

Untersuchungen zur Bedeutung der zellulären Integrität für die

Kardiomyoplastie:

eine tierexperimentelle Studie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Matthias Dominik Wimmer

aus Waldbröl

2010

**Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Herr Privatdozent Dr. med. Wilhelm Röll**
- 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. D.C. Wirtz**

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.10.2010

Aus:

Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie

Universitätsklinikum Bonn

Sigmund – Freud Str. 25

53105 Bonn

Direktor: Univ. Professor Dr. med. Armin Welz

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	- 3 -
2	Abkürzungsverzeichnis	- 6 -
3	Einleitung	- 7 -
3.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen	- 7 -
3.2	Zelluläre Kardiomyoplastie	- 11 -
3.3	Stammzellen	- 12 -
3.3.1	Embryonale Stammzellen	- 13 -
3.3.2	ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten	- 15 -
3.3.3	Adulte Stammzellen	- 16 -
3.3.4	Induziert Pluripotente Stammzellen (iPS)	- 17 -
3.4	Embryonale Kardiomyozyten (eCM)	- 18 -
3.5	Biomechanistik der Zellersatztherapie	- 19 -
3.6	Ziele der Arbeit	- 21 -
4	Material und Methoden	- 22 -
4.1	Tiermodell	- 22 -
4.1.1	Mauslinien	- 22 -
4.1.2	Superovulationsinduktion bei Mäusen	- 22 -
4.2	Präparation	- 23 -
4.2.1	Entnahme von Embryonen der Maus	- 23 -
4.2.2	Entnahme der embryonalen Herzen	- 23 -
4.2.3	Selektion EGFP-positiver Herzen	- 24 -
4.2.4	Organentnahme aus der adulten Maus	- 24 -
4.2.5	Perfusionsfixation der entnommenen Herzen	- 24 -
4.3	Gewinnung embryonaler Kardiomyozyten	- 25 -
4.3.1	Zelldissoziation	- 25 -
4.3.2	Bestimmung der Zelldichte	- 26 -
4.3.3	Plattieren der Zellen	- 26 -
4.4	Generierung von Lysaten aus eCM	- 27 -
4.4.1	Lysierung von embryonalen Kardiomyozyten	- 27 -
4.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	- 27 -

4.5	Operative Techniken	- 28 -
4.5.1	Kryoinfarkt	- 28 -
4.5.2	Technische Ausstattung	- 28 -
4.5.3	Intraoperatives Vorgehen	- 29 -
4.5.4	Intraoperative zelluläre Injektion	- 31 -
4.6	Hämodynamik	- 32 -
4.6.1	Visualisierung der Herzfunktion über Druck-Volumen Diagramme	- 35 -
4.6.2	Linksventrikuläre Funktionsuntersuchung	- 36 -
4.6.3	Technische Ausstattung	- 38 -
4.6.4	Intraoperatives Vorgehen	- 38 -
4.7	Histologische Verfahren	- 40 -
4.7.1	Schneiden von Herzen am Kryotom	- 40 -
4.7.2	Sirius-Rot Färbung	- 41 -
4.7.3	Van Gieson Färbung	- 41 -
4.7.4	Immunhistochemischer Proteinnachweis	- 42 -
4.7.5	Antigen-Retrieval	- 42 -
4.8	Antikörper	- 43 -
4.8.1	Vimentin	- 43 -
4.8.2	Perlecan	- 43 -
4.8.3	CD 45	- 43 -
4.8.4	Ki67	- 44 -
4.8.5	Lectin	- 44 -
4.8.6	Alpha smooth muscle actin (asmac)	- 44 -
4.9	Morphometrie	- 45 -
4.10	Statistische Verfahren	- 48 -
5	Ergebnisse	- 49 -
5.1	Transmurale kardiale Schädigung durch Kryoinfarzierung	- 49 -
5.1.1	Makroskopische Lokalisation der Kryoläsion	- 49 -
5.1.2	Mikroskopische Lokalisation der Kryoläsion	- 50 -
5.2	Transplantation von embryonalen Kardiomyozyten	- 51 -
5.2.1	Integration der transplantierten eCM 3,7 und 14 Tage postoperativ	- 51 -
5.2.2	Tranplantierte eCM elongieren zunehmend von Tag 3 zu Tag 14	- 52 -

5.3	Herstellung von eCM- Lysaten	- 53 -
5.3.1	Trypan-blau Färbung	- 53 -
5.3.2	Korrelation von Zellzahl und Proteingehalt	- 54 -
5.4	Morphometrisch-histologische Analyse	- 55 -
5.4.1	Prozentuales Infarktvolumen	- 55 -
5.4.2	Mittelwert der Wanddicke des Infarktgebietes	- 56 -
5.4.3	Infarktoberfläche	- 57 -
5.5	Immunhistochemische Analyse	- 58 -
5.5.1	Vimentin und Ki67 positive Zellen im vitalen Myokard	- 58 -
5.5.2	Nachweis von Fibroblasten und proliferierenden Zellen im Infarkt	- 60 -
5.5.3	Überlappung der Vimentin-Färbung und der Ki67-Färbung	- 62 -
5.5.4	Lectin-Färbung zum Nachweis von Gefäßen im vitalen Myokard	- 63 -
5.5.5	Lectin-Färbung zum Nachweis von Gefäßen im Infarktbereich	- 63 -
5.5.6	Inflammation nach Kryoläsion bzw. zellulärer Kardiomyoplastie	- 65 -
5.5.7	Nachweis von glatter Muskulatur über die α smac-Färbung	- 67 -
5.5.8	Nachweis von Extrazellulärmatrix am Beispiel des Perlecan Proteins	- 68 -
5.5.9	Kontrollen	- 70 -
5.6	Hämodynamische Analyse	- 71 -
5.6.1	Herzfrequenz	- 71 -
5.6.2	Schlagvolumen	- 72 -
5.6.3	Herzzeitvolumen	- 73 -
5.6.4	Ejektionsfraktion	- 74 -
5.6.5	Enddiastolisches Volumen	- 75 -
5.6.6	Enddiastolischer Druck	- 76 -
5.6.7	Minimale intraventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit	- 77 -
5.6.8	Arterielle Elastance	- 78 -
6	Diskussion	- 79 -
7	Zusammenfassung	- 89 -
8	Literaturverzeichnis	- 91 -
	Danksagung	- 106 -

2 Abkürzungsverzeichnis

α -MHC	<i>alpha-myosin heavy chain</i> (schwere Myosinkette)	FSH	Follikel stimulierendes Hormon
α smac	<i>alpha-smooth muscle actin</i> (Aktin des glatten Muskels)	HE	Hämatoxylin / Eosin
ACE	angiotensin-converting- enzyme	hES	humane, embryonale Stammzelle
AMI	akuter Myokardinfarkt	HFSS	<i>heart failure survival score</i>
ASS	Acetylsalicylsäure	HSC	hämatopoetische Stammzelle
BSA	Bovines Serum Albumin	HZV	Herzzeitvolumen
CD	<i>cluster of differentiation</i>	IMDM	<i>Iscove's modified dulbecco's medium</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	iPS	induziert-pluripotente Stammzelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>	KHK	koronare Herzkrankheit
dP/dtmin	minimale intraventrikuläre Druckanstiegs- geschwindigkeit	LAD	<i>left anterior descending coronary artery</i>
Ea	arterielle Elastance	LH	lutheinisierendes Hormon
EB	<i>embryonic body</i>	LIF	<i>leukaemia inhibiting factor</i>
eCM	embryonale Kardiomyozyten	MEF	murine, embryonale Fibroblasten
EDP	enddiastolischer Druck	MSC	mesenchymale Stammzelle
EDV	enddiastolisches Volumen	NSC	neuronale Stammzellen
EF	Ejektionsfraktion	PBS	Phosphat gepufferte Saline
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	PFA	Paraformaldehyd
EPC	endotheliale Progenitorzellen	PMSG	<i>pregnant mare serum gonadotropin</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen	RNA	Ribonucleinsäure

3 Einleitung

3.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in den Industrienationen sowie mit zunehmendem Industrialisierungsgrad auch in den Schwellenländern die Haupttodesursache mit enormer individueller und gesellschaftlicher Relevanz dar. Der Anteil an den diagnostizierten Todesursachen lag 2006 in Deutschland bei 43,7%, die Lebenszeitprävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen bei ca. 30% für Männer und 15% für Frauen. Insbesondere die chronische, ischämische Herzerkrankung (KHK) nimmt mit 9,5% aller Todesfälle eine Ausnahmestellung ein. 2006 verstarben in Deutschland 144.189 Patienten an der KHK, 64.796 (7,3%) an einem akuten Myokardinfarkt (AMI) (Statistisches Bundesamt, 2007). Pathomechanistisch kommt es zu einer makroangiopathisch-arteriosklerotischen Gefäßveränderung. Begünstigend wirken neben einer genetischen Prädisposition die Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Hypertonie, Adipositas, Rauchen, Diabetes Mellitus, Alkohol und Stress. Die arteriosklerotischen Läsionen, instabile Plaques und Plaquerupturen führen im Herzen zu Gefäßthrombosen mit einer koronaren Minderperfusion bzw. einem Perfusions-Utilisations-Mismatch. Weitere seltene Ursachen myokardialer Minderperfusion mit konsekutivem Gewebsuntergang sind 1) Endokarditis assoziierte Embolien, 2) die disseminierte, intravasale Koagulopathie oder 3) lang anhaltende Vasospasmen. Die Verlegung der Koronararterien ist außerdem durch Hämorrhagien, Tumoren am Herzen oder Gefäßdissektionen möglich. Als Folge der Minderperfusion kommt es nach einer Ischämiezeit von 15 bis 30 Minuten zur kardiomyozytären Malfunktion und im weiteren Verlauf zu einer irreversiblen Gewebeschädigung. Die betroffene Myokardregion wird dann innerhalb weniger Wochen durch eine fibrotische Narbe ersetzt (Braunwald und Pfeffer, 1991). Das umliegende kompensatorisch hypertrophierende Myokard (Cheng et al., 1996) ist einem erhöhten mechanischen Stress (Olivetti et al., 1990) ausgesetzt und kann zwar kurzfristig durch die Hypertrophie die Schlagkraft steigern, führt aber aufgrund der herabgesetzten Kompensationsfähigkeit gegenüber erneuter Belastung zur Herzinsuffizienz. Dies ist unabhängig von der kausalen Erkrankung (Sarmiento-Leite et al., 2001). Nach einem AMI kommt es außerdem häufig zu tachyarrhythmischen Erregungsleitungsstörungen, die die Mortalität ebenfalls ungünstig beeinflussen.

Bei Patienten, die wegen KHK, AMI oder allgemein terminaler Herzinsuffizienz behandelt wurden, ist häufig postinzidentuell eine lebenslange Pharmakotherapie indiziert. Es besteht während der akuten Phase kurzfristig die Möglichkeit einer Inotropiesteigerung mittels der i.v. Gabe von Katecholaminen. Die weitere langfristige medikamentöse Behandlung mit ACE-Hemmern, β -Blockern, Statinen und Thrombozytenaggregationshemmern (z.B. ASS oder Clopidogrel) ist in ihrer Kreislauf unterstützenden Wirkung jedoch begrenzt und bleibt symptomatisch. Mittels Ballonangioplastie oder koronarer Bypassoperation kann bei vorliegender KHK die myokardiale Perfusion des noch vitalen Myokards verbessert werden. In erster Linie kurz und mittelfristig als Überbrückung bis zur Herztransplantation, aber auch langfristig als sogenannte „*destination therapy*“ sind mechanische Kreislaufunterstützungssysteme einsetzbar (El-Banayosy et al., 1999). Diese sind aber durch enormen technischen und finanziellen Aufwand gekennzeichnet (Couper et al., 1999). Insbesondere auch die häufigen unter Einsatz auftretenden Komplikationen wie Blutungen oder Infektionen limitieren letztendlich die Einsatzdauer (Roell et al., 1997). Die Lasermyokardrevaskularisation wird als mögliche therapeutische Option kontrovers diskutiert (Schofield et al., 1999).

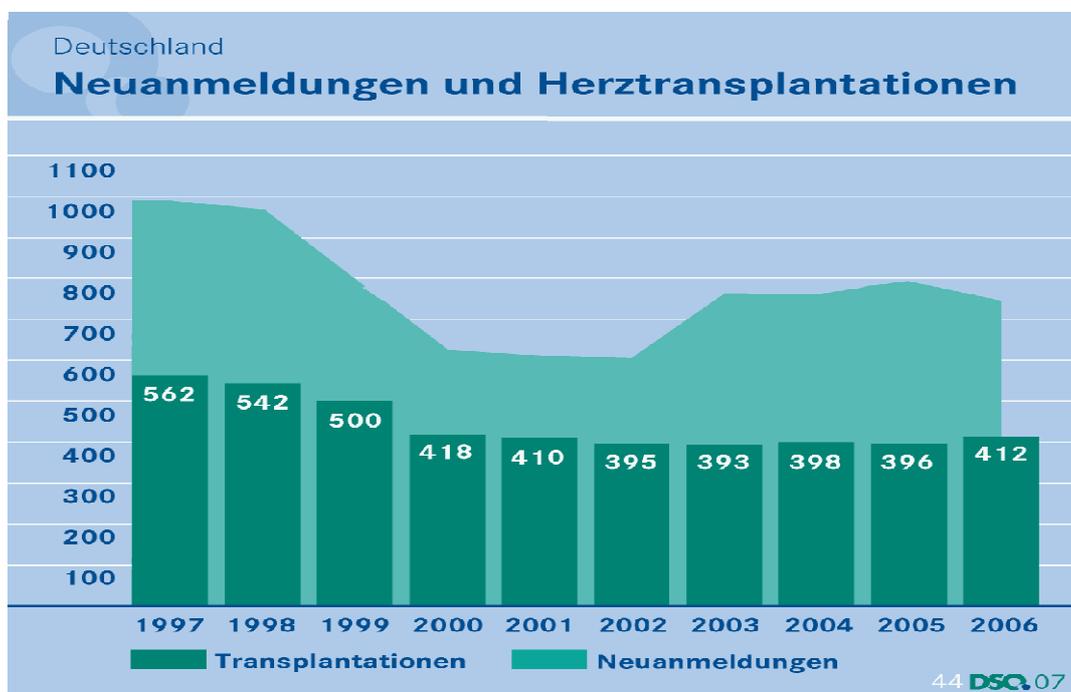


Abbildung 1 Neuanmeldungen und Herztransplantationen

Neuangemeldete Patienten zur Herztransplantation im Vergleich zu durchgeführten Transplantationen in Deutschland von 1997 bis 2006. Trotz strenger Indikationsstellung ist ein deutlicher Überschuss an potentiellen Empfängern erkennbar (Quelle: Deutsche Stiftung Organspende, 2007).

Aufgrund der Abnahme von Lebensqualität und -erwartung bleibt in letzter Instanz nach Abwägung der oben genannten pharmakologischen und interventionellen therapeutischen Optionen bislang nur die Herztransplantation als langfristig erfolgreiche Therapie (Fraund et al.; 1999). Bei Herztransplantationen gibt es trotz enger Indikationsstellung in Deutschland jedoch eine enorme Diskrepanz zwischen den zur Verfügung stehenden Spenderherzen und den benötigten Transplantaten. Den 412 im Jahr 2006 transplantierten Herzen stand ein Bedarf in der Bundesrepublik von ca. 1000 Spenderherzen gegenüber. Im gleichen Jahr wurden zusätzlich 745 Patienten neu für eine Herztransplantation angemeldet.

Dieses Missverhältnis zwischen Donorherzen und potentiellen Empfängern nimmt auch global zu, so dass insgesamt ca. 30% der akzeptierten Patienten auf der Transplantationswarteliste versterben (Fukushima et al., 1999). Innerhalb eines Jahres nach Akzeptierung für eine Transplantation und einem Hochrisiko Score nach HFSS (heart failure survival score) liegt die Mortalität ebenfalls bei deutlich über 30%.

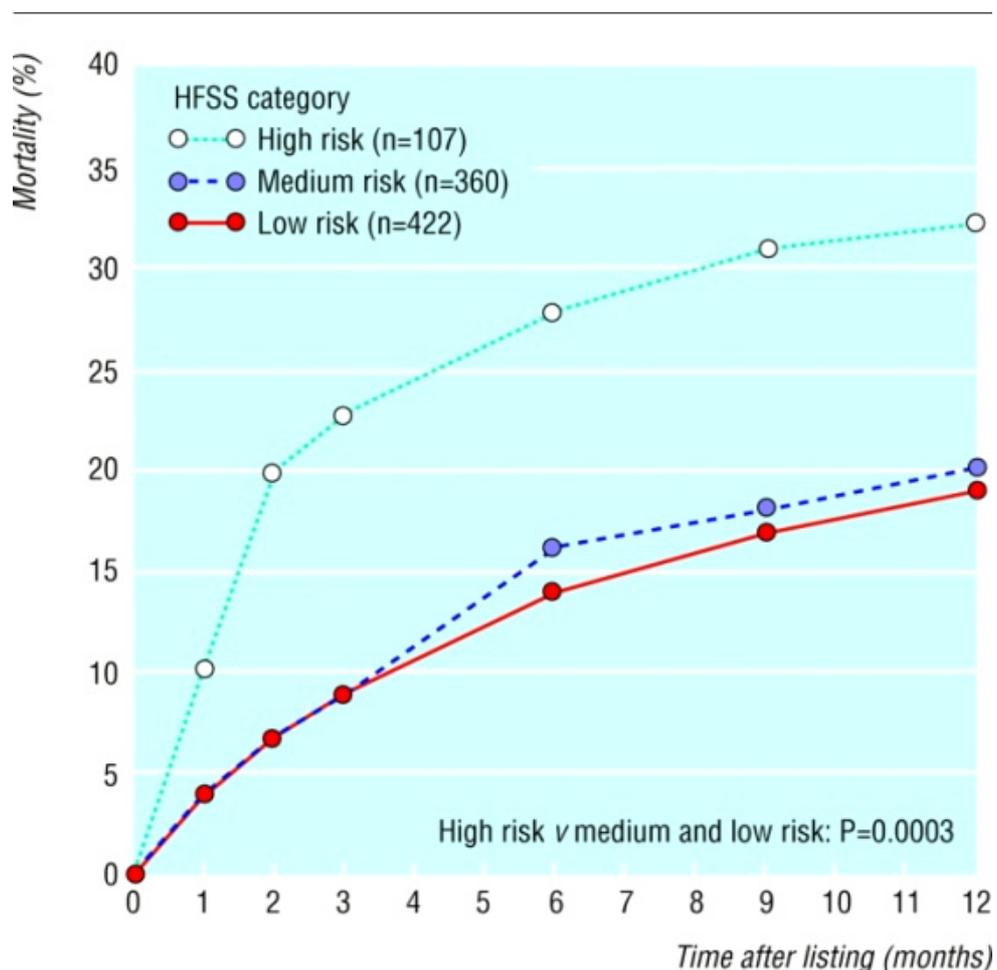


Abbildung 2 Mortalität auf der Warteliste nach HFSS

Mortalität von Patienten auf der Warteliste für Herztransplantationen geschichtet nach Schweregrad der Herzinsuffizienz (Quelle: Deng et al., 2000).

Der Therapieerfolg der kardial transplantierten Patienten ist differenziert zu betrachten:

Bei orthotopen Transplantationen für den Zeitraum von 1993 bis 1995 liegt nach dem International Register die Ein-Jahres-Überlebensrate bei ca. 84%, die 5-Jahres-Überlebensrate bei 63 %, die 10-Jahres-Überlebensrate bei nur 43 %, jeweils für die Zeiträume von 1982 bis 1995 (Hetzer, 2006). Gründe hierfür sind in erster Linie Abstoßungsreaktionen, Infektionen und die Transplantatvaskulopathie (Fraund et al., 1999; Schwaiblmair et al., 1999).

Das prä- und perioperative Transplantationsmanagement ist strukturierter und effizienter geworden. Bei der Beurteilung des Fortschritts der Transplantationen ist allerdings zu berücksichtigen, dass das Aufnehmen von kritisch kranken Patienten auf die Warteliste und der Einsatz von so genannten Marginal-Donorherzen, bedingt durch die zunehmende Knappheit der Spender, dazu geführt hat, dass sich das Therapieergebnis postoperativ nicht weiter verbessert hat (Deng et al., 2000).

Der bei den terminal herzinsuffizienten Patienten verminderte Allgemeinzustand wird zudem durch die schwerwiegenden Nebenwirkungen der transplantations-assoziierten Immunsuppressivgabe beeinträchtigt und die Lebensqualität der Patienten so teilweise stark verschlechtert (Schwaiblmair et al., 1999; Crespo-Leiro et al., 2008).

Im Experimentalstadium befinden sich noch Untersuchungen zu transgenen, porcinen Xenografts (Schmoeckel et al., 1998). Ob diese mittel- oder langfristig Einsatz in der Klinik finden, ist jedoch trotz erster funktionell viel versprechender Ergebnisse fraglich. Die eventuell mögliche Übertragung porciner Retroviren (Martin et al., 1998) auf den Menschen spielt hierbei eine wesentliche Rolle, obgleich diese in einigen Studien durch RNA-Interferenz teilweise unterdrückt werden konnte (Paradis et al., 1999; Patience et al., 1998).

3.2 Zelluläre Kardiomyoplastie

Bei Betrachtung des oben beschriebenen Ungleichgewichts zwischen der Anzahl zur Verfügung stehender Donorherzen und der deutlich größeren Zahl an möglichen Empfängern rückt bei der Behandlung der terminalen Herzinsuffizienz, in erster Linie nach Ausschöpfung aller pharmakologischer Therapieoptionen, als mögliche zusätzliche therapeutische Anwendung die tierexperimentell erforschte, aber auch in klinischen Studien untersuchte zelluläre Kardiomyoplastie in den Blickpunkt (Acker et al., 1999). Da es sich bei adulten Kardiomyozyten um terminal differenzierte Zellen handelt, kann das irreversibel ischämisch geschädigte Myokard vom Herzen selbst funktionell und morphologisch nicht oder nur bedingt ersetzt und regeneriert werden (Pfeffer und Braunwald, 1990). Es konnte zwar gezeigt werden, dass auch Herzzellen proliferieren können, allerdings ist dieser Effekt, vermutlich aufgrund der sehr geringen Proliferationsrate ohne physiologisch-regenerative Relevanz (Kajstura et al., 1998; Beltrami et al., 2001). Daher wird bei der Kardiomyoplastie in die kardiale Läsion, das Infarktgebiet oder übergeordnet in das insuffiziente Myokardareal eine Zellsuspension appliziert. Dies kann direkt durch Injektion in das Gewebe oder indirekt über Perfusion der Koronarien geschehen (Roell et al., 2002; Suzuki et al., 2000). Die Anforderungen an die verwendete Zellpopulation sind jedoch hoch. Die Zellen, die zur Injektion gebracht werden, sollten im Idealfall folgende Kriterien aufweisen:

Die Zellen müssten

- 1) immunkompatibel,
- 2) kontraktile,
- 3) elektrophysiologisch koppelnd,
- 4) aus sich selbst heraus proliferierend,
- 5) non-onkogen und non-teratogen sein (Murry et al., 2005).

Ein weiteres wichtiges Kriterium an die ideale Zelle ist die ethische Unbedenklichkeit bei der Gewinnung.

Im Folgenden werden verschiedene Zelltypen charakterisiert, die experimentelle Anwendung gefunden haben.

3.3 Stammzellen

Der menschliche Körper verfügt über ca. 200 verschiedene Zellarten, die sich speziell an ihre jeweiligen Aufgaben angepasst haben. Zellen, die diese Ausdifferenzierung und Subspezialisierung noch nicht vollzogen haben, bezeichnet man als Stammzellen. Sie verfügen über die einzigartige Möglichkeit, Tochterzellen zu generieren und sich dabei selbst unbegrenzt zu erneuern und zu erhalten. Die Tochterzellen können sowohl zunehmend ausdifferenzierter sein als auch selbst über die Eigenschaften einer Stammzelle verfügen. Auch eine Entdifferenzierung ist möglich (Koerstenbauer et al., 2006).

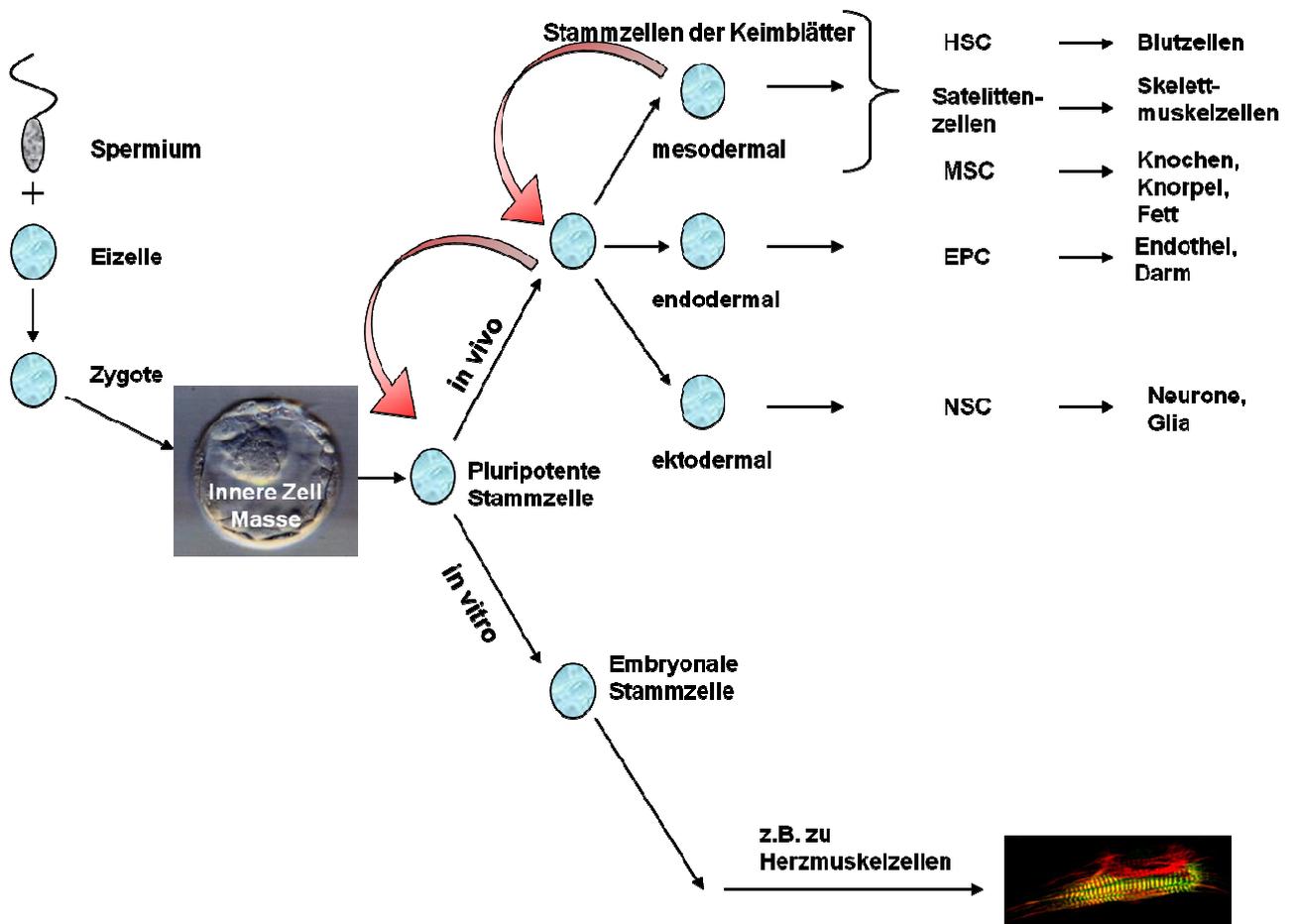


Abbildung 3 Stammzellbaum, Plastizität, Differenzierung und Dedifferenzierung

Aus der befruchteten Eizelle entsteht über die Blastozyste die pluripotente Stammzelle. *In vivo* differenziert die Zelle in adulte Stammzellen, weiter in die verschiedenen Keimbältern und schließlich in die einzelnen spezialisierten Zelltypen. Auch eine Dedifferenzierung ist möglich. *In vitro* lässt sich die embryonale Stammzelle gezielt reproduzieren und ausdifferenzieren (Nach Koerstenbauer et al., 2006; Dimmeler et al., 2005; Dimmeler et al., 2008; Breitbach 2006).

Die Zygote, als Zelle, welche die komplette Embryogenese durchläuft, stellt dabei die erste Form einer Stammzelle dar. Aus ihr können alle Zellen des Organismus entstehen, man spricht hier von einer totipotenten Stammzelle. Im Laufe der Ausdifferenzierung der Tochterzellen lässt die Fähigkeit zur Subspezialisierung in jede beliebige Zelle sukzessive nach: Von der totipotenten über die pluri- und multipotente, hin zur unipotenten Zelle, die nur noch eine bestimmte Zellart hervorbringen kann. Durch das Differenzierungspotential und das ontogenetische Alter lassen sich verschiedene Typen von Stammzellen charakterisieren (Anderson et al., 2001; Morrison et al., 1997).

3.3.1 Embryonale Stammzellen

Seit ihrer erstmaligen Isolierung und Etablierung im Jahre 1981 durch Evans et al. sind embryonale Stammzelllinien (ES-Zelllinien) Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen von Fachgruppen verschiedenster Subdisziplinen der Biomedizin. ES-Zellen verfügen über ein pluripotentes Differenzierungspotential oder auch eine pluripotente Plastizität (Odorico et al., 2001). Das bedeutet, sie können sich in Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) und damit in die verschiedenen Zelltypen des Körpers differenzieren, wie z.B. in funktionelle Kardiomyozyten (Kolossoff et al., 2006; Laflamme und Murry, 2005). ES-Zellen werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert. Alternativ können embryonale Keimbahnzellen zudem aus der Keimbahnleiste isoliert werden. *In vitro* werden die Zellen auf embryonalen Fibroblasten, so genannten *feeder*-Zellen (*murine embryonal fibroblasts*; MEFs) kultiviert, um die Zellen in einem undifferenzierten Stadium zu erhalten wird dem Kulturmedium *leukaemia inhibiting factor* (LIF) zugesetzt. Durch Änderung der zellkulturellen Bedingungen kommt es gemäß der Pluripotenz zu einer Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter. Wird die Zellsuspension als hängende Tropfen (Wobus et al., 1991; Boheler et al., 2002) ausplattiert, aggregieren sich die Zellen gemäß der Schwerkraft zu so genannten *embryoid bodies* (EBs) (Evans. 1981). Hierbei bilden sich unter anderem auch autorhythmogen schlagende Herzzellaggregate (Doetschman et al., 1985; Robbins et al., 1990).

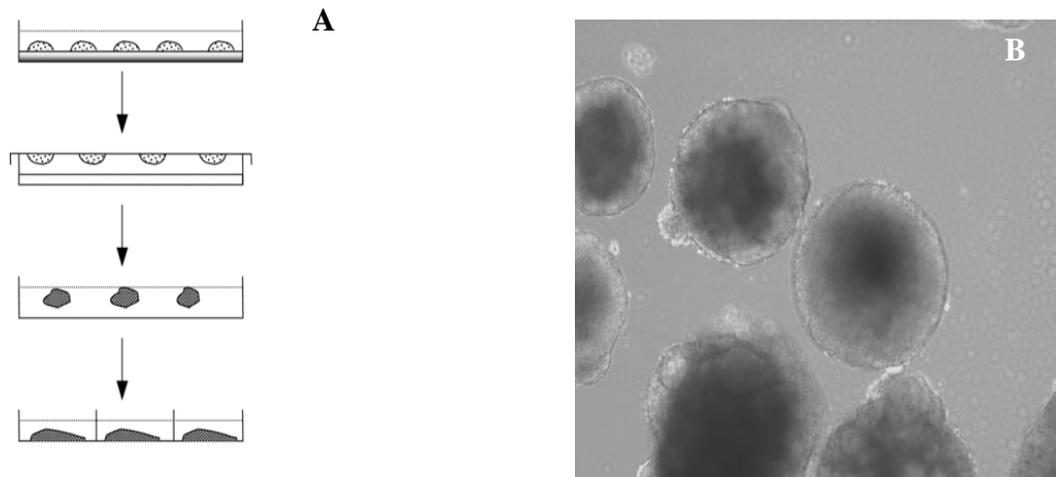


Abbildung 4 Embryoid bodies

Gemäß der Schwerkraft haben sich nach dem hängenden Tropfen Protokoll (Abb. 4 A) embryoid bodies aggregiert (Abb. 4 B). (Quellen: Abb. 4 A: Pandur P. Biol Cell. 2005 97:197-210; Abb. 4 B: Odorico Lab; U of Wisconsin)

ES-Zellen und insbesondere humane ES-Zellen (hES) sind von großem Interesse für die Etablierung von spezialisiert differenzierten Zellen für eine potentielle Zellersatztherapie. 1998 gelang die erstmalige Etablierung von hES-Zelllinien mit ähnlichen Eigenschaften, wie sie aus murinen Studien bekannt waren. Die Gewinnung erfolgte aus überschüssigen Embryonen nach *in vitro* Fertilisation (Thomson et al., 1998) und diese hES-Zelllinien konnten *in vitro* zu spezifischen Zellen ausdifferenziert werden (Schuldiner et al., 2000; Odorico et al., 2001). Die induzierte und gerichtete Differenzierung über Zytokine ist hierbei Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Zudem wurden 2002 von Hochedlinger und Jaenisch im Tierexperiment erstmals Blastozysten über nukleären Transfer erzeugt und hieraus murine ES-Zellen isoliert. Bei hES entstehen so neue Ansatzpunkte für die Umgehung der Allogenität und der damit verbundenen Immunreaktion nach Transplantation. Da hES-Zellen nach *in vitro* Fertilisation gewonnen werden, ist die Forschung mit hES-Zellen und von hES-Zellen abstammenden Zelllinien ethisch sehr umstritten. Den möglichen fundamentalen, positiven Impulsen für die Forschung und die Therapie von bisher kausal nicht behandelbaren Krankheiten steht eine emotional oftmals sehr aufgeladene Debatte über den Würdeschutz des menschlichen Lebens gegenüber (Sugarman, 2008). Diese auch religiös geprägte Diskussion (Heinemann und Honnefelder, 2002) und die restriktive Gesetzeslage in Deutschland zur Forschung mit hES-Zellen führen dazu, dass die Forschung mit hES-Linien in Deutschland im Vergleich zu anderen medizinisch

forschungsstarken Industrienationen zur Zeit zunehmend in den Hintergrund tritt. Die am 01.04.2008 umgesetzte Novellierung und Liberalisierung des im internationalen Vergleich sehr restriktiven Stammzellgesetzes und die Verschiebung des Stichtages für den Import von ES-Zelllinien auf den 01.05.2007 durch den Deutschen Bundestag bringen neue Impulse zur Forschung an hES-Zellen - auch im kardiovaskulären Bereich - mit sich.

3.3.2 ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten

Wie bereits beschrieben verfügen undifferenzierte ES-Zellen über ein pluripotentes Differenzierungspotential und eine gute Vermehrbarkeit, beides Grundlagen für einen Einsatz in der Zellersatztherapie. Bei Implantation von undifferenzierten ES-Zellen in einen syngenen Empfänger bilden sich allerdings Teratokarzinome aus (Erdo et al., 2003; Kolossov et al., 2006).

Wie oben beschrieben, können ES-Zellen auch in funktionsfähige Kardiomyozyten ausdifferenzieren (Menard et al., 2005). Zur Selektion dieser wurden verschiedene transgene Zelllinien generiert, welche z.B. *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) sowie die Resistenz gegenüber dem Aminoglykosid Neomycin unter dem herzspezifischen Promotor α -MHC exprimieren (Klug et al., 1996). In nachfolgenden Protokollen wurde auch die Resistenz gegenüber dem translationsinhibierenden Nukleosidantibiotikum Puromycin in den ES-Zell Klon als Selektionsmarker verwendet (Kolossov et al., 2006). Hieraus konnten nach dem „hängenden Tropfen Protokoll“, zellkultureller Aufarbeitung und der Aufreinigung und Selektion unter dem entsprechenden Antibiotikum ES-Zell-abgeleitete Kardiomyozyten selektiert werden (Boheler et al., 2002). Unter immunhistochemischen und zellbiologischen Kontrollen wurde die Reinheit der gewonnenen Kardiomyozyten auf $\geq 99\%$ taxiert (Kolossov et al., 2006). Die Zellen konnten biochemisch und elektrophysiologisch klar als Kardiomyozyten charakterisiert werden (Muller et al., 2000; Kehat et al., 2001, Kolossov et al., 2006). Nach Kardiomyoplastie mit ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten und Co-transplantation einer äquivalenten Menge Fibroblasten bildet sich ein funktionelles Synzytium. ES-Zell-abgeleitete Kardiomyozyten integrieren sich auf Dauer stabil in die kardiale Läsion, wirken funktionell kardioregenerativ und sind Gegenstand unterschiedlichster Forschungsansätze, insbesondere zur Arrhythmogenität nach AMI (Fleischmann et al., 1998; Kolossov et al., 1998; Roell et al., 2007).

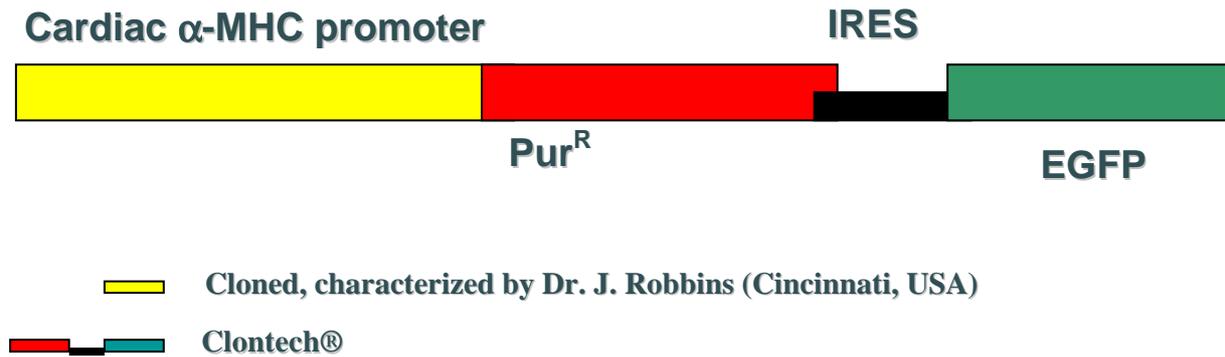


Abbildung 5 Vektorkonstrukt

Unter dem herzspezifischen α -MHC Promotor wird durch Verwendung einer internen ribosomalen Eintrittsstelle sowohl die Puromycin Resistenz als auch EGFP exprimiert.

3.3.3 Adulte Stammzellen

Postnatal finden sich im Organismus ebenfalls Stammzellen, die spezialisierte Zellen hervorbringen können. Diese adulten oder somatischen Stammzellen finden sich unter anderem im Knochenmark, im Blut, in der Haut, im Gehirn, in der Leber, in der Nabelschnur, im Nabelschnurblut, im Fettgewebe und im Pankreas.

Da in jedem Organismus individuelle adulte Stammzellen zur Verfügung stehen, welche auch ethisch unbedenklich verwendet werden können, bietet sich diese Zellpopulation zum autologen *tissue engineering* an. Eine Tendenz zur Entartung dieser im Vergleich zu ES-Zellen weiter differenzierten Zellen, z.B. in Lymphome, Myelome oder Sarkome, wird zudem nur selten beobachtet.

Blutbildende, hämatopoetische Stammzellen (HSCs), die gefäßbildenden endothelialen Progenitorzellen (EPCs) sowie die mesenchymbildenden mesenchymalen Stammzellen (MSCs) kommen im Knochenmark vor. Das Transdifferenzierungspotential, insbesondere über das vordifferenzierte Keimblatt hinaus, ist aber ausgesprochen umstritten (Murry, 2004; Chen, 2004; Nygren, 2004). Von der Arbeitsgruppe um P. Anversa wurde 2001 die myokardiale Transdifferenzierung von HSCs beschrieben (Orlic et al, 2001a; Orlic et al, 2001b; Kocher et al. 2007). Es gibt aber auch viele Stimmen, die diese Transdifferenzierung bestreiten und postulieren, dass z.B. das Auftreten einzelner Herzzellen mit Y-Chromosomen in weiblichen Empfängern nach männlicher Knochenmarkstransplantation (Deb et al., 2003) u.a. durch vereinzelte Zellfusionsereignisse zu erklären sein könnte (Balsam et al., 2004; Murry et al., 2004; Kolossov et al., 2006; Nygren et al., 2004). Das Phänomen der Zellfusion ist derzeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen (Nygren et al., 2008). Die postulierte

Verbesserung der kardialen Funktion im Allgemeinen und der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) im Speziellen nach kardiomyoplastischem Einsatz wurde in zahlreichen klinischen Studien untersucht und versucht zu reproduzieren (Hamano et al., 2001, Stamm et al., 2003; Schächinger et al., 2006; Assmus et al., 2006; Lunde et al., 2008). Nach randomisierten Doppelblindstudien zur Applikation über die Koronararterien (Janssens et al., 2006) oder zur Mobilisierung (Zohlhofer et al., 2006) konnte jedoch kein positiver Effekt auf die Linksherzfunktion festgestellt werden. Dennoch ist der Diskurs hierüber nicht endgültig abgeschlossen (Phinney, Prockop; 2007). Klinische Studien werden momentan fortgeführt, obgleich auch potentielle Risiken (Vulliet et al., 2004, Villa et al., 2007) wie z.B. durch intramyokardiale Kalzifizierung beschrieben sind (Breitbach et al. 2007). Aus diesem Grund wird zur engmaschigen Kontrolle, insbesondere auch unter rhythmogenen Gesichtspunkten aufgerufen.

3.3.4 Induziert Pluripotente Stammzellen (iPS)

2006 gelang es der Gruppe um Yamanaka erstmals, humane adulte Zellen retroviral induziert *in vitro* in einen quasi-embryonalen Zustand zurückzusetzen. Im Experiment konnten aus diesen Zellen Nervenzellen und in neuesten Studien auch funktionale Kardiomyozyten (Mauritz et al., 2008) redifferenziert werden (Takahashi und Yamanaka, 2006; Yamanaka, 2007). Einer Forschergruppe gelang die Generierung von fertilen Mäusen, die direkt von iPS-Zellen abgeleitet waren. Dies gilt als ein Schlüsselkriterium zur Vergleichbarkeit mit embryonalen Stammzellen. Als einer der ersten klinischen Ansätze konnte von der Arbeitsgruppe um Jaenisch Symptome des Morbus Parkinson durch iPS abgeleitete Nervenzellen in der Ratte behandelt werden (Wernig et al., 2008). Von derselben Arbeitsgruppe konnte im Dezember 2007 eine Sichelzellanämie im Mausmodell mit iPS behandelt werden (Hanna et al., 2007).

Dieser Ansatz der induzierten Stammzeleigenschaften wird als möglicher Wendepunkt in der *tissue engineering* Forschung gewertet. Da die Forschung an iPS-Zellen derzeit aber noch in den Anfängen steht, ersetzt sie andere Ansätze nicht (Hyun et al., 2007).

3.4 Embryonale Kardiomyozyten (eCM)

Vordifferenzierte, embryonale Kardiomyozyten werden im Mausmodell durch die Entnahme embryonaler Herzen gewonnen. Die Ventrikel werden isoliert und zu Einzelzellen dissoziiert. Diese Zellen besitzen nachfolgend noch bedingt die Möglichkeit, zu proliferieren (Armstrong et al.; 2000) und differenzieren schließlich in einen adulten Phänotyp aus. Im Tiermodell wurde für diesen Zelltyp zudem in mehreren Studien gezeigt, dass die Transplantation in geschädigtes Myokard die linksventrikuläre Funktion verbessern kann (Roell et al., 2002; Reinecke et al., 1999). Obwohl ein Großteil der injizierten Zellen aufgrund der Myokardischämie nach Transplantation abstirbt (Zhang et al., 1996), kann eine stabile reproduzierbare Integration der transplantierten eCM in das vorgeschädigte Myokard (Etzion et al.; 2001; El Oakley et al.; 2001) erreicht werden. Ferner wurden nach Transplantation von eCM die einschneidendsten hämodynamischen Effekte beobachtet, weshalb dieser Zelltyp für die nachfolgend beschriebenen Experimente verwendet wurde.

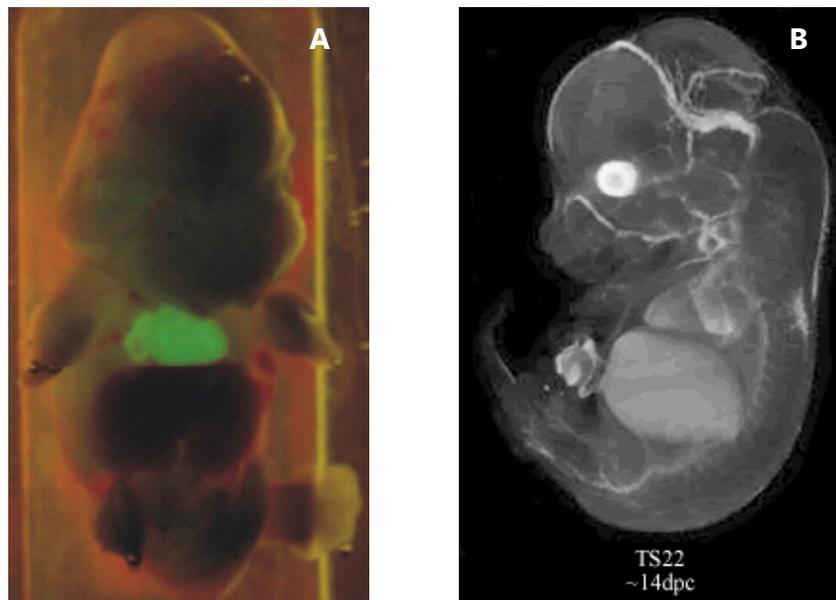


Abbildung 6 transgener Embryo mit α -actin-EGFP Expression

Abb. 6 A zeigt einen transgenen murinen Embryo in Rückenlage unter Fluoreszenzbeleuchtung. Das transgene Herz exprimiert EGFP und leuchtet unter der Fluoreszenzlampe grünlich. 6 B zeigt einen anatomisch fixierten Schnitt durch einen murinen Embryo an Tag E14. (Quellen: 6 A: Roell et al., 2002a; 6 B: Edinburgh mouse atlas project)

Bei dem in Abb. 6 gezeigten Embryo exprimieren die Kardiomyozyten EGFP unter einem herzspezifischen Promotor (human cardiac α -actin), wodurch die Zellen nach Transplantation *in vivo* unter der Fluoreszenzlampe sichtbar gemacht werden.

3.5 Biomechanistik der Zellersatztherapie

Wie beschrieben gibt es verschiedene Zellpopulationen, die bei der tierexperimentellen Kardiomyoplastie und partiell auch in humanen Phase-I und Phase-II Studien Verwendung gefunden haben. Wie genau jedoch z.B. embryonale Kardiomyozyten oder ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten zu einer Verbesserung der linksventrikulären Leistung führen, ist nicht abschließend geklärt. Neben der aktiven Beteiligung an der myokardialen Kontraktion, sowie der Integration in den Erregungsleitungsverbund bei Connexin 43 exprimierenden Zellen (Roell et al., 2007; Kolossov et al., 2006), spielen sicherlich auch passive Effekte bei der zellulären Kardiomyoplastie eine große Rolle. Wie bereits erwähnt, proliferiert nur eine sehr geringe Fraktion der adulten Kardiomyozyten. Bei diesen Zellen könnte es sich um kardiale Stammzellen handeln, die in den letzten Jahren von verschiedenen Gruppen beschrieben worden sind (Beltrami et al., 2003; Martin et al., 2004; Dawn et al., 2005). Da die Zellen jedoch keine homogene Zellpopulation darstellen und ihre *in vivo* Existenz umstritten ist, bleibt die physiologische und biochemische Funktion dieser Zellen weitgehend ungeklärt. Die mögliche Aktivierung der proliferierenden Zellen, unter Umständen der gewebebeständigen Herzstammzellen, könnte jedoch ein therapeutischer Ansatzpunkt sein. In diesem Zusammenhang wurde von Ebel et al. 2007 die Zytokinliberation vor und nach der Injektion von skeletalen Myoblasten und ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten verglichen. Der Vergleich ist insofern besonders interessant, da skeletale Myoblasten nicht in der Lage sind, Herzzellen zu bilden. Es zeigte sich in der Studie, dass beide Zellpopulationen zu einer lang anhaltenden Verbesserung der linksventrikulären Funktion und der Gewebearchitektur führten. Die Gruppe postulierte, dass der funktionell und morphologisch gezeigte Gewinn teilweise von der Integration der transplantierten Zellen in das intakte Herzgewebe, aber auch unterhalb der Zellebene, von der Freisetzung von kardioaktiven Zytokinen abhängt. Diese Effekte werden als parakrine Effekte bezeichnet. Der Begriff parakrin leitet sich etymologisch aus dem Griechischen ab, aus para: „daneben“ und krinein: „trennen“. Mit parakrin bezeichnet man daher den Sekretionsmodus von Einzelzellen, welche Hormone,

Wachstumsfaktoren, Zytokine o.ä. direkt auf die Zellen oder den Zell- und Gewebeverband in ihrer unmittelbaren Umgebung sezernieren. Dies ist in sofern wichtig, da zelluläre Differenzierungsvorgänge oftmals durch parakrine Sekretionsvorgänge gesteuert oder beeinflusst werden (Gnecchi et al. 2005; Behfar et al., 2004). In wieweit Zytokine jedoch etwa herzeigene Progenitor- oder Stammzellen aktivieren können, ist ungeklärt (Barile et al., 2007). Zellverfolgungstechniken werden zur Klärung empfohlen, wie sich implantierte Stammzellen *in vivo* verhalten und wie sie zur funktionellen Verbesserung beitragen (Braun und Martire, 2007).

3.6 Ziele der Arbeit

Der wissenschaftliche Kenntnisstand zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen durch zelluläre Kardiomyoplastie hat sich in den letzten Jahren enorm verbessert. Es kamen verschiedene Zelltypen im Tierexperiment und zum Teil auch in klinischen Studien zum Einsatz. Im Mausmodell zeigte sich dabei, dass sich z.B. intakte embryonale Kardiomyozyten nach Transplantation in eine artifizielle kardiale Läsion integrieren und zu einer Verbesserung der Herzfunktion führen oder beitragen. Der Mechanismus, der zur Verbesserung der Herzfunktion führt, ist bislang jedoch nicht endgültig geklärt.

In dieser Studie soll ein Beitrag zum Verständnis der Mechanistik nach zellulärer Transplantation geleistet werden. Im Detail soll gezeigt werden,

- 1) wie sich embryonale Kardiomyozyten nach Implantation im Infarktgebiet morphologisch verhalten,
- 2) welchen Einfluss die Zellen auf die Narbenbildung haben,
- 3) wie die embryonalen Kardiomyozyten die Herzfunktion beeinflussen und
- 4) wie sich der Extrakt von Zellen, welche nach hypoosmolarer Lyse ihre zelluläre Integrität verloren haben und daher nur noch auf subzellulärer, Protein- und Zytokinebene wirken können, im Vergleich zu vitalen, intakten Zellen verhält.

4 Material und Methoden

4.1 Tiermodell

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde als Tiermodell die Maus gewählt. Murine Studien haben den Vorteil, dass immunkompatible und transgene Stämme (Klug et al.; 1996) zur Verfügung stehen und auch embryonale Stammzelllinien untersucht werden können (Kolosov et al., 1998). Die in dieser Studie verwendeten Mäuse exprimierten zum Teil das *live reporter gen* EGFP (*enhanced green fluorescent protein*). Ursprünglich entstammt das Gen der Quallengattung *Aequorea Victoria*. Es emittiert, durch Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 488 nm angeregt, im grünen Spektrum. Diese Emission kann durch selektive Filter sichtbar gemacht werden (Heim et al., 1994; Chalfie et al., 1994). Verwendet wurden α -actin EGFP transgene Mäuse, welche eine sehr hohe EGFP-Expression in Herzmuskelzellen zeigen, wodurch diese vor einer geringen Hintergrundaktivität eindeutig detektierbar sind (Fleischmann et al., 1998). Die Zellfunktionalität wird durch das EGFP-Konstrukt dabei nicht beeinträchtigt.

Die Zucht von Mäusen ist außerdem relativ unkompliziert, und die Tiere sind physisch sehr robust. Daher ist es am Mausmodell möglich, eine große Anzahl von Tieren zu untersuchen. Die Schwierigkeiten der kleinen Körpergröße und der damit verknüpften komplexen operativen Vorgehensweise bei *in vivo* Untersuchungen wurden bereits in der Arbeitsgruppe gelöst und die Techniken etabliert (Roell et al., 2002).

4.1.1 Mauslinien

Die CD1 Wildtyp-Mauslinie wurde auf Grund ihrer physischen Charakteristika für das Projekt ausgewählt. Die Mäuse weisen eine stabile, robuste Konstitution auf und erreichen normalerweise ein Alter von ca. 2 Jahren. Zu einer großen durchschnittlichen Wurfgröße von ca. 12 Tieren kommt eine gute Superovulierbarkeit.

4.1.2 Superovulationsinduktion bei Mäusen

Um eine möglichst große Anzahl von Embryonen von einer graviden Maus zu erhalten, wurden den Weibchen Gonadotropine als hormonelle Stimulanz zur Superovulation appliziert. Simuliert werden mussten die Hormone „Follikelstimulierendes Hormon“ (FSH) und

„Lutheinisierendes Hormon“ (LH). Hierzu wurde der Maus Intergonan 50 IU/ml (engl. PMSG, pregnant mare serum gonadotropin; Intervet; Boxmeer, Niederlande) als FSH Ersatz und Ovogest 1500 (Intervet, Boxmeer, Niederlande) als LH Substitution verabreicht. So wurde erreicht, dass die Tiere in den Ovarialzyklus eintreten und möglichst viele Oozyten in die Tuba Uterina gelangen und dort befruchtet werden können. Mit einer Injektionsnadel von 0,3 mm Durchmesser wurde den Mäusen eine Dosis von 10 IU Intergonan intraperitoneal injiziert. Die Ovogest Injektion (10 IU) folgte 46 - 48 Stunden nach der Intergonan Injektion, ebenfalls intraperitoneal. Die induzierte Ovulation setzte im Zeitfenster von 10 - 14 Stunden ein und die Mäuse wurden mit männlichen Mäusen für 24 Stunden zur Verpaarung in einen Käfig zusammengesetzt. Bei den Tieren konnte nach 24 Stunden mit Überprüfung der Vaginalplugs ein Indiz zum Erfolg der Kopulation erfolgen; dieser Zeitpunkt wurde als Konzeptionstermin gesetzt.

4.2 Präparation

4.2.1 Entnahme von Embryonen der Maus

CD1 Wildtyp Mäuse haben normalerweise eine Tragzeit der Embryonen von 20 - 21 Tagen bis zur Geburt. Tag 1 entspricht dabei bei engmaschiger Kontrolle dem Tag, an dem der Vaginalplug festgestellt wird. An Tag 14 oder 15 wurden die superovulierten Mäuse durch zervikale Dislokation unter Isofluran Narkose getötet. Nach dem Fixieren der Maus auf einer Styropor Platte und erfolgter Hautdesinfektion wurde die Abdominalhöhle mittels einer medianen Laparotomie eröffnet. Das distale Ende der Cornua-Uteri wurde mit einer chirurgischen Pinzette gefasst und das Uterushorn mitsamt der eingelagerten Embryonen aus der Bauchhöhle entfernt und in eisgekühlter PBS-Lösung (Gibco / Invitrogen, Karlsruhe) gelagert. Unter einem Stereomikroskop (S8AP0, Leica Microsystems GmbH, Solms, Deutschland) wurden die Embryonen von der Plazenta und der Fruchtblase getrennt.

4.2.2 Entnahme der embryonalen Herzen

Der Kopf der Embryonen wurde mit einer chirurgischen Schere vom Thorax abgesetzt, der Thorax eröffnet und das Herz stumpf mit einer Pinzette aus dem Embryo präpariert. Die

embryonalen Herzen wurden in eine kleine Petrischale mit gekühlter PBS-Lösung auf Eis überführt.

4.2.3 Selektion EGFP-positiver Herzen

Die in einer Petrischale gesammelten embryonalen Herzen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (MZ 16F, Leica Microsystems GmbH, Solms, Deutschland) mit einem EGFP Filter und unter einer HBO103 Fluoreszenzlampe betrachtet. Die EGFP-positiven Herzen leuchteten im Fluoreszenzlicht grün. Diese Herzen wurden von den nicht fluoreszenten separiert. Die Dokumentation erfolgte über eine JenOptik ProgRes C10+ Kamera (JenOptik AG, Jena, Deutschland) und die dazugehörige ProgRes Capture Pro Software.

4.2.4 Organentnahme aus der adulten Maus

Die zu präparierende Maus wurde nach der linksventrikulären Funktionsuntersuchung, (siehe 3.6.5) noch unter vollständiger Isofluran Narkose stehend, durch zervikale Dislokation getötet. Nach Eröffnung des Brustkorbs wurde das Herz vom Lungenparenchym gelöst und aus dem Thorax in gekühlte PBS-Lösung auf Eis überführt. Unter einem Stereomikroskop (Leica MZ 16F) wurde die kryoinfarzierte Läsion betrachtet. Die injizierten transgenen Zellen wurden unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenzfilters sichtbar gemacht und das Engraftment der EGFP-positiven Zellen dokumentiert.

4.2.5 Perfusionsfixation der entnommenen Herzen

Durch die Perfusion nach Langendorff soll eine möglichst rasche und gleichmäßige Fixierung des Myokards nach Entnahme der behandelten Herzen erreicht werden. Dazu wurden die Herzen unter der Stereolupe mit einer feinen Metallkapillare durch die Aorta in den linken Ventrikel kanüliert. Oberhalb der Aortenklappe und der Abgänge der Koronararterien wurde die Aorta um die Kapillare ligiert und somit abgedichtet bzw. das Herz an der Perfusionskanüle fixiert. Bedingt durch die Schwerkraft wurden die Herzen zunächst mit 5 ml PBS-Lösung und darauf folgend mit 15 ml 4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA) mit konstantem Druck von nicht über 70 - 80 mmHg perfundiert. Die Herzen wurden anschließend in gekühlte 4% PFA-Lösung überführt und über Nacht bei 4°C gelagert. Die nun fixierten Herzen wurden danach dreimal für 20 min mit PBS-Lösung gewaschen und dann zur Entwässerung in eine 20%-ige Saccharose-Lösung in PBS überführt. Die Lagerung erfolgt

ebenfalls bei 4°C für 24 Stunden. Die fixierten und entwässerten Herzen wurden nun in Schnappdeckelröhrchen überführt und in Einbettmedium (Neg 50, Richard-Allan-Scientific, Kalamazoo, MI, USA) eingebettet. Mit flüssigem Stickstoff und gekühltem Isopropanol wurden die Herzen nun zügig von basal nach apikal eingefroren und bei -80°C für weitere Experimente gelagert.

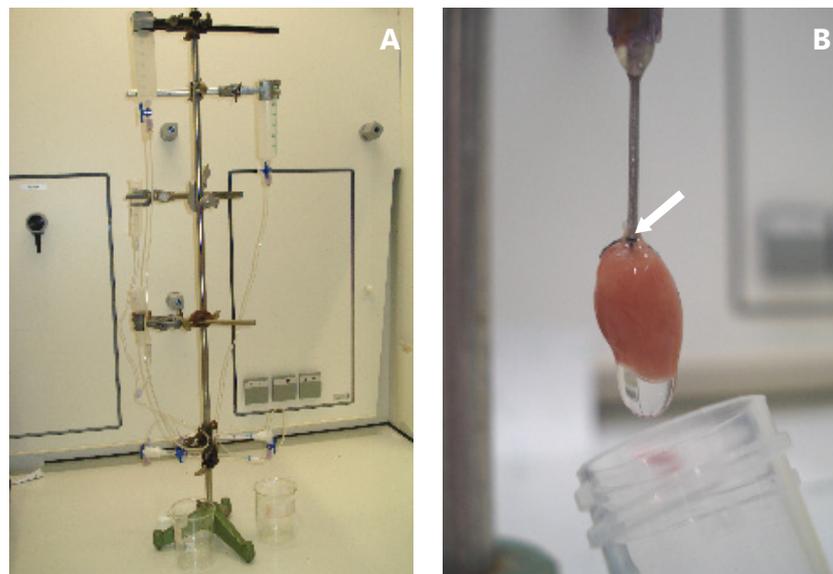


Abbildung 7 Langendorff Apperatur und kanuliertes Herz

In der Langendorff Apperatur (Abb. 7 A) werden die Herzen fixiert und für die Kryokonservierung vorbereitet. In Abbildung 7 B sind die Kanüle und die Ligatur um die Aorta zu erkennen (Pfeil). Das Herz wird dabei abhängig vom Höhenunterschied zum Perfusat mit einem konstanten Druck perfundiert.

4.3 Gewinnung embryonaler Kardiomyozyten

4.3.1 Zelldissoziation

Die EGFP exprimierenden und isolierten embryonalen Herzen wurden soweit möglich mit Skalpell und Pinzette zerkleinert. Darauf folgend wurden die Gewebestücke für 30 min. bei 37°C in 500 µl Kollagenase B-Lsg (1mg/ml; Roche, Mannheim) inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenase-Lösung gegen 600 µl KB-Lösung ausgetauscht und das Eppendorf-Gefäß bei Raumtemperatur für 30 min. in einem Becherglas mittels eines Rührfisches bewegt. Durch anschließendes 25-maliges vorsichtiges auf und ab Pipettieren mit einer 1000 µl Pipette wurde nahezu eine Einzelzelldissoziation erreicht. Eine Probe zur Zellzählung wurde

entnommen und das Eppendorfgefäß für 3 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Nach Abgesaugen der KB Lösung wurden das Zellpellet in DMEM-Medium resuspendiert.

4.3.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Dichte der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Faust, Köln) ermittelt. Mit einer 0,2% Trypanblau Färbelösung in PBS wurden die sich in Suspension befindlichen Zellen auf die Zählkammer aufpipettiert. Nekrotische oder apoptotische Zellen werden von der Trypan Färbung blau eingefärbt und lassen sich somit von vitalen Zellen unterscheiden. Die Anzahl der Zellen auf vier 16-Felder Quadranten wurde bestimmt und der Mittelwert berechnet. Die Zelldichte in Zellen pro ml ergibt sich aus der Multiplikation des Mittelwertes mit dem Verdünnungsfaktor mal 1000.

$$dZ\left(\frac{Z}{ml}\right) = \text{Mittelwert} \times V(x) \times 1000$$

4.3.3 Plattieren der Zellen

Kardiomyozyten Medium: 77,9% (v/v) IMDM
20%(v/v) FKS
1% (v/v) Penicillin (10.000 U/ml) /
Streptomycin (10.000 U/ml)
1% (v/v) nicht essentielle Aminosäuren, MEM (100x)
0,1% (v/v) β -Mercaptophenol (25 mmol/l)

Bevor die Zellen, die für die Zelllysierung vorgesehen waren, dem Lyseprozess unterzogen worden sind, sollte sichergestellt werden, dass die EGFP-Positivität der Zellen nach der Zelldissoziation nicht verloren gegangen ist. Hierzu wurden die Zellen in Kardiomyozyten Medium auf mit 0,1% Gelatine beschichtete Deckgläschen in eine 24-Loch-Platte pipettiert und das Vorhandensein von EGFP unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Zudem wurden überschüssige Zellen nach den Operationen, die nicht transplantiert wurden, ebenfalls plattiert. So konnte sichergestellt werden, dass die Suspension der EGFP-positiven embryonalen Kardiomyozyten, welche bis zur intramyokardialen Injektion auf Eis gelagert wurde zum Zeitpunkt der Injektion vitale Zellen enthielt.

4.4 Generierung von Lysaten aus eCM

4.4.1 Lysierung von embryonalen Kardiomyozyten

Ziel des Lysierungsprozesses war es, die intakte Zellstruktur und die Integrität der Zellmembran zu zerstören. Nach der Bestimmung der Zelldichte wurden die Zellen in 90 µl hypoosmolare (0,01 M) PBS-Lösung überführt und für 10 min. auf Eis auf einem Rüttler (DSG 304, Heidolph GmbH&Co.KG, Schwabach) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter Vermeidung von Schaumbildung ca. 200-mal mit einer 100 µl Pipette auf und ab pipettiert und so dissoziiert. Es folgte nun eine Zentrifugation mit 13000 rpm (5415D, Eppendorf, Hamburg) bei 4°C. Das Pellet wurde nun wieder resuspendiert, nach erneuter Zentrifugation ein weiteres Mal dissoziiert und wiederum zentrifugiert. Der Überstand wurde isoliert und mit 9,1 µl hyperosmolarer (1 M) PBS Lösung isoosmolarisiert. Die Osmolarität wurde mit einem Osmometer (Vapro 5520, Weser, UT, USA) kontrolliert. Das Zellpellet wurde einer Zellzählung unterzogen und dokumentiert. Der isoosmolarisierte Überstand wurde einer Proteinmessung nach Bradford unterzogen.

4.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford Test bietet die Möglichkeit, den Proteingehalt einer Probe quantitativ zu erfassen. Die kationischen, apolaren und hydrophoben Seitenketten der Proteine bilden mit dem in der Bradford Reagenz enthaltenen Triphenyl-Methan-Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 Komplexe. Durch diese Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsspektrum auf 595 nm. Bei der ungebundenen Form liegt es bei 470 nm.

Unter Zuhilfenahme eines Photometers kann nun der Anstieg der Absorption bei 595 nm gegen das freie Reagenz gemessen werden. Die Proteinkonzentration im Lysat der embryonalen Herzen wurde mit Hilfe einer BSA Verdünnungsreihe photometrisch ermittelt. Es wurde eine 10 µg/ml BSA-Lösung angesetzt und eine Verdünnungsreihe von 9, 7, 5, 3 und 1 µg/ml BSA angesetzt. Zu je 1 ml BSA-Lösung wurde 1 ml Bradford Reagenz zugesetzt. Die zu untersuchende Probe wurde mit einem Volumen von 10 µl in 990 µl destilliertes Wasser gegeben und darauf folgend mit 1 ml Bradford Reagenz versetzt. Nach gründlichem Durchmischen der Lösung durch mehrmaliges Invertieren wurde nach 10 min. bei 595 nm die Absorption am Photometer gemessen. Über Microsoft Excel wurden die gemessenen Daten

ausgewertet und eine Eichgerade erstellt. Der Proteingehalt der Lysat- Proben konnte so bestimmt werden.

4.5 Operative Techniken

4.5.1 Kryoinfarkt

Die im nachfolgenden Teil erläuterte Operationsmethode zur kryoinfarzierten kardialen Läsion hat eine artifizielle, lokale, irreversible nekrotisierende Wirkung auf das Myokard, in deren Folge eine transmurale Narbe entsteht. Der Kryoinfarkt lässt sich sehr gut in Hinblick auf die Lokalisation und Größe der Läsion reproduzieren. Der infarzierte Bereich lässt sich zudem hervorragend und eindeutig makroskopisch schon intraoperativ vom vitalen Myokard unterscheiden. Die Ausdehnung des Infarktgebietes ist dabei im Vergleich zum Ligaturmodell des *Ramus Interventrikularis Anterior* der *Arteria Coronaria Sinistra* (LAD–Ligatur Modell) sehr viel homogener, zudem kommt es bei der LAD – Ligatur nicht immer zu transmuralen Läsionen. Von Orlic et al. wurde zudem über eine bis zu 50%ige Mortalität bei der LAD-Ligatur berichtet. Beim Kryoinfarktmodell wurde von Roell et al. in der Arbeitsgruppe die operative Mortalität bereits auf unter 10% gesenkt.

4.5.2 Technische Ausstattung

Gasanlage

Asecos TRG 197.80+

Asecos GmbH, Weiherfeld

Waldner MC6

Waldner GmbH, Wangen

Ventilationsmaschine

Hugo Sachs MiniVent 845

Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten

Intubationslampe

Schott KL1500

Schott AG, Mainz

Operationsmikroskop

Leica M651

Leica, Microsystems GmbH, Wetzlar

Dräger Forene Vapor

Drägerwerk AG, Lübeck

Heizplatte u. Narkosekammer

Feinmechanische Werkstatt,
Inst. f. Physiologie I, UKB

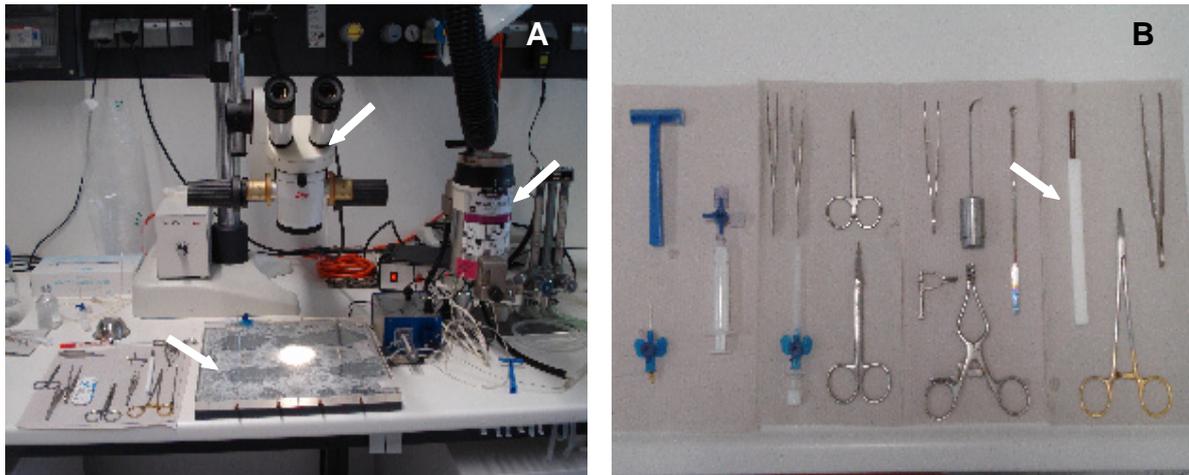


Abbildung 8 Operationsplatz und Operationsbesteck

Abb. 8 A zeigt den operative Aufbau für die Kryoinfarktoperationen. Die Pfeile in A zeigen auf das Operationsmikroskop und den Isofluran Vapor. (v.l.n.r.)

Abb. 8 B zeigt das tierchirurgische Instrumentarium für die Kryoinfarktoperation. Der Pfeil zeigt auf den Kupferstempel zur Generierung der Kryoläsion mit einem Durchmesser von 4 mm.

4.5.3 Intraoperatives Vorgehen

Die zu operierende Maus wurde in der präoperativen Narkosekammer unter Zufuhr von 40% Sauerstoff, 60% N₂O und 5% Isofluran sediert. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, welche auch anhand der Abnahme der Atemfrequenz beurteilt wurde, erfolgte die Intubation der Maus mit Hilfe einer 22G Venenverweilkanüle (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die Beatmung erfolgte mit einer Frequenz von 150 Zügen pro Minute und einem Zugvolumen von 200 µl pro Atemzug. Die inspirative Isofluran Konzentration wurde nun auf 1.5% reduziert. Die Maus wurde mit Leukosilk (BSN Medical, Hamburg, Deutschland) in Rückenlage auf der beheizbaren OP-Platte fixiert. Der Thorax wurde links anterolateral bis etwa zur Medianlinie mit einem Einmalrasierer und nach Desinfektion mit 70%-iger Ethanollösung rasiert. Die peri- und postoperative Analgesie bzw. Infektionsprophylaxe erfolgte durch subcutane Injektion von 100mg/KG Metamizol (Stada, Bad Vilbel) bzw. 100 mg/KG Cefuroxim (Gibco / Invitrogen, Karlsruhe). Nach Hautschnitt und Präparation durch die thorakale Muskulatur erfolgte die Thorakotomie linksthorakal im zweit- oder drittletzten Interkostalraum (ICR) von lateral nach medial mit einer Incisionslänge von ca. 10 mm. In den Interkostalraum wurde ein Selbstspreizer eingesetzt, der den Blick auf

Lunge und Herz sicherstellte. Das Perikard wurde mit einer Pinzette leicht abgehoben und längsinzidiert. Ein Kupferstempel mit einem Durchmesser von 4 mm wurde in flüssigem Stickstoff auf ca. -200°C heruntergekühlt. Die freie linksventrikuläre Wand des Herzens wurde mit einem Präparationslöffel exponiert und der Kryostempel apexnah für 15-20 s aufgesetzt. Nach Entfernung des Stempels stellte sich das gefrorene Myokard weis dar. Nach Wiedererwärmung wurde diese Prozedur noch zwei weitere Male wiederholt, um eine transmurale Schädigung sicherzustellen.

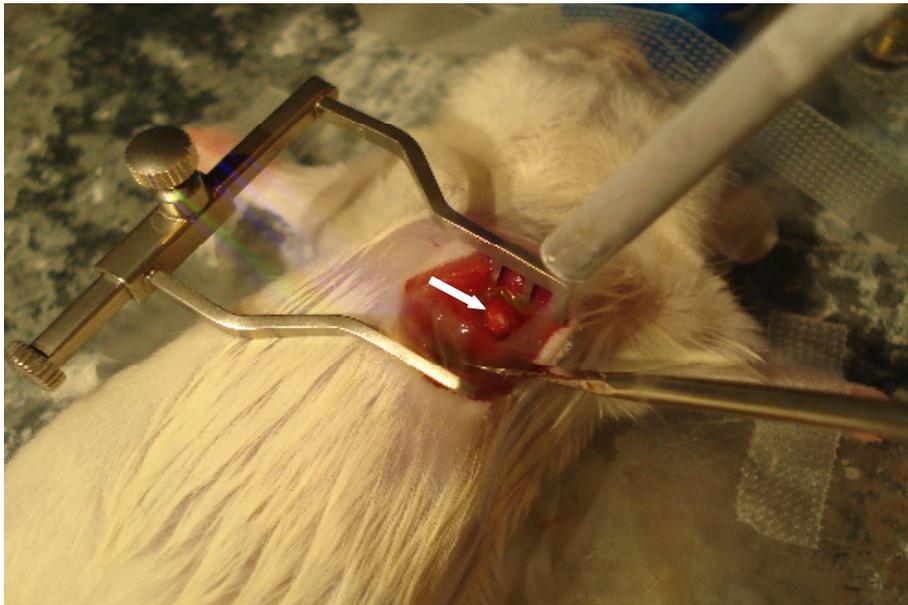


Abbildung 9 Generierung des Kryoinfarktes

Das analgosedierte Versuchstier ist auf der Operationsplatte fixiert. Der Thorax ist linksseitig ventrolateral im 5. ICR eröffnet. Der Selbstspreizer stellt die Sicht auf das Herz sicher, das im Präparationslöffel ruht. Nach Aufsetzen des gekühlten Kupferstempels ist die Kryoläsion auch makroskopisch deutlich zu erkennen (Pfeil).

Nun folgte die unter 4.5.4 beschriebene Zellinjektion. Dem Versuchstier wurde nach der Zellinjektion und vor dem Thoraxverschluss eine 22G Venenverweilkanüle mit zusätzlichen seitlichen Einlässen konnektiert an eine Heidelberger Verlängerung als Throaxdrainage eingelegt. Die Kanüle wurde dabei kaudal der Schnittstelle subkutan und submuskulär getunnelt und durch den Intercostalraum distal der Thorakotomie in die Thoraxhöhle vorgeschoben. Die Rippen wurden mit fortlaufender chirurgischer Nahttechnik (6.0 Vicryl, Ethicon, Johnson&Johnson Deutschland, Nordersted) reponiert und verschlossen. Nach dem sicheren Vernähen der Rippen wurden die profunden und superfizialen Brustmuskeln und anschließend die Haut vernäht. Die N₂O Beimischung wurde bei Beginn des Thoraxverschlusses beendet, die Beatmung auf 100% O₂ heraufgeregelt um eine N₂O induzierte Diffusionshypoxie auszuschließen. Mit einer an die Heidelberger-Verlängerung der Drainage angeschlossenen 5 ml Spritze wurde ein Unterdruck im Brustkorb erzeugt und etwaig angesammeltes Blut sowie die intrathorakale Luft abgezogen. Nun wurde auch die Isoflurane-Beimischung des Beatmungsgemisches beendet und die Fixation des Versuchstiers gelöst. Nach Wiedereinsetzen der Spontanatmung erfolgte die Extubation, die Drainage wurde wenig später unter Sog gezogen. Die Maus wurde in einen Aufwachkäfig unter eine Wärmelampe gesetzt und der weitere Verlauf des Aufwachprozesses beobachtet und überwacht. Vor OP-Beginn, sowie an den ersten postoperativen Tagen wurde den Versuchstieren Metamizol sowie Cefuroxim in einer Dosierung von 100 mg/kgKG i.m. zur Analgie sowie Infektionsprophylaxe verabreicht.

4.5.4 Intraoperative zelluläre Injektion

Die vorbereitete und mit Lebensmittelfarbstoff (Verdünnung 1:100, Patentblau V E131, Azorubin E122, Brauns-Heitmann GmbH&Co KG, Warburg, Deutschland) dezent kolorierte Kardiomyozytensuspension mit einer Konzentration von ca. 20.000 - 25000 Zellen/ μ l und 6 μ l Volumen wurde mit einer Kapillarspritze (Hamilton, Reno, NV, USA) aufgezogen. Die Spritze war mit einer 29 G Kanüle (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) armiert. Mit dem Präparationslöffel wurde nun das Herz so im Thorax mobilisiert, dass die nach den drei Kryoinfarkt Durchgängen dunkelrot makroskopisch klar erkennbare Läsion in der Thoraxöffnung gut zu sehen war. Die Injektionskanüle der Kapillarspritze wurde daraufhin in flachem Winkel in die Infarktregion intramyokardial eingestochen und die definierte Menge an Kardiomyozyten, Kardiomyozytenlysat oder Medium injiziert. Den Erfolg der Injektion

konnte man auf Grund der Anfärbung der Lösung und der damit verbundenen Färbung der Infarktzone nach der Injektion markroskopisch visuell und digital - fotografisch validieren.

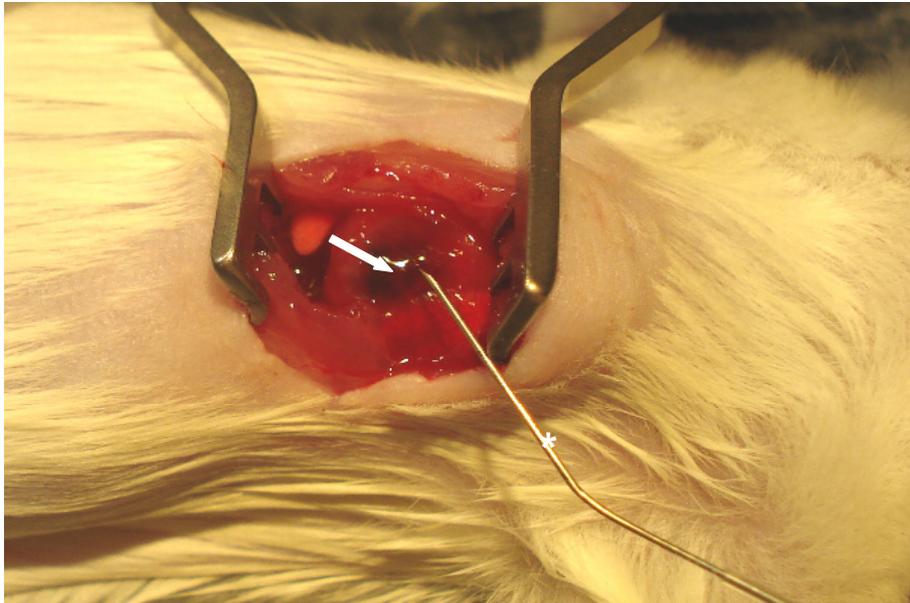


Abbildung 10 intramyokardiale Zellinjektion

Mit der 29 G Kanüle (Stern) und der Kapillarspritze wurde die leicht angefärbte Zellsuspension in die Infarktregion eingespritzt. Auf dem Bild ist die Blaufärbung nach der Injektion deutlich zu erkennen (Pfeil). So ist direkt ersichtlich, ob die Injektion erfolgreich war.

4.6 Hämodynamik

Die systolische und diastolische Funktion sind entscheidend für die kardiale hämodynamische Leistungsfähigkeit. Nach kardialer Schädigung ist mit Veränderungen, Störungen oder Komplikationen dieser Funktion zu rechnen. Um die hämodynamischen Veränderungen zu erfassen wurde die kardiale Funktion nach Kryoläsion bzw. darauf erfolgter Therapie invasiv mittels linksventrikulärer Katheterisierung untersucht.

Die Herzfrequenz definiert die Anzahl der Herzaktionen pro Minute und wird in der Einheit Schläge pro Minute (bpm) erfasst. Die Herzfrequenz wird in dieser Arbeit als grundlegender Parameter für die Vergleichbarkeit der untersuchten Gruppen untereinander verwendet.

Die Systole oder Kontraktionsphase der Herzaktion ist definiert als die isovolumetrische Anspannungsphase und die darauf folgende Austreibungsphase. Das Blutvolumen wird während der Austreibungsphase aus den Herzkammern ins Gefäßsystem gepumpt. Die

systolische Funktion ist ausschlaggebend für die Förderleistung des Herzens und wird beeinflusst von der kardialen Vorlast, der Nachlast und der Kontraktilität.

Vorlast ist definiert als die volumenabhängige Dehnung der Sarkomere und der daraus folgenden diastolischen Wandspannung des Ventrikelmyokards. Die Autoregulation des Schlagvolumens (SV) wird durch die Vorlast wesentlich beeinflusst und durch den Frank-Starling Mechanismus beschrieben: eine Zunahme der Vorlast steigerte bis zu einem Grenzwert die Kontraktionskraft und damit das kardiale Schlagvolumen. Beeinflusst wird die Vorlast vom venösen Rückstrom, dem Aufnahme- und Speichervolumen der venösen präkardialen Gefäße, dem Venentonus und dem Blutvolumen, das während der Diastole aufgenommen wird. In dieser Studie werden als Maß zur Erfassung der diastolischen Vordehnung das enddiastolische Volumen (EDV) und der enddiastolische Druck (EDP) erfasst und ausgewertet.

Als Nachlast bezeichnet man die endsystolische Wandspannung des Ventrikelmyokards. Physiologische Größen, welche die Nachlast beeinflussen, sind der Gefäßwiderstand, die Compliance der Gefäße, also die Gefäßelastizität, die ventrikuläre Wandspannung, die Beschleunigung der Blutsäule sowie die Viskosität des Blutes. Damit das Schlagvolumen von den Kompartimenten des Herzens gefördert werden kann, muss der enddiastolische Aorten- oder Pulmonaldruck überwunden werden. Eine Erhöhung des systemischen oder pulmonalen Gefäßwiderstandes führt zu einer Steigerung der Nachlast und darauffolgend zu einer erniedrigten Auswurfleistung. In dieser Arbeit wurde als charakteristischer Parameter für die Nachlast die arterielle Elastance (E_a) gewählt. Bei der Beurteilung der erfassten Werte ist jedoch die Volumenflussabhängigkeit zu beachten.

Die Kontraktilität des Herzmuskels ist definiert als die myokardiale Fähigkeit, bei gleich bleibender Vor- und Nachlast die Kontraktionskraft zu ändern. Unter Inotropie versteht man zudem die positive oder negative Beeinflussung der Kontraktilität. Positive Inotropie führt also sowohl in der isovolumetrischen Kontraktion zu einer Erhöhung der maximalen Zugkräfte als auch in der isotonischen Kontraktion zu einer beschleunigten maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit. In dieser Arbeit wurden als Parameter für die Kontraktilität das Herzzeitvolumen (HZV), also das Blutvolumen, das vom Herzen in einer Minute durch den Körper gepumpt wird (Herzfrequenz \times Schlagvolumen), und die Ejektionsfraktion (EF) verwendet. Die Ejektionsfraktion oder Auswurffraktion definiert den Anteil des vom Herzen bei einer Kontraktion ausgeworfenen Blutes (Schlagvolumen) im Verhältnis zum gesamten

enddiastolischen Volumen im linken Ventrikel. Bei der Beurteilung der erfassten Messwerte ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Ejektionsfraktion vor- und nachlastabhängig ist. Die klinisch am häufigsten erfassten und verwendeten Parameter, um die kardiale systolische Funktion zu untersuchen, sind das HZV und das SV. Sie sind jedoch ebenfalls lastabhängig. Jeder Parameter für sich isoliert ist demnach nur bedingt zur Beurteilung der Kontraktilität geeignet. Aus dem Gesamtbild und der Relation der Werte untereinander lässt sich die systolische Herzfunktion jedoch fundiert und differenziert beurteilen.

Neben der systolischen Funktion ist die Diastole für die Beurteilung der Herzfunktion ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Für eine normale, physiologische diastolische Funktion ist eine ungehinderte Dehnbarkeit sowie eine ungehinderte Relaxation erforderlich (Pirrachio 2007).

Die Diastole ist definiert als die Relaxations- und Füllungsphase des Myokardes vom Schluss der Pulmonal- und Aortenklappe bis zum Schluss der Tricuspidal- und Mitralklappe. Die Füllung des Herzens erfolgt in der Diastole und das zu fördernde Volumen wird so bestimmt. Physiologisch wird die Diastole unterteilt in eine Phase der aktiven Relaxation (Lusitropie) und eine passive Füllungsphase. In diesem Zusammenhang wird auch der Begriff passive Steifheit oder Compliance verwendet. Klinisch und funktionell lässt sich die Diastole in vier Phasen (unterteilen:

- a. Die isovolumetrische Relaxationsphase: Durch das Unterschreiten des Aortendruckes und des intrapulmonalen Druckes im Ventrikel kommt es zum Schluss der Taschenklappen. Nach dem Öffnen der Segelklappen folgt
- b. die schnelle Füllungsphase durch das Unterschreiten des ventriulären Druckes gegenüber dem atrialen Druck und der Öffnung der Mitralklappe. In der schnellen Füllungsphase werden 70-80% des Füllungsvolumens erreicht. Hierauf folgt
- c. die passive, langsame Füllungsphase, in der sich die Druckverhältnisse zwischen Vorhof und Ventrikel angleichen. Der Blutstrom zwischen Vorhöfen und Kammern bleibt nahezu konstant, und in dieser Phase werden nur maximal 5% des Füllungsvolumens erreicht. Die vierte Phase ist

- d. die späte Füllungsphase der Ventrikel durch eine Kontraktion der Vorhöfe. Durch einen kurzzeitigen Druckgradienten kommt es zu einem Beitrag an der ventrikulären Füllung von ca. 20%.

In dieser Arbeit wird als diastolischer, hämodynamischer Parameter die minimale Rate des Druckabfalls verwendet (dP/dt_{min}), welcher den Beginn des isovolumetrischen Druckabfalls im Ventrikel beschreibt. (Renz-Polster et al., 2006).

4.6.1 Visualisierung der Herzfunktion über Druck-Volumen Diagramme

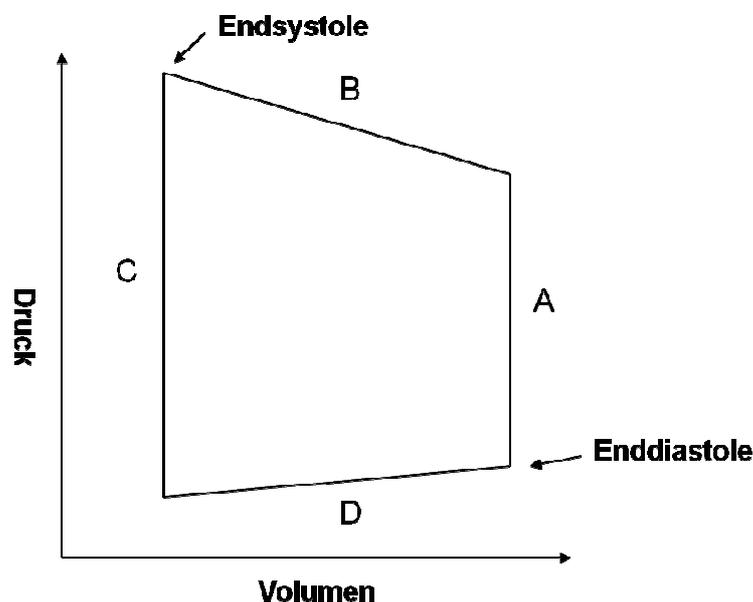


Abbildung 11 Druck-Volumen Diagramm eines Herzzyklus

Der Isovolumetrischen Kontraktionsphase A folgt die Austreibungsphase B. Die Diastole gliedert sich in Isovolumetrische Erschlaffungsphase C und Füllungsphase D.

Die Herzaktion lässt sich treffend über ein Druck-Volumen Diagramm abbilden. Innerhalb des Druck-Volumen Diagramms lassen sich vier Phasen unterscheiden. Beginnend bei der Enddiastole beschreibt A die isovolumetrische, systolische Kontraktionsphase, B die azyklische Ejektionsphase. Die Strecke C beschreibt die diastolische isovolumetrische Relaxation und D die Füllungsphase im kardialen Zyklus. Die kontinuierliche Erfassung von Druck-Volumen-Schleifen war Grundlage für die Bestimmung der oben beschriebenen Parameter. Positive Inotropie, also eine Steigerung der Kontraktilität, führt zu einer Verschiebung der Endystole, nach links oben.

4.6.2 Linksventrikuläre Funktionsuntersuchung

Die linksventrikuläre Herzfunktion und –leistung wurde *in vivo* mit Hilfe eines Miniatur-Herzkatheters analysiert, Druck (p) und Volumen (V) wurden dabei simultan erfasst. Der in dieser Studie verwendete Katheter SPR-774 (Millar, Houston, Tx, USA) in der Größe 1,4-French, basiert auf der so genannten Biconductance Technik. Über die Analyse eines kontinuierlichen elektrischen Signals wurde so die Ermittlung des realen ventrikulären Volumens ermöglicht. Die Messeinheit des Miniaturkatheters für Druck und Volumenaufnahme trägt vier 0,25 mm lange Platinelektroden. Die proximalste und am weitesten distal gelegene Elektrode lagen 4,5 mm auseinander. Die Druckmessung in mmHg erfolgte über ein Miniaturbarometer das im Intervall zwischen zweiter und dritter Elektrode lokalisiert ist.

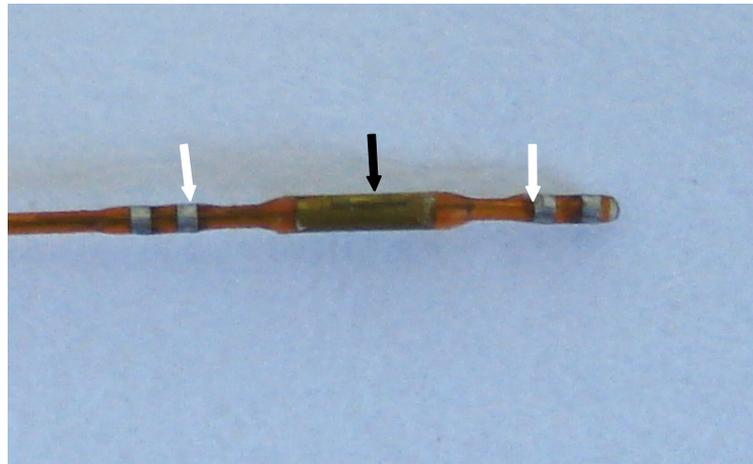


Abbildung 12 Messeinheit des Millar-Miniatur-Messkatheters

Das Miniaturbarometer (schwarzer Pfeil) ist zwischen zweiter und dritter Elektrode (weiße Pfeile) lokalisiert.

An den Katheter wurde die so genannte Conductanceeinheit angeschlossen, welche ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 40 μA und einer Frequenz von 20 kHz generiert. Als Sendelektroden dienen die proximal und distal liegenden Elektroden, als Messelektroden die beiden inneren. Durch die Perfusion des interventrikulären Lumens und den Blutfluss kommt es zu einer Variation des Leitwertes und damit der elektrischen Feldeigenschaften. Diese Veränderungen und Variationen in der Signalstärke können detektiert und in ein auf Zylinderform idealisiertes Volumensignal mit folgender Formel umgerechnet werden:

$$V_{cath} = \left[\left(\frac{1}{\alpha} \cdot \frac{L^2}{\sigma_b} \right) (G(t) - G^P) \right]$$

σ_b beschreibt die spezifische Leitfähigkeit des Blutes, L den Abstand der Katheterelektroden, G(t) den Gesamtleitwert zu der Zeit t und G^P steht für die Parallele Conductance. Bei α handelt es sich um einen dimensionslosen, konstanten Faktor. Über unabhängige Referenzmethoden wurde dieser Wert in der Literatur zuvor bestimmt. Abhängig vom Tiermodell variiert dieser Faktor, bei der Maus nähert er sich jedoch 1 an. In der hier vorliegenden Arbeit wird demzufolge auch 1 als konstanter σ -Wert benutzt.

Das bei der Biconductance Technik ermittelte Signal steht in direkter Proportionalität zum absoluten intraventrikulären Volumen, allerdings nur, wenn es um die sogenannte parallele Conductance korrigiert wurde. Als parallele Conductance oder gemeinsamen Leitwert bezeichnet man alle Größen, die bedingt durch das Messprinzip über die elektrische Feldstärke, mit erfasst werden. Dazu gehören in erster Linie das Myokard, das Blutvolumen im rechten Ventrikel und das Lungenvolumen. Diese Größen verfälschen die Messergebnisse; daher ist es angezeigt, diese zu eliminieren.

Variiert nach Baan et al. (1984) kann die parallele Conductance durch Injektion von 0,9 M NaCl Lösung über eine Kapillarspritze in die V. jugularis sinister bestimmt werden.

Diese „Saline Calibration“ (Baan et al.; 1984) basiert auf folgendem theoretischen Konstrukt: Durch die einmalige Injektion von NaCl wurde die Leitfähigkeit des Blutes temporär verändert. In der Phase, in welcher der NaCl Bolus den linken Ventrikel passiert, wurde über den Millarkatheter der sich verändernde Leitwert jeweils in der Enddiastole und Endsystole gemessen. Das enddiastolische Volumen (VED) und das endsystolische Volumen (VES) sind während eines Herzzyklus nur dann gleich, wenn das Herz blutleer und die Werte damit gleich 0 sind. Über die Bildung einer Regressionsgrade aus VES und VED kann dieser Zeit- und Volumenpunkt ermittelt werden. Die ermittelte parallele Conductance muss nun vom ermittelten Gesamtvolumen abgezogen werden. Dies kann in der Größenordnung zwischen 40% und 70% liegen.

4.6.3 Technische Ausstattung

(siehe 4.5.2); zusätzlich:

Conductance Interface Aria	Millar Instruments, Houston, Tx, USA
Millar 1,4G Minipress Katheter	Millar Instruments, Houston, Tx, USA
Biobench Analysis Software	Austin, Tx, USA

4.6.4 Intraoperatives Vorgehen

Die linksventrikuläre Katheterisierung und die Erfassung der Druck- und Volumenparameter erfolgten bei den zu untersuchenden Mäusen am vierzehnten postoperativen Tag nach Generierung der Kryoläsion.

Die Tiere wurden wie unter 4.5.3 beschrieben analgosediert, intubiert und in Rückenlage auf der beheizten Operationsplatte fixiert. Nach einem medialen, zervikalen, longitudinalen Hautschnitt wurde das Platysma zusammen mit den superfizialen Strukturen am Hals durchtrennt und abpräpariert. Mit zwei Fixationsnähten wurde die Haut nach lateral transloziert und so ein guter Blick auf das Operationsfeld sichergestellt. Der Thymusrestkörper wurde in der Mitte stumpf gespalten und mit dem M. Sternocleidomastoideus zur Seite präpariert.

Die *Arteria Carotis Communis* wurde nun auf der rechten Seite dargestellt. Auf der linken Seite wurde die *Vena Jugularis* dargestellt. Die A. Carotis Communis wurde mit zwei dünnen Fäden proximal und distal in ihrem freigelegten Verlauf umschlungen. Die distale A. carotis wurde unterbunden, der proximale nur lose fixiert und soweit unter Zug gesetzt, bis das Gefäßlumen okkludiert wurde.

Die A. Carotis Communis wurde nun mit einer feinen Federschere quer inzidiert und der Katheter über die Aorta Ascendens und durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel vorgeschoben und in der Folgezeit die Druck-Volumenkurven online aufgezeichnet. Für die Auswertung wurden später einzelne Ausschnitte von bis zu 2 Sekunden extrahiert.

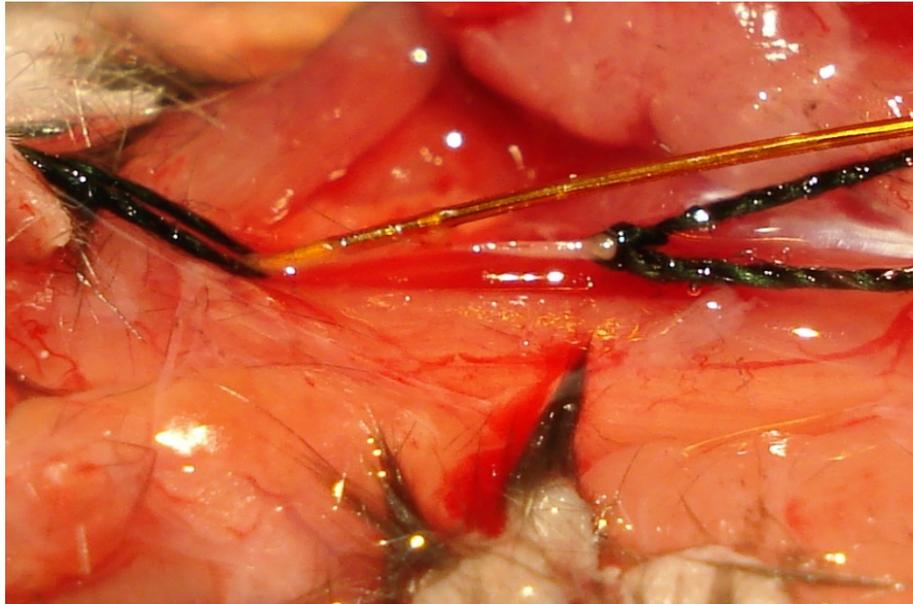


Abbildung 13 Lage des Millar-Katheters in der A.Carotis Communis dexter

Nach Inzision der *Arteria Carotis Communis* wird der Katheter (Pfeil) sorgsam retrograd bis zu seiner endgültigen Lage im linken Ventrikel vorgeschoben.

Pro Tier wurden dabei während 2 bis 4 jeweils 2s langer Intervalle 5 bis 15 Druck-Volumen Diagramme abgeleitet. Die optische Form der Druck-Volumen Kurven wurde intraoperativ zudem als Lagekontrolle genutzt.

Auf Grund des Biconductance Messprinzips des Millar Miniaturkathetersystems wurden über die *Vena jugularis sinister* zur Ermittlung der parallelen Conductance 10 μ l 10%-ige NaCl-Lösung injiziert. Nach der Erfassung der Werte wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet und die Herzen wurden entnommen.

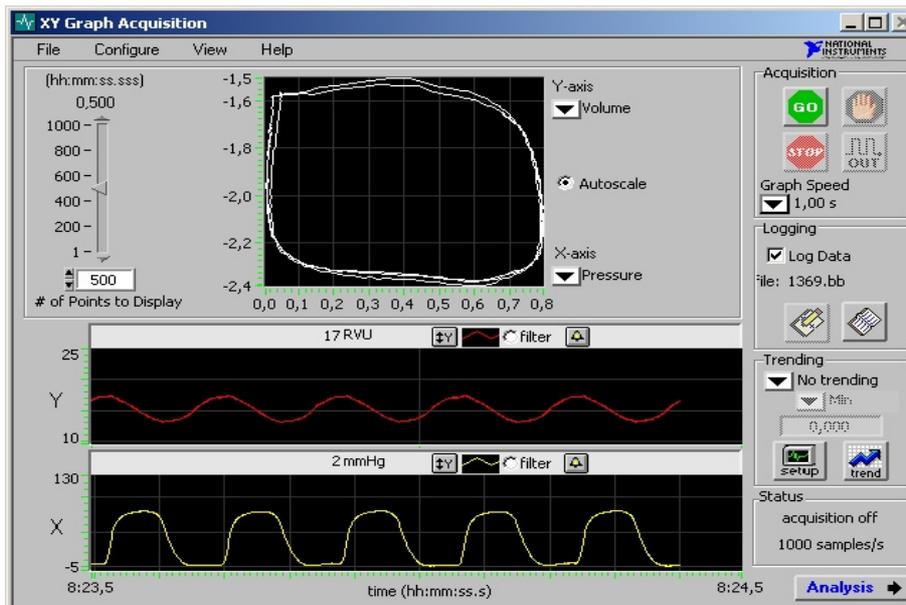


Abbildung 14 Druck-Volumen Kurven

Die über den Druck-Volumen Katheter registrierten Signale wurden über die Biobench Software grafisch visualisiert. Die Schleifen wurden intraoperativ zur Lagekontrolle genutzt und die erhaltenen Daten ausgewertet. Abb. 14 zeigt exemplarisch eine Druck-Volumen Schleife (oben) und die dazugehörigen Druck- und Volumenkurven.

Auf Grund des Biconductance Messprinzips des Millar Miniaturkathetersystems wurden über die *Vena jugularis sinister* zur Ermittlung der parallelen Conductance 10 μ l 10%-ige NaCl-Lösung injiziert. Nach der Erfassung der Werte wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet und die Herzen wurden entnommen.

4.7 Histologische Verfahren

4.7.1 Schneiden von Herzen am Kryotom

Das jeweils zu schneidende Herz wurde mit Hilfe von Einbettmedium auf dem mobilen Schnittstempel des Kryotoms (Leica CM30505) befestigt. Die Kammertemperatur betrug -24°C und die Objekttemperatur -22°C. Das Gewebe konnte nun vorsichtig bei einer Schichtdicke von 8 μ m nach einem stets gleichen, dokumentierten und vordefinierten Protokoll geschnitten werden. Im Abstand von 1 mm wurden zusätzlich zwei Schnitte von 20 μ m Dicke (weniger Gewebeverziehung) für die Sirius-Rot Färbung und die morphometrische Analyse angefertigt. Es wurden jeweils 2 Schnitte auf beschichtete Objektträger (Histobond

Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufgezogen. Die Objektträger wurden bei -80°C gelagert und so für weitere Experimente gesichert.

4.7.2 Sirius-Rot Färbung

Direkt Sirius Red 80 (Sigma / Aldrich; WI, USA)	0,1 g
Pikrinsäure Lösung 100% (Sigma / Aldrich; WI, USA)	100 ml

Direct Sirius Red und Pikrinsäure Lösung wurden für 10 min vermischt und die Lösung anschließend filtriert. Fibrotisches Gewebe wird bei der Sirius Rot Färbung in ein dunkleres Rot gefärbt als das übrige Gewebe. Geschädigtes Gewebe kann so bei den Kryoschnitten identifiziert und lokalisiert werden. Unter visueller Kontrolle wurden die zu färbenden Kryoschnitte für je 5 min in eine absteigende Alkoholreihe und anschließend 15-mal in Aqua bidest eingetaucht. Daraufhin folgte eine aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils 15-maligem Tauchen in 70%, 90% und 2-mal 15-maligen Tauchen in 100% Isopropanol. Die Schnitte wurden nun für 2 mal 5 min in Xylol überführt und anschließend mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

4.7.3 Van Gieson Färbung

Pikrinsäure Lösung (100%)	1000 ml Aqua bidest.
Säurefuchsin Lösung	1g Säurefuchsin 50 ml Aqua bidest.

Bei der van Gieson Färbung wird kollagenes Bindegewebe dunkelrot angefärbt, Muskelgewebe wird gelblich angefärbt. Bei Herzen mit einer Kryoinfarkt Läsion wird so die Lokalisation der Infarktnarbe gezeigt. Die gesättigte Pikrinsäure Lösung wurde zur van Gieson Färbung abfiltriert und mit 50 ml Säurefuchsin zu einer Stammlösung vermischt. Die Kryoschnitte wurden aufgetaut und mit dieser Stammlösung 3 min inkubiert. Die Stammlösung wurde entfernt und das Präparat sofort kurz in eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70%, 90% und 100% Isopropanol und anschließend 10 min in Xylol gegeben. Die Objektträger wurden anschließend mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) als Eindeckmedium eingedeckt.

4.7.4 Immunhistochemischer Proteinnachweis

Zur immunhistochemischen Färbung wurden die zu färbenden Gewebe-Kryoschnitte zunächst mit einem Fettstift (PAP-Pen, Labomedic, Bonn, Deutschland) kreisförmig umrandet. Hierdurch wurde ein Verlaufen der verwendeten Flüssigkeiten verhindert. Die Objektträger wurden zunächst viermal mit 0,05M PBS-Lösung für jeweils 10 min auf einem Schüttler gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte in 0,2% Triton-X in PBS permeabilisiert und nach zwei weiteren Waschschritten zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen mit 5%igem Eselserum für 60 min inkubiert. Nach kurzem Waschen wurde der erste Antikörper (AK) über Nacht bei 4°C in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Kammer inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde der zweite, fluoreszenzgekoppelte AK mit Spezifität gegen den zuvor verwendeten Erstantikörper in PBS für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde nicht gebundener Zweitantikörper durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt und die Schnitte mit Hoechst Kernfärbungslösung in PBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte, bevor die Objektträger mit *polyvinyl alcohol mounting medium* mit DABCO (Sigma-Aldrich, Buchs, CH) und einem Deckgläschen eingedeckt wurden.

Zur Auswertung der immunhistologisch gefärbten Schnitte wurden die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M mit ApoTome (Carl Zeiss Microimaging, Oberkochen, Deutschland) und XBO 75 Fluoreszenzlampe sowie Bandpassfiltern für EGFP, Cy3, Cy5 und Hoechst (AHF Analysetechnik AG, Tübingen, Deutschland) und einer Zeiss AxioCam MRm fotografiert und ausgewertet. Als Software wurde Zeiss AxioVision 4.6 verwendet. Die immunhistologischen Färbungen wurden mit der gleichen Vergrößerung (40-fach mit Öl-Immersion-Objektiv) fotografiert. Zur bestmöglichen direkten Vergleichbarkeit der Bilder untereinander war bei der Einstellung der verschiedenen Kanäle für die Fotos zu beachten, dass die Belichtungszeit gleich eingestellt war und die Bilder möglichst zeitnah bearbeitet wurden.

4.7.5 Antigen-Retrieval

Durch die Fixationsprozesse nach Entnahme der Herzen und Vorbereitung des Gewebes zur Anfertigung der Kryoschnitte kann die Immunreaktivität von Geweben teilweise oder vollständig verloren gehen. Die Proteine werden durch die Fixierung partiell untereinander quervernetzt. Die Antigenität von Proteinen wird u.U. maskiert und Epitope können von den

entsprechenden Antikörpern nicht mehr erkannt werden. Der Begriff Antigen-Retrieval ist synonym zur Antigen- oder Epitop Demaskierung. Die zu demaskierenden Kryoschnitte werden dazu in kochenden, 10 mM Zitratpuffer mit einem pH-Wert von 6.0 überführt und in der Mikrowelle bei 440 W für 15 min. gekocht. Anschließend lässt man die Schnitte im Zitratpuffer 30 min. bei Raumtemperatur abkühlen. Initial eventuell vorhandene EGFP-Fluoreszenz geht hierbei verloren.

4.8 Antikörper

4.8.1 Vimentin

Vimentin ist als Teil der Intermediärfilamentgruppe ein wichtiger struktureller Bestandteil des eukaryotischen Zytoskeletts. Es handelt sich um ein Typ-3 Intermediärfilament aus der übergeordneten Gruppe der Desmine. Humanes Vimentin hat eine Molekülmasse von 53690 Dalton und kommt im Zytoplasma von allen mesenchymalen Zellen wie z.B. Fibroblasten oder glatten Muskelzellen vor. Obwohl die meisten Intermediärfilamente stabile Strukturen darstellen, handelt es sich bei Vimentin in Fibroblasten um eine dynamische Struktur die für die Zellflexibilität und den Erhalt der Zellintegrität entscheidend ist. Die Lokalisation und Positionierung der Zellorganellen wird von Vimentin bedeutsam beeinflusst.

4.8.2 Perlecan

Perlecan ist ein multidomainäres Proteoglycan. Es bindet und verknüpft viele Komponenten der Extrazellulären Matrix und Zelloberflächen Moleküle. Kodiert wird es durch das Heparan Sulfat Proteoglycan-2-Gen (HSPG2) und wird sowohl von Gefäßendothelien als auch von glattmuskulären Zellen synthetisiert und darauffolgend in der extrazellulären Matrix angelagert. Perlecan ist ein potenter Promotor der Aktivität von Wachstumsfaktoren wie z.B. FGF2 und stimuliert endotheliales Wachstum und endotheliale Regeneration.

4.8.3 CD 45

Bei dem *cluster of differentiation antigen 45* (früher: *leukocyte common antigen*) handelt es sich um ein membranständiges Protein mit Oberflächenrezeptorwirkung und einer prominenten Bedeutung für die immunhistologische und immunhistochemische

Differentialdiagnostik. Auf Grund der Tatsache, dass sowohl lymphoide als auch myeloide Zellen CD 45 auf der Zelloberfläche exprimieren, wird es als Pan-Leukozytenmarker eingesetzt.

4.8.4 Ki67

Bei dem Antigen Ki67 handelt es sich um einen Proliferationsmarker, der am Institut für Pathologie der Universität zu Kiel benannt wurde. Zellen, die sich im Zellzyklus in der G1-, S-, G2- und M-Phase befinden, exprimieren das Ki67-Antigen. Zellen in der Ruhephase (G0 Phase) exprimieren das Antigen nicht.

In der Tumordiagnostik ist Ki67 Expression ein äußerst wertvoller Praediktor für die Feststellung der Wachstumsfraktion und damit direkt für die Tumorstadiumsgeschwindigkeit. In der hier vorliegenden Arbeit findet Ki67 Anwendung als allgemeiner Proliferationsmarker nach der Kryofärbung und benötigt vor der Färbung eine Epitop Demaskierung.

4.8.5 Lectin

Lectine sind zuckerbindende Proteine mit einer hohen Spezifität für ihre jeweiligen funktionellen chemischen Gruppen. In der hier vorliegenden Arbeit wird das Lectin Griffonia simplicifolia agglutinin I verwendet. Es bindet an α D-Gal α D-GalNAc und wird als Marker für Endothelzellen verwendet.

4.8.6 Alpha smooth muscle actin (asmac)

Bei *alpha smooth muscle actin* handelt es sich um eine Aktin Isoform, die in hohen Konzentrationen in vaskulären glatten Muskelzellen vorkommt. AK gegen *asmac* wurden in dieser Arbeit als Marker für die glatte Muskelschicht von Gefäßen verwendet.

4.9 Morphometrie

Die am Kryotom, wie unter 4.7.1 beschrieben, angefertigten Herzschnitte wurden nach der Sirius-Rot Färbung für eine morphometrische Analyse der Infarkt- und Herzarchitektur verwendet. Ein adultes, murines Herz hat eine basal-apikale Länge von ca. 9 mm. Es wurde im 1 mm Abstand jeweils ein 20 µm Schnitt ausgewählt. Insgesamt also neun Schnitte. So konnte das Herz annäherungsweise aus neun jeweils 1 mm dicken Ringscheiben extrapoliert und dreidimensional rekonstruiert werden.

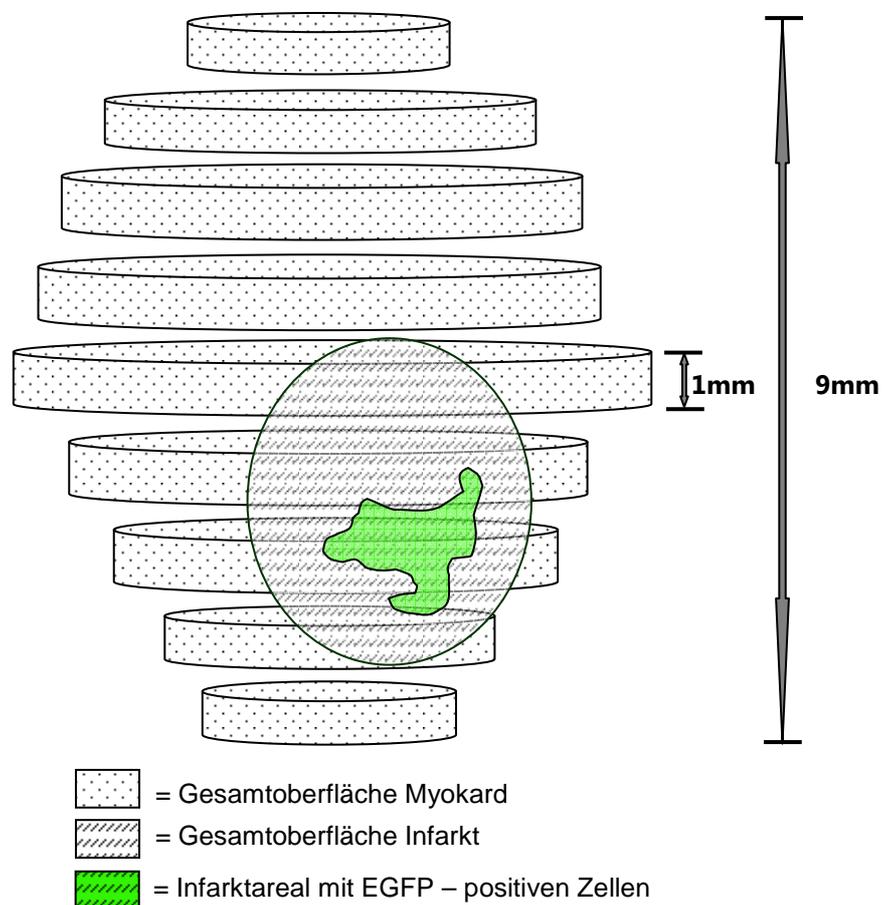


Abbildung 15 Schematische Schnittführung für die Morphologie

Die Grafik illustriert schematisch die Schnittführung durch das Herz. Aus den gemessenen und errechneten extrapolierten Säulen von 1 mm Höhe können die beschriebenen Parameter bestimmt werden.

Mit Hilfe der auf eine 16-fache Vergrößerung kalibrierten AxioVision Software (Zeiss) konnte die linksventrikuläre Fläche, das linksventrikuläre Lumen und die Fläche des Infarktes durch

manuelles Umfahren ermittelt werden. Die durchschnittliche Wanddicke des Myokards sowie die durchschnittliche Wanddicke des Infarktes wurden ebenfalls bestimmt. Hierzu wurden jeweils für einen Schnitt zwischen 4 und 7 Geraden manuell durch das Gewebe gelegt und die Mittelwerte errechnet. Die Auswertung und Messung der Schnitte erfolgte geblindet.

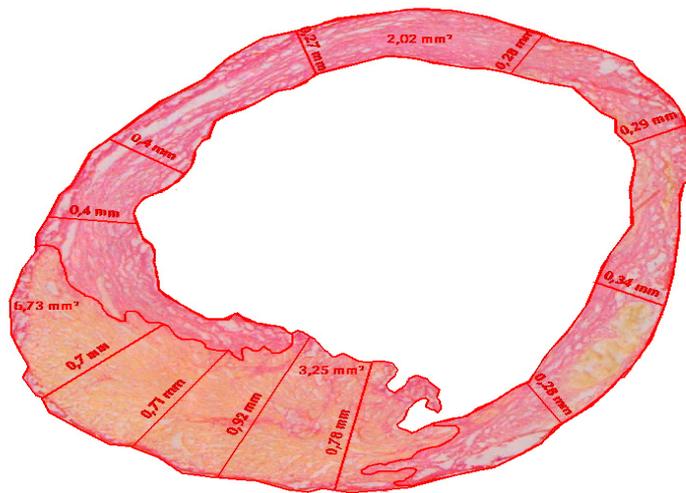


Abbildung 16 Exemplarisch vermessener, Sirius-Rot gefärbter Transversalschnitt

Nach Sirius-Rot Färbung wurden die Herzen von Hand vermessen und die erhaltenen Werte über die nachfolgend aufgeführten Formeln zur Analyse der Herzarchitektur verwendet. Das durch die Kryoläsion geschädigte Gewebe ist in rot angefärbt, das vitale Myokard erscheint in gelb bis orange.

Aus den ergebnen Werten konnten nun die Myokardfläche, die Gesamtlänge des Myokardes, die Länge des Infarktanteiles, die Oberfläche des Myokardes und die Oberfläche des Infarktareals errechnet werden. In Kenntnis des Abstandes der Schnitte konnte aus den erhaltenen Daten das Gesamtvolumen des Myokards, das Gesamtvolumen des Infarktes, die Gesamtaußenoberfläche des Myokards, die Gesamtaußenoberfläche des Infarktes, das prozentuelle Infarktverhalten und die prozentuelle Infarktoberfläche errechnet werden.

Algorithmisch leiten sich die Werte wie folgt ab:

Kenngröße, Abkürzung, Einheit	Algorithmus
Gesamtumfahrung li. Ventrikel (LG; mm)	Messwert
Infarktfläche (AI; mm ²)	Messwert
Linksventrikuläres Lumen (LL, mm ²)	Messwert
Wanddicke Myokard (DM; Median; mm)	Messwert
Wanddicke Infarkt (DI; Median; mm)	Messwert
Linksventrikuläre, nicht infarzierte Myokardfläche (AM; mm ²)	$AM = LG - (LL + AI)$
Außenlänge Myokard (LM; mm)	$LM = \frac{AM}{DM}$
Außenlänge Infarkt (LI; mm)	$LI = \frac{AI}{DI}$
Außenoberfläche Myokard (OM; mm ²)	$LM \cdot 1mm$
Außenoberfläche Infarkt (OI; mm ²)	$LI \cdot 1mm$
Gesamtvolumen Myokard (GM; mm ³)	$\sum AM \cdot 1mm$
Gesamtvolumen Infarkt (GI; mm ³)	$\sum AI \cdot 1mm$
Gesamtaußenoberfläche Myokard (GOM; mm ²)	$\sum OI$
Gesamtaußenoberfläche Infarkt (GOI; mm ²)	$\sum OM$
Prozentuales Infarktvolumen (%)	$\frac{GI}{GM + GI}$
Prozentuale Infarktoberfläche (%)	$\frac{GOI}{GOI + GOM}$

4.10 Statistische Verfahren

Die aus der hämodynamischen Messung und aus der morphometrischen Auswertung erhaltenen Werte wurden konvertiert und in MS Excel 2003 und SPSS 14 exportiert.

Die erhaltenen Daten wurden einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit anschließender Scheffé-Prozedur als Post-Hoc-Test unterzogen. Auf diese Weise wurden Einzelvergleiche über t-Tests vermieden, die zu einer α -Fehler Kummulation geführt hätten.

5 Ergebnisse

5.1 Transmurale kardiale Schädigung durch Kryoinfarzierung

5.1.1 Makroskopische Lokalisation der Kryoläsion

Die Kryoinfarkt-Operationsmethode generierte eine transmurale myokardiale Läsion im Bereich der freien linksventrikulären Wand. Das kryoinfarzierte Areal war dabei lokal klar umschrieben. Makroskopisch im Auflichtbild (Abb. 17 A) und besonders in digitalen Phasenkontraststufen (Abb. 17 B-D) konnte die Läsion eindeutig vom umgebenden, nicht infarzierten Gewebe abgegrenzt werden. Das Gewebe in direktem Umfeld um den Kryostempel wurde durch die Kälteauswirkungen ebenfalls geschädigt, so dass ein Kupferstempel von 4 mm Durchmesser eine Läsion von ca. 5 – 6 mm Durchmesser erzeugte. Neben der Größe war auch die Lokalisation der Läsion hoch reproduzierbar. A

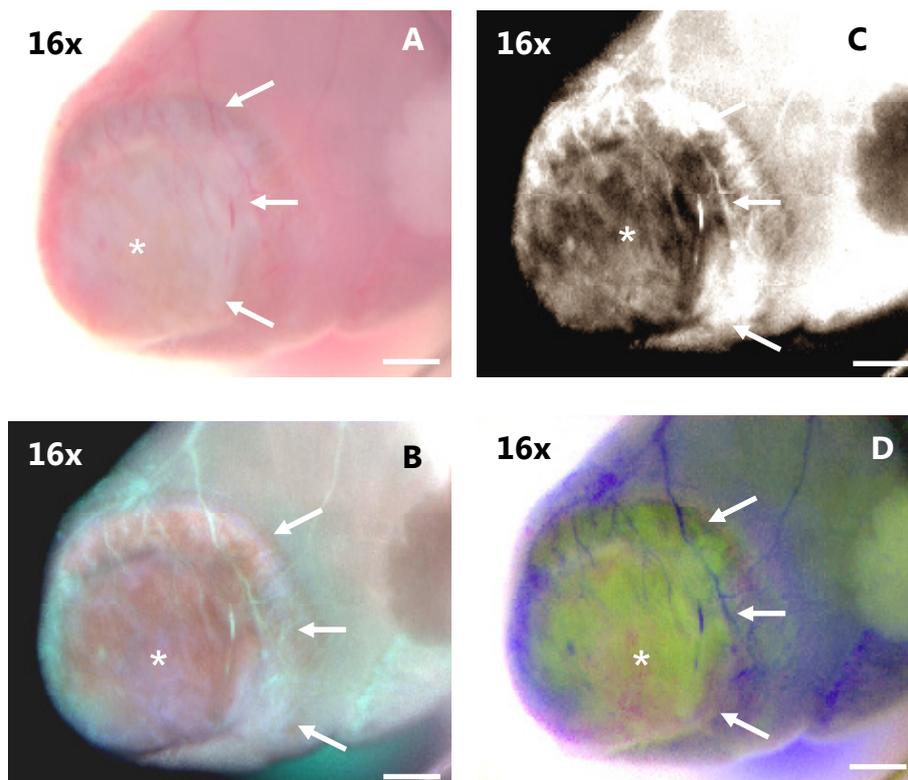


Abbildung 17 Kryoinfarkt makroskopisch in Auflicht Aufnahme- und Polarisationsstufen

Murines Herz 14 Tage nach Kryoinfarkt-Operation mit einem 4 mm Kupferstempel. Die weißen Pfeile weisen auf die runde Infarktzone. In den digitalen, phasenkontrastierten Polarisationsstufen (Abb. 17 B-D) lassen sich Rand- bzw. Zentralzone (weiße Sterne) deutlicher erkennen. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

5.1.2 Mikroskopische Lokalisation der Kryoläsion

Mittels Kryoinfarzierung konnte eine interindividuell homogene, transmurale Narbe erzeugt werden. Sowohl in der Sirius-rot Färbung (siehe Morphometrie) als auch in der Van Gieson-Färbung ließen sich die Ventrikel und das Septumsgewebe durch den Faserzugverlauf und die anatomische Lokalisation voneinander unterscheiden. Von diesen vitalen Geweben ließ sich der infarzierte und nekrotische Bereich in beiden Färbeverfahren deutlich abgrenzbar darstellen.

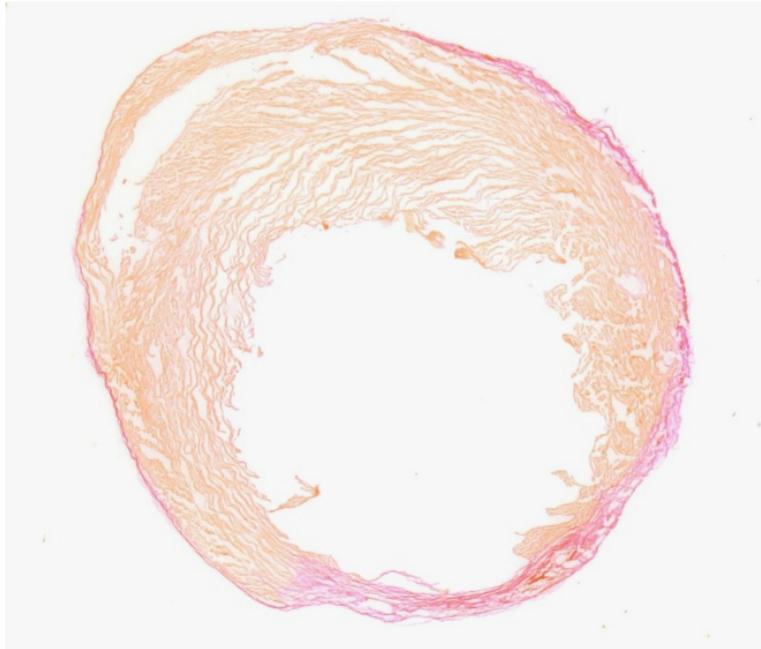


Abbildung 18 Van Gieson-Färbung nach Kryoinfarkt

In der Van Gieson Färbung ist die Infarktzone deutlich vom vitalen, nicht geschädigten Myokard zu unterscheiden. Vitales Gewebe ist in gelb bis orange dargestellt. Das durch den Kryoinfarkt geschädigte Myokard ist rot gefärbt.

5.2 Transplantation von embryonalen Kardiomyozyten

5.2.1 Integration der transplantierten eCM 3,7 und 14 Tage postoperativ

Intraoperativ wurden 200.000 transgene eCM in 5 µl Lösung in das infarzierte Areal injiziert. Die Entnahme der Herzen erfolgte nach drei, sieben und vierzehn Tagen. Die Integration der EGFP-transgenen eCM (Promotor: *human cardiac α-actin*) in das Wirtsgewebe wurde unter Verwendung eines Fluoreszenzfilters sowohl makroskopisch nach Entnahme der Herzen als auch mikroskopisch in angefertigten Kryoschnitten fotografiert und dokumentiert (Abb. 19 A-D). Das native vitale Myokard verfügte über eine diskrete Autofluoreszenz, die aber durch geeignete Doppelfilter eindeutig von der EGFP-Fluoreszenz unterschieden werden konnte. Das nekrotische Infarktareal erschien unter der Fluoreszenzlampe dunkel. In das Wirtsgewebe integrierte Kardiomyozyten zeigten sich sowohl nach 3 und 7, als auch nach 14 Tagen. Nach Injektion von Zell Lysaten aus eCM zeigte sich keine Fluoreszenz. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS-Lösung, die ebenfalls erwartungsgemäß keine Fluoreszenz hervorrief.

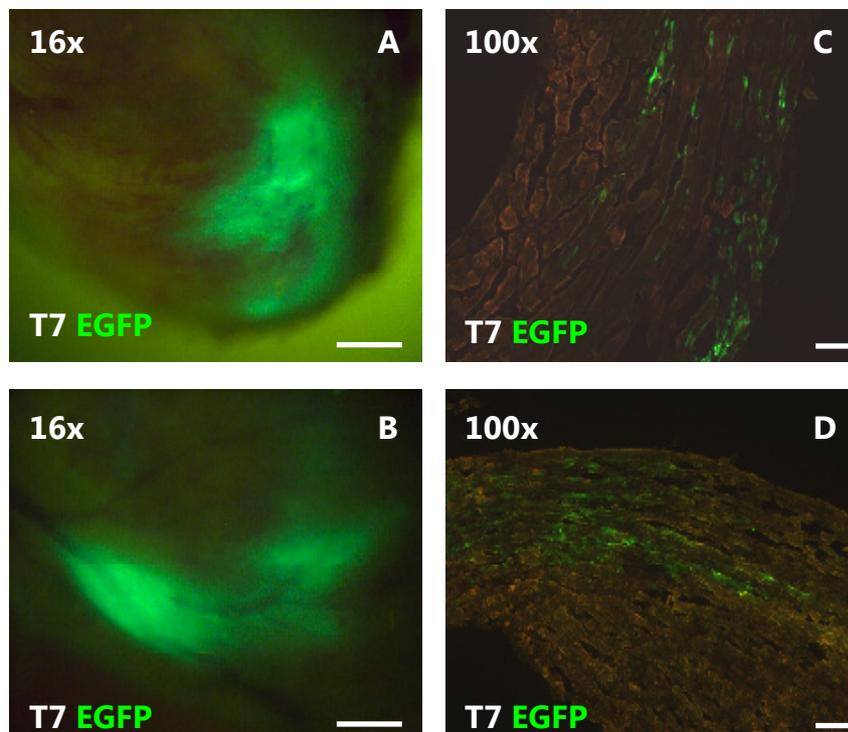


Abbildung 19 EGFP-Fluoreszenz makroskopisch (A, B) und am kryoperservierten Schnitt (C, D)

Abbildung 19 A und B zeigen makroskopisch im Läsionsbereich integrierte EGFP-positive Zellen 7 Tage postoperativ. Abbildung 19 C und D zeigen mikroskopische Aufnahmen der gleichen Herzen unter Verwendung eines Doppelfilters für EGFP. Maßstabsbalken in Abb. 19 A und B = 1mm; Maßstabsbalken in Abb. 19 C und D = 80 µm.

5.2.2 Transplantierte eCM elongieren zunehmend von Tag 3 zu Tag 14

Weiterhin wurden die morphologischen Eigenschaften der transplantierten eCM im Zeitverlauf untersucht. An Tag drei nach Transplantation war die Mehrzahl der transplantierten Zellen rund bis rundoval (Abb.20 A). An Tag sieben nach Transplantation hatte sich die Form der Kardiomyozyten abgeflacht. Die Zellen waren länger und orientierten sich in ihrer Ausrichtung am umgebenden Wirtsgewebe (Abb.20 B). Vierzehn Tage nach Transplantation waren die transplantierten eCM weiter elongiert und hatten sich in das Wirtsgewebe integriert (Abb. 20 C). Zudem war die Querstreifung, ein deutliches Zeichen für die Weiterdifferenzierung der transplantierten eCM, zwei Wochen postoperativ am deutlichsten sichtbar und mittels immunhistochemischen Methoden (α -actinin-Färbung) nachweisbar.

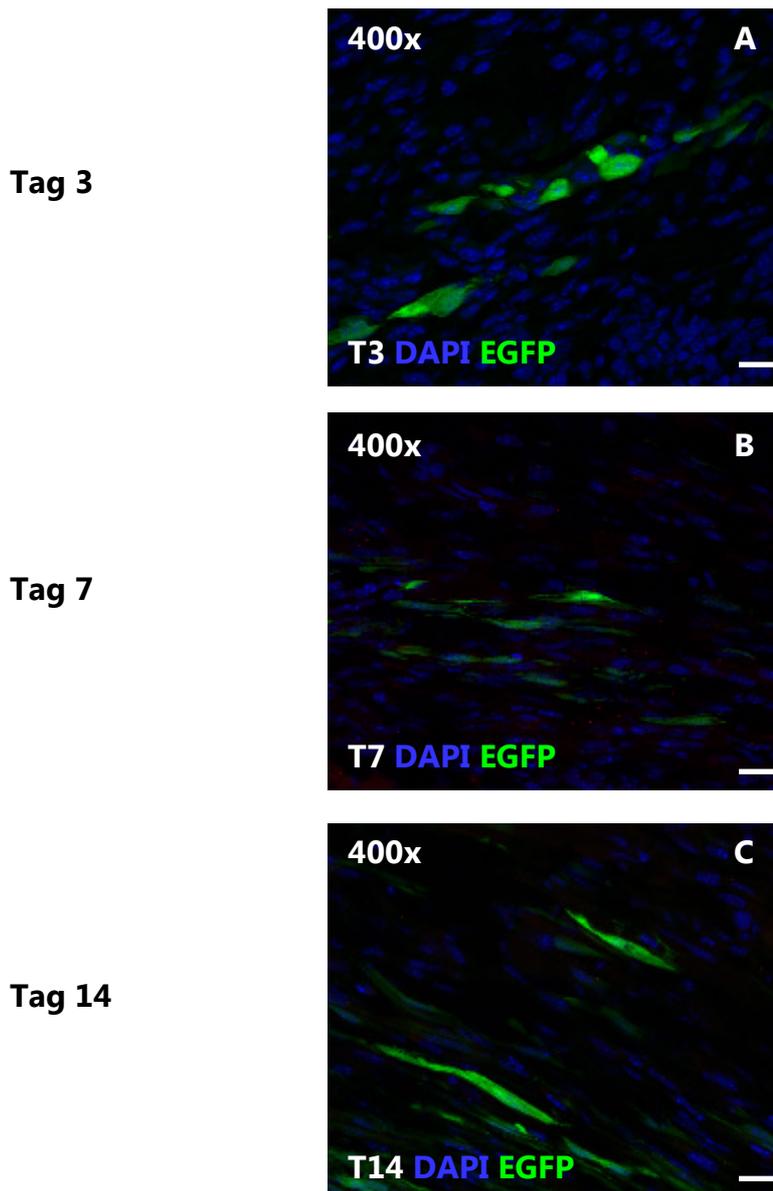


Abbildung 20 Elongation der Kardiomyozyten nach Transplantation im Zeitverlauf

Die transplantierten embryonalen Kardiomyozyten lassen sich durch die native EGFP-Fluoreszenz deutlich von der nur marginal vorhandenen Autofluoreszenz des umgebenden Infarktgewebes unterscheiden. Zu beachten ist die im Zeitverlauf von Tag 3 (Abb. 20 A) über Tag 7 (Abb. 20 B) zu Tag 14 (Abb. 20 C) erkennbare Elongation der transplantierten Zellen. Maßstabsbalken = 20 μm .

5.3 Herstellung von eCM- Lysaten

5.3.1 Trypan-blau Färbung

Bei der unter 4.3.1 beschriebenen Zellzählung konnten die entnommenen und zur Injektion vorbereiteten Kardiomyozyten ausgezählt werden. Aus einem embryonalen Herzen des Alters E 13.5 – 15.5 konnten zwischen 150.000 und 200.000 Zellen gewonnen werden (Abb. 21)



Abbildung 21 Dissoziierte embryonale Kardiomyozyten vor hypoosmolarer Lyse

Aus einem embryonalen Herzen E 13.5 – 15.5 wurden 150000 bis 200000 Zellen gewonnen. Maßstabsbalken = 80 μm .

Unter Verwendung des unter 4.4.1 beschriebenen Lyseprotokolls und anschließender Trypan blau Färbung zeigte sich, dass durch den Lyseprozess die zelluläre Integrität der embryonalen Kardiomyozyten vollständig aufgelöst wurde. Vitale und intakte Zellen wurden nicht mehr beobachtet. Teilweise waren noch Zellreste und Zelldetritus zu beobachten.

5.3.2 Korrelation von Zellzahl und Proteingehalt

Der Proteingehalt nach Zelllyse wurde mit der Bradford Methode bestimmt. Im Lysat von 200.000 embryonalen Kardiomyozyten, die Zellmenge welchen den Tieren in der eCM Gruppe standardisiert injiziert wurden, konnte eine Proteinmenge von durchschnittlich 60,7 µg/ml quantifiziert werden. Die Anzahl der lysierten Zellen korrelierte dabei mit $r=0,99$ mit dem erhaltenen Proteingehalt, die Varianzaufklärung beträgt 99 Prozent (Abb. 22).

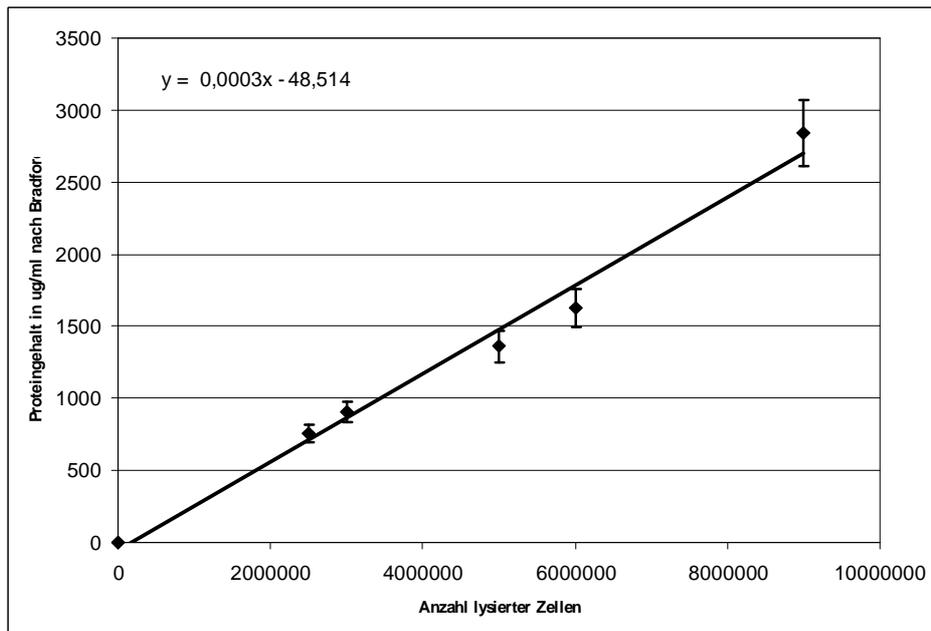


Abbildung 22 Korrelation des Proteingehaltes nach hypoosmolarer Lyse zur Anzahl der lysierten Zellen

Die Grafik zeigt die positive, lineare Regression mit $R^2=0,9859$ des nach Bradford Analyse bestimmten Proteingehaltes zur Anzahl der lysierten Zellen.

5.4 Morphometrisch-histologische Analyse

5.4.1 Prozentuales Infarktvolumen

Für die Gruppe der eCM zeigte sich ein durchschnittliches prozentuales Infarktvolumen von $21,4\% \pm 1,19\%$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts) am Gesamtvolumen des linksventrikulären Myokards. Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich ein durchschnittliches prozentuales Infarktvolumen von $8,39\% \pm 0,88\%$. Bei den Kontrollen lag das durchschnittliche prozentuale Infarktvolumen bei $10,99\% \pm 1,69\%$. Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit den drei Faktorstufen eCM, Lysate und Kontrollen mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p \leq 0,05$; $F_{2,12} = 28,153$). Dies beruht auf einem signifikanten Unterschied der Werte nach eCM Injektion von den Lysaten ($p \leq 0,05$) und den Kontrollen ($p \leq 0,05$).

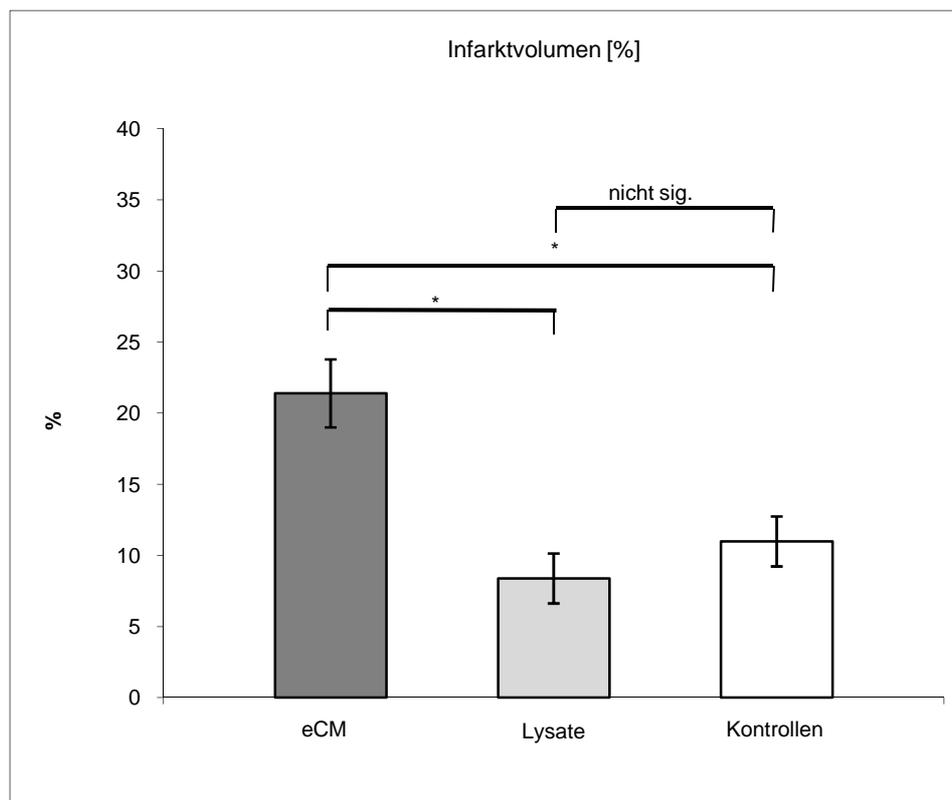


Abbildung 23 Analyse des prozentualen Infarktvolumens

Prozentuales Infarktvolumen der drei untersuchten Kohorten: Mäuse mit Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die eCM Kohorte unterscheidet sich signifikant von Lysaten und Kontrollen. Kontrollen und Lysate untereinander unterscheiden sich nicht.

5.4.2 Mittelwert der Wanddicke des Infarktgebietes

Für die Gruppe der eCM zeigte sich ein durchschnittlicher Mittelwert der Wanddicke des Infarktgebietes von $0,52\text{mm} \pm 0,03\text{ mm}$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich ein durchschnittlicher Mittelwert der Wanddicke des Infarktgebietes von $0,22\text{mm} \pm 0,04\text{ mm}$. Bei den Kontrollen lag der durchschnittliche Mittelwert der Wanddicke des Infarktgebietes bei $0,24\text{mm} \pm 0,04\text{ mm}$. Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit den drei Faktoren eCM, Lysate und Kontrollen mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p \leq 0,05$; $F_{2,12} = 16,783$): Dies beruht auf einem signifikanten Unterschied der Werte nach eCM Injektion von den Lysaten ($p \leq 0,05$) und den Kontrollen ($p \leq 0,05$), während sich zwischen den Lysaten und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede zeigten ($p=0,937$).

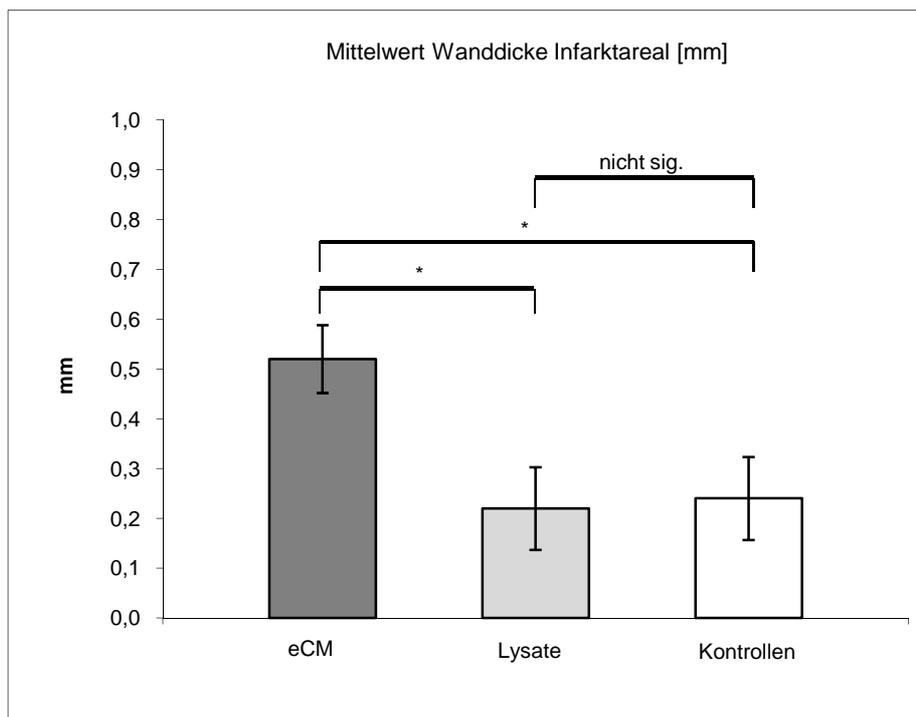


Abbildung 24 Analyse des Mittelwertes Wanddicke des Infarktes

Mittelwert der Wanddicke der drei untersuchten Kohorten: Mäuse mit Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die eCM Kohorte unterscheidet sich signifikant von Lysaten und Kontrollen. Kontrollen und Lysate untereinander unterscheiden sich nicht.

5.4.3 Infarktoberfläche

Für die Gruppe der eCM zeigte sich eine durchschnittliche prozentuale Infarktoberfläche von $18,93\% \pm 0,74\%$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich eine durchschnittliche prozentuale Infarktoberfläche von $21,96\% \pm 1,13\%$. Bei den Kontrollen lag die durchschnittliche prozentuale Infarktoberfläche bei $21,79\% \pm 1,96\%$. Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit den drei Faktorstufen eCM, Lysate und Kontrollen mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p = 0,268$; $F_{2,12} = 1,532$: die Werte nach eCM Injektion wichen weder von den Lysaten ($p = 0,342$) noch von den Kontrollen ($p = 0,379$) signifikant ab.

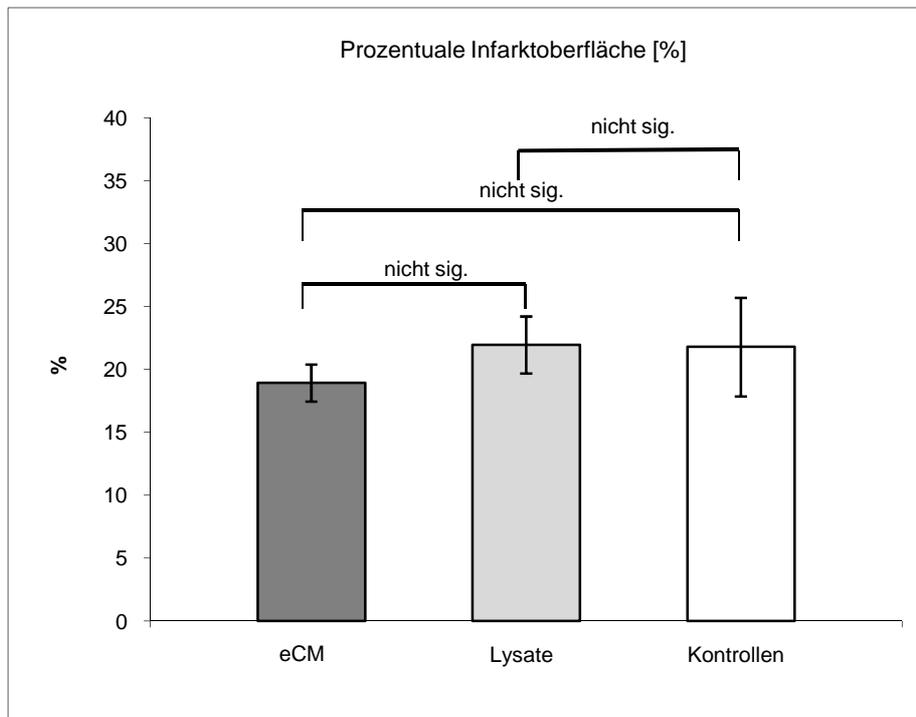


Abbildung 25 Analyse der prozentualen Infarktoberfläche

Prozentuale Infarktoberfläche der drei untersuchten Kohorten: Mäuse mit Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die Kohorten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

5.5 Immunhistochemische Analyse

5.5.1 Vimentin und Ki67 positive Zellen im vitalen Myokard

Die Abbildungen 26 A-C zeigen jeweils charakteristische Ausschnitte nativen Myokardarealen in kryoinfarzierten Herzen. In Abbildung A und C wurden die Herzmuskelzellen längs angeschnitten, in Abbildung B quer. Die Kardiomyozyten waren durch ihre Erscheinungsform und besonders durch die erhaltene charakteristische Querstreifung (weiße Sterne in Abb. 26 A-C) identifizierbar. Die Zellen wiesen eine im Fluoreszenzlicht dunkelgrün erscheinende Autofluoreszenz auf. Die Anzahl Ki67-positiver Kerne, ein Zeichen von Proliferation (weiße Pfeile in Abb. 26 B und C) ist im vitalen Myokard niedrig. Die Vimentin-Färbung ist in den Interzellularspalten zwischen den Kardiomyozyten lokalisiert und färbt am ehesten dort lokalisierte Fibroblasten an. In Bezug auf das Volumen überwiegen bei weitem die Kardiomyozyten. Das Ki67- und Vimentin-Verteilungsmuster unterschied sich im vitalen Myokard im Zeitverlauf nicht. Auch zwischen den 3 untersuchten Gruppen, Mäuse mit Injektion von eCM, Mäuse mit Injektion von Lysaten aus eCM und Mäuse mit Kontrollinjektion zeigten sich keine Unterschiede.

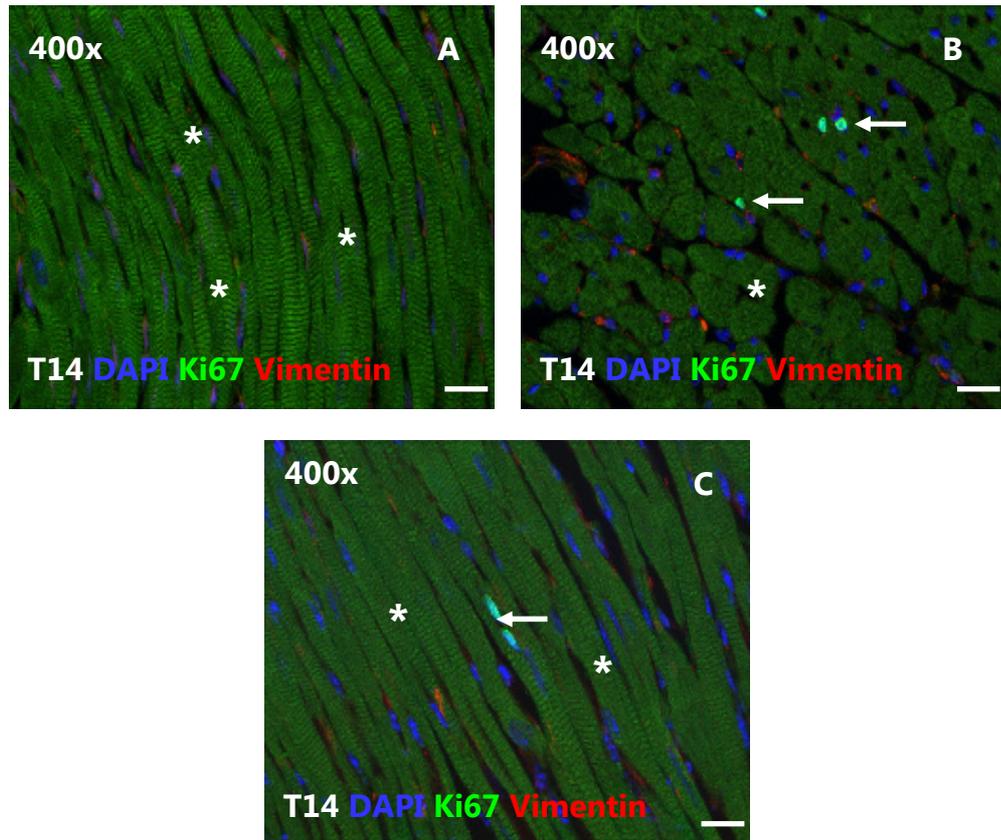


Abbildung 26 Ki67- und Vimentin-Färbung im vitalen Myokard

Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte aus intaktem und vitalem Myokard, welches durch die Kryoläsion nicht geschädigt wurde. Die weißen Sterne markieren Areale mit deutlicher Querstreifung der Kardiomyozyten. Die weißen Pfeile zeigen auf Ki67-positive Zellen. Der Ki67-Antikörper wird unter Verwendung eines Alexa 488-Zweitantikörpers grün dargestellt, Vimentin mit einem Cy3-Zweitantikörper rot dargestellt. Die Hoechst-Kernfärbung erscheint in blau. Maßstabsbalken = 20 μ m.

5.5.2 Nachweis von Fibroblasten und proliferierenden Zellen im Infarkt

In Abbildung 27 ist in der linken Spalte (Abb. 27 A-C) jeweils ein Bild aus der Übergangszone von vitalem Myokard zu Infarktgewebe dargestellt, zu erkennen an Morphologie und Autofluoreszenz der nicht geschädigten, nativen Kardiomyozyten. Die rechte Spalte (Abb. 27 D-F) zeigt jeweils einen zentralen Ausschnitt aus der Infarktzone. Der Zeitverlauf nach Operation und Injektion ist zeilenweise von Zeile 1: Tag 3 nach Operation, über Zeile 2: Tag 7 nach Operation zu Zeile 3: Tag 14 nach Operation gegliedert.

Am dritten Tag nach Operation (Abb. 27 A und D) war sowohl in der Übergangszone (A) als auch im zentralen Infarktareal (D) ein deutlich aufgelockerter Gewebeverband erkennbar. Die vorherrschende Zellform war rund bis rundoval. Sowohl in der Übergangsregion (A) als auch im zentralen Infarktareal (D) wiesen davon zahlreiche Zellen eine Ki67-positive Signatur auf und befanden sich somit in einem proliferierenden Zellstadium. Der Vimentin Antikörper besitzt eine Spezifität für Bindegewebszellen und zeigte an Tag 3 nach Operation im geschädigten Gewebe eine sehr deutliche Färbung. Im vitalen Myokard der Übergangszone färbten sich wie bereits beschrieben nur vereinzelte Zellen an.

Eine Woche postoperativ (Abb. 27 B und E) waren die meisten Zellen oval bis längsoval geformt. Auch die Zellkerne waren im Vergleich zu den runden Zellkernen an Tag 3 abgeflacht. Der Narbenverband orientierte sich in seiner Erstreckung deutlich an der Architektur des Gewebezuges des Ventrikels. Die Ki67-positiven, proliferierenden Zellen waren weniger zahlreich als an Tag 3. In der Kohorte nach Injektion von eCM zeigte sich gegenüber der Kohorte nach Injektion von Lysaten und Kontrollen eine vermehrte Anzahl Ki67-positiver Zellen. In der Inferenzstatistischen Analyse wurde jedoch nach Auszählung 10 exemplarischer Schnitte kein signifikantes Ergebnis erzielt. Dieses Verteilungsmuster zeigte sich sowohl in der Übergangsregion als auch im zentralen Infarktbereich.

14 Tage postoperativ (Abb. 27 C und F) waren die Zellen und auch die Zellkerne sowohl in der Übergangsregion (C) als auch in der zentralen Infarktzone (F) elongiert. Der Gewebeverband präsentierte sich verdichtet und die Zellen waren entlang der Zugrichtung des Narbenverlaufes ausgerichtet. Es ließen sich kaum mehr Zellen identifizieren, die ein Ki67-positives Signal aufwiesen. Nur sehr wenige Zellen wurden durch den Vimentin Antikörper

markiert, wobei auch an Tag 14 in der Übergangsregion mehr Zellen Vimentin-positiv sind als in der zentralen Infarktzone (F).

Zusammenfassend lässt sich beschreiben, dass die Anzahl der Ki67- und auch der Vimentin-positiven Zellen sowohl in der Übergangszone (Abb. 27 A-C) als auch in der zentralen Infarktzone (Abb. 27 D-F) im Zeitverlauf, von Tag 3 über Tag 7 zu Tag 14, abnahm. Nach Injektion von eCM proliferierten an Tag sieben vermehrt Vimentin-positiv Zellen als nach Injektion von Kontrollmedium oder Lysaten. Ansonsten ließen sich zwischen den untersuchten Gruppen in Bezug auf die Zellproliferation und das Vimentin Verteilungsmuster jedoch keine Unterschiede beobachten.

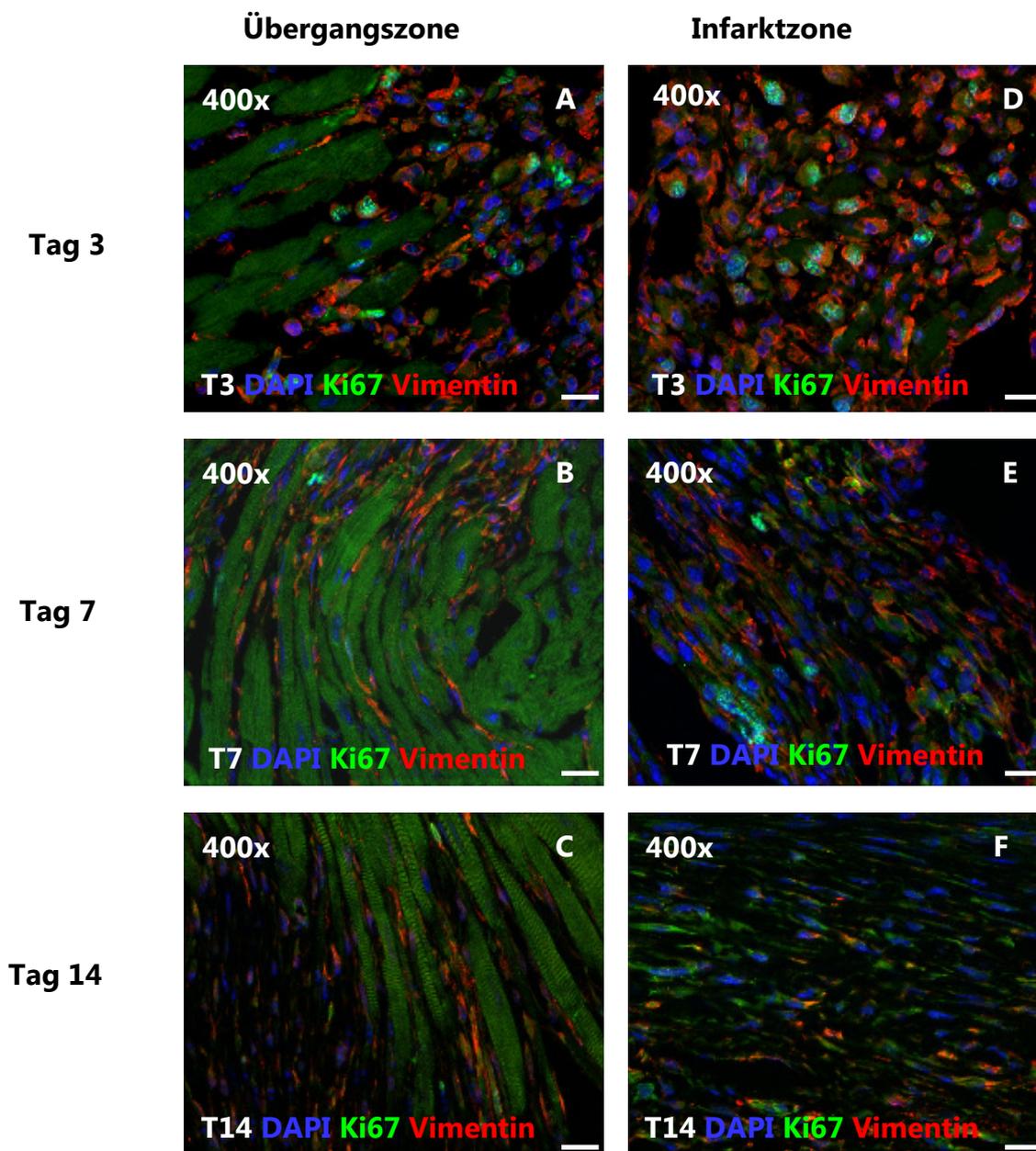


Abbildung 27 Ki67 - und Vimentin-Färbung im Infarktgebiet

Der Ki67 Antikörper ist mit einem Alexa 488 Zweitantikörper grün dargestellt, Vimentin ist mit einem Cy3 Zweitantikörper rot dargestellt. Die Hoechst-Kernfärbung ist blau dargestellt. Die linke Spalte (Abb. 27 A-C) zeigt jeweils den Übergang von vitalem Myokard zu infarziertem Myokard nach Injektion von eCM. A an Tag 3 nach der Kryoläsion, B an Tag 7, C an Tag 14. Die Abbildungen der rechten Spalte (Abb. 27 D-F) zeigen jeweils einen Ausschnitt dem zentralen Bereich der Infarktzone. D an Tag 3, E an Tag 7 und F an Tag 14 nach der Läsion. Maßstabsbalken = 20 µm.

5.5.3 Überlappung der Vimentin-Färbung und der Ki67-Färbung

In Abbildung 28 A und B ist jeweils der identische Ausschnitt aus einem zentralen Abschnitt des Infarktes an Tag 3 nach Kryoinfarzierung dargestellt. Die weißen Pfeile weisen in Bild A und B exemplarisch jeweils auf die identischen Zellen. Der Ki67-Antikörper wies bei allen untersuchten Zellen eine Überschneidung mit der Hoechst - Kernfärbung auf. Zudem wurde untersucht, in wieweit sich die Ki67-positiven Zellen auch über ein Vimentin-Signal charakterisieren ließen. Bei allen untersuchten Zellen zeigte sich dabei, dass Zellen, die positiv für den Proliferationsmarker Ki67 waren, auch eine positive Färbesignatur für den Marker Vimentin aufwiesen.

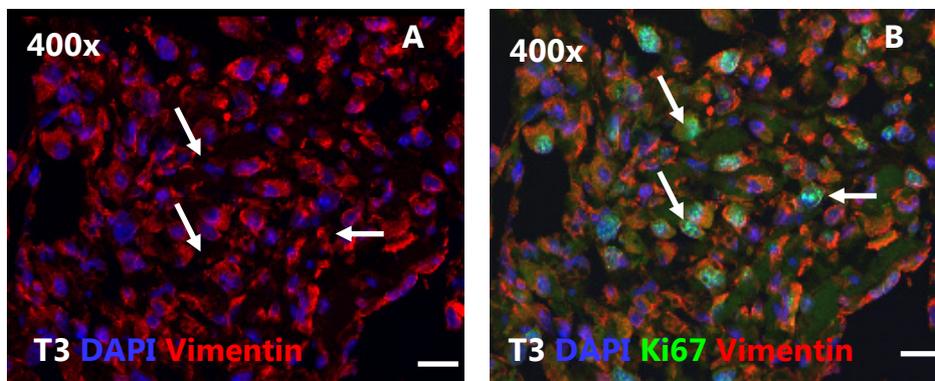


Abbildung 28 Überschneidung der Ki67- und Vimentin-Färbung

Der Ki67 Antikörper ist mit einem Alexa 488 anti-Hase Zweitantikörper grün dargestellt, Vimentin ist mit einem Cy3 anti-Huhn Zweitantikörper rot dargestellt. Die Hoechst-Kernfärbung ist blau gezeigt. Abbildung A zeigt nur die Hoechst-Kernfärbung und das Signal der Vimentin-Färbung. Abbildung B zeigt zusätzlich den Kanal für die Ki67-Färbung in grün eingeblendet. Die weißen Pfeile weisen in A und B jeweils auf die identischen Zellkerne. Maßstabsbalken = 20 µm.

5.5.4 Lectin-Färbung zum Nachweis von Gefäßen im vitalen Myokard

Die Zellen des Gewebeverbandes ließen sich, wie bereits beschrieben, durch ihre charakteristische Zellform und die erhaltene Querstreifung als Kardiomyozyten identifizieren. In rot ließen sich zahlreiche geschlossenen, quer angeschnittene vaskuläre Strukturen erkennen, welche einen Teil der Mikrovaskularisierung des Myokardes widerspiegeln (weiße Pfeile). Ganz vereinzelt lassen sich im vitalen Myokard Zellen erkennen, die ein positives Signal für den Pan-Hämatopoesemarker CD 45 aufwiesen (weißer Stern).

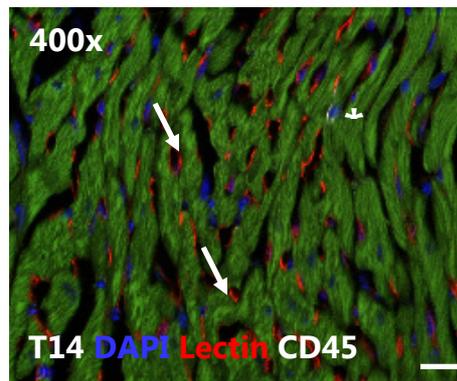


Abbildung 29 Lectin – positive Kapillaren im vitalen, nicht infarzierten Myokard

Die Lectin – Färbung ist rot dargestellt. Der CD45 Antikörper ist mit einem Cy5 anti – Ratte Zweitantikörper in weiß dargestellt. Die Hoechst-Kernfärbung erscheint in blau. Die weißen Pfeile weisen auf durch die Lectin Färbung dargestellte Gefäße. Der weiße Stern weist auf eine CD 45 positive Zelle. Maßstabsbalken = 20 µm.

5.5.5 Lectin-Färbung zum Nachweis von Gefäßen im Infarktbereich

Am dritten Tag nach Operation (Abb. 30 A und D) war sowohl in der Übergangsregion (A) als auch im zentralen Infarktareal (D) wie bereits beschrieben ein deutlich aufgelockerter Gewebeverband mit runder bis rundovaler Zellform erkennbar. Sowohl in der Übergangsregion (A) als auch im zentralen Infarktareal (D) wiesen davon zahlreiche Zellen eine Lectin-positive Signatur auf. Im vitalen Myokard der Übergangszone griff die Lectin-Färbung nur vereinzelt im Interzellularraum an.

An Tag 7 nach Generierung der Narbe (Abb. 30 B und E) zeigte sich auch hier, wie auch in 4.7.2 beschrieben, in den untersuchten Schnitten eine eher ovale bis längsovale Zellform. Auch die Zellkerne waren im Vergleich zu den runden Zellkernen an Tag 3 abgeflacht. Der

Zellverband orientierte sich in seiner Erstreckung deutlich an der Architektur des Gewebezuges. Die Lectin-positiven Zellen waren weniger zahlreich als an Tag 3. Dieses Verteilungsmuster zeigte sich sowohl in der Übergangsregion als auch im zentralen Infarktbereich. 14 Tage nach Operation (Abb.30 C und F) waren die Zellen und auch die Zellkerne sowohl in der Übergangsregion (C) als auch in der zentralen Infarktzone (F) elongiert. Der Gewebeverband war verdichtet und die Zellen entlang der Zugrichtung des Narbenverlaufes ausgerichtet. Es ließen sich kaum mehr Zellen identifizieren, die ein Lectin-positives Signal aufwiesen. Das Verteilungsmuster der Lectin-Färbung unterschied sich innerhalb der untersuchten Gruppen, Mäuse nach Injektion von eCM, nach Injektion von Lysaten aus eCM und nach Injektion von Kontrollmedium nicht.

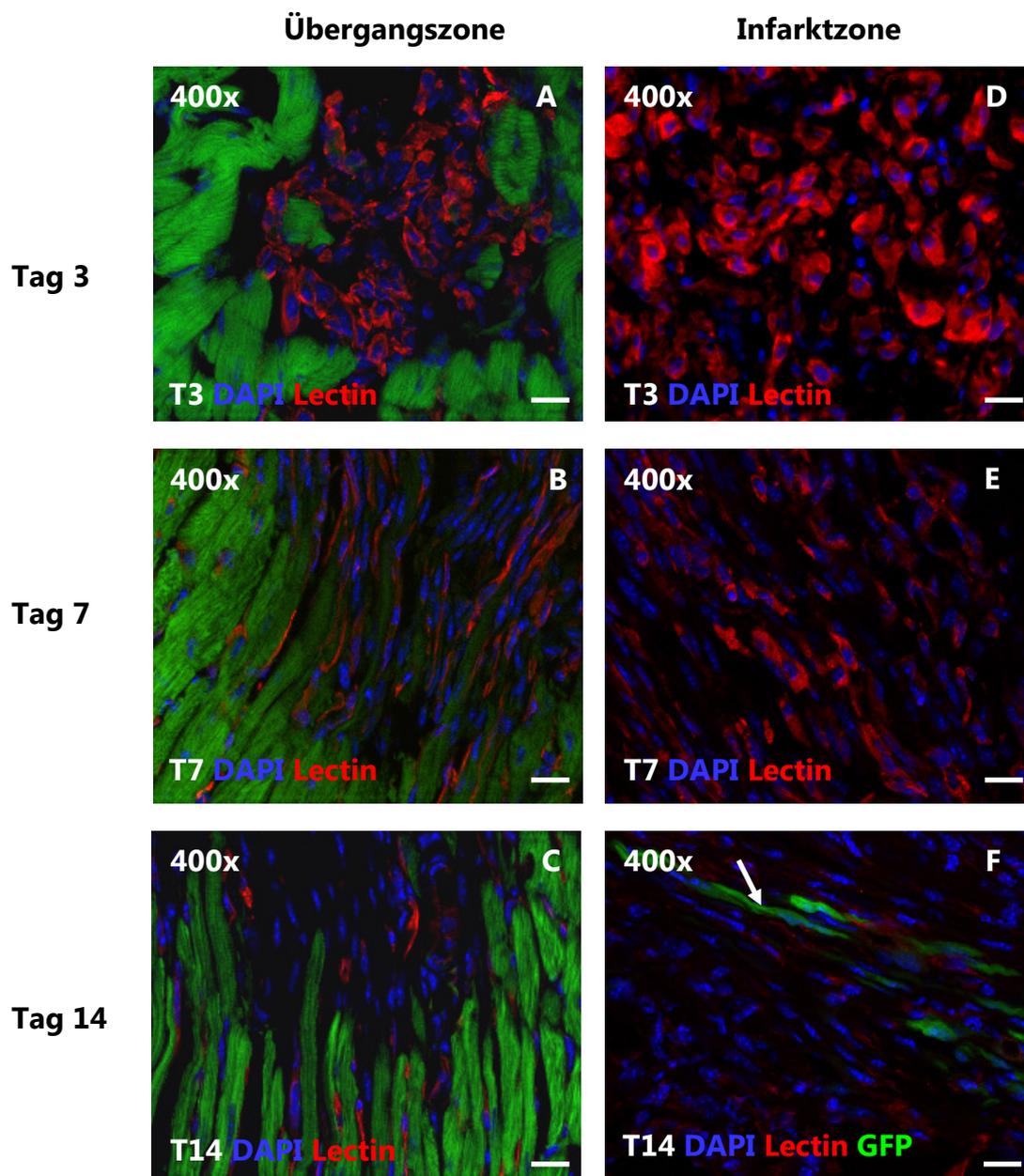


Abbildung 30 Lectin – Färbung im Infarktgebiet

Die Lectin-Färbung ist in rot dargestellt. Die Hoechst Kernfärbung ist blau dargestellt. Der weiße Pfeil in 30 F weist auf einen EGFP-positiven Kardiomyozyten. Maßstabsbalken = 20 µm.

5.5.6 Inflammation nach Kryoläsion bzw. zellulärer Kardiomyoplastie

Blutzellen wurden über den Pan-Hämatopoiesemarker CD 45 nachgewiesen. Am dritten Tag nach Kryoläsion (Abb. 31 A und D) war sowohl in der Übergangsregion (A) als auch im zentralen Infarktareal (D) ein aufgelockerter Gewebeverband erkennbar. Sowohl in der Übergangsregion (A) als auch im zentralen Infarktareal (D) wiesen zahlreiche Zellen eine CD 45-positive Signatur auf. Im vitalen Myokard der Übergangszone waren nur sehr vereinzelt CD 45-positive Zellen zu erkennen. An Tag 7 nach Generierung der Narbe (Abb. 31 B und E) orientierte sich der Zellverband in seiner Erstreckung deutlich an der Architektur des Gewebebezuges. Insgesamt wiesen weniger Zellen als am dritten post-OP Tag ein CD 45-positives Signal auf. 14 Tage postoperativ (Abb. 31 C und F) ließen sich kaum mehr CD 45-positive Zellen nachweisen.

Das Verteilungsmuster der CD 45-Färbung unterschied sich innerhalb der untersuchten Gruppen, Injektion von eCM, Injektion von eCM Lysaten und Injektion von Kontrollmedium nicht

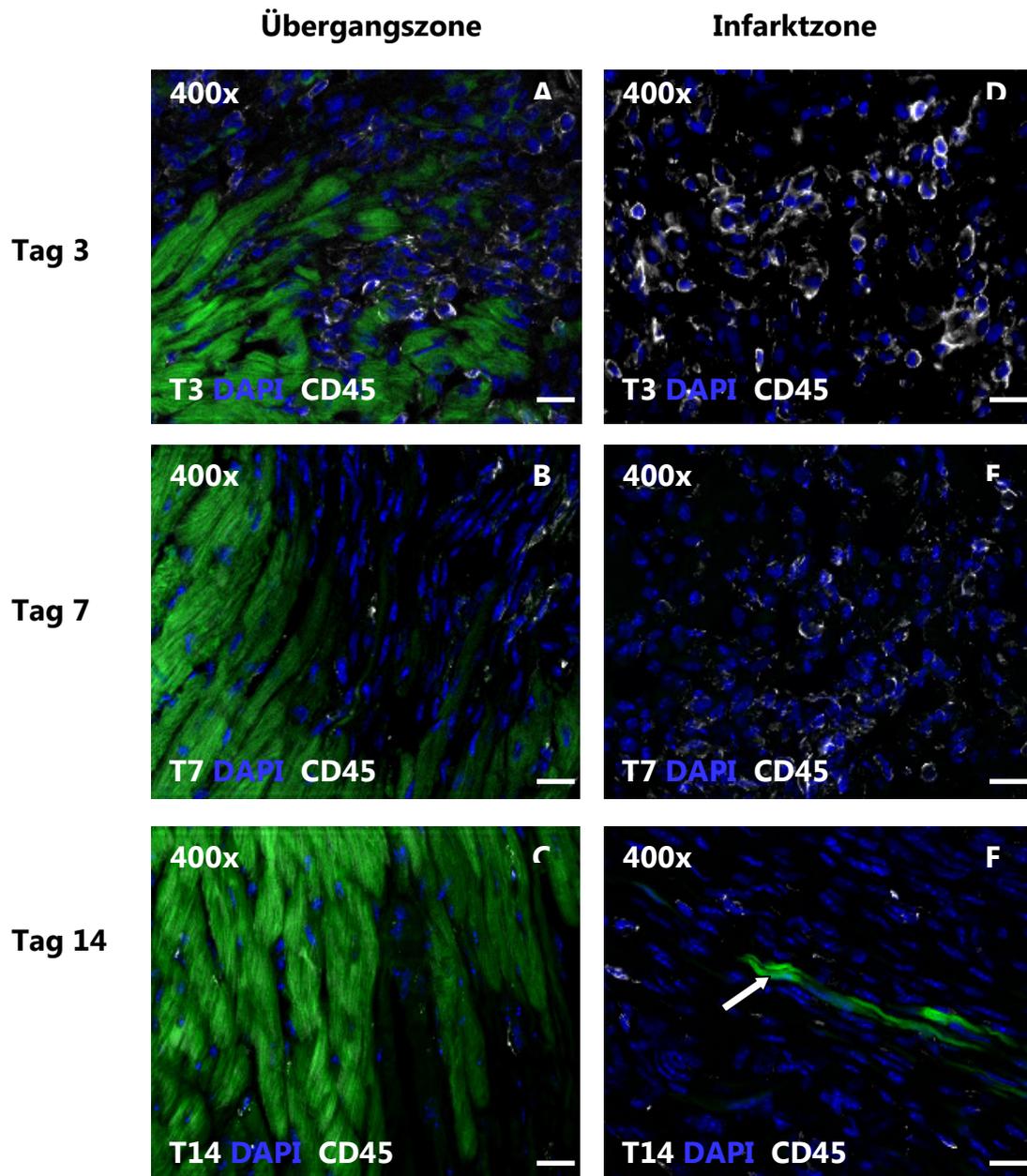


Abbildung 31 CD 45-Färbung im Infarktgebiet

Der CD 45 positive Zellen sind durch Verwendung eines Cy5 Zweitantikörpers weiß dargestellt. Die Hoechst Kernfärbung erscheint in blau. Der weiße Pfeil in Abb. 31 F zeigt einen transplantierten, EGFP – positiven Kardiomyozyten. Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

5.5.7 Nachweis von glatter Muskulatur über die α smac-Färbung

Mit Hilfe des α smac – Antikörpers konnten u.a. glatte Muskelzellen in der Gefäßwand von Koronargefäßen dargestellt werden. In Abbildung 32 ist exemplarisch eine Arteriole im Bereich der Infarktregion dargestellt, welche über eine glatte Muskelschicht verfügt.

Weder das Verteilungsmuster noch die Quantität (2-6 pro Schnitt) der α smac-positiven Gefäße änderte sich im untersuchten Zeitverlauf. Auch zwischen den drei untersuchten Gruppen, Mäuse nach Injektion von eCM, Mäuse nach Injektion von Lysaten aus eCM oder Mäuse nach Injektion von Kontrollmedium, wurden keine Unterschiede festgestellt.

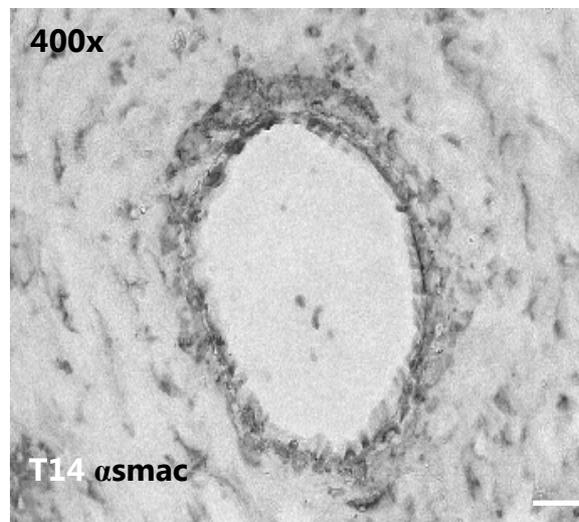


Abbildung 32 α smac-positiv Gefäße im Infarktgebiet

Die Abbildung zeigt Durchlichtaufnahmen eines Ausschnittes aus der Infarktregion 14 Tage nach Operation. Der α smac Antikörper ist über das DAB (3,3'-Diaminobenzidin) – Entwicklungsprotokoll in schwarz dargestellt. Maßstabsbalken = 20 μ m.

5.5.8 Nachweis von Extrazellulärmatrix am Beispiel des Perlecan Proteins

In Abbildung 33 A sind EGFP-positive embryonale Kardiomyozyten an Tag 14 nach Operation als Übersichtsaufnahme dargestellt. Abbildung 33 B zeigt dabei das korrespondierende Bild nach PERLECAN Färbung und DAB Entwicklung. Der weiße Rahmen stellt die entsprechende Region dar, die für die 400-fache Vergrößerung (vergl. Abb. 34 F) ausgewählt wurde.

In Abbildung 34 ist in der linken Spalte jeweils ein Bild aus der zentralen Infarktzone nach Injektion von Kontrolllösung dargestellt. Die rechte Spalte zeigte jeweils einen zentralen Ausschnitt aus der Infarktzone nach Injektion von eCM in einem Gebiet, in dem die eCM nach Injektion angewachsen sind und in einem korrespondierenden Vergleichsschnitt unter der Fluoreszenzlampe ein EGFP-positives Signal zeigen (s. Abb 33). Der Zeitverlauf nach Operation und Injektion ist zeilenweise von Zeile 1: Tag 3 nach Operation, über Zeile 2: Tag 7 nach Operation zu Zeile 3: Tag 14 nach Operation gegliedert.

Sowohl in der Gruppe nach Injektion von Kontrollmedium (Abb. 34 A-C) als auch in der Gruppe nach Transplantation von embryonalen Kardiomyozyten (Abb. 34 D-F) zeigt sich, wie bereits beschrieben, eine Verdichtung der Narbenstruktur und eine Orientierung der Zellen entlang des Gewebeverbandes. In der Kontroll- und Lysatgruppe zeigte sich eine leichte Zunahme der Perlecan-Färbeintensität von Tag 3 zu Tag 7. Am 14 postoperativen Tag war nahezu keine Perlecan Expression zu sehen. Nach Injektion von eCM in in das Infarktgebiet ist vor allem eine Woche postoperativ, also während der Konsolidierung der Narbe, ein deutliches Perlecan Signal zu sehen. Dabei war die Perlecan Expression vor allem um die transplantierten eCM lokalisiert.

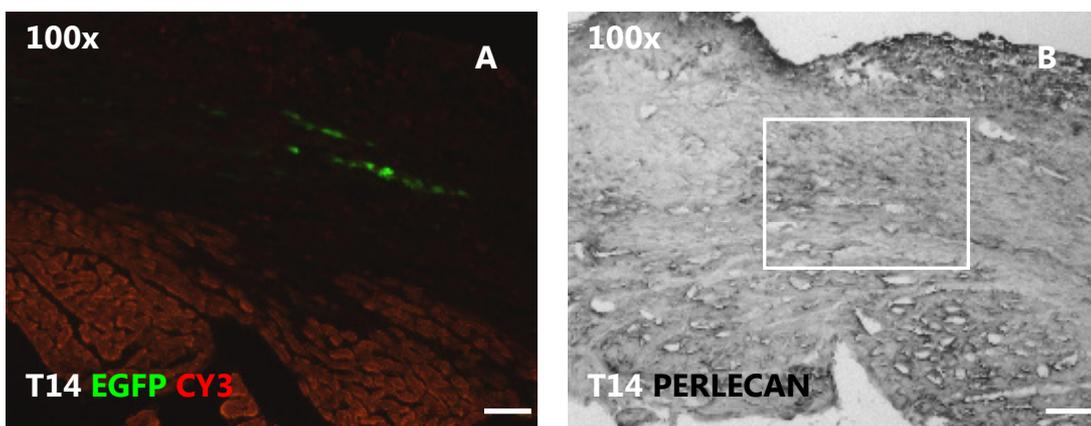


Abbildung 33 Übersicht zur Auswahl der Schnittregion in Abbildung 34

Abbildung 33 A zeigt EGFP-positive embryonale Kardiomyozyten an Tag 14 nach der Operation. Abb. 33 B zeigt einen korrespondierenden Schnitt mit PERLECAN Färbung nach DAB Entwicklung. Der weiße Rahmen stellt die entsprechende Region dar, die für die 400-fache Vergrößerung (vergl. Abb. 34 F) ausgewählt wurde. Der weiße Maßstabsbalken entspricht 80 µm.

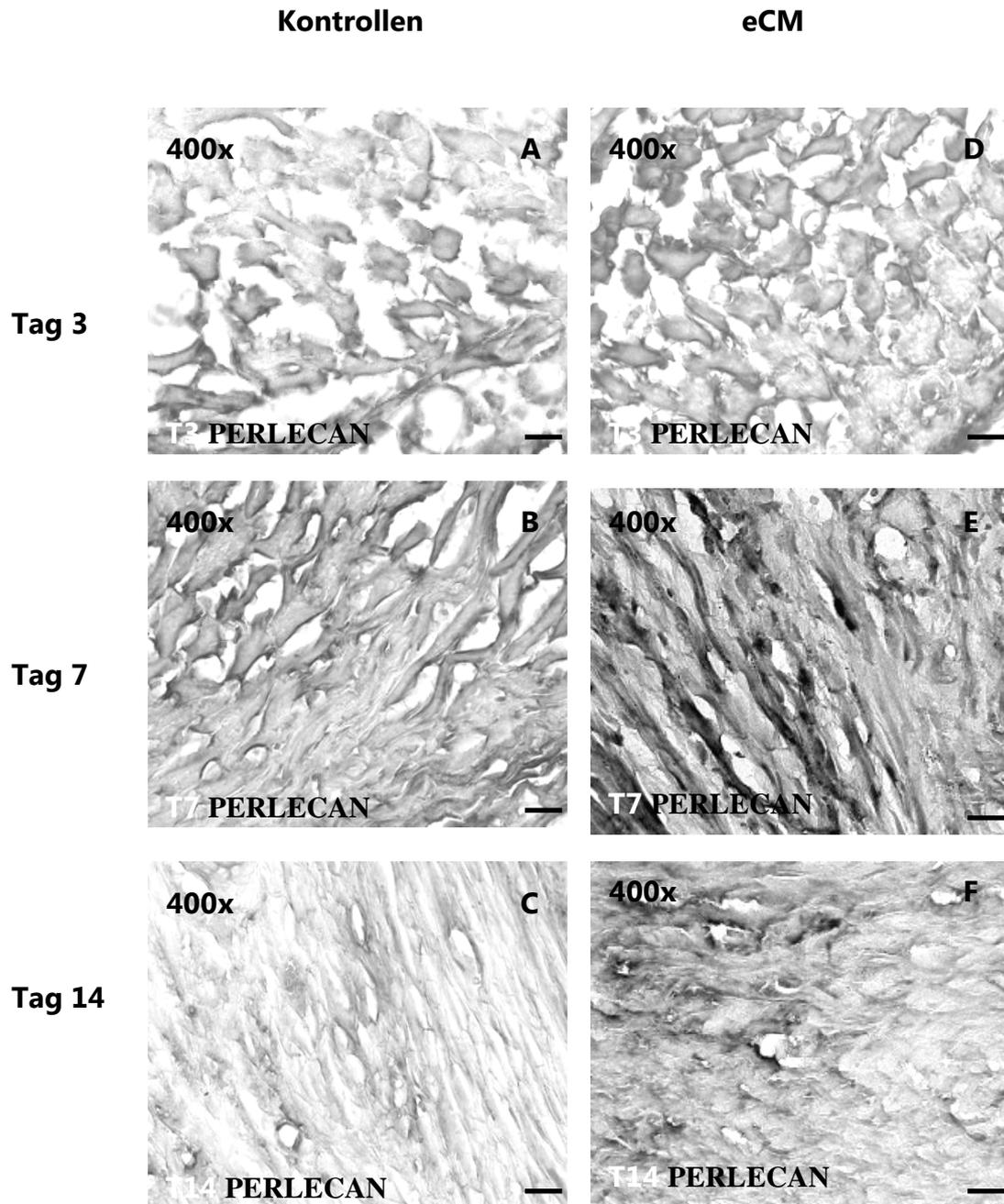


Abbildung 34 Perlecan Färbung im Infarktgebiet

Das Bild zeigt Durchlichtaufnahmen, jeweils aus einem zentralen Abschnitt der Infarktzone. In der linken Spalte (Abb. 34 A-C) ist ein Herz nach Injektion von PBS Lösung dargestellt, in der rechten Spalte (Abb. 34 D-F) ein Herz nach Injektion von eCM. Der Perlecan-Antikörper ist über das DAB-Entwicklungsprotokoll schwarz dargestellt. Maßstabsbalken = 20 µm.

5.5.9 Kontrollen

Bei der immunhistochemischen Analyse wurde über eine Antikörper Kontrollfärbung sichergestellt, dass es sich bei den angewendeten Färbungen um für den jeweiligen Marker spezifische Färbungen handelte. Anstelle des ersten Antikörpers wurde während des Färbeprotokolls PBS-Lösung auf den Schnitt aufgebracht. Es wurde anschließend kontrolliert, ob der zweite Antikörper auch ohne den ersten Antikörper eine unspezifische Färbung hervorrief. Diese Kontrollen wurden für alle hier gezeigten Färbungen durchgeführt.

Exemplarisch (Abb. 35) wird hier eine Kontrolle von einer Kombinationsfärbung von Ki67 und Vimentin mit den Zweitantikörpern Alexa 488 anti-Hase und Cy3 anti-Huhn in vitalem Myokard 14 Tage nach Operation und Injektion von PBS-Lösung in den Infarktbereich gezeigt. Die beiden hier verwendeten Zweitantikörper Alexa 488 anti-Hase und Cy3 anti-Huhn riefen keine unspezifische Färbung hervor.

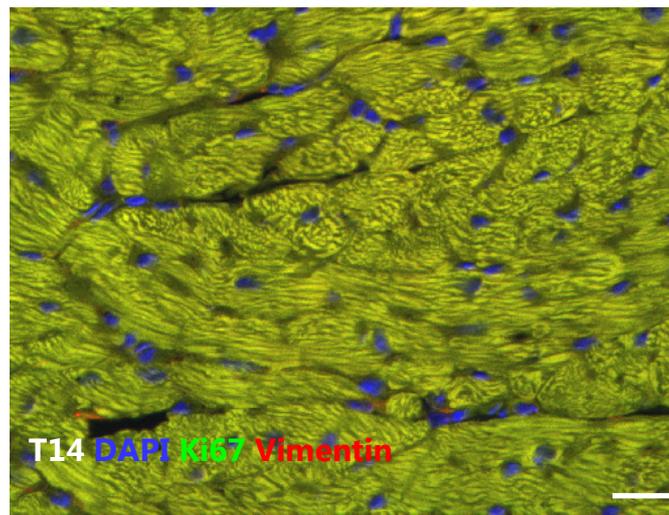


Abbildung 35 Kontrollfärbung von Ki67 und Vimentin ohne ersten Antikörper

Die verwendeten Zweitantikörper Alexa 488 anti-Hase (grün) und Cy3 anti-Huhn (rot) rufen keine unspezifische Färbung hervor. Die hohe Autofluoreszenz des Myokardes lässt sich durch geeignete Doppelfilter gut von dem hier nicht erkennbaren grünen Ki67 Signal unterscheiden. Maßstabsbalken = 20 μm

5.6 Hämodynamische Analyse

5.6.1 Herzfrequenz

Mäuse, welchen eCM in die myokardiale Läsion implantiert worden waren, zeigten 14 Tage postoperativ eine durchschnittliche Herzfrequenz von $541,45 \pm 31,84$ bpm (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich eine durchschnittliche Herzfrequenz von $551,61 \pm 23,80$ bpm. Bei den Kontrollen lag die durchschnittliche Herzfrequenz bei $576,56 \pm 20,61$ bpm.

Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit den drei Faktorstufen eCM, Lysate und Kontrollen mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p = 0,609$; $F_{2,20} = 0,508$). Die Werte nach eCM Injektion wichen weder von den Lysaten ($p = 0,962$) noch von den Kontrollen ($p = 0,632$) signifikant ab.

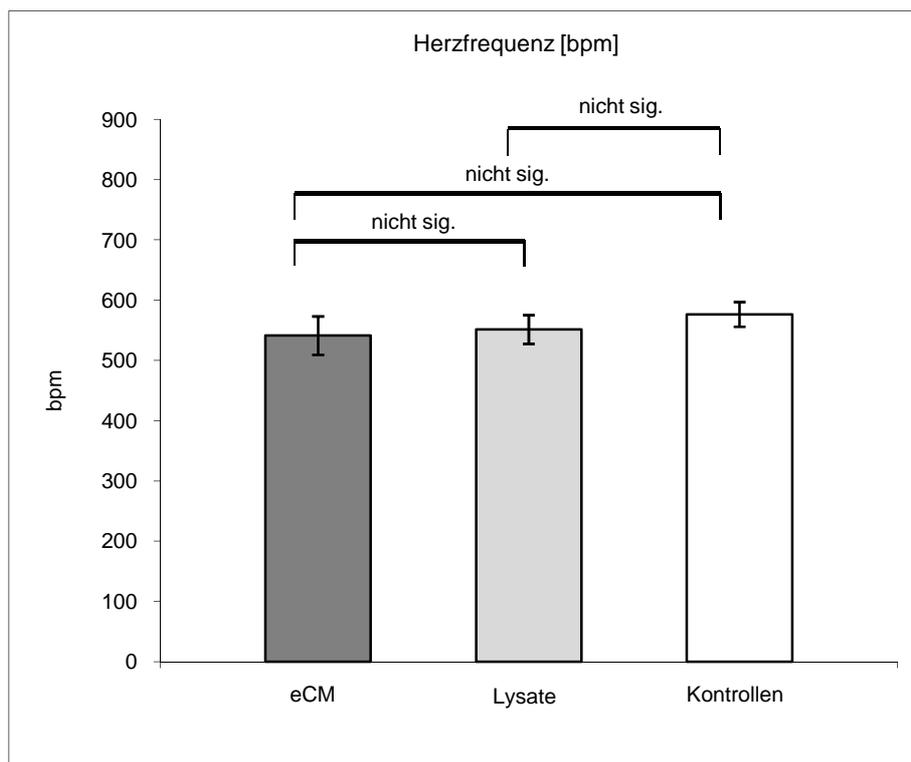


Abbildung 36 Analyse der Herzfrequenz

Gezeigt wird die durchschnittliche Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (bpm) der drei untersuchten Kohorten 14 Tage postoperativ: Mäuse nach Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten nach hypoosmolarer Lyse aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die drei untersuchten Kohorten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

5.6.2 Schlagvolumen

Für die Gruppe der Mäuse nach Transplantation von eCM zeigte sich ein durchschnittliches Schlagvolumen von $39,26 \mu\text{l} \pm 3,82 \mu\text{l}$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich ein durchschnittliches Schlagvolumen von $28,61 \mu\text{l} \pm 1,32 \mu\text{l}$. Bei den Kontrollen lag das durchschnittliche Schlagvolumen bei $29,81 \mu\text{l} \pm 1,59 \mu\text{l}$. Eine einfaktorische Varianzanalyse mit den drei Faktorstufen, eCM, Lysate und Kontrollen mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p \leq 0,05$; $F_{2,20} = 5,836$). Dieser Effekt kann auf ein signifikantes Abweichen der Werte nach eCM Injektion von den Lysaten ($p \leq 0,05$) und den Kontrollen ($p \leq 0,05$) zurückgeführt werden, während sich zwischen den Lysaten und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede zeigten ($p=0,934$).

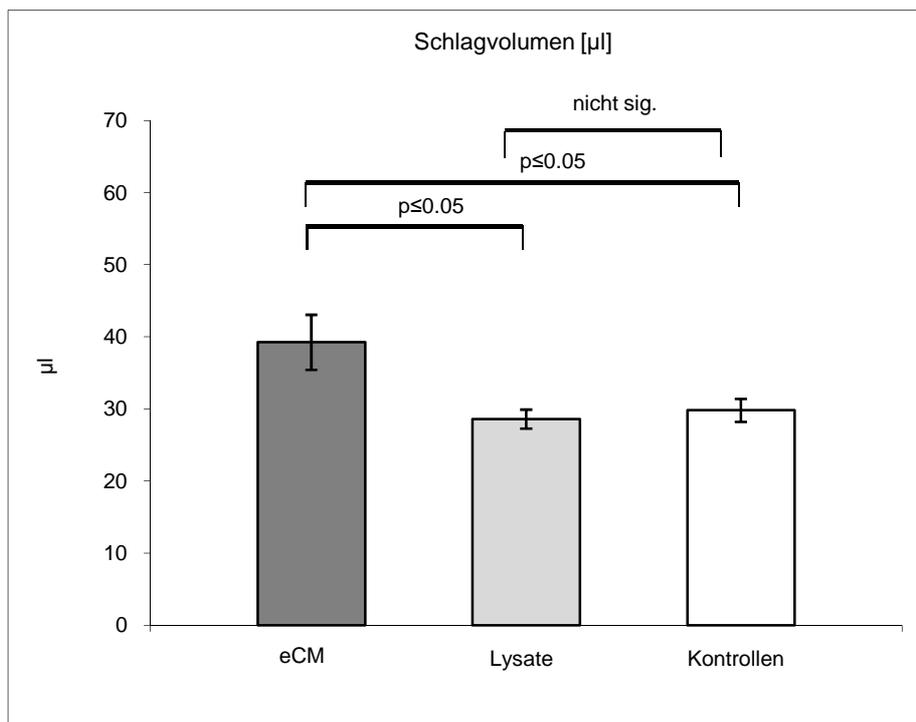


Abbildung 37 Analyse des Schlagvolumens

Gezeigt wird das durchschnittliche Schlagvolumen der drei untersuchten Kohorten in μl : Mäuse mit Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten nach hypoosmolarer Lyse aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die Kohorte nach Injektion von eCM unterscheidet sich sowohl von der Kohorte nach Lysatinjektion als auch von der Kontrollkohorte signifikant.

5.6.3 Herzzeitvolumen

In der eCM Gruppe wurde mittels Linksherzkatheter 14 Tage postoperativ ein durchschnittliches Herzzeitvolumen von $20957,76 \mu\text{l} / \text{min} \pm 2019 \mu\text{l} / \text{min}$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts) gemessen. Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich ein durchschnittliches Schlagvolumen von $15890,79 \mu\text{l} / \text{min} \pm 1204,29 \mu\text{l} / \text{min}$. Bei den Kontrollen lag das durchschnittliche Schlagvolumen bei $17016,51 \mu\text{l} / \text{min} \pm 682,07 \mu\text{l} / \text{min}$. Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit den drei Faktorstufen eCM, Lysate und Kontrollen mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p \leq 0,05$; $F_{2,20} = 3,729$): nach Auswertung der Einzelvergleiche wichen die Werte nach eCM Injektion jedoch von den Kontrollen ($p = 0,151$) nicht signifikant ab. Auch im Vergleich mit den Lysaten ($p = 0,052$) wurde im Einzelvergleich knapp kein signifikantes Ergebnis erzielt.

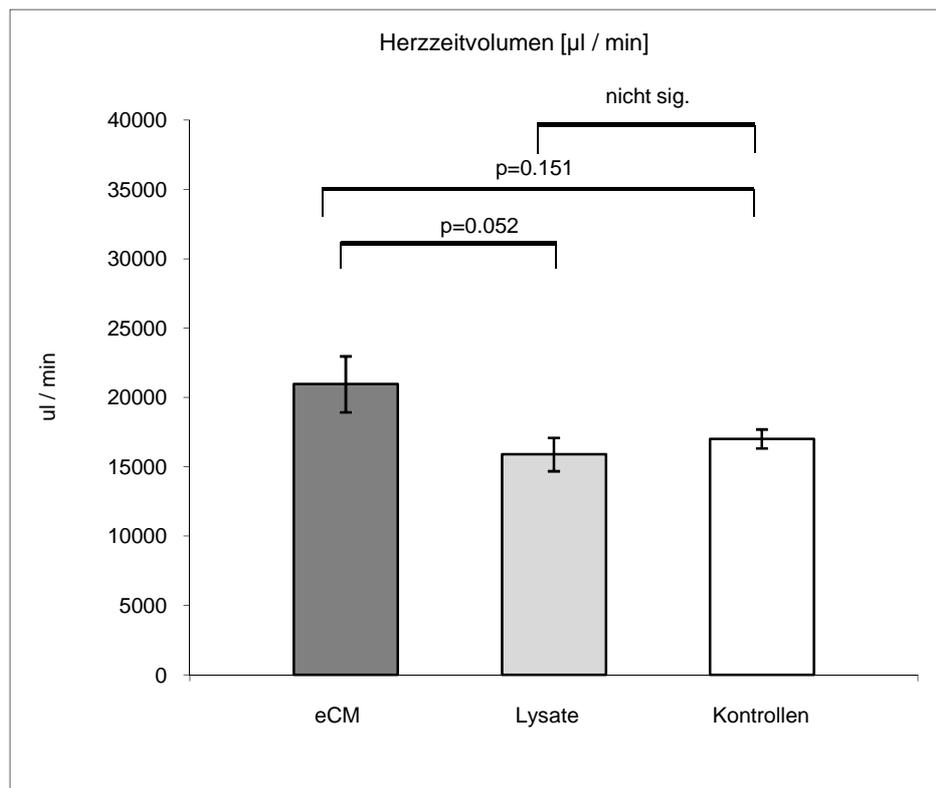


Abbildung 38 Analyse des Herzzeitvolumens

Gezeigt wird das durchschnittliche Herzzeitvolumen in $\mu\text{l} / \text{min}$ der drei untersuchten Kohorten: Mäuse nach Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten nach hypoosmolarer Lyse aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die untersuchte Gruppe nach eCM Injektion unterscheidet sich nicht signifikant von den Lysaten und den Kontrollen. Lysate und Kontrollen untereinander unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant.

5.6.4 Ejektionsfraktion

In der eCM Gruppe zeigte sich eine durchschnittliche Ejektionsfraktion von $50,78\% \pm 3,19\%$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich dagegen eine durchschnittliche Ejektionsfraktion von $40,45 \pm 2,67\%$. Bei den Kontrollen lag die durchschnittliche Ejektionsfraktion bei $39,15\% \pm 1,21\%$. Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit den drei Faktorstufen eCM, Lysate und Kontrollen mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p \leq 0,05$; $F_{2,20} = 6,544$). Dies beruht auf einem signifikanten Abweichen der Werte nach eCM Injektion von den Lysaten ($p \leq 0,05$) und den Kontrollen ($p \leq 0,05$), während sich zwischen den Lysaten und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede zeigten ($p=0,929$).

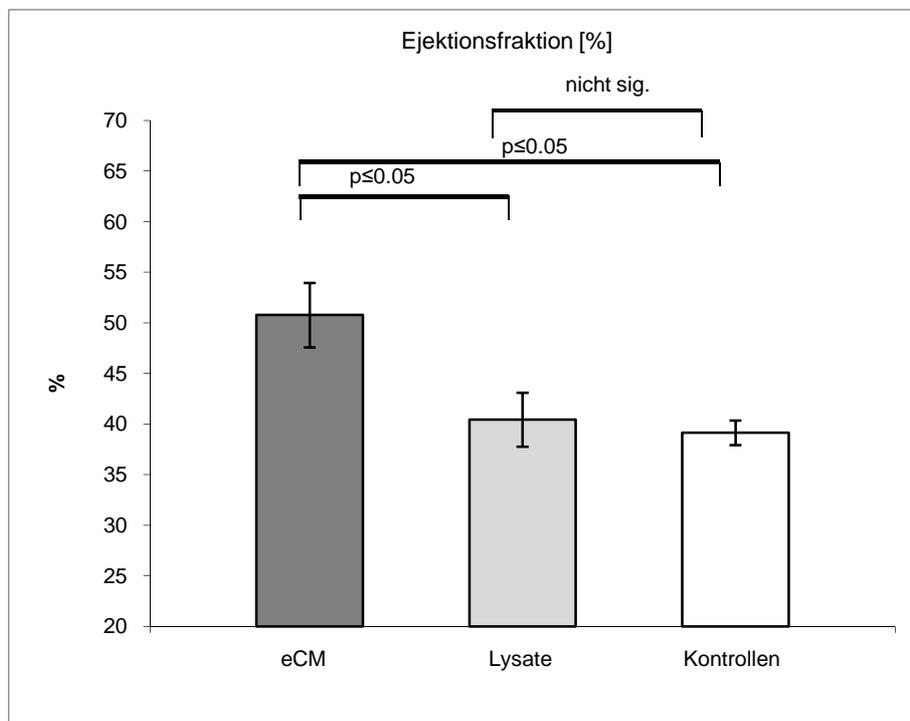


Abbildung 39 Analyse der Ejektionsfraktion

Gezeigt wird die durchschnittliche Ejektionsfraktion in Prozent der drei untersuchten Kohorten: Mäuse nach Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten nach hypoosmolarer Lyse aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die untersuchte Gruppe nach eCM Injektion unterscheidet sich signifikant von den Lysaten und den Kontrollen. Lysate und Kontrollen untereinander unterscheiden sich nicht signifikant.

5.6.5 Enddiastolisches Volumen

Für die eCM Gruppe zeigte sich ein durchschnittliches enddiastolisches Volumen von $70,71 \mu\text{l} \pm 6,54 \mu\text{l}$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich ein durchschnittliches enddiastolisches Volumen von $65,86 \mu\text{l} \pm 4,03 \mu\text{l}$. Bei den Kontrollen lag das durchschnittliche enddiastolische Volumen bei $70,02 \mu\text{l} \pm 3,6 \mu\text{l}$.

Eine einfaktorische Varianzanalyse mit den drei Faktorstufen eCM, Lysate und Kontrollen mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p = 0,736$; $F_{2,20} = 0,311$). Die Werte nach eCM Injektion wichen weder von den Lysaten ($p = 0,776$) noch von den Kontrollen ($p = 0,995$) signifikant ab.

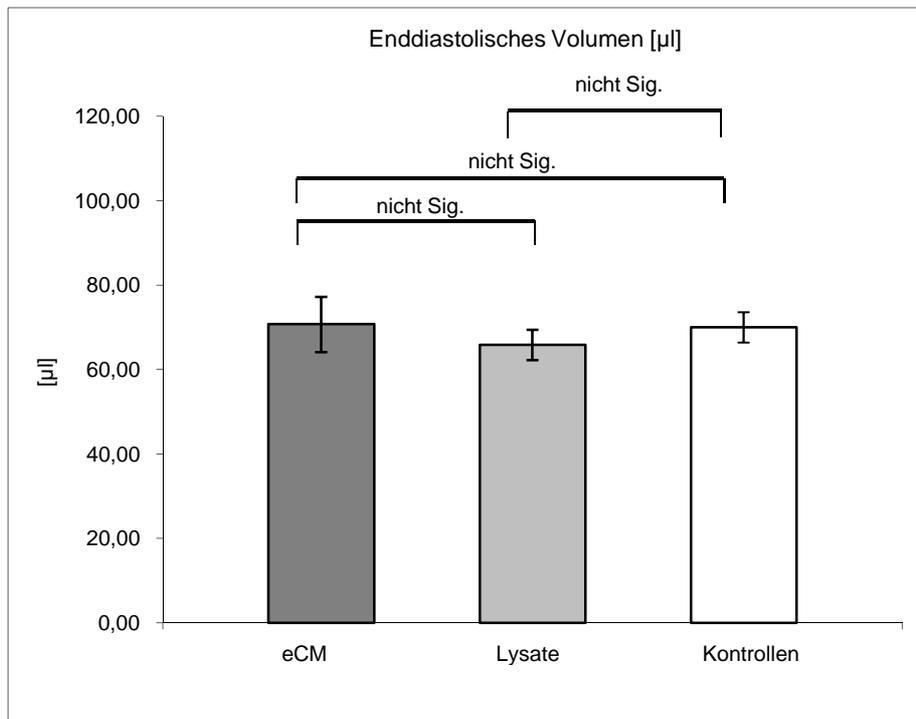


Abbildung 40 Analyse des enddiastolischen Volumens

Gezeigt wird das durchschnittliche enddiastolische Volumen der drei untersuchten Kohorten: Mäuse mit Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten nach hypoosmolarer Lyse aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die Kohorten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

5.6.6 Enddiastolischer Druck

Für die Gruppe der eCM zeigte sich ein durchschnittlicher enddiastolischer Druck von 9,29 mmHg \pm 2,8 mmHg (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich eine durchschnittlicher enddiastolischer Druck von 6,51 mmHg \pm 2,36 mmHg. Bei den Kontrollen lag der durchschnittliche enddiastolische Druck bei 6,9 mmHg \pm 1,32 mmHg.

Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit den drei Faktorstufen, eCM, Lysate und Kontrollen, mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p = 0,647$; $F_{2,20} = 0,446$): die Werte nach eCM Injektion wichen weder von den Lysaten ($p = 0,683$) noch von den Kontrollen ($p = 0,754$) signifikant ab.

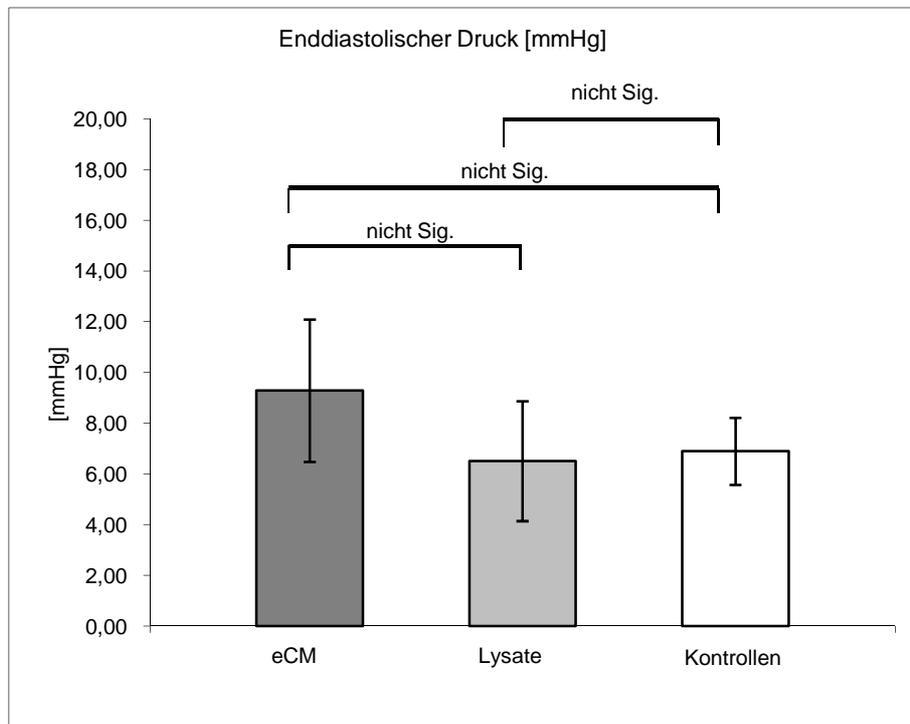


Abbildung 41 Analyse des durchschnittlichen enddiastolischen Drucks

Gezeigt wird der durchschnittliche enddiastolische Druck in mmHg der drei untersuchten Kohorten: Mäuse nach Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten nach hypoosmolarer Lyse aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die drei untersuchten Kohorten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

5.6.7 Minimale intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit

Für die eCM Gruppe zeigte sich eine durchschnittliche minimale intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit von $-6739,89 \text{ mmHg / s} \pm 373,44 \text{ mmHg / s}$ (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich eine durchschnittliche minimale intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit $-5927,82 \text{ mmHg / s} \pm 527,38 \text{ mmHg / s}$. Bei den Kontrollen lag die durchschnittliche minimale intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit bei $-7257,64 \text{ mmHg / s} \pm 359,1 \text{ mmHg / s}$. Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit den drei Faktorstufen eCM, Lysate und Kontrollen mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p = 0,107$; $F_{2,20} = 2,505$): die Werte nach eCM Injektion wichen weder von den Lysaten ($p = 0,439$) noch von den Kontrollen ($p = 0,709$) signifikant ab.

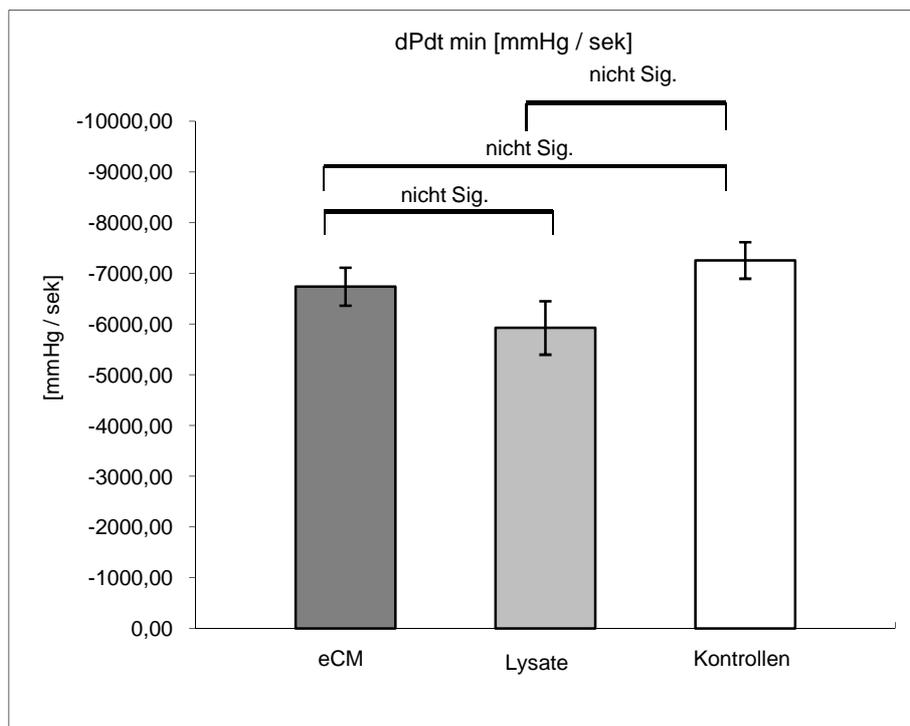


Abbildung 42 Analyse der minimalen intraventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit

Gezeigt wird die durchschnittliche minimale intraventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit in mmHg / Sekunde der drei untersuchten Kohorten: Mäuse nach Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten nach hypoosmolarer Lyse aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die drei untersuchten Kohorten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

5.6.8 Arterielle Elastance

Für die eCM Gruppe zeigte sich eine durchschnittliche arterielle Elastance von 2,47 mmHg / μ l \pm 0,24 mmHg / μ l (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts). Nach Injektion von Kardiomyozytenlysate ergab sich eine durchschnittliche arterielle Elastance von 3,36 mmHg / μ l \pm 0,82 mmHg / μ l. Bei den Kontrollen lag die durchschnittliche arterielle Elastance bei 3,36 mmHg / μ l \pm 0,54 mmHg / μ l.

Eine einfaktorielle Varianzanalyse mit den drei Faktorstufen eCM, Lysate und Kontrollen mit anschließender Scheffé – Prozedur zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($p \leq 0,05$; $F_{2,20} = 4,239$): nach Auswertung der Einzelvergleiche wichen die Werte nach eCM Injektion jedoch von den Kontrollen ($p = 0,6$) nicht signifikant ab.

Auch im Vergleich mit den den Lysaten ($p = 0,06$) wurde im Einzelvergleich knapp kein signifikantes Ergebnis erzielt.

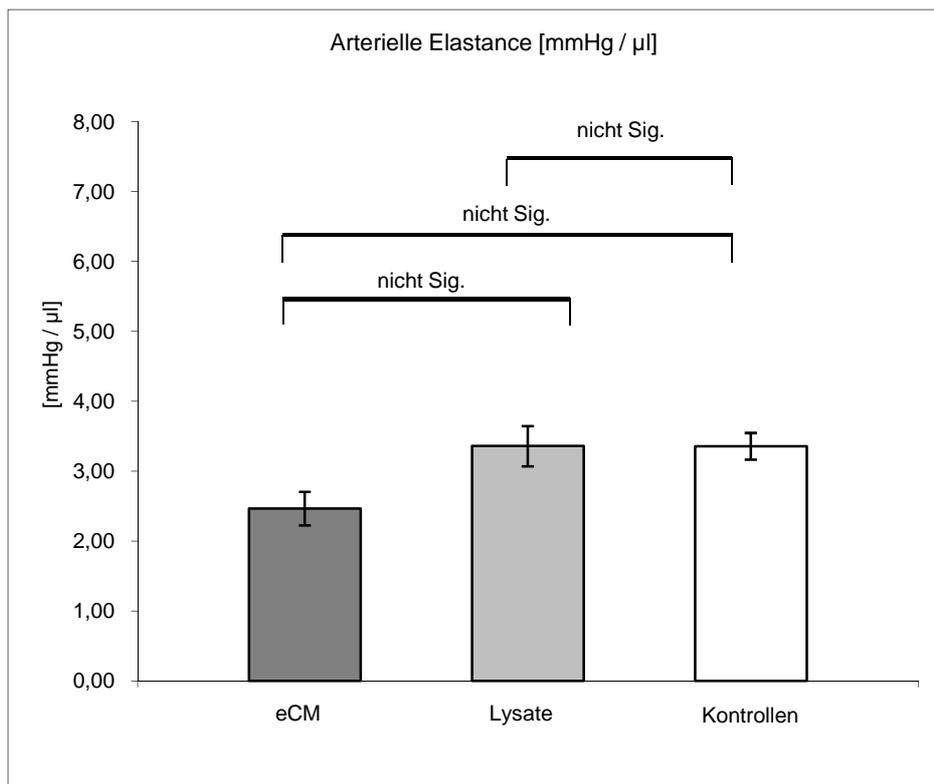


Abbildung 43 Analyse der Arteriellen Elastance

Gezeigt wird die durchschnittliche arterielle Elastance in mmHg / μ l der drei untersuchten Kohorten: Mäuse nach Injektion von embryonalen Kardiomyozyten, mit Lysaten nach hypoosmolarer Lyse aus embryonalen Kardiomyozyten und mit PBS Kontrollinjektion. Die drei untersuchten Kohorten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

6 Diskussion

In den vergangenen Jahren hat sich die zelluläre Kardiomyoplastie zu einem neuen, viel versprechenden Forschungsschwerpunkt auf dem kardiovaskulären Gebiet entwickelt. Momentan werden in grundlagenwissenschaftlichen Ansätzen (Murry et al., 1996; Taylor et al., 1998; Roell et al., 2002; Suzuki et al., 2004) und in diversen klinischen Studien (Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002; Stamm et al., 2003; Stamm et al., 2004; Wollert et al., 2004; Badorff et al., 2003; Meyer et al., 2006) die zu Grunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen aufgeklärt sowie die klinische Durchführbarkeit dieses Therapieansatzes untersucht. Langfristig könnte mittels zellulärer Kardiomyoplastie eine kausale Therapie der terminalen Herzinsuffizienz erfolgen, was momentan nur durch eine Herztransplantation erreicht werden kann. Weiterhin weisen neuere Studien darauf hin, dass auch nach einem Herzinfarkt auftretende Herzrhythmusstörungen mittels zellulärer Ersatztherapie günstig beeinflusst werden können (Roell et al., 2007).

In der hier vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag dazu geleistet werden, die Mechanistik der zellulären Kardiomyoplastie weiter zu erklären. Die postulierten parakrinen Effekte, die an der kardioregenerativen Wirkung nach Zelltherapie in eine Herzläsion beschrieben sind (Dai et al., 2007; Formigli et al., 2007; Gnechi et al. 2005; Behfar et al., 2004), beziehen sich u.a. auf die subzelluläre Wirkung von Proteinen und Zytokinen. So wird im Rahmen eines Myokardinfarktes sowohl über Botenstoffe als auch über zelluläre Strukturen (z.B. CD 45-positive myeloide Blutzellen) eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die wiederum zelluläre und molekulare Umbaumechanismen in Gang setzt, die den myokardialen Schaden begrenzen und die kardiale Funktionalität soweit möglich erhalten (Ren et al., 2003; Nian et al., 2004). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, in wieweit durch hypoosmolare Lyse gewonnene zelluläre Proteine, welche nur auf der beschriebenen subzellulären Protein- und Zytokinebene wirken können, sich im Vergleich zu vitalen, intakten embryonalen Kardiomyozyten nach intramyokardialer Transplantation in einem murinen Läsionsmodell verhielten. Die mittels embryonalen Kardiomyozyten oder Zelllysaten behandelten Tiere bzw. Herzen wurden postoperativ sowohl morphologisch als auch funktionell untersucht. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Beeinflussung der Narbenbildung gelegt; die myokardiale Pumpfunktion wurde invasiv unter Verwendung der

Linksherzkatheter-Technik untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, bei welchen nach myokardialer Läsion Kontrollmedium injiziert wurde. Die in der Ratte (Ciulla et al. 2004; Murry et al. 1996) und am Hasen (Taylor et al., 1998) beschriebene und bereits in der Arbeitsgruppe etablierte Operationstechnik (Roell et al., 2002) zur Generierung einer transmuralen Kryoläsion am Mausmodell konnte erfolgreich nachvollzogen werden. Hoch reproduzierbar in Bezug auf Lokalisation und Größe wurde eine kryoinduzierte myokardiale Läsion generiert, und das Gewebe wurde durch die Kälte (Mazur, 1970) akut irreversibel geschädigt. Durch die verlässliche Wiederholbarkeit der linksventrikulären Schädigung führte dies zu standardisierten Bedingungen für die nachfolgenden funktionellen *in vivo* Analysen und die histomorphologischen Untersuchungen. Ebenfalls reproduziert wurde die standardisierte Injektion von Zellsuspension in die kardiale Läsion (Roell et al., 2002). Der Erfolg der direkten Injektion in das Infarktgebiet konnte durch die Anfärbung mit einem Lebensmittelfarbstoff sichergestellt werden. Wie in der Literatur beschrieben, stellt die Kombination der Generierung der Läsion und der intramyokardialen Injektion in einer operativen Sitzung eine valide und reliable Methodik dar, um eine dem klinisch auftretenden Myokardinfarkt vergleichbare ischämische Läsion zu erzeugen und zelltherapeutische Strategien *in vivo* untersuchen zu können (v.d.Bos et al., 2005; Roell et al., 2002).

In der hier vorliegenden Studie wurden drei verschiedene Kohorten vergleichend über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Die erste Kohorte bestand aus Mäusen, denen transgene embryonale Kardiomyozyten, die an Tag 14.5 post conceptionem aus graviden CD1-Mäusen gewonnen wurden, nach der Kryoläsion implantiert wurden. Durch die Verwendung eines transgenen Mausmodells (Fleischmann et al., 1998), welches das *live-reporter*-Gen EGFP unter dem muskelspezifischen α -actin Promoter exprimierten, zeigten diese Herzzellen eine deutliche detektierbare EGFP-Fluoreszenz. Mögliche Artefakte auf Grund von sekundären Nachweismethoden entfielen auf diese Weise. Zwar gibt es Berichte über eine mögliche Veränderung der Herzzellen durch die EGFP-Expression (Huang et al., 2000), in einer sehr großen Zahl anderer Studien wurde das EGFP-Konstrukt jedoch erfolgreich und ohne Veränderung der Herzzellen verwendet. Nach intramyokardialer Injektion der embryonalen Kardiomyozyten hatten sich Teile der transplantierten Zellpopulation an den untersuchten Zeitpunkten nach 3, 7 und 14 Tagen stabil in die durch den Kryostempel geschädigte Myokardregion integriert. Die Zellen zeigten makroskopisch unter der Fluoreszenzlampe ein

deutliches EGFP-positives Signal innerhalb des Kryoinfarktes. Es integrierten sich jedoch bei weitem nicht alle Zellen in das ischämisch geschädigte Gewebe, da ein Teil vermutlich wieder aus dem Injektions- und Inzisionskanal austrat oder durch die Zirkulation in den Blutkreislauf gelangte (Muller-Ehmsen et al., 2002). Zudem wurde an infarzierten Rattenherzen und der Transplantation von embryonalen Kardiomyozyten bereits gezeigt, dass ca. 90% der angewachsenen Zellen in einen Apoptoseprozess übergehen. Als Hauptgrund hierfür wurden die ischämischen Umgebungsbedingungen in der Läsionszone angesehen (Zhang et al., 2001).

Auch mikroskopisch war es möglich, die implantierten Zellen zu identifizieren und bis zur Einzelzellebene hin zu untersuchen. Im Zuge der narbigen Umwandlung des Läsionsareals elongierte die Zellform der transplantierten eCM von runden Zellen an Tag 3 über rund- bis rundoval an Tag 7 zu Tag 14, und die Zellen fügten sich in die entstehende Gewebearchitektur ein, eine Grundvoraussetzung für ihre Funktionalität. Die transplantierten Zellen waren an Tag 14 nach Injektion neben ihrer Fluoreszenz auch durch ihre schmalere, schlankere und weniger voluminöse Form von den nicht geschädigten nativen Kardiomyozyten unterscheidbar. Die für kardiale Zellen charakteristische Querstreifung ließ sich ebenfalls insbesondere an Tag 14 nach Transplantation feststellen. Auch unter zellphysiologischen Aspekten ist eine Entwicklung hin zu einem zunehmend adulten Phänotyp beschrieben (Roell et al., 2002). Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde bereits in früheren Studien die Kontraktilität bzw. die elektrische Kopplung von transplantierten embryonalen Kardiomyozyten beschrieben (Roell et al., 2002; Roell et al., 2007). Aufgrund der Vordaten und der im Rahmen der vorliegenden Studie erhobenen Messwerte stellen diese Tiere eine ideale Vergleichsgruppe zur Untersuchung weiterer Therapieformen dar.

In einer zweiten untersuchten Kohorte wurde Mäusen, bei gleichem experimentellen Aufbau wie bei der ersten Kohorte, Zelllysate aus dissoziierten eCM injiziert. Die Zellen wurden durch hypoosmolare Lösung und die damit verbundene Diffusion von Flüssigkeit in die Zellen zum Aufquellen und schließlich zum Platzen gebracht. Auf diese Weise verloren die Zellen ihre zelluläre Integrität. Nach Isoosmolarisierung mit hyperosmolarer Lösung korrelierte der Proteingehalt der entstandenen Lösung hoch signifikant positiv mit den zuvor ausgezählten Zellen. Da bei der Lyse durch hypoosmolare PBS-Lösung keine Chemikalien verwendet werden mussten, welche auch potentiell subzellulär schädigend wirken könnten, ermöglicht

die hier verwendete Methode Zellysate relativ schonend zu gewinnen bei nahezu vollständiger Lyse aller Zellen. Durch die Korrelation der Zellzahl mit der erhaltenen Proteinmenge mit $R^2=0,9859$ konnte demonstriert werden, dass die injizierte Proteinmenge in etwa der Menge Protein entsprach, die durch die Injektion von nicht lysierten eCM in die Läsion eingebracht wurde. Als weiterer Indikator einer vollständigen Zellyse konnte nach intramyokardialer Transplantation keine EGFP-Fluoreszenz detektiert werden.

Als dritte Kontrollkohorte wurde weiteren Versuchstieren, wieder im standardisierten Versuchsaufbau, Zellkulturmedium injiziert. Auch bei diesen Mäusen wurde ebenfalls erwartungsgemäß keine EGFP-Fluoreszenz im Injektionsareal nachgewiesen. Die Morphologie der Infarktregion nach Kontrollinjektion unterschied sich nicht von der nach Injektion von Zellysaten. Ein weiterer Fokus der Untersuchungen lag auf den makroskopischen Auswirkungen der transplantierten Zellen auf die Herzarchitektur. Dies wurde - in diesem Detailgrad erstmalig - an einem extrapolierten Herzen mit histologisch gefärbten Kryoschnitten untersucht. Dabei konnte wie bereits in makroskopischen Phasenkontrastaufnahmen der explantierten Herzen erkennbar, gezeigt werden, dass sich die Größe der erzeugten Kryoläsion in Bezug auf die Oberfläche zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant voneinander unterschied. Diese Tatsache unterstreicht die Vergleichbarkeit der Läsionen durch den Kryostempel und die damit verbundenen standardisierten Versuchsbedingungen. Das Infarktareal war dabei im Gegensatz zu der nicht durch den Kryoinfarkt geschädigten Region deutlich ausgedünnt. Während sich nach Injektion von Lysaten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen zeigten, kam es nach Transplantation von eCM in die Infarktnarbe jedoch zu einer signifikanten Zunahme der Wanddicke des Infarktareals von $0,24 \pm 0,03$ mm (Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts) bei der Kontrollgruppe auf $0,52 \pm 0,04$ mm. Daraus bedingt kam es auch zu einem Anstieg des Volumens des Infarktanteils auf $21,4\% \pm 1,19\%$ gegenüber der Kontrollgruppe mit $10,99\% \pm 1,69\%$. Eine Dickenzunahme insbesondere der nekrotischen Infarktzone könnte sich günstig auf die physiologischen Kompensationsmechanismen des Herzens, das sogenannte *remodeling*, auswirken. Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde untersucht, wie sich die Narbe und der Heilungs- oder Regenerationsprozess im Zeitverlauf auf zellulärer Ebene darstellten. Im Einzelnen wurde untersucht, welche Zellen in besonderem Umfang an der Narbenbildung und der Narbenentwicklung beteiligt waren.

Zudem wurde untersucht, in wieweit Zellen im Zeitverlauf nach Narbengenerierung proliferierten und möglicherweise die Wanddickenzunahme bedingen könnten, und um welche Zellen es sich bei dieser Zellfraktion handelte.

An Tag drei nach Generierung der Kryoläsion sowie der Transplantation von eCM, Lysaten oder Kontrollmedium wurde ein massiver Anstieg von proliferierenden Zellen innerhalb des Infarktgewebes beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser proliferierenden Zellpopulation vermutlich um Fibroblasten handelte, welche positiv für Vimentin als Fibroblastenmarker und Ki67 als Marker für Zellproliferation färbten. Im Gegensatz dazu konnten im vitalen Myokard nur sehr wenige proliferierende Zellen nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit einer vor kurzem publizierten Studie (Grisel et al.; 2008) konnte gezeigt werden, dass es sich auch hier um interstitielle Zellen und nicht um Herzmuskelzellen handelte. Die Anzahl proliferierender Zellen nahm im untersuchten Zeitverlauf wieder deutlich ab. Einhergehend mit dieser Abnahme wurde auch das über Vimentin dargestellte Signal für die Identifikation von Fibroblasten von Tag 3 über Tag 7 hin zu Tag 14 schwächer. Diese Abnahme ist unter Umständen (v.d. Bos et al., 2006) durch die zunehmend kollagenös durchbaute Infarktnarbe während der Wundheilungsprozesse erklärbar. Nach Transplantation von eCM zeigte sich an Tag 7 nach der Läsion eine gegenüber den Vergleichsgruppen erhöhte Anzahl an Ki67-positiven, proliferierenden Zellen, die jedoch inferenzstatistisch keine Signifikanz erreichte. Auch hier kann auf Grund der Vimentin-Überschneidung der proliferierenden Zellen von Fibroblasten ausgegangen werden. Die drei untersuchten Kohorten, Herzen nach Transplantation von eCM, nach Transplantation von Lysaten aus eCM sowie Kontrollen, wiesen in Bezug auf die proliferierenden Zellen, die Fibroblastenverteilung und in der Entwicklung im Zeitverlauf ansonsten keine in dieser Studie nachweisbaren Unterschiede auf.

Durch die histologischen und immunhistochemischen Färbungen konnte außerdem gezeigt werden, dass es nach Generierung der Kryoläsion im Infarktgebiet zu einer massiven inflammatorischen Antwort im ischämisch geschädigten Infarktareal kam. Insbesondere drei Tage nach der Operation zeigten viele Zellen ein positives Signal für den Pan-Hämatopoesemarker CD45. Die Entzündungszellen waren an ihrer Signalgebung und auch an ihrer charakteristischen Form identifizierbar, jedoch nicht vollkommen gleichmäßig über den

Infarktbereich verteilt. Vielmehr gab es Zonen, in welchen CD45-positive Zellen besonders gehäuft anzutreffen waren, ohne dass bei diesen Zonen wiederum ein auffälliges oder repetitives Verteilungsmuster erkennbar gewesen wäre. In der Übergangszone vom vitalen Myokard in den Infarktbereich an Tag drei nach Operation konnten besonders viele Leukozyten dargestellt werden. Besonders deutlich wurde die starke Entzündungsreaktion im Vergleich mit vitalem, nicht geschädigten Myokard, in dem kaum CD45-positive Zellen zu finden waren und in dem demzufolge auch kein entzündlicher Prozess stattfand. Im untersuchten Zeitrahmen nach der Operation nahm die akute Entzündungsreaktion im Folgezeitraum nach Tag 3 wieder ab, so dass an Tag 14 kaum noch Blutzellen detektierbar waren. Innerhalb der untersuchten Kohorten unterschied sich die CD45-Verteilung nicht. Auch nach Transplantation der eCM konnte keine veränderte Immunantwort gezeigt werden, die über CD45 nachweisbar wäre. Diese Daten decken sich mit dem beschriebenen weitgehenden Abschluss der primären Geweberegeneration in der Maus und in der Ratte und der Abnahme der Beteiligung von Entzündungszellen (Ren et al., 2003; Nian et al., 2004). Auch die Lysate hatten keinen Effekt auf die Entzündungsreaktion, obwohl theoretisch injizierte Zytokine zu einer vermehrten Infiltration von Blutzellen in das Infarktareal hätten führen können. Die Beteiligung von Entzündungszellen beruht daher wahrscheinlich nicht in erster Linie auf Zytokinen, sondern war vielmehr durch die apoptotischen und nekrotischen Herzzellen bedingt. Eine Beteiligung von Zytokinen an der Inflammation im Infarktareal, welche aktiv von den nativen Kardiomyozyten der Übergangszone der Myokardläsion ausgeschüttet werden könnten, ist dennoch möglich.

Gegenstand des wissenschaftlichen Interesses war außerdem, wie sich die Vaskularisierung im vitalen Myokard und insbesondere auch im Infarktbereich darstellte, da für eine regelgerechte Herzfunktion die Versorgung mit Sauerstoff essentiell ist. Daher könnte eine verbesserte Vaskularisierung evtl. die Zunahme der Pumpfunktion bedingen. Innerhalb des vitalen Myokards konnte eine dichte und fein ausgeprägte Kapillarisation über die Lektinfärbung dargestellt werden. Die angefärbten Endothelzellen bildeten geschlossene Lumina und deuteten auf eine suffiziente Perfusion hin. In der kryoschämisch geschädigten Infarktzone konnte diese Kapillarisation mittels Lektin jedoch nicht mehr dargestellt werden. Lektin färbte im Infarktgebiet partiell auch Fibroblasten und band nicht mehr selektiv an vaskuläre Strukturen. Neben den feinen Kapillaren konnten über die α mac-Färbung sowohl

im vitalen Myokard als auch in der Infarktzone wenige große, glattmuskuläre Gefäße dargestellt werden. Durch die Schädigung und Auflösung des Kapillarnetzes (Huwer et al., 1998) kann die makrovaskuläre Reperfusion (v.d.Bos et al., 2005, Reffelmann et al., 2003) durch diese wenigen großen Gefäße jedoch nicht an die einzelnen Zellen gelangen und die durch die Kryoläsion hervorgerufene Ischämie nicht kompensieren. Eine veränderte Vaskularisierung durch die Transplantation von eCM, Lysaten oder den Kontrollen konnte in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden. Dennoch ist es möglich, dass die transplantierten Zellen einen Einfluss auf die Gefäßneubildung haben. Dass Zytokine oder andere Botenstoffe an einer möglichen Neoangiogenese nach Infarkten beteiligt sind, ist sogar wahrscheinlich (Imanishi et al., 2008) und erfordert weitere Studien mit einem längeren Nachbeobachtungszeitraum.

Große Bedeutung kommt bei den ablaufenden Umbaumechanismen nach einer Gewebeschädigung der extrazellulären Matrix und im Besonderen auch dem Proteoglycan Perlecan zu (Nakahama et al., 2000). Die extrazelluläre Matrix dient nicht nur als wichtiges Reservoir für Zytokine, ihr kommt auch eine ausgesprochen wichtige Funktion beim Wasserhaushalt der Gewebe, bei der Form-, und Stabilitätsgebung von Geweben, der Gewebeelastizität, der Signaltransduktion und - in diesem Zusammenhang besonders hervorzuheben - der Modulation von Wundheilungsprozessen zu (Ajad et al., 1998). Insbesondere auch die Stabilisierung des Infarktareals soll durch den Umbau der extrazellulären Matrix gewährleistet werden (Jugdutt et al., 1996; Lutgens et al., 1999). Daher wurde in dieser Arbeit an Hand des Perlecan-Antikörpers untersucht, in wieweit es durch die Transplantation von eCM oder den aus den lysierten eCM extrahierten, transplantierten Zytokinen und Proteinen zu einer Modulation der Ausbildung extrazellulärer Matrix im Vergleich zur Kontrollkohorte im Zeitverlauf kam.

Nach Transplantation von transgenen eCM in das Infarktareal kam es, insbesondere in der Region, in welcher die transplantierten embryonalen Kardiomyozyten stabil in die Läsion integriert hatten und über das EGFP-Signal eine Fluoreszenz gezeigt wurde, zu einer erhöhten Expression von Perlecan. Insbesondere 7 Tage nach der Operation konnten über den Perlecan-Antikörper vermehrt anfärbbare Elemente und Strukturen der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden. Die Co-Lokalisation mit den eCM könnte darauf hindeuten,

dass Perlecan vermehrt durch die eCM gebildet wird. Es kam im Zeitverlauf zu einem deutlichen Verdichtungs- und Kondensationsprozess in der Infarkt Narbe. Durch die Perlecan-Färbung wurde die Erstreckung und Ausrichtung des geschädigten Zellverbandes im beobachteten Zeitverlauf entlang der vorherrschenden Gewebearchitektur zusätzlich besonders deutlich. An Tag 14 nach OP hatte sich ein dichtes Narbengewebe ausgebildet. Gegenüber Tag 7 kam es jedoch wieder zu einer Abnahme der Darstellbarkeit von Perlecan. Dennoch war auch zu diesem Zeitpunkt mehr Perlecan darstellbar als in der Lysat- und Kontrollgruppe. Zwischen der Kohorte nach Transplantation von Lysat aus eCM und von Kontrollmedium ließ sich kein Unterschied in der Perlecan-Verteilung und damit in der Ausbildung der extrazellulären Matrix erkennen. Diese Ergebnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass durch die Implantation der eCM eine verstärkte Ausprägung der extrazellulären Matrix bewirkt wird, ein wichtiger Faktor für die Stabilisierung und die Elastizität im Infarktgebiet nach einer Kryoläsion. Diese parakrinen Effekte konnten mittels Injektion von isolierten Zellproteinen nicht imitiert werden.

Neben der histologischen und immunohistochemischen Aufarbeitung wurden die Tiere aller drei Versuchsgruppen *in vivo* invasiv mittels Linksherzkathetertechnik untersucht. Anhand der abgeleiteten Druck-Volumendiagramme konnte dabei die linksventrikuläre Funktion visualisiert werden. Insbesondere die vergleichbaren Herzfrequenzen als globale Parameter stellten wichtige Marker zur generellen Vergleichbarkeit der untersuchten Gruppen untereinander dar. Es wurde weiterhin untersucht, ob sich die untersuchten Gruppen in Bezug auf die Vorlast unterschieden. Als Parameter dienten das enddiastolische Volumen und der enddiastolische Druck, die jedoch keine signifikanten Unterschiede zeigten. Auch in Bezug auf die Nachlast, die anhand des endsystolischen Drucks und der arterielle Elastance bestimmt wurde, unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant voneinander. Die diastolische Funktion, indexgebend war hier die minimale Rate des Druckabfalls, zeigte nach Injektion von Kontrollmedium, Lysaten oder eCM keine signifikanten Unterschiede. Die vergleichbaren hämodynamischen Rahmenbedingungen, angezeigt durch Vorlast, Nachlast und Diastole lassen eine Betrachtung der linksventrikulären Kontraktilität zu. Nach Injektion von eCM und anschließend nachgewiesenem EGFP-positivem Signal innerhalb der Infarktzone zeigte sich eine Verbesserung der durch den Druck-Volumen-Katheter visualisierten und erfassten Pumpfunktion des linken Ventrikels. Durch die Integration der eCM stieg die Ejektionsfraktion

von $39,15\% \pm 1,21\%$ bei den Kontrollen auf $50,78\% \pm 3,19\%$ nach eCM Injektion an. Die Herzen nach Lysatinjektion unterschieden sich mit $40,45 \pm 2,67\%$ nicht signifikant von den Kontrollen. Die verbesserte Kontraktilität wird zusätzlich durch eine Zunahme des Schlagvolumens unterstrichen. Nach eCM Injektion zeigte sich mit $39,26 \mu\text{l} \pm 3,82 \mu$ gegenüber den Kontrollen mit $29,81 \mu\text{l} \pm 1,59 \mu$ und den Lysaten mit $28,61 \mu\text{l} \pm 1,32 \mu\text{l}$ ein signifikant erhöhtes Schlagvolumen. Das Herzzeitvolumen als relevanter Parameter für die Förderleistung des Herzens war nach Injektion von eCM ebenfalls erhöht. Mit einem Anstieg auf $20957,76 \mu\text{l} / \text{min} \pm 2019 \mu\text{l} / \text{min}$ gegenüber den Kontrollen mit $17016,51 \mu\text{l} / \text{min} \pm 682,07 \mu\text{l} / \text{min}$ und den Lysaten mit $15890,79 \mu\text{l} / \text{min} \pm 1204,29 \mu\text{l} / \text{min}$ wurde jedoch knapp kein signifikantes Ergebnis erzielt. Dennoch kann hier in Bezug auf den Einzelvergleich der eCM mit den Lysaten mit einem p – Wert von 0.052 inferenzstatistisch von einem Trend zur Signifikanz gesprochen werden. Die eCM haben durch ihre Integration in der geschädigte Gewebe zu einer erhöhten Pump- und Förderleistung des Hohlorgans beigetragen. Insbesondere die gesteigerte Ejektionsfraktion nach Implantation von eCM als in der Klinik bedeutsamer Parameter unterstreicht die verbesserte kardiale Leistungsfähigkeit.

Zusammengefasst integrieren sich transgene eCM nach Transplantation stabil in das Infarktareal und entwickeln sich zu einem adulten kardiomyozytären Phänotyp. Die Läsionszone wurde innerhalb von 7 Tagen durch eine fibrotische Narbe ersetzt. Die linksventrikuläre Pumpfunktion und Kontraktilität wurden durch die transplantierten Zellen verbessert. Dies könnte zum einen durch die Beteiligung der transplantierten Zellen an der Herzaktion und die lokale, aktive Generierung von Kraft geschehen (Roell et al., 2002). Zum anderen könnten auch passive Faktoren wie die Wundstabilisierung durch vermehrte Ausbildung extrazellulärer Matrixproteine für die Verbesserung verantwortlich sein. Die Induktion der vermehrten Ausprägung der extrazellulären Matrix und deren Beteiligung an den Wundheilungsprozessen und der Narbenstabilität und Elastizität könnte durchaus auch auf parakrinen Effekten durch die transplantierten eCM beruhen. Auch eine vermehrte proliferative Aktivität der Fibroblasten nach eCM Implantation könnte für eine höhere Steifigkeit des Infarktgewebes sowie die gemessene Dickenzunahme im Bereich der Läsion verantwortlich sein und so zu einer verbesserten linksventrikulären Pumpfunktion beitragen. Die Herstellung von Zelllysaten durch hypoosmolare Lösung stellt eine schonende Möglichkeit dar, die zelluläre Integrität aufzuheben und eine korrelierende Menge Zellextrakt

zu erhalten. Durch die Transplantation der Extrakte nach hypoosmolarer Lyse von eCM war es jedoch nicht möglich, die Herzfunktion oder die Narbenbildung in den in dieser Studie untersuchten Parametern über das Niveau der Kontrollgruppe hinaus zu verändern oder zu beeinflussen.

Durch die in dieser Studie durchgeführte Lysierung von Zellen und die einmalige Injektion von Zellextrakt konnte der Effekt der transplantierten eCM nicht imitiert werden. Dennoch gibt es weiterhin eine Vielzahl interessante Aspekte, die in Bezug auf den Einfluss parakriner Effekte in der zellulären Ersatztherapie am Herzen untersucht werden könnten. Bedingt durch die gewählte Methodik und die einmalige Injektion von Extrakten aus lysierten Zellen wurde in dieser Studie nicht untersucht, welchen Einfluss Stoffe besitzen, die von eCM aktiv sezerniert werden. Experimentell wäre es z.B. möglich, den Überstand von sich in Kultur befindlichen Kardiomyozyten zu transplantieren. Hierdurch hätte man auch die Möglichkeit, den Einfluss der aktiv sezernierten Fraktion der Zellen zu untersuchen. Dennoch würde auch diese Studie ein strukturelles Defizit aufweisen. Sie würde sich wie die vorliegende Arbeit auf eine einmalige Gabe von Stoffen beschränken. Die transplantierten embryonalen Kardiomyozyten integrierten sich jedoch bereits an Tag 3 stabil in die Läsion. Der mögliche Wirkungszeitraum bis zur Feststellung der hämodynamischen Verbesserung ist somit erheblich länger. Es war den Zellen konstant möglich, Zytokine, Botenstoffe und Mediatoren zu sezernieren und so Einfluss auf die Geweberegeneration zu nehmen. Mit implantierbaren Pumpen für das Mausmodell, die konstant Zellysate oder Zellüberstände infundieren würden, könnte hierfür ein neuer experimenteller Ansatz entstehen. Auch neue bildgebende Verfahren könnten für die *in vivo* Darstellung in der Zellersatztherapie in Zukunft neue Ansätze bieten (Judenhofer et al., 2008).

Das komplizierte und komplexe Zusammenspiel verschiedener biochemischer und zellphysiologischer Vorgänge macht die zelluläre Ersatztherapie am Herzen zu einem schwierigen und mechanistisch teilweise noch völlig offenen Untersuchungsgebiet. Weitere Studien sind nötig, um weitergehende Erkenntnisse über den kardiomyoplastischen Einsatz von verschiedenen Zellpopulationen oder parakrinen Botenstoffen zu gewinnen.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde im Mausmodell eine kälteinduzierte kardiale Läsion erzeugt. Durch hypoosmolare Lyse wurde die zelluläre Integrität embryonaler Kardiomyozyten aufgelöst. Der Extrakt – unter anderem Proteine und Zytokine – wurde den Mäusen intraoperativ in die Infarktregion transplantiert. Diese Experimente wurden mit den Ergebnissen nach Transplantation von nicht lysierten embryonalen Kardiomyozyten und einer Kontrollkohorte verglichen. Es wurde untersucht, ob durch die Injektion von Zellysaten der in der Literatur beschriebene positive Effekt auf die Herzfunktion durch die Implantation der eCM imitiert werden konnte.

Transgene, EGFP-positive embryonale Kardiomyozyten wurden aus Embryonen an Tag E13.5 – E14.5 gewonnen. 2×10^5 Zellen wurden entweder für die Injektion präpariert oder in hypoosmolarer Lösung lysiert. In 12 bis 18 Wochen alten weiblichen CD1 Mäusen wurde eine linksventrikuläre Kryoläsion von ca. 4 mm Durchmesser generiert. Die eCM oder das eCM – Lysat wurden, verdünnt in 5 μ l PBS-Lösung, intramyokardial in die Läsion injiziert. Mäuse, welche nur reine PBS-Lösung injiziert bekamen, dienten als Kontrollgruppe. Nach 3, 7 und 14 Tagen postoperativ wurden die Herzen zur histologischen Analyse entnommen, kryokonserviert und geschnitten. Zusätzlich wurde an Tag 14 die *in vivo* Hämodynamik mit einem Linksherzkatheter untersucht. An den Gefrierschnitten wurde eine detaillierte morphometrische Analyse über Sirius-Rot Färbungen durchgeführt. Auf zellulärer Ebene wurden die Herzen immunhistochemisch durch α smac-, Ki67-, Vimentin-, CD45-, Lectin- und Perlecan-Färbungen analysiert.

Makroskopisch und durch die Morphometrie war eine hoch reproduzierbare kardiale Läsion darstellbar. Die Wanddicke und das Volumen der Infarktregion war in der eCM – Gruppe signifikant gesteigert ($p \leq 0.05$). Nach eCM Injektion wurden angewachsene EGFP – positive embryonale Kardiomyozyten in der Läsion beobachtet. Die Zellen integrierten sich in den Gewebeverband und elongierten zunehmend von Tag 3 zu Tag 14 im Rahmen der Ausprägung eines im Zeitverlauf zunehmend adulten Phänotyps. Im Linksherzkatheter zeigte die eCM – Gruppe signifikant erhöhte Werte für das Herzzeitvolumen, das Schlagvolumen und die Ejektionsfraktion gegenüber der Kontrollgruppe ($p \leq 0.05$). Immunhistochemisch

wurde eine frühe postoperative Hochregulation von Extrazellulärmatrix-Proteinen über das Perlecan- und proliferierender Zellen über das Ki67-Signal in der eCM Gruppe, jedoch nicht in der Lysat- und Kontrollgruppe gezeigt. Durch die hypoosmolare Lösung konnte eine vollständige Zelllyse erreicht werden. Nach Bradford Testung wurde gezeigt, dass der gemessene Proteingehalt positiv mit der Anzahl der lysierten Zellen korrelierte. Die Mäuse nach Lysat Injektion unterschieden sich jedoch in allen untersuchten morphometrischen, histologischen und hämodynamischen Parametern nicht signifikant von den Mäusen der Kontrollgruppe.

Die beobachtete hämodynamische Verbesserung durch die injizierten eCM nach der kardialen Schädigung basiert vermutlich auf mehreren Einflussfaktoren: Zum einen ist in der Literatur eine aktive Kontraktilitätssteigerung durch die integrierten, elektrisch koppelnden eCM beschrieben. Weiterhin spielen aber auch passive Effekte wie die Zunahme der Wanddicke eine wichtige Rolle: Die vermehrte Proliferation von Fibroblasten und die vermehrte Darstellbarkeit von Extrazellulärmatrix führen wie in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, über eine Wanddickenzunahme zu einer höheren Elastizität und Stabilität im Infarktgewebe. Diese parakrinen Effekte wurden nur durch die Injektion von eCM mit intakter Zellstruktur vermittelt und konnten nicht durch die Injektion von Proteinen und Zellbestandteilen dieser Zellen imitiert werden.

8 Literaturverzeichnis

Acker M. Dynamic cardiomyoplasty: at the crossroads. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 750-755

Anderson DJ, Gage FH und Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001; 7: 393-395

Armstrong MT, Lee DY und Armstrong PB. Regulation of proliferation of the fetal myocardium. *Dev Dyn* 2000; 219: 226-236

Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S und Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-3017

Ayad S, Boot-Hanford RP, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA. *The Extracellular Matrix (Facts Book)*. Academic Press (Harcourt Brace & Company, Publishers) 1998; 3-17

Badorff C, Brandes RP, Popp R et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107: 1024-1032

Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984; 70: 812-823

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

Barile L, Messina E, Giacomello A, Marbán E. Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007; 50: 31-48

Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A und Puceat M. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J* 2002; 16: 1558-1566

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA und Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 1750-1757

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B und Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-776.

Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV und Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* 2002; 91: 189-201

Braun T, Martire A. Cardiac stem cells: paradigm shift or broken promise? A view from developmental biology. *Trends Biotechnol.* 2007; 25: 441-447

Braunwald E und Pfeffer MA. Ventricular enlargement and remodelling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. *Am J Cardiol* 1991; 68: 1D-6D

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. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood.* 2007; 110: 1362-1369

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW und Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263: 802-805

Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S und Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94: 92-95

Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, Clark WA, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G und Anversa P. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res* 1996; 226: 316-327

Ciulla MM, Paliotti R, Ferrero S, Braidotti P, Esposito A, Gianelli U, Busca G, Cioffi U Bulfamante G, Magrini F. Left ventricular remodeling after experimental myocardial cryoinjury in rats. *J Surg Res* 2004; 116: 91-97

Couper GS, Dekkers R, Adams D. The logistics and cost-effectiveness of circulatory support: advantages of the ABIOMED BVS 5000. *Ann Thorac* 1999; 68: 646-649

Crespo-Leiro MG, Alonso-Pulpón L, Vázquez de Prada JA, Almenar L, Arizón JM, Brossa V, Delgado JF, Fernandez-Yañez J, Manito N, Rábago G, Lage E, Roig E, Diaz-Molina B, Pascual D, Muñoz J. Malignancy after heart transplantation: incidence, prognosis and risk factors. *Am J Transplant.* 2008; 8: 1031-1039

Dai W, Hale SL, Kloner RA. Role of a paracrine action of mesenchymal stem cells in the improvement of left ventricular function after coronary artery occlusion in rats. *Regen Med.* 2007; 2: 63-68

Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, Torella D, Tang XL, Rezazadeh A, Kajstura J, Leri A, Hunt G, Varma J, Prabhu SD, Anversa P und Bolli R. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3766-3771

Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D und Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003; 107(9):1247-1249

Deng MC, De Meester JM, Smits JM, Heinecke J, Scheld HH. Effect of receiving a heart transplant: analysis of a national cohort entered on to a waiting list, stratified by heart failure

severity. Comparative Outcome and Clinical Profiles in Transplantation (COCPIT) Study Group
BMJ 2000; 321: 540-545

Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 208-216

Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest.* 2005; 115: 572-583

Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W und Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 87: 27-45

Ebelt H, Jungblut M, Zhang Y, Kubin T, Kostin S, Technau A, Oustanina S, Niebrügge S, Lehmann J, Werdan K, Braun T. Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines. *Stem Cells* 2007; 25: 236-244

Etzion S, Battler A, Barbash IM, Cagnano E, Zarin P, Granot Y, Kedes LH, Kloner RA und Leor J. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1321-1330

El Oakley RM, Ooi OC, Bongso A und Yacoub MH. Myocyte transplantation for myocardial repair: a few good cells can mend a broken heart. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 1724-1733

El-Banayosy A, Deng M, Loisanche D et al. The European experience of Novacor left ventricular assist (LVAS) therapy as a bridge to transplant: a retrospective multi-centre study. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 15: 835-841

Evans MJ und Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156

Erdo F, Buhle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Focking M, Kustermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA und Trapp T. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 780-785

Fleischmann M, Bloch W, Kolossov E, Andressen C, Muller M, Brem G, Hescheler J, Addicks K und Fleischmann BK. Cardiac specific expression of the green fluorescent protein during early murine embryonic development. *FEBS Lett* 1998; 440: 370-376

Formigli L, Perna AM, Meacci E, Cinci L, Margheri M, Nistri S, Tani A, Silvertown J, Orlandini G, Porciani C, Zecchi-Orlandini S, Medin J, Bani D. Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodelling. *J Cell Mol Med* 2007; 11:1087-1100

Fraund S, Pethig K, Franke U et al. Ten year survival after heart transplantation: palliative procedure or successful long term treatment? *Heart* 1999; 82: 47-51

Fukushima N, Ohtake S, Sawa Y et al. Predicting outcomes and management of candidates for heart transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31: 1961-1962

Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS und Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 2005; 11: 367-368

Grisel P, Meinhardt A, Lehr HA, Kappenberger L, Barrandon Y, Vassalli G. The MRL mouse repairs both cryogenic and ischemic myocardial infarcts with scar. *Cardiovasc Pathol* 2008; 17: 14-22

Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318: 1920-1923

Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M, Miura T, Matsuzaki M, Esato K. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001; 65: 845-847

Heim R, Prasher DC und Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12501-12504

Heinemann und Honnefelder. Principles of ethical decision making regarding embryonic stem cell research in Germany. *Bioethics* 2002; 16: 530-543

Hetzer R. *Deutscher Aertekongress Abstracts 2006*, Abstract 309

Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 2002; 415: 1035-1038

Huang WY, Aramburu J, Douglas PS und Izumo S. Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat Med* 2000; 6: 482-483

Huwer H, Nikoloudakis N, Rissland J, Vollmar B, Menger MD, Schafers HJ. In vivo analysis of microvascular injury after myocardial cryothermia. *J Surg Res* 1998; 79: 1-7

Hyun I, Hochedlinger K, Jaenisch R, Yamanaka S. New advances in iPS cell research do not obviate the need for human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 367-368

Imanishi Y, Saito A, Komoda H, Kitagawa-Sakakida S, Miyagawa S, Kondoh H, Ichikawa H, Sawa Y. Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44: 662-671

Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000; 6: 88-95

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

Judenhofer MS, Wehrl HF, Newport DF, Catana C, Siegel SB, Becker M, Thielscher A, Kneilling M, Lichy MP, Eichner M, Klingel K, Reischl G, Widmaier S, Röcken M, Nutt RE, Machulla HJ, Uludag K, Cherry SR, Claussen CD, Pichler BJ. Simultaneous PET-MRI: a new approach for functional and morphological imaging. Nat Med 2008; 14:459-465

Jugdutt BI, Joljart MJ und Khan MI. Rate of collagen deposition during healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in rat and dog models. Circulation 1996; 94: 94-101

Kajstura J, Leri A, Finato N, Di LC, Beltrami CA und Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 8801-8805

Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J und Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. J Clin Invest 2001; 108: 407-414

Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM und Itescu. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. Nat Med 2001; 7: 430-436

Koestenbauer S, Zech NH, Juch H, Vanderzwalmen P, Schoonjans L, Dohr G. Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. Am J Reprod Immunol 2006; 55: 169-80

Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JW, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu Z, Duan Y, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen

H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE und Fleischmann, BK. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 2006; 203: 2315-2327

Kolossov E, Fleischmann BK, Liu Q, Bloch W, Viatchenko-Karpinski S, Manzke O, Ji GJ, Bohlen H, Addicks K und Hescheler J. Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissuespecific expression of the green fluorescent protein. *J Cell Biol* 1998; 143: 2045-2056

Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY und Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98: 216-224

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

Lutgens E, Daemen MJ, de Muinck ED, Debets J, Leenders P und Smits JF. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc* 1999; 41: 586-593

Lunde K, Solheim S, Forfang K, Arnesen H, Brinch L, Bjørnerheim R, Ragnarsson A, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A, Aakhus S. Anterior myocardial infarction with acute percutaneous coronary intervention and intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: safety, clinical outcome, and serial changes in left ventricular function during 12-months' follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 674-676

Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science* 1970; 168: 939-949

Martin U, Kiessig V, Blusch J et al. Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *Lancet* 1998; 352: 692-694

Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, Goetsch SC, Gallardo TD und Garry DJ. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter,

Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 2004; 265: 262-275

Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirintaki K, Maier LS, Nguemo F, Menke S, Haustein M, Hescheler J, Hasenfuss G, Martin U. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008; 118:507-517

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

Menard C, Hagege AA, Agbulut O et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 2005; 366:1005-1012

Morrison SJ, Wright DE und Weissman IL. Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1908-1913

Muller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, Laird PW und Kedes L. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 107-116

Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM und Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2512-2523

Murry CE, Field LJ und Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 2005; 112: 3174-3183

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA und Field LJ.

Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-668

Muller P, Pfeiffer P, Koglin J, Schafers HJ, Seeland U, Janzen I, Urbschat S und Bohm M. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation* 2002; 106: 31-35

Nakahama M, Murakami T, Kusachi S, Naito I, Takeda K, Ohnishi H, Komatsubara I, Oka T, Ninomiya Y, Tsuji T. Expression of perlecan proteoglycan in the infarct zone of mouse myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 1087-1100

Nian M, Lee P, Khaper N und Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004; 94: 1543-1553

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK und Jacobsen SE. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; 10: 494-501

Nygren JM, Liuba K, Breitbach M, Stott S, Thorén L, Roell W, Geisen C, Sasse P, Kirik D, Björklund A, Nerlov C, Fleischmann BK, Jovinge S, Jacobsen SE. Myeloid and lymphoid contribution to non-haematopoietic lineages through irradiation-induced heterotypic cell fusion. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 584-592

Odorico JS, Kaufman DS und Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19: 193-204

Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH und Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res* 1990; 67: 23-34

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A und Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001a; 410: 701-705

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

Paradis K, Langford G, Long Z et al. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 1999; 285: 1236-1241

Patience C, Patton G, Takeuchi Y et al. No evidence of pig DNA or retroviral infection in patients with short-term extracorporeal connection to pig kidneys. *Lancet* 1998; 352: 699-701

Pfeffer MA und Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161-1172

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007; 11: 2896-2902

Pirracchio R, Cholley B, De Hert S, Solal AC, Mebazaa A. Diastolic heart failure in anaesthesia and critical care. *Br J Anaesth.* 2007; 98: 707-721

Reffelmann T, Hale SL, Dow JS, Kloner RA. No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation* 2003; 108: 2911-2917

Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD und Murry CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000; 149: 731-740

Ren G, Dewald O und Frangogiannis NG. Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003; 2: 242-256

Robbins J, Gulick J, Sanchez A, Howles P und Doetschman T. Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *J Biol Chem* 1990; 265: 11905-11909

Roell W, Goedje O, Vetter H, Schmitz C, Dewald O, Reichart B. Improvement of heart-, lung, and liver performance during mechanical circulatory support by the Novacor-system. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;11: 1045-1051

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. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature* 2007 Dec 6;450(7171):819-24.

Roell W, Fan Y, Xia Y, Stoecker E, Sasse P, Kolossov E, Bloch W, Metzner H, Schmitz C, Addicks K, Hescheler J, Welz A, Fleischmann BK. Cellular cardiomyoplasty in a transgenic mouse model. *Transplantation* 2002; 73:462-465

Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia,Y, Stoecker E, Fleischmann M, Bohlen H, Stehle R, Kolossov E, Brem G, Addicks K, Pfitzer G, Welz A, Hescheler J und Fleischmann BK. Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury. *Circulation* 2002; 105: 2435-2441

Sarmiento-Leite R, Krepsky AM, Gottschall CA, Acute myocardial infarction. One century of history. *Arq Bras Cardiol.* 2001; 77: 593-610

Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1210-1221

Schmoeckel M, Bhatti F, Zaidi A et al. Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model. *Transplantation* 1998; 65: 1570-1577

Schofield P, Sharples L, Caine N et al. Transmyocardial laser revascularisation in patients with refractory angina: a randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 353: 1714

Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA und Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 11307-11312

Schwaiblmair M, von Scheidt W, Überfuhr P, Reichart B, Vogelmeier C. Lung function and cardiopulmonary exercise performance after heart transplantation: influence of cardiac allograft vasculopathy. *Chest* 1999; 116: 332-339

Stamm C, Kleine HD, Westphal B et al. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004;52:152-158

Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M und Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-46

Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-1918

Sugarman J. Human stem cell ethics: beyond the embryo. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 529-33

Suzuki K, Brand NJ, Smolenski RT, Jayakumar J, Murtuza B, Yacoub MH. Development of a Novel Method for Cell Transplantation Through the Coronary Artery. *Circulation* 2000;102: 303-359

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; Aug 126: 663-676

Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4: 929-933

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS und Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147

van den Bos EJ, Mees BM, de Waard MC, de Crom R, Duncker DJ. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: 1291-1300

Villa A, Sanchez PL, Fernandez-Aviles F. Ventricular arrhythmias following intracoronary bone marrow stem cell transplantation. *Europace* 2007 12: 1222- 1223

Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA und Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004; 363: 783-784

Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 5856-5861

Wobus AM, Wallukat G und Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 1991; 48: 173-182

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-148

Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 39-49

Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K und Murry CE.. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 907-921

Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschlager G von WJ, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A und Schomig A. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 295: 1003-1010

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Wilhelm Röhl für die Überlassung des Promotionsthemas, fachliches Vorbild in Klinik und Labor und die vertrauensvolle und persönlich sehr herzliche Betreuung.

Herrn Professor Dr. med. B. K. Fleischmann danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die stets faire, konstruktive und für mich sehr lehrreiche Zusammenarbeit.

Frau Dr. med. Toktham Bostani danke ich besonders herzlich für die kompetente, ruhige und freundliche Anleitung zur Durchführung der Operationen an der Maus und die Einarbeitung im Labor. Ihr und auch Frau Dipl. Biochem. Alexandra Klein und Herrn Frank Holst vielen Dank für die Unterstützung bei den Tierexperimenten.

Herrn Dr. rer. nat. Martin Breitbach danke ich für ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen großen und kleinen Fragen und Schwierigkeiten im Laboralltag und beim Verfassen der Arbeit.

Frau Dipl. Biol. Eva Ratering danke ich besonders für die Unterstützung bei den Immunfärbungen. Mein Dank gilt auch allen anderen Kolleginnen und Kollegen in der Arbeitsgruppe am Institut für Physiologie 1. Vielen Dank für die entspannte, freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Persönlich gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Hans – Jürgen Machulla für den Ansporn zur medizinischen Wissenschaft und Herrn Dr. med. Rolf - Henning Wimmer für das Vorbild als Arzt. Ihm und Herrn Dr. med. Georg Kiefer gilt außerdem mein Dank für die Unterstützung und Motivation bei der Entscheidungsfindung zum Medizinstudium.

Ganz besonders Danke ich meinen Geschwistern, Lioba und meinen Eltern, die mich stets unterstützen und immer an meiner Seite stehen.