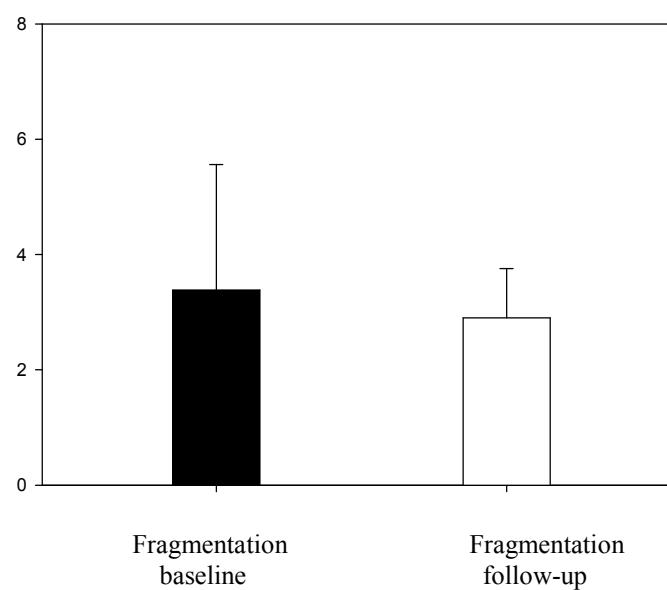


Abb. 23: Vergleich der Fragmentierung in der baseline-Phase mit der Fragmentierung in der follow-up-Phase

- **QRS-Komplex**

Das EMM zeigte keine Verbreiterung der Dauer des QRS-Komplexes in der Injektionszone in der follow-up-Phase. baseline: $31,7 \pm 7,5\text{ms}$, follow-up: $32,1 \pm 8\text{ms}$, $p=\text{NS}$.

Tab. 9: Vergleich der Dauer des QRS-Komplexes in der baseline-Phase mit der Dauer in der follow-up-Phase

Pat.	Baseline	Follow-up
1	38,13	41,36
2	32,92	30,4
3	23,13	27,31
4	38,5	40,25
5	25,87	23
6	21,48	17
7	23,03	29,21
8	41,81	37,35
9	33,05	35
10	32,81	29,46
11	29,42	32,79
12	31,16	23,27
13	30,54	32,5
14	24,35	35,33
15	49,21	47,8
MW	31,7	32,1
STABW	7,5	7,9
P	0,732	

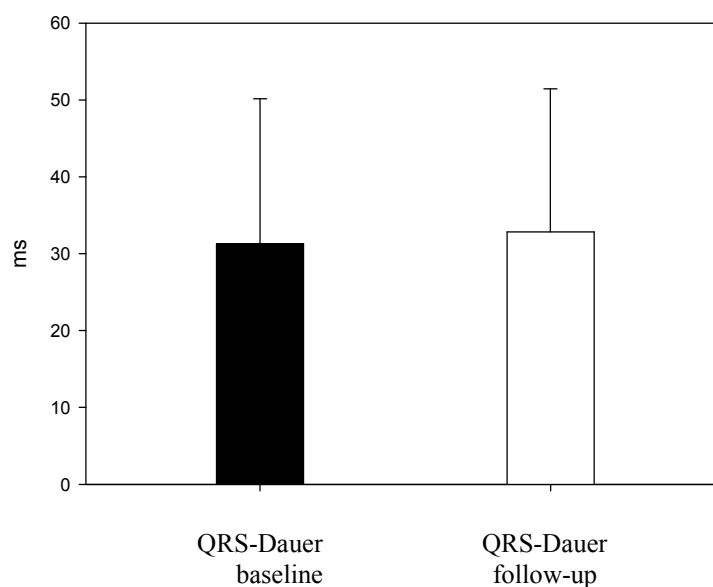


Abb. 24: Vergleich der QRS-Dauer in der baseline-Phase mit der QRS-Dauer in der follow-up-Phase

- **Unipolare Voltage (UV)**

Das EMM zeigte eine minimale Zunahme der UV in der follow-up-Phase baseline: $5,9 \pm 2$; follow-up $6,0 \pm 2$ mV; $p = \text{NS}$.

Tab. 10: Vergleich der UV in der baseline-Phase mit der UV in der follow-up-Phase

Pat.	Baseline	Follow-up
1	5,25	3,7
2	6,43	6,71
3	3,54	5,34
4	4,31	4,24
5	4,05	5,54
6	5,86	2,6
7	5,65	7,11
8	4,49	3,8
9	13,31	7,01
10	7,02	9,54
11	7,33	6,23
12	6,05	6,45
13	6,1	8,77
14	3,6	7,42
15	5,55	6,18
MW	5,90	6,02
STABW	2,27	1,9
P	0,834	

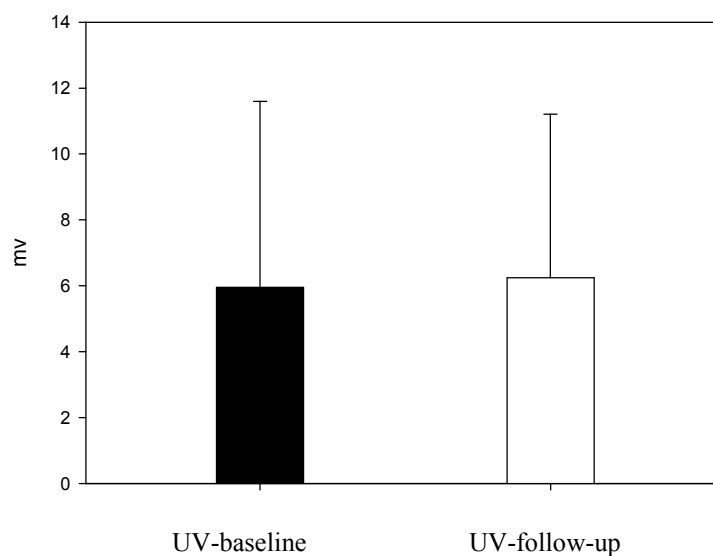


Abb. 25: Vergleich der UV in der baseline-Phase mit der UV in der follow-up-Phase

- **Bipolare voltage (BV)**

Das EMM zeigte keine Senkung der BV in der follow-up-Phase baseline: $2,2 \pm 1$, follow-up $2,0 \pm 1$ mV; $p = \text{NS}$.

Tab. 11: Vergleich der BV in der baseline-Phase mit BV in der follow-up-Phase

Pat.	Baseline	Follow-up
1	1,97	2,35
2	2,72	1,5
3	1,64	2,27
4	0,81	2,05
5	2,65	2,76
6	1,69	1,08
7	2,59	3,59
8	1,09	1,51
9	5,57	0,27
10	2,22	2,44
11	2,92	2,01
12	1,6	1,22
13	2,02	3,56
14	2,47	3,14
15	1,31	1,01
MW	2,21	2,05
STABW	1,08	0,96
P	0,695	

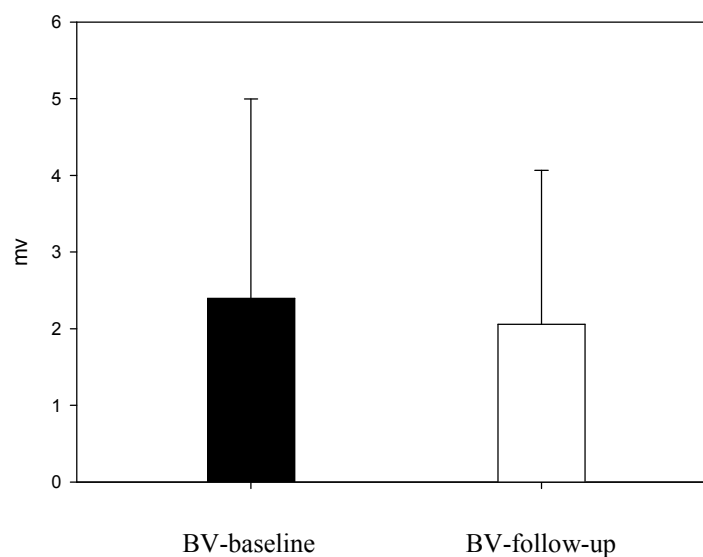


Abb. 26: Vergleich der BV in der baseline-Phase mit der BV in der follow-up-Phase

4.2.2 Ergebnisse des Langzeit-EKG

Tab. 12: Ergebnisse des Langzeit-EKG (baseline und follow-up)

	Baseline		follow-up	
	MW	STABW	MW	STABW
HF mittel	70	11	64	10
HF min.	56	13	51	7
HF max.	99	15	103	20
Isolierte VES	42	65	18	35
Couplets	5	12	0,6	2,1
Salven	0	0	0	0

In den Holter-EKG-Aufzeichnungen wurden keine anhaltenden ventrikulären Tachykardien vor und nach MNC Injektion dokumentiert. Die Anzahl der ventrikulären Extrasystolen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

5 Diskussion

5.1 Überlegung zum Versuchsaufbau des experimentellen Teils der Arbeit

5.1.1 Wahl des Tiermodells

Es stellt sich bei tierexperimentellen Untersuchungen grundsätzlich die Frage nach der Übertragbarkeit auf den Menschen. Hierbei kommt es vor allem auf die passende Auswahl der Versuchstierspezies an. Aufgrund seiner dem Menschen sehr ähnlichen Koronaranatomie hat sich das Schwein hier besonders auf dem Gebiet der Erforschung der koronaren Herzkrankheit als geeignetes Versuchstier erwiesen (White et al. 1986; Böcker et al. 2001). Die häufige, in der Literatur beschriebene Nutzung des Schweines, vor allem des "chronischen ischämischen Modells" ist wegen der entsprechend bestehenden Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Studien dieser Art von Vorteil (Rahimtoola 1989).

5.1.2 Konstriktormodell und Verlustrate

Das am weitesten verbreitete "chronische Ischämie-Modell" ist das Konstriktormodell. Es wurde bereits in mehreren experimentellen Studien zur Erforschung von Revaskularisierungstherapien angewendet. Dennoch hat auch dieses chronische Modell weiterhin den Nachteil einer relativ hohen Verlustrate von etwa 30% (Hughes et al. 2003). In unserer Studie zeigte sich eine Verlustrate durch die Konstriktur-Implantation von nur 12%.

Bei den anderen Methoden, wie z. B. die Methode der Mikroembolisation zur Infarktinduktion beträgt die Verlustrate 38% (Rammos 2009). Weitere tierexperimentelle Modelle akuter myokardialer Ischämie verwenden die Methode der Ballonokklusion der Koronargefäße mit geringeren Verlusten (Sasano 2008; Schuleri 2008). Eine Verlustrate von 20% wurde in der tierexperimentellen Studie Horackovas dargestellt, wobei dort die chirurgische Ligatur der linken Koronararterie benutzt wurde um einen Infarkt auszulösen (Horackova 2004).

Der Vorteil an dem Konstriktor-Modell die relativ leichte Handhabung sowie der nur langsame, graduelle Verschluss des Gefäßes durch den Konstriktor. Nicht bestätigt hat sich auch die Behauptung von Carroll et al. (1993), dass der runde Konstriktor im Gegensatz zum ovalen Modell eine höhere Thrombosegefahr birgt, denn in unserer Studie wurde bei keinem der untersuchten Tiere Anzeichen für einen solchen akuten Verschluss nachgewiesen.

Aufgrund der ungenauen Angaben zur absoluten Verschlusszeit des Konstriktors ist es schwer für alle Tiere konstante Versuchsbedingungen zu schaffen. Ein weiteres Problem bei diesem chronischen Ischämie-Modell ist die nach einiger Zeit einsetzende Kollateralenbildung, welche auch beim Schwein bei einem retardierenden Totalverschluss ein gewisses Ausmaß annehmen kann. Somit wird die Entstehung eines Ischämiegebietes verringert wenn nicht sogar vollkommen verhindert. Aufgrund der guten Kollateralenversorgung am Schweineherzen nach etwa drei Wochen konnten Harada et al. (1994) während der Dobutamin-Stressechokardiographie keine Wandbewegungsstörungen feststellen. Verbleibt hingegen ein Restfluss, wie bei einer Stenose, ist die Kollateralenbildung nicht so ausgeprägt und der Myokardschaden im Vergleich größer (St. Louis et al. 2000).

In dieser Studie konnte in allen Tieren eine deutliche Wandbewegungsstörung in den ischämischen Regionen nachgewiesen werden.

Generell gegen dieses Modell spricht der invasive chirurgische Eingriff, der mit nicht unerheblichen Schmerzen und Beeinträchtigungen der Tiere verbunden sein kann.

5.1.3 Limitationen, Vor- und Nachteile des NOGA-Systems

Ein großer Vorteil ist es, dass die Erstellung der NOGA-Karten im Gegensatz zu anderen Methoden fast ganz ohne Röntgenstrahlung möglich ist (Gepstein et al. 1997; Kornowski et al. 1998b; NOGA - Trainingsmaterials 2003). Lediglich das Einführen des Katheters und die Aufnahme der ersten drei Punkte muss unter Röntgenkontrolle erfolgen. Beim NOGA wird kein Kontrastmittel benötigt, so dass Komplikationen wie Nieren- oder Herzversagen durch allergische Reaktionen auf die Injektion von hyperosmotischer Lösung ausgeschlossen werden können (Gepstein et al. 1997). Ein weiterer Vorteil des NOGA-Systems ist die Möglichkeit, gleichzeitig elektrische und mechanische Informationen über den lokalen sowie globalen Vitalitätszustand des Herzens zu sammeln (Gepstein et al. 1997; Gepstein et al. 1998; Kornowski et al. 1998b; Keck et al. 2002). Durch die Nutzung des speziell entwickelten Katheters und die 3D Echtzeit Darstellung des Katheters ist es ohne weiteren Aufwand möglich, erst eine diagnostische Karte zu erstellen und direkt im Anschluss an die Untersuchung eine Therapie, wie z.B. das injizieren von Wachstumsfaktoren in das Myokard sehr präzise durchzuführen (Kornowski et al. 2000). Vorbereitungen und benötigte Voraussetzungen (Einführschleuse, Röntgengerät) für das NOGA-Mapping sind identisch mit denen der Koronarangiographie. Daher ist es direkt im Anschluss an das NOGA-Mapping möglich, ohne weitere Vorbereitungen eine koronarangiographische Untersuchung durchzuführen. Es muss lediglich ein anderer Katheter dafür verwendet werden.

Für die Anwendung des NOGA-Systems benötigt man speziell geschultes Untersuchungspersonal, um zuverlässige Werte zu erhalten. Mit Erfahrung des Untersuchers verkürzt sich die Untersuchungszeit

auf ein moderates Maß, anfangs ist allerdings mit wesentlich längeren Zeiten zu rechnen. Hinzu kommen hohe Kosten für die Geräte sowie die Ausbildung des Personals (Ben-Haim et al. 1996).

Bei unerfahrenem Personal besteht die Gefahr, dass bestimmte Gebiete des Ventrikels aufgrund ihrer Geometrie und der mechanischen Gegebenheiten bei der Datenkollektion ausgelassen und somit die Ergebnisse verfälscht werden (Gepstein et al. 1997). So ist es z.B. schwierig, direkt neben den Papillarmuskeln den Katheter in die richtige Position zu bringen und ihn stabil zu halten, was bei unerfahrenen Untersuchern zu nicht verwertbaren Daten führen kann (Lessick et al. 2002). Der Herzrhythmus muss während der gesamten Untersuchung relativ stabil sein, da Daten für einen Punkt über mehrere Herzschläge gesammelt werden. Dies ist vor allem aufgrund der Dauer der Untersuchung oft schwierig (Gepstein et al. 1997). Durch die Verwendung eines "Pacers" können Herzfrequenz und Zykluslänge auch über einen längeren Zeitraum stabil gehalten werden (Lessick et al. 2002). Bei manueller Filterung der NOGA-Daten kann es, je nach Untersucher, zu Schwankungen bei den entfernten Punktzahlen kommen. Daher sollte man hauptsächlich mit der automatischen Filterung arbeiten (Lessick et al. 2002). Beim Vergleich der NOGA-Karten mit einem zweidimensionalen Verfahren (Echokardiographie) besteht zudem noch eine gewisse Ungenauigkeit, da die Zuordnung der anatomischen Strukturen des 3D-Bildes im Vergleich mit dem 2D-Bild trotz der vergleichbaren Segmententeilung schwierig ist (Botker et al. 2001).

5.1.4 Vergleich der verschiedenen Stammzellen

Bisher liegen keine Daten vor, welche Art der Stammzellen am besten geeignet wäre, um in der Kardiologie eine Anwendung zu finden. Grundsätzlich ist festzuhalten, dass die Präparation unselektierter und selektierter mononukleärer Knochenmarkstammzellen klinisch am einfachsten und schnellsten auszuführen ist und somit auch bei der Behandlung eines akuten Myokardinfarkts angewendet werden kann. Die Mehrzahl der aufgeführten Zelllinien, wie endotheliale Vorläuferzellen, mesenchymale Stammzellen oder skelettale Myoblasten müssen in einem, meist mehrere Tage oder Wochen, andauernden Prozess in Zellkulturflaschen angezüchtet werden. Deshalb sind sie in der klinischen Akutsituation für eine autologe Transplantation nicht einsetzbar.

5.1.5 Gewebeschäden

In dieser Arbeit wurde histologisch keine Abwehrreaktion gesehen. Dies bestätigten auch andere Studien, welche von allogener MSC Gebrauch machten (Dai et al. 2005 und Kinnaird et al. 2004).

Darüber hinaus wurde beschrieben, dass MSC eine gewisse Toleranz induziert, welche für die Reduktion der graft-versus-host-disease, der Abwehrreaktion und der Regulierung der Entzündungsreaktion verantwortlich sein könnte (Aggarwal et al. 2005; Le Blanc et al. 2003).

Andere Autoren hingegen beschrieben eine zelluläre und humorale Immunantwort bei drei untersuchten Schweinen (Poncelet et al. 2007).

Erst kürzlich wurden Kalzifizierungen nach MNC und MSC Injektion beschrieben (Breitbach et al. 2007). Wir bestätigen Kalzifikationen in sechs von 15 Tieren, aber wir haben auch, Kalzifizierung bei Schweinen festgestellt, die lediglich nur ein Placebo erhielten. Es ist nicht sichergestellt, ob die Injektion selbst Kalzifizierungen der Zellen verursacht.

Zwei unabhängige Pathologen interpretierten diese als degenerative Kalzifizierungen im Rahmen der chronischen Ischämie. Ob die Konzentration der injizierten Zellen ebenso für diese Befunde verantwortlich ist, müsste in zusätzlichen Experimenten erwiesen werden.

Im Hinblick auf die myokardiale Arrhythmogenität und die Kontraktion scheinen diese kleinen Mikrokalzifizierungen als nicht relevant.

Da die positive Wirkung der Zell-Injektion in der aktuellen Studie auch zu einem geringeren Grad der interstitielle Fibrose geführt hat, kann man dieses Phänomen als nicht relevant erachten.

5.2 Arrhythmogenität und Sicherheit

Wir untersuchten die Merkmale von endokardialen Elektrogrammen vor und nach perkutaner intramyokardialer Stammzell-Injektion im Modell der chronischen koronaren Erkrankungen sowohl im experimentellen Tiermodell als auch in einer klinischen Studie bei Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt. Wir haben das arrhythmogene Substrat an der Injektionsstelle von MSC und MNC im ischämischen Tiermodell und MNC in der klinischen Studie untersucht. Hierbei fand sich sowohl im Tiermodell als auch in der klinischen Studie keinen Hinweis für einen negativen Einfluss auf das arrhythmogene Substrat in diesem Bereich, gemessen an den lokalen Elektrogrammen.

In der klinischen Studie haben wir zusätzlich bei jeden Patienten ein LZ-EKG in der baseline- und follow-up-Phase durchgeführt. Alle Patienten hatten sowohl in der baseline- als auch in der follow-up Phase durchgehend einen Sinus-Rhythmus. Anhaltendes Vorhofflimmern oder ventrikuläre Tachykardien wurden nicht nachgewiesen.

5.2.1 Ursachen der Herzrhythmusstörungen nach Zellinjektion

Da eine Transdifferenzierung adulter Stammzellen zu voll funktionsfähigen Kardiomyozyten umstritten ist, ist davon auszugehen, dass im Rahmen aktueller klinischer Studien keine relevante funktionelle Integration transplanted adulter Stammzellen im Sinne eines aktiven Beitrags zur Kontraktion des Empfängerherzens stattfindet. Trotzdem muss beachtet werden, dass eine gewisse elektrische Kopplung zwischen Empfänger-kardiomyozyten und transplanted adulten Stammzellen auch ohne kardiale Transdifferenzierung vorhanden ist. Humane mesenchymale Stammzellen exprimieren Connexine und bilden intakte Gap junctions mit den Kardiomyozyten des Hundes aus (Valiunas et al. 2004).

Bei mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmarkstroma wurde in Studien unter speziellen Kulturbedingungen eine Differenzierung in myozytenähnliche Zellen beobachtet. Nach Injektion dieser Zellen in Infarktgewebe zeigten sich eine Funktionsverbesserung sowie eine Verhinderung von Remodelingprozessen (Pittenger 2004). Weitere Vorteile dieser Zellen sind ihre Expandierbarkeit in vitro und ihre geringe Immunogenität (Pittenger 2004). Problematisch für die praktische Anwendung der mesenchymalen Stammzellen im klinischen Alltag erscheint jedoch ihr arrhythmogenes Potential. In einer Studie, in der menschliche mesenchymale Stammzellen mit ventrikulären Myozyten neonataler Ratten kokultiviert wurden, zeigte sich, dass die Mischung der beiden Zelltypen Arrhythmien hervorrufen kann (Chang 2006). Man nahm an, dass der Reentrymechanismus bei heterogenem Myokard aufgrund der elektrischen Kopplung unerregbarer mesenchymaler Stammzellen mit Myozyten erhöht ist, die dann eine verlangsamte Erregungsleitung aufweisen.

In einem In-Vitro-Modell für Erregungsblockierungen, bei dem zwei Areale neonataler Rattenkardiomyozyten durch einen bis zu 450µm breiten Spalt separiert wurde, konnte eine Erregungsausbreitung zwischen beiden Arealen durch eine Plattierung humaner mesenchymaler Stammzellen in den Spalt erzeugt werden (Beeres et al. 2005). Die Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung war jedoch um den Faktor elf reduziert. Darüber hinaus ergaben intrazelluläre Aktionspotentialableitungen, dass Potentiale der Stammzellen ein deutlich reduziertes Ruhemembranpotential ($-23 \pm 13 \text{ mV}$) sowie eine stark verminderte Amplitude ($15 \pm 8 \text{ mV}$) aufweisen. Es lag also kein typisches kardiakles Aktionspotential vor.

Als Folge dieser Inhomogenität der Erregungsausbreitung und der Aktionspotentialparameter ist eine Induktion von Arrhythmien (Erregungsblockierungen, Reentry-Tachykardien) durch eine Transplantation adulter Stammzellen theoretisch nicht auszuschließen.

Chen et al. berichten in diesem Sinne über eine verlängerte lokale Aktivierungszeit nach MSC-Injektion in einem Herzinsuffizienz-Modell (Chen et al. 2006). Auch in einem Großtiermodell wurden

drei Monate nach intravenösen MSC-Injektionen kürzere effektive Refraktärzeiten gemessen (Price et al. 2006). Auf der anderen Seite fanden Mills et al. eine reduzierte Arrhythmieinduzierbarkeit in einem Infarkt-Modell der Ratte nach MSC-Injektionen (Mills et al. 2007).

In klinischen Studien bei Patienten mit chronisch-ischämischer Herzkrankheit ohne Revaskularisierungsoption, bei denen MNC intramyokardial wie auch in unserer Studie injiziert wurden, sind keine vermehrten Arrhythmien beschrieben worden (Fuchs et al. 2006, Perin et al. 2004). Die MNC veränderten die elektrophysiologischen Eigenschaften im injizierten Areal nicht (Beeres et al. 2007) und es ergab sich auch kein Unterschied in der programmierten Ventrikelstimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe (Meyer et al. 2006). In allen Studien, bei denen MNC intrakoronar injiziert wurden, ergab sich auch kein Hinweis für vermehrte Arrhythmogenität.

Die gefährlichsten Herzrhythmusstörungen sind nach der Implantation Skelettmuskelzellen entstanden. Menasché et al. gelang es, die sogenannten Satellitenzellen, eine Art Vorläuferzellen oder Myoblasten der Skelettmuskulatur, aus Biopsien quergestreifter Muskulatur zu isolieren und in vitro zu expandieren. Operativ oder durch transepikardiale Injektion wurden diese Zellen, Patienten mit bereits bestehender ischämischer Kardiomyopathie oder direkt nach einem akuten Myokardinfarkt in ein akinetisches Infarktareal transplantiert (Herreros 2003, Menasché 2003, Pagani 2003).

Postoperativ kam es zu einer signifikanten und persistierenden Verbesserung der regionalen und globalen Pumpfunktion. Angesichts der simultanen Bypass-Operation ist jedoch der Effekt der Zelltransplantation schwer zu beurteilen. Bei Patienten ohne gleichzeitige Revaskularisationstherapie reduzierten die per Katheter in alte Infarktstellen injizierten Myoblasten zwar die Symptome der Herzinsuffizienz, verbesserten jedoch die globale linksventrikuläre Pumpfunktion nicht (Smits et al.). Obwohl es in den vorausgegangenen umfangreichen Tierexperimenten keinen Hinweis auf eine arrhythmogene Wirkung der Skelett-Myoblastentransplantation gegeben hatte, entwickelten Patienten nach Myoblasteninjektion ventrikuläre Arrhythmien, die zu Todesfällen führten (Menasche et al. 2003). Deshalb war für die in der Phase-II-Studie MAGIC („Myoblast Autologous Graft in Ischaemic Cardiomyopathy“) die simultane Implantation eines automatischen Defibrillators (ICD) obligat (Menasche et al. 2005).

Die klinische Phase-II -Studie MAGIC zeigte keine Verbesserung der Herzfunktion bei Infarktpatienten. Vielmehr zeigte sich in der Zellimplantationsgruppe eine Häufung ventrikulärer Arrhythmien (Smith et al. 2008).

Skelettmuskelzellen exprimieren allerdings *per se* nicht die nötigen Adhäsionsproteine oder Connexine, die eine elektromechanische Kopplung mit dem Myokard ermöglichen (Reinecke et al. 2000, Rubart et al. 2004).

Nach Myoblasteninjektion aufgetretene ventrikuläre Arrhythmien sind auf die ektopische elektrische Aktivität der transplantierten Skelettmuskelzellen zurückzuführen, die keine zellulären Kontakte mit den Kardiomyozyten des Empfängerherzens ausbilden (Leobon et al. 2003).

In vitro-Experimente zeigten, dass die transgene Expression des „Gap-Junction“-Proteins Connexin 43 die Arrhythmogenität humaner Skelettmyoblasten in Kokultur mit neonatalen Rattenkardiomyozyten deutlich reduzierten (Abraham et al. 2005).

Interessanterweise konnte in einer neueren Studie im Tiermodell gezeigt werden, dass genetisch modifizierte Connexin-43 (Cx43) über exprimierende Muskelzellen elektromechanisch mit dem Myokard koppeln. Das Auftreten ventrikulärer Arrhythmien nach Transplantation dieser Zellen konnte somit verhindert werden (Roell et al. 2007).

Neben diesen rhythmogenen Nebenwirkungen sind von Breitbach et al. wie auch in unserer Studie in deutlich geringerem Ausmaß histomorphologisch vermehrte relevante Kalzifikationen in Arealen nach MSC-Injektion beschrieben worden (Breitbach 2007) mit potentiell arrhythmogener Wirkung. Der Sicherheitsaspekt bei der intramyokardialen Injektion darf also nicht außer Acht gelassen werden.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Wir fanden vier Wochen nach MSC- und MNC-Injektion beim ischämischen Tier-Modell keine elektrophysiologische Veränderung bzgl. der Fragmentierung, QRS-Breite, unipolare und bipolare Voltage im injizierten Ischämie-Gebiet.

In der klinischen Studie, änderte die Implantation von MNC nicht die elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards. Die Ergebnisse des EMM nach sechs Monaten, nach intramyokardialer Implantation von MNC, zeigten keine Verschlechterung der elektrophysiologischen Effekte hinsichtlich der QRS- Breite, Fragmentierung, unipolare Voltage (UV), bipolare Voltage (BV) und lokale Kontraktion des lokalen EKG's.

Darüber hinaus zeigten LZ-EKG nach sechs Monaten keine Vermehrung von Arrhythmien.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Anwendung von SZ aus dem Knochenmark zur Therapie von Patienten mit einer chronischen Myokardischämie nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit am ischämischen Schweineherzen und Patienten in der Frühphase nach akutem Myokardinfarkt vielversprechend ist. Durch die SZ-Implantation sind keine negativen Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften des injizierten Myokards nachgewiesen worden.

Die Zukunftsperspektive der Behandlung des Myokardinfarkts durch die adulten Stammzellen sind vielfältig und haben das Ziel, Stammzellmarkierungen vorzunehmen, das Stammzellschicksal zu verfolgen, die Applikationsmechanismen zu verbessern, die Zellidentifikation spezifisch vorzunehmen, das Homing, d.h. die Einnistung der Zellen in das Gewebe zu verbessern und mögliche Komplikationen zu vermeiden. Weitere Untersuchungen und Forschungen in diesem Bereich sind auf jeden Fall noch erforderlich.

6 Zusammenfassung

Diese Doktorarbeit soll die Frage behandeln, ob elektrophysiologische Effekte nach intramyokardialer Injektion mononuklearer Knochenmarkzellen und mesenchymaler Stammzellen bei ischämischer Herzkrankheit entstehen.

Aus vorherigen Experimenten und klinischen Studien geht hervor, dass die Ursachen für potentielle Herzrhythmusstörungen bei Stammzell-Implantation nach Myokardinfarkt die Heterogenität der Aktionspotentiale und die Leitungsverzögerung der elektrischen Signale durch die Stammzellen sein können. Darüber hinaus kann die intramyokardiale Injektion von Stammzellen in das lebensfähige Myokard die lokale Erregungsleitung verändern und zur Auslösung von Herzrhythmusstörungen führen.

Die hier vorgestellte Arbeit zeigt sowohl tierexperimentelle als auch die klinische Anwendung der perkutanen transendomyokardialen Zellinjektion in der frühen Postinfarktphase.

Vor einer direkten transendokardialen Injektion von Stammzellen erfolgte ein elektromechanisches Mapping (NOGA – Mapping) zur Erstellung eines dreidimensionalen Bildes des linken Ventrikels. Dies ermöglicht eine Unterscheidung von vitalem, geschädigtem und vernarbten Myokard. Über einen speziellen Katheter werden die Stammzellen transendothelial direkt in das ischämisch geschädigte Myokard injiziert.

Die elektrophysiologischen Effekte bei dieser Arbeit wurden hinsichtlich der QRS- Breite, Fragmentierung, unipolare Voltage (UV) und bipolare Voltage (BV) des lokalen EKG's von den Tieren und Patienten sowohl bei Stammzellinjektion als auch in der Nachbeobachtungsphase untersucht und analysiert. In der Nachbeobachtungsphase zeigten sich keine Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften.

In der klinischen Studie wurden die Herzrhythmusstörungen zusätzlich mittels Langzeit-EKG untersucht. Auch hier zeigte sich keine Vermehrung von Herzrhythmusstörungen in der follow-up-Phase.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass keine elektrophysiologische Effekte nach intramyokardialer Injektion mononuklearer Knochenmarkzellen und mesenchymaler Stammzellen in der Frühphase nach akutem Myokardinfarkt entstehen.

Literaturverzeichnis

Abraham MR, Henrikson CA, Tung L. et al. (2005): Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation *Circ Res*, 97(2): 159-67.

Aggarwal S, Pittenger MF. (2005): Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-1822. 69.

Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. (2005): Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11474-11479.

Andresen D, Leitner ER, Wegscheider K, Schröder R. (1982): Nachweis komplexer tachykarder ventrikulärer Rhythmusstörungen im Langzeit-EKG. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 107, 571-574.

Antoniucci D, Santoro GM, Bolognese L, Valenti R, Trapani M, Aalkjær C, Fazzini PF. (1998): A clinical trial comparing primary stenting of the infarct-related artery with optimal angioplasty for acute myocardial infarction. Results from the florence randomized elective stenting in acute coronary occlusions (FRESCO) trial“, *Journal of the American College of Cardiology* 31, 1234-1239.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967.

Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. (2002): Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106(24): 3009-17.

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. (2004): Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428:668-673.

Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, et al. (2005): Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation* 112:1178-183.

Bayes-Genis A, Roura S, Prat-Vidal C, et al. (2007): Chimerism and microchimerism of the human heart: evidence for cardiac regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*; 4 Suppl 1:S40-45.

Bearzi C, Rota M, Hosoda T, et al. (2007): Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14068-14073.

Beeres SL, Atsma DE, van der Laarse A, Pijnappels DA, van Tuyn J, Fibbe WE, de Vries AA, Ypey DL, van der Wall EE, Schalij MJ. (2005): Human adult bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental conduction block in rat cardiomyocyte cultures. *J Am Coll Cardiol*; 46:1943-52.

- Beeres SL, Zeppenfeld K, Bax JJ, Dibbets-Schneider P, Stokkel MP, Fibbe WE, van der Wall EE, Atsma DE, Schalij MJ. (2007):** Electrophysiological and arrhythmogenic effects of intramyocardial bone marrow cell injection in patients with chronic ischemic heart disease. *Heart Rhythm*. 4:257-65.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. (2003):** Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*; 114:763-776.
- Ben-Haim SA, Osadchy D, Schuster I, Gepstein L, Hayam G, Josephson ME. (1996):** Nonfluoroscopic, in vivo navigation and mapping technology. *Nat Med*, 2(12): 1393-5.
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. (2009):** Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324:98-102.
- Bethge K, Gonska BD. (1988):** Stellenwert verschiedener Konzepte der Langzeit-Elektrokardiographie. *Wien. Med. Wochenschr.* 138, 5-12.
- Bethge K, Gonska BD (1985):** Langzeit-Elektrokardiographie: Wertigkeit und Zuverlässigkeit unterschiedlicher Systeme. *Z. Kardiol.* 74, 567-579.
- Blau H, Brazelton T, Weimann J. (2001):** The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105:829-841.
- Bloor CM, White D, Roth DM. (1992):** The pig as a model of myocardial ischemia and gradual coronary artery occlusion. In: M. M. SWINDLE (Hrsg.): *Swine as models in biomedical research*. Iowa State University Press, Ames. 163-175.
- Böcker W., Denk H., Heitz PH. (2001):** Pathologie, 2. Auflage. Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore. 2001, 431-2, 1120.
- Bolognese L., Cerisamo G, Buonamici P, Santini H, Santoro G.M, Antoniaci D; Fazzini P.F. (1997):** "Influence of infarct-zone viability on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction", *Circulation* 96, 3353-3359.
- Bolukoglu H, Liedtke AJ, Nellis SH, Eggleston AM, Subramanian R., Rentstrom M. (1992):** An animal model of chronic coronary stenosis resulting in hibernating myocardium. *Am J Physiol.* 263: H20-9.
- Borchardt U, Hafner D. (2000):** "Ionenkanäle und Herzrhythmusstörungen." - *Z. Kardiol.* 89: 6-12.
- Botker HE, Lassen JF, Hermansen F, et al. (2001):** Electromechanical mapping for detection of myocardial viability in patients with ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 103:1631-1637.
- Brehm M, Zeus T, Strauer BE. (2002):** Stem cells--clinical application and perspectives. *Herz* 27(7): 611-20.
- Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK. (2007):** Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*. 110:1362-9.

- Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Califf R (1994):** Epic. Investigators. „Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty“, *New England Journal of Medicine* 330, 956-961.
- Caplan AI. (2007):** Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213:341-347.
- Carroll SM, White FC, Roth DM (1993):** Bloor CM. Heparin accelerates coronary collateral development in a prine model of coronary artery occlusion. *Circulation* 88: 198-207.
- Chang MG, Tung L, Sekar RB, et al. (2006):** Proarrhythmic potential of mesenchymal stem cell transplantation revealed in an in vitro coculture model. *Circulation* 113:1832-4121.
- Chen M, Fan ZC, Liu XJ, Deng JL, Zhang L, Rao L, Yang Q, Huang DJ. (2006):** Effects of autologous stem cell transplantation on ventricular electrophysiology in doxorubicin-induced heart failure. *Cell Biol Int.* 30:576-82.
- Claydon FJ, 3rd, Pilkington TC, Ideker RE. (1985):** Classification of heart tissue from bipolar and unipolar intramural potentials. *IEEE Trans Biomed Eng.* 32:513-520.
- Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. (2005):** Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* 112:214-23.
- Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. (2003):** Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 107:1247-1249.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) 2001,** S. 56; National Institutes of Health.
- Dorfman J, Duong M, Zibiatis A. (1998):** „Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation“, *Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery* 116, 744-751.
- Elzinga WE. (1969):** Ameroid constrictor: uniform closure rates and a calibration procedure. *J Appl Physiol.* 27: 419-21.
- Engelhardt VW, Breves G. (2000):** *Physiologie der Haustiere.* Enke Verlag, Stuttgart. 137, 283.
- Erdmann E et al. (2000):** *Klinische Kardiologie, Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße,* Springer Verlag (Hrsg. Erdmann), Kpt. 21, Pathogenese der Herzrhythmusstörungen, S446-451.
- Fallavollita, Logue, Canty. (2001):** Stability of hibernating myocardium in pigs with a chronic left anterior descending coronary artery stenosis: absence of progressive fibrosis in the setting of stable reductions in flow, function and coronary flow reserve. *J Am Coll Cardiol* 37: 1989-1995.
- Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, et al. (2004):** Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95:742-748.

Freyman T, Polin G, Osman H, et al. (2006): A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J.* 27:1114-1122.

Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, Weissman NJ, Leon MB, Epstein SE, Kornowski R. (2001): Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 37(6): 1726-32.

Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, Satler LF, Smits PC, Okubagzi P, Baffour R, Aggarwal A, Weissman NJ, Cerqueira M, Waksman R, Serruys P, Battler A, Moses JW, Leon MB, Epstein SE. (2006): Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol.* 97(6): 823-9.

Fuchs S, Battler A, Kornowski R. (2007): Catheter-based stem cell and gene therapy for refractory myocardial ischemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 4 Suppl 1: S89-95.

Gepstein L, Goldin A, Lessick J, Hayam G, Shpun S, Schwartz Y, Hakim G, Shofty R, Turgeman A, Kirshenbaum D, Ben-Haim SA. (1998): Electromechanical characterization of chronic myocardial infarction in the canine coronary occlusion model. *Circulation* 98: 2055-64.

Gepstein L, Hayam G, Ben-Haim SA. (1997a): A novel method for nonfluoroscopic catheter-based electroanatomical mapping of the heart. *Circulation* 95: 1611-22.

Gepstein L, Hayam G, Shpun S, Ben-Haim SA. (1997b): Hemodynamic evaluation of the heart with a nonfluoroscopic electroanatomical mapping technique. *Circulation* 96: 3672-80.

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. (2008): Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 103:1204-1219.

Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al. (2002): Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 105:380-386.

Hallstrom AP, Bigger JT Jr, Roden D, Friedman L, Akiyama T, Richardson DW, Rogers WJ, Waldo AL, Pratt CM, Capone RJ, et al. (1992): Prognostic significance of ventricular premature depolarizations measured 1 year after myocardial infarction in patients with early postinfarction asymptomatic ventricular arrhythmia. *J Am Coll Cardiol.*; 20: 259-64.

Harada K, Grossman W, Friedman M. (1994): Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest.* 94: 623-30.

Haverkamp W und Breithardt G (2003): Moderne Herzrhythmustherapie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York Kap. 3 (20-24).

Hodgson D, Behfar A, Zingman L, et al. (2004): Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 287(2):471–479. 1.2.4

Höfling R. (1991): Sondierung und Angiographie des Herzens und der herznahen Gefäße. In: G. RIEKER (Hrsg.): Klinische Kardiologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest. 104-119.

Hofmann M et al. (2005): Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 111:2198-2202.

Horackova M, Arora R, Chen R, Armour JA, Cattini PA, Livingston R, Byczko Z. (2004): Cell transplantation for treatment of acute myocardial infarction: unique capacity for repair by skeletal muscle satellite cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(4): H1599-608.

Horneffer PJ, Gott VL, Gardner T J. (1986): Swine as a cardiac surgical model. In: M. E. TUMBLESON (Hrsg.): Swine in biomedical research. Plenum Press, New York, London. 321-25.

Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, et al. (2005): Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation* 112:I150-156.

Hughes HC. (1986): Swine in cardiovascular research. *Lab Anim Sci.* 36: 348-50.

Hughes GC, Post MJ, Simons M, Annex BH. (2003): Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J Appl Physiol.* 94: 1689-1701.

Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. (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.

Jorgensen E, Madsen T, Kastrup J. (2005): Comparison of the left ventricular electromechanical map before percutaneous coronary stent revascularization and at one-month follow-up in patients with a recent ST elevation infarction. *Catheter Cardiovasc Interv*, 64(2): 153-9.

Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. (2003): Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 107(3): 461-8.

Keck A, Hertting K, Schwartz Y, et al. (2002): Electromechanical mapping for determination of myocardial contractility and viability. A comparison with echocardiography, myocardial single-photon emission computed tomography, and positron emission tomography. *J Am Coll Cardiol* 40(6):1067-74; discussion 1075-8

Kehat I, Khimovich L, Caspi O et al. (2004). Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 1282–1289.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. (2004): Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109:1543-1549.

Koch KC, vom Dahl J. (2000): Electromechanical mapping of the heart. *Curr Opin Cardiol*, 15(5): 337-42.

Koch KC, vom Dahl J, Wenderdel M, Nowak B, Schaefer WM, Sasse A, Stellbrink C, Buell U, Hanrath P. (2001): Myocardial viability assessment by endocardial electroanatomic mapping: comparison with metabolic imaging and functional recovery after coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol*, 38(1): 91-8.

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. (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.

Kofidis T, Lebl DR, Swijnenburg RJ et al. (2006): Allopurinol/uricase and ibuprofen enhance engraftment of cardiomyocyte-enriched human embryonic stem cells and improve cardiac function following myocardial injury. *Eur J Cardiothorac Surg* 29, 50–55.

Körbling M, Estrov Z. (2003): Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349:570-582.

Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T, et al. (2008): Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Eur Heart J*; 29:2851-2858.

Kornowski R, Hong MK, Gepstein L, Goldstein S, Ellahham S, Ben-Haim SA, Leon M B. (1998a): Preliminary animal and clinical experiences using an electromechanical endocardial mapping procedure to distinguish infarcted from healthy myocardium. *Circulation* 98: 1116-24.

Kornowski R, Hong MK, Leon MB (1998b): Comparison between left ventricular electromechanical mapping and radionuclide perfusion imaging for detection of myocardial viability. *Circulation* 98: 1837-41.

Kornowski R, Leon MB, Fuchs S, Vodovotz Y, Flynn MA, Gordon DA, Pierre A, Kovesdi I, Keiser JA, Epstein SE. (2000): Electromagnetic guidance for catheter-based transendocardial injection: A platform for intramyocardial angiogenesis therapy. *J Am Coll Cardiol*. 35: 1031-9.

Kornowski R, Fuchs S, Shiran A, et al. (2001): Catheter-based electromechanical mapping to assess regional myocardial function: a comparative analysis with transthoracic echocardiography. *Catheter Cardiovasc Interv*; 52:342-347.

Krause K, Schneider C, Lange C, et al. (2009): Endocardial electrogram analysis after intramyocardial injection of mesenchymal stem cells in the chronic ischemic myocardium. *Pacing Clin Electrophysiol* 32:1319-1328.

Krause K SC, Jaquet K, Kuck KH. (2010): Clinical utility of stem cells in cardiovascular diseases. *Stem Cell and Cloning: Advances and Applications*; in press.

Laflamme MA, Murry CE. (2005): Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*; 23:845-856.

Le Blanc K. (2003): Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*; 5:485-9.

Leri A, Kajstura J, Anversa P (2005): Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration, *Physiol Rev* 85:1373-1416.

Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT (2003): Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(13):7808-11.

Lessick J, Hayam G, Zaretzky A, Reisner SA, Schwartz Y, Ben-Haim SA. (2000): Evaluation of inotropic changes in ventricular function by NOGA mapping: comparison with echocardiography. *J Appl Physiol*. 93: 418-26.

Lessick J, Smeets JL, Reisner SA, Ben-Haim SA. (2000): Electromechanical mapping of regional left ventricular function in humans: comparison with echocardiography. *Catheter Cardiovasc Interv*, 50(1): 10-8.

Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, et al. (2007): Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol*; 50:1761-1767.

Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE. (2002): Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 105(17): 2012-8.

Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. (2006): Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367:1747-1757.

Lovell MJ, Mathur A. (2004): The role of stem cells for treatment of cardiovascular disease. *Cell Prolif*; 37:67-87.

Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. (2006): Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*; 355:1199-1209.

Malekan R, Reynolds C, Narula N, Kelley ST, Suzuki Y, Bridges CR. (1998): Angiogenesis in transmyocardial laser revascularization. A nonspecific response to injury. *Circulation*, 98(19 Suppl): II62-5; discussion II66.

Malouf NN, Coleman WB, Grisham JW, Lininger RA, Madden VJ, Sproul M, Anderson PA. (2001): Adult-derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo. *Am J Pathol*; 158:1929-1935.

Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, et al. (2007): Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv*; 69:773-781.

Marchlinski FE, Callans DJ, Gottlieb CD, Zado E. (2000): Linear ablation lesions for control of unmappable ventricular tachycardia in patients with ischemic and nonischemic cardiomyopathy. *Circulation* 101:1288-1296.

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

Menasche P, Hagege A, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. (2001): Autologous skeletal myoblast transplantation for cardiac insufficiency. First clinical case. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 94:180-2. 62.

Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. (2003): Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*; 41:1078-1083 20.

Menasche P. (2005): Stem cells for clinical use in cardiovascular medicine. *Thrombosis and haemostasis.* 94:697-701.

Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. (2006): Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 113:1287-94.

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

Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, et al. (2009): Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart*; 30:2978-2984.

Mills WR, Mal N, Kiedrowski MJ, Unger R, Forudi F, Popovic ZB, Penn MS, Laurita KR. (2007): Stem cell therapy enhances electrical viability in myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 42:304-14.

Moss AJ. (2003): MADIT-I and MADIT-II. *J Cardiovasc Electrophysiol*; 14:S96-98.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. (2004): Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*; 428:664-668.

Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. (2006): Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol*; 47:1777-1785.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. (2004): Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*; 428:664-668.

N Engl J Med. (1983): Risk stratification and survival after myocardial infarction. N Engl J Med 309:331-336.

Naslund U, Häggmark S, Johansson G, Marklund S.L, Reiz S. (1992): A closed-chest myocardial occlusion-reperfusion model in the pig: techniques, morbidity and mortality. Euro Heart J. 13: 1282-89.

Natale A, Breeding L, Tomassoni G, Rajkovich K, Richey M, Beheiry S, Martinez K, Cromwell L, Wides B, Leonelli F. (1998): Ablation of right and left ectopic atrial tachycardias using a three-dimensional nonfluoroscopic mapping system. Am J Cardiol, 82(8): 989-92.

NOGA - Software overview. (2000): Clinical and training course for the biosense technology at the European Surgical Institute in Norderstedt, Biosense Webster Johnsson&Johnsson.

NOGA - Training materials (2003): Cordis Johnsson&Johnsson Company.

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, et al. (2004): Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. Nat Med. 10:494-501.

Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. (2003): Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. Proc Natl Acad Sci U S A; 100:12313-12318.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. (2001): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature; 410:701-705.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. (2001): Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. Proc Natl Acad Sci U S A; 98:10344-10349.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. (2001): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature; 410:701-705.

Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. (2006): Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. N Engl J Med; 355:251-259.

Oyama T, Nagai T, Wada H, et al. (2007): Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. J Cell Biol; 176:329-341.

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatta R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT (2003): Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. Circulation 107:2294-2302.

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, Mesquita CT, Belem L, Vaughn WK, Rangel FO, Assad JA, Carvalho AC, Branco RV, Rossi MI, Dohmann HJ, Willerson JT. (2004): Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. Circulation 110:II213-8.

Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, et al. (2003): Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med*; 349:1893-1906.

Pitt B, Remme W, Zannad F et al. (2003): Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*; 348 (14): 1309-21.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; 284:143-147.

Poncelet AJ, Vercruysse J, Saliez A, Gianello P. (2007): Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation*. 83:783-90.

Price MJ, Chou CC, Frantzen M, Miyamoto T, Kar S, Lee S, Shah PK, Martin BJ, Lill M, Forrester JS, Chen PS, Makkar RR (2006): Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol*. 111:231-9.

Rahimtoola SH. (1989): The hibernating myocardium. *Am Heart J*. 117: 211-21.

Rammos (2009): Effekt einer transendokardialen kathetergestützten Applikation von Stromal cell-derived factor 1 α auf linksventrikuläre Funktion im Herzinfarktmodell im Schwein.

Richard E. Klabunde, PhD, (2011): Cardiovascular Physiology Concepts, Second Edition, Published by Lippincott Williams & Wilkins, ISBN: 9781451113846.

Roell W, Lewalter T, Sasse P, Tallini YN, Choi BR, Breitbach M, Doran R, Becher UM, Hwang SM, Bostani T, von Maltzahn J, Hofmann A, Reining S, Eiberger B, Gabris B, Pfeifer A, Welz A, Willecke K, Salama G, Schrickel JW, Kotlikoff MI, Fleischmann BK. (2007). Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature*. 450:819-24.

Roth DM, Maruoka Y, Rogers J, White FC, Longhurst JC, Bloor CM. (1987): Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 253: H1279-88.

Sakai T, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Tomita S, Kim EJ, Yau TM. (1999): Fetal cell transplantation: a comparison of three cell types. *J Thorac Cardiovasc Surg*;118:715-724.

Sanchez PL et al. (2007): Present and future of stem cells for cardiovascular therapy. *Ann Med* 39:412-427.

Sandri M, Adams V, Gielen S, et al. (2005): Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation*; 111:3391-3399.

Sandri M, Adams V, Gielen S, et al. (2005): Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation* 111(25): 3391-9.

Sasano T, Abraham MR, Chang KC, Ashikaga H, Mills KJ, Holt DP, Hilton J, Nekolla SG, Dong J, Lardo AC, Halperin H, Dannals RF, Marban E, Bengel FM. (2008): Abnormal sympathetic innervation of viable myocardium and the substrate of ventricular tachycardia after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 51(23): 2266-75.

Saurbier B et al. (2007): Krankheiten des Koronarkreislaufs. In: Gerok, W; Huber, C; Meinertz, T; Zeidler, H (Hrsg.) *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. Schattauer, F.K. Verlag GmbH, Stuttgart, S. 138-163.

Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. (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.

Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. (2003): Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 108(18): 2212-8.

Schaper W, Jageneau A, Xhonneux R, (1967): The development of collateral circulation in the pig and the dog heart. *Cardiologica*. 51: 321-35.

Scheunert A, Trautmann A. (1987): Lehrbuch der Veterinärphysiologie. Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg. 211-64, 276-82, 289-300.

Schmidt RF, Thews G. (2000): Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 448-560.

Schuleri KH, Amado LC, Boyle AJ, Centola M, Saliaris AP, Gutman MR, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Zimmet JM, Young RG, Heldman AW, Lardo AC, Hare JM (2008): Early improvement in cardiac tissue perfusion due to mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294(5): H2002-11.

Siebels J und Kuck K.-H. (2001): Ventrikuläre Arrhythmie, S 194, *Innere Medizin (Duale Reihe)*, ISBN 3-13-128751-9.

Smits PC, van Geuns RJ et al. (2003) : Catheter-based intramyocardial injection of autolog skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 42:20 van Geuns RJ, Poldermans D 63-2069.

Smits PC, van Langenhove G, Schaar M, Reijs A, Bakker WH, van der Giessen WJ, Verdouw PD, Krenning EP, Serruys PW. (2002) : Efficacy of percutaneous intramyocardial injections using a nonfluoroscopic 3-D mapping based catheter system. *Cardiovasc Drugs Ther*, 16(6): 527-33.

Smits PC. (2004): Myocardial repair with autologous skeletal myoblasts: a review of the clinical studies and problems. *Minerva Cardioangiol*. 52(6):525-35.

Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. (2007): Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 115:896-908.

Smith RR, Barile L, Messina E, Marban E. (2008). Stem cells in the heart: what's the buzz all about? Part 2: Arrhythmic risks and clinical studies. *Heart Rhythm*. 5:880-7.

St. Louis JD, Hughes GC, Kypson AP, Degrado TR, Donovan CL, Coleman RE, Yin B, Steenbergen C, Landolfo KP, Lowe JE (2000): An experimental model of chronic myocardial hibernation. *Ann Thorac Surg*. 69: 1351-7.

Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. (2003): Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*; 361:45-53.

Steinbeck, G. (1994): Qualitätssicherung in der Kardiologie: Ergometrie/Langzeit-EKG. *Z. Kardiol*. 83, Suppl. 6, 21-25.

Steinbeck G, Hoffmann E, Reithmann C, et al. (2000): Klinische Kardiologie, Springer Verlag; Hrg. Erdmann E. Kap.21 (445-451).

Strauer BE, Kornowski R. (2003): Stem cell therapy in perspective. *Circulation*, 107(7): 929-34.

Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, et al. (2009): Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J*; 30:1313-1321.

Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP (2003): Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*, 361(9351): 47-9.

Unger EF. (2001): Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res*. 49: 497-506.

Verdouw PD, Wolffenbittel BHR, Vander Giessen WJ (1983): Domestic pigs in the study of myocardial ischemia. *Euro Heart J*. 4: 61-7.

Virginijus Valiunas, Sergey Doronin, Laima Valiuniene, Irina Potapova, Joan Zuckerman, Benjamin Walcott, Richard B. Robinson, Michael R. Rosen, Peter R. Brink, and Ira S. Cohen (2004): Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions *J Physiol* 555 (3) 617-626; published ahead of print, doi: 10.1113 /jphysiol.2003.058719.

White FC, Bloor CM. (1986): The pig as a model for myocardial ischemia. In: M. E. TUMBLESON: Swine in biomedical research. Plenum Press, New York, London. 481-90.

White FC, Roth DM, Bloor CM. (1986): The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. *Lab Anim Sci*. 36: 351-6.

Wiggers H, Botker HE, Sogaard P, et al. (2003): Electromechanical mapping versus positron emission tomography and single photon emission computed tomography for the detection of myocardial viability in patients with ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*; 41:843-848.

Wolf T, Gepstein L, Dror U, Hayam G, Shofti R, Zaretzky A, Uretzky G, Oron U, Ben-Haim SA. (2001): Detailed endocardial mapping accurately predicts the transmural extent of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 37(6): 1590-7.

Wollert KC, Drexler H. (2005): Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res*, 96(2): 151-63.

Wollert KC (2010): Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: a critical appraisal. *Nature Reviews Cardiology*; 7(4):204-215.

Wormer E. (2003): Mehr Wissen über Stammzellen Köln, Lingen Verlag.

Xue T, Cho HC, Akar FG et al. (2005): Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 111, 11–20.

Zhang Y.M., Hartzell C., Narlow M., Dudley S.C. et al. (2002): Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation* 106(10):1294-9

Zhang S, Sun A, Xu D, et al. (2009): Impact of timing on efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow stem cells transplantation in acute myocardial infarction: a pooled subgroup analysis of randomized controlled trials. *Clin Cardiol*; 32:458-466.

Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. (2004): Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*; 94:230-238.

Zimmermann WH, Didie M, Doker S, et al. (2006): Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc Res*. 71:419-429.

Internetquellen:

<http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/herzkreislauf/article/518180/khk-weltweit-haeufigste-todesursache.html>

Simon B, Klisch 2012. <http://herzzentrum.online.uni-marburg.de/hzb12.htm>

Statistisches Bundesamt Deutschland. Todesursachen; Sterbefälle insgesamt 2007 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD 10). [Online im Internet]. URL:

<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt.psm1>
[Stand: 10.06.2010, 19:31].

World Health Organisation (WHO): <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>

Danksagung

In erster Linie bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Kuck und Herrn PD Dr. Krause für die Vergabe des Themas und die vorzügliche Förderung der Arbeit.

Besonders danke ich Herrn PD Dr. Krause für die ausgezeichnete Betreuung meiner Doktorarbeit. Er stand mir stets mit wertvollen Ratschlägen und ermunternden Diskussionen zur Seite.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an das gesamte Ärzteteam der kardiologischen und der kardiochirurgischen Abteilung der Asklepios Klinik St. Georg für ihre kollegiale Hilfsbereitschaft und die in jeder Hinsicht freundschaftliche Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch meiner Frau Naderah und meinen vier Kindern Mariam, Dania, Yusuf und Ibrahim für die Geduld und die seelische und moralische Unterstützung während der gesamten Zeit der Fertigstellung meiner Promotionsarbeit.

Schließlich danke ich meinen Eltern und meiner gesamten Familie in Palästina, die mich immer unterstützt haben.

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Ahmed Salhi, erkläre, dass ich die Arbeit mit dem Thema „**Elektrophysiologische Effekte nach intramyokardialer Injektion mononukleare und mesenchymaler Stammzellen bei ischämischer Herzkrankheit: Untersuchungen an Tiermodell und bei Patienten in der Frühphase nach Myokardinfarkt**“ 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 die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

A. Salhi