

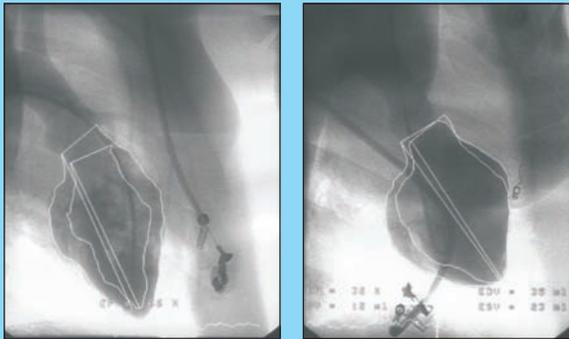
LENA BAISCH

**TRANSPLANTATION AUTOLOGER KNOCHENMARKZELLEN  
NACH MYOKARDINFARKT BEIM SCHWEIN**

Überleben, Differenzierung und funktioneller Einfluss

**BONE MARROW CELL TRANSPLANTATION IN PIG  
MYOCARDIAL INFARCT**

Survival, Differentiation and Functional Impact



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Kleintiere, Innere Medizin  
Justus-Liebig-Universität Giessen  
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. M. Schneider , Dipl.ECVIM-CA (Cardiology)  
und  
der Klinik III für Innere Medizin  
der Universität zu Köln  
Betreuer: PD Dr. med. J. Müller-Ehmsen

**Transplantation autologer Knochenmarkzellen nach Myokardinfarkt  
beim Schwein  
Überleben, Differenzierung und funktioneller Einfluss**

**Bone Marrow Cell Transplantation in Pig Myocardial Infarct –  
Survival, Differentiation and Functional Impact**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

^ingereicht von  
**Lena Baisch**  
Tierärztin aus Berlin

Gießen 2011

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. med. vet. M. Schneider, Dipl.ECVIM-CA (Cardiology)

PD Dr. med. J. Müller-Ehmsen

Tag der Disputation: 06.10.2011

Gewidmet  
meinen Eltern und Geschwistern

# 1 INHALTSVERZEICHNIS

<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Stand der Forschung</b> .....	<b>9</b>
3.1	Das Schwein als Myokardischämiemodell.....	9
3.1.1	Anatomie des Schweineherzens.....	10
3.1.2	Vergleich Koronarsystem Schwein/Mensch .....	10
3.2	Definition des Myokardinfarktes .....	12
3.3	Epidemiologie und Pathophysiologie des Myokardinfarktes .....	12
3.4	Infarktprävention bei bestehender Koronarstenose .....	13
3.5	Derzeitige Therapie des Myokardinfarktes .....	13
3.6	Zelltherapie nach Myokardinfarkt .....	14
3.6.1	Skelettmuskelzellen .....	15
3.6.2	Endotheliale Progenitorzellen .....	16
3.6.3	Fettgewebszellen.....	17
3.6.4	Nabelschnurzellen .....	17
3.6.5	Knochenmarkzellen .....	18
3.6.6	Weitere Zellen.....	27
3.7	Verbleib der applizierten Zellen.....	28
3.8	Markierung von Zellen vor Injektion in infarzierte Herzen.....	29
3.8.1	Zellmarkierung mittels bestimmter Genlinien .....	30
3.8.2	Nachweis des Y-Chromosomes.....	30
3.8.3	Zellmarkierung durch fluoreszierende Farbstoffe .....	31
3.8.4	Lichtmikroskopisch nachweisbare Färbemethoden.....	31
3.8.5	Radioaktive Markierungsverfahren .....	32
3.8.6	Eisenmarkierung zum Nachweis im MRT .....	33
3.9	Fragestellungen und Ziele der vorliegenden Arbeit .....	34
<b>4</b>	<b>Material und Methoden:</b> .....	<b>35</b>
4.1	Rahmenbedingungen der Untersuchungen.....	35
4.2	Ablauf der Untersuchungen.....	35
4.2.1	Funktionelle Untersuchungen zur Auswirkung der MNC auf die LV Funktion (Projektteil A) :.....	35
4.2.2	Histologie und Zellverbleib bei Infarkten ohne und mit Reperfusion (Projektteil B): .....	37
4.2.3	Gruppierung der Tiere.....	39
4.3	Anästhesie .....	39
4.4	Infarktinduktion.....	40
4.4.1	Irreversible Gefäßokklusion durch Coil Embolisation .....	40
4.4.2	Reversible Gefäßokklusion durch Ligatur .....	42
4.5	Knochenmarkgewinnung.....	42
4.6	Isolation mononukleärer Zellen .....	42
4.7	Markierung mononukleärer Zellen.....	43
4.7.1	Hoechst Dye Markierung .....	43
4.7.2	Goldmarkierung .....	44
4.7.3	Radioaktive Markierung mit <sup>111</sup> Indium.....	44
4.7.4	Vitalitätskontrolle der zu applizierenden Zellen .....	45
4.8	Wachstumskontrollen der injizierten mononukleären Zellen.....	45
4.9	In vitro Teststudien der <sup>111</sup> Indium markierten Zellen.....	45
4.10	Zellinjektion .....	46
4.10.1	Intramyokardiale Zellinjektion .....	46
4.10.2	Intrakoronare Zellinjektion.....	48
4.11	Funktionelle Analyse der Knochenmarkzelltherapie .....	48

4.12	Messung des intraarteriellen Druckes .....	50
4.13	<sup>8</sup> F-FDG-PET Analyse zur kardialen Vitalitätsdiagnostik .....	50
4.14	Szintigraphische Verfolgung <sup>111</sup> In markierter Knochenmarkzellen.....	51
4.15	Euthanasie der Tiere .....	51
4.16	Histologische Aufarbeitung des Schweineherzens .....	52
4.16.1	Fixation der Proben .....	52
4.16.2	Gefrierschnitterstellung .....	53
4.16.3	Färben der Proben.....	54
4.17	Histologische Analyse der Spenderzellen .....	55
4.18	Statistische Analyse .....	56
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
5.1	Tierkollektive .....	57
5.2	Untersuchungen zur Pumpfunktion .....	58
5.2.1	Wachstumsparameter zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ..	58
5.2.2	Systolischer und diastolischer Aortendruck.....	60
5.2.3	Funktionsveränderung durch Infarktinduktion .....	60
5.2.1	Einfluss der Zelltherapie auf die LV-Funktion nach Myokardinfarkt.....	62
5.2.2	Analyse der regionalen LV Funktion .....	67
5.2.3	Infarktgrößenbestimmung mittels Positronenemmissionstomographie (PET) .....	69
5.2.4	Wachstumskontrollen der injizierten mononukleären Zellen .....	70
5.3	Untersuchungen zur histologischen Darstellung der Zellen.....	70
5.3.1	Histologische Darstellung der injizierten markierten Zellen .....	70
5.3.2	Histologische numerische Auswertung der injizierten markierten Zellen..	72
5.4	Untersuchung zum Zellverbleib .....	73
5.4.1	Szintigraphie der Tiere .....	73
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
6.1	Das Schweineherz als Infarktmodell und die Wahl der LAD als Infarktgefäß ..	78
6.2	Technik der Infarktinduktion .....	79
6.3	Wahl des Zeitpunktes der Zelltransplantation.....	80
6.4	Wahl der verwendeten Zellen.....	81
6.5	Färbemethoden .....	82
6.6	Funktionelle Auswirkung der applizierten Zellen .....	83
6.7	Zellmigration und Ausdifferenzierung der transplantierten Zellen.....	86
6.8	Applikationseffizienz und Verbleib von mononukleären und mesenchymalen Knochenmarkzellen nach Myokardinfarkt.....	87
6.9	Auswirkung der applizierten Zellen.....	90
6.10	Zusammenfassung und Beurteilung.....	92
6.11	Summary and conclusion .....	94
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>Anhänge .....</b>	<b>115</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	115
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	117
8.3	Tabellenverzeichnis .....	119

## 2 EINLEITUNG

In den westlichen Industrienationen sind die 3 häufigsten Todesursachen die chronische ischämische Herzerkrankung (10,3%), der akute Myokardinfarkt (7,5%) und die Herzinsuffizienz (5,9%). In Deutschland erleiden jedes Jahr etwa 280.000 Menschen einen Herzinfarkt. Laut Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes starben in Deutschland im Jahr 2004 fast 62.000 Menschen an einem akuten Herzinfarkt (2004, Statistisches Bundesamt Deutschland, letzte Aktualisierung 17.11.2005). Auch in den USA erkrankten jährlich 13,2 Millionen Menschen an der koronaren Herzkrankheit, davon erleiden 7,2 Millionen einen Myokardinfarkt (American Heart Association, 2003). Selbst wenn Therapiemaßnahmen unmittelbar nach einem Ereignis eingeleitet werden, führt ein Myokardinfarkt in 5 bis 15% der Fälle innerhalb der ersten 30 Tage zum Tod (Hamm, 2004a; Hamm, 2004b). Somit bleibt trotz verbesserter und rascherer Möglichkeiten zur Revaskularisierung und optimierter prä-hospitaler Versorgung die Letalität des Herzinfarkts unbefriedigend hoch.

Durch aktuelle Therapiemöglichkeiten wie Thrombolyse und/oder mechanische Rekanalisierung durch Ballondilatation oder Stentimplantation kann zwar eine rasche Reperfusion des unterversorgten Myokardgewebes sichergestellt werden, jedoch gibt es bisher keine Möglichkeit den Herzmuskel zu regenerieren, und damit bereits untergegangenes Herzmuskelgewebe zu revitalisieren. Eine rasche Revaskularisierung verhindert nur, dass infarziertes Myokardgewebe vollständig nekrotisiert und so zumindest Teile von kontraktilem Gewebe in den Randzonen erhalten bleiben.

Bei Kardiomyozyten führt schon ein vierstündiges Sauerstoffdefizit zu irreversiblen Schäden (Reimer u. Jennigns, 1979; Dumont et al., 2000; Giugliano u. Braunwald, 2003). In den Wochen danach führen strukturelle Umbauvorgänge am Herzen, das so genannte postinfartielle Remodelling des Myokards, oft zu tödlichen Komplikationen. Somit wäre es erstrebenswert das kardiale Remodelling zu unterbrechen und den Funktionsverlust nach Myokardinfarkt zu beheben. Eine Neubildung von Kardiomyozyten im Sinne einer Myogenese, sowie eine Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) könnten sowohl eine Funktionsverbesserung als auch einen Schutz vor den problematischen Folgen des kardialen Remodellings

bewirken (Kessler u. Byrne, 1999; Kawamoto et al., 2001). Ein solcher Ansatz wird bei der (Stamm-) Zelltherapie des Myokardinfarktes verfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurden am Schweineherzischämiemodell die Möglichkeiten einer autologen Transplantation von aus dem Knochenmark gewonnenen, mononukleären Zellen (MNC) untersucht. Wir untersuchten sowohl den Verbleib der Zellen nach intramyokardialer und intrakoronarer Injektion, als auch die Ausdifferenzierung der Zellen und den Einfluss auf die Funktion des durch einen Infarkt ischämisch geschädigten Schweinemyokards.

## 3 STAND DER FORSCHUNG

### 3.1 Das Schwein als Myokardischämiemodell

Aufgrund seiner physiologischen und anatomischen Ähnlichkeit zum menschlichen Herzen gewinnt das Schweinetiermodell immer mehr an Bedeutung (Swindle et al., 1984-1988). Bisher wurde der Hund überwiegend als Tiermodell in kardiovaskulären Studien eingesetzt. Der Hund hat allerdings als genetisch determinierter Ausdauerleister ein ausgeprägtes Kollateralsystem der Koronarien. Das Infarktisiko eines Hundeherzens ist sehr gering. Somit ist dieses Herzmodell für unsere Fragestellung ungeeignet.

Das Schwein ist besonders als Modell für Untersuchungen der chronischen myokardialen Ischämie geeignet, weil es neben einem dem Menschen vergleichbaren Koronargefäßsystem auch die gleichen Merkmale bei der Kollateralbildung hat. Das Schwein besitzt ein Koronarsystem mit genauso gering ausgebildeten Kollateralen und Anastomosen wie der Mensch (White et al., 1986, Maxwell et al., 1987). Auch die Zuordnung des Versorgungsgebietes der in unserem Versuch okkludierten "left anterior descending artery" (LAD) ist durch die geringe Kollateralbildung beim Schwein leichter als bei anderen Tiermodellen (Schaper et al., 1967)

Ähnlichkeiten zwischen Mensch und Schwein gibt es auch auf dem Gebiet der Herzphysiologie. Die Ruhewerte der Herzfrequenz eines untrainierten Menschen liegen bei circa 80 Schlägen/Minute (Scheunert und Trautmann, 1987), die Herzfrequenz des Schweins ist mit 90 Schlägen/Minute unwesentlich höher (Engelhardt und Breves, 2000). Bei beiden Spezies beträgt das Gewicht des Herzens etwa 0,5% des Körpergewichts. 5% des Herzzeitvolumens fließen durch das Myokard des Menschen (Böcker et al., 1997) beim Schwein werden dazu je nach Wachstumszustand 5 bis 10% des Herzzeitvolumens angegeben (Scheunert und Trautmann, 1987). Herzfrequenz, Herzgröße und das Verhältnis zum Körpergewicht entsprechen bei einem 25-30 kg schweren Schwein gegenüber anderen Spezies dem Menschen am ehesten.

### 3.1.1 Anatomie des Schweineherzens

Das Herz passt sich in seiner Stellung im Brustraum der Form des bilateral abgeflachten, kielförmigen Brustkorbes an. Dadurch erscheint es, gegenüber der Lage des Herzens in dem beim Menschen mehr tonnenförmigen Thorax, etwa 90° um seine Längsachse gedreht. Infolgedessen orientieren sich der rechte Vorhof und die rechte Herzkammer nach rechts kranial, der linke Vorhof und die linke Herzkammer nach links kaudal. Beim Schwein ist die breit plumpe Kegelform des Herzens mit wenig ausgeprägter Spitze typisch. Der Margo ventricularis dexter ist konvex, der Margo ventricularis sinister aber gerade. (Schummer u. Habermehl, 1984, Koch und Berg, 1993).

### 3.1.2 Vergleich Koronarsystem Schwein/Mensch

Die Koronararterien (Arteria coronaria sinistra und Arteria coronaria dextra) entspringen der Aorta direkt hinter den Aortenklappen. Die Arteria coronaria sinistra (LCA) verläuft beim Schwein wie beim Mensch als Truncus communis zwischen dem Truncus pulmonalis und dem linken Herzohr (s. Abbildung 1). Sie teilt sich beim Schwein nach etwa 1 cm in den Ramus circumflexus (linke Kammerwand) und den Ramus interventricularis paraconalis (Versorgung der Herzspitze).

Auch beim menschlichen Herzen teilt sich der Hauptstamm der Arteria coronaria sinistra (LCA) in die left anterior descending coronary artery (LAD) oder auch Ramus interventricularis anterior (RIVA) und die left circumflex coronary artery (LCX) oder auch Ramus circumflexus (RCX). Die linke Koronararterie (LCA) ist mit ihren Seitenästen für die Versorgung des linken Vorhofs und des linken Ventrikels zuständig. Die LCA übernimmt einen Großanteil der Versorgung der proximalen Anteile des Septums interventrikulare sowie einen Teil der Vorderwand des rechten Ventrikels. Die LAD versorgt 49% des linken Ventrikels und 28% des rechten. 58% des Septum interventrikulare werden von ihr versorgt. Die LCX übernimmt dagegen mit 25,5% die Versorgung des linken Vorhofes, verschiedene Teile des linken Ventrikels, des Papillarmuskels und bisweilen auch des Sinusknotens. Die Teile der Hinterwand des Herzens, Teile des Papillarmuskels, des Septums, der rechte Vorhof, der rechte Ventrikel, der Sinusknoten und der Atrioventrikular-Knoten werden von der right coronary artery (RCA) versorgt (Meyer et al., 1994).

Der Ramus (R) interventricularis paraconalis des Schweines entspricht der left anterior descending coronary artery (LAD) des Menschen. Auch er versorgt einen

Teil der rechten Kammer und des Conus arteriosus, die linke Kammerwand und einen Teil des Septums. In der vorliegenden Arbeit wird an Stelle von Ramus interventricularis paraconalis auch beim Schwein der Begriff LAD verwendet, um eine bessere Vergleichbarkeit mit der Human-Literatur zu gewährleisten. Beim Schwein teilt sich das Gefäß in den Ramus collateralis prox. und Ramus collateralis dist. auf, beim Menschen ist es der Ramus lateralis prox. und dist. (Schummer u. Habermehl, 1984, Feneis et al., 2000).

Für die Koronarangiographie wird die LAD in drei Abschnitte unterschieden:

1. proximaler Abschnitt bis zum Abgang des R. lateralis prox.,
2. mittlerer Abschnitt zwischen R. lateralis prox. und dist.
3. distales Drittel ab Abgang des R. lateralis dist. (Winkhardt et al., 2005).

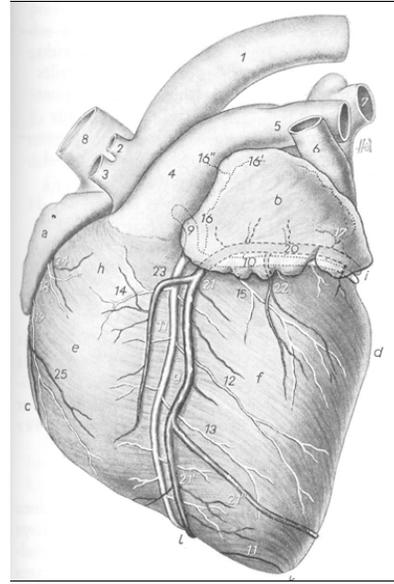
Die rechte Koronararterie läuft zwischen Conus arteriosus und rechtem Herzohr zum rechten Abschnitt des Sulcus coronarius. Im proximalen Teil zweigt beim Schwein der R. marginis ventricularis dexter ab, bevor er als R. circumflexus bis zur Faszia subsinuosa zieht (Schummer u. Habermehl, 1984). Beim Menschen ist der Verlauf der rechten Koronararterie sehr ähnlich. Im proximalen Teil gehen Abzweigung zum Sinusknoten und als R. atriales zum Vorhof ab. Im weiteren Verlauf des Sulcus coronarius teilt diese sich unter vorherige Abzweigung des R. marginalis dext. in den R. posterolateralis und in den R. interventrikularis posterior, der die Herzspitze mitversorgt (Feneis et al., 2000, Winkhardt et al., 2005).

### Abbildung 1 Koronararterien eines Schweineherzens

(aus Schummer und Habermehl, 1984)

a. rechtes Herzohr; b. Linkes Herzohr; c. Margo ventricularis dext.; d. Margo ventricularis sin.; e. Ventriculus sin.; g. Sulcus interventricularis paraconalis; h. Conus arteriosus; i. Sulcus coronarius sin.; k. Apex cordis; l. Incisura apicis

1. Arcus aorta; 2. A.subclavia sin.; 3. A.brachiocephalica; 4. Truncus pulmonalis; 5. A.pulmonalis sin.; 6. V.azygos sin.; 7. linke Lungenvenen; 8. V.cava cran.; 9. A.coronaria sin.; 10. ihr R.circumflexus; 11. R.interventricularis paraconalis; 12. R.collateralis prox.; 13. R.collateralis dist.; 14. A.coni arteriosi; 15. R.prox.ventriculi sin.; 16. R.prox.atrii sin.; 17. R.intermed.atrii sin.; 18. A.coni arteriosi der A.coronaria dext.; 19. R.prox.ventriculi dex.; 20 21 V. cordis magna, 20. ihr R.circumflexus, 21. ihr R.interventricularis paraconalis; 22. V.ventriculi sin.; 23. Begleitast d. R.interventricularis paraconalis d. V.cordis magna; 24. V.coniarteriosi; 25. R.ventricularis dext. der V.semicircumflexa dext.



### 3.2 Definition des Myokardinfarktes

Wird die Wiederbelebenszeit eines Gewebes überschritten, entsteht ein Infarkt. Ein Herzinfarkt ist eine irreversible Schädigung der Herzmuskelfasern. Herzmuskelanteile gehen bei längerem Koronargefäßverschluss durch persistierende oder rezidivierende Ischämie irreversibel verloren (Meyer, 2000, Hort, 2001). Sobald die Myokardperfusion so lange unterbunden ist, dass Sauerstoff und Nährstoffe den Bedarf des betroffenen Myokards nicht mehr decken können, führt dies zu einem Zelltod der Kardiomyozyten (American Heart Association, 2003).

### 3.3 Epidemiologie und Pathophysiologie des Myokardinfarktes

Ursache des akuten Myokardinfarktes ist in den meisten Fällen eine sich über viele Jahre entwickelnde Arteriosklerose der arteriellen Gefäßversorgung des Herzens. Durch Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie oder arterieller Hypertonie kommt es zu Lipideinlagerungen in die Gefäßwand. Wird der Vorgang nicht unterbrochen, führt dies zu einer Stenosierung der entsprechenden Arterien. Familiäre Disposition und Nikotinabusus verstärken die Tendenz zur Lipideinlagerung. Wenn einer dieser Plaques rupturiert, wird die Gerinnungskaskade aktiviert, und der entstehende Thrombus führt zum vollständigen Gefäßverschluss und damit zur Unterversorgung des durch dieses Gefäß versorgten Herzmuskelgewebes. Dies führt zu den typischen pectanginösen Beschwerden des Herzinfarktes. Als Angina Pectoris bezeichnet man einen Schmerz in der Brust, der

durch eine Durchblutungsstörung am Herzen ausgelöst wird. Meist beruht diese Durchblutungsstörung auf einer passagären Engstelle eines Herzkranzgefäßes. Beim Herzinfarkt sind Durchblutung und Sauerstoffzufuhr in einem bestimmten Bezirk des Herzens auf Dauer unterbrochen, weil eine Koronararterie vollständig blockiert wird. Durch den irreversiblen Verschluss kommt es zum Absterben des von dem Infarktgefäß versorgten Myokardareals und zu einem Ersatz des abgestorbenen Gewebes durch narbiges Bindegewebe. Also Folgeerscheinung kann der Infarkt zur hämodynamischen Instabilität bis hin zum Kreislaufschock, oder gar zur tödlichen Ventrikelrupturen führen. Typische Komplikationen des akuten Myokardinfarkts sind das Auftreten von elektrophysiologischen Erregungsleitungsstörungen und Arrhythmien (Herold, 2007).

Wird die akute Phase des Myokardinfarktes überlebt, bleibt ein geschwächter Herzmuskel mit reduzierter Kontraktilität und Auswurfleistung zurück. In der Folge entsteht häufig eine Herzinsuffizienz (Hort et al., 2001). Das geschädigte Herz versucht die verlorene Kontraktilität auszugleichen, dieses so genannte "remodelling" führt unter anderem zur Verlängerung von Herzmuskelfasern und oft zu elektrophysiologischen Erregungsleitungsstörungen.

### **3.4 Infarktprävention bei bestehender Koronarstenose**

Die Therapie einer bereits vorbestehenden koronaren Herzerkrankung besteht aus der Reduktion der Risikofaktoren in Form von Gewichtsabnahme, körperlichem Training, guter Einstellung eines Diabetes mellitus und Nikotinabstinenz. Medikamentös kann mit Acetylsalicylsäure, Betablockern und Statinen interveniert werden. Darüber hinaus kann mittels perkutaner Angioplastie und Stenting oder einer aortokoronarer Bypass-Operation die Perfusion des Herzens verbessert werden (Hort et al., 2001).

### **3.5 Derzeitige Therapie des Myokardinfarktes**

Wenn ein akutes Infarktereignis eintritt, steht die Revaskularisation des Infarktgefäßes im Vordergrund derzeitiger Therapiebemühungen. Hierbei spielen der medikamentöse Ansatz mit Thrombozytenaggregationshemmern (Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten), Antikoagulation sowie allgemeine

Maßnahmen (Sauerstoffzufuhr, Sedierung) eine wichtige Rolle. Im Zentrum der Bemühungen steht die mechanische Revaskularisierung durch akute katheterinterventionelle Wiedereröffnung des Gefäßes, in den meisten Fällen mit primärem oder sekundärem Stenting. Durch eine rasche Revaskularisierung kann verhindert werden, dass das abhängige Myokardgewebe vollständig nekrotisiert, so dass Teile der Myokardfunktion im ischämischen Bereich erhalten werden können. Insbesondere bei der Therapie des ST-Hebungsinfarktes ist eine Revaskularisierung in möglichst kurzer Zeit anzustreben. Hier haben sich die katheterinterventionellen Optionen gegenüber einer Fibrinolyse in den meisten Untersuchungen als überlegen erwiesen, wenn eine Katheterintervention innerhalb von zwei Stunden nach Symptombeginn durchgeführt werden kann (Andersen et al., 2003; Keeley et al., 2003; Hamm, 2004b). Entsprechend dieser Studienlage empfehlen die nationalen und internationalen Leitlinien zur Therapie des akuten Myokardinfarktes neben der medikamentösen Therapie ein möglichst rasches interventionelles Vorgehen (American Heart Association 2003). Jedoch gibt es, selbst wenn man mit allen aktuellen Therapiemöglichkeiten eine rasche Reperfusion des unterversorgten Myokardgewebes sicherstellen kann, bisher keine Möglichkeit Herzmuskelfasern zu regenerieren und damit bereits untergegangenes Herzmuskelgewebe zu revitalisieren.

Die Revitalisierung von Herzmuskelgewebe ist das Ziel der Zelltherapie. Durch Zellersatz soll es gelingen den Funktionsverlust nach Myokardinfarkt zu beheben. Der zusätzliche Nutzen einer Zelltherapie beim Myokardinfarkt gegenüber der bisher gebräuchlichen Therapie liegt darin, dass nicht nur der Untergang von Herzmuskelgewebe verhindert oder verzögert werden soll, sondern dass durch das Einbringen neuer kontraktile Zellen geschädigtes Herzmuskelgewebe ersetzt werden kann.

### **3.6 Zelltherapie nach Myokardinfarkt**

Stammzellen sind Zellen, die sich in einem undifferenzierten Zustand befinden und sich selbst erneuern können, um eine große Anzahl differenzierter Nachkommen zu bilden. Auf diese Weise tragen sie zur Bildung, Erhaltung und Regeneration von Gewebe bei.

Der Archetyp einer Stammzelle ist die totipotente befruchtete Eizelle, aus der alle embryonalen und adulten Zelltypen und Gewebe eines multizellulären Organismus gebildet werden. Im Laufe der Ontogenese nimmt ihre Ausdifferenzierungsfähigkeit ab. Sie reduziert ihr Differenzierungspotential von totipotent über pluripotent und multipotent nach unipotent. Es ist nach wie vor unklar, wie potent eine applizierte Zelle sein muss, um hochdifferenziertes Gewebe wie beispielsweise Myokard zu ersetzen. Am besten würden sich embryonale Zellen aus frühen Embryonalstadien zum Beispiel Blastozysten eignen, dies ist allerdings ethisch umstritten da dabei der frühe Embryo zerstört werden müsste.

Eine ethische Problematik besteht beim Einsatz adulter Zellen nicht. Nachdem man lange Zeit der Überzeugung war, dass adulte Zellen nur ein eingeschränktes Differenzierungspotential besitzen und nur in wenige (Multipotenz) oder nur einen (Unipotenz) Zelltypen differenzieren können, zeigen Forschungsergebnisse der letzten Jahre, dass adulte Zellen unter bestimmten Bedingungen ein größeres Differenzierungsspektrum aufweisen könnten als bislang angenommen (Müller-Ehmsen et al., 2006; Strauer et al., 2001; Taylor et al., 1998). Adulte Stammzellen lassen sich aus Geweben, wie dem Knochenmark isolieren. Für viele weitere Gewebe wie Muskel, Haut, Darm, Leber, Pankreas, Fett- und Nervengewebe konnte das Vorhandensein von differenzierungsfähigen Zellen nachgewiesen werden (Manz et al., 2004, Vogelstein et al., 2001).

### *3.6.1 Skelettmuskelzellen*

Im Skelettmuskel wurden Zellen (Skelettmuoblasten) als ruhende, mononukleäre Satellitenzellen beschrieben. Diese Satellitenzellen liegen in der Basallamina, welche die Muskelfasern umgibt (Mauro, 1961). Es wird davon ausgegangen, daß diese Zellen eine Zellpopulation darstellen, welche zur Regeneration des Muskelgewebes beiträgt. Studien haben gezeigt, dass Satellitenzellen proliferieren und Muskelfasern bilden können. Auch in vitro konnte eine Differenzierung von Satellitenzellen in Muskelfasern gezeigt werden (Bischoff, 1990). Im Jahre 1992 wurde erstmals in einer experimentellen Arbeit versucht untergegangenes Herzmuskelgewebe durch das Einbringen von Skelettmuoblasten zu kompensieren (Marelli et al., 1992). Verschiedenen Arbeitsgruppen führten am murinen Tiermodell Versuche mit Skelettmuoblasten durch, die nach Infarktinduktion sowohl in Ratten (Murry et al.,

1996) als auch in Kaninchen (Taylor et al., 1998) injiziert wurden. Nach einigen Wochen zeigte sich eine Funktionsverbesserung der Ejektionsfraktion (Taylor et al., 1998) sowie eine Expression von spezifischen skelett- und kardialen Markern bei Spenderzellen im infarzierten Areal; letzteres wurde durch Immunhistochemie nachgewiesen. Menasché et al. fanden eine Verbesserung der Kontraktilität des Herzens nach 5 Monaten (Menasché et al., 2001). Dies konnte allerdings in der Placebo kontrollierten und randomisierten MAGIC Studie nicht bestätigt werden. Die 97 Patienten, welche mit Skelettmyoblasten intramyokardial behandelt wurden zeigten keine Verbesserung der LV Funktion im Vergleich zur Placebogruppe (n=30) (Menasché et al., 2008).

### *3.6.2 Endotheliale Progenitorzellen*

Auch endothelialen Progenitorzellen (EPC) wird das Potential zugesprochen, bei der Zelltherapie am Herzen von Bedeutung zu sein. Ihnen wird vor allem die Neubildung von Endothel zugeschrieben (Assmus et al., 2002, Müller-Ehmsen et al., 2006). Die endothelialen Progenitorzellen wurden als aus dem Knochenmark stammende Zellen im peripheren Blut nachgewiesen und können in ischämischem Gewebe zur Bildung neuer Blutgefäße führen (Asahara et al., 1999b, Kocher et al., 2001, Takahashi et al., 1999). Eine allgemein anerkannte Charakterisierung der endothelialen Progenitorzellen ist allerdings unklar. Es gibt Hinweise dafür, dass eine gemeinsame Vorläuferzelle sowohl für hämatopoetische als auch endotheliale Zelllinien, ein so genannter Hämangioblast, existiert (Dieterlen-Lievre et al., 2002, Manz et al., 2004, Shalaby et al., 1995, Yamashita et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass EPCs unter dem Einwirken angiogenetischer Wachstumsfaktoren Eigenschaften endothelialer Zellen annehmen können (Fernandez et al., 2001, Schmeisser et al., 2001). Ihre Differenzierungsfähigkeit zu reifen Endothelzellen konnte in vitro und in vivo nachgewiesen werden (Asahara et al., 1997).

Ischämiezonen mobilisieren Botenstoffe wie den vascular endothelial growth factor (VEGF), welche z.B. Progenitorzellen aus dem Knochenmark anlocken (Gill et al., 2001). Im ischämischen Gewebe werden einerseits Botenstoffe exprimiert, aber auch Rezeptoren ausgebildet, welche die Adhäsion, Migration und Differenzierung der angelockten Zellen steuern (Liesveld et al., 2001). Dieser Reparaturmechanismus scheint jedoch nur kleine Endotheldefekte zu reparieren und bei einem Myokardinfarkt nicht auszureichen (Jackson et al., 2001). Es wird vermutet, dass

durch die gezielte Applikation von Progenitorzellen in das Infarktgebiet die Reparaturkapazität vervielfacht werden kann.

Kawamoto et al. führten Untersuchungen mit EPCs am Schwein durch (Kawamoto et al., 2003). Sie applizierten EPCs durch Katheter basierte intramyokardiale Injektion in infarziertes Myokard. Vier Wochen nach der Applikation von CD31+ MNC (Mononukleäre Zellen) waren die Kollateralgefäße deutlicher ausgeprägt und die ultrasonographisch gemessene Ejektionsfraktion (EF) stieg signifikant an. In den Kontrollgruppen war keine Verbesserung festzustellen (Kawamoto et al., 2003).

In der TOPCARE-AMI-Studie wurde die Wirkung von zirkulierenden EPCs bei Patienten mit akutem Herzinfarkt nach direkter intrakoronarer Injektion evaluiert und ein positiver Effekt auf das Remodelling festgestellt (Schächinger et al., 2004). Das Problem bei diesen Zellen ist ihre geringe Verfügbarkeit, da sie derzeit mit hohem Aufwand aus peripherem Blut gewonnen und in Kultur vermehrt werden müssen. Kultivieren und Aufzuchten bedeutet aber, dass sowohl das Differenzierungspotential der Zellen vermindert wird als auch das Risiko ihrer kanzerogenen Entartung steigen könnte.

### *3.6.3 Fettgewebszellen*

Auch subkutanes Fettgewebe enthält Zellen, welchen ein Potential zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen zugeschrieben wird. Es konnten Differenzierungen in verschiedene Zelllinien bestätigt werden: Adipogenese, Chondrogenese, Osteogenese, Angiogenese und Myogenese. Die Fähigkeit sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren, konnte mehrmals in vitro gezeigt werden (Zuk et al., 2002, Rehman et al., 2004, Morizono et al., 2003). Yamada et al. injizierten aus dem Fettgewebe gewonnene Zellen in die Infarkttrandzone infarzierter Mäuseherzen und fanden eine Ausdifferenzierung in Kardiomyozyten (Yamada et al., 2006).

### *3.6.4 Nabelschnurzellen*

Im Jahre 1989 führte Gluckmann die erste erfolgreiche Transplantation von Zellen aus der Nabelschnur durch (Gluckmann et al., 1989). In der letzten Zeit hat die Anwendung von Nabelschnurblutzellen immer mehr an Bedeutung gewonnen, denn auch im Nabelschnurblut konnten z.B. Progenitorzellen gefunden werden. Man nimmt an, dass die Zellen im Nabelschnurblut weniger differenziert sind als die im Blut ausgewachsener Organismen und daher weniger stark immunologisch wirken.

Heterologe Transplantate von Nabelschnurblut rufen interessanterweise keine starke Abwehrreaktion hervor (Henning et al., 2004). Henning et al. fanden nach intramyokardialer Injektion humaner Nabelschnurblutzellen in infarzierte Rattenherzen eine Verbesserung der kardialen Funktionsparameter (LVEF, Wanddicke und dP/dt) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Henning et al., 2004).

Auch die Arbeitsgruppe von Stamm arbeitet mit Nabelschnurblutzellen (Ma et al., 2006). Nach Injektion humaner Nabelschnurzellen in infarzierte Mäuseherzen fanden sie zwar Spenderzellen, die endotheliale Marker exprimierten, doch konnten keine Hinweise auf eine Differenzierung in Myozyten gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass humane Nabelschnurzellen zur Angiogenese in der Lage sind, doch muss ihre Auswirkung auf die Kontraktilität weiter untersucht werden (Ma et al., 2006). Moelker et al. untersuchten die Wirkung von Nabelschnurblutzellen auf den Myokardinfarkt beim Schwein (Moelker et al., 2007). Magnetresonanztomographisch wurde kein Unterschied in der linksventrikulären Funktion zwischen der mit Zellen behandelten Gruppe und der Placebogruppe gefunden. Die Zellen schienen zwar in der Infarkttrandzone zu überleben, doch zeigten sie keine Expression endothelialer oder kardialer Marker. Durch die intrakoronare Injektion der Zellen ist es sogar zu weiteren Mikroinfarkten gekommen (Moelker et al., 2007).

### *3.6.5 Knochenmarkzellen*

Schon mit Beginn der Stammzellforschung wurde Zellen aus dem Knochenmark ein hohes Ausdifferenzierungspotential zugestanden. Sie vermögen sich in verschiedene Gewebe auszdifferenzieren (Goodell, 2001; Krause, 2001). In vitro zeigten Pittenger et al. ihr großes Potential sich in unterschiedlichste Zelltypen zu differenzieren (Pittenger et al., 1999). Neben der Differenzierung in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten konnte gezeigt werden, dass sie sich auch in Kardiomyozyten weiterentwickeln können (Makino et al., 1999). Der erstmalige Befund, dass sich adulte Knochenmarkzellen nach Einbringen in infarziertes Herzmuskelgewebe möglicherweise zu Herzmuskelzellen differenzieren könnten, führte dazu, dass der Zellersatztherapie eine echte Chance für den klinischen Einsatz eingeräumt wurde (Orlic et al., 2001). Knochenmarkzellen haben im Vergleich zu anderen Zellen den Vorteil, dass sie vom Patienten selbst leicht gewonnen, und somit autolog eingesetzt werden können. Die zu befürchtende Abstoßungsreaktion beim Einsatz heterologer

Zellen ist bei dieser Art der Zellersatztherapie nicht zu erwarten. Nach Ausdifferenzierung in Herzmuskelzellen wären Knochenmarkzellen auch anderen autolog einsetzbaren Zelltypen, wie z.B. Skelettmyoblasten, dadurch überlegen, dass sie keine Fremdzellen im Herzen darstellen (Leobon et al., 2003).

Bisher konnten drei adulte Stammzelllinien im Knochenmark gefunden werden: Hämangioblasten, mesenchymale Zellen und hämatopoetische Zellen. Man schätzt, dass der Anteil der hämatopoetischen Zellen an allen mononukleären Zellen im Knochenmark bei 1-2% liegt (Strauss, 1991). Hämangioblasten sind in der Lage Gefäße zu regenerieren. Sie wurden bislang nur in embryonalen in vitro Systemen charakterisiert (Lacaud, 2001). Mesenchymale Zellen (MSC) wurden erstmalig 1968 von Friedenstein et al. beschrieben (Friedenstein et al., 1968). Es sind in vivo ruhende, nicht phagozytierende, Fibroblasten ähnliche Zellen, die in vitro adhären und Kolonien ausbilden. Im Gegensatz zu hämatopoetischen Zellen können sich MSCs über viele Passagen hinweg teilen und sind, in Kultur gehalten, negativ für CD34 (Guo, 2001). MSCs haben das Potential sich in Knochen, Fett, Stromamark, Skelett- und Herzmuskel auszudifferenzieren (Horwitz, 1999, Toma, 2002, Bianco, 2001). Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Verfaillie (Verfaillie, 2002) legen nahe, dass aus isolierten MSC Gewebe alle drei Grundgewebeschichten (Endo-, Meso- und Ektoderm) des Körpers gezüchtet werden können. Dies ist ein weiteres Indiz für die Multipotenz der adulten MSC (Jiang et al., 2002).

Eine weitere Stammzellfraktion im Knochenmark stellen die hämatopoetischen Zellen (HSC) dar. Sie teilen sich in vivo kontinuierlich, werden in vitro nicht adhären, imponieren als einfach strukturierte, zytoplasmaarme Zellen mit großem Kern und differenzieren sich zu den einzelnen Komponenten des blutbildenden Systems aus (Bianco et al., 2001). HSCs sind gut charakterisiert und die bislang einzige Stammzellart, die in der klinischen Routine im Rahmen der autologen und allogenen Transplantation bei hämatologischen Erkrankungen wie Leukämien, Lymphomen oder multiplen Myelomen eingesetzt wird (Appelbaum et al., 2001; Döhner et al., 2001; Druker et al., 2002; Harousseau et al., 1995). Neben der Hämatopoese haben HSCs unter geeigneten Bedingungen auch das Potential sich in andere Zellen wie Muskelzellen (Ferrari et al., 1998), Herzmuskelzellen (Orlic et al., 2001 b; Müller et al., 2002), Hepatozyten (Lagasse et al., 2000), Astrozyten (Kopen et al., 1999) und Nervenzellen (Brazelton et al., 2000) auszudifferenzieren. Ein Problem für die therapeutische Verwendung dieser Zellen liegt darin, dass es bis heute nicht möglich

ist, HSCs über längere Zeit ohne Verlust ihres Stammzellpotentials in vitro zu expandieren. Sie müssen daher immer frisch gewonnen werden.

Wegen des guten Potentials von Knochenmarkzellen, ihrer leichten Gewinnung durch Knochenmarkpunktion und den bereits vorhandenen Erfahrungen der Hämatologie, wurden sowohl klinische als auch tierexperimentelle Studien zur Zellersatztherapie des Myokardinfarktes mit diesen Zellen verstärkt durchgeführt.

#### 3.6.5.1 Klinische Studien mit Knochenmarkzellen

Die erste klinische Arbeit mit Transplantation von autologen mononukleären Knochenmarkzellen wurde von Hamano und Mitarbeitern in Japan durchgeführt (Hamano et al., 2001). Die Zellen wurden bereits 1999 bei 5 Patienten, während einer aortokoronaren Bypass-Operation in das Infarktareal injiziert. Bei 3 von 5 Patienten konnte im weiteren Verlauf des Jahres eine deutliche Verbesserung der myokardialen Durchblutung im Infarkttrandgebiet festgestellt werden. Im weiteren Verlauf gab es andere klinische Studien, die eine ähnliche Zellapplikation einsetzten (Stamm et al., 2003, 2004). Diese intramyokardialen Applikationsmethoden beinhalten allerdings die Risiken einer Thoraxeröffnung. Diese Intervention kann jedoch bei einem akuten Infarkt nicht durchgeführt werden. Tse et al. vermieden dies indem sie die Zellen kathetergesteuert intramyokardial injizierten (Tse et al., 2003).

In den meisten Situationen wird die Applikation der Zellen während der Ballondilatation bei Katheterisierung favorisiert. Strauer und Mitarbeiter waren die ersten, die mononukleäre Knochenmarkzellen ohne Thoraxeröffnung intrakoronar appliziert haben. Sie verwendeten einen Niedrig-Druck Ballonkatheter, um die Zellen in das Infarktgebiet zu injizieren (Strauer et al., 2001). Zur Zellgewinnung wurde bei den Patienten Knochenmark aspiriert. Die Zellen wurden aufbereitet, kultiviert und 6 Tage nach Infarkt injiziert. 10 Wochen nach Applikation war die Infarktgröße bei dem 46 jährigen Patienten von anfangs ca. 25 % auf 16 % verringert und die Ejektionsfraktion verbesserte sich um 7%.

Seitdem sind weitere nicht kontrollierte klinische Studien durchgeführt worden. 2002 veröffentlichten Strauer et al. eine größere Studie mit 20 Patienten, bei denen der akute Infarkt durch medikamentöse Standardtherapie, Reperfusion der Arterie mittels Ballondilatation und Stentimplantation behandelt wurde. 10 Patienten erhielten zusätzlich autologe, mononukleäre Knochenmarkzellen mittels Niedrig-Druck-

Balloninfiltration. Im Verlaufe der nächsten 3 Monate verminderte sich bei der Zelltherapiegruppe die Infarktgröße von 30% auf 12% und es konnte eine Zunahme der regionalen Wandbewegung von  $2.0 \pm 1.1$  auf  $4.0 \pm 2.6$  cm/s,  $P=0.028$  festgestellt werden. Die Verbesserung war signifikant verschieden zu der der Kontrollgruppe. Jedoch lies sich keine Verbesserung der EF sichern (Strauer et al., 2002).

2002 folgte die TOPCARE-AMI-Pilotstudie in die 31 Patienten mit standardmäßiger Behandlung eingeschlossen wurden. Mittels Katheterapplikation bekamen 9 von ihnen zusätzlich autologe Knochenmarkzellen und 11 Patienten ebenfalls zusätzlich EPCs aus peripherem Blut. Zwischen den 3 Gruppen bestand kein Unterschied der Ausgangswerte. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen gab es keinen Unterschied zwischen der Knochenmark- und der EPC-Gruppe. Bei beiden zellbehandelten Gruppen stieg im Verlaufe der ersten 4 Monate sowohl die EF von ca. 52% auf 60% als auch der WMSI („Wall Motion Score Index“) im infarzierten Bereich von  $-1,5$  auf  $-0,5$  SD/chord signifikant an. Das linksventrikuläre endsystolische Volumen (LVESV) verkleinerte sich von 56 auf 42 ml. Die unbehandelte (historische) Kontrollgruppe verbesserte sich nicht. Bei dieser Studie wurde ersichtlich, dass vor allem die am Infarktgebiet angrenzenden Regionen eine Verbesserung aufzeigten (Assmus et al., 2002). Zur Klärung der Frage welche der beiden Zellgruppen einen größeren Einfluss auf die Herzfunktion hat, wurden in einer Folgestudie 5 Tage nach Rekanalisation bei 30 Patienten per transkoronarer Applikation Knochenmarkzellen injiziert, bei 29 Patienten erfolgte die Injektion von EPCs aus dem peripheren Blut. Eine Angiographie nach 4 Monaten bestätigte wiederum, dass bei beiden zellbehandelten Gruppen die LVEF von 50% auf 58% aufgrund eines von 54 auf 44 ml abgesunkenen LVESV, signifikant angestiegen war. Eine Kontrast-Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) nach einem Jahr belegte eine signifikante Verbesserung der EF ( $9,3 \pm 8,0\%$ ), eine reduzierte Infarktgröße und eine ausbleibende linksventrikuläre Hypertrophie. Dies ließ eine funktionale Regeneration des infarzierten Ventrikels vermuten (Schächinger et al., 2004).

Die BOOST-Studie in Hannover schloss 60 Patienten mit akutem ST-Hebungsinfarkt ein (Wollert et al., 2004). Bei allen Patienten wurde zunächst lege artis eine Rekanalisation des Infarktgefäßes durchgeführt. Einige Tage später wurden bei 30 mittels Zufallsprinzip gewählten Patienten bei einer erneuten Koronarangiographie autologe mononukleäre Knochenmarkzellen über das Infarktgefäß infundiert. In dieser Gruppe zeigte sich nach sechs Monaten bei der kernspintomographisch

gemessenen LVEF eine Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe. (+6,7%; Kontrollgruppe +0,7%). Auch diese Studie ließ erkennen, dass vorrangig die Randgebiete des Infarktes für die kardiomyogene Regeneration verantwortlich waren (Wollert et al., 2004). Im Anschluss an diese Studien mit doch relativ kleiner Fallzahl, folgten doppel-blind durchgeführte, randomisierte, Placebo-kontrollierte Studien. Da die Ergebnisse solcher Studien ein wesentlich besser verifiziertes Ergebnis bezüglich der funktionellen Auswirkung von Knochenmarkzellen haben, müssen diese besonders hervorgehoben werden. Diese neueren Studien mit einer deutlich höheren Fallzahl zeigen widersprüchliche Ergebnisse: Ein günstiger Effekt einer mononukleären Knochenmarktherapie auf die linksventrikuläre Funktion bei Patienten nach Myokardinfarkt wurde in der REPAIR AMI- Studie gefunden. In dieser Untersuchung wurden 103 Patienten mit im Mittel  $23,6 \times 10^7$  Knochenmarkzellen intracoronar behandelt und 101 Patienten mit Placebo. Hier zeigte sich bei der Placebogruppe eine Verbesserung der EF von im Mittel 47% auf 50%, während der Anstieg bei den zellbehandelten Patienten von im Mittel 48 auf 54% signifikant größer war (Schächinger et al., 2006).

Janssens und Mitarbeiter behandelten 33 von 67 Patienten mit ST-Hebungsinfarkt schon innerhalb von 24-48 Stunden nach Infarkt intracoronar mit  $30,4 \times 10^7$  mononukleären Knochenmarkzellen. Untersuchungen der globalen linksventrikulären Funktion mittels Magnetresonanztomographie konnten keine Verbesserung gegenüber der Placebogruppe (n = 34) zeigen. Bei der Positronen Emissions Tomographie (PET)-Analyse zur Bewertung der Vitalität von myokardialem Gewebe, zeigt sich, dass die mit Zellen behandelten Patienten ein deutlich geringeres Infarktareal zurückbehielten. Dies zeigte sich auch in der Kernspintomographie bei der Analyse der regionalen Wandbewegung der betroffenen Infarktregionen (Janssens et al., 2006).

Eine weitere doppelblinde randomisierte placebokontrollierte Studie mit einem sehr homogenen Patientenkollektiv ist die ASTAMI-Studie. 97 Patienten mit ausschließlich ST-Hebungsinfarkt der Vorderwand durch nachgewiesenem Verschluss der LAD wurden in diese Studie eingeschlossen (Lunde et al., 2006). Die intracoronare Zellinjektion erfolgte im Mittel sechs Tage nach Myokardinfarkt. Die Herzfunktion wurde mit verschiedenen Methoden (SPECT, Echokardiographie und MRT) ermittelt. Der Effekt der Knochenmarkzellen auf die LVEF lag in einer Verbesserung von 0.6%

( $P=0.77$ ) bei der Untersuchung mittels SPECT, bei 0.6% ( $P=0.70$ ) bei der echokardiographischen Untersuchung sowie einer Abnahme von 3.0% ( $P=0.054$ ) bei der Messung mittels MRT. Demnach konnte bei keiner der Methoden ein zusätzlicher Nutzen einer mononukleären Knochenmarkzelltherapie nachgewiesen werden. In der Arbeit von Chen et al. bekamen 35 (Placebogruppe) von 69 Patienten 18 Tage nach Myokardinfarkt ein der Zelltherapiegruppe äquivalentes Volumen an Phosphor Buffered Saline injiziert. Im Gegensatz zu den meisten anderen Studien wurden in der Zelltherapiegruppe autologe über 10 Tage kultivierte Knochenmarkzellen (mesenchymal stem cells, MSC) ( $8-10 \times 10^9$  Zellen/ml) appliziert. Alle 69 Patienten wurden über 6 Monate zu den gleichen Zeitpunkten untersucht (PET, Herzkatheterisierung, Echokardiographie). Die LVEF stieg nach 3 Monaten in der zellbehandelten Gruppe signifikant im Vergleich zu vor Zellinjektion und der Kontrollgruppe ( $67 \pm 11\%$  vs  $49 \pm 9\%$  und  $53 \pm 8\%$ ,  $P < 0.05$ ). Im Verlauf der folgenden 3 Monate konnte keine weitere Verbesserung der EF festgestellt werden. Der WMSI verbesserte sich nach 3 Monaten in der Zellgruppe ( $4.2 \pm 2.5$  cm/s vs  $2.2 \pm 1.3$  cm/s,  $P < 0.05$ ), aber nicht in der Kontrollgruppe ( $2.2 \pm 1.5$  cm/s vs  $2.7 \pm 1.7$  cm/s,  $P > 0.05$ ) (Chen et al., 2004).

#### 3.6.5.2 Tierexperimentelle Studien

Die Auswertungen aller klinischen Studien erlauben keine endgültigen Rückschlüsse auf das Potential der Stammzellapplikation am Herzen. Es ist beim Menschen weder möglich den Differenzierungszustand noch den Verbleib der Zellen nach Applikation histologisch nachzuvollziehen. Daher wurden verschiedene tierexperimentelle Versuchsmodelle entwickelt, um sowohl die Wirkung der Zelltherapie am Herzen besser nachvollziehen zu können als auch Informationen über den Verbleib und Abbauweg der Zellen nach Applikation zu gewinnen.

Untersuchungen dieser Art begannen am transgenen Ratten-/Mausmodell, da sich u.a. bei diesen Spezies durch spezifische „Mäuselinien“ die Zellen leichter nachweisen lassen. Des Weiteren sind für Ratte und Maus die für die Immunhistologie notwendigen Antikörper viel umfangreicher vorhanden. Immunhistochemisch kann nachgewiesen werden, ob die applizierten Zellen entsprechende kardiale Proteine ausgebildet haben. Viele dieser Marker sind für die Spezies Ratte/Maus vorhanden, nicht aber fürs Schwein.

Die Gruppe um Jackson (Jackson et al., 2001) untersuchte die Spontanmigration von Knochenmarkszellen bei Mäusen. Es sollte festgestellt werden, ob Einwanderung in infarziertes Gewebe stattfindet. Hierfür wurde weiblichen Tieren einer Mäuselinie das Knochenmark durch Bestrahlung zerstört und danach durch Knochenmark männlicher Mäuselinien, welche u.a. das lacZ Antigen exprimierten, ersetzt. 10 Wochen nach diesem Vorgang wurde bei den Knochenmark transplantierten Tieren die LAD okkludiert. 2-4 Wochen nach Infarktinduktion wurden die Mäuseherzen zur immunhistochemischen Untersuchung entnommen. Aus dem Knochenmark stammende Zellen mit Y-Chromosom wurden durch die verschiedenen verwendeten Markierungstechniken im Herzen der weiblichen Mäuse detektiert. Es wurde untersucht, welche Art der Regeneration durch die eingewanderten Zellen entstanden ist und wie weit sich kardiale Eigenschaften ausgebildet hatten. Es zeigte sich, dass aus dem transplantierten Knochenmark Zellen in die infarzierte Herzregion eingewandert sind und sich in Myokard (0,02% der vorhandenen Kardiomyozyten) und Endothelzellen (3% der Blutgefäße) differenziert haben (Jackson et al., 2001).

Orlic et al. brachten 2001 an weiblichen LAD ligierten Mäusen nach Injektion männlicher „enhanced Green Fluorescent Protein“ (eGFP) Zellen, als Erste den Befund, dass adulte Knochenmarkszellen (KMZ) nach Autotransplantation in infarziertes Herzmuskelgewebe zu Herzmuskelzellen differenzieren könnten (Orlic et al., 2001).

Murry et al. konnten nach Anreicherung der KMZ und intramyokardialer Injektion keinerlei Ausdifferenzierung der lin-/c-kit<sup>+</sup>-Zellen zu Herzmuskelzellen feststellen (Murry et al., 2004). Balsam et al. konnten in einem ähnlichen Versuchsaufbau wie von Orlic et al. ebenfalls bei den applizierten Zellen keinerlei kardiozytenspezifische Marker detektieren. Es fanden sich nach 10 Tagen zwar noch vereinzelt Zellen aus dem Transplantat, jedoch konnten 30 Tage nach Zellapplikation keine markierten Zellen mehr nachgewiesen werden. Im Bezug auf die Herzleistung fand sich jedoch nach 6 Wochen echokardiographisch eine moderate aber dennoch signifikante Verbesserung der Herzleistung (Balsam et al., 2004).

Es stellte sich die Frage, ob sich die von Orlic et al. gefundenen Zellen nun wirklich in Myozyten ausdifferenziert hatten, oder ob womöglich eine Zellfusion zu den gefundenen Ergebnissen geführt hat. Terada et al. zeigten für Zellen des Knochenmarks, daß sie in vitro mit embryonalen Zellen fusionieren und deren Eigenschaften annehmen können (Terada et al, 2002). Alvarez-Dolado et al. zeigten

die Fusion von (hämatopoetischen) Knochenmarkzellen mit Kardiomyozyten, Hepatozyten und Purkinje Neuronen in vivo (Alvarez-Dolado et al., 2003). So kann vermutet werden, dass zumindest ein Teil der beobachteten Plastizität adulter Stammzellen auf einer Fusion mit gewebe-spezifischen Zellen besteht. Auch Nygren et al. stellten in ihren Arbeiten lediglich Zellfusion und keine Transdifferenzierung in Kardiomyozyten fest (Nygren et al., 2004). Die Häufigkeit der beobachteten Fusionen ist allerdings zumindest in vitro mit 2-11 fusionierten Zellen/ $10^6$  Knochenmarkzellen sehr gering (Terada et al., 2002). Auch Harris et al. postulierten, dass die Zellfusion zwar in vitro möglich ist, in vivo aber so selten ist, dass sie physiologisch keinerlei Bedeutung hat (Harris et al., 2004).

Unter absolut reproduzierbaren Bedingungen, und in Anlehnung an die von Orlic 2001 durchgeführten Untersuchungen, injizierten Kajstura et al. c-kit/eGFP positive Knochenmarkzellen männlicher Mäuse in infarzierte Herzen weiblicher Tiere. Sie fanden eine funktionelle Verbesserung der Herzfunktion, welche ihrer Meinung nach auf eine Differenzierung der applizierten Zellen und eine Wiederherstellung des geschädigten Myokards zurückzuführen ist. Der Beweis, dass dies nicht auf eine Zellfusion zurückzuführen war, liegt darin, dass alle von ihnen gefundenen neue Herzzellen einen einfachen Y-Chromosomensatz hatten und nicht, wie den bei einer Zellfusion zu erwartenden X- und Y-Chromosomensatz (Kajstura et al., 2005).

Neben den obigen Vorteilen bei den beschriebenen murinen Tiermodellen, gibt es aber auch Nachteile. Die hohe Herzfrequenz (bis zu 600 Schläge pro Minute) erschwert die genaue Applikation der Zellen, auch ist die Größe des Herzens limitierend für eine genaue Infarktinduktion. Dieses gilt auch für die funktionellen Untersuchungen. Daher wurden neben den murinen Studien auch Studien am Hund, Schaf und Schwein durchgeführt.

Silva et al. okkludierten nach Thoraxeröffnung bei 12 Hundeherzen die LAD mit Hilfe eines Ameroid Constrictors (Silva et al., 2005). 30 Tage später wurden entweder  $100 \times 10^6$  mesenchymale Stammzellen (MSCs) gelöst in 10 ml Kochsalzlösung (n=6), oder reine Kochsalzlösung (n=6) intramyokardial injiziert. Zum Zeitpunkt der Zellinjektion und nach weiteren 30 Tagen wurden ein Ruhe- und ein Belastungsschall durchgeführt. Nach Euthanasie wurden die Tiere histopathologisch und immunhistochemisch untersucht. Die Ausgangs-ejektionsfraktion war in beiden Gruppen gleich. In der Zellgruppe verbesserte sich die

EF von ca 42% auf 47% im Vergleich zu der Placebogruppe, in der die EF von ca 38% auf 20% weiter abfiel. Ähnlich verhielt es sich bei der stressinduzierten Untersuchung. Bei der histopathologischen Untersuchung fanden Silva et al. im Infarktgebiet in der Zellgruppe einen Trend zur geringeren Fibrosierung und höherer Gefäßdichte. Gemäß den histologischen Untersuchungsbefunden differenzierten sich die MSCs in Endothelzellen und glatte Muskelzellen aber nicht in Myozyten.

Um den Einfluss von autologen, mononukleären Knochenmarkzellen auf die Herzfunktion zu untersuchen, applizierten Shake et al. 14 Schweinen kultivierte Knochenmarkzellen. Die Infarktinduktion erfolgte durch 60 minütige Ligatur der LAD. Die Zelltransplantation erfolgte intramyokardial 2 Wochen später. Zur Messung der regionalen Wandbewegung wurden piezoelektrische Kristalle in der Infarktregion platziert. Der Grad der Kontraktion war 4 Wochen nach Infarkt mit 5,4% bei der Zelltherapiegruppe deutlich besser als die 3,4% in der Placebogruppe. Auch war die Wanddickenabnahme bei den mit Zellen behandelten Tieren deutlich weniger ausgeprägt. In der histologischen Analyse schienen die Zellen bei den Tieren aufgrund des Nachweises herzmuskelspezifischer Proteine, im Herzen angewachsen zu sein (Shake et al., 2002).

Wie oben beschrieben stellten viele der Arbeitsgruppen eine Zunahme der Kollateralgefäße nach Stammzellapplikation fest. Fuchs et al. gingen u.a. der Frage nach, wie es zu dieser Gefäßbildung kommen kann und welchen Einfluss diese Gefäßzunahme auf die Herzfunktion haben könnte. Sie kultivierten Endothelzellen einerseits in mit Knochenmarkzellen angereichertem Medium sowie in knochenmarkzellularfreiem Medium. Sie stellten fest, dass die Proliferationsfaktoren Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) bei Anwesenheit von Zellen signifikant anstiegen. In einer in vivo Studie wurden 21 spezifisch pathogenfreie Schweine von Fuchs et al. untersucht. 14 Tieren wurde mit Hilfe eines Ameroid Constrictors die linke Arteria circumflex okkludiert, bei 7 wurden mittels transendokardialer Injektion 4 Wochen nach Infarktinduktion autologe Knochenmarkzellen appliziert. Die Placebogruppe erhielt heparinisierte Pufferlösung (n=7). Von 7 zusätzlichen Schweinen ohne myokardiale Ischämie wurde 4 Tieren ebenfalls frisch entnommene Knochenmarkzellen appliziert, 3 der Tiere erhielten heparinisierte Pufferlösung. Bei den nicht infarzierten Tieren wie auch bei der Placebogruppe konnte kein Einfluss der Zellen festgestellt werden. Obwohl

histologisch keine Vermehrung der Kollateralefäße oder eine Zunahme des Gefäßdurchmessers festgestellt werden konnte, fand sich in der Zellgruppe 4 Wochen nach Zellinjektion ein signifikanter Anstieg der regionalen Durchblutung des Myokards im ischämischen Bereich von 83 auf 98%. Das beweist, dass schon minimale, histologisch nicht mehr nachweisbare, anatomische Veränderungen im Kapillarbett große Durchblutungsveränderungen bewirken können. Die gefundene Durchblutungssteigerung kann durch die in der *in vitro* Studie gefundene Zunahme von Angiogenesefaktoren wie VEGF und MCP-1 erklärt werden (Fuchs et al., 2001).

Der Fragestellung, ob die ins Herz applizierten Zellen ein arhythmogenes Potential haben, sind Goodchild et al. nachgegangen. Sie untersuchten am Schweinmodell mögliche Konsequenzen einer intramyokardialen Transplantation mit mononukleären Knochenmarkszellen. Vier Wochen nach Infarktinduktion wurden  $10^7$  oder  $10^8$  autologe MNCs mittels kathetergesteuerter intramyokardialer Injektion gespritzt. In der Placebogruppe wurde Kochsalzlösung gespritzt. Nach 7 Wochen wurden elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt, um das rhythmogene Potential der Zellen zu evaluieren. Es waren keine Arrhythmien sowohl in der mit  $10^7$  als auch in der mit  $10^8$  Zellen behandelten Gruppe feststellbar. Nach Euthanasie des Tieres wurde das Herz histopathologisch untersucht, es wurden keine zellinduzierten histopathologischen Veränderungen gefunden. Damit kam er zu dem Schluss, dass diese Art der Zellapplikation aus elektrophysiologischer Sicht sicher ist und nicht zu Arrhythmien führt (Goodchild et al, 2006).

### *3.6.6 Weitere Zellen*

Neben den oben erwähnten Zellen gibt es auch weitere Untersuchungen, um mit anderen Zelltypen adulter Stammzellen eine Zellersatztherapie durchzuführen. So konnten Laugwitz et al. nachweisen, dass kardiale Progenitorzellen (Islet 1) das Potential haben sich zu Herzmuskelzellen auszudifferenzieren (Laugwitz et al., 2008). Eine weitere Zelllinie, die Herzmuskelgewebe eventuell ersetzen könnte, wurde in den iPS Zellen (induced pluripotent stem cells) gefunden. Kim et al. konnten zeigen, dass die ursprünglich aus Fibroblasten von Mäusen und Menschen gewonnenen Zellen sich in verschiedenen Zelllinien weiter ausdifferenzieren können (Kim, 2008)

Als eine weitere Quelle adulter Stammzellen werden auch Spermatogonien auf ihr Potential zur weiteren Differenzierung untersucht. In ihren Untersuchungen konnten Guan et al. zeigen, dass die Zellen aus den Hoden von erwachsenen Mäusen unter Zellkulturbedingungen ähnliche Eigenschaften entwickeln wie embryonale Stammzellen (Guan et al., 2006).

### **3.7 Verbleib der applizierten Zellen**

Neben der Fragestellung der Plastizität der applizierten Zellen, ist auch der Verbleib dieser Zellen von Bedeutung. Barbash et al. applizierten in vitro vermehrte Knochenmarkszellen adulter Ratten in 39 koronar ligierte und scheinoperierte Ratten. Die Applikation erfolgte in den linken Ventrikel oder intravenös. Die mit Technetium ( $^{99m}\text{Tc}$ ) (n=19) markierten Zellen wurden entweder 2 oder 10-14 Tage nach Myokardinfarkt appliziert. Bei einem Teil der Tiere erfolgte die Darstellung der Zellen mittels Gammakamera vier Stunden nach Zellapplikation. Herz, Lunge, Leber, Milz und Knochen wurden zusätzlich nach Tötung des Tieres auf das Vorhandensein von  $^{99m}\text{Tc}$  untersucht. Bei Tieren mit intravenöser Applikation wurden die Zellen hauptsächlich in den Lungen wieder gefunden, bei der linksventrikulären Applikation hingegen fanden sich die Zellen vermehrt im Herz und weniger in der Lunge. Bei den infarzierten Tieren war die Radioaktivität im Herzen im Vergleich zu den scheinoperierten deutlich höher. Für die histologische Analyse wurden bei einem Teil der Tiere (n=20) die gespritzten Zellen mit LacZ Markergen oder Bromodeoxyuridine markiert. Die zu untersuchenden Organe wurden zur histologischen Analyse 1 Woche nach Applikation entnommen. LacZ markierte Zellen fanden sich in Leber, Lunge, Milz und Knochenmark und auch in der Infarkttrandzone (Barbash et al., 2003)

Müller-Ehmsen et al. applizierten neonatale Kardiomyozyten männlicher Ratten in die durch Ligatur infarzierten Herzen weiblicher Tiere und verwendeten die TaqMan-PCR-Analyse zum Nachweis des Y-Chromosoms in den Empfängertieren. Der Nachweis erfolgte 3 oder 6 Monate nach Zelltransplantation. Die PCR-Daten der Untersuchung zeigten, dass mehr als 60% der implantierten Zellen selbst sechs Monate nach Zelltherapie nachweisbar waren (Müller-Ehmsen et al., 2002b). Jedoch waren etwa 10 % der injizierten Zellen Fibroblasten, Endothelzellen oder andere kardiale Zellen, so dass die tatsächliche Zahl der überlebenden Kardiomyozyten eher

geringer einzuschätzen war. Die TaqMan-PCR-Analyse des Y-Chromosoms lässt leider eine Differenzierung zwischen verschiedenen Zelltypen nicht zu. Histologisch ließen sich große Areale mit neonatalen Herzmuskelzellen im Infarktreal nachweisen.

Auch bei Untersuchungen am Menschen wurde der Frage nachgegangen welchen Weg die applizierten Zellen nehmen und wo sie nach der Injektion verbleiben. Hofmann et al. markierten unselektierte KMZ mit radioaktivem 2-[<sup>18</sup>F] fluoro-2-deoxy-D-Glukose (<sup>18</sup>F-FDG). Die Zellen waren zu 99% markiert bei einer gemessenen Vitalität von 92- 96%. Sie wurden 5-10 Tage nach Stentimplantation injiziert. 6 Patienten bekamen die Zellen intrakoronar appliziert, wobei bei 3 von ihnen die Fraktion mit CD34+-Zellen angereichert wurde. Bei weiteren 3 Patienten wurden die Zellen intravenös über die Vena antecubitalis injiziert. 50-75 min nach Zellapplikation wurden die Patienten mittels 3D PET (Positron Emission Tomography) untersucht. Die intravenös injizierten, unselektierten Zellen konnten im Herzen nicht eindeutig von der Hintergrundaktivität unterschieden werden. Bei den intrakoronar applizierten unselektierten KMZ wurden 1,3-5,3% der markierten, unselektierten KMZ im infarzierten Myokard detektiert. Bei der mit CD34+ Zellen angereicherten Fraktion befanden sich 12,0% bis 21,3% der Gesamtaktivität im infarzierten Myokard. Unselektierte Zellen reichert sich gleichmäßig sowohl im Infarktzentrum als auch an den Randgebieten an, wohingegen sich CD34+ Zellen hauptsächlich an den Randgebieten fanden. Der größte Anteil der extrakardialen Radioaktivität konnte in Milz und Leber gemessen werden (Hofmann et al., 2005).

### **3.8 Markierung von Zellen vor Injektion in infarzierte Herzen**

Die Markierung der applizierten Zellen ist zur Differenzierung wie auch Lokalisation der applizierten Zellen im Infarktgebiet von entscheidender Bedeutung. Die wichtigsten Kriterien einer Erfolg versprechenden Markierungsmethode sind die Markierungseffektivität, -beständigkeit, und welchen Einfluss die Markierung auf Vitalität und Funktionalität der markierten Zellen hat. Hierfür stehen verschieden Methoden zur Verfügung. Sie lassen sich in 6 große Gruppen einteilen: genetische Marker, Nachweis des Y-Chromosoms, Fluoreszenzmarker, cytoplasmatische Marker, radioaktive Marker, Eisenmarkierung.

### *3.8.1 Zellmarkierung mittels bestimmter Genlinien*

Das Prinzip der genetischen Zellmarkierung ist die Expression eines Proteins, welches von den Donorzellen aber nicht von den Zellen des Empfängertieres exprimiert wird. So wird es möglich, applizierte Zellen von den ubiquitär vorhandenen gleichartigen Zellen des Empfängertieres zu unterscheiden und durch den Nachweis dieses Proteines zu detektieren. Beispielsweise werden bei Mäusen Zellen benutzt, welche eGFP exprimieren. eGFP-fluoreszierende Zellen können 14 Tage nach Zellapplikation noch nachgewiesen werden (Orlic et al., 2001a; Balsam et al., 2004; Murry et al., 2004). Da es sich um eine genetische Zellmarkierung handelt, liegt die „Markierungseffizienz“ bei 100%. Es gibt keinen Unterschied in Vitalität und Differenzierungspotential zwischen Zellen der eGFP positiven und eGFP negativen Mäuselinie.

Ein anderer häufig benutzter genetischer Zellenachweis, ist die Verwendung von Zellen, die LacZ-Protein exprimieren (Jackson et al., 2001). Viral transduziertes LacZ wurde auch bei weiteren murinen Studien (Wang et al., 2001; Mangi et al., 2003, Reinecke et al., 2004) und Schweinen (Vale et al., 1999) eingesetzt. Allerdings kann diese Methode beim Schweinmodell noch nicht effizient durchgeführt werden.

### *3.8.2 Nachweis des Y-Chromosomes*

Eine besondere Genmarkierung ist die Nutzung des männlichen Geschlechtschromosoms. Orlic et al. benutzten als Donorzellen Knochenmarkzellen aus männlichen Tieren. Somit konnten die weiblichen Empfänger-Tiere nach heterologer Transplantation des selektierten Knochenmarks auf das Vorhandensein des Y-Chromosoms untersucht werden (Orlic et al., 2001a). Auch Müller-Ehmsen et al. verwendeten eine abgewandelte Form dieser Nachweismethode. Sie injizierten Kardiomyozyten von männlichen neonatalen Ratten in infarziertes Herzgewebe weiblicher Tiere. Mittels TagMan-PCR konnte das Y Chromosom in den weiblichen Empfängertieren nachgewiesen werden (Müller-Ehmsen et al., 2002).

Generell muss bei der Anwendung genetischer Marker bedacht werden, dass sie einerseits nur am murinen Tiermodell wirklich etabliert sind und andererseits beim heutigen Stand der Forschung lediglich für die Transplantation heterologer Zellen geeignet sind.

### *3.8.3 Zellmarkierung durch fluoreszierende Farbstoffe*

Eine Markierungsart für autologe Zellen ist die direkte Färbung der Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen. Kocher et al. benutzten 2001 für ihre Studie 1,1'-Dioctadecyl-1-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyaninperchlorat (Dil) zur Fluoreszenz-Markierung der zu injizierenden Zellen. Das lipophile Fluorochrom Dil ist eine membran-selektive Zellfärbung und leuchtet im Fluoreszenzmikroskop rot. So können durch Fluoreszenzmikroskopie die Gewebsschnitte auf vorhandene Spenderzellen untersucht werden (Kocher et al., 2001). Dieser Fluoreszenz-Farbstoff Dil wurde auch in anderen Studien zum Zellenachweis verwendet (Kawamoto et al., 2001; Vulliet et al., 2004). Ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff ist 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), welches den Zellkern der zu transplantierenden Zellen anfärbt. Beide Zellfärbungen sind nicht zytotoxisch (Henning et al., 2006; Tang et al., 2006).

Eine Fluoreszenzmethode mit Gegenfärbung ist die Nachweismethode mit Bromodeoxyuridin (BrdU). Hierbei werden die Spenderzellen immunhistochemisch mit Hilfe von anti-BrdU-Antikörpern detektiert. Die Färbefeffizienz liegt bei dieser Methode ungefähr bei 75%. Tomita et al. wiesen 5 Wochen nach Zelltransplantation noch implantierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop nach (Tomita et al., 1999). Auch Barbash et al. verwendeten für die histologische Analyse Spenderzellen, die mit Bromodeoxyuridine mit einer Markierungseffizienz von 30% markiert waren (Barbash et al., 2003).

### *3.8.4 Lichtmikroskopisch nachweisbare Färbemethoden*

Neben fluoreszierenden Substanzen bietet auch der lichtmikroskopische Nachweis des sich im Cytoplasma anreichernden kolloidalen Goldes eine Möglichkeit die applizierten Zellen im Gewebe zu detektieren. Christensen et al. verwendeten 1992 zum ersten Mal diese Markierungstechnik, bei der sie Makrophagen einmal für 24-48 Stunden und in einer anderen Gruppe bis zu 14 Tage zusammen mit kolloidalem Gold inkubierten (Christensen et al., 1992). Die Markierungseffizienz lag bei etwa 98% und die Vitalität der Zellen war über 14 Tage nicht beeinträchtigt. Schmidt et al. verwendeten diese Markierungstechnik für mesenchymale Zellen. Der Nachweis der Zellen erfolgt lichtmikroskopisch durch Gegenfärbung. Diese Methode bietet zusätzlich den Vorteil der Möglichkeit des elektronenmikroskopischen Nachweises (Schmidt et al., 2006).

### 3.8.5 Radioaktive Markierungsverfahren

Radioaktive Isotope stellen eine weitere Möglichkeit dar, Zellen zu markieren und anschließend zu detektieren. Gebräuchlich sind die Nuklide  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  und  $^{111}\text{In}$ . Allen gemeinsam ist, dass ihr Zerfall über eine Gammakamera detektiert werden kann. Ihre atomphysikalischen Halbwertszeiten liegen für  $^{18}\text{F}$  bei 110 Minuten, für  $^{64}\text{Cu}$  bei 12,7 Stunden, für  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  bei 6 Stunden und für  $^{111}\text{In}$  bei 2,8 Tagen.

Hofmann et al. markierten unselektierte Knochenmarkzellen mit radioaktivem  $^{18}\text{F}$ -FDG (2-[ $^{18}\text{F}$ ] fluoro-2- deoxy-D-Glukose). Es stellte sich heraus, dass 99% des applizierten radioaktiven Moleküls zellgebunden war. Die Vitalität der markierten Zellen lag zwischen 92% und 96% (Hofmann et al., 2005). Brenner et al. fanden in Vorversuchen bei der Markierung von EPCs und HPCs (Hematopoietic Progenitor Cell) lediglich eine Markierungseffizienz von unter 10% (Brenner et al., 2004). Adonai et al. zeigen, dass die Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -FDG in die Zellen abhängig von der Verfügbarkeit von Glucosetransportern ist, daher verwendeten sie in ihren Studien glucosefreies Medium (Adonai et al., 2002). Die geringe Halbwertszeit von  $^{18}\text{F}$ -FDG (110min) und die hohe Eliminationsrate erschweren Kinetikuntersuchungen.

Adonai et al. verwendeten auch  $^{64}\text{Cu}$  zum in vivo Nachweis der applizierten Zellen. In in vitro Studien fanden sie eine Markierungseffektivität, die von der jeweiligen Kupferkonzentration abhing. Nach 5 Stunden erreichten sie eine Aufnahme bei 70-85% der Zellen. Die markierten Zellen zeigten eine Vitalität von 80-85% (Adonai et al., 2002).

Barbash et al. verwendeten  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  zum Nachweis der intraventrikulär oder intravenös applizierten Knochenmarkzellen bei infarzierten Ratten. Die Darstellung der Zellen erfolgte mittels Gammakamera vier Stunden nach Zellapplikation. Die Zellen zeigten eine Vitalität von 99% sowie Adhäsion und Proliferation nach erneutem ausplattieren (Barbash et al., 2003). Penicka et al. untersuchten die Kinetik der Knochenmarkzellen nach intrakoronarer Injektion mit Hilfe von  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  am Patienten mit und ohne akuten oder chronischen Myokardinfarkt. (Penicka et al., 2007).

Chin et al. wendeten  $^{111}\text{In}$  markierte Zellen am Schweinmodell an. Sie wiesen markierte MSCs mittels „Single Photon Emission Computed Tomography“ (SPECT) nach. Sie erreichten eine Markierungseffektivität von 85,6%, 48 h nach radioaktiver Markierung lag die getestete Vitalität bei >95% (Chin et al., 2003).

Auch die Arbeitsgruppe um Aicher und Brenner verwenden  $^{111}\text{In}$  zum Nachweis der applizierten Zellen und sie fanden am Rattenmodell, dass nach 48 und 96 Stunden die Vitalität nur noch bei 30% lag, und nach 7 Tagen keinerlei Proliferation oder Differenzierung der Zellen ex vivo beobachtet werden konnte. Die Angaben zur Markierungseffizienz in der Arbeitsgruppe Aicher und Brenner schwanken allerdings zwischen 31,9% (Brenner et al., 2004) und 67% (Aicher et al., 2003) nach einer Inkubationszeit von jeweils 60 Minuten. Zu Bedenken ist die geringe Auflösung am murinen Tiermodell, so dass kaum zwischen Herz, Leber und Milz unterschieden werden konnte (Brenner et al., 2004). Bei T-Lymphozyten liegt die Markierungseffektivität bei 70% (Kuyama et al., 1997). Laut Botti et al. liegt die Vitalität von T-Lymphozyten für  $^{111}\text{In}$ -oxin bei 90% (Botti et al., 1997).

### *3.8.6 Eisenmarkierung zum Nachweis im MRT*

Eine weitere Möglichkeit ist die Markierung der Zellen mit Nanopartikeln aus Eisen und dem anschließenden Nachweis der mit Eisen markierten Zellen mittels Magnetresonanztomographie (MRT). Auch diese Technik erlaubt die Zellen in vivo zu verfolgen. Hill erreichte bei mesenchymalen Zellen eine Markierungseffektivität von 99%. Die Vitalität und die Differenzierungskapazität blieb über einen Zeitraum von 3 Monaten unbeeinflusst von der Eisenmarkierung (Hill et al., 2003). Auch Kraitchman konnte keinerlei Veränderung der MSC nach dem Markierungsvorgang feststellen. Bei ihm lag die Vitalität kurz vor Applikation der Zellen bei >95% (Kraitchman et al., 2003). Bei Nachweisen durch MRT muss bedacht werden, dass Menschen mit metallischen Implantaten wie Herzschrittmachern oder Defibrillatoren u.a. von dieser Art der Zellverfolgung ausgeschlossen sind. Auch muss gesagt werden, dass für tierexperimentelle Studien die doch recht personal- und kostenintensiven Magnetresonanztomographen nicht immer zur Verfügung stehen.

### **3.9 Fragestellungen und Ziele der vorliegenden Arbeit**

Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen war es, den funktionellen Nutzen von in einen Myokardinfarkt transplantierten Knochenmarkzellen zu untersuchen, die Menge der im Herzen verbleibenden Zellen zu quantifizieren und die eventuelle Ausdifferenzierung der Zellen zu dokumentieren.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist am Schweineherz nach permanentem Verschluss der LAD ein funktioneller Nutzen einer Therapie mit Knochenmarkzellen im Vergleich zu Placebo nachweisbar?
2. Wie viele autologe Knochenmarkzellen sind 14 Tage nach intrakardialer Injektion in infarziertes Schweinemyokard noch im Herzen nachweisbar? Wie stellen sich diese Zellen histologisch dar?
3. Gibt es zwischen intramyokardialer und intrakoronarer Injektion Unterschiede hinsichtlich des Verbleibs der Zellen am infarzierten Herzen?

## **4 MATERIAL UND METHODEN:**

### **4.1 Rahmenbedingungen der Untersuchungen**

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte im Institut für Experimentelle Medizin (IfEM), der Medizinischen Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln (Herzkatheterlabor) und der Klinik für Nuklearmedizin. Für die Studie wurden 2 Monate alte männliche Hausschweine eingesetzt. Die Tiere hatten zu Beginn der Studie ein Gewicht von circa 30 kg. Ihnen stand Wasser ad libitum zur Verfügung und sie wurden mit pelletiertem Trockenfutter gefüttert. Die Schweine wurden 1 Woche vor Beginn der Studie im Tierstall des Institutes für Experimentelle Medizin eingestellt. Die tierexperimentelle Studie wurde geblindet und randomisiert durchgeführt. Die Tierversuche wurden nach Überprüfung und Zustimmung der Ethikkommission gemäss § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt (50.203.2K 47, 15/02). Der Allgemeinzustand der Tiere wurde täglich durch den verantwortlichen Veterinär beurteilt.

### **4.2 Ablauf der Untersuchungen**

Die Versuchsdurchführung war in 2 Teile gegliedert, Projektteil A diente zur Analyse der funktionellen Auswirkung der Transplantation von mononukleären Knochenmarkzellen (MNC) auf das infarzierte Schweinemyokard, in Projektteil B erfolgten Untersuchungen zum Zellverbleib und zur Zelldifferenzierung. Für die verschiedenen Untersuchungen wurden 2 Infarktmodelle verwendet, eines mit permanenter Okklusion und eines mit anschließender Reperfusion des Infarktgefässes. Die genauen Untersuchungsabläufe sind in den nachfolgenden Absätzen aufgelistet.

#### *4.2.1 Funktionelle Untersuchungen zur Auswirkung der MNC auf die LV Funktion (Projektteil A) :*

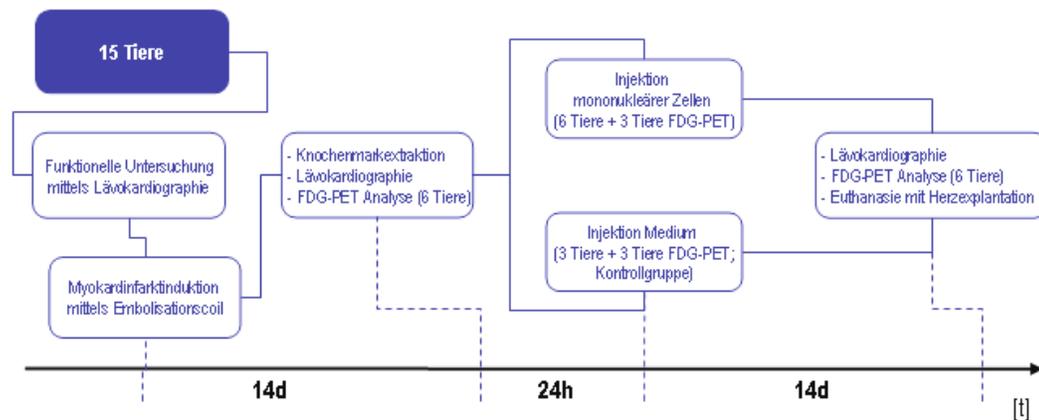
Die funktionelle Analyse nach Transplantation autologer mononukleärer Zellen in infarziertes Schweinemyokard erfolgte am permanent okkludierten Infarktgefäß. In der Gruppe für die funktionelle Analyse wurden bei 9 von 15 Tieren mononukleäre Zellen (MNC) gespritzt (Ctx Gruppe) bei 6 Tieren wurde lediglich Medium appliziert

(Kontrollgruppe). Somit wurden insgesamt 15 Tiere für die Bestimmung der funktionellen Auswirkungen eingesetzt.

Bei diesen Tieren erfolgte:

- initial eine Myokardinfarktinduktion mittels Embolisationscoil nach funktioneller Untersuchung mittels Lävokardiographie
- eine lävokardiographische Überprüfung der Pumpfunktion des Herzens 2 Wochen nach Infarktinduktion
- Knochenmarksentnahme 2 Wochen nach Infarktinduktion
- Applikation der Zellen 24 Stunden nach Knochenmarkentnahme
- funktionelle Untersuchung 2 Wochen nach Ctx/Mediuminjektion
- Euthanasie des Tieres 2 Wochen nach Ctx/Mediuminjektion

Bei jeweils 3 Tieren aus der Ctx- und aus der Kontrollgruppe wurde zusätzlich vor Ctx/Mediumapplikation und zum Zeitpunkt 2 Wochen danach eine FDG-PET Untersuchung durchgeführt. Der Ablauf der funktionellen Untersuchungen ist in Abb. 2a dargestellt.

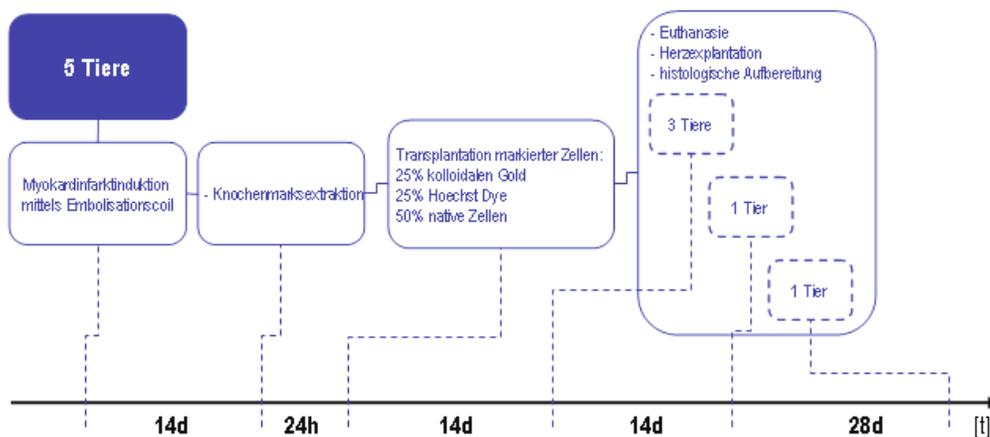


**Abbildung 2a:** Versuchsablauf für die Tiergruppe zur funktionellen Analyse nach Transplantation autologer mononukleärer Zellen in infarziertes Schweinemyokard (Projektteil A)

#### 4.2.2 Histologie und Zellverbleib bei Infarkten ohne und mit Reperfusion (Projektteil B):

Es wurden insgesamt 14 Tiere hinsichtlich des Zellverbleibs untersucht.

Bei 5 Tieren erfolgte ein histologischer Nachweis der Zellen im Herzen nach Infarktinduktion mittels Coilembolisation (Projektteil B1). Davon wurden 3 Schweine zur Quantifizierung der Zellen mittels Histologie verwendet. Die verbleibenden 2 Tiere mit Überlebenszeiten von 4 und 8 Wochen nach Zelinjektion wurden für die histologische Darstellung der Zellen genutzt. Zur histologischen Nachweisbarkeit wurden die applizierten Zellen mit kolloidalem Gold oder Hoechst Dye markiert. Diese Untersuchungen erfolgten am nicht reperfundierten Infarktgefäß (Coilembolisation). Der Versuchsablauf erfolgte zeitlich analog zur funktionellen Untersuchung und ist in Abb. 2b dargestellt.

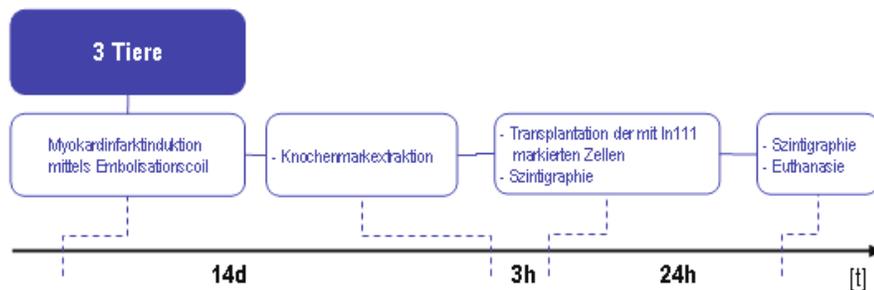


**Abb. 2b:** Versuchsablauf für die Tiergruppe zur histologischen Analyse nach Transplantation autolog markierter mononukleärer Zellen in infarziertes Schweinemyokard (Projektteil B1)

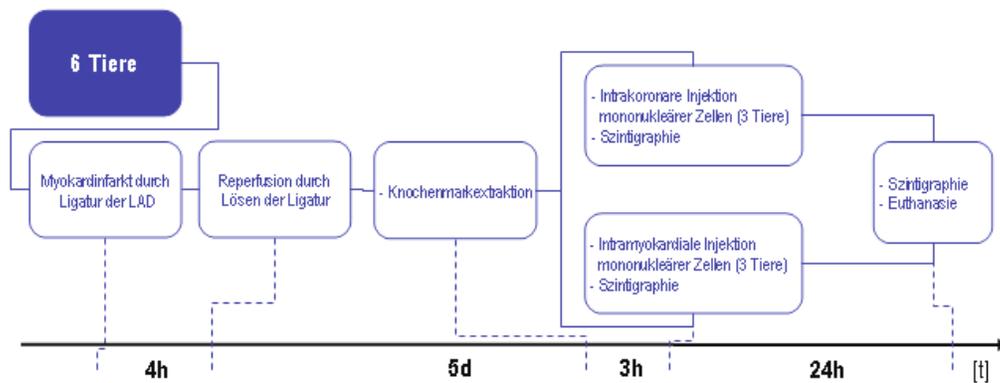
Bei 9 Tieren wurde der Verbleib autologer Indium<sup>111</sup> (In<sup>111</sup>) markierter mononukleärer Zellen nach Transplantation in infarziertes Schweinemyokard in vivo szintigraphisch dargestellt (Projektteil B2).

Bei den Untersuchungen zum Darstellen der applizierten Zellen lassen sich hinsichtlich der Infarktinduktion 2 Gruppen bilden. Bei 3 Tieren erfolgte die permanente Infarktinduktion mittels Coil Embolisation analog zur funktionellen Untersuchung, hier wurden die Zellen intramyokardial injiziert (Projektteil B2<sub>Coil</sub>) (Abb. 3).

In der zweiten Gruppe wurde der Infarkt durch eine 4 stündige Ligatur der LAD ausgelöst (Projektteil B2<sub>Ligatur</sub>). Der Zeitpunkt der Zelinjektion wurde in Anlehnung an die klinischen Studien (Strauer et al., 2002; Wollert et al., 2004; Janssens et al., 2006) auf 5 Tage nach Infarkt verkürzt. In diesem Teil wurden 3 Tieren die Zellen intramyokardial verabreicht und bei 3 Tieren erfolgte die Applikation intracoronar mittels Ballonkatheter. Der genaue zeitliche Ablauf der 9 szintigraphisch untersuchten Tiere ist Abb. 3 (Projektteil B2<sub>Coil</sub>) und Abb. 4 (Projektteil B2<sub>Ligatur</sub>) zu entnehmen.



**Abbildung 3:** Versuchsablauf für den Projektteil B2<sub>Coil</sub> zur szintigraphischen Darstellung des Verbleibs autologer In<sup>111</sup> markierter mononukleärer Zellen nach intramyokardialer Transplantation in durch permanente Coilokklusion infarziertes Schweinemyokard (3 Tiere)



**Abbildung 4:** Versuchsablauf für den Projektteil B2<sub>Ligatur</sub> zur szintigraphische Darstellung des Verbleibs autologer In<sup>111</sup> markierter mononukleärer Zellen nach intrakoronarer oder intramyokardialer Transplantation in durch reversible Ligatur der LAD infarziertes Schweinemyokard (6 Tiere)

#### 4.2.3 Gruppierung der Tiere

Je nach Fragestellung waren folgende Tiergruppen vorgesehen

**Projektteil A** Funktionelle Untersuchungen zur Auswirkung der MNC auf die LV Funktion

Bei 15 Tieren erfolgte eine Untersuchung der Herzfunktion nach Zelltransplantation.

Davon erhielten 9 Tiere Zellen gespritzt (Ctx Gruppe), 6 Tiere bekamen stattdessen zellfreies Medium injiziert (Kontrollgruppe, Placebo).

**Projektteil B** Histologie und Zellverbleib bei Infarkten ohne und mit Reperfusion

Projektteil B1 *Histologische Untersuchung*

5 coilembolisierte Tiere wurden mit Gold sowie Hoechst Dye markierten Zellen versehen und entweder zur histologischen Quantifizierung oder zur histologischen Darstellung der Zellen verwendet.

Projektteil B2 *Untersuchung zum Zellverbleib*

9 Tiere wurden in die Gruppe zur szintigraphischen Untersuchung des Zellverbleibs eingeschlossen. In die Gruppe mit permanenter Okklusion wurden 3 Tiere (Projektteil B2<sub>Coil</sub>), in die Gruppe mit reversibler Okklusion 6 Tiere eingeschlossen (Projektteil B2<sub>Ligatur</sub>).

#### 4.3 Anästhesie

Die Tiere wurden durch intramuskuläre Gabe der Kombination aus Ketamin (Ketanest<sup>®</sup> 25mg/ml, Pfizer) in einer Dosierung von 5mg/kg Körpergewicht und Azaperon (Stresnil, Janssen Animal Health, Neuss) 0,05 ml/kg Körpergewicht, prämediziert. Etwa 20 Minuten nach intramuskulärer Injektion wurde eine Venenverweilkanüle (Vasofix<sup>®</sup>, 22G, B. BRAUN Melsungen AG) in die Vena auricularis gelegt. Für die Narkoseeinleitung wurde über diese Propofol (Propofol-

Lipuro Ampullen, 1%, 10mg/ml, B. BRAUN Melsungen AG), in der Dosierung von 1-2 mg/kg Körpergewicht, appliziert. Die Tiefe der Narkose wurde mittels Lidreflex überprüft. Im Anschluss daran wurde das Tier mit einem Tubus (Trachealtubus, „Safety Clear“ 7mm, Kernen) intubiert und mit einer Kombination aus Sauerstoff und Raumluft gleichmäßig beatmet.

Die Narkoseaufrechterhaltung erfolgte durch Ketamin 15mg/kg Körpergewicht/ Stunde. Während der kompletten Narkosezeit wurden die Sauerstoffsättigung und der Kohlendioxidanteil im Blut mittels eines Atemgasmonitors ständig überwacht. Es wurde darauf geachtet, dass in der Ausatemluft der pO<sub>2</sub> stets zwischen 85 und 100 mmHg und der pCO<sub>2</sub> zwischen 35 und 40 mmHg lag. Die Sauerstoffsättigung des Blutes wurde mittels Pulsoxymetrie transluminal gemonitort. Die Platzierung des Sensors erfolgte im medialen Mundwinkel, es wurde darauf geachtet, dass die Sättigung stets oberhalb von 95% lag. Zur Schmerzausschaltung wurde den Tieren vor Beginn des Eingriffs 0,05 mg/kg KGW Buprenorphin (Temgesic<sup>®</sup>, Essex Pharma GmbH) verabreicht.

Nach Beenden des jeweiligen Eingriffes wurde die Narkose reduziert und die Tiere von der Beatmung entwöhnt und extubiert

#### **4.4 Infarktinduktion**

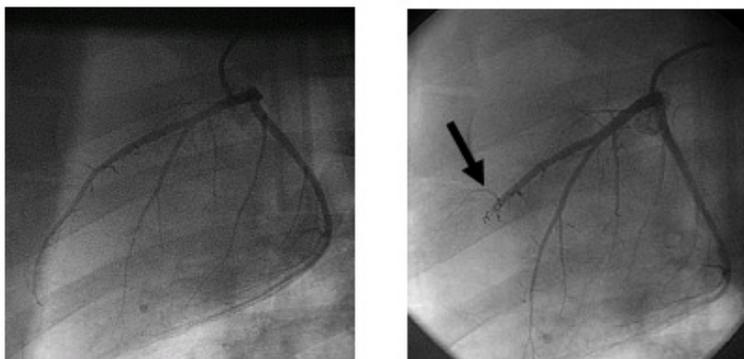
Es wurden 2 Infarktmodelle verwendet. Bei den Tieren mit permanenter Okklusion erfolgte die Embolisierung der LAD mittels eines Coils, in der Tiergruppe mit reversibler Okklusion wurde der Infarkt mittels Ligation der LAD induziert. Die Zeitpunkte und Zeiträume der Ischämie und Reperfusion, sowie der Zellinjektion (5 Tage nach Infarkt) wurden an die derzeitige klinische Realität der Reperfusion eines Infarktes nach 4 Stunden und an die derzeit in der Klinik durchgeführten klinischen Studien angepasst.

##### *4.4.1 Irreversible Gefäßokklusion durch Coil Embolisation*

Die Infarktinduktion erfolgte im Herzkatheterlabor der Klinik III für Innere Medizin am monoplanen Herzkathetermessplatz der Firma Philips. Das Tier wurde in Rückenlage fixiert und die Leiste mittels einer alkoholischen Lösung desinfiziert. Nach einem Hautschnitt im Bereich des linken Leistenspaltes wurde durch stumpfe Präparation

die A. femoralis freigelegt. Die Arterie wurde proximal und distal der vorgesehenen Schleusenapplikationsstelle mittels eines Mersilene Bändchens (Mersilene grün gefl., Ethicon, Johnson&Johnson) angeschlungen und die Blutversorgung mit Hilfe eines etwa 4 cm langen Stückes eines Infusionsschlauches unterbrochen. Hierfür wurden die beiden Enden des Mersilene Bändchens durch den Infusionsschlauch geführt und mittels einer Arterienklemme fixiert. Die Positionierung einer 7F Schleuse (Cordis Corporation, Miami, FL, USA) erfolgte mittels Seldinger Technik. Vor Applikation des Coils erfolgte eine linksventrikuläre Angiographie (siehe 4.11) sowie die Positionierung eines Castillo Katheters (Castillo I (CAS I) 6 F, Cordis, Miami) in der LAD. Durch Kontrastmittel (Accupaque 300, 300mg/ml, Schering AG) wurde die linke und rechte Koronararterie dargestellt. Die Aufnahmen erfolgten in latero-lateraler Projektion bei 0 Grad Neigung der Bildröhre.

Nach Darstellung der Herzkranzarterien wurde die Platzierung des Leggiero Katheter (Leggiero, 135 cm Fr. 2,7, Terumo Corporation, Tokyo) in der LAD mittels Koronardraht unterstützt. Nach Entfernen des Koronardrahtes wurde der Tornado Embolisationscoil mittels eines „Pusherdrahtes“ (Coil Pusher Microcoils CP-18-180, Firma Cook, Bjaeverskov DK) im Leggiero Katheter vorgeschoben. Die Applikation des Microcoils (Tornado Embolisations Microcoil, soft Platinum A= .018” b, Cook, Bjaeverskov DK) erfolgte unter Durchleuchtung im distalen Drittel der LAD nach Abgang des RD2. Der Applikationsort wurde anhand der vorher aufgenommenen Bilder so gewählt, dass eine ausreichende Einschränkung der Perfusion erreicht wurde. Die Vollständigkeit der Okklusion und der Perfusionsstopp wurden nach 5 Minuten mittels einer erneuten Koronarangiographie bestätigt (Abb.5).



**Abbildung 5:** Koronarangiographie vor (A) und nach (B) Coil- Okklusion der distalen LAD beim Schwein.

#### *4.4.2 Reversible Gefäßokklusion durch Ligatur*

Für die Infarktinduktion mittels einer reversiblen Ligatur der LAD war, im Gegensatz zum minimalinvasiven Eingriff der intraarteriellen Infarktinduktion, die Eröffnung des Thorax notwendig. Nach rechts parasternaler Thorakotomie (siehe 4.10) erfolgte die Infarktinduktion durch temporäre Ligatur nach Umschlingung der LAD im distalen Drittel. Für die spätere Öffnung der Ligatur wurde der Ligaturfaden in einem Schlauch vor Verschluss des Thorax nach außen herausgeführt, so dass das Lösen der Ligatur zu einem späteren Zeitpunkt ohne Wiedereröffnen des Thorax möglich war. Die Ligatur wurde über 4 Stunden aufrechterhalten. Die Reperfusion der LAD erfolgte nach 4 Std. im Herzkatheterlabor der Klinik III für Innere Medizin durch Lösen der Ligatur unter angiographischer Kontrolle. Dazu wurde wie oben beschrieben eine Koronarangiographie durchgeführt.

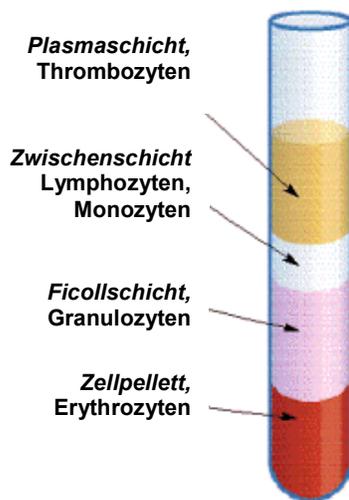
#### **4.5 Knochenmarkgewinnung**

Zur Gewinnung autologer Zellen wurde 2 Wochen beziehungsweise 5 Tage nach Infarktinduktion eine Punktion des Trochanter Major des Femurs vorgenommen. Die Entnahme erfolgte mittels einer Knochenmarkstanze am narkotisierten Schwein. Die Entnahmestelle wurde mittels 4 ml Lidocain (Lidocain 1,0% B. BRAUN Melsungen AG) durch Umstechung der Stanzstelle lokal anästhesiert. Nach Durchdringung der Corticalis wurden 40 ml Knochenmark aspiriert. Die Gerinnung des Punktates wurde durch 1,5 ml Heparin-Natrium (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm) verhindert.

#### **4.6 Isolation mononukleärer Zellen**

Durch Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) erfolgte die Isolation der mononukleären Zellen (MNC). Hierfür wurde das heparinisierte Knochenmarkpunktat mit PBS (6.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM KCl, 140 mM NaCl, pH 7.2) in einem Verhältnis von eins zu eins verdünnt. Das Gemisch wurde durch einen sterilen 70 µm Nylonfilter in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Renner 38008) gegeben. Ein Teil Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll, Fa. PAA) wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen gegeben. Das verdünnte und gefilterte Knochenmark wurde langsam und am Rand entlang auf das Lymphozyten-Separationsmedium gegeben. Im Anschluss daran wurde das Zentrifugenröhrchen unter Vermeidung jeglicher

Erschütterung in die Zentrifuge gestellt und bei 800 x g, 30 min zentrifugiert. Man ließ die Zentrifuge auslaufen ohne zu bremsen. Die entstandene Schichtung der Dichtegradientenzentrifugation ist in Abbildung 6 dargestellt. Nach Dichtegradientenzentrifugation wurde nur die Zwischenschicht in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Diese Zwischenschicht enthält die benötigten mononukleären Zellen. Dieses wurde auf 30 ml mit PBS aufgefüllt und bei 800 x g erneut 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde dann in 10 ml PBS resuspendiert.



**Abbildung 6:** Schichtung von heparinisierendem Vollblut nach Dichtegradientenzentrifugation

## 4.7 Markierung mononukleärer Zellen

Sowohl für den den histologischen Nachweis als auch den szintigraphischen Nachweis wurden markierte Zellen benötigt. Bei einem Viertel der für den histologischen Nachweis vorgesehenen Zellen erfolgte die Markierung mittels des fluoreszierenden Kernfarbstoff Hoechst Dye. Ein weiteres Viertel wurde mit kolloidalem Gold markiert, die verbleibenden 50% blieben unmarkiert. Für den szintigraphischen Nachweis (9 Tiere) wurden alle applizierten Zellen radioaktiv mit  $^{111}\text{In}$  markiert. Für die funktionelle Analyse wurden unmarkierte Zellen verwendet.

### 4.7.1 Hoechst Dye Markierung

Für die Hoechst Dye Markierung wurde pro ml Zellsuspension 1  $\mu\text{l}$  Hoechst Dye hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 10-15 min im Brutschrank bei 37° C

erfolgte die Zentrifugation bei 800 x g für 5 min. Das Zellpellet wurde daraufhin in PBS resuspendiert und abzentrifugiert, nach Wiederholung dieses Vorgangs resuspendierte man das Zellpellet in 2 ml PBS.

#### *4.7.2 Goldmarkierung*

Die für die Goldmarkierung vorgesehene Zellsuspension wurde in eine mit 10 ml Medium (DMEM Zellkulturmedium, PAA E15-080) gefüllte Zellkulturschale (10 cm Ø Renner 38019) gegeben. Dem Zellkulturmedium wurden 10% FCS (Fetales Kälberserum, PAA A15-080) und 1% Penicillin-Streptomycin (PAA P11-010) beigefügt. In die Zellkulturschale wurden weiterhin 250 µl kolloidales Gold (SIGMA G 1402) dazugegeben. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank (37°C) inkubiert. Am folgenden Tag wurde der nicht-adhärenente Anteil der Zellen gemeinsam mit dem Zellkulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. Der adhärenente Teil wurde mit PBS abgespült. Das Ablösen der Zellen von der Zellkulturschale erfolgte mit 3ml Trypsin/EDTA (PAA L11-002). Gemeinsam mit 10 ml Medium wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und erneut abzentrifugiert. Der nicht-adhärenente und der adhärenente Teil wurden zusammengebracht und mit PBS resuspendiert, nochmals zentrifugiert und in 2 ml PBS resuspendiert. Demnach enthielt die entstandene Zellsuspension sowohl die hämatopoetischen als auch die mesenchymalen Zellfraktionen.

#### *4.7.3 Radioaktive Markierung mit <sup>111</sup>Indium*

Die Markierung und die spätere Szintigraphie wurden in Kooperation mit der Klinik für Nuklearmedizin durchgeführt. Für den Umgang mit radioaktivem Material wurde eine Genehmigung eingeholt. Die Genehmigung zum Umgang mit radioaktiven Stoffen für dieses Projekt erfolgte durch die Bezirksregierung Köln am 15.09.04, Az.: 55.8331.1-U 22/04-H. <sup>111</sup>Indium wurde für die szintigraphische Verfolgung der Zellen verwendet. Es wurden 70µl <sup>111</sup>In mit 100µl Tropolon gemischt und in einen ml Zellsuspension überführt. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension mit 5 ml 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt und bei 800 x g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach erneutem Waschen mit Kochsalzlösung wurden die Zellen in einem ml resuspendiert.

#### *4.7.4 Vitalitätskontrolle der zu applizierenden Zellen*

Vor Applikation der Zellen ins Schweinemyokard wurde für jede der Resuspensionen eine Vitalitätskontrolle mit Trypan Blau durchgeführt. Hierbei wurden aus der jeweiligen Resuspension 10 µl entnommen und mit 90 µl PBS verdünnt. 40 µl der Zellverdünnung wurden in ein Reagiergefäß gegeben und 10 µl Trypan Blau dazugemischt. Nach 3 Minuten erfolgte die Zählung der nicht blau gefärbten Zellen. Gemäss dem Versuchsansatz sollten für die funktionellen Untersuchungen insgesamt  $4 \times 10^7$  Zellen in das Infarktgebiet appliziert werden. Um diese Zellzahl zu erreichen wurde aus jeder der Resuspensionen die benötigte ml Menge entnommen. Um die zu injizierende Volumenmenge immer gleich zu halten wurde das Zellgemisch erneut abzentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 2 ml resuspendiert. Diese Suspension wurde zur Injektion in 4 Insulinspritzen à 0,5 ml aufgezogen.

Für den szintigraphischen Nachweis wurden die vitalen Zellen mittels der in Absatz 4.7.4. beschriebenen Vitalitätskontrolle mit Trypan Blau gezählt und jeweils eine Zellzahl von  $10^8$  radioaktiv markierten Zellen appliziert. Für die intramyokardiale Verabreichung erfolgte auch die Aufteilung der Zellsuspension auf 4 Insulinspritzen, für die intrakoronare Verabreichung wurde das Gesamtvolumen auf 20 ml mit PBS aufgefüllt.

#### **4.8 Wachstumskontrollen der injizierten mononukleären Zellen**

Zur Darstellung des Wachstums wurde ein Anteil mit  $1 \times 10^5$  Zellen jeder Fraktion der für die funktionellen Untersuchungen vorgesehenen Zellen gemeinsam mit 2 ml Medium in eine Zellkulturschale überführt. Alle 3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 14 Tagen wurde die Ausbreitung des Zellrasens grob quantitativ beurteilt. Das Überleben der Zellen wurde als positiv beurteilt wenn ein durchgehender Zellrasen entstanden war.

#### **4.9 In vitro Teststudien der $^{111}\text{Indium}$ markierten Zellen**

Für die Messung der Überlebenszeit der mit  $^{111}\text{Indium}$  markierten Zellen wurde folgender Ansatz gewählt. Es wurden 4 mal 20 µl des mit  $^{111}\text{Indium}$  markierten Zellgemisches ausplattiert und das Zellwachstum nach 6, 24, 48 und 144 Stunden mit PFA (Paraformaldehyd) 4%ig abgestoppt. Die zum jeweiligen Zeitpunkt noch

vorhandene Zellzahl, die Anzahl der noch vitalen Zellen und die Apoptoserate wurden mittels PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) Färbung beurteilt.

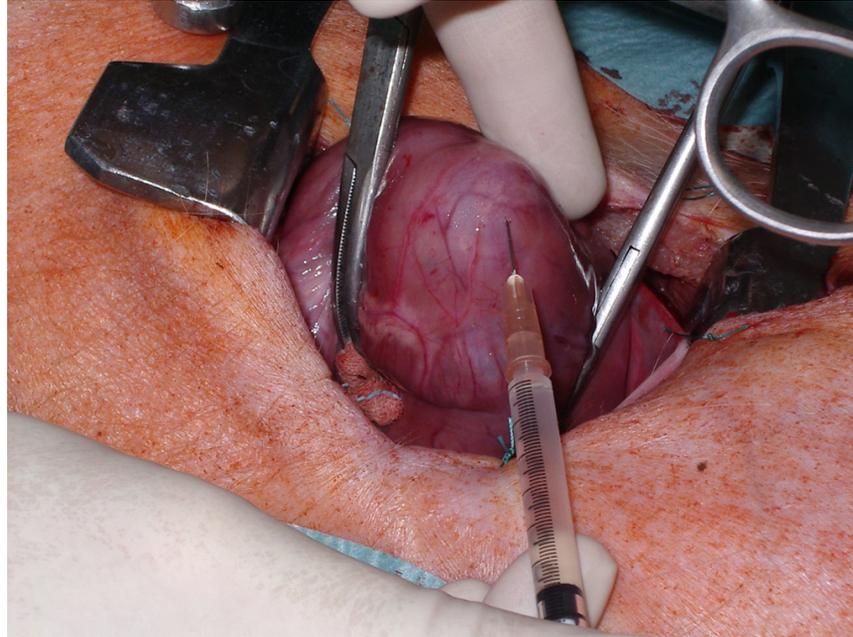
#### **4.10 Zellinjektion**

Bei der Tiergruppe mit permanenter Okklusion mittels Coilembolisation wurden bei allen Tieren die Zellen mittels intramyokardialer Injektion appliziert. Bei der Tiergruppe mit reversibler Okklusion durch Ligatur wurden die Zellen bei 3 Tieren intrakoronar und bei 3 Tieren intramyokardial verabreicht.

##### *4.10.1 Intramyokardiale Zellinjektion*

Bei der intramyokardialen Zellinjektion erfolgte die Applikation der Zellsuspension parasternal durch eine Mini- Thorakotomie. Dafür wurde nach Fixation des wie in Absatz 4.3. beschriebenen anaesthetisierten Tier die linke Thoraxwand rasiert, mit einer alkoholischen Lösung desinfiziert und mit einem Elektrokauter ein 15-20 cm langer Hautschnitt gesetzt. Nach Durchtrennung der oberflächlichen und tiefen Pektoralismuskulatur wurde die Brusthöhle eröffnet. Die Rippen wurden mit einem Wundspreizer gespreizt und das Perikard mittels einer kleinen Schere eröffnet.

Nach vorsichtigem Lösen eventuell bestehender Verklebungen wurde die Infarkt Narbe in der Apexregion dargestellt. Die Injektion der vorbereiteten Knochenmarkzellen (siehe 4.7.4) oder Medium (Kontrollgruppe), erfolgte von epikardial durch direkte Nadelinjektion (Nadelstärke 27G). Die Applikation der Medium oder Zellsuspension erfolgte unter Sicht mit 20 Injektionen á 100 µl in das Periinfarktareal und in die Infarktregion (Abb. 7). Demnach wurden insgesamt 2 ml Zellsuspension, aufgeteilt auf 4 Spritzen, injiziert.



**Abbildung 7:** Applikation der mononukleären Zellen in das (Peri-) Infarktgewebe

Um für die spätere Probenentnahme das Wiederfinden des Applikationsareals zu erleichtern, wurde bei den zur histologischen Untersuchung vorgesehenen Schweinen vor Zellapplikation zusätzlich Prolene Fäden in das Myokard geknotet. Der infarzierte Bereich wurde als kreisförmig angenommen und gemäss der Ziffernabfolge einer Uhr in Segmente eingeteilt. Die Position des Coils wurde als 12 Uhr, die maximale Ausdehnung des Infarktgebietes in apikaler Richtung als 6 Uhr definiert. An diesen beiden Punkten wurden die erwähnten Prolene Fäden eingeknotet. In der Randzone dieses vorgestellten Ziffernblattes sowie ins Zentrum erfolgte die Injektion der Lösungen.

Nach Injektion der Lösungen wurde das Herz wieder repositioniert. Ein eventuell auftretendes Kammerflimmern wurde per Defibrillation behoben. Vor Verschluss des Thorax wurde 2 Intercostalräume caudal des ersten Schnittes ein weiterer etwa 2 cm langer Zugang zur Brusthöhle hergestellt. Hierüber wurde eine Thoraxdrainage (BBD Aesculap GmbH) in die Brusthöhle eingeführt. Zum Verschluss der Öffnung wurde eine Tabaksbeutelnaht vorbereitet. Nach Entfernen des Thoraxspreizers wurden die Rippen mit einer Drahtzerklage repositioniert, die Pektoralismuskulatur repositioniert und fixiert. Abschließend wurde mit einer Hautnaht die Wunde verschlossen. Über die liegende Thoraxdrainage wurde die verbliebene Luft im Thorax abgesaugt. Die Lunge wurde über einen manuellen Beatmungsbeutel (Ambu) 3mal gebläht, zum

Zeitpunkt der maximalen Blähung wurde die Thoraxdrainage ruckartig entfernt und die vorbereitete Tabaksbeutelnaht verschlossen. Bei Eintreten des Schluckreflexes wurde das Tier extubiert. Zur Schmerzsuppression wurde den Tieren 4 mg/kg Körpergewicht Carprofen (Rimadyl 20 ml Injektionslösung, 50mg/ml, Pfizer) intramuskulär verabreicht. Um eine Wundinfektion zu verhindern wurden prophylaktisch 5 mg/kg Körpergewicht Enrofloxacin (Baytril 5%, 50 mg/ml, Bayer HealthCare, Leverkusen) intramuskulär appliziert. Diese antibiotische Therapie wurde 6 weitere Tage fortgeführt. Die Wunde wurde mit sterilen Tupfern abgedeckt welche mit Fixomull® fixiert wurden.

#### *4.10.2 Intrakoronare Zellinjektion*

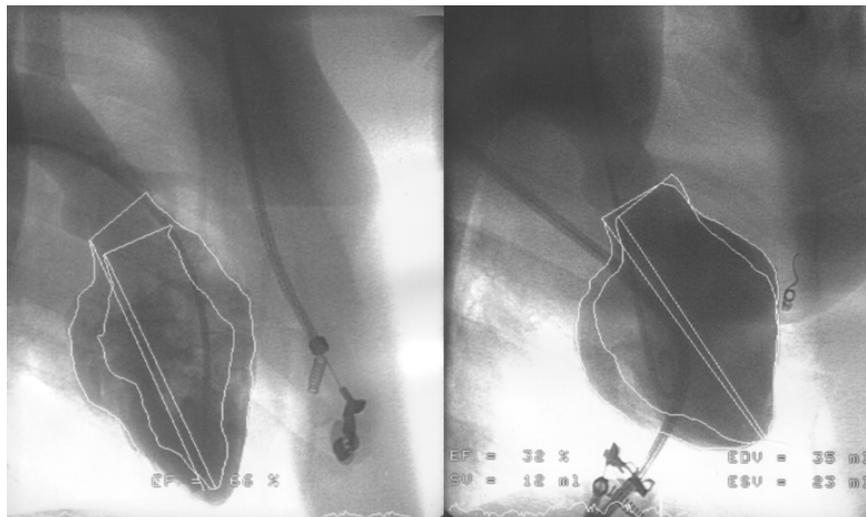
Bei 3 der Tiere mit Koronarligatur wurden am 5. Tag nach Infarktinduktion die Zellen intrakoronar appliziert. Die durch den oben beschriebenen (s. 4.7.3) Vorgang gewonnene Zellsuspension wurde zunächst in 20 ml PBS Lösung suspendiert. Die Positionierung des für die Zellapplikation notwendigen Ballon-Koronarkatheters erfolgte im Herzkatheterlabor der Medizinischen Klinik III für Innere Medizin durch die in Kapitel 4.4.1 beschriebene Technik. Die Applikation der Zellen wurde in der Klinik für Nuklearmedizin in Schritten von 5 ml Portionen durchgeführt. Jeweils 5 ml wurden über den liegenden Ballon-Koronarkatheter (Concerto, 2.5 × 20 mm, Occam Int. BV, Eindhoven, The Netherlands) langsam über ca. 1 Minute injiziert. Um die Druckverhältnisse und die Flussgeschwindigkeit bei der Injektion der markierten Zellen kontrollieren zu können, wurde der Ballon während der Injektion für 3 Minuten insouffliert und das Infarktgefäß kurzzeitig geblockt. Danach folgte eine 3-minütige Reperfusionzeit, bevor die nächsten 5 ml injiziert wurden. Diese Prozedur erfolgte in Anlehnung an die bisher durchgeführten großen klinischen Studien (Strauer et al., 2002; Wollert et al., 2004; Janssens et al., 2006).

#### **4.11 Funktionelle Analyse der Knochenmarkzelltherapie**

Die Pumpfunktion des Herzens wurde mittels einer linksventrikulären Angiographie in zwei Ebenen ermittelt. Die Aufnahmen erfolgten in einer linksanterioren 30 Grad Projektion (LAO) und in einer rechtsanterioren 60 Grad Projektion (RAO). LV-Angiographien zur Beurteilung der linksventrikulären Funktion wurden vor Infarktinduktion, zwei Wochen nach Infarktinduktion (vor Zell- oder Mediuminjektion) und zwei Wochen nach Zell- oder Mediuminjektion durchgeführt (Abb. 2). Ein 6

French Pigtailkatheter (Pigtail (Pig) 6 F, 110 cm, Cordis, Miami Lakes, FL, USA) wurde über einen 0,035-inch Führungsdraht (Galeo Hydro 0,0135inch Durchmesser Guide Wire F, Biotronic, Berlin) in die Aorta ascendens und in den linken Ventrikel vorgeschoben. Zur Darstellung des linken Ventrikels wurde jodhaltiges Kontrastmittel (Accupaque 300, 300mg/ml, Schering AG) über den Katheter injiziert. Dies erfolgte durch Anschluss des Katheters an die Kontrastmittelpumpe. Das Kontrastmittel wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml/s in einer Gesamtmenge von 20 ml injiziert. Dies erfolgte unter Kontrolle durch Durchleuchtung. Mittels der entstandenen Bilder wurden die Parameter linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV), linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LVESV) ermittelt. Aus der Differenz (LVEDV - LVESV) wurde das Schlagvolumen (LVSV) berechnet. Das Schlagvolumen wurde auf das LVEDV zur Ermittlung der Ejektionsfraktion (EF) bezogen;  $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100$ .

Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten, wurden die Parameter LVEDV, LVESV und LVSV auf das Körpergewicht (KGW) des Schweines bezogen. In der Humanmedizin würde man diese Werte normalerweise auf die Körperoberfläche beziehen, da für Schweine im Wachstum keine Normogramme vorliegen wurden die oben beschriebenen Parameter lediglich auf das Körpergewicht bezogen. Demnach erhielt man eine Einheit von ml/kg. Zusätzlich zur klassischen LV-Angiographie wurde eine Analyse der regionalen Wandbewegung durchgeführt. Hierzu wurde die Centerline- Methode nach Sheehan eingesetzt (Einteilung des LV- Umfanges in 100 Teilsegmente, Sheehan, et al., 1986)



**Abbildung 8:** Messung der linksventrikulären Ejektionsfraktion Links: vor Infarkt; Rechts: nach Infarkt

#### **4.12 Messung des intraarteriellen Druckes**

Nach Positionierung des Katheters im linken Ventrikel wurde dieser mittels einer Hochdruckleitung (Hochdruckleitung 75 cm, 1200 psi, Smiths, Kirchseeon) an den Druckmonitor des Herzkathetermessplatzes angeschlossen, um den linksventrikulären Druck zu messen. Um den Aortendruck zu erfassen, wurde während des Rückzuges des Pigtail Katheters ebenfalls gemessen. Aus den Kurven wurde der enddiastolische Ventrikeldruck extrahiert, sowie über die erste Ableitung der Maximalwert der Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{max}$ ) ermittelt.

#### **4.13 $^{18}\text{F}$ -FDG-PET Analyse zur kardialen Vitalitätsdiagnostik**

Bei 6 Tieren (3 Kontrolltiere, 3 Ctx Tiere) wurden zusätzlich zur Lävokardiographie jeweils zwei Positronen-Emissions-Tomographien zur kardialen Vitalitätsdiagnostik durchgeführt. Diese erfolgte das erste Mal zwei Wochen nach Infarktinduktion (vor Zell- oder Mediuminjektion) und das zweite Mal zwei Wochen nach Zell- oder Mediuminjektion.

Die Positronen-Emissions-Tomographie unter Verwendung von  $^{18}\text{F}$ Fluor-2-deoxy-2-D-Glukose welches vom Herzmuskelgewebe aufgenommen wird, stellt das Referenzverfahren zur kardialen Vitalitätsdiagnostik dar (Stephen et al. 2003, Heinrich et al. 2003)

Die  $^{18}\text{F}$ FDG-PET Untersuchungen wurde mit einem Ganzkörper-Scanner durchgeführt (Siemens CTI ECAT EXACT 921, Erlangen; Germany). Um die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme zu verbessern, erhielt jedes Tier 1 Stunde vor der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Verabreichung 40 g Glukose per Dauertropfinfusion. Vor der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Injektion wurden die Blutglukosekonzentrationen gemessen, bei einem Glukosespiegel größer 120 mg/dl wurden 0,5 I.E. Altinsulin (Actrapid, Novo Nordisk) pro 10 mg erhöhte Glucose gespritzt. 60 Minuten nach Injektion von 370 MBq  $^{18}\text{F}$ -FDG-Injektion begann die Datenaquisition, bestehen aus Emissions- und Transmissionsmessungen (Dauer 45 min). Die Datenakquisition und –rekonstruktion erfolgte mit ECAT7.2-Software unter Berücksichtigung einer Zerfalls- und Totzeitkorrektur sowie Korrekturen für Streuungen und zufällige Koinzidenzen. Aus den Daten wurden übliche kardiale Schnittbilder (Kurzachsen- und vertikale und horizontale Langachsenschnitte) generiert und ein Polartomogramm rekonstruiert. Ausdehnung und Ausmaß der

kardialen Vitalität distal des ligierten Koronargefäßes wurden beurteilt und in Beziehung zur kardialen Vitalität des übrigen LV-Myokards gesetzt. Avitales Myokard wurde eine  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aktivitätsaufnahme von  $< 50\%$  im Vergleich zum gesunden Referenzsegment mit maximaler  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme gesetzt.

#### **4.14 Szintigraphische Verfolgung $^{111}\text{In}$ markierter Knochenmarkzellen**

9 Tiere waren für die szintigraphische Verfolgung In-111-markierter mononukleärer Knochenmarkzellen vorgesehen. Die szintigraphischen Untersuchungen erfolgten am wie in Absatz 4.3. beschrieben narkotisierten Tier. Bei diesen Tieren wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Den Tieren mit permanenter Okklusion wurden 2 Wochen nach Induktion des MI nach der oben beschriebenen Methode  $^{111}\text{Indium}$  markierte Zellen appliziert. Die szintigraphische Untersuchung wurde an einer 2-Kopf-Kamera (Picker Prism 2000, Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) durchgeführt.

Bei den Tieren mit LAD-Ligatur und Reperfusion wurden die mononukleären Knochenmarkzellen 5 Tage nach Infarktinduktion gewonnen, markiert und in die infarzierten Herzen injiziert. Die Reperfusion des Infarktgefäßes wurde koronarangiographisch unmittelbar nach Lösen der Ligatur nachgewiesen. Bei Vorhandensein eines TIMI III-Flusses wurden die Tiere in die Analyse mit einbezogen. 3 Tiere bekamen die Zellen intramyokardial appliziert und bei 3 Tieren wurden die Zellen ohne Eröffnung des Thorax über einen Ballonkatheter intrakoronar injiziert (Abb. 4). Es kam ein dynamisches Aufnahmeprotokoll zur Anwendung mit seriellen Aufnahmen unmittelbar nach der in 4.10.1 beschriebenen Zellinjektion bis 2 Stunden nach Zellinjektion unter Einschluss von Ganzkörper- und SPECT-Aufnahmen. Weitere Ganzkörperszintigramme und SPECT-Aufnahmen erfolgten 24 h nach Zellinjektion.

#### **4.15 Euthanasie der Tiere**

Für die Euthanasie der für die histologische Analyse verwendeten Tiere wurde das wie in Absatz 4.3. beschrieben tief narkotisierte Tier in Rückenlage fixiert. Mit einem Messer erfolgte die Trennung der sternalen Muskulatur. Mit Hilfe eines Thorakotomiebesteckes wurde das Sternum durchtrennt, ohne den Herzbeutel zu

verletzen. Durch einen Thoraxspreizer wurde die Sicht auf das schlagende Herz hergestellt, nun wurden manuell die Verklebungen und der Herzbeutel weitestgehend vom Epikard getrennt. Der rechte Vorhof wurde eröffnet und das Schwein durch Ausbluten getötet. Im Anschluss daran wurde das Herz komplett entnommen.

Zur Darstellung noch vorhandener Zellen 4 und 8 Wochen nach Zellapplikation erfolgte bei einem Tier die Euthanasie erst 4 Wochen nach Zellapplikation, bei einem Weiteren war dies erst nach 8 Wochen der Fall. Beide Tiere hatten bei Zellapplikation Gold und Hoechst Dye markierte Zellen erhalten. Die Zellsuspension setzte sich aus 25% Hoechst Dye, 25% Gold und 50% unmarkierten Zellen zusammen.

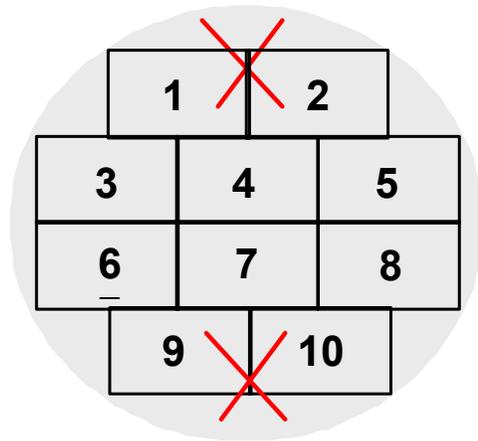
Bei Tieren die für die szintigraphische und funktionelle Untersuchung verwendet wurden, erfolgte die Euthanasie mit Narcoren (Narcoren ad us. vet, Injektionslösung, Veterinaria AG).

Bei Tieren die für die szintigraphische verblieb das tote Tier im Anschluss in einer Gefriertruhe der Nuklearmedizin bis die Radioaktivität auf das gesetzlich zulässige Maß abgeklungen war.

## **4.16 Histologische Aufarbeitung des Schweineherzens**

### *4.16.1 Fixation der Proben*

Direkt nach der Entnahme des Herzens wurde die durch die Prolenefäden markierte Infarktregion mit der Infarkttrandregion gemäß der Abb. 8 in 10 Gewebeblöcke aufgeteilt. Jeder Block wurde über 24h mit 4%igem PFA (Sigma) fixiert. Nach 24 Stunden wurde jede Probe in 3 Schritten mit 0,1 molarem PBS gewaschen, und für weitere 24 Stunden in 0,1 molarem PBS (Cambrex) gespült. Danach wurde die PBS Lösung durch 18%ige Succhrose Lösung (18 g Succrose auf 100 ml 0,1 mol PBS) ersetzt. Circa 20 Stunden nach Immersion in Succhrose Lösung wurde die Probe in Tissue Tec eingebettet und auf -80 Grad Celsius abgekühlt.

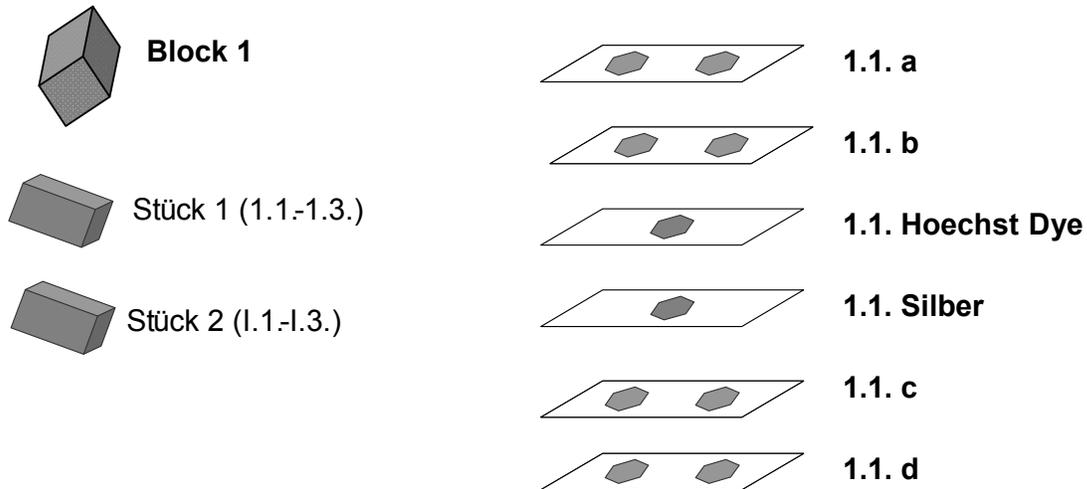


**Abbildung 9:** Aufteilung und Benennung der 10 Blöcke des Infarktareals und der Infarkttrandzone (grauer Kreis) nach Zelltransplantation, die roten Kreuze stellen die applizierten Fäden dar.

#### 4.16.2 Gefrierschnitterstellung

Zur histologischen Analyse wurde jedes der Gewebestücke im Kryostat geschnitten. Die Schnittstärke wurde auf 10 µm eingestellt. Die Temperatur des Gefrierbereiches im Kryostat betrug -27 Grad Celsius. Die Gefrierschnitte wurden auf beschichtete Objektträger (Polysine, Menzelgläser, Art No. J2800AMNZ) aufgebracht. Um die Zellzahl in verschiedenen Gewebesebenen zu erfassen erfolgte die Wahl der Schnitte für die histologische Analyse folgendermaßen:

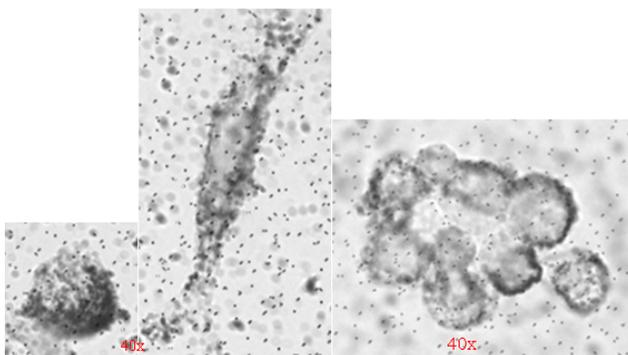
Am Anfang wurde jeder Block in der Mitte durchgeteilt. Von jeder Hälfte wurden 10 Schnitte nach dem in Abbildung 10 dargestellten Schema auf die Objektträger aufgebracht. Dieser Vorgang wurde an jedem Block beidseitig 10mal wiederholt. Die Objektträger auf denen nur ein Schnitt aufgezogen wurde (Abb.10), wurden gefärbt (siehe nächstes Kapitel) und eingedeckt und für die Identifikation der Zellen und die Quantifizierung verwendet. Alle mit 2 Schnitten versehenen Objektträger wurden bei -80°C eingelagert.



**Abbildung 10:** Darstellung der Schnitttechnik pro Gewebekblock

#### 4.16.3 Färben der Proben

Alle Färbeschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Der Nachweis der Gold markierten Zellen erfolgte mittels einer Gegenfärbung mit dem Silver Enhancer Kit (Sigma, SE-100, St. Louis, USA). Die Schnitte wurden gleichmäßig mit der Flüssigkeit bedeckt und für 7 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach 2maliger Spülung mit destilliertem Wasser wurde die Färbung mit 2,5%igen wässrigem Thiosulfat für 3 Minuten fixiert. Im Anschluss daran wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt. Das goldmarkierte Cytoplasma war nun lichtmikroskopisch erkennbar (Abb. 11). Die Darstellung der Hoechst Dye markierten Zellen erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Schnitte wurden wässrig eingedeckt.



**Abbildung 11:** Histologische Darstellung der mit kolloidalem Gold markierten Zellen

#### 4.17 Histologische Analyse der Spenderzellen

Zur histologischen Analyse wurden alle 10 aus dem Infarktareal generierten Blöcke ausgewertet. In vorrausgegangenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen nach Applikation nicht mehr migrieren. Da die Zellen in das Infarktgebiet appliziert wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass die sich im gesunden Myokard befindliche, gegenüber der im Infarktgebiet befindlichen Zellzahl zu vernachlässigen ist. Pro Block wurden 20 Schnitte ausgewählt. Die goldmarkierten Zellen je Gesichtsfeld ( $Z_{\text{Gold}}$ ) wurden ausgezählt und dann auf die Gesamtzellmenge hochgerechnet. Auf jedem Schnitt lagen 100 Gesichtsfelder von denen je 10 ausgezählt wurden. Die Summe der gefundenen Zellen in den 10 Gesichtsfeldern wurde gebildet und mit 10 multipliziert um die Zellzahl pro Schnitt zu erhalten. Aus den 20 Schnitten wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Schnitt gebildet ( $\sum_{\text{Gold}/20}$ ). Da nur ein Viertel der applizierten Zellen mit Gold markiert war, wurde der ermittelte Wert pro Schnitt mal 4 genommen ( $f_{\text{Gold}}=4$ ). Um auf die Zellzahl pro Block zu schließen ergäbe sich bei einer durchschnittlichen Tiefe jeden Blockes von 7000  $\mu\text{m}$  bei unserer Schnittdicke von 10  $\mu\text{m}$  ein Multiplikationsfaktor von 700 ( $f_{\text{Tiefe}}=700$ ). Ausgehend von einem mittleren Durchmesser der mononukleären Zellen von 20  $\mu\text{m}$  wurde vereinfachend angenommen, dass jede Zelle auf 2 nebeneinander liegenden Schnitten nachweisbar wäre. Daher wurde die errechnete Zahl noch mal durch 2 dividiert ( $f_{\text{Zelle/Schnitt}}=0,5$ ), um damit auf die etwaige Zellzahl pro Gewebblock zu schließen.

$$\text{Zellen}_{\text{Block}} = \sum_{\text{Gold}/20} \times f_{\text{Gold}} \times f_{\text{Tiefe}} \times f_{\text{Zelle/Schnitt}}$$

Die so gewonnen Zellzahlen pro Block wurden für alle 10 Blöcke addiert, um so auf die noch vorhandene Zellzahl im Herzen des Tieres zu schließen. Um auf den Prozentsatz der im Herzen verbliebenen Zellen zu schließen, wurde die ermittelte Zellzahl im Herzen auf die applizierten  $4 \times 10^7$  Zellen bezogen.

#### 4.18 Statistische Analyse

Die Meßergebnisse werden anhand von Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM: standard error of the mean) beschrieben und graphisch dargestellt. Die Berechnungen zur Ermittlung von Gruppenunterschieden wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 11.5 der Firma SPSS Inc. durchgeführt. Die quantitativen Untersuchungsergebnisse werden statistisch mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel aus dem Office 2003 Packet der Firma Microsoft durchgeführt. Für die Vergleiche zwischen beiden Gruppen kam der Mann-Whitney-U-Test (ungepaarte Stichproben) bzw. der Wilcoxon T Test (gepaarte Stichproben) zum Einsatz. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ( $p < 0,05$ ) wurde als statistisch signifikant angesehen.

Für die funktionellen Untersuchungen wurden folgende Parameter statistisch verglichen kg, LVESV, LVEDV, SV, EF, LVEDP,  $dp/dt_{max}$ . Da alle Tiere bis zur Kontrolle vor Medium/Zellinjektion völlig identisch behandelt wurden, sind sie für die Beurteilung des Infarktes für diese 2 Termine zusammengefasst worden. LVESV, LVEDV und das SV wurden auf das jeweilige Körpergewicht bezogen. Für die Beurteilung der Infarktinduktion wurden die Gruppenunterschiede von vor Infarkt zu nach Infarkt mit Hilfe des Wilcoxon test (gepaarte Stichproben) getestet. Für die Beurteilung des Verlaufs nach Medium/Zelltransplantation trennen sich die Gruppen in die Mediumgruppe (6 Tiere) und die Zellgruppe (9 Tiere). Für die Beurteilung der funktionellen Auswirkung der Zellen, sind grundsätzlich 2 Differenzen statistisch bewertet worden, einmal der Unterschied von vor Infarkt zu nach Infarkt, sowie der Unterschied von nach Infarkt zu nach Medium/Ctx Injektion. Der Gruppenunterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Ctx-Gruppe wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test (ungepaarte Stichproben) ermittelt.

Bei den Tieren, die zur funktionellen Erprobung des Infarktmodells sowie der histologischen Untersuchung verwendet wurden, wurden keine Gruppenvergleiche durchgeführt. Bei den Untersuchungen zum Zellverbleib erfolgte ein Gruppenvergleich zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten mit Hilfe des Wilcoxon test.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Tierkollektive

Es wurden insgesamt 29 Tiere in die Auswertung mit aufgenommen. Die Darstellung aller Tiere und die Zuordnung zu den verschiedenen Gruppen ist Tabelle 1 zu entnehmen.

	Schwein Nr.	ausgewertete Untersuchungen	injizierte Substanz	Bemerkungen	
Projektteil A	10	Lävokardiographie	unmarkierte MNC		
	11	Lävokardiographie	Medium		
	12	Lävokardiographie	unmarkierte MNC		
	13	Lävokardiographie	Medium		
	14	Lävokardiographie	unmarkierte MNC		
	15	Lävokardiographie	unmarkierte MNC		
	16	Lävokardiographie	Medium		
	18	Lävokardiographie	unmarkierte MNC		
	22	Lävokardiographie	unmarkierte MNC		
	23	Lävokardiographie, FDG-PET	Medium		
	26	Lävokardiographie, FDG-PET	Medium		
	27	Lävokardiographie, FDG-PET	unmarkierte MNC		
Projektteil B1	3	Histologie, Quantifizierung	Gold, HoDye, Nativ		
	6	Histologie, Quantifizierung	Gold, HoDye, Nativ		
	7	Histologie	Gold, HoDye, Nativ	Tier hat 8 Wochen überlebt	
	9	Histologie	Gold, HoDye, Nativ	Tier hat 4 Wochen überlebt	
	33	Histologie, Quantifizierung	Gold, HoDye, Nativ		
	Projektteil B2 (CoB)	24	Szintigraphie	111In markierte MNC	intramyokardiale Applikation
		25	Szintigraphie	111In markierte MNC	intramyokardiale Applikation
		28	Szintigraphie	111In markierte MNC	intramyokardiale Applikation
	Projektteil B2 (Ugatur)	35	Szintigraphie	111In markierte MNC	intrakoronare Applikation
		37	Szintigraphie	111In markierte MNC	intramyokardiale Applikation
39		Szintigraphie	111In markierte MNC	intramyokardiale Applikation	
40		Szintigraphie	111In markierte MNC	intrakoronare Applikation	
42		Szintigraphie	111In markierte MNC	intrakoronare Applikation	
	43	Szintigraphie	111In markierte MNC	intramyokardiale Applikation	

Tabelle 1: Liste der untersuchten Schweine und ihrer Zugehörigkeit

## 5.2 Untersuchungen zur Pumpfunktion

### 5.2.1 Wachstumsparameter zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Die Tiere der Kontrollgruppe (n=6) waren im Durchschnitt  $30,7 \pm 1,4$  kg (vor MI),  $41,4 \pm 1,7$  kg (nach MI),  $49,7 \pm 2,1$  kg (nach Medium Injektion) schwer. Die Tiere der Ctx-Gruppe (n=9) waren im Durchschnitt  $31,6 \pm 0,9$  (vor MI),  $40,8 \pm 1,4$  (nach MI),  $51,1 \pm 0,9$  kg (nach Zellinjektion) schwer. Die durchschnittliche Tageszunahme im 28 Tage Untersuchungszeitraum lag in der Kontrollgruppe bei  $695 \pm 6,2$  g/Tag, in der Ctx-Gruppe lag diese bei  $679 \pm 7,1$  g/Tag. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Gewichte der Tiere zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten sind in Tabelle 2 aufgelistet.

		Gewicht			LVEDV (RAO)			LVESV (RAO)			LVSV (RAO)			LVEF (RAO)		
		kg			ml			ml			ml			%		
Tage nach Infarkt		0	14	28	0,0	14,0	28,0	0,0	14,0	28,0	0,0	14,0	28,0	0,0	14,0	28,0
Ctx-Gruppe	Schwein 10	31	41	47	59,0	55,3	59,8	26,3	26,8	27,8	32,8	28,6	32,0	55,5	51,6	53,6
	Schwein 12	28	32	49	52,0	62,9	65,2	11,3	20,8	15,5	40,7	42,1	49,8	78,3	67,0	76,3
	Schwein 14	34	43	51	58,5	84,1	76,9	12,3	30,1	32,8	46,2	53,9	44,0	79,0	64,2	57,3
	Schwein 15	34	43	52	44,1	102,1	133,6	17,2	44,2	55,8	26,8	57,9	77,8	60,9	56,7	58,2
	Schwein 18	36	46	52	61,9	72,6	68,6	33,5	45,6	33,8	28,4	27,0	34,8	45,9	37,2	50,8
	Schwein 22	31	43	57	50,0	54,8	89,9	16,6	23,1	34,1	33,5	31,8	55,8	66,9	57,9	62,1
	Schwein 27	28	36	51	54,0	54,3	68,5	19,5	30,4	29,6	34,5	23,9	39,0	63,9	44,0	56,9
	Schwein 30	30	42	52	50,6	51,5	95,0	15,1	27,0	50,2	35,5	24,4	44,8	70,2	47,5	47,2
	Schwein 31	32	41	49	44,2	64,3	115,7	16,0	30,4	43,4	28,2	34,0	72,4	63,9	52,8	62,5
	<b>Mittelwert</b>	31,6	40,8	51,1	52,7	66,9	85,9	18,6	30,9	35,9	34,1	36,0	50,0	64,9	53,2	58,3
Kontrollgruppe	Schwein 11	31	41	51	62,7	62,6	67,1	12,7	17,7	24,2	50,0	45,0	43,0	79,8	71,8	64,0
	Schwein 13	34	48	56	58,8	77,8	81,9	16,1	28,2	32,1	42,7	49,6	49,8	72,6	63,7	60,8
	Schwein 16	30	42	50	33,5	58,5	60,7	6,9	13,4	18,5	26,5	45,2	42,3	79,3	77,1	69,6
	Schwein 23	30	41	50	43,4	61,6	68,8	10,3	22,0	27,8	33,1	39,6	41,1	76,3	64,3	59,6
	Schwein 26	25	35	40	38,8	54,2	65,4	8,7	16,4	24,3	30,1	37,9	41,2	77,5	69,8	62,9
	Schwein 32	34	42	51	60,4	70,8	92,7	23,9	37,4	31,0	36,5	33,4	61,7	60,4	47,2	66,6
		<b>Mittelwert</b>	30,7	41,4	49,7	49,6	64,3	72,8	13,1	22,5	26,3	36,5	41,8	46,5	74,3	65,7

		LVEDV (LAO)			LVESV (LAO)			LVSV (LAO)			LVEF (LAO)		
		ml			ml			ml			%		
Tage nach Infarkt		0	14	28	0,0	14,0	28,0	0,0	14,0	28,0	0,0	14,0	28,0
Ctx-Gruppe	Schwein 10	75,3	80,6	98,9	34,0	41,2	47,3	41,3	39,4	51,6	54,9	48,9	52,2
	Schwein 12	52,9	62,4	82,8	13,6	19,4	32,3	39,3	43,0	50,5	74,2	68,9	61,0
	Schwein 14	47,8	68,3	87,9	10,9	25,4	47,5	36,9	42,9	40,5	77,3	62,9	46,0
	Schwein 15	34,2	61,8	90,9	14,3	36,6	37,6	19,9	25,3	53,3	58,1	40,9	58,6
	Schwein 18	88,8	63,5	102,6	48,6	40,1	55,2	40,2	23,4	47,3	45,3	36,8	46,2
	Schwein 22	35,1	58,6	64,7	11,1	27,2	25,4	24,0	31,4	39,3	68,5	53,6	60,8
	Schwein 27	64,4	67,3	67,1	29,7	31,8	28,8	34,7	35,5	38,3	53,9	52,7	57,1
	Schwein 30	54,9	63,5	84,0	14,0	31,9	43,0	40,9	31,6	41,1	74,5	49,8	48,9
	Schwein 31	41,0	74,2	103,6	15,0	33,7	46,6	26,0	40,5	57,1	63,4	54,6	55,1
	<b>Mittelwert</b>	54,9	66,7	86,9	21,2	31,9	40,4	33,7	34,8	46,6	63,3	52,1	54,0
Kontrollgruppe	Schwein 11	60,3	78,8	94,0	17,5	28,8	36,1	42,9	50,0	57,9	71,0	63,4	61,6
	Schwein 13	56,7	81,1	82,8	16,5	28,8	32,3	40,2	52,3	50,5	70,9	64,5	61,0
	Schwein 16	55,0	77,1	48,9	11,1	26,2	18,9	43,9	50,8	30,1	79,8	66,0	61,5
	Schwein 23	48,3	60,2	83,8	14,4	28,4	39,3	33,9	31,8	44,5	70,2	52,8	53,1
	Schwein 26	28,4	42,1	51,8	7,9	15,4	22,7	20,5	26,8	29,0	72,3	63,5	56,1
	Schwein 32	56,1	78,0	97,1	24,6	40,5	47,1	31,5	37,5	50,1	56,1	48,1	51,6
		<b>Mittelwert</b>	50,8	69,5	76,4	15,3	28,0	32,7	35,5	41,5	43,7	70,0	59,7

		LVEDP			+dP/dt			Aortendruck			Aortendruck		
		mmHg			mmHg/sec			mmHG			mmHg		
Tage nach Infarkt		0,0	14,0	28,0	0,0	14,0	28,0	0,0	14,0	28,0	0,0	14,0	28,0
Ctx-Gruppe	Schwein 10	10	10	10	1384	2804	2639	92	110	102	59	68	58
	Schwein 12	5	8	12	2285	2771	2503	79	80	85	53	48	55
	Schwein 14	12	11	10	2391	2007	2932	79	78	75	46	45	40
	Schwein 15	12	11	13	1900	1919	2066	86	82	91	46	41	48
	Schwein 18	9	nd	15	1900	nd	1690	73	nd	83	50	nd	56
	Schwein 22	10	16	16	2108	1811	2012	80	90	96	47	45	58
	Schwein 27	9	12	12	1900	1533	2089	90	80	88	65	55	56
	Schwein 30	10	15	15	1900	1900	1700	95	84	105	58	55	70
	Schwein 31	15	12	11	1774	1800	1600	95	62	78	65	40	47
	<b>Mittelwert</b>	10,2	11,9	12,7	1949	2068	2137	85,4	83,3	89,2	54,3	49,6	54,2
Kontrollgruppe	Schwein 11	10	15	11	2900	2897	2400	87	101	85	55	65	52
	Schwein 13	11	15	9	1482	1900	1834	72	88	75	45	55	44
	Schwein 16	14	12	9	2109	2190	2100	84	90	93	45	55	56
	Schwein 23	19	11	9	1900	1769	1800	82	74	72	55	49	47
	Schwein 26	7	15	14	2118	2055	1900	70	82	90	40	43	60
	Schwein 32	18	8	15	2000	1500	1435	95	75	85	65	55	50
		<b>Mittelwert</b>	13,2	12,7	11,2	2085	2052	1912	81,7	85,0	83,3	50,8	53,7

**Tabelle 2:** Gemessene Werte aller Tiere des Projektteil A an den Untersuchungszeitpunkten vor MI, 14 Tage nach MI und 14 Tage nach Medium/Ctx Injektion für die Tiere der Ctx-Gruppe (oben) und der Kontrollgruppe (unten). Für jede der beiden Gruppen wurde zusätzlich der Mittelwert gebildet. Nicht durchgeführte Untersuchungen sind mit nd gekennzeichnet.

### 5.2.2 Systolischer und diastolischer Aortendruck

Beim Vergleich des systolischen Aortendrucks zwischen der Kontrollgruppe und der Ctx-Gruppe gibt es keinen signifikanten Unterschied. Bei beiden hat er sich im Laufe der Untersuchung nicht verändert (Kontrollgruppe: vor MI  $81,7 \pm 3,8$  mmHg, nach MI  $85,0 \pm 4,2$  mmHg, nach Medium  $83,3 \pm 3,4$  mmHg, Ctx-Gruppe: vor MI  $85,4 \pm 2,7$  mmHg, nach MI  $83,2 \pm 2,2$  mmHg, nach Ctx  $88,8 \pm 2,9$  mmHg). Für den diastolischen Aortendruck konnten folgende Werte gemessen werden Kontrollgruppe: vor MI  $50,8 \pm 3,7$  mmHg, nach MI  $53,7 \pm 3,0$  mmHg, nach Medium  $51,5 \pm 2,4$  mmHg, Ctx Gruppe: vor MI  $50,1 \pm 2,4$  mmHg, nach MI  $49,7 \pm 2,9$  mmHg, nach Ctx  $53,7 \pm 2,2$  mmHg. Eine Auflistung des systolischen und diastolischen Aortendruckes der Tiere zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

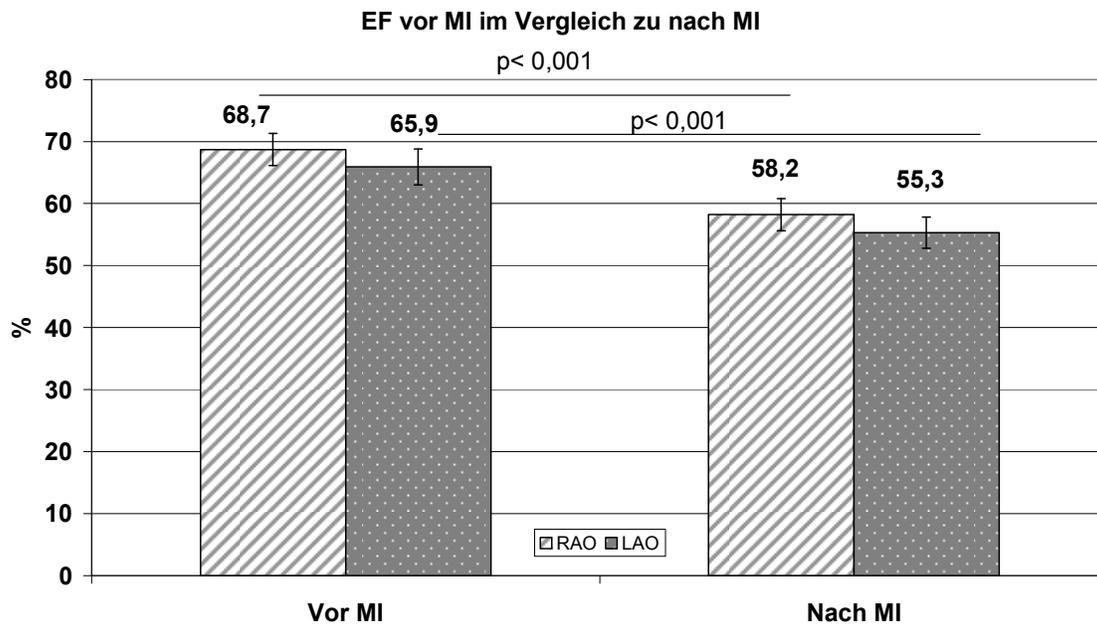
### 5.2.3 Funktionsveränderung durch Infarktinduktion

Bei den 15 untersuchten Tieren nahm das SV/kg KGW nach Myokardinfarkt in der RAO Projektion von vor MI  $1,13 \pm 0,24$  ml/kg KGW auf  $0,94 \pm 0,24$  ml/kg KGW nach MI mit  $p=0,011$  ab, in der LAO Projektion von vor MI  $1,10 \pm 0,27$  ml/kg KGW auf  $0,92 \pm 0,24$  ml/kg KGW mit  $p < 0,001$  ab.

Auch die EF nahm nach Myokardinfarkt erwartungsgemäß ab, RAO vor MI  $68,7 \pm 2,6\%$  auf RAO nach MI  $58,2 \pm 2,9\%$  mit  $p < 0,001$ , LAO vor MI  $65,9 \pm 2,6\%$  auf  $55,3 \pm 2,5\%$  mit  $p < 0,001$ . Das heißt, es ergab sich eine durchschnittliche Verschlechterung der EF um  $10,5 \pm 0,25\%$  (Abbildung 12).

n=15	RAO			LAO		
	Vor MI	Nach MI	p vor MI zu nach MI	Vor MI	Nach MI	p vor MI zu nach MI
<i>LVEDV/KGW (ml/kg)</i>	$1,7 \pm 0,25$	$1,6 \pm 0,3$	0,211	$1,7 \pm 0,46$	$1,7 \pm 0,25$	0,467
<i>LVESV/KGW (ml/kg)</i>	$0,52 \pm 0,2$	$0,67 \pm 0,2$	0,002	$0,6 \pm 0,32$	$0,74 \pm 0,16$	0,015
<i>LVSV/KGW (ml/kg)</i>	$1,13 \pm 0,24$	$0,94 \pm 0,24$	0,011	$1,1 \pm 0,27$	$0,92 \pm 0,24$	0,001
<i>LVEF (%)</i>	$68,7 \pm 2,6$	$58,2 \pm 2,9$	$< 0,001$	$65,9 \pm 2,6$	$55,3 \pm 2,5$	$< 0,001$

**Tabelle 3:** Mittelwerte und SEM der lävokardiographisch erhobenen Funktionsdaten des Herzens für alle Tiere des Projektteil A (n=15) zu den 2 Untersuchungszeitpunkten vor und nach Infarkt, sowie die p-Werte vor MI versus nach MI. Die rechtsanteriore Projektion (RAO) steht im linken Tabellenteil, die linksanteriore Projektion (LAO) im rechten Tabellenteil



**Abbildung 12:** Mittelwerte und SEM der Ejektionsfraktion von den Untersuchungszeitpunkten vor MI (linkes Balkenpaar) und 14 Tage nach MI (rechtes Balkenpaar) für alle Tiere des Projektteil A (n=15). Die schraffierten Balken stellen die rechtsantere Projektion (RAO) dar, die gepunkteten die linksantere Projektion (LAO). Die Abnahme von vor MI zu nach MI war mit  $p < 0,001$  signifikant, zwischen LAO und RAO besteht kein Unterschied.

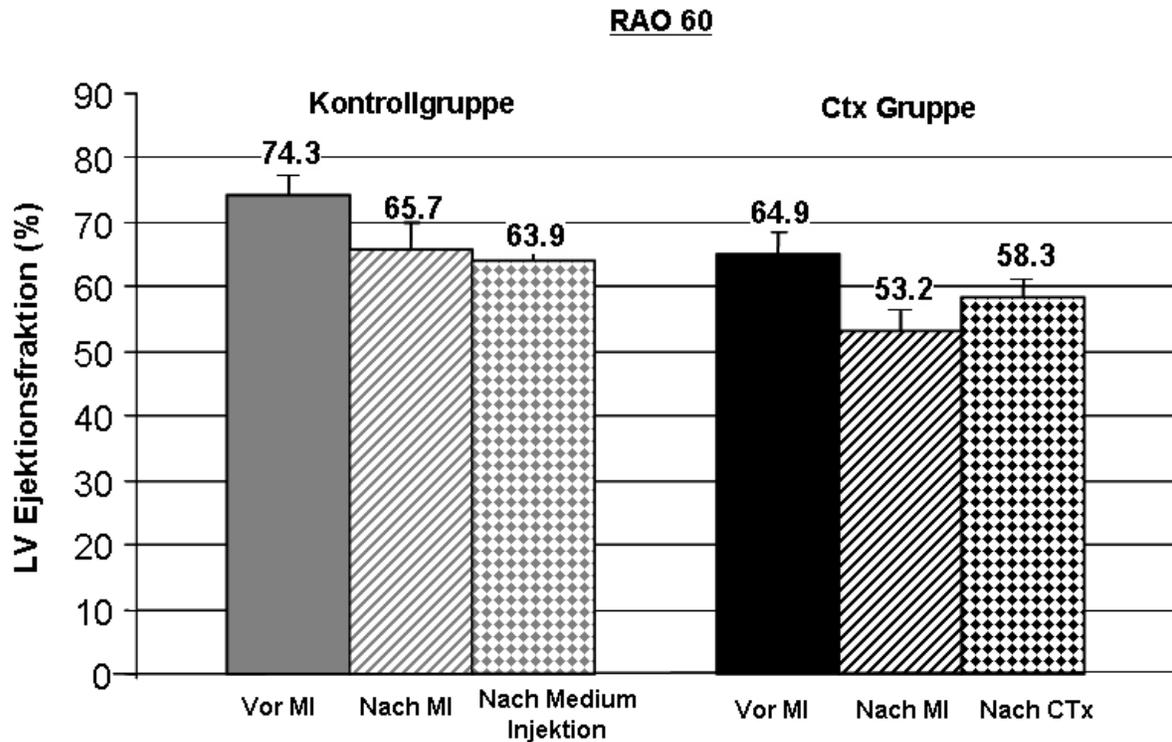
Auch die Parameter LVEDP und  $dp/dt_{max}$  wurden zur Infarktbeurteilung hinzugezogen. LVEDP nahm zu (vor MI  $11,4 \pm 1,0$  mmHg, nach MI  $12,2 \pm 0,7$  mmHg,  $p = 0,231$ ,  $dp/dt_{max}$  zeigte keine signifikante Veränderung (vor MI  $2003,4 \pm 93,4$  mmHg/sec, nach MI  $2061,1 \pm 120,8$  mmHg/sec) (Tabelle 4).

n=15	Vor MI	Nach MI	p vor MI zu nach MI
LVEDP (mmHg)	$11,4 \pm 1,0$	$12,2 \pm 0,7$	0,231
dP/dt (mmHg/sec)	$2003,4 \pm 93,4$	$2061,1 \pm 120,8$	0,467

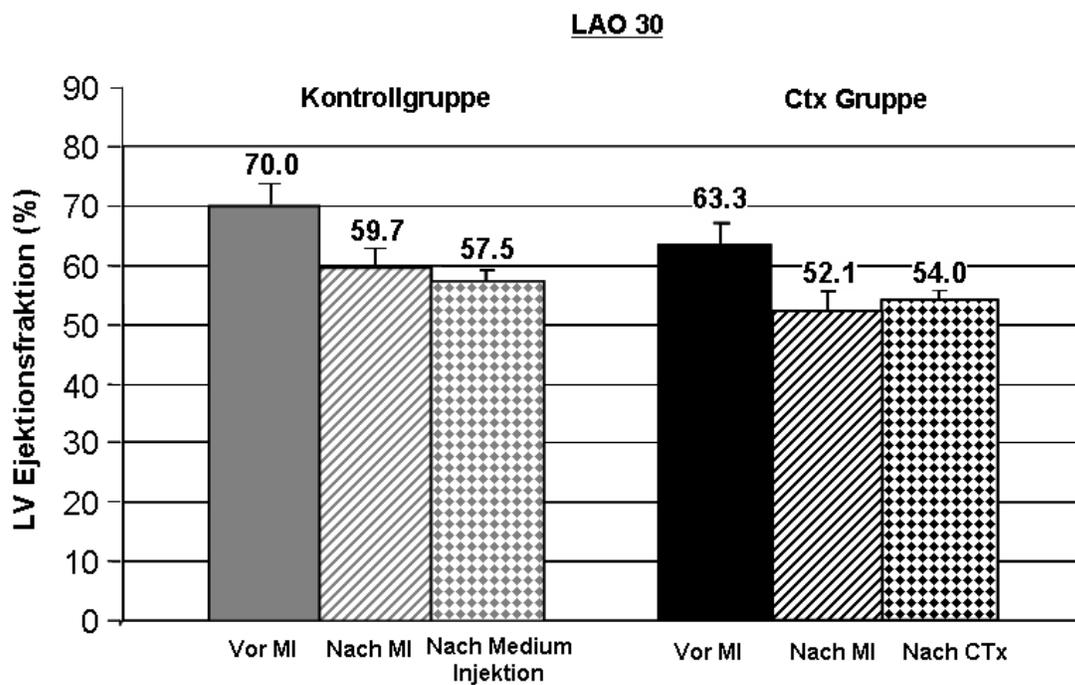
**Tabelle 4:** Mittelwerte und SEM von LVEDP und  $dp/dt_{max}$  von den Untersuchungszeitpunkten vor MI und 14 Tage nach MI für alle Tiere des Projektteil A (n=15)

### *5.2.1 Einfluss der Zelltherapie auf die LV-Funktion nach Myokardinfarkt*

Zur Beurteilung der Auswirkung der applizierten Lösung (Medium oder Zellen) auf die Pumpfunktion des Herzens wurden die 15 Tiere des Projektteil A auf die Ctx Gruppe (9 Tiere) und die Kontrollgruppe (6 Tiere) aufgeteilt. Für diese Gruppen wurden die Parameter auf das jeweilige Körpergewicht bezogen und gemittelt. Bei der Kontrollgruppe blieb die EF zwei Wochen nach Mediuminjektion unverändert mit Tendenz zu weiterer Reduktion (RAO nach MI  $65,7 \pm 4,2\%$ , nach Medium Injektion  $63,9 \pm 1,5\%$ , LAO nach MI  $59,7 \pm 3,0\%$ , nach Medium Injektion  $57,5 \pm 1,8\%$ ). In der zelltherapierten Gruppe hingegen war die EF 2 Wochen nach Zellinjektion höher als vor Zellinjektion (RAO- Projektion nach MI  $53,2 \pm 3,2\%$  zu nach Ctx  $58,3 \pm 2,8\%$ , LAO Projektion  $52,1 \pm 3,3\%$  vor MI zu  $54,0 \pm 2,0\%$  (Abb. 13 und 14).



**Abbildung 13:** Linksventrikuläre Auswurffraktion (RAO 60) der Kontrollgruppe (linke Gruppe, grau) und der Ctx-Gruppe (rechte Gruppe, schwarz) jeweils vor Infarkt (linke Säule), 2 Wochen nach Infarkt (mittlere Säule) und 2 Wochen nach Zell- oder Mediuminjektion (rechte Säule).



**Abbildung 14:** Linksventrikuläre Auswurffraktion (LAO 30) der Kontrolltiere (linke Gruppe, grau) und der zelltherapierten Tiere (rechte Gruppe, schwarz) jeweils vor Infarkt (linke Säule), 2 Wochen nach Infarkt (mittlere Säule) und 2 Wochen nach Zell- oder Mediuminjektion (rechte Säule).

Um die Veränderung der Funktionsparameter zwischen der Zelltherapiegruppe und der Kontrollgruppe vergleichen zu können, wurde in jeder der beiden Gruppen die Differenz zwischen nach Medium/Ctx Injektion zu nach MI gebildet (z.B. LVEF nach Ctx/Medium – LVEF nach MI) (Tab.5)

		Kontrollgruppe		Ctx Gruppe		p (3-2) Ctx zu (3-2) Medium	p (3-1) Ctx zu (3-1) Medium
		nach Medium (3) - nach MI (2)	nach Medium (3) - vor MI (1)	nach Ctx - nach MI	nach Ctx - vor MI		
RAO	LVEDV/kg (ml)	-0,08±0,06	-0,14±0,13	0,03±0,16	-0,0003±0,23	0,388	0,523
	LVESV/kg (ml)	-0,01±0,06	0,11±0,05	-0,05±0,08	0,11±0,1	0,388	0,477
	LVSV/kg (ml)	-0,07±0,1	-0,25±0,13	0,09±0,1	-0,11±0,15	0,164	0,477
	LVEF (%)	-1,5±4,4	-10,2±3,6	5,1±2,3*	-6,7±3,2	0,043	0,185
LAO	LVEDV/kg (ml)	-0,14±0,16	-0,11±0,16	0,06±0,11	-0,04±0,2	0,164	0,432
	LVESV/kg (ml)	-0,02±0,06	0,17±0,05	0,02±0,07	0,13±0,12	0,388	0,523
	LVSV/kg (ml)	-0,12±0,11	-0,28±0,13	0,04±0,09	-0,16±0,12	0,288	0,432
	LVEF (%)	-2,3±1,7	-12,5±2,4	1,6±3,3	-9,2±4,0	0,131	0,131

**Tabelle 5:** Auflistung der Unterschiede zwischen Werten nach Medium/Ctx und nach MI (Differenz) und nach Medium/Ctx und vor MI (Differenz) und der dazugehörigen p-Werte. Darstellung erfolgt für RAO (oben) und LAO (unten).

Die Änderung des Schlagvolumens nach Zellinjektion im Vergleich zu nach Myokardinfarkt in der RAO-Projektion lag bei 0,09±0,1 ml/kg KGW gegenüber -0,07±0,1 in der Mediumgruppe (p= 0,164). Für die LAO-Projektion ergaben sich folgende Werte, Ctx-Gruppe 0,04±0,09 ml/kg KGW und Kontrollgruppe -0,12±0,11 ml/kg KGW (p= 0,288). Die Unterschiede im LVESV, LVEDV und dem LVSV für die LAO und RAO Projektion sind in Abbildung 15 und 16 dargestellt.

Für die Ejektionsfraktion ergaben sich folgende Werte (RAO Projektion: Ctx-Gruppe +5,1±2,3%, Kontrollgruppe -1,5±4,4 (p= 0,043); LAO-Projektion: Ctx-Gruppe 1,6±3,3%, Mediumgruppe -2,3±1,7% (p= 0,131)) (Abb.17).

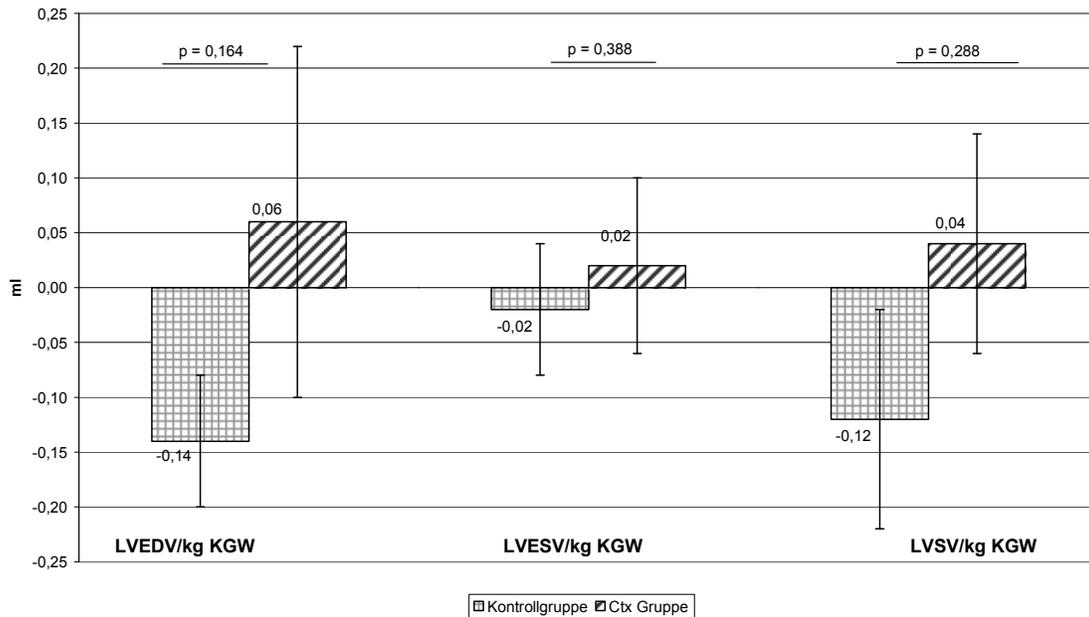
Auch für den linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP Kontrollgruppe +1,3±0,8; Ctx Gruppe -0,11±0,31 mmHg) und sowie für die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dp/dt<sub>max</sub>, Kontrollgruppe -74±21 mmHg/sec; Ctx Gruppe 165±62 mmHg/sec) wurde diese Differenz gebildet (Abb. 18). Der Unterschied des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) lag in der Kontrollgruppe bei 1,33 mmHg wohingegen er in der Ctx Gruppe bei -0,11 mmHg lag (p=0,038). Für die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dp/dt<sub>max</sub>) ergab sich in der Kontrollgruppe ein Unterschied von -74mmHg±21 während er in der Ctx Gruppe bei 165±62 mmHg lag (p=0,015).

## RAO 60: Vergleich nach Ctx/Medium mit nach MI



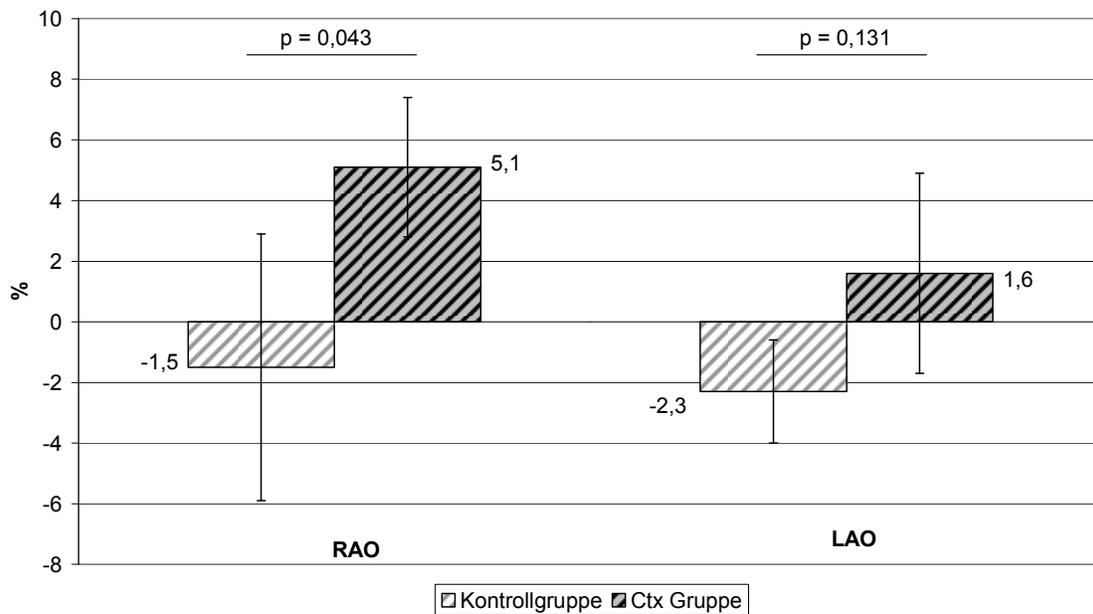
**Abbildung 15:** Unterschied der LVEDV, LVESV, LVSV bezogen auf das jeweilige Körpergewicht nach Medium/Ctx und nach MI (Differenz) in der RAO Projektion. Die grau karierten Balken stellen die Tiere der Kontrollgruppe (n=6) dar, und die schwarz schraffierten Balken die Tiere der Ctx-Gruppe (n=9).

### LAO 30: Vergleich nach Ctx/Medium mit nach MI

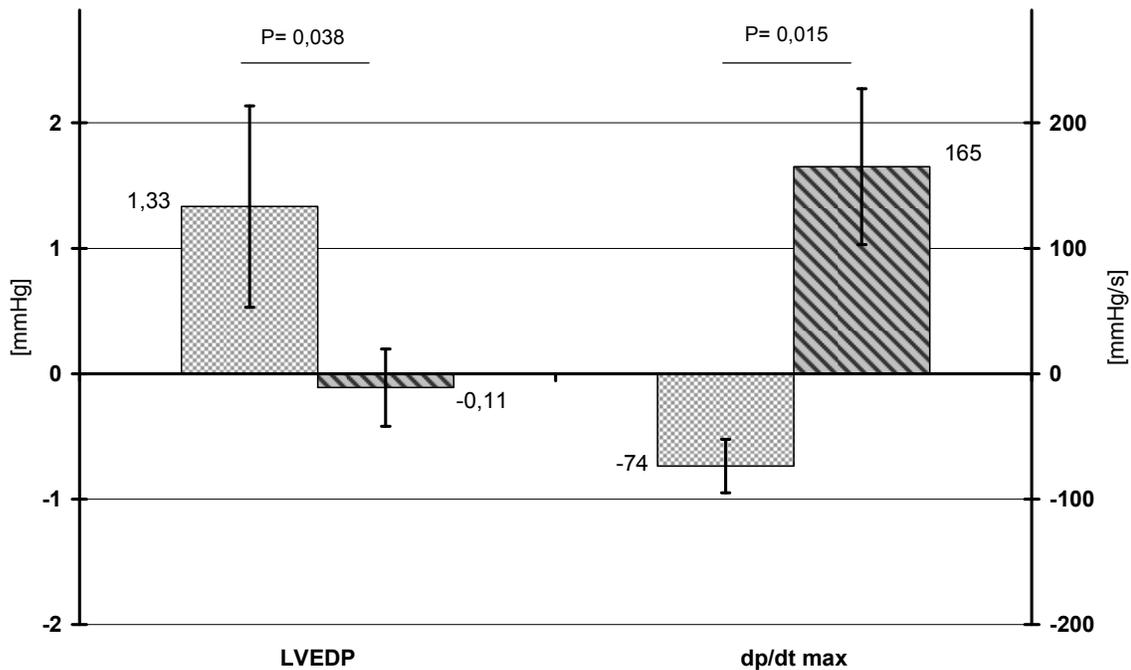


**Abbildung 16:** Unterschied der LVEDV, LVESV, LVSV bezogen auf das jeweilige Körpergewicht nach Medium/Ctx und nach MI (Differenz) in der LAO Projektion. Die grau karierten Balken stellen die Tiere der Kontrollgruppe (n=6) dar, und die schwarz schraffierten Balken die Tiere der Ctx-Gruppe (n=9).

### Vergleich der EF: Ctx Gruppe vs. Kontrollgruppe



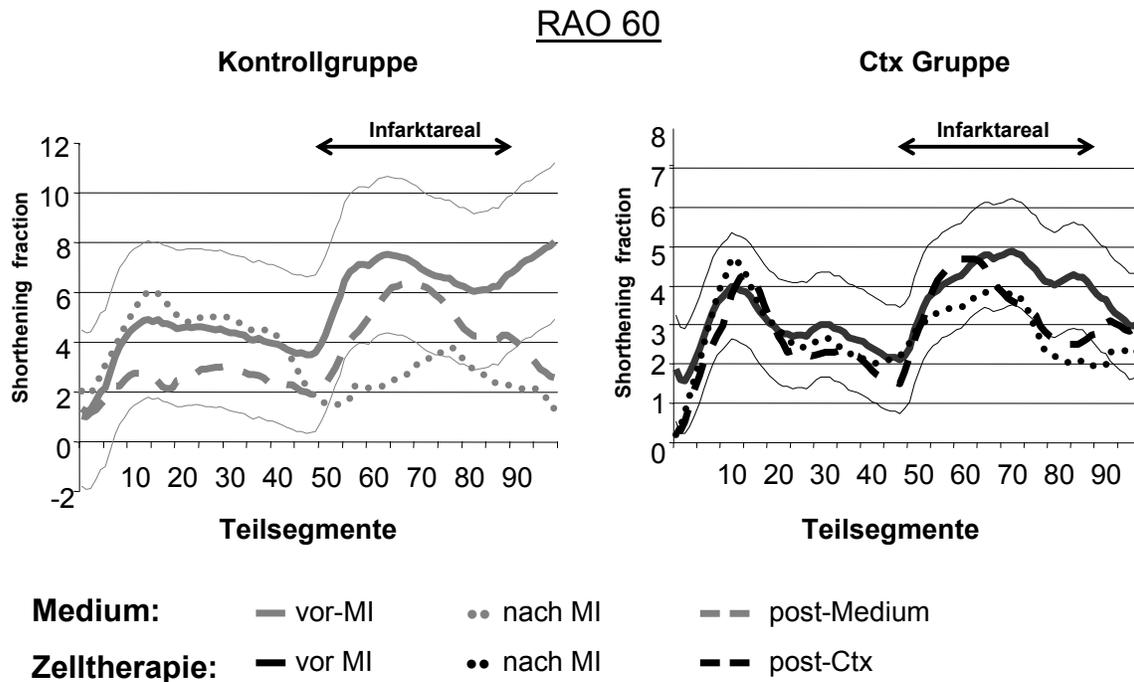
**Abbildung 17:** Unterschied der EF nach Medium/Ctx und nach MI (Differenz) in der RAO (linkes Balkenpaar) und LAO (rechtes Balkenpaar) Projektion. Die grau schraffierten Balken stellen die Tiere der Kontrollgruppe (n=6) dar, und die schwarz schraffierten Balken die Tiere der Ctx-Gruppe (n=9) dar.



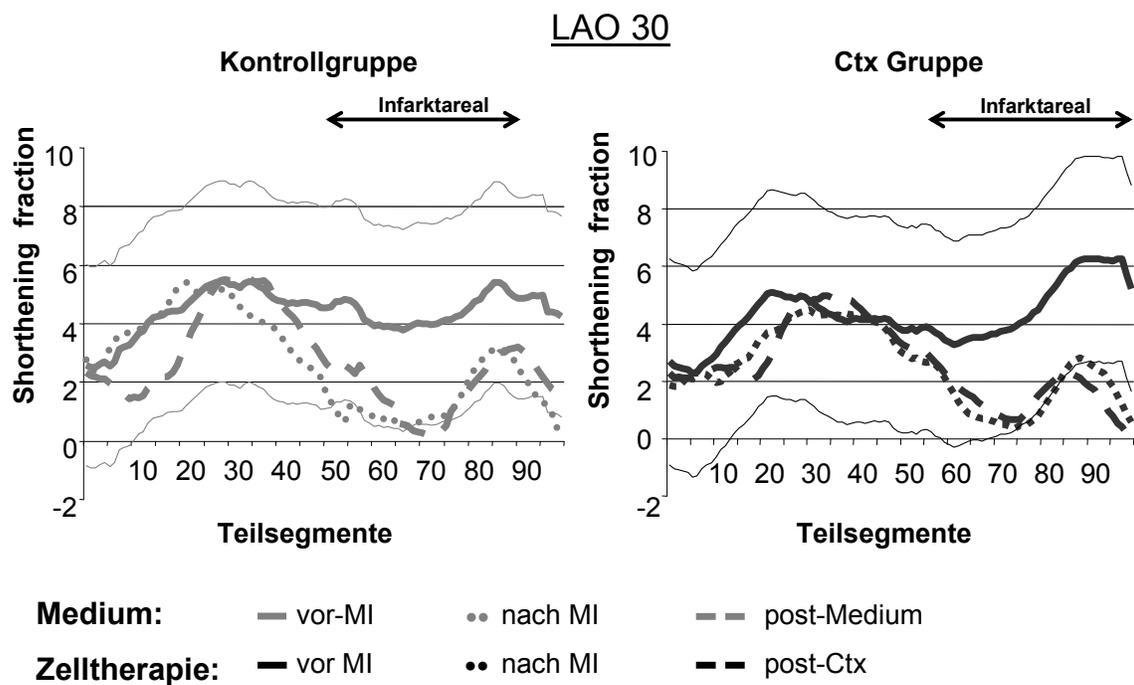
**Abbildung 18:** Unterschied des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) (linkes Balkenpaar) und der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{max}$ ) (rechtes Balkenpaar) nach Medium/Ctx und nach MI (Differenz). Die grau karierten Balken stellen die Tiere der Kontrollgruppe (n=6), und die schwarz schraffierten Balken die Tiere der Ctx-Gruppe (n=9) dar.

### 5.2.2 Analyse der regionalen LV Funktion

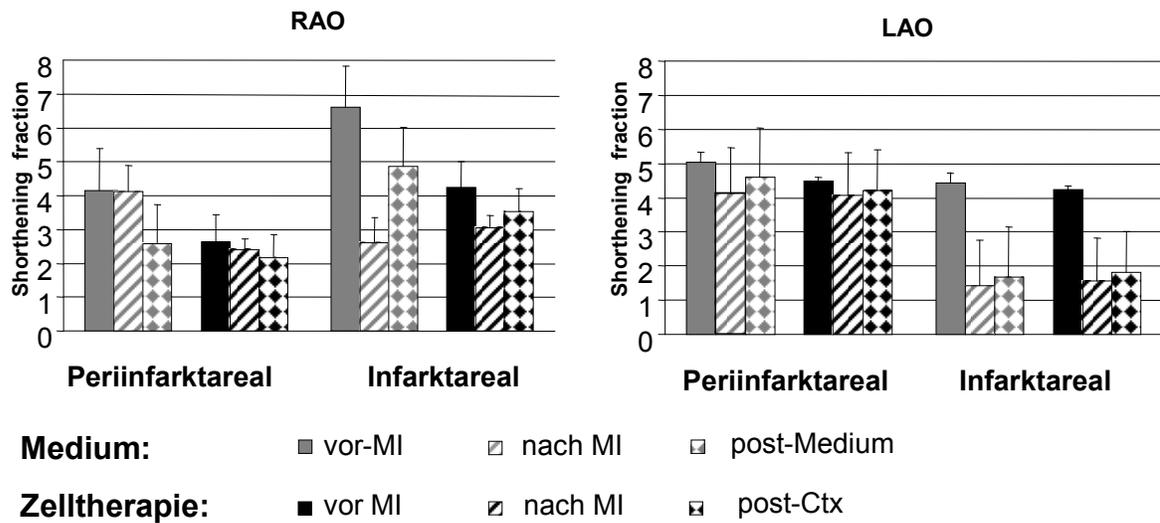
Neben der globalen LV- Funktion wurden auch Analysen zur regionalen LV- Funktion durchgeführt. Hierzu wurde die Centerline- Methode nach Sheehan eingesetzt (Einteilung des LV- Umfangs in 100 Teilssegmente/Chords, Sheehan et al., 1986). Abbildungen 19 und 20 zeigen die Daten der Analyse in RAO und LAO. In RAO zeigte sich 2 Wochen nach Mediuminjektion im Vergleich zu nach Myokardinfarkt eine Abnahme der Kontraktilität im nicht vom Infarkt betroffenen Myokardareal, welche in der Zelltherapiegruppe nicht beobachtet wurde (Chords 10-45, Abb. 22). In der LAO- Projektion wurde kein Unterschied der regionalen Wandbewegung gefunden (Abb. 19 und 20). Nach Zusammenfassung der linksventrikulären Regionen in Infarktregion (Chords 50-90) und Nichtinfarktregion (übrige Chords) war kein signifikanter Unterschied in der Entwicklung der regionalen Kontraktilität zwischen Medium- und Zell- behandelten Tieren erkennbar (Abb. 21).



**Abbildung 19:** Analyse der regionalen Wandbewegung in RAO 60 mit der Centerline- Methode nach Sheehan (Sheehan, et al., 1986) bei Schweinen, denen 2 Wochen nach Myokardinfarkt entweder Medium (links) oder autologe mononukleäre Knochenmarkzellen (rechts) injiziert wurden. Das Infarktareal befindet sich etwa zwischen Teilsegment 50 und 90.



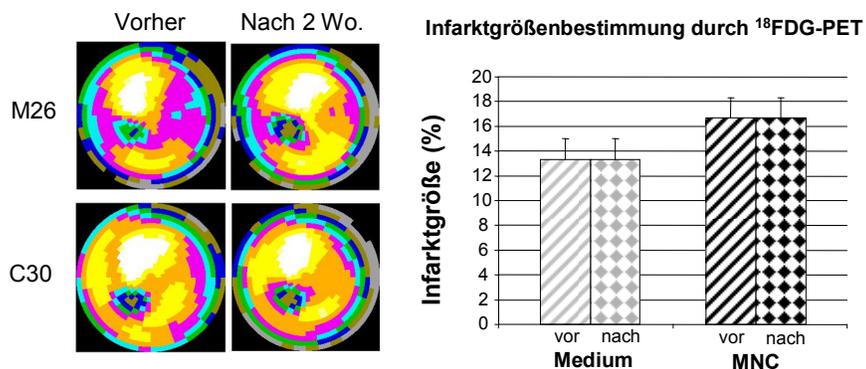
**Abbildung 20:** Analyse der regionalen Wandbewegung in LAO mit der Centerline- Methode nach Sheehan (Sheehan, et al., 1986) bei Schweinen, denen 2 Wochen nach Myokardinfarkt entweder Medium (links) oder autologe mononukleäre Knochenmarkzellen (rechts) injiziert wurden. Das Infarktareal befindet sich etwa zwischen Teilsegment 50 und 90.



**Abbildung 21:** Analyse der regionalen Wandbewegung im Infarktareal (Chords 60-90) und außerhalb des Infarktareals (links RAO, rechts LAO).

### 5.2.3 Infarktgrößenbestimmung mittels Positronenemmissionstomographie (PET)

Die Bestimmung der Infarktausdehnung mittels FDG-PET-Analyse ergab vergleichbare Infarktgrößen für beide Gruppen (Ctx Gruppe  $16,7 \pm 1,7\%$ ; Kontrollgruppe  $13,3 \pm 1,7\%$ ). Nach zwei Wochen zeigte sich weder in der Ctx Gruppe noch in der Kontrollgruppe eine Veränderung der Infarktgröße im Vergleich zur Gesamtfläche des linken Ventrikels (bull's eye view, Ctx Gruppe  $15,8 \pm 1,9\%$ , Kontrollgruppe  $13,6 \pm 0,8\%$ ) (Abb. 22).



**Abbildung 22:** <sup>18</sup>F-FDG- PET Analyse nach Myokardinfarkt; Links vier Original- Tomographien von einem Medium- behandelten (oben) und von einem Zell- behandelten (unten) Tier vor (links) und 2 Wochen nach (rechts) Injektion. Im rechten Teil der Abbildung sind die Mittelwerte der Analysen für je 3 Tiere abgebildet die entweder mit Medium (graue Säulen) oder mit mononukleären Knochenmarkszellen behandelt wurden (schwarze Säulen).

#### *5.2.4 Wachstumskontrollen der injizierten mononukleären Zellen*

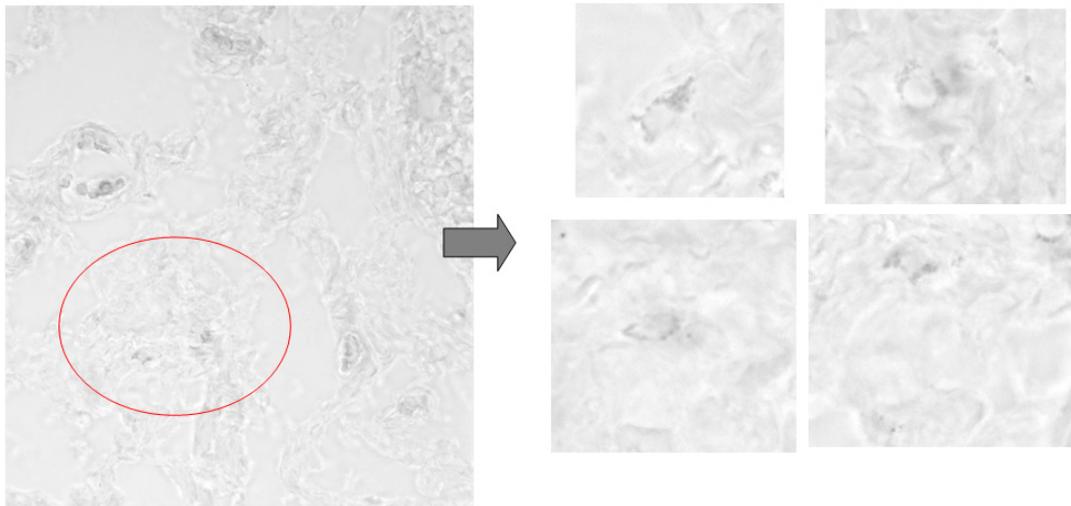
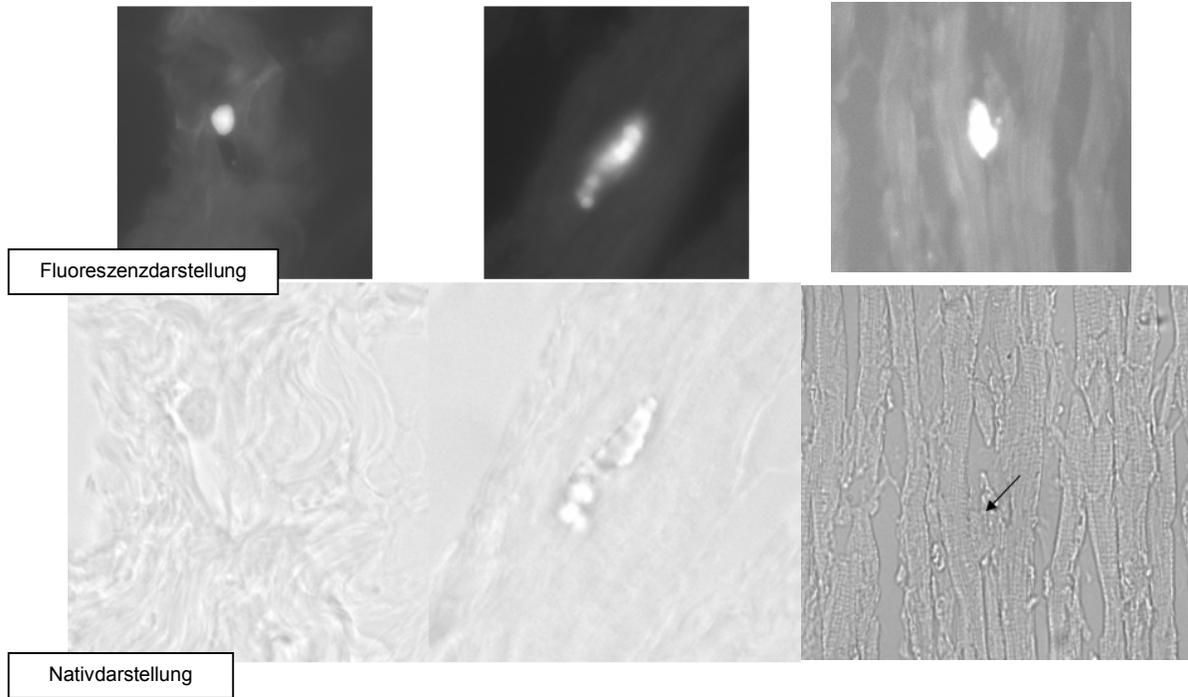
Die Betrachtung der ausplattierten Zellen unter dem Mikroskop nach 14 Tagen ergab, dass die Zellen adhärent wuchsen und eine spindelartige Form zeigten und die Kulturschale durchgehend bewachsen war. Bei einem Tier konnten die Zellen aufgrund von einer Brutschrankkontamination nicht ausgewertet werden.

### **5.3 Untersuchungen zur histologischen Darstellung der Zellen**

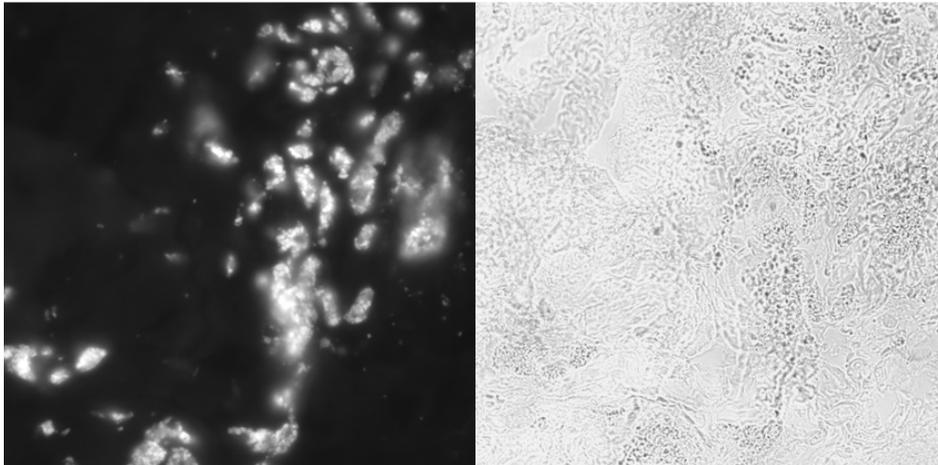
Es wurden 5 Tiere mit Gold sowie Hoechst Dye markierten Zellen versehen, wovon bei 3 Tieren die Herzen 2 Wochen nach Zellinjektion entnommen wurden, bei den anderen beiden jeweils 4 und 8 Wochen nach Zellinjektion.

#### *5.3.1 Histologische Darstellung der injizierten markierten Zellen*

Die Gold und Hoechst Dye markierten Zellen waren bis zu einem Zeitraum von 8 Wochen nach Injektion im Schweinemyokard histologisch nachweisbar. Bei der histologischen Untersuchung 2 Wochen nach Transplantation wies ein großer Teil der Zellen deutliche morphologische Schäden auf, ein geringer Teil war in Form und Struktur den Myokardzellen ähnlich (s. Abb. 22b). Bei allen Tieren fanden sich in den "Einstichregionen" deutliche "Zelldetritusansammlungen" (Abb. 22c).



**Abbildung 22b:** Histologischer Nachweis der transplantierten mononukleären Zellen im (Peri-) Infarktgewebe von Schweinen (LAD- Verschluss) zwei Wochen nach Injektion. Darstellung der Hoechst Dye markierten Zellen (oben) und Darstellung der mit kolloidalem Gold markierten Zellen (unten)



**Abbildung 22c:** Histologischer Nachweis der Einstichregion der transplantierten mononukleären Zellen zwei Wochen nach Injektion.

### 5.3.2 Histologische numerische Auswertung der injizierten markierten Zellen

Bei den 3 Tieren mit Herzentnahme 2 Wochen nach Zelinjektion wurden die vor Applikation markierten Zellen histologisch ausgezählt. Nach 2 Wochen verblieben im Mittel  $4,7 \pm 0,5 \times 10^6$  Zellen, was einem Prozentsatz von  $11,8 \pm 1,3\%$  der ursprünglich  $4 \times 10^7$  injizierten Zellen entspricht. Die Zellzahlen pro Block und Tier sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

	Schwein 3	Schwein 6	Schwein 33
<b>Zellen/Block 1</b>	625333	532023	461482
<b>Zellen/Block 2</b>	624999	587977	387851
<b>Zellen/Block 3</b>	507445	356172	301342
<b>Zellen/Block 4</b>	435222	402161	314658
<b>Zellen/Block 5</b>	513125	498723	423115
<b>Zellen/Block 6</b>	464877	565277	449552
<b>Zellen/Block 7</b>	720861	534521	324556
<b>Zellen/Block 8</b>	534472	599479	165444
<b>Zellen/Block 9</b>	575112	423211	435622
<b>Zellen/Block 10</b>	533221	419122	467378
<b>Blöcke 1-10</b>	<b>5534667</b>	<b>4918667</b>	<b>3731000</b>

**Tabelle 6:** Gesamtzellzahl der einzelnen Blöcke nach Auszählung mittels Lichtmikroskopie

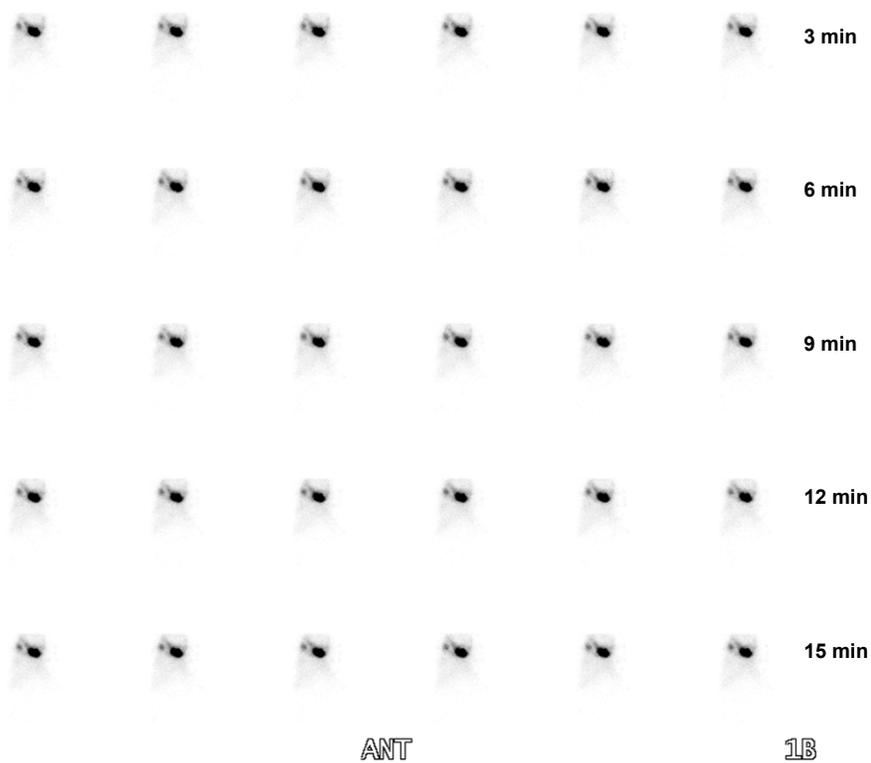
## 5.4 Untersuchung zum Zellverbleib

Für die szintigraphischen Untersuchungen wurden  $1 \times 10^8$  Zellen verabreicht, die im Mittel eine Radioaktivität von  $89,7 \pm 11,3$  MBq hatten.

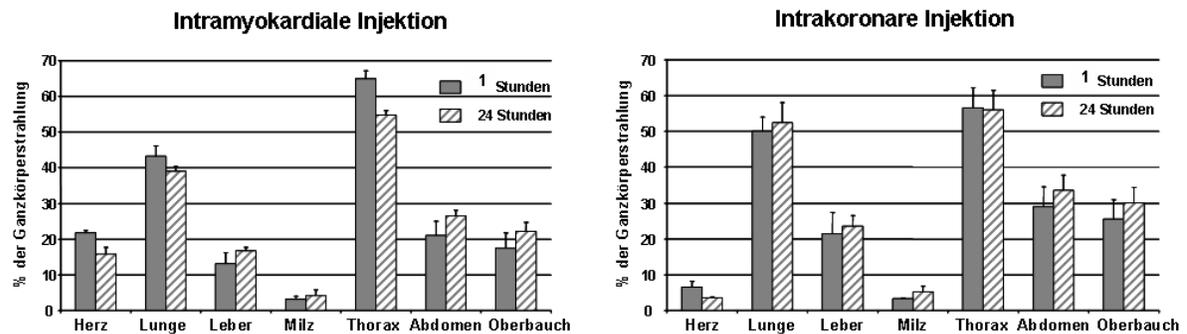
### 5.4.1 Szintigraphie der Tiere

Bei den 3 Tieren, die  $^{111}\text{Indium}$  markierte Zellen intramyokardial in das durch Coilembolisation infarzierte Herz gespritzt bekamen, war nach 24 Stunden noch  $22 \pm 2\%$  der initial im Herzen nachweisbaren Radioaktivität messbar. In in vitro Teststudien zeigte sich, dass die Zellen durch die Markierung in den ersten 24 Stunden nicht nachhaltig geschädigt werden.

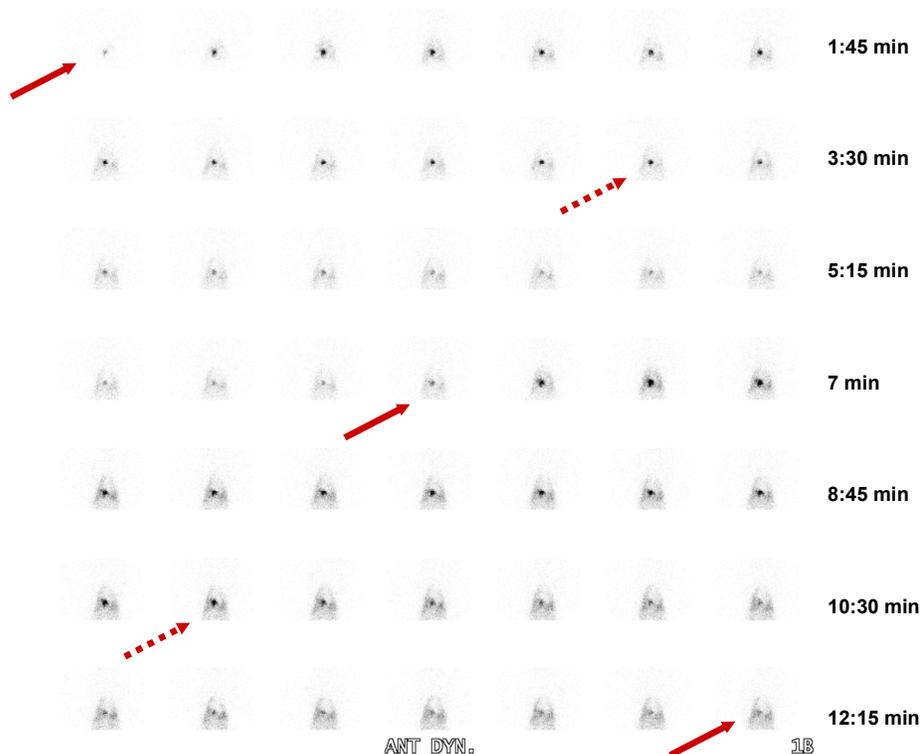
Bei den Tieren mit LAD-Ligatur (4 Std.) und Reperfusion ist in der dynamischen Szintigraphie der Herzregion zu erkennen, dass unmittelbar nach intramyokardialer Zellinjektion die Herzregion gleichmäßig radioaktiv markiert bleibt (Abb. 23). In der quantitativen Analyse waren zum Zeitpunkt 1,0 Stunden nach Injektion  $22 \pm 1\%$  der applizierten Gesamtaktivität im Herzen nachweisbar. Diese Zahl fiel nach 24 Std. auf  $16 \pm 2\%$  ab ( $P=0,07$ ). Die restliche Radioaktivität akkumulierte sich in den extrakardialen Organen (Tab. 7 und Abb. 24).



**Abbildung 23:** Dynamische Szintigraphie unmittelbar nach intramyokardialer Injektion von  $^{111}\text{In}$ -markierten mononukleären Knochenmarkszellen in infarzierte Herzen (mit Reperfusion) (1 Aufnahme alle 30 Sek., Start links oben, Ende rechts unten).



**Abbildung 24:** Quantitative Analyse des Verbleibs radioaktiv markierter Knochenmarkszellen 1,0 Std. und 24 Std. nach intramyokardialer Injektion (links) und nach intrakoronare (rechts) in infarzierte Herzen bei reperfundiertem Infarktgefäß.



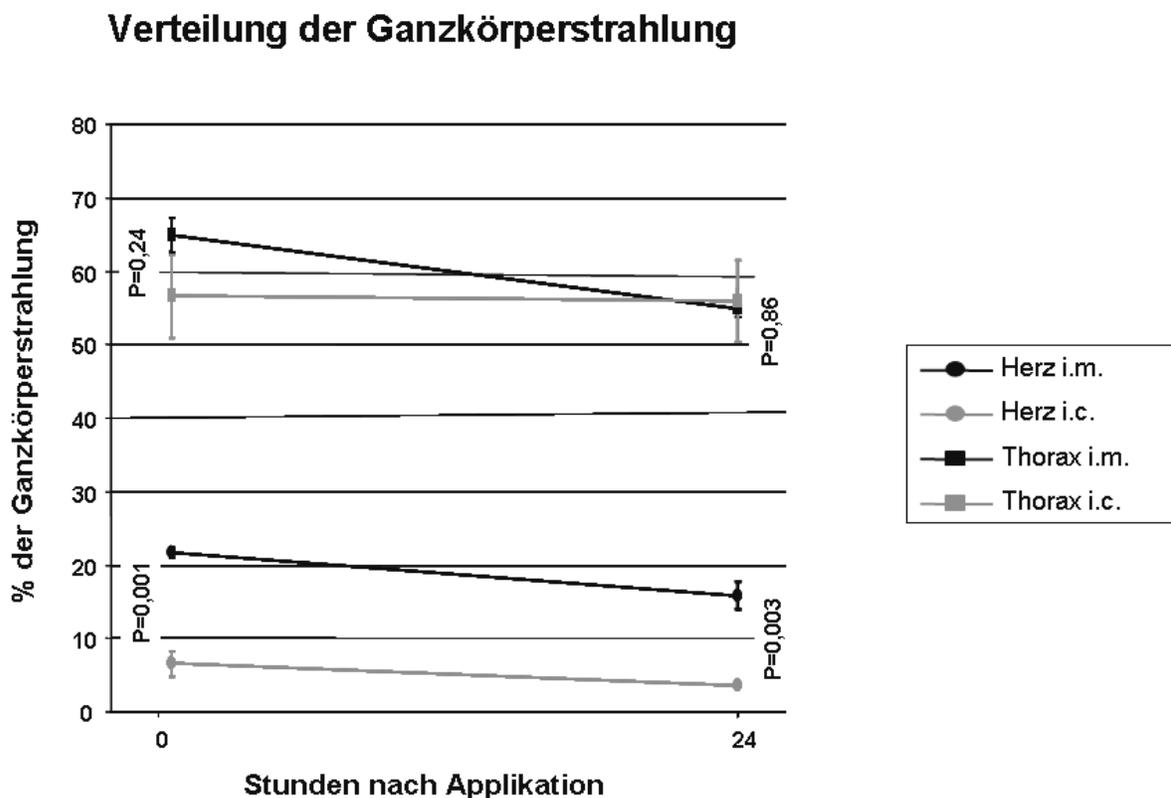
**Abbildung 25:** Dynamische Szintigraphie unmittelbar nach intrakoronarer Injektion von <sup>111</sup>Indium-markierten mononukleären Knochenmarkzellen in infarzierte Herzen nach Reperfusion (eine Aufnahme alle 15 Sek.). Die Zellen wurden über einen liegenden Ballonkatheter mit insouffliertem Ballon injiziert (durchgehende Pfeile, 3 Min. Inflation). Danach wurde der Ballon desuffliert und es fand eine 3 minütige Reperfusion statt (gestrichelte Pfeile, 4 Wiederholungen).

	Intramyokardiale Applikation (n=3)		Intrakoronare Applikation (n=3)	
	1 Std.	24 Std.	1Std.	24 Std.
<b>Gesamt</b>	100%	100%	100%	100%
<b>Thorax</b>	65±2,3%	55±1,1%	57±5,6%	56±5,5%
<b>Herz</b>	22±0,7%	16±1,9%	7±1,7%**	4±0,1% **
<b>Lunge</b>	43±2,9%	39±1,3%	50±4,0%	52±5,6%
<b>Abdomen</b>	21±4,0%	26±1,7%	29±5,5%	33±4,3%
<b>Oberbauch</b>	17±4,3%	22±2,5%	26±5,5%	30±4,4%
<b>Leber</b>	13±3,1%	17±1,0%	22±5,9%	24±3,1%
<b>Milz</b>	4±0,9%	5±1,6%	4±0,2%	6±1,7%

**Tabelle 7:** Zellverbleib <sup>111</sup>In-markierter mononukleärer Knochenmarkzellen nach intramyokardialer (links) oder intrakoronarer (rechts) Injektion bei reperfundierten Infarktgefäß p<0,01 intrakoronar vs. intramyokardial)

Bei intrakoronarer Gabe der Zellen zeigte sich in der dynamischen Szintigraphie, dass mit Zellinjektion bei verschlossenem Koronargefäß (aufgeblasener Ballon) ein starkes radioaktives Signal in der Herzregion nachweisbar war. Unmittelbar mit

Beginn der Reperfusion (desoufflierter Ballon) zeigte sich jedoch ein deutlicher Abfall der Signalintensität im Herzen und eine deutliche Signalzunahme im Bereich der Lungen (Reperfusion für drei Minuten, vier Injektionen) (Abb. 25). Nach Abschluss der intrakoronaren Injektion (1,0 Std.) waren noch  $7 \pm 2\%$  der Gesamtaktivität im Herzen nachweisbar ( $n=3$ ). Innerhalb von 24 Stunden sank die Aktivität weiter auf  $4 \pm 0,1\%$  ( $P=0,2$ ). Die intramyokardiale Zellapplikation war sowohl nach 1,0 Std. ( $P=0,001$ ) als auch nach 24 Stunden ( $P=0,003$ ) effektiver im Vergleich zur intrakoronaren Injektion (in Tab. 7 und Abb. 24). Die Verteilung der Aktivität auf die extrakardialen Organe veränderte sich sowohl nach intrakoronarer Gabe als auch nach intramyokardialer Injektion im Verlauf von 24 Stunden (24 Std. vs. 1,0 Std.) nicht. Eine die intramyokardiale Applikation mit der intrakoronaren Applikation vergleichende Darstellung findet sich in Abb. 26.



**Abbildung 26:** Direkter Vergleich des Zellverbleibs im Herzen 1,0 Std. und 24 Std. nach intramyokardialer vs. intrakoronarer Applikation der Zellen in infarzierten Schweineherzen (mit Reperfusion)

## 6 DISKUSSION

Bei unseren Untersuchungen an 29 Schweinen konnten hinsichtlich des funktionalen Einflusses, des Zellverbleibs, der Ausdifferenzierung von mononukleären Knochenmarkzellen nach Applikation ins Infarktgebiet folgende Ergebnisse festgestellt werden:

1. In der mit autologen mononukleären Knochenmarkzellen behandelten Gruppe war eine geringe Verbesserung der LV-Auswurffraktion (globale Funktion) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Medium Injektion) nachweisbar. Jedoch konnten bezüglich der Größe des Infarktes wie auch für die regionale Wandbewegung keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.
2. Bei den Schweinen mit permanenter Gefäßokklusion des Herzkranzgefäßes und intramyokardialer Applikation der Zellen konnten diese Zellen bis zu 8 Wochen im Infarktareal nachgewiesen werden. Szintigraphisch gemessen verblieben innerhalb von 24 Stunden etwa 20% der applizierten Zellen im Herzen. Histologisch ausgezählt waren es nach 2 Wochen in etwa 10% der applizierten Zellmenge. Histologisch konnte keine Ausdifferenzierung der Zellen nachgewiesen werden.
3. Bei den Tieren mit reperfundiertem Infarktgefäß waren nach 24 Stunden etwa 16% der intramyokardial applizierten Zellen und nur ca. 4% der intrakoronar applizierten Zellen im Herzen nachweisbar.

## **6.1 Das Schweineherz als Infarktmodell und die Wahl der LAD als Infarktgefäß**

Grundsätzlich stellt sich die Frage, welches Tiermodell am besten geeignet ist, um zum Menschen vergleichbare Werte bei der Behandlung eines Myokardinfarktes zu liefern. Untersuchungen am Schweineherz sind sinnvoll, da die Ausprägung des Koronarsystems am Schweineherz dem am menschlichen Herz insbesondere in der Entwicklung und im Verlauf der linken Koronararterie mit LAD und LCX sehr ähnlich ist. (Schummer et al., 1984, Winkhardt et al., 2005, Swindle et al., 1984-1988). Das Kollateralsystem am Schweineherz ist wie beim Menschen weniger stark entwickelt und die Versorgung des linken Ventrikels hängt ausschließlich von der LAD ab. Der intrakoronare Verlauf der LAD, die verminderte Anzahl von Kollateralen, die geringe Wanddicke und ihr geringes Lumen hat zur Folge, dass bei Verschluss der LAD ein großer Teil des linksseitigen Myokards betroffen ist. Folglich kommt es beim Verschluss zum Absterben großer Gewebeareale. Wir haben in unserer Untersuchung die Okklusion in das untere Drittel der LAD gesetzt, da eine dortige Unterbrechung des Blutflusses eine ausreichende aber nicht lebensbedrohliche Infarkt Narbe entstehen lässt.

Ein Verschluss der LAD beim Hundherz führt zu sehr viel geringeren Schäden, da dessen Kollateralsystem sehr viel besser entwickelt ist. Daher eignet sich das Hundeherz weniger als Infarktmodell (Schaper et al., 1967, White et al. 1986). Auch der Anteil des Herzens am Gesamtgewicht ist beim Hund sehr viel größer (0,7%) als beim Mensch (0,49%). Durch die gezielte Auswahl einer bestimmten Gewichtsklasse der Schweine (25-35kg) wurde in der vorliegenden Studie sichergestellt, dass der Herzorganindex (Herzgewicht/ Körpergewicht) mit 0,5% ähnlich dem des Menschen ist (Dickhuth, 2007). In Folge dessen hat das Schweinmodell bei kardiologischen Fragestellungen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Es gibt verschiedene Stenosemodelle beim Schwein zur Untersuchung von chronischen Ischämien sowie akuten Infarkt ereignissen, die einerseits zum Verständnis des pathophysiologischen Geschehens eines Infarktes und andererseits die Fähigkeit zur therapeutischen Angiogenese untersucht haben (Fallavollita et al., 1997, Roth et al., 1987, Litvak et al., 1957).

Die Form der Applikation von Zellen, ob intrakoronar oder intramyokardial ist für die im Herzen verbleibende Zellzahl von entscheidender Bedeutung. Hinsichtlich der Fragestellung zur Applikationsart bestimmen Größe und Gefäßanatomie des verwendeten Tierherzens die Vergleichbarkeit zum Menschen. Praxisnahe

Applikationsmethoden, wie die der intrakoronaren Injektion können nur äußerst eingeschränkt bei murinen Spezies durchgeführt und bewertet werden.

## **6.2 Technik der Infarktinduktion**

Ein myokardialer Infarkt in Tiermodellen wurde bisher meist nach Thoraxeröffnung induziert, wobei der Infarkt unter Sicht durch Ligation der LAD gelegt wurde (Litvak et al., 1957, Fuchs et al., 2001, Liu et al., 2004). Die Induktion eines Infarkts mittels Coilembolisation hat gegenüber einer Ligatur bei Thorakotomie entscheidende Vorteile. Das chirurgische Trauma ist bei einer Thorakotomie viel größer, als bei der Induktion mittels eines Coils. Die mit einer Thorakotomie verbundenen Komplikationen sind höher und oft letal. Da der Infarkt selbst schon eine starke Beeinträchtigung für das Tier darstellt, ist es sinnvoll zusätzliche Belastungen so gering wie möglich zu halten. Erfahrungen haben gezeigt, dass die Thorakotomie selbst Einfluss auf die kardiale Funktion nach einem Infarkt hat (Kraitchman et al., 2000). Die kardiale Funktion, insbesondere das Herzzeitminutenvolumen wird außerdem durch den höheren Einsatz an Analgetika und Anästhetika, wie sie bei einer Thorakotomie gefordert sind, negativ beeinträchtigt. Die Gesamtbelastung für das Tier wird dabei erheblich erhöht. Der Eingriff für eine Coilembolisation ist gegenüber der Thorakotomie minimal invasiv. Er fordert nur die Schaffung eines Gefäßzugangs (Kraitchman et al., 2000, Naslund et al., 1992). Weiterhin erlaubt der Verschluss des Koronargefäßes mittels Coilembolisation eine genaue Kontrolle der Lokalisation des Infarktes. Durch die Angiographie ist die Koronaranatomie bekannt und es können Herzinfarkte mit homogener Größe erzeugt werden. In den von uns durchgeführten Untersuchungen erfolgte die Applikation des Coils im distalen Drittel der LAD nach Abgang des RD2, so dass die Perfusion hinreichend eingeschränkt und der Infarkt ausreichend groß aber nicht letal war. Die in unserem Ansatz gewählte Infarktinduktion durch Coilembolisation ist auch für die Auswertung der funktionellen Auswirkung der Zellen sinnvoll, da durch das nicht reperfundierte Infarktgefäß eine Verbesserung nicht auf die Wiederdurchblutung des Kranzgefäßes zurückzuführen ist, sondern nur alternative Mechanismen dafür in Frage kommen. Für die Anwendung im klinischen Alltag muss jedoch berücksichtigt werden, dass die überwiegende Anzahl von Koronargefäßen wiedereröffnet wird und somit eine Reperfusion des Infarktareals ermöglicht wird.

Bei der Gruppe der Tiere mit Zelltransplantation nach Reperfusion war dieses Infarktmodell nicht möglich, da sich ein einmal durch Coil verschlossenes Gefäß nicht mehr öffnen lässt. Daher musste für diese Untersuchungen ein Infarktmodell mit Hilfe der Thorakotomie gewählt werden. Eine temporäre Ballonokklusion über 4 Stunden war aus versuchstechnischen Gegebenheiten nicht möglich. Da bei diesem Projektteil ausschließlich die Frage der Applikationseffizienz im Vordergrund stand, wurde in dieser Gruppe auf Funktionsuntersuchungen verzichtet und lediglich der Frage nachgegangen, welche Applikationsmethode (intrakoronar vs. intramyokardial) die höchste Anreicherung von Zellen am Herzen ergibt. Dadurch war die oben beschriebene Problematik der eingeschränkten Vitalität nach Thorakotomie nicht von Bedeutung, da bei dieser Tiergruppe die kardiale Funktion nicht untersucht wurde und die Tiere nur 6 Tage nach Infarkt überleben mussten. Die Ligatur der LAD erfolgte hier unter Sicht an der gleichen Stelle wie bei den coilokkludierten Tieren.

### **6.3 Wahl des Zeitpunktes der Zelltransplantation**

Es gibt zahlreiche Argumente für die Wahl des Zeitpunktes einer Zelltherapie nach Myokardinfarkt. Einerseits ist es auf Grund des pathophysiologischen Geschehens und der entstehenden Entzündung im akuten Infarkt nicht sinnvoll Zellen in dieses frische Infarktareal zu transplantieren, doch sollte auf der anderen Seite auch nicht zu lange gewartet werden, da die Stammzellapplikation vor Beginn des kardialen Remodellings erfolgen sollte (Li et al.; 2001). Der Wirkmechanismus injizierter Knochenmarkszellen ist noch nicht bekannt, so dass davon ausgehend kein bestimmter Zeitpunkt favorisiert werden muss. Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss der Knochenmarkszellen auf die LV-Funktion nach Myokardinfarkt unabhängig von den endogenen Regenerationsvorgängen zu untersuchen. Daher wurde für die funktionellen Untersuchungen mit 14 Tagen nach Myokardinfarkt ein Injektionszeitpunkt mit weitgehend abgeschlossener narbiger Umbildung des infarzierten Myokardareals gewählt. Ein solch später Zeitpunkt entspricht auch der klinischen Realität zur intramyokardialen Injektion, da eine intramyokardiale Injektion beim Menschen lediglich im Rahmen einer Bypassoperation stattfindet, die in der Regel nicht vor Ablauf von 14 Tagen nach Infarkt durchgeführt wird. Darüber hinaus haben Schächinger et al. gerade bei späteren Injektionszeitpunkten (allerdings bei intrakoronarer Applikation) einer Verbesserung der LV-Funktion beobachtet (Schächinger et al., 2005). Fernandez-Aviles behandelte in einer klinischen Studie 20

Patienten ca. 14 Tage nach Myokardinfarkt intrakoronar mit Knochenmarkzellen (Fernandez-Aviles et al., 2004). In dieser Arbeitsgruppe wurde der relativ späte Zeitpunkt der Zellapplikation, hier 14 Tage, gewählt, um eine Beeinflussung der Zellen durch inflammatorische Zellen zu vermeiden. Auch die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigen, dass eine kardiale Funktionsverbesserung auch nach größerer Zeitspanne zwischen Myokardinfarktbehandlung und intrakoronarer Zellapplikation möglich ist (Fernandez-Aviles et al., 2004). Jedoch muss angemerkt werden, dass eine noch durchgreifendere Funktionsverbesserung als die in unseren Untersuchungen beobachtete durch eine KM-Zelltherapie nach Myokardinfarkt verpasst worden sein könnte, sollte der Wirkmechanismus doch gerade die frühen Umbauvorgänge nach dem Infarkt ereignis beeinflussen.

Für die Fragestellung der Applikationseffizienz nach intramyokardialer oder intrakoronarer Injektion wurde der Applikationszeitpunkt dem der klinischen Studien angepasst. Die intrakoronare Applikation mittels Katheterinjektion wird am Menschen unter den heutzutage üblichen Gesichtspunkten innerhalb eines sehr kurzen Zeitraumes nach akutem Infarkt durchgeführt. In den klinischen Studien werden heute routinemäßig die Zellen circa 5 Tage nach akutem Infarkt ereignis appliziert (Strauer et al., 2002; Wollert et al., 2004; Janssens et al., 2006). In der bisher größten randomisierten klinischen Studie konnten Schächinger et al. eine signifikante Verbesserung der LV-Auswurffraktion feststellen, sie applizierten die Zellen intrakoronar zeitnah (3-6 Tage) nach Reperfusion (Schächinger et al., 2006). Aus diesen Gründen erfolgte die Zellapplikation in diesem Versuchsteil 5 Tage nach Infarktinduktion

#### **6.4 Wahl der verwendeten Zellen**

In unseren Untersuchungen wurden mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark verwendet, die lediglich durch Ficoll Gradienten Zentrifugation aufgereinigt wurden. Eine solche Zellfraktion enthält sowohl Zellen der hämatopoetischen Reihe, CD34<sup>+</sup> Zellen, mesenchymale Zellen wie auch eine Vielzahl anderer Zellpopulationen. Da bisher noch nicht geklärt ist, welche Zellen aus der mononukleären Fraktion tatsächlich die am besten geeigneten Zellen für eine Therapie am Herzen sind, wurden die mononukleären Zellen ohne weitere Aufbereitung für die Zelltransplantation verwendet. Auch wird diskutiert, dass eine weitere Kultivierung der Zellen ihr Ausdifferenzierungspotential beeinflussen könnte (Assmus et al.,

2002), daher wurden die Zellen über Nacht im Kühlschrank gelagert und nicht ausplattiert. Die von uns gewählte Zellfraktion entspricht der in den klinischen Studien verwendeten und liefert somit die vergleichbarsten und für die Anwendung beim Menschen reproduzierbarsten Ergebnisse (Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002; Wollert et al., 2004; Janssens et al., 2006; Schächinger et al., 2006).

## **6.5 Färbemethoden**

Mit der Markierung des Zytoplasmas mit kolloidalem Gold und der Kernmarkierung mit Hoechst Dye, haben wir die Methoden gewählt, von welchen die geringste Zellfunktionseinschränkung bekannt war und ein Nachweis der Zellen über einen Zeitraum von bis zu 8 Wochen gewährleistet war (Henning et al., 2006; Tang et al., 2006, Schmidt et al., 2006). Von den in der Einleitung genannten Färbemethoden sind die genetischen Marker aufgrund fehlender transgener Zuchtlinien beim Schwein nicht möglich, auch der Nachweis des Y-Chromosomes entfiel auf Grund der in der Fragestellung vorgeschriebenen Randbedingung nur autologe Zellen zu verwenden. Mit der von uns gewählten Markierungsmethode konnten die Zellen innerhalb von 20 h markiert werden. Für die Markierung mit kolloidalem Gold konnten wir diese Eigenschaft in eigenen Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe verifizieren. Somit haben wir die bisher nur zur Thrombozytenmarkierung (Christensen et al. 1992) verwendete Goldmarkierung eingesetzt und konnten zeigen, dass diese Färbemethode effektiv und zellschonend ist. Des Weiteren konnten die kolloidalen Goldpartikel bis zu 8 Wochen nachgewiesen werden. Um einen alternativen Nachweis der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, wurde ein Teil der Zellen mit Hoechst Dye markiert. Diese Technik wurde gewählt, da in vielen Untersuchungen ihr erfolgreicher Einsatz beschrieben wurde (Henning et al., 2006; Tang et al., 2006). Diese Markierung hatte des Weiteren den Vorteil, dass für den Nachweis der Zellen keine Gegenfärbung notwendig war.

Für die Fragestellung des Nachweises der Zellen *in vivo*, wurde eine Markierungsmethode benötigt, welche zulässt, die Zellen *in vivo* im Empfängertier zu verfolgen. Für diese Fragestellung stand keine Methode mit hoher Markierungseffektivität und längerfristiger Vitalität der Zellen zur Verfügung. Mit <sup>111</sup>Indium wurde ein Zellmarker gewählt, der die Vitalität der Zellen nachhaltig schädigt. Da allerdings für diese Fragestellung nur Kurzzeitbeobachtungen (bis 24 Stunden) gefragt waren und auch keine Aussagen zu funktionalen Auswirkungen

getroffen werden sollten, konnte die eingeschränkte Vitalität der Zellen in Kauf genommen werden.

## **6.6 Funktionelle Auswirkung der applizierten Zellen**

Trotz des geringen Zellüberlebens, der niedrigen Zahl der transplantierten Zellen im Herzen und der histologisch nicht nachweisbaren Ausdifferenzierung, wurde in der Lävokardiographie in der Ctx Gruppe eine leichte Verbesserung der globalen LV-Funktion nach Injektion autologer mononukleärer Knochenmarkzellen beobachtet. Während erwartungsgemäß die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zwei Wochen nach Myokardinfarkt signifikant geringer war als vor dem Infarkt (Abnahme ca. 10 %), und es bei den mit Medium behandelten Tieren zu einer weiteren leichten Abnahme der Auswurffraktion kam, stabilisierte sich die Auswurffraktion der zelltherapierten Tiere mit Tendenz zur leichten Zunahme im Vergleich zum Zeitpunkt vor Zelltherapie (Messungen zwei Wochen nach Zelltherapie oder Medium-Injektion). Auch für die anderen Funktionsparameter konnten ähnliche Befunde ermittelt werden. Hinsichtlich des Preloads (LVEDP) konnte in der Ctx-Gruppe 14 Tage nach Zelltransplantation ein leichter Abfall des LVEDP im Vergleich zum Zustand nach Myokardinfarkt gefunden werden, wohingegen er in der Kontrollgruppe weiter anstieg. Der Kontraktilitätsparameter  $dp/dt_{max}$  zeigte in der Ctx-Gruppe einen deutlichen Anstieg zum Zeitpunkt 14 Tage nach Zelltransplantation, wohingegen er in der Kontrollgruppe weiter gefallen ist. Der Kontraktilitätsparameter  $dp/dt_{max}$  ist allerdings abhängig vom Aortendruck. Da sich der Aortendruck in unserer Untersuchung nicht signifikant geändert hat, und auch kein relevanter Trend zu finden war, genügt es die Unterschiede der absoluten  $dp/dt_{max}$  Werte zu betrachten. Bei den absoluten Parametern LVEDV, LVESV, LVSV konnte zwar eine ähnliche Tendenz festgestellt werden, doch waren die Unterschiede nicht signifikant.

Grundsätzlich stellt sich allerdings die Frage, welchen Einfluss die Gewichtszunahme der Tiere auf die Veränderungen am Herzen hatte. Beim Körpergewicht haben wir eine durchschnittliche Gewichtszunahme der Schweine von 679-695 g/Tag gemessen. Das bedeutet eine Gewichtszunahmerate von circa 2% pro Tag. Abgeleitet von den lävokardiographischen Volumenmessungen zeigt sich, dass auch das Herz in gleichem Maße, also in 14 Tagen um circa 28%, wie das ganze Schwein an Gewicht zugenommen hat. Da davon auszugehen ist, dass das Infarktreal nicht

mitgewachsen ist, wird verständlich warum der Kontraktilitätsparameter  $dp/dt_{max}$  in der Kontrollgruppe sich von vor Infarkt zu 14 Tage nach Infarkt nicht verändert hat. Bei der EF spielt die Gewichtszunahme der Tiere eine sehr viel geringere Rolle, da das aktuelle LVSV immer auf das LVEDV bezogen wird. Die Parameter LVEDV, LVESV, LVSV hingegen sind wachstumsabhängig und wurden aus diesem Grund durch das zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ermittelte Körpergewicht geteilt. Allerdings ist bis heute nicht geklärt, wie weit LVEDP vom Wachstum abhängig ist. LVEDP hängt unter anderem vom Blutvolumen ab. Es muss diskutiert werden, ob ein Teil der Gewichtszunahme der Tiere eventuell auch auf durch Herzinsuffizienz bedingte Wassereinlagerung zurückzuführen ist. Bei der regionalen Wandbewegungsanalyse nach Sheehan wurde kein Hinweis dafür gefunden, dass die regionalen Kontraktilitätsverbesserungen im Infarktareal und seinen Randgebieten durch Zelltherapie hervorgerufen wurden. Somit muss der geringe positive Einfluss der Zelltherapie auf eine globale Verbesserung der Pumpfunktion des Herzens zurückgeführt werden. Für die Vermutung, dass globale Faktoren für die Funktionsverbesserung verantwortlich sind, spricht, dass diese bei gleich bleibend fehlender Vitalität der Zellen im Infarktareal auftrat und beobachtet wurde, obwohl fast keine Zellen mehr nachweisbar waren. Von der erhofften Regeneration des Myokards durch sich in Myokardzellen differenzierende Knochenmarkzellen, kann daher nicht ausgegangen werden. Als globale Parameter sind eventuell parakrine Faktoren anzusehen, die das nicht geschädigte Myokard positiv beeinflussen haben (Ciulla et al., 2003, Kinnaird, et al., 2004b; Kinnaird, et al., 2004a; Gnecci, et al., 2005). Auch wenn die erhoffte Myokardregeneration ausblieb konnte doch eine Verbesserung der absoluten Auswurffraktion des Herzens um 10% gefunden werden. Die hier nachgewiesene Verbesserung der Herzfunktion konnte schon in Studien an der Ratte von Orlic et al. festgestellt werden (Orlic et al., 2001) und wurde auch in weiteren klinischen Studien bestätigt. In der TOPCARE-AMI-Pilotstudie (Assmus et al., 2002) verbesserte sich die EF in der zellbehandelten Gruppe innerhalb der ersten 4 Monate mit 8% in der gleichen Größenordnung wie in unseren Untersuchungen. Auch die nachgewiesene Verbesserung der EF um circa 6% in der BOOST-Studie konnten wir basierend auf unseren Ergebnissen bestätigen (Wollert et al., 2004). Die Untersuchung von Schächinger und Mitarbeitern fand einen Unterschied der Herzfunktion zwischen Kontrollgruppe und Ctx Gruppe von 4% (Schächinger et al., 2005). Auch bei einer größeren Zeitspanne zwischen

Myokardinfarktbehandlung und intrakoronarer Zellapplikation konnten Fernandez-Aviles et al. eine kardiale Funktionsverbesserung zeigen (Fernandez-Aviles et al., 2004).

Neben den positiven Befunden bezüglich der funktionalen Auswirkung der applizierten Zellen, gibt es jedoch auch einige kontroverse Ergebnisse. In der doppelblind randomisierten placebokontrollierte ASTAMI-Studie in die 97 Patienten mit ausschließlich ST-Hebungsinfarkt der Vorderwand eingeschlossen wurden, konnte mittels SPECT, Echokardiographie und MRT keine signifikante Verbesserung durch die Applikation mononukleärer Zellen gefunden werden (Lunde et al., 2005). Auch Janssens und Mitarbeiter konnten keine Verbesserung der globalen Pumpfunktion statistisch sichern. Zusätzlich zur Untersuchung der Pumpfunktion untersuchten Sie aber auch die Vitalität des myokardialen Gewebes durch FDG-PET-Analyse. Hierbei wurde festgestellt, dass die mit Zellen behandelten Patienten ein etwas geringeres Infarktareal zurückbehielten (Janssens et al., 2006). In den von uns durchgeführten FDG-PET Untersuchungen konnten allerdings hinsichtlich der Infarktgröße keine Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Ctx-Gruppe gefunden werden, so dass in unseren Untersuchungen der Remodeling-Prozess nach Myokardinfarkt anscheinend unbeeinflusst blieb.

Beim Vergleich der klinischen Studien mit unseren Untersuchungen am Schwein, ist zu bedenken, dass bei Versuchen am Menschen immer eine Standardtherapie zusätzlich zur Zelltransplantation durchgeführt wird. Dies schließt unter anderem die Heparinisierung ein. Dadurch haben die transplantierten Zellen eventuell ein anderes Wirkungspotential, da ihnen durch die Gerinnungshemmung und die gesteigerte Aktivität zur Auflösung thrombotischen Materials mehr geschädigtes Infarktgewebe zugänglich ist. In unserer Untersuchung wurde dagegen keine Heparinisierung und keine Revaskularisation durchgeführt, damit die funktionellen Auswirkungen möglichst alleine auf die applizierten Zellen zurückgeführt werden können. Allerdings ist es denkbar, dass auch die Überlebensbedingungen der applizierten Zellen bei nicht reperfundierten Infarktgefäß aufgrund von Sauerstoffmangel geringer sind. In weiteren Untersuchungen muss daher ermittelt werden, welchen Einfluss Heparin und eine Reperfusion auf den Zellverbleib und die funktionelle Verbesserung durch eine Therapie mit Knochenmarkzellen hat.

## 6.7 Zellmigration und Ausdifferenzierung der transplantierten Zellen

Bei den Untersuchungen in der Gruppe mit permanentem LAD-Verschluss durch Coilembolisation konnten nach intramyokardialer Injektion der Zellen in das Infarkt- und Periinfarktareal immer noch etwa 20% der Zellen nach 24 Stunden im Herzen nachgewiesen werden. Mittels der semiquantitativen histologischen Auswertung konnte nach 2 Wochen ein Prozentsatz von  $11,8 \pm 1,3\%$  der ursprünglich  $4 \times 10^7$  injizierten Zellen nachgewiesen werden. Ein großer Teil der wieder gefundenen markierten Zellen wies morphologisch deutliche Schäden auf. Dies bedeutet, dass die Zahl der verbliebenen vitalen Zellen als wesentlich geringer einzuschätzen ist. Ein längerfristiger Verbleib mononukleärer Knochenmarkszellen nach Injektion in das Infarktareal wurde von Müller-Ehmsen et al. am Rattenmodell nachgewiesen. Es zeigte sich, dass 1-2% der implantierten Zellen auch nach sechs Wochen noch im Herzen der Tiere nachweisbar waren (Müller-Ehmsen et al., 2005a, 2006). In unserer Untersuchung waren die Gold- und Hoechst Dye- markierten Zellen bis zu einem Zeitraum von 8 Wochen nach Injektion im Schweinemyokard histologisch nachweisbar. Wir haben nach 8 Wochen noch ca. 1% wieder gefunden. Die in der Einstichregion gefundenen Anhäufungen von Zelldetritus wurden nicht mitgezählt. In früheren Arbeiten fanden Müller-Ehmsen et al. nach Applikation neonataler Kardiomyozyten in infarzierte Herzen, dass nach 6 Monaten noch mehr als 60% der implantierten Zellen nachweisbar waren (Müller-Ehmsen et al., 2002b). Jedoch kann vermutet werden, dass etwa 10 % der injizierten Zellen Fibroblasten, Endothelzellen oder andere kardiale Zellen waren, die eventuell sogar proliferierten, so dass die tatsächliche Zahl der überlebenden Kardiomyozyten eher als geringer einzuschätzen war.

Hinsichtlich der Frage, ob eine (Trans-) Differenzierung von autologen Knochenmarkszellen zu Kardiomyozyten möglich ist, konnten wir feststellen, dass ein sehr geringer Teil der Zellen in Form und Struktur den Myokardzellen ähnlich war. Auffällig war, dass diese Zellen lediglich in intaktem Myokard (Randzone) zu finden waren (s. Abb. 23b). Aufgrund fehlender Zellmarker und Nachweismethoden, war keine genaue Graduierung der (Trans-) Differenzierung in Kardiomyozyten möglich. Die Beurteilung der Zellen erfolgte gemäß ihrem histologischen Erscheinungsbild und der Integration in das umliegende Gewebe. Dass eine Differenzierung in Herzmuskelzellen möglich ist, konnte von Jackson et al 2001 anhand von spontan

migrierten Knochenmarkzellen (Jackson et al., 2001), sowie Orlic et al. die adulte Knochenmarkzellen in infarziertes Herzmuskelgewebe von Ratten transplantierten (Orlic et al., 2001), gezeigt werden.

Demgegenüber muss beachtet werden, dass verschiedene Arbeitsgruppen die Ausdifferenzierung autologer Knochenmarkzellen nicht nachweisen konnten (Murry et al., 2004; Balsam et al., 2004).

## **6.8 Applikationseffizienz und Verbleib von mononukleären und mesenchymalen Knochenmarkzellen nach Myokardinfarkt**

In den meisten klinischen Studien werden zum heutigen Zeitpunkt die Zellen intrakoronar appliziert, dies erfolgt nach Reperfusion des beeinträchtigten Herzkranzgefäßes. Die durch den Kathetereingriff minimal invasive Methode ermöglicht es die Zellen kurz nach akutem Myokardereignis zu transplantieren. Bei der hier durchgeführten Untersuchung zum Vergleich der intramyokardialen versus der intrakoronaren Applikation wurden die Bedingungen der klinischen Studien weitestgehend übernommen (Zellinjektion mehrere Tage nach Infarkt, mehrfache intrakoronare Zellinjektion), so dass hier erstmals ein valider Hinweis auf den Zellverbleib von mononukleären Knochenmarkzellen unter den Bedingungen der klinischen Studien vorgelegt werden kann.

Bei den bei permanentem LAD-Verschluss durchgeführten Untersuchungen, waren nach intramyokardialer Injektion der Zellen in das Infarkt- und Periinfarktareal etwa 20% der Zellen 24 Stunden nach Injektion noch szintigraphisch nachweisbar. Durch Rekanalisation des Infarktgefäßes 4 Stunden nach Ligatur, verringerte sich bei gleicher Applikationsart die Zahl der im Herzen verbleibenden Zellen auf etwa 16% nach 24 Stunden. Bei der intrakoronaren Injektion direkt ins rekanalisierte Infarktgefäß waren demgegenüber nur ca. 4% der Zellen nach 24 Stunden szintigraphisch nachweisbar.

Ähnliche Daten wurden von Hou et al. gefunden, die bei Schweinen eine vorübergehende Myokardischämie durch Ballonokklusion der LAD auslösten und anschließend circa  $2,6 \pm 0,3\%$  der intrakoronar applizierten Zellen im Herzen wiederfanden (Hou et al., 2005). Nach intramyokardialer Gabe wurden  $11 \pm 3\%$  der Zellen gefunden. Jedoch muss bei der Diskussion dieser Studie berücksichtigt werden, dass die Ischämiezeit nur 45 Minuten betrug, so dass keine transmurale Myokardschädigung entstanden sein kann. Darüber hinaus wurden mononukleäre

Zellen aus dem peripheren Blut verwendet, die unmittelbar nach Reperfusion des Gefäßes in nur einmaliger Injektion intrakoronar appliziert wurden.

Damit unterscheiden sich die Bedingungen, die von Hou et al. gewählt wurden deutlich von unseren Studienbedingungen und ebenso von den Bedingungen, klinischer Studien zur Zelltherapie (Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002; Wollert et al., 2004; Janssens et al., 2006).

Hofmann und Mitarbeiter haben in der BOOST-Studie, deren Studienbedingungen mit unseren vergleichbar waren, bei sechs Patienten den Verbleib der injizierten Knochenmarkzellen durch FDG-PET-Analyse bis zu einer Stunde nach Applikation verfolgt (Hofmann et al., 2005). Dabei fanden sie einen vergleichbaren Prozentsatz an im Herzen verbleibenden Zellen von 1,3 % bis 5,3 %. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen am Schwein fanden sich bei den Patienten der BOOST-Studie über 85% der Radioaktivität im Bereich der abdominalen Organe. Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen fanden sich etwa 50% der Zellen in den Lungen wieder. Ähnliches beobachteten auch Penicka et al. bei der Verfolgung von <sup>111</sup>Indium markierten Zellen (Penicka et al., 2005). Hier fand sich, dass 18 Stunden nach intrakoronarer Gabe bei Patienten mit Myokardinfarkt nur 1% der Zellen im Herzen nachweisbar waren. Durch Anreicherung der CD34-positiven Zellfraktion (n=3) konnte bei Hofmann et al. die Applikationseffizienz im Herzen auf 12% bis 21,3 % gesteigert werden (Hofmann, et al., 2005).

Zur Fragestellung des Verbleibs der applizierten Zellen außerhalb des Herzens, zeigte sich bei unseren Untersuchungen, dass bei reperfundiertem Infarktgefäß 24 Stunden nach intramyokardialer Gabe mehr als 80 % der Zellen außerhalb des Herzens zu finden waren. Der größte Teil an Radioaktivität ließ sich bei der intramyokardialen Applikationsart in der Lunge nachweisen (ca. 40%), gefolgt von der Leber mit ca. 17% und der Milz (ca. 5%). Nach intrakoronarer Gabe wurden nach 24 Stunden sogar bis zu 95% der Zellen außerhalb des Herzens gefunden (Lunge ca. 50%, Leber ca. 23%, Milz ca. 5%). Diese Zahlen unterscheiden sich deutlich von den in der klinischen Studie von Hoffmann et al. erhobenen Befunden, bei denen eine Stunde nach Zellapplikation mehr als 85% der Zellen intraabdominal in Milz und Leber gefunden wurden (Hofmann et al., 2005). Diese Diskrepanz kann einerseits durch Speziesunterschiede erklärt werden, aber auch auf die unterschiedliche Behandlung nach akutem Infarkt ereignis zurückgeführt werden. Es ist

wahrscheinlich, dass durch die Heparinisierung des Menschen zum Zeitpunkt der Zellapplikation die Gerinnung unterdrückt und somit nicht die Lunge als Thrombosefilter gewirkt hat und Milz und Leber viele Kreislaufpassagezyklen nutzen konnten um die Zellen aus dem Blut zu entfernen. Dies könnte auch durch die Untersuchung von Hou et al. bestätigt werden, die am Schweinemodell ebenso wie bei unsere Untersuchung den Großteil der extrakardialen Zellen in der Lunge nachweisen konnten, gefolgt von Leber und Milz (Hou et al., 2005).

Dow et al. haben den Zellverbleib neonataler Rattenkardiomyozyten nach Injektion in Ratten nach 60-minütiger Koronarokklusion und dreistündiger Reperfusion bzw. permanenter Koronarokklusion untersucht (Dow et al., 2005). Auch in dieser Studie wurde gefunden, dass weniger Zellen im Herzen verbleiben wenn eine Reperfusion stattfindet. Ebenso wurden die Spenderzellen bei allen Tieren in den Lungen und bei etwa der Hälfte der Tiere in der Leber, in den Nieren und in der Milz nachgewiesen.

Ciulla et al. untersuchten 2003 die Möglichkeit und Effizienz der intravenösen Knochenmarkzellapplikation im Vergleich zur intramyokardialen Injektion. 7 Tage nach der Zellapplikation konnten im Herzen markierte Knochenmarkzellen nur im infarzierten Gewebe entdeckt werden, im Schnitt lag deren Anzahl bei 8 Zellen pro Gewebeschnitt. In der Milz konnten durchschnittlich 3 gefärbte Zellen detektiert werden. Im Knochenmark der Empfängertiere konnten nach der Transplantation 0,8% gefärbter Zellen nachgewiesen werden. Jedoch wurden in anderen Zielorganen, wie Lunge, Leber und Niere keinerlei transplantierte Zellen nachgewiesen. Um diese Daten zu erklären, stellten Ciulla et al. die Hypothese einer Cytokin-Kaskade auf, welche die injizierten Zellen zum beschädigten Gewebe führen würde (Ciulla et al., 2003)

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sowie der vergleichbaren Studien zeigen, dass die Applikationseffizienz und die Zahl der verbleibenden Zellen am Herzen bei intramyokardialer Injektion deutlich höher liegen, als bei der intrakoronaren Injektion. Da in den klinischen Studien, in denen eine Verbesserung der Herzfunktion beobachtet wurde (Assmus et al., 2002; Wollert et al., 2004; Schächinger et al., 2005) die Zellen intrakoronar verabreicht wurden, muss überlegt werden, ob die Anwesenheit der Zellen für die Funktionsverbesserung überhaupt notwendig ist. Wenn diesbezüglich aber doch die Annahme besteht, scheint die intramyokardiale Injektion der intrakoronaren überlegen zu sein, welches beim klinischen Einsatz der Zelltherapie bedacht werden muss. Da hierzu noch keine eindeutigen Ergebnisse

vorliegen, sollte darüber nachgedacht werden, die Applikationseffizienz auch bei intrakoronarer Applikation zu verbessern. Dies könnte zum Beispiel durch langsamere Injektion der Zellen oder längere Ballonokklusion des Gefäßes während der Injektion erreicht werden. Da bislang die Applikationstechnik noch nicht genauer validiert wurde, müssen verschiedene Ansätze noch genauer untersucht werden, bevor über die optimale Applikationsmethode eine genaue Aussage getroffen werden kann.

## **6.9 Auswirkung der applizierten Zellen**

Die ursprüngliche Erwartung an die Zelltherapie war und ist, dass sich die applizierten Zellen in schlagende Herzmuskelzellen ausdifferenzieren. Diese Transdifferenzierung wurde anfangs von einigen Arbeitsgruppen gefunden (Orlic, et al., 2001, Shake et al.; 2002) aber im Laufe der Jahre mehrfach widerlegt. Derzeit wird davon ausgegangen, dass Knochenmarkszellen nicht in Myokardzellen ausdifferenzieren. Falls doch bei applizierten Zellen kardiale Marker gefunden wurden, wird von alternativen Mechanismen wie z.B Zellfusion ausgegangen (Terada et al, 2002, Alvarez-Dolado et al., 2003). Auch in den von uns durchgeführten Untersuchungen sind keine Hinweise dafür gefunden worden, dass sich die applizierten Zellen wirklich zu Herzmuskelzellen differenzieren können. Die Zellen, die sich histologisch der Herzstruktur angepasst hatten, waren lediglich im intakten Myokard angesiedelt.

24 Stunden nach intramyokardialer Injektion ins nicht reperfundierte Infarktgefäß, waren bis zu 20% der Zellen und nach 2 Wochen 11% der applizierten Zellen noch im Herzen zu finden. Übersetzt man diesen Prozentsatz der im Herzen wiedergefundenen Zellen in absolute Zellzahlen, so ergibt sich für unsere Versuche, dass von den  $40 \times 10^6$  injizierten Zellen 24 Stunden nach intramyokardialer Applikation etwa  $8 \times 10^6$  und nach 2 Wochen noch etwa  $4,4 \times 10^6$  der Zellen im Herzen nachweisbar waren. Nach intrakoronarer Applikation verbleiben nur noch etwa  $1,5 \times 10^6$  Zellen im Herzen. Selbst wenn all diese Zellen zu Kardiomyozyten (trans-) differenzierten, ist es angesichts der Zahl der im linken Ventrikel des Schweines normalerweise vorhandenen Kardiomyozyten (ca.  $10.000 \times 10^6$ ) nicht vorstellbar, dass eine solch geringe Zellzahl (etwa ein Promille) zu einer entscheidenden Verbesserung der Pumpfunktion führen kann. Auch aufgrund

unseres FDG-PET Befundes, in dem hinsichtlich der Größe des Infarktareals kein Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Ctx Gruppe gefunden wurde, muss angenommen werden, dass die applizierten Zellen keinen direkten Einfluss auf die Vitalität des nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgten Infarktareals haben.

Dennoch wurde in unseren Untersuchungen eine moderate Verbesserung der Pumpfunktion in der Ctx Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden. Falls sich diese und die in einigen experimentellen und klinischen Studien gezeigten Verbesserungen der LV-Pumpfunktion (Orlic et al., 2001; Assmus et al., 2002; Wollert et al., 2004; Schächinger et al., 2005) bestätigen sollten, muss ein anderer Wirkmechanismus als die Ausdifferenzierung in Kardiomyozyten postuliert werden. Abgeleitet von den in unseren und anderen Untersuchungen gefundenen Zellzahlen in Abhängigkeit der Zeit bestehen 2 Möglichkeiten für den Einfluss der applizierten Zellen auf das Infarktgewebe. Entweder hat die große Zellzahl, die kurz nach Applikation im Infarktgebiet vorhanden war eine hinreichende und andauernde Signalwirkung hinterlassen oder die wenigen im Infarktbereich verbliebenen Zellen haben das Potential über einen deutlich längeren Zeitraum zu wirken. Erstere Überlegung ist aufgrund des biologischen Potentials einer Zelle eher unwahrscheinlich.

Als mögliche Art der Zellkommunikation könnten parakrine Mechanismen eine Rolle spielen (Ciulla et al., 2003, Kinnaird et al., 2004b; Kinnaird et al., 2004a; Gneocchi et al., 2005). Auch Ciulla et al. stellten die Hypothese auf, dass eine Cytokin-Kaskade geeignet ist, Zellen in den geschädigten Bereich zu locken (Ciulla et al., 2003). Eine Art dieser parakrinen Botenstoffe, die diese Zellen aussenden könnten, sind die Angiogenesefaktoren. Mehrere Studien zeigen, dass in erster Linie eine Neovaskularisierung des infarzierten Myokards für die gefundene Regeneration des Herzgewebes verantwortlich ist (Takashahi et al., 1999; Asahara et al., 1999; Murohara et al., 2000; Kawamoto et al., 2001; Kocher et al., 2001). Kocher et al. haben zum Beispiel humane CD34+ Zellen 48 Stunden nach Infarktinduktion intravenös in Ratten injiziert. Sie fanden in der Ctx Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe einen Anstieg der Kapillardichte am Randgebiet und im infarzierten Bereich, wobei Kapillaren, welche das humane CD31 exprimierten, sich vorzugsweise im Zentrum des Infarktgebietes ansiedelten. Kapillaren welche das murine CD31 exprimierten siedelten sich mehr in der Randzone an. Funktionell

konnten eine signifikante Verbesserung der EF und eine Verminderung der Infarktgröße nachgewiesen werden (Kocher et al., 2001).

Es kann angenommen werden, dass durch die Neoangiogenese die Apoptose hypertrophierter Myozyten im Periinfarktareal eingeschränkt wird und es zu einer signifikanten Reduktion von Kollagenablagerungen und somit zu einer anhaltenden Verbesserung der Herzfunktion durch Minimierung der Narbenbildung kommt (Kawamoto et al., 2001; Kocher et al., 2001). Durch die Minimierung der Narbenbildung könnte es dann im längerfristigen Verlauf zur Reduktion des kardialen Remodellings und somit zur nachhaltigen Funktionsverbesserung kommen. Dies erklärt auch, dass neben Untersuchungen, die die Verbesserung der linksventrikulären Funktion relativ früh nach Myokardinfarkt und Transplantation von Skelettmyoblasten (Taylor et al., 1998; Menasché et al., 2001; Jain et al., 2001), Knochenmarkzellen (Orlic et al., 2001) und fetalen Kardiomyozyten (Soonpaa et al., 1994; Scorsin et al., 1997; Etzion et al., 2001) gefunden haben, dies auch bei Studien, die die Auswirkung der Zellen über einen längeren Zeitraum untersucht haben, nachweisbar war. Es gibt Studien, die nachweisen konnten dass die Zelltherapie auch einen langfristigen günstigen Einfluss auf die linksventrikuläre Funktion hat (Chen et al., 2004, Müller-Ehmsen, et al., 2002a, Schächinger et al., 2004, Wollert et al., 2004, ).

## **6.10 Zusammenfassung und Beurteilung**

Bei den Untersuchungen zum Thema "Transplantation autologer Knochenmarkzellen nach Myokardinfarkt am Schwein - Überleben, Differenzierung und funktioneller Einfluss" wurde am Schweineherzischämiemodell die Möglichkeit einer autologen Transplantation von aus dem Knochenmark gewonnenen, mononukleären Zellen evaluiert. Es wurden sowohl der Verbleib der Zellen nach intramyokardialer und intrakoronarer Injektion, als auch die Ausdifferenzierung der Zellen und der Einfluss auf die Funktion des durch einen Infarkt ischämisch geschädigten Schweinemyokards untersucht. Hierfür wurde bei insgesamt 29 Schweinen ein Infarkt induziert, dies erfolgte je nach Fragestellung entweder durch permanente Coronarokklusion oder durch reversible Ligatur der LAD. Die Injektion der Zellen wurde bei einem Teil der Tiere intramyokardial 14 Tage nach Infarktinduktion, sowie bei einer weiteren Tiergruppe intrakoronar in Anlehnung an die durchgeführten klinischen Studien mit intrakoronarer Injektion 5 Tage nach Infarkt durchgeführt.

Bei 15 Tieren erfolgte eine Untersuchung der Herzfunktion nach Knochenmarkzelltransplantation, hierfür wurden 9 Tieren mononukleäre Zellen und 6 Tieren zellfreies Medium intramyokardial injiziert. Bei einer Untergruppe von 6 Tieren aus den 15 Tieren (3 Ctx, 3 Placebo) wurde zusätzlich zu der Lävangiographie eine FDG-PET Untersuchung durchgeführt. Bei einer weiteren Tiergruppe (n=5) wurden die Zellen vorab mit Gold sowie Hoechst Dye markiert und bis zu einem Zeitraum von 8 Wochen histologisch nachgewiesen. Für die Darstellung des Zellverbleibs nach intramyokardialer (n=6) oder intrakoronarer (n=3) Injektion wurden bei 9 Schweinen  $\text{In}^{111}$  markierter mononukleäre Zellen injiziert.

Trotz einer histologisch nicht nachweisbaren Ausdifferenzierung der Zellen, war in der mit mononukleären Zellen behandelten Gruppe eine Verbesserung der LV-Auswurfraction (globale Funktion) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Medium Injektion) nachweisbar. Bezüglich der Größe des Infarktes wie auch für die regionale Wandbewegung konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Bei szintigraphischen sowie histologischen Untersuchungen in der Gruppe mit permanentem LAD-Verschluss durch Coilembolisation und bei intramyokardialer Injektion der Zellen in das Infarkt- und Periinfarktareal konnten szintigraphisch immer noch etwa 20% der Zellen 24 Stunden nach Injektion im Herzen nachgewiesen werden. In der histologischen Untersuchung konnte nach 2 Wochen ein Prozentsatz von  $11,8 \pm 1,3\%$  der ursprünglich  $40 \times 10^6$  injizierten Zellen nachgewiesen werden. Die applizierten Zellen konnten bis zu 8 Wochen im Infarktareal gefunden werden. Ein großer Teil der wiedergefunden markierten Zellen wies morphologisch deutliche Schäden auf.

Bei den durchgeführten Untersuchungen waren bei permanentem LAD-Verschluss und intramyokardialer Injektion der Zellen in das Infarkt- und Periinfarktareal etwa 20% der Zellen 24 Stunden nach Zellinjektion noch szintigraphisch nachweisbar. Wenn das Infarktgefäß 4 Stunden nach Ligatur rekanalisiert wurde, verringerte sich bei gleicher Applikationsart die Zahl der im Herzen verbleibenden Zellen auf etwa 16% nach 24 Stunden. Bei der intrakoronaren Injektion direkt ins rekanalisierte Infarktgefäß konnten nur noch ca. 4% der Zellen nach 24 Stunden szintigraphisch nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit, dass eine kardiale Zelltherapie auch beim Schwein mit einer geringen Verbesserung der globalen LV-

Pumpfunktion verbunden sein kann. Beim Einsatz von Knochenmarkzellen verbleiben jedoch nur wenige Zellen kurz-, mittel- und langfristig vor Ort, und die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen machen eine Transdifferenzierung der applizierten Zellen zu Myokardzellen unter den hier eingesetzten Untersuchungsbedingungen eher unwahrscheinlich.

Das Fehlen von Nachweisen, dass sich Knochenmarkzellen zu Kardiomyozyten ausdifferenzieren sowie das Fehlen einer Revitalisierung des infarzierten Areals gemeinsam mit der geringen Menge an im Herzen verbleibenden Zellen, lässt schlussfolgern, dass eine Regeneration des infarzierten Myokards nicht erfolgt ist, sondern alternative Mechanismen für die beobachtete Funktionsverbesserung verantwortlich waren. Es sind demnach weitere Untersuchungen notwendig, um die genaue Auswirkung autologer Knochenmarkzellen auf das Myokard zu erklären. Erst nach Beendigung der aktuellen großen randomisierten und Placebo-kontrollierten Multicenterstudien kann das wahre Potential einer Knochenmarkzelltherapie zur Behandlung des Myokardinfarktes beurteilt werden.

### **6.11 Summary and conclusion**

Cell therapy is seen as a novel promising therapy for myocardial infarction. In contrast to the current therapeutic options aiming at revascularization, attenuation of myocardial loss and treatment of consecutive heart failure, the aim of cardiac cell therapy is to regenerate injured myocardium and replace cells that were lost by ischemia.

The study of „Bone Marrow Cell Transplantation following Myocardial Infarct of Pigs– Survival, Differentiation and Functional Impact“ evaluated the possibility of autologous transplantation of bone marrow generated mononuclear cells on a pig myocardial ischemia model. The study monitored the survival and persistence of mononuclear (MNC) bone marrow cells after intramyocardial or intracoronary application into infarcted hearts and investigated whether a global/general or regional functional improvement could be observed. In 29 pigs myocardial infarction was induced by either permanent coil embolisation or reversible ligation of the LAD. In one part of the test group the cell injection was performed intramyocardial 14 days after myocardial infarction, for a smaller number of the test animals the cells were

applied intracoronary 5 days after myocardial infarction in conjunction with the clinical studies of intracoronary application.

In the group of 15 pigs with permanent occlusion of the left anterior descending coronary artery (LAD), the functional impact of treatment with mononuclear bone marrow cells was investigated. Mononuclear cells were injected into 9 animals in comparison to medium control (n=6) and levangiography was performed. In 6 pigs (3 Ctx, 3 Placebo) out of the 15 animals an additional FDG-PET analysis was done. To investigate the persistence and differentiation of the cells, gold and Hoechst Dye labelled cells were injected into another group of animals (n=5) and histologically observed for up to 8 weeks. To investigate cell persistence after intramyocardial (n=6) or intracoronary (n=3) injection, In111 labeled mononuclear cells were injected into a group of 9 pigs.

Despite a histologically not detectable differentiation of the injected cells a trend towards stabilization of LV ejection fraction was observed 2 weeks after direct intramyocardial MNC injection (n=9) in comparison to medium control (n=6). This was mainly due to increased stroke volume in the cell-treated animals, however, other parameters, such as regional wall motion and scar size (18F-FDG-PET analysis) of the tissue remained unaltered.

Cell persistence was also tested in pigs with myocardial infarction; both semi quantitatively by histology and quantitatively by scintigraphy in the group of permanent coil occlusion of the LAD and intramyocardial injection. Scintigraphy showed, 20% of the cells continuing intact 24 h after direct cell injection (open thorax, 111Indium- labelled cells) into the infarct and periinfarct area. 2 weeks after cell injection 11.8±1.3% of the injected  $40 \times 10^6$  cells could be traced with histological semi quantitative analysis (Gold and Hoechst Dye labelling, same infarct and injection modalities). The applied cells were found up to 8 weeks in the infarcted area. The majority of the retraced cells showed large morphological damages. In the setting of acute myocardial infarction (LAD- occlusion) and reperfusion (after 4 h), 111Indium- labelled cells were applied by either intracoronary (n=3) or intramyocardial (n=3) injection and monitored up to 24 h. During this time, more cells remained in the heart after intramyocardial (16%) than after intracoronary injection (4%).

In conclusion the data shows that cardiac autologous cell therapy can go along with a small functional benefit of the global LV function. However, cell survival and cardiac persistence of autologous mononuclear bone marrow cells are poor. This is the case independently from application time, but with intramyocardial injection proving more effective than intracoronary injection. The histological results make it unlikely that under the conditions of this study a transdifferentiation of the applied cells to myocardial cells took place.

Due to the lack of proof that bone marrow cells can differentiate into cardiomyocytes and the absence of revascularisation of the infarcted area combined with the low amount of intracardial persisting cells, it can be concluded that a regeneration of the infarcted myocardium has not occurred, and alternative mechanisms were responsible for the observed functional improvement. Further studies are necessary to explain the correct impact of autologous bone marrow cells on the myocardium. Only after the completion of the ongoing randomised, placebo controlled multicenter studies, the true potential of the bone marrow cell therapy to treat myocardial infarction can be judged.

## 7 LITERATUR

Adonai N, Nguyen KN, Walsh J, Iyer M, Toyokuni T, Phelps ME, McCarthy T, McCarthy DW, Gambhir SS. Ex vivo cell labeling with  $^{64}\text{Cu}$ -pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 99(5):3030-5.

Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, Eckey T, Henze E, Zeiher AM, Dimmeler S. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation*. 2003 07(16):2134-9.

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003 Oct 30;425(6961):968-73.

American Heart Association Statistic Updates, Dallas, 2003.

Andersen HR, Nielsen TT, Rasmussen K, Thuesen L, Kelbaek H, Thayssen P, Abildgaard U, Pedersen F, Madsen JK, Grande P, Villadsen AB, Krusell LR, Haghfelt T, Lomholt P, Husted SE, Vigholt E, Kjaergard HK and Mortensen LS. A comparison of coronary angioplasty with fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003 349:733-42.

Appelbaum FR. Perspectives on the future of chronic myeloid leukemia treatment. *Semin Hematol*. 2001 38(3 Suppl 8):35-42.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 275(5302):964-7.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999 85, 221-28.

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO Journal*. 1999b 18: 3964- 72.

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

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL and Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004 428:668-73.

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003 108(7):863-8.

Bischoff R. Cell cycle commitment of rat muscle satellite cells. *J Cell Biol*. 1990 111(1):201-7. PMID: 2365732.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001 19(3):180-92.

Botti C, Negri DR, Seregini E, Ramakrishna V, Arienti F, Maffioli L, Lombardo C, Bogni A, Pascali C, Crippa F, Massaron S, Remonti F, Nerini-Molteni S, Canevari S, Bombardieri E. Comparison of three different methods for radiolabelling human activated T lymphocytes. *Eur J Nucl Med*. 1997 24(5):497-504.

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000 290(5497):1775-9.

Brenner W, Vernon C, Muzi M, Mankoff DA, Link JM, Conrad EU, Eary JF. Comparison of different quantitative approaches to <sup>18</sup>F-fluoride PET scans. *J Nucl Med*. 2004 45(9):1493-500.

Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, Zhang JJ, Lin S, Liao LM, Zhao RC. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*. 2004 Oct 117(10):1443-8.

Chin BB, Nakamoto Y, Bulte JWM, Pittenger MF, Wahl R, Kraitchman DL. 111Indium oxine labelled mesenchymal stem cell SPECT after intravenous administration in myocardial infarction. *Nuclear Medicine Communications*. 2003 24:1149-1154.

Christensen MM, Danscher G, Ellermann-Eriksen S, Schiønning JD, Rungby J. Autoradiographic silver-enhancement of colloidal gold particles used to label phagocytic cells. *Histochemistry*. 1992 97(3):207-11

Ciulla MM, Lazzari L, Pacchiana R, Esposito A, Bosari S, Ferrero S, Gianelli U, Paliotti R, Busca G, Giorgetti A, Magrini F, Rebulli P. Homing of peripherally injected bone marrow cells in rat after experimental myocardial injury. *Haematologica*. 2003 Jun 88(6):614-21

Dieterlen-Lievre F, Paradanaud L, Bollerot K, Jaffredo T. Hemangioblasts and hemopoietic stem cells during ontogeny. *Comptes Rend Biol*. 2002 325: 1013- 1020

Dickhuth H-H, Badtke G, *Sportmedizin für Ärzte*. Deutscher Ärzteverlag, 2007

Dow J, Simkhovich BZ, Kedes L and Kloner RA. Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy. *Cardiovasc Res*. 2005 67:301-307.

Dow JS, Hale SL and Kloner RA. Can moderate alcohol intake limit the size of myocardial infarction? *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001 37:662-667.

Druker BJ. Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. *Eur J Cancer*. 2002 Sep 38 Suppl 5:S70-6.

Dumont EA, Hofstra L, Van Heerde WL, Van Den Eijnde S, Doevendans PA, Demuinck P, Daemen MA, Smits F, Frederik P, Wellens HJ, Daemen HJ and Reutlingsperger CP. Cardiomyocyte death induced by myocardial ischemia and reperfusion: measurement with recombinant human annexin-V in a mouse model. *Circulation*. 2000 102, 1564-1568.

Engelhardt VW., Breves G. Physiologie der Haustiere Enke Verlag, Stuttgart 2000 137, 283.

Etzion S, Battler A, Barbash IM, Cagnano E, Zarin P, Granot Y, Kedes LH, Kloner RA and 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.

Fallavollita JA, Perry BJ, Canty JM Jr. 18F-2-deoxyglucose deposition and regional flow in pigs with chronically dysfunctional myocardium. Evidence for transmural variations in chronic hibernating myocardium. *Circulation*. 1997 95(7):1900-9.

Feneis H, Dauber W. Pocketatlas of the human anatomy-4th edition Based on the International Nomenclature. Thieme, New York, USA, 2000.

Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Zuzarte M, Lutjens P, Muller R, Havemann K Dendritic cells derived from peripheral monocytes express endothelial markers and in the presence of angiogenic growth factors differentiate into endothelial-like cells. *Eur J Cell Biol*. 2001 80: 99- 110.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998 Mar 279(5356):1528-30. Erratum in: *Science* 1998 Aug 281(5379):923.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968 Mar 6(2):230-47.

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

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR 2(+) AC 133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001, 88(2): 167-74.

Giugliano RP, Braunwald P, Selecting the best reperfusion strategy in ST-elevation myocardial infarction: it's all a matter of time. *Circulation*. 2003 108, 2828-2830.

Gluckman, E, Broxmeyer H, Auerbach H. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA identical sibling. *New England Journal of Medicine*. 1989 321, 1174.

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

Goodchild T, Pang W, Tondato F, Cui J, Otsuka Y, Frowein S, Ungs M, Robinson K, Poznansky M, Chronos N. Safety of intramyocardial injection of autologous bone marrow cells to treat myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Revasc Med*. 2006 Jul-Sep 7(3):136-45.

Goodell MA. Stem cells: is there a future in plastics? *Curr Opin Cell Biol*. 2001 Dec 13(6):662-5.

Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*. 2006 Apr 440(7088):1199-203.

Guo Z, Yang J, Liu X, Li X, Hou C, Tang PH, Mao N. Biological features of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Chin Med J (Engl)*. 2001 Sep 114(9):950-3.

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.

Hamm CW. Guidelines: acute coronary syndrome (ACS). 1: ACS without persistent ST segment elevations. *Z Kardiol*. 2004a 93:72-90.

Hamm CW. Guidelines: Acute coronary syndrome (ACS). II: Acute coronary syndrome with ST-elevation. *Z Kardiol*. 2004b 93:324-341.

Harousseau JL, Attal M, Divine M, Marit G, Leblond V, Stoppa AM, Bourhis JH, Caillot D, Boasson M, Abgrall JF, et al. Autologous stem cell transplantation after first remission induction treatment in multiple myeloma. A report of the French Registry on Autologous Transplantation in Multiple Myeloma. *Stem Cells*. 1995 Aug 13 Suppl 2:132-9.

Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, Grove JE, Van Arnam JS, Krause DS. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*. 2004 Jul 305(5680):90-3.

Schelbert HR, Beanlands R, Bengel F. American Society of Nuclear Cardiology Practice Guidelines: PET Myocardial Glucose Metabolism and Perfusion Imaging, Part 2 – Guidelines for interpretation and reporting. *J Nucl Cardiol*. 2003 10: 557 – 571

Henning RJ, Abu-Ali H, Balis JU, Morgan MB, Willing AE, Sanberg PR. Human umbilical cord blood mononuclear cells for the treatment of acute myocardial infarction. *Cell Transplant*. 2004 13(7-8):729-39.

Henning RJ, Burgos JD, Ondrovic L, Sanberg P, Balis J, Morgan MB. Human umbilical cord blood progenitor cells are attracted to infarcted myocardium and significantly reduce myocardial infarction size. *Cell Transplant*. 2006 15(7):647-58.

Herold G. *Innere Medizin*. Köln, 2007 S. 210.

Hill JM, Dick AJ, Venkatesh KR, Thompson RB, Yu Z, Hinds KA, Pessanha BSS, Guttman MA, Varney TR, Martin BJ, Dunbar CE, McVeight ER, Lederman RJ, Serial Cardiac Magnetic Resonance Imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation*. 2003 108:1009-1014.

Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH and Drexler H, Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*. 2005 111:2198-2202.

Hort W, Arnold G. *Durchblutungsstörungen des Myokards*. Pathologische Anatomie des Herzens und seiner Hüllen. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 2000: 659-666.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999 Mar 5(3):309-13.

Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, Yeung AC, Johnstone BH, Yock PG, March KL. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intrakoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*. 2005 112:1150-1156.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001 107:1395-1402.

Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, Ngoy S, Teller P, Edge AS, Zawadzka A, Wetzel K, Sawyer DB, Colucci WS, Apstein CS and Liao R. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation*. 2001 103:1920-1927.

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 and Van de WF. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006, 367:113-121.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 418(6893):41-9.

Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, Nurzynska D, Kasahara H, Zias E, Bonafé M, Nadal-Ginard B, Torella D, Nascimbene A, Quaini F, Urbanek K, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res*. 2005 96(1):127-37.

Kawamoto AH, Gwon HC, Iwaguro H, Yamagushi YI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM and Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001 103, 634-637

Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Araúzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Schöler HR. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008 Jul 454 (7204):646-50.

Koch T, Berg R: *Lehrbuch der Veterinäranatomie Band III. Die großen Versorgungs- und Steuerungssysteme.* Gustav Fischer Verlag 1993, Jena Stuttgart

Kocher, AA, Schuster MD, Szabolca MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NN, Itescu S. 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

Kraitchman DL, Bluemke DA, Chin BB, Heldman AW, Heldman AW. A minimally invasive method for creating coronary stenosis in a swine model for MRI and SPECT imaging. *Invest Radiol.* 2000 Jul 35(7):445-51.

Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, Hare JM, Bulte JW. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation.* 2003 May 13;107(18):2290-3.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001 May 4;105(3):369-77.

Keeley EC, Boura JA and Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet.* 2003 361:13-20.

Kessler PD and Byrner BJ: Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol.* 1999 61, 219-242

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S and Epstein SE Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004a 94:678-685.

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S and Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004b 109:1543-1549.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 96(19):10711-6

Lacaud G, Robertson S, Palis J, Kennedy M, Keller G. Regulation of hemangioblast development. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Jun 938:96-107

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000 Nov;6(11):1212-3.

Laugwitz KL, Moretti A, Caron L, Nakano A, Chien KR Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development*. Jan 2008 135(2):193-205

Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E and Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 100:7808-7811.

Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Rao V and Jia ZQ. Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Ann Thorac Surg*. 2001 72:1957-1963.

Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Zhang J and Mohabeer MK In vivo survival and function of transplanted rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1996 78:283-288.

Li X, Zhu L, Chen X, Fan M. Effects of hypoxia on proliferation and differentiation of myoblasts. *Med Hypotheses*. 2007;69(3):629-36.

Liu J, Hu Q, Wang Z, Xu C, Wang X, Gong G, Mansoor A, Lee J, Hou M, Zeng L, Zhang JR, Jerosch-Herold M, Guo T, Bache RJ, Zhang J. Autologous stem cell transplantation for myocardial repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Aug;287(2):H501-11.

Liesveld JL, Rosell K, Panoskaltsis N, Belanger T, Harbol A, Abboud CN. Response of human CD34+ cells to CXC, CC, and CX3C chemokines: implications for cell migration and activation. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001 10(5):643-55.

Litvak J, Siderides LE, Vineberg AM. The experimental production of coronary artery insufficiency and occlusion. *Am Heart J*. 1957 Apr 53(4):505-18.

Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H and Forfang K. Effects on left ventricular function by intrakoronary injections of autologous mononuclear bone marrow cells in acute anterior wall myocardial infarction: the ASTAMI randomized controlled trial. *Circulation* 112(21), 3364. 2005.

Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grøgaard HK, Bjørnerheim R, Brekke M, Müller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 355(12):1199-209

Ma N, Ladilov Y, Kaminski A, Piechaczek C, Choi YH, Li W, Steinhoff G, Stamm C.1: Umbilical cord blood cell transplantation for myocardial regeneration. *Transplant Proc*. 2006 Apr 38(3):771-3

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999 Mar 103(5):697-705.

Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*. 2003 Sep 9(9):1195-201

Manz MG, Akashi K, Weissmann IL. Biology of hematopoietic stem and progenitor cells. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR (Hrsg.). *Thomas' hematopoietic cell*

transplantation. 3. Auflage. Blackwell Publishing. Malden, Oxford, Carlton. 2004 69-95

Marelli D, Desrosiers C, el Alfy M, Kao RL and Chiu RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992 1:383-390.

Mauro A, Adams WR. The structure of the sarcolemma of the frog skeletal muscle fiber. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961 Aug;10(4)Suppl:177-85.

Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction *Cardiovasc Res* 1987., 21(10):737-46

Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001 357:279-280.

Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008 Mar 4;117(9):1189-200

Meyer J, Gross R, Schölmerich P, Gerok W. Koronargefäßerkrankung In: Schölmerich P, Gross R, Gerok W, Meyer J. (Hrsg.): *Die innere Medizin Schattauer Verlag, Stuttgart, New York* 1994: 205-230

Moelker AD, Baks T, Wever KM, Spitskovsky D, Wielopolski PA, van Beusekom HM, van Geuns RJ, Wnendt S, Duncker DJ, van der Giessen WJ. Cardiology, Thoraxcenter, Erasmus MC Rotterdam, Rotterdam, The Netherlands. Intracoronary delivery of umbilical cord blood derived unrestricted somatic stem cells is not suitable to improve LV function after myocardial infarction in swine. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Apr;42(4):727-9.

Morizono K, De Ugarte DA, Zhu M, Zuk P, Elbarbary A, Ashjian P, Benhaim P, Chen IS, Hedrick MH. Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles *Hum Gene Ther.* 2003 14(1):59-66

Müller P, Pfeiffer P, Koglin J, Schäfers HJ, Seeland U, Janzen I, Urbschat S, Böhm M. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation*. 2002 Jul 2;106(1):31-5.

Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Schenk K, Burst V, Fries JW, Hescheler J, Schwinger RHG. Survival and organ distribution of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells after transplantation in acute and chronic myocardial infarction in rats. *European Heart Journal*. 2005a 26(suppl.1), 531 Abstract.

Müller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, Whittaker P, Dow JS, Long TI, Laird PW and Kloner RA Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation* 2002a 105:1720-1726.

Müller-Ehmsen J, Schmidt A, Krausgrill B, Schwinger RH and Bloch W Role of erythropoietin for angiogenesis and vasculogenesis: from embryonic development through adulthood. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 290:H331-H340.

Müller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, Laird PW and Kedes L. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2006 34:107-116.

Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, Schenk K, Neisen UC, Fries JW, Fleischmann BK, Hescheler J, Schwinger RH. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2006 Nov 41(5):876-84.

Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000 Jun 105(11):1527-36.

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

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

Näslund U, Häggmark S, Johansson G, Marklund SL, Reiz S. A closed-chest myocardial occlusion-reperfusion model in the pig: techniques, morbidity and mortality. *Eur Heart J*. 1992 Sep 3(9):1282-9.

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK and 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.

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

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001b Aug 28;98(18):10344-9.

Penicka M, Widimsky P, Kobylka P, Kozak T and Lang O Images in cardiovascular medicine. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcatheter transplantation in a patient with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2005 112:e63-e65.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr ;284(5411):143-7.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004, 109(10):1292-8

Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977 56(5):786-94

Reinecke H, Minami E, Poppa V, Murry CE. Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells. *Circ Res*. 2004 Apr 2;94(6):e56-60

Roth DM, White FC, Mathieu-Costello O, Guth BD, Heusch G, Bloor CM, Longhurst JC. Effects of left circumflex Ameroid constrictor placement on adrenergic innervation of myocardium. *Am J Physiol*. 1987 Dec 253(6 Pt 2):H1425-34.

Schächinger V, Assmus B., Zeiher A.M. Stammzelltherapie bei ischämischer Herzkrankheit *Kliniker* 2004 33 (3): 68–73

Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey D, Hamm C, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S and Zeiher AM. Intracoronary infusion of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: a randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial (REPAIR-AMI). *Circulation* 2005 112(21), 3362.

Schaper W., Jageneau A., Xhonneux R. The development of collateral circulation in the pig and dog heart. *Cardiologia*. 1967, 51(6):321-35

Scheunert A, Trautmann A. *Lehrbuch der Veterinärphysiologie*, 7.Auflage Paul Parey Berlin, Hamburg 1987 217: 258-259

Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord- like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 2001 49: 671- 680

Schmidt A, Ladage D, Steingen C, Brixius K, Schinköthe T, Klinz FJ, Schwinger RH, Mehlhorn U, Bloch W. Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. *Eur J Cell Biol*. 2006 Nov 85(11):1179-88.

Schummer A, Habermehl KH. Blutgefäße, Bau und Funktion In: Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (Hrsg.): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band III, 2.Auflage Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1984: 9

Scorsin M, Hagege AA, Marotte F, Mirochnik N, Copin H, Barnoux M, Sabri A, Samuel JL, Rappaport L and Menasche P. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium? *Circulation*. 1997 96:II-188-93.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002 Jun 73(6):1919-25

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995 376: 62- 66

Sheehan FH, Bolson EL, Dodge HT, Mathey DG, Schofer J and Woo HW. Advantages and applications of the centerline method for characterizing regional ventricular function. *Circulation*. 1986 74:293-305.

Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT, Perin EC. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005 Jan 18;111(2):150-6.

Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG and Field LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*. 1994 264:98-101.

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

Statistisches Bundesamt. Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht (abgerufen am 13. Juni 2006.) Website des Statistischen Bundesamtes Deutschland

Bacharach SL, Bax JJ, Case J. American Society of Nuclear Cardiology Practice Guidelines: PET Myocardial Glucose Metabolism and Perfusion Imaging, Part 1 - Guidelines for patient preparation and data acquisition. *J Nucl Cardiol.* 2003 10: 543 – 554

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G and Wernet P. Intrakoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr.* 2001 126:932-938.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G , Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intrakoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002 106:1913-1918.

Strauss LC, Trischmann TM, Rowley SD, Wiley JM, Civin CI. Selection of normal human hematopoietic stem cells for bone marrow transplantation using immunomagnetic microspheres and CD34 antibody. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1991 Summer;13(2):217-21.

Swindle MM. Swine as replacements for dogs in the surgical teaching and research laboratory. *Lab Anim Sci.* 1984, 34(4):383-5

Swindle MM, Horneffer PJ, Gardner TJ, Gott VL, Hall TS, Stuart RS, Baumgartner WA, Borkon AM, Galloway E, Reitz BA. Anatomic and anesthetic considerations in experimental cardiopulmonary surgery in swine. *Lab Anim Sci.* 1986 Aug 36(4):357-61

Swindle MM, Smith AC, Hepburn B.J. Swine as models in experimental surgery *J Invest Surg.* 1988 1(1):65-79

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

Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006 Aug 30(2):353-61.

Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD and Kraus WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998 4:929-933.

Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002 Apr 16(6880):542-5.

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002 Jan 105(1):93-8.

Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*. 1999 Nov 100(19 Suppl):247-56

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

Vale PR, Losordo DW, Tkebuchava T, Chen D, Milliken CE, Isner JM. Catheter-based myocardial gene transfer utilizing nonfluoroscopic electromechanical left ventricular mapping. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Jul 34(1):246-54.

Vogelstein B, Goodman CS, Graybiel AM et al., (Committee on the biological and biomedical applications of stem cell research; Board on life sciences national research council; Board on neuroscience and behavioral health institute of medicine) Stem cells and the future of regenerative medicine. 2001 National Academy Press. Washington DC

Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*. 2004 Mar 363(9411):783-4

Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Oct 122(4):699-705.

White FC, Roth DM, Bloor CM. The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. *Lab Anim Sci.* 1986 36(4):351-6

Winkhard M. In: *Das Herzkatheterlabor Einführung in die Aufgabenbereiche des kardiologischen Assistenzpersonals* Steinkopffverlag, Darmstadt, 2005

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

Yamada Y, Wang XD, Yokoyama S, Fukuda N, Takakura N. Cardiac progenitor cells in brown adipose tissue repaired damaged myocardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Apr 342(2):662-70.

Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flk1- positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000 408: 92- 96

Zuk PA., Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso YC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells *Molecular Biology of the Cell* 2002 13: 4279–4295

## 8 ANHÄNGE

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

ADC	Adipose tissue derived stem cell
APV	Average peak velocity
BNP	Brain-natriuretic-peptid
BrdU	Bromodeoxyuridin
CK:	Creatinin Kinase
Ctx	Zelltransplantation
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindole
DIL	1,1'-Dioctadecyl-1-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyaninperchlorat
Dist	distalis
$dp/dt_{max}$	Druckanstiegsgeschwindigkeit
EF	Ejektionsfraktion
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
EtCO <sub>2</sub>	expiratorischer CO <sub>2</sub>
FCS	Fetales Kälberserum
FDG-PET	<sup>18</sup> F-FDG (2-[ <sup>18</sup> F] fluoro-2- deoxy-D-Glukose)
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IfEM	Institut für Experimentelle Medizin
KGW	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KMZ	Knochenmarkzellen
LAD	Left anterior descending coronary artery
LAO	Left anterior oblique
LCA	Linke Koronararterie
LCX	Left circumflex coronary artery
LVEDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVEF	linksventrikuläre Auswurfraction
LVESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVSV	Schlagvolumen
MI	Myokardinfarkt
MNC	Mononukleäre Zellen

MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
PARP	Poly-(ADP-. Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
Prox	proximalis
R	Ramus
RCA	rechte Koronararterie
RCX	Ramus circumflexus
RAO	Right Anterior Oblique
RIVA	Ramus interventricularis anterior (RIVA)
SEM	standard error of the mean
SPECT	Single photon emission computed tomography
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WMSI	Wall motion score index
<sup>99m</sup> Tc	<sup>99m</sup> Technetium
<sup>111</sup> In	<sup>111</sup> Indium

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

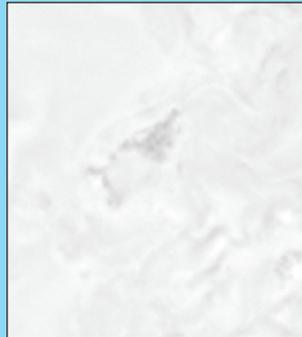
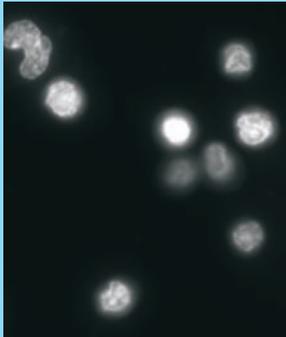
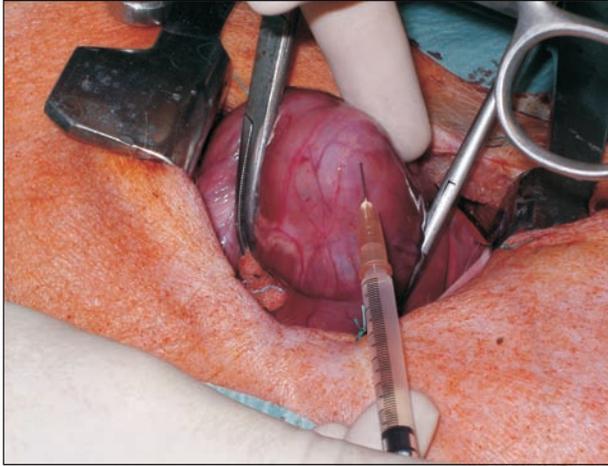
Abbildung 1: Koronararterien eines Schweineherzens .....	12
Abbildung 2: Versuchsablauf für die Tiergruppe zur funktionellen Analyse nach Transplantation autologer mononukleärer Zellen in infarziertes Schweinemyokard (Projektteil A).....	36
Abbildung 3: Versuchsablauf für den Projektteil B2 Coil zur szintigraphischen Darstellung des Verbleibs autologer In <sup>111</sup> markierter mononukleärer Zellen nach intramyokardialer Transplantation in durch permanente Coilokklusion infarziertes Schweinemyokard (3 Tiere).....	38
Abbildung 4: Versuchsablauf für den Projektteil B2 Ligatur zur szintigraphische Darstellung des Verbleibs autologer In <sup>111</sup> markierter mononukleärer Zellen nach intrakoronarer oder intramyokardialer Transplantation in durch reversible Ligatur der LAD infarziertes Schweinemyokard (6 Tiere) .....	38
Abbildung 5: Koronarangiographie vor (A) und nach (B) Coil- Okklusion der distalen LAD beim Schwein. ....	41
Abbildung 6: Schichtung von heparinisiertem Vollblut nach Dichtegradientenzentrifugation .....	43
Abbildung 7: Applikation der mononukleären Zellen in das (Peri-) Infarktgewebe....	47
Abbildung 8: Messung der linksventrikulären Ejektionsfraktion Links: Enddiastole; Rechts: Endsystole.....	49
Abbildung 9 Aufteilung und Benennung der 10 Blöcke des Infarktareals und der Infarkttrandzone (grauer Kreis) nach Zelltransplantation, die roten Kreuze stellen die applizierten Fäden dar. ....	53
Abbildung 10: Darstellung der Schnitttechnik pro Gewebeblock .....	54
Abbildung 11: Histologische Darstellung der mit kolloidalem Gold markierten Zellen .....	54
Abbildung 12: Mittelwerte und SEM der Ejektionsfraktion von den Untersuchungszeitpunkten vor MI (linkes Balkenpaar) und 14 Tage nach MI (rechtes Balkenpaar) für alle Tiere der Gruppe II (n=15). Die schraffierten Balken stellen die rechtsanteriore Projektion (RAO) dar, die gepunkteten die linksanteriore Projektion (LAO). Die Abnahme von vor MI zu nach MI war mit $p < 0,001$ signifikant, zwischen LAO und RAO besteht kein Unterschied.....	61
Abbildung 13: Linksventrikuläre Auswurffraktion (RAO 60) der Kontrollgruppe (linke Gruppe, grau) und der Ctx-Gruppe (rechte Gruppe, schwarz) jeweils vor Infarkt (linke Säule), 2 Wochen nach Infarkt (mittlere Säule) und 2 Wochen nach Zell- oder Mediuminjektion (rechte Säule). ....	63
Abbildung 14: Linksventrikuläre Auswurffraktion (LAO 30) der Kontrolltiere (linke Gruppe, grau) und der zelltherapierten Tiere (rechte Gruppe, schwarz) jeweils vor Infarkt (linke Säule), 2 Wochen nach Infarkt (mittlere Säule) und 2 Wochen nach Zell- oder Mediuminjektion (rechte Säule). ....	63
Abbildung 15: Unterschied der LVEDV, LVESV, LVSV bezogen auf das jeweilige Körpergewicht nach Medium/Ctx und nach MI (Differenz) in der RAO Projektion. Die grau karierten schraffierten Balken stellen die Tiere der Kontrollgruppe (n=6) dar, und die schwarz schraffierten Balken die Tiere der Ctx-Gruppe (n=9).....	65
Abbildung 16: Unterschied der LVEDV, LVESV, LVSV bezogen auf das jeweilige Körpergewicht nach Medium/Ctx und nach MI (Differenz) in der LAO Projektion. Die grau karierten Balken stellen die Tiere der Kontrollgruppe (n=6) dar, und die schwarz schraffierten Balken die Tiere der Ctx-Gruppe (n=9).....	66

Abbildung 17: Unterschied der EF nach Medium/Ctx und nach MI (Differenz) in der RAO (linkes Balkenpaar) und LAO (rechtes Balkenpaar) Projektion. Die grau schraffierten Balken stellen die Tiere der Kontrollgruppe (n=6) dar, und die schwarz schraffierten Balken die Tiere der Ctx-Gruppe (n=9) dar.....	66
Abbildung 18: Unterschied des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) (linkes Balkenpaar) und der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt <sub>max</sub> ) (rechtes Balkenpaar) nach Medium/Ctx und nach MI (Differenz). Die grau karierten Balken stellen die Tiere der Kontrollgruppe (n=6), und die schwarz schraffierten Balken die Tiere der Ctx-Gruppe (n=9) dar.....	67
Abbildung 19: Analyse der regionalen Wandbewegung in RAO 60 mit der Centerline- Methode nach Sheehan (Sheehan, et al., 1986) bei Schweinen, denen 2 Wochen nach Myokardinfarkt entweder Medium (links) oder autologe mononukleäre Knochenmarkzellen (rechts) injiziert wurden. Das Infarktareal befindet sich etwa zwischen Teilsegment 50 und 90.....	68
Abbildung 20: Analyse der regionalen Wandbewegung in LAO mit der Centerline- Methode nach Sheehan (Sheehan, et al., 1986) bei Schweinen, denen 2 Wochen nach Myokardinfarkt entweder Medium (links) oder autologe mononukleäre Knochenmarkzellen (rechts) injiziert wurden. Das Infarktareal befindet sich etwa zwischen Teilsegment 50 und 90.....	68
Abbildung 21: Analyse der regionalen Wandbewegung im Infarktareal (Chords 60-90) und außerhalb des Infarktareals (links RAO, rechts LAO).....	69
Abbildung 22: <sup>18</sup> F-FDG- PET Analyse nach Myokardinfarkt; Links vier Original-Tomographien von einem Medium- behandelten (oben) und von einem Zell-behandelten (unten) Tier vor (links) und 2 Wochen nach (rechts) Injektion. Im rechten Teil der Abbildung sind die Mittelwerte der Analysen für je 3 Tiere abgebildet die entweder mit Medium (graue Säulen) oder mit mononukleären Knochenmarkzellen behandelt wurden (schwarze Säulen).....	69
Abbildung 22b: Histologischer Nachweis der transplantierten mononukleären Zellen im (Peri-) Infarktgewebe von Schweinen (LAD- Verschluss) zwei Wochen nach Injektion. Darstellung der Hoechst Dye markierten Zellen (oben) und Darstellung der mit kolloidalem Gold markierten Zellen (unten)	71
Abbildung 22c: Histologischer Nachweis der Einstichregion der transplantierten mononukleären Zellen zwei Wochen nach Injektion.	72
Abbildung 23: Dynamische Szintigraphie unmittelbar nach intramyokardialer Injektion von <sup>111</sup> Indium- markierten mononukleären Knochenmarkzellen in infarzierte Herzen (mit Reperfusion) (1 Aufnahme alle 30 Sek., Start links oben, Ende rechts unten). ....	74
Abbildung 24: Quantitative Analyse des Verbleibs radioaktiv markierter Knochenmarkzellen 1,0 Std. und 24 Std. nach intramyokardialer Injektion (links) und nach intrakoronare (rechts) in infarzierte Herzen bei reperfundiertem Infarktgefäß. ....	74
Abbildung 25: Dynamische Szintigraphie unmittelbar nach intrakoronarer Injektion von <sup>111</sup> Indium- markierten mononukleären Knochenmarkzellen in infarzierte Herzen nach Reperfusion (eine Aufnahme alle 15 Sek.). Die Zellen wurden über einen liegenden Ballonkatheter mit insouffliertem Ballon injiziert (durchgehende Pfeile, 3 Min. Inflation). Danach wurde der Ballon desouffliert und es fand eine 3 minütige Reperfusion statt (gestrichelte Pfeile, 4 Wiederholungen). ....	75
Abbildung 26: Direkter Vergleich des Zellverbleibs im Herzen 1,0 Std. und 24 Std. nach intramyokardialer vs. intrakoronarer Applikation der Zellen in infarzierten Schweineherzen (mit Reperfusion) .....	76

### 8.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Liste der untersuchten Schweine und ihrer Gruppenzugehörigkeit	56
<b>Tab. 2:</b> Gemessene Werte aller Tiere der Gruppe II an den Untersuchungszeitpunkten vor MI, 14 Tage nach MI und 14 Tage nach Medium/Ctx Injektion für die Tiere der Ctx-Gruppe (oben) und der Kontrollgruppe (unten). Für jede der beiden Gruppen wurde zusätzlich der Mittelwert gebildet.	58
<b>Tab. 3:</b> Mittelwerte und SEM der lävokardiographisch erhobenen Funktionsdaten des Herzens für alle Tiere der Gruppe II (n=15) zu den 2 Untersuchungszeitpunkten vor und nach Infarkt, sowie die p-Werte vor MI versus nach MI. Die rechtsanteriore Projektion (RAO) steht im linken Tabellenteil, die linksanteriore Projektion (LAO) im rechten Tabellenteil	60
<b>Tab. 4:</b> Mittelwerte und SEM von LVEDP und dp/dtmax von den Untersuchungszeitpunkten vor MI und 14 Tage nach MI für alle Tiere der Gruppe II (n=15).	61
<b>Tab. 5:</b> Auflistung der Unterschiede zwischen Werten nach Medium/Ctx und nach MI (Differenz) und nach Medium/Ctx und vor MI (Differenz) und der dazugehörigen p-Werte. Darstellung erfolgt für RAO (oben) und LAO (unten)	64
<b>Tab. 6:</b> Gesamtzellzahl der einzelnen Blöcke nach Auszählung mittels Lichtmikroskopie	72
<b>Tab. 7:</b> Zellverbleib <sup>111</sup> Indium- markierter mononukleärer Knochenmarkzellen nach intramyokardialer (links) oder intrakoronarer (rechts) Injektion bei reperfundierten Infarktgefäß )** p<0,01 intrakoronar vs. intramyokardial)	75

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus - Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5828-9



9 783835 958289