

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III
Universitätsklinikum Halle (Saale)
Direktor: Prof. Dr. med. Karl Werdan

**Vergleich der Transplantation von embryonalen Kardiomyozyten und Myoblasten der
Skelettmuskulatur im Herzinfarktmodell der Maus**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mirco Jungblut
Geboren am 27.03.1978 in Andernach

Betreuer: Prof. Dr.med. Henning Ebel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Ebel
2. Prof. Dr. A. Simm
3. PD Dr. med. S. Costin

Eröffnung des Verfahrens: 07.10.2014

Datum der Verteidigung: 05.08.2015

Referat

Der akute Myokardinfarkt (AMI) ist eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen und gilt nach wie vor als eine der wichtigsten Komplikationen der koronaren Herzkrankheit (KHK). Um die Therapie sowohl des akuten Myokardinfarktes als auch der sich häufig entwickelnden chronischen Herzinsuffizienz weiter zu verbessern, werden seit Jahren verschiedene Ansätze verfolgt, die einen Ersatz des geschädigten Myokardgewebes anstreben. Hierzu zählt als eine bereits in klinischen Studien untersuchte Therapiestrategie auch der Einsatz von Zelltransplantationen, wobei viele Fragen sowohl zu den zugrundeliegenden Mechanismen als auch zur Frage der optimalen Transplantationsstrategie bislang ungeklärt sind. In dieser Arbeit sollen die Effekte der Transplantation verschiedener Zelltypen (von embryonalen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten sowie Myoblasten der Skelettmuskulatur) auf das Myokardgewebe und die Herzfunktion im Herzinfarktmodell der Maus untersucht werden. Durch Ligatur der linken Koronararterie werden bei ICR-Mäusen ausgedehnte Myokardinfarkte induziert. Eine Woche später erfolgt die Zelltransplantation (bzw. die Injektion von PBS als Kontrollgruppe). Über einen Untersuchungszeitraum von insgesamt 35 Tagen werden regelmäßige echokardiographische Untersuchungen zur Kontrolle der Herzfunktion und –morphologie durchgeführt, und 28 Tage nach den Transplantationen erfolgt die Organentnahme für zusätzliche histologische Untersuchungen. Die Ergebnisse belegen, dass die Transplantation sowohl der Myoblasten als auch der Kardiomyozyten positive Effekte auf die Funktion und Morphologie des geschädigten Myokardgewebes ausüben. Neben einer verbesserten Pumpfunktion des linken Ventrikels kann auch eine Reduktion der durch den Myokardinfarkt induzierten Fibrose beobachtet werden. Im Vergleich der verschiedenen Zellarten führt die Myoblastentransplantation eher zu einer Reduktion der Infarktexpansion, wohingegen die Kardiomyozytentransplantation vor allem einen günstigen Einfluss auf das Remodelling hat. Da 28 Tage nach den Zelltransplantationen keine relevanten Mengen an funktionell integrierten Zellen nachgewiesen werden können, muss man davon ausgehen, dass die Wirkung der transplantierten Zellen weniger durch eine direkte funktionelle Integration in das geschädigte Myokard hervorgerufen wird, sondern eher durch indirekte Mechanismen wie die Freisetzung verschiedener Zytokine resultiert.

Jungblut, Mirco: Vergleich der Transplantation von embryonalen Kardiomyozyten und Myoblasten der Skelettmuskulatur im Herzinfarktmodell der Maus, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinischen Fakultät, Diss., 63 Seiten, 2014

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Der akute Myokardinfarkt	1
1.1.1 Pathogenese	1
1.1.2 Symptomatik und Diagnostik des akuten Myokardinfarktes	2
1.1.3 Therapieansätze des akuten Myokardinfarktes	3
1.1.4 Herzinsuffizienz als Spätfolge des akuten Myokardinfarktes	4
1.1.5 Zukunftsorientierte Therapiekonzepte	4
1.2 Stammzellen und Zelltransplantation	5
1.2.1 Embryonale Stammzellen	5
1.2.2 Postembryonale/Adulte Stammzellen	7
1.2.3 Skelettale Myoblasten	8
1.2.4 Kardiale Zelltransplantationen – Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse von Myoblasten und ES-Kardiomyozyten	9
2. Zielstellung	12
3. Material und Methodik	13
3.1 Mäuse	13
3.2 Echokardiographie	13
3.3 Transplantierte Zellen	15
3.3.1 Skelettale Myoblasten	15
3.3.2 Von embryonalen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten (ES-Kardiomyozyten)	16
3.3.3 DiI-Markierung der transplantierten Zellen	18
3.4 Operationen	19
3.4.1 Induktion eines Myokardinfarktes durch LAD-Ligatur	19
3.4.2 Schein-Operation	19
3.4.3 Zell-Transplantationen	20
3.5 Organentnahme und In-Situ-Fixierung	20
3.6 Histologie	21
3.6.1 Herstellung und Dokumentation der Schnittpräparate	21
3.6.2 Trichrom-Färbung	21
3.6.3 Bestimmung der Myozytenquerschnittsfläche	22
3.6.4 Gefäßkollagenanfärbung	23

3.7	Auswertungen	23
3.8	Reagenzien	24
4.	Ergebnisse	26
4.1	Morphometrie	26
4.2	Echokardiographie	28
4.3	Histologie	34
4.3.1	Infarktgrößen- und Wanddickenbestimmung	34
4.3.2	Remodelling nach Myokardinfarkt – Bestimmung der Myozytenquerschnittsfläche sowie der interstitiellen Kollagenfraktion	40
4.3.3	Direkter Nachweis der transplantierten Zellen	45
5.	Diskussion	47
6.	Zusammenfassung	53
7.	Literaturverzeichnis	54
8.	Thesen	63

Abkürzungsverzeichnis

AMI	Akuter Myokardinfarkt
KHK	Koronare Herzkrankheit
TEE	Transösophageale Echokardiographie
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
PBN	<i>PBS with horse serum</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
HDL	<i>high-density-lipoprotein</i>
LDL	<i>low-density-lipoprotein</i>
EKG	Elektrokardiographie
LAD	<i>left anterior descending (LAD)</i>
RIVA	<i>R. interventricularis anterior (RIVA)</i>
RCX	<i>Ramus circumflexus</i>
RCA	<i>Arteria coronaria dextra</i>
RIVP	<i>Ramus interventricularis posterior</i>
STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i>
NSTEMI	<i>Non-ST-elevation myocardial infarction</i>
CK	Creatinkinase
AST	Aspartataminotransferase
LDH	Lactatdehydrogenase
PTCA	Perkutane transluminale coronare Angioplastie
t-PA	<i>tissue Plasminogen Activator</i>
i.v.	intravenös
IE	Internationale Einheit
av-Block	atrio-ventrikulärer Block
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
IGF-I	<i>insulin-like growth factor</i>
OSM	Oncostatin M
IL	Interleukin
ICR	CD-1-Mausstamm
FAC	<i>fraction of area change</i>
Area diast.	Fläche des linken Ventrikels in der Diastole in der parasternalen kurzen Achse im Echokardiogramm

Area syst.	Fläche des linken Ventrikels in der Systole in der parasternalen kurzen Achse im Echokardiogramm
LVAWD	linksventrikuläre diastolische Vorderwanddicke
LVAWS	linksventrikuläre systolische Vorderwanddicke
LVIDS	linksventrikulärer Durchmesser systolisch
LVIDD	linksventrikulärer Durchmesser diastolisch
LVPWS	linksventrikuläre posteriore Wanddicke in der Systole
LVPWD	linksventrikuläre posteriore Wanddicke in der Diastole
EF	Ejektionsfraktion
FS	<i>fractional shortening</i> (fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
RA	rechter Vorhof
RV	rechter Ventrikel
HS	horse serum (Pferde-Serum)
ES-Kardiomyozyten	von embryonalen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten
RGB	Rot-Grün-Blau Farb-Darstellung
Tif	<i>Tagged Image File Format</i> (Dateiformat)
Tx	Transplantation
Myobl.	Myoblasten
Schein-OP	Scheinoperiert, keine LAD-Ligatur in der ersten Operation
ISC	<i>interstitial collagen</i> (= interstitielles Kollagen)
MCSA	<i>myocyte cross sectional area</i> (= Kardiomyozytenquerschnittsfläche)
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanineperchlorat (Fluoreszenzfarbstoff)

1. Einleitung

Der akute Myokardinfarkt und der daraus resultierende Untergang von Herzmuskelgewebe stellt eine häufige Ursache von Krankenhauseinweisungen in den Industrienationen dar. Laut statistischem Bundesamt wurden im Jahr 2012 über 217.000 Menschen in Deutschland aufgrund eines akuten Myokardinfarktes vollstationär behandelt. Die häufigste Todesursache in Deutschland im Jahr 2012 war die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 71.655 Verstorbenen (8,2%), der akute Myokardinfarkt war mit 52.516 Verstorbenen (6%) die zweithäufigste Todesursache [1]. Als Infarkt-Folge können eine deutlich reduzierte Pumpfunktion durch untergegangenes Myokard, unterschiedliche Herzrhythmusstörungen und eine daraus resultierende Belastungseinschränkung auftreten.

Herzmuskelzellen verlieren relativ kurz nach der Geburt die Fähigkeit zur Proliferation und können so das abgestorbene und erkrankte Gewebe nicht ersetzen [2-4]. Das Ausmaß der Myokardzerstörung wird maßgeblich durch die Größe des Ischämieareals, den Grad des Gefäßverschlusses, die Dauer bis zu einer eventuellen Reperfusion, den Grad der Kollateralenversorgung, den Sauerstoffbedarf des Myokards zum Zeitpunkt des Infarktes und durch die Intensität der Reperfusion bestimmt [5]. Aktuell ist noch ungeklärt, ob vermeintliche gewebeeigene Vorläuferzellen, die unlängst identifiziert wurden, beim Ersatz von abgestorbenem Herzmuskelgewebe eine bedeutende Rolle spielen, insbesondere da sie nur in einer geringen Anzahl im ausgewachsenen Herzen nachweisbar sind [6].

1.1 Der akute Myokardinfarkt

Eine allgemeine, einfache und in jeder Situation gültige Definition für den akuten Myokardinfarkt (MI) existiert heute nicht mehr. Es ist jedoch akzeptiert, dass der Herzinfarkt den Zelltod der Myokardzellen durch länger währende Minderperfusion (Ischämie) beschreibt. Im Jahr 2000 wurde durch die „First Global MI Task Force“ die ischämie-bedingte Nekrose des Myokardgewebes als MI definiert. 2007 wurde durch die „Second Global MI Task Force“ ein „Universal Definition of Myocardial Infarction Consensus Document“ verfasst, das die verschiedenen Bedingungen, die zu einem Myokardinfarkt führen können, zusätzlich betont und beschreibt. Dieses Dokument wurde durch verschiedene internationale Gesellschaften wie beispielsweise die European Society of Cardiology (ESC) oder die American Heart Association (AHA) befürwortet und im Folgenden in der Medizin sehr gut akzeptiert, zuletzt auch von der World Health Organization (WHO) übernommen [7].

1.1.1 Pathogenese

Pathoanatomisch findet sich bei einem Großteil der Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine Ruptur einer intrakoronaren Plaque. Diese Ruptur erfolgt in der Regel in einem Bereich einer vorbestehenden Stenose. Es kommt nach einer Plaqueruptur zu einer massiven Exposition

subendothelialen Gewebes und in der Folge zu einer lokalen Thrombusbildung, die dann letztendlich zum Verschluss des Herzkranzgefäßes führt [8]. Die Ischämietoleranz des Herzmuskelgewebes beträgt etwa 2 bis 4 Stunden je nach lokalen Gegebenheiten wie vorhandene Kollateralgefäße oder individuellem Sauerstoffbedarf [9]. Nach dieser Zeit kommt es sukzessive zum Untergang des durch das betroffene Herzkranzgefäß versorgten Herzmuskelgewebes. Dieser Untergang kann häufig durch Wiederherstellung des Blutflusses innerhalb von 2-4 Stunden verhindert werden. Mit zunehmender Ischämiedauer kommt es jedoch zum progredienten irreversiblen Untergang von Herzmuskelgewebe.

Es existieren unterschiedliche Theorien zur Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen an den Gefäßwänden. Durch eine Reihe epidemiologischer Studien, wie der Framingham- und der MONICA-Studie, wurde gezeigt, dass verschiedene Risikofaktoren für die Entwicklung arteriosklerotischer Veränderungen an den Gefäßwänden existieren. Sowohl die Anzahl als auch die Ausprägung der Risikofaktoren ist entscheidend für das individuelle Erkrankungsrisiko [8]. Diese Faktoren unterscheidet man nochmals in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Risikofaktoren [8].

Als mögliche beeinflussbare Ursachen bzw. prädisponierende Faktoren werden unter anderem der Nikotinkonsum, Fettstoffwechselstörungen (insbesondere erniedrigtes HDL- und LDL-Cholesterin), Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Hyperurikämie, Stress sowie Bewegungsmangel, Fehlernährung und Übergewicht angesehen. Zu den nicht beeinflussbaren Faktoren zählen das Alter, das männliche Geschlecht, hormonelle Faktoren und eine familiäre Disposition [8, 10-12].

Die Sauerstoffausschöpfung des Blutes ist in den Koronararterien annähernd gleichbleibend hoch [10]. Eine Regulierung des Sauerstoffangebots für das Herz ist daher im Wesentlichen nur durch eine Steigerung der Koronarperfusion und hier in erster Linie durch eine Erweiterung der Koronargefäße möglich. Dieser Mechanismus unterliegt einer metabolischen Autoregulation und orientiert sich am Sauerstoffgehalt der Myokardzellen. Eine Einengung des Koronargefäßlumens kann etwa ab einer 70prozentigen Stenose zu einer Minderdurchblutung des Herzmuskels bei Belastung führen. Bei noch höhergradigen Stenosen kann das Myokard auch in Ruhe ischämisch werden. Als Folge kann es zum partiellen oder vollständigen Verlust der Kontraktilität des betroffenen Herzmuskelgewebes kommen, was als „Myokard im Winterschlaf“ (hibernating myocardium) bezeichnet wird. Nach Wiederherstellung der Durchblutung ist diese Funktionsstörung in der Regel reversibel.

1.1.2 Symptomatik und Diagnostik des akuten Myokardinfarktes

Die meisten Patienten klagen beim Infarkt ereignis über Schmerzen unterschiedlicher Stärke und Qualität in der Brust. Ein starkes retrosternales Druckgefühl oder ein Engegefühl im gesamten Brustkorb sind typische Symptome. Zusätzlich wird häufig ein ausstrahlender Schmerz vor

allem in den linken Arm, den Hals, die Schulter, den Oberbauch oder in den Rücken beschrieben. Der Schmerz wird häufig als Vernichtungsschmerz bezeichnet und geht regelhaft mit Atemnot, Übelkeit und Angstgefühl - bis zu Todesangst - einher. Im Gegensatz zu Angina-Pectoris-Anfällen bessert sich die Symptomatik nicht durch Anwendung von Nitroglycerin. Manche Infarkte verursachen aber auch nahezu keine Symptome und werden lediglich in nachträglich durchgeführten routinemäßigen EKG oder vergleichbaren Untersuchungen festgestellt [8]. Diese symptomlosen Infarkte werden auch als „stille“ oder „stumme“ Infarkte bezeichnet. Der Anteil stummer Infarkte liegt bei Frauen etwa bei 35%, bei Männern bei ca. 28% [8]. Die Lokalisation des Infarktareals kann zum Teil anhand des EKG-Musters beschrieben werden.

Als diagnostische Untersuchungsverfahren stehen neben der Elektrokardiographie und laborchemischen Untersuchungen auch weitere bildgebende Verfahren wie die Echokardiographie, die transösophageale Echokardiographie (TEE), die Farb-Doppler-Echokardiographie und schließlich die Koronarangiographie zur Verfügung. Insbesondere im Rahmen der Koronarangiographie kann während der gleichen Herzkatheteruntersuchung bereits interventionell mittels percutaner Coronar-Intervention (PCI) die Reperfusion angestrebt werden.

1.1.3 Therapieansätze des akuten Myokardinfarktes

Die Diagnose akuter Myokardinfarkt kann nur bei einem ST-Hebungsinfarkt (STEMI) bereits außerhalb der Klinik gestellt werden. Die Unterscheidung zwischen instabiler Angina pectoris und nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) ist erst in der Klinik anhand der Biomarker und weiterer Diagnostik möglich. Unter dem Krankheitsbild des akuten Koronarsyndroms fasst man alle Patienten mit einem STEMI, einem NSTEMI sowie Patienten mit instabiler Angina pectoris zusammen. Patienten mit dem klinischen Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom sollten demnach möglichst mit Arzt-Begleitung sofort in ein Krankenhaus mit adäquater Versorgungs- und Überwachungsmöglichkeit gebracht werden [13].

Bei allen Patienten mit einem STEMI sollte innerhalb der ersten 12 Stunden unter Berücksichtigung möglicher Kontraindikationen eine Reperfusionstherapie begonnen werden. Eine schnellstmögliche primäre Katheterintervention sollte die bevorzugte Behandlungsstrategie sein. Durch eine zusätzliche medikamentöse intravenöse Thrombolyse sowie Thrombozytenaggregationshemmung kann eine Reduktion der Infarktgröße durch frühzeitige Reperfusion des ischämischen Areals und eine Reduktion der Letalität erreicht werden [13-15]. Zusätzlich zu Thrombozytenhemmern und Heparin können Betablocker, ACE-Hemmer, Benzodiazepine oder Opiate indiziert sein. Betablocker senken die Herzfrequenz und verbessern durch die verlängerte Diastole die Füllung des Ventrikels, verlängern die Zeitspanne der myokardialen Durchblutung und reduzieren den myokardialen Sauerstoffverbrauch

Bei Patienten ohne ST-Strecken-Hebung (NSTEMI) ist möglichst innerhalb von 24h eine invasive Diagnostik anzustreben. Thrombozytenaggregationshemmer auf Dauer sowie Clopidogrel und Heparin werden sowohl peri- als auch postinterventionell empfohlen [13].

1.1.4 Herzinsuffizienz als Spätfolge des akuten Myokardinfarktes

Das adulte Herz ist nicht in der Lage irreversibel geschädigtes und untergegangenes Myokardgewebe durch neue kontraktile Zellen zu ersetzen, da Kardiomyozyten in der Perinatalzeit ihre Fähigkeit zur Proliferation verlieren [16, 17].

Im Falle einer zu späten Rekanalisation bzw. Reperfusion tritt eine irreversible Schädigung des Myokards ein, was gleichbedeutend mit dem Untergang von funktionellen Herzmuskelzellen ist. Je nach Ausmaß des Myokardverlustes führt dies zu einer eingeschränkten Pumpfunktion und so als Spätfolge häufig zur Herzinsuffizienz.

Die Ursache der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt liegt zum Großteil in der reduzierten linksventrikulären Pumpfunktion. Die Anzahl der an Herzinsuffizienz leidenden Patienten ist in unserer Gesellschaft aufgrund der verbesserten Überlebensrate des akuten Myokardinfarktes zunehmend. In den USA ist die Diagnose Herzinsuffizienz bereits seit einigen Jahren die führende Diagnose für eine stationäre Krankenhausbehandlung [18]. Auch in Deutschland ist die Herzinsuffizienz die am häufigsten vollstationär behandelte Erkrankung. Im Jahr 2011 wurden laut statistischem Bundesamt über 380.000 Patienten aufgrund einer Herzinsuffizienz stationär behandelt [19]. Zur Therapie der Herzinsuffizienz stehen aktuell vor allem pharmakologische Verfahren zur Verfügung. Durch die kombinierte Gabe von β -Rezeptorblockern, Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, Diuretika und Digitalis-Glykosiden kann sowohl eine Verbesserung der klinischen Beschwerden als auch eine Reduktion der Mortalität und Morbidität erreicht werden [20]. Mechanische Kreislaufunterstützungssysteme (assist devices) sowie Geräte zur kardialen Resynchronisationstherapie wurden in den letzten Jahren als zusätzliche Therapie-Optionen etabliert. Bei persistierender Herzinsuffizienz stellt die Herztransplantation eine weitere wichtige Therapie-Option dar, ist jedoch aufgrund des eingeschränkten Organangebotes und der Notwendigkeit einer lebenslangen Immunsuppression nur für einen geringen Teil der Patienten verfügbar [21, 22].

1.1.5 Zukunftsorientierte Therapiekonzepte

Die Herzinsuffizienz entsteht wie oben beschrieben häufig durch den Verlust von kontraktilen Myokardgewebe. Da das adulte Herz nicht mehr in der Lage ist größere Areale zum Beispiel durch Gewebeproliferation eigenständig zu reparieren, sollte es ein sinnvoller Ansatz sein, durch verschiedene Methoden die Anzahl der funktionellen Herzmuskelzellen durch gezielte therapeutische Eingriffe zu vermehren.

In den letzten Jahren wurden sowohl in tierexperimentellen Versuchen als auch in klinischen Studien die Effekte von Zelltransplantationen auf die Herzfunktion nach einem akuten Myokardinfarkt untersucht [23, 24]. Die Transplantation von autologen Knochenmark-Stammzellen erscheint demnach machbar und zeigte zudem signifikante Verbesserungen sowohl bei der linksventrikulären Ejektionsfraktion, als auch beim Umbau der infarzierten Ventrikelwand. Zusätzlich wurde das end-systolische linke Ventrikelvolumen nachhaltig reduziert. Es wurden zusammenfassend positive Effekte auf den gesamten Remodelling-Prozess festgestellt [23]. Die funktionelle Verbesserung im Sinne einer gesteigerten linksventrikulären Pumpfunktion nach Myokardinfarkt durch die Transplantation von autologen Knochenmarksstammzellen wurde mehrfach beschrieben [24-26].

Als weiterer aussichtsreicher Ansatz gilt der Versuch, durch gezielte molekularbiologische Interventionen die vorhandenen Herzmuskelzellen wieder in den Zellzyklus zu überführen und ihnen so die Möglichkeit zur Proliferation und damit zur Selbstreparatur des geschädigten Herzmuskelgewebes zu geben [27-30].

1.2 Stammzellen und Zelltransplantation

Eine einfache allgemein gültige Definition des Begriffes "Stammzelle" ist kaum zu etablieren. Allgemein akzeptiert ist, dass Stammzellen eine uneinheitliche Gruppe von Zellen sind, die durch Zellteilung sowohl Vorläuferzellen von hoch differenzierten Zellen wie zum Beispiel Herz-, Nerven-, Haut- oder Muskelzellen bilden, als auch nach der Teilung erneut als Stammzellen hervorgehen (self-renewal) [31-33]. Innerhalb der Stammzellen werden die Zellen sowohl in Bezug auf ihr ontogenetisches Alter, als auch hinsichtlich ihres Differenzierungspotenzials unterschieden: Embryonale Stammzellen sowie adulte postembryonale Stammzellen [33, 34].

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind sowohl in vivo als auch in vitro in der Lage sich undifferenziert zu vermehren, ebenso können sie sich in Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) differenzieren. Die erneute Bildung von Stammzellen wird als self-renewal bezeichnet. Diese Zellen werden daher als pluripotent bezeichnet und können alle somatischen Zellen wie z.B. Kardiomyozyten, Neuronen oder Chondrozyten bilden [32, 35-39]. ES-Zellen sind in Zellkultur im Gegensatz zu anderen (primären) Körperzellen, die ihre Teilungstendenz in vitro schnell einstellen, unbegrenzt teilbar. Als Ursache wurde unter anderem eine hohe Aktivität des Enzyms Telomerase festgestellt [37, 40].

ES-Zellen weisen im undifferenzierten Stadium verschiedene Charakteristika auf, anhand derer eine Unterscheidung gegenüber den differenzierten Zellen möglich ist. Folgende Punkte sind hierbei von besonderer Bedeutung [41]:

- pluripotentes Differenzierungspotential [42]
- hohe Aktivität an Alkalischer Phosphatase (AP) [43-45]
- Expression des stage specific embryonic antigen 1 (SSEA-1), einem Zelloberflächenglykan [46, 47]
- Expression des Zelloberflächenantigen E-Cadherin, welches für die Zelladhäsion der frühen Embryonalentwicklung eine Rolle spielt [48, 49]
- Expression des Transkriptionsfaktors Oct4 [50]
- hohe Telomeraseaktivität [51-53]
- eine hypermethylierte DNA [54]
- eine kurze G1-Phase im Zellzyklus [55]

Um in vitro die Pluripotenz der murinen ES-Zellen aufrecht zu erhalten sind zwei Methoden beschrieben: Zum Einen kann das Zytokin *leukemia inhibitory factor (LIF)* [56, 57] direkt hinzugefügt werden, alternativ können mitotisch inaktivierte Fibroblasten als Feederzellen zur Ko-Kultivierung benutzt werden. Diese sezernieren ein dem LIF entsprechendes Glykoprotein, welches als *differentiation inhibitory activity (DIA)* bezeichnet wird [41, 58-60].

ES-Zellen wurden erstmals Anfang der 1980er Jahre aus Blastozyten der Maus isoliert und kultiviert [61, 62]. Durch die Technik der In-vitro-Fertilisation können ES-Zellen aus überschüssigen Blastozyten gewonnen werden. Diese Zellen können dann in speziellen Nährmedien aufgenommen und kultiviert werden. Hierbei wird der frühe Embryo jedoch abgetötet; es existiert bis dato kein Verfahren um dies zu verhindern.

Alternativ kann man bereits vorhandene Stammzellen klonen (Zellkerntransfer) [33, 63]. Dazu wird einer Empfängerzelle (Eizelle) zunächst der Zellkern durch Absaugen mittels Mikropipette entfernt [64-66]. Danach wird dieser Zellkern der Spenderzelle (Karyoplast) in die Empfängerzelle (Zytoplast) übertragen. Im Anschluss erfolgt die Fusionierung durch elektrische Impulse (Elektrofusion). Durch Mikromanipulatoren bleibt die Zona pellucida dabei erhalten.

Als weiterer bedeutender Fortschritt gilt die Etablierung erster humaner embryonaler Stammzelllinien Ende der 1990er Jahre [67].

Aus medizinischer Sicht besitzen ES-Zellen prinzipiell ein großes Potential im Rahmen von regenerativen Therapieansätzen. Im Verlauf verschiedener Untersuchungen in vitro zeigten sich jedoch wiederholt ähnliche Probleme. Nach der Transplantation von ES-Zellen in z.B. Myokardgewebe entwickelten sich häufig Tumore, insbesondere Terratome [63, 67-69]. Die Schwierigkeit besteht darin, die transplantierten Zellen frei von undifferenzierten ES-Zellen oder differenzierten Zellen anderen Gewebetyps zu halten. Nicht zuletzt aufgrund dieser bisher

noch nicht endgültig gelösten Schwierigkeiten und der Gefahr einer Abstoßungsreaktion bestehen nach wie vor eine große Unsicherheit und ethische Bedenken gegenüber der Stammzellforschung mit embryonalen Stammzellen. Insbesondere in der humanen Stammzellforschung ist es nach wie vor nicht möglich eine adäquate Menge an Stammzellen zu gewinnen ohne den frühen Embryo zu töten [61]. Diese „verbrauchende Stammzellforschung“ wird von vielen Seiten kritisiert. So hat der europäische Gerichtshof 2011 ein Urteil erlassen, demnach es sich bei befruchteten Eizellen bereits um menschliches Leben handelt [70]. In Deutschland ist sowohl das Zerstören von humanen Embryonen zum Zwecke der Forschung (=„verbrauchende Embryonenforschung“) als auch die Herstellung von Embryonen für Forschungszwecke untersagt. Laut dem Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes (Stammzellgesetz) nach der letzten Änderung vom 14.08.2008 ist es jedoch unter bestimmten Auflagen zulässig, an importierten humanen embryonalen Stammzellen zu forschen, die im Herkunftsland vor dem 1. Mai 2007 gewonnen wurden (Stichtagsregelung).

1.2.2 Postembryonale/ Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die in einem ansonsten differenzierten Gewebe oder Organ vorkommen. Sie erneuern sich ein Leben lang, wobei sie einerseits identische Kopien ihrer selbst erzeugen (self-renewal), andererseits aber auch in spezialisierte Zellen des jeweiligen Gewebes differenzieren [71]. Sie werden vermehrt in Geweben mit hohem Regenerationspotential wie beispielsweise Knochenmark, Blut, Leber oder in der Skelettmuskulatur vorgefunden.

Adulte Stammzellen wurden bisher im Gegensatz zu den ES-Zellen nicht mehr als pluripotent angesehen. Bis vor einigen Jahren wurde davon ausgegangen, dass sich das Differenzierungspotential der adulten Stammzellen auf die Ausreifung genetisch determinierter Gewebe wie zum Beispiel Haut, Leber oder das hämatopoetische System beschränkt. Man war der Annahme, dass adulte Stammzellen sich nicht in Zellen eines anderen Keimblattes differenzieren könnten. Deshalb bezeichnete man sie lediglich als multipotent. Sie haben im Vergleich zu ES-Zellen in vitro nur ein eingeschränktes Selbsterneuerungsvermögen und wie oben beschrieben primär ein eingeschränktes Differenzierungspotential. In aktuelleren Forschungen zeigte sich jedoch, dass diese strenge Einteilung so nicht mehr aufrecht zu halten ist [29, 72, 73]. Es wurde gezeigt, dass Zellen des Knochenmarks, die selbst mesodermalen Ursprungs sind, sich zu Hauptzelltypen des Gehirns mit ektodermalem Ursprung (Neuronen, Gliazellen, Astrozyten) differenzieren können [74]. Umgekehrt wurden Zellen des Gehirns (Ektoderm) in Blut- und Muskelzellen (Mesoderm) differenziert [75]. Es wurde ebenfalls berichtet, dass neuronale Stammzellen aus dem Gehirn erwachsener Mäuse Zellen aller drei Keimblätter bilden können [76]. Weiterhin umstritten aber in verschiedenen Arbeiten beschrieben, wurde die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu

Kardiomyozyten [77-79]. In den Gegendarstellungen wird zumeist die Reinheit der Stammzellen in Frage gestellt. So würden die entstehenden Kardiomyozyten sich nicht aus den hämatopoetischen Stammzellen differenzieren, sondern aus direkten Vorläuferzellen der Kardiomyozyten [80-82].

Ein großer Vorteil adulter Stammzellen ist ihre relativ leichte Verfügbarkeit. Sie sind in jedem Individuum in ausreichender Anzahl vorhanden und somit wesentlich einfacher zu gewinnen als embryonale Zellen. So kann zum Beispiel durch eine Beckenkammpunktion ausreichend Knochenmark zur Stammzellisolierung gewonnen werden, ohne dass der Spender nennenswert geschädigt wird [63]. Mit der Verwendung adulter Stammzellen könnten die ethischen Bedenken einerseits und mögliche Abstoßungsreaktionen andererseits aufgrund autologer Transplantation umgangen werden. Ebenfalls scheint die Neigung zur Entartung gegenüber embryonalen Stammzellen geringer zu sein [83]. Die Hoffnung, dass adulte Stammzellen bei der Bekämpfung vieler Erkrankungen helfen könnten, stützte sich vor allem auf den jahrelangen Erfolg bei Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) des Knochenmarks bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems [79].

Zusätzlich entdeckte man, dass Stammzellen dazu neigen aus Randgebieten in beeinträchtigt Gewebe zu wandern [84]. Operationstechniken werden so vereinfacht, da das ohnehin geschädigte vulnerable Gewebe nicht durch die Manipulation weiter geschädigt werden muss, sondern die Injektion oder Transplantation in Randgebiete des Zielgewebes ausreichend ist. Insbesondere bei der Bekämpfung von Tumorerkrankungen scheint die Migration markierter Zellen in den Tumor ein Ansatzpunkt für eine gezielte Therapie zu sein [84].

1.2.3 Skelettale Myoblasten

Myoblasten der Skelettmuskulatur - auch Satellitenzellen genannt - sind residente, also ortständige Stammzellen der quergestreiften Muskulatur [85]. Sie befinden sich über lange Zeit ruhend innerhalb der Skelettmuskellzellmembran und werden bei Schädigung oder Verletzung der Skelettmuskulatur aktiv, um im Rahmen von Reparationsmechanismen geschädigtes Muskelgewebe zu regenerieren [85-89]. Es wird als bestätigt angesehen, dass die Regenerationsfähigkeit von Skelettmuskulatur in den skelettalen Myoblasten bzw. Satellitenzellen begründet liegt [90, 91]. Myoblastenlinien, die ihre Differenzierungsfähigkeit erhalten haben, wurden bereits aus verschiedenen Spezies - inklusive Maus und Mensch - erfolgreich isoliert. Ebenso wurde die Differenzierungsfähigkeit und Bildung von funktionellen Muskelfasern nach Transplantation von autologen skelettalen Myoblasten in Skelettmuskulatur mehrfach beschrieben [92, 93]. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur fehlt es dem Herzmuskelgewebe an einem ähnlichen funktionierenden Stammzellsystem zur Regeneration. Ventrikuläre Kardiomyozyten sind ohne äußere Stimulation vom Wiedereintritt in den Zellzyklus ausgeschlossen. Vergleichbare Satellitenzellen liegen nicht vor [2, 91, 94].

Ein großer Vorteil skelettaler Myoblasten ist ihre einfache Gewinnung aus Muskulatur des jeweiligen Patienten. Da die Myoblasten in vitro ein hohes Proliferationspotential haben, ist eine rasche Vermehrung in vitro und in der Folge eine zeitnahe autologe Transplantation oder gar Anlage von Reserven zur eventuell späteren Benutzung möglich [87, 95, 96]. Mit der Benutzung autologer skelettaler Myoblasten wäre der Mangel an Spenderorganen bzw. -zellen und die Notwendigkeit der Immunsuppression sowie das ethische Dilemma, welches mit der Verwendung von allogenen oder embryonalen Stammzellen verbunden ist, zu lösen [97]. Es wird beschrieben, dass Myoblasten eine gute Toleranz gegenüber Minderperfusion bzw. Ischämie aufweisen. Diese Eigenschaft ist insbesondere bei der Transplantation in ischämisches Herzmuskelgewebe ein großer Vorteil [98-101]. Skelettale Myoblasten werden schon seit vielen Jahren als experimentelle Zelltransplantate in Myokardgewebe verwendet [91]. In mehreren Studien konnte sowohl die Integration solcher Zellen in Narbengewebe am geschädigten Myokard als auch deren Einfluss auf die Morphologie und Funktion des geschädigten Herzmuskelgewebes nachgewiesen werden [87-89].

1.2.4 Kardiale Zelltransplantationen - Ein Vergleich der vorliegenden Ergebnisse von Myoblasten und ES-Kardiomyozyten

In dieser Arbeit soll die Transplantation verschiedener Zellarten am Myokardinfarktmodell der Maus untersucht werden. Zur Übertragung der entsprechenden Stammzellen stehen prinzipiell mit der intrakoronaren, der intravenösen sowie der direkten Injektion in die Ventrikelwand verschiedene Methoden zur Verfügung. In dieser Arbeit werden die Zellen direkt in die Randzone des Infarktareals injiziert. Dies ist bei Versuchsreihen am Infarktmodell bzw. bei Patienten nach Herzinfarkt sowie bei Narbengewebe, das kaum spezifische Oberflächenstrukturen besitzt, die meist genutzte Methode [89].

In dieser Arbeit wurden Myoblasten und von ES-Zellen abgeleitete Kardiomyozyten als mögliche Optionen zur Zelltransplantationstherapie nach Myokardinfarkt untersucht. Als Vergleichsgruppen wurden sowohl Mäuse untersucht, denen lediglich PBS als Transplantat injiziert wurde, sowie eine Gruppe von Mäusen, bei der kein Myokardinfarkt induziert wurde (Schein-OP-Gruppe). Die beiden verschiedenen Zellgruppen sind bewusst aus dem Spektrum der theoretisch denkbaren Zellarten gewählt worden, um so unterschiedliche Voraussetzungen für die funktionelle Integration in das Myokardgewebe zu gewährleisten.

ES-Zellen haben ein hohes Potential an regenerativer Therapie von erkranktem, verletztem oder zerstörtem Gewebe, insbesondere für Gewebe mit beschränktem Regenerationspotential wie das Myokardgewebe. ES-Zellen sind auch aufgrund ihrer Pluripotenz eine hervorragende Quelle, da sie in jede somatische Zelle des Körpers differenziert werden können [41, 101-103]. Sie können in Kardiomyozyten mit den typischen elektrophysiologischen, strukturellen sowie kontraktile Eigenschaften differenziert werden. Teilweise werden sogar Eigenschaften und Proteine von

speziellen Subtypen wie beispielsweise Vorhof- oder Ventrikelzellen nachgewiesen [101, 102, 104, 105].

Bei der *in vitro* Differenzierung zu Kardiomyozyten entstehen sogenannte *embryoid bodies* [106]. Die Differenzierung kann man in drei Phasen einteilen. In der frühen Phase entstehen Schrittmacher-ähnliche Zellen [55, 107-109]. In der folgenden intermediären Phase kommt es zur Ausbildung von Vorhof- und Ventrikelzellen sowie Zellen des Reizleitungssystems des Herzens [107, 110]. Zuletzt können in der terminalen Phase gut organisierte Konvolute von Myofibrillen mit gut differenzierten A-, I- und Z-Banden sowie mit Desmosomen und gap-junctions nachgewiesen werden. Diese Zellen reagieren sehr sensibel auf β -adrenerge Stimulation [101, 105].

Bereits in den 1990er Jahren wurden von ES-Zellen abgeleitete Kardiomyozyten in Myokardgewebe transplantiert, nachdem man zuvor einen Benefit nach Transplantation von fetalen Kardiomyozyten nachgewiesen hatte [111, 112]. Die damals von Klug et al. *in vitro* differenzierten Kardiomyozyten zeigten eine Reinheit von mehr als 99 % und wurden in Herzen mit Muskeldystrophie Typ Duchenne injiziert. Obwohl hier noch keine speziellen Effekte untersucht wurden, konnte sowohl das Überleben der transplantierten Kardiomyozyten als auch die strukturelle Integration in das lokale Myokardgewebe nachgewiesen werden [112, 113]. Yang et al. transplantierten die Kardiomyozyten 15 Minuten nach Koronararterienverschluss in das potentielle Infarktareal. 6 Wochen nach Transplantation wurde hier eine verbesserte Herzfunktion nachgewiesen [114]. Hämodynamische Messungen zeigten einen höheren linksventrikulären Druck (LVSP) sowie einen niedrigeren linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) nach Zelltransplantation im Gegensatz zur lediglich scheintransplantierten Vergleichsgruppe [114]. Zusätzlich war die Reaktion auf eine β -adrenerge Stimulation signifikant verbessert. Auch in den histologischen Auswertungen konnte morphologisch der Benefit nach Zelltransplantation nachgewiesen werden. In den Arbeiten von Wetfall et al. konnten die Ausbildung von gap junctions sowie synchrone Kontraktionen nach Transplantation von embryonalen Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten nachgewiesen werden [108]. Der Nachweis der gap-junctions erfolgte durch Färbung mit Connexin 43 [105, 106, 115]. Min et al. transplantierten 2002 erfolgreich von ES-Zellen abgeleitete Kardiomyozyten in Infarktgewebe nach Myokardinfarkt der Ratte. Im 6-Wochen Follow-up konnten sowohl echokardiographisch als auch mittels Herzkatheteruntersuchung eine verbesserte Herzfunktion nachgewiesen werden [103].

Über die zweite Zellgruppe dieser Arbeit, die skelettalen Myoblasten, wird auch in verschiedenen Arbeiten die erfolgreiche Transplantation der Zellen in das Myokardgewebe der Maus beschrieben [88, 116-118]. Diese Zellen wurden ebenfalls schon erfolgreich als Zelltransplantate in infarziertem Myokardgewebe verwendet [91]. Sie können sich allerdings nicht weiter zu Kardiomyozyten differenzieren und integrieren nicht funktionell in das

umliegende Myokardgewebe, sondern verbleiben isoliert im Myokard. Bereits 1977 wurden Myoblasten als Zelltransplantate von Yaffe et al. benutzt [119]. Auch von weiteren Arbeitsgruppen wurden positive Einflüsse dieser Zellart auf die Herzfunktion beschrieben [120-122]. Auch hier wurden die Myoblasten jeweils völlig unabhängig vom umgebenden Herzmuskelgewebe nachgewiesen. In den meisten Arbeiten werden jedoch die Effekte nur jeweils einer transplantierten Zellart untersucht. Ohne eine alternative Zellart als Referenz unter analogen Untersuchungsbedingungen sowie identischem Studiendesign macht dies den Vergleich der jeweiligen Ergebnisse nur schwer möglich. Zusätzlich zeigt sich in einem Großteil der Studien, dass neben den direkten Transplantationseffekten ebenso indirekte Effekte durch Zytokine und verschiedene Wachstumsfaktoren auf das geschädigte Myokard wirken können. Um die meßbaren Effekte auf das zuvor geschädigte Myokard nach Zelltransplantationen vergleichen zu können, ist ein Studiendesign mit Verwendung verschiedener Transplantate und eine sorgfältige Aufarbeitung der Ergebnisse notwendig.

2. Zielstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welche Auswirkungen bei adulten ICR-Mäusen durch die Induktion eines Myokardinfarktes im Hinblick auf die Funktion des linken Ventrikels im Zeitverlauf zu beobachten sind und inwiefern sich diese Infarkt-Effekte durch die Transplantation von verschiedenen Zellarten beeinflussen lassen. Als Transplantate sollen dabei sowohl Myoblasten der Skelettmuskulatur, die bekanntlich nicht die Fähigkeit zur Differenzierung in Kardiomyozyten besitzen, als auch aus embryonalen Stammzellen abgeleitete primitive Kardiomyozyten (ES-Kardiomyozyten) vergleichend eingesetzt werden. Als Vergleichsgruppe werden eine scheinoperierte Gruppe (kein Myokardinfarkt) sowie eine Gruppe mit Myokardinfarkt und folgender PBS-Injektion (Schein-Transplantation) verwendet. Im Ergebnis soll beurteilt werden, inwiefern eine funktionelle Integration der transplantierten Zellen, die nur bei den ES-Kardiomyozyten anzunehmen ist, eine Voraussetzung für eine Verbesserung der Herzfunktion in diesem Modell darstellt.

3. Material und Methodik

3.1 Mäuse

Für die Versuchsreihen werden adulte Mäuse des ICR-Stammes mit einem Mindestgewicht bei Versuchsbeginn von 30g benutzt. Bezogen werden die Mäuse von dem Züchter Harlan-Winkelmann. Die Mäuse haben freien Zugang zu Wasser und zu Trockenfutter (ALTRONIN Standard-Diät 1320). Im Beobachtungszeitraum werden sie in einem klimatisierten Mausstall im Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gehalten. Der Hell-Dunkel-Wechsel beträgt 12 Stunden. Präoperativ werden die Mäuse durch Ohrmarkierungen unter Narkose gekennzeichnet, somit ist eine eindeutige Identifizierung der Mäuse gewährleistet. Während der Experimente wird der Gesundheitszustand der Mäuse regelmäßig kontrolliert. Alle Tiere werden einmal pro Woche gewogen.

3.2 Echokardiographie

Für die Echokardiographie werden die Mäuse mit einer 1,5% Isofluran-Inhalationsnarkose leicht narkotisiert, alle Untersuchungen finden unter Spontanatmung statt. Verwendet wird ein Ultraschall-Gerät der Firma Toshiba (Power Vision, 10MHz, Toshiba, Neuss, Deutschland). Echokardiographien erfolgen jeweils vor allen operativen Eingriffen und werden dann in wöchentlichen Abständen bis zum Tag der Organentnahme wiederholt. Alle Messungen werden in der parasternalen kurzen Achse in mittlerer Papillarmuskelhöhe durchgeführt.

Im B-Mode (zweidimensionale Darstellung) wird jeweils die diastolische und systolische Fläche des linken Ventrikels [mm²] auf Papillarmuskelebene durch manuelles Umfahren der Endokardlinie mit dem Cursor gemessen. Aus den beiden Werten wird anschließend die *fraction of area change* (FAC) als ein Parameter zur Beurteilung der linksventrikulären Pumpfunktion nach folgender Formel berechnet:

$$\text{FAC [\%]} = \frac{(\text{Area diast.} - \text{Area syst.})}{\text{Area dist.}} \times 100$$

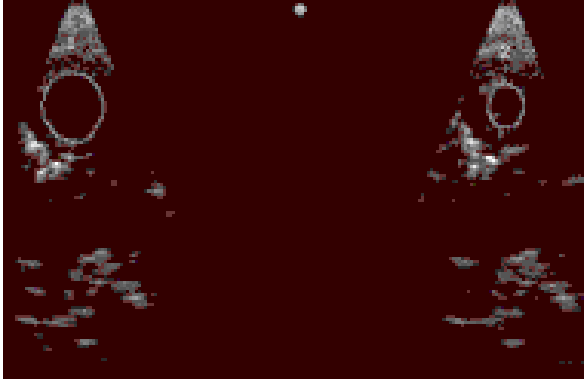


Abb. 1

B-Mode Echokardiographie, Aufnahme in der parasternalen kurzen Achse in mittlerer Papillarmuskelhöhe. Bestimmung der Fläche des linken Ventrikels in der Diastole (links; Area diast.) und Systole (rechts, Area syst.). Beispiel einer normalen adulten ICR-Maus.

Im M-Mode wird zunächst die Herzfrequenz durch Ausmessung des RR-Intervalls von drei Herzaktionen bestimmt. Desweiteren werden die linksventrikulären Diameter systolisch (LVIDS) und diastolisch (LVIDD), die systolische und diastolische Wanddicke der linksventrikulären Vorder- (LVAWS/D) und Hinterwand (LVPWS und LVPWD) sowie die Ejektionsfraktion (EF) nach Teichholz und die FS (fractional shortening, fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung) als Ausdruck der Pumpfunktion des linken Ventrikels bestimmt.

Die fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung (FS) berechnet sich wie folgt:

$$FS = \frac{(LVIDD - LVIDS)}{LVIDD}$$

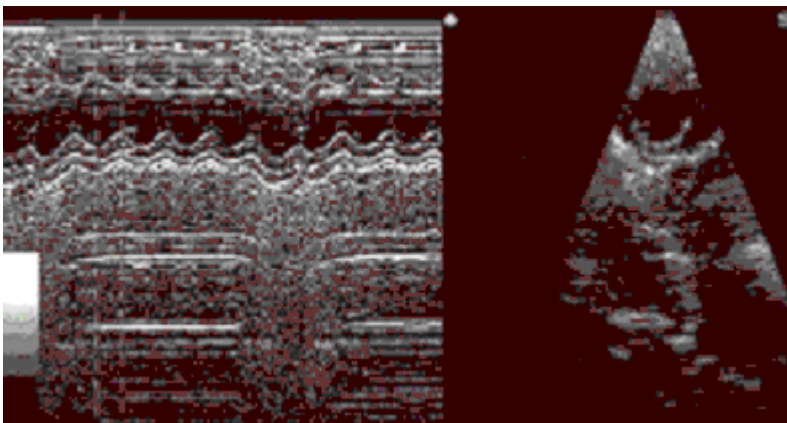


Abb. 2

M-Mode Echokardiographie, Aufnahme in der parasternalen kurzen Achse (Beispiel einer normalen adulten ICR-Maus)

Um eventuelle Messungenauigkeiten auszugleichen, werden alle Messungen sowohl im B-Mode als auch im M-Mode jeweils dreimal durchgeführt und gemittelt.

Bei allen echokardiographischen Untersuchungen wird der Untersucher im Hinblick auf die Gruppenzugehörigkeit der Mäuse zu den verschiedenen Therapie- bzw. Kontrollgruppen verblindet.

3.3 Transplantierte Zellen

3.3.1 Skelettale Myoblasten

Primäre Maus-Myoblasten können *in vitro* gereinigt, isoliert und vermehrt werden. Von Skelettmuskeln gewonnene Primärkulturen beinhalten zunächst eine Mischpopulation aus Myoblasten und Fibroblasten. Die Myoblasten werden nach einem standardisierten Protokoll isoliert. Durch Generierung optimaler Wachstumsbedingungen u.a. durch das entsprechende Nährmedium werden die Myoblasten in ca. 1 bis 2 Wochen zu der dominanten Zellart. Nach knapp 3 Wochen färben sich annähernd 100% der Zellen positiv für das Myoblasten-spezifische Protein Desmin. Zur Verfügung gestellt werden die Zellen freundlicherweise von Frau Dr. Svetlana Oustanina aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. T. Braun [123, 124].

Zur Gewinnung der Myoblasten werden die Mäuse durch cervikale Dislokation unter CO₂-Inhalation geopfert, anschließend werden die Extremitäten mit 70-prozentigem Ethanol gespült, abgetrennt und die Muskeln unter sterilen Bedingungen idealerweise unter dem Mikroskop vom Knochen und von der Haut getrennt und isoliert. Das Muskelgewebe wird auf einer Petrischale auf Eis gelagert und stets unter sterilem PBS feucht gehalten. Nun wird das Gewebe mit einem Rasiermesser zerkleinert bis sich ein Gewebebrei gebildet hat. Unter weiterem Zerkleinern wird eine Enzymlyösung mit Kollagenase/Dispase/Ca₂Cl₂ hinzugefügt. Das so entstandene Gewebe wird in ein steriles Röhrchen gegeben und bei 37°C für ca. 20 Minuten inkubiert, bis ein endgültig homogener Gewebebrei entsteht. Um eine Klumpenbildung zu verhindern, wird die Suspension stetig vorsichtig mit einer Plastikpipette titriert (ggfs. Filtrieren durch ein 80µm Nylonnetz in einem sterilen Trichter). Nach Zentrifugieren der Zelllösung für 10 Minuten bei 350g erfolgt die Resuspendierung des Gewebshaufens (Pellets) in F-10-basiertem Nährmedium für primäre Myoblasten und die Ausplattierung in einer kollagenbeschichteten Petrischale. Um das Zellverhältnis zunehmend zu den Myoblasten zu verschieben, wird die Petrischale bei 37°C und unter 5% CO₂ im Inkubator belassen. Das Nährmedium wird alle zwei Tage gewechselt. Sobald die Fibroblasten nicht mehr nachweisbar sind, werden die Myoblasten mit PBS auf eine neue Schale ausplattiert. Das Nährmedium wird nochmals auf F-10/DMEM-Nährmedium gewechselt. So kann eine schnellere und dichtere Besiedelung mit Myoblasten erreicht werden. Nach ca. 2 Wochen können die annähernd Fibroblasten-freien Myoblastenkulturen gewonnen werden. Die Vitalität der Zellen wird vor der Transplantation mittels Propidiumiodidausschluss-Assay getestet und durch ein „*fluorescence activated cell sorting-System*“ (FACS) ausgewertet

[30]. Propidium-Iodid (PI) ist ein Farbstoff, der die Zellmembran von toten Zellen perforieren kann, jedoch nicht die intakte Membran von lebenden Zellen durchdringen kann. Diese Eigenschaft wird in der Durchflusszytometrie zur Lebend-Tot-Diskriminierung von Zellen verwendet [30]. Im PI-Assay zeigt sich, dass der überwiegende Anteil der für die eigenen Experimente eingesetzten Myoblasten ($91 \pm 4\%$) sich nicht mit Propidiumiodid anfärbt, was auf die Integrität der Zellmembranen schließen lässt [124]. Wie in Abb. 3 zu sehen ist, ist nur ein geringer Anteil der Myoblasten für den PI-Farbstoff permeabel und daher instabil bzw. avital.

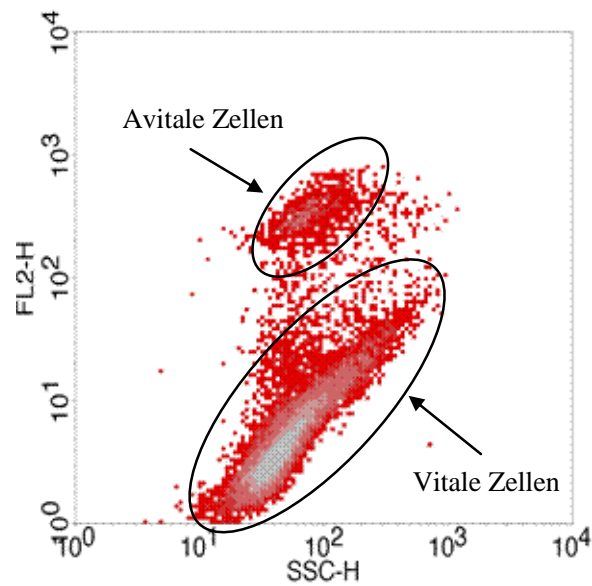


Abb. 3
Vitalitäts-Assay :

Propidium-Iodid-Ausschluss (FL2-H)

Die Mehrheit der Zellen ist unmittelbar vor Transplantation vital. Um die Vitalität der transplantierten Zellen zu bestimmen, wird ein PI-Assay durchgeführt und durch FACS ausgewertet. Lediglich ein kleiner Anteil der Zellen wird durch den Propidium-Iodid- Farbstoff penetriert und so als avital dargestellt (Beispiel: Skelett-Myoblasten).

Simultan werden die Myoblasten mittels des Fluochromes DiI für die spätere Identifizierung markiert (siehe 3.3.3.).

3.3.2 Von embryonalen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten (ES-Kardiomyozyten)

Die aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten (ES-Kardiomyozyten) werden freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat. S. Niebrügge aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. J. Lehmann (Institut für Zellkulturtechnik, Technische Fakultät der Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt [41]. In einem zuvor optimierten Bioreaktorprozess im 2L-Maßstab werden Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen differenziert. Verwendet werden hierzu gentechnisch veränderte embryonale Stammzellen der Maus, die ein Fusionsgen tragen, das die Expression einer Aminoglykosid-Phosphotransferase unter der Kontrolle des α MHC-Promoter

realisiert und so den sich differenzierenden Kardiomyozyten eine Resistenz gegenüber bestimmten Zytostatika (G418) vermittelt [41]. Die weitere Kultivierung erfolgt in zwei Phasen. Die embryonalen Stammzellen verklumpen zu Cardiac Bodies und werden so in ein Nährmedium geimpft, wo sie für 9 Tage in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren. Im Anschluss werden Kardiomyozyten durch Zugabe von G418 selektiert. Um die Differenzierung in die kardiogene Linie zu unterstützen, wird Retinsäure als Differenzierungsfaktor hinzugesetzt. Während der gesamten Zeit im Kulturmedium werden sowohl die Anzahl der Cardiac Bodies als auch deren Funktionsfähigkeit bestimmt. An die Kultivierung schliesst sich routinemäßig eine Charakterisierung der generierten Zellen an. Es werden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt, um die Expression von „sarcomeric myosin“ als Marker für Kardiomyozyten zu bestimmen. Durch diese Untersuchungen kann eine Reinheit der Kardiomyozyten vor Transplantation von über 99% nachgewiesen werden. Außerdem können mit immunohistochemischen Analysen spezifische kardiale Proteine und ein hoher myofibrillärer Organisationsgrad der generierten Kardiomyozyten detektiert werden (siehe Abb 4). Direkt vor Transplantation werden die Kardiomyozyten (wie auch die Myoblasten) durch einen stabilen Fluoreszenzfarbstoff, das Fluochrom DiI (siehe 3.3.3.) wie vom Hersteller beschrieben markiert. So wird die spätere Identifizierung der transplantierten Zellen ermöglicht. Die Viabilität der Kardiomyozyten wird wie bereits unter 3.3.1. beschrieben mittels Propidiumiodidausschluss-Assay (FACS) nachgewiesen [41, 125, 126].

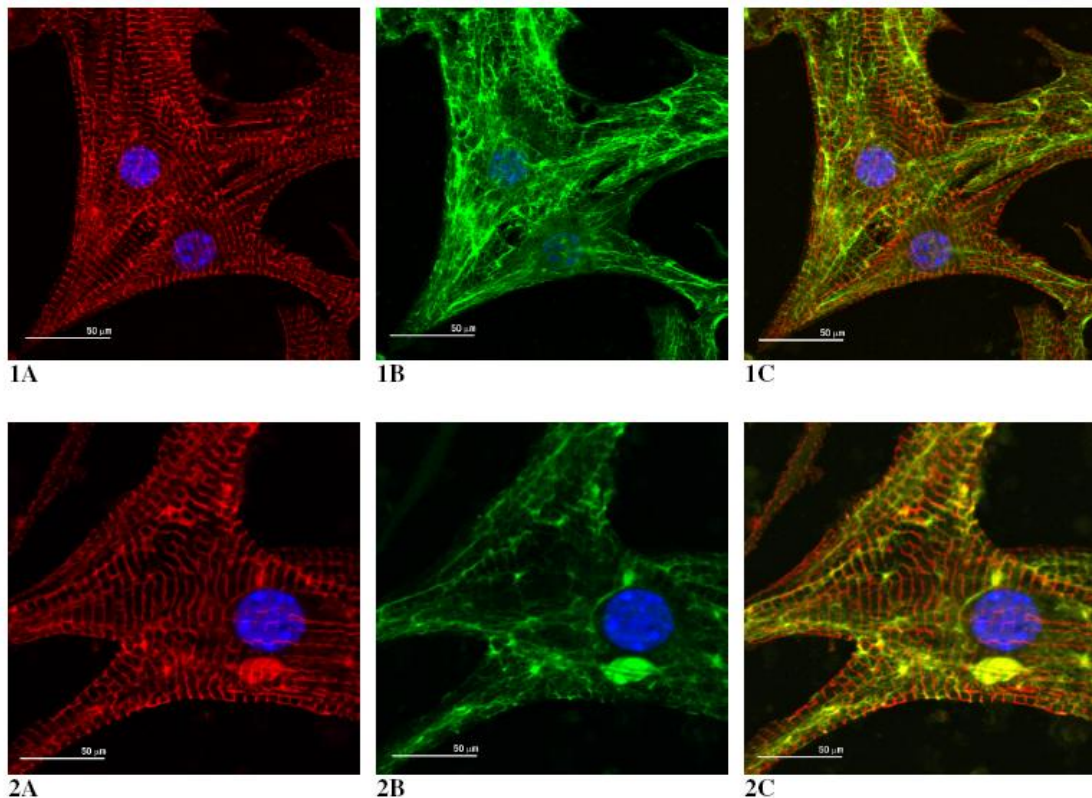


Abb. 4

Nachweis von α -Actin (rot) und Desmin (grün), Zellkernfärbung (blau) an ausplattierten Kardiomyozyten, die mittels des beschriebenen Verfahrens aus ES-Zellen differenziert wurden (Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie).

1A) α -Actin 1B) Desmin 1C) Overlay 2A) α -Actin 2B) Desmin 2C) Overlay

Die Bilder wurden freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat S. Niebrügge (Institut für Zellkulturtechnik, Technische Fakultät der Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt.

3.3.3 DiI-Markierung der transplantierten Zellen

Um die Zellen nach der jeweiligen Transplantation später leichter nachweisen zu können, werden die Transplantate in der Zellkultur mit dem fluoreszierenden Zellmarker DiI markiert. Dieser lipophile Farbstoff besteht aus langkettigen Kohlenwasserstoffketten, mit denen er sich gut an die Lipoproteine der Zellmembran bindet. Aufgrund der geringen Zelltoxizität ist der Farbstoff gut für längere Beobachtungszeiträume geeignet. Die Fluoreszenz ist in wässrigem Milieu nur gering, die intensive Fluoreszenz ist erst nach Einbau in die Zellmembran darstellbar [127, 128]. Vor Markierung der Zellen wird das Kulturmedium der Zellen abgesaugt. Die Zellen werden mit PBS zweimal gespült. Der Farbstoff wird in einer Konzentration von 2 μ g/ml aufgetragen und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann erfolgt eine Einlagerung der Zellkulturen bei 4°C für weitere 15 Minuten. Diese geringe Temperatur erlaubt es dem Farbstoff, die Zellmembran zu färben, ohne jedoch via Endozytose in die Zelle einzudringen und hier in cytoplasmatischen Vesikeln gespeichert zu werden. Im Anschluss erfolgt das nochmalige Waschen mit PBS [129].

3.4 Operationen

3.4.1 Induktion eines Myokardinfarktes durch LAD-Ligatur

Die Mäuse werden unter 2,5% Isofluran-Inhalationsnarkose intubiert und an ein Beatmungsgerät (MiniVent, Hugo Sachs Elektronik) angeschlossen. Dem Sauerstoff wird für die gesamte Narkose 2,5% Isofluran beigemischt. Die Mäuse werden mit einem positiven Druck volumenkontrolliert beatmet. Präoperativ wird den Mäusen zusätzlich als Analgetikum 5µg/g KG Rimadyl subcutan verabreicht. Nun wird in narkotisiertem Zustand zunächst die linke ventrale Thoraxseite der Mäuse rasiert. Nach sorgfältiger Desinfektion des Operationsgebietes erfolgt der Hautschnitt parallel des Rippenverlaufes in Höhe des vierten Interkostalraumes. Jetzt wird die den Thorax unmittelbar bedeckende Muskulatur (M. pectoralis major et minor) sorgfältig freigelegt. Die Muskeln werden vorsichtig mit einem 5-0 Faden umlegt und durch leichte Zugkraft separiert. Nun wird der Thorax über einen interkostalen Zugang im vierten Rippenzwischenraum eröffnet, indem die interkostale Muskulatur scharf durchtrennt wird. Anschließend wird die Lunge vorsichtig zur Seite geschoben, und das Perikard wird freigelegt und eröffnet. Durch Ligatur der linken Koronararterie wird die hauptsächliche arterielle Blutversorgung des linken Ventrikels unterbunden und so der Myokardinfarkt provoziert. Das linke Koronargefäß wird hierbei aufgesucht und vor seiner Hauptaufzweigung mit einem Faden ligiert. Die Ligatur gilt als erfolgreich, wenn das Myokard der anterioren Ventrikelwand sich blass verfärbt, die Kontraktibilität nachlässt und die LAD distal der Ligatur eine livide Verfärbung annimmt. Abschließend erfolgt der Wundverschluss in drei Schichten: Zunächst lockere Adaptation der Rippen, es folgt die Adaptation der separierten Pectoralis-Muskulatur und zuletzt der Hautverschluss. Nach der Extubation werden die Mäuse wieder zurück in den Käfig gesetzt, wo sie unter Aufsicht wieder aufwachen. Zur postoperativen Schmerztherapie wird den Tieren drei Tage lang Rimadyl als Analgetikum in einer Konzentration von 50µg/ml dem Trinkwasser beigefügt.

3.4.2 Schein-Operation

Die Mäuse werden wie oben bereits beschrieben unter 2,5% Isofluran-Inhalationsnarkose intubiert und an ein Beatmungsgerät (MiniVent, Hugo Sachs Elektronik) angeschlossen. Dem Sauerstoff wird für die gesamte Narkose 2,5% Isofluran beigemischt. Die Mäuse werden mit einem positiven Druck volumenkontrolliert beatmet. Präoperativ wird den Mäusen zusätzlich als Analgetikum 5µg/g KG Rimadyl subcutan verabreicht. Nun wird in narkotisiertem Zustand zunächst wieder die linke ventrale Thoraxseite der Mäuse rasiert und nach sorgfältiger Desinfektion des Operationsgebietes erfolgt der gleiche Zugang wie zur LAD-Ligatur. Nach Freilegung des Perikards wird die Wunde bereits wieder über drei Schichten wie unter 3.4.1. beschrieben verschlossen, ohne dass jedoch eine Manipulation an den Koronargefäßen erfolgt ist.

3.4.3 Zell-Transplantationen

Sieben Tage nach der Infarkt-Induktion (LAD-Verschluss) erfolgt die nochmalige Operation der Tiere zur Durchführung der Zell-Transplantation bzw. PBS-Injektion. Die Mäuse werden wie oben bereits beschrieben unter 2,5% Isofluran-Inhalationsnarkose intubiert und an ein Beatmungsgerät angeschlossen. Dem Sauerstoff wird für die gesamte Narkose 2,5% Isofluran beigemischt. Die Mäuse werden mit einem positiven Druck volumenkontrolliert beatmet. Präoperativ wird den Mäusen zusätzlich als Analgetikum 5µg/g KG Rimadyl subcutan verabreicht. Nun wird in narkotisiertem Zustand zunächst wieder die linke ventrale Thoraxseite der Mäuse rasiert und nach sorgfältiger Desinfektion des Operationsgebietes erfolgt der gleiche Zugang wie zur LAD-Ligatur. Nach Freilegung des Perikards wird 3 x 50µl einer Lösung, die entweder $3 \cdot 10^5$ Myoblasten oder $3 \cdot 10^5$ embryonale Kardiomyozyten bzw. nur PBS enthält, in die Randzone des Infarktareals injiziert. Abschließend folgt erneut der schichtweise Wundverschluss.

3.5 Organentnahme und In-Situ-Fixierung

35 Tage nach dem operativen Verschluss der LAD (d.h. 28 Tage nach den Zell-Transplantationen) erfolgt nach der Durchführung der abschließenden Echokardiographie die diastolische in-situ-Fixierung der Herzen und anschließend die Organentnahme. Hierfür werden die Mäuse erneut mit 2,5% Isofluran narkotisiert und beatmet. Zunächst wird das Abdomen eröffnet und die Aorta abdominalis kanüliert. Anschließend wird der Thorax und der rechte Vorhof (RA) durch Inzision eröffnet. Direkt nach Eröffnung des RA wird über die kanülierte Aorta abdominalis eine Kardioplegie-Lösung (50mM KCL + 200IE/ml Heparin in PBS) infundiert. Der Vorratsbehälter der Kalium-Heparin-Lösung wird 120cm oberhalb des Maus-Herzens aufgehängt; somit wird in der Aorta arterieller Blutdruck simuliert. Zeitgleich mit der Einleitung der Kalium-Heparin-Lösung über die Aorta wird eine weitere Kanüle durch das Myokard bzw. die Narbe direkt in den linken Ventrikel eingeführt. Auch hier wird die Kalium-Heparin-Lösung eingeleitet. Im Gegensatz zur ersten Kanülierung wird der Vorratsbehälter für diese Infusion nur ca. 15cm oberhalb des Herzens (= diastolischer Druck im linken Ventrikel) aufgehängt. Dieser Druck bestimmt letztendlich auch die Vordehnung der Kardiomyozyten, so dass die Kardiomyozyten in der Diastole fixiert werden. Nach ca. 15 Minuten wird über die liegenden Kanülen mit Hilfe von 3-Wege-Hähnen eine 4%ige Formalin-Lösung eingeleitet, die Druckverhältnisse (Höhe der Vorratsbehälter) bleiben dabei unverändert. Nachdem 50ml PFA durch die Aorta infundiert worden sind, werden die Organe entnommen und nochmal kurz mit 4% PFA nachfixiert. Es werden das Herz, die Leber und die Lungen entnommen. Das Herz wird aus dem umgebenden Gewebe sorgfältig herauspräpariert, und die zu- bzw. abführenden Gefäße werden durchtrennt. Nachdem das Herz aus dem Brustkorb entfernt ist, wird die komplette

Lunge ebenso getrennt vom umgebenden Gewebe entnommen. Zuletzt wird die Leber unter Erhalt aller Leberlappen vorsichtig entnommen.

3.6 Histologie

3.6.1 Herstellung und Dokumentation der Schnittpräparate

Nach Organentnahme werden die Organe (Herz, Lunge, Leber) einzeln gewogen. Die Herzen werden zur Entwässerung in 30-prozentiger Saccharose-Lösung in PBS über 24 Stunden im Kühlschrank gelagert. Anschließend werden die Herzen in Polyfreeze TM Tissue Freezing Medium TM (Polyscience, Inc.) eingebettet, auf Trockeneis tiefgefroren und bei -20°C gelagert. Bei der Einbettung wird darauf geachtet, dass bei der späteren Schnittführung Kurzschnittschnitte entstehen. Am Gefrierschnitt-Kryotom werden die Herzen in 10µm Schritten von der Herzspitze bis zur Klappenebene komplett geschnitten und auf Objektträger aufgezo-gen, die zuvor mit Vectabond beschichtet werden. Es ergeben sich pro Herz etwa 100 Objektträger mit jeweils vier bis fünf Kryo-Schnitten, die bis zur Durchführung der histologischen Färbungen ebenfalls wieder bei -20°C gelagert werden.

Um später für die Färbungen einen genauen Überblick über die Herzposition und Qualität der einzelnen Schnitte zu haben, werden die Schnitte zunächst ungefärbt unter dem Durchlicht-Mikroskop beurteilt. Dabei wird analysiert, auf welchem Objektträger sich jeweils die Herzspitze, die Basis der Papillarmuskeln sowie der Mitralklappenring befindet. Es werden diejenigen 4 Schnittpräparate herausgesucht, die den Abschnitt zwischen Herzspitze und Mitralklappenebene in 5 gleich große Abschnitte untergliedern, um so die spätere quantitative Bestimmung der Infarktgröße vergleichbar zu gestalten.

3.6.2 Trichrom-Färbung

Trichrom-Färbungen werden primär zur Unterscheidung von Kollagen und Muskelgewebe verwendet [130], in den eigenen Untersuchungen wird ein vorgefertigtes Kit der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Das erste Trichrom-System ist auf Mallory zurückzuführen [131, 132]. Weitere Modifikationen wurden von Masson und Gomori eingeführt [131, 133]. Das hier beschriebene Verfahren beruht auf den Arbeiten von Masson und der Modifizierung von Lillie [134] mit Verwendung von Anilinblau anstatt eines grünen Farbstoffs zur Färbung von Kollagen.

Zunächst werden die Gewebeschnitte mit Bouins-Lösung nachfixiert, die Zellkerne werden mit Weigerts Eisen-Hämatoxylin und Zytoplasma sowie Muskelgewebe dann mit Beibrich-Scharlachrot-Säurefuchsin gefärbt. Nach Behandlung mit Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure wird Kollagen durch eine Färbung mit Anilinblau nachgewiesen. Ein Spülen in Essigsäure nach der Färbung läßt die Abstufung der Farben deutlicher und transparenter erscheinen [130, 133, 135-139].

Für die Färbung werden die vier Objektträger verwendet, die den Abstand zwischen Herzs Spitze und -basis in 5 gleiche Abschnitte unterteilen (siehe 3.6.1.). Mit diesen gefärbten Schnitten werden später die Infarktgrößen sowie die linksventrikuläre Zirkumferenz und die Dicken der jeweiligen Ventrikelwände bestimmt.

Färbeprotokoll

Nach Angaben des Herstellers werden die Objektträger mit den 10µm dicken Schnittpräparaten zum Auftauen und Spülen in eine große Küvette mit PBS-Puffer für 30 Minuten gehängt, wobei der PBS-Puffer nach 15 Minuten gewechselt wird. Nun werden die Objektträger für 15 Minuten bei 56°C in Bouins-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) im Brutschrank fixiert. Im Anschluss werden die Objektträger unter laufendem Wasser solange gewaschen, bis jegliche gelben Farbreste rausgespült sind. Anschließend werden die Objektträger zunächst in deionisiertes Wasser getaucht und danach für 5 Minuten in Weigerts Iron Hämatoxylin Solution gefärbt. Hiernach erfolgt ein erneutes Eintauchen in deionisiertes Wasser zum Spülen und dann das Eintauchen in Biebrich Scarlet-Acid-Fuchsin für 5 Minuten. Nach Waschen in deionisiertem Wasser werden die Präparate zunächst 5 Minuten in Phosphotungstic/Phosphomolybdic Acid Solution und dann 50 Minuten in Aniline Blue Solution gebadet. Anschließend werden die Objektträger für 2 Minuten in 1%ige Essigsäure gestellt. Abschließend werden alle Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert. Eingedeckelt werden die Objektträger mit Entellan und einem Deckgläschen.

Für die Auswertung wird jeder Schnitt des jeweiligen Objektträgers unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet und per Foto dokumentiert. Die genaue Ausmessung der Herzen erfolgt mit dem Programm Scion Image (Scion Corporation).

3.6.3 Bestimmung der Myozytenquerschnittsfläche

Unter Verwendung von Peanut-Agglutinin wird in dieser Färbung zunächst das interstitielle Kollagen angefärbt, welches anschließend unter dem Laser-Mikroskop anhand einer grünen Fluoreszenz sichtbar wird. Die Färbung gestattet später die Bestimmung der Myozytenquerschnittsfläche und in Kombination mit einer weiteren Färbung (Rhodamine-Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I-Färbung) die Bestimmung des interstitiellen Kollagengehaltes im Myokard (siehe Tab. 1).

Färbeprotokoll

Pro Herz werden für diese Färbung jeweils 2 Objektträger mit den 10µm-Schnitten verwendet. Zunächst werden diese für zweimal 15 Minuten in PBS in einer großen Küvette gewaschen. Es folgt die Nachfixierung mit 4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für 20 Minuten. Nach erneutem Waschen in 10% PBS für 5 Minuten werden die Schnitte zuerst mit PBS (pH 7,2-7,4)

und anschließend mit PBS (pH 5,0) gespült. Jetzt wird Neuraminidase mit einer Konzentration von 3,3U/ml aufgetragen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt zweimaliges Spülen mit PBS-Puffer, bevor das Fluorescein-markierte Peanut Agglutinin (5mg/ml Vector Laboratories) verdünnt auf 20µl/ml für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln aufgetragen wird. Zum Abschluss erfolgt das erneute dreimalige Spülen mit PBS, bevor die Objektträger mit Mowiol-Lösung und einem Deckgläschen eingedeckelt werden. Die Objektträger werden über Nacht im Dunkeln im Kühlschrank gelagert und am Folgetag am Laser-Scan-Mikroskop (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) betrachtet, fotografiert und ausgewertet.

3.6.4 Gefäßkollagenanfärbung

Das Gefäß-Endothel der zwischen den Myozyten gelegenen Kapillaren wird durch einen rot fluoreszierenden Farbstoff angefärbt. In Kombination mit der oben geschilderten Färbung des Gesamt-Kollagens, das aus dem interstitiellen Kollagen und dem Gefäß-assoziierten Kollagen besteht (Peanut Agglutinin = grün), kann somit der Kollagengehalt des Interstitiums als Differenz aus Gesamt-Kollagen und Gefäßanteil bestimmt werden.

Färbeprotokoll

Zunächst werden die ausgewählten Objektträger für zweimal 15 Minuten in PBS in einer großen Küvette gewaschen. Es folgt die Nachfixierung der Schnitte mit 4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für 30 Minuten, bevor die Schnitte erneut zweimalig in 10% PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen werden. Nun wird der Lectin-I- Farbstoff (siehe hierzu 3.6.3. und Tab. 1) in einer Verdünnung von 1:400 aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Dunkelheit gelagert. Nach erneutem dreimaligem Spülen mit PBS folgt das Eindeckeln mit Mowiol-Lösung und einem Deckgläschen. Die Objektträger werden über Nacht im Dunkeln im Kühlschrank gelagert und am Folgetag am Laser-Scan-Mikroskop (Leica Microsystems Heidelberg GmbH) betrachtet, fotografiert und ausgewertet.

3.7 Auswertungen

Die genauen Ausmessungen der histologischen Fotos werden im Programm Scion Image von Scion Corporation (als Freeware erhältlich) durchgeführt.

Zur Auswertung und statistischen Umsetzung werden alle gewonnenen Daten in das Programm Microsoft Excel 2002 (Microsoft) übertragen. Zusätzlich wird das Add-In Winstat, Version 2009.1 für die Tabellen und Grafiken benutzt. Das Literaturverzeichnis wird mit dem Literaturmanagementprogramm EndNote 6.0.2 als AddIn für Word verwaltet.

3.8 Reagenzien

Herstellung eines 10fach PBS-Puffers (Phosphate buffered Saline)

Zum Ansatz von 1000ml Pufferlösung werden zunächst folgende Bestandteile abgewogen und vermischt und schließlich in einem sterilen wiederverschließbaren Gefäß mit deionisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt: 80,0g Natriumchlorid (NaCl), 2,0g Kaliumchlorid (KCl), 14,4g Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) sowie 2,0g Kaliumdihydrogenphosphat. Der pH-Wert wird mit HCl bzw. NaOH auf einen Wert zwischen 7,2-7,4 eingestellt.

Herstellung von Pbn (PBS + 1% BSA + 0,05 % Natriumsäure)

Zum Ansatz von 1000 ml Pbn-Lösung werden zunächst 990ml PBS-Pufferlösung hergestellt. Dazu wird der unter 3.2.1. hergestellte PBS-Puffer 1:10 verdünnt. Dann werden 10ml BSA sowie 0,5ml NaN_3 hinzugefügt und für 10 Minuten mit dem Rührer vermischt.

Herstellung von 4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA-Lösung)

Zum Ansatz von 1000ml PFA-Lösung werden zunächst 40g PFA in 800ml deionisiertem Wasser unter Rühren auf 60°C unter dem Abzug erhitzt. Nun werden einige Tropfen Natronlauge (NaOH) zugegeben, bis sich die Lösung klärt. Nun werden 100ml 10% PBS-Puffer hinzugefügt. Die Gebrauchslösung wird mit deionisiertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt. Es folgt das Filtrieren der Gebrauchslösung. Der pH-Wert wird bei 7,0 eingestellt. Das PFA wird im Anschluss in 50ml Kunststoff-Röhrchen abgefüllt, verschlossen und bei -20°C gelagert.

Herstellung von Mowiol-Lösung

Es werden 2,4g Mowiol und 6g Glycerol in ein Gefäß gegeben und gründlich vermischt. Nach der Zugabe von 6ml deionisiertem Wasser bleibt die Lösung bei Raumtemperatur für 4 Stunden stehen. Anschließend werden 12ml 0,2M Tris mit einem pH-Wert von 8,5 ergänzt. Diese Lösung wird nun auf einer Heizplatte unter ständigem Rühren auf maximal 50°C erhitzt, bis sich die Lösung klärt (ca. 10 Minuten). Das Mowiol wird im Anschluss in 10ml Kunststoff-Röhrchen abgefüllt und bei -20°C gelagert.

Material	Hersteller
Altromin Standard Diät 1320 (=Mäusenahrung)	Altromin Gesellschaft für Tierernährung GmbH Deutschland
Forane®/Forene® (= Anästhetikum Isofluran)	Drägerwerk AG Lübeck, Abott GmbH & Co KG
Rimadyl (= Analgetikum NSAID)	Pfizer GmbH, Direktionsbereich Tiergesundheit 76139 Karlsruhe
Polyfreeze™ Tissue Freezing Medium™	Polyscience, Inc. , Warrington, PA 18976
Vectabond™ Reagent for tissue section adhesion	Vector laboratories Inc.US Headquarter 30Ingold Road, Burlingame, CA 94010
Accustain ® Trichrome Stain (Masson)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH Aschenstrasse 5 82024 Taufkirchen bei München
Accustain ® Bouin's Solution	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH Aschenstrasse 5 82024 Taufkirchen bei München
Fluorescein labeled Peanut Agglutinin	Vector laboratories Inc.US Headquarter 30Ingold Road, Burlingame, CA 94010
Rhodamine labeled Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I	Vector laboratories Inc.US Headquarter 30Ingold Road, Burlingame, CA 94010
DiI lipophilic tracer (= DiI-Farbstoff zur Markierung der Zellen)	Molecular probes, Invitrogen™ Life technologies GmbH Frankfurter Strasse 129B 64293 Frankfurt
Hoechst 33258, Pentahydrate-FluoroPure™ Grade (= fluoreszierender Kernfarbstoff)	Molecular probes, Invitrogen™ Life technologies GmbH Frankfurter Strasse 129B 64293 Frankfurt
Leica Bi-Ocular Mikroskop (Leica DM IL)	Leica Microsystems Heidelberg GmbH Am Friedensplatz 3 68165 Mannheim
Leica MZFL III, Fluo III™ (= Fluoreszenzstereomikroskop)	Leica Microsystems Heidelberg GmbH Am Friedensplatz 3 68165 Mannheim
LEJ ebq 50 (= Fluoreszenzlichtquelle)	Leistungselektronik Jena GmbH Stockholmer Strasse 5 07747 Jena
Leica DM IRE2 (= motorisiertes invertiertes Fluoreszenzmikroskop)	Leica Microsystems Heidelberg GmbH Am Friedensplatz 3 68165 Mannheim
Mouse Ventilator Mini Vent (Typ 845) (= Mausbeatmungsgerät)	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus Gruenstrasse 1 79232 March-Hugstetten
Microm Typ HM 500 OM Cryostat Microtome	Microm International GmbH Otto Hahn Strasse 1a 69190 Walldorf
Leica TCS SP2 (= Laser Scan Mikroskop)	Leica Microsystems Heidelberg GmbH Am Friedensplatz 3 68165 Mannheim
Ultraschallgerät Power Vision 10 MHz	Toshiba Europe GmbH Hammfelddamm 8 41460 Neuss

Tab. 1
Benutzte Materialien und Herstellerangaben

4. Ergebnisse

4.1 Morphometrie

Das Körpergewicht der in den Untersuchungen eingesetzten Mäuse im Zeitverlauf ist in Tab. 2 dargestellt.

Mausgewicht [g]	vor Infarkt (-7)	vor Tx (0)	7d nach Tx (+7)	14d nach Tx (+14)	21d nach Tx (+21)	28d nach Tx (+28)
Schein-OP	38,2 ± 1,2	36,9 ± 0,9	36,7 ± 1,0	37,6 ± 0,9	37,4 ± 1,4	38,5 ± 0,9
PBS	38,2 ± 2,5	31,4 ± 1,2	34,7 ± 1,8	35,7 ± 1,8	35,3 ± 1,8	35,5 ± 1,6
Myoblasten	34,0 ± 0,8	32,0 ± 0,7	32,7 ± 0,7	32,5 ± 0,6	33,0 ± 0,5	34,4 ± 0,7
Kardiomyozyten	38,9 ± 0,9	36,2 ± 0,9	35,1 ± 0,8	35,8 ± 0,6	36,4 ± 0,6	36,8 ± 0,8

Tab. 2

Mittelwerte und Standardfehler des Körpergewichtes der verwendeten Mäuse (Einheit g) zum jeweiligen Zeitpunkt

Im Verlauf zeigen alle Mäuse nach Myokardinfarkt zunächst eine deutliche Gewichtsabnahme. Nach Transplantation von Myoblasten zeigen die Mäuse der entsprechenden Gruppe eine signifikant größere relative Gewichtszunahme im Vergleich zur Kardiomyozyten-Gruppe (siehe Abb. 5). Zwischen der PBS und der Kardiomyozyten-Gruppe können diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Bei der scheinoperierten Gruppe zeigte sich ebenfalls eine Gewichtsreduktion, diese fällt jedoch geringer aus und erreicht bereits während des Untersuchungszeitraums wieder das Vorniveau.

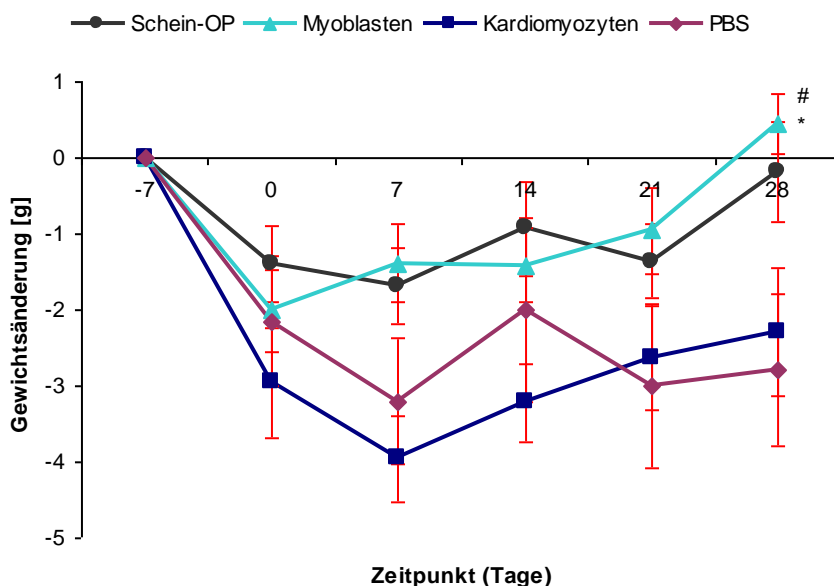


Abb. 5

Änderung des Körpergewichtes der Versuchstiere bezogen auf den Tag vor der LAD-Ligatur (Tag -7); der Tag 0 entspricht dem Tag der Zell-Transplantation. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied nach 28 Tagen zwischen Myoblasten und PBS sowie zwischen Myoblasten und Kardiomyozyten (* $p < 0,05$ vs. Kardiom.; # $p < 0,05$ vs. PBS).

Am Ende der Versuchsreihe werden die Gewichte der verschiedenen Organe gemessen. Hier zeigt sich, dass die Herzen der scheinoperierten Mäuse mit einem relativen Gewicht von $7,1 \pm 0,4\text{mg/g}$ am leichtesten sind. Die Herzen der beiden Stammzell-transplantierten Gruppen zeigen mit jeweils $9,0 \pm 0,4\text{mg/g}$ bzw. $8,4 \pm 0,4\text{mg/g}$ ein signifikant höheres relatives Gewicht ($p < 0,05$) als die der scheinoperierten Gruppe. Die Mäuseherzen, denen lediglich Pufferlösung injiziert wurde, zeigen mit $10,6 \pm 0,9\text{mg/g}$ den höchsten Wert (siehe Abb. 6).

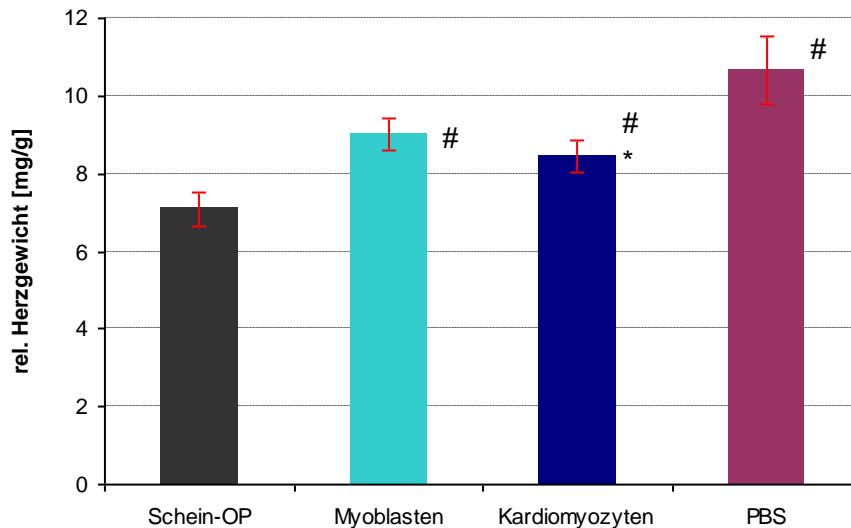


Abb. 6

Relative Herzgewichte (Herzgewicht pro Gramm Körpergewicht der Maus) 28 Tage nach Zelltransplantationen im Myokardinfarktmodell der Maus. Die relativen Herzgewichte aller Gruppen mit Myokardinfarkt sind signifikant größer als die der scheinoperierten Gruppe (Infarkt-induzierte Hypertrophie). Die Zelltransplantationen führen gegenüber der PBS-Injektion zu einer Verringerung der Hypertrophie (* $p < 0,05$ vs. PBS; # $p < 0,05$ vs. Schein-OP).

Die Auswertung der Gewichte der anderen Organe ist in Tabelle 3 dargestellt.

	Schein-OP	Myoblasten	Kardiomyozyten	PBS
Lunge [mg]	461 ± 37	494 ± 36	536 ± 51	576 ± 25
relatives Lungengewicht [mg/g]	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1
Leber [mg]	2066 ± 87	2061 ± 118	2032 ± 97	1768 ± 113
relatives Lebergewicht [mg/g]	5,4 ± 0,3	5,9 ± 0,3 *	5,5 ± 0,2 *	5,0 ± 0,1

Tab. 3

Mittlere absolute und relative Organgewichte der Versuchsgruppen 28 Tage nach intramyokardialer Transplantation der angegebenen Zellarten (d.h. 35 Tage nach operativem LAD-Verschluss (bzw. Schein-OP) (* $p < 0,05$ vs. PBS).

4.2 Echokardiographie

Um die Änderung der Herzfunktion im Zeitverlauf in vivo über den gesamten Zeitraum der Versuchsreihe beurteilen zu können, werden die Herzen sowohl präoperativ als auch postoperativ bis zum Ende des Beobachtungszeitraums einmal pro Woche echokardiographisch untersucht. Dem Untersucher ist dabei nicht bekannt, aus welcher Untersuchungsgruppe die einzelnen Mäuse stammen. Die Mäuse sind lediglich mit fortlaufender Nummerierung an Schwanz und Ohr markiert. Auch am Käfig ist keine weitere Information vorhanden, die eine Zuordnung der Tiere zu den verschiedenen Gruppen gestattet.

Um eine Aussage über die Veränderungen der LV-Geometrie im Rahmen der Untersuchungen treffen zu können, werden der systolische linksventrikuläre Innen-Diameter (LVIDS) und der enddiastolische linksventrikuläre Innendiameter (LVIDD) bestimmt. Beide werden in der 1-dimensionalen Darstellung im M-Mode gemessen. Zusätzlich werden die linksventrikuläre Hinterwand- (LVPWD und LVPWS) sowie die linksventrikuläre Vorderwanddicke (LVAWD und LVAWS) sowohl diastolisch als auch systolisch gemessen.

**Echokardiographie 28 Tage nach Zell-Transplantation
(d.h. 35 Tage nach LAD-Ligatur/Schein-OP)**

		Schein-OP	Myoblasten	Kardiomyozyten	PBS
Herzfrequenz	[1/min]	529 ± 17	497 ± 13 *	531 ± 18	534 ± 11
LVAWD	[mm]	0,7 ± 0,03	0,5 ± 0,04 *	0,5 ± 0,05 *	0,3 ± 0,02
LVIDD	[mm]	4,3 ± 0,1	5,8 ± 0,1 *	5,9 ± 0,1 *	6,2 ± 0,1
LVPWD	[mm]	0,8 ± 0,03	0,7 ± 0,04 *	0,7 ± 0,03 *	0,5 ± 0,04
LVAWS	[mm]	1,3 ± 0,04	0,8 ± 0,1 *	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,06
LVIDS	[mm]	2,6 ± 0,1	4,7 ± 0,2 *	4,9 ± 0,2 *	5,6 ± 0,1
LVPWS	[mm]	1,3 ± 0,04	1,1 ± 0,1 *	1,3 ± 0,05 *	0,9 ± 0,07
FS		0,4 ± 0,02	0,19 ± 0,02 *	0,18 ± 0,02 *	0,1 ± 0,01
FAC	[%]	61 ± 1	35 ± 3 *	35 ± 3 *	22 ± 2

Tab. 4

Im Rahmen der Echokardiographie gemessene Werte 28 Tage nach Transplantation bzw. 35 Tage nach LAD-Ligatur/ Schein-OP (* p<0,05 vs. PBS).

Die scheinoperierten Mäuse zeigen im Verlauf eine nahezu unveränderte Herzgröße und -funktion. Im Gegensatz dazu kann bei allen infarzierten Mäusen eine signifikante Zunahme des linksventrikulären Diameters sowohl systolisch (LVIDS) als auch diastolisch (LVIDD) nachgewiesen werden (siehe Abb. 7 und 8).

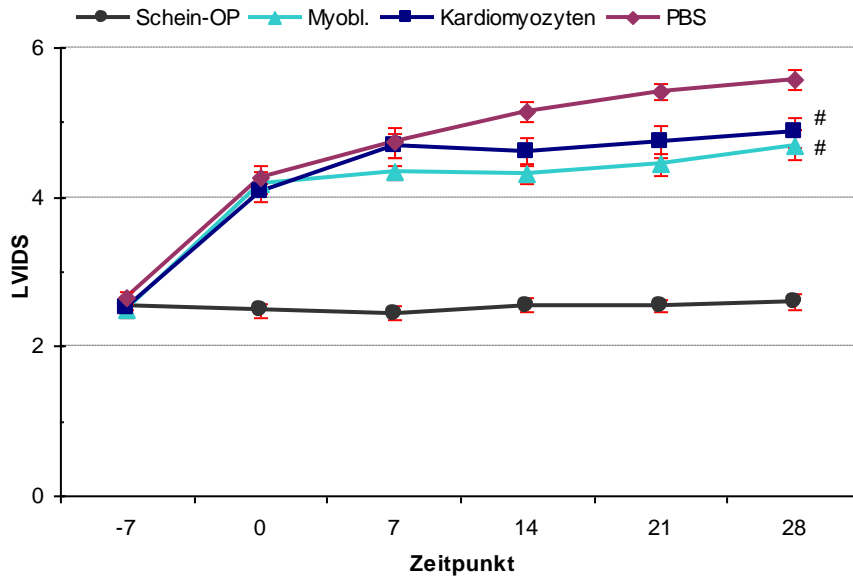


Abb. 7

Linksventrikulärer Durchmesser systolisch (LVIDS) unmittelbar vor LAD-Ligatur (d.h. 7 Tage vor Zelltransplantation (Tx); Tag -7), am Tag der Tx (Tag 0), und im weiteren Verlauf. 28 Tage nach Tx zeigt sich ein signifikanter Unterschied (# $p < 0,05$ vs. PBS).

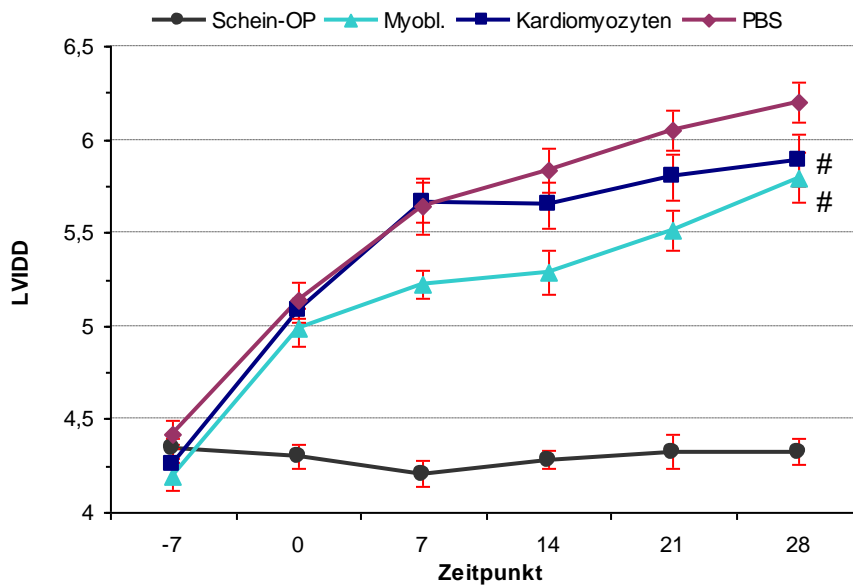


Abb. 8

Linksventrikulärer Durchmesser diastolisch unmittelbar vor LAD-Ligatur bzw. 7 Tage vor Zelltransplantation (-7), am Tag der Tx(0), und dann jeweils 7, 14, 21 und 28 Tage nach Zelltransplantation. Nach 28 Tagen zeigt sich ein signifikanter Unterschied für Myobl. vs. PBS und für Kardiom. vs. PBS (# $p < 0,05$ vs. PBS).

Die Ventrikeldilatation findet sich nach Transplantation von Myoblasten bzw. ES-Kardiomyozyten nur in geringerem Ausmaß, als dies ohne Zelltransplantation (d.h. nach alleiniger PBS-Injektion) zu beobachten ist.

Als weitere Parameter werden die diastolische und systolische Wanddicke der linksventrikulären Hinterwand (LVPWD und LVPWS) sowie der Vorderwand (LVAWD und LVAWS) bestimmt (siehe Abb. 9-11).

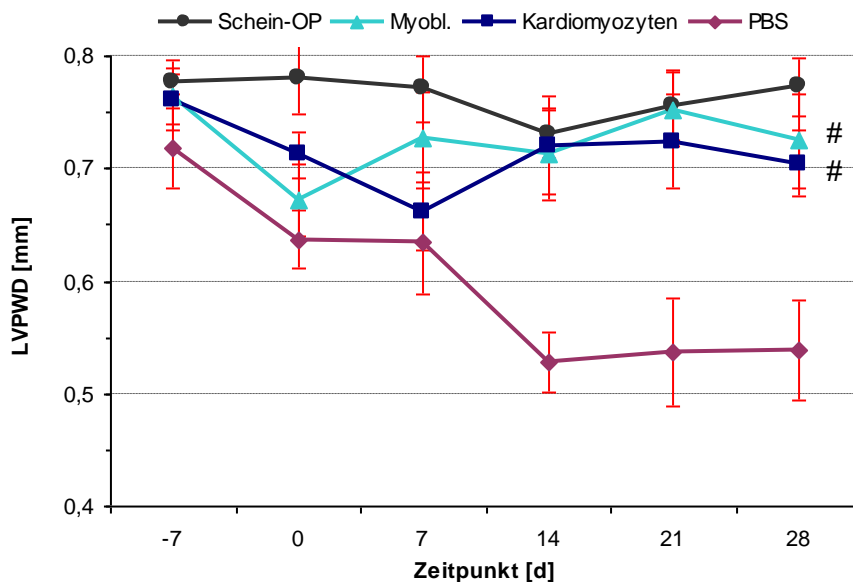


Abb. 9

Linksventrikuläre posteriore Wanddicke in der Diastole der jeweiligen Gruppe im Zeitverlauf. Myoblasten und Kardiomyozyten unterscheiden sich signifikant von der PBS-Gruppe (# $p < 0,05$ vs. PBS).

Unmittelbar nach LAD-Ligatur läßt sich in allen drei Gruppen lediglich ein geringer Verlust der Wandstärke der Herzhinterwand nachweisen. Im Verlauf dünnt die Hinterwand der PBS-Gruppe jedoch weiter aus, wohingegen nach Transplantation von Kardiomyozyten oder Myoblasten keine weitere Reduktion der Herzhinterwanddicke zu beobachten ist.

Bei der Auswertung der Herzvorderwanddicken zeigt sich 7 Tage nach LAD-Ligatur eine deutliche Abnahme der Wanddicke in allen drei Infarkt-Gruppen. Im Verlauf zeigt sich jedoch lediglich in der PBS-Gruppe eine kontinuierliche weitere Ausdünnung der Vorderwand. In beiden transplantierten Gruppen zeigt sich keine weitere Reduktion der Wanddicke, nach 28 Tagen sogar eine geringe Zunahme der Vorderwanddicke. Hier können signifikante Unterschiede zwischen der Kardiomyozytengruppe und Myoblastengruppe gegenüber der PBS-Gruppe gemessen werden (siehe Tab. 4). Zwischen der Myoblastengruppe und der Kardiomyozyten-transplantierten Gruppe lassen sich keine relevanten Unterschiede feststellen.

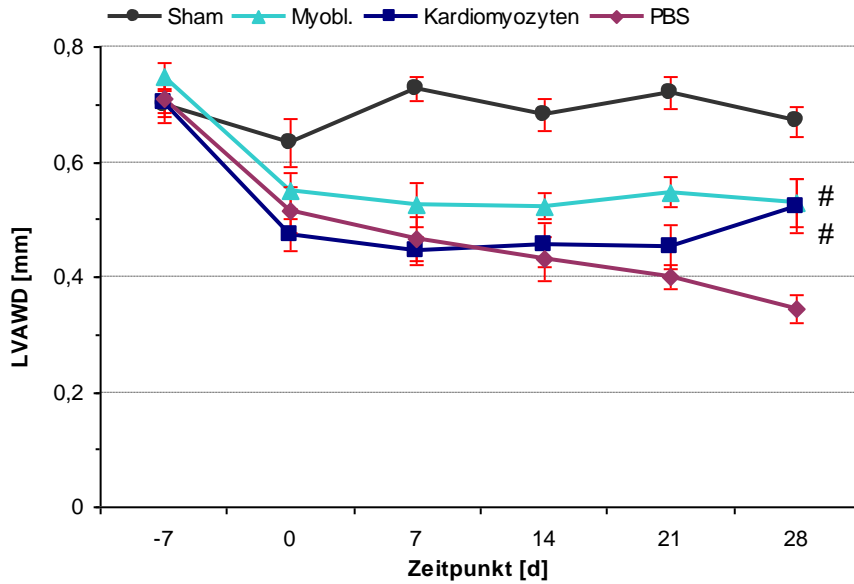


Abb. 10

Linksventrikuläre diastolische Vorderwanddicke der jeweiligen Gruppe im Zeitverlauf, Myoblasten und Kardiomyozyten unterscheiden sich 28 Tage nach Transplantation gegenüber der PBS-Gruppe signifikant (# $p < 0,05$ vs. PBS).

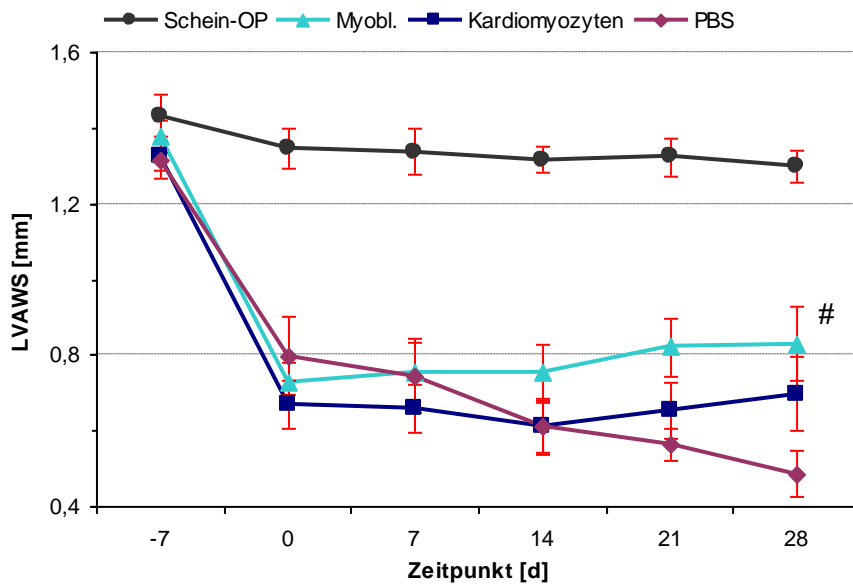


Abb. 11

Linksventrikuläre systolische Vorderwanddicke der jeweiligen Gruppen im Zeitverlauf
Die systolische Vorderwanddicke der Myoblastengruppe unterscheidet sich signifikant von der PBS-Gruppe (# $p < 0,05$ vs. PBS).

Die FS (fraktionale systolische Durchmesserverkürzung) ist ein berechneter Wert, der sich aus dem linksventrikulären Diameter sowohl diastolisch als auch systolisch ergibt. Die FS kann als ein Maß der linksventrikulären Pumpfunktion angesehen werden.

Im Zeitverlauf zeigt sich, dass ohne die Transplantation von Zellen (PBS-Gruppe) nach Induktion des Myokardinfarktes eine progrediente Abnahme der FS auftritt. Am Ende der Experimente zeigt sich in dieser Gruppe die niedrigste FS. In den beiden Zell-transplantierten Gruppen stabilisiert sich die FS zwar deutlich unter der nur scheinoperierten Gruppe (entspricht etwa dem Ausgangsniveau), jedoch mit einer signifikant höheren FS als bei der PBS-Gruppe. Beim Vergleich der beiden Transplantationsgruppen lassen sich keine nennenswerten Unterschiede nachweisen.

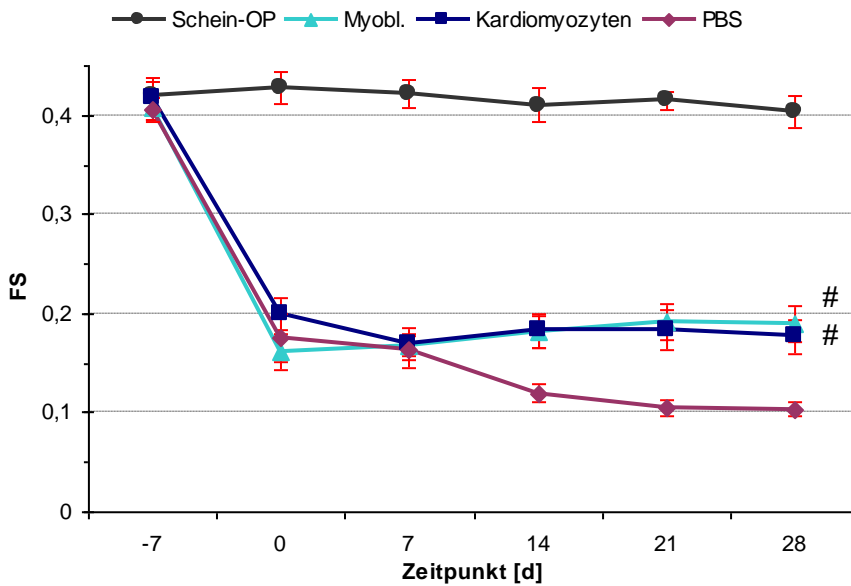


Abb. 12

Die fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung (FS) der jeweiligen Gruppe im Zeitverlauf. Die FS sowohl der Myoblastengruppe als auch die der Kardiomyozyten unterscheiden sich signifikant gegenüber der PBS-Gruppe (# $p < 0,05$ vs. PBS).

Im B-Mode in der kurzen parasternalen Achse wird außerdem 2-dimensional die fraction of area change (FAC) als weiterer Parameter der systolischen LV-Funktion bestimmt (siehe 3.2.).

In Analogie zu den Veränderungen, die im Hinblick auf den Parameter FS bereits beschrieben wurden, findet sich eine deutliche Abnahme der FAC nach Induktion der Myokardinfarkte. Ohne die Durchführung einer Zelltransplantation (PBS-Gruppe) kommt es auch in der Folgezeit zu einer weiteren progredienten Abnahme der FAC. Diesem Trend kann durch die beiden verwendeten Transplantationsprotokolle entgegengewirkt werden, wobei Werte der Schein-OP-Gruppe auch hier nicht erreicht werden.

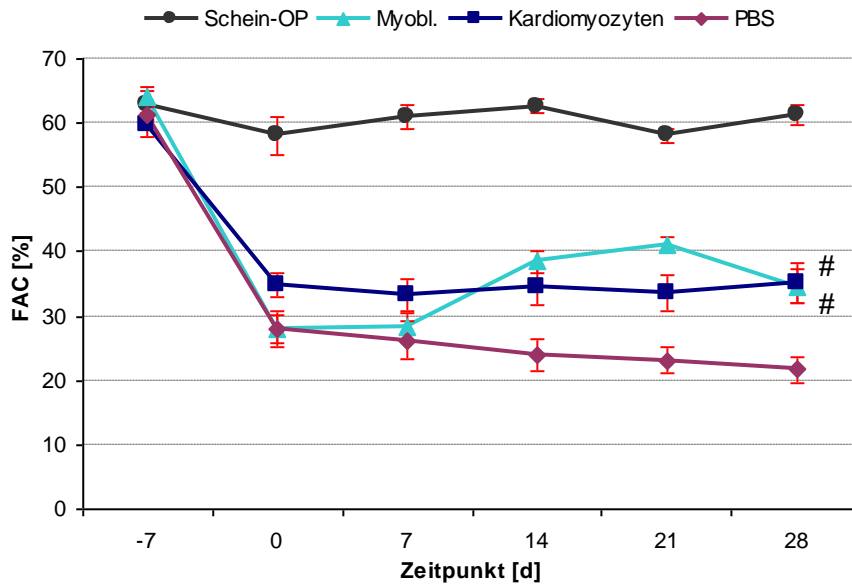


Abb. 13

Die fraction of area change (FAC) der jeweiligen Gruppe im Zeitverlauf. 28 Tage nach Zelltransplantation zeigen sich signifikant höhere Werte für die zelltransplantierten Gruppen gegenüber der PBS-Gruppe (# $p < 0,05$ vs. PBS).

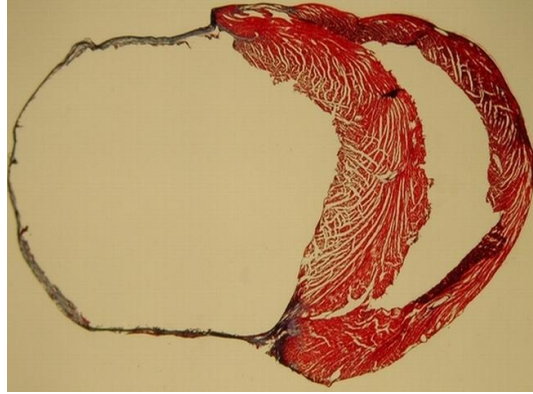
4.3 Histologie

4.3.1 Infarktgrößen- und Wanddickenbestimmung

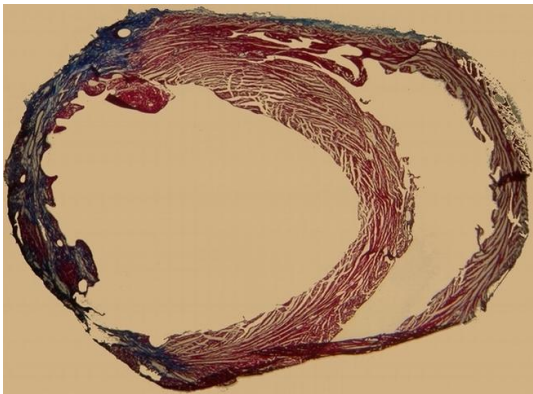
Zur Bestimmung der Infarktgrößen und zum Ausmessen des linksventrikulären Diameters sowie der Wanddicken werden die Herzen der Tiere anhand histologischer Kryoschnittpräparate aufgearbeitet. Zur Bestimmung der Wanddicken, Umfänge und Flächen sowie Infarktgrößen werden ausgewählte Schnitte in einer bestimmten Herzebene mit TriChrom wie unter 3.6.2. beschrieben gefärbt. Um eine möglichst genaue Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, werden hierfür die 4 Gewebeschnitte ausgewählt, die den linken Ventrikel jeweils in 5 äquidistante Bereiche einteilen (von Apex bis Basis).



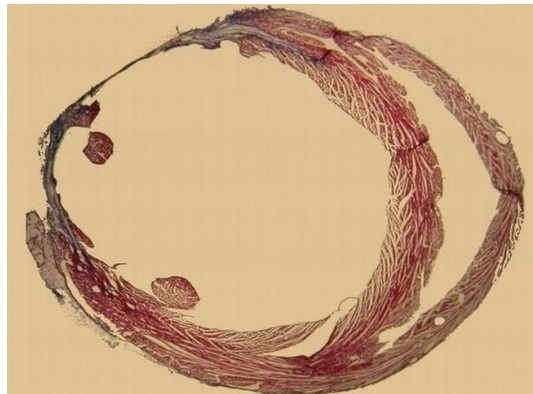
14-A Schein-OP



14-B PBS



14-C Myoblasten



14-D Kardiomyozyten

Abb. 14

Infarktgrößenbestimmung mittels TriChrom-Färbung an 10µm dicken Kryoschnitten adulter ICR-Mäuse 28 Tage nach Transplantation der verschiedenen Zellarten (d.h. 35 Tage nach operativer Induktion eines Myokardinfarktes durch Ligatur der linken Koronararterie)

14-A) Kontroll-Herz einer scheinoperierten Maus (Schein-OP) ohne Infarkt

14-B) Infarziertes Herz mit folgender PBS-Injektion

14-C) Infarziertes Herz mit folgender Myoblasten-Transplantation

14-D) Infarziertes Herz mit folgender Transplantation von ES-Kardiomyozyten

Die Abbildung 14 zeigt die Präparate vergleichbarer Herzebenen jeder der vier Versuchsgruppen. In Abbildung 14-A ist das Herz einer scheinoperierten Maus dargestellt. Die normale Anatomie des Herzens läßt sich hier gut nachvollziehen. Der linke Ventrikel stellt sich rund dar und zeigt eine sehr kräftige gleichmäßige Muskulatur. In der äußeren Ventrikelwand erkennt man Koronargefäße. Am Innenrand des Ventrikels sind zwei Papillarmuskeln angeschnitten (diese lassen sich sehr gut auch in Abb. 14-C und 14-D erkennen), sie ragen leicht in das Ventrikellumen hinein. Die freie Ventrikelwand geht nach rechts in das Septum interventriculare über. Dieses trennt den großen muskelstarken linken Ventrikel vom deutlich kleineren und bei weitem nicht so muskelstarken rechten Ventrikel. Im Vergleich zu diesem gesunden Herzen weisen die unter 14-B – 14-D dargestellten Herzen folgende Unterschiede auf:

Unter 14-B bis 14-D lässt sich im Bereich der linksventrikulären Vorderwand ein deutlicher transmuraler Infarkt anhand der blau gefärbten Narbe erkennen. Hier ist das ehemalige Muskelgewebe abgestorben und fibrinös umgebaut, was an der blauen Färbung zu erkennen ist. Außerdem ist in diesem Bereich die Ventrikelwand, insbesondere im Vergleich mit dem nicht-infarzierten Herz unter 14-A, erheblich ausgedünnt. Je nach Ausprägung der Infarktgröße findet sich auch eine zunehmende Dilatation des linken Ventrikels. Bei dem in Abb. 14-D dargestellten Herz lassen sich die Papillarmuskeln noch gut abgrenzen. Bei jedoch noch ausgeprägterem Infarkt sind auch die Papillarmuskeln betroffen. Diese lassen sich dann nicht mehr von der Infarktnarbe abgrenzen und ragen dementsprechend nicht mehr in das Ventrikellumen hinein (siehe 14-B). Weiterhin zeigt sich in der Regel das muskuläre Septum interventriculare im chronischen Stadium nach Myokardinfarkt kompensatorisch deutlich verdickt (siehe hierzu insbesondere Abb. 14-B und 14-C).

Beim Vergleich der infarzierten Herzen untereinander zeigen sich ebenfalls erkennbare Unterschiede. Abb. 14-B zeigt das Herz einer Maus, der eine Woche nach Infarzierung lediglich PBS injiziert wurde. Abb. 14-C und 14-D zeigen hingegen Herzen mit einem Myokardinfarkt, denen eine Woche nach Infarzierung entweder Myoblasten oder Kardiomyozyten transplantiert wurden. Alle drei Gruppen zeigen eine ausgeprägte Infarktnarbe. Diese unterscheidet sich jedoch bereits leicht in ihrer Ausdehnung. Bei der PBS-Gruppe erkennt man einen extrem ausgeprägten Infarkt, der nahezu die gesamte Zirkumferenz der freien Ventrikelwand einnimmt und bis an das Septum interventriculare heranzieht. Betroffen sind auch die zuvor beschriebenen Papillarmuskeln, die in der Abb. 14-B gar nicht mehr zur Darstellung kommen. Die beiden Zell-transplantierten Herzen zeigen ebenfalls eine deutliche Infarktnarbe, die sich jedoch zumeist nicht über die komplette Zirkumferenz des linken Ventrikels ausdehnt. Die Papillarmuskeln lassen sich weitgehend abgrenzen und ragen deutlich in das linksventrikuläre Lumen hinein.

Durch Ausmessen der Infarktausdehnung auf den 4 Standard-Schnittebenen pro Herz kann man die o.g. morphologischen Veränderungen quantifizieren. Hier zeigt sich, dass die mittlere Infarktausdehnung der PBS-behandelten Mäuse bei $49,4 \pm 3,2\%$ der gesamten linksventrikulären Zirkumferenz liegt. Damit ist sie signifikant höher als die der Myoblasten-Gruppe. Hier liegt die Infarktausdehnung bei $33,9 \pm 3,5\%$ ($p < 0,05$ vs. PBS).

Die Infarktausdehnung der Tiere, die als Transplantat ES-Kardiomyozyten erhalten haben, liegt bei $40,3 \pm 3,2\%$ und ist ebenfalls deutlich, jedoch nicht signifikant niedriger als die der PBS-Gruppe ($p < 0,07$ vs. PBS).

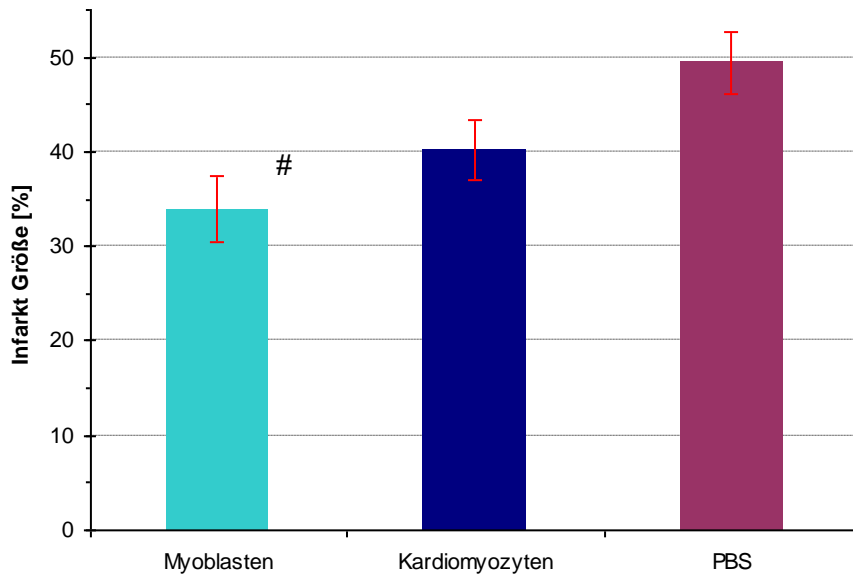


Abb. 15

Mittlere Infarktausdehnungen der drei Untersuchungsgruppen 28 Tage nach Zelltransplantation. Die scheinoperierten Mäuse haben kein Infarktareal und sind daher nicht dargestellt. Nach Myoblastentransplantation zeigen sich signifikant geringere Infarktgrößen (# $p < 0,05$ vs. PBS).

Im weiteren Verlauf der Analysen werden die Wanddicken der Herzen sowie die Umfänge und Flächen der Ventrikel gemessen. Hier zeigt sich, dass insbesondere das Septum interventriculare bei allen infarzierten Mäusen kompensatorisch hypertrophiert. Das Septum ist im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe signifikant verdickt (siehe Abb. 14).

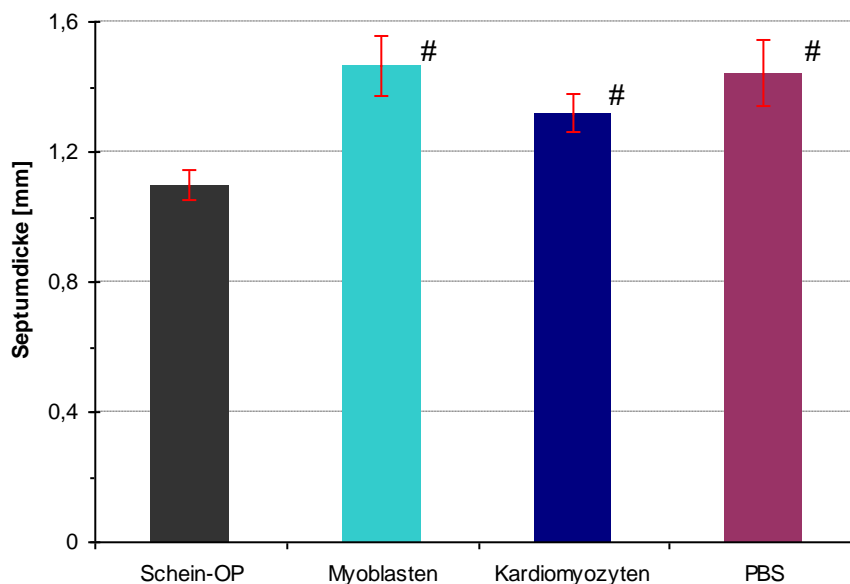


Abb. 16

Vergleich der histologisch bestimmten Dicken des Septum interventriculare der jeweiligen Herzen 35 Tage nach LAD-Ligatur bzw. Schein-OP. Die Septumdicken unterscheiden sich bei allen drei infarzierten Mäusegruppen signifikant von der scheinoperierten Gruppe, untereinander jedoch nicht signifikant (# $p < 0,05$ vs. Schein-OP).

Beim Vergleich der Vorderwand-Dicke zeigt sich in Übereinstimmung zu den echokardiographischen Untersuchungen die deutlichste Abnahme der Wandstärke bei der PBS-Gruppe. Wie in Abb. 17 zu erkennen, nimmt die Wanddicke der Vorderwand der beiden Zelltransplantierten Mäusegruppen zwar auch deutlich ab, jedoch geringer als dies bei der PBS-Gruppe der Fall ist.

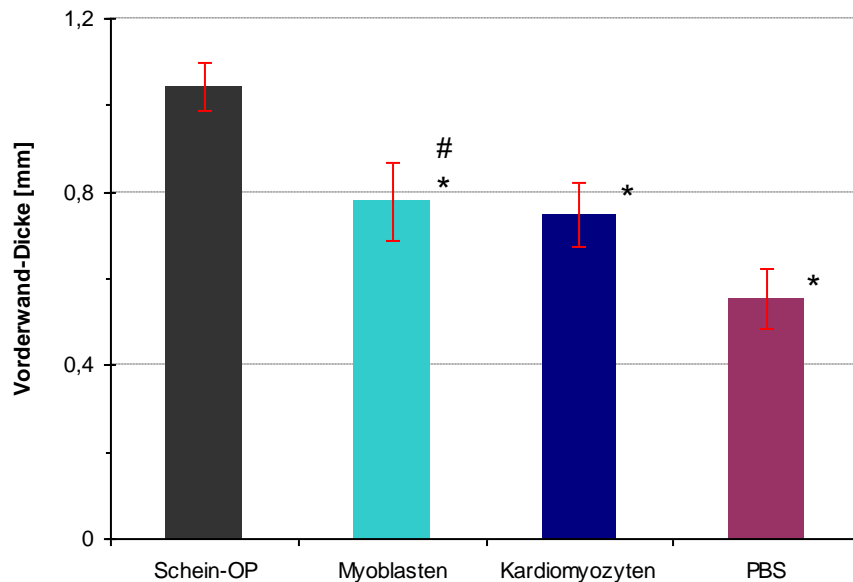


Abb. 17

Vergleich der histologisch bestimmten Vorderwand (VW)-Dicke der linken Ventrikel. 35 Tage nach Infarkt weisen die drei Gruppen eine signifikant geringere VW-Dicke gegenüber der Schein-OP-Gruppe auf. Gegenüber der PBS-Gruppe zeigt sich für die zelltransplantierten Gruppen eine deutlich geringere Abnahme der Wanddicke (# $p < 0,05$ vs. PBS; * $p < 0,05$ vs. Schein-OP).

Sowohl für die laterale Ventrikelwand (LW) als auch für die Hinterwand (HW) lassen sich ebenfalls die oben beschriebenen Unterschiede nachweisen. Die laterale Ventrikelwanddicke unterscheidet sich signifikant ($p < 0,05$) zwischen der Kardiomyozyten-Gruppe und der PBS-Gruppe (siehe Abb. 18 und Abb. 19).

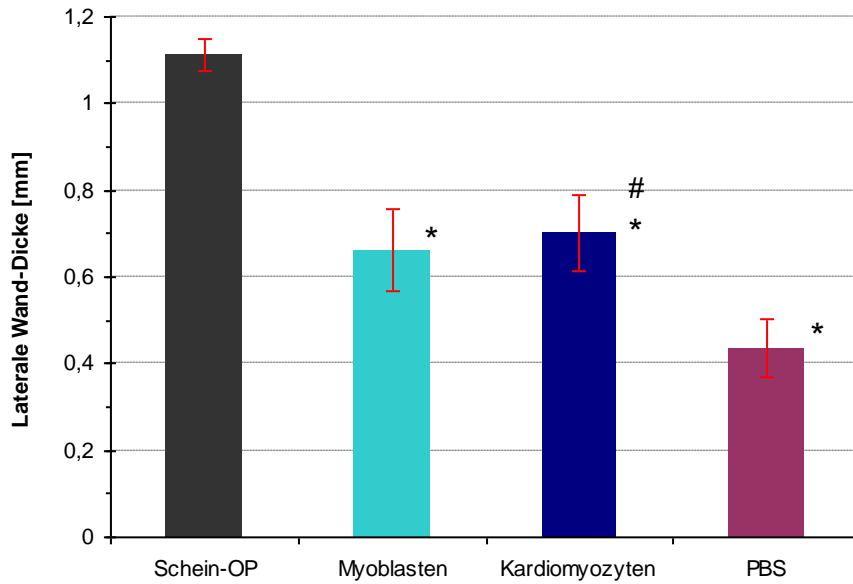


Abb. 18

Vergleich der histologisch bestimmten lateralen (LW)-Dicke der linken Ventrikel 35 Tage nach Infarkt (# $p < 0,05$ vs. PBS; * $p < 0,05$ vs. Schein-OP; Myobl. vs. PBS $p = 0,051$).

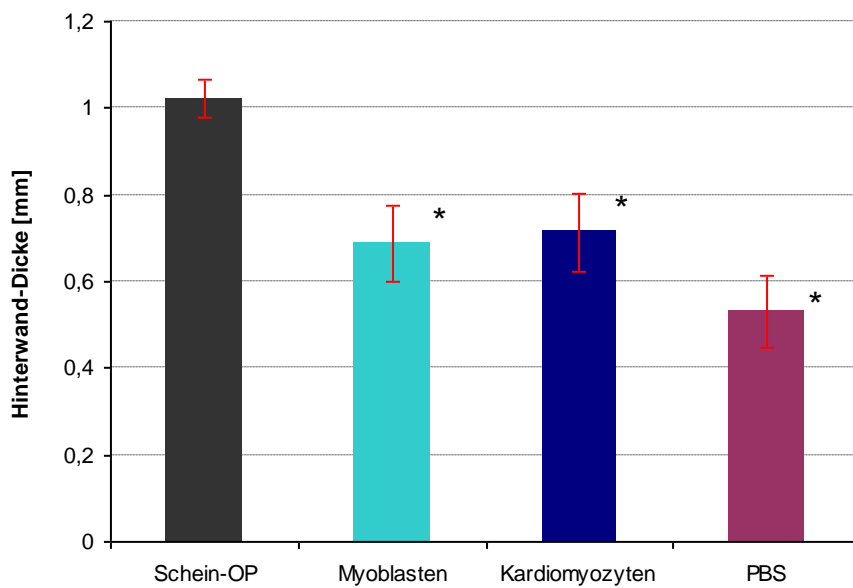
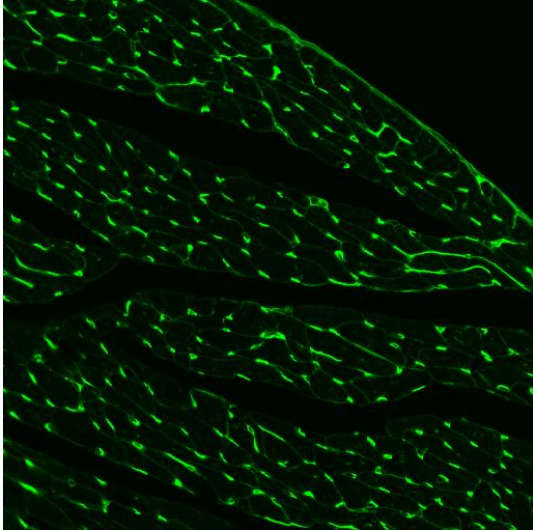


Abb. 19

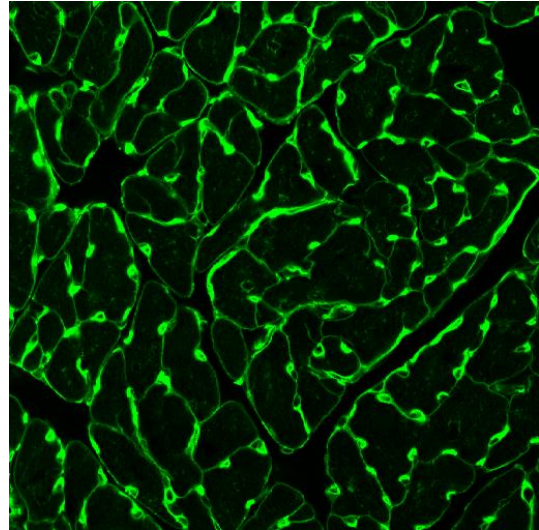
Vergleich der histologisch bestimmten Wanddicken für die Hinterwand (HW) des linken Ventrikels. Nach Infarkt weisen die drei Gruppen eine signifikant geringere HW-Dicke gegenüber der Schein-OP-Gruppe auf (* $p < 0,05$ vs. Schein-OP).

4.3.2 Remodelling nach Myokardinfarkt - Bestimmung der Myozytenquerschnittsfläche sowie der interstitiellen Kollagenfraktion

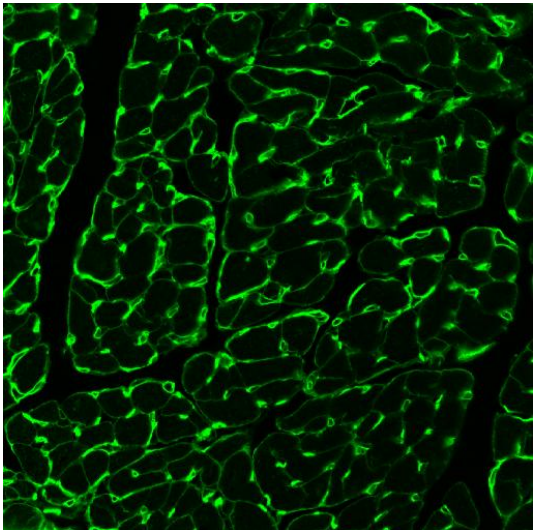
Im Rahmen des Post-Infarkt-Remodellings werden typischerweise Prozesse initiiert, die zum einen zu einer deutlichen Myozytenhypertrophie, zum anderen aber auch zu einer diffusen interstitiellen Fibrose durch vermehrte Kollagensynthese führen können [23, 140, 141]. Zur weiteren Beurteilung des Post-Infarkt-Remodelling wird deshalb in den 10µm dicken Kryoschnitten wie unter 3.6.3. beschrieben das interstitielle Kollagen angefärbt. Für die Auswertung unter dem Mikroskop wird das primär vom Infarkt nicht betroffene Septum interventriculare („remote myocardium“) aufgesucht und fotografiert. Das interstitielle Kollagen im Myokard stellt sich hier fluoreszierend grün dar und liegt zwischen den Kardiomyozyten. Somit wird deren Form und Größe sichtbar.



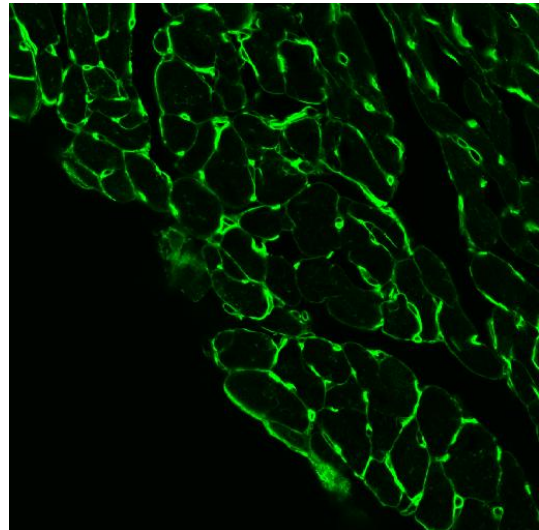
20-A Schein-OP



20-B PBS



20-C Myoblasten



20-D Kardiomyozyten

Abb. 20

10µm Kryoschnitte adulter ICR-Mäuse 28 Tage nach den Zell- bzw. PBS-Transplantationen (d.h. 35 Tage nach Myokardinfarkt/Schein-OP). Gezeigt ist jeweils ein exemplarischer Ausschnitt aus dem Septum interventriculare. Das Kollagen ist grün angefärbt.

20-A – Scheinoperierte Gruppe (kein Infarkt)

20-B – PBS-Gruppe

20-C – Myoblasten-Gruppe

20-D – Kardiomyozyten-Gruppe

In Abb. 20 sind histologische Abbildungen der vier Versuchsgruppen dargestellt. Abb. 20-A zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus dem Septum interventriculare einer scheinoperierten Maus ohne Myokardinfarkt. Hier zeigt sich das Kollagen nur sehr zart zwischen den einzelnen Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten selbst sind relativ klein, und die Form der einzelnen Myozyten erscheint insgesamt sehr homogen.

Im Vergleich dazu zeigen die Präparate der übrigen Gruppen deutliche Unterschiede. In Abb. 20-B dargestellt ist ein typischer Ausschnitt aus dem Septum interventriculare einer Maus nach Myokardinfarkt und folgender PBS-Injektion. Insgesamt fällt der deutlich vermehrte Kollagengehalt auf. Die Grünzeichnung zwischen den einzelnen Myozyten ist stark verbreitert. Die Myozytenquerschnittsflächen sind im Vergleich zu dem nicht infarzierten Herz wesentlich größer.

Um diese Beobachtung genauer zu untersuchen, werden einzelne Kardiomyozyten ausgemessen, um die Hypertrophie in Abhängigkeit der jeweiligen Gruppe im Verlauf einordnen zu können.

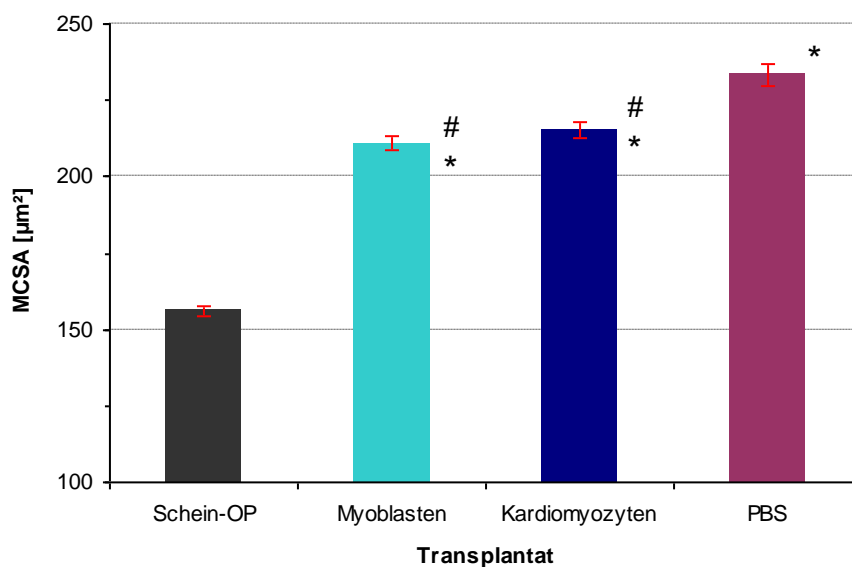
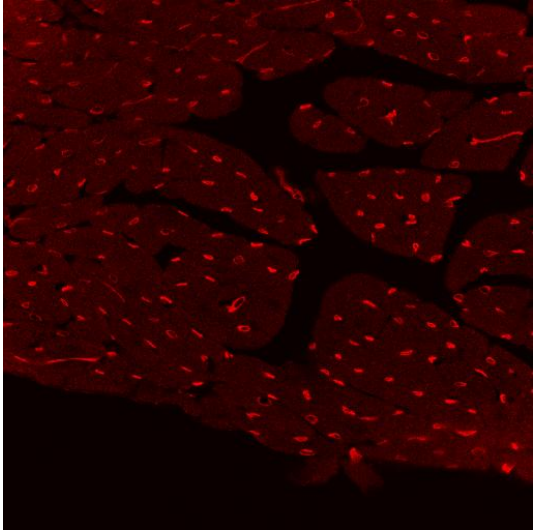


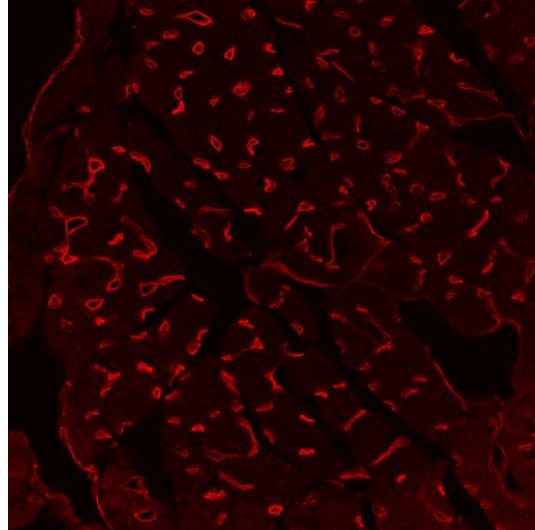
Abb. 21

Mittelwerte der Kardiomyozytenquerschnittsfläche des Septum interventriculare in μm^2 adulter ICR-Mäuse 28 Tage nach Transplantation bzw. 35 Tage nach LAD-Ligatur (# $p < 0,05$ vs. PBS; * $p < 0,05$ vs. Schein-OP)

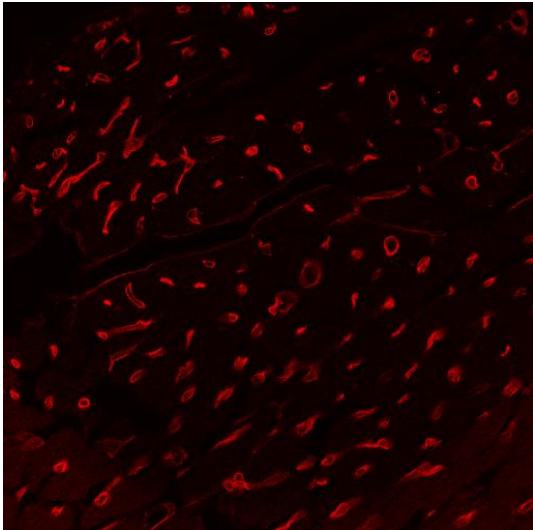
Die mittlere Kardiomyozytenquerschnittsfläche der scheinoperierten Tiere ohne Infarkt liegt bei $156 \pm 2 \mu\text{m}^2$. Die Kardiomyozyten der PBS-Gruppe zeigen mit $233 \pm 4 \mu\text{m}^2$ den größten Wert. Die Myoblasten-Gruppe liegt mit $211 \pm 2 \mu\text{m}^2$ ebenso wie die ES-Kardiomyozyten-Gruppe mit $215 \pm 3 \mu\text{m}^2$ zwischen den zwei erstgenannten Vergleichsgruppen. Die Zell-transplantierten Gruppen unterscheiden sich untereinander nicht signifikant, zeigen aber im Vergleich zu der PBS-Gruppe beide eine deutlich kleinere Myozytenquerschnittsfläche (jeweils $p < 0,05$ vs. PBS). Für die genaue Quantifizierung des interstitiellen Kollagens ist die Abgrenzung gegenüber dem Kollagen der myokardialen Blutgefäße erforderlich, das sich in dieser Färbung ebenfalls grün anfärbt. Daher erfolgt parallel zur Kollagen-Färbung eine Visualisierung der Blutgefäße durch einen rot-fluoreszierenden Farbstoff (siehe 3.6.4.). Im Folgenden wird die Differenz beider Färbungen ermittelt und so der interstitielle Kollagengehalt errechnet [142].



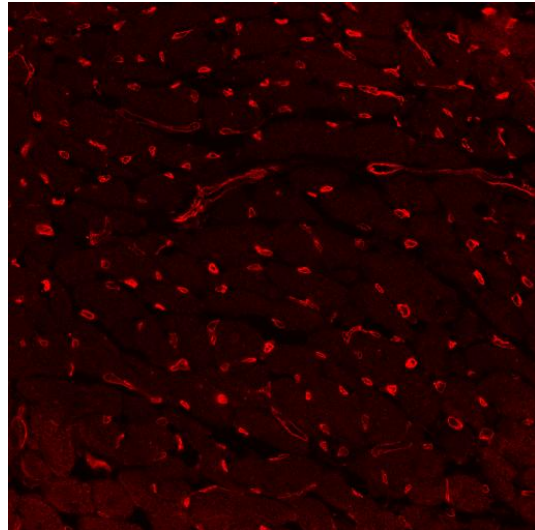
22-A Schein-OP



22-B PBS



22-C Myoblasten



22-D Kardiomyozyten

Abb. 22

Gefäßendothelanfärbung im Septum interventriculare mit Rhodamine-Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I, 35 Tage nach LAD-Ligatur bzw. Schein-OP. Der jeweilige Gefäßkollagenanteil ist für alle 4 Gruppen auf einem vergleichbaren Niveau und zeigt keine signifikanten Unterschiede.

	Kardiomyozyten querschnittsfläche in μm^2	Gesamter Kollagen-Anteil am Septum in % (inkl. Gefäße)	Gefäßkollagen- Anteil am Septum in %	Interstitielles Kollagen in % (Gesamt ISC - Gefäß- Kollagen)	
Schein-OP	156 \pm 2	6,8 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1	5,5 \pm 0,2	
Myoblasten	211 \pm 2,5 * #	7,8 \pm 0,4	1,4 \pm 0,1	6,4 \pm 0,4	*
Kardiomyozyten	215 \pm 2,7 * #	6,8 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1	5,5 \pm 0,3	#
PBS	233 \pm 3,7 *	8,1 \pm 0,3	1,3 \pm 0,1	6,8 \pm 0,3	*

Tab. 5

Interstitieller Kollagenanteil des Septum interventriculare 28 Tage nach Zelltransplantation bzw. 35 Tage nach LAD-Ligatur (# $p < 0,05$ vs. PBS; * $p < 0,05$ vs. Schein-OP).

Bei der Untersuchung des interstitiellen Kollagenanteils (ohne Gefäßkollagen) im Septum interventriculare zeigt sich, dass durch die Induktion des Myokardinfarktes eine Zunahme des Kollagengehaltes im Sinne einer interstitiellen Fibrose ausgelöst wird. Allerdings bestehen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen deutliche quantitative Unterschiede. Die Mauspräparate, denen lediglich PBS injiziert wurde, weisen den höchsten Kollagenanteil auf (6,8 \pm 0,3%). Der Kollagengehalt in den Herzen, denen ES-Kardiomyozyten transplantiert wurden, ist mit 5,5 \pm 0,3% signifikant geringer ausgeprägt ($p < 0,05$ vs. PBS).

Auch in der Myoblasten-Gruppe ist der Anteil im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren etwas geringer, jedoch kann hier kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden. Gegenüber der Myoblasten-Gruppe zeigt die Kardiomyozyten-Gruppe im Trend einen geringeren, jedoch ebenfalls nicht signifikant unterschiedlichen Kollagen-Anteil ($p = 0,07$ Myobl. vs. Kardiom.)

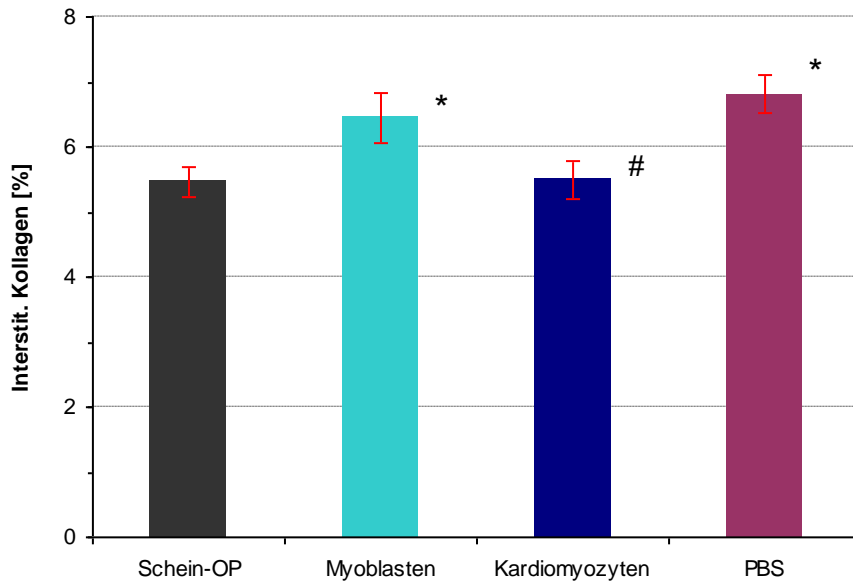


Abb. 23

Interstitieller Kollagenanteil adulter ICR-Mäuse 28 Tage nach Zell- und PBS-Transplantation bzw. 35 Tage nach LAD-Ligatur/Schein-OP errechnet als Differenz zwischen Gesamtkollagen und Gefäßkollagen im Septum interventriculare (# $p < 0,05$ vs. PBS; * $p < 0,05$ vs. Schein-OP).

4.3.3 Direkter Nachweis der transplantierten Zellen

Um zu unterscheiden, ob der direkte funktionelle Einbau der transplantierten Zellen oder eher indirekte Mechanismen die Ursache für die beobachteten Effekte sind, wird nun versucht, die transplantierten Zellen durch histologische Verfahren nachzuweisen. Wie unter 3.3.1. und 3.3.2. bereits geschildert, werden sowohl die Myoblasten als auch die von embryonalen Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten durch das membranständige Fluorochrom DiI vor der Transplantation markiert (siehe auch 3.3.3.).

Zunächst werden in der TriChrom-Färbung alle Schnitte sorgfältig durchgesehen und die entsprechenden Schnitte ausgewählt, auf denen potenzielle Myoblasten oder Kardiomyozyten im Bereich des Stichkanals (entstanden durch Injektion der Zellen während der Transplantation) zu sehen sind. Zur Kontrolle werden ebenfalls vergleichbare Schnittebenen der PBS-Kontrollgruppe ausgewählt. Vor Kontrolle unter der UV-Lampe des Mikroskops werden die Schnitte mit dem Farbstoff Hoechst 33258 zur Visualisierung aller Zellkerne (blaue Färbung) angefärbt. In der Kontroll-Gruppe der mit PBS behandelten Mäuse können Zellen mit typischer DiI-Fluoreszenz weder nach 2 noch nach 28 Tagen nachgewiesen werden (Abb. 24-E).

48 Stunden nach der Transplantation können sowohl die Myoblasten als auch die Kardiomyozyten anhand der DiI-Fluoreszenz gut im Gewebe nachgewiesen werden. Dies beweist, dass bei der Transplantation eine adäquate Menge der Zellen in das Myokard gelangt ist (Abb. 24-A und 24-C). Nach 28 Tagen jedoch sind nahezu keine Myoblasten mehr nachzuweisen, wohingegen sich weiterhin vereinzelte ES-Kardiomyozyten in den betreffenden Herzen finden lassen (Abb. 24-B, 24-D).

Die genauere Analyse der ES-Kardiomyozyten 28 Tage nach der Transplantation zeigt jedoch, dass die transplantierten Zellen überwiegend durch Narbengewebe von dem Rest-Myokard isoliert sind und keine funktionelle Integration stattgefunden hat (Abb. 24- F).

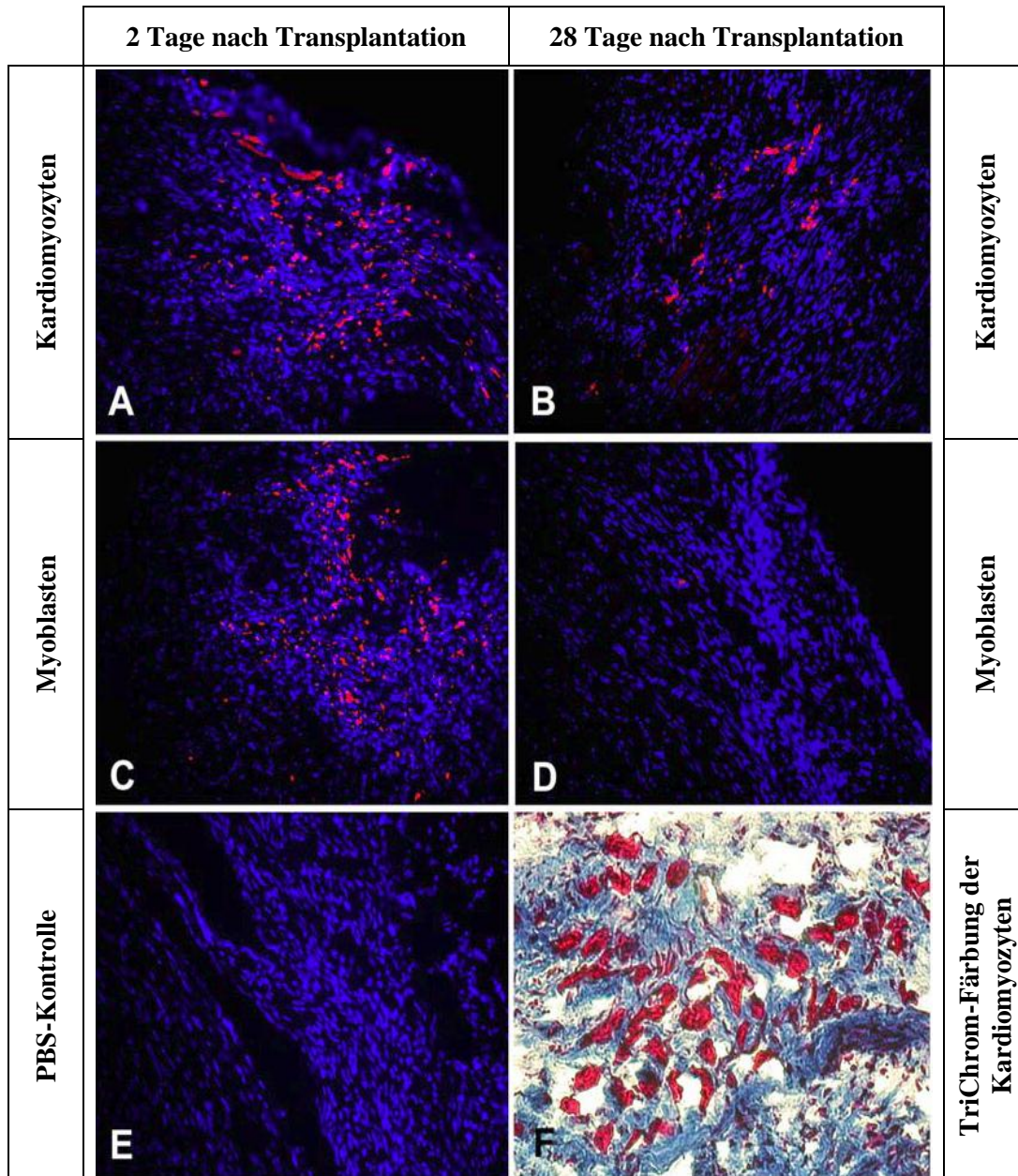


Abb. 24

Schicksal der DiI-markierten Kardiomyozyten (A, B, F) und Myoblasten (C, D) in den Empfängerherzen 2 Tage nach Transplantation (A und C) und dann 28 Tage nach Transplantation (B, D, F)[30]

A-E: Fotos mit dem Fluoreszenz-Mikroskop, rot = DiI (Zellmarker, der zur Markierung vor Transplantation genutzt wurde), blau = Kernfärbung (Hoechst 33258)

F: Trichrom-Färbung

5. Diskussion

Der akute Myokardinfarkt ist eine der wichtigsten Komplikationen der koronaren Herzkrankheit (KHK) und ist nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen. Es gibt mittlerweile eine Reihe von etablierten Therapieansätzen, insbesondere die rasche Reperfusion des ischämischen Myokards, die im Verlauf der letzten Jahre zu einem schrittweisen Rückgang der Infarktsterblichkeit geführt haben [143-146]. Nicht nur in Deutschland hat dies aufgrund der demographischen Entwicklung in Verbindung mit der zunehmenden Überlebens tendenz nach akutem Myokardinfarkt [99] jedoch zu einer Zunahme der Patienten geführt, die eine chronische Herzinsuffizienz entwickeln [147]. Unabhängig vom Schweregrad beläuft sich die Inzidenz der chronischen Herzinsuffizienz mittlerweile in Europa auf ca. 2,3 – 3,7 pro 1000 Einwohner und Jahr [144]. In den USA stellt die Herzinsuffizienz seit einigen Jahren sogar die häufigste Einweisungsdiagnose zur stationären Therapie dar.

Bei der Therapie sowohl des akuten Myokardinfarktes als auch der sich häufig entwickelnden chronischen Herzinsuffizienz sind die etablierten pharmakologischen Ansätze nach wie vor das Mittel der ersten Wahl. Darüber hinaus stehen insbesondere im chronischen Stadium der Herzinsuffizienz weitere Therapieoptionen wie mechanische Kreislaufunterstützungssysteme (assist devices) sowie Geräte zur Resynchronisations-Therapie zur Verfügung. Die Herztransplantation als Therapieoption ist durch die stark eingeschränkte Verfügbarkeit von Spenderherzen stark limitiert. Um in Zukunft die Therapieoptionen nach Myokardinfarkt weiter zu verbessern, werden seit einigen Jahren weitere Alternativen diskutiert, die sich mit der Therapie des bereits geschädigten Myokardgewebes beschäftigen. Hierbei erscheint die Transplantation von Stammzellen ein viel versprechendes Konzept zu sein. Trotz ermutigender Resultate erster klinischer Studien, die deutlich positive Einflüsse von Zelltransplantationen auf die gestörte Herzfunktion belegen, sind die genauen zugrundeliegenden Mechanismen nach wie vor nicht komplett geklärt.

Zu Beginn der eigenen Arbeiten war weitgehend unklar, welche Mechanismen im Einzelnen für die positiven Effekte der Zelltransplantationen verantwortlich sind. Es sollten daher im Rahmen der eigenen Experimente zwei grundsätzlich verschiedene Zellreihen im Herzinfarktmodell der Maus als Transplantate eingesetzt und die sich ergebenden Effekte verglichen werden, um so Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen ziehen zu können. Zum einen wurden skelettale Myoblasten verwendet, die keine Kardiomyozyten mehr bilden können und auch nur in geringem Maß zur Fusion mit Kardiomyozyten in der Lage sind [91]. Zum anderen wurden von embryonalen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten verwendet, die bereits in vivo einen Kardiomyozyten-Phänotyp erworben hatten und so zur funktionellen Integration in das nach dem Infarkt verbliebene Rest-Myokard befähigt sein sollten. Trotz völlig unterschiedlichen Ursprungs der jeweiligen transplantierten Zellen sind in den vorgestellten Untersuchungen

ähnliche Verbesserungen im Hinblick auf die Herzfunktion und Herzmorphologie nachweisbar. Allerdings finden sich im Vergleich der beiden Zellarten einige relevante Unterschiede.

Vor LAD-Ligatur werden alle Mäuse echokardiographisch untersucht. Hier zeigt sich für den untersuchten Mausstamm ICR ein mittlerer Wert für den linksventrikulären diastolischen Innendiameter von $4,3 \pm 0,1$ mm. In der Literatur finden sich mit $4,23 \pm 0,48$ mm [148], $3,6 \pm 0,01$ mm [149] oder $4,31 \pm 0,08$ mm [150] vergleichbare Werte.

Nach LAD-Ligatur entsteht im entsprechenden Versorgungsgebiet ein histologisch nachgewiesener Myokardinfarkt, in dessen Folge sich eine deutliche linksventrikuläre Dilatation in allen drei Infarkt-Gruppen entwickelt (Spannweite: LVIDD $5,8 \pm 0,1$ mm bis $6,2 \pm 0,1$ mm); bei der Schein-OP-Gruppe findet sich erwartungsgemäß keine LV-Dilatation ($4,3 \pm 0,1$ mm). In der Literatur zeigen sich vier Wochen nach Myokardinfarkt mit $5,5 \pm 0,2$ mm [149] ebenfalls ähnliche Werte.

Zusätzlich zur linksventrikulären Dilatation zeigt sich nach LAD-Ligatur eine Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion, welche über die fraktionelle systolische Durchmesserverkürzung (FS) und die „fraction of area change“ (FAC) dargestellt wird (siehe Abb. 12+13). Nach den Zelltransplantationen finden sich jedoch im Zeitverlauf zunehmend Unterschiede zwischen den verschiedenen Infarkt-Gruppen.

Echokardiographisch werden für beide Zellarten funktionelle Vorteile nachgewiesen. 28 Tage nach der Transplantation von Myoblasten oder Kardiomyozyten zeigt sich sowohl systolisch als auch diastolisch eine deutlich geringere linksventrikuläre Dilatation. Exemplarisch zeigt sich in der Myoblasten-Gruppe eine signifikant geringere linksventrikuläre Dilatation (LVIDD = $5,8 \pm 0,1$ mm) als in der PBS-Gruppe (LVIDD = $6,2 \pm 0,1$ mm $p < 0,05$). Der linksventrikuläre systolische Diameter (LVIDS = $4,9 \pm 0,2$ mm) zeigt für die Kardiomyozyten-Gruppe einen deutlich kleineren Wert als in der PBS-Gruppe (LVIDS = $5,6 \pm 0,14$ mm; $p < 0,05$), was einer geringeren Dilatation entspricht. Zusätzlich zur Reduktion der linksventrikulären Dilatation zeigt sich eine Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion. Die FS ist sowohl nach Myoblastentransplantation (FS = $0,19 \pm 0,02$) als auch für die Kardiomyozytengruppe (FS = $0,18 \pm 0,02$) signifikant größer als für die PBS-Gruppe (FS = $0,10 \pm 0,01$; $p < 0,05$). Tsutsui et al. beschreiben in ihrer Arbeit eine FS von $0,17 \pm 0,02$ vier Wochen nach LAD-Ligatur [149], Kinugawa et al. beschreiben vier Wochen nach LAD-Ligatur für die unbehandelte Gruppe eine FS von $0,12 \pm 0,01$ [151].

Die FAC zeigt sich ebenfalls 35 Tage nach Myokardinfarkt und demnach 28 Tage nach Transplantation mit jeweils $35 \pm 3\%$ für beide transplantierten Gruppen höher als bei der PBS-Gruppe ($22 \pm 2\%$). In der Literatur zeigen sich äquivalente Werte von $36,0 \pm 3,5\%$ [150] für adulte Mäuse nach ischämischem Myokardinfarkt und folgender Gentherapie. Auch die Arbeitsgruppe Collins et al. beschreibt eine FAC von $22 \pm 10\%$ nach ischämischem

Myokardinfarkt bei CD-1-Mäusen durch LAD-Ligatur [148], so dass die oben beschriebenen Werte als Vergleichsmaße herangezogen werden können.

Zur Vervollständigung wurde echokardiographisch die Dicke der Ventrikelvorder- und hinterwand 28 Tage nach Zelltransplantation sowohl in der Systole als auch in der Diastole gemessen. Mit einer diastolischen anterioren Wanddicke (LVAWD) von $0,53 \pm 0,04\text{mm}$ für die Myoblastengruppe und $0,52 \pm 0,05\text{mm}$ für die Kardiomyozytengruppe zeigte sich die Vorderwand signifikant dicker als nach PBS-Injektion (LVAWD = $0,34 \pm 0,02\text{mm}$; $p < 0,05$).

Die diastolische linksventrikuläre posteriore Wanddicke (LVPWD) ist für beide transplantierten Gruppen (Myobl. $0,73 \pm 0,04\text{mm}$ und Kardiom. $0,70 \pm 0,03\text{mm}$) ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) dicker als in der PBS-Gruppe ($0,54 \pm 0,04\text{mm}$). Mit Werten zwischen $0,66 \pm 0,04\text{mm}$ bis $0,92 \pm 0,2\text{mm}$ für die Hinterwand des linken Ventrikels nach ischämischem Myokardinfarkt adulter Mäuse zeigen sich auch in der Literatur vergleichbare Werte [148, 152].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die durchgeführte LAD-Ligatur der Literatur entsprechende große Myokardinfarkte induziert wurden. 28 Tage nach Transplantation von Myoblasten oder ES-Kardiomyozyten wird jedoch eine geringere Infarktexpansion im Vergleich zur PBS-Gruppe beobachtet. Die Funktionsparameter entsprechen nicht den Vergleichswerten ohne MI, sind jedoch signifikant besser als ohne Zelltransplantation. Dies kann zum einen durch die geringere Infarktexpansion und zum anderen durch ein möglicherweise besseres Remodelling erklärt werden. Die Integration der transplantierten Zellen in das bestehende Myokard oder die Generierung neuer funktionell eingebundener Myokardzellen sind potentielle Erklärungen, wie die Verbesserungen in Morphologie und Funktion erreicht werden könnten. In den daraufhin durchgeführten histologischen Untersuchungen werden diese Ergebnisse kontrolliert und weiter spezifiziert.

Im Rahmen der histologischen Untersuchungen mittels TriChrom-Färbung bestätigt sich eine ausgeprägte Infarktausdehnung als mögliche Ursache für die in der Echokardiographie beschriebene linksventrikuläre Dilatation. Der Anteil von infarzierter Ventrikelwand an der gesamten Ventrikelzirkumferenz liegt mit $49,4 \pm 3,2\%$ in der PBS-Gruppe am höchsten. 28 Tage nach Myoblastentransplantation zeigt sich in der entsprechenden Gruppe mit $33,9 \pm 3,5\%$ eine deutlich kleinere Infarktausdehnung. In der Kardiomyozyten-Gruppe zeigt sich ebenfalls eine deutlich geringere Infarktausdehnung ($40,3 \pm 3,2\%$). In der Literatur findet man nach LAD-Ligatur durchaus differierende Werte für die Infarktausdehnung, beispielsweise $28 \pm 2,8\%$ bei Michael et al. [153] und $44,6 \pm 2,1\%$ bei Lutgens et al. [154]; die eigenen Werte liegen damit im oberen Bereich der publizierten Spannweite. Degabriele et al. beschrieben 2004 eine starke Abhängigkeit der Infarktausdehnung von der Höhe der LAD-Ligatur [155]. Um große transmurale Infarkte mit niedriger Mortalität zu induzieren, sollte nach Angabe der genannten Autoren 3mm distal des atrioventrikulären Übergangs die LAD-Ligatur erfolgen [155]. In

Abhängigkeit der Ligaturhöhe kann die Infarktausdehnung von 8% bis über 60% variieren [155].

Bei der mikroskopischen Ausmessung der linksventrikulären Wanddicken bestätigt sich weitestgehend das Ergebnis der echokardiographischen Untersuchungen. Nach Myokardinfarkt zeigen sich die Vorder-, Hinter- und laterale Ventrikelwand deutlich ausgedünnt als Ausdruck des Myokardinfarktes und des damit verbundenen Verlustes an funktionellem Myokardgewebe. Nach PBS-Injektion findet sich die ausgeprägteste Reduktion der Wanddicken (HW-Dicke $0,53 \pm 0,08\text{mm}$; LW-Dicke $0,43 \pm 0,07\text{mm}$; VW-Dicke $0,55 \pm 0,07\text{mm}$). Sowohl nach Myoblasten- als auch nach Kardiomyozytentransplantation zeigt sich eine geringere Wandausdünnung.

Lutgens et al. beschreiben mit durchschnittlich 1,5mm für die Ventrikelwand von scheinoperierten Mäusen sowie $0,5 \pm 0,3\text{mm}$ für infarziertes Myokard fünf Wochen nach LAD-Ligatur vergleichbare Werte [154].

Das Septum interventriculare ist im angewendeten Infarktmodell aufgrund der Koronaranatomie der Maus primär nicht von der Ischämie betroffen (Versorgung durch weit proximal aus der LAD abgehende Septalarterie) und zeigt deshalb andere Veränderungen als die vom Infarkt betroffene freie Wand des linken Ventrikels: im Rahmen des kardialen Remodelling-Prozess entwickelt sich kompensatorisch eine als ungünstig anzusehende Septum-Hypertrophie. Zur Quantifizierung dieses Prozesses wird die mittlere Kardiomyozytenquerschnittsfläche des nicht infarzierten Septum interventriculare (= remote myocardium) histologisch untersucht. Hier zeigt sich nach Myokardinfarkt eine deutliche Zunahme der mittleren Kardiomyozytenquerschnittsfläche (MCSA). Die Schein-OP-Kontrollgruppe zeigt mit $156 \pm 2\mu\text{m}^2$ die kleinste MCSA. Nach alleiniger PBS-Injektion ist die Zunahme der MCSA im Rahmen des Remodellings am größten ($MCSA 233 \pm 3,7\mu\text{m}^2$). Nach Transplantation sowohl von Myoblasten ($211 \pm 2,2\mu\text{m}^2$) als auch von Kardiomyozyten ($215 \pm 2,7\mu\text{m}^2$) findet sich jeweils eine signifikant kleinere MCSA. In der Literatur werden ebenfalls MCSA-Werte adulter Mäuseherzen von 130 bis $150\mu\text{m}^2$ für scheinoperierte Mäuse angegeben, nach LAD-Ligatur und folgendem Myokardinfarkt werden $260\mu\text{m}^2$ bis $302\mu\text{m}^2$ beschrieben [156-158]; die eigenen Werte finden sich annähernd in diesem Bereich.

Bei der weiteren Untersuchung des kardialen Remodelling des „remote myocardium“ zeigt sich 35 Tage nach Myokardinfarkt außerdem eine Veränderung des interstitiellen Kollagenanteils im Septum interventriculare im Sinne einer interstitiellen Fibrose. Während in der scheinoperierten Gruppe lediglich $5,5 \pm 0,2\%$ Kollagen nachgewiesen werden kann, zeigt sich nach Myokardinfarkt und PBS-Injektion mit $6,8 \pm 0,3\%$ ein deutlich höherer Kollagenanteil. 28 Tage nach der Transplantation von Myoblasten ist gegenüber der PBS-Gruppe das Ausmaß der Fibrose geringer ausgeprägt ($6,5 \pm 0,4\%$), nach Kardiomyozyten-Transplantation sind diese Werte mit $5,5 \pm 0,3\%$ sogar nochmals niedriger ($p < 0,05$ vs. PBS) und unterscheiden sich nicht mehr signifikant von der Schein-OP-Kontrollgruppe. In der Literatur zeigen sich für gesunde

adulte Mäuse ebenfalls Werte von 4,5 bis 5,5% für das interstitielle Kollagen [146, 157, 158], was weitgehend deckungsgleich mit den eigenen Untersuchungen ist. Vier Wochen nach Myokardinfarkt adulter Mäuse (ICR oder C57BL) werden Werte von 6% bis 11% beschrieben [146, 157, 158]. Die hier deutlichere Schwankung der Werte kann durch verschiedene Ansätze, wie den jeweils verwendeten Maus-Stamm, Methode der Kollagen-Quantifizierung und Unterschiede in der Infarkt-Größe der Versuchstiere, erklärt werden. Yang et al. beschreiben in ihrer Arbeit sogar eine weitere Zunahme der interstitiellen Fibrose bis 4 Monate nach Myokardinfarkt, dann bleibt der interstitielle Kollagenanteil in ihren Untersuchungen bei 13% konstant [157].

Zusammenfassend kann man sagen, dass es nach LAD-Ligatur in jeder Infarkt-Gruppe zu einem ausgeprägten Myokardinfarkt mit Ventrikeldilatation und *adverse remodelling* kommt. Die Zelltransplantationen, reduzieren das Ausmaß dieser ungünstigen Veränderungen, ohne jedoch eine vollständige Normalisierung der Herzfunktion herstellen zu können. Der Einwand, dass eventuell primär unterschiedliche Infarktausdehnungen vorliegen könnten, ist sehr unwahrscheinlich, da in den echokardiographischen Untersuchungen 7 Tage nach LAD-Verschluss (d.h. direkt vor den verschiedenen Behandlungen) eine gleichmäßige Reduktion der linksventrikulären Pumpfunktion beobachtet wird. Die Art und Weise des Remodellings scheint nicht nur von dem Ausmaß der Infarktausdehnung, sondern auch von der Art der transplantierten Zellen abhängig zu sein. Obwohl nach Myoblastentransplantation eine deutlich geringere Infarktausdehnung beobachtet wird, findet hier dennoch ein vergleichsweise ausgeprägtes *adverse remodelling* statt. Dagegen liegt der interstitielle Kollagenanteil für die Herzen nach Kardiomyozyten-Transplantation trotz größerer Infarktausdehnung deutlich niedriger als für die Myoblastengruppe.

Frühere Überlegungen waren vor allem davon ausgegangen, dass die transplantierten Myoblasten in den Herzen der Versuchstiere Kardiomyozyten-ähnliche Zellen bilden, welche im Myokard funktionell eingebaut werden und aufgrund direkter Kontraktilität die Herzfunktion insbesondere systolisch verbessern [88]. Die eigenen Untersuchungen legen dagegen eher nahe, dass vor allem eine Zytokin-Sekretion für die Umbauvorgänge und positiven Einflüsse auf das geschädigte Myokard verantwortlich sein könnte. Dies gilt insbesondere, da 28 Tage nach Transplantation keine Myoblasten mehr nachgewiesen werden können. Als Beleg für die suffiziente Transplantation vitaler Zellen in das betroffene Myokardareal werden exemplarische Herzen bereits 48 Stunden nach Transplantation entnommen. Hier können die transplantierten Myoblasten sicher nachgewiesen werden. Dementsprechend werden Myoblasten erfolgreich transplantiert, deren Überleben kann jedoch nur für kurze Zeit nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die o.g. Effekte bereits in der Frühphase nach der Transplantation in Gang gesetzt werden. Die geringere Infarktexpansion untermauert die Theorie der eher frühen Effekte der Myoblastenbehandlung nach MI.

Diese Hypothese, dass Zytokine bzw. die Aktivierung von endogenen Signalkaskaden für positive Einflüsse von transplantierten Zellen nach Myokardinfarkt verantwortlich sind, konnte mittlerweile in weiterführenden Versuchsreihen belegt werden [28, 30, 159-165]. Als Ergänzung zu den hier vorgestellten Experimenten wurden zwischenzeitlich von Ebel et al. mit Hilfe einer Western Blot-Analyse untersucht, welche Zytokine und Wachstumsfaktoren durch Myoblasten und Kardiomyozyten sezerniert werden [30]. Hier zeigt sich, dass sowohl die Myoblasten als auch die Kardiomyozyten ein komplexes, teils vergleichbares Gemisch von Wachstumsfaktoren und Zytokinen freisetzen. Dies sind zum Teil proinflammatorische Zytokine, Kardiomyozyten-stimulierende Wachstumsfaktoren oder die Angiogenese stimulierende Zytokine. Beide Zellreihen sezernieren Zytokine wie IL-1 α , IL-4, TNF- β und MCSF sowie Stimulantien für die Zellmotilität und das interstitielle Remodelling (OSM, EGF) [30]. In den folgenden Untersuchungen konnte die Freisetzung o.g. Stoffe nach Zelltransplantation nachgewiesen werden. Es erscheint nachvollziehbar, dass solche komplexen Zusammensetzungen an Zytokinen und Wachstumsfaktoren einen entscheidenden Einfluss auf das Myokardgewebe haben können. Es bleibt also weiter abzuwarten, inwiefern die Zelltransplantation oder doch direkte Injektion von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen in geschädigtes Myokardgewebe ein sinnvoller und erfolgversprechender Therapieansatz nach Myokardinfarkt darstellt. Um funktionsunfähiges Herzmuskelgewebe zu reparieren oder zerstörtes Gewebe zu ersetzen, wäre es für die Zukunft ideal, wenn man Zellen gewinnen könnte, die sowohl strukturell als auch funktionell in das bestehende Herzmuskelgewebe zu integrieren sind. Aufgrund der bekannt hohen Gefäßversorgung der Herzmuskelzellen muss diese sicher ebenso berücksichtigt werden wie eine so exakte Einpassung der Zellen, dass sie auch bei der elektrischen Erregungsausbreitung nicht zu asynchroner Funktion führen und somit durch neue Probleme erkaufte werden [89].

6. Zusammenfassung

Eine Reihe von Studien beschäftigen sich mit der Zelltransplantation als mögliche Therapie nach akutem Myokardinfarkt. In dieser Arbeit sollen die Effekte der Transplantation verschiedener Zelltypen (embryonale Kardiomyozyten sowie Myoblasten der Skelettmuskulatur) auf das Myokardgewebe und die Herzfunktion im Mausmodell untersucht werden.

Nach Induktion eines akuten Myokardinfarktes durch Ligatur der linken Koronararterie werden sowohl echokardiographische Untersuchungen als auch histologische Analysen nach Organentnahme durchgeführt. Sowohl die Transplantation von Myoblasten als auch die von embryonalen Kardiomyozyten führen zu positiven Auswirkungen in Bezug auf die Myokardfunktion und -morphologie nach Myokardinfarkt. Es kann zwar keine Wiederherstellung der ursprünglichen Herzfunktion erreicht werden, jedoch werden ein weiterer Funktionsverlust und die Zunahme der Myokardfibrose deutlich reduziert. Die Effekte der einzelnen transplantierten Zellarten unterscheiden sich insofern, als dass die Myoblastentransplantation eher zu einer Reduktion der Infarktexpansion führt, wohingegen die transplantierten Kardiomyozyten vor allem einen günstigen Einfluss auf das Remodelling haben. Dennoch können 28 Tage nach den Zelltransplantationen keine relevanten Mengen an funktionell integrierten Zellen nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die transplantierten Zellen ihre Wirkung weniger durch eine direkte funktionelle Integration in das geschädigte Myokard ausüben, sondern eher durch indirekte Mechanismen wie die Freisetzung verschiedener Zytokine.

7. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt, D., *Gesundheit - Todesursachen in Deutschland*. DeStatis Wissen.Nutzen Fachserie 12 Reihe 4, 2013.
2. Rumyantsev, P.P., *Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration*. Int Rev Cytol, 1977. **51**: p. 186-273.
3. Durrani, S., M. Konoplyannikov, M. Ashraf, and K.H. Haider, *Skeletal myoblasts for cardiac repair*. Regen Med, 2010. **5**(6): p. 919-32.
4. Soonpaa, M.H. and L.J. Field, *Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts*. Am J Physiol, 1997. **272**(1 Pt 2): p. H220-6.
5. Völker, M., *Influence of the C5a receptor inhibition on the reperfusion damage after myocardial ischemia/reperfusion in the mouse*. 2007.
6. Laugwitz, K.L., A. Moretti, J. Lam, P. Gruber, Y. Chen, S. Woodard, L.Z. Lin, C.L. Cai, M.M. Lu, M. Reth, O. Platoshyn, J.X. Yuan, S. Evans, and K.R. Chien, *Postnatal *Isl1*⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages*. Nature, 2005. **433**(7026): p. 647-53.
7. Thygesen, K., J.S. Alpert, A.S. Jaffe, M.L. Simoons, B.R. Chaitman, H.D. White, H.A. Katus, F.S. Apple, B. Lindahl, D.A. Morrow, P.M. Clemmensen, P. Johanson, H. Hod, R. Underwood, J.J. Bax, J.J. Bonow, F. Pinto, R.J. Gibbons, K.A. Fox, D. Atar, L.K. Newby, M. Galvani, C.W. Hamm, B.F. Uretsky, P.G. Steg, W. Wijns, J.P. Bassand, P. Menasche, J. Ravkilde, E.M. Ohman, E.M. Antman, L.C. Wallentin, P.W. Armstrong, J.L. Januzzi, M.S. Nieminen, M. Gheorghide, G. Filippatos, R.V. Luepker, S.P. Fortmann, W.D. Rosamond, D. Levy, D. Wood, S.C. Smith, D. Hu, J.L. Lopez-Sendon, R.M. Robertson, D. Weaver, M. Tendera, A.A. Bove, A.N. Parkhomenko, E.J. Vasilieva, S. Mendis, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, C. Deaton, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, A. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, B.A. Popescu, Z. Reiner, U. Sechtem, P.A. Sirnes, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, J. Morais, C. Aguiar, W. Almahmeed, D.O. Arnar, F. Barili, K.D. Bloch, A.F. Bolger, H.E. Botker, B. Bozkurt, R. Bugiardini, C. Cannon, J. de Lemos, F.R. Eberli, E. Escobar, M. Hlatky, S. James, K.B. Kern, D.J. Moliterno, C. Mueller, A.N. Neskovic, B.M. Pieske, S.P. Schulman, R.F. Storey, K.A. Taubert, P. Vranckx, and D.R. Wagner, *Third universal definition of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(16): p. 1581-98.
8. Kannel, W.B., M.J. Schwartz, and P.M. McNamara, *Blood pressure and risk of coronary heart disease: the Framingham Study. 1969*. Chest, 2009. **136**(5 Suppl): p. e23.
9. Thygesen, K., J.S. Alpert, and H.D. White, *Universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2007. **28**(20): p. 2525-38.
10. H.-W. Baenkler, D.K., G. Rudolf, D. Fritze, R. Köster, H.-E. Schaefer et al, *Duale Reihe Innere Medizin*. Thieme Verlag, 2001: p. 119-163.
11. Van de Werf, F., D. Ardissino, A. Betriu, D.V. Cokkinos, E. Falk, K.A. Fox, D. Julian, M. Lengyel, F.J. Neumann, W. Ruzyllo, C. Thygesen, S.R. Underwood, A. Vahanian, F.W. Verheugt, and W. Wijns, *Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J, 2003. **24**(1): p. 28-66.
12. Moss, A.J., D. Ryan, D. Oakes, R.E. Goldstein, H. Greenberg, M.M. Bodenheimer, M.W. Brown, R.B. Case, E.M. Dwyer, Jr., S.W. Eberly, C.W. Francis, J.A. Gillespie, R.J. Krone, E. Lichstein, J.W. MacCluer, F.I. Marcus, J. McCarthy, C.E. Sparks, and W. Zareba, *Atherosclerotic risk genotypes and recurrent coronary events after myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2005. **96**(2): p. 177-82.
13. Hamm C. W. , A.H.-R., Bode C.,Giannitsis E.,Katus H.,Lebenson B., Nordt Th., Neumann F. J., Tebbe U., Zahn R., *Leitlinien Akutes Koronarsyndrom (ACS) Teil 1 und 2*. Zeitschrift für Kardiologie, 2004. **93/4**(92): p. 324-341.

14. Gibson, R.S., J.F. Hansen, F. Messerli, K.B. Schechtman, and W.E. Boden, *Long-term effects of diltiazem and verapamil on mortality and cardiac events in non-Q-wave acute myocardial infarction without pulmonary congestion: post hoc subset analysis of the multicenter diltiazem postinfarction trial and the second danish verapamil infarction trial studies*. Am J Cardiol, 2000. **86**(3): p. 275-9.
15. Al Suwaidi, J., D.N. Reddan, K. Williams, K.S. Pieper, R.A. Harrington, R.M. Califf, C.B. Granger, E.M. Ohman, and D.R. Holmes, Jr., *Prognostic implications of abnormalities in renal function in patients with acute coronary syndromes*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 974-80.
16. Ueno, H., M.B. Perryman, R. Roberts, and M.D. Schneider, *Differentiation of cardiac myocytes after mitogen withdrawal exhibits three sequential states of the ventricular growth response*. J Cell Biol, 1988. **107**(5): p. 1911-8.
17. Buggisch, M., *Mechanismen der Proliferation von Kardiomyozyten differenziert aus embryonalen Stammzellen der Maus*. 2007: Gießen.
18. Ghali, J.K., R. Cooper, and E. Ford, *Trends in hospitalization rates for heart failure in the United States, 1973-1986. Evidence for increasing population prevalence*. Arch Intern Med, 1990. **150**(4): p. 769-73.
19. Statistisches Bundesamt, D., *Die 20 häufigsten Hauptdiagnosen der vollstationär behandelten Patienten insgesamt (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) nach der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10) 2011*. 2014.
20. Tanner, F.C., T. Largiader, Z. Yang, and T.F. Luscher, *[Gene therapy in heart diseases]*. Schweiz Med Wochenschr, 1999. **129**(46): p. 1784-91.
21. Sachinidis, A., B.K. Fleischmann, E. Kolossov, M. Wartenberg, H. Sauer, and J. Hescheler, *Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells*. Cardiovasc Res, 2003. **58**(2): p. 278-91.
22. Siu, C.W., J.C. Moore, and R.A. Li, *Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for heart therapies*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2007. **7**(2): p. 145-52.
23. Assmus, B., V. Schachinger, C. Teupe, M. Britten, R. Lehmann, N. Dobert, F. Grunwald, A. Aicher, C. Urbich, H. Martin, D. Hoelzer, S. Dimmeler, and A.M. Zeiher, *Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3009-3017.
24. Wollert, K.C., G.P. Meyer, J. Lotz, S. Ringes-Lichtenberg, P. Lippolt, C. Breidenbach, S. Fichtner, T. Korte, B. Hornig, D. Messinger, L. Arseniev, B. Hertenstein, A. Ganser, and H. Drexler, *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*. Lancet, 2004. **364**(9429): p. 141-148.
25. Klein, H.M., *Ischaemic Heart Disease – Alternative Treatment Options*. European Cardiovascular Disease, 2007(1): p. 123-125.
26. Aetna, *Autologous Skeletal Myoblast/Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation for Cardiac and Peripheral Arterial Diseases*. Clinical Policy Bulletin, 2011. **0599**.
27. Nian, M., P. Lee, N. Khaper, and P. Liu, *Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling*. Circ Res, 2004. **94**(12): p. 1543-53.
28. Prabhu, S.D., *Cytokine-induced modulation of cardiac function*. Circ Res, 2004. **95**(12): p. 1140-53.
29. Yoon, Y.S., A. Wecker, L. Heyd, J.S. Park, T. Tkebuchava, K. Kusano, A. Hanley, H. Scadova, G. Qin, D.H. Cha, K.L. Johnson, R. Aikawa, T. Asahara, and D.W. Losordo, *Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 326-38.
30. Ebelt, H., M. Jungblut, Y. Zhang, T. Kubin, S. Kostin, A. Technau, S. Oustanina, S. Niebrugge, J. Lehmann, K. Werdan, and T. Braun, *Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines*. Stem Cells, 2007. **25**(1): p. 236-44.

31. Sturmer, D., M. Bogner, D. Güth, D. Lanzerath, and D.R.f.E.i.d. Biowissenschaften, *Forschung an humanen embryonalen Stammzellen*. 2007.
32. Morrison, S.J., N.M. Shah, and D.J. Anderson, *Regulatory mechanisms in stem cell biology*. Cell, 1997. **88**(3): p. 287-298.
33. Zandstra, P.W., C. Bauwens, T. Yin, Q. Liu, H. Schiller, R. Zweigerdt, K.B. Pasumarthi, and L.J. Field, *Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. Tissue Eng, 2003. **9**(4): p. 767-778.
34. Beddington, R.S. and E.J. Robertson, *An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo*. Development, 1989. **105**(4): p. 733-737.
35. Doetschman, T.C., H. Eistetter, M. Katz, W. Schmidt, and R. Kemler, *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. J Embryol Exp Morphol, 1985. **87**: p. 27-45.
36. Wobus, A.M., G. Wallukat, and J. Hescheler, *Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers*. Differentiation, 1991. **48**(3): p. 173-82.
37. Capi, O. and L. Gepstein, *Myocardial regeneration strategies using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes*. J Control Release, 2006. **116**(2): p. 211-218.
38. Brustle, O., K. Choudhary, K. Karram, A. Huttner, K. Murray, M. Dubois-Dalcq, and R.D. McKay, *Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(11): p. 1040-4.
39. Donovan, P.J. and J. Gearhart, *The end of the beginning for pluripotent stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 92-7.
40. Hubner, K., G. Fuhrmann, L.K. Christenson, J. Kehler, R. Reinbold, R. De La Fuente, J. Wood, J.F. Strauss, 3rd, M. Boiani, and H.R. Scholer, *Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells*. Science, 2003. **300**(5623): p. 1251-1256.
41. Niebrügge, S., *Generierung von funktionellen Kardiomyozyten aus murinen embryonalen Stammzellen im Bioreaktorsystem*. 2005.
42. Bradley, A., M. Evans, M.H. Kaufman, and E. Robertson, *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines*. Nature, 1984. **309**(5965): p. 255-6.
43. Moog, F. and R.D. Grey, *A system regulating alkaline phosphatase activity in the duodenum of the chick embryo and mouse*. Biol Neonat, 1965. **9**(1): p. 10-23.
44. Berstine, E.G., M.L. Hooper, S. Grandchamp, and B. Ephrussi, *Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(12): p. 3899-903.
45. Resnick, J.L., L.S. Bixler, L. Cheng, and P.J. Donovan, *Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture*. Nature, 1992. **359**(6395): p. 550-1.
46. Solter, D. and B.B. Knowles, *Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(11): p. 5565-9.
47. Solter, D. and B.B. Knowles, *Developmental stage-specific antigens during mouse embryogenesis*. Curr Top Dev Biol, 1979. **13 Pt 1**: p. 139-65.
48. Sefton, M., M.H. Johnson, and L. Clayton, *Synthesis and phosphorylation of ovomorulin during mouse early development*. Development, 1992. **115**(1): p. 313-8.
49. Butz, S. and L. Larue, *Expression of catenins during mouse embryonic development and in adult tissues*. Cell Adhes Commun, 1995. **3**(4): p. 337-52.
50. Scholer, H.R., A.K. Hatzopoulos, R. Balling, N. Suzuki, and P. Gruss, *A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor*. Embo J, 1989. **8**(9): p. 2543-50.
51. Johnson, L.V., P.G. Calarco, and M.L. Siebert, *Alkaline phosphatase activity in the preimplantation mouse embryo*. J Embryol Exp Morphol, 1977. **40**: p. 83-9.
52. Armstrong, L., M. Lako, J. Lincoln, P.M. Cairns, and N. Hole, *mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells*. Mech Dev, 2000. **97**(1-2): p. 109-16.

53. Liu, Y., B.E. Snow, M.P. Hande, D. Yeung, N.J. Erdmann, A. Wakeham, A. Itie, D.P. Siderovski, P.M. Lansdorp, M.O. Robinson, and L. Harrington, *The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo*. *Curr Biol*, 2000. **10**(22): p. 1459-62.
54. Monk, M., *Changes in DNA methylation during mouse embryonic development in relation to X-chromosome activity and imprinting*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1990. **326**(1235): p. 299-312.
55. Rohwedel, J., U. Sehlmeier, J. Shan, A. Meister, and A.M. Wobus, *Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution*. *Cell Biol Int*, 1996. **20**(8): p. 579-87.
56. Pease, S., P. Braghetta, D. Gearing, D. Grail, and R.L. Williams, *Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF)*. *Dev Biol*, 1990. **141**(2): p. 344-52.
57. Zandstra, P.W., H.V. Le, G.Q. Daley, L.G. Griffith, and D.A. Lauffenburger, *Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation*. *Biotechnol Bioeng*, 2000. **69**(6): p. 607-17.
58. Smith, A.G., J.K. Heath, D.D. Donaldson, G.G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, and D. Rogers, *Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides*. *Nature*, 1988. **336**(6200): p. 688-90.
59. Williams, R.L., D.J. Hilton, S. Pease, T.A. Willson, C.L. Stewart, D.P. Gearing, E.F. Wagner, D. Metcalf, N.A. Nicola, and N.M. Gough, *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. *Nature*, 1988. **336**(6200): p. 684-7.
60. Rathjen, P.D., J. Nichols, S. Toth, D.R. Edwards, J.K. Heath, and A.G. Smith, *Developmentally programmed induction of differentiation inhibiting activity and the control of stem cell populations*. *Genes Dev*, 1990. **4**(12B): p. 2308-18.
61. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. *Nature*, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
62. Martin, G.R., *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
63. Passier, R. and C. Mummery, *Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair*. *Cardiovasc Res*, 2003. **58**(2): p. 324-335.
64. Campbell, K.H., P. Loi, P. Cappai, and I. Wilmut, *Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes*. *Biol Reprod*, 1994. **50**(6): p. 1385-93.
65. Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind, and K.H. Campbell, *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. *Nature*, 1997. **385**(6619): p. 810-3.
66. Schreiner, R., *Klonen durch Zellkerntransfer, Stand der Forschung*. 2005.
67. Thomson, J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones, *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. *Science*, 1998. **282**(5391): p. 1145-1147.
68. Strom, T.B., L.J. Field, and M. Ruediger, *Allogeneic stem cells, clinical transplantation and the origins of regenerative medicine*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(5): p. 601-5.
69. Ott, H.C., T.S. Matthiesen, J. Brechtken, S. Grindle, S.K. Goh, W. Nelson, and D.A. Taylor, *The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007. **4 Suppl 1**: p. S27-39.
70. Reuters, dpa, and EuGh. *Menschliche Stammzellen, für deren Gewinnung Embryonen zerstört werden müssen, so der Europäische Gerichtshof (EuGH) am 18. Oktober 2011, dürfen nicht patentiert werden, da es sich bei befruchteten Eizellen bereits um menschliches Leben handle*. 2011.

71. Watt, F.M. and B.L. Hogan, *Out of Eden: stem cells and their niches*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1427-1430.
72. Kanatsu-Shinohara, M. and T. Shinohara, *The germ of pluripotency*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(6): p. 663-4.
73. Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
74. Mezey, E., K.J. Chandross, G. Harta, R.A. Maki, and S.R. McKercher, *Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow*. Science, 2000. **290**(5497): p. 1779-82.
75. Bjornson, C.R., R.L. Rietze, B.A. Reynolds, M.C. Magli, and A.L. Vescovi, *Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo*. Science, 1999. **283**(5401): p. 534-7.
76. Clarke, D.L., C.B. Johansson, J. Wilbertz, B. Veress, E. Nilsson, H. Karlstrom, U. Lendahl, and J. Frisen, *Generalized potential of adult neural stem cells*. Science, 2000. **288**(5471): p. 1660-3.
77. Gussoni, E., Y. Soneoka, C.D. Strickland, E.A. Buzney, M.K. Khan, A.F. Flint, L.M. Kunkel, and R.C. Mulligan, *Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation*. Nature, 1999. **401**(6751): p. 390-4.
78. Jackson, K.A., S.M. Majka, H. Wang, J. Pocius, C.J. Hartley, M.W. Majesky, M.L. Entman, L.H. Michael, K.K. Hirschi, and M.A. Goodell, *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells*. J Clin Invest, 2001. **107**(11): p. 1395-402.
79. Krause, D.S., N.D. Theise, M.I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel, and S.J. Sharkis, *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell*. Cell, 2001. **105**(3): p. 369-377.
80. D'Amour, K.A. and F.H. Gage, *Are somatic stem cells pluripotent or lineage-restricted?* Nat Med, 2002. **8**(3): p. 213-4.
81. Holden, C. and G. Vogel, *Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal?* Science, 2002. **296**(5576): p. 2126-9.
82. Tsai, R.Y., R. Kittappa, and R.D. McKay, *Plasticity, niches, and the use of stem cells*. Dev Cell, 2002. **2**(6): p. 707-12.
83. Tremblay, J.P., B. Roy, and M. Goulet, *Human myoblast transplantation: a simple assay for tumorigenicity*. Neuromuscul Disord, 1991. **1**(5): p. 341-3.
84. Aboody, K.S., A. Brown, N.G. Rainov, K.A. Bower, S. Liu, W. Yang, J.E. Small, U. Herrlinger, V. Ourednik, P.M. Black, X.O. Breakefield, and E.Y. Snyder, *Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12846-12851.
85. Ziemer, G.H., A., *Herzchirurgie - Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen*, ed. S. Auflage. 2010.
86. Chou, S.M. and I. Nonaka, *Satellite cells and muscle regeneration in diseased human skeletal muscles*. J Neurol Sci, 1977. **34**(1): p. 131-45.
87. Murry, C.E., R.W. Wiseman, S.M. Schwartz, and S.D. Hauschka, *Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis*. J Clin Invest, 1996. **98**(11): p. 2512-23.
88. Taylor, D.A., B.Z. Atkins, P. Hungspreugs, T.R. Jones, M.C. Reedy, K.A. Hutcheson, D.D. Glower, and W.E. Kraus, *Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation*. Nat Med, 1998. **4**(8): p. 929-33.
89. Tao, Z.W. and L.G. Li, *Cell therapy in congestive heart failure*. J Zhejiang Univ Sci B, 2007. **8**(9): p. 647-660.
90. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **9**: p. 493-5.
91. Koh, G.Y., M.G. Klug, M.H. Soonpaa, and L.J. Field, *Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): p. 1548-54.

92. Watt, D.J., J.E. Morgan, and T.A. Partridge, *Use of mononuclear precursor cells to insert allogeneic genes into growing mouse muscles*. Muscle Nerve, 1984. **7**(9): p. 741-50.
93. Morgan, J.E., D.J. Watt, J.C. Sloper, and T.A. Partridge, *Partial correction of an inherited biochemical defect of skeletal muscle by grafts of normal muscle precursor cells*. J Neurol Sci, 1988. **86**(2-3): p. 137-47.
94. Rumyantsev, P.P.C., B.M., *Growth and Hyperplasia of Cardiac Muscle Cells*. 1991.
95. Hauschka, S.D., *Clonal analysis of vertebrate myogenesis. II. Environmental influences upon human muscle differentiation*. Dev Biol, 1974. **37**(2): p. 329-44.
96. Hauschka, S.D., *Muscle cell culture: future goals for facilitating the investigation of human muscle disease*. J.Wiley & Sons, New York, 1982.
97. Taylor, D.A., *Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease and heart failure*. Curr Control Trials Cardiovasc Med, 2001. **2**(5): p. 208-210.
98. Goodell, M.A., K.A. Jackson, S.M. Majka, T. Mi, H. Wang, J. Pocius, C.J. Hartley, M.W. Majesky, M.L. Entman, L.H. Michael, and K.K. Hirschi, *Stem cell plasticity in muscle and bone marrow*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **938**: p. 208-18; discussion 218-20.
99. Menasche, P., *Cell transplantation in myocardium*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(6 Suppl): p. S20-8.
100. Tambara, K., Y. Sakakibara, G. Sakaguchi, F. Lu, G.U. Premaratne, X. Lin, K. Nishimura, and M. Komeda, *Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers*. Circulation, 2003. **108 Suppl 1**: p. II259-63.
101. Rosenstrauch, D., G. Poglajen, N. Zidar, and I.D. Gregoric, *Stem cell therapy for ischemic heart failure*. Tex Heart Inst J, 2005. **32**(3): p. 339-347.
102. Gepstein, L., *Derivation and potential applications of human embryonic stem cells*. Circ Res, 2002. **91**(10): p. 866-76.
103. Min, J.Y., Y. Yang, K.L. Converso, L. Liu, Q. Huang, J.P. Morgan, and Y.F. Xiao, *Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats*. J Appl Physiol, 2002. **92**(1): p. 288-96.
104. Kehat, I., D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir, H. Segev, M. Amit, A. Gepstein, E. Livne, O. Binah, J. Itskovitz-Eldor, and L. Gepstein, *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes*. J Clin Invest, 2001. **108**(3): p. 407-414.
105. Boheler, K.R., J. Czyz, D. Tweedie, H.T. Yang, S.V. Anisimov, and A.M. Wobus, *Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes*. Circ Res, 2002. **91**(3): p. 189-201.
106. Kumar, D., T.J. Kamp, and M.M. LeWinter, *Embryonic stem cells: differentiation into cardiomyocytes and potential for heart repair and regeneration*. Coron Artery Dis, 2005. **16**(2): p. 111-6.
107. Maltsev, V.A., A.M. Wobus, J. Rohwedel, M. Bader, and J. Hescheler, *Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents*. Circ Res, 1994. **75**(2): p. 233-44.
108. Westfall, M.V., K.A. Pasyk, D.I. Yule, L.C. Samuelson, and J.M. Metzger, *Ultrastructure and cell-cell coupling of cardiac myocytes differentiating in embryonic stem cell cultures*. Cell Motil Cytoskeleton, 1997. **36**(1): p. 43-54.
109. Skerjanc, I.S., *Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells*. Trends Cardiovasc Med, 1999. **9**(5): p. 139-43.
110. Maltsev, V.A., J. Rohwedel, J. Hescheler, and A.M. Wobus, *Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types*. Mech Dev, 1993. **44**(1): p. 41-50.
111. Soonpaa, M.H., G.Y. Koh, M.G. Klug, and L.J. Field, *Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium*. Science, 1994. **264**(5155): p. 98-101.

112. Klug, M.G., M.H. Soonpaa, G.Y. Koh, and L.J. Field, *Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 216-24.
113. Rubart, M. and L.J. Field, *Cardiac repair by embryonic stem-derived cells*. Handb Exp Pharmacol, 2006(174): p. 73-100.
114. Yang, Y., J.Y. Min, J.S. Rana, Q. Ke, J. Cai, Y. Chen, J.P. Morgan, and Y.F. Xiao, *VEGF enhances functional improvement of postinfarcted hearts by transplantation of ESC-differentiated cells*. J Appl Physiol, 2002. **93**(3): p. 1140-51.
115. Behfar, A., L.V. Zingman, D.M. Hodgson, J.M. Rauzier, G.C. Kane, A. Terzic, and M. Puceat, *Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart*. Faseb J, 2002. **16**(12): p. 1558-66.
116. Koh, G.Y., M.H. Soonpaa, M.G. Klug, and L.J. Field, *Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium*. Am J Physiol, 1993. **264**(5 Pt 2): p. H1727-33.
117. Rubart, M., M.H. Soonpaa, H. Nakajima, and L.J. Field, *Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation*. J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 775-83.
118. Ebelt, H., *Beeinflussung der Zellzyklusregulation von Kardiomyozyten zur Stimulation von Regenerationsprozessen des Herzmuskels*. 2009: Halle/Saalle.
119. Yaffe, D. and O. Saxel, *Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle*. Nature, 1977. **270**(5639): p. 725-7.
120. Mannion, J.D., T. Bitto, R.L. Hammond, N.A. Rubinstein, and L.W. Stephenson, *Histochemical and fatigue characteristics of conditioned canine latissimus dorsi muscle*. Circ Res, 1986. **58**(2): p. 298-304.
121. Reinecke, H., G.H. MacDonald, S.D. Hauschka, and C.E. Murry, *Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair*. J Cell Biol, 2000. **149**(3): p. 731-40.
122. Leobon, B., I. Garcin, P. Menasche, J.T. Vilquin, E. Audinat, and S. Charpak, *Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7808-11.
123. Neuhaus, P., S. Oustanina, T. Loch, M. Kruger, E. Bober, R. Dono, R. Zeller, and T. Braun, *Reduced mobility of fibroblast growth factor (FGF)-deficient myoblasts might contribute to dystrophic changes in the musculature of FGF2/FGF6/mdx triple-mutant mice*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(17): p. 6037-48.
124. Oustanina, S., G. Hause, and T. Braun, *Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification*. Embo J, 2004. **23**(16): p. 3430-9.
125. Brenner, W., A. Aicher, T. Eckey, S. Massoudi, M. Zuhayra, U. Koehl, C. Heeschen, W.U. Kampen, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, and E. Henze, *¹¹¹In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model*. J Nucl Med, 2004. **45**(3): p. 512-8.
126. Lehmann, J.N., S., „*Generierung funktioneller Kardiomyozyten abgeleitet aus murinen embryonalen Stammzellen für die Transplantation in ein MausHerzinfarkt-Modell*. 2005.
127. Weir, C., M.C. Morel-Kopp, A. Gill, K. Tinworth, L. Ladd, S.N. Hunyor, and C. Ward, *Mesenchymal stem cells: isolation, characterisation and in vivo fluorescent dye tracking*. Heart Lung Circ, 2008. **17**(5): p. 395-403.
128. Naresh, N.K., Y. Xu, A.L. Klibanov, M.H. Vandsburger, C.H. Meyer, J. Leor, C.M. Kramer, B.A. French, and F.H. Epstein, *Monocyte and/or macrophage infiltration of heart after myocardial infarction: MR imaging by using T1-shortening liposomes*. Radiology, 2012. **264**(2): p. 428-35.
129. Scholz, C.G.F., *Das Verhalten transplantierte Herzmuskelzellen im regenerierenden Hinterbein von Notophthalmus viridescens - Transdifferenzierung im Rahmen einer Regeneration*. 2008: Halle/Saale.
130. Conn, H., *Biological Stains*. Edited by RD Lillie, 9th ed, Williams and Wilkins, Baltimore (MD), 1977.

131. Lillie, R.D., *Further Experiments with the Masson Trichrome Modification of Mallory's Connective Tissue Stain*. 1940.
132. Sheehan, D.C.H., B.B., *Theory and practice of histotechnology*. 1980.
133. Gomori, G., *A rapid one-step trichrome stain*. *Am J Clin Pathol*, 1950. **20**(7): p. 661-4.
134. Clark, G., *Staining procedures*. 1973.
135. Brinn, N.T., *Rapid Metallic Histological Staining Using the Microwave Oven*. *Journal of Histotechnology*, 1983. **3**: p. 125-129.
136. Leong, A.S. and J. Milios, *Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation*. *J Pathol*, 1986. **148**(2): p. 183-7.
137. Maynard, J.H., *A trichrome stain in glycol methacrylate that works*. *Lab Med*, 1986(17): p. 471.
138. Valle, S., *Special stains in the microwave oven*. *Journal of Histotechnology*, 1986. **4**: p. 237-239.
139. Sigma, A., *Accustain trichrom-Farbstoffe (Masson)*, in *Verfahren Nr. HT15*. 2003.
140. Firth, B.G. and P.M. Dunnmon, *The prevention of congestive heart failure: left ventricular dilation and its management*. *Am J Med Sci*, 1990. **299**(4): p. 276-90.
141. Dhalla, N.S., D. Kaura, X. Liu, and R.E. Beamish, *Mechanisms of subcellular remodelling in post-infarct heart failure*. *Exs*, 1996. **76**: p. 463-77.
142. Liu, Y.H., J. Xu, X.P. Yang, F. Yang, E. Shesely, and O.A. Carretero, *Effect of ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists on endothelial NO synthase knockout mice with heart failure*. *Hypertension*, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 375-81.
143. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study*. *Lancet*, 1997. **349**(9064): p. 1498-504.
144. Remme, W.J. and K. Swedberg, *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure*. *Eur Heart J*, 2001. **22**(17): p. 1527-60.
145. Bassand, J.P., C.W. Hamm, D. Ardissino, E. Boersma, A. Budaj, F. Fernandez-Aviles, K.A. Fox, D. Hasdai, E.M. Ohman, L. Wallentin, and W. Wijns, *Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes*. *Eur Heart J*, 2007. **28**(13): p. 1598-660.
146. Bosbach, I., *Kardioprotektive Effekte des Bone-Morphogenetic-Protein-2 (PMP-2) im Herzinfarktmodell der Maus*. Dissertation, 2010.
147. Hunt, S.A., *ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure)*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(6): p. e1-82.
148. Collins, K.A., C.E. Korcarz, S.G. Shroff, J.E. Bednarz, R.C. Fentzke, H. Lin, J.M. Leiden, and R.M. Lang, *Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(5): p. H1954-62.
149. Tsutsui, H., T. Ide, S. Hayashidani, N. Suematsu, T. Shiomi, J. Wen, K. Nakamura, K. Ichikawa, H. Utsumi, and A. Takeshita, *Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure*. *Circulation*, 2001. **104**(2): p. 134-6.
150. Li, Q., Y. Guo, W. Tan, A.B. Stein, B. Dawn, W.J. Wu, X. Zhu, X. Lu, X. Xu, T. Siddiqui, S. Tiwari, and R. Bolli, *Gene therapy with iNOS provides long-term protection against myocardial infarction without adverse functional consequences*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(2): p. H584-9.
151. Kinugawa, S., H. Tsutsui, S. Hayashidani, T. Ide, N. Suematsu, S. Satoh, H. Utsumi, and A. Takeshita, *Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress*. *Circ Res*, 2000. **87**(5): p. 392-8.
152. Condorelli, G., A. Drusco, G. Stassi, A. Bellacosa, R. Roncarati, G. Iaccarino, M.A. Russo, Y. Gu, N. Dalton, C. Chung, M.V. Latronico, C. Napoli, J. Sadoshima, C.M.

- Croce, and J. Ross, Jr., *Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12333-8.
153. Michael, L.H., M.L. Entman, C.J. Hartley, K.A. Youker, J. Zhu, S.R. Hall, H.K. Hawkins, K. Berens, and C.M. Ballantyne, *Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model*. Am J Physiol, 1995. **269**(6 Pt 2): p. H2147-54.
 154. Lutgens, E., M.J. Daemen, E.D. de Muinck, J. Debets, P. Leenders, and J.F. Smits, *Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 586-93.
 155. Degabriele, N.M., U. Griesenbach, K. Sato, M.J. Post, J. Zhu, J. Williams, P.K. Jeffery, D.M. Geddes, and E.W. Alton, *Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction*. Exp Physiol, 2004. **89**(4): p. 497-505.
 156. Cavasin, M.A.S., S ; Lu, Ai-Li, *Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodelling and function in mice with myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **284**:(myocardial remodelling): p. H1560-H1569.
 157. Yang, F., Y.H. Liu, X.P. Yang, J. Xu, A. Kapke, and O.A. Carretero, *Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice*. Exp Physiol, 2002. **87**(5): p. 547-55.
 158. LaPointe, M.C., M. Mendez, A. Leung, Z. Tao, and X.P. Yang, *Inhibition of cyclooxygenase-2 improves cardiac function after myocardial infarction in the mouse*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(4): p. H1416-24.
 159. Decker, R.S., M.G. Cook, M. Behnke-Barclay, and M.L. Decker, *Some growth factors stimulate cultured adult rabbit ventricular myocyte hypertrophy in the absence of mechanical loading*. Circ Res, 1995. **77**(3): p. 544-55.
 160. Nakano, M., A.A. Knowlton, Z. Dibbs, and D.L. Mann, *Tumor necrosis factor-alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte*. Circulation, 1998. **97**(14): p. 1392-400.
 161. Fujio, Y., T. Nguyen, D. Wencker, R.N. Kitsis, and K. Walsh, *Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart*. Circulation, 2000. **101**(6): p. 660-7.
 162. Orlic, D., J. Kajstura, S. Chimenti, F. Limana, I. Jakoniuk, F. Quaini, B. Nadal-Ginard, D.M. Bodine, A. Leri, and P. Anversa, *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10344-9.
 163. Harada, M., Y. Qin, H. Takano, T. Minamino, Y. Zou, H. Toko, M. Ohtsuka, K. Matsuura, M. Sano, J. Nishi, K. Iwanaga, H. Akazawa, T. Kunieda, W. Zhu, H. Hasegawa, K. Kunisada, T. Nagai, H. Nakaya, K. Yamauchi-Takahara, and I. Komuro, *G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 305-11.
 164. Lopez, N., J. Diez, and M.A. Fortuno, *Characterization of the protective effects of cardiotrophin-1 against non-ischemic death stimuli in adult cardiomyocytes*. Cytokine, 2005. **30**(5): p. 282-92.
 165. Ma, Z., M. Kotaki, R. Inai, and S. Ramakrishna, *Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds*. Tissue Eng, 2005. **11**(1-2): p. 101-9.

8. Thesen

1. Die proximale Ligatur der linken Koronararterie bei adulten ICR-Mäusen verursacht einen ausgeprägten Myokardinfarkt, welcher echokardiographisch und histologisch nachgewiesen werden kann.
2. Mittels serieller Echokardiographie können die sich infolge des Myokardinfarktes entwickelnden Veränderungen der Herzfunktion und Herzmorphologie nachgewiesen werden. Die Dicke der lateralen, anterioren und posterioren Wand des linken Ventrikels nimmt nach LAD-Ligatur stark ab. Durch Kompensationsmechanismen kommt es nach LAD-Ligatur zur reaktiven Hypertrophie des Septum interventriculare, und der innere linksventrikuläre Durchmesser nimmt nach Infarzierung als Zeichen der Ventrikeldilatation zu.
3. Die Transplantation sowohl von Myoblasten als auch von embryonalen Kardiomyozyten wirkt dem progredienten Pumpleistungsverlust und der zunehmenden Dilatation des linken Ventrikels entgegen.
4. Die Transplantation von Myoblasten führt bereits nach 7 Tagen zur Stabilisierung der Herzfunktion, wohingegen die positiven Effekte der ES-Kardiomyozyten erst nach 28 Tagen echokardiographisch ein ähnliches Niveau erreichen.
5. Die Größe der einzelnen Myozyten des Ventrikelseptums nimmt nach LAD-Verschluss im Sinne einer kompensatorischen Hypertrophie signifikant zu. Diesem Phänomen des „adverse remodelling“ kann durch Transplantation sowohl der Myoblasten als auch der ES-Kardiomyozyten entgegengewirkt werden.
6. Insgesamt sprechen die erhobenen Befunde dafür, dass die positiven Effekte der Zell-Transplantationen vor allem in indirekten Effekten wie der Sekretion von Zytokinen begründet liegen und sich nicht auf die funktionelle Integration oder Bildung neuer Muskelzellen zurückführen lassen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Jungblut, Mirco
Adresse: Am Heiligenhaus 5, 53347 Alfter
Familienstand: verheiratet, 1 Sohn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: evangelisch
Geburtsdatum: 27.03.1978
Geburtsort: Andernach

Schulbildung

1984 – 1988 Grundschule St. Stephan Andernach
1988 – 1997 Kurfürst-Salentin-Gymnasium Andernach
06/1997 Abitur/ Hochschulreife
07/1997 – 12/1997 Praktikum bei RWE Mühlheim-Kärlich
1/1998 – 10/1998 Grundwehrdienst im Bataillon für Operative Information 950 Mayen
Personalabteilung (S1)

Studium und beruflicher Werdegang

10/1998 – 03/2005 Studium Humanmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Während des Studiums wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für
Physiologische Chemie der Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg
04/2005 – 11/2005 Studium Humanmedizin
an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
9.11.2005 3. Staatsexamen Humanmedizin
an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
1/2006 – 12/2009 Assistenzarzt in der Abteilung für Chirurgie und Unfallchirurgie
Malteser Krankenhaus Bonn Rhein/Sieg
1/2010 – 08/2011 Assistenzarzt in der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie
Marienhaus GmbH, Orthopädische Fachklinik St. Josef in Bendorf
08/2011 Assistenzarzt in der Abteilung für Chirurgie und Unfallchirurgie
Malteser Krankenhaus Bonn Rhein/Sieg
05/2012 Facharzt für Unfallchirurgie und Orthopädie
09/2014 Oberarzt in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
Malteser Krankenhaus Bonn Rhein/Sieg

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mirco Jungblut

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Mirco Jungblut

Danksagung

Ich bedanke mich bei all denen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. med. Henning Ebelt für die Überlassung des interessanten und klinisch relevanten Themas sowie die ständige Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken. Frau Nicole Glaubitz sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologische Chemie der Universitätsklinik Halle-Wittenberg möchte ich für die gute Zusammenarbeit und hervorragende Einarbeitung in die Arbeitstechniken sowie die technischen Geräte danken. Danken möchte ich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben und mich über das gesamte Studium begleitet und hilfreich zur Seite gestanden haben.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Sandra und meinem Sohn Julian für die große Geduld und liebevolle Unterstützung.