

JOHANN MORITZ KATHS

**Einfluss von Methylprednisolon auf das
Homing von autologen Knochenmarkzellen in
ischämisches Myokard von isoliert perfundierten
Rattenherzen im Langendorff-Modell**



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER 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 2013

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.

1st Edition 2013

© 2013 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

www.doktorverlag.de

**Einfluss von Methylprednisolon auf das Homing von autologen
Knochenmarkzellen in ischämisches Myokard von isoliert
perfundierten Rattenherzen im Langendorff-Modell**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Johann Moritz Kath

aus Gießen

Gießen 2013

Aus dem Labor für experimentelle Kardiologie und vaskuläre Medizin,
Medizinische Klinik I, Abteilung Kardiologie/Angiologie,
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Leiter:

Prof. Dr. med. Hans Hölschermann

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Hölschermann

Gutachter: Prof. Dr. med. M. Kracht

Tag der Disputation:

28.10.2013

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Stammzelltherapie bei akutem Koronarsyndrom.....	1
1.2	Myokardiale Ischämie.....	3
1.2.1	Ischämie-Reperfusionssyndrom	3
1.2.2	Leukozytenadhäsionskaskade.....	3
1.3	Stammzellen	7
1.3.1	Differenzierungspotential und Einteilung	7
1.3.2	Bone marrow-derived (stem) cells	8
1.4	Methylprednisolon – synthetisches Glucocorticoid.....	10
1.4.1	Chemie.....	10
1.4.2	Wirkungen und Wirkmechanismen	10
1.4.3	Indikationen für eine pharmakologische Glucocorticoidtherapie	16
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Versuchstiere	19
2.1.2	Perfusat	19
2.1.3	Isolationsmedium.....	20
2.2	Methoden.....	21
2.2.1	Blutentnahme bei Ratten	21
2.2.2	Lösen des Methylprednisolons in Aqua ad iniectabilia	21
2.2.3	Gewichtsadaptierte Applikation des Methylprednisolons	22
2.2.4	Exsanguination der Spenderratten und Entnahme der Femurknochen.....	23
2.2.5	Extraktion der Knochenmarkzellen aus den Femurknochen	23
2.2.6	Aufbereitung der Knochenmarkzellen.....	24
2.2.7	Exsanguination der Empfängerratten und Entnahme der Herzen	25
2.2.8	Modifiziertes Modell nach Langendorff.....	27
2.2.9	Versuchsdurchführung.....	29
2.2.10	Versuchsauswertung	31
2.2.11	Angaben zur Statistik.....	32

3	ERGEBNISSE	33
3.1	Bestimmung der Creatinkinase im Effluat	33
3.2	Immunhistochemie	35
3.3	Anzahl rekrutierter Knochenmarkzellen	38
4	DISKUSSION	51
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
4.2	Diskussion des Versuchsaufbaus	51
4.2.1	Auswahl des Versuchstiers	51
4.2.2	Adulte Stammzellreihe: Knochenmarkzellen/BMCs	51
4.2.3	Isolationstechnik und Aufbereitung der Knochenmarkzellen	53
4.2.4	Immunmodulator Methylprednisolon	54
4.2.5	Langendorff-Modell	55
4.2.6	Steady-state, Ischämie- und Reperfusionphase	55
4.2.7	Intrakoronare Verabreichung der Knochenmarkzellen	57
4.3	Immunhistochemische Färbung von Knochenmarkzellen intramyokardial	58
4.4	Ischämie-Reperfusionssyndrom - Grundlage für das Homing von Knochenmarkzellen	59
4.4.1	Endotheliale Dysfunktion, reaktive Sauerstoffspezies und Komplementsystem	59
4.4.2	Zytokine	60
4.4.3	Zelluläre Adhäsionsmoleküle	64
4.5	Dosisabhängige Reduktion des Homings von Knochenmarkzellen durch Glucocorticoide	71
4.5.1	Zytokine	72
4.5.2	Zelluläre Adhäsionsmoleküle	72
4.5.3	Weitere, nicht-genomische Mechanismen der Regulation der Zelladhäsion	76
4.6	Stammzelltherapie bei Akutem Koronarsyndrom	77
4.6.1	Aktuelle klinische Studienlage	77
4.6.2	Funktionsmechanismen der Stammzelltherapie	79
4.6.3	Ausblick	80
5	ZUSAMMENFASSUNG	82
6	ANHANG	83

6.1	Zusammenfassung englisch	83
6.2	Abbildungsverzeichnis	84
6.3	Tabellenverzeichnis	86
6.4	Materialien	88
6.5	Übersichtstabellen	92
6.6	Publikationsverzeichnis	99
6.7	Erklärung zur Durchführung der Dissertation	100
6.8	Danksagung.....	101
6.9	Tabellarischer Lebenslauf	102
6.10	Literaturverzeichnis	103

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom
ASC	Adult stem cell
BMC	Bone marrow-derived cell
BMSC	Bone marrow-derived stem cell
BTM	Basal transcription machinery
CAM	Cellular adhesion molecule
CD	Cluster of differentiation
CSC	Cardiac stem cell
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF	Ejektionsfraktion
EPC	Endothelial progenitor cell
ESC	European Society of Cardiology
ESC	Embryonic stem cell
GC	Glucocorticoidmolekül
GCR'	Aktivierter Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GRE	Glucocorticoid responsive element
hGR	Humaner Glucocorticoidrezeptor
HPC/HSC	Hematopoietic progenitor/stem cell
HSP	Heat shock protein
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule 1

ICD	International Statistical Classification of Diseases
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin 1
Ip	Immunophiline
JAM	Junctional adhesion molecule
KDR	Kinase insert domain receptor
LFA-1	Leukocyte function-associated antigen type 1
Mac-1	Macrophage antigen 1
MAPC	Multipotent adult progenitor cells
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MI	Myokardinfarkt
MSC	Mesenchymal stem cell
NSTEMI	Non-ST-elevation myocardial infarction, Nicht-ST-Hebungsinfarkt
PECAM-1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
STEMI	ST-elevation myocardial infarction, ST-Hebungsinfarkt
TEM	Transendothelial migration
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-1/2	Vascular endothelial growth factor receptor-1/2
VLA-4	Very late antigen 4

1 Einleitung

1.1 Stammzelltherapie bei akutem Koronarsyndrom

Herz-Kreislaufkrankungen nehmen aufgrund ihrer Epidemiologie insbesondere in den Industrienationen einen wichtigen Stellenwert ein. Das Statistische Bundesamt Deutschland listet die Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems in der Todesursachenstatistik des Jahres 2011 mit über 40% auf Rang eins. Der akute Myokardinfarkt (MI) ist mit 6,5% eine der häufigsten Todesursachen überhaupt (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2013).

Der Terminus Akutes Koronarsyndrom (ACS) definiert verschiedene Ausprägungen der koronaren Herzerkrankung, die den akuten Thoraxschmerz als gemeinsames Leitsymptom haben und unmittelbar lebensbedrohlich sind. Die Therapie des ACS erfolgt nach in Leitlinien festgelegten Algorithmen. In Europa und Deutschland werden diese von der European Society of Cardiology (ESC) und der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) definiert. (Hamm, 2009, Bassand and Hamm, 2007). Beim akuten Myokardinfarkt wird die schnellstmögliche Reperfusion des ischämischen Stromgebiets durch eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA), eine operative Koronarrevaskularisation (CABG = coronary artery bypass graft) oder Aktivatoren der Fibrinolyse angestrebt. Zusätzlich kommen antiischämische Substanzen, Antikoagulantien sowie Thrombozytenfunktionshemmer zum Einsatz. Evidenzgrundlage der Therapie stellen zahlreiche Studien und Metaanalysen dar (Eikelboom et al., 2000, Boersma et al., 2002, Petersen et al., 2004, Yusuf et al., 2006). Ziel ist es, eine Reduktion der Ischämie bzw. die Verhinderung einer Progression zu erreichen.

Da ischämisch kardiale Erkrankungen trotz guter therapeutischer Möglichkeiten weiterhin eine große Rolle als Ursache für Morbidität und Mortalität weltweit spielen (Levy et al., 2002, Roger et al., 2004), wird die Verbesserung der pharmakologischen, interventionellen und operativen Strategien sowie die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze angestrebt. Eine derzeit in klinischen Studien untersuchte Therapieoption ist die Verabreichung von Stammzellen nach Auftreten eines Myokardinfarkts. Im Rahmen tierexperimenteller Untersuchungen konnten Bittner et al. die Transmigration von kardialen Stammzellen isogener Mäuse in das Myokard muskulär-dystropher Empfängertiere nachweisen (Bittner et al., 1999). Orlic et al. konnten am Mausmodell zeigen, dass es nach Injektion von Knochenmark(stamm)zellen in ischämisches Myokard zu einer Neubildung von Myokardgewebe kommt (Orlic et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen mit gezüchteten

peripheren Skelettmuskel- (Menasche et al., 2001) und mesenchymalen Progenitorzellen (Martin et al., 2000). Auf diesen Versuchen basierende klinische Studien ergaben eine Verbesserung herzfunktioneller und –struktureller Parameter durch Stammzellverabreichung nach Myokardinfarkt (Strauer et al., 2001, Strauer et al., 2002, Assmus et al., 2002, Wollert et al., 2004, Lunde et al., 2006, Schachinger et al., 2006, Assmus et al., 2006a, Surder et al., 2011). Metaanalysen, in die prospektive, randomisiert kontrollierte Studien eingeschlossen wurden, konnten signifikante Verbesserungen unter anderem der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) und die Verringerung der Infarktgröße bestätigen (Abdel-Latif et al., 2007, Lipinski et al., 2007, Kang et al., 2008, Jiang et al., 2010).

1.2 Myokardiale Ischämie

1.2.1 Ischämie-Reperfusionssyndrom

Nach Revaskularisation eines okkludierten Koronargefäßes mittels PTCA kommt es zu einer Reperfusion des ischämischen Bereichs am Herzen. Die Reperfusion ist das Ziel der Therapie und verhindert den progredienten Infarkt von Myokard (Hamm, 2009). Dieser Prozess kann jedoch selbst zusätzlichen Schaden verursachen. Ein Teil der ischämischen Myozyten, die bei Beginn der Reperfusion noch vital sind, werden durch entstehende Noxen und pathophysiologische Phänomene irreversibel geschädigt. Dieser durch Reperfusion nach Gewebsischämie auftretende Schädigungsmechanismus ist für mehrere Organe beschrieben, so zum Beispiel für das Gehirn (Pratschke et al., 2004), die Skelettmuskulatur (Chan et al., 2004), die Niere (de Vries et al., 2004) und den Darm (Mallick et al., 2004).

Am Myokard kommt es nach Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßabschnittes zum Reperfusionsschaden mit „myocardial stunning“ (reversible kontraktile Dysfunktion), Arrhythmie, Mikrozirkulations- und Endothelstörung, erhöhter Gefäßpermeabilität und Apoptoseerscheinungen. Von Bedeutung ist die Induktion einer inflammatorischen Reaktion, eingeleitet durch eine Aktivierung des Komplementsystems. Es erfolgt eine vermehrte Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen, die zu einer Rekrutierung und Akkumulation von Leukozyten im Gewebe führt (Park and Lucchesi, 1999).

Der Prozess der Inflammation und die dadurch bedingte Aktivierung des Endothels sind, analog zur Rekrutierung von Leukozyten, auch für die Rekrutierung der Bone marrow-derived cells (BMCs) entscheidend. Es wird angenommen, dass die Extravasation der Zellen aus dem Koronargefäß in das Myokard durch Bindung von auf Endothel und BMCs exprimierten zellulären Adhäsionsmolekülen (CAM) vermittelt wird (Garrood et al., 2006, Cook et al., 2009).

1.2.2 Leukozytenadhäsionskaskade

Die für die leukozytär-endothelialen Interaktionen wichtigen CAMs werden in drei Gruppen eingeteilt: Selektine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-CAM). Es sind Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche der Leukozyten bzw. des Endothels befinden und über Liganden-Rezeptor-Erkennung zur Bindung zwischen Endothel und Leukozyten führen. Sie vermitteln die Leukozytenadhäsionskaskade, die nach ihrem zeitlichem Verlauf in

unterschiedliche Phasen unterteilt werden kann (Laudanna and Alon, 2006, Goliás et al., 2007).

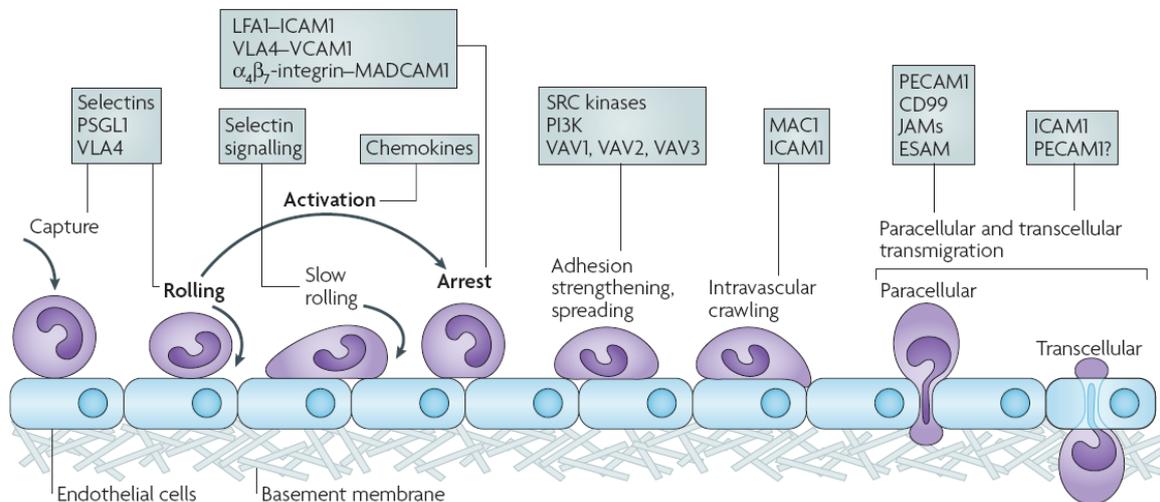


Abbildung 1: Erweitertes mehrstufiges Modell der Leukozytenadhäsionskaskade nach Ley mit Unterteilung in folgende Phasen: Capture (Einfangen), Rolling (Rollen), Activation (Aktivierung), Slow Rolling (langsames Rollen), Arrest/Firm adhesion (Adhäsion), Adhesion strengthening/spreading (verstärkte Adhäsion), Intravascular crawling (Kriechen), Paracellular and Transcellular migration (para- und transzelluläre Migration). In der Abbildung sind zudem die wichtigsten Adhäsionsmoleküle und deren Liganden aufgeführt (Erläuterungen tabellarisch im Anhang) (Ley et al., 2007).

Capture:

Nach Margination der Leukozyten erfolgt ein als „Capture“ oder „Tethering“ beschriebener Prozess. Er stellt den ersten Kontakt zwischen Leukozyten und Endothel dar. Die für diesen Schritt wichtigsten Adhäsionsmoleküle sind die Selektine, insbesondere P- und L-Selektin und deren Liganden (von Andrian, 2000).

Rolling:

Nach erfolgreichem „Capture“ der Leukozyten kommt es zu einer transienten Bindung an das Endothel - der Vorgang des „Rolling“ wird eingeleitet. Die Familie der Selektine bremsen die Leukozyten im Blutstrom von 1000 – 4000 µm/s auf eine kritische Geschwindigkeit (critical velocity = hydrodynamic velocity) von 5 – 40 µm/s (Engelhardt, 2008). Insbesondere P-Selektin, aber auch L- und E-Selektin vermitteln diesen Schritt. P- und E-Selektin werden auf Entzündungsreize hin auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert, L-Selektin befindet

sich dauerhaft auf der Zellmembran von Leukozyten. Kommen die Leukozyten durch Bindung über Selektine in Kontakt mit dem Endothel werden Signale nach intrazellulär (sowohl in Leukozyten als auch Endothelzellen) übermittelt. Sind keine Stimuli vorhanden, lösen sie sich wieder und verbleiben im Blutstrom. Sind dagegen entsprechende Signalmoleküle (hauptsächlich Chemokine) vorhanden, kommt es zur Aktivierung von Integrinen, wodurch die „Firm adhesion“ eingeleitet werden kann (Ley et al., 2007).

Auch α_4 -Integrine (insbesondere VLA-4) und β_2 -Integrine können „Tethering“ und „Rolling“ unterstützen, sind jedoch wesentlich weniger effizient (Ley et al., 2007, von Andrian, 2000, Zarbock and Ley, 2008, Garrood et al., 2006).

Activation / Slow rolling:

Nach Induktion der Inflammation durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α fällt die Geschwindigkeit, mit der sich die Leukozyten im Blutstrom bewegen, deutlich ab. Bei diesem Vorgang sind insbesondere die Expression von E-Selektin auf Endothelzellen und CD18-Integrinen auf Leukozyten sowie deren Liganden wichtig.

Um ihre Funktionsfähigkeit zu erhalten, müssen Integrine aktiviert werden. Eine Schlüsselrolle für die Aktivierung und die Einleitung des nächsten Schrittes – der „Firm adhesion“ – scheint die Kontaktzeit zwischen Leukozyten und Endothel zu spielen. Die „rollenden“ Leukozyten registrieren durch das Endothel produzierte Chemokine und andere Chemoattraktantien über spezifische G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren (von Andrian, 2000, Zarbock and Ley, 2008). Signalwege in den Leukozyten werden aktiviert und es erfolgt eine Konformationsänderung der Integrine – dies wird als „inside-out signaling“ bezeichnet (Zarbock and Ley, 2008). Neben der Konformationsänderung gibt es einen zweiten Mechanismus, der zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität der Integrine führt. „Increased lateral mobility“ führt zu Zell-Oberflächen-Clustering und Polarisierung. Diese Prozesse sind vorübergehend und können innerhalb sehr kurzer Zeit (0,1s) erfolgen (Garrood et al., 2006).

Firm adhesion / Arrest:

Für den Vorgang der „Firm adhesion“ sind die vorherigen Prozesse des „Rolling“ von entscheidender Bedeutung. Direkte Adhäsion frei im Blutstrom fließender Leukozyten ist extrem selten. E-Selektin scheint eine die „Firm adhesion“ einleitende Funktion zu besitzen.

Selektin-vermittelte Bindungen sind zu instabil, um die im „Rolling“ befindlichen Leukozyten endgültig abzubremsen und eine feste Adhäsion an die Gefäßwand zu

ermöglichen. Für die „Firm adhesion“ müssen zusätzliche (sekundäre) Rezeptoren aktiviert werden. Diese gehören zur Familie der Integrine: $\alpha_1\beta_2$ -Integrin (LFA-1 = leukocyte function-associated antigen type 1), $\alpha_M\beta_2$ -Integrin (Mac-1 = macrophage antigen 1) $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (VLA-4 = very late antigen 4) und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin (von Andrian, 2000, Zarbock and Ley, 2008). Nach Bindung der Leukozyten an das Endothel über Integrine erfolgt über diese eine Signalübertragung in die Leukozyten. Dieser Vorgang, als „outside-in signaling“ bezeichnet, aktiviert verschiedene Signalwege in der Zelle, führt unter anderem zu einer Verstärkung der Adhäsion (Ley and Zarbock, 2006) und initiiert die Transmigration (Zarbock and Ley, 2008).

Transendothelial migration (TEM) / Diapedesis:

Für die Transmigration ist die Aktivierung der Leukozyten durch Chemokine und deren Bindung über Integrine an das Endothel entscheidend. Im Leukozyten erfolgt eine strukturelle Veränderung des Zytoskeletts, die die notwendige Verformung der Zelle ermöglicht. Generell wird eine „parazelluläre Route“, also eine Extravasation über kleine Spalten zwischen interzellulären Endothelzellverbindungen vermutet. Jedoch gibt es auch Hinweise auf eine „transzelluläre Route“, also eine Wanderung durch die Endothelzelle hindurch (Engelhardt and Wolburg, 2004). Die Zell-Zell-Verbindungen des Endothels werden durch bestimmte Adhäsionsmoleküle gebildet: JAMs (junctional adhesion molecules), PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule), Occludine, „vascular endothelial (VE) Cadherin“, „claudins“ und CD99 (van Buul and Hordijk, 2004). Neben diesen Adhäsionsmolekülen spielen beispielsweise auch ICAM-1 und VCAM-1 eine Rolle als Liganden der Integrine und sind wichtig für die TEM (Ley et al., 2007).

Die Adhäsionskaskade ist ein hochregulierter Prozess, in dem eine strikte Trennung der einzelnen Phasen nicht möglich ist. Einzelne Abschnitte überschneiden sich und die einzelnen Familien der CAM kooperieren miteinander (teils synergistische, teils redundante Funktionen). Diskutiert wird eine Aktivierung von Rezeptoren der Integrin- und Immunglobulinfamilie durch die die Adhäsionskaskade initiierenden Selektine (Garrood et al., 2006, Goliias et al., 2007).

1.3 Stammzellen

1.3.1 Differenzierungspotential und Einteilung

Stammzellen sind unspezialisierte (nicht differenzierte) Zellen, die durch die ihnen zugrunde liegende Eigenschaft charakterisiert sind, einerseits weitere Stammzellen durch Proliferation („process of self-renewal“), andererseits höher entwickelte Zellen durch Differenzierung („process of differentiation“) auszubilden (Till and Mc, 1961, Baker, 2009).

Unterteilung nach **Differenzierungs- bzw. Regenerationspotential** (Stangl K., 2003):

- **Unipotente Stammzellen:** Undifferenzierte Zellen, die sich zu einem Typ differenzierter Zellen entwickeln (bsp. Differenzierung von Epidermisstammzellen zu Keratinozyten).
- **Multipotente Stammzellen:** Zellen, aus denen mehrere Arten von Zelltypen entstehen können. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise neuronale Stammzellen, aus denen sich alle Zellen des Nervensystems entwickeln können.
- **Pluripotente Stammzellen:** Ausbildung sämtlicher Zelltypen des Körpers. Zu ihnen gehören beispielsweise embryonale Stammzellen (ESCs).
- **Totipotente Stammzellen:** Ausbildung vollständiger Embryonen. Zu ihnen gehören die befruchtete Eizelle und frühe Furchungsstadien (Entstehung bei der in vitro Fertilisation).

Einteilung nach **Ursprung** oder **Methode der Gewinnung** (Stangl K., 2003):

- **Adulte Stammzellen (ASC):** ASCs kommen in den meisten Organen des Körpers vor. Ihr Anteil an der Zellzahl eines Organs ist mit 1-2% gering. Auf 10000 Knochenmarkzellen kommt eine haematopoetische Stammzelle (Weissman, 2000). Bisher wurde angenommen, dass sich gewebsspezifische ASCs nur in Gewebe ihres Ursprungs differenzieren (Multipotenz). Untersuchungen jedoch zeigen, dass sich z.B. Zellen aus dem Knochenmark durch Transdifferenzierung in andere Gewebe umwandeln können (Pluripotenz) (Jiang et al., 2002). So lassen Studien annehmen, dass BMCs in Skelettmuskel-, Nervenzellen, Hepato-, Kardiomyozyten, Gefäßendothel und Epithel von Haut und Darm transdifferenzieren (Guan and Hasenfuss, 2007). Progenitorzellen besitzen eine limitierte Kapazität zur Selbsterneuerung und sind weiter ausdifferenziert (Cook et al., 2009).
- **Embryonale Stammzellen (ESC):** Ihre Isolation erfolgt aus frühen Embryonen. Die innere Zellmasse der Blastozyste, aus der normalerweise der Fötus hervorgeht, wird entnommen. ESCs sind pluripotent und bilden jede Zelle des menschlichen Körpers aus.

1.3.2 Bone marrow-derived (stem) cells

In tierexperimentellen sowie klinischen Studienprotokollen zur Stammzelltherapie einer akuten myokardialen Ischämie werden mehrheitlich ASCs eingesetzt (Orlic et al., 2001, Rosenzweig, 2006). Genutzt werden beispielsweise Knochenmark(stamm)zellen, skelettale Myoblasten, zirkulierende Progenitorzellen, Fettgewebs(stamm)zellen, sowie kardiale Progenitorzellen (CSCs) (Guan and Hasenfuss, 2007, Charwat et al., 2008). Im Folgenden wird die am häufigsten verwendete, auch in dieser Arbeit zum Einsatz kommende Zellpopulation beschrieben. Dies sind (Stamm)Zellen aus dem Knochenmark, welche als **Bone marrow-derived cells (BMCs)** bezeichnet werden. Sie setzen sich aus diversen Zelltypen des Knochenmarks zusammen. Nach Guan und Cook können sie unterteilt werden in (Guan and Hasenfuss, 2007, Cook et al., 2009):

Haematopoietic stem / progenitor cells (HSC / HPC)

HSCs/HPCs sind verantwortlich für die konstante Regeneration aller Zellen des haematopoetischen Systems und des Immunsystems. Sie sind die am besten charakterisierten adulten Stammzellen und werden im klinischen Alltag in der Therapie hämatologischer Erkrankungen (Knochenmarktransplantation) eingesetzt. HSCs/HPCs exprimieren das Oberflächenglykoprotein CD34. Die Isolierung von CD34-exprimierenden Zellen (aus Nabelschnurvenenblut, Knochenmark, Blut) führt zu einer heterogenen Zellpopulation (Cook et al., 2009). Unter 0,1% der mittels CD34-Markierung angereicherten Zellen sind HSCs (Wognum et al., 2003).

Mesenchymal stem cells (MSC)

MSCs wurden ursprünglich im Stroma des Knochenmarks nachgewiesen. Sie dienen der Unterstützung der Haematopoese durch Sekretion verschiedener Zytokine (Koloniestimulierende - und Wachstumsfaktoren), zum Beispiel VEGF (Vascular endothelial growth factor). Diese sind wichtig für Proliferation, Differenzierung und Überleben der haematopoetischen Stammzellen. Sie sind außerdem integraler Bestandteil des Endothels und damit ubiquitär nachweisbar. MSCs exprimieren keinen für sie spezifischen Zelloberflächenmarker. Negativ sind sie für charakteristische Antigene der haematopoetischen Zellreihe: CD45, CD34 und CD11. Positiv sind sie für CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 und Stro-1 (Cook et al., 2009). Neben der parakrinen Funktion wird ihnen zusätzlich die Fähigkeit zugesprochen, sich in ausgereifte Zellpopulationen des Mesoderms zu differenzieren. So entwickeln sie sich zu Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Skelettmuskelzellen (Guan and

Hasenfuss, 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass sie sich zusätzlich in ektodermales und endodermales Gewebe differenzieren können (Jiang et al., 2002, Lee et al., 2004).

Endothelial progenitor cells (EPC)

EPCs spielen in der Angiogenese, der Wiederherstellung von Endothel und der endothelialen Homöostase eine entscheidende Rolle. Wie HSCs/HPCs und MSCs entstammen sie dem Knochenmark (Cook et al., 2009). In geringer Anzahl zirkulieren sie im Blut. Mittels Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) können sie aus dem Knochenmark mobilisiert werden und befinden sich dann in größeren Mengen im Blut (Fadini et al., 2006). Charakteristisch für EPC ist die Expression von CD34⁺ und Flk-1⁺. Flk-1⁺, in der Maus auch als „Vascular endothelial growth factor receptor-2“ (VEGFR-2) und beim Menschen als „kinase insert domain receptor“ (KDR) bekannt, vermittelt gemeinsam mit VEGFR-1 (auch als Flt-1 bezeichnet) die Wirkungen des „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF), welcher entscheidende Funktionen in der Regulation der Angiogenese vermittelt. VEGFR-2 sowie CD144 (Vascular-endothelium cadherin) und CD31 (platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 = PECAM-1) werden als Marker für Progenitorzellen gesehen, die sich zur endothelialen Zelllinie hin entwickeln. Ein weiterer Marker ist CD133 (prominin-1). Da EPCs und HPCs einen gemeinsamen Vorgänger (Hämangioblasten) haben, exprimieren sie teils identische Oberflächenmoleküle (Cook et al., 2009).

Multipotent adult progenitor cells (MAPC)

Entsprechend ihrer Oberflächenmarker-Expression gehören diese MAPCs keiner der zuvor beschriebenen Gruppen an. Sie werden als Zellen beschrieben, die primitiver sind als MSCs und EPCs (Guan and Hasenfuss, 2007).

Ausdifferenzierte Zellen und deren Vorläufer

Neben den oben genannten Zelltypen befinden sich im Knochenmark weitere Zellen wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten sowie deren Vorstufen. Demnach sind auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Zellisolat nicht ausschließlich Stamm- und Progenitorzellen zu finden sondern ebenfalls ausdifferenzierte Zellen.

1.4 Methylprednisolon – synthetisches Glucocorticoid

1.4.1 Chemie

Das in dieser Arbeit verwendete Methylprednisolon (Urbason®) ist ein synthetisch hergestelltes Cortisolanalogon. Prednisolon unterscheidet sich von Cortisol durch eine zusätzliche Doppelbindung im Ring A (Δ^1 -Dehydrocortisol). Durch Methylierung an Position sechs entsteht 6 α -Methylprednisolon. Die Wirkdauer des Methylprednisolons ist im Vergleich zu Cortisol (kurze Wirkdauer: 8-12 h) mittellang, also ca. 12-36 h; die relative glucocorticoide Potenz beträgt fünf, die relative mineralcorticoide Potenz 0,5 (Aktories, 2009). Die synthetischen Glucocorticoide zeigen dosisabhängig die gleichen Wirkungen auf das Immunsystem wie Cortisol (Hatz, 2005).

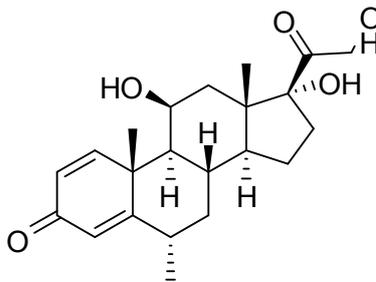


Abbildung 2: Chemische Strukturformel des Methylprednisolons (Aktories, 2009).

1.4.2 Wirkungen und Wirkmechanismen

Neben Wirkungen auf Stoffwechsel, Wasser- und Elektrolythaushalt, kardiovaskuläres und zentrales Nervensystem, Blut, Skelettmuskulatur sowie Wachstum bedingten Glucocorticoide Modulationen des Immunsystems. Insbesondere die antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung ermöglicht die breite therapeutische Anwendung der Glucocorticoide. Gehemmt werden sowohl frühe als auch späte entzündliche Reaktionen. Zu den frühen Entzündungsreaktionen gehört neben Ödementstehung, Kapillardilatation und Fibrinablagerung auch die Migration von Leukozyten. Immunreaktionen werden auf humoraler und zellulärer Ebene unterdrückt (Aktories, 2009).

Die Wirkmechanismen der Glucocorticoide können in genomische und nicht-genomische unterteilt werden (Rhen and Cidlowski, 2005, Buttgerit et al., 2005, Song and Buttgerit, 2006, Stahn et al., 2007, Perretti and D'Acquisto, 2009).

1.4.2.1 Genomische Glucocorticoidwirkungen

Die **spezifischen Glucocorticoidwirkungen** werden über einen intrazellulären Rezeptor vermittelt, den humanen Glucocorticoidrezeptor (hGR). Er wurde 1968 erstmalig in Thymuszellen von Ratten beschrieben (Munck & Brinck-Johnsen, Schaumburg & Bojesen, 1968). Nachgewiesen wurde, dass in nahezu allen Zellen des Körpers hGRs exprimiert werden, deren Dichte jedoch gewebe- und zellzyklusabhängig sind (Cidlowski et al., 1990, Oakley et al., 1996, Lu and Cidlowski, 2005, Rhen and Cidlowski, 2005). Der hGR gehört zur „**Superfamilie der nuklearen Hormonrezeptoren**“ (NHR). Gemeinsames strukturelles Merkmal dieser Gruppe sind drei funktionelle Domänen: Ein N-terminaler (aminoterminaler) Bereich, eine DNA-bindende Domäne (DBD) und ein C-terminaler (carboxyterminaler), ligandenbindender Bereich (LBD) (Mangelsdorf et al., 1995). Eine Gelenkregion (hinge region) verbindet DBD und LBD.

Der humane Glucocorticoidrezeptor liegt im Zytoplasma der Zelle in Verbindung mit Proteinen als inaktiver Multiproteinkomplex vor. Er besteht aus dem hGR selbst und folgenden Strukturen: zwei Hitzeschockproteinen mit 90 kDa (HsP 90) und weiteren Proteinen wie HsP 70, HsP 56 und HsP 40. Zusätzlich findet eine Interaktion mit Chaperonen (wie p23 und Src), Immunophilinen (Ip) und Proteinen der MAPK (mitogen-activated protein kinase) - Signalkaskade statt (Dittmar et al., 1997, Dittmar et al., 1998, Stahn et al., 2007). Zur Aktivierung des hGR kommt es, wenn das Glucocorticoidmolekül (GC) über die Zellmembran in das Zytoplasma der Zelle diffundiert und an die Ligandenbindungsstelle des hGR bindet. Die zuvor genannten Proteine werden abgespalten, in das Zytoplasma abgegeben und es entsteht der aktivierte Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex (GCR'). Durch Abspaltung der Proteine wird die DNA-bindende Domäne durch Konformationsänderung der Eiweißstruktur freigegeben. Der GCR' transloziert nach Aktivierung der NLS (nuclear localization sequence) innerhalb von Sekunden in den Zellkern und übt als Homodimer über verschiedene Mechanismen glucocorticoidspezifische Wirkungen aus (Smoak and Cidlowski, 2004, Charmandari, 2004).

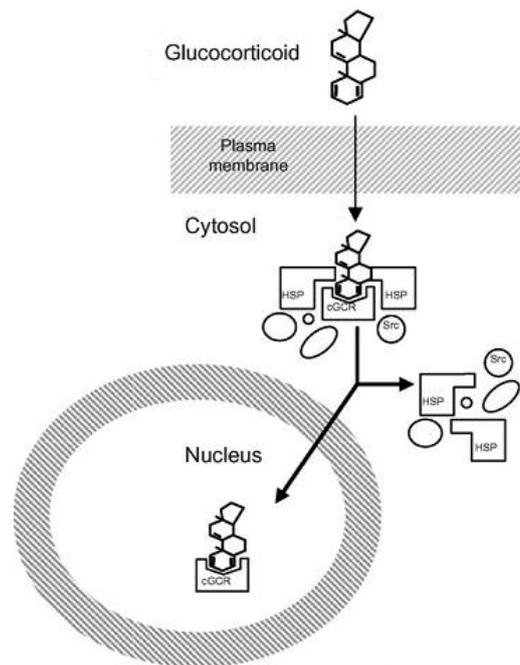


Abbildung 3: Genomische Glucocorticoidwirkung: Migration des Glucocorticoids in das Zytosol, Aktivierung des Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexes, Migration in den Zellkern (Modifikation nach Stahn et al. 2007).

Vier Mechanismen können differenziert werden (Stahn et al., 2007):

I. Durch Bindung des als Homodimer vorliegenden GCR' über die DBD an corticoidspezifische DNA-Sequenzen – so genannte „glucocorticoid responsive elements“ (GRE) - kommt es zur **direkten Gentranskriptionsförderung (trans-activation)**: Nach Bindung an GRE kommt es zu einer Konformationsänderung des GCR'. Dies führt zu einer Rekrutierung von Coaktivatoren und der Entstehung eines GCR'-DNA-Komplexes. Wichtige Coaktivatoren sind beispielsweise p300/CREB-binding protein (CBP), P/CAF p300/CBP-associated protein und SRC-1 (steroid receptor coactivator 1). Sie besitzen die Fähigkeit, Histone zu acetylieren (HAT = histone acetylase activity) und somit eine Neuordnung der Nukleosomen („Chromatinremodeling“) hervorzurufen. Dadurch wird es der BTM (basale Transkriptionsmaschinerie) ermöglicht, den Promoter der DNA zu erreichen und die Glucocorticoideffekte vollständig zur Ausprägung zu bringen. Zusätzlich zur beschriebenen Fähigkeit der Coaktivatoren, die Menge der hergestellten Produkte zu beeinflussen, wird auch das Spleißen moduliert. Damit sind sie auch in der Lage, das entstehende Produkt selbst zu beeinflussen (De Bosscher and Haegeman, 2009). Auch Coaktivatoren, die nicht die Fähigkeit besitzen, Histone zu acetylieren (z.B. SWI/SNF = switching/sucrose non-fermenting complex, pCIF,

GRIP = glucocorticoid receptor-interacting protein), spielen eine Rolle beim Chromatinremodeling. Es wird spezifische mRNA synthetisiert, die an Ribosomen zu verschiedenen Proteinen translatiert wird. Durch diesen Mechanismus erklärt man den Anstieg anti-inflammatorischer Proteine wie Annexin-1 (Lipocortin-1, Phospholipase A2-Inhibitor), I κ B- α (Inhibitor von NF- κ B), dem physiologischen Proteaseninhibitor SLPI (serum leukoprotease inhibitor), clara cell protein 10 (CC10), IL-1 Rezeptorantagonist, IL-1 Rezeptor Typ II, IL-10, GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper protein), neurale Endopeptidase und mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) Phosphatase-1 (MKP-1) (Barnes, 2006, Lowenberg et al., 2008).

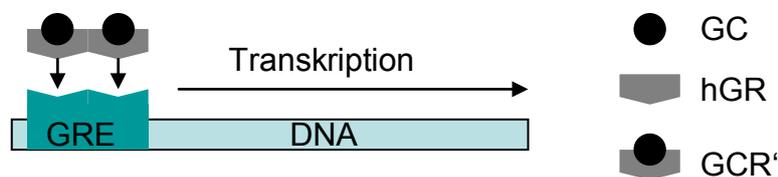


Abbildung 4: Direkte Gentranskriptionsförderung (trans-activation).

II. Die direkte Gentranskriptionshemmung (cis-repression) erfolgt dagegen über Bindung des Homodimers GCR' an „negative glucocorticoid responsive elements“ (nGRE). Die Expression verschiedener Gene wird gehemmt und somit auch die Synthese bestimmter Proteine. Beispielsweise wird die Transkription von Proopiomelanocortin-, α -Fetoprotein- und Prolactin-Genen (Stahn et al., 2007) sowie Osteocalcin-Gen (Smoak and Cidlowski, 2004) supprimiert. Auch erfolgt eine Hemmung der Transkription inflammatorischer Gene wie IL-1 und IL-2 (Stahn et al., 2007).

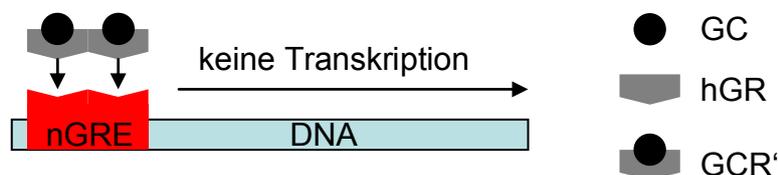


Abbildung 5: Direkte Gentranskriptionshemmung (cis-repression).

III. Häufiger jedoch erfolgt die Inhibierung bzw. Modulation der Transkription indirekt (indirekte Gentranskriptionshemmung = trans-repression/tethering mechanism) über Protein-Protein Interaktion zwischen monomeren GR α und anderen Transkriptionsfaktoren, vor allem „activating-protein 1“ (AP-1 = Dimer aus c-Fos und c-Jun) (Almawi and Melemedjian, 2002) und NF- κ B; zusätzlich außerdem mit IRF-3 (interferon regulatory factor-

3), NF-AT (nuclear factor of activated T cells), STATs (Signal Transduction and Activator of Transcription) und Smad (SmaMAD family). Es kommt zu einer Inhibierung der nuklearen Translokation und Funktion von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren, wodurch die Synthese von inflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen und Prostaglandinen unterdrückt wird (Smoak and Cidlowski, 2004, Stahn et al., 2007, De Bosscher and Haegeman, 2009).



Abbildung 6: Indirekte Gentranskriptionshemmung (trans-repression).

IV. Ein weiterer Mechanismus, der zu antiinflammatorischen Wirkungen der GC führt, wird als „**competition**“ bezeichnet. Hierbei kommt es zur „**Kompetition**“ zwischen GCR' und anderen Transkriptionsfaktoren um Koaktivatoren (s.o.), die zur Gentranskription nötig sind bzw. diese erleichtern (Stahn et al., 2007, De Bosscher and Haegeman, 2009). So wird beispielsweise für die Koaktivatoren CBP, p300 und SRC-1 beschrieben, dass sie nicht nur für die Stimulierung der Aktivität des Transkriptionsfaktors GCR', sondern auch die der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF-κB entscheidend sind (Almawi and Melemedjian, 2002).

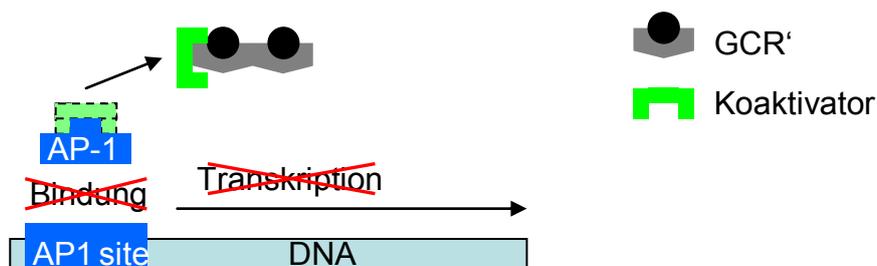


Abbildung 7: Konkurrenz (competition).

Außer den oben genannten Mechanismen werden zusätzlich **posttranskriptionelle Wirkungen** vermutet. Liegt eine Entzündung im menschlichen Organismus vor, werden proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet die wiederum einen Anstieg von endogenen GC bewirken. Da diese auch bestehende entzündliche Veränderungen supprimieren können, muss ein Wirkmechanismus auf posttranskriptioneller Ebene vorliegen – über Destabilisierung von mRNA oder Inhibition der Translation von mRNA. Ziele dieser Regulationsmechanismen

sind COX-2, TNF, VEGF (vascular endothelial growth factor), Interferon β , CSF2 (colony stimulating factor 2), IL-5, IL-6, IL-1 α und IL-1 β , iNOS (induzierbare NO-Synthase) und verschiedene Chemokine (Barnes, 2006, Clark, 2007).

1.4.2.2 Nicht-genomische Glucocorticoidwirkungen

Die nicht-genomischen Glucocorticoidwirkungen sind im Gegensatz zu den genomischen Glucocorticoidwirkungen nicht zellkernabhängig. Sie setzen sehr schnell ein und sind verglichen mit den genomischen besonders stark von der Dosis des verabreichten GC abhängig. Drei verschiedene, nicht-genomische Mechanismen werden nach Stahn et al. unterschieden (Stahn et al., 2007):

I. Nicht spezifische Interaktion von GC (bei hohen Konzentrationen) mit der **Plasmamembran** (Buttgereit and Scheffold, 2002, Buttgereit et al., 2004):

Werden Glucocorticoide in hoher Konzentration verabreicht, kommt es zum Einbau von GC-Molekülen in die Plasmamembran (Interkalierung). Es tritt eine Veränderung der physikochemischen Eigenschaften der Membran sowie der Aktivität von membranassoziierten Proteinen auf. Zu einer schnellen immunsuppressiven und antiinflammatorischen Wirkung kommt es daraufhin wahrscheinlich durch einen verminderten Calcium- und Natriumstrom über die Plasmamembran von Immunzellen. An mitochondrialen Membranen kann es zu einem GC-induziertem „Protonenleck“ kommen und dadurch zu einer verminderten ATP-Produktion. Eine verminderte Dichte von ATP (Adenosintriphosphat) wirkt sich nachteilig auf den Stoffwechsel von Immunzellen aus, da diese ATP zur Zytokinsynthese, für Migration und Phagozytose sowie Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation benötigen.

II. Nicht-genomische Effekte, die über Interaktion von GC mit dem **zytosolischen hGR** vermittelt werden (Croxtall et al., 2000):

Treten GC über die Zellmembran in das Zytoplasma der Zelle ein, binden sie an den hGR, der in Form eines inaktivierten Multiproteinkomplexes vorliegt. Dabei kommt es zu einer Abspaltung bestimmter Proteine vom hGR, wodurch der aktivierte GCR' in den Zellkern übertreten kann. Es wird vermutet, dass eine Ablösung von Signalmolekülen (z.B. SRC-1) vom Multiproteinkomplex durch vorherige GC-Bindung für schnell eintretende immunmodulatorische Effekte verantwortlich sein könnte. Beispielsweise wird die Freisetzung von Arachidonsäure von zellmembranassoziierten Phospholipiden durch GC über einen cGR-

abhängigen, aber transkriptionsunabhängigen Mechanismus inhibiert. Arachidonsäure spielt eine wichtige Rolle bei diversen metabolischen und inflammatorischen Reaktionen.

III. Spezifische Interaktion von GC mit einem **membrangebundenen Glucocorticoidrezeptor (mGR)** (Bartholome et al., 2004):

Des Weiteren wird die Interaktion von GC mit einem membrangebundenen Glucocorticoidrezeptor (mGR) als wichtiger Mechanismus für schnell eintretende GC-Wirkungen vermutet. Erstmals wurde der mGR 1999 in amphibischen neuronalen Membranen und Lymphomzellen nachgewiesen (Gametchu et al., 1999). Auch in menschlichen peripheren mononuklearen Zellen konnten mGR identifiziert werden. Es wird vermutet, dass der mGR eine Variante des cGR darstellt und durch alternatives Splicing, Promoterwechsel oder posttranskriptionelle Veränderung aus dem gleichen Gen entsteht.

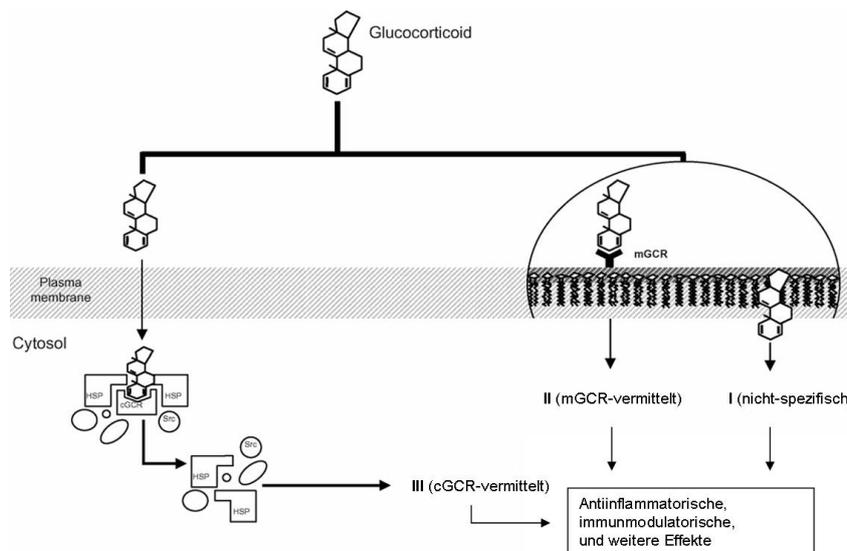


Abbildung 8: Nicht-genomische Glucocorticoidwirkungen, Modifikation nach Stahn (Stahn et al., 2007).

1.4.3 Indikationen für eine pharmakologische Glucocorticoidtherapie

Die Indikationen zur klinischen Anwendung der Glucocorticoide können unterteilt werden in solche, die eine systemische Applikation benötigen und andere, die eine lokale Anwendung erfordern. Systemisch ist die Verabreichung beispielsweise bei Erkrankungen aus dem entzündlich-rheumatischen Formenkreis gegeben. Weitere Therapiemöglichkeiten bestehen

bei Nierenerkrankungen, Allergien, Lungenerkrankungen, Tumoren sowie hämatologischen, gastrointestinalen, endokrinen, neurologischen, dermatologischen und ophthalmologischen Erkrankungen. Auch zur Immunsuppression im Rahmen von Transplantationen kommen sie zum Einsatz. Topisch erfolgt die Gabe bei Haut-, Atemwegs-, Augen-, Gelenk- sowie Darmerkrankungen (Aktories, 2009).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen der myokardialen Ischämie kommt es durch Okklusion von Koronarien zu einer Minderdurchblutung von Herzmuskelgewebe. Die mangelnde Versorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) führt zur Nekrose von Gewebe und damit zum Myokardinfarkt. Das Therapieziel beim Myokardinfarkt liegt in einer raschen Reperfusion des ischämischen Herzmuskelbereichs durch zügige Revaskularisation.

Ischämie und anschließende Reperfusion induzieren den sogenannten Ischämie-Reperfusionsschaden. Dadurch wird eine inflammatorische Reaktion mit Aktivierung des Komplementsystems, Ausschüttung von Zytokinen und vermehrter Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen ausgelöst. Die so genannte Leukozytenadhäsionskaskade mit den Phasen Capture, Rolling, Activation/Slow Rolling, Firm adhesion/Arrest und Transendothelial migration/Diapedesis wird eingeleitet.

Analog zur Leukozytenadhäsionskaskade wird davon ausgegangen, dass nicht nur Entzündungszellen, sondern auch Stammzellen über ähnliche Mechanismen in entzündlich veränderte Gewebe transmigrieren. Diese Möglichkeit wird seit 2001 im Rahmen klinischer Studien genutzt. Nach Auftreten eines Myokardinfarkts werden aus dem Knochenmark gewonnene autologe (Stamm-)Zellen (Bone marrow-derived (stem) cells) intrakoronar appliziert. Ziel ist eine Verbesserung der myokardialen Funktion (Rosenzweig, 2006, Kang et al., 2008, Jiang et al., 2010).

Die zugrunde liegenden Mechanismen des Homings der Zellen sind im Detail größtenteils unbekannt. Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie war die Untersuchung der Relevanz von Ischämie- und Reperfusionsphase für das Homing von Knochenmarkzellen in das Myokard im Langendorff-Modell an der Ratte. Zusätzlich wurde der Einfluss des Immunmodulators Methylprednisolon (Cortisonanalogon) auf den Homingprozess untersucht.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Hat die myokardiale Ischämie Einfluss auf das Homing von Knochenmarkzellen?
- Ist die Reperfusionsphase von Bedeutung für den Homingvorgang?
- Beeinflusst Methylprednisolon dosisabhängig das Homing von Knochenmarkzellen in ischämisches Myokard bei der Ratte im Langendorff-Modell?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Für die Versuchsdurchführung am isolierten Rattenherzmodell nach Langendorff wurden ausschließlich männliche Wistar-Furth Ratten mit einem Gewicht zwischen 200 und 350 g verwendet. Die Tiere wurden vom Zuchtbetrieb Harlan Winkelmann GmbH (Gartenstrasse 27, 33178 Borcheln, Deutschland) bezogen. Die Haltung erfolgte in normierten Käfigen auf Standardstreu für Labortiere unter konstanten, kontrollierten Bedingungen. Der Tag-Nacht-Zyklus war auf 12 Stunden eingestellt. Während der (zehntägigen) Eingewöhnungszeit und der Vorbehandlung der Ratten bekamen die Tiere Futter und Wasser ad libitum. Das Futter bestand aus einer pelletierten Standard-Diät für Ratten und Mäuse. Raumklima und Lichtmenge wurden konstant eingestellt. Die Betreuung erfolgte durch ausgebildete Tierpfleger. Insgesamt wurden für das Versuchsvorhaben 86 Tiere eingesetzt. Davon wurden 43 Ratten als „Spendertiere“ genutzt, aus deren Femurknochen die Isolierung der Knochenmarkzellen erfolgte. 43 Ratten dienten als „Empfängertiere“. Die aus den Empfängertieren isolierten Herzen wurden einer globalen Ischämie unterzogen. Anschließend wurden diesen Herzen die isolierten Knochenmarkzellen zugeführt („Stammzelltherapie“). Der Tierschutzantrag wurde vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Ordnungsnummer 46/2006).

2.1.2 Perfusat

Als Perfusat wurden 975 ml der Elektrolytlösung I/3 von Serag-Wiessner KG (Naila, Deutschland), versetzt mit 25 ml NaHCO₃ (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland), verwendet. Die Elektrolytlösung enthält 2,4 mmol Calciumchloriddihydrat, 1,3 mmol Magnesiumchloridhexahydrat, 4,3 mmol Kaliumchlorid, 1,1 mmol Kaliumhydrogenphosphat, 125 mmol Natriumchlorid und 13,32 mmol Glukose. Der pH-Wert des Perfusats wurde vor Versuchsbeginn auf 7,35 – 7,45 mit Hilfe von 1 M NaHCO₃ eingestellt. Onkotischer Druck sowie Osmolalität wurden mit einem Onkometer (BMT 921, Dr. Karl Thomae, Biberbach, Deutschland) und einem Mikro-Osmometer (Roebeling Messtechnik, Berlin, Germany) kontrolliert.

2.1.3 Isolationsmedium

Zur Isolation der Knochenmarkzellen wurde Macrophagen-SFM Medium GIBCO (Invitrogen Corporation, Karlsruhe, D), versetzt mit 1% Penicillin/Streptomycin GIBCO (Invitrogen Corporation, Paisley, UK), benutzt. Im Weiteren wird das Medium als Isolationsmedium bezeichnet.

2.2 Methoden

2.2.1 Blutentnahme bei Ratten

Die venöse Blutentnahme erfolgte sowohl bei Spender- als auch Empfängertieren zu Beginn (Tag eins) und nach Abschluss (Tag acht) der siebentägigen Behandlung mit Methylprednisolon oder Aqua ad iniectabilia.

An Tag eins wurde das Versuchstier mit Isofluran (Isofluran-Baxter©, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) narkotisiert. Nach ausreichender Sedierung wurde die Ratte in Rückenlage gehalten und gleichzeitig die Nackenhaut zurückgezogen. Dadurch konnten eine Kompression der Halseingeweide und eine Venenstauung im Bereich von Hals und Kopf erreicht werden. Nach Herausziehen der Zunge mit einer Plastikpinzette erfolgte das Anstechen der V. sublingualis an der Zungenunterseite mit einer Kanüle (BD Microlance 3 - Kanülen (0,45 x 13 mm), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). 0,5 bis 1 ml venöses Blut wurden in einem Li-Heparin Mikro-Probengefäß (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D) aufgefangen und dieses bei -80 °C eingefroren.

An Tag acht erfolgte die Blutentnahme während des operativen Eingriffs. Dazu wurde nach Eröffnung des Thorax und Entnahme des Herzens die Aorta punktiert, das gewonnene Blut in einem Li-Heparin Mikro-Probengefäß aufgefangen und anschließend ebenfalls eingefroren.

2.2.2 Lösen des Methylprednisolons in Aqua ad iniectabilia

Das den Ratten verabreichte Methylprednisolon war das Urbason solubile (forte) ® (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland). Das Präparat setzt sich aus den Bestandteilen Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat und Natriumsalz zusammen. Die Lösung der Trockensubstanz erfolgte gemäß Herstellerangaben in Aqua ad iniectabilia (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Vor Beginn der Versuchsreihen wurden das Methylprednisolon in Form von Trockensubstanz mit einer Waage (30/160 g (0,01/0,1 mg), Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) abgewogen und das Aqua ad iniectabilia mit Pipetten (Falcon, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) abgemessen und getrennt voneinander steril aufbewahrt. Erst kurz vor Injektion wurde die Lösung der Trockensubstanz in Wasser vorgenommen.

2.2.3 Gewichtsadaptierte Applikation des Methylprednisolons

Der Vorbehandlung wurden sowohl Spender- als auch Empfängertiere über sieben Tage jeweils täglich unterzogen. Zur gewichtsadaptierten Gabe des Methylprednisolons erfolgte durch Isofluran eine Sedierung der Versuchstiere in Form einer Kurzzeit-Inhalationsnarkose. Mit Hilfe einer Einmalspritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und aufgesetzter Kanüle (0,45 x 13 mm) wurde das in Aqua ad iniectabilia gelöste Methylprednisolon intraperitoneal in der jeweiligen Dosis injiziert. Die Applikation erfolgte täglich um 8.00 Uhr morgens, zuvor jeweils die Gewichtsbestimmung der Ratten mit der Waage Kern 440-47 (0,1 g; 1200 g) (Kern & Sohn GmbH, Frommern, Deutschland).

Die folgende Tabelle zeigt die gewählten Dosierungen. Die Versuchreihen I, II und III stellen die Verum-Gruppen dar. Hier wurden jeweils als Dosierungen 0,1, 1 und 5 mg/kgKG/d gewählt. Gruppe VI stellt die Kontrollgruppe dar. Die dieser Gruppe zugehörigen Ratten wurden nicht vorbehandelt. Gruppe VII kennzeichnet die Placebogruppe. Hier wurde den Ratten nur die Trägerlösung (Aqua ad iniectabilia) körperrgewichtsadaptiert (1 ml/kgKG/d) injiziert. In Gruppe IV wurde nur eine Ischämiezeit von 15 Minuten eingesetzt, eine Reperfusionphase wurde nicht nachgeschaltet. Bei Gruppe V wurde weder eine Ischämie noch eine Reperusionszeit eingeschaltet.

Gruppe	MP/kg KG/d	Trägerlsg. /kgKG/d	MP/1 ml Trägerlsg.	Reper- fusionszeit	Ischämie	Anzahl Versuche
I	0,1 mg	1 ml	0,1 mg	30 min	15 min	4
II	1,0 mg	1 ml	1,0 mg	30 min	15 min	5
III	5,0 mg	1 ml	5,0 mg	30 min	15 min	9
IV	-	-	-	keine	15 min	5
V	-	-	-	keine	keine	3
VI	-	-	-	30 min	15 min	7
VII	-	1 ml	-	30 min	15 min	4

Tabelle 1: MP = Methylprednisolon, kg = Kilogramm, KG = Körpergewicht, d = Tag.

2.2.4 Exsanguination der Spenderratten und Entnahme der Femurknochen

Zur Entnahme beider Femurknochen wurde bei den Spendertieren eine balancierte Allgemeinanästhesie mit Isofluran und 0,1 mg/100 g KG Ketamin i.m. (Ketanest©, Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, D) in Kombination mit 1 mg/100 g KG Xylazinhydrochlorid i.m. (RompunTS©, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, D) durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle über eine mediane Laparotomie mit Schere und Skalpell. Durch Inzision des Zwerchfells und laterale Durchtrennung der linken und rechten Rippen in der vorderen Axillarlinie wurde der Thorax eröffnet und durch Einschneiden in den Aortenbogen der Tod durch Exsanguination herbeigeführt. Nach Darstellung des Hüftgelenks erfolgten die Eröffnung der Gelenkkapsel und die Durchtrennung des Lig. capitis femoris, anschließend die Exartikulation des Femurkopfes. Zur Entnahme des Femurs wurde dieser von Muskelgewebe freipräpariert und die Gelenkverbindung zum Unterschenkel unterbrochen. Anschließend wurde der Knochen in mit NaCl gefüllten Greiner Röhrchen (Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland) kurzzeitig bis zur Zellextraktion aufbewahrt.

2.2.5 Extraktion der Knochenmarkzellen aus den Femurknochen

Die aus den Wistar-Furth Ratten isolierten Knochenmarkzellen sind per definitionem als autolog zu bezeichnen, da die Spendertiere aus demselben Inzuchtstamm kamen wie die Empfängertiere. Die Extraktion und Isolation der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Sicherheitswerkbank Cleanbench Lamin Air HB 2472 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Genutzt wurde immer das Knochenmark beider Femurknochen eines Spendertiers, mit dem Ziel, daraus Zellen zur Applikation für ein Empfängerherz zu gewinnen.

Zur Extraktion der Knochenmarkzellen aus den Femurknochen wurden die proximale und die distale Epiphyse mit Hilfe einer Knochenzange im Bereich der Epiphysenfugen abgehoben. Der lange Röhrenknochen war nun an beiden Seiten eröffnet und der Knochenmarksraum frei zugänglich. Dieser wurde mit Hilfe von 5 ml Einmalspritzen und aufgesetzter Kanüle der Größe 0,9 x 40 mm (BD Microlance 3, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgekratzt und von beiden Seiten mit 25 ml Isolationsmedium pro Knochen durchspült. Das Isolationsmedium mit den darin enthaltenen Knochenmarkanteilen wurde in Greiner-Röhrchen aufgefangen. Nach diesen Arbeitsschritten kann von einer weitgehend vollständi-

gen Auslösung der Zellen aus den Knochen ausgegangen werden. Die grobe Trennung der Zellen von Knochen trabekeln und Knochensplittern sowie die Auflösung größerer Zellkonglomerate erfolgte im Anschluss mittels Durchspülen der gewonnenen Suspension durch Kanülen der Größe 0,6 x 30 mm und anschließend Kanülen der Größe 0,45 x 13 mm.

2.2.6 Aufbereitung der Knochenmarkzellen

Die Isolation der Knochenmarkzellen erfolgte nach einem standardisierten Protokoll, welches von Scutt et al. 1995 beschrieben wurde:

Zur **Isolation der Knochenmarkzellen** erfolgte die Zentrifugation der mit Knochenmarkbestandteilen und Isolationsmedium gefüllten Greiner-Röhrchen (50 ml) mit 1400 U/min bei 23 °C für zehn Minuten (Megafuge 2.0 R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Nach Abgießen des Flüssigkeitsüberstandes wurde das am Boden des Greiner-Röhrchens befindliche Zellpellet gelöst und mit 10 ml frischem Isolationsmedium aufgefüllt. Im darauf folgenden Schritt wurden je 5 ml der Zellsuspension in ein Polypropylen-Röhrchen (Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland) auf 5 ml Ficoll Gradienten (Ficoll Paque™ Plus, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) aufgeschichtet. Nun erfolgte die wiederholte Zentrifugation mit 1400 U/min bei 23 °C für 30 Minuten und deaktivierter Bremse. Danach wurde die Zellbande entnommen, in ein frisches Greiner-Röhrchen gegeben und dies bis auf 50 ml mit der Waschlösung Dulbecco's Phosphate buffered saline (1x) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, D) aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation mit 1400 U/min bei 23 °C für zehn Minuten mit aktivierter Bremse wurde das Zellpellet gelöst und mit 10 ml Isolationsmedium aufgefüllt.

Zur **Durchführung der Vitalfärbung** wurden 14 µl der Zellsuspension mit 14 µl Trypanblau (Trypan Blue Solution (0,4%), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) vermischt. Morphologie und Färbung der Zellen wurden unter dem Mikroskop Leica DMIL (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) begutachtet. Die Zählung der vitalen Zellen erfolgte in einer Zählkammer nach Neubauer (OptikLabor, Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm²) unter dem Mikroskop. Mit Hilfe dieses Tests wurde der Anteil vitaler Zellen innerhalb der Zellsuspension festgestellt. Grundlage des Tests ist die veränderte Membrandurchlässigkeit avitaler Zellen. Farbstoffe, für die die Zellmembran normalerweise undurchlässig ist, werden aufgenommen und die Zellen färben sich dunkelblau. Aufgrund seiner Zytotoxizität erfolgte die Auswertung unmittelbar nach Zugabe des Farbstoffes.

Nach Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen wiederholt bei 23 °C und 1400 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Die anschließende **Fluoreszenzfärbung** erfolgte mit dem PKH26 Red Fluorescent Phagocytotic Cell Linker (PCL) Kit (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland). Pro 5×10^6 Zellen wurden 0,5 ml Puffer B und pro Milliliter Puffer B 4 µl des Fluoreszenzfarbstoffs gebraucht. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit der Hälfte der ermittelten Puffermenge versetzt und gelöst und die andere Hälfte in einem separaten Greiner Röhrchen mit Farbstoff vermischt. Dann wurden Zellmischung und Farbmischung zusammengegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 0,5 ml fetales Kalbserum (Seromed Biochrom KG, Berlin, Deutschland) hinzugegeben und dies für eine Minute inkubiert.

Zur Entfernung von Farbstoffüberschuss und fetalem Kalbserum wurde das Greiner Röhrchen bis 50 ml mit Isolationsmedium aufgefüllt und im Anschluss für zehn Minuten bei 1400 U/min und 23 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Zellpellet gelöst und mit 2 ml Isolationsmedium aufgefüllt.

Die Zellen wurden gezählt, 18×10^6 Zellen abgenommen, mit Isolationsmedium aufgefüllt und wiederholt zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nochmals gelöst, mit 2 ml Isolationsmedium aufgefüllt und im Anschluss gezählt.

Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Zellen lichtgeschützt im Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) bei 38 °C und 5% CO₂ aufbewahrt.

2.2.7 Exsanguination der Empfängerratten und Entnahme der Herzen

30 Minuten vor Einleitung der Anästhesie wurden 500 I.E./kgKG Heparin (Liquemin©, Roche AG, Grenzbach-Wyhlen, Deutschland) zur Antikoagulation in den M. quadriceps femoris der Ratten injiziert. Eine balancierte Allgemeinanästhesie unter Spontanatmung wurde mit Isofluran (Isofluran-Baxter ©, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) eingeleitet und durch 1,0 mg/100 g KG Ketamin i.m. (Ketanest©, Pfizer Pharma, GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 1,0 mg/100 g KG Xylazinhydrochlorid i.m. (RompunTS©, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) ergänzt. Nach Feststellung einer ausreichenden Narkosetiefe per „tail pinch“ (Setzen eines Schmerzreizes mit einer chirurgischen Pinzette am Rattenschwanz) wurden die Ratten unter Fortsetzung der Inhalationsanästhesie auf dem Operationstisch in Rückenlage fixiert.

Ein schmaler Streifen des Fells wurde median im Bereich des Abdomens mit Hilfe einer Schere reseziert. Mittels Skalpell erfolgte die Ablösung der umliegenden Haut vom Unterhautfettgewebe über Abdomen und Thorax. Entlang des Rippenbogens wurde zur Eröffnung der Bauchhöhle ein Schnitt durch Unterhautfett- und Muskelgewebe geführt. Anschließend wurde das Zwerchfell am Ansatz der Rippen eingeschnitten und dann die Rippen in Höhe der vorderen Axillarlinie links und rechts durchtrennt. Die knöcherne Wand des Thorax konnte nach kranial weggeklappt werden, um Mediastinum und Lungengewebe frei darzustellen.

Das Perikard wurde eröffnet und die Aorta zur Darstellung von Gefäßabgängen freipräpariert. Anschließend wurde der Aortenbogen oberhalb des Truncus brachiocephalicus abgesetzt, die Vv. cava superior et inferior durchtrennt, das Herz-Lungenbündel angehoben und mit einem Scherenschlag herausgelöst. Nach Isolation wurde es sofort in auf 4 °C abgekühlte isotonische Kochsalzlösung (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) verbracht, die als kardioplegische Lösung diente. Hier erfolgte die Entfernung der Lunge und noch vorhandener Gewebereste. Im Anschluss wurde das Herz in das Langendorff-Modell eingebracht.

2.2.8 Modifiziertes Modell nach Langendorff

In dieser Arbeit kam ein modifiziertes Modell nach Langendorff zum Einsatz:

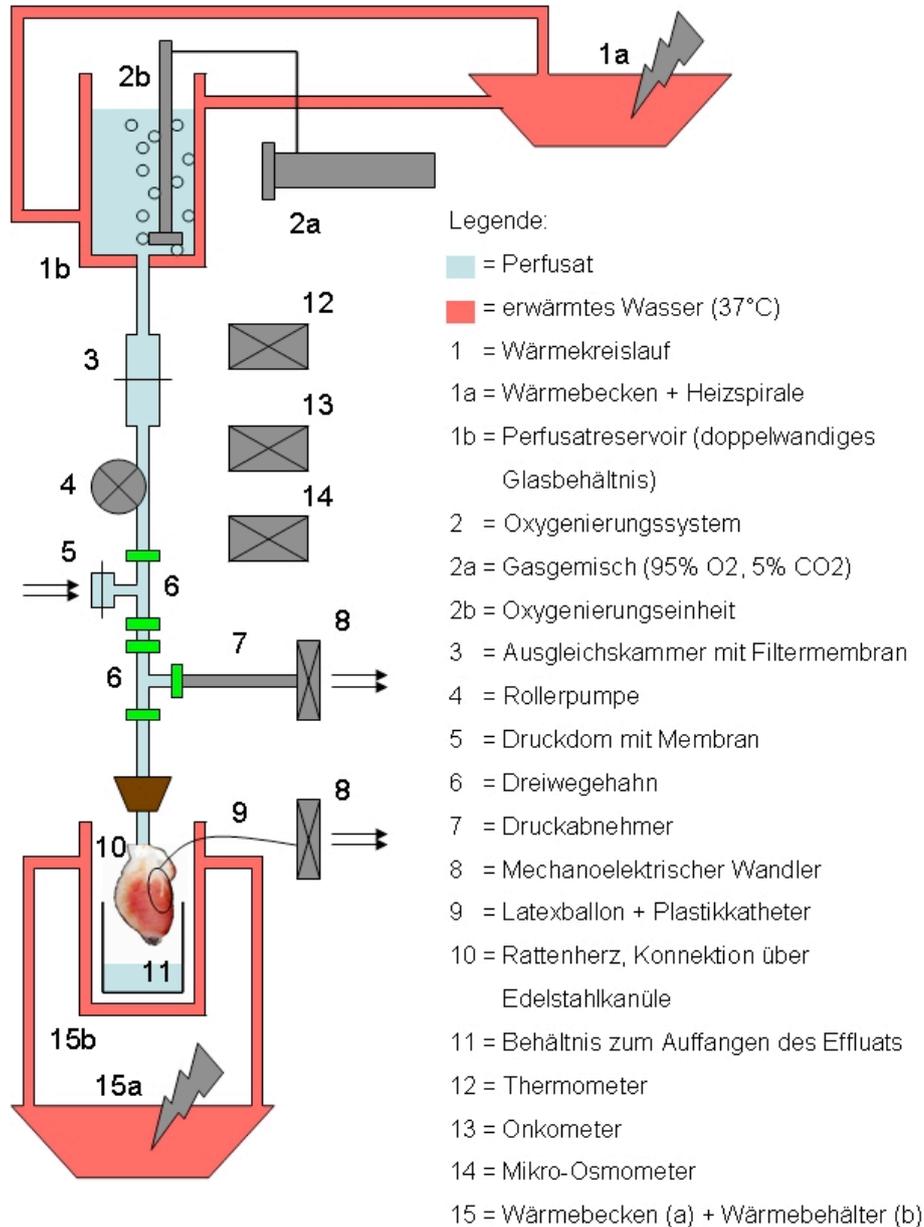


Abbildung 9: Modifiziertes Langendorff-Modell.

Das Perfusatreservoir (1b), ein doppelwandiger Glasbehälter, wurde über einen Wärmekreislauf (1a) erwärmt. Es diente als Speicher für das Perfusat und sorgte zusätzlich für dessen konstante Temperatur von 37 °C. Diese wurde vor und während der Versuchsdurchführung mit einem Thermometer (12) kontrolliert. Über die Oxygenierungseinheit (2b) wurde das Perfusat mit 95% O₂ und 5% CO₂ versetzt und damit ein pO₂ von > 400 mmHg in der

Nährlösung im Langendorff-Modell selbst und von > 200 mmHg in den Koronarien sichergestellt. Dazu wurden zu Beginn des Versuchs und im Verlauf alle fünf Minuten Perfusatproben entnommen und Gaskonzentration sowie pH-Wert mit dem Blutgasanalysegerät ABL 330 (Radiometer GmbH, Willich, Deutschland) bestimmt. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaHCO₃ auf Werte zwischen 7,35 und 7,45 eingestellt.

Über eine Rollerpumpe (4) wurde das Perfusat nach Passage einer Ausgleichskammer mit Filtermembran (3) druckreguliert in die Aorta befördert. Um einen konstanten Perfusionsdruck von 70 mmHg sicherzustellen, wurde im System zwischen Edelstahlkanüle (10) und „Infusionspunkt zur Zellgabe“ (5) ein Druckabnehmer (8) (Combitrans, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) installiert. Noch vor Versuchsbeginn wurden die zur Messung der Drücke notwendigen Schlauchsysteme im Langendorff-Modell entlüftet um Schwankungen bei der Druckmessung oder Luftembolien zu verhindern. Mit einem Quecksilbermanometer nach Gauer (HSE Druckeichgerät Typ 367, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) erfolgten Druckabgleich und Eichung in den Kreisläufen (9) und (7) (damit auch Druckabgleich im Hauptsystem). Die Softwareprogramme MacLab und Chart 4.0 wurden zur kontinuierlichen Überwachung des Perfusionsdrucks sowie Registrierung der linksventrikulären Pumpfunktion aktiviert. Wurden Veränderungen des Perfusionsdrucks durch MacLab und Chart 4.0 registriert, konnte dieser über Einstellungen an der Rollerpumpe angepasst werden.

Aufgezeichnet wurden Herzfrequenz, linksventrikulärer systolischer und diastolischer Druck. Die Erfassung der linksventrikulären Herzaktionen erfolgte mittels „Ballonmethode“. Ein im linken Ventrikel platzierter Latexballon (9) (Hugo Sachs Elektronik KG, Mach, Deutschland) war über einen starren Katheter (9) mit einem mechano-elektrischen Druckwandler (8) verbunden. Die elektrischen Signale wurden ebenfalls an den Macintosh PC weitergeleitet und durch MacLab und Chart 4.0 aufgezeichnet.

Da isolierte Herzen sehr temperaturempfindlich sind, wurde zur Gewährleistung einer definiert konstanten Temperatur des Herzens zum einen die Temperatur des Perfusats auf 37 °C gehalten und zusätzlich das Herz selbst innerhalb einer Thermostatkammer (doppelwandiger Glasbehälter) (15) installiert.

2.2.9 Versuchsdurchführung

Das zuvor isolierte Herz wurde am Aortenstumpf mit zwei atraumatischen Pinzetten gefasst, über die Edelstahlkanüle (10) geschoben und mit einer Krokodilklemme gehalten. Im Anschluss erfolgte die endgültige Fixierung mittels Ligatur. Die Öffnung der Edelstahlkanüle wurde so platziert, dass sich diese noch oberhalb der Koronarabgänge befand, um eine Verlegung derselben zu vermeiden.

Nachdem das Herz im Langendorff-Modell installiert worden war, erfolgten die letzten Schritte der Präparation: Lungengewebereste wurden vollständig entfernt und der Latexballon zur linksventrikulären Druckmessung im linken Ventrikel platziert. Dazu wurde das linke Atrium des Herzens eröffnet und der Latexballon über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt.

Nach Aktivierung der Rollerpumpe gelang das Perfusat über die Koronararterien in den arteriellen Abschnitt des Koronarkreislaufes. Hier kam es dementsprechend zu einer anterograden (physiologischen) Zirkulation. Nach Durchlaufen des venösen Schenkels des Koronarsystems strömte das Perfusat aus dem Sinus coronarius in das rechte Atrium, von dort in den rechten Ventrikel und verließ dann das Herz über den Truncus pulmonalis. Das rechte Herz hatte dabei keine physiologische Arbeit zu leisten. Das aus dem Herzen strömende Perfusat – nun als Effluat bezeichnet – wurde in einem Behältnis (11) aufgefangen und für weitere Auswertungen aufbewahrt.

Zu Beginn des Versuchs wurde eine fünfminütige Perfusionsphase eingeschaltet, um eine „Gewöhnung“ des Herzens an das Langendorff-Modell sicherzustellen; diese Phase wird als „steady state“ bezeichnet. Aus dem während dieser Phase gesammelten Effluat wurde eine repräsentative Menge entnommen und die Isoenzyme CK (Creatinkinase) und CK-MB (Creatinkinase, Isozym MB) bestimmt (CKA).

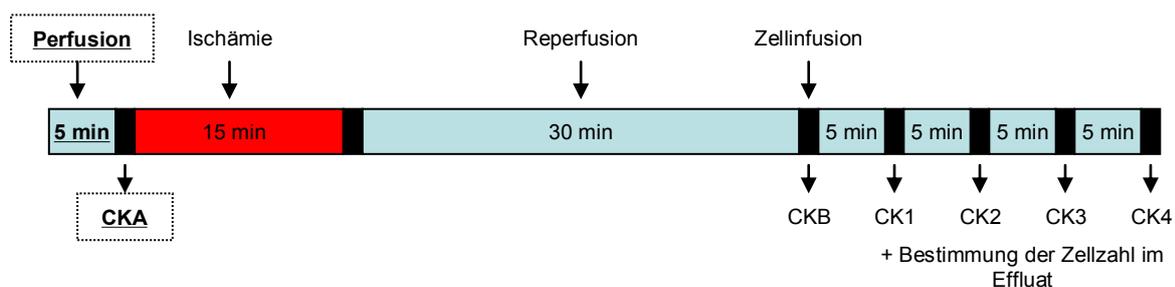


Abbildung 10: Zeitliche Abfolge des Versuchs mit Kennzeichnung der Perfusions-, Ischämie-, Reperfusion- und Zellinfusionsphase sowie den Zeitpunkten der CK-Messung.

Nach Abschluss der ersten Perfusionsphase wurde bei den Versuchsreihen I, II, III sowie VI und VII (Verum, Kontrolle und Placebo) eine 15-minütige globale Ischämie durch Stopp des Perfusats induziert. Bereits nach kurzer Zeit wurde am Herzen, bedingt durch einen Mangel an Nährstoffen, keine Pumpfunktion mehr festgestellt.

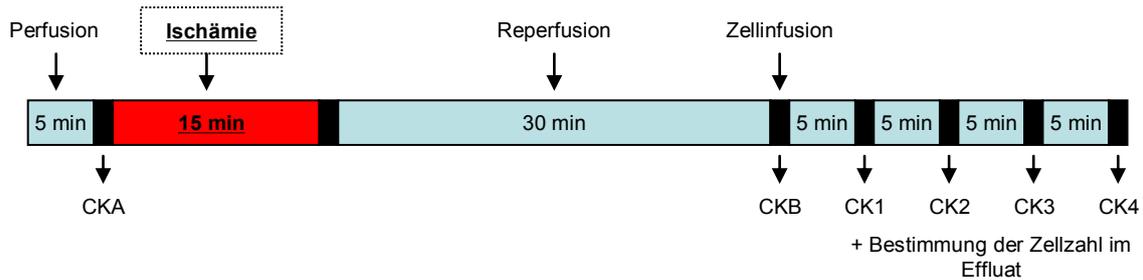


Abbildung 11: Zeitliche Abfolge des Versuchs mit Kennzeichnung der Perfusions-, Ischämie-, Reperfusion- und Zellinfusionsphase sowie den Zeitpunkten der CK-Messung.

Nach der Ischämiezeit wurde die Rollerpumpe wieder aktiviert und das Herz nahm seine Pumpfunktion wieder auf. Am Ende dieser 30-minütigen Reperusionsphase wurden ein zweites Mal die Werte CK und CK-MB im Effluat bestimmt (CKB). Zusätzlich erfolgte nun die Infusion der in zwei Milliliter Isolationsmedium gelösten fluoreszenzmarkierten BMCs. Mit Hilfe einer Spritze und aufgesetzter Kanüle der Größe 0,45 x 13 mm wurde die Zellsuspension über eine Membran in das Langendorff-Modell unter geringer Geschwindigkeit druckkontrolliert eingebracht.

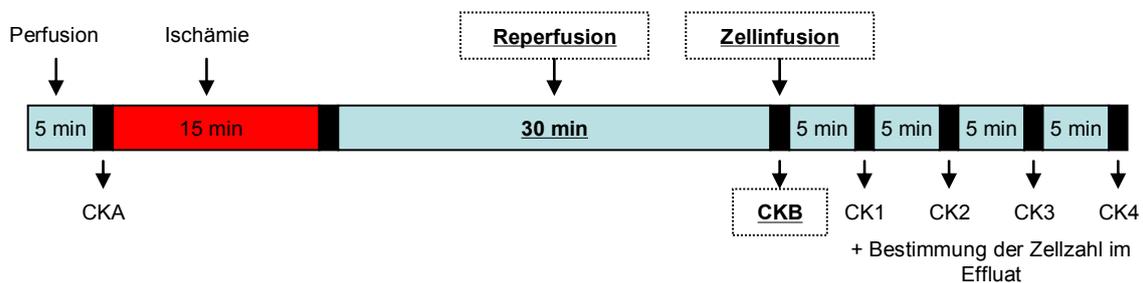


Abbildung 12: Zeitliche Abfolge des Versuchs mit Kennzeichnung der Perfusions-, Ischämie-, Reperfusion- und Zellinfusionsphase sowie den Zeitpunkten der CK-Messung.

Im Anschluss wurde das Effluat über einen Zeitraum von weiteren 20 Minuten gesammelt und in Behältnissen zur weiteren Auswertung aufgefangen. Die 20 Minuten waren in vier 30

Phasen zu je fünf Minuten unterteilt. Aus jeder der vier Phasen wurde eine repräsentative Menge des Effluats entnommen, CK sowie CK-MB gemessen (CK1-4) und die Anzahl der „ausgeschiedenen“ Zellen bestimmt.

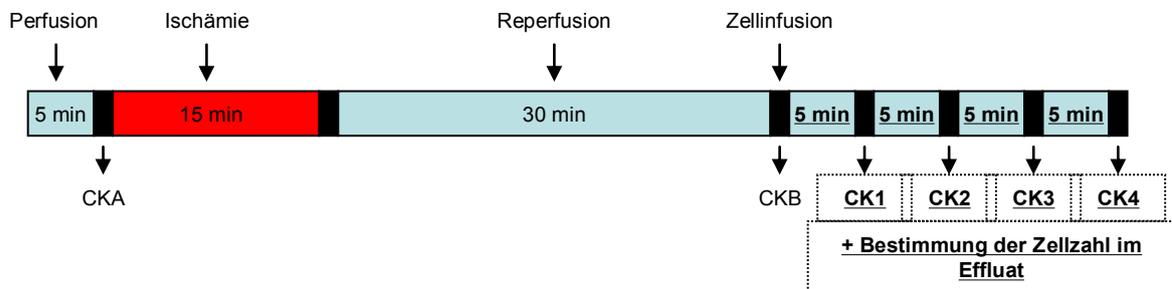


Abbildung 13: Zeitliche Abfolge des Versuchs mit Kennzeichnung der Perfusions-, Ischämie-, Reperfusions- und Zellinfusionsphase sowie den Zeitpunkten der CK-Messung.

2.2.10 Versuchsauswertung

2.2.10.1 Bestimmung der CK-Werte

Die Messung der Creatinkinaseaktivität erfolgte photometrisch im Labor des Instituts für klinische Chemie des Universitätsklinikums Gießen. Bestimmt wurden die Isoformen CK und CK-MB. Hierfür wurden die Proben vorher für zehn Minuten bei 4 °C und 4000 U/min zentrifugiert und dann abpipetiert, um vorhandene Zellen zu eliminieren.

2.2.10.2 Zählen der Zellen im Effluat

Das zu den unterschiedlichen Phasen des Versuchs gesammelte Effluat wurde auf BMCs untersucht. Dafür wurden Mengen von jeweils 14 µl mittels Pipette (Easypet, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) entnommen und auf eine Neubauer-Zählkammer (LO – Laboroptik GmbH, Bad Homburg, Deutschland) gegeben. Unter dem Mikroskop (Leica DMIL, Wetzlar, Deutschland) erfolgte die Auszählung der BMCs der einzelnen Stichproben, im Anschluss daran die Bildung eines Mittelwerts. Über Hochrechnung wurde auf die Gesamtanzahl der im Effluat befindlichen Zellen geschlossen. Die Anzahl der im Herzen verbliebenen Zellen ergab sich aus Subtraktion der im Effluat gezählten Zellen von der Menge der verabreichten Zellen.

2.2.10.3 Evaluation der Herzen

Nach Beenden des Versuchs am modifizierten Langendorff-Modell wurde das isolierte Herz in drei Abschnitte (A, B, C) unterteilt. Mit einer Rasierklinge wurden Vorhöfe (Herzbasis, A), Ventrikel Ebene (B) und apikaler Ventrikelanteil (C) getrennt, auf Korkplättchen gelegt und

mit dem Gewebekleber Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) überzogen. Anschließend wurden sie in Flüssigstickstoff eingefroren, mit Parafilm „M“ (American National Can Group, Chicago, USA) zur Vermeidung von Verunreinigungen und Verdunstungen abgedeckt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Mit einem Mikrotom (Kryostat CM 1900, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden repräsentative Anteile des Herzens in 10 µm dicke Schnitte unterteilt. Diese wurden auf einen Objektträger aufgebracht und bis zur Färbung bei -80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Mit Propidium Iodid (Absorptionsmaximum: ~30-40 nm, Emissionsmaximum: ~15 nm; Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) wurden das Endothel, mit DAPI (4', 6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Absorptionsmaximum: 340nm, Emissionsmaximum: 488nm) die myokardialen Zellen gefärbt.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop BX60 (Olympus, Hamburg, Deutschland). Mit der angeschlossenen Digitalkamera Hitachi KP-M1E/K (Hitachi Denshi Europe, Garforth, UK) wurden Aufnahmen angefertigt.

2.2.11 Angaben zur Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS 19 (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) durchgeführt. Zur Auswertung der Vergleiche der Creatinkinase vor und nach Ischämie sowie der Unterschiede innerhalb und zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bezüglich Zellrekrutierung wurden folgende Tests genutzt: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (nichtparametrischer Test), Oneway-Anova (einfaktorielle Varianzanalyse), 2-seitiger Dunnet-T-Test (paarweiser T-Test für Mehrfachvergleiche), Scheffé-Prozedur (paarweise Vergleiche gleichzeitig für alle möglichen Kombinationen der Mittelwerte).

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Creatinkinase im Effluat

Im Effluat wurde in den Versuchsreihen I, II, III, IV, VI und VII zu den Zeitpunkten vor Einleitung der Ischämie (A), 30 Minuten nach Ischämie bzw. am Ende der Reperfusionphase (B) sowie fünf (1), zehn (2), 15 (3) und 20 Minuten (4) nach Zellgabe die Creatinkinase in U/l (Isoenzyme CK und CK-MB) bestimmt. In der Versuchsreihe V ergab sich keine signifikante CK-Veränderung – hier wurde keine Ischämie induziert, da das Perfusat nicht gestoppt wurde.

Zeitpunkt / Isoenzym	Arithmetisches Mittel in U/l	Standardabweichung in U/l
A / CK	9,05	3,76
A / CK-MB	8,18	5,93
B / CK	30,95	23,93
B / CK-MB	16,27	13,41
1 / CK	19,14	22,34
1 / CK-MB	10,77	7,71
2 / CK	32,33	74,03
2 / CK-MB	9,86	24,53
3 / CK	26,14	59,9
3 / CK-MB	8,32	21,99
4 / CK	21,5	51,66
4 / CK-MB	7,55	21,64

Tabelle 2: Arithmetisches Mittel und Standardabweichung der CK- und CK-MB-Bestimmungen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Versuchsdurchführung, Angaben in U/l.

Das arithmetische Mittel des Isoenzym CK vor Ischämieinduktion (A) betrug 9,05 U/l mit einer Standardabweichung von 3,76 U/l. Nach stattgehabter Ischämie (B) wurde im Mittel

eine CK von 30,95 U/l mit einer Standardabweichung von 23,93 U/l gemessen. Bei der Messung des Isoenzym CK-MB vor Stopp des Perfusats (A) ergab sich ein arithmetisches Mittel von 8,18 U/l mit einer Standardabweichung von 5,93 U/l. Nach Ischämie (B) wurde eine CK-MB von 16,27 U/l (+/- 13,41 U/l) gemessen.

Auf statistisch signifikante Unterschiede wurden die Creatinkinase (Isoenzyme CK und CK-MB) im Effluat vor (A) und nach Induktion der Ischämie (B) im Langendorff-Modell untersucht.

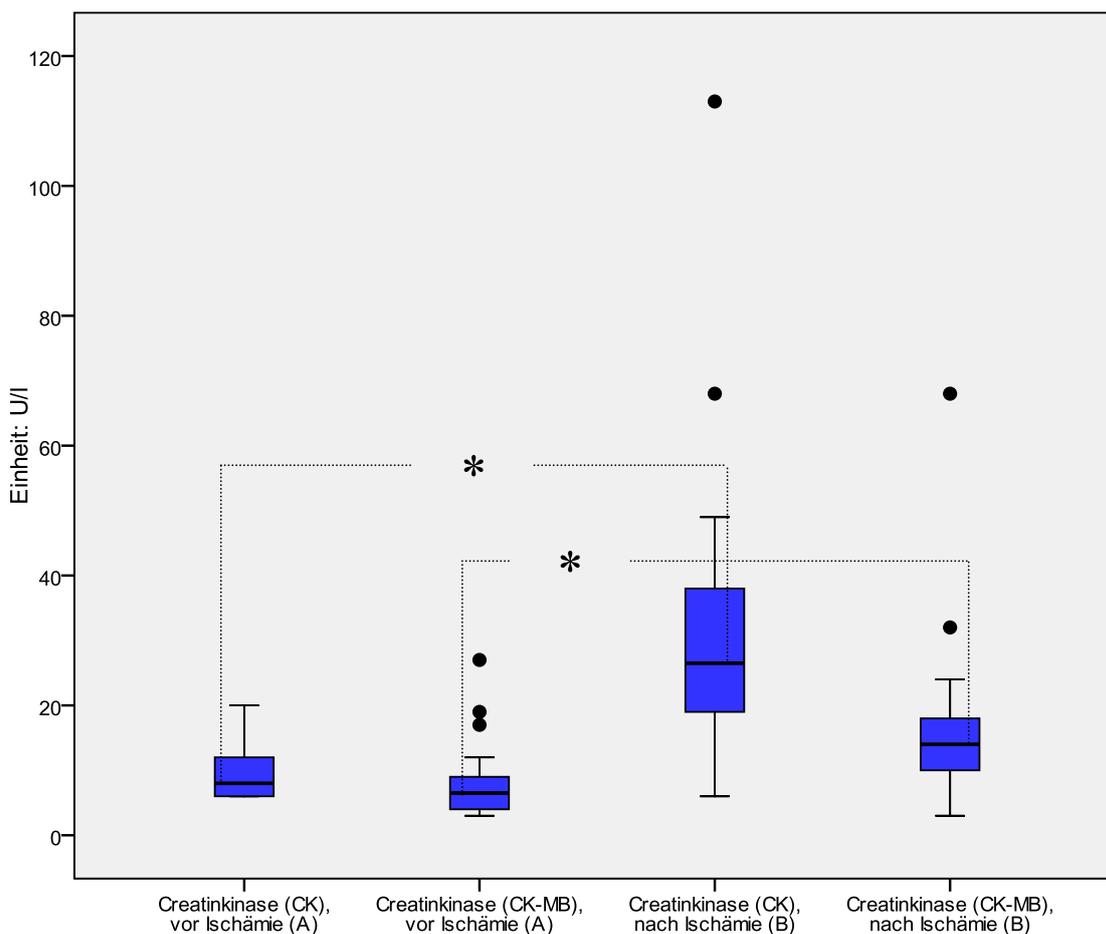


Abbildung 14: Arithmetisches Mittel von Creatinkinase (Isoenzyme CK und CK-MB) mit Standardabweichung vor und nach Ischämie. Signifikanzniveaus (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) zwischen CK vor und nach sowie CK-MB vor und nach Ischämie.

• Ausreißer, * Signifikanz ($p < 0,05$).

Die Auswertung mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zeigte signifikante Unterschiede für die gemessenen Creatinkinase-Werte vor (A) und nach Ischämie (B) für beide Isoenzyme (CK: $p < 0,001$, CK-MB: $p = 0,002$).

3.2 Immunhistochemie

Mittels Fluoreszenzmikroskop wurden die Herzschnitte evaluiert. Nach Induktion einer globalen Ischämie waren die infundierten und fluoreszenzmarkierten Zellen im Myokard vorzufinden.

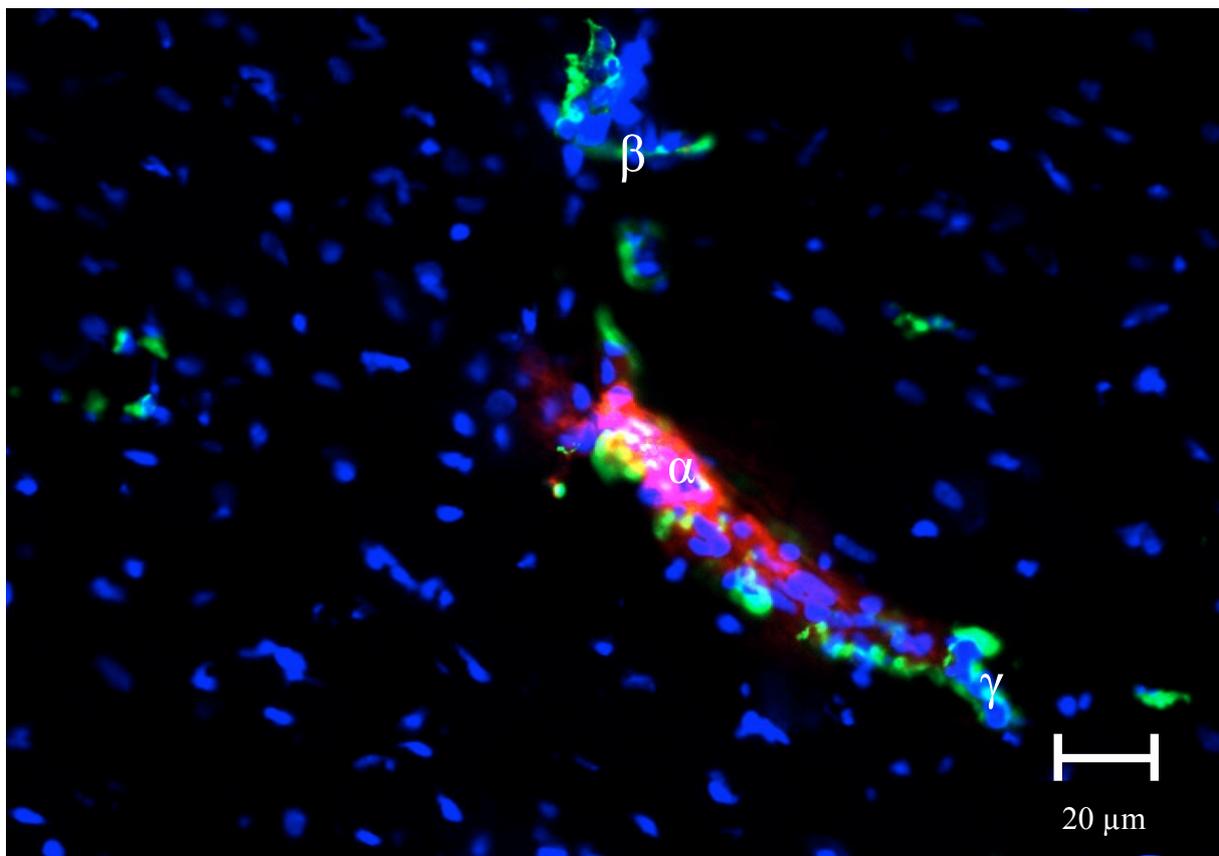


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Gewebeschnitte (Herzbasis, A; exemplarische Abbildung der Versuchsgruppe IV), Maßstab: 20 μm . α = CD34-positive Zellen (rot); β = myokardiale Zellkerne (blau); γ = Actinfilamente des Endothels (grün).

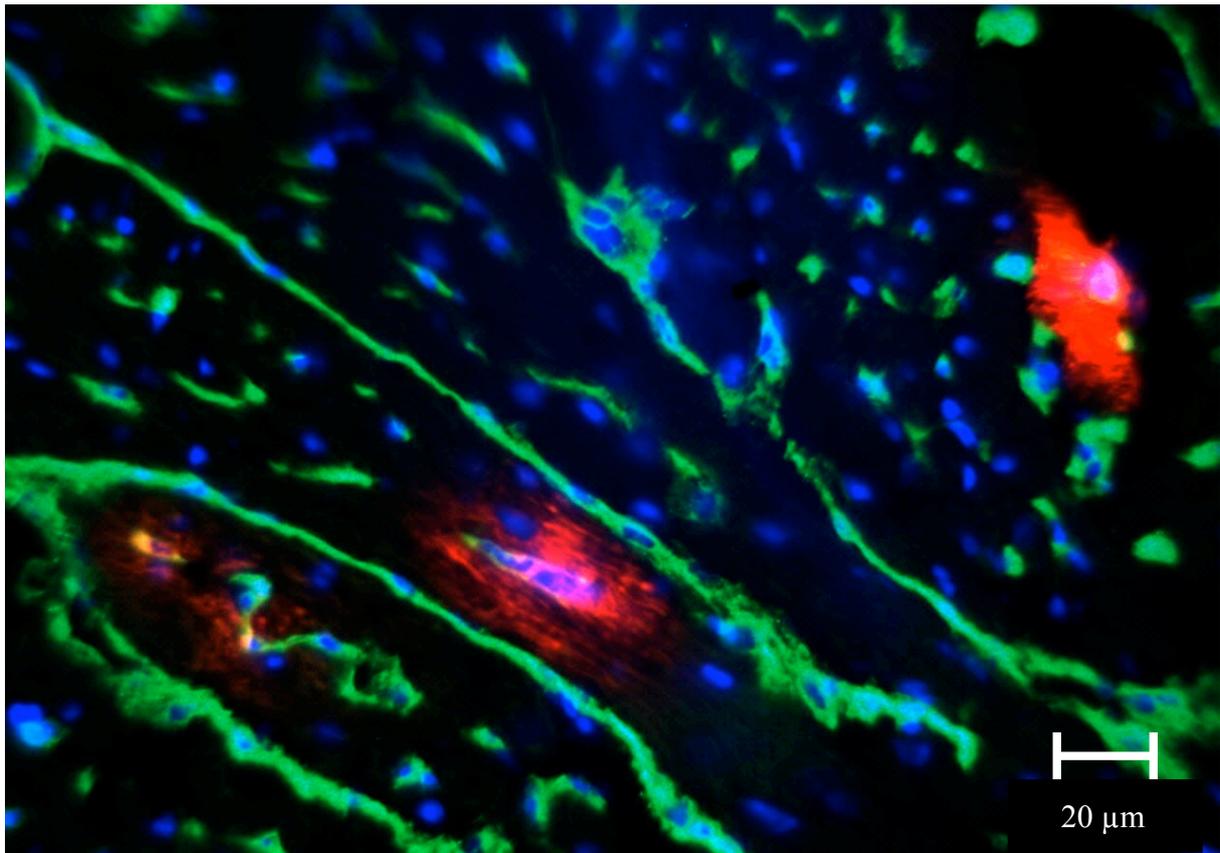


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Gewebeschnitte (Ventrikel-ebene, B; exemplarische Abbildung der Versuchsgruppe IV), Maßstab: 20 μm . Maßstab: 20 μm . α = CD34-positive Zellen (rot), eine extra-, eine weitere intravesikulär lokalisiert; β = myokardiale Zellkerne (blau); γ = Actinfilamente des Endothels (grün).

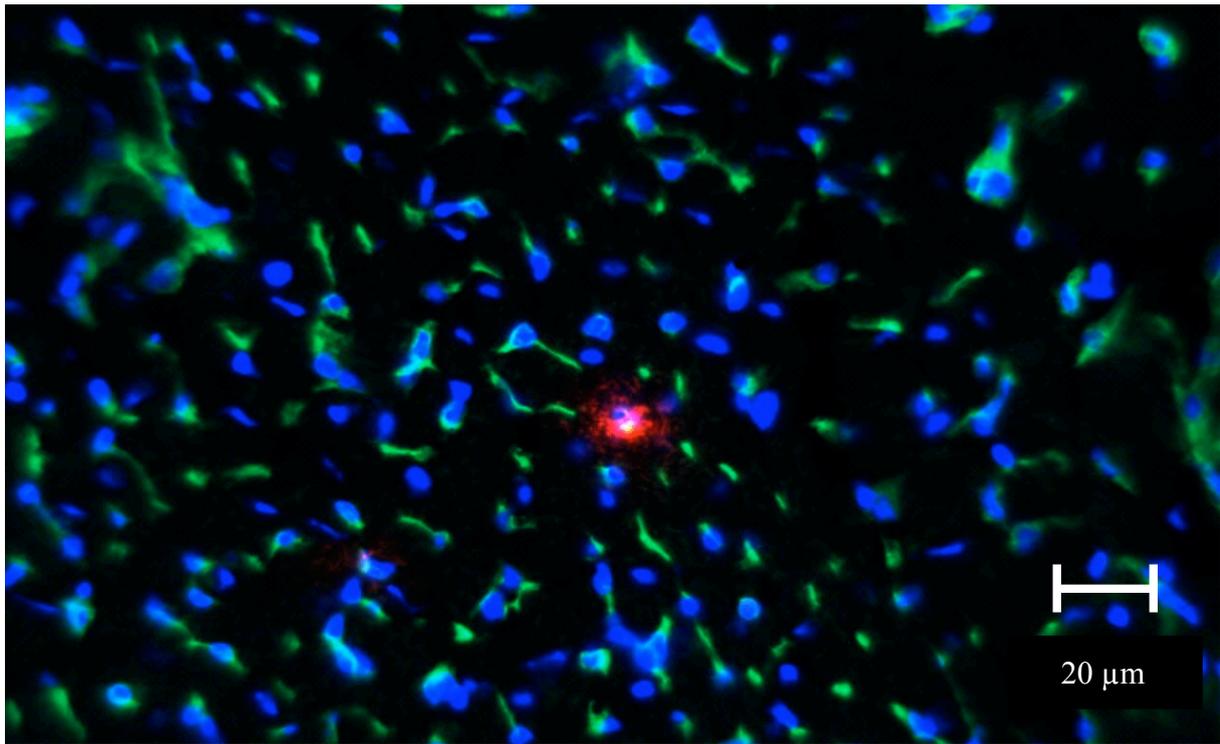


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Gewebeschnitte (apikaler Ventrikelanteil, C; exemplarische Abbildung der Versuchsgruppe IV), Maßstab: 20 μm . Maßstab: 20 μm . α = CD34-positive Zellen (rot), intramyokardial; β = myokardiale Zellkerne (blau); γ = Actinfilamente des Endothels (grün).

3.3 Anzahl rekrutierter Knochenmarkzellen

Im Rahmen der lichtmikroskopischen Auswertung der Effluatproben wurden ausschließlich Zellen in den Effluaten des ersten Sammelzeitraums gefunden; die Effluatproben 2-4 waren bei allen Versuchsreihen zellfrei.

Im Folgenden ist eine Übersicht zu den durchgeführten Versuchsreihen mit Angabe der Anzahl infundierter, im Effluat befindlicher und rekrutierter Zellen aufgelistet:

Versuchsreihe I (Dosierung des Methylprednisolons: 0,1 mg/kgKG)

	Infundierte Zellzahl	Zellzahl im Effluat		Rekrutierte Zellzahl	
I 1	20,2 x 10 ⁶	12,75 x 10 ⁶	63,11 %	7,45 x 10 ⁶	36,88 %
I 2	15,1 x 10 ⁶	9,1 x 10 ⁶	60,26 %	6 x 10 ⁶	39,74 %
I 3	19,6 x 10 ⁶	13,16 x 10 ⁶	67,14 %	6,44 x 10 ⁶	32,86 %
I 4	17,5 x 10 ⁶	10,09 x 10 ⁶	57,65 %	7,41 x 10 ⁶	42,34 %
Arithmetisches Mittel und Standardabweichung					
	$\bar{x} = 18,1 \times 10^6$ $\sigma = 2,31$			$\bar{x} = 6,83$ $\sigma = 0,72$	$\bar{x} = 37,96 \%$ $\sigma = 4,06$

Tabelle 3: Versuchsreihe I. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.

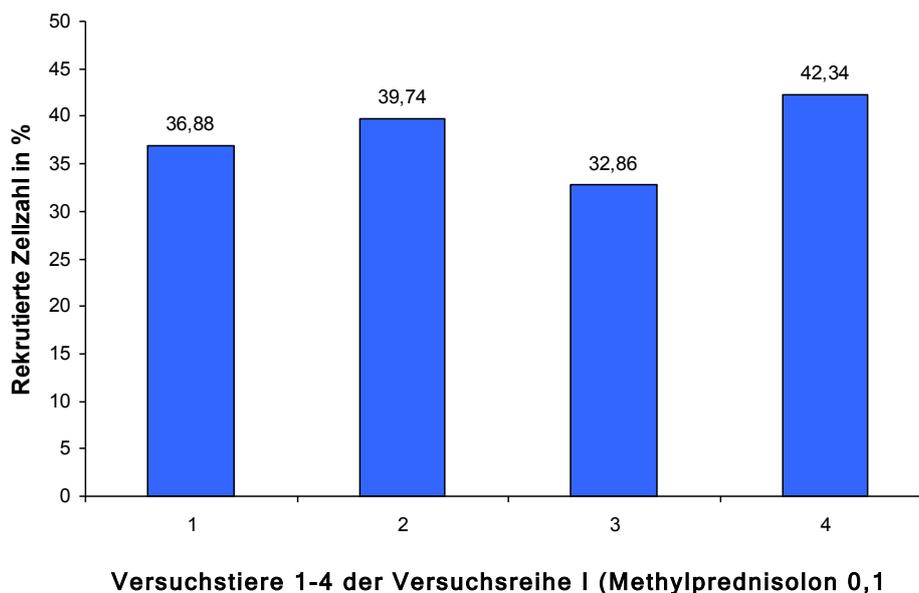


Abbildung 18: Versuchsreihe I (Verumgruppe), Dosierung des Methylprednisolons 0,1 mg/kgKG.. Rekrutierte Zellen, Angabe in %.

Versuchsreihe II (Dosierung des Methylprednisolons: 1 mg/kgKG)

	Infundierte Zellzahl	Zellzahl im Effluat		Rekrutierte Zellzahl	
II 1	15,2 x 10 ⁶	11,7 x 10 ⁶	76,97 %	3,5 x 10 ⁶	23,03 %
II 2	15,7 x 10 ⁶	10,73 x 10 ⁶	68,34 %	4,97 x 10 ⁶	31,66 %
II 3	17,2 x 10 ⁶	14,3 x 10 ⁶	83,13 %	2,9 x 10 ⁶	16,86 %
II 4	15,7 x 10 ⁶	13,49 x 10 ⁶	85,9 %	2,21 x 10 ⁶	14,1 %
II 5	17,0 x 10 ⁶	12,7 x 10 ⁶	74,7 %	4,3 x 10 ⁶	25,3 %
Arithmetisches Mittel und Standardabweichung					
	$\bar{x} = 16,16 \times 10^6$ $\sigma = 0,88$			$\bar{x} = 3,58 \times 10^6$ $\sigma = 1,09$	$\bar{x} = 22,19 \%$ $\sigma = 6,96$

Tabelle 4: Versuchsreihe II. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.

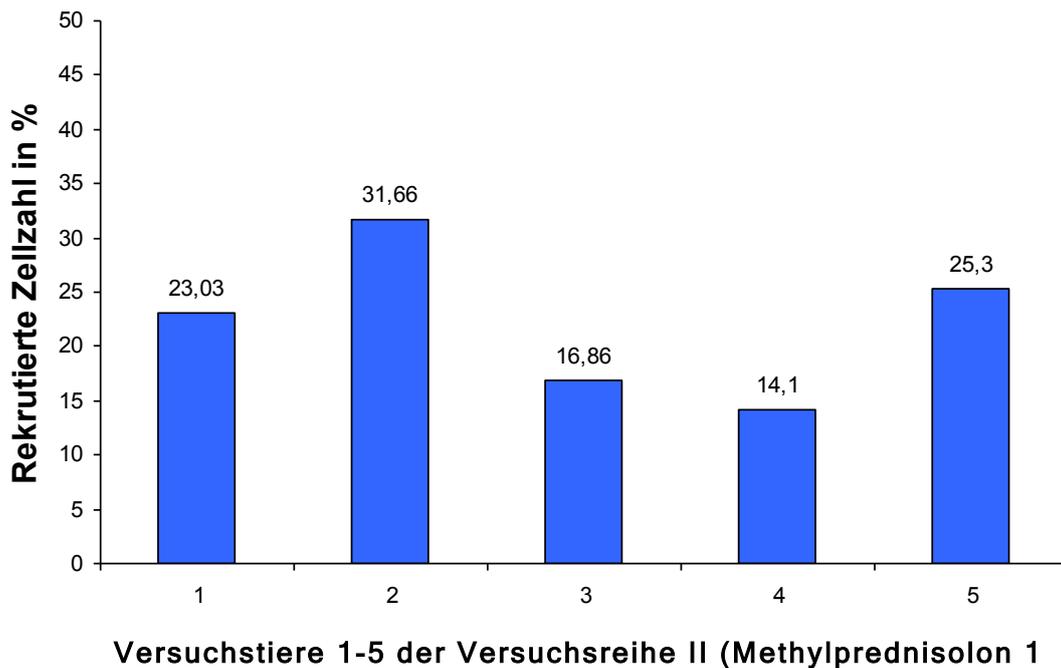


Abbildung 19: Versuchsreihe II (Verumgruppe), Dosierung des Methylprednisolons 1 mg/kgKG.. Rekrutierte Zellen, Angabe in %.

Versuchsreihe III (Dosierung des Methylprednisolons: 5 mg/kgKG)

	Infundierte Zellzahl	Zellzahl im Effluat		Rekrutierte Zellzahl	
III 1	18,9 x 10 ⁶	11,59 x 10 ⁶	61,34 %	7,31 x 10 ⁶	38,66 %
III 2	15,1 x 10 ⁶	12,59 x 10 ⁶	83,35 %	2,51 x 10 ⁶	16,65 %
III 3	17,5 x 10 ⁶	13,08 x 10 ⁶	74,73 %	4,42 x 10 ⁶	25,27 %
III 4	20,8 x 10 ⁶	12,83 x 10 ⁶	61,65 %	7,98 x 10 ⁶	38,34 %
III 5	17,4 x 10 ⁶	15,27 x 10 ⁶	87,75 %	2,13 x 10 ⁶	12,24 %
III 6	17,3 x 10 ⁶	15,3 x 10 ⁶	88,43 %	2 x 10 ⁶	11,56 %
III 7	16,5 x 10 ⁶	15,06 x 10 ⁶	91,27 %	1,44 x 10 ⁶	8,73 %
III 8	16,1 x 10 ⁶	12,51 x 10 ⁶	77,71 %	3,59 x 10 ⁶	22,29 %
III 9	13,9 x 10 ⁶	12,58 x 10 ⁶	90,5 %	1,32 x 10 ⁶	9,5 %
Arithmetisches Mittel und Standardabweichung					
	$\bar{x} = 17,06 \times 10^6$ $\sigma = 2,02$			$\bar{x} = 3,63 \times 10^6$ $\sigma = 2,48$	$\bar{x} = 20,36 \%$ $\sigma = 11,71$

Tabelle 5: Versuchsreihe III. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.

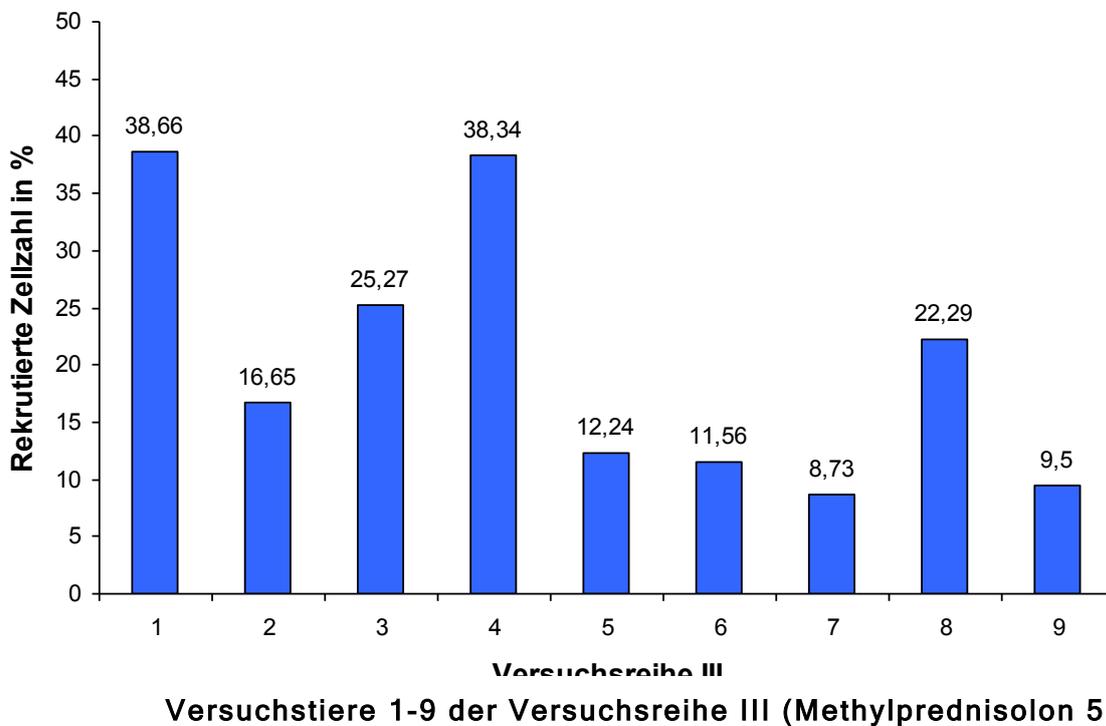


Abbildung 20: Versuchsreihe III (Verumgruppe), Dosierung des Methylprednisolons 5 mg/kgKG.. Rekrutierte Zellen, Angabe in %.

Versuchsreihe IV (keine Vorbehandlung, 15 min Ischämie, keine Reperfusion)

	Infundierte Zellzahl	Zellzahl im Effluat		Rekrutierte Zellzahl	
IV 1	19,9 x 10 ⁶	14,96 x 10 ⁶	75,17 %	4,94 x 10 ⁶	24,82 %
IV 2	15 x 10 ⁶	14,175 x 10 ⁶	94,5 %	0,825 x 10 ⁶	5,5 %
IV 3	17,3 x 10 ⁶	14,025 x 10 ⁶	81,06 %	3,275 x 10 ⁶	18,93 %
IV 4	13,8 x 10 ⁶	10,625 x 10 ⁶	76,99 %	3,175 x 10 ⁶	23,01 %
IV 5	16 x 10 ⁶	11,875 x 10 ⁶	74,21 %	4,125 x 10 ⁶	25,78 %
Arithmetisches Mittel und Standardabweichung					
	$\bar{x} = 16,4 \times 10^6$ $\sigma = 2,34$			$\bar{x} = 3,27 \times 10^6$ $\sigma = 1,54$	$\bar{x} = 19,61\%$ $\sigma = 8,31$

Tabelle 6: Versuchsreihe IV. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.

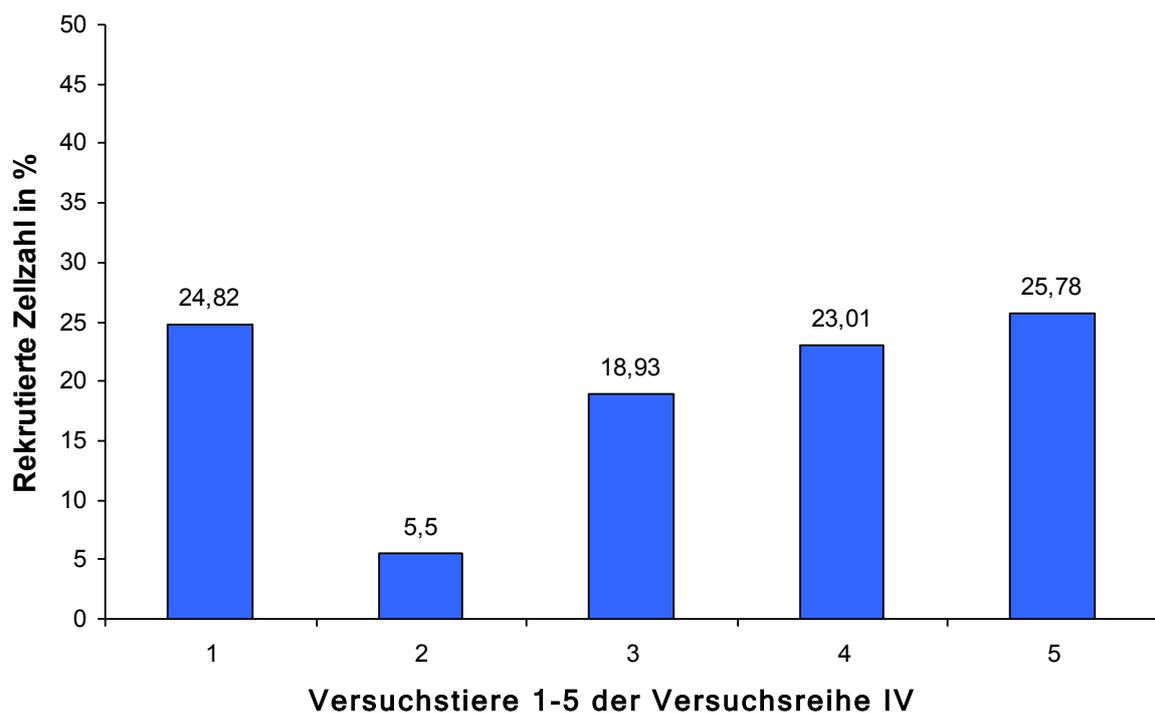
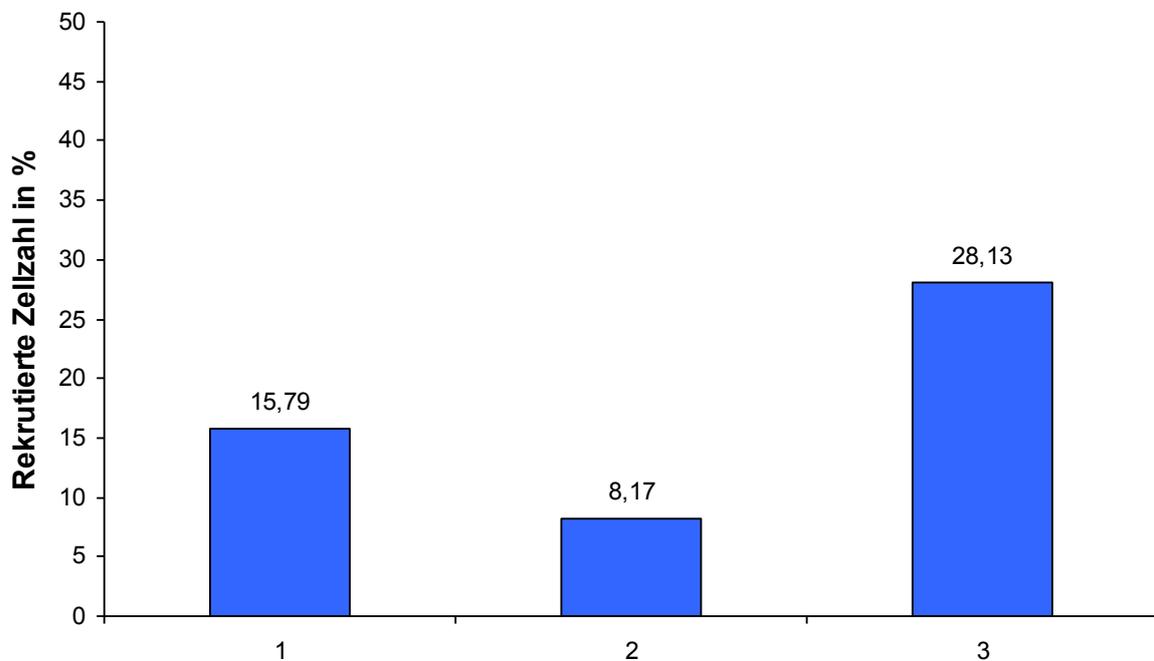


Abbildung 21: Versuchsreihe IV (keine Vorbehandlung, 15 Minuten Ischämie, keine Reperfusion). Rekrutierte Zellen, Angabe in %.

Versuchsreihe V (keine Vorbehandlung, keine Ischämie, keine Reperfusion)

	Infundierte Zellzahl	Zellzahl im Effluat		Rekrutierte Zellzahl	
V 1	14,25 x 10 ⁶	12 x 10 ⁶	84,21 %	2,25 x 10 ⁶	15,79 %
V 2	23,25 x 10 ⁶	21,35 x 10 ⁶	91,82 %	1,9 x 10 ⁶	8,17 %
V 3	16 x 10 ⁶	11,5 x 10 ⁶	71,87 %	4,5 x 10 ⁶	28,13 %
Arithmetisches Mittel und Standardabweichung					
	$\bar{x} = 17,83 \times 10^6$ $\sigma = 4,77$			$\bar{x} = 2,88 \times 10^6$ $\sigma = 1,41$	$\bar{x} = 17,36 \%$ $\sigma = 10,07$

Tabelle 7: Versuchsreihe V. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.



Versuchstiere 1-3 der Versuchsreihe V

Abbildung 22: Versuchsreihe V (keine Vorbehandlung, keine Ischämie, keine Reperfusion). Rekrutierte Zellen, Angabe in %.

Versuchsreihe VI (Kontrollgruppe, keine Vorbehandlung)

	Infundierte Zellzahl	Zellzahl im Effluat		Rekrutierte Zellzahl	
VI 1	16,7 x 10 ⁶	10,5 x 10 ⁶	62,87 %	6,2 x 10 ⁶	37,13 %
VI 2	20,1 x 10 ⁶	10,86 x 10 ⁶	54,02 %	9,24 x 10 ⁶	45,97 %
VI 3	28 x 10 ⁶	17,7 x 10 ⁶	63,21 %	10,3 x 10 ⁶	36,79 %
VI 4	15 x 10 ⁶	7,43 x 10 ⁶	49,5 %	7,58 x 10 ⁶	50,5 %
VI 5	22,6 x 10 ⁶	12,66 x 10 ⁶	56 %	9,95 x 10 ⁶	44 %
VI 6	18,25 x 10 ⁶	6,8 x 10 ⁶	37,26 %	11,45 x 10 ⁶	62,74 %
VI 7	18 x 10 ⁶	11,25 x 10 ⁶	62,5 %	6,75 x 10 ⁶	37,5 %
Arithmetisches Mittel und Standardabweichung					
	$\bar{x} = 19,81 \times 10^6$ $\sigma = 4,35$			$\bar{x} = 8,78 \times 10^6$ $\sigma = 1,97$	$\bar{x} = 44,95 \%$ $\sigma = 9,42$

Tabelle 8: Versuchsreihe VI: \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.

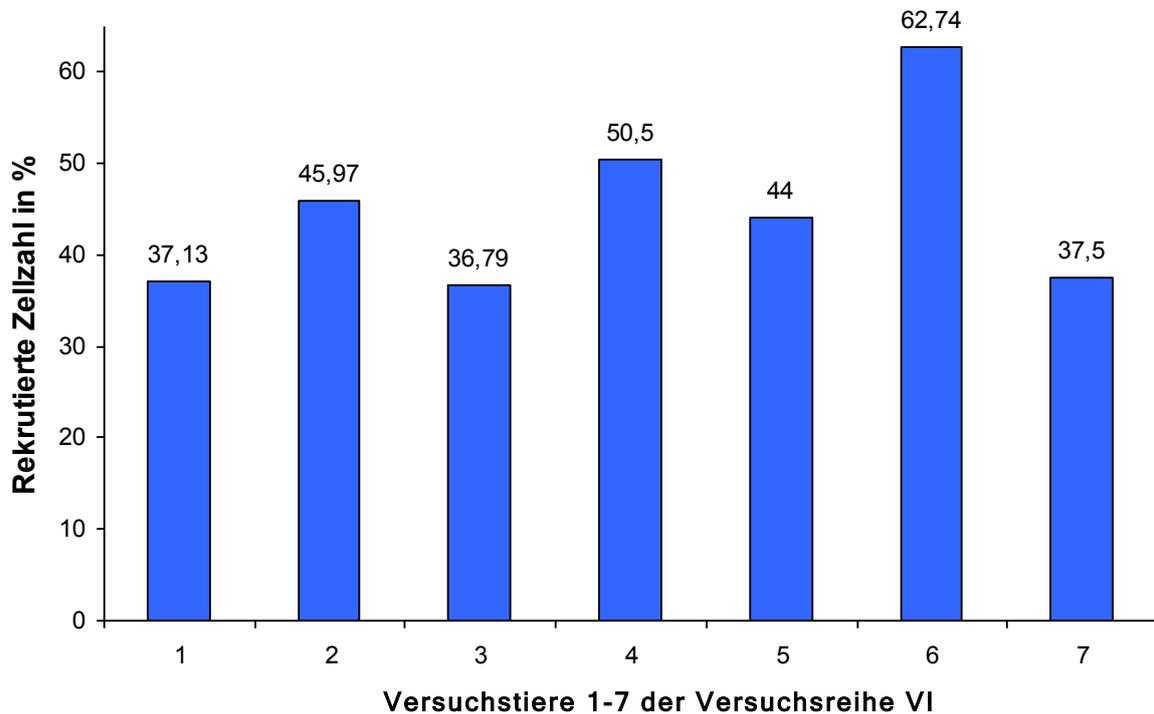


Abbildung 23: Versuchsreihe VI (Kontrollgruppe), keine Vorbehandlung. Rekrutierte Zellen, Angabe in %.

Versuchsreihe VII (Placebogruppe, 1 ml Aqua ad iniectabilia/kgKG)

	Infundierte Zellzahl	Zellzahl im Effluat		Rekrutierte Zellzahl	
VII 1	18,2 x 10 ⁶	11,55 x 10 ⁶	63,46 %	6,65 x 10 ⁶	36,54 %
VII 2	12,9 x 10 ⁶	7,35 x 10 ⁶	56,97 %	5,55 x 10 ⁶	43,02 %
VII 3	19,6 x 10 ⁶	11,85 x 10 ⁶	60,45 %	7,75 x 10 ⁶	39,54 %
VII 4	18,7 x 10 ⁶	11,79 x 10 ⁶	63,04 %	6,91 x 10 ⁶	36,95 %
Arithmetisches Mittel und Standardabweichung					
	$\bar{x} = 17,35 \times 10^6$ $\sigma = 3,02$			$\bar{x} = 6,72 \times 10^6$ $\sigma = 0,91$	$\bar{x} = 39,01 \%$ $\sigma = 2,98$

Tabelle 9: Versuchsreihe VII. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.

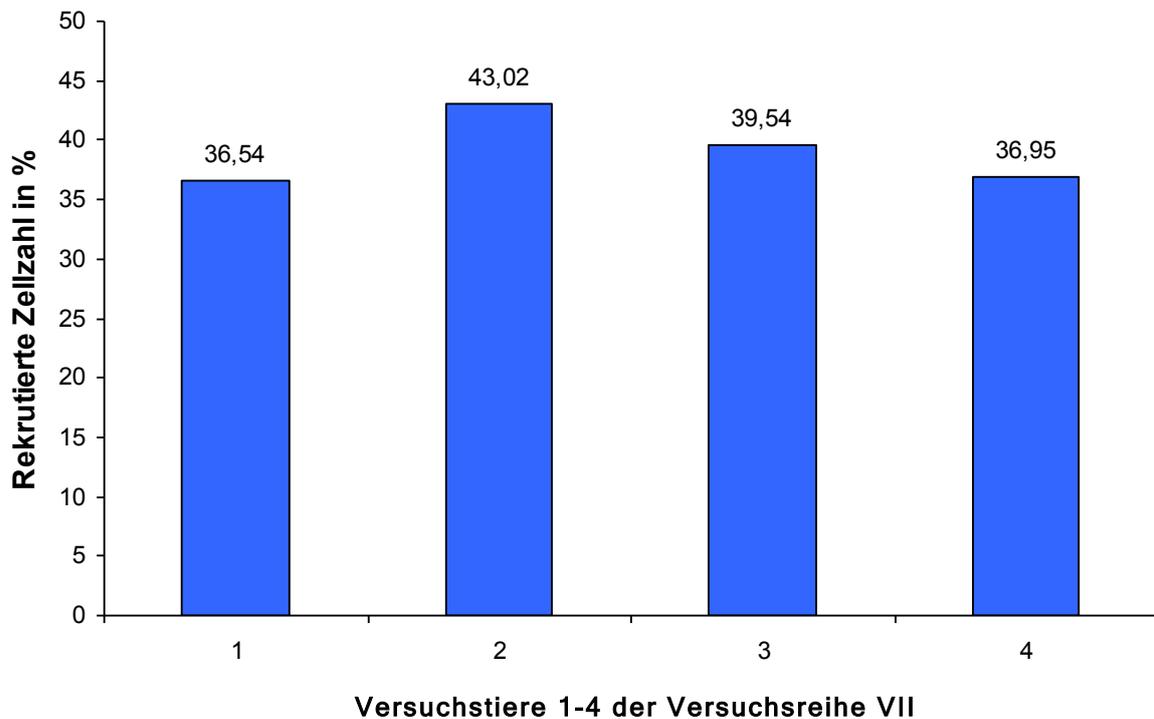


Abbildung 24: Versuchsreihe VII (Placebogruppe), Aqua ad iniectabilia 1 ml/kgKG. Rekrutierte Zellen, Angabe in %.

Die folgende Abbildung zeigt die durchgeführten Versuchsreihen in einer Übersicht als Boxplot-Grafik. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigt, dass die in den jeweiligen Gruppen erhobenen Mittelwerte statistisch signifikant unterschiedlich sind ($p < 0,001$).

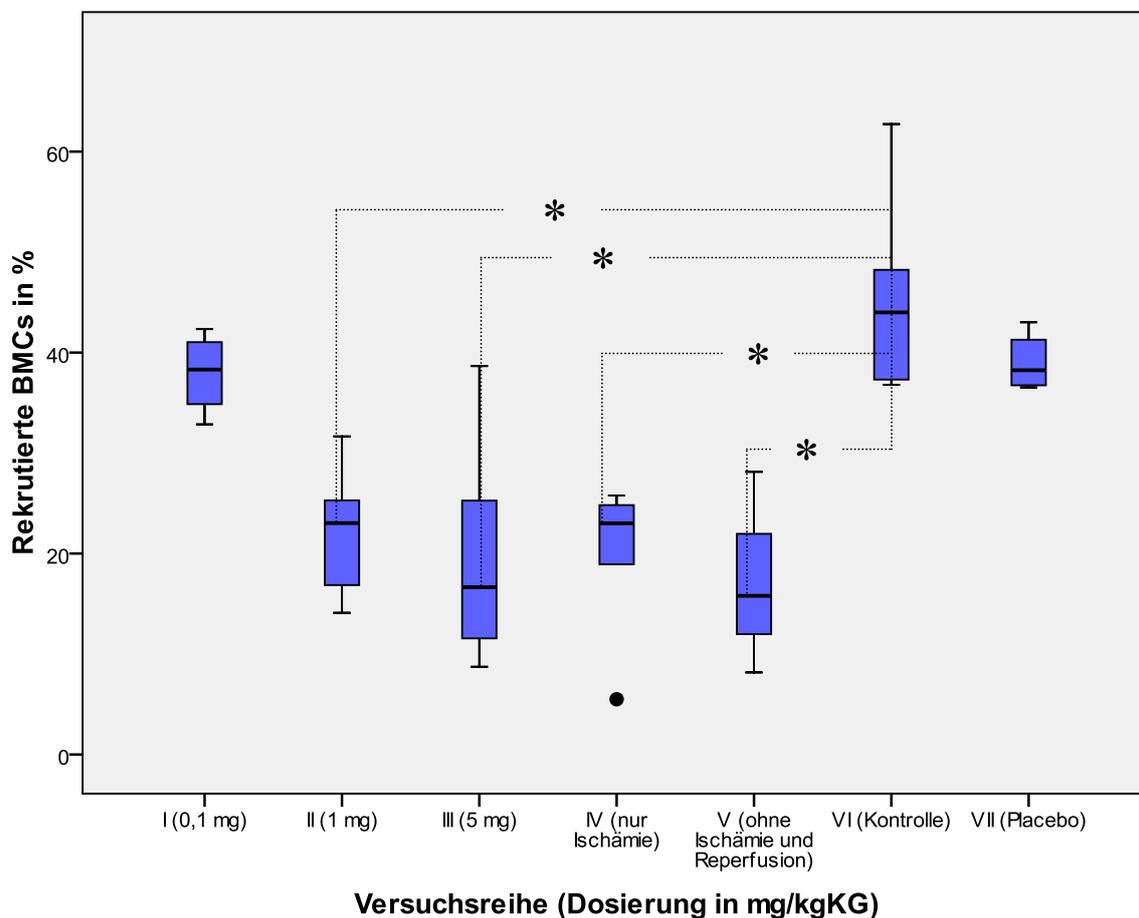


Abbildung 25: Darstellung der Versuchsreihen I, II, III, IV, V, VI und VII als Boxplot-Grafik mit Mittelwerten und Standardabweichung.

- Ausreißer, * Signifikanz ($p < 0,05$).

Der statistische Vergleich mittels Dunnet-T-Test zwischen Kontrollgruppe VI und Placebogruppe VII zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,755$).

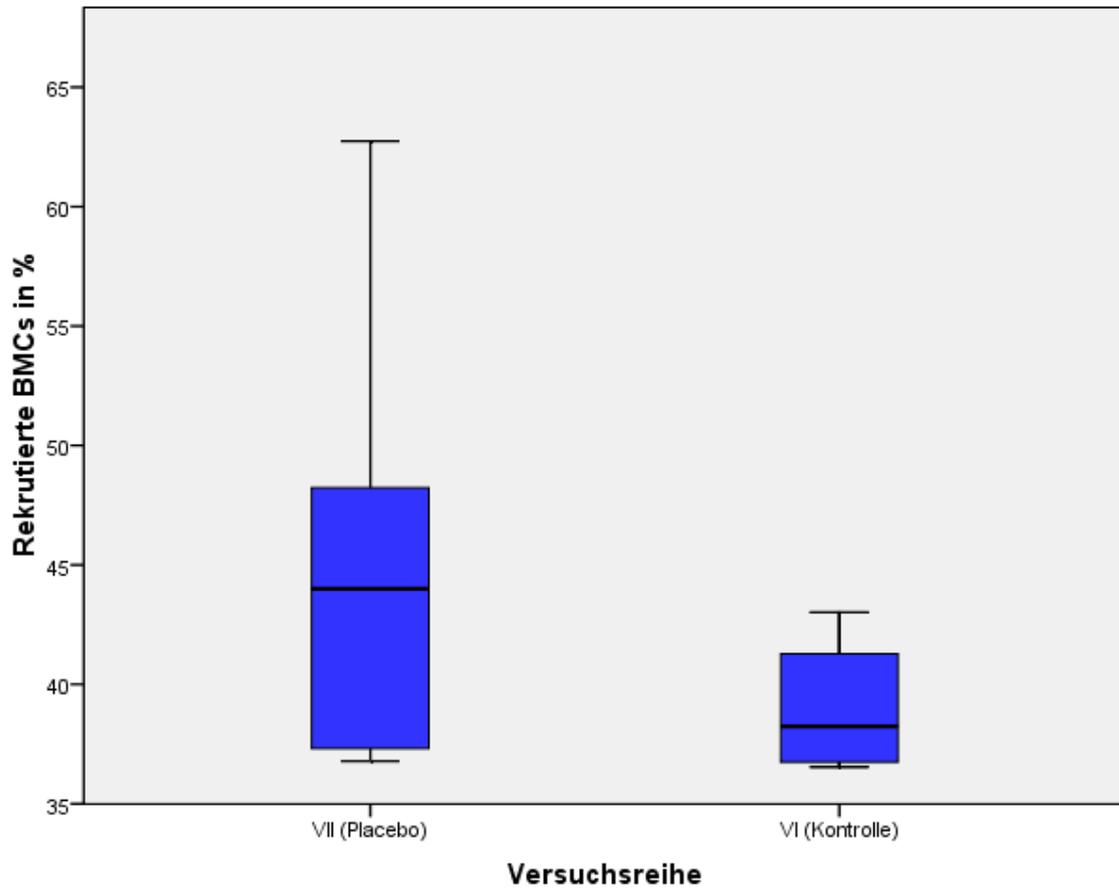


Abbildung 26: Statistischer Vergleich zwischen Kontroll- (IV) und Placebogruppe (VII). Darstellung als Boxplot.

Der statistische Vergleich mittels Dunnet-T-Test zwischen Kontrollgruppe VI und der Gruppe IV in der eine Ischämie-, aber keine Reperfusionphase durchgeführt wurde, zeigte einen signifikanten Unterschied ($p = 0,014$).

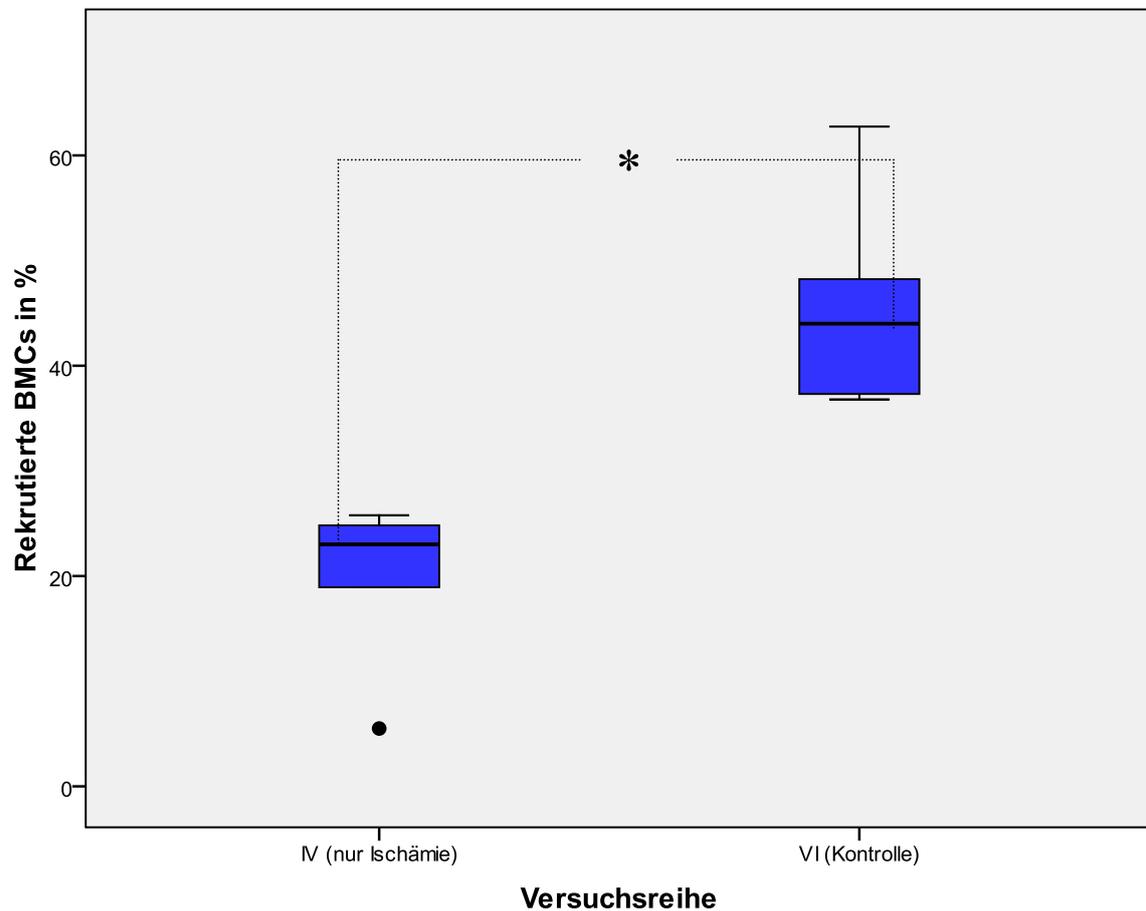


Abbildung 27: Statistischer Vergleich zwischen Kontrollgruppe (VI) und Gruppe mit Ischämieinduktion ohne Nachschaltung einer Reperfusionphase (IV). Darstellung als Boxplot. • Ausreißer, * Signifikanz ($p < 0,05$).

Der statistische Vergleich mittels Dunnet-T-Test zwischen Kontrollgruppe VI und der Gruppe V, in der keine Ischämie- und dementsprechend auch keine Reperfusion durchgeführt wurde, zeigte einen signifikanten Unterschied ($p = 0,016$).

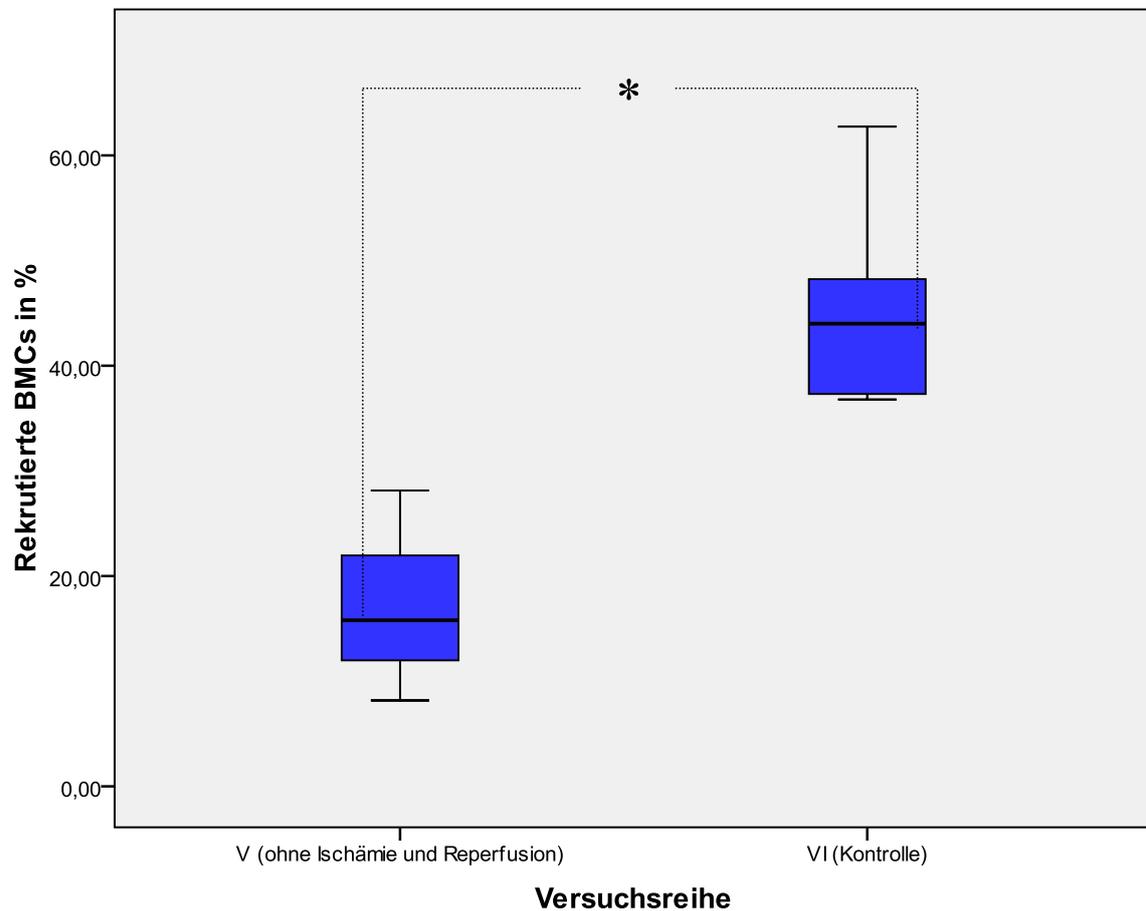


Abbildung 28: Statistischer Vergleich zwischen Kontrollgruppe (VI) und Gruppe ohne Ischämieinduktion und Reperfusion (V). Darstellung als Boxplot. * Signifikanz ($p < 0,05$).

Im Rahmen des statistischen Vergleichs der Verumgruppe I (0,1 mg/kgKG) gegen die Kontrollgruppe VI (keine Vorbehandlung mit Methylprednisolon) zeigte sich im Dunnet-T-Test bzw. in der Scheffé-Prozedur kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,524$ bzw. $p = 0,710$). Die Verumgruppen II (1 mg/kgKG) und III (5 mg/kgKG) dagegen waren signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe VI im Dunnet-T-Test sowie in der Scheffe-Prozedur (II: $p = 0,001$ bzw. $p = 0,005$; III: $p < 0,001$ bzw. $p = 0,001$).

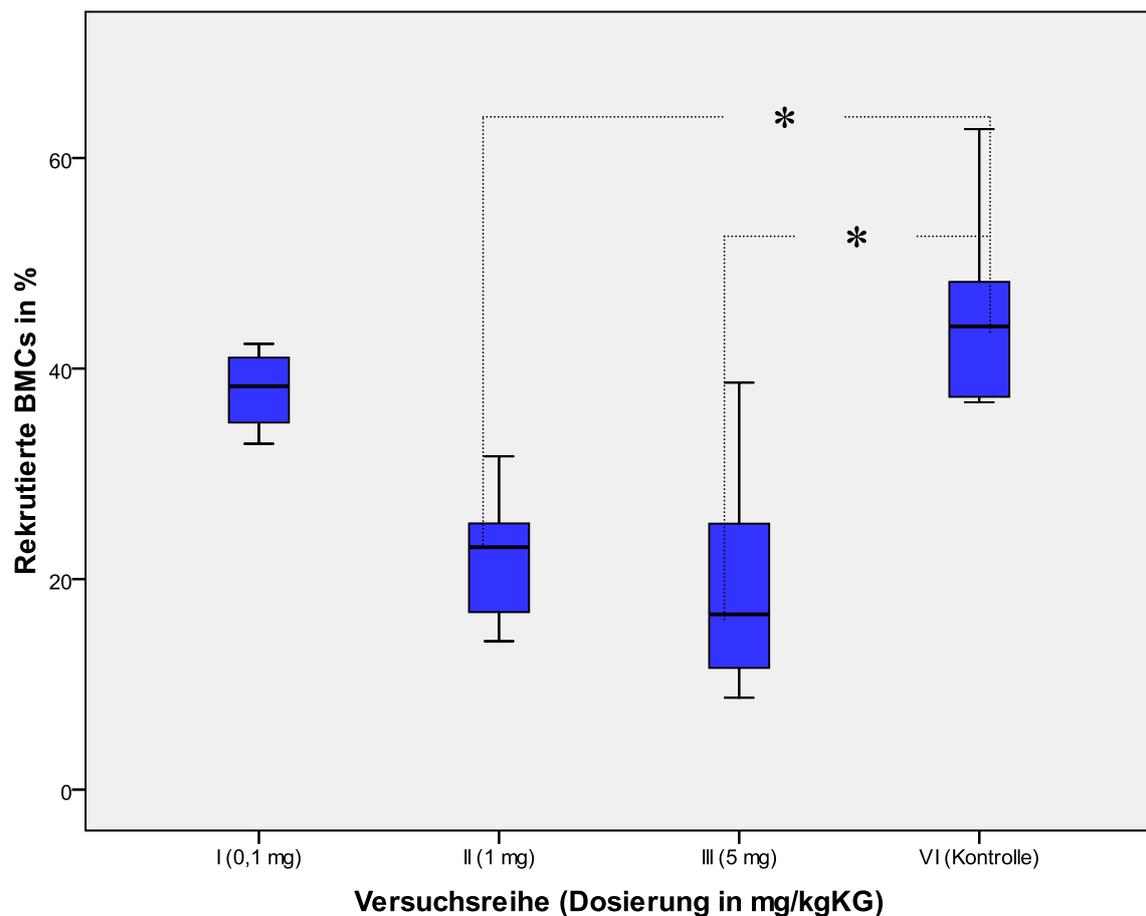


Abbildung 29: Verum-Gruppen I (0,1 mg/kgKG), II (1 mg/kgKG), III (5 mg/kgKG) im Vergleich zur Kontrollgruppe VI. Signifikanzen nach Berechnung im Dunnet-T-Test. Darstellung als Boxplot. * Signifikanz ($p < 0,05$).

Vergleicht man die Verumgruppen I (0,1 mg/kgKG), II (1 mg/kgKG) und III (5 mg/kgKG) mit der Placebogruppe VII, zeigt sich im Dunnet-T-Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen I und VII ($p = 0,996$). Signifikante Unterschiede ergeben sich für II und III im Vergleich zu VII ($p = 0,025$ bzw. $p = 0,006$).

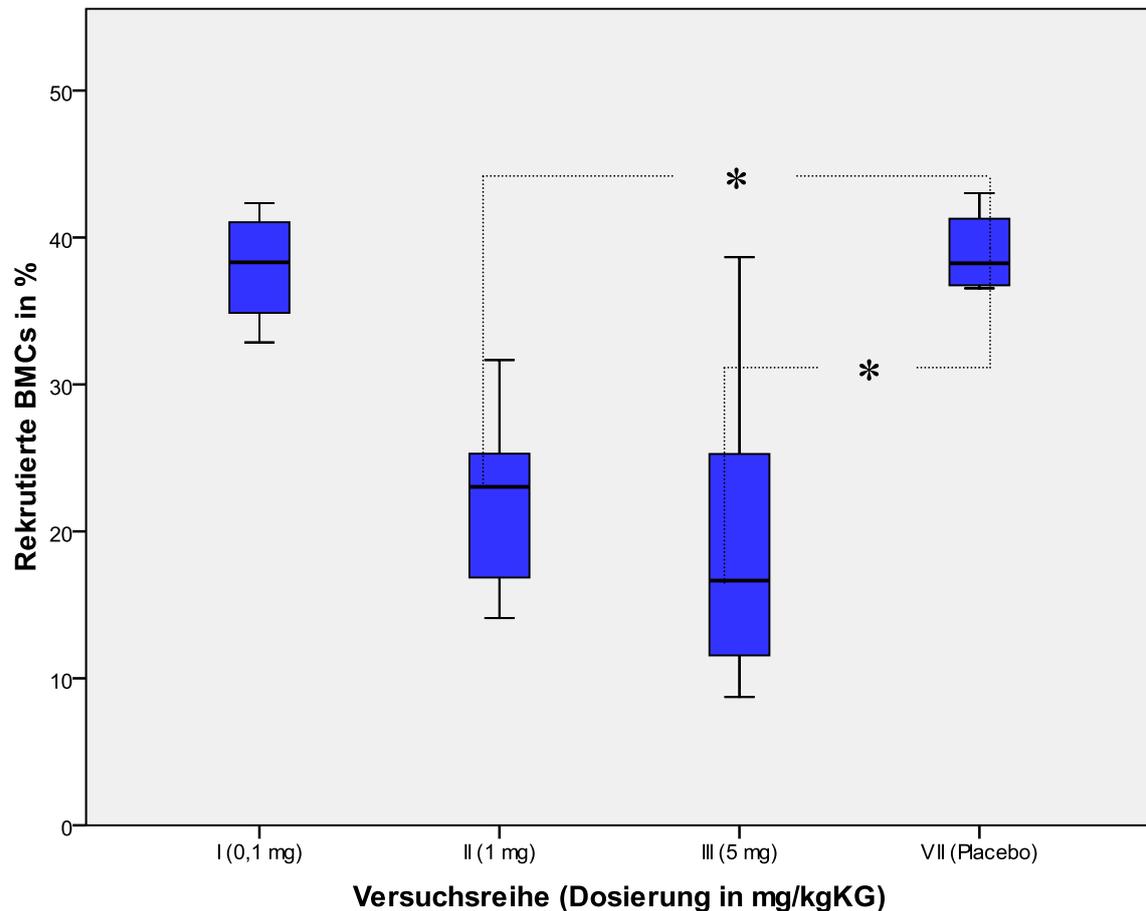


Abbildung 30: Verum-Gruppen I (0,1 mg/kgKG), II (1 mg/kgKG), III (5 mg/kgKG) im Vergleich zu VII. Signifikanzen nach Berechnung im Dunnet-T-Test. Darstellung als Boxplot.
* Signifikanz ($p < 0,05$).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind:

1. Nach einer myokardialen Ischämie kommt es zur Transmigration von BMCs in das Myokard.
2. Für die Rekrutierung von BMCs sind sowohl Ischämie- als auch Reperfusionphase von entscheidender Bedeutung. Die klinisch angewandte ischämische Präkonditionierung scheint damit essentiell für eine erfolgreiche Migration der BMCs.
3. Methylprednisolon reduziert signifikant die Anzahl rekrutierter BMCs in ischämisches Myokard. Die Reduktion der rekrutierten Zellen ist dosisabhängig.

4.2 Diskussion des Versuchsaufbaus

4.2.1 Auswahl des Versuchstiers

Die in diesem Modell verwendeten Wistar-Furth Ratten gehören zur Spezies *Rattus norvegicus*. Entwickelt wurde dieser Stamm am Wistar Institut 1906 zur Verwendung in biologischer und medizinischer Forschung. Wistar-Furth Ratten stellen aktuell die am häufigsten im Labor gebrauchten Ratten dar. Soweit möglich sind diese Ratten genetisch identisch. Damit werden genetische Variationen zwischen den Versuchstieren, die die Ergebnisse von zahlreichen Untersuchungen beeinflussen könnten, reduziert. Die in diesem Modell genutzten Knochenmarkzellen, die beim Spendertier extrahiert, isoliert und anschließend in das Herz des Empfängertiers infundiert werden, können als autolog bezeichnet werden.

4.2.2 Adulte Stammzellreihe: Knochenmarkzellen/BMCs

Seit Beginn der klinischen Studien werden verschiedene Stammzelltypen zur Therapie des Myokardinfarkts eingesetzt. Hauptsächlich sind aktuell adulte autologe BMCs, welche vorwiegend haematopoetische und endotheliale Stammzellen (2-4%), mesenchymale Stammzellen (< 0,1%) sowie kleinere Nebenpopulationen beinhalten, im Gebrauch (siehe auch Kapitel 1.3) (Dimmeler and Zeiher, 2008). Auch bei diesem Versuchsvorhaben kamen diese Knochenmarkzellen zum Einsatz. Vorteile sind im Tierexperiment und in der Klinik gute Erreichbarkeit, Erneuerungsfähigkeit, Differenzierungs- sowie Migrationsfähigkeit und

autologer Charakter der Zellen (Strauer and Steinhoff, 2011). Randomisierte Studien und Metaanalysen konnten Nutzen und Effizienz der BMCs aufzeigen (Kapitel 4.8.1).

Alternativ verwendete adulte Stammzellen:

Auch autologe skelettale Myoblasten können in geringer Anzahl in infarziertem Myokardgewebe überleben und sich zu kardialen Myofibrillen differenzieren. Da allerdings keine elektromechanischen Verbindungen zu den Herzmuskelzellen aufgebaut werden können, kann es zu Arrhythmien kommen (Henning, 2011). Die erste multizentrische, randomisierte, placebo-kontrollierte, doppel-blinde klinische Studie (MAGIC-Studie) an 97 Patienten wurde 2008 durchgeführt. Im Rahmen von Bypass-Operationen wurden skelettale Myoblasten in Infarktzone der Herzen injiziert. Eine Verbesserung der LVEF wurde nicht erzielt. Arrhythmien traten häufiger auf, schwerwiegende kardiale Ereignisse oder ventrikuläre Arrhythmien waren allerdings nicht signifikant häufiger zu verzeichnen (Menasche et al., 2008).

Mesenchymalen Stammzellen (MSCs) wird ein großes Potential zur Geweberegeneration zugesprochen. In tierexperimentellen Studien zeigten MSCs nach Einbringen in myokardiale Infarktzone die Fähigkeit, sich in Kardiomyozyten und Gefäßzellen zu differenzieren, endogene kardiale Stammzellen zu rekrutieren und parakrine Faktoren zu sezernieren. Damit könnten sie das Remodeling nach Myokardinfarkt verhindern bzw. dieses rückgängig machen. In klinischen Phase I Studien zeigte sich eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion und eine Verringerung der Narbengröße nach Infarkt (Williams and Hare, 2011).

Für lange Zeit wurde allgemein postuliert, dass das menschliche Herz ein ausdifferenziertes Organ sei und die zur Geburt vorhandenen Kardiomyozyten bis zum Versterben des Patienten persistieren. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass auch im Herzen so genannte kardiale Stammzellen (CSCs) angesiedelt sind. Nachgewiesen wurde, dass sich diese in verschiedene kardiale Zelllinien differenzieren können und eine stetige Regeneration des Herzens bewirken. Aus diesem Grund wird die Möglichkeit diskutiert, dass sie im Rahmen der Stammzelltherapie eine entscheidende Rolle spielen und evtl. auch nach Auftreten eines Myokardinfarkts zur Regeneration des Herzens beitragen (Leri et al., 2011).

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) werden aktuell in vitro und in experimentellen Studien bezüglich ihrer Fähigkeit, die kardiale Regeneration zu verbessern, untersucht. iPS sind Stammzellen mit pluripotentem Charakter, die durch Anregung der Expression spezieller

Gene aus somatischen Zellen mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren hergestellt werden. Ob diese Zellen allerdings in ihren Fähigkeiten mit denen natürlicher Stammzellen übereinstimmen, ist ungewiss (Passier et al., 2008, Martinez-Fernandez et al., 2009, Tongers et al., 2011).

Alternative: Embryonale Stammzellen

Auch über den Einsatz embryonaler Stammzellen wird diskutiert. Die erstmalige Isolation von ESCs aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste der Maus gelang 1981. Beim Menschen gelang dies zum ersten Mal 1998. ESCs sind pluripotent und können sich somit in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren. Von ESCs abstammende Kardiomyozyten zeigen spontane kontraktile Aktivität, exprimieren kardiale Transkriptionsfaktoren und beinhalten Strukturproteine, die typisch für Herzmuskelzellen sind. Untereinander bilden sie strukturelle und elektromechanische Verbindungen aus (Guan and Hasenfuss, 2007). Der Einsatz embryonaler Stammzellen im Rahmen von tierexperimentellen Studien zur Therapie der myokardialen Ischämie liegt nahe. Nach Transplantation von ESCs in myokardiale Rattenherzen zeigte sich nach einem Beobachtungszeitraum von vier Wochen in der Behandlungsgruppe eine signifikante Verbesserung der kardialen Funktion gegenüber den Kontrollgruppen. Drei Monate später jedoch war kein Unterschied mehr festzustellen (van Laake et al., 2008, Laflamme et al., 2007). Der Einsatz von ESCs im Rahmen der Therapie der myokardialen Ischämie wird zudem kritisch gesehen durch deren arrhythmogene Eigenschaften, der Gefahr der Teratom-/Teratokarzinomentstehung (genetische Instabilität) sowie dem Risiko der Abstoßung durch den „Transplantatempfänger“ (Nussbaum et al., 2007). Zusätzlich bestehen große ethische Bedenken. Nach Angabe von Guan et al. werden klinische Studien auf diesem Gebiet in naher Zukunft daher nicht durchgeführt werden (Guan and Hasenfuss, 2007).

4.2.3 Isolationstechnik und Aufbereitung der Knochenmarkzellen

In dieser Arbeit erfolgte die Isolation und Aufbereitung der Knochenmarkzellen nach einem Protokoll von Scutt et al. Die einzelnen Schritte sind in Kapitel 2.2 ausführlich beschrieben. Die Prozesse der Isolation und Aufbereitung der Knochenmarkzellen vor deren Verabreichung werden insbesondere im klinischen Setting diskutiert. Die zum Teil voneinander abweichenden Ergebnisse der in dieser Arbeit aufgeführten klinischen Studien (siehe Kapitel 4.6) werden unter anderem auf unterschiedliche Zell-Isolationsprotokolle zurückgeführt.

Klinisch werden 80 bis 250 ml adulten Knochenmarkblutes aus dem Beckenkamm entnommen. Die Isolation der gewünschten Zellfraktion erfolgt im Anschluss größtenteils mittels manueller Aufarbeitung, jedoch wurden kürzlich auch automatische Systeme entwickelt. Drei Zellseparationsarten werden unterschieden: Die Isolation der nuklearen Zellen aus dem Knochenmarkspirat, die Separation der mononuklearen Zellfraktion und die gesonderte Separation von spezifischeren Zellen wie CD34- und CD133-positiven Zellen (Strauer and Steinhoff, 2011). Am häufigsten erfolgte die Isolation der BMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation (im Fall des BOOST-Trial dagegen beispielsweise mittels Sedimentationsprotokoll) (Dimmeler and Zeiher, 2008). Besonders wichtig für die Effizienz der infundierten BMCs ist nach Angabe von Assmus et al., dass keine Kontaminierung des Zellisolationsprodukts mit Erythrozyten vorliegt. Dabei korrelierte eine erhöhte Anzahl an Erythrozyten in der Zellfraktion signifikant mit einer verminderten Erholung der linksventrikulären Ejektionsfraktion. Höhere Zahlen an roten Blutkörperchen führten zu einer signifikant höheren Reduktion der Funktionsfähigkeit der BMCs, der CFU-Kapazität (Kolonieformierung) und der Migrationsfähigkeit. Auch wird die Neovaskularisationsrate signifikant beeinträchtigt (Assmus et al., 2010b). Zusätzlich scheint die Lagerung der Zellen einen Einfluss auf deren Funktionsfähigkeit zu haben (ggf. deswegen schlechteres Outcome bei der Studie ASTAMI) (Dimmeler and Zeiher, 2008).

4.2.4 Immunmodulator Methylprednisolon

Untersucht werden soll der Einfluss eines Immunmodulators auf den Homing-Prozess von BMCs am ischämischen Myokard. Methylprednisolon ist ein synthetisches Glucocorticoid mit einer relativen glucocorticoiden Potenz von fünf. Für diesen Versuchsaufbau eignet es sich unter anderem wegen seiner geringen relativen mineralcorticoiden Potenz von 0,5 sowie der mittellangen Wirkdauer von 12-36 h (passend zur einmaligen Gabe innerhalb von 24 h). Die Cushing-Schwellendosis liegt beim Menschen bei ca. 0,1 mg/kgKG (Aktories, 2009). Die Dosierungen wurden anhand von Vorarbeiten gewählt, in denen Dosierungen von 0,1 bis 30 mg/kg/d bei Ratten intraperitoneal verabreicht wurden und immunologische Effekte innerhalb von unter sieben Tagen hervorgerufen wurden (Yoshikawa et al., 1983, Van Kerckhoven et al., 2004). Die intraperitoneale Gabe erfolgte aufgrund der guten Resorptionseigenschaften des Peritoneums und der relativ einfachen Applikationsmöglichkeit im Tierversuchsmodell.

4.2.5 Langendorff-Modell

Von Oskar **Langendorff** wurde 1896 ein Modell eingeführt, in dem man isolierte Säugetierherzen mit Hilfe einer geeigneten Nährlösung (Perfusat) perfundieren und damit deren Schlagfunktion sicherstellen kann. Unter standardisierten Bedingungen wird so ein funktionell und metabolisch stabiles System über mehrere Stunden aufrechterhalten. Systemische Einflüsse auf das Herz und seine Funktion sowie Nebeneffekte, beispielsweise im Organismus zirkulierende neurohumorale Faktoren, nervale Stimulation durch das vegetative Nervensystem oder Änderungen des systemischen oder pulmonalen Gefäßwiderstands, können damit ausgeschlossen werden (Langendorff, 1898, Skrzypiec-Spring et al., 2007).

Das System ermöglicht die Durchführung von Untersuchungen am isolierten Herzen und die Messung biochemischer, physiologischer, morphologischer und pharmakologischer Parameter. Je nach Fragestellung können experimentelle Parameter wie Koronarfluss, Oxygenierung des Perfusats, ventrikuläre Vor- und Nachlast, Herzfrequenz und –temperatur individuell angepasst werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dem Herzen direkt in die koronare Zirkulation Medikamente – oder wie in dieser Arbeit Knochenmarkzellen – zu injizieren. Außerdem kann eine globale oder regionale Ischämie durch Stopp des Perfusats oder Ligatur eines Koronargefäßes induziert werden. Anschließend kann dann die Auswertung der Auswirkungen von ischämie- und reperfusionsbedingten Schäden erfolgen (Reichelt et al., 2009).

Am Modell nach Langendorff kann also eine intrakoronare Verabreichung von Knochenmarkzellen, wie sie klinisch mittels PTCA bei Patienten nach Myokardinfarkt im Rahmen von Studien durchgeführt wird, experimentell simuliert werden. Die Auswirkungen des Immunmodulators Methylprednisolon auf die Leukozytenadhäsionskaskade und das Homingverhalten der Knochenmarkzellen können untersucht werden.

4.2.6 Steady-state, Ischämie- und Reperfusionphase

Nach Entnahme und Präparation des Rattenherzens beim Empfängertier wird dieses schnellstmöglich - um eine Störung der Homöostase und eine initiale myokardiale Ischämie zu vermeiden - in kardioplege Lösung und anschließend in den Kreislauf des Langendorffsystems eingebracht. Dazu wird die Aorta ascendens über die Kanüle gestülpt und mittels

Ligaturen befestigt. Im Anschluss wird direkt die Rollerpumpe aktiviert, die damit eine Versorgung des Herzens mit Perfusat sichergestellt.

Zu Beginn des Versuchsabschnitts im Langendorff-Modell wird das Herz fünf Minuten im Langendorff-Modell kontinuierlich perfundiert und entsprechende Parameter wie pH, Sauerstoffoxygenierung, Temperatur und Perfusionsdruck werden optimiert. Geprüft wird ebenfalls, ob das Herz eine gute Kontraktionsfähigkeit besitzt, die Bewegungen rhythmisch und gleichmäßig sind und ob die mittels Katheterverfahren gemessenen Drücke physiologische Werte liefern. Diese Phase wird als „steady state“ bezeichnet und ist entscheidend für eine Anpassung des Herzens an das Langendorff-Modell.

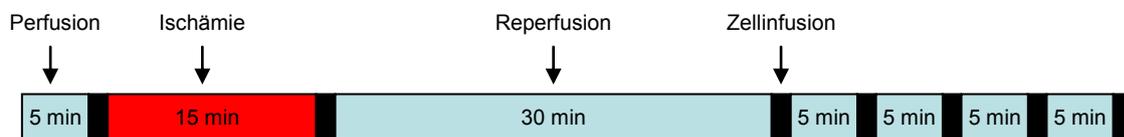


Abbildung 31: Zeitliche Abfolge des Versuchs mit Kennzeichnung der Perfusions-, Ischämie-, Reperfusion- und Zellinfusionsphase sowie den Zeitpunkten der CK-Messung.

Im zweiten Schritt wird eine Ischämie durch Stopp des Perfusats induziert. Diese ist – wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen konnten – von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Rekrutierung von Stammzellen (Erläuterung der Mechanismen in nachfolgenden Kapiteln). Die Bestimmung der Kreatinkinase zu den Zeitpunkten vor Stopp des Perfusats (Ischämieinduktion) und nach Reperfusion erfolgte, um zu überprüfen, ob im Myokard der Ratte im Langendorff-Modell eine Ischämie hervorgerufen wird. Klinisch werden die Isoenzyme CK und CK-MB zum Nachweis und der Verlaufskontrolle eines akuten Koronarsyndroms laborchemisch kontrolliert, da sie einen selektiven und empfindlichen Parameter für eine Myokardschädigung darstellen (Hamm, 2009). Der statistische Vergleich der CK- sowie CK-MB-Werte zu den unterschiedlichen Zeitpunkten A und B zeigt in der vorliegenden Arbeit im Wilcoxon-Rang-Test signifikante Unterschiede ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,002$). Somit ist davon auszugehen, dass durch Stopp des Perfusats eine Ischämie im Myokard hervorgerufen wird.

Nach der Ischämiephase wird eine dreißigminütige Reperfusionphase eingeschaltet. Im Rahmen dieser Versuchsreihe hat sich gezeigt, dass diese Phase entscheidend ist für eine erfolgreiche Rekrutierung der verabreichten Knochenmarkszellen. Die durch den Ischämieschaden induzierten entzündlichen Veränderungen treten erst innerhalb einiger Minuten auf.

Erklärt werden die potentiell zugrunde liegenden Mechanismen in den nachfolgenden Kapiteln.

4.2.7 Intrakoronare Verabreichung der Knochenmarkzellen

Prinzipiell gibt es drei verschiedene Möglichkeiten der Zellapplikation: die intravenöse und die intrakoronare Infusion sowie die direkte intramyokardiale Injektion. In diesem Modell wurde in Anlehnung an die in der Klinik am häufigsten verwendete Applikationsart die intrakoronare Verabreichung gewählt:

Durch intrakoronare Infusion der Stammzellen bei der Therapie des Myokardinfarkts können die Zellen die Infarkt- und Periinfarktzone erreichen. Einfache Durchführbarkeit und geringe Kosten sind Vorteile sowohl im klinischen als auch tierexperimentellen Versuchsaufbau (Charwat et al., 2008). Bei den klinisch durchgeführten Studien wurden die Zellen während einer passageren Niederdruckballonokklusion fraktioniert (à 5 ml Zellsuspension mit jeweils sechs bis zehn Millionen mononuklearen Zellen) und druckreguliert intrakoronar infundiert. Somit soll ein Reflux der Zellsuspension vermieden werden und zusätzlich eine verbesserte Zelladhäsion durch ischämische Präkonditionierung ermöglicht werden (Assmus et al., 2006b). Im Langendorff-Modell kann die Zellgabe unkompliziert über eine dem Herzen vorgeschaltete, in den Perfusionskreislauf eingebrachte Membran appliziert werden.

Die direkte intramyokardiale Injektion erfolgt entweder intraoperativ (transepikardial) oder interventionell (transendokardial) mittels Kathetersystem (Assmus et al., 2006b). Transendokardial ist das Aufsuchen der korrekten Injektionsstelle mittels elektromechanischem mapping technisch schwierig. Zellverlust in den Ventrikel, falsche Injektionsstellen, ventrikuläre Arrhythmien und kardiale Tamponaden sind Komplikationen, die auftreten können (Strauer and Steinhoff, 2011). Die transepikardiale, intramyokardiale Injektion von Stammzellen erfolgt offen chirurgisch zum Beispiel im Rahmen einer Bypass-Operation oder mittels Minithorakotomie. Nach Anlage des Bypass und Revaskularisation zeichnet sich das Infarktgebiet deutlich ab. Nach direkter Injektion der Zellen in das Infarktgebiet ist hier eine hohe Konzentration derselben gegeben (Strauer and Steinhoff, 2011). Eine 2010 durchgeführte Metaanalyse umfasst sechs Studien, in denen Patienten mit chronisch ischämischer Herzerkrankung einer Bypass-Operation unterzogen und zusätzlich einer intramyokardialen BMC-Injektion zugeführt wurden. Schwerwiegende kardiovaskuläre Komplikationen wie

ventrikuläre Arrhythmien traten nicht auf (Donndorf et al., 2010). Die intramyokardiale Gabe bietet sich in diesem Modell nicht an, da eine globale Ischämie am Rattenherz induziert wird.

Die intravenöse Infusion erfolgt entweder über Koronarvenen oder periphere Venen. Hierzu wurden bisher nur wenige kleine Studien durchgeführt. Beobachtet wurde, dass nur wenige der infundierten Zellen das infarzierte Myokardareal erreichten (Charwat et al., 2008). Legt man einen koronaren Blutfluss von ca. 3% des kardialen Outputs zu Grunde, wären viele kardiale Zyklen für ein Erreichen einer hohen Konzentration im Bereich des ischämischen Myokards notwendig. Ein Homing in andere Organe ist zudem wahrscheinlich (Hofmann et al., 2005, Strauer and Steinhoff, 2011). Auch die intravenöse Verabreichung der Zellen ist in diesem Modell uninteressant bzw. nicht durchführbar.

4.3 Immunhistochemische Färbung von Knochenmarkszellen intramyokardial

In aktuellen klinischen und tierexperimentellen Studien wird die Möglichkeit untersucht, mit der Infusion von BMCs die Herzfunktion nach Auftreten eines Myokardinfarkts zu verbessern (Strauer and Steinhoff, 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels immunhistochemischer Färbungen die Transmigration von CD34⁺-Zellen in ischämischem Myokard, nach transkoronarer Infusion, gezeigt werden (siehe dazu Abbildungen des Kapitels 3.2). Die Zellen befinden sich dabei größtenteils im Myokard selbst und nicht im Gefäßsystem.

4.4 Ischämie-Reperfusionssyndrom - Grundlage für das Homing von Knochenmarkzellen

Der statistische Vergleich der Kontrollgruppe VI mit den Gruppen, in denen jeweils nur eine Ischämiephase (IV) bzw. weder Ischämie- noch Reperfusionsphase (V) eingeschaltet wurden, zeigt signifikante Unterschiede ($p = 0,014$ bzw. $p = 0,016$). In der Kontrollgruppe werden im Durchschnitt 44,95%, in den Gruppen IV (keine Reperfusion) und V (weder Ischämie noch Reperfusion) dagegen nur 19,61% bzw. 17,36% der Knochenmarkzellen rekrutiert. Der Vergleich dieser Gruppen zeigt, dass in erster Linie die Reperfusionsphase, nach Induktion einer Ischämie, für die Rekrutierung von Bedeutung ist. Auch Vorversuche am Kaninchen- und Rattenmodell an unserem Institut konnten dies aufzeigen (Sequeira et al., 2005). Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit der in klinischen Studien festgestellten Relevanz der ischämischen Prækonditionierung vor Verabreichung von Knochenmarkzellen (Kamota et al., 2009). Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass der durch Ischämie mit anschließender Reperfusion entstehende Schaden, der als **Ischämie-Reperfusionssyndrom** bezeichnet wird, zu einer inflammatorischen Reaktion und damit zu einer Aktivierung der an der Leukozytenadhäsionskaskade beteiligten molekularen Mechanismen führt (Bywaters and Beall, 1941, Becker, 2004, Girm et al., 2007, Abu-Amara et al., 2011). Analog zum Modell der Leukozytenadhäsion bzw. -transmigration wird derzeit auch die Rekrutierung von BMCs in ischämisches Myokard erklärt (Chavakis and Dimmeler, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Stopp des Perfusats im Langendorff-Modell eine globale myokardiale Ischämie induziert. Inklusiv der nachgeschalteten Reperfusionsphase verblieben bis zur Gabe der Knochenmarkzellen 45 Minuten. Aufgrund dieser zeitlichen Limitation können einige der potentiell in Frage kommenden Homing-Mechanismen von Knochenmarkzellen, die länger als diese 45 Minuten zur Aktivierung brauchen, hier nicht zum Tragen kommen. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick zu in diesem Modell potentiell relevanten Mechanismen der Rekrutierung von Knochenmarkzellen gegeben.

4.4.1 Endotheliale Dysfunktion, reaktive Sauerstoffspezies und Komplementsystem

Das Endothel spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen des Ischämie-Reperfusionssyndroms. Durch Ischämie, Reperfusion, lokale physikalische Verletzungen oder inflammatorische Reaktionen kommt es zu einer Aktivierung des Endothels. Eine Reihe von

Mechanismen wird ausgelöst, welche im gesamten als **endotheliale Dysfunktion** bezeichnet wird. (Girn et al., 2007). Durch eine erhöhte Permeabilität des verletzten Endothels, **reaktive Sauerstoffspezies** (Cadenas et al., 2010, Frank et al., 2012), **Komplementfaktoren** (Diepenhorst et al., 2009, Banz and Rieben, 2011), Mitglieder der **Zytokinfamilien** TNF- α , Interleukin-1 und -6, Chemokine und **Adhäsionsmoleküle** sowie vermindertem Vorhandsein antiinflammatorischer Mediatoren (Wu et al., 2011) kommt es zur Einschaltung der Leukozytenadhäsionskaskade (ausführliche Beschreibung in Kapitel 1.2) (Ley et al., 2007). Dies führt zu einer proinflammatorischen und prothrombotischen Veränderung der Oberfläche mit vermehrter Rekrutierung von Entzündungszellen, Thrombozyten und Knochenmarkzellen.

4.4.2 Zytokine

Im Rahmen von Ischämie und Reperfusion kommt es zu einer erhöhten Produktion und Ausschüttung von Zytokinen. Diese inflammatorisch und immunologisch modulierenden Proteine können nach ihrer Struktur in neun Familien eingeteilt werden. (Tabellarische Auflistung der im Rahmen einer kardialen Ischämie von Stammzellen und kardialen Zellen ausgeschütteten Faktoren im Anhang, Kapitel 6.6) (Vilcek, 2003).

Nach Induktion einer Ischämie werden kardial erhöhte Level von TNF- α , IL-1 und IL-6 festgestellt. **TNF- α** ist ein proinflammatorisches Protein mit multiplen Funktionen. In Endothelzellen kommt es durch Umstrukturierung von Aktinfilamenten zu Zellschäden und dem Verlust von Tight junctions. Dadurch entsteht ein kapilläres Leck, Leukozyten können leichter durch das Endothel hindurchtreten (Transmigration) (Girn et al., 2007). Zusätzlich stellt es eines der wichtigsten Signale dar, welche die Zytokinkaskade initiieren und führt zu einer endothelialen Dysfunktion. Erfolgt eine Vorbehandlung mit TNF-neutralisierenden Antikörpern, werden sowohl endotheliale Dysfunktion als auch Infarktgröße reduziert. Werden TNF- α -überexprimierende Mausstämme einer kardialen Ischämie und Reperfusion unterzogen, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu einer Vergleichsgruppe von TNF-knockout Mäusen bezüglich endothelialer Dysfunktion und Reperfusionsschaden (Wu et al., 2011). TNF- α führt außerdem zur Expression von IL-1, IL-6, IL-8 und dem Monozyten-Chemotaxis-Protein I. **IL-1** hat chemotaktische Wirkungen und erhöht die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen. **IL-6** moduliert die Wirkungen der Akute-Phase-Proteine im Rahmen inflammatorischer und immunologischer Reaktionen. Es induziert die Zelladhäsion und erhöht die endotheliale Permeabilität. **IL-8** entsteht in Endothelzellen und Leukozyten. Nach Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens kann IL-8 in erhöhter

60

Konzentration unter anderem in myokardialem Gewebe nachgewiesen werden. IL-8 wirkt chemotaktisch und begünstigt die Adhäsion (Girn et al., 2007). Die lokale Injektion von IL-8 in nicht ischämisches Myokard führt zu einer vermehrten Rekrutierung von CD34⁺-Zellen (Chavakis et al., 2008). Die genannten Zytokine spielen teilweise wahrscheinlich auch in diesem, zeitlich limitiertem Modell eine entscheidende Rolle für die Initiierung einer Inflammation und Rekrutierung von BMCs. Im Kaninchenherzen konnte nach Induktion einer myokardialen Ischämie eine Mastzelldegranulation mit Ausschüttung von präformierten Mediatoren wie TNF- α und Histamin aufgezeigt werden. Nachgewiesen werden konnte auch, dass dadurch innerhalb kürzester Zeit (15 min nach Beginn der Reperfusion) erhöhte Mengen an IL-6-mRNA nachweisbar waren (Frangogiannis et al., 1998). In einem Tiermodell am Schwein wurde nach Induktion einer Ischämie durch koronare Okklusion und siebenminütiger ventrikulärer Fibrillation eine Reanimation gestartet. TNF- α stieg direkt nach Reperfusion signifikant an und erreichte seine maximale Ausschüttung bereits nach 15 Minuten, IL-1 β erst nach zwei Stunden. IL-6 dagegen wurde im gemessenen Intervall von sechs Stunden nicht vermehrt ausgeschüttet (Niemann et al., 2009).

Chemokine (chemoattraktive Zytokine) sind 8-14 kDa große Proteine und gehören zur Familie der Zytokine. Derzeit sind ca. 50 Chemokine (vier Subfamilien) und 20 Rezeptoren bekannt (Murphy et al., 2000, Frangogiannis and Entman, 2005). ELR⁺-Chemokine sind durch ihre Fähigkeit charakterisiert, Neutrophile an den Ort einer Inflammation zu vermitteln; ELR⁻-Chemokine sind für die Rekrutierung von Lymphozyten und Monozyten verantwortlich. β -Chemokine bewirken eine Rekrutierung von Monozyten, Basophilen, dendritischen Zellen und T-Zellen (Ghadge et al., 2011). Die Chemokinrezeptoren werden auf verschiedenen Populationen von Leukozyten, BMCs sowie Endothelzellen exprimiert (Bonaros et al., 2008). Mehrere Studien konnten aufzeigen, dass Chemokine wie C-X-C- und C-C-Chemokine im Rahmen einer myokardialen Ischämie hochreguliert und vermehrt in der Zirkulation nachgewiesen werden (Frangogiannis and Entman, 2005). Chemokine beeinflussen so das Remodelling des Myokards (Takahashi, 2010) und stellen außerdem einen entscheidenden Schritt in der Aktivierung des Rekrutierungsvorgangs von Progenitor-/Stammzellen dar (Chavakis et al., 2008).

Die Expression von **CXCL12 (SDF-1 = stromal derived factor)** ist unter anderem im Herz nachzuweisen (Nagasawa et al., 1996). Die vorherrschende Isoform SDF-1 α (insgesamt sechs Isoformen) wird im Rahmen eines Myokardinfarkts signifikant hochreguliert. Die Bindung

von SDF-1 erfolgt insbesondere an den Rezeptor CXCR4, der auch auf BMCs und EPCs exprimiert wird (Chavakis et al., 2010, Yu et al., 2006). SDF-1 bewirkt eine Veränderung der Zellmotilität, Zelladhäsion, Chemoattraktion und Gentranskription (Takahashi, 2010). Der Interaktion zwischen SDF-1 und CXCR4 wird eine herausragende Stellung im Rahmen der Regulation der Rekrutierung von BMCs aus dem Knochenmark zugeordnet. Dabei korreliert die Menge an nachgewiesenem SDF-1 α mit der Menge der zirkulierenden Progenitor-/Stammzellen. Die Unterbrechung der SDF-1/CXCR4-Achse führt zu einer Mobilisierung der BMCs in die Zirkulation, die regionale Erhöhung von SDF-1 in ischämischem Myokard bewirkt eine Rekrutierung von CXCR4⁺-Zellen und lässt eine Unterstützung kardialer Reparaturmechanismen und Regeneration zu (Ghadge et al., 2011). In präklinischen Studien ergab auch die direkte Verabreichung von SDF-1 α eine erhöhte Rekrutierung von c-kit⁺-Zellen mit einer Verbesserung der kardialen Funktion (Tang et al., 2010). Im Kaninchenmodell kam es nach G-CSF-Verabreichung zu einer Erhöhung von SDF-1 α sowie einer schnellen Rekrutierung von CXCR4⁺-Zellen in ischämisches Myokard. Die Auswertungen ergaben eine Verkleinerung der Narbe sowie eine Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (Misao et al., 2006). Nach intrakoronarer Infusion von BMCs nach Myokardinfarkt konnte in einer tierexperimentellen Untersuchung eine erhöhte Rekrutierung der Zellen insbesondere nach Forcierung der SDF-1 α -Expression nachgewiesen werden (Abbott et al., 2004). Neutralisierende Antikörper gegen SDF-1 und CXCR4 führen im Gegensatz dazu zu einer Reduktion der Adhäsion von EPCs und vermindern so das Homing dieser Zellen (Chavakis et al., 2008). In einem weiteren Tiermodell wurde Mäusen zur Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark G-CSF verabreicht. Zusätzlich erfolgte eine pharmakologische Inaktivierung der Depeptidylpeptidase IV (DPP-IV), wodurch eine Hemmung von SDF-1 verhindert wurde. Auswertungen ergaben eine verstärkte Rekrutierung von Stammzellen mit Verbesserung der Blutversorgung des Herzmuskels, Steigerung der Herzfunktion und Verbesserung des Überlebens der Tiere. SDF-1 gilt als einer der wichtigsten molekularen Homing-Faktoren für Stammzellen (Zaruba et al., 2009). Da SDF-1 und sein dazugehöriger Rezeptor CXCR4 nicht nur durch unterschiedliche Stimuli induziert, sondern auch kontinuierlich auf entsprechenden Zellen exprimiert werden (Frangogiannis and Entman, 2005), kann die Interaktion dieser beiden Moleküle eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung der Knochenmarkzellen in diesem Modell spielen.

In einem tierexperimentellen Modell konnte der Einfluss **CCR3-bindender Chemokine** auf die Rekrutierung von CD34⁺-Zellen im Rahmen einer myokardialen Ischämie gezeigt werden. Wird der Rezeptor CCR3 geblockt, kommt es zu einer Reduktion der Rekrutierung intravenös applizierter BMCs in ischämisches Myokard. Dementsprechend wird auch CCR3 und den dazugehörigen Liganden Eotaxin, RANTES und MCP-3 eine Schlüsselrolle für die erfolgreiche Rekrutierung von BMCs zugeschrieben (Bonaros et al., 2008). Ob diese Chemokine und deren dazugehörige Rezeptoren eine entscheidende Rolle für die Rekrutierung von Knochenmarkzellen in diesem Modell spielen, ist fraglich, da Eotaxin, RANTES und MCP-3 nicht kontinuierlich, sondern erst auf einen Stimulus hin exprimiert (Frangogiannis and Entman, 2005). Die Zeit von 45 Minuten könnte dafür zu gering sein.

Der **Wachstumsfaktor VEGF** (vascular endothelial growth factor) wird nach myokardialer Ischämie ebenfalls vermehrt exprimiert und induziert über eine vermehrte Produktion von SDF-1 die Rekrutierung von BMCs und EPCs. Andere Faktoren wie IGF (insulin-like growth factor), FGF (fibroblast growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor) können Überleben und Funktion von Progenitorzellen verbessern (Chavakis et al., 2010). Für das hämatopoetische Zytokin Erythropoietin konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es die Rekrutierung und das Überleben von BMCs im Rahmen eines Myokardinfarkts über die SDF-1/CXCR-4-Achse verbessern kann (Brunner et al., 2009).

Thymosin beta-4 (TB4), Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) und VEGF gelten als kardioprotektiv nach akutem Myokardinfarkt und sind mit der Rekrutierung von BMCs sowie der Neovaskularisation verbunden. Nach chirurgischer Induktion einer myokardialen Ischämie am Schweinemodell wurde ein direkter, statistisch signifikanter Anstieg aller drei Marker gemessen, der sich nach Abschluss der Ischämie und Reperfusion bei MMP-9 sowie TB4 fortsetzte. TB4 vermittelt ein besseres Überleben von Myozyten und eine Verbesserung der kardialen Funktion. Dies wird auch über eine verstärkte Zellmigration und eine Erhöhung der Rekrutierung von BMCs in ischämisches Myokard erwirkt (Shah et al., 2011). VEGF vermittelt neben Angiogenese und Überleben der Kardiomyozyten auch eine Verstärkung der Rekrutierung von BMCs in ischämisches Myokard über Induktion von SDF-1 (Grunewald et al., 2006). TB4 ist einer der wichtigsten Faktoren, die an der Rekrutierung von Stammzellen in ischämisches Myokard beteiligt sind und eine Differenzierung in endotheliale oder kardiale Zellen vermitteln. VEGF wird ebenfalls das Potential zugeschrieben, eine Transdifferenzierung in endotheliale Zellen zu bewirken. Eine Expression dieser Zytokine im Rahmen einer

myokardialen Ischämie erfolgt innerhalb von wenigen Minuten (Shah et al., 2011). Somit ist eine Beteiligung dieser Mechanismen an der Knochenmarkzell-Rekrutierung in diesem Modell wahrscheinlich.

4.4.3 Zelluläre Adhäsionsmoleküle

Für einige Adhäsionsmoleküle, welche am Ischämie-Reperfusionssyndrom beteiligt sind konnte bereits gezeigt werden, dass sie für die Rekrutierung von Knochenmarkzellen ebenfalls entscheidend sind (Übersichtstabelle in Kapitel 6.6) (Chavakis et al., 2008, Dimmeler and Losordo, 2011, Chavakis and Dimmeler, 2012).

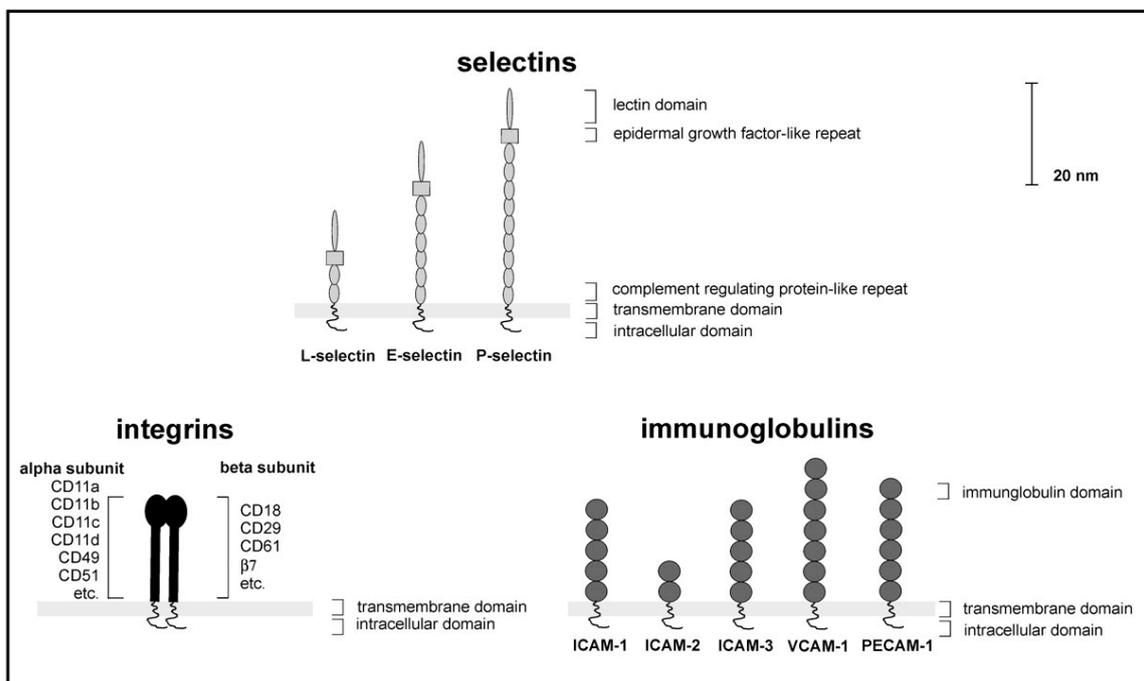


Abbildung 32: Übersicht zur Struktur von Adhäsionsmolekülen (Walzog and Gaehgens, 2000).

Selektine

Selektine sind einkettige Glykoproteine, die in der Plasmamembran verschiedener Zellen lokalisiert sind. Die drei unterschiedlichen Typen der Selektine (CD62L, E, P) weisen verschiedene Aminosäurestrukturen auf (Ivetic and Ridley, 2004). Die Gruppe der Selektine bildet eine wichtige Grundlage für eine adäquate Leukozytenadhäsion (siehe Kapitel 1.3.2). Ohne entsprechende Selektinwirkung zum Tethering und Rolling ist auch der Vorgang der festen Adhäsion eingeschränkt (Vestweber and Blanks, 1999). Auch für die Rekrutierung von

BMCs/Progenitorzellen sind Selektine entscheidend, da CD62L und P ebenfalls auf Stammzellen exprimiert werden (Turner et al., 1995, Chavakis et al., 2008). So führt zum Beispiel die Behandlung mit löslichem E-Selektin zu einer Erhöhung der Homing-Rate von Progenitorzellen. Die Stimulation eines Adenosin-Rezeptors auf EPCs und kardialem Endothel führt zu einer verstärkten Adhäsion über eine Beeinflussung des PSGL-1/P-Selektin-Mechanismus. Biomaterialien, die Sialyl-Lewis(X) enthalten, der an L-Selektin bindet, führen zu einer Erhöhung von Mobilisierung, Homing und Neovaskularisation von Progenitorzellen in ischämischen Extremitäten (Chavakis et al., 2010).

L(leukocyte)-Selektin (CD62L) wird dauerhaft auf der Oberfläche (auf Mikrovilli) der meisten zirkulierenden Leukozyten (Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten) exprimiert. Es ist insbesondere für die Schritte des Tethering und Rolling der Leukozytenkaskade wichtig und damit grundlegender Bestandteil der Leukozytenadhäsionskaskade (Ivetic and Ridley, 2004). Auch für die Rekrutierung von BMCs konnte indirekt eine tragende Rolle für L-Selektin beobachtet werden. Suuronen et al. nutzten eine azelluläre kollagen-basierte Matrix, die Sialyl-Lewis^x (sLe^x) enthielt. sLe^x bindet an L-Selektine. Der Effekt dieser speziellen Matrix auf Progenitorzellen und die Angiogenese wurde im Ischämie-Modell an der Ratte untersucht. Gegenüber normaler Matrix war die Rekrutierung endogener CD133⁺CD34⁻ und systemisch injizierter CXCR4⁺L-Selektin⁺-Zellen signifikant erhöht, wobei die Rekrutierung der Zellen über eine Bindung von L-Selektin erfolgte (Suuronen et al., 2009). Da L-Selektin dauerhaft auf Knochenmarkzellen exprimiert wird und damit für eine Rekrutierung direkt zur Verfügung steht, spielt es wahrscheinlich auch in diesem zeitlich limitierten Modell eine wesentliche Rolle für die Knochenmarkzell-Rekrutierung in das ischämische Myokard.

E(endothelial)-Selektin (CD62E) wird durch aktivierte Endothelzellen exprimiert. Die Aktivierung erfolgt dabei durch Zytokine, hauptsächlich über IL-1 und TNF- α oder durch Lipopolysaccharide (Bevilacqua et al., 1989). Da E-Selektin durch Erhöhung der Transkriptionsrate de-novo synthetisiert werden muss, wird die maximale Expression des E-Selektins auf der Zelloberfläche nach ca. vier Stunden erreicht. Nach 16-24 Stunden geht die Konzentration auf das ursprüngliche Niveau zurück. Die Konzentration von in Serum gelöstem E-Selektin (sE-Selektin) steigt dagegen innerhalb von 24 Stunden an und bleibt für sieben Tage erhöht. Die Steuerung der Expression des Gens für E-Selektin erfolgt vorwiegend durch NF- κ B (Schindler and Baichwal, 1994). E-Selektin spielt auch für die Rekrutierung von Progenitor- bzw. Stammzellen eine entscheidende Rolle (Oh et al., 2007). Da E-Selektin allerdings nicht

kontinuierlich auf Endothelzellen, sondern es erst über eine Aktivierung durch verschiedene Mediatoren nach mehreren Stunden zur Expression kommt, spielt es in diesem tierexperimentellen, zeitlich limitiertem Modell wahrscheinlich keine wesentliche Rolle bei der Beeinflussung der Knochenmarkzell-Rekrutierung.

P(platelet)-Selektine (CD62P) werden von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen entzündeten Gewebes exprimiert. Sie sind in Granula gespeichert, welche in Thrombozyten als α -Granula und in Endothelzellen als Weibel-Palade-Körperchen bezeichnet werden. Die Translokation aus den Granula zur Plasmamembran erlaubt eine schnelle Hochregulierung der Oberflächenexpression innerhalb von 10 Minuten. Mediatoren wie Histamin und Thrombin initiieren diesen Vorgang. Des Weiteren werden P-Selektine auch nach Zellaktivierung durch Zytokine de novo synthetisiert und an die Zelloberfläche transportiert. Nach ca. 30-60 Minuten werden sie durch Endozytose wieder von der Oberfläche entfernt (McEver, 1997). P-Selektine spielen neben ihrer Funktion im Rahmen der Leukozytenadhäsionskaskade ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von BMCs nach myokardialer Ischämie. Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass nach Blockieren des P-Selektins im Langendorff-Modell am Rattenherz mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper PoAb (BD-Pharmingen, Deutschland) eine signifikante Reduktion der BMC-Rekrutierung gegenüber der Kontrollgruppe auftrat (8% \pm 3% vs. 44% \pm 7%, $p < 0,01$) (Sequeira et al., 2005). Dieses Ergebnis konnte 2012 von Elser et al. in einem ähnlichen Modell ebenfalls aufgezeigt werden. Zur Untersuchung des Einflusses von Ischämie und Reperfusion sowie Selektinen auf die Rekrutierung von BMCs wurden isoliert perfundierten Mäuseherzen nach Ischämie und Reperfusion BMCs verabreicht. Ischämie und Reperfusion von min. 30 Minuten Länge erwiesen sich – ähnlich wie in unseren Untersuchungen - als entscheidende Faktoren für eine erfolgreiche Zellrekrutierung. C-kit⁺/CD45⁺-BMCs konnten verhältnismäßig häufiger im Myokard nachgewiesen werden. Dabei gilt c-kit als Marker für myogene Progenitorzellen, CD45 als Marker für Zellen, die aus dem Knochenmark stammen. Ohne Ischämiephase und bei kürzerer Reperfusionphase ließen sich signifikant weniger dieser Zellen im Myokard nachweisen. In einigen Versuchsgruppen wurden außerdem selektiv P- und L-Selektine mit Hilfe von Antikörpern geblockt. Die Blockierung von P-Selektin führte dabei zu einer deutlichen Reduktion rekrutierter c-kit⁺/CD45⁺-BMCs. Zur Bestätigung der Interaktion von c-kit⁺-BMCs mit Zelladhäsionsmolekülen wurden BMCs außerdem durch eine Flusskammer, welche entweder mit P- oder L-Selektinen beschichtet war, durchströmt. c-kit⁺-BMCs zeigten eine deutlich erhöhte Adhäsion an P-Selektinen. c-kit⁻

BMCs dagegen zeigten bei beiden Selektinarten keine Veränderung der Adhäsion (Elser et al., 2012). P-Selektin wird nicht dauerhaft auf Zellen exprimiert, kann aber innerhalb kürzester Zeit durch Aktivierung induziert werden. Durch den Reiz der Ischämie kommt es zu einer Typ-I-Aktivierung des Endothels und damit zu einer schnellen Ausschüttung von P-Selektin aus entsprechenden Granula (Walzog and Gaetgens, 2000). Aufgrund der 30-minütigen Reperfusionphase spielt P-Selektin daher in unserem Modell mit großer Wahrscheinlichkeit eine Rolle für die Rekrutierung von Knochenmarkzellen in ischämisches Myokard. Eine Typ-II-Reaktion dagegen erfordert eine Veränderung der Transkription und erscheint hier nicht verantwortlich für die vermehrte Rekrutierung nach Reperfusion (Pober and Sessa, 2007).

PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) (CD162) ist ein Glykoprotein, das auf Leukozyten und Endothelzellen lokalisiert ist und als wichtiger Ligand für Selektine gilt. Besonders hoch ist die Affinität zu P-Selektin (Veerman et al., 2012). Winkler et al. konnten zeigen, dass PSGL-1 auf CD34⁺-Zellen exprimiert werden (Winkler et al., 2004). Funktionell ergab sich nach Blockade von PSGL-1 in einem Mausmodell eine Verminderung der Adhäsion und der proangiogenen Eigenschaften von EPCs (Foubert et al., 2007). Dementsprechend kann diesem Molekül für dieses Modell ebenfalls eine entscheidende Rolle zugeschrieben werden.

Integrine und deren Liganden der Immunglobulinsuperfamilie

Integrine sind glykosylierte transmembrane Proteine, bestehend aus nicht kovalent gebundenen Dimeren: einer α - und einer β -Kette (Lammermann et al., 2008). Die Bindung von β -Integrinen an entsprechende Liganden induziert ein „outside-in-signaling“ und dadurch eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege (Zarbock and Ley, 2008). Fünf Integrine werden als wichtig für den Prozess der Leukozytenadhäsion beschrieben: $\alpha_L\beta_2$ -, $\alpha_M\beta_2$ -, $\alpha_X\beta_2$ -, $\alpha_4\beta_1$ - und $\alpha_4\beta_7$ -**Integrin**. Endotheliale Liganden sind Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie wie ICAM-1-5, VCAM-1 und MadCAM-1 (Garrood et al., 2006). Exprimiert werden sie auf Leukozyten. Die Aktivierung der im Ruhezustand nicht funktionsfähigen Integrine (zur Verhinderung einer willkürlichen Adhäsion und Transmigration) erfolgt durch inflammatorische Mediatoren, insbesondere proinflammatorische Chemokine (Pitzalis et al., 2002). β_2 -Integrine können ihre Adhäsionseigenschaften durch Veränderung von Affinität und Avidität modulieren. Die unterschiedlichen Ausprägungsgrade der Affinität werden durch Konformationsänderungen der extrazellulären Domänenabschnitte geregelt und eingeteilt in Stadien

niedriger, mittlerer und hoher Affinität. Die Avidität wird hauptsächlich nach Ligandenbindung durch Interaktion der Integrine mit dem Zytoskelett gesteuert. Durch den Prozess des „Clustering“ kommt es zu einer Akkumulation von β -Integrinen, welche die Zellavidität für auf Oberflächen präsentierte Integrin-Liganden erhöht. Dadurch wird eine spezifische Bindung der Leukozyten im Bereich von Entzündungen gewährleistet (Zarbock and Ley, 2008).

LFA-1 (α L β 2, CD11a/CD18) kontrolliert die Geschwindigkeit des Rollings sowie Adhäsion und Migration von Leukozyten *in vivo*. Ein wichtiger Ligand ist ICAM-1 (Zarbock et Ley 2008). **Mac-1 (α M β 2, CD11b/CD18)** wird in Granula von Neutrophilen gespeichert und nach Zellaktivierung stimuliert. Neben ICAM-1 sind beispielsweise Fibrinogen, Glykoproteine und der Komplementfaktor iC3b wichtige Liganden. Auch Mac-1 reguliert die Rolling-Geschwindigkeit von Leukozyten *in vivo* und beeinflusst die Migration (Zarbock and Ley, 2008). **VLA-4 (α 4 β 1, CD49d/CD29)** ist ein β 1-Integrin, welches ebenfalls wichtig für die Rekrutierung von Leukozyten ist. Relevante Liganden sind VCAM-1, MadCAM-1 und Fibronectin (Garrood et al., 2006). Nachgewiesen werden konnte, dass β 2-Integrine nicht nur entscheidend sind für eine erfolgreiche Rekrutierung von Leukozyten, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Progenitor- und Stammzellen spielen (tabellarische Übersicht zur Expression von β -Integrinen auf Progenitor-/Stammzellen mit deren dazugehörigen Liganden auf Endothel und Matrixkomponenten in Kapitel 6.6).

Am Mausmodell wurde die Rolle von Integrinen, im besonderen β 2-Integrinen für das Homing und die Neovaskularisationskapazität von EPCs und hämatopoetischen Stammzellen in ischämischen Geweben untersucht. Dabei sind die Mitglieder der β 2-Integrinfamilie insbesondere für den Prozess der festen Adhäsion verantwortlich und vermitteln diesen Schritt über Interaktion mit endothelialen Liganden wie ICAM-1, VCAM-1 und Fibrinogen. β 2-Integrin-defiziente Mäuse zeigen ein verringertes Homing von hämatopoetischen Stammzellen in ischämische Geweberegionen und eine Reduktion der Neovaskularisation. Dagegen führt eine vorherige Aktivierung von β 2-Integrinen zu einer verstärkten Neovaskularisation durch EPCs (Chavakis et al., 2005). Die kurzzeitige pharmakologische Stimulation von Epc verstärkt die integrinvermittelte Adhäsion von EPCs, CD34⁺ Progenitorzellen und MSCs *in vitro*, *in vivo* außerdem das Homing von EPCs in ischämisches Myokard und deren Fähigkeit, eine Neovaskularisation zu bewirken. Zusätzlich sind Integrine für die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung von Stamm-/Progenitorzellen entscheidend

(Chavakis et al., 2010). In einem myokardialen Infarktmodell an Mäusen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CD18-Integrine und der dazugehörige Ligand ICAM-1 essentiell für das Homing von aus dem Knochenmark stammenden EPCs sowie die Angiogenese sind. Mit Antikörpern wurde eine Blockade der β 2-Integrine hervorgerufen. Die Blockade führte zu einer signifikanten Inhibierung der Adhäsionskapazität *in vitro* und reduzierte die Rekrutierung in ischämisches Myokard *in vivo* um 95% (Wu et al., 2006).

Wu et al. untersuchten außerdem nach myokardialer Ischämie die Expression von Genen, die für eine Kodierung von an der Rekrutierung von BMCs beteiligten Molekülen verantwortlich sind. Dazu wurden EPCs (Flk1⁺ und CD34⁺) aus dem Knochenmark von Ratten isoliert und in einem Medium kultiviert. Nach sieben Tagen wurden diese Zellen markiert. Im Mausmodell wurde durch Ligatur der LAD eine myokardiale Ischämie induziert. Oben beschriebene Zellen wurden im Anschluss intrakavitär injiziert. Acht und 24 Stunden nach Myokardinfarkt wurde durch Mikroarray-Analysen das Expressionsprofil verschiedener Moleküle untersucht. Zusätzlich wurden die für die Rekrutierung der EPCs wichtigen Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Zytokine und chemotaktischen Moleküle mittels real-time PCR auf ihre veränderte Expression hin untersucht. Acht und 24 Stunden nach Ischämie zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression von Molekülen wie SDF-1, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf dem Endothel. Die Untersuchung der EPCs auf dazugehörige Rezeptoren zeigte eine Expression von CXCR-4, ESL, CD18 und dem Integrin α 4 (Wu et al., 2006).

Die Übertragbarkeit der oben aufgeführten Mechanismen auf die vorliegende Studie ist fraglich. Es ist bekannt, dass beispielsweise ICAM-1 nur in sehr geringer Dichte auf dem Gefäßendothel exprimiert wird. Erst im Rahmen adäquater Stimuli, wie Ischämie und anschließender Reperfusion kommt es zu einem signifikanten Anstieg der ICAM-1-Expression. Yamazaki et al. konnte in einem Rattenmodell nachweisen, dass ICAM-1 nach entsprechenden Stimuli erst innerhalb von acht Stunden signifikant ansteigt (Yamazaki et al., 1993). Auch Integrine müssen zum Erreichen ihrer funktionellen Aufgaben zuvor aktiviert werden. Dies geschieht vorwiegend Chemokin-vermittelt (s.o.). Die benötigte Zeitdauer der Aktivierung übersteigt allerdings die in diesem Modell zur Verfügung stehenden 45 Minuten.

PECAM-1 (CD31) und CD99

Über die transendotheliale Migration von EPCs ist bislang wenig bekannt. Es ist nicht geklärt, ob diese über eine trans- oder parazelluläre Route stattfindet. Neben Integrinen sind bei der

Transmigration von Leukozyten auch PECAM-1 und CD99 involviert. Für CD99 konnte gezeigt werden, dass es auf CD34⁺-Zellen exprimiert wird und in den Prozess der trans-endothelialen Migration involviert ist (Imbert et al., 2006). Untersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten außerdem zeigen, dass nach Blockade von PECAM-1 durch Antikörper die Rekrutierung von Knochenmarkzellen in ischämisches Myokard entscheidend reduziert wird (Sequeira et al., 2005). PECAM-1 spielt damit in diesem Modell eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Rekrutierung von Knochenmarkzellen.

4.5 Dosisabhängige Reduktion des Homings von Knochenmarkzellen durch Glucocorticoide

Betrachtet man die Versuchsreihen I (Methylprednisolon in einer Dosierung von 0,1 mg/kgKG), II (Methylprednisolon: 1 mg/kgKG) und III (Methylprednisolon: 5 mg/kgKG) im Vergleich zur Versuchsreihe VI (Kontrollgruppe, keine Verwendung von Methylprednisolon) zeigt sich eine dosisabhängige Verminderung der Knochenmarkzellrekrutierung. In der Kontrollgruppe werden im Durchschnitt 44,95% der Knochenmarkzellen rekrutiert, in der Versuchsreihe I 37,96% der Zellen, in Versuchsreihe II 22,19% und in Versuchsreihe III 20,36%. Beim Vergleich der Reihe I mit der Kontrollgruppe lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen ($p = 0,524$). Dagegen zeigt der statistische Vergleich der Gruppen II und III mit Gruppe VI signifikante Unterschiede ($p = 0,001$ bzw. $p < 0,001$).

Verschiedene pharmakologische Wirkstoffe haben die Eigenschaft, die Expression bzw. Funktion von Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen zu beeinflussen und unter anderem dadurch ihre antiinflammatorischen Wirkungen zu entfalten. Zu ihnen gehören auch die Glucocorticoide (Cronstein et al., 1992, Sanchez-Madrid and Gonzalez-Amaro, 2001). Die Reduktion der Anzahl an rekrutierten Knochenmarkzellen durch Methylprednisolon wird durch ein Eingreifen des Glucocorticoids an unterschiedlichen Punkten des Ischämie-Reperfusionssyndroms hervorgerufen (Farsky et al., 1995, Pitzalis et al., 2002). Die Wirkmechanismen der Glucocorticoide, welche in genomische und nicht genomische unterteilt werden können, sind in Kapitel 1.4 ausführlich beschrieben. Im Anhang ist eine tabellarische Übersicht der für die Rekrutierung wichtigsten und durch Glucocorticoide beeinflussten Systeme aufgeführt (6.6). Wichtig ist die Unterscheidung zwischen genomisch (Manning et al., 1995) und nicht-genomisch (Pitzalis et al., 2002) aufgrund des in dieser Arbeit vorliegenden Zeitmodells. Für die veränderte Rekrutierung von Knochenmarkzellen können sowohl genomische als auch nicht-genomische Wirkmechanismen eine Rolle spielen: Genomische Mechanismen sind entscheidend, da durch sie bereits im Vorfeld vor Induktion einer Ischämie für die Rekrutierung wichtige Strukturen inhibiert werden können. Nicht-genomische Mechanismen sind sowohl für Veränderungen im Vorfeld des Versuchs wichtig als auch für Veränderungen während bzw. nach Induktion der Ischämie, da sie innerhalb kürzester Zeit Effekte zeigen.

4.5.1 Zytokine

Über den genomischen Mechanismus der trans-repression und posttranskriptionelle Mechanismen wird durch Glucocorticoide die Produktion verschiedener Zytokine beeinflusst. Insbesondere werden **TNF- α** , **IL-1**, **IL-6** und **IL-8** vermindert synthetisiert (Barnes, 2006). In diesem Modell scheint insbesondere die Verminderung der Expression von TNF- α eine Rolle zu spielen. Bei Auftreten einer myokardialen Ischämie wird es, wie oben erläutert, innerhalb kürzester Zeit durch Degranulation von Mastzellen im Myokard freigesetzt. Bereits im Vorfeld kann die Synthese von TNF- α durch genomische Wirkungen der Glucocorticoide gehemmt und anschließend die schnelle Expression vermindert werden.

Ebenso wurde die entscheidende Rolle von **SDF-1** und seinem Rezeptor **CXCR4** für die Rekrutierung von Knochenmarkzellen in ischämisches Myokard dargestellt. Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass Glucocorticoide auch die Expression dieses Chemokins vermindern. Am Tiermodell wurde eine verminderte Expression von SDF-1 und CXCR4 in der Lunge bei Mäusen nach Budenosidgabe gezeigt (Luan et al., 2010). Die erhöhte Produktion von SDF-1 in humanen, ortsständigen Zellen der Schulter im Rahmen einer entzündlichen Bursitis wurde durch Behandlung mit Dexamethason ex vivo umgekehrt (Kim et al., 2006). Bei Patienten mit allergischer Rhinitis wurde die Rekrutierung von CD34⁺/CXCR4⁺-Zellen durch lokale Behandlung mit einem Glucocorticoid vermindert (Sergejeva et al., 2005). 48 Stunden nach im Rattenmodell induzierter Hirnischämie zeigte sich eine deutlich vermehrte Expression von CXCR4 im affektierten Hirnanteil. Eine vorherige Behandlung mit Dexamethason ergab eine deutlich geringere Dichte an CXCR4 (Felszeghy et al., 2004). Diese Untersuchungen lassen darauf schließen, dass Methylprednisolon die Rekrutierung von Knochenmarkzellen bei myokardialer Ischämie durch Beeinflussung der SDF-1/CXCR4-Achse vermindern kann.

4.5.2 Zelluläre Adhäsionsmoleküle

Selektine

Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass durch Verabreichung von Glucocorticoiden eine Reduktion der Expression von **L-Selektin** auf mononukleären Zellen um 79% erreicht wird (Wehling-Henricks et al., 2004). Auch die Inkubation menschlichen Blutes mit Dexamethason führt zu einer Reduktion von L-Selektin auf Neutrophilen (Filep 1997). Dabei führen Glucocorticoide bei Verabreichung zu einem vermehrten, so genannten „L-selectin

shedding“ (Perretti and D'Acquisto, 2009). Beim Vorgang des Shedding kommt es zu einer proteolytischen Abspaltung extrazellulärer Anteile des L-Selektins. Als Ergebnis zeigt sich eine Herunterregulation von L-Selektin. Das Shedding ist ein Vorgang, der in wenigen Minuten eingeleitet werden kann. Auf Neutrophilen kommt es zu einer Abspaltung beinahe aller L-Selektin-Moleküle innerhalb der ersten fünf Minuten, auf Lymphozyten dagegen beträgt die Zeitdauer über 30 Minuten. Die Proteasen, die ursächlich für ein Shedding von L-Selektin sind, werden außerdem auch auf genomischem Wege (über eine Beeinflussung ihrer Transkriptionsrate) reguliert (Smalley and Ley, 2005). Wird das L-Selectin-Shedding blockiert, resultiert daraus ein Anstieg des neutrophilen Arrest, eine Reduktion der Rolling-Geschwindigkeit und dadurch ein stabiler Rolling-Prozess (Zarbock and Ley, 2008). Da L-Selektin dauerhaft auf Leukozyten und Knochenmarkzellen exprimiert wird, kommen neben nicht-genomischen auch genomische Mechanismen als Ursache für die Beeinträchtigung der Rekrutierung von Knochenmarkzellen durch Methylprednisolon in Frage.

Eine Studie zeigte die Suppression von **E-Selektin** und ICAM-1 durch Glucocorticoide auf Endothelzellen und eine dadurch hervorgerufene Unterdrückung der PMN-Adhäsion. Bei der Beeinflussung des E-Selektins wird eine direkte Gen-Beeinflussung durch Glucocorticoide angenommen (Cronstein et al., 1992). Da E-Selektin nicht kontinuierlich auf Endothelzellen, sondern es erst durch Aktivierung über verschiedene Mediatoren nach mehreren Stunden zur Expression auf Endothelzellen kommt, spielt es in diesem Modell wahrscheinlich keine große Rolle bei der Beeinflussung der Knochenmarkzell-Rekrutierung durch Glucocorticoide.

Die Expression von **P-Selektin** wird durch Glucocorticoide beeinflusst. In einer Untersuchung am Mausmodell konnte nach Gabe von Prednisolon eine Reduktion von P-Selektin auf dem Gefäßendothel um 82% nachgewiesen werden. Spezifische Entzündungszellen waren in inflammatorisch verändertem Gewebe vermindert nachzuweisen. Die Autoren führen diesen Effekt auf das verminderte Vorhandensein von P-Selektin und anderen Adhäsionsmolekülen sowie eine Modulation der CAM-Funktion zurück (Wehling-Henricks et al., 2004). Genau wie im Falle des E-Selektins wird P-Selektin nur durch aktivierte Thrombozyten und Endothelzellen und nicht kontinuierlich exprimiert. Da es jedoch aus Granula innerhalb weniger Minuten nach Aktivierung freigesetzt und exprimiert wird, könnte es in diesem Modell eine Rolle für die beeinträchtigte Rekrutierung durch Methylprednisolon spielen.

Integrine und Immunglobulin-Superfamilie

In einem *in vitro* Experiment wurden humane Lymphozyten 24 Stunden mit Dexamethason inkubiert. Es zeigte sich eine Reduktion der Adhäsion von Lymphozyten an humanem Endothel um 35% sowie eine interzelluläre Lymphozytenaggregationshemmung um 75%. Untersuchungen zeigten, dass die Reduktion wohl hauptsächlich durch eine Herunterregulation der **Integrine LFA-1** und **CD2** erfolgte. Vermutet wird eine direkte Unterdrückung der Gentranskription sowie eine Destabilisierung der mRNA (Pitzalis et al., 1997). Ein weiterer genomischer Mechanismus betrifft die Eigenschaft der Glucocorticoide, die Produktion von Zytokinen und Chemokinen zu reduzieren. Bekannt ist, dass diese für die erfolgreiche Aktivierung der CAM-Expression nötig sind. IL-2, IL-7 und IL-15 scheinen beispielsweise wichtig für die Expression von LFA-1 und CD2 zu sein (Pitzalis et al., 2002). Da Integrine in diesem Modell aufgrund der zeitlichen Komponente wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle für die Rekrutierung der Knochenmarkzellen spielen, ist der Mechanismus der Integrinhemmung durch Methylprednisolon in diesem Fall wahrscheinlich zu vernachlässigen.

Die für Integrine wichtigen Liganden (ICAM-1-5, VCAM-1, MadCAM-1 und PECAM-1) sind unter anderem auch auf dem Endothel lokalisiert und gehören zur **Immunglobulin-Superfamilie**. In tierexperimentellen Versuchen wurden männliche Wistar-Ratten mit RU 38486 (Mifepriston), einem Antiglucocorticoid behandelt oder adrenaletomiert. Die Expression von L-Selektin auf Leukozyten sowie die Expression von P-Selektin, E-Selektin, PECAM-1, VCAM-1 und ICAM-1 auf dem Gefäßendothel wurden gemessen. Eine Behandlung mit RU 38486 führte zu einer erhöhten Expression von L-Selektin auf Neutrophilen sowie zu einer vermehrten Retention dieser Zellen in der Zirkulation. Die Expression auf Zellmembranen sowie die mRNA-Level von ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1 war erhöht nach Adrenaletomie oder Behandlung mit RU 38486. Ebenfalls erhöht war die Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Beobachtet wurde auch eine Auswirkung auf die Zelladhäsion: Eine erhöhte Anzahl adhärenter neutrophiler Zellen war am Endothel nachweisbar (Cavalcanti et al., 2007).

ICAM-1 spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der Leukozytenadhäsionskaskade und ist insbesondere für die Adhäsion der Leukozyten bzw. Knochenmarkzellen verantwortlich. ICAM-1 scheint ein dominanter Ligand während der Inflammation zu sein, da er durch proinflammatorische Stimuli hochreguliert wird (Hubbard and Rothlein, 2000). ICAM-2 dagegen wird dauerhaft auf Gefäß- und lymphatischem Endothel exprimiert. Insbesondere die Blockade beider ICAMs führt am Mausmodell zu einer signifikanten Reduktion der

Expression von ICAM-1 sowohl auf mononukleären Zellen (-57%) als auch auf dem Gefäßendothel (-52%) (Wehling-Henricks et al., 2004).

Auch **PECAM-1** wird vermindert exprimiert, wenn Glucocorticoide verabreicht werden (Cavalcanti et al., 2007). Für die Transmigration von Leukozyten spielt PECAM-1 eine entscheidende Rolle (Pitzalis et al., 2002). Unsere Arbeitsgruppe selbst konnte nachweisen, dass PECAM-1 auch eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Rekrutierung von Knochenmarkzellen spielt. Nach Blockieren von PECAM-1 mit Hilfe eines mononuklearen Antikörpers (MoAb) (BD Pharmingen, Germany) wurde die Rekrutierung von Knochenmarkzellen im Bereich des ischämischen Myokards signifikant reduziert (Sequeira et al., 2005).

Antiinflammatorische Mediatoren

Des Weiteren können Glucocorticoide ihre antiadhäsiven Eigenschaften durch Induktion der Synthese antiinflammatorischer Mediatoren bewirken. Wichtiges Beispiel ist hier **Annexin AI (ANXA I)**. Die Funktion von Annexin AI besteht in einer Gegenregulation von Effekten des Immunsystems (Perretti and D'Acquisto, 2009). Es vermindert insbesondere die Extravasation von Leukozyten, verhindert eine übermäßige Produktion von entzündlichen Mediatoren und damit eine überschießende Reaktion des Immunsystems (Pitzalis et al., 2002). Annexin AI befindet sich, zum Teil in Granula gespeichert, im Zytoplasma der Leukozyten. Kommt es zu einer Zellaktivierung, wird Annexin AI innerhalb kurzer Zeit an die Außenseite der Plasmamembran transloziert und führt zu einer Beeinträchtigung der Adhäsion und Migration von Neutrophilen (Perretti and D'Acquisto, 2009). Synthese und Funktion von Annexin AI werden durch Glucocorticoide reguliert. Werden dem menschlichen Körper Glucocorticoide verabreicht, steigt die Expression von Annexin AI durch Neutrophile und Monozyten. Die Regulation erfolgt dabei, abhängig von Zelltyp und Induktionszeit, auf genomische und nicht-genomische Art. Eine Hypothese beschreibt, dass während einer Entzündungsreaktion die Konzentration von Glucocorticoiden ansteigt und dadurch zügig die Verfügbarkeit von Annexin AI auf der Zelloberfläche über nicht-genomische Mechanismen erhöht wird. Erst dann, innerhalb von 2-4 Stunden kommt es zu einer Erhöhung der Expression von Genen die Annexin AI und dessen Rezeptor ALXR über genomische Mechanismen erhöhen. Die Gabe von Annexin AI selbst zeigt den Glucocorticoiden ähnliche Effekte. Es kommt zu einer Ablösung adhärenter Zellen vom Endothel und der Inhibierung neutrophiler Transmigration (Perretti and D'Acquisto, 2009). Als grundlegender Mechanismus wird nicht eine Beeinflussung der Expression von CAMs angenommen, sondern eine

Modifikation deren Funktionsfähigkeit (Pitzalis 2002). Auch wenn die Synthese von Annexin AI teilweise direkt genomisch geregelt wird, können Effekte, die durch die schnelle Mobilisierung von Annexin AI aus dem Zytoplasma zur Zellmembran als nicht-genomisch bezeichnet werden. Auch dieser Mechanismus kann durch Glucocorticoide beeinflusst werden und damit eine entscheidende Rolle für die verminderte Rekrutierung der Knochenmarkzellen in diesem Modell spielen.

4.5.3 Weitere, nicht-genomische Mechanismen der Regulation der Zelladhäsion

Nicht-genomisch, durch Glucocorticoide hervorgerufene Effekte, sind besonders von der Konzentration der verabreichten Glucocorticoide abhängig. Charakterisiert sind diese außerdem durch ein sofortiges Eintreten innerhalb von Sekunden bis Minuten, da deren Auftreten nicht durch Inhibitoren der Gentranskription oder der Proteinbiosynthese gesteuert ist (Stahn et al., 2007). Insbesondere deshalb sind diese Mechanismen interessant als Erklärungsansatz für die Ergebnisse dieser Arbeit. Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, werden die nicht-genomischen Effekte wahrscheinlich durch membrangebundene Glucocorticoidrezeptoren oder direkte physikochemikalische Interaktion vermittelt. Erst im Rahmen einer Entzündung werden die auf den Zellmembranen vorhandenen Adhäsionsmoleküle aktiviert. Diese schnelle Aktivierung wird wahrscheinlich durch eine Veränderung der Tertiärstruktur der CAMs hervorgerufen. In vitro und in vivo Untersuchungen konnten zeigen, dass Glucocorticoide über nicht-genomische Mechanismen auf die Adhäsion von Zellen einwirken können. So wird beispielsweise die Expression eines Epitops (NKI-L16) des Integrins LFA-1 auf Lymphozyten unterdrückt und damit auch innerhalb kurzer Zeit eine Aggregation dieser Zellen vermindert. Auch der verminderten Migration von Entzündungszellen in entzündlich verändertes Gewebe scheinen nicht-genomische Effekte zugrunde zu liegen. Dabei spielt die Dosierung der Glucocorticoide eine entscheidende Rolle: Genomische Effekte treten vor allem im Rahmen niedriger Dosierungen auf, nicht-genomische Effekte bei hohen Dosierungen (Pitzalis et al., 2002).

4.6 Stammzelltherapie bei Akutem Koronarsyndrom

Die häufig nach einem Myokardinfarkt auftretende kardiale Insuffizienz ist der limitierende prognostische Faktor eines Infarktpatienten. Derzeit etablierte medikamentöse, interventionelle und operative Therapieoptionen dienen der Entlastung des Herzens und der Aufrechterhaltung seiner Pumpfunktion (siehe Kapitel 1.5.1). Versagen diese Möglichkeiten, bleibt aktuell nach Auftreten einer ischämischen Kardiomyopathie als eine der letzten Optionen nur die Herztransplantation (Mehra et al., 2006). Seit ungefähr zehn Jahren werden daher auf Grundlage experimenteller Untersuchungen klinische Studien durchgeführt, im Rahmen derer mit Hilfe einer Stammzelltherapie versucht wird, eine verbesserte Regeneration des Herzmuskels zu erreichen. Indikationen für eine Stammzelltherapie sind akute und chronische Herzerkrankungen wie beispielsweise der akute Myokardinfarkt, die chronische Herzinsuffizienz und die dilatative Kardiomyopathie (Strauer and Steinhoff, 2011). Im Folgenden werden wichtige klinische Studien dargestellt und diskutiert.

4.6.1 Aktuelle klinische Studienlage

Im Jahre 2002 wurde die erste klinische Studie an einem größeren Patientenkollektiv von insgesamt 20 Patienten durch **Strauer et al.** durchgeführt. Nach drei Monaten zeigte sich eine signifikante Reduktion der Infarktgröße innerhalb der Verum-Gruppe. Auch funktionelle Parameter des Herzens waren verbessert (Strauer et al., 2002). **Assmus et al.** transplantierte in der Studie **TOPCARE-AMI** 20 Patienten mit akutem Infarktereignis jeweils adulte Knochenmarkstammzellen (BMCs) oder aus dem Blut gewonnene Vorläuferzellen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der globalen linksventrikulären Ejektionsfraktion, eine verbesserte Wandbewegung im Infarktbereich, ein reduziertes endsystolisches linksventrikuläres Volumen und ein signifikant erhöhter Blutfluss in der „Infarktarterie“ vier Monate nach Transplantation (Assmus et al., 2002). Das durchgeführte 5-Jahres-Follow-Up an 55 Patienten erbrachte signifikant niedrigere BNP-Serumspiegel, eine anhaltende Verbesserung der LVEF gegenüber der Baseline-Untersuchung sowie eine Reduktion der funktionellen Infarktgröße (Leistner et al., 2011). **Wollert et al.** führte mit der Studie **BOOST-Trial** eine randomisierte Studie (n = 60 Patienten) durch. Nach sechs Monaten wurde eine Verbesserung der globalen linksventrikulären Ejektionsfraktion in der mit Knochenmarkzellen behandelten Verum-Gruppe festgestellt (Wollert et al., 2004). 18 Monate sowie fünf Jahre nach Infarkt waren jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr feststellbar (Meyer et al., 2006, Meyer et al.,

2009, Schaefer et al., 2010). Eine doppelblinde, randomisierte, placebokontrollierte Studie wurde von **Janssens et al.** 2006 veröffentlicht. Die 24 Stunden nach akutem Infarkt infundierten Knochenmarkprogenitorzellen bewirkten keine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach vier Monaten, jedoch eine signifikante Größenabnahme der Infarktnarbe (Janssens et al., 2006). 2006 wurde eine Reihe weiterer Studien zu diesem Thema veröffentlicht (Rosenzweig, 2006). In der randomisierten Studie **ASTAMI** konnte nach sechs Monaten keine positiven Effekte durch die Stammzelltherapie nachgewiesen werden (Lunde et al., 2006). Diesbezüglich wurden auch im 3-Jahres-Follow-up keine Effekte aufgezeigt (Beitnes et al., 2009). In der multizentrischen Studie **REPAIR-AMI** von **Schächinger et al.** zeigte sich nach vier Monaten eine signifikant stärkere Zunahme der globalen linksventrikulären Funktion in der Verum- verglichen mit der Placebogruppe. Zusätzlich zeigten sich eine Verbesserung der koronaren Flussreserve nach vier Monaten und eine tendenziell verminderte kardiovaskuläre Ereignisrate. Bei einem Ein-Jahres-Follow-Up zeigte sich in der Verum-Gruppe eine geringere Mortalität sowie eine geringere Reinfarktrate (Schächinger et al., 2006). Eine mittels MRT an einer Subgruppe durchgeführte Analyse der Herzfunktion ein Jahr nach Behandlung ergab eine signifikante Zunahme der Ejektionsfraktion und eine Verringerung der Zunahme des enddiastolischen Volumens (Dill et al., 2009). In der Zweijahreskontrolle traten die Endpunkte Tod, Myokardinfarkt und Notwendigkeit der Revaskularisation in der BMC-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe signifikant seltener auf (Assmus et al., 2010a).

Andere Studien zeigten keine positive Veränderung am Myokard nach Infarkt durch Stammzellgabe (**Late TIME Trial** (Traverse et al., 2011), **HEBE Trial**, (Hirsch et al., 2011). Im **BONAMI Trial**, ebenfalls 2011 durchgeführt, zeigte sich hingegen wieder ein positiver Effekt der BMC-Therapie. Die multivariate Analyse ergab einen signifikanten Vorteil der LVEF für die Patienten der BMC-Gruppe (Roncalli et al., 2011). Aktuell laufende Studien sind **SWISS-AMI** (Surder et al., 2011), **REGEN-AMI** (Mathur, 2011), **PERFECT** (Steinhoff, 2012) und **PROMETHEUS** (Hare, 2010).

Eine von Abdel-Latif im Jahre 2007 durchgeführte **Metaanalyse** ergab in den Verumgruppen eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) um 3,66% gegenüber den Kontrollgruppen, außerdem eine Verringerung der Infarktgröße sowie reduzierte LVESV und LVEDV (Abdel-Latif et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse ergab eine weitere Metaanalyse 2007 (Lipinski et al., 2007). Auch neueste Metaanalysen aus den Jahren

2008 und 2010 zeigten für die Verumgruppen signifikante Verbesserungen der LVEF (Kang et al., 2008, Jiang et al., 2010).

4.6.2 Funktionsmechanismen der Stammzelltherapie

Den Stammzellen werden bei Verabreichung im Rahmen von ischämischen Herzerkrankungen positive Eigenschaften für die Verbesserung der Herzfunktion zugeschrieben. Genaue zugrunde liegende Funktionsmechanismen sind nicht bekannt. Diskutiert wird die Fähigkeit verschiedener Stammzellpopulationen, eine **Neovaskularisation** am Myokard zu bewirken. Möglichkeiten für die Neuentstehung von Kapillaren könnten die Umwandlung von Progenitorzellen/Stammzellen in Gefäßendothelzellen selbst oder die Abgabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und damit die Stimulation residenter Endothelzellen sein (Dimmeler and Zeiher, 2008). Ein weiterer Mechanismus, der einem verbesserten Outcome nach Stammzelltherapie zugrunde liegen könnte, ist die **Sekretion parakriner Faktoren** durch die transplantierten Stammzellen. Sie könnten eine Schutzfunktion für Kardiomyozyten darstellen und deren Apoptose verhindern. Zusätzlich könnten sie zu einer positiven Beeinflussung von Remodelling, Inflammationsreaktion und Fibrosierung führen (Anversa et al., 2006, Dimmeler and Zeiher, 2008). Des Weiteren ist eine Modulation des Matrixremodelling sowie eine Rekrutierung von weiteren Stamm-/Progenitorzellen beschrieben (Tongers et al., 2011). Durch parakrine Faktoren sollen ebenfalls kardiale Stammzellen (CSCs) aktiviert werden, die zu einer Verbesserung der Herzfunktion führen könnten (Prockop and Olson, 2007, Wen et al., 2011). Diskutiert wird, ob BMCs über den Mechanismus einer **Transdifferenzierung von Stammzellen zu Kardiomyozyten/Gefäßzellen** zu einer Verbesserung der kardialen Funktion führen. Einige Gruppen wiesen nach, dass eine Transdifferenzierung von HPCs zu Kardiomyozyten stattfindet (Orlic et al., 2001, Rota et al., 2007). Andere Forschungsgruppen dagegen sprechen sich für eine Transdifferenzierung in haematopoetische Zellreihen aus (Balsam et al., 2004, Murry et al., 2004). Kontrovers diskutiert wird ebenfalls die Differenzierung von MSCs in Kardiomyozyten im Maus-Modell und dem Menschen. Da einige tierexperimentelle Studien Verbesserungen der myokardialen Funktion nach Myokardischämie und MSC-Transplantation gezeigt haben (Amado et al., 2005, Toma et al., 2002), wird ihnen Potential in der Behandlung des Myokardinfarkts beim Menschen zugeschrieben. Die Verabreichung von EPCs führte ebenfalls zu einer klinischen Besserung (Katritsis et al., 2005). Auch für diese Zellart muss noch geklärt werden, ob sie zur Transdifferenzierung befähigt ist. In vitro bilden BMCs typische Sarkomere mit zentral positionierten Zellkernen

und reichlich Mitochondrien aus. Sie bewirken eine Expression von ANP (atrial natriuretic peptide) und BNP (brain natriuretic peptide) sowie kontraktilen Proteinen wie Myosin (leichte und schwere Ketten) und alpha-Aktin (Rangappa et al., 2009). 2002 wurde im Mausmodell nachgewiesen, dass transplantierte BMCs mit embryonalen **Zellen fusionieren** können (Terada et al., 2002). 2003 konnte außerdem gezeigt werden, dass BMCs in vivo mit neuronalen Progenitorzellen, Hepatozyten, Purkinjezellen und Kardiomyozyten fusionieren können. Resultat sind mehrkernige Zellen (Alvarez-Dolado et al., 2003). Offen ist, ob und in wieweit der Prozess der Fusion zur Verbesserung der kardialen Funktion beiträgt.

4.6.3 Ausblick

Die Ergebnisse der beschriebenen Studien und Metaanalysen zeigen, dass die intrakoronare Stammzelltherapie bei akutem Myokardinfarkt sicher und machbar ist. Es kam, mit Ausnahme einer Studie, in der CD133⁺ Zellen implantiert wurden (Mansour et al., 2006), zu keiner gehäuften Inzidenz von Arrhythmien, Restenosierungen oder sonstigen Komplikationen. Als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der oben (4.6.1) aufgeführten Studien werden verschiedene Punkte diskutiert (Dimmeler and Zeiher, 2008, Strauer and Steinhoff, 2011, Dimmeler and Losordo, 2011, Tongers et al., 2011). Angenommen wird, dass voneinander abweichende Zeitpunkte der Zelltransplantation und die Art der Verabreichung (insbesondere Intensität der ischämischen Präkonditionierung, unterschiedliche Anzahl verabreichter Zellen, verschiedene Zeitintervalle zwischen akutem Infarkt und Zeitpunkt der Zellapplikation), voneinander abweichende Methoden der Zellpräparation (Janssens et al., 2006, Schachinger et al., 2006, Dimmeler and Zeiher, 2008, Surder et al., 2011), unterschiedliche Patientenkollektive (Dimmeler and Zeiher, 2008) und die Bestimmungsmethoden des Erfolgs der Stammzelltherapie (Traverse et al., 2011, Nguyen et al., 2011) für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnten. Diskutiert wird ebenfalls der Langzeiterfolg der Stammzelltherapie bei Myokardinfarkt (Wollert et al., 2004, Dill et al., 2009, Meyer et al., 2009, Schaefer et al., 2010).

Nach Angabe von Dimmeler et al. sind die derzeitigen Stammzelltherapiestudien aufgrund der geringen Verbesserung der Ejektionsfraktion eher enttäuschend. In einigen Untergruppen, beispielsweise bei Patienten mit großen Infarktregionen, konnten jedoch unter anderem in der Studie REPAIR-AMI deutlichere Verbesserungen erzielt werden. Deswegen sind insbesondere für diese, mit einer klinisch schlechteren Prognose versehenen Patientenpopulation, weitere klinische Studien notwendig. Zusätzlich sollten potentere Zellen mit besserer Fähigkeit, eine

kardiale Regeneration zu bewirken, eingesetzt werden (Dimmeler and Zeiher, 2008). Ein Konzept zur Verbesserung der Stammzelltherapie ist das so genannte „Priming“ der zu verabreichenden Stammzellen vor Gabe. Dabei sollen die Funktionen Adhäsion, Transmigration, Homing, Migration, Engraftment, Überleben, Zell-Zell-Interaktionen, Reparaturkapazität und Differenzierung mittels Einsatz von Medikamenten, niedermolekularen Verbindungen, Plasmiden und epigenetischer Reprogrammierung verbessert werden (Tongers et al., 2011). Der Einsatz von Bionanotechnologien zur Schaffung eines optimalen Milieus wird ebenfalls untersucht. Biomaterialien können zur Angiogenese beitragen, das Engraftment und die Differenzierung von Stammzellen verbessern und die elektromechanische Integration der Stammzellen beschleunigen. Auch können mit Hilfe von Biomaterialien Proteine, Gene und RNA-Abschnitte zur Verbesserung der Funktion der Stammzellen zur Verfügung gestellt werden. Klinische Studien existieren auf diesem Gebiet allerdings noch nicht, da noch zu viele Fragen geklärt werden müssen (Segers and Lee, 2011, Traverse, 2012).

5 Zusammenfassung

Eine etablierte Therapieoption bei einem Myokardinfarkt ist die Durchführung einer perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA). Experimentelle und klinische Studien sowie Metaanalysen lassen vermuten, dass die intrakoronare Infusion von Bone marrow-derived cells (BMCs) zu einer Regeneration des ischämischen Myokards führen kann. Die Mechanismen, die der Rekrutierung der BMCs zugrunde liegen, sind nicht hinreichend bekannt. Mit Hilfe eines Langendorff-Modells wurden Untersuchungen zum Einfluss von Ischämie-, Reperfusionsphase und Corticosteroiden auf die Rekrutierung von Knochenmarkzellen durchgeführt.

Adulten Wistar-Furth Ratten wurde insgesamt sieben Tage morgens Methylprednisolon in Dosierungen von 0,1, 1 und 5 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Die im Anschluss isolierten Rattenherzen wurden im Langendorff-Modell einer 15-minütigen globalen Ischämie unterzogen. Nach 30-minütiger Reperfusionsphase wurden 18×10^6 fluoreszenzmarkierte, in einer Elektrolytlösung befindliche Knochenmarkzellen, die zuvor aus dem Femur isoliert wurden, intrakoronar infundiert. Die intramyokardiale Rekrutierung der Knochenmarkzellen wurde quantitativ durch Auszählung der im Effluat befindlichen Zellen bestimmt. Qualitativ erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung des reperfundierten Myokards.

In der Gruppe, in der eine 15-minütige Ischämie mit 30-minütiger Reperfusion durchgeführt wurde, zeigte sich im Vergleich zu den Gruppen, in denen nur eine Ischämie bzw. weder Ischämie noch Reperfusion eingeschaltet wurden, eine deutlich höhere Knochenmarkzell-Rekrutierungsrate (44,95% vs. 19,61% mit $p = 0,014$ vs. 17,36% mit $p = 0,016$). Die intrakoronar infundierten Zellen waren vorwiegend im myokardialen Gewebe lokalisiert. Erfolgte eine siebentägige Vorbehandlung der Ratten mit 0,1, 1 oder 5 mg Methylprednisolon pro Kilogramm Körpergewicht, war eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der Knochenmarkzell-Rekrutierung ab 1 mg/kgKG im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen (44,95% vs. 37,96% vs. 22,19% mit $p = 0,001$ vs. 20,36% mit $p < 0,001$).

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass eine erfolgreiche Rekrutierung von Knochenmarkzellen eine Ischämie des Myokards mit anschließender Reperfusionsphase erfordert. Corticosteroide vermindern die Rekrutierung dosisabhängig signifikant.

6 Anhang

6.1 Zusammenfassung englisch

Coronary reperfusion with percutaneous coronary intervention (PCI) improves outcomes in patients with acute myocardial infarction. Recent experimental and clinical trials as well as meta-analysis suggest that intracoronary infusion of bone marrow-derived cells (BMCs) contribute to regeneration of ischemic myocardium. The mechanism by which the ischemic heart recruits BMCs from the blood is unknown. We examined the influence of ischemia, reperfusion and corticosteroids on the recruitment of BMCs applying a Langendorff-heart preparation.

Adult Wistar Rats were treated for seven days in the morning with methylprednisolone in a dosage of 0,1, 1 and 5 mg/kg body weight intraperitoneally. The isolated hearts were subjected to 15 min global no-flow ischemia in the Langendorff-heart preparation model. Following 30 min of reperfusion there were injected 18×10^6 fluorescence labelled BMCs intracoronary, isolated from the femur of adult rats. Intracardial trapping of BMCs was evaluated quantitatively by cell counts in the coronary effluent as well as qualitatively by fluorescence-microscopy of the reperfused myocardium.

Compared to non-ischemic hearts and hearts with ischemia not followed by reperfusion markedly increased number of BMCs were recruited into ischemic hearts (17,36% vs. 44,95%, $p = 0,016$; 44,95% vs. 19,61%, $p = 0,014$). The trapped BMCs predominantly were localized in the myocardial tissue, with only few cells found within the coronary vasculature. A seven day pre-treatment with 0,1, 1 or 5 mg/kg body weight methylprednisolone revealed a dosage-related significant reduction in BMC-recruitment compared to control (37,96% vs. 44,95%, $p > 0,05$; 22,19% vs. 44,95%, $p = 0,001$; 20,36% vs. 44,95%, $p < 0,001$).

The results of this experimental study suggest that for a successful recruitment of BMCs ischemia of the myocardium and reperfusion are essential. Corticosteroids influence the recruitment of the BMCs in a dose dependent manner significantly.

6.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Erweitertes mehrstufiges Modell der Leukozytenadhäsionskaskade.
- Abbildung 2: Chemische Strukturformel des Methylprednisolons.
- Abbildung 3: Genomische Glucocorticoidwirkung.
- Abbildung 4: Direkte Gentranskriptionsförderung (trans-activation).
- Abbildung 5: Direkte Gentranskriptionshemmung (cis-repression).
- Abbildung 6: Indirekte Gentranskriptionshemmung (trans-repression).
- Abbildung 7: Konkurrenz (competition).
- Abbildung 8: Nicht genomische Glucocorticoidwirkungen.
- Abbildung 9: Modifiziertes Langendorff-Modell.
- Abbildung 10-13: Zeitliche Abfolge des Versuchs.
- Abbildung 14: Arithmetisches Mittel der Creatinkinase (Isoenzyme CK und CK-MB)
- Abbildung 15-17: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Gewebeschnitte
- Abbildung 18: Versuchsreihe I (Verumgruppe), Dosierung des Methylprednisolons 0,1 mg/kgKG.. Rekrutierte Zellen, Angabe in %.
- Abbildung 19: Versuchsreihe II (Verumgruppe), Dosierung des Methylprednisolons 1 mg/kgKG.. Rekrutierte Zellen, Angabe in %.
- Abbildung 20: Versuchsreihe III (Verumgruppe), Dosierung des Methylprednisolons 5 mg/kgKG.. Rekrutierte Zellen, Angabe in %.
- Abbildung 21: Versuchsreihe IV (keine Vorbehandlung, 15 Minuten Ischämie, keine Reperfusion). Rekrutierte Zellen, Angabe in %.
- Abbildung 22: Versuchsreihe V (keine Vorbehandlung, keine Ischämie, keine Reperfusion). Rekrutierte Zellen, Angabe in %.
- Abbildung 23: Versuchsreihe VI (Kontrollgruppe), keine Vorbehandlung. Rekrutierte Zellen, Angabe in %.

-
- Abbildung 24: Versuchsreihe VII (Placebogruppe), Aqua ad iniectabilia 1 ml/kgKG. Rekrutierte Zellen, Angabe in %.
- Abbildung 25: Darstellung der Versuchsreihen I, II, III, IV, V, VI und VII als Boxplot-Grafik mit Mittelwerten und Standardabweichung.
- Abbildung 26: Statistischer Vergleich zwischen Kontroll- (IV) und Placebogruppe (VII). Darstellung als Boxplot.
- Abbildung 27: Statistischer Vergleich zwischen Kontrollgruppe (VI) und Gruppe mit Ischämieinduktion ohne Nachschaltung einer Reperfusionphase (IV). Darstellung als Boxplot.
- Abbildung 28: Statistischer Vergleich zwischen Kontrollgruppe (VI) und Gruppe ohne Ischämieinduktion und Reperfusion (V). Darstellung als Boxplot. * Signifikanz ($p < 0,05$).
- Abbildung 29: Verum-Gruppen I (0,1 mg/kgKG), II (1 mg/kgKG), III (5 mg/kgKG) im Vergleich zur Kontrollgruppe VI. Signifikanzen nach Berechnung im Dunnet-T-Test. Darstellung als Boxplot.
- Abbildung 30: Verum-Gruppen I (0,1 mg/kgKG), II (1 mg/kgKG), III (5 mg/kgKG) im Vergleich zu VII. Signifikanzen nach Berechnung im Dunnet-T-Test. Darstellung als Boxplot.
- Abbildung 31: Zeitliche Abfolge des Versuchs.
- Abbildung 32: Übersicht zur Struktur von Adhäsionsmolekülen.

6.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: MP = Methylprednisolon, kg = Kilogramm, KG = Körpergewicht, d = Tag.
- Tabelle 2: Arithmetisches Mittel und Standardabweichung der CK- und CK-MB-Bestimmungen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Versuchsdurchführung.
- Tabelle 3: Versuchsreihe I. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.
- Tabelle 4: Versuchsreihe II. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.
- Tabelle 5: Versuchsreihe III. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.
- Tabelle 6: Versuchsreihe IV. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.
- Tabelle 7: Versuchsreihe V. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.
- Tabelle 8: Versuchsreihe VI. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.
- Tabelle 9: Versuchsreihe VII. \bar{x} = arithmetisches Mittel, σ = Standardabweichung.
- Tabelle 10: Verzeichnis der verwendeten Geräte und Labormaterialien
- Tabelle 11: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Medikamente
- Tabelle 12: Verzeichnis der verwendeten Hard- und Software
- Tabelle 13: Unterteilung der Zytokine nach Girm et al. Abkürzung: IL = Interleukin
- Tabelle 14: Parakrin/autokrin wirkende Faktoren, die bei Transplantation von Stammzellen im Rahmen einer myokardialen Ischämie ausgeschüttet werden.
- Tabelle 15: Parakrin/autokrin wirkende Faktoren, die bei Transplantation von Stammzellen im Rahmen einer myokardialen Ischämie von kardialen Zellen ausgeschüttet werden.
- Tabelle 16: Adhäsionsmoleküle mit entsprechenden Liganden, die für das Homing von Leukozyten und Stamm-/Progenitorzellen wichtig sind

Tabelle 17:	Auf Progenitor-/Stammzellen exprimierte Integrine und deren dazugehörige, auf dem Endothel oder in der Matrix lokalisierte Liganden, die eine Rolle im Rahmen des Homings spielen.
Tabelle 18:	Verzeichnis der zu entsprechenden Phasen der Leukozyten-/BMC-Adhäsionskaskade wichtigen Moleküle
Tabelle 19:	Tabellarische Übersicht über den Einfluss von Glucocorticoiden auf verschiedener Moleküle und Rezeptoren

6.4 Materialien

Geräte und Labormaterialien

Gerät / Labormaterial	Hersteller	Stadt, Land	
Blutentnahme			
Mikro-Probengefaß, Lithium-Heparin (1,3 ml)	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht	D
BD Microlance 3 - Kanüle (0,45x13 mm)	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg	D
Methylprednisolon – Vorbereitung und Injektion			
BD Microlance 3 - Kanüle (0,45x13 mm)	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg	D
Einmalspritze	B. Braun Melsungen AG	Melsungen	D
Eppendorfgefaß	Eppendorf AG	Hamburg	D
Waage 30/160 g (0,01/0,1 mg)	Sartorius AG	Göttingen	D
Waage Kern 440-47 (0,1g; 1200g)	Kern & Sohn GmbH	Frommern	D
Zellisolation			
Cleanbench LaminAir HB 2472	Heraeus Instruments GmbH	Hanau	D
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH	Hanau	D
BD Microlance 3 – Kanülen (0,9 x 40; 0,6 x 30; 0,45 x 13 mm)	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg	D
Deckgläser 24 x 50 mm #1	Menzel-Gläser, Menzel GmbH & CoKG	Braunschweig	D
Einmalspritze (2, 5, 10 ml)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen	D
Ficoll-Röhrchen	Amersham Biosciences GmbH	Freiburg	D
Greiner Röhrchen (15, 50 ml)	Greiner BioOne	Frickenhausen	D
Perfusorspritze	B. Braun Melsungen AG	Melsungen	D
Polypropylen-Röhrchen (14 ml)	Greiner BioOne	Frickenhausen	D
Pipette Easypet	Eppendorf AG	Hamburg	D
Pipette: Falcon (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg	D
Pipetman	Gilson Intern. B.V.	Den Haag	N
Vortex-Schüttler VF2	IKA®-Werke GmbH &	Staufen	D

Gerät / Labormaterial	Hersteller	Stadt, Land	
	CO.KG		
Wärmebad, Heizspirale	Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach	D
Zentrifuge: Centrifuge 5417R	Eppendorf AG	Hamburg	D
Zentrifuge: Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments GmbH	Hanau	D
Zellzählung			
Fluoreszenzlampe 50 W	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar	D
Mikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar	D
Objektträger (76 x 26 mm/3 x 1 inch)	Menzel-Gläser, Menzel GmbH & CoKG	Braunschweig	D
Zählkammer nach Neubauer, Tiefe 0,1mm, Fläche 0,0025mm ²	LO – Laboroptik GmbH	Bad Homburg	D
OP-Femur- und Herzentnahme			
Faden	Johnson & Johnson Medical GmbH	Norderstedt	D
Krokodilklemme	Aesculap AG	Tuttlingen	D
Nierenschale	Aesculap AG	Tuttlingen	D
Pinzetten (OCO86R; OC12)	Aesculap AG	Tuttlingen	D
Schere	Aesculap AG	Tuttlingen	D
Skalpelli	Feather Safety Razor CO., LTD.	Osaka	J
Langendorff-Modell			
Glasbehälter verschiedener Größen	VWR International GmbH	Darmstadt	D
Latex Ballon, Größe 4 (inneres Volumen: 0,06 ml)	Hugo Sachs Elektronik GmbH	March-Hugstetten	D
Thermostat Julabo UC	Julabo Labortechnik GmbH	Seelbach	D
Infusionssysteme/-bestecke	B. Braun Melsungen AG	Melsungen	D
Roller-Pumpe MS Reglo	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH	Wertheim- Mondfeld	D
Einmalspritze	B. Braun Melsungen AG	Melsungen	D
BD Microlance 3 – Kanülen (0,45 x 13 mm)	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg	D

Gerät / Labormaterial	Hersteller	Stadt, Land	
HSE Druckeichgerät Typ 367	Hugo Sachs Elektronik GmbH	March-Hugstetten	D
Blutgasanalysegerät ABL 330	Radiometer GmbH	Willich	D
BMT 921 Onkometer	Dr. Karl Thomae	Biberach	D
Mikro-Osmometer	Roebbling Messtechnik	Berlin	D
Herzschnitte/Immunhistochemie			
Parafilm "M"	American National Can Group	Chicago	US
Fluoreszenzmikroskop BX60	Olympus	Hamburg	D
Hitachi KP-M1E/K	Hitachi Denshi Europe	Garforth	UK
Mikrotom Kryostat CM1900	Leica Microsystems GmbH	Wetzlar	D

Tabelle 10: Verzeichnis der verwendeten Geräte und Labormaterialien

Chemikalien und Medikamente

Substanz	Hersteller	Stadt, Land	
Aqua ad iniectabilia	Baxter Deutschland GmbH	Unterschleißheim	D
DAPI (4', 6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim	D
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (1x) (PBS)	PAA Laboratories GmbH	Pasching	A
Fetales Kalbsserum	Seromed Biochrom KG	Berlin	D
Ficoll Paque™ Plus	Amersham Biosciences GmbH	Freiburg	D
Heparin (Liquemin©)	Roche AG	Grenzbach-Wyhlen	D
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH	Unterschleißheim	D
Isotone Kochsalzlösung	Baxter Deutschland GmbH	Unterschleißheim	D
Ketamin (Ketanest©)	Pfizer Pharma GmbH,	Karlsruhe	D
Macrophagen-SFM Medium GIBCO	Invitrogen Corporation	Karlsruhe	D
NaHCO ₃ 8,4 %	B. Braun Melsungen AG	Melsungen	D
NaHCO ₃	Baxter Deutschland GmbH	Unterschleißheim	D
Penicillin/Streptomycin GIBCO	Invitrogen Corporation	Paisley	UK
Perfusat	Serag-Wiessner KG	Naila	D

PKH26 Red Phagocytotic Cell Linker (PCL) Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München	D
Propidium Iodid	Molecular Probes Europe BV	Leiden	N
Tissue Tek®	Sakura Finetek Europe B.V.	Zoeterwoude	N
Trypanblau, Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	D
Urbason soluble forte (MP)	Sanofi-Aventis Deutschl. GmbH	FFM	D
Xylazinhydrochlorid (RompunTS®)	Bayer Vital GmbH	Leverkusen	D

Tabelle 11: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Medikamente

Hard- und Software

Hardware	Hersteller	Stadt, Land	
MacLab/8	ADInstruments GmbH	Spechbach	D
Power Macintosh 7200/90	Apple Inc.	Cupertino	US
Amplifier (2-Kanal-Brücken-Verstärker, Typ 303)	Hugo Sachs	March-Hugstetten	D
Software			
Chart v 4.2.3	ADInstruments GmbH	Spechbach	D
Scope v 3.7	ADInstruments GmbH	Spechbach	D
SPSS Statistics 17.0	SPSS GmbH Software	München	D

Tabelle 12: Verzeichnis der verwendeten Hard- und Software

6.5 Übersichtstabellen

Zytokinfamilie		
IL-2/IL-2 Familie	Tumornekrosefaktor (TNF) Familie	Transforming growth factor (TGF)- β Familie
IL-6/IL12 Familie	IL-10 Familie	Chemokin Familie
Interferon- α/β Familie	Interleukin-1 Familie	

Tabelle 13: Unterteilung der Zytokine nach Girn et al. Abkürzung: IL = Interleukin

Stammzelltyp	Ausgeschüttete Faktoren
BM-MNCs	VEGF, bFGF, Ang-1, IL-1 β , TNF- α
BMSCs (HSCs und MSCs)	VEGF, bFGF, IGF, SDF-1, Akt, eNOS
MSCs	VEGF, bFGF, Ang-1, IL-1, SDF-1, PIGF, MCP-1, FGF-7, IL-6, TGF- β , PDGF, PA, MMP-9, TB4, Sfrp, Tenacin C, Thrombospondin-1
MAPCs	VEGF, MCP-1, TGF- β , PDGF-BB
Multipotent BM-derived cells (non-HSCs und non-MSCs)	VEGF, bFGF, Ang-1, Ang-2, IGF-1, SDF-1 α , PDGF-B, HGF
EPCs	VEGF-A, VEGF-B, FGF-2, Ang-1, SDF-1, IGF-1, FGF-2, HGF
PB-MNCs	VEGF, HGF, GM-CSF, G-CSF

Tabelle 14: Parakrin/autokrin wirkende Faktoren, die bei Transplantation von Stammzellen im Rahmen einer myokardialen Ischämie ausgeschüttet werden. BM-MNCs = bone marrow mononuclear cells, BMSCs = bone marrow stem cells, HSCs = haematopoietic stem cells, MSCs = mesenchymal stem cells, MAPCs = multipotent adult progenitor cells, PB-MNCs = peripheral blood mononuclear cells, EPCs = endothelial progenitor cells, VEGF = vascular endothelial growth factor, FGF = fibroblast growth factor, Ang = angiopoietin, PIGF = placental growth factor, HGF = hepatocyte growth factor, IGF = insulin growth factor, PDGF = platelet-derived growth factor, SDF = stromal cell-derived factor, IL = interleukin, MCP-1 = monocyte chemoattractant protein-1, TNF = tumor necrosis factor, TGF = transforming growth factor, AM = adrenomedullin, PA = plasminogen activator, Sfrp = secreted frizzled related protein, TB4 = thymosin beta 4, MMP = matrix metalloproteinase, TIMP = tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (Burchfield and Dimmeler, 2008).

Faktoren, die von kardialen Zellen hochreguliert/ausgeschüttet werden						
VEGF-A	PIGF	IL-1 β	Bax	Elastin	Type I collagen	Phosphocreatine ATP
FGF-2	HGF	MCP-1	Bcl-2	Myocardin	Type 3 collagen	Creatine kinases
Ang-1	IGF-1	TNF- α		DNA-damage inducible transcript 3		Mito ATPase- β
Ang-2	PDGF-B SDF-1	IL-6				

Tabelle 15: Parakrin/autokrin wirkende Faktoren, die bei Transplantation von Stammzellen im Rahmen einer myokardialen Ischämie von kardialen Zellen ausgeschüttet werden (Burchfield and Dimmeler, 2008). Abkürzungen siehe Tabelle 14.

Adhäsionsmolekül	CD	Expressionsort	Ligand/Rezeptor
Selektine			
L(leukocyte)-Selektin	CD62L	Leukozyten	Sialyl Lewis (x), PSGL-1, GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1
E(endothelial)-Selektin	CD62E	Endothelzellen	Sialyl Lewis (x), PSGL-1, CD 44,

Adhäsionsmolekül	CD	Expressionsort	Ligand/Rezeptor
			ESL-1
P(platelet)-Selektin	CD62P	Endothelzellen, Thrombozyten	Sialyl Lewis (x), PSGL-1
Integrine			
<u>β1-Integrin (CD29)</u>			
VLA-4 (α4β1)	CD49d/ CD29	Monozyten, Lymphozyten	VCAM-1, MAdCAM-1, Fibronectin, JAM-C
<u>β2-Integrine (CD18)</u>			
LFA-1 (αLβ2)	CD11a/CD18	Leukozyten, Progenitorzellen	ICAM-1, -2, -3, JAM-A
Mac-1 (αMβ2)	CD11b/CD18	Monozyten, Neutrophile, Progenitorzellen	ICAM-1, iC3b, Faktor X, Fibrinogen, JAM-B, RAGE
P150/95 (αXβ2)	CD11c/CD18	Monozyten, Neutrophile, Progenitorzellen	ICAM-1, iC3b, Fibrinogen
αDβ2	CD11d/CD18		ICAM-3, VCAM-1
<u>β7-Integrine</u>			
α4β7		Lymphozyten	VCAM-1, MAdCAM-1
Immunglobulin Superfamilie			Binden an Integrine

Adhäsionsmolekül	CD	Expressionsort	Ligand/Rezeptor
ICAM-1	CD54	Endothelzellen, Leukozyten, Epithelzellen, Fibroblasten, andere Zelllinien	CD 11a, CD 11b, CD 11c, CD 18- positive Lymphozyten, Granulo- zyten und Monozyten
ICAM-2	CD102	Endothelzellen	CD 11a, CD 18-positive Lympho- zyten, Granulozyten und Mono- zyten
ICAM-3	CD50	Leukozyten	LFA-1
VCAM-1	CD106	Endothelzellen, glatte Muskelzellen	$\chi 4\beta 1$, $\chi 4\beta 7$
MadCAM-1			$\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$
PECAM-1	CD31	Endothelzellen, Leukozyten, Thrombozyten	Thrombozyten, CD31-positive Zellen, (kontrolliert mit sich selbst)
<u>Mucin-like</u>			
PSGL-1 (mucin like)	CD162	Leukozyten	L-, E-, P-Selektin
Sonstige Glykoproteine			
GlyCAM-1	CD34		
sialyl-Lewis (A)			
sialyl-Lewis (X)	sCD15		

Tabelle 16: Adhäsionsmoleküle mit entsprechenden Liganden, die für das Homing von Leukozyten und Stamm-/Progenitorzellen wichtig sind. CD = Cluster of differentiation, LFA = lymphocyte function-associated antigen, Mac = macrophage, VLA = very late antigen, ICAM = intercellular adhesion molecule, VCAM = vascular cell adhesion molecule, MadCAM = mucosal addressin cell adhesion molecule, PECAM = platelet/endothelial adhesion molecule, GlyCAM = glycosylation-dependent cell adhesion molecule, PSGL = P-selectin glycoprotein ligand (von Andrian, 2000, Garrood et al., 2006, Chavakis et al., 2008).

Integrine (Expression auf Progenitor-/Stammzellen)		Dazugehörige Liganden (Expression auf Endothel und Matrixkomponenten)
<u>β1-Integrine (CD29)</u>		
CD49d/CD29 (α4β1, VLA-4)	↔	VCAM-1, Fibronectin
<u>β2-Integrine (CD18)</u>		
CD11a/CD18 (αLβ2, LFA-1)	↔	ICAM-1, -2, -3, JAM-A
CD11b/CD18 (αMβ2, Mac-1)	↔	ICAM-1, JAM-C, RAGE, Fibrinogen, Koagulationsfaktor X, iC3b
CD11c/CD18 (αxβ2, p150,95)	↔	ICAM-1, Fibrinogen

Tabelle 17: Auf Progenitor-/Stammzellen exprimierte Integrine und deren dazugehörige, auf dem Endothel oder in der Matrix lokalisierte Liganden, die eine Rolle im Rahmen des Homings spielen (Chavakis et al., 2008).

Phase der Leukozytenadhäsion	Zur angegebenen Phase wichtige Moleküle
Capturing/Rolling	CD62L, PSGL-1, ESL-1, (SLe-X)
	GlyCAM-1, CD62P, CD62E
	CD34, MAdCAM-1
Activation	C5a-fMLP-PAF, Chemokine und deren Rezeptoren
	Chemokine (IL-8, MCP-1, Eotaxin), PAF, CD62E, PECAM-1

Phase der Leukozytenadhäsion	Zur angegebenen Phase wichtige Moleküle
Adhesion	β 1-, β 2-, β 7-Integrine, ICAM-1 und -2, VCAM-1, MAdCAM-1
Transmigration	PECAM-1
	β 1-, β 2-, β 7-Integrine, PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1

Tabelle 18: Verzeichnis der zu entsprechenden Phasen der Leukozyten-/BMC-Adhäsionskaskade wichtigen Moleküle (Pitzalis et al., 2002)

Mechanismus	Beeinflusste Moleküle und Rezeptoren
trans-activation (genomisch) (Barnes, 2006, Lowenberg et al., 2008)	Annexin-1 (Lipocortin-1, Phospholipase A2-Inhibitor), I κ B- α (Inhibitor von NF- κ B), physiologischer Proteaseninhibitor SLPI (serum leukoprotease inhibitor), Clara Cell Protein 10 (CC10), IL-1 Rezeptorantagonist, IL-1 Rezeptor Typ II, IL-10, GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper protein), neurale Endopeptidase und mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) Phosphatase-1 (MKP-1)
cis-repression (genomisch) (Stahn et al., 2007).	Hemmung der Transkription von: IL-1 und -2
trans-repression (genomisch) (Barnes, 2006, De Bosscher and Haegeman, 2009):	Verminderte Produktion von: <u>Zytokine</u> : IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, IL-17, IL-18, TNF α , GM-CSF, SCF. <u>Chemokine</u> : IL-8, RANTES, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3, MCP-4, Eotaxin. <u>Adhäsionsmoleküle</u> : ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin. <u>Inflammatorische Enzyme</u> : iNOS, COX-2, zytoplasmatische Phospholipase A ₂ (cPLA2). <u>Inflammatorische Rezeptoren</u> : Tachykinin NK1-Rezeptor, NK2-Rezeptor, Bradykinin B2-Rezeptor. <u>Peptide</u> : Endothelin
competition (genomisch) (Almawi and Melemedjian, 2002)	AP-1 und NF- κ B

posttranskriptionelle Wirkungen (Barnes, 2006, Clark, 2007).	TNF, IL-5, IL-6, IL-1 α und IL-1 β und verschiedene Chemokine
„nicht-genomische“ Mechanismen (Lowenberg et al., 2008).	Veränderungen inflammatorischer Signaltransduktionskaskaden (z.B. MAPK), des zellulären Calciumeinstroms, neutrophiler Degranulation, Phagozytose durch Makrophagen, zellulärer Adhäsion und Veränderungen des Aktinzytoskeletts verantwortlich

Tabelle 19: Tabellarische Übersicht über den Einfluss von Glucocorticoiden auf verschiedener Moleküle und Rezeptoren

6.6 Publikationsverzeichnis

Die vorliegende Studie wurde im Februar 2006 auf der 50. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH) in Basel vorgestellt:

I. Sequeira, M. Kathes, K. Schweitzer, C. Neuhof, B. Parviz, H. Tillmann, H. Muth, H. Hölschermann

Justus-Liebig-Universität Gießen (Gießen, Deutschland)

Englischer Titel:

Methylprednisolone prevents recruitment of bone marrow-derived cells (BMCs) into ischemic myocardium

Deutscher Titel:

Methylprednisolon vermindert die Rekrutierung von Knochenmarkzellen (BMCs) in ischämisches Myokard

6.7 Erklärung zur Durchführung der Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

6.8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans Hölschermann sowie Frau Dr. med. Indira Sequeira für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit. Außerdem möchte ich Kathrin Purnhagen für die tolle Zusammenarbeit während der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit im Labor danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den medizinisch technischen Angestellten des Labors für experimentelle Kardiologie und vaskuläre Medizin, allen voran der Leiterin Frau Benoush Parviz, für die Unterstützung in technischen Fragen und die schöne Zusammenarbeit bedanken.

Ebenso danken möchte ich allen Doktoranden unserer Arbeitsgruppe für den kollegialen Umgang miteinander; außerdem dafür, dass sie mir bei der Erlernung wichtiger labortechnischer Verfahren stets zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Elisabeth und Torsten Kath, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben und jederzeit wichtige Ansprechpartner bei allen möglichen Fragen waren. Außerdem möchte ich auch meinen beiden Geschwistern Friederike und Jakob danken, die mir insbesondere während der Erstellung des schriftlichen Teils der Arbeit stets beratend zur Seite standen.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

6.10 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, J. D., HUANG, Y., LIU, D., HICKEY, R., KRAUSE, D. S. & GIORDANO, F. J. (2004) Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, 110, 3300-5.
- ABDEL-LATIF, A., BOLLI, R., TLEYJEH, I. M., MONTORI, V. M., PERIN, E. C., HORNUNG, C. A., ZUBA-SURMA, E. K., AL-MALLAH, M. & DAWN, B. (2007) Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*, 167, 989-97.
- ABU-AMARA, M., YANG, S. Y., TAPURIA, N., FULLER, B., DAVIDSON, B. & SEIFALIAN, A. (2011) Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl*, 16, 1016-32.
- AKTORIES, K., FÖRSTERMANN, U., HOFMANN, F. B., STARKE, K. (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
- ALMAWI, W. Y. & MELEMEDJIAN, O. K. (2002) Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol*, 71, 9-15.
- ALVAREZ-DOLADO, M., PARDAL, R., GARCIA-VERDUGO, J. M., FIKE, J. R., LEE, H. O., PFEFFER, K., LOIS, C., MORRISON, S. J. & ALVAREZ-BUYLLA, A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425, 968-73.
- AMADO, L. C., SALIARIS, A. P., SCHULERI, K. H., ST JOHN, M., XIE, J. S., CATTANEO, S., DURAND, D. J., FITTON, T., KUANG, J. Q., STEWART, G., LEHRKE, S., BAUMGARTNER, W. W., MARTIN, B. J., HELDMAN, A. W. & HARE, J. M. (2005) Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11474-9.
- ANVERSA, P., LERI, A. & KAJSTURA, J. (2006) Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol*, 47, 1769-76.
- ASSMUS, B., HONOLD, J., SCHACHINGER, V., BRITTEN, M. B., FISCHER-RASOKAT, U., LEHMANN, R., TEUPE, C., PISTORIUS, K., MARTIN, H., ABOLMAALI, N. D., TONN, T., DIMMELER, S. & ZEIHNER, A. M. (2006a) Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355, 1222-32.
- ASSMUS, B., ROLF, A., ERBS, S., ELSASSER, A., HABERBOSCH, W., HAMBRECHT, R., TILLMANN, H., YU, J., CORTI, R., MATHEY, D. G., HAMM, C. W., SUSELBECK, T., TONN, T., DIMMELER, S., DILL, T., ZEIHNER, A. M. & SCHACHINGER, V. (2010a) Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail*, 3, 89-96.
- ASSMUS, B., SCHACHINGER, V., TEUPE, C., BRITTEN, M., LEHMANN, R., DOBERT, N., GRUNWALD, F., AICHER, A., URBICH, C., MARTIN, H., HOELZER, D., DIMMELER, S. & ZEIHNER, A. M. (2002) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 106, 3009-17.

-
- ASSMUS, B., SCHACHINGER, V. & ZEIHNER, A. M. (2006b) [Regenerative therapy in cardiology: how distant is it from reality?]. *Internist (Berl)*, 47, 1177-82.
- ASSMUS, B., TONN, T., SEEGER, F. H., YOON, C. H., LEISTNER, D., KLOTSCHKE, J., SCHACHINGER, V., SEIFRIED, E., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. (2010b) Red blood cell contamination of the final cell product impairs the efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy. *J Am Coll Cardiol*, 55, 1385-94.
- BAKER, M. (2009) State of the stem cell. *Nature Reports Stem Cells*.
- BALSAM, L. B., WAGERS, A. J., CHRISTENSEN, J. L., KOFIDIS, T., WEISSMAN, I. L. & ROBBINS, R. C. (2004) Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 428, 668-73.
- BANZ, Y. & RIEBEN, R. (2011) Role of complement and perspectives for intervention in ischemia-reperfusion damage. *Ann Med*.
- BARNES, P. J. (2006) Corticosteroids: the drugs to beat. *Eur J Pharmacol*, 533, 2-14.
- BARTHOLOME, B., SPIES, C. M., GABER, T., SCHUCHMANN, S., BERKI, T., KUNKEL, D., BIENERT, M., RADBRUCH, A., BURMESTER, G. R., LAUSTER, R., SCHEFFOLD, A. & BUTTGEREIT, F. (2004) Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *Faseb J*, 18, 70-80.
- BASSAND, J. P. & HAMM, C. (2007) New European guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction--what are the new and key messages. *Pol Arch Med Wewn*, 117, 391-3.
- BECKER, L. B. (2004) New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res*, 61, 461-70.
- BEITNES, J. O., GJESDAL, O., LUNDE, K., SOLHEIM, S., EDVARDSEN, T., ARNESEN, H., FORFANG, K. & AAKHUS, S. (2009) Left ventricular systolic and diastolic function improve after acute myocardial infarction treated with acute percutaneous coronary intervention, but are not influenced by intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: a 3 year serial echocardiographic sub-study of the randomized-controlled ASTAMI study. *Eur J Echocardiogr*, 12, 98-106.
- BEVILACQUA, M. P., STENGELIN, S., GIMBRONE, M. A., JR. & SEED, B. (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 243, 1160-5.
- BITTNER, R. E., SCHOFER, C., WEIPOLTSHAMMER, K., IVANOVA, S., STREUBEL, B., HAUSER, E., FREILINGER, M., HOGER, H., ELBE-BURGER, A. & WACHTLER, F. (1999) Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)*, 199, 391-6.
- BOERSMA, E., HARRINGTON, R. A., MOLITERNO, D. J., WHITE, H., THEROUX, P., VAN DE WERF, F., DE TORBAL, A., ARMSTRONG, P. W., WALLENTIN, L. C., WILCOX, R. G., SIMES, J., CALIFF, R. M., TOPOL, E. J. & SIMOONS, M. L. (2002) Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials. *Lancet*, 359, 189-98.
- BONAROS, N., SONDERMEIJER, H., SCHUSTER, M., RAUF, R., WANG, S. F., SEKI, T., SKERRETT, D., ITESCU, S. & KOCHER, A. A. (2008) CCR3- and CXCR4-mediated interactions regulate migration of CD34+ human bone marrow progenitors

-
- to ischemic myocardium and subsequent tissue repair. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 136, 1044-53.
- BRUNNER, S., WINOGRADOW, J., HUBER, B. C., ZARUBA, M. M., FISCHER, R., DAVID, R., ASSMANN, G., HERBACH, N., WANKE, R., MUELLER-HOECKER, J. & FRANZ, W. M. (2009) Erythropoietin administration after myocardial infarction in mice attenuates ischemic cardiomyopathy associated with enhanced homing of bone marrow-derived progenitor cells via the CXCR-4/SDF-1 axis. *Faseb J*, 23, 351-61.
- BURCHFIELD, J. S. & DIMMELER, S. (2008) Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 1, 4.
- BUTTGEREIT, F., SAAG, K. G., CUTOLO, M., DA SILVA, J. A. & BIJLSMA, J. W. (2005) The molecular basis for the effectiveness, toxicity, and resistance to glucocorticoids: focus on the treatment of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 34, 14-21.
- BUTTGEREIT, F. & SCHEFFOLD, A. (2002) Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*, 67, 529-34.
- BUTTGEREIT, F., STRAUB, R. H., WEHLING, M. & BURMESTER, G. R. (2004) Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum*, 50, 3408-17.
- BYWATERS, E. G. & BEALL, D. (1941) Crush Injuries with Impairment of Renal Function. *Br Med J*, 1, 427-32.
- CADENAS, S., ARAGONES, J. & LANDAZURI, M. O. (2010) Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*, 88, 219-28.
- CAVALCANTI, D. M., LOTUFO, C. M., BORELLI, P., FERREIRA, Z. S., MARKUS, R. P. & FARSKY, S. H. (2007) Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br J Pharmacol*, 152, 1291-300.
- CHAN, R. K., AUSTEN, W. G., JR., IBRAHIM, S., DING, G. Y., VERNA, N., HECHTMAN, H. B. & MOORE, F. D., JR. (2004) Reperfusion injury to skeletal muscle affects primarily type II muscle fibers. *J Surg Res*, 122, 54-60.
- CHARMANDARI, E., KINO, T., CHROUSOS, G. (2004) Molecular Mechanisms of Glucocorticoid Action. *orpha.net*.
- CHARWAT, S., GYONGYOSI, M., LANG, I., GRAF, S., BERAN, G., HEMETSBERGER, R., NYOLCZAS, N., SOCHOR, H. & GLOGAR, D. (2008) Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art. *Exp Hematol*, 36, 672-80.
- CHAVAKIS, E., AICHER, A., HEESCHEN, C., SASAKI, K., KAISER, R., EL MAKHFI, N., URBICH, C., PETERS, T., SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K., ZEIHNER, A. M., CHAVAKIS, T. & DIMMELER, S. (2005) Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med*, 201, 63-72.
- CHAVAKIS, E. & DIMMELER, S. (2012) Homing of progenitor cells to ischemic tissues. *Antioxid Redox Signal*, 15, 967-80.
- CHAVAKIS, E., KOYANAGI, M. & DIMMELER, S. (2010) Enhancing the outcome of cell therapy for cardiac repair: progress from bench to bedside and back. *Circulation*, 121, 325-35.

-
- CHAVAKIS, E., URBICH, C. & DIMMELER, S. (2008) Homing and engraftment of progenitor cells: a prerequisite for cell therapy. *J Mol Cell Cardiol*, 45, 514-22.
- CIDLOWSKI, J. A., BELLINGHAM, D. L., POWELL-OLIVER, F. E., LUBAHN, D. B. & SAR, M. (1990) Novel antipeptide antibodies to the human glucocorticoid receptor: recognition of multiple receptor forms in vitro and distinct localization of cytoplasmic and nuclear receptors. *Mol Endocrinol*, 4, 1427-37.
- CLARK, A. R. (2007) Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol*, 275, 79-97.
- COOK, M. M., KOLLAR, K., BROOKE, G. P. & ATKINSON, K. (2009) Cellular therapy for repair of cardiac damage after acute myocardial infarction. *Int J Cell Biol*, 2009, 906507.
- CRONSTEIN, B. N., KIMMEL, S. C., LEVIN, R. I., MARTINIUK, F. & WEISSMANN, G. (1992) A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 9991-5.
- CROXTALL, J. D., CHOUDHURY, Q. & FLOWER, R. J. (2000) Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br J Pharmacol*, 130, 289-98.
- DE BOSSCHER, K. & HAEGEMAN, G. (2009) Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol*, 23, 281-91.
- DE VRIES, B., WALTER, S. J., WOLFS, T. G., HOICHEPIED, T., RABINA, J., HEERINGA, P., PARKKINEN, J., LIBERT, C. & BUURMAN, W. A. (2004) Exogenous alpha-1-acid glycoprotein protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of inflammation and apoptosis. *Transplantation*, 78, 1116-24.
- DIEPENHORST, G. M., VAN GULIK, T. M. & HACK, C. E. (2009) Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies. *Ann Surg*, 249, 889-99.
- DILL, T., SCHACHINGER, V., ROLF, A., MOLLMANN, S., THIELE, H., TILLMANN, H., ASSMUS, B., DIMMELER, S., ZEIHNER, A. M. & HAMM, C. (2009) Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am Heart J*, 157, 541-7.
- DIMMELER, S. & LOSORDO, D. (2011) Stem cells review series: an introduction. *Circ Res*, 109, 907-9.
- DIMMELER, S. & ZEIHNER, A. M. (2008) Cell Therapy of Acute Myocardial Infarction: Open Questions. *Cardiology*, 113, 155-160.
- DITTMAR, K. D., BANACH, M., GALIGNIANA, M. D. & PRATT, W. B. (1998) The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J Biol Chem*, 273, 7358-66.
- DITTMAR, K. D., DEMADY, D. R., STANCATO, L. F., KRISHNA, P. & PRATT, W. B. (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based

-
- chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor.hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. *J Biol Chem*, 272, 21213-20.
- DONNDORF, P., KUNDT, G., KAMINSKI, A., YEREBAKAN, C., LIEBOLD, A., STEINHOFF, G. & GLASS, A. (2010) Intramyocardial bone marrow stem cell transplantation during coronary artery bypass surgery: a meta-analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 142, 911-20.
- EIKELBOOM, J. W., ANAND, S. S., MALMBERG, K., WEITZ, J. I., GINSBERG, J. S. & YUSUF, S. (2000) Unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin in acute coronary syndrome without ST elevation: a meta-analysis. *Lancet*, 355, 1936-42.
- ELSER, J. A., PURCELL, B. P., ALLANA, I. A., BURDICK, J. A. & MARGULIES, K. B. (2012) Ischemia induces P-selectin-mediated selective progenitor cell engraftment in the isolated-perfused heart. *J Mol Cell Cardiol*, 52, 105-12.
- ENGELHARDT, B. (2008) Adhesion and Signalling Molecules Controlling the Extravasation of Leukocytes across the Endothelium. *Transfus Med Hemother*, 35, 73-75.
- ENGELHARDT, B. & WOLBURG, H. (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol*, 34, 2955-63.
- FADINI, G. P., DE KREUTZENBERG, S. V., CORACINA, A., BAESSO, I., AGOSTINI, C., TIENGO, A. & AVOGARO, A. (2006) Circulating CD34+ cells, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *Eur Heart J*, 27, 2247-55.
- FARSKY, S. P., SANNOMIYA, P. & GARCIA-LEME, J. (1995) Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J Leukoc Biol*, 57, 379-86.
- FELSZECHY, K., BANISADR, G., ROSTENE, W., NYAKAS, C. & HAOUR, F. (2004) Dexamethasone downregulates chemokine receptor CXCR4 and exerts neuroprotection against hypoxia/ischemia-induced brain injury in neonatal rats. *Neuroimmunomodulation*, 11, 404-13.
- FOUBERT, P., SILVESTRE, J. S., SOUTTOU, B., BARATEAU, V., MARTIN, C., EBRAHIMIAN, T. G., LERE-DEAN, C., CONTRERES, J. O., SULPICE, E., LEVY, B. I., PLOUET, J., TOBELEM, G. & LE RICOUSSE-ROUSSANNE, S. (2007) PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 117, 1527-37.
- FRANGOIANNIS, N. G. & ENTMAN, M. L. (2005) Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med*, 15, 163-9.
- FRANGOIANNIS, N. G., LINDSEY, M. L., MICHAEL, L. H., YOUKER, K. A., BRESSLER, R. B., MENDOZA, L. H., SPENGLER, R. N., SMITH, C. W. & ENTMAN, M. L. (1998) Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*, 98, 699-710.
- FRANK, A., BONNEY, M., BONNEY, S., WEITZEL, L., KOEPPEN, M. & ECKLE, T. (2012) Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: From Basic Science to Clinical Bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*.
- GAMETCHU, B., CHEN, F., SACKKEY, F., POWELL, C. & WATSON, C. S. (1999) Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids*, 64, 107-19.

-
- GARROOD, T., LEE, L. & PITZALIS, C. (2006) Molecular mechanisms of cell recruitment to inflammatory sites: general and tissue-specific pathways. *Rheumatology (Oxford)*, 45, 250-60.
- GHADGE, S. K., MUHLSTEDT, S., OZCELIK, C. & BADER, M. (2011) SDF-1alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther*, 129, 97-108.
- GIRN, H. R., AHILATHIRUNAYAGAM, S., MAVOR, A. I. & HOMER-VANNIASINKAM, S. (2007) Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc Endovascular Surg*, 41, 277-93.
- GOLIAS, C., TSOUTSI, E., MATZIRIDIS, A., MAKRIDIS, P., BATISTATOU, A. & CHARALABOPOULOS, K. (2007) Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In Vivo*, 21, 757-69.
- GRUNEWALD, M., AVRAHAM, I., DOR, Y., BACHAR-LUSTIG, E., ITIN, A., JUNG, S., CHIMENTI, S., LANDSMAN, L., ABRAMOVITCH, R. & KESHET, E. (2006) VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, 124, 175-89.
- GUAN, K. & HASENFUSS, G. (2007) Do stem cells in the heart truly differentiate into cardiomyocytes? *J Mol Cell Cardiol*, 43, 377-87.
- HAMM, C. W. (2009) Kommentar zu den Leitlinien der European Society of Cardiology (ESC) zur Diagnose und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne ST-Strecken-Hebung (NTSE-ACS). *Kardiologe*, 3, 81-100.
- HARE, J., HELDMAN, A., GERSTENBLITH, G, CONTE, J., SCHULMAN, S. (2010) Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00587990> (abgerufen am 05.02.2012).
- HATZ, H. J. (2005) Glucocorticoide: Immunologische Grundlagen, Pharmakologie und Therapierichtlinien.
- HENNING, R. J. (2011) Stem cells in cardiac repair. *Future Cardiol*, 7, 99-117.
- HIRSCH, A., NIJVELDT, R., VAN DER VLEUTEN, P. A., TIJSSEN, J. G., VAN DER GIESSEN, W. J., TIO, R. A., WALTENBERGER, J., TEN BERG, J. M., DOEVENDANS, P. A., AENGEVAEREN, W. R., ZWAGINGA, J. J., BIEMOND, B. J., VAN ROSSUM, A. C., PIEK, J. J. & ZIJLSTRA, F. (2011) Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. *Eur Heart J*, 32, 1736-47.
- HOFMANN, M., WOLLERT, K. C., MEYER, G. P., MENKE, A., ARSENIEV, L., HERTENSTEIN, B., GANSER, A., KNAPP, W. H. & DREXLER, H. (2005) Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*, 111, 2198-202.
- HUBBARD, A. K. & ROTHLEIN, R. (2000) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*, 28, 1379-86.

-
- IMBERT, A. M., BELAALOU, G., BARDIN, F., TONNELLE, C., LOPEZ, M. & CHABANNON, C. (2006) CD99 expressed on human mobilized peripheral blood CD34+ cells is involved in transendothelial migration. *Blood*, 108, 2578-86.
- IVETIC, A. & RIDLEY, A. J. (2004) The telling tail of L-selectin. *Biochem Soc Trans*, 32, 1118-21.
- JANSSENS, S., DUBOIS, C., BOGAERT, J., THEUNISSEN, K., DEROOSE, C., DESMET, W., KALANTZI, M., HERBOTS, L., SINNAEVE, P., DENS, J., MAERTENS, J., RADEMAKERS, F., DYMARKOWSKI, S., GHEYSENS, O., VAN CLEEMPUT, J., BORMANS, G., NUYTS, J., BELMANS, A., MORTELMANS, L., BOOGAERTS, M. & VAN DE WERF, F. (2006) Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 367, 113-21.
- JIANG, M., HE, B., ZHANG, Q., GE, H., ZANG, M. H., HAN, Z. H., LIU, J. P., LI, J. H., ZHANG, Q., LI, H. B., JIN, Y., HE, Q., GONG, X. R. & YIN, X. Y. (2010) Randomized controlled trials on the therapeutic effects of adult progenitor cells for myocardial infarction: meta-analysis. *Expert Opin Biol Ther*, 10, 667-80.
- JIANG, Y., JAHAGIRDAR, B. N., REINHARDT, R. L., SCHWARTZ, R. E., KEENE, C. D., ORTIZ-GONZALEZ, X. R., REYES, M., LENVIK, T., LUND, T., BLACKSTAD, M., DU, J., ALDRICH, S., LISBERG, A., LOW, W. C., LARGAESPADA, D. A. & VERFAILLIE, C. M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41-9.
- KAMOTA, T., LI, T. S., MORIKAGE, N., MURAKAMI, M., OHSHIMA, M., KUBO, M., KOBAYASHI, T., MIKAMO, A., IKEDA, Y., MATSUZAKI, M. & HAMANO, K. (2009) Ischemic pre-conditioning enhances the mobilization and recruitment of bone marrow stem cells to protect against ischemia/reperfusion injury in the late phase. *J Am Coll Cardiol*, 53, 1814-22.
- KANG, S., YANG, Y. J., LI, C. J. & GAO, R. L. (2008) Effects of intracoronary autologous bone marrow cells on left ventricular function in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis for randomized controlled trials. *Coron Artery Dis*, 19, 327-35.
- KATRITSIS, D. G., SOTIROPOULOU, P. A., KARVOUNI, E., KARABINOS, I., KOROVESIS, S., PEREZ, S. A., VORIDIS, E. M. & PAPAMICHAIL, M. (2005) Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv*, 65, 321-9.
- KIM, Y. S., BIGLIANI, L. U., FUJISAWA, M., MURAKAMI, K., CHANG, S. S., LEE, H. J., LEE, F. Y. & BLAINE, T. A. (2006) Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1, CXCL12) is increased in subacromial bursitis and downregulated by steroid and non-steroidal anti-inflammatory agents. *J Orthop Res*, 24, 1756-64.
- LAFLAMME, M. A., CHEN, K. Y., NAUMOVA, A. V., MUSKHELI, V., FUGATE, J. A., DUPRAS, S. K., REINECKE, H., XU, C., HASSANIPOUR, M., POLICE, S., O'SULLIVAN, C., COLLINS, L., CHEN, Y., MINAMI, E., GILL, E. A., UENO, S., YUAN, C., GOLD, J. & MURRY, C. E. (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*, 25, 1015-24.
- LAMMERMANN, T., BADER, B. L., MONKLEY, S. J., WORBS, T., WEDLICH-SOLDNER, R., HIRSCH, K., KELLER, M., FORSTER, R., CRITCHLEY, D. R.,

-
- FASSLER, R. & SIXT, M. (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453, 51-5.
- LANGENDORFF, O. (1898) Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. 291-332.
- LAUDANNA, C. & ALON, R. (2006) Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thromb Haemost*, 95, 5-11.
- LEE, O. K., KUO, T. K., CHEN, W. M., LEE, K. D., HSIEH, S. L. & CHEN, T. H. (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103, 1669-75.
- LEISTNER, D. M., FISCHER-RASOKAT, U., HONOLD, J., SEEGER, F. H., SCHACHINGER, V., LEHMANN, R., MARTIN, H., BURCK, I., URBICH, C., DIMMELER, S., ZEIHNER, A. M. & ASSMUS, B. (2011) Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol*.
- LERI, A., KAJSTURA, J. & ANVERSA, P. (2011) Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res*, 109, 941-61.
- LEVY, D., KENCHIAIAH, S., LARSON, M. G., BENJAMIN, E. J., KUPKA, M. J., HO, K. K., MURABITO, J. M. & VASAN, R. S. (2002) Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med*, 347, 1397-402.
- LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. & NOURSHARGH, S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-89.
- LEY, K. & ZARBOCK, A. (2006) Hold on to your endothelium: postarrest steps of the leukocyte adhesion cascade. *Immunity*, 25, 185-7.
- LIPINSKI, M. J., BIONDI-ZOCCAI, G. G., ABBATE, A., KHIANEY, R., SHEIBAN, I., BARTUNEK, J., VANDERHEYDEN, M., KIM, H. S., KANG, H. J., STRAUER, B. E. & VETROVEC, G. W. (2007) Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol*, 50, 1761-7.
- LOWENBERG, M., STAHN, C., HOMMES, D. W. & BUTTGEREIT, F. (2008) Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids*, 73, 1025-9.
- LU, N. Z. & CIDLOWSKI, J. A. (2005) Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell*, 18, 331-42.
- LUAN, B., HUANG, X. J. & QIAO, J. Y. (2010) [Expression of stromal cell derived factor-1 and CXC chemokine receptor 4 and the effects of budesonide on their expression in mice with asthma]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 12, 215-8.
- LUNDE, K., SOLHEIM, S., AAKHUS, S., ARNESEN, H., ABDELNOOR, M., EGELAND, T., ENDRESEN, K., ILEBEKK, A., MANGSCHAU, A., FJELD, J. G., SMITH, H. J., TARALDSRUD, E., GROGAARD, H. K., BJORNERHEIM, R., BREKKE, M., MULLER, C., HOPP, E., RAGNARSSON, A., BRINCHMANN, J. E. & FORFANG, K. (2006) Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355, 1199-209.

-
- MALLICK, I. H., YANG, W., WINSLET, M. C. & SEIFALIAN, A. M. (2004) Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*, 49, 1359-77.
- MANGELSDORF, D. J., THUMMEL, C., BEATO, M., HERRLICH, P., SCHUTZ, G., UMESONO, K., BLUMBERG, B., KASTNER, P., MARK, M., CHAMBON, P. & EVANS, R. M. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83, 835-9.
- MANNING, A. M., BELL, F. P., ROSENBLOOM, C. L., CHOSAY, J. G., SIMMONS, C. A., NORTHRUP, J. L., SHEBUSKI, R. J., DUNN, C. J. & ANDERSON, D. C. (1995) NF-kappa B is activated during acute inflammation in vivo in association with elevated endothelial cell adhesion molecule gene expression and leukocyte recruitment. *J Inflamm*, 45, 283-96.
- MANSOUR, S., VANDERHEYDEN, M., DE BRUYNE, B., VANDEKERCKHOVE, B., DELRUE, L., VAN HAUTE, I., HEYNDRIKX, G., CARLIER, S., RODRIGUEZ-GRANILLO, G., WIJNS, W. & BARTUNEK, J. (2006) Intracoronary delivery of hematopoietic bone marrow stem cells and luminal loss of the infarct-related artery in patients with recent myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 47, 1727-30.
- MARTIN, B., SHAKE, J., BRAUN, J., REHMOND, M. & TPITTENGA, M. (2000) Mesenchymal Stem Cells (MSC) implantation improves regional function in infarcted swine myocardium. *Circulation*, 102.
- MARTINEZ-FERNANDEZ, A., NELSON, T. J., YAMADA, S., REYES, S., ALEKSEEV, A. E., PEREZ-TERZIC, C., IKEDA, Y. & TERZIC, A. (2009) iPS programmed without c-MYC yield proficient cardiogenesis for functional heart chimerism. *Circ Res*, 105, 648-56.
- MATHUR, A. (2011) Bone Marrow Derived Adult Stem Cells for Acute Anterior Myocardial Infarction (REGEN-AMI). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00765453> (abgerufen am 05.02.2012).
- MCEVER, R. P. (1997) Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J*, 14, 585-91.
- MEHRA, M. R., KOBASHIGAWA, J., STARLING, R., RUSSELL, S., UBER, P. A., PARAMESHWAR, J., MOHACSI, P., AUGUSTINE, S., AARONSON, K. & BARR, M. (2006) Listing criteria for heart transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation guidelines for the care of cardiac transplant candidates--2006. *J Heart Lung Transplant*, 25, 1024-42.
- MENASCHE, P., ALFIERI, O., JANSSENS, S., MCKENNA, W., REICHENSPURNER, H., TRINQUART, L., VILQUIN, J. T., MAROLLEAU, J. P., SEYMOUR, B., LARGHERO, J., LAKE, S., CHATELLIER, G., SOLOMON, S., DESNOS, M. & HAGEGE, A. A. (2008) The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*, 117, 1189-200.
- MENASCHE, P., HAGEGE, A. A., SCORSIN, M., POUZET, B., DESNOS, M., DUBOC, D., SCHWARTZ, K., VILQUIN, J. T. & MAROLLEAU, J. P. (2001) Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*, 357, 279-80.
- MEYER, G. P., WOLLERT, K. C., LOTZ, J., RAGER, U., PIRR, J., SCHAEFER, A., FICHTNER, S., GANSER, A. & DREXLER, H. (2009) Intrakoronare Knochenmark-zelltherapie nach akutem Myokardinfarkt: 5-Jahres MRT Follow-Up der Boost Studie. *Clin Res Cardiol*, 98.

-
- MEYER, G. P., WOLLERT, K. C., LOTZ, J., STEFFENS, J., LIPPOLT, P., FICHTNER, S., HECKER, H., SCHAEFER, A., ARSENIJEV, L., HERTENSTEIN, B., GANSER, A. & DREXLER, H. (2006) Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*, 113, 1287-94.
- MISAO, Y., TAKEMURA, G., ARAI, M., OHNO, T., ONOGI, H., TAKAHASHI, T., MINATOGUCHI, S., FUJIWARA, T. & FUJIWARA, H. (2006) Importance of recruitment of bone marrow-derived CXCR4+ cells in post-infarct cardiac repair mediated by G-CSF. *Cardiovasc Res*, 71, 455-65.
- MURPHY, P. M., BAGGIOLINI, M., CHARO, I. F., HEBERT, C. A., HORUK, R., MATSUSHIMA, K., MILLER, L. H., OPPENHEIM, J. J. & POWER, C. A. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 52, 145-76.
- MURRY, C. E., SOONPAA, M. H., REINECKE, H., NAKAJIMA, H., NAKAJIMA, H. O., RUBART, M., PASUMARTHI, K. B., VIRAG, J. I., BARTELMEZ, S. H., POPPA, V., BRADFORD, G., DOWELL, J. D., WILLIAMS, D. A. & FIELD, L. J. (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 428, 664-8.
- NAGASAWA, T., HIROTA, S., TACHIBANA, K., TAKAKURA, N., NISHIKAWA, S., KITAMURA, Y., YOSHIDA, N., KIKUTANI, H. & KISHIMOTO, T. (1996) Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382, 635-8.
- NGUYEN, P. K., LAN, F., WANG, Y. & WU, J. C. (2011) Imaging: guiding the clinical translation of cardiac stem cell therapy. *Circ Res*, 109, 962-79.
- NIEMANN, J. T., ROSBOROUGH, J. P., YOUNGQUIST, S., SHAH, A. P., LEWIS, R. J., PHAN, Q. T. & FILLER, S. G. (2009) Cardiac function and the proinflammatory cytokine response after recovery from cardiac arrest in swine. *J Interferon Cytokine Res*, 29, 749-58.
- NUSSBAUM, J., MINAMI, E., LAFLAMME, M. A., VIRAG, J. A., WARE, C. B., MASINO, A., MUSKHELI, V., PABON, L., REINECKE, H. & MURRY, C. E. (2007) Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *Faseb J*, 21, 1345-57.
- OAKLEY, R. H., SAR, M. & CIDLOWSKI, J. A. (1996) The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem*, 271, 9550-9.
- OH, I. Y., YOON, C. H., HUR, J., KIM, J. H., KIM, T. Y., LEE, C. S., PARK, K. W., CHAE, I. H., OH, B. H., PARK, Y. B. & KIM, H. S. (2007) Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. *Blood*, 110, 3891-9.
- ORLIC, D., KAJSTURA, J., CHIMENTI, S., JAKONIUK, I., ANDERSON, S. M., LI, B., PICKEL, J., MCKAY, R., NADAL-GINARD, B., BODINE, D. M., LERI, A. & ANVERSA, P. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410, 701-5.
- PARK, J. L. & LUCCHESI, B. R. (1999) Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 68, 1905-12.

-
- PASSIER, R., VAN LAAKE, L. W. & MUMMERY, C. L. (2008) Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*, 453, 322-9.
- PERRETTI, M. & D'ACQUISTO, F. (2009) Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 9, 62-70.
- PETERSEN, J. L., MAHAFFEY, K. W., HASSELBLAD, V., ANTMAN, E. M., COHEN, M., GOODMAN, S. G., LANGER, A., BLAZING, M. A., LE-MOIGNE-AMRANI, A., DE LEMOS, J. A., NESSEL, C. C., HARRINGTON, R. A., FERGUSON, J. J., BRAUNWALD, E. & CALIFF, R. M. (2004) Efficacy and bleeding complications among patients randomized to enoxaparin or unfractionated heparin for antithrombin therapy in non-ST-Segment elevation acute coronary syndromes: a systematic overview. *Jama*, 292, 89-96.
- PITZALIS, C., PIPITONE, N., BAJOCCHI, G., HALL, M., GOULDING, N., LEE, A., KINGSLEY, G., LANCHBURY, J. & PANAYI, G. (1997) Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion: an additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect. *J Immunol*, 158, 5007-16.
- PITZALIS, C., PIPITONE, N. & PERRETTI, M. (2002) Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci*, 966, 108-18.
- POBER, J. S. & SESSA, W. C. (2007) Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*, 7, 803-15.
- PRATSCHKE, J., TULLIUS, S. G. & NEUHAUS, P. (2004) Brain death associated ischemia/reperfusion injury. *Ann Transplant*, 9, 78-80.
- PROCKOP, D. J. & OLSON, S. D. (2007) Clinical trials with adult stem/progenitor cells for tissue repair: let's not overlook some essential precautions. *Blood*, 109, 3147-51.
- RANGAPPA, S., MAKKAR, R. & FORRESTER, J. (2009) Review article: current status of myocardial regeneration: new cell sources and new strategies. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 15, 338-43.
- REICHELT, M. E., WILLEMS, L., HACK, B. A., PEART, J. N. & HEADRICK, J. P. (2009) Cardiac and coronary function in the Langendorff-perfused mouse heart model. *Exp Physiol*, 94, 54-70.
- RHEN, T. & CIDLOWSKI, J. A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, 353, 1711-23.
- ROGER, V. L., WESTON, S. A., REDFIELD, M. M., HELLERMANN-HOMAN, J. P., KILLIAN, J., YAWN, B. P. & JACOBSEN, S. J. (2004) Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *Jama*, 292, 344-50.
- RONCALLI, J., MOUQUET, F., PIOT, C., TROCHU, J. N., LE CORVOISIER, P., NEUDER, Y., LE TOURNEAU, T., AGOSTINI, D., GAXOTTE, V., SPORTOUCH, C., GALINIER, M., CROCHET, D., TEIGER, E., RICHARD, M. J., POLGE, A. S., BEREGI, J. P., MANRIQUE, A., CARRIE, D., SUSEN, S., KLEIN, B., PARINI, A., LAMIRAULT, G., CROISILLE, P., ROUARD, H., BOURIN, P., NGUYEN, J. M., DELASALLE, B., VANZETTO, G., VAN BELLE, E. & LEMARCHAND, P. (2011) Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *Eur Heart J*, 32, 1748-57.
- ROSENZWEIG, A. (2006) Cardiac cell therapy--mixed results from mixed cells. *N Engl J Med*, 355, 1274-7.

-
- ROTA, M., KAJSTURA, J., HOSODA, T., BEARZI, C., VITALE, S., ESPOSITO, G., IAFFALDANO, G., PADIN-IRUEGAS, M. E., GONZALEZ, A., RIZZI, R., SMALL, N., MURASKI, J., ALVAREZ, R., CHEN, X., URBANEK, K., BOLLI, R., HOUSER, S. R., LERI, A., SUSSMAN, M. A. & ANVERSA, P. (2007) Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 17783-8.
- SANCHEZ-MADRID, F. & GONZALEZ-AMARO, R. (2001) Drugs, inflammation and cell adhesion receptors. *Expert Opin Pharmacother*, 2, 3-17.
- SCHACHINGER, V., ERBS, S., ELSASSER, A., HABERBOSCH, W., HAMBRECHT, R., HOLSCHERMANN, H., YU, J., CORTI, R., MATHEY, D. G., HAMM, C. W., SUSELBECK, T., ASSMUS, B., TONN, T., DIMMELER, S. & ZEIHNER, A. M. (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355, 1210-21.
- SCHAEFER, A., ZWADLO, C., FUCHS, M., MEYER, G. P., LIPPOLT, P., WOLLERT, K. C. & DREXLER, H. (2010) Long-term effects of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: 5-year results from the randomized-controlled BOOST trial--an echocardiographic study. *Eur J Echocardiogr*, 11, 165-71.
- SCHINDLER, U. & BAICHWAL, V. R. (1994) Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol*, 14, 5820-31.
- SEGERS, V. F. & LEE, R. T. (2011) Biomaterials to enhance stem cell function in the heart. *Circ Res*, 109, 910-22.
- SEQUEIRA, I., SCHIFFERINGS, P., ESCH, F., NEUHOF, C., MUTH, H., TILLMANN, H. & HÖLSCHERMANN, H. (2005) PECAM-1 (CD31) and P-Selectin are involved in the recruitment of bone marrow stem-cells into ischaemic heart tissue. *European Society of Cardiology Congress*.
- SERGEJEVA, S., MALMHALL, C., LOTVALL, J. & PULLERITS, T. (2005) Increased number of CD34+ cells in nasal mucosa of allergic rhinitis patients: inhibition by a local corticosteroid. *Clin Exp Allergy*, 35, 34-8.
- SHAH, A. P., YOUNGQUIST, S. T., MCCLUNG, C. D., TZVETKOVA, E., HANIF, M. A., ROSBOROUGH, J. P. & NIEMANN, J. T. (2011) Markers of progenitor cell recruitment and differentiation rise early during ischemia and continue during resuscitation in a porcine acute ischemia model. *J Interferon Cytokine Res*, 31, 509-13.
- SKRZYPIEC-SPRING, M., GROTHUS, B., SZELAG, A. & SCHULZ, R. (2007) Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 55, 113-26.
- SMALLEY, D. M. & LEY, K. (2005) L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med*, 9, 255-66.
- SMOAK, K. A. & CIDLOWSKI, J. A. (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev*, 125, 697-706.
- SONG, I. H. & BUTTGEREIT, F. (2006) Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments. *Mol Cell Endocrinol*, 246, 142-6.
- STAHN, C., LOWENBERG, M., HOMMES, D. W. & BUTTGEREIT, F. (2007) Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol*, 275, 71-8.

-
- STANGL K., K. L. (2003) Stammzellenforschung. *Imago Hominis*, Band 10, Heft 3, 163-177.
- STATISTISCHESBUNDESAMTDEUTSCHLAND (2013) Krankheitskosten 2011; Todesursachen 2011.
- STEINHOFF, G. (2012) Intramyocardial Transplantation of Bone Marrow Stem Cells in Addition to Coronary Artery Bypass Graft (CABG) Surgery (PERFECT). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00950274> (abgerufen am 05.02.2012).
- STRAUER, B. E., BREHM, M., ZEUS, T., GATTERMANN, N., HERNANDEZ, A., SORG, R. V., KOGLER, G. & WERNET, P. (2001) [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr*, 126, 932-8.
- STRAUER, B. E., BREHM, M., ZEUS, T., KOSTERING, M., HERNANDEZ, A., SORG, R. V., KOGLER, G. & WERNET, P. (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 106, 1913-8.
- STRAUER, B. E. & STEINHOFF, G. (2011) 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice. *J Am Coll Cardiol*, 58, 1095-104.
- SURDER, D., SCHWITTER, J., MOCSETTI, T., ASTORI, G., RUFIBACH, K., PLEIN, S., LO CICERO, V., SONCIN, S., WINDECKER, S., MOSCHOVITIS, A., WAHL, A., ERNE, P., JAMSHIDI, P., AUF DER MAUR, C., MANKA, R., SOLDATI, G., BUHLER, I., WYSS, C., LANDMESSER, U., LUSCHER, T. F. & CORTI, R. (2011) Cell-based therapy for myocardial repair in patients with acute myocardial infarction: rationale and study design of the SWISS multicenter Intracoronary Stem cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISS-AMI). *Am Heart J*, 160, 58-64.
- SUURONEN, E. J., ZHANG, P., KURAITIS, D., CAO, X., MELHUIH, A., MCKEE, D., LI, F., MESANA, T. G., VEINOT, J. P. & RUEL, M. (2009) An acellular matrix-bound ligand enhances the mobilization, recruitment and therapeutic effects of circulating progenitor cells in a hindlimb ischemia model. *Faseb J*, 23, 1447-58.
- TAKAHASHI, M. (2010) Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction. *Circ J*, 74, 418-23.
- TANG, J., WANG, J., SONG, H., HUANG, Y., YANG, J., KONG, X., GUO, L., ZHENG, F. & ZHANG, L. (2010) Adenovirus-mediated stromal cell-derived factor-1 alpha gene transfer improves cardiac structure and function after experimental myocardial infarction through angiogenic and antifibrotic actions. *Mol Biol Rep*, 37, 1957-69.
- TERADA, N., HAMAZAKI, T., OKA, M., HOKI, M., MASTALERZ, D. M., NAKANO, Y., MEYER, E. M., MOREL, L., PETERSEN, B. E. & SCOTT, E. W. (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416, 542-5.
- TILL, J. E. & MC, C. E. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-22.
- TOMA, C., PITTENGER, M. F., CAHILL, K. S., BYRNE, B. J. & KESSLER, P. D. (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105, 93-8.

-
- TONGERS, J., LOSORDO, D. W. & LANDMESSER, U. (2011) Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. *Eur Heart J*, 32, 1197-206.
- TRAVERSE, J. H. (2012) Using biomaterials to improve the efficacy of cell therapy following acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res*, 5, 67-72.
- TRAVERSE, J. H., HENRY, T. D. & MOYE, L. A. (2011) Is the measurement of left ventricular ejection fraction the proper end point for cell therapy trials? An analysis of the effect of bone marrow mononuclear stem cell administration on left ventricular ejection fraction after ST-segment elevation myocardial infarction when evaluated by cardiac magnetic resonance imaging. *Am Heart J*, 162, 671-7.
- TURNER, M. L., MCILWAINE, K., ANTHONY, R. S. & PARKER, A. C. (1995) Differential expression of cell adhesion molecules by human hematopoietic progenitor cells from bone marrow and mobilized adult peripheral blood. *Stem Cells*, 13, 311-6.
- VAN BUUL, J. D. & HORDIJK, P. L. (2004) Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 824-33.
- VAN KERCKHOVEN, R., VAN VEGHEL, R., SAXENA, P. R. & SCHOEMAKER, R. G. (2004) Pharmacological therapy can increase capillary density in post-infarction remodeled rat hearts. *Cardiovasc Res*, 61, 620-9.
- VAN LAAKE, L. W., PASSIER, R., DOEVENDANS, P. A. & MUMMERY, C. L. (2008) Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and cardiac repair in rodents. *Circ Res*, 102, 1008-10.
- VEERMAN, K. M., CARLOW, D. A., SHANINA, I., PRIATEL, J. J., HORWITZ, M. S. & ZILTENER, H. J. (2012) PSGL-1 Regulates the Migration and Proliferation of CD8+ T Cells under Homeostatic Conditions. *J Immunol*, 188, 1638-46.
- VESTWEBER, D. & BLANKS, J. E. (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*, 79, 181-213.
- VILCEK, J. (2003) Basic cytokine biology. *The Cytokine Handbook, Elsevier Science Academic Press; 2003:3-18.*, Vol 1. 4th ed. London.
- VON ANDRIAN, M. (2000) Advances in Immunology: T-Cell Function and Migration - Two Sides of the Same Coin. *The New England Journal of Medicine*, 343.
- WALZOG, B. & GAEHTGENS, P. (2000) Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. *News Physiol Sci*, 15, 107-113.
- WEHLING-HENRICKS, M., LEE, J. J. & TIDBALL, J. G. (2004) Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Neuromuscul Disord*, 14, 483-90.
- WEISSMAN, I. L. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100, 157-68.
- WEN, Z., ZHENG, S., ZHOU, C., WANG, J. & WANG, T. (2011) Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *J Cell Mol Med*, 15, 1032-43.
- WILLIAMS, A. R. & HARE, J. M. (2011) Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*, 109, 923-40.
- WINKLER, I. G., SNAPP, K. R., SIMMONS, P. J. & LEVESQUE, J. P. (2004) Adhesion to E-selectin promotes growth inhibition and apoptosis of human and murine hematopoietic progenitor cells independent of PSGL-1. *Blood*, 103, 1685-92.

-
- WOGNUM, A. W., EAVES, A. C. & THOMAS, T. E. (2003) Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*, 34, 461-75.
- WOLLERT, K. C., MEYER, G. P., LOTZ, J., RINGES-LICHTENBERG, S., LIPPOLT, P., BREIDENBACH, C., FICHTNER, S., KORTE, T., HORNIG, B., MESSINGER, D., ARSENIJEV, L., HERTENSTEIN, B., GANSER, A. & DREXLER, H. (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 364, 141-8.
- WU, J., LI, J., ZHANG, N. & ZHANG, C. (2011) Stem cell-based therapies in ischemic heart diseases: a focus on aspects of microcirculation and inflammation. *Basic Res Cardiol*, 106, 317-24.
- WU, Y., IP, J. E., HUANG, J., ZHANG, L., MATSUSHITA, K., LIEW, C. C., PRATT, R. E. & DZAU, V. J. (2006) Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res*, 99, 315-22.
- YAMAZAKI, T., SEKO, Y., TAMATANI, T., MIYASAKA, M., YAGITA, H., OKUMURA, K., NAGAI, R. & YAZAKI, Y. (1993) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in rat heart with ischemia/reperfusion and limitation of infarct size by treatment with antibodies against cell adhesion molecules. *Am J Pathol*, 143, 410-8.
- YOSHIKAWA, T., MURAKAMI, M., FURUKAWA, Y., TAKEMURA, S. & KONDO, M. (1983) Prevention by methylprednisolone of disseminated intravascular coagulation induced by sustained infusion of endotoxin in rats. *Haemostasis*, 13, 268-73.
- YU, L., CECIL, J., PENG, S. B., SCHREMENTI, J., KOVACEVIC, S., PAUL, D., SU, E. W. & WANG, J. (2006) Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, 374, 174-9.
- YUSUF, S., MEHTA, S. R., CHROLAVICIUS, S., AFZAL, R., POGUE, J., GRANGER, C. B., BUDAJ, A., PETERS, R. J., BASSAND, J. P., WALLENTIN, L., JOYNER, C. & FOX, K. A. (2006) Comparison of fondaparinux and enoxaparin in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 354, 1464-76.
- ZARBOCK, A. & LEY, K. (2008) Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol*, 172, 1-7.
- ZARUBA, M. M., THEISS, H. D., VALLASTER, M., MEHL, U., BRUNNER, S., DAVID, R., FISCHER, R., KRIEG, L., HIRSCH, E., HUBER, B., NATHAN, P., ISRAEL, L., IMHOF, A., HERBACH, N., ASSMANN, G., WANKE, R., MUELLER-HOECKER, J., STEINBECK, G. & FRANZ, W. M. (2009) Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell*, 4, 313-23.



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: 978-3-8359-6082-4



Cover photo (front): © cliparea.com - fotolia.com
Cover photos (back): © angelhell - istockphoto.com