

Der Einfluss einer Behandlung mit Simvastatin auf das Homing von autologen Vorläuferzellen aus Rattenknochenmark im adulten Rattenherzen nach Ischämie und Reperfusion im Langendorff- Modell

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

vorgelegt von Kathrin Ines Purnhagen, geb. Schweitzer
aus Gießen

Gießen 2012

Der Einfluss einer Behandlung mit Simvastatin auf das Homing von autologen Vorläuferzellen aus Rattenknochenmark im adulten Rattenherzen nach Ischämie und Reperfusion im Langendorff- Modell

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

vorgelegt von Kathrin Ines Purnhagen, geb. Schweitzer
aus Gießen

Gießen 2012

Aus der Medizinischen Klinik I, Kardiologie & Angiologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hamm (kommissarisch)

Gutachter: Prof. Dr. med. Hans Hölschermann
Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Hamm

Tag der Disputation:
23.08.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden	2
1.2 Das Homing von Stammzellen im infarzierten Areal	2
1.2.1 Mechanismus der Zelladhäsion und -transmigration: Die Adhäsionskaskade	2
1.2.1.1 Annäherung und Rollen	3
1.2.1.2 Aktivierung und feste Bindung	3
1.2.1.3 Transmigration durch die Gefäßwand	4
1.2.2 Wichtige Zelladhäsionsmoleküle	6
1.2.2.1 Selektine	6
1.2.2.1.1 P-Selektin	6
1.2.2.1.2 E-Selektin	6
1.2.2.1.3 L-Selektin	7
1.2.2.2 Integrine	7
1.2.2.3 Rezeptoren aus der Immunsuperglobulinfamilie	7
1.2.2.3.1 ICAM	7
1.2.2.3.2 VCAM-1	8
1.2.2.3.3 PECAM	8
1.3 Charakterisierung, Wirkweise und Effekte von Statinen	8
1.3.1 Simvastatin	8
1.3.2 Wirkung	9
1.4 Bone Marrow-derived adult Stem Cells (BMCs)	11
1.4.1 Hämatopoietische Stammzellen (HPCs)	12
1.4.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	12
1.4.3 Endotheliale Stamm-/Progenitorzellen (EPCs)	12
1.4.4 Randpopulation (Side Population, SP)	12
1.4.5 Multipotente adulte Progenitorzellen (MAPCs)	13
1.4.6 CXCR4-positive Gewebe-gebundene Stammzellen (CXCR4 ⁺ tissue-committed stem cells, TCSCs)	13
2 Ziel der Arbeit	14
3 Material und Methoden	15
3.1 Übersicht über den Versuchsablauf	15
3.2 Tiermodell	15
3.2.1 Tierhaltung	16
3.2.2 Vorbehandlung mit Simvastatin	16
3.2.2.1 Ansetzen der Simvastatin-Lösung	16
3.2.2.2 Intraperitoneale Verabreichung des Medikamentes	16
3.2.2.3 Auswirkungen der Behandlung mit Simvastatin auf den Cholesterinspiegel	17
3.2.3 Entnahme der Femurknochen	17
3.3 Isolation der Bone Marrow-derived Stem Cells (BMCs)	17
3.3.1 Zellzählung	19

3.3.2 Fluoreszenzfärbung	19
3.4 Versuchsmodell des isoliert schlagenden Herzens/modifiziertes Langendorff-Modell	20
3.4.1 Aufbau	20
3.4.2 Perfusionslösung	21
3.4.3 Monitoring	22
3.4.3.1 Kontinuierliches Monitoring	22
3.4.3.2 Diskontinuierliches Monitoring	22
3.4.4 Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität	22
3.4.5 Organentnahme	23
3.4.6 Fixierung und Vorbereitung des Herzens	23
3.4.7 Versuchsdurchführung	24
3.5 Versuchsreihen	24
3.6 Gefrierschnitte	25
3.6.1 Anfertigung	25
3.6.2 Färbung	25
3.6.3 Auswertung	26
3.7 Statistische Methoden	26
4 Ergebnisse	28
4.1 Zellrekrutierung unter verschiedenen Bedingungen	28
4.1.1 Auswirkung einer Reperfusionphase auf die Zellrekrutierung	28
4.1.2 Auswirkung von Simvastatin auf die Zellrekrutierung	29
4.2 Visuelle Auswertung	32
4.3 Veränderung der Kreatinkinase im Effluat	33
4.4 Die Auswirkungen der Behandlung mit Simvastatin auf den Cholesterin-, HDL- und LDL-Spiegel	35
5 Diskussion	39
5.1 Rekrutierung von BMCs unter Statintherapie	39
5.2 Die Auswirkung einer Reperfusionphase auf die Rekrutierung der BMCs	42
5.3 Nachweis der BMCs im ischämischen Myokard	43
5.4 Cholesterin-, LDL- und HDL-Spiegel	43
5.5 Anstieg der Kreatinkinase und des Isoenzym MB	44
5.6 Das Langendorff-Modell als Versuchsmodell	44
5.7 BMCs vs. embryonale Stammzellen	45
5.8 Studienlage zur Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt	45
5.8.1 Experimentelle Studien	45
5.8.2 Klinische Studien	46
5.9 Unerwünschte Ereignisse nach Stammzelltherapie	49

5.10 Abwägung Statintherapie vs. Therapie mit BMCs	51
5.11 Ausblick	52
6 Zusammenfassung	54
7 Summary	55
8 Literaturverzeichnis	56
9 Anhang	62
9.1 Abkürzungsverzeichnis	63
9.2 Abbildungsverzeichnis	65
9.3 Tabellenverzeichnis	65
9.4 Veröffentlichungen	66
9.5 Danksagung	67
9.6 Eidesstattliche Erklärung	68

1 Einleitung

Das menschliche Herz verfügt nach Myokardschaden, beispielsweise nach Myokardinfarkt, nicht über geeignete Reparaturmechanismen. Der entstandene Zellverlust mit konsekutiv ungenügender Kontraktilität kann bis zur Herzinsuffizienz führen. Die Verabreichung von Stammzellen zur Verhinderung beziehungsweise Verminderung des Ischämie-Reperfusionsschadens nach Myokardinfarkt wird nicht nur tierexperimentell oder in vitro, sondern auch in klinischen Studien erforscht und erscheint hierbei als therapeutische Option überaus attraktiv.

Hierzu fehlt jedoch noch grundlegendes Wissen, beispielsweise zum idealen Zeitpunkt der Zelltherapie, zur Menge der verabreichten Zellen und zur Art der Verabreichung. Auch die Wirkung von Medikamenten auf das Homing (Mechanismus, über den die Zellen ins Gewebe wandern) ist nicht ausreichend geklärt. Da viele Patienten, die einen Myokardinfarkt erleiden aufgrund ihres Risikoprofils zum Zeitpunkt des Infarktes unter einer Statintherapie stehen und davon ausgegangen wird, dass Statine Einfluss auf kardiale Endothelrezeptoren haben, könnte dies von besonderer Bedeutung für die Stammzelltherapie sein.

In dieser Arbeit wird die Auswirkung einer Vorbehandlung mit Simvastatin auf das Homing von Bone Marrow-derived Stem Cells (BMCs, knochenmarkstämmige Vorläuferzellen) im Myokard der Ratte nach globaler Ischämie untersucht.

1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden

Der sogenannte Ischämie-Reperfusionsschaden ist derjenige, der nach einer Ischämiezeit und erfolgter Reperfusion entsteht. Im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens kommt es zu einer reperfusionsbedingten Entzündungsreaktion, bei der eine Zytokinkaskade getriggert wird durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und freigesetzte Zellmediatoren (Ferrari 1995). Durch diese Kaskade werden für die Leukozytenadhäsion wichtige Zelladhäsionsmoleküle hochreguliert und dadurch die Leukozytenadhäsion und -transmigration erhöht (Entman, Michael et al. 1991).

Als klinische Manifestation zeigen sich im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens ein vermehrtes Auftreten von Arrhythmien (Krumpl, Todt et al. 1989), ein myokardialer Gewebsverlust (Hearse and Bolli 1991) sowie bei kurzdauernder Ischämie eine reversible kontraktile Dysfunktion des vitalen Myokards, das als „Stunning“ bezeichnet wird (Braunwald and Kloner 1982). Der entstehende Schaden ist abhängig davon, wie lange die Ischämie vor der Reperfusion bestanden hat.

1.2 Das Homing von Stammzellen im infarzierten Areal

1.2.1 Mechanismus der Zelladhäsion und -transmigration: Die

Adhäsionskaskade

Der Vorgang des Homings von BMCs ist noch nicht ausreichend geklärt. Man nimmt an, dass die Adhäsion und Transmigration der Bone Marrow-derived Stem Cells ins Gewebe nach denselben oder sehr ähnlichen Mechanismen erfolgt wie die von Leukozyten. Dabei unterscheidet man verschiedene Phasen: Durch die Gewebeschädigung nach Ischämie und Reperfusion werden die Endothelzellen aktiviert und nehmen zu im Blut zirkulierenden Zellen Kontakt auf. Diese Zellen nähern sich an die Gefäßwand mit anschließender lockerer Anhaftung (Rolling) an, es erfolgt eine Aktivierung der Zellen, anschließend eine feste Bindung und schließlich als letzter Schritt die Transmigration durch die Gefäßwand. Daran sind eine Reihe von Adhäsions-

onsmolekülen aus den Gruppen der Selektine, der Integrine und Rezeptoren aus der Immunglobulinsuperfamilie zu unterschiedlichen Zeitpunkten beteiligt.

1.2.1.1 Annäherung und Rollen

Die Annäherung („Tethering“) der Zellen an das aktivierte Endothel erfolgt über Selektine, welche charakteristischerweise innerhalb kürzester Zeit aktiviert und deaktiviert werden können. Dieser Vorgang macht den Kontakt unter Strömungsbedingungen erst möglich und führt zu dem Phänomen des Rollens („Rolling“) auf der Endotheloberfläche. An diesem Vorgang sind bei den Leukozyten drei unterschiedliche Selektine beteiligt. Das L-Selektin, das auf der Oberfläche aller Granulozyten und Monozyten exprimiert wird, E-Selektin auf aktivierten Endothelzellen und schließlich das P-Selektin, das in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert wird (Ley 2003).

Den Einfluss der endothelialen Selektine für die Rekrutierung hämatopoietischer Stammzellen wurde durch Versuche mit P- und E-Selektin Knockout-Mäusen bewiesen (Frenette, Subbarao et al. 1998). Das Rollen von CD34-positiven Zellen auf P-Selektin, E-Selektin und dem CD44-Liganden Hyaluronsäure unter physiologischer Scherströmung in vitro stellten Peled et al. durch ihre Studien dar (Peled, Grabovsky et al. 1999).

1.2.1.2 Aktivierung und feste Bindung

Der Prozess des Rollens ist reversibel und ist durch eine lockere Bindung charakterisiert, bei der auch viele Zellen wieder in den normalen Blutstrom zurückkehren. Da für das Homing eine feste Bindung benötigt wird, besteht der nächste Schritt in einer Aktivierung („Triggering“) der Zellen durch verschiedene Aktivatoren und eine feste Adhäsion („Arrest“) der Zellen an das Endothel, die über Integrine stattfindet.

Durch das „Triggering“ wird die Konformation der Integrine verändert, sodass anschließend eine feste Bindung erfolgen kann. Zu den Aktivatoren der Integrine gehören beispielsweise Chemokine, darunter SDF-1, Komplement-

faktoren, IL-6, IL-8, Platelet activating Factor und die freien Radikale. Unter anderem konnte bereits der Einfluß von SDF-1 über den Rezeptor CXCR4 auf das Homing von EPCs nach arterieller Verletzung gezeigt werden (Hristov, Zerneck et al. 2007).

Für das Homing von Leukozyten während der Immunreaktion sind die Zell-Zell Interaktionen zwischen Leukozyt und Endothel unerlässlich (Chavakis, Urbich et al. 2008).

Die Bedeutung der β -Integrine für das Homing von endothelialen Progenitorzellen (EPCs) konnten Chavakis et al. zeigen. Sie untersuchten zum einen die Kapazität für das Homing und die Neovaskularisation von aus peripherem Blut gewonnenen, kultivierten EPCs, knochenmarksstämmigen murinen hämatopoietischen Sca-1⁺/Lin⁻ und VEGF R2⁺/Lin⁻ Progenitorzellen. Mit ihren Ergebnissen konnten sie in vitro zeigen, dass β 2-Integrine die Adhäsion von EPCs zum Endothel und zu extrazellulären Matrixproteinen vermitteln (Chavakis, Aicher et al. 2005).

Des Weiteren konnten sie in Versuchen an β 2-Integrin-defizienten Mäusen, an denen eine Ischämie der hinteren Extremität durchgeführt wurde, den Einfluß der β 2-Integrine auf das Homing von murinen Sca-1⁺/Lin⁻ hämatopoietischen Progenitorzellen in ischämisches Gewebe in vivo zeigen (ibid).

Die Bindungspartner der Integrine auf Seiten des Endothels sind Rezeptoren aus der Immunglobulinfamilie. In Bezug auf die Adhäsionskaskade zählen zu den wichtigsten Vertretern hierbei die Intercellular Adhesion Molecules (ICAM) und das Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) .

1.2.1.3 Transmigration durch die Gefäßwand

Der Prozess der Transmigration von Leukozyten ist im Verhältnis zu den anderen Schritten der Adhäsionskaskade weniger erforscht. An dem Prozess sind auf der Endothelzelle sechs verschiedene Moleküle beteiligt, die sich alle an den Lateralseiten befinden (Muller 2003). Dies sind JAM-A, -B und -C, CD99, VE-Cadherin und PECAM (CD31) (ibid). PECAM, das wie auch die JAMs zur Immunglobulinsuperfamilie gehört, hat hier für die Transmigration

die größte Bedeutung, was sich dadurch ausdrücken lässt, dass bei Blockade von PECAM durch Antikörper die Migration um 70-90% abnimmt (Muller, Weigl et al. 1993). Auch auf der Seite der Leukozyten ist hier der agierende Rezeptor das PECAM, das eine homophile Bindung mit dem endothelialen PECAM eingeht (Muller and Randolph 1999).

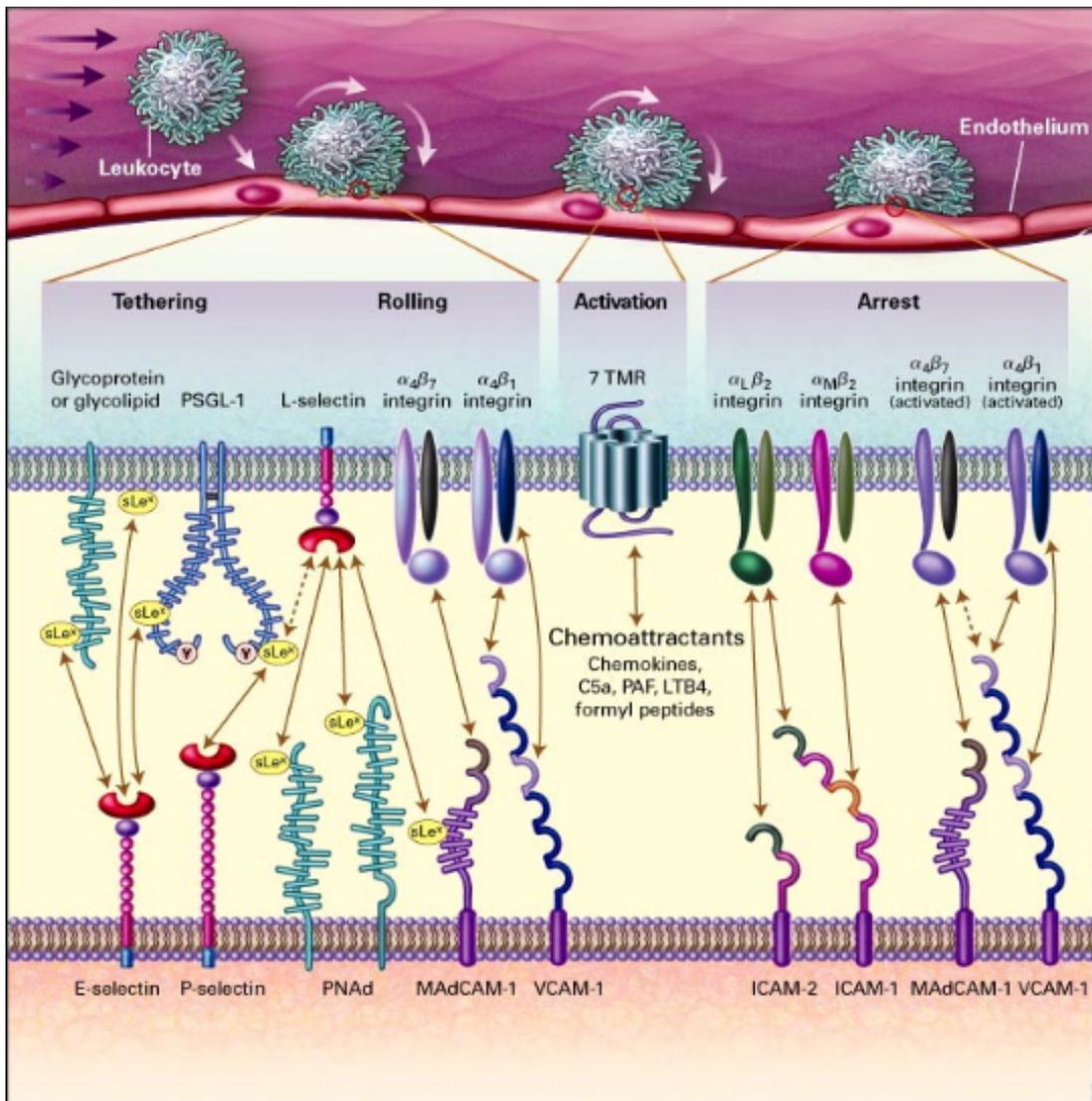


Abbildung 1 Wichtige Moleküle der Adhäsionskaskade, übernommen aus „T-Cell Function and Migration — Two Sides of the Same Coin“ (von Andrian and Mackay 2000), mit freundlicher Genehmigung der Autoren

1.2.2 Wichtige Zelladhäsionsmoleküle

1.2.2.1 Selektine

Zur Gruppe der Selektine gehören 3 unterschiedliche Selektine, diese sind jeweils mit Präfixen versehen, die auf den Ort der ersten Beschreibung hinweisen. L-Selektin wird auf den meisten Leukozyten exprimiert, E-Selektin findet sich auf dem aktivierten Endothelium und P-Selektin wurde zuerst in Thrombozyten (engl. Platelets) nachgewiesen, findet sich jedoch auch auf Endothelzellen. Alle Selektine sind durch einen ähnlichen Aufbau im Bereich der extrazellulären Region gekennzeichnet. Diese besteht aus einer calci-umabhängigen Lektin-Domäne, einer Wachstumsfaktor-ähnlichen (EGF) Domäne sowie neun „short consensus repeat“ (SCR) Einheiten. Die größten Ähnlichkeiten bestehen in der Lektin und EGF Domäne, über diese nehmen sie Kontakt zu kohlenhydratartigen Determinanten, die auf diversen Liganden exprimiert werden auf.

1.2.2.1.1 P-Selektin

P-Selektin ist auch unter den Namen CD62 antigen-like family member P (CD62P), Granule Membrane Protein 140 (GMP-140), und Platelet Activation-Dependent Granule to External Membrane Protein (PADGEM) bekannt. Es wird in nicht aktivierten Endothelzellen in den Weibel-Palade Körperchen gespeichert. (Ley 2003) Daher ist nach Stimulation der Expression eine schnelle Bereitstellung des Rezeptors innerhalb weniger Minuten auf der Zelloberfläche möglich.

1.2.2.1.2 E-Selektin

E-Selektin, auch bekannt unter den Namen CD62 antigen-like family member E (CD62E), endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1), oder leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 2 (LECAM2), wird nach Aktivierung durch Zytokine ausschliesslich auf Endothelzellen exprimiert. Durch die Zytokininduktion wird durch Aktivierung und nukleäre Translokation von NF-

kappaB die Gentranskription von E-Selektin ausgelöst (Collins, Read et al. 1995).

Die Bindungspartner von E-Selektin auf den Leukozyten sind CD66, beta2-Integrine und L-Selektin. (Carlos and Harlan 1994)

1.2.2.1.3 L-Selektin

L-Selektin, auch CD62 antigen-like family member L (CD62L) wird auf Leukozyten exprimiert. Es ist der Bindungspartner für E-Selektin auf dem Endothel.

1.2.2.2 Integrine

Integrine sind glykosylierte heterodimere Proteine, die auf der Zelloberfläche der Leukozyten exprimiert werden, dort vermitteln sie die Zell-Adhäsion zu extrazellulären Matrix-Proteinen und zu anderen Zellen (Hynes 2002). Sie besitzen zwei Ketten, die alpha- und beta-Untereinheit. Durch verschiedene Kombinationen dieser Untereinheiten können viele verschiedene Integrine gebildet werden.

1.2.2.3 Rezeptoren aus der Immunsuperglobulinfamilie

Die Rezeptoren aus der Immunsuperglobulinfamilie sind die Bindungspartner der Integrine auf der Endothelseite. In Bezug auf die Adhäsionskaskade zählen zu den wichtigsten Vertretern hierbei die Intercellular Adhesion Molecules (ICAM) und das Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) und Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1).

1.2.2.3.1 ICAM

ICAM-1 (auch CD54) wird typischerweise auf Zellen des Immunsystems und Endothelzellen exprimiert. Eine kleinere Menge der Rezeptoren befindet sich ständig auf der Zelloberfläche. Der Großteil wird jedoch nach Stimulation durch Zytokine, beispielsweise durch Interleukin-1 und Tumor-Nekrose Faktor alpha exprimiert. Es bindet an Integrine des Typs CD11a/CD18 oder CD11b/CD18.

1.2.2.3.2 VCAM-1

VCAM-1 (auch CD106) wird ausschließlich nach Zytokininduktion auf der Endotheloberfläche von kleineren und größeren Gefäßen exprimiert. Die Zytokine lösen hierbei eine vermehrte Gentranskription aus. VCAM ist der endotheliale Ligand für beta-Integrine.

1.2.2.3.3 PECAM

PECAM (auch CD31) befindet sich als Bindungspartner sowohl auf der Leukozytenoberfläche, auf Blutplättchen als auch auf der Endothelseite in den interzellulären Verbindungen. Man nimmt an, dass es einen stimulatorischen Effekt auf die Integrine ausübt, an der Leukozytenadhäsion wesentlich beteiligt ist sowie einen wichtigen Schritt in der transendothelialen Migration spielt (Jackson 2003).

1.3 Charakterisierung, Wirkweise und Effekte von Statinen

1.3.1 Simvastatin

Simvastatin wird synthetisch aus einem Fermentationsprodukt von *Aspergillus terreus* gewonnen. (Für eine quellenmäßige Fundierung vgl. im Folgenden Merck, Highlights of Prescribing Information, S. 10 f., abrufbar unter http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/z/zocor/zocor_pi.pdf, abgerufen am 10.10.2010). Nach Aufnahme in den Körper wird das inaktive Lakton durch Hydrolyse zur β -Hydroxysäure, die als Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)- Reduktasehemmer fungiert. Die Reinsubstanz ist ein weißes, nicht hygroskopisches, kristallines Puder, das nicht in Wasser, jedoch in Methanol, Ethanol und Chloroform löslich ist. Simvastatin ist eine Buttersäure, die Summenformel lautet $C_{25}H_{38}O_5$. Bei oraler Gabe unterliegt Simvastatin einem hohen first-pass Effekt in der Leber, nur etwa 5% der Substanz gelangen in den großen Kreislauf.

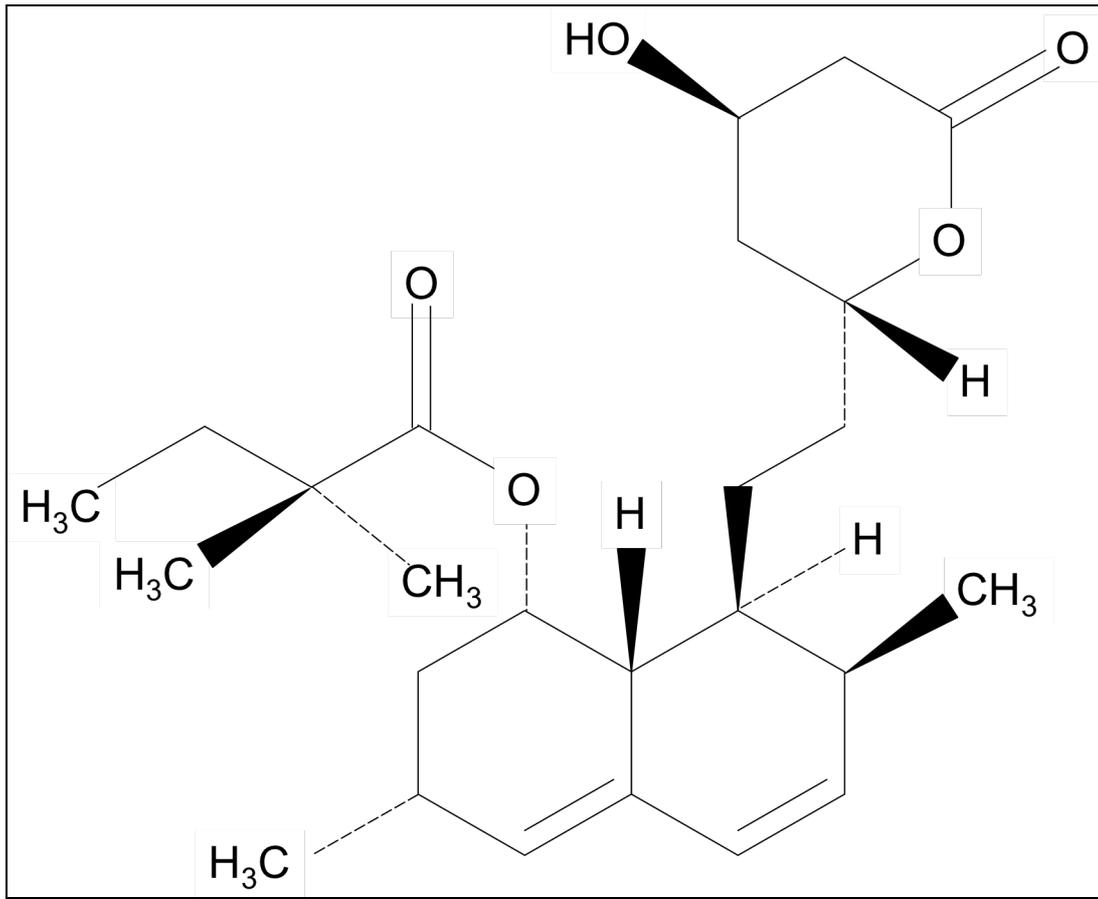


Abbildung 2 Strukturformel Simvastatin

1.3.2 Wirkung

Das Enzym HMG-CoA Reduktase katalysiert die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat in der Leber, welche eine der ersten Schritte in der Cholesterolsynthese darstellt. Durch die Hemmung mittels eines Statins wird die Cholesterolsynthese in einem frühen Schritt unterbrochen. Es werden vermehrt LDL-Cholesterinrezeptoren in der Leber ausgebildet, durch die LDL-Cholesterin vermehrt aus dem Kreislauf aufgenommen wird. Der Anteil des HDL-Cholesterins wird erhöht. Unter anderem dadurch sinkt das kardiovaskuläre Risiko.

Statine haben auch Wirkungen, die unabhängig von dem cholesterinsenkenden Effekt sind. Diese werden gemeinhin als pleiotrophische Effekte bezeichnet. Dazu gehören beispielsweise

- die Verminderung inflammatorischer Prozesse (Pruefer, Scalia et al. 1999),
- die Modulation der Leukozytenaktivität und Leukozytenadhäsion auf zellulärer Ebene (Weber, Erl et al. 1997),
- die Stimulation zur Bildung neuer Blutgefäße (Kureishi, Luo et al. 2000),
- die Verminderung des Ischämie-Reperfusionsschadens nach myokardialer Ischämie (Di Napoli, Antonio Taccardi et al. 2001; Jones, Trocha et al. 2001),
- die verminderte Produktion von Adhäsionsmolekülen, z.B. E-Selektin und ICAM-1 (Meroni, Raschi et al. 2001),
- und die Inhibierung der Expression von VCAM-1 und ICAM-1 über den NF-kappaB Signalweg (Zapolska-Downar, Siennicka et al. 2004).

Im Folgenden soll der Fokus auf die Auswirkungen auf die Endothelfunktion und die Zelladhäsion gelegt werden.

Für die Endotheldysfunktion sowohl in atherosklerotischen Gefäßen, als auch nach myokardialer Ischämie, ist ein Charakteristikum der Mangel an Stickstoffmonoxid (NO). Dieser kommt durch eine verminderte Synthese, geringere Freisetzung und eine verringerte Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) zustande (Laufs and Liao 2000). Durch diesen Mangel kommt es zu verringerter vaskulärer Relaxation (Casino, Kilcoyne et al. 1993), geringerer Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (Laufs and Liao 2000), und vermehrter Leukozytenadhäsion (Kubes, Suzuki et al. 1991).

Durch die vermehrte NO Produktion unter Statineinfluss kommt es durch eine Herunterregulation von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, P-Selektin) (Jones and Lefer 2001) zu einer verminderten Interaktion von Neutrophilen und dem Endothel und damit verminderter Entzündungsreaktion beziehungsweise zu einem geringeren Ischämie-Reperfusionsschaden.

Statine können über verschiedene Mechanismen die Bioverfügbarkeit von NO erhöhen. Eine Rolle hierbei spielt die Familie der kleinen G-Proteine. Da-

zu gehören beispielsweise Ras, Rho, Rac und andere kleine GTPasen (Rab, Rap, Ran, Rheb, Rat, Rit und Arf) (Wang, Liu et al. 2008). Ras gehört zu den Proto-Onkogenen und hat eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion, Proliferation und der Tumorgenese; Rho reguliert Veränderungen im Zytoskelett durch Aktin, die Bewegung der Mikrotubuli, Transport von Vesikeln, Zellpolarität, den Ablauf des Zellzyklus und hat einen Einfluss auf die Regulation von NO über die eNOS (Wang, Liu et al. 2008). Proteinisoprenylation befähigt diese zur kovalenten Bindung, subzellulären Ansammlung und intrazellulärem Transport (Wolfrum, Jensen et al. 2003). Die Isoprenylation findet durch Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) statt, das in einem späten Schritt der Cholesterinbiosynthese aus Farnesyl-Pyrophosphat (FPP) entsteht. Durch Hemmung der Cholesterinbiosynthese in einem frühen Schritt durch Statine wird die Produktion von FPP und somit auch GGPP vermindert. Laufs und Liao konnten in einer Studie zeigen, dass Rho von GGPP, nicht aber von FPP beeinflusst wird, wodurch es zu einem negativen Feedback der eNOS-mRNA Expression kommt (Laufs and Liao 2000).

Ein anderer Mechanismus der Beeinflussung von NO liegt im PI-3 Kinase Akt Signalweg. Kureishi et al. konnten zeigen, dass Simvastatin durch eine Akt-vermittelte Phosphorylierung von eNOS zur Produktion von NO führt (Kureishi, Luo et al. 2000). Der genaue Mechanismus der Aktivierung von Akt ist nicht geklärt, es scheint jedoch der PI-3 Kinase Signalweg involviert zu sein, da eine Blockierung dieses Signalweges die Aktivierung von Akt verhindert (ibid.).

1.4 Bone Marrow-derived adult Stem Cells (BMCs)

In vielen Geweben des menschlichen Organismus sind adulte Stammzellen beherbergt, um im Falle von Krankheit oder Verletzung Reparaturvorgänge möglich zu machen. (Für eine quellenmäßige Fundierung dieses Unterkapitels vgl. (Dawn and Bolli 2005). Diese gewebspezifischen Stammzellen wurden beispielsweise in der Haut, dem Gastrointestinaltrakt, der Lunge, der Leber und im Herzen gefunden. Die aber wohl am besten erforschten und zahlenmäßig meisten Stammzellen befinden sich im

Knochenmark. Damit sind sie an vielen verschiedenen Stellen des Körpers verteilt und befinden sich gut geschützt in den Knochen, was teleologisch die Annahme zulässt, dass Stammzellen ein großes Potential besitzen viele verschiedene Gewebe zu regenerieren.

Die verschiedenen Typen der primitiven Zellen im Knochenmark können in sechs Gruppen aufgegliedert werden.

1.4.1 Hämatopoietische Stammzellen (HPCs)

Die HPCs zählen zu der am besten erforschten Untergruppe und sind zur Selbsterneuerung ebenso wie zur Differenzierung in alle Arten von hämatopoietischen Zellen fähig. Sie sind negativ für alle Zelllinienmarker aber positiv für die hämatopoietischen Marker CD45, CD34, CD133 und CD 117.

1.4.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

Die MSCs gehören einer heterogenen Gruppe an, die sich in der Zellkultur als adhärente Zellen darstellen und zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren und denen auch eine Funktion in der Verhinderung des Cardiac Remodeling bei Gabe nach Myokardinfarkt zugeschrieben wird (Pittenger and Martin 2004). Als Marker dieser Zellen wurden Stro-1, CD90, CD106 und CD13 gefunden. Für CD45 sind diese Zellen negativ.

1.4.3 Endotheliale Stamm-/Progenitorzellen (EPCs)

EPCs zeichnen sich dadurch aus, dass sie vom Knochenmark ins periphere Blut auswandern und von dort aus in verschiedene Gewebe rekrutiert werden und an der Regeneration von Blutgefäßen in verschiedenen adulten Organen beteiligt sind (Asahara and Kawamoto 2004; Urbich and Dimmeler 2004). Zu ihren Markern zählen CD34, VEGFR2 und Tie-2, auch sie sind negativ für CD45.

1.4.4 Randpopulation (Side Population, SP)

Die Untergruppe der SPs wird dadurch charakterisiert, dass sie durch den Vitalfarbstoff Hoechst 33342 darstellen lassen (Goodell, Brose et al. 1996).

1.4.5 Multipotente adulte Progenitorzellen (MAPCs)

MAPCs zeigen eine sehr hohe Plastizität mit einem hohen Differenzierungspotential. Sie differenzieren zu Zellen mit endodermalen, mesodermalen und ektodermalen Antigeneigenschaften.

1.4.6 CXCR4-positive Gewebe-gebundene Stammzellen (CXCR4⁺ tissue-committed stem cells, TCSCs)

Diese Zellen können durch Ansprechen auf Chemotaxis mittels SDF-1 isoliert werden (Ratajczak, Kucia et al. 2004). Diese Unterpopulation von BMCs exprimiert Marker für Endothel, Pankreas, Leber, Skelettmuskulatur und auch Myokard (Kucia, Dawn et al. 2004; Kucia, Ratajczak et al. 2004; Ratajczak, Kucia et al. 2004).

2 Ziel der Arbeit

In dieser experimentellen Arbeit wird der Einfluss des HMG-CoA Reduktasehemmers Simvastatin auf die Rekrutierung autologer BMCs nach globaler myokardialer Ischämie am Herzen der adulten Ratte untersucht. Direktuntersuchungen werden am modifizierten Modell nach Langendorff statinbehandelter Ratten nach globaler Ischämie durchgeführt. In der einer globalen Ischämie folgenden Reperfusionphase werden autologe BMCs über die Aorta retrograd infundiert. Verglichen werden dabei verschiedene Dosierungen des Medikamentes Simvastatin auf die Unterschiede in der Zellrekrutierung. Des Weiteren wird der Einfluss einer kürzeren oder länger dauernden Reperfusionphase nach der globalen Ischämie und vor der Zellgabe auf die Auswirkung auf die Zellrekrutierung untersucht. Zur Dokumentation der Lokalisation der BMCs im Myokard werden Gewebeschnitte angefertigt, die fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Übersicht über den Versuchsablauf

Die Spendertiere für die Herzen wurden je nach Protokoll über sieben Tage mit Simvastatin vorbehandelt, bekamen nur die Grundsubstanz des Medikamentes ohne Wirkstoff (Placebo) verabreicht, oder erhielten keine Vorbehandlung. Vor Beginn der Behandlung und am Ende wurde je eine Blutentnahme durchgeführt.

Am modifizierten Langendorff-Modell wurde eine globale Ischämie durchgeführt und die vorher isolierten autologen BMCs anschließend je nach Protokoll verabreicht.

Genauere Informationen hierüber sind den folgenden Unterkapiteln zu entnehmen.

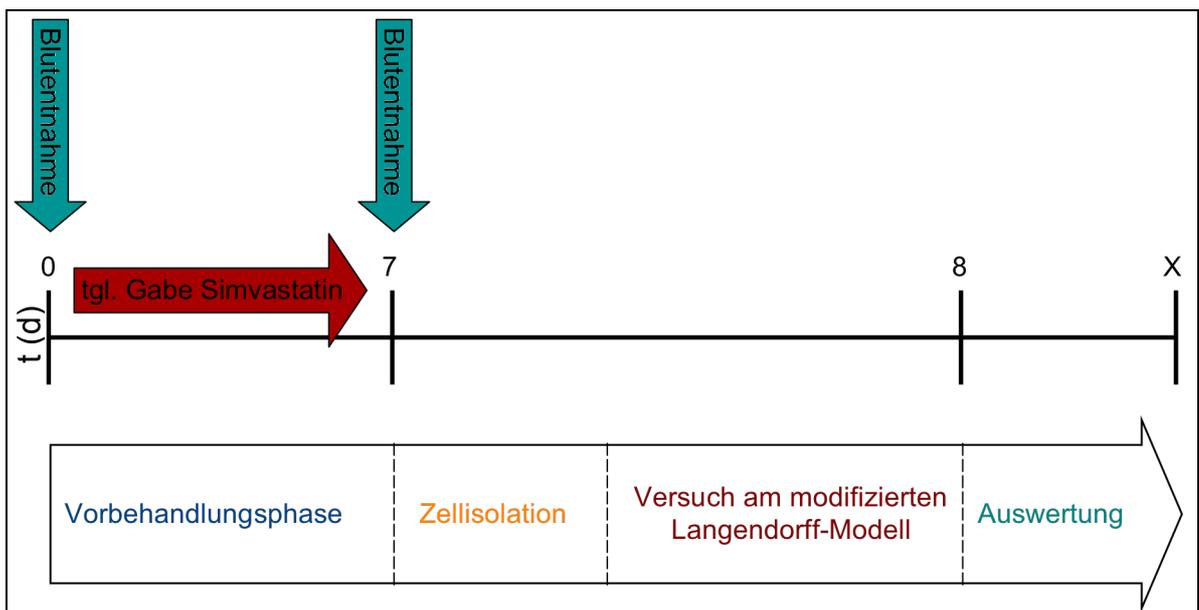


Abbildung 3 Versuchsablauf

3.2 Tiermodell

Als Versuchstiere wurden 92 männliche Wistar-Furth Ratten (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, BRD) mit einem Körpergewicht von 150-200 Gramm verwendet. Davon wurden 46 als Spender der Bone Marrow-derived

Stem Cells und 46 als Herzspender gebraucht. Per definitionem sind die BMCs hierbei als autolog zu bezeichnen, da alle Ratten aus dem gleichen Inzuchtstamm stammten.

Das Versuchsvorhaben wurde dem Regierungspräsidium Gießen angezeigt und am 05.09.2004 genehmigt. Die Durchführung der Versuche fand in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Vorschriften über den Tierschutz statt.

3.2.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte in handelsüblichen Käfigen in Gruppen und unter Einhaltung eines 12-stündigen Tag-Nacht Rhythmus. Die Tiere hatten freien Zugang zu handelsüblichem Trockenfutter und Trinkwasser.

3.2.2 Vorbehandlung mit Simvastatin

3.2.2.1 Ansetzen der Simvastatin-Lösung

Simvastatin in Reinsubstanz (MSD SHARP & DOHME GMBH, Haar, BRD) wurde als 4 mg/ml Stock hergestellt und anschließend mit isotoner Kochsalzlösung (Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 % Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) auf 1 mg/ml, beziehungsweise 0,1 mg/ml verdünnt. Für den Stock wurden zunächst 4 mg Simvastatin in 100 µl Ethanol und 150 µl 0.1 N NaOH gelöst und anschließend bei 50°C für zwei Stunden inkubiert. Danach wurde der pH-Wert auf 7 titriert (Leung, Sattar et al. 2003).

3.2.2.2 Intraperitoneale Verabreichung des Medikamentes

Die Verabreichung des Medikamentes erfolgte sieben Tage vor der Durchführung des Versuchs im modifizierten Langendorff-Modell jeweils täglich intraperitoneal. Hierzu wurden die Tiere mit Isofluran (Isofluran-Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, BRD) kurz narkotisiert um unnötigen Stress zu vermeiden.

3.2.2.3 Auswirkungen der Behandlung mit Simvastatin auf den Cholesterinspiegel

Zur Untersuchung der Veränderung des Cholesterin-, LDL- und HDL-Spiegels im Blut unter der Behandlung mit Simvastatin wurde den Tieren vor Beginn der Behandlung und nach sieben Tagen Blut aus der Zungengrundvene in einer kurzen Isoflurannarkose abgenommen. Dazu wurde die Zunge leicht herausgezogen, die Vene angeschlitzt und 0,5-1ml Blut anschließend in einem Mikro- Probengefäß mit Lithium-Heparin (Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, BRD) aufgefangen. Die Bestimmung der Werte erfolgte im Labor des Instituts für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Gießen. Die Ergebnisse wurden photometrisch ermittelt.

3.2.3 Entnahme der Femurknochen

Die Femurknochen wurden einer zuvor durch Exsanguation in balancierter Allgemeinanästhesie mit Isofluran und Ketamin (Ketanest, 1,0mg/100g KG i.m., PFIZER PHARMA GmbH, Karlsruhe, BRD) kombiniert mit Xylazinhydrochlorid (RompunTS, 1,0mg/100g KG i.m., Bayer Vital GmbH, Leverkusen, BRD), getöteten Wistar-Furth Ratte entnommen.

Dazu wurde das Tier auf dem Operationstisch fixiert und dann der Femur durch einen ventralen Schnitt und Entfernen der Muskulatur freigelegt. Nachdem die Gelenkkapseln an Knie und Hüfte eröffnet und alle Ligamente durchtrennt worden sind, wurde der Femur entnommen und in kalter isotoner Kochsalzlösung in einem sterilen Gefäß bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.3 Isolation der Bone Marrow-derived Stem Cells (BMCs)

Die Isolation der BMCs fand unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank (Cleanbench LaminAir HB 2472, Heraeus Instruments, Hanau, BRD) statt. Zur Isolation wurde Macrophagen-SFM Medium (GIBCO, Auckland, Neuseeland) versetzt mit 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO,

Invitrogen Corporation, Paisley, UK), im Folgenden Isolationsmedium genannt, verwendet.

Zur Gewinnung der autologen BMCs wurden beide Femurknochen einer Wistar-Furth Ratte verwendet. Nach Entfernung aller Gewebereste konnte der Knochen proximal und distal eröffnet werden, sodass der Knochenmarksraum zugänglich war.

Mit Hilfe einer sterilen 5 ml Einmalspritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) mit aufgesetzter Nadel der Größe 0,9x40 mm (BD Microlance 3, Beckton Dickinson, Drogheda, Irland) wurde der Knochenmarksraum mit jeweils 25 ml Isolationsmedium durchspült und ausgekratzt. Danach wurden die gewonnenen Zellen durch Spritzen durch eine 0,6x30 mm (BD Microlance 3, Beckton Dickinson SA, Fraga, Spanien) und anschließend eine 0,45x13 mm (BD Microlance, Beckton Dickinson SA, Fraga, Spanien) Kanüle in ein 50 ml Greiner Röhrchen (Greiner BioOne, Frickenhausen, BRD) voneinander getrennt. Das Medium mit den Zellen wurde anschließend für zehn Minuten bei 1400 U/min und 23°C zentrifugiert (Megafuge 3.0, Hereaus Instruments, Hanau, BRD).

Das Zellpellet wurde vorsichtig gelöst und mit 10 ml Isolationsmedium aufgefüllt. Anschließend wurden in ein 14 ml Polypropylen-Röhrchen (Greiner BioOne, Frickenhausen, BRD) jeweils 5 ml der Zellsuspension auf 5 ml Ficoll Gradienten (Ficoll Paque Plus, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) aufgeschichtet. Nun wurde für eine halbe Stunde bei 1400 U/min bei 23°C ohne Bremse zentrifugiert.

Im Anschluss an die Zentrifugation wurde die entstandene Zellbande abgenommen, in ein 50 ml Greiner Röhrchen gefüllt und bis zur 50 ml Markierung mit Dulbecco's Phosphate buffered Saline (1x) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, BRD), das als Waschlösung diente, aufgefüllt. Es erfolgte nun eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 1400 U/min und 23°C. Das Zellpellet wurde wiederum vorsichtig gelöst und mit 10 ml Isolationsmedium aufgefüllt.

3.3.1 Zellzählung

Durch Abnahme von 14 µl der Zellsuspension und Färbung mit 14 µl Trypanblau (Trypan Blue Solution (0,4%), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD) erfolgte in der Neubauer Zählkammer (OptikLabor, Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm²) eine Zählung der vitalen Zellen. Auch alle weiteren Zellzählungen wurden in einer Zählkammer nach Neubauer durchgeführt.

3.3.2 Fluoreszenzfärbung

Anschließend wurden die Zellen wiederum bei 23°C und 1400 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte mit dem PKH26 Red Fluorescent Phagocytotic Cell Linker Kit (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD). Pro 5x10⁶ Zellen wurden 0,5 ml Puffer B verwendet und pro Milliliter Puffer B 4 µl des Farbstoffes. Dabei wurden zuerst die Zellen mit der Hälfte des Puffers versetzt und gelöst und die andere Hälfte des Puffers in einem separaten Greiner Röhrchen mit der Farbe vermischt. Anschließend wurden die Zellmischung und die Farbmischung zusammengegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 0,5 ml fetales Kalbsserum (Seromed Biochrom KG, Berlin, BRD) zugegeben und für eine Minute inkubiert.

Zum Entfernen von Farbüberschuss und des fetalen Kalbsserums wurde das Greiner Röhrchen bis 50 ml mit Isolationsmedium aufgefüllt und für zehn Minuten bei 1400 U/min und 23°C zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgegossen, das Zellpellet vorsichtig gelöst und mit 2 ml Isolationsmedium aufgefüllt. Nun fand eine Zellzählung statt, nach deren Ergebnis 18x10⁶ Zellen abgenommen, nochmals aufgefüllt und zentrifugiert, wiederum mit 2 ml Isolationsmedium aufgefüllt und anschließend nochmals gezählt wurden.

Nun wurde die Zellsuspension bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau, BRD) bei 5% CO₂ und 38°C aufbewahrt.

3.4 Versuchsmodell des isoliert schlagenden Herzens/modifiziertes

Langendorff-Modell

3.4.1 Aufbau

Der Aufbau des Modells des isoliert schlagenden Herzens ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. In einem doppelwandigen, geheizten Behälter wird die Perfusionslösung auf 37°C gewärmt und mit 95% O₂ und 5% CO₂ versetzt. Mit Hilfe einer Rollerpumpe wird die Perfusionslösung kontinuierlich durch die Perfusionskanüle über die Aorta in die Koronarien und über das venöse Koronarsystem bis ins rechte Atrium befördert. Über den Druckdom an der Perfusionskanüle können die BMCs dem Perfusat zugefügt werden.

Der koronare Perfusionsdruck wird kontinuierlich über einen Druckabnehmer (Combitrans, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD), der mit der Perfusionskanüle verbunden ist, bestimmt. Der linksventrikuläre systolische und enddiastolische Druck (LVEDP) werden über einen Latexballon (Durchmesser 3 oder 4mm, Hugo Sachs Elektronik KG, Mach, BRD) im linken Ventrikel, der mit einem Druckabnehmer verbunden ist, gemessen. Im Behälter unter dem isoliert schlagenden Herzen kann das Effluat aus dem Herzen aufgefangen werden.

Folgende Werte wurden für die Versuchsdurchführung eingehalten:

Perfusionsdruck	60-70 mmHg
LVDP	60-80 mmHg
Perfusat	
pH	7,35-7,45
pO ₂	>400 mmHg
pCO ₂	variabel nach pH-Wert
Temperatur	37°C

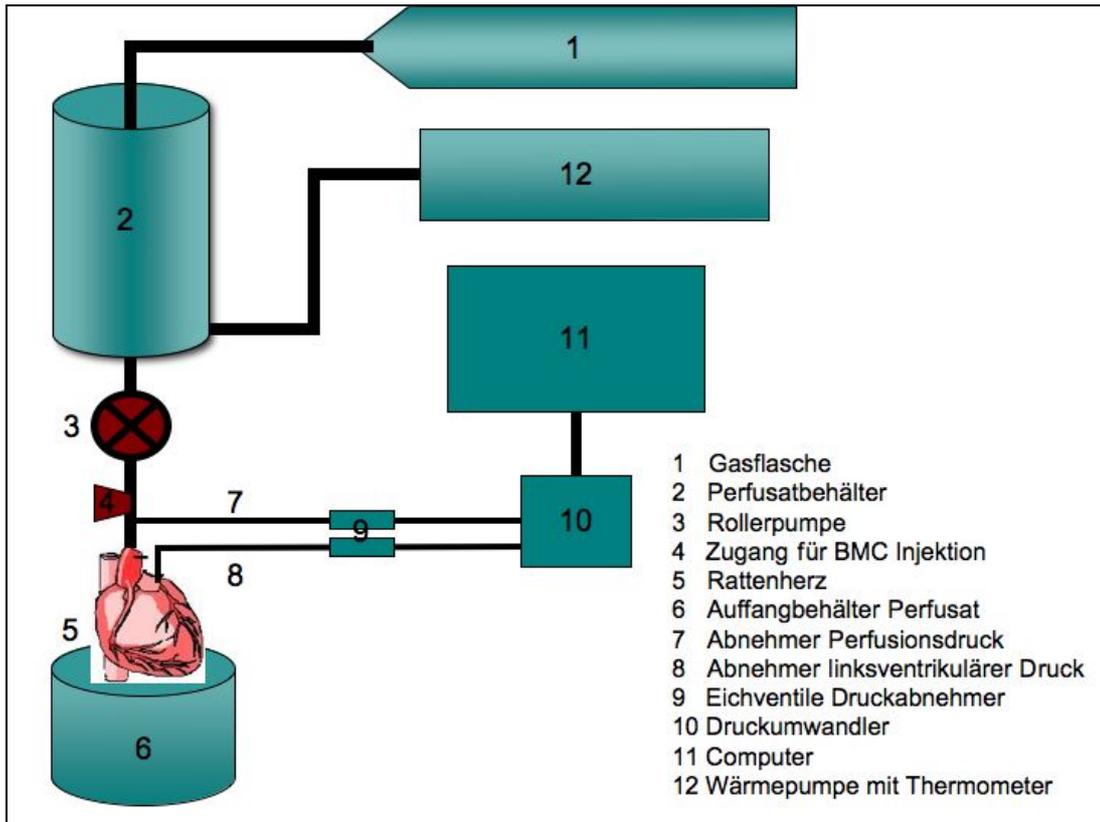


Abbildung 4 Versuchsaufbau modifiziertes Langendorff-Modell

3.4.2 Perfusionslösung

Zur Perfusion der Koronarien wurde eine fertige Elektrolytlösung 1/3 (Serag-Wiessner KG, Naila, BRD) mit folgendem Inhalt verwendet:

Calciumchlorid-Dihydrat	2,4 mmol/l
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	1,3 mmol/l
Calciumchlorid	4,3 mmol/l
Kaliumhydrogenphosphat	1,1 mmol/l
Natriumchlorid	125 mmol/l
Glukose	13,32 mmol/l

975 ml der Elektrolytlösung 1/3 wurden mit 25 ml NaHCO₃ (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) versetzt und als Perfusat verwendet. Der pH-Wert des Perfusats wurde vor Versuchsbeginn auf 7,35 - 7,45 mit Hilfe von 1 molarem NaHCO₃ eingestellt. Der onkotische Druck sowie die Osmolalität wurden mit einem Onkometer (BMT 921, Dr. Karl Thomae, Biberbach, BRD) und einem Mikro-Osmometer (Roebeling Messtechnik, Berlin, BRD) kontrolliert.

3.4.3 Monitoring

3.4.3.1 Kontinuierliches Monitoring

Über den Ballon im linken Ventrikel wurden der linksventrikuläre systolische und enddiastolische Druck mit einem Druckabnehmer kontinuierlich gemessen. Des Weiteren fand ein kontinuierliches Monitoring des koronaren Perfusionsdruckes mit einem Druckabnehmer statt. Die Registrierung und Aufzeichnung der Werte erfolgte mit einem Macintosh Computer und den Programmen MacLab (GE Healthcare, München, BRD) und Chart 4.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.4.3.2 Diskontinuierliches Monitoring

Vor Beginn des Versuches und danach jeweils alle fünf Minuten wurden Perfusatproben zur Bestimmung des pH-Wertes und der Gaskonzentration abgenommen. Die Werte wurden mit dem Blutgasanalysegerät ABL 330 (Radiometer GmbH, Willich, BRD) bestimmt. Proben zur Bestimmung der Kreatinkinase wurden jeweils vor der Ischämie, vor der Zellgabe und alle fünf Minuten nach der Gabe der BMCs aus dem Effluat gewonnen.

3.4.4 Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität

Die Bestimmung der Kreatinkinaseaktivität wurde im Labor des Instituts für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Gießen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden photometrisch ermittelt. Die Proben wurden hierzu vorher für 10 min bei 4°C und 4000 U/min zentrifugiert und dann abpipetiert um vorhandene Zellen zu eliminieren.

3.4.5 Organentnahme

Vor der Organentnahme wurden dem entsprechenden Tier zur Koagulationsprophylaxe 500 I.E./kg KG Heparin (Liquemin, Roche AG, Grenzach-Wyhlen, BRD) intramuskulär verabreicht. Nach 30 Minuten wurde dann die balancierte Allgemeinanästhesie unter Spontanatmung mit Isofluran (Isofluran-Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, BRD) eingeleitet und durch Ketamin (Ketanest, 1,0mg/100g KG i.m., PFIZER PHARMA GmbH, Karlsruhe, BRD) kombiniert mit Xylazinhydrochlorid (RompunTS, 1,0mg/100g KG i.m., Bayer Vital GmbH, Leverkusen, BRD) ergänzt.

In Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert wurde an dem Tier zunächst eine mediane Laparotomie durchgeführt. Anschließend wurde der Schnitt beidseits nach lateral entlang des Rippenbogens erweitert ohne dabei das Zwerchfell zu verletzen. Dann konnte nach beidseitiger ventro-lateraler Abtrennung des Zwerchfells eine Sternotomie vollzogen werden.

Bei nun freiem Blick auf das Herz-Lungen Paket wurden zunächst der Herzbeutel eröffnet und die Aorta freipräpariert bis man die abgehenden und ankommenden Gefäße gut überblicken konnte. Der Aortenbogen wurde oberhalb des Abganges der Arteria brachiocephalica abgesetzt, die Venae Cavae durchtrennt und das Herz-Lungen Paket entlang der Wirbelsäule abgelöst. Das komplette Explantat wurde zur Kardioplegie in 4°C kaltes Aqua ad injectabilia (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) gelegt. Hier wurde nun das Herz weiter freipräpariert, indem die Lungenflügel und anderes Gewebe abpräpariert wurden.

3.4.6 Fixierung und Vorbereitung des Herzens

Das freipräparierte Herz wurde anschließend fixiert. Dazu wurde der Aortenstumpf mit zwei atraumatischen Pinzetten ergriffen und dann bis über die Fixierungsrille an der Aortenkanüle gezogen und mit einer Krokodilklemme kurzfristig fixiert. Nun wurde mit einem Faden in der Höhe der Fixierungsrille der Aortenstumpf gleichzeitig abgedichtet, das Herz fixiert und mit der Perfusion begonnen. Anschließend wurde in den linken Ventrikel,

über den leicht eröffneten linken Vorhof, durch die Mitralklappe hindurch der mit dem Druckaufnehmer verbundene Ballon eingeführt.

3.4.7 Versuchsdurchführung

Bei Versuchsbeginn wurde eine fünf Minuten lange Steady-State Phase durchgeführt, an deren Ende eine erste Probe des Effluats für die Bestimmung der Kreatinkinase abgenommen wurde. Danach erfolgte je nach Planung die jeweils unterschiedliche Durchführung des Versuchs. Nach der Ischämie und dann in fünfminütigen Abständen nach der Gabe der BMCs wurden weitere Kreatinkinase-Proben entnommen. Des Weiteren wurde das Effluat nach der Zellgabe gesammelt und eine Auswertung der im Effluat enthaltenen BMCs jeweils alle fünf Minuten durchgeführt, bis keine Zellen mehr im Effluat enthalten waren.

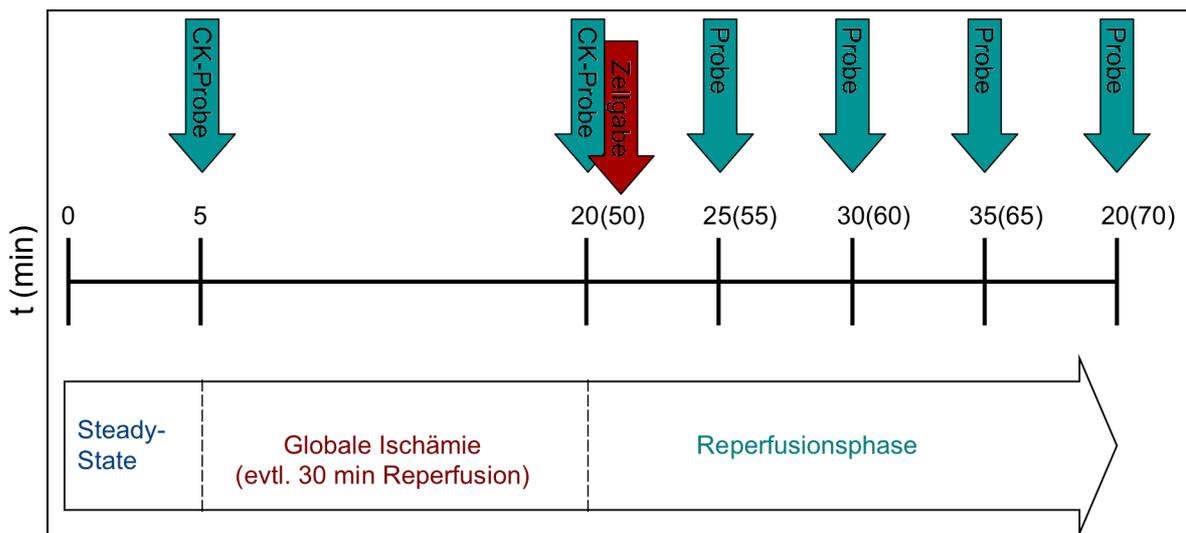


Abbildung 5 Versuchsablauf Langendorff-Modell

3.5 Versuchsreihen

Es wurden insgesamt 46 verwertbare Versuche in sieben verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt (siehe Tab.1).

Tabelle 1: Versuchsgruppen

Dosierung Simvastatin	Anzahl Versuchstiere	Reperfusion (min)
0,1 mg/kg KG/d	n=10	0
1,0 mg/kg KG/d	n=10	0
1,0 mg/kg KG/d	n=5	30
0,1 mg/kg KG/d	n=4	30
Trägersubstanz	n=5	0
keine Vorbehandlung	n=5	0
keine Vorbehandlung	n=7	30

3.6 Gefrierschnitte

Nach Beendigung des Versuchs am modifizierten Langendorff-Modell wurde das Herz abgenommen und in der Klappenebene und der Mitte der Ventrikel durchtrennt. Die entstandenen Stücke wurden auf einem Korkplättchen in Gewebekleber (Tissue-Tek O.C.T™ Compound, Sakura Finetek U.S.A., Inc., Torrance, USA) eingebettet und in Flüssigstickstoff eingefroren und anschließend im Gefrierschrank (-80°C) in einem geeigneten Behältnis aufbewahrt, bis die Schnitte angefertigt wurden.

3.6.1 Anfertigung

Die Gefrierschnitte wurden von der Klappenebene erstellt, da sich hier die Gefäße aufgrund ihrer Größe besonders gut darstellen lassen. Im Mikrotom (Kryostat CM1900, Leica, Wetzlar, BRD) wurden 10µm dicke Schnitte angefertigt, die anschließend auf einen Glas-Objektträger aufgebracht wurden. Die Schnitte wurden dann im Gefrierschrank (-80°C) bis zur Färbung aufbewahrt.

3.6.2 Färbung

Die vaskulären Endothelzellen wurden zunächst mit Hilfe eines anti-CD-34 Antikörpers (anti Ratte- anti Maus CD 34 (ICO 115): sc-7324, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA., U.S.A.) für zwei Stunden bei Raumtemperatur (mit der Verdünnung 1:50) inkubiert, anschließend nach Waschvorgängen mit dem fluoreszierenden anti Maus IgG (Alexa Fluor 488, Invitrogen Corporation, Paisley, UK) für weitere zwei Stunden (mit der Verdünnung

1:750) inkubiert. Die myokardialen Zellen wurden mit DAPI (4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD) gegengefärbt. Beide Färbungen wurden gemäß gängigen Standards nach Herstellerangabe durchgeführt.

3.6.3 Auswertung

Am Fluoreszenzmikroskop BX60 (Olympus, Hamburg, BRD) wurden die entsprechenden Schnitte ausgewertet und mit der angeschlossenen Digitalkamera Hitachi KP-M1E/K (Hitachi Denshi (Europe), Garforth, UK) digitale Fotografien angefertigt.

3.7 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Programms SPSS (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, USA) durchgeführt. Als Signifikanzniveau für alle folgenden statistischen Analysen wurde $\alpha = .05$ festgelegt.

Unterschiede in der Zellrekrutierung nach differentieller Vorbehandlung wurden in einer Teilstichprobe von 16 Tieren mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt, in der die Dosis von Simvastatin als Zwischensubjektfaktor (1mg vs. 0,1mg vs. 0 mg) gesetzt wurde. Anschließend wurde der Scheffe-Test als post-hoc Verfahren angewendet. Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Anzahl der eingesetzten Zellen einen Einfluss auf den Zusammenhang zwischen Simvastatin Gabe und Zellrekrutierung ausübt, wurden im Abschluss die Analysen ebenfalls hinsichtlich des prozentualen Anteils rekrutierter Zellen durchgeführt. Analog zu den beschriebenen Analysen erfolgte die Auswertung des Einflusses einer Reperfusion auf die Zellrekrutierung an einer Teilstichprobe von 29 Tieren mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA (Reperfusion vs. keine Reperfusion) sowohl durch eine Analyse absoluter als auch der Betrachtung von Veränderungswerten. Veränderungen der Kreatinkinase während der Versuchsdurchführung wurden mit dem Wilcoxon-Rangtest berechnet. Abschließend wurden Veränderungen von Gesamtcholesterin, LDL- und

HDL-Cholesterin nach einer 7-tägigen Behandlung zunächst für die Gesamtgruppe mit Hilfe paarweiser t-tests für abhängige Stichproben ermittelt, um zunächst unspezifische Anstiege/Abfälle zu ermitteln (z.B. aufgrund von Stress oder Wachstum in allen Versuchsgruppen). Im Anschluss erfolgte die Überprüfung differentieller Veränderungswerte in Abhängigkeit der jeweiligen Behandlung (Simvastatin 0,1mg/kgKG vs. 1,0 mg/kgKG vs. Trägersubstanz) durch eine einfaktorielle ANOVA (Zwischensubjektfaktor: Behandlungsgruppe) mit Messwiederholungsdesign.

4 Ergebnisse

4.1 Zellrekrutierung unter verschiedenen Bedingungen

4.1.1 Auswirkung einer Reperfusionphase auf die Zellrekrutierung

Zunächst wurde die Auswirkung einer 30-minütigen Reperfusionphase auf die Zellrekrutierung getestet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Dosierungsgruppen Reperfusionphase

Simvastatin 1,0 mg/kg KG/d und 0,1 mg/kg KG/d	n=20	15 min globale I-schämie	keine Reperfusion
Simvastatin 1,0 mg/kg KG/d und 0,1 mg/kg KG/d	n=9	15 min globale I-schämie	30 min Reperfusion

Dabei zeigte sich ein signifikanter Effekt der Reperfusion auf die Zellrekrutierung ($F(1,27) = 9,86$; $p = 0.004$; Abb. 6).

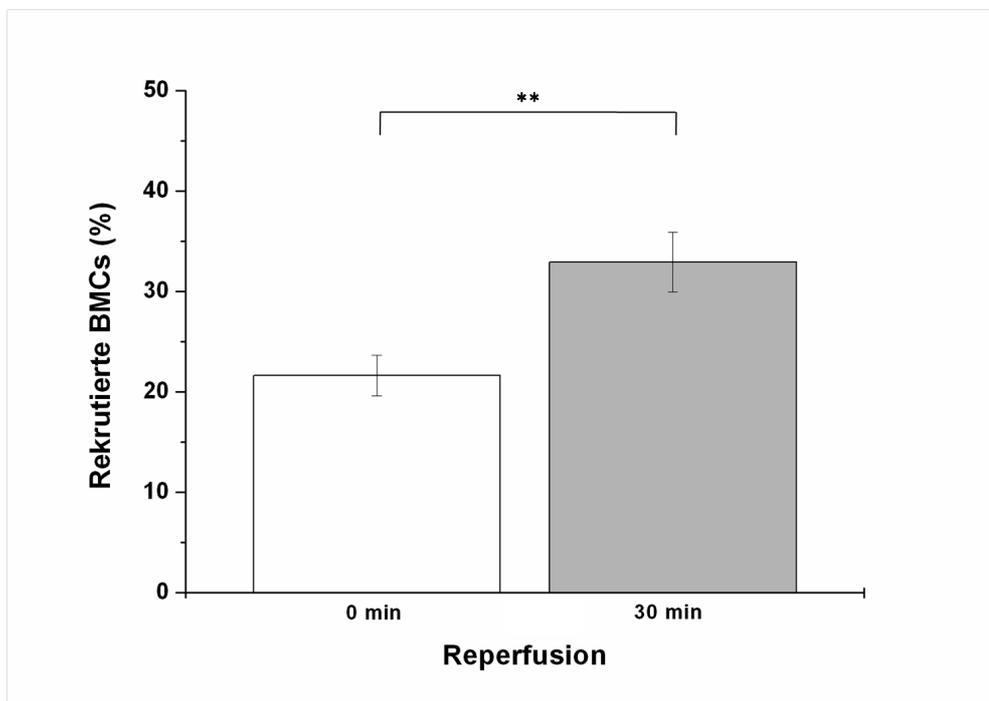


Abbildung 6 Zellrekrutierung (Mittelwert und Standardfehler in Abhängigkeit der Reperfusionphase (prozentuale Werte))

4.1.2 Auswirkung von Simvastatin auf die Zellrekrutierung

Die Auswirkung einer Vorbehandlung mit Simvastatin wurde in drei unterschiedlichen Versuchsgruppen ermittelt, die alle nach Gabe des Medikamentes einer globalen Ischämie von 15 min ausgesetzt waren und nach 30 minütiger Reperfusion eine Zellgabe ($M = 17,25 \times 10^6$, $SD = 2,85 \times 10^6$) erhielten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Dosierung von Simvastatin in den Versuchsgruppen

Dosierung Simvastatin	Anzahl der Versuchstiere
1,0 mg/kg KG/d	n=5
0,1 mg/kg KG/d	n=4
0 mg/kg KG/d	n=7

Es zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zellrekrutierung in Abhängigkeit der Simvastatin Dosierung ($F(2,13) = 13,22$; $p = 0.001$, Abb. 7). Um für Effekte versuchsbedingter Schwankungen in den injizierten Zellzahlen zu korrigieren, wurde im Anschluss eine zusätzliche, auf dem prozentualen Anteil rekrutierter Zellen basierte ANOVA durchgeführt, in der sich ebenfalls ein signifikanter Effekt der Simvastatin Dosierung auf die Zellrekrutierung nachweisen ließ ($F(2,13) = 6,90$; $p = 0.009$, Abb. 8).

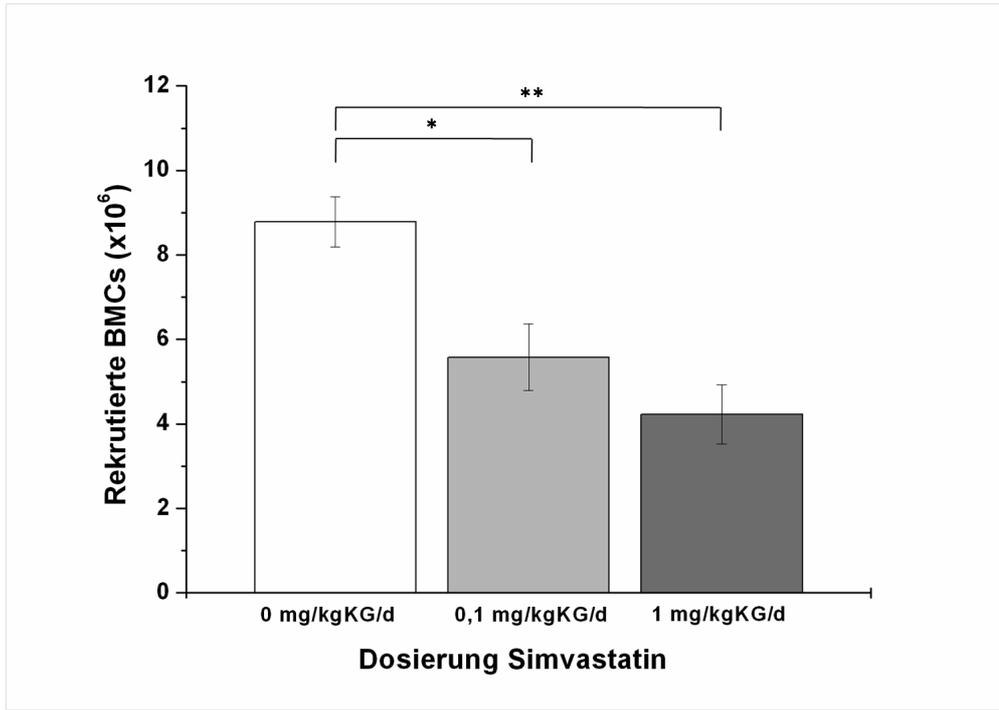


Abbildung 7 Anzahl der rekrutierten Zellen (Mittelwert und Standardfehler) in Abhängigkeit der Simvastatin Dosierung (absolute Werte)

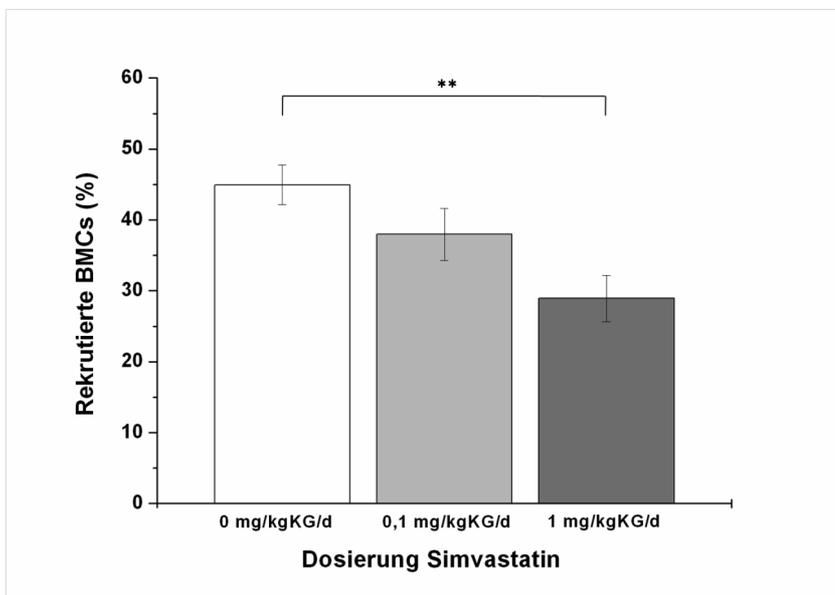


Abbildung 8 Anzahl der rekrutierten Zellen (Mittelwert und Standardfehler) in Abhängigkeit der Simvastatin Dosierung (prozentuale Werte)

In sich anschließenden post-hoc Tests (Scheffe-Test) zeigte sich, dass dieser Effekt auf eine signifikant geringere Zellrekrutierung (absolute Werte) sowohl in der hoch (MD = -4,55; p = 0.001) als auch in der niedrig dosierten (MD = -3,20; p = 0.021) Medikamentengruppe zurückzuführen ist, wenn diese mit der Gruppe unbehandelter Ratten verglichen wurden, wobei sich das Ausmaß der Zellrekrutierung nicht zwischen der 1mg/kg und der 0,1mg/kg Bedingung unterschied (MD = 1,35; p = 0.461). Im Anschluss erfolgte ebenfalls eine auf dem prozentualen Anteil rekrutierter Zellen basierende post-hoc Auswertung, wobei hier lediglich unter der hohen Statindosierung (1mg/kg) eine signifikant verminderte Zellrekrutierung im Vergleich zur Trägersubstanz nachgewiesen werden konnte (MD = -16,02; p = 0.009) und sich im Gegensatz zum Vergleich hinsichtlich absoluter Zellzahlen die rekrutierten Zellzahlen nicht zwischen 0,1mg/kg Dosierung und Nichtbehandlung unterschieden (MD = -6,98; p = 0.349).

Somit kann festgehalten werden, dass die Behandlung mit Simvastatin zu einer signifikant verminderten Zellrekrutierung nach globaler Ischämie und sich anschließender Reperfusion führt, wobei dieser Effekt stabiler unter der 1 mg/kg Dosierung zu beobachten ist und ebenfalls nach einer Korrektur um die eingesetzten Zellzahlen zu finden ist.

4.2 Visuelle Auswertung

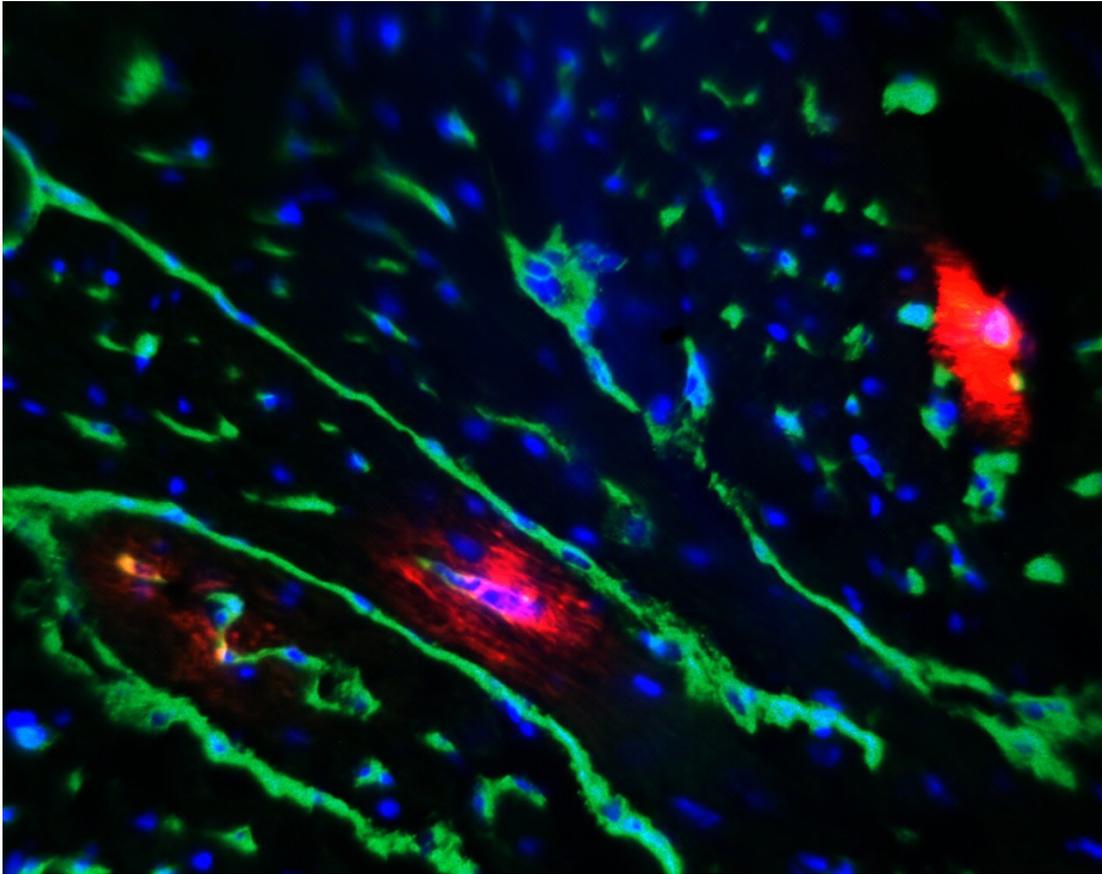


Abbildung 9: Endothel (grün) mit einer intravaskulär zu sehenden BMC (rot), sowie einer weiteren BMC, die sich bereits extravaskulär befindet, umgeben von myokardialen Zellen (blaue Zellkerne)

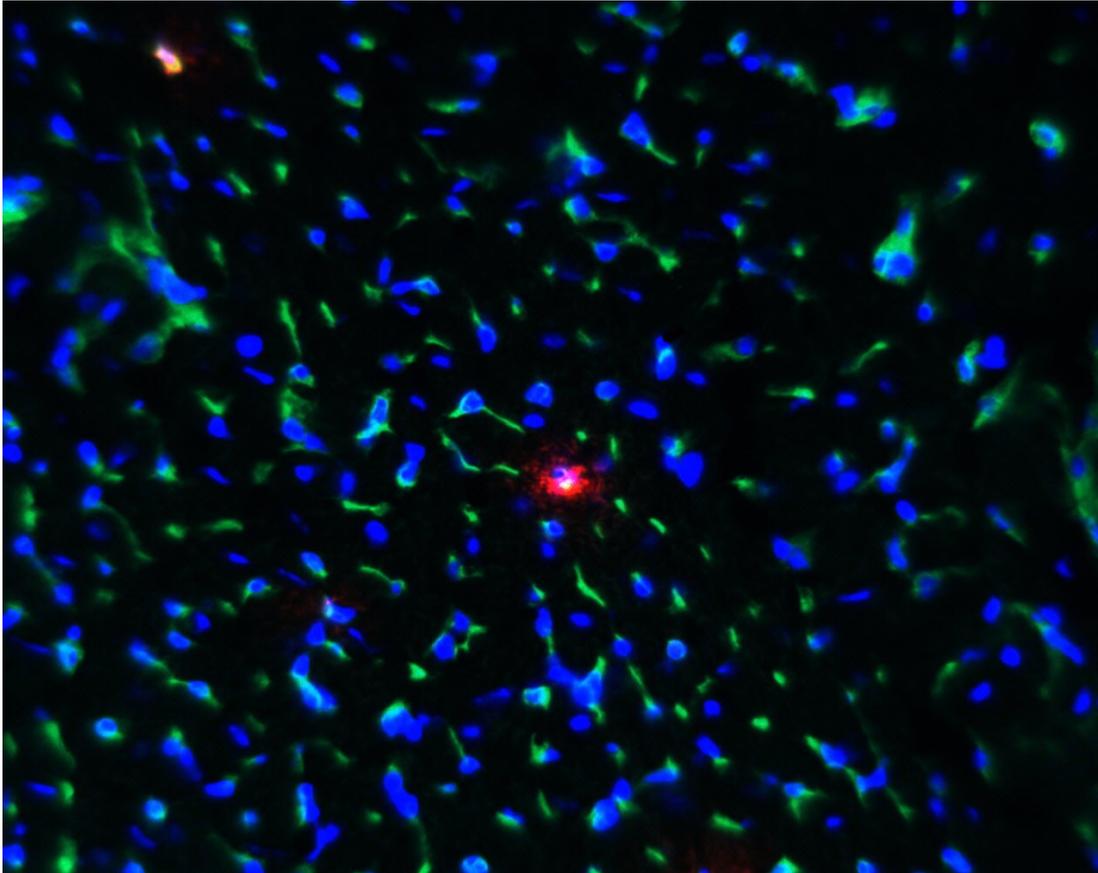


Abbildung 10: Eine bereits ins Myokard eingewanderte BMC (rot), umgeben von myokardialen Zellkernen (blau).

4.3 Veränderung der Kreatinkinase im Effluat

Die Veränderung der Gesamtkreatinkinase und des Isoenzym MB nach Ischämie wurde mit Hilfe eines Wilcox Rangsummentests ermittelt. Dabei konnten sowohl hinsichtlich der Gesamtkreatinkinase ($z=-3,77$ $p<.001$) als auch im Hinblick auf Isoenzym MB ($z=-2.96$ $p=.005$) signifikante Anstiege der Konzentrationen 15 min nach Induktion der Ischämie beobachtet werden (Abb.11 und 12).

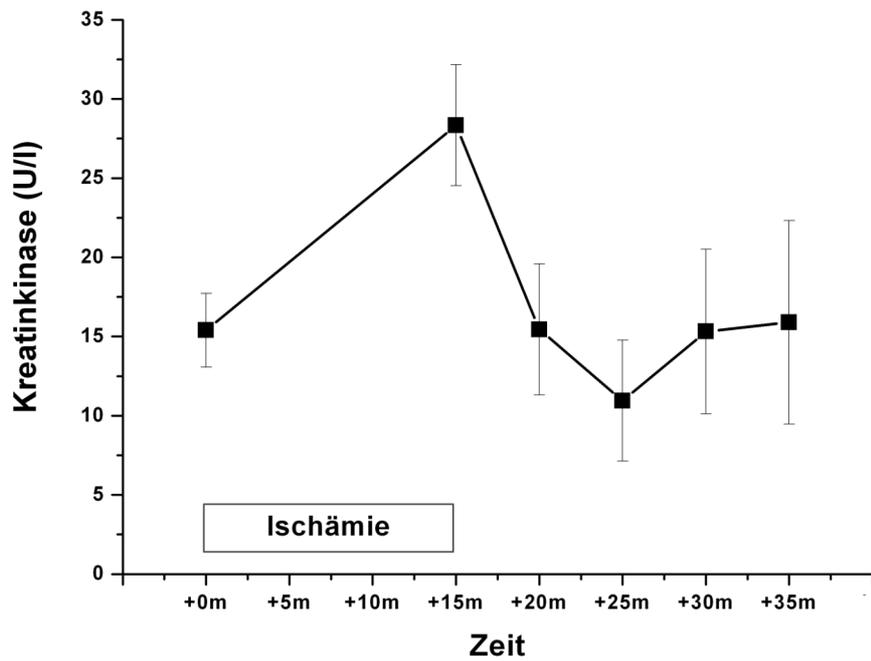


Abbildung 11: Veränderung Gesamtkreatinkinase im Versuchsverlauf

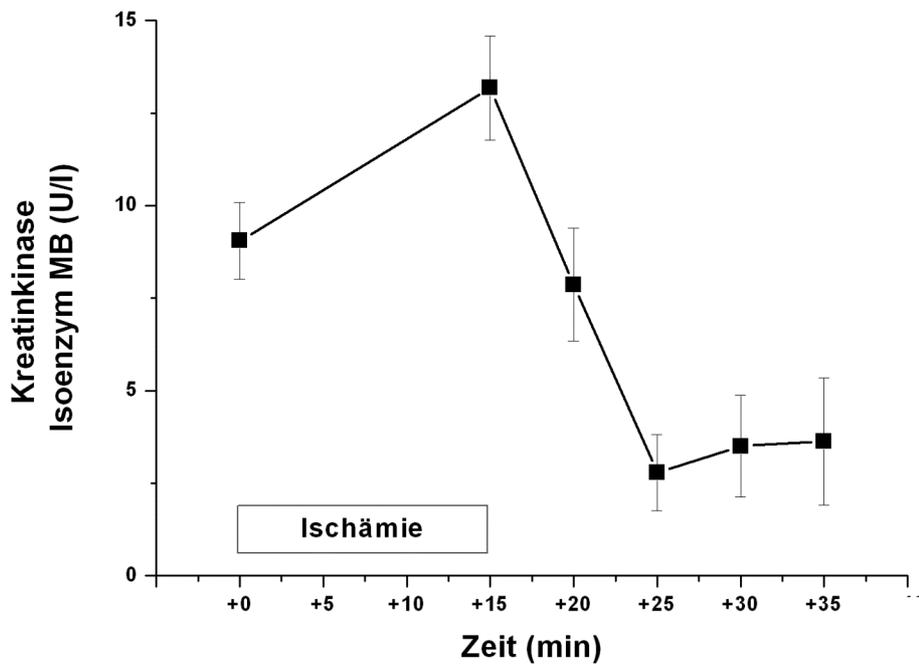


Abbildung 12: Veränderung Kreatinkinase Isoenzym MB im Versuchsverlauf

4.4 Die Auswirkungen der Behandlung mit Simvastatin auf den Cholesterin-, HDL- und LDL-Spiegel

Abschließend wurde geprüft, ob die Gabe von Simvastatin in unterschiedlicher Dosierung (0,1 mg/kgKG und 1 mg/kgKG) zu differentiellen Veränderungen von Cholesterin, HDL- und LDL- Spiegel nach einwöchiger Therapie führt im Vergleich zur Gabe einer Trägersubstanz.

Innerhalb der Gesamtgruppe konnten in Folge der Behandlung signifikante Abfälle von Cholesterin ($t(24) = 3,85$, $p < 0.001$; Abb. 13) und HDL ($t(24) = 5,85$; $p = 0.03$; Abb. 14), sowie ein signifikanter Anstieg von LDL ($t(24) = 5,59$, $p < 0.001$; Abb. 15) im Vergleich zu den Ausgangswerten beobachtet werden. Die varianzanalytische Auswertung zeigte jedoch, dass diese Veränderungen unabhängig von einer Behandlung mit Simvastatin erfolgten und sich somit keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Behandlungsgruppen hinsichtlich der Abfälle von Cholesterin ($F(1,12) = 0.84$; $p = 0.38$) und HDL ($F(1,12) = 0,60$; $p = 0.45$) sowie der Anstiege von LDL ($F(1,12) = 0,46$; $p = 0.46$) zeigten.

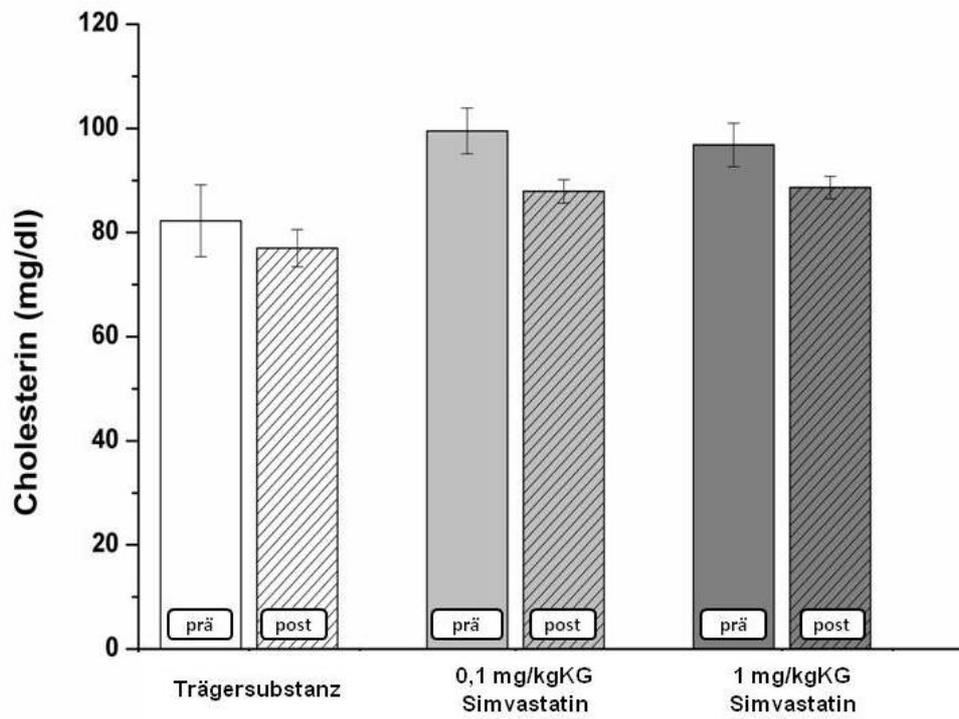


Abbildung 13: Cholesterinspiegel vor und nach Behandlung

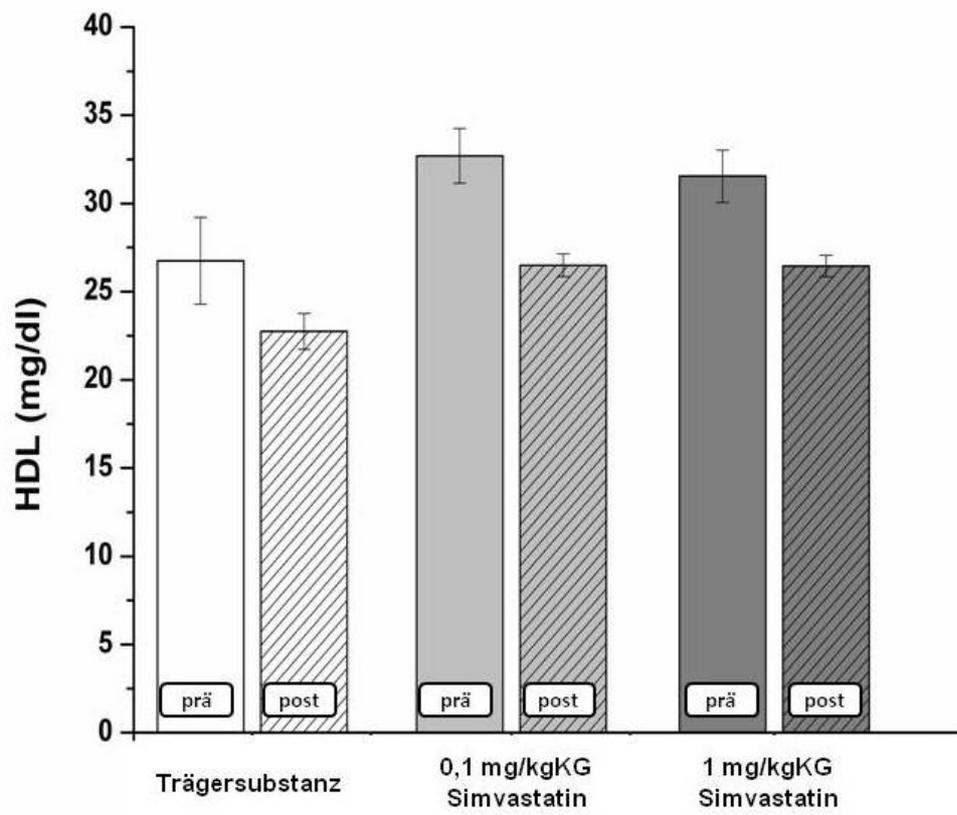


Abbildung 14: HDL-Cholesterinspiegel vor und nach Behandlung

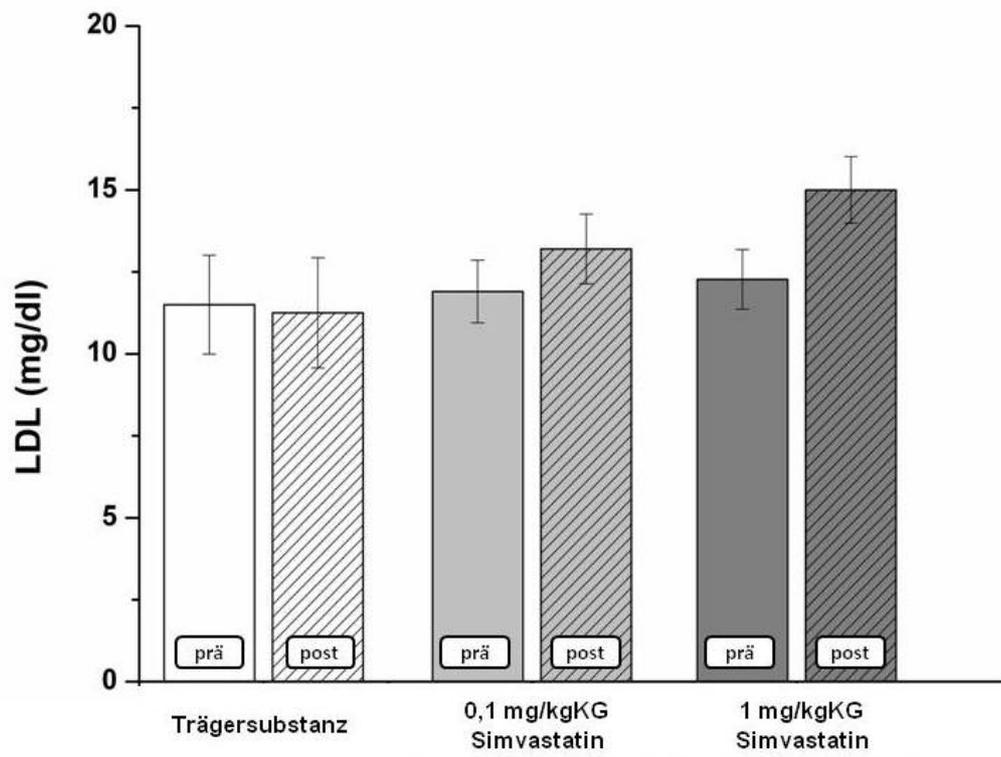


Abbildung 15: LDL-Cholesterinspiegel vor und nach Behandlung

5 Diskussion

5.1 Rekrutierung von BMCs unter Statintherapie

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von BMCs im ischämisch-reperfundierten Myokard durch eine Statintherapie dosisabhängig reduziert wird.

Der Mechanismus dieser verminderten Rekrutierung von BMCs ist bis jetzt nicht endgültig geklärt. Ein Einfluss von Simvastatin auf die Ausbildung endothelialer Rezeptoren, die zum Homing von BMCs führen erscheint hier sehr wahrscheinlich. Man geht davon aus, dass das Homing von BMCs über sehr ähnliche Mechanismen erfolgt wie bei Leukozyten. Die Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe ist sehr gut erforscht und besteht aus mehreren einzelnen Schritten. Diese bestehen aus (1) Anhaftung und Rollen, (2) Aktivierung und (3) der Transmigration durch die Gefäßwand. Bei diesen Schritten sind Adhäsionsmoleküle aus den Gruppen der Selektine, der Integrine und Rezeptoren der Immunglobulinsuperfamilie zu verschiedenen Zeitpunkten involviert.

Die Bedeutung einzelner Adhäsionsmoleküle für das Homing von Progenitorzellen konnte schon in einigen Studien aufgezeigt werden. So zeigten Frenette et al. in einer Studie mit P- und E-Selektin Knockout-Mäusen den Einfluss endothelialer Selektine, die für eine lockere Anhaftung der Zellen sorgen, auf die Rekrutierung hämatopoietischer Stammzellen (HPC) auf (Frenette, Subbarao et al. 1998). Hierbei wurden Mäuse in einer tödlichen Dosis bestrahlt und anschließend mit hämatopoietischen Stammzellen behandelt. Bei den P- und E-Selektin Knockout Mäusen wurden signifikant weniger HPCs ins Knochenmark rekrutiert, des Weiteren waren nach einer 14-stündigen Perfusion der Zellen deutlich mehr HPCs zirkulierend nachweisbar als bei normalen Mäusen. Eine weitere Verringerung der Rekrutierung war auffällig, wenn zusätzlich ein VCAM1-Antikörper verabreicht wurde. Mit dieser Arbeit konnte also gezeigt werden, dass die Selektine eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Stammzellen spielen, des Weiteren auch VCAM-1.

Peled et al. stellten in ihrer Studie das Rollen von CD34-positiven Zellen auf P-Selektin, E-Selektin und dem CD44-Liganden Hyaluronsäure unter physiologischer Scherströmung in vitro dar (Peled, Grabovsky et al. 1999).

Die Bedeutung der β -Integrine für das Homing von endothelialen Progenitorzellen (EPCs) konnten Chavakis et al. mit ihren in vitro erlangten Ergebnissen zeigen, sie demonstrierten, dass β 2-Integrine die Adhäsion von EPCs zum Endothel und zu extrazellulären Matrixproteinen vermitteln (Chavakis, Aicher et al. 2005).

Außerdem führten sie Versuche an β 2-Integrin-defizienten Mäusen durch, bei denen eine Ischämie der hinteren Extremität durchgeführt wurde, wobei der Einfluss der β 2-Integrine auf das Homing von murinen Sca-1⁺/Lin⁻ hämatopoietischen Progenitorzellen in ischämisches Gewebe in vivo gezeigt wurde (ibid).

Vorangehende Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten mittels Antikörperblockierung des bei Leukozyten wichtigsten Adhäsionsmoleküls PECAM-1 zeigen, dass auch die Rekrutierung von BMCs im Ischämie-Reperfusionmodell nach Langendorff über PECAM-1 reguliert wird. (Sequeira, Schifferings et al. 2005)

Bezüglich der Wirkung von Statinen auf die Exprimierung von Adhäsionsmolekülen gehen die Studien sehr weit auseinander. Einige beschreiben eine Erhöhung der Exprimierung der Adhäsionsmoleküle, andere eine Verminderung der Expression, auch dosisabhängige Effekte werden diskutiert.

Die Arbeitsgruppe um Landmesser konnte durch Versuche mit eNOS-Synthase Knockout-Mäusen unter Statinbehandlung klar die Abhängigkeit von NO auf die Wirksamkeit von Statinen nachweisen. Nach Setzen eines Myokardinfarktes wurden Wildtiere sowie die Knockout Mäuse über 4 Wochen mit Atorvastatin behandelt. Atorvastatin verbesserte signifikant die Revascularisierung, EPC Mobilisation, linksventrikuläre Funktion und das Überleben in den Wildtypen, jedoch nicht in den Knockout Tieren (Landmesser, Engberding et al. 2004).

Auch andere Gruppen zeigten den Zusammenhang zwischen einer Erhöhung des Angebots an NO durch eine Statinbehandlung und die verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen, zum Beispiel VCAM-1 und ICAM1 (De Caterina, Libby et al. 1995; Zapolska-Downar, Siennicka et al. 2004), und P-Selektin (Davenpeck, Gauthier et al. 1994). Weitz-Schmidt et al. konnten nachweisen, dass Statine durch Bindung an eine regulatorische Einheit von beta-2 Integrinen eine Blockierung der Adhäsion mit dem Gegenrezeptor ICAM-1 bewirken (Weitz-Schmidt, Welzenbach et al. 2001).

Schmidt et al. hingegen fanden in Ihrer Arbeit eine Superinduktion von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in humanen vaskulären Endothelzellen nach Stimulation mit TNF-alpha bei Zellen die mit Lovastatin vorbehandelt wurden (Schmidt, Goepfert et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vorbehandlung mit Simvastatin an den BMC-Empfängertieren durchgeführt. Die signifikant verminderte Rekrutierung von BMCs unter einer Statintherapie konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, es muss hier somit von einer verminderten Expression der Adhäsionsmoleküle auf Endothelseite ausgegangen werden. Eine spezifische Testung der einzelnen Adhäsionsmoleküle wurde nicht durchgeführt, dies wäre jedoch sicher eine sinnvolle Ergänzung der Arbeit.

Die Auswirkung von Simvastatin auf Zelladhäsionsmoleküle auf Seiten der BMCs wurde nicht untersucht, da die Spender nicht vorbehandelt wurden. Es liegen jedoch Arbeiten vor, denen zufolge die Wirkung von Statinen im Rahmen der Atherosklerose sich vor allem auf zirkulierende Leukozyten auswirkt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich eine Behandlung mit Atorvastatin auf alle überprüften Leukozyten-Integrine (CD11a, CD18, CD49d und L-Selektin), außer CD11b sowie auf Serum ICAM-1, E-Selektin und von-Willebrand Faktor auswirkt (Stulc, Vrablik et al. 2008). Dieses Verhalten auf BMCs wäre ein Ansatz für die Fortsetzung der aktuellen Arbeit um die Wirkung von Statinen auf die Adhäsionsmoleküle von BMCs zu untersuchen.

5.2 Die Auswirkung einer Reperfusionphase auf die Rekrutierung der BMCs

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Bedeutung einer Reperfusionphase zwischen Ischämie und Zellgabe dargestellt. In den Gruppen, bei denen eine 30-minütige Reperfusionphase durchgeführt wurde, wurden signifikant mehr Zellen rekrutiert als in den Gruppen ohne Reperfusionphase. Diese signifikant höhere Rekrutierung von BMCs weist auf die Bedeutung der Reperfusion für die Rekrutierung von BMCs hin.

Nach Ischämie-Reperfusionsschaden ist das erste Zeichen der endothelialen Dysfunktion eine verminderte Produktion von NO, die nach etwa zweieinhalb bis fünf Minuten nach Reperfusion auftritt. Diese Phase ist gefolgt von einer vermehrten Leukozytenadhäsion etwa 20 Minuten nach Reperfusion, sowie einer gesteigerten Transmigration (Lefer and Lefer 1996).

Für P-Selektin ist eine maximale Hochregulation nach einer Reperfuionszeit von 10-20 Minuten beschrieben (McEver 1991; Weyrich, Buerke et al. 1995). Durch die Speicherung in den Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen ist eine schnelle Expression möglich.

E-Selektin hingegen wird durch eine Stimulation durch Zytokine (z.B. IL-1 β und TNF-alpha) durch de novo Proteinsynthese hochreguliert (Bevilacqua, Pober et al. 1987), dieser Prozess dauert im Vergleich deutlich länger, erst nach etwa 4-6 Stunden ist eine Hochregulation nachweisbar (Lefer and Lefer 1996). Eine Rolle für die Rekrutierung in der akuten postischämischen Phase ist somit unwahrscheinlich.

Die Arbeitsgruppe um Pahl konnte bei Patienten, die eine Aortenbypassoperation erhielten, nach Beendigung der Abklemmzeit und Reperfusion nach etwas mehr als 30 Minuten einen deutlichen Anstieg von CD11b und CD18 im reperfundierten Gebiet nachweisen.(Pahl, Vaziri et al. 2005). Der Komplex aus CD11b und CD18 (CR3) reagiert mit ICAM-1 und sorgt somit für einen wichtigen Schritt der Zelladhäsion nach Ischämie und Reperfusion.

Nakamuta et al. konnten in ihrer Studie zum idealen Zeitpunkt der Verabreichung von BMCs nach Myokardinfarkt bei der Ratte bei intravenöser Gabe einen, 3 und 5 Tage nach Myokardinfarkt keinen Unterschied in der Menge der verbleibenden Zellen im Myokard finden. (Nakamuta, Danoviz et al. 2009)

Es ist somit festzustellen, dass die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wenige Minuten nach der Reperfusionphase beginnt. Eine signifikant höhere Zelladhäsion ist aber aufgrund der Notwendigkeit der Hochregulation und Expression von Zelladhäsionsmolekülen erst nach einer Reperfusionzeit, in der vorliegenden Arbeit 30 Minuten, nachweisbar. Eine Untersuchung dazu, welche Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche des Myokards wann exprimiert wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Dies wäre ein Aspekt für weitergehende Forschung.

5.3 Nachweis der BMCs im ischämischen Myokard

In den angefertigten Schnitten durch das ischämische Myokard konnten die zuvor PKH26-markierten BMCs intramyokardial nachgewiesen werden. Die BMCs wurden somit über die Gefäßwand rekrutiert und ins ischämische Myokard aufgenommen.

5.4 Cholesterin-, LDL- und HDL-Spiegel

In der statistischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass innerhalb einer Woche Veränderungen im Cholesterinspiegel im Sinne eines Abfalls, sowie beim LDL Spiegel im Sinne eines leichten Anstieges feststellbar waren. Dieser Effekt zeigte sich jedoch bei allen Tieren, also sowohl denen, die mit Simvastatin, als auch denen die mit Trägersubstanz behandelt wurden. Der Effekt kann somit nicht auf die Behandlung mit Simvastatin zurückgeführt werden. Am ehesten ist bei den Veränderungen an physiologische Schwankungen, sowie auch Schwankungen und Veränderungen im Rahmen der Wachstumsphase zu denken.

5.5 Anstieg der Kreatinkinase und des Isoenzym MB

Nach der induzierten Ischämie stiegen sowohl die Werte der Kreatinkinase als auch des Isoenzym MB im Vergleich zu Werten vor der Ischämie signifikant an. Daraus kann gefolgert werden, dass eine erfolgreiche ischämische Phase durchgeführt wurde.

5.6 Das Langendorff-Modell als Versuchsmodell

Das Langendorff-Modell ist in der experimentellen Forschung ein etabliertes Modell, das im Laufe der Jahre einige Veränderungen zum ursprünglichen Modell erfahren hat. Eingeführt wurde es durch Oskar Langendorff im Jahre 1895. Trotz seiner langen Historie ist das Langendorff-Modell immer noch zeitgemäß, da hierbei am schlagenden und perfundierten Herzen pharmakologische Einflüsse sowie physiologische Untersuchungen ohne Einfluss von hormonalen oder neuronalen Interaktionen des Organismus erforscht werden können.

Die Nachteile des Langendorff-Modells liegen genau hier. Da das Herz aus dem Organismus herausgenommen wird, fehlen jegliche humorale und neuronale Einflüsse. Des Weiteren kommt es durch den Ersatz des Blutes durch kristalloide Flüssigkeiten zu vergleichsweise hohen und damit unphysiologischen Flussgeschwindigkeiten in den Koronarien.

Nichts desto trotz überwiegen die Vorteile des Modells, insbesondere auch die relativ leichte Erlernbarkeit der Technik und damit eine gute Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. In der vorliegenden Arbeit liegt der Vorteil eben auch genau darin, dass hier unbehandelte BMCs in ein pharmakologisch vorbehandeltes Herz eingebracht werden konnten. Ein umgekehrtes Vorgehen wäre auch möglich. Es ist somit hiermit möglich in einem den physiologischen Bedingungen nahe kommenden Modell gezielt beide Seiten der Zelladhäsion zu testen. Da im Langendorff-Modell keine anderen Organe vorkommen kann eine einfache Zählung der eingegebenen und nach Perfusion vorhandenen Zellen vorgenommen werden um nachzuweisen, wie viele Zellen im Herzen verblieben sind.

5.7 BMCs vs. embryonale Stammzellen

Bei der Behandlung mit Stammzellen stellt sich prinzipiell die Frage nach der Wahl der geeigneten Stammzellart. Grundsätzlich stehen hier adulte Stammzellen, embryonale Stammzellen oder Stammzellen aus Nabelschnurblut zur Verfügung. Die Auswahl ist dabei nicht lediglich durch medizinische Faktoren beeinflusst, sondern hier müssen ethische, religiöse, soziale, politische und juristische Gesichtspunkte zum Ausgleich gebracht werden. Insbesondere in Deutschland hat sich der Gesetzgeber für eine restriktive Gesetzgebung im Hinblick auf die Forschung mit embryonalen Stammzellen entschieden. Es finden sich jedoch auch in der Behandlung mit adulten Stammzellen/Vorläuferzellen positive Ergebnisse.

5.8 Studienlage zur Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt

In den vergangenen Jahren wurden sowohl experimentelle, als auch erste klinische Studien in diesem Gebiet durchgeführt. Die Ergebnisse hierbei erscheinen bisweilen eher heterogen. Im Folgenden sollen daher einige Arbeiten exemplarisch herausgegriffen werden.

5.8.1 Experimentelle Studien

Die durchgeführten experimentellen Studien sind zahlreich und ebenso unterschiedlich in ihren Ansätzen. Sowohl die Wahl des geeigneten in vitro beziehungsweise Tiermodells, als auch die Wahl der Zellart, die Art der Zellschädigung, des Applikationszeitpunktes der Zellen und der untersuchten Parameter sind äußerst unterschiedlich, sodass ein sinnvoller Vergleich schwer erscheint.

Tomita et al. veröffentlichten 1999 ihre Arbeit in der sie zunächst BMCs in verschiedenen Medien kultivierten (Tomita, Li et al. 1999). Diese Zellen wurden dann drei Wochen nach Setzen einer Narbe im linken Ventrikel durch Kryoschädigung in ein Rattenherz implantiert. Acht Wochen später wurde die Herzfunktion untersucht. Nur in der Gruppe, die 5-aza- behandelte BMCs erhalten hatte fand sich eine signifikante Verbesserung der systolischen Drucke im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es hatten sich „cardiac-like“ Zellen ge-

bildet. Bei allen Gruppen zeigte sich die Induktion einer Angiogenese in der Narbenregion.

Die Forschungsgruppe um Orlic injizierte drei bis fünf Stunden nach koronarer Ligation am Mäuseherz Lin^- , $\text{c-Kit}^{\text{pos}}$ BMCs in die Periinfarktregion (Orlic, Kajstura et al. 2001). Sie konnten nach neun Tagen eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion und die Bildung neuer Myokardzellen nachweisen.

Yang et al isolierten aus Rattenherzen kardiale Vorläuferzellen und injizierten diese zwei Wochen nach Infarkt durch Ligation des Ramus interventrikularis anterior ins Myokard (Yang, Chou et al. 2008). Nach weiteren zwei Wochen wurden die Tiere getötet und Auswertungen der Herzen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Proliferation der Zellen mit Zeichen für eine Integration der Zellen ins vorhandene Myokard der Infarktnarbe, zum Beispiel eine Ausrichtung der Zellen in dieselbe Richtung, Nachweis kardialer Marker und die Ausbildung von Gap Junctions zwischen den implantierten und kardialen Zellen.

Die Gruppe um Caspi veröffentlichte 2007 ihre Studie (Caspi, Huber et al. 2007). Hierbei wurde 7-10 Tage nach koronarer Ligation im Rattenherz eine Injektion von humanen Embryonalen Stammzellen (hESC), hESC-CMs (kardiomyozytäre hESCs), nichtmyozytären hESCs oder Kochsalzlösung durchgeführt. Bei den hESCs entstanden teratomähnliche Strukturen, bei der Kontrollgruppe und der nichtmyozytären hESCs-Gruppe eine signifikante linksventrikuläre Dilatation und funktioneller Verlust. In der hESC-CM-Gruppe jedoch zeigte sich ein Überleben der implantierten Zellen mit Proliferation und Formung von gerichteten Gap Junctions mit dem Empfängergewebe und eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion.

5.8.2 Klinische Studien

Die ersten Ergebnisse von klinischen Untersuchungen zur Gabe von BMCs nach Myokardinfarkt und erfolgter Koronarintervention wurden 2002 von Strauer et al. veröffentlicht, in dieser Studie wurden 10 Patienten mit BMCs behandelt (Strauer, Brehm et al. 2002). In der Kontrolluntersuchung drei Mo-

nate nach Behandlung zeigte sich in der Linksherzventrikulographie in der BMC Gruppe eine signifikante Verkleinerung der Infarktregion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem verbesserte sich die Kontraktilität in der BMC Gruppe. In beiden Gruppen verbesserte sich die Ejektionsfraktion signifikant zur Voruntersuchung ohne einen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. In einer nur in der BMC Gruppe durchgeführten ²⁰¹Thallium-Szintigraphie zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Koronardurchblutung.

Eine der ersten monozentrischen klinischen Studien, die zur Effektivität der autologen Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt durchgeführt wurde, war die Topcare-AMI (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction) Studie, die von Schachinger, Assmus und Kollegen von 2001 bis 2003 durchgeführt wurde (Schachinger, Assmus et al. 2004). Hierbei wurden 59 Patienten 4,9 ±1,5 Tage nach akutem Myokardinfarkt mit durchgeführter Herzkatheterintervention autologe Knochenmarks- beziehungsweise im Blut zirkulierende Stammzellen in die infarzierte Koronararterie appliziert. Die globale linksventrikuläre Ejektionsfraktion, die Wandmotilität des infarzierten Areals und die endsystolischen linksventrikulären Volumina verbesserten sich in der Nachkontrolle vier Monate nach der Therapie signifikant. Nach einem Jahr wurden Kontrast- Magnetresonanztomographien durchgeführt, bei denen sich eine signifikant verbesserte linksventrikuläre Ejektionsfraktion, eine verminderte Infarktgröße und fehlende reaktive Hypertrophie darstellten. Es zeigten sich hierbei keine Unterschiede in der Wahl der Zellen.

Nach diesen ersten positiven Ergebnissen, bei denen negative Wirkungen der Therapie mit Progenitorzellen wie zum Beispiel befürchtete kardiale Arrhythmien (siehe hierzu Kapitel 5.8 Unerwünschte Ereignisse nach Stammzelltherapie) nicht aufgetreten waren wurden weitere Studien mit größeren Patientenpopulationen durchgeführt.

Im Jahr 2006 wurde „The Reinfusion of Enriched Progenitor cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction“ (Repair-AMI) Studie veröffentlicht

(Schachinger, Erbs et al. 2006). Es handelt sich hierbei um eine in 16 deutschen und einem schweizer Zentrum durchgeführte randomisierte multizentrische, doppelblinde und placebo-kontrollierte Studie, die die Wirksamkeit einer intrakoronaren Therapie mit BMCs nach Myokardinfarkt auf die Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) zeigt. Zwischen 2004 und 2005 wurden insgesamt 204 Patienten mit akutem ST-Elevationsmyokardinfarkt in die Studie eingeschlossen. In der Nachkontrolle nach vier Monaten zeigte sich in der linksventrikulären Angiographie eine signifikante Verbesserung der LVEF in der BMC Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe. Dabei profitierten Patienten mit stärker eingeschränkter LVEF ($\leq 48,9\%$) signifikant mehr von der Therapie, als solche mit einer weniger eingeschränkten Funktion. Nach einem Jahr zeigte die mit BMCs behandelte Gruppe eine signifikante Verminderung der klinischen Endpunkte Tod, wiederholter Myokardinfarkt und Notwendigkeit einer erneuten Intervention zur Revaskularisation.

Eine weitere große Studie ist die „Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration“ (BOOST) (Meyer, Wollert et al. 2006). Nach perkutaner Koronarintervention mit Stentimplantation wurden hier 60 Patienten 1:1 randomisiert und erhielten entweder eine optimale Standardtherapie oder zusätzlich BMCs intrakoronar. Vor der Gabe der BMCs, sowie 6 ± 1 Monate und 18 ± 6 Monate nach der Therapie wurden Kardio- Magnetresonanzuntersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich hierbei zunächst eine signifikante Verbesserung der LVEF in der BMC Gruppe nach 6 Monaten. Nach 18 Monaten konnte dieser Unterschied jedoch nicht mehr gezeigt werden. Auch in anderen Parametern wie dem linksventrikulären Volumen, der regionalen Wandmotilität und der Wanddicke konnten keine Unterschiede aufgezeigt werden. Die Gabe von BMCs ergab in dieser Studie lediglich eine deutlich schnellere Regeneration der LVEF im Vergleich zur mit Standardtherapie behandelten Patienten.

Zwischen 2003 und 2005 wurden die Daten für die „Autologous Stem-Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction“ (ASTAMI) Studie erhoben. Hier erhielten 47 Patienten nach erfolgreicher perkutaner Koronarintervention

BMCs. In der Kontrollgruppe waren 50 Patienten, diese erhielten die nach allgemeinen Richtlinien empfohlene Standardtherapie (Lunde, Solheim et al. 2006). Zur Ermittlung der LVEF wurden sofort nach dem Ereignis eine EKG-gesteuerte SPECT Untersuchung und eine Echokardiographie durchgeführt, sowie nach zwei bis drei Wochen ein Kardio- MRT. Sechs Monate nach dem Infarkt ereignis wurden die Untersuchungen wiederholt. Bei keiner der genannten Untersuchungsmethoden konnte ein signifikanter Unterschied in der Veränderung der LVEF der BMC-Gruppe zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

5.9 Unerwünschte Ereignisse nach Stammzelltherapie

Im Rahmen der ASTAMI-Studie wurden Entzündungsparameter nach Gabe von BMCs bestimmt (Solheim, Seljeflot et al. 2008). Blutentnahmen erfolgten hier einen Tag vor und einen und drei Tage sowie zwei bis drei Wochen und drei Monate nach Transplantation der Zellen. Es zeigten sich hierbei in der BMC Gruppe ein signifikanter Anstieg von Interleukin-6 und TNF-alpha mRNA bis zum ersten Tag nach BMC Gabe. Der Abfall der IL-6 Spiegel bis zur dritten Woche und des CRP bis zum dritten postinterventionellen Tag war in der BMC Gruppe weniger ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Andererseits stiegen in der BMC Gruppe die Spiegel von TNF-alpha und MCP-1 weniger an. Man kann also sagen, dass wohl kurzfristig die Entzündungsparameter in mit BMCs behandelten Patienten ansteigen, langfristig ist aber eher eine verminderte Entzündungsreaktion zu erkennen.

Eine gefürchtete Komplikation der Therapie mit BMCs war das Auslösen kardialer Arrhythmien. In einigen klinischen Phase-I Studien zeigten sich bei herzinsuffizienten Patienten nach Gabe von myoblastären Zellen tachyarrhythmische Ereignisse (Menasche, Hagege et al. 2001; Smits, van Geuns et al. 2003).

In einer Studie untersuchte die Forschergruppe um Fernandes dieses Phänomen (Fernandes, Amirault et al. 2006). Sieben Tage nach koronarer Ligation wurden hier Wistar Ratten entweder gar nicht weiter behandelt, erhielten Kulturmedium oder autologe Myoblasten ins infarzierte Myokard

injiziert. Im anschließenden Holter Monitoring zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Wurde jedoch eine programmierte elektrische Stimulation durchgeführt, zeigte sich in der Gruppe, die Myoblasten erhalten hatte, eine signifikante Neigung zu anhaltenden ventrikulären Tachykardien. Als weitere Gruppe wurden daraufhin Ratten mit autologen mononukleären BMCs behandelt. In dieser Gruppe zeigte sich keine erhöhte Neigung zu ventrikulären Tachykardien nach elektrischer Stimulation.

5.10 Abwägung Statintherapie vs. Therapie mit BMCs

Da unter Statintherapie, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde signifikant weniger BMCs rekrutiert wurden als ohne eine solche Therapie, stellt sich nun die Frage, ob zum Zweck der autologen Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt eine bestehende Statintherapie abgebrochen oder unterbrochen werden sollte, beziehungsweise eine Neumedikation zunächst nicht begonnen werden sollte. Hier stehen die positiven Einflüsse der Statintherapie gegen den Erfolg einer Gabe von BMCs mit deren positiven Effekten.

Die Statintherapie ist ein etabliertes Behandlungsprinzip sowohl zur Primärprävention als auch nach kardiovaskulären Ereignissen im Sinne einer Sekundärprävention. Für den nicht-ST Hebungsinfarkt gibt die europäische Gesellschaft für Kardiologie klar die Empfehlung eine Statintherapie sobald wie möglich nach Infarkt zu beginnen. (Hamm, Bassand et al.) In der Primärprävention wird zum Beispiel beim Diabetes mellitus eine Statintherapie bei Patienten mit erhöhtem Cholesterin empfohlen. (D. Tschöpe and Behrens 2006)

In der Frühphase nach akutem Koronarsyndrom konnte in Studien ein positiver Effekt von hochdosierten Statinen nachgewiesen werden. In der MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering) Studie konnte gezeigt werden, dass unter Therapie mit hochdosiertem Atorvastatin, das erstmalig 24 bis 96 Stunden nach akutem Koronarsyndrom verabreicht wurde, signifikant weniger ischämische Ereignisse in den folgenden 16 Wochen vorkamen als in der Kontrollgruppe (Schwartz, Olsson et al. 2001). Im Rahmen der PROVE IT-TIMI 22 Studie (The Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 22) konnte in einem Zeitrahmen von 30 Tagen nach ACS unter intensivierter Therapie mit Atorvastatin eine deutliche Reduktion der klinischen Zwischenfälle gezeigt werden. (Ray, Cannon et al. 2005) Es wird daher die klare Empfehlung gegeben bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom so schnell wie möglich nach dem

Ereignis eine hochdosierte Statintherapie zu beginnen. Für die positiven Effekte innerhalb der ersten Wochen nach dem Ereignis werden vor allem pleiotrophische Effekte verantwortlich gemacht. (Ray, Cannon et al. 2005)

Diese pleiotrophischen Effekte liegen, wie bereits in der Einleitung beschrieben in einem erhöhten Angebot von NO begründet. Durch das erhöhte NO-Angebot kommt es durch Herunterregulation von Adhäsionsmolekülen zu einer verminderten Leukozytenadhäsion und damit auch einem geringeren Ischämie-Reperfusionsschaden. Durch diese verminderte Expressierung der Adhäsionsmoleküle kommt es aber auch, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, zu einer verminderten Rekrutierung von BMCs ins geschädigte Myokard.

Positive Langzeitergebnisse für eine Behandlung mit Simvastatin sind beispielsweise in der 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study) Studie gezeigt worden. Hier zeigte sich über einen Zeitraum von durchschnittlich 5,4 Jahren ein signifikanter Unterschied bezüglich des 6-Jahres Überlebens, schwerer koronarer Vorkommnisse sowie der Notwendigkeit einer Revaskularisation (Pedersen, Kjekshus et al. 1994).

Hier sollte sicher eine gut überdachte Nutzen-Risiko Abwägung erfolgen bevor eine Statintherapie, die in diversen Studien sowohl in der kurzfristigen als auch der Langzeittherapie positive Effekte gezeigt hat, für die bis jetzt nicht sicher positiven Effekte einer Stammzelltherapie abgesetzt, pausiert oder verschoben wird.

5.11 Ausblick

Die Forschung im Bereich der Stammzellen hat in den letzten Jahren und Jahrzehnten deutliche Fortschritte gemacht. Mittlerweile interessieren sich nahezu alle Fachgebiete am Einsatz von Stammzellen verschiedensten Ursprungs und Differenzierungsgrades zur Verbesserung von Funktionen nach akuten Schädigungen oder bei Fehlbildungen. Der Traum ist hier sicher, dass mit Hilfe der Stammzellen Schädigungen vollständig „repariert“ werden können, sowohl bei akut eingetretenen Ereignissen, chronischen Erkrankungen als auch bei angeborenen Schädigungen oder Fehlbildungen.

Von diesem Traum ist man leider auch nach jahrzehntelanger Forschung noch weit entfernt, wenn auch immer wieder hoffnungsvolle Nachrichten eintreffen.

So ist auch die Therapie mit BMCs nach Myokardinfarkt sicher ein interessanter Ansatz für die Verhinderung des kardialen Remodeling. Bis jetzt konnte jedoch noch in keiner Studie eine langfristig anhaltende Verbesserung im Vergleich zu konservativ behandelten Patienten gezeigt werden. Ein großes Problem ist hier sicher auch die Objektivierbarkeit. Das Patientenkollektiv unterscheidet sich in hohem Maße in Alter, Vorerkrankungen und Medikamenteneinnahme. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, hat Simvastatin einen Einfluss auf das Homing von BMCs. Für viele andere Medikamente ist ein solcher Einfluss auf Rezeptoren im Myokard denkbar, bislang jedoch noch nicht erforscht worden.

Bisher liegen auch noch keine Langzeitergebnisse nach Implantation von Stammzellen ins Myokard vor. Es bleibt somit auch unklar, ob es zum Beispiel zur malignen Entartung der Zellen oder anderen Spätschäden kommen könnte.

Es bedarf weiterer intensiver präklinischer Basisforschung, um grundlegende Fragen des BMC Homings in ischämisches Myokard zu klären um dann schließlich in klinischen Gebieten Erfolge erreichen zu können.

6 Zusammenfassung

In dieser tierexperimentellen Arbeit wird der Einfluss des HMG-CoA Reduktasehemmers Simvastatin auf die Rekrutierung autologer Bone Marrow-derived Stem Cells (BMCs) nach globaler myokardialer Ischämie am Herzen der adulten Ratte untersucht. Am modifizierten Modell nach Langendorff wird am Herzen des mit Simvastatin vorbehandelten Tieres eine globale Ischämie durchgeführt. In der anschließenden Reperfusionphase werden autologe BMCs über die Aorta retrograd infundiert. Verglichen werden dabei verschiedene Dosierungen des Medikamentes. Des Weiteren wird der Einfluss einer kurzen oder länger dauernden Reperfusionphase vor der Zellgabe auf die Auswirkung auf die Zellrekrutierung untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Statintherapie sowohl in einer hohen Dosierung von 1,0 mg/kg KG als auch in einer niedrigen Dosierung von 0,1 mg/kg KG signifikant weniger BMCs rekrutiert werden als in der Kontrollgruppe. Hieraus kann geschlossen werden, dass Simvastatin einen negativen Effekt auf das Homing von BMCs in infarziertes Myokard hat. Der Mechanismus dieser verminderten Rekrutierung von BMCs ist bis jetzt nicht geklärt. Ein Einfluss von Simvastatin auf die Ausbildung endothelialer Rezeptoren, die zum Homing von BMCs führen scheint denkbar.

In den Gruppen, bei denen eine 30minütige Reperfusionphase durchgeführt wurde, wurden signifikant mehr Zellen rekrutiert als in den Gruppen ohne Reperfusionphase. Diese signifikant höhere Rekrutierung von BMCs weist auf die Bedeutung einer Reperfusion für die Rekrutierung von BMCs hin.

7 Summary

This animal experiment research examines the influence of the HMG-CoA Reductase Inhibitor Simvastatin on the recruitment of autologous Bone-Marrow-derived Stem Cells (BMCs) after a global myocardial ischemia on adult rat hearts. A global ischemia on the heart of a Simvastation pretreated animal is performed in the modified Langendorff-preparation. In the following reperfusion autologous BMCs are retrograde infused via the Aorta. Different dosages of the medication are compared. Furthermore the effect of a shorter or longer lasting reperfusion time before the BMC injection on the recruitment of BMCs is examined.

This research shows that under therapy with statins in a high dosage of 1,0 mg/kg KG as well as a lower dosage of 0,1 mg/kg KG there are less BMCs recruited than in the control group, concluding that Simvastatin has a negative effect on the homing of BMCs to ischemic myocardium. The mechanism of this reduced homing is unclear, an effect of Simvastatin on the expression of endothelial receptors guarding to the homing of BMCs is supposable. Significantly more BMCs were recruited in groups of 30 minutes' reperfusion compared to those without reperfusion. This significantly higher recruitment of BMCs shows the impact of a reperfusion for the recruitment of BMCs.

8 Literaturverzeichnis

- Asahara, T. and A. Kawamoto (2004). "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **287**(3): C572-9.
- Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, D. L. Mendrick, R. S. Cotran and M. A. Gimbrone, Jr. (1987). "Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9238-42.
- Braunwald, E. and R. A. Kloner (1982). "The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction." Circulation **66**(6): 1146-9.
- Carlos, T. M. and J. M. Harlan (1994). "Leukocyte-endothelial adhesion molecules." Blood **84**(7): 2068-101.
- Casino, P. R., C. M. Kilcoyne, A. A. Quyyumi, J. M. Hoeg and J. A. Panza (1993). "The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients." Circulation **88**(6): 2541-7.
- Caspi, O., I. Huber, I. Kehat, M. Habib, G. Arbel, A. Gepstein, L. Yankelson, D. Aronson, R. Beyar and L. Gepstein (2007). "Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts." J Am Coll Cardiol **50**(19): 1884-93.
- Chavakis, E., A. Aicher, C. Heeschen, K. Sasaki, R. Kaiser, N. El Makhfi, C. Urbich, T. Peters, K. Scharffetter-Kochanek, A. M. Zeiher, T. Chavakis and S. Dimmeler (2005). "Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells." J Exp Med **201**(1): 63-72.
- Chavakis, E., C. Urbich and S. Dimmeler (2008). "Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy." J Mol Cell Cardiol.
- Collins, T., M. A. Read, A. S. Neish, M. Z. Whitley, D. Thanos and T. Maniatis (1995). "Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers." FASEB J **9**(10): 899-909.
- D. Tschöpe, B. S., E. Standl, S. Eckert, H.U. Janka, E. Erdmann, M. and R. H. S. Behrens, R. Dörr, W. Motz, S. Jacob (2006). "Diagnostik und Therapie von Herzerkrankungen bei Diabetes mellitus." Evidenzbasierte Leitlinie Deutsche Diabetes Gesellschaft.
- Davenpeck, K. L., T. W. Gauthier and A. M. Lefer (1994). "Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation." Gastroenterology **107**(4): 1050-8.
- Dawn, B. and R. Bolli (2005). "Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment." Basic Res Cardiol **100**(6): 494-503.
- De Caterina, R., P. Libby, H. B. Peng, V. J. Thannickal, T. B. Rajavashisth, M. A. Gimbrone, Jr., W. S. Shin and J. K. Liao (1995). "Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines." J Clin Invest **96**(1): 60-8.
- Di Napoli, P., A. Antonio Taccardi, A. Grilli, R. Spina, M. Felaco, A. Barsotti and R. De Caterina (2001). "Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts." Cardiovasc Res **51**(2): 283-93.

- Entman, M. L., L. Michael, R. D. Rossen, W. J. Dreyer, D. C. Anderson, A. A. Taylor and C. W. Smith (1991). "Inflammation in the course of early myocardial ischemia." FASEB J **5**(11): 2529-37.
- Fernandes, S., J. C. Amirault, G. Lande, J. M. Nguyen, V. Forest, O. Bignolais, G. Lamirault, D. Heudes, J. L. Orsonneau, M. F. Heymann, F. Charpentier and P. Lemarchand (2006). "Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias." Cardiovasc Res **69**(2): 348-58.
- Ferrari, R. (1995). "Metabolic disturbances during myocardial ischemia and reperfusion." Am J Cardiol **76**(6): 17B-24B.
- Frenette, P. S., S. Subbarao, I. B. Mazo, U. H. von Andrian and D. D. Wagner (1998). "Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14423-8.
- Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner and R. C. Mulligan (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med **183**(4): 1797-806.
- Hamm, C. W., J. P. Bassand, S. Agewall, J. Bax, E. Boersma, H. Bueno, P. Caso, D. Dudek, S. Gielen, K. Huber, M. Ohman, M. C. Petrie, F. Sonntag, M. S. Uva, R. F. Storey, W. Wijns, D. Zahger, J. J. Bax, A. Auricchio, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, C. Deaton, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, A. Hoes, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, D. Poldermans, B. A. Popescu, Z. Reiner, U. Sechtem, P. A. Sirnes, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, S. Achenbach, L. Badimon, M. Bertrand, H. E. Botker, J. P. Collet, F. Crea, N. Danchin, E. Falk, J. Goudevenos, D. Gulba, R. Hambrecht, J. Herrmann, A. Kastrati, K. Kjeldsen, S. D. Kristensen, P. Lancellotti, J. Mehilli, B. Merkely, G. Montalescot, F. J. Neumann, L. Neyses, J. Perk, M. Roffi, F. Romeo, M. Ruda, E. Swahn, M. Valgimigli, C. J. Vrints and P. Widimsky "ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)." Eur Heart J.
- Hearse, D. J. and R. Bolli (1991). "Reperfusion-induced injury manifestations, mechanisms, and clinical relevance." Trends Cardiovasc Med **1**(6): 233-40.
- Hristov, M., A. Zerneck, K. Bidzhekov, E. A. Liehn, E. Shagdarsuren, A. Ludwig and C. Weber (2007). "Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury." Circ Res **100**(4): 590-7.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-87.
- Jackson, D. E. (2003). "The unfolding tale of PECAM-1." FEBS Lett **540**(1-3): 7-14.
- Jones, S. P. and D. J. Lefer (2001). "Cardioprotective actions of acute HMG-CoA reductase inhibition in the setting of myocardial infarction." Acta Physiol Scand **173**(1): 139-43.
- Jones, S. P., S. D. Trocha and D. J. Lefer (2001). "Pretreatment with simvastatin attenuates myocardial dysfunction after ischemia and chronic reperfusion." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(12): 2059-64.

- Krumpl, G., H. Todt, S. Schunder-Tatzber and G. Raberger (1989). "Holter monitoring in conscious dogs. Assessment of arrhythmias occurring in the late reperfusion phase after coronary occlusion." *J Pharmacol Methods* **22**(2): 93-102.
- Kubes, P., M. Suzuki and D. N. Granger (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 4651-5.
- Kucia, M., B. Dawn, G. Hunt, Y. Guo, M. Wysoczynski, M. Majka, J. Ratajczak, F. Rezzoug, S. T. Ildstad, R. Bolli and M. Z. Ratajczak (2004). "Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction." *Circ Res* **95**(12): 1191-9.
- Kucia, M., J. Ratajczak, R. Reza, A. Janowska-Wieczorek and M. Z. Ratajczak (2004). "Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury." *Blood Cells Mol Dis* **32**(1): 52-7.
- Kureishi, Y., Z. Luo, I. Shiojima, A. Bialik, D. Fulton, D. J. Lefer, W. C. Sessa and K. Walsh (2000). "The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals." *Nat Med* **6**(9): 1004-10.
- Landmesser, U., N. Engberding, F. H. Bahlmann, A. Schaefer, A. Wiencke, A. Heineke, S. Spiekermann, D. Hilfiker-Kleiner, C. Templin, D. Kotlarz, M. Mueller, M. Fuchs, B. Hornig, H. Haller and H. Drexler (2004). "Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase." *Circulation* **110**(14): 1933-9.
- Laufs, U. and J. K. Liao (2000). "Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors." *Trends Cardiovasc Med* **10**(4): 143-8.
- Lefer, A. M. and D. J. Lefer (1996). "The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion." *Cardiovasc Res* **32**(4): 743-51.
- Leung, B. P., N. Sattar, A. Crilly, M. Prach, D. W. McCarey, H. Payne, R. Madhok, C. Campbell, J. A. Gracie, F. Y. Liew and I. B. McInnes (2003). "A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis." *J Immunol* **170**(3): 1524-30.
- Ley, K. (2003). "The role of selectins in inflammation and disease." *Trends Mol Med* **9**(6): 263-8.
- Lunde, K., S. Solheim, S. Aakhus, H. Arnesen, M. Abdelnoor, T. Egeland, K. Endresen, A. Ilebekk, A. Mangschau, J. G. Fjeld, H. J. Smith, E. Taraldsrud, H. K. Groggaard, R. Bjornerheim, M. Brekke, C. Muller, E. Hopp, A. Ragnarsson, J. E. Brinchmann and K. Forfang (2006). "Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction." *N Engl J Med* **355**(12): 1199-209.
- McEver, R. P. (1991). "GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium." *J Cell Biochem* **45**(2): 156-61.
- Menasche, P., A. A. Hagege, M. Scorsin, B. Pouzet, M. Desnos, D. Duboc, K. Schwartz, J. T. Vilquin and J. P. Marolleau (2001). "Myoblast transplantation for heart failure." *Lancet* **357**(9252): 279-80.

- Meroni, P. L., E. Raschi, C. Testoni, A. Tincani, G. Balestrieri, R. Molteni, M. A. Khamashta, E. Tremoli and M. Camera (2001). "Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype." Arthritis Rheum **44**(12): 2870-8.
- Meyer, G. P., K. C. Wollert, J. Lotz, J. Steffens, P. Lippolt, S. Fichtner, H. Hecker, A. Schaefer, L. Arseniev, B. Hertenstein, A. Ganser and H. Drexler (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**(10): 1287-94.
- Muller, W. A. (2003). "Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response." Trends Immunol **24**(6): 327-34.
- Muller, W. A. and G. J. Randolph (1999). "Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes." J Leukoc Biol **66**(5): 698-704.
- Muller, W. A., S. A. Weigl, X. Deng and D. M. Phillips (1993). "PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes." J Exp Med **178**(2): 449-60.
- Nakamuta, J. S., M. E. Danoviz, F. L. Marques, L. dos Santos, C. Becker, G. A. Goncalves, P. F. Vassallo, I. T. Schettert, P. J. Tucci and J. E. Krieger (2009). "Cell therapy attenuates cardiac dysfunction post myocardial infarction: effect of timing, routes of injection and a fibrin scaffold." PLoS One **4**(6): e6005.
- Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri and P. Anversa (2001). "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium." Nature **410**(6829): 701-5.
- Pahl, M. V., N. D. Vaziri, T. Connall, D. Morrison, C. Kim, C. J. Kaupke and S. E. Wilson (2005). "Systemic upregulation of leukocyte integrins in response to lower body ischemia-reperfusion during abdominal aortic aneurysm repair." J Natl Med Assoc **97**(2): 172-9.
- Pedersen, T., J. Kjekshus, K. Berg, T. Haghfelt and e. al (1994). "Randomised of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)." Lancet **344**(8934): 1383-9.
- Peled, A., V. Grabovsky, L. Habler, J. Sandbank, F. Arenzana-Seisdedos, I. Petit, H. Ben-Hur, T. Lapidot and R. Alon (1999). "The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow." J Clin Invest **104**(9): 1199-211.
- Pittenger, M. F. and B. J. Martin (2004). "Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics." Circ Res **95**(1): 9-20.
- Pruefer, D., R. Scalia and A. M. Lefer (1999). "Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(12): 2894-900.
- Ratajczak, M. Z., M. Kucia, R. Reca, M. Majka, A. Janowska-Wieczorek and J. Ratajczak (2004). "Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow." Leukemia **18**(1): 29-40.

- Ray, K. K., C. P. Cannon, C. H. McCabe, R. Cairns, A. M. Tonkin, F. M. Sacks, G. Jackson and E. Braunwald (2005). "Early and late benefits of high-dose atorvastatin in patients with acute coronary syndromes: results from the PROVE IT-TIMI 22 trial." *J Am Coll Cardiol* **46**(8): 1405-10.
- Schachinger, V., B. Assmus, M. B. Britten, J. Honold, R. Lehmann, C. Teupe, N. D. Abolmaali, T. J. Vogl, W. K. Hofmann, H. Martin, S. Dimmeler and A. M. Zeiher (2004). "Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial." *J Am Coll Cardiol* **44**(8): 1690-9.
- Schachinger, V., S. Erbs, A. Elsasser, W. Haberbosch, R. Hambrecht, H. Holschermann, J. Yu, R. Corti, D. G. Mathey, C. W. Hamm, T. Suselbeck, B. Assmus, T. Tonn, S. Dimmeler and A. M. Zeiher (2006). "Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction." *N Engl J Med* **355**(12): 1210-21.
- Schmidt, A., C. Goepfert, K. Feitsma and E. Buddecke (2002). "Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF-alpha activated human vascular endothelial cells." *Atherosclerosis* **164**(1): 57-64.
- Schwartz, G. G., A. G. Olsson, M. D. Ezekowitz, P. Ganz, M. F. Oliver, D. Waters, A. Zeiher, B. R. Chaitman, S. Leslie and T. Stern (2001). "Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial." *JAMA* **285**(13): 1711-8.
- Sequeira, I., P. Schifferings, F. Esch, C. Neuhof, H. Muth, H. Tillmanns and H. Hoelschermann (2005). "PECAM-1 and P-selectin are involved in the recruitment of bone marrow stem cells into ischaemic heart tissue." *European Heart Journal* **26 (Abstract Supplement): 685**.
- Smits, P. C., R. J. van Geuns, D. Poldermans, M. Bountiokos, E. E. Onderwater, C. H. Lee, A. P. Maat and P. W. Serruys (2003). "Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up." *J Am Coll Cardiol* **42**(12): 2063-9.
- Solheim, S., I. Seljeflot, K. Lunde, P. Aukrust, A. Yndestad, H. K. Groggaard, S. Aakhus, K. Forfang and H. Arnesen (2008). "Inflammatory responses after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction." *Am Heart J* **155**(1): 55 e1-9.
- Strauer, B. E., M. Brehm, T. Zeus, M. Kosterling, A. Hernandez, R. V. Sorg, G. Kogler and P. Wernet (2002). "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans." *Circulation* **106**(15): 1913-8.
- Stulc, T., M. Vrablik, Z. Kasalova, I. Marinov, H. Svobodova and R. Ceska (2008). "Leukocyte and endothelial adhesion molecules in patients with hypercholesterolemia: the effect of atorvastatin treatment." *Physiol Res* **57**(2): 184-94.
- Tomita, S., R. K. Li, R. D. Weisel, D. A. Mickle, E. J. Kim, T. Sakai and Z. Q. Jia (1999). "Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function." *Circulation* **100**(19 Suppl): II247-56.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." *Circ Res* **95**(4): 343-53.
- von Andrian, U. H. and C. R. Mackay (2000). "T-cell function and migration. Two sides of the same coin." *N Engl J Med* **343**(14): 1020-34.

- Wang, C. Y., P. Y. Liu and J. K. Liao (2008). "Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results." Trends Mol Med **14**(1): 37-44.
- Weber, C., W. Erl, K. S. Weber and P. C. Weber (1997). "HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia." J Am Coll Cardiol **30**(5): 1212-7.
- Weitz-Schmidt, G., K. Welzenbach, V. Brinkmann, T. Kamata, J. Kallen, C. Bruns, S. Cottens, Y. Takada and U. Hommel (2001). "Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site." Nat Med **7**(6): 687-92.
- Weyrich, A. S., M. Buerke, K. H. Albertine and A. M. Lefer (1995). "Time course of coronary vascular endothelial adhesion molecule expression during reperfusion of the ischemic feline myocardium." J Leukoc Biol **57**(1): 45-55.
- Wolfrum, S., K. S. Jensen and J. K. Liao (2003). "Endothelium-dependent effects of statins." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(5): 729-36.
- Yang, C. F., K. Y. Chou, Z. C. Weng, S. C. Hung, S. T. Lai, C. P. Hsu and J. S. Wang (2008). "Cardiac myocyte progenitors from adult hearts for myocardial regenerative therapy." J Chin Med Assoc **71**(2): 79-85.
- Zapolska-Downar, D., A. Siennicka, M. Kaczmarczyk, B. Kolodziej and M. Naruszewicz (2004). "Simvastatin modulates TNFalpha-induced adhesion molecules expression in human endothelial cells." Life Sci **75**(11): 1287-302.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ANOVA	ANalysis Of VAriance between groups (Varianzanalyse)
BMC	Bone Marrow-derived Stem Cell (Knochenmarksstämmige Vorläuferzelle)
BRD	Bundesrepublik Deutschland
CD	Cluster of Differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
DAPI	4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
df	Freiheitsgrad
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
g	Gramm
HDL	High density Lipoprotein (Lipoprotein höherer Dichte)
hESC	humane Embryonale Stammzelle
hESC-CM	kardiomyozytäre humane Embryonale Stammzelle
HMG Co-A	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HPC	Hämatopoetische Stammzelle
I.E.	internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LDL	Low density Lipoprotein (Lipoprotein niederer Dichte)
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVPD	Left Ventricular Developed Pressure, Linksventrikulärer Druck

M	Mittelwert
MAPC	Multipotent Adult Progenitor Cell (Multipotente adulte Vorläuferzelle)
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MD	Mittlere Differenz
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Mesenchymal Stem Cell (Mesenchymale Stammzelle)
n	Häufigkeit, Anzahl
N	normal
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
p	Signifikanz
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PECAM-1	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
pH	potentia Hydrogenii, mit -1 multiplizierter dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
SD	Standardabweichung
SDF	Stromal Cell-derived Factor
SFM	Serumfreies Medium
SPECT	single-photon-emission computed tomography
t	Zeit
TNF-alpha	Tumor-Nekrosefaktor-alpha
U/l	Units pro Liter

U/min	Umdrehungen pro Minute
UK	Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGFR	Vascular Endothelial Cell Growth Factor Receptor
µl	Mikroliter

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Wichtige Moleküle der Adhäsionskaskade, übernommen aus „T-Cell Function and Migration — Two Sides of the Same Coin“ (von Andrian and Mackay 2000), mit freundlicher Genehmigung der Autoren	5
Abbildung 2 Strukturformel Simvastatin.....	9
Abbildung 3 Versuchsablauf.....	15
Abbildung 4 Versuchsaufbau modifiziertes Langendorff-Modell.....	21
Abbildung 5 Versuchsablauf Langendorff-Modell	24
Abbildung 6 Zellrekrutierung (Mittelwert und Standardfehler in Abhängigkeit der Reperfusionphase (prozentuale Werte).....	28
Abbildung 7 Anzahl der rekrutierten Zellen (Mittelwert und Standardfehler) in Abhängigkeit der Simvastatin Dosierung (absolute Werte)	30
Abbildung 8 Anzahl der rekrutierten Zellen (Mittelwert und Standardfehler) in Abhängigkeit der Simvastatin Dosierung (prozentuale Werte)	30
Abbildung 9: Endothel (grün) mit einer intravaskulär zu sehenden BMC (rot), sowie einer weiteren BMC, die sich bereits extravaskulär befindet, umgeben von myokardialen Zellen (blaue Zellkerne).....	32
Abbildung 10: Eine bereits ins Myokard eingewanderte BMC (rot), umgeben von myokardialen Zellkernen (blau).	33
Abbildung 11: Veränderung Gesamtkreatinkinase im Versuchsverlauf.....	34
Abbildung 12: Veränderung Kreatinkinase Isoenzym MB im Versuchsverlauf	34
Abbildung 13: Cholesterinspiegel vor und nach Behandlung	36
Abbildung 14: HDL-Cholesterinspiegel vor und nach Behandlung	37
Abbildung 15: LDL-Cholesterinspiegel vor und nach Behandlung.....	38

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsgruppen.....	25
Tabelle 2: Dosierungsgruppen Reperfusionphase.....	28
Tabelle 3: Dosierung von Simvastatin in den Versuchsgruppen	29

9.4 Veröffentlichungen

02/2006 Posterpräsentation auf dem Kongress der „Gesellschaft für Thrombose und Hämostase“ in Basel, Schweiz

Titel: „Methylprednisolon vermindert die Rekrutierung von Knochenmarkstammzellen (BMCs) in ischämisches Myokard“

9.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans Hölschermann für die Überlassung des Forschungsthemas, die Bereitstellung von Mitteln zur Durchführung dieser Arbeit sowie die fachliche Unterstützung.

Frau Dr. Indira Sequeira für die Betreuung insbesondere während der Durchführung der Experimente, sowie Frau Benoush Parviz und Frau Antje Weber für die Unterstützung in labortechnischen Fragen.

Für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung danke ich Herrn Wolfgang Pabst und Frau Dr. Nina Alexander.

Meiner Mutter für die Ermöglichung meines Studiums sowie das Korrekturlesen.

Ganz besonders danken möchte ich meinem Mann ohne dessen Unterstützung während weniger Hochs und vieler Tiefs diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9.6 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten 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.

Kathrin Purnhagen