

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Abteilung für experimentelle Erwachsenenkardiologie des Deutschen
Herzzentrums München**

**Apoptoseverhalten der menschlichen Stammzellen und histologischer Verlauf
bei akutem Herzinfarkt im Rattenmodell bei Stammzelltherapie mit und ohne
IGF2**

Francesca Rosa Renate Di Cerbo

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott
2. Univ.-Prof. Dr. A. Kastrati

Die Dissertation wurde am 29.06.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2011 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Einleitung	9
Der Myokardinfarkt.....	9
Mechanismen des ischämischen Zellschadens.....	14
Therapie des Myokardinfarktes.....	25
Stammzellen	26
Wachstumsfaktoren	32
Problemstellung	37
Material und Methoden.....	38
Versuchsplan	38
Versuchstiere	39
Anästhesie	40
Operation und intramyokardiale Zelltransplantation	40
Euthanasie und Probengewinnung	42
Aufarbeitung der Paraffinschnitte.....	42
Hämatoxylin – Eosin – Färbung (HE-Färbung).....	42
HE-Auswertung.....	43
Elastica-van-Giesson-Färbung (EvG-Färbung)	43
EvG-Auswertung.....	44
Immunfluoreszenz.....	44
Verarbeitung der Paraffinschnitte mit der Fluoreszenz-Doppelfärbung Troponin I und TUNEL.....	45
Auswertung der Troponin I –TUNEL Färbung:	46
Verarbeitung der Paraffinschnitte mit der Fluoreszenz-Doppelfärbung: anti-humanes CD31 und TUNEL.....	47
Auswertung der hCD31 – TUNEL Färbung	48
Statistische Berechnung und Dokumentation	49
Ergebnisse	50
Ergebnisse der Kontrolltiere.....	50
Auswertung der Zelltherapie und der Zelltherapie mit Wachstumsfaktoren.....	57

Auswertung der Immunfluoreszenz.....	66
Diskussion.....	82
Limitationen.....	88
Schlussfolgerung	89
Zusammenfassung	90
Literaturverzeichnis.....	91
Danksagung.....	116

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptosis-inducing factor
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
ASTAMI-Studie	Autologous Stem Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction-Studie
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BMC	Bone Marrow Cells
BMMCs	Bone Marrow Mononuclear Cells
BOOST-Studie	Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration-Studie
ca.	circa
Ca	Calcium
°C	Grad Celsius
CAD	Caspase Activated Deoxyribonuclease
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CPCs	Circulating Progenitor Cells
CURE-Studie	Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events Trial -Studie
DANAMI-2-Studie	The Danish multicentre randomized study of fibrinolytic therapy vs. primary angioplasty in acute myocardial infarction-Studie
DAPI	4', 6 Diamidino-2-Phenyl-indole
DED	death-effector domain
DNA	deoxyribonucleic acid
EC	Endotheliale Zellen
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPC	Endothelialen Progenitorzellen
et al.	et alii, und Mitarbeiter

EvG	Elastica van Giesson
FAK	Focal-Adhesion-Kinase
Flt-1	FMS-like Tyrosin Kinase-1
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GA	Gentamycin-Amphotericin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HE	Hämatotoxylin-Eosin
HDL	HighDensity Lipoprotein
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA	humanes Leukozyten Antigen
HTX	Hämatoxylin
i.m.	intramuskulär
ICAD	Inhibitor von CAD
IL	Interleukin
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1-Rezeptor
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IGF-2R	Insulin-like growth factor -2-Rezeptor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IgG1	Immunglobulin G
ISIS-2-Studie	Second International Study of Infarct Survival
K	Kalium
KDR	Kinase-insert-domain-receptor
LAD	Left Anterior Descending Artery
LDL	Low Density Lipoprotein
Ltd	Limited (beschränkte Haftung)
LV-Zellen	Leervektor-Zellen
LVEF	LinksVentrikulären AuswurfFraktion
M.	Musculus
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
min	Minuten
MIRACL-Studie	Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering-study

ml	Milliliter
Mm.	musculi
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSC	Mesenchymale Stammzellen
n	Anzahl
Na	Natrium
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
pH	pondus Hydrogenii oder potentia Hydrogenii, negativer Logarithmus Wasserstoffionenkonzentration
P-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAK	p21-aktivierte Kinase 2
PBS	phosphate buffered saline
PCI	Perkutane Koronare Intervention
PIG	p53 induced genes
PLGF	placental growth factor
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
REPAIR-AMI-Studie	Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction-Studie
RNU	thymusaplastisch
STH	Somatotropes Hormon
s.c.	subcutan
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
sec	Sekunden
sog.	sogenannt
STEMI	ST-elevation myocardial infarction
TOPCARE-AMI-Studie	Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction-Studie
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
USA	United States of America
UK	United Kingdom

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V	Volt
vWF	von Willebrand Faktor
VE-Cadherin	vascular/endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
x	fache

Einleitung

Der Myokardinfarkt

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie der Myokardinfarkt spielen heutzutage eine sehr wichtige Rolle. Koronare Herzerkrankungen, insbesondere der Myokardinfarkt verursachen mehr Tote, Invalide und größere volkswirtschaftliche Kosten als alle anderen Erkrankungen in der entwickelten Welt zusammen. Auch in Deutschland belegt der Myokardinfarkt einen der vordersten Plätze in der Todesursachenstatistik. In den USA leiden über 12 Millionen Menschen an koronarer Herzerkrankung, und über 1 Million Patienten erleiden dort Jährlich einen Myokardinfarkt (Statistisches Bundesamt 2007).

Das heutige Konsumverhalten fördert Risikofaktoren und -verhalten wie Hypertonie, Diabetes, Rauchen, Adipositas, LDL-Cholesterin-Erhöhung, HDL-Cholesterin-Erniedrigung und Bewegungsmangel. In den Entwicklungsländern kommt es durch die zunehmende Urbanisierung ebenfalls zu einer Zunahme dieses Lebensstils und damit auch zur Entstehung dieser Erkrankungen. Dies kann dazu führen, dass bis 2020 die koronare Herzerkrankung die häufigste Todesursache in der ganzen Welt sein kann.

Deshalb ist die genaue Erforschung dieser Krankheiten, ihrer Therapie und das Verhindern von deren Spätfolgen von herausragender Bedeutung für unsere Gesellschaft (Statistisches Bundesamt 2007; Selwyn und Braunwald, 2005).

Das Herz ist das zentrale Organ des Herz-Kreislauf-Systems. Das von Blut befreite Herz eines gesunden Erwachsenen wiegt bei einem Mann etwa 300g und bei der Frau etwa 270g. Die äußere Form entspricht der eines abgestumpften Kegels. Dieser liegt so im Thorax, dass seine Spitze nach links unten vorne und die Basis nach rechts oben hinten zeigt. Es handelt sich um einen Hohlmuskel und besteht hauptsächlich aus Myokard, welches mit über 5% des Herz-Zeit-Volumens durch die beiden Koronararterien (A. coronaria sinistra und A. coronaria dextra) mit Blut versorgt wird. Diese münden in ein sehr dichtes, im Interstitium des Herzens gelegenes Kapillarsystem, das für die Sauerstoffversorgung der Herzmuskulatur verantwortlich ist. Das numerische Verhältnis zwischen Kapillaren und Myozyten beträgt 1:1 (Blütmann, Kirkpatrick, Baba, 2004). Des Weiteren sind histologisch im Interstitium afferente und efferente Fasern des vegetativen Nervensystems in

unmittelbarer Nachbarschaft der Kapillaren und der postkapillären Venolen nachweisbar, sowie Fibroblasten, Makrophagen / Histozyten und verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix. Die Herzkammern (rechtes und linkes Atrium, rechter und linker Ventrikel) und die Herzklappen sind mit Endokard überzogen, einer besonders glatten Innenhaut, die aus Endothelzellen und fibroelastischem Gewebe besteht; während das Herz insgesamt sackförmig von Perikard und Epikard (das viszerale Blatt des Perikards) umschlossen ist, jeweils überzogen von Mesothelzellen. Zwischen Vorhof und Kammern liegen die Segelklappen (links die zweizipflige Mitralklappe, rechts die dreizipflige Trikuspidalklappe) und an den Ausflussbahnen je eine Taschenklappe (links die Aorten- und rechts die Pulmonalklappe) (Fleischhauer 1994; Blütmann, Kirkpatrick, Baba, 2004).

Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt per definitionem eine Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzarterien dar. Flusslimitierende Koronarstenosen führen zu einem Missverhältnis zwischen dem Sauerstoffbedarf des Myokards, und dem momentan zur Verfügung stehenden Angebot. Der Schweregrad und insbesondere die Dauer der durch dieses Ungleichgewicht hervorgerufenen Ischämie bestimmen die Manifestation in Form von stabiler (belastungsabhängig auftretender) oder instabiler Angina pectoris (sog. Ruheangina), Myokardinfarkt, chronischer Herzinsuffizienz oder plötzlichem Herztod (Mellwig und Schmidt, 2005). Beim Myokardinfarkt kommt es zu einer hochgradigen Stenose bzw. zum Verschluss einer oder mehrerer Koronararterie(n) und infolgedessen zum Absterben von Gewebe, also einer ischämischen Myokardnekrose.

Histopathologisch handelt es sich beim Herzinfarkt um eine Koagulationsnekrose der Herzmuskulatur sprich ein Nekrosetyp in dem es zur Denaturierung zellulärer Proteine kommt, meist infolge einer plötzlichen Ischämie. Im Gegensatz zu einer Kolliquationsnekrose, welche typischerweise in lipidreichen Geweben auftritt in Folge der Wirkung von hydrolytischen Enzymen (Blütmann, Kirkpatrick, Baba, 2004).

Der akute Myokardinfarkt beruht meist auf dem akuten thrombotischen Verschluss eines arteriellen Koronargefäßes nach Ruptur einer atherosklerotischen Plaque. Es gibt jedoch auch weit seltenere Auslöser für ein Infarktgeschehen: Beispiele hierfür sind thromboembolische Koronarverschlüsse aufgrund einer floriden Endokarditis, Koronarobliterationen aufgrund dissezierender Aneurysmen, oder Gefäßverschlüsse

die auf eine Arteriitis oder eine anatomische Variation im Sinne eines abnormalen Abgangs der linken Koronararterie aus dem rechten Sinus aortae zurückzuführen sind. Meist ist der betroffene Infarktbereich im linken Ventrikel lokalisiert. Es handelt sich meist um einen transmuralen Infarkt, der per definitionem alle Wandschichten umfasst, und mit dem akuten Verschluss eines oder mehrerer Koronargefäße einhergeht. Bei einer 80%-igen Stenose kommt es üblicherweise zu einem Innenschichtinfarkt (auch subendokardialer Infarkt). Hier sind die so genannten „letzten Wiesen“, also die von der sauerstoffversorgenden Arterie am weitesten entfernten Zellen mit der längsten Sauerstoffdiffusionsstrecke betroffen, da die Koronararterien funktionell als Endarterien fungieren (Blütmann, Kirkpatrick, Baba, 2004).

Das Herz besitzt in Ruhe einen Energiebedarf von etwa 10% des Umsatzes des gesamten Organismus, obwohl es als Organ nur 0,5% des gesamten Körpergewichts ausmacht. Bei körperlicher Belastung kann sich der Umsatz bis auf das Zehnfache steigern, woraus auf einen aeroben Energieumsatz geschlossen werden kann. Eine weitere physiologische Besonderheit ist die äußerst geringe Ischämietoleranz des Herzmuskelgewebes bei länger andauerndem Sauerstoffmangel.

Bei einer Unterbrechung des kardialen Blutflusses kommt es zum Sistieren des aeroben Stoffwechsels, zur Verminderung des Vorrats an Kreatinphosphat, zur Umstellung auf anaerobe Glykolyse und zum Sistieren der Zufuhr und des Abtransportes von Substanzen und Metaboliten in das bzw. aus dem Herzgewebe heraus. Diese Veränderungen gehen mit Pumpversagen und elektrokardiographischen Veränderungen einher. Wenn der Verbrauch von energiereichen Phosphaten den Nachschub an ATP übersteigt, kommt es zu einer signifikanten Verminderung von ATP im Gewebe. Unter Verbrauch der Kreatinphosphatspeicher kann der ATP-Spiegel nur bis zu 5 min im Normbereich gehalten werden. 80% der ATP-Produktion werden währenddessen durch anaerobe Glykolyse bereitgestellt, welche Glykogen als Substrat benötigt. Der Anstau von ADP, AMP und organischem Phosphat stimuliert die Glykogenolyse und die Glykolyse, die aufgrund der ungünstigen Relation von anaerober ATP-Bildung und aktuellem myokardialen Energiebedarf den weiteren Abfall des ATP-Spiegels zwar verlangsamt, aber nicht aufhalten kann.

Sowohl der Anstau von NADH in der Atmungskette, als auch die starke Protonenkonzentrationserhöhung vermindern zunehmend den glykolytischen Fluss. Die Stagnation des Zitratzyklus und der Betaoxidation verursacht eine Anhäufung langkettiger Fettsäuren, die möglicherweise über detergentienartige Lysoverbindungen Membranschäden bedingen. Durch die Anhäufung von Laktat aus der anaeroben Glykolyse kommt es zur osmotischen Schwellung der Zelle und ihrer Organellen.

Durch den Anstieg der Laktatkonzentration kommt es des Weiteren zum pH-Abfall im Myokardgewebe und deshalb zur Azidose, welche den anaeroben Metabolismus zusätzlich inhibiert. Während dieses Prozesses kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Kalzium-Konzentration durch das Versagen verschiedener Membranpumpensysteme (darunter die sarkoplasmatische Ca-Pumpe und die Na-/K-ATPase mit Rückwirkung auf den Na-/Ca-Austauscher der Zellmembran) (Jennings et al., 1991; Kobayashi und Neely, 1979; Hierholzer und Schmidt, 1991).

Außerdem sinkt mit der Unterbrechung des koronaren Blutflusses die kontraktile Tätigkeit der ischämischen Region. Diese kann den intraventrikulären Druck, der durch die Kontraktion der normal durchbluteten Areale aufgebaut wird, nicht bewältigen, sodass es in dieser Region während der Systole zur Auswölbung des Myokards kommt. Die Sarkomere werden somit während der Systole stark überstreckt und beschädigt.

Die kontraktile Dysfunktion wird durch die Erschöpfung des ATP-Vorrats und durch den abnormalen Kalziumgehalt der in den Zellen herrscht, verursacht. Der verminderte Eintritt von Kalzium zu Anfang der Ischämie scheint für einige abnorme Veränderungen des Aktionspotentials und folglich für das Auftreten von Arrhythmien verantwortlich zu sein (Crozatier et al., 1977; Lee et al., 1967; Fabiato, 1983).

Makroskopisch zeigt sich beim Menschen nach 6 bis 12 Stunden im Infarktbereich eine Erblässung wegen verminderter Blutfüllung und Myoglobinschwund, zudem eine Schwellung und ein Ödem. Wenn die Koagulationsnekrose deutlich ausgebildet ist, erscheint das Gewebe innerhalb der ersten 3 Tage lehmfarben und trübe, außerdem wird die Konsistenz fester. Anschließend bildet sich, durch das Einwandern und den Zerfall von neutrophilen Granulozyten ein schmaler gelber Randsaum aus. Dem folgt ein rötlicher Saum durch die Ausbildung eines Granulationsgewebes und von blutgefüllten Kapillaren. Im Laufe der Zeit wird dann die gesamte Nekrose vom

Granulationsgewebe durchsetzt. Im Rahmen der Umbildung in Narbengewebe erscheint das geschädigte Gebiet immer mehr grauweißlich, und die Konsistenz wird noch fester (Sunni et al., 1984; Sepulchre und Fechner, 1992; Staemmler, 1955; Gould, 1968; Doerr et al., 2000).

Elektronenmikroskopisch kann man innerhalb der ersten 10 Minuten bereits erste Veränderungen beobachten: Durch die intrazelluläre Ionenverschiebung kommt es zum vermehrten Wassereinstrom in die Zelle, was eine Schwellung verursacht. Nach und nach schwellen auch die einzelnen Zellorganellen wie z. B. Mitochondrien an und es kommt zu einer Dilatation des sarkoplasmatischen Retikulums. Nach 30 Minuten kommt es zu irreversiblen Veränderungen der Herzmuskelzellen. Diese erkennt man an folgenden Merkmalen: Das Sarkolemm zeigt eine deutliche Fragmentierung, und im Zellkern sind deutliche Pyknosen (Pyknose bedeutet die Schrumpfung des Zellkerns und Verdichtung des Chromatins zu einer einheitlichen Masse) zu sehen. Außerdem sind Defekte in der Kernmembran zu finden. Die Mitochondrien verdichten sich zu „dense bodies“, und es kommt zu einer deutlichen Cristolyse (Auflösung und Verschwinden der Cristae der Mitochondrien). Auch dort zeigen sich Membrandefekte. Die Sarkomere der Myofibrillen erscheinen deutlich gedehnt, und die Z-Streifen, wie auch die Basalmembranen weisen ausgeprägte Defekte auf (Blütmann, Kirkpatrick, Baba, 2004; Jennings et al., 1978; Jennings und Reimer, 1981; Scharper, 1990).

Mittels der Hämatotoxylin-Eosin(HE)-Färbung und der Elastica van Giesson(EvG)-Färbung kann man lichtmikroskopisch erste histologisch nachweisbare Veränderungen 4 bis 6 Stunden nach dem Infarkt erkennen. Die nekrotischen Herzmuskelfasern verlieren ihre Querstreifung. Sie sind verschmälert und weisen eine verstärkte Eosinophilie als Ausdruck der beginnenden Koagulationsnekrose, sowie einen feingewellten Verlauf auf. Die Hyperkontraktionsbänder der Myofibrillen sowie das „myocytic waving“ (gewellte Muskelfasern) sind ein Zeichen der Myozytenschädigung. Nach 6 bis 24 Stunden weist das Interstitium eine Hyperämie der Kapillaren und ein eiweißarmes Ödem auf. Diese sind der morphologische Ausdruck einer beginnenden entzündlichen Reaktion. Die infarzierten Herzmuskelfasern sind nach 2-3 Tagen eosinrot gefärbt, während die Kerne in der

HE Färbung nicht mehr anfärbbar sind. Außerdem weist das Interstitium ein granulozytäres Exsudat auf, das von der perinekrotischen Zone aus einwandert.

In den folgenden Tagen nimmt die entzündliche Reaktion weiter zu, und die nekrotischen Herzmuskelfasern werden von Makrophagen und polymorphkernigen Granulozyten nach und nach abgebaut. Im Infarktgebiet herrschen nunmehr Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Plasmazellen vor und aus dem interstitiellen Gewebe am Rande sprießen immer mehr Kapillargefäße in die Nekrosezone ein.

Um den 14. Tag herum ist die Nekrose vollständig resorbiert und durch ein fibrovaskuläres narbiges Granulationsgewebe ersetzt, und die Fibroblasten synthetisieren zunehmend Kollagenfasern, bis nach ca. 6 Wochen die Nekrose vollständig mit kollagenem Bindegewebe durchsetzt ist (Riede, 1998; Blütmann, Kirkpatrick, Baba, 2004).

Mechanismen des ischämischen Zellschadens

Während einer Ischämie kommt es im Gewebe zum Zellschaden und Zelluntergang. Es gibt zwei Wege, die zum Zelluntergang führen können: die Nekrose und die Apoptose.

Das Auftreten der Nekrose ist die Folge schwerer Abweichungen von physiologischen Bedingungen wie Hypoxie und Ischämie, starke Veränderungen der Umgebungstemperatur, oder Veränderungen der Zellmembranpermeabilität durch Toxine. Nekrosen werden somit immer durch starke äußere Noxen ausgelöst, niemals durch intrinsische Faktoren der Zelle selbst, und sind somit immer ein pathologischer Prozess. Nekrose wird auch Onkose genannt. „Onkos“ kommt aus dem Griechischen und bedeutet Schwellung wegen der Zytoplasma- oder Kernschwellung, die während dieses Vorgangs vorkommen.

Die beschriebene Schwellung wird durch einen ATP-Mangel verursacht. Dadurch kommt es zu einem Funktionsverlust der Ionenpumpen, die wiederum zu einer vermehrten Membranpermeabilität führt. Es kommt zu einer blasenartigen Veränderung der Plasmamembran und schließlich zur Ruptur. Die Zellorganelle werden zerstört, und es kommt zum Austritt lysosomaler Enzyme.

Dies führt zu einer starken Involvierung der Nachbarzellen und zu einer Aktivierung des Immunsystems mit Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und

Makrophagen in das geschädigte Gewebe (Zatloukal K, RothJ und Denk H, 2004; Jennings et al., 1975; Kam und Ferch, 2000).

Einige Autoren, wie erstmals Majno und Joris 1995 und später auch Takemura, die ausschließlich von Apoptose und Onkose sprechen und den finalen Schritt im Zelluntergang der von apoptotischen und onkotischen Zellen durchlaufen wird als Nekrose bezeichnen (Majno und Joris, 1995; Takemura und Fujimara, 2006; Kam und Ferch, 2000). In dieser Arbeit wird der Begriff Onkose mit dem Begriff Nekrose gleichgestellt.

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, wurde erstmals von Kerr und Kollegen in den 70er Jahre beschrieben.

Der Begriff Apoptose kommt aus dem Griechischen und bedeutet „Abtropfen“ oder „Abfallen“, wie verwelkte Blätter im Herbst von den Bäumen abfallen. Sie ist ein physiologischer Vorgang in der fetalen Entwicklung oder im Rahmen des Involutionprozesses. Hierbei kommt es zum Zellersatz im adulten Gewebe (wie zum Beispiel im Thymus). Außerdem spielt sie bei einer Vielzahl von pathologischen Situationen eine zentrale Rolle, wie bei der Elimination infizierter Zellen, bei Autoimmunerkrankungen, degenerativen Erkrankungen, ischämischer Gewebsschädigung und insbesondere bei der Krebsentstehung (die Hemmung der Apoptose führt zu einer Zunahme der Zellzahl) (Zatloukal K, RothJ und Denk H, 2004; Kerr et al., 1972; Kam und Ferch, 2000).

Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose eine streng regulierte Serie an energieabhängigen molekularen und biochemischen Reaktionen, die genetisch kontrolliert werden.

Eine Zelle, die apoptotisch wird unterscheidet sich von einer nekrotischen Zelle in vielerlei Hinsicht: Die Zelle schrumpft und löst sich von den benachbarten Zellen. Das Chromatin, das im Zellkern kondensiert, wird in Vesikel verpackt und durch Exozytose aus der Zelle transportiert und von den umgebenden Zellen phagozytiert. Die Zellmembran bleibt anfangs erhalten und geht erst ganz am Ende des Vorgangs zugrunde. Außerdem findet die Apoptose, im Unterschied zur Nekrose, ohne Entzündungsreaktion statt. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose zusammengefasst:

Apoptose	Nekrose
Physiologisch oder pathologisch	Immer pathologisch
Asynchronischer Prozess einzelner Zellen	Erfolgt synchron mit vielen Zellen
Genetisch reguliert	Verursacht durch starke äußere Noxen
Später Verlust der Membranfunktion	Früher Verlust der Membranfunktion
Zellschrumpfung	Generalisierte Zell- und Zellkernschwellung
Kondensation des Zellkerninhaltes	Chromatinzerstörung
Keine Entzündungsreaktion	Entzündungsreaktion

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose (Kam und Ferch, 2000)

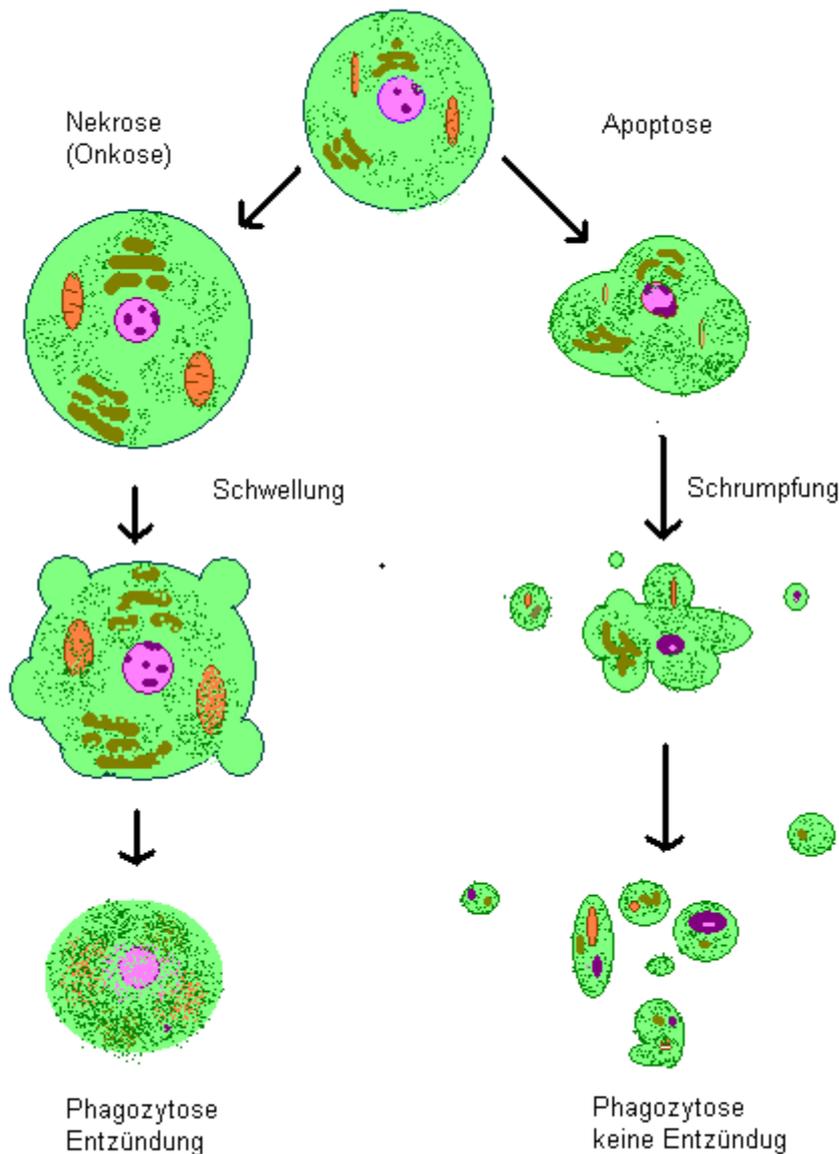


Abbildung 1: Schematische Abbildung von Apoptose und Nekrose (Onkose) (modifiziert nach Elsässer et al., 2000)

Die zwei am meisten verbreiteten Methoden zum Nachweis von Apoptose sind zum einen die histochemische Darstellung der nukleären DNA-Fragmente mittels der „terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling“ (TUNEL)-Färbung und zum anderen der Nachweis der charakteristischen „Leiter“ von kleinen DNA-Fragmenten (von ca. 180 Basenpaaren) mittels der Agarose-Gel-Elektrophorese. Apoptotische Zellen können außerdem anhand ihres charakteristischen morphologischen Erscheinungsbildes in der Elektronenmikroskopie erkannt werden, bei der die Membranintegrität gut beobachtet

werden kann (Collucci, 1996; Takemura und Fujiwara, 2006), oder durchflusszytometrisch durch die Bindung von Annexin V bestimmt werden.

Die biochemischen und molekularen Vorgänge werden in drei Schritte unterteilt: Die „Induktions-“, „Entscheidungs- (Determinations)“ und die „Exekutions-Phase“.

Die „Apoptoseinduktion“ wird durch diverse Stimuli eingeleitet: Hierzu gehören Liganden, die an den Fas- Rezeptor oder an den TNF-Rezeptor binden, sowie Strahlung, Chemikalien, Hitze und der Mangel an Wachstumsfaktoren oder Hormonen. Die erste Gruppe dieser Stimuli verursacht DNA Schädigungen und beinhaltet u. a. ionisierende Strahlung und alkylierende Medikamente. Die zweite Gruppe induziert Apoptose mittels Rezeptormechanismen. Entweder erfolgt die Rezeptoraktivierung über Glukokortikoide (die auf den Thymus wirken), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) oder über den Entzug von Wachstumsfaktoren (Nerve Growth Factor, Interleukin (IL)-3) (Rudin und Thompson, 1997; MacLellan und Schneider, 1997). Die dritte Gruppe beinhaltet biochemische Agenzien, welche die nachgeschalteten Komponenten der Apoptose-Kaskade verstärken. Phosphatasen und Kinase-Inhibitoren (wie z.B. Calphostin C, Staurosporine) sind Teil dieser Gruppe. Die vierte Gruppe enthält Agenzien, die direkt die Zellmembran beschädigen wie zum Beispiel Hitze, ultraviolettes Licht und oxydierende Agenzien (Wasserstoffperoxid). Tabelle 2 zeigt die vier Hauptgruppen von apoptoseaktivierenden Stimuli (Haimovitz-Friedman et al., 1994; Kam und Ferch, 2000).

DNA Schaden	Ionisierende Strahlung Chemotherapie (z.B. Alkylantien)
Aktivierung der Todesrezeptoren	Bindung an die Todesrezeptoren (z.B. Fas Rezeptor und TNF-Rezeptor) Entzug von Wachstumsfaktoren (z.B. IL-3, nerve growth factor)
Stimulation der Apoptose	Phosphatasen, Kinaseinhibitoren
Direkte Zellschädigung	Hitze, ultraviolettes Licht, sauerstofffreie Radikale, Wasserstoffperoxid

Tabelle 2: Apoptose aktivierende Stimuli

In der „Entscheidungsphase“ erreichen die Signale der Induktionsphase den Kern. Dort kommt es zu einer Expression von Protoonkogenen, wie unter anderem c-myc, c-fos und bcl-2, und zur verminderten Expression von Suppressorgenen, wie zum Beispiel p53. Diese fördern oder supprimieren die Expression oder Aktivierung von pro-apoptischen Mediatoren oder von Mediatoren, welche die Zelle überleben lassen. Die Bcl-2 Gene sind eine Familie von Genen, welche die Apoptose regulieren. Sie befinden sich auf der Mitochondrienmembran und auf dem endoplasmatischen Retikulum und kontrollieren die Kalzium – Kanäle. Proteine wie das Bcl-2 und das Bcl-x_L verhindern die Apoptose, während die Bcl assoziierten x-Proteine wie Bax, Bad, Bak, und Bcl-x_s die Apoptose vorantreiben (Brown, 1996; Vaux et al., 1992; Cleary et al., 1986; Hockenbery et al., 1993; Yang et al., 1997). p53 ist ein nukleäres Phosphoprotein, das an die DNA bindet, als Transkriptions-Faktor wirkt, die Zellproliferation und die DNA-Reparatur kontrolliert. Mutationen von p53 sind in >50% der Karzinome gefunden worden (z.B. Kolon-Karzinom) und mit Therapieresistenz assoziiert (Miyashita und Reed, 1995; Donehower et al., 1992). Das c-myc Gen ist ein Protoonkogen, das die Sequenz des DNA Bindungsproteins entziffert, welches als Transkriptions-Faktor fungiert und in Anwesenheit von p53 die Apoptose induziert. Es konnte zudem gezeigt werden, dass auch der Gehalt an c-myc Protein in vielen Tumoren erhöht ist (Tanuma, 1996; Takemura und Fujiwara, 2006; Roy et al., 1995; Kam und Ferch, 2000).

Während der Exekutions-Phase kommt es letztendlich zur DNA-Fragmentation und den typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose, die im Folgenden beschrieben werden. Im Gegensatz zur Induktionsphase, die durch verschiedene Wege und Stimuli eingeleitet werden kann, verläuft die Exekutionsphase immer in der gleichen Art und Weise (Takemura und Fujiwara, 2006).

Die spezifische Proteolyse wird durch Caspasen durchgeführt. Caspasen sind eine Familie von Cysteinproteasen mit einer Spezifität für Asparaginsäure in einer Polypeptidsequenz. Beim Menschen sind mehr als 10 Caspasen bekannt, die in funktionelle Gruppen unterteilt werden können. Caspasen bewirken die Apoptose und vorher ihre Einleitung (Thornberry und Lazebnik, 1998; Reed, 2000; Enari et al., 1998). Sie ähneln einander in der Aminosäuresequenz, der Struktur und der Substratspezifität (Nicholson und Thornberry, 1997), und werden alle als Proenzyme exprimiert, die drei Domänen besitzen: eine NH₂-Domäne, eine große (~20kD) und

eine kleine (~10kD) Domäne. Die Aktivierung beinhaltet eine proteolytische Prozessierung zwischen den Domänen, gefolgt von der Verbindung der kleinen und der großen Untereinheit zu einem Heterodimer. Zwei Heterodimere formen ein Tetramer mit katalytischen Domänen, die unabhängig voneinander arbeiten.

Die Spaltung von Proteinen durch Caspasen ist nicht nur sehr spezifisch sondern auch höchst effizient. Die strikte Spezifität zeigt, dass in diesem Prozess nicht wahllos Proteine verdaut werden, sondern nur ausgewählte Proteine koordiniert gespalten werden. Meist erfolgt diese Spaltung nur auf einer Seite, die mit einem Verlust oder einer Veränderung ihrer Funktion einhergeht (Walker et al., 1994; Wilson et al., 1994; Rotonda et al., 1996; Thornberry et al., 1997).

Eine weitere Aufgabe der Caspasen besteht in der Inaktivierung von Proteinen, welche die Zelle vor der Apoptose schützen. Ein Beispiel ist die Spaltung von ICAD/DFF45, ein Inhibitor derjenigen Nuklease, die für die DNA-Fragmentation verantwortlich ist (CAD). CAD (caspase activated deoxyribonuclease) ist in nichtapoptotischen Zellen als inaktiver Komplex mit ICAD vorhanden. Während der Apoptose wird ICAD von den Caspasen inaktiviert. CAD kann somit als Nuklease frei funktionieren. Doch das System ist komplizierter als es scheint, da die CAD, die in Abwesenheit von ICAD synthetisiert wird, nicht aktiv ist. Das setzt voraus, dass der CAD-ICAD-Komplex co-translational gebildet wird und das ICAD für die Aktivierung und die Inaktivierung der Nuklease verantwortlich ist (Enari et al., 1998; Liu et al., 1997).

Bcl-2 Proteine sind weitere negative Regulatoren der Apoptose, die von Caspasen gespalten werden. Diese Spaltung führt jedoch nicht nur zur Inaktivierung dieser Proteine. Es werden außerdem Fragmente produziert, welche die Apoptose weiter vorantreiben. Zudem zerlegen die Caspasen auf direktem Wege Zellstrukturen, wie die Kernlamina, eine rigide Struktur, die der Zellkernmembran unterliegt und die an der Chromatinkondensation beteiligt ist. Die Kernlamina besteht aus intermediären Filamentproteinen, die Laminine genannt werden. Während der Apoptose werden die Laminine von den Caspasen nur auf einer Seite gespalten, sodass die Kernlamina kollabiert. Dadurch kommt es zur Chromatinkondensation (Xue und Horvitz, 1997; Cheng et al., 1997; Adams und Cory, 1998).

Caspasen zerstören Zellstrukturen auf indirekte Art, indem sie Proteine spalten, die das Zytoskelett regulieren, wie zum Beispiel Gelsolin, Focal-Adhesion-Kinase (FAK)

und die p21-aktivierte Kinase 2 (PAK2). Die Spaltung dieser Proteine führt zu einer Dysregulation ihrer Aktivität. Außerdem inaktivieren und deregulieren sie Proteine, die an der DNA-Reparatur, dem Spleißen und der DNA-Replikation beteiligt sind. Obwohl der Zusammenhang dieser Spaltungen noch nicht vollständig verstanden ist, wird vermutet, dass die zusätzliche Störung der Reparatursysteme die zelluläre Demontage fördert.

Zudem unterbrechen Caspasen den Kontakt mit umgebenden Zellen, induzieren die Zelle, die Signale zur Phagozytose anzuzeigen und zerlegen die Zelle in apoptotische Körper (Kothakota et al., 1997; Wen et al., 1997; Rudel und Bokoch, 1997; Rheaume et al., 1997; Cryns et al., 1997).

Die Regulation der Caspasen erfolgt auf folgende Art und Weise: Ein pro-apoptotisches Signal aktiviert die Initiatorcaspase, welche ihrerseits die Effektorcaspase aktiviert, wodurch es dann zum Abbau der Zelle kommt. Verschiedene Initiatorcaspasen vermitteln verschiedene Signale (Ashikenazi und Dixit, 1998; Hakem et al., 1998; Kuida et al., 1998).

Es gibt viele Wege um Caspasen zu aktivieren, doch besonders 2 Wege sind bis ins Detail studiert worden: der Todesrezeptorweg und der mitochondriale Weg.

Der Todesrezeptorweg funktioniert über einen Liganden-Rezeptorkomplex (Fas/CD95) in der Plasmamembran. Dieser Weg wird auch der extrinsische Weg genannt. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor stimuliert die Bindung eines Adaptermoleküls im Zytosol. Dieser wiederum rekrutiert und aktiviert die Caspasen.

Beim mitochondrialen Weg (intrinsische Weg) kommt es infolge eines externen Signals zu einer Aktivierung von Proteinen der bcl-2-Familie und der bax-Subfamilie. Dies führt zur Anheftung dieser Proteine an die Mitochondrienmembran, was wiederum zu einer Freisetzung von Cytochrom c führt, welches an das cytosolische Protein Apaf-1 bindet, welches wiederum Caspasen aktiviert (Reed, 1997; Green und Reed, 1998).

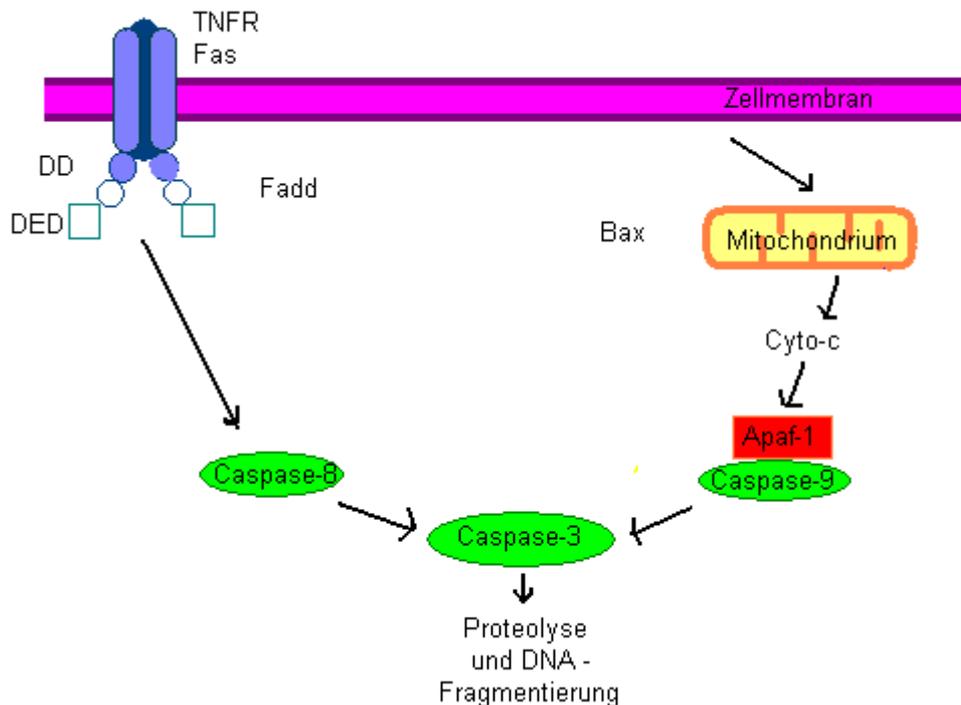


Abbildung 2: Signalkaskade zur Auslösung der Apoptose (modifiziert nach Reed, 2000).

Abbildung 2 zeigt die zwei Hauptmechanismen zur Caspaseaktivierung: Der linke Weg (extrinsischer Weg) kann über Mitglieder der TNF Familie von Zytokin-Rezeptoren wie TNFR1 und Fas induziert werden. Diese Proteine rekrutieren Adapterproteine zu ihren Death Domains (Todesdomänen), einschließlich Fadd, welches die DED (death-effector domain) – beinhaltende Pro-Caspasen bindet. Es handelt sich in diesem Falle vor allem um die Pro-Caspase 8 (Salvesen und Dixit, 1997; Wallach et al., 1999; Yuan, 1997).

Der rechte Weg (intrinsischer Weg) wird über die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium durch diverse Stimuli induziert. Diese Stimuli beinhalten unter anderem eine Erhöhung von Bax aus der pro-apoptotischen Bcl-2-Familie. Im Zytosol bindet Cytochrom c an Apaf-1 und aktiviert es. Im Anschluss bindet und aktiviert Apaf-1 die Pro-Caspase-9.

Die aktivierten Caspase-9 (intrinsisch) und Caspase-8 (extrinsisch) spalten und aktivieren die Effektor-Caspase (Caspase-3) (Kuida et al., 1998; Zou et al., 1997; Saleh et al., 1999; Hale et al., 1996; Reed 2000).

Morphologische Zellveränderungen:

In der Morphologie der Apoptose unterscheidet man wieder drei Phasen:

In der ersten Phase löst sich die Zelle von ihren Nachbarzellen durch den Verlust von Mikrovilli und Desmosomen. Im Zellkern kondensiert das Chromatin und spezielle Endonukleasen spalten die DNA erst in große (50-300 Kilobasenpaare), und anschließend in sehr kleine oligonukleosomale Fragmente, die dann in Vesikel verpackt werden. Das endoplasmatische Retikulum schwillt an, es kommt zur Exozytose von Inhaltsstoffen und die Zelle erscheint dichter, da das Zytoplasma relativ zum Kern an Volumen abnimmt.

In der zweiten Phase bilden die Zellen in einem „budding“ genannten Vorgang Pseudopodien, die Zellorganellen und Zellfragmente enthalten. Die Zellfragmente werden in Vesikel verpackt und als „Apoptosekörper“ von der Zelle abgespalten.

Im Laufe der dritten Phase wird die Zellmembran durchlässig. Anschließend phagozytieren Makrophagen, endotheliale Zellen und vaskuläre Endothelzellen die Apoptosekörper und die Vesikel.

Somit wird die Zelle vollständig entfernt, ohne dass toxische Inhaltsstoffe austreten (Kerr et al., 1972; Kam und Ferch, 2000).

Apoptose in Herzmuskelzellen und bei Myokardinfarkt:

Während der Embryonalentwicklung spielt die Apoptose wie bei allen anderen Organen auch im Herzen eine wichtige Rolle.

Apoptotischer Zelltod in Kardiomyozyten findet vor allem in der Embryogenese statt. Nach der Geburt sind eher die Zellen der Erregungsbildung und -leitung betroffen (Zellen des Sinusknoten, AV-Knoten und His-Bündel). Außerdem hat man herausgefunden, dass wenige Tage nach der Geburt in der rechten Herzhälfte mehr Zellen (Kardiomyozyten) apoptotisch zugrunde gehen als in der linken. Das würde erklären, warum das linke und das rechte Herz vor der Geburt gleich viele Zellen besitzen und später das linke Herz bedeutend mehr als das rechte (James, 1994; Kajustra et al., 1995; Takemura und Fujiwara, 2006)

Apoptose im erwachsenen Herzen kann verschiedene Ursachen haben: schwere Arrhythmien, mechanische Überdehnung, Hypertonie oder auch Ischämie und Myokardinfarkt. Interessanterweise konnten Gottlieb und Kollegen 1994 erstmals beschreiben, dass im Myokardinfarkt nicht nur die Nekrose vorkommt, sondern auch die Apoptose eine wichtige Rolle spielt. In diesem Falle wurde die Apoptose durch

ein Ischämie/Reperusionsmodell an Hasenherzen induziert (Gottlieb et al., 1994). Es folgten viele Studien wie die von Anversa und Kollegen, die dies bestätigen (Anversa et al., 1997). Der zelluläre Mechanismus läuft vermutlich auf folgende Art und Weise ab:

Die Hauptaktivierung läuft über den mitochondrialen Weg ab. Es sind zwei apoptogenetische Faktoren bekannt, der „Apoptosis-inducing factor“ (AIF) und das Cytochrom c. Der AIF, welcher die Caspasen aktiviert, kann auch ohne das Cytochrom c die Apoptose einleiten. Das Cytochrom c selbst kann es nicht, doch das Holocytochrom c, dem eine Hämgruppe fehlt, wird durch beschädigte Mitochondrien freigesetzt. Die Mitochondrien können durch reaktive Sauerstoffspezies oder durch Überladung mit Kalzium beschädigt werden. Das Cytochrom c bindet dann an den „Apoptotic protease-activating factor-1“ (Apaf-1). Da Apaf-1 eine ATP-Bindungsstelle besitzt, wird die Caspase-Kaskade ATP-abhängig aktiviert. Die Caspaseaktivierung über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien wird durch oxidativen Stress im Zytosols oder im Mitochondrium selbst verursacht. Außerdem kann diese durch noch nicht identifizierte Signale, die durch aktivierte sog. Todesrezeptoren an der Plasmamembran wie Fas- und TNF-Rezeptoren aktiviert werden, auch direkt ausgelöst werden. In Anwesenheit von desoxy-ATP aktiviert Apaf-1 die Caspase-9, ein Enzym welches sich weit upstream in der Kaskade befindet. Die Caspase-9 aktiviert die Caspase-3, welche ihrerseits CAD aktiviert, was schlussendlich die DNA-Fragmentation und die Spaltung der Zytoskelettproteine induziert. p53 ist auch an der Caspase-Aktivierung beteiligt. p53 supprimiert die Transkription von bcl-2 und induziert PIGs (p53 induced genes), welche die Aktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies amplifizieren und die Zelle Richtung Apoptose steuern (Yaoita et al., 2000). Scarabelli und Kollegen zeigten 2002, dass die Apoptose in Kardiomyozyten nicht nur durch Caspase-9 mediiert ist, sondern bei Reperfusion auch durch Caspase-8. Man vermutet, dass die Aktivierung über die Bindung von Fas stattfindet. Doch welche Prozesse hierbei genau ablaufen, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt (Scarabelli et al., 2002).

Besonders interessant ist, dass beim Myokardinfarkt die Endothelzellen, sowohl während der Ischämie als auch bei Reperfusion, nur über die Caspase-9 apoptotisch werden. Dies könnte auf eine endogene Produktion von FLIP – einem Caspase-8 Inhibitor – zurückzuführen sein.

Es gibt allerdings neue, widersprüchliche Studien zur Rolle der Apoptose beim Herzinfarkt. 2006 zeigten z. B. Takemuras und Fujiwaras Ergebnisse, dass Kardiomyozyten im Infarktgebiet eher nekrotisch als apoptotisch sind. Somit ist das Ausmaß von Apoptose und Nekrose noch nicht vollständig geklärt (Takemura und Fujiwara, 2006; Freude et al., 2000; Ohno et al., 1998).

Therapie des Myokardinfarktes

Die Akuttherapie des Herzinfarktes besteht aus einer Reperfusionstherapie zur Behebung der ischämischen Ursache und verschiedenen Allgemeinmaßnahmen zur Stabilisierung des Patienten:

Die Reperfusionstherapie sollte bei jedem Patienten innerhalb von 12 Stunden begonnen werden. Die Reperfusionstherapie hat zum Ziel, die behinderte Flusspassage aufzuheben und die Organperfusion wiederherzustellen. Hierfür gibt es im Wesentlichen zwei Möglichkeiten: Zum einen die Thrombolyse bei der mit Hilfe von Fibrinolytika versucht wird, den frischgebildeten Thrombus aufzulösen und somit wieder eine vollständige Durchblutung zu gewährleisten. Zum anderen kann man Patienten auch interventionell mit der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) behandeln, in der mit einem von der Leiste aus intraarteriell vorgeschobener Katheter die verengten Koronararterien dargestellt werden, und anschließend mit einem Ballon dilatiert werden. Dabei kann bei Bedarf ebenfalls ein Stent implantiert werden, eine Therapieform (PTCA+Stent), die auch als PCI (perkutane koronare Intervention) bezeichnet wird. Die PTCA wird heute bevorzugt, da sie als Reperfusionstherapie beim STEMI (Hebungsinfarkt) in 90 Prozent der Fälle die Koronarien wieder eröffnet, während dies nach einer Fibrinolyse nur in jedem zweiten Fall gelingt. Einige Jahre lang waren die PCI und die ältere Thrombolyse konkurrierende Therapieverfahren beim akuten Myokardinfarkt, jedoch ist nach 23 randomisierten kontrollierten Studien mit insgesamt 7.739 Patienten die Frage der Überlegenheit mittlerweile geklärt: Die PTCA führt zu signifikant besseren Ergebnissen (Busk et al., 2008).

Durch die Katheterisierung und die dadurch mögliche Reperfusionstherapie konnte die Letalität des akuten Myokardinfarktes drastisch gesenkt werden. Doch die Morbidität, die mit Herzversagen assoziiert ist, nimmt allmählich zu. Interessanterweise erhöht die lebensrettende Angiographie und PTCA die Ischämie/Reperfusions-Verletzung des Myokards und die Apoptoserate im

betroffenen Gebiet, was unter Umständen zum Herzversagen führen kann (Busk et al., 2008; Stone und Gersh, 2006; Mellwig K.-P. und Schmidt H. K., 2005).

Die Allgemeinmaßnahmen sehen für Patienten eine medikamentöse Therapie, engmaschige Überwachung des Kreislaufs auf einer Intensivstation mit Reanimationsbereitschaft, Bettruhe und psychische Abschirmung vor. All diese Maßnahmen zielen darauf ab, die erforderliche Herzarbeit zu reduzieren und damit das Herz zu entlasten, die Komplikationsrate und die Letalität zu senken, dem Patienten Schmerzen und Angst zu nehmen, und bereits das Remodeling und die Infarktgröße positiv zu beeinflussen. Die medikamentöse Therapie besteht aus Sauerstoff, Nitraten, Heparin, Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, β -Blockern, Morphin, Statinen und ACE-Hemmer (Genoni et al., 2000 (ISIS-2-Studie); Fox et al., 2004 (CURE-Studie); Buller et al., 2003 (MIRACL-Studie); Mellwig K.-P. und Schmidt H. K., 2005).

Da trotz hochentwickelter Therapiestrategien noch immer relativ viele Todesfälle und Langzeitfolgen nach Herzinfarkt zu verzeichnen sind, bedarf es weiterer Optimierung aktueller Therapien, aber auch der Erforschung und Etablierung neuer Therapieansätze. Einige davon sind noch in experimenteller oder zum Teil bereits in klinischer Erprobung: Insbesondere zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang einerseits die Zelltherapie, andererseits die Therapie mit Wachstumsfaktoren. Diese Therapieansätze werden im Folgenden detailliert beschrieben.

Stammzellen

Stammzellen sind nicht ausdifferenzierte Körperzellen, die charakteristische Fähigkeiten besitzen. Diese sind die Fähigkeit zur Proliferation, zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in spezialisiertes und regenerierendes Gewebe. Man unterscheidet zwei Hauptgruppen von Stammzellen: embryonale und adulte Stammzellen.

Embryonale Stammzellen werden 4 bis 5 Tage nach Fertilisation aus dem 50 – 150 Zellen großen Embryo isoliert. Sie sind pluripotent, was bedeutet dass sie sich in alle Zelltypen differenzieren können.

Im Gegensatz hierzu sind adulte Stammzellen meistens bereits in den verschiedenen Geweben des Körpers lokalisiert („gewebeständige Stammzellen“), wo sie unter anderem als quasi unerschöpfliches Reservoir für beschädigte und alternde Zellen

dienen. Unter physiologischen Bedingungen sind sie multipotent, was bedeutet, dass ihr Potential zur Differenzierung geringer ist, und sie sich nur noch in Zellen ihres jeweiligen Keimblattes differenzieren können. Verglichen mit adulten Stammzellen haben embryonale Stammzellen ein deutlich höheres Differenzierungspotential, doch sind sie offenbar deutlich schwieriger zu kontrollieren, was zu einer nicht zu vernachlässigenden Entartungstendenz führt. Sie können Tumore bilden, die alle Arten von Gewebe enthalten wie z. B. das Teratom. Der therapeutische Einsatz von embryonalen Stammzellen wird noch zusätzlich durch die Tatsache erschwert, dass die Erforschung und die therapeutische Verwendung dieser Zellen mit ethischen Kontroversen behaftet ist. Aus diesem Grund werden im Folgenden nur adulte Stammzellen behandelt (Tuch, 2006; Burt et al., 2008).

Endotheliale Progenitorzellen

Das periphere Blut enthält eine kleine Population von endothelialen Progenitorzellen (EPC), welche in der Lage sind durch Vaskulogenese (in situ Differenzierung von Stammzellen in endotheliale Zellen - ECs) und Angiogenese (Proliferation der ECs) neue Gefäße zu bilden und bestehende Gefäßnetze auszubauen.

1997 konnten Asahara und Kollegen nachweisen, dass Zellen aus dem Knochenmark therapeutische Angiogenese in ischämischem Gewebe induzieren können (Asahara et al., 1997). Später konnte gezeigt werden, dass diese endothelialen Vorläuferzellen interessanterweise nicht nur im Knochenmark enthalten sind, sondern auch im Nabelschnurblut. Dort sind sie in der Lage, im Falle einer Ischämie den Blutfluss zu erhöhen (Murohara et al., 2000). Phänotypisch und im Bezug auf funktionelle Eigenschaften ähneln Progenitorzellen fetalen Hämangioblasten. Im Embryo sind sie im Bereich der Aorta für die Blut- und Endothelbildung zuständig (Jaffredo et al., 1998).

Zwei Jahre später haben Asahara und Kollegen in einem Mausmodell beobachtet, dass sich EPCs aus dem Knochenmark beim Myokardinfarkt in das Endothelium kleiner Gefäße in der Randzone des Infarktgebietes integrieren. In einem athymischen Ratten-Infarktmodell wurden humane Progenitorzellen injiziert, die von Spendern kamen, die mit G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) vorbehandelt wurden. Die behandelten Tiere zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant gesteigerte Angiogenese in der Perinfarktzone und im Randgebiet des Infarktes. Die Apoptose von Myozyten der Perinfarktzone zeigte sich deutlich

vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies führte zudem zu einer verbesserten ventrikulären Funktion und einer verminderten Narbenbildung (Asahara et al., 1999).

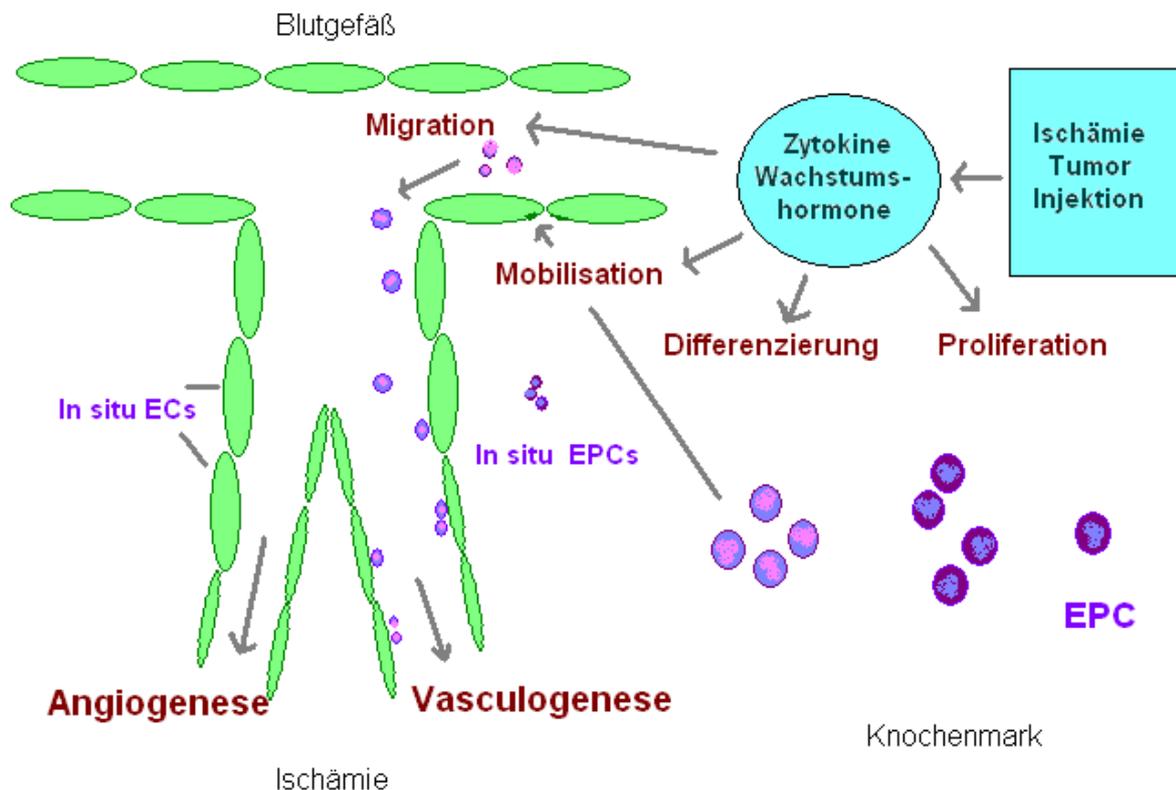


Abbildung 3: Postnatale Neovascularisation bei pathologischen Stimuli. Es kommt zur Kapillarbildung durch Angiogenese und Vasculogenese (modifiziert nach Iwami et al., 2004).

Early und late EPCs

2003 wurden bei der Zellkultivierung von humanem Peripherblut 2 Arten von Zellen beschrieben, die nach ihrem zeitlichen Auftreten als „Early und late EPCs“ bezeichnet wurden. Interessanterweise ähnelten early EPCs denjenigen Zellen, die von Asahara beschrieben wurden (Gulati et al., 2003).

Early EPCs haben eine spindelförmige Gestalt, besitzen eine kurze Lebensdauer und ein geringes Proliferationspotential, sind aber in der Lage Wachstumsfaktoren zu produzieren. Hierbei handelt es sich in erster Linie um VEGF und IL-8, Zytokine, die proangiogenetisch wirken und die endotheliale Proliferation, Tubulusbildung und Migration erhöhen. Bei intravenöser Injektion im Mausmodell wanderten diese Zellen in ischämisches Gewebe ein und wurden dort integriert. Außerdem waren sie in der Lage, die endogene Angiogenese zu stimulieren. Early EPCs werden zu den mononukleären Zellen gezählt (Hur et al., 2004). Yoon und Kollegen zeigten, dass

sie eine heterogene Zellpopulation sind, die sowohl CD14+ als auch CD14- Zellen enthält. Aus den CD14- Zellen können sich die late EPCs entwickeln. Außerdem konnten sie zeigen, dass diese Heterogenität auch in vivo nachweisbar ist. Late EPCs dagegen sind eine homogene Zellgruppe mit einer kopfsteinpflasterartigen Anordnung, die endotheliale Marker exprimieren und eine deutlich bessere Kapazität zur Proliferation sowie eine höhere Lebensdauer besitzen (Yoon et al., 2005). Hur und Kollegen konnten beweisen, dass early und late EPCs CD45, Flt-1, eNOS, vWF und CD31 exprimieren. Außerdem werden VE-Cadherin und KDR bei late EPCs stabil, bei early EPCs hingegen nur transient exprimiert (Hur et al., 2004).

Interessanterweise zeigten die late EPCs auf Matrigel mehr Potential zur (Neo-)Angiogeneseinduktion, was nach in vivo Applikation der Zellen in ischämischem Gewebe gezeigt werden konnte. Die Zellen integrierten sich in diesem Experiment in die neuen Gefäße. In diesem Ischämiemodell zeigten allerdings beide Zellgruppen eine deutliche Verbesserung der Angiogenese, was Hur et al. auf die schon oben genannte Zytokinproduktion durch early EPCs zurückführten (Hur et al., 2004). Wie bereits oben beschrieben sezernieren early EPCs große Mengen an IL-8 und VEGF. Interessanterweise exprimieren jedoch beide Zelltypen (early und late EPCs) die Rezeptoren für diese Zytokine. Somit fördern early EPCs auf parakrinem Wege die Proliferation, die Migration und die Fähigkeit zur Tubulusformierung von Endothelzellen. Yoon und Kollegen injizierten im ischämischen Muskel-Modell ein Gemisch von early und late EPCs, und konnten sich im Vergleich zur alleinigen Injektion von early oder late EPCs eine Erhöhung der Perfusion sogar bei Injektion gleicher Zellzahl zeigen. Histologisch zeigte sich außerdem im Muskel eine höhere Kapillardichte in der Gruppe, die das Gemisch von early und late EPCs injiziert bekommen hat, im Vergleich zu den anderen beiden oben genannten Gruppen sowie der Kontrolle. Die Proliferation der Zellen im ischämischen Gewebe bei simultaner Injektion beider Zellgruppen war ebenfalls erhöht im Vergleich zu den anderen Gruppen. Um den in vivo Effekt zu untersuchen, injizierten die Autoren außerdem beide Zellen in subkutanen Matrigelplugs. Die gemischte Zellgruppe sezernierte große Mengen an MMP-2, MMP-9, und VEGF, zusätzlich zeigte die gemischte Gruppe aus early und late EPCs eine deutlich schnellere Proliferation und erhöhte Migration im Gegensatz zu allen anderen Versuchsgruppen. In den Matrigelplugs konnte eine im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erhöhte Kapillardichte nachgewiesen werden, woraus Yoon und Kollegen schlossen, dass early und late

EPCs synergistisch handeln um die Neovascularisation im Ischämischen Gewebe zu fördern(Yoon et al., 2005; Rehman et al., 2003; Hur et al., 2004).

Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind pluripotente Stammzellen, die das Potenzial haben, sich in verschiedene Gewebe, wie Knorpel, Knochen, Fett, quergestreifte Muskulatur sowie Herzmuskel zu differenzieren (Makino et al., 1999). Sie sind im Knochenmark und im peripheren Blut zu finden und werden von der International Society of Cellular Therapy folgendermaßen definiert (Dominici et al., 2006):

- Die Zellen werden in Zellkultur auf Plastik adhärent
- Sie exprimieren CD 105, CD 73 und CD 90
- Sie exprimieren keine hämatopoetischen Markern wie CD 45, CD34, CD14, CD11b, CD19, CD79a und HLA DR
- Sie besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten

Ein Vorteil dieser Zellen besteht in der herabgesetzten Immunogenität der MSCs im Vergleich zu anderen Stammzelllinien, die eine Therapie mit allogenen Zellmaterial erleichtert.

Bei autologer Implantation in einem porcinen Myokardinfarkt-Modell konnte gezeigt werden, dass MSCs zu Kardiomyozyten differenzieren konnten. Die Ventrikelwandverschmälerung fiel geringer aus, und es kam zu einer Reduktion des ventrikulären Remodelings sowie zu einer Verbesserung der Herzfunktion (Toma et al., 2002; Shake et al., 2002).

Min und Kollegen berichteten von einer Verbesserung der Herzfunktion und der Perfusion bei Co-Transplantation von MSCs mit fetalen Kardiomyozyten (Min et al., 2002). Die Injektion von mesenchymalen Stammzellen in das infarzierte Myokard im porcinen Infarktmodell induziert die Überexpression von kardialem Tenascin und eine Sprossung des sympathischen Leitungssystems, was interessanterweise zu einer sympathischen Hyperinnervation des Myokards führte. Die Tenascin-Familie gehört zu den extrazellulären Matrix Proteinen und ist an der neuralen Regeneration, am kardialen und vaskulären Remodeling sowie an der Neointimaproliferation beteiligt. Dieser Mechanismus könnte die Verbesserung der Herzfunktion nach der MSC-

Transplantation erklären (Pak et al., 2003; Wallner et al., 2001). Doch wurde bereits gezeigt, dass die induzierte sympathische Hyperinnervation zu gefährlichen Tachyarrhythmien führen kann (Lai et al., 2000; Joester und Faissner, 2001; Cao et al., 2000).

In den letzten Jahren wurden diverse klinische Studien durchgeführt, in denen Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt zusätzlich zur Standardtherapie auch mit Stammzellen behandelt wurden. Diese Studien sind jedoch oft nur eingeschränkt vergleichbar, da sie sich in vielerlei Hinsicht unterscheiden: angefangen von Art und Menge der Stammzellen, bis hin zu Applikationszeitpunkt, und -ort. Doch im folgenden Text werden drei Studien präsentiert die ähnliche Rahmenbedingungen aufweisen. In der TOPCARE-AMI – Studie (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction) wurden mehrere Studien verglichen in denen die intrakoronare Applikation von BMMCs (Bone Marrow Mononuclear Cells) mit der Applikation von CPCs (circulating progenitor cells) untersucht wurde. Bei beiden Gruppen zeigte sich eine ähnliche Erhöhung der LVEF, sowie koronarer Durchblutung. Der beobachtete klinische Benefit hielt mindestens 12 Monate an (Schächinger et al., 2004; Schächinger et al., 2006): Die REPAIR-AMI-Studie (Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction) zeigte eine Erhöhung der linksventrikulären Funktion bei intrakoronare Transplantation von BMMCs bei infarzierten Patienten nach erfolgreicher PCI (Dill et al., 2009). Die BOOST-Studie (Bone Marrow Transfer to Enhance ST-Elevation Infarct Regeneration), intrakoronare Applikation von BMMCs bei STEMI (ST-Elevation Myocardial Infarction), zeigte am Anfang ebenfalls eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion. Nach 18 Monaten jedoch relativierte sich der klinische Benefit der mit Stammzellen therapierten Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Schaefer et al., 2006). Im Gegensatz zur REPAIR-AMI- Studie und der BOOST-Studie, zeigte eine doppelblind randomisierte Studie von Janssens et al., dass die intrakoronare Verwendung von MNCs 24 Stunden post Infarkt und nach erfolgreicher PTCA nicht zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion führte, wohl aber zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße und einer Erhöhung der regionalen linksventrikulären Funktion (Janssens et al., 2006). Die Verabreichung von speziell isolierten MSCs an Patienten mit Z.n. Myokardinfarkt zeigte ebenfalls eine vielversprechende Erhöhung der linksventrikulären Funktion

(Chen et al. 2006). Klinische Versuche mit EPCs zeigten jeweils Trends zur Erhöhung der linksventrikulären Funktion bei akuter und chronischer Ischämie ohne Nebenwirkungen (Losordo et al., 2007; Erbs et al., 2005; Ge et al., 2006; Bartunek et al., 2005). In der ASTAMI-Studie (Autologous Stem Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction) konnte hingegen kein signifikanter Benefit bei intrakoronarer Applikation von BMMCs gezeigt werden (Beitnes et al., 2009). Abdel-Latif und Kollegen haben versucht, im Rahmen einer Metanalyse sämtliche bisherigen klinischen Studien zusammenzufassen und zu vergleichen, und kamen zum Ergebnis, dass die Transplantation von Stammzellen (insbesondere BMCs – Stammzellen die aus dem Knochenmark stammen) bei akutem Myokardinfarkt und chronisch ischämischer Herzerkrankung die linksventrikuläre Funktion um 5,4% verbessern, und die Infarktgröße um 5,49% reduzieren können. Des Weiteren kommt es zu einer Erniedrigung des endsystolischen Volumens im linken Ventrikel um 4,80ml (Abdel-Latif et al., 2007; Burt et al., 2008). Doch die Mechanismen, die für die Benefits zuständig sind, sowie die Gründe weshalb sie teilweise nicht andauern, bleiben jedoch weiter unklar. Deshalb sind auf diesem Gebiet weitere Studien notwendig um optimale und dauerhafte Ergebnisse zu erhalten.

Wachstumsfaktoren

Zusätzlich zur Stammzelltherapie gibt es weitere experimentelle Studien über die Verwendung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, HGF und IGF1 und 2, da diese Wachstumsfaktoren bekanntermaßen weitere Stimuli zur (Neo-)Angiogenese geben. Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) wirkt an Endothelzellen über verschiedene spezifische VEGF Rezeptoren (VEGFR 1-3). Er ist in der Angiogenese allgegenwärtig und spielt auch eine fundamentale Rolle in der Vaskulogenese (Carmeliet et al., 1996). Als Angiogenese bezeichnet man das Wachstum von Kapillaren, überwiegend durch Sprossung aus einem vorgebildeten Kapillarsystem. Dagegen wird die Neubildung von Blutgefäßen aus den Endothelialen Vorläuferzellen als Vaskulogenese bezeichnet.

Der Hepatocyte growth factor (HGF) besitzt angiogenetische, antiapoptotische, antifibrotische und antiinflammatorische Effekte. Interessanterweise konnte in einem porcinen Infarktmodell eine Verbesserung der kardialen Funktion und Perfusion durch vermehrte Gefäßkollateralbildung nach Gentransfer von HGF gezeigt werden,

was eine wichtige Rolle von HGF im Rahmen der Angiogenese unterstreicht (Jayasankar et al., 2005; Jin et al., 2004; Matsumoto et al., 2001; Wang et al., 2006).

Insulin-like Growth Factor (IGF) 1 und 2 sind einkettige Polypeptide, die aus 70 bzw. 67 Aminosäuren zusammengesetzt sind. Sie sind strukturell und funktionell dem Insulin sehr ähnlich. Während Insulin eher für kurze metabolische Effekte zuständig ist, sind IGF1 und 2 eher für Langzeiteffekte und Wachstum verantwortlich. IGF1 und IGF2 werden in vielen verschiedenen Geweben, wie z. B. in Leber, Herz, Lunge, Nieren, Pankreas, Milz, Kolon, Gehirn und Hypophyse, in unterschiedlichen Konzentrationen synthetisiert (Pavelic et al., 2007).

Das IGF1 Gen ist auf Chromosom 12q22-q24.1 lokalisiert. Das IGF2 Gen dagegen nahe dem Insulingen, auf Chromosom 11p5.5.

IGF1 zirkuliert in relativ hoher Konzentration im Blut. Es wird vorwiegend in der Leber synthetisiert, entfaltet aber (besonders in der postnatalen Entwicklung) eine sehr breite Wirkung auf andere Organe. Die IGF1 Produktion wird durch Wachstumshormone (vor allem STH) und Insulin stark beeinflusst. Diese bewirkt dann durch eine negative Rückkopplung eine Suppression des jeweiligen Hormons. Zusätzlich zu den Hormonen selbst wirken sich bestimmte Entwicklungsfaktoren sowie der Ernährungszustand ebenfalls auf die Produktion aus (Pollak et al., 2004; Pavelic et al., 2007). Im Gegensatz zu IGF1 ist die Synthese von IGF2 jedoch relativ unabhängig von Wachstumshormonen. Die Produktion ist während der fetalen Entwicklung weit höher als nach der Geburt.

IGF2 hat eine regulierende Funktion und wirkt mitogen auf viele verschiedene Zelltypen.

Die Transkription des IGF2-Gens wird durch vier verschiedene Promotoren (P1-P4) reguliert. Die monoallelische Expression dieser Promotoren findet meistens in fötalen und jungen Geweben statt, jedoch reguliert der P1-Promotor vor allem die Expression in adultem Lebergewebe. Er wird im Gegensatz zu den anderen Promotoren auf zwei Allelen exprimiert. Das IGF2-Gen kann auf verschiedene Art und Weise transkribiert werden, sodass verschiedene Protein-Produkte mit unterschiedlichen Molekulargewichten entstehen. Die aktivste Form hinsichtlich der IGF-Rezeptor-Bindung ist 7,5 kDa schwer (Tang et al., 2006; Kiess et al., 1994; Pavelic et al., 2007).

Die biologischen Effekte von IGF1 und 2 werden durch verschiedene Zelloberflächenrezeptoren vermittelt: den IGF1-Rezeptor (IGF-R1) und den IGF2-Rezeptor (IGF-R2) sowie auch durch den Insulin-Rezeptor. IGF1 bindet primär am Typ 1 Rezeptor und hat eine geringere Affinität für den Insulin-Rezeptor. IGF2 besitzt eine hohe Affinität für den Typ-2-Rezeptor und eine geringe für IGF-R1, jedoch keine Affinität für den Insulin-Rezeptor. Interessanterweise wird der biologische Effekt der IGFs meistens über IGF-R1 reguliert. Wie beim Insulin-Rezeptor handelt es sich hierbei um ein Mitglied der Tyrosin-Kinase-Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Die Bindung eines Liganden an diesen Rezeptor initiiert eine Signalkaskade, welche die Zellproliferation, Differenzierung, Migration vermittelt, und anti-apoptotisch wirkt. Der Typ-2-Rezeptor ist ein kationunabhängiger Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und unterscheidet sich somit grundsätzlich vom Typ-1-Rezeptor. Er ist vermutlich für die Entfernung von IGF2 aus dem Kreislauf zuständig und für die Überführung lysosomaler Enzyme in die Lysosomen verantwortlich (Kiess et al., 1994; Kornfeld, 1992).

Im Plasma sind IGF1 und IGF2 an Trägerproteine gekoppelt, welche deswegen IGF-Bindungsproteine (IGF-BP) genannt werden. Bisher konnten sechs solche Bindungsproteine identifiziert werden. Sie verlängern die Halbwertszeiten der IGFs im Körper, doch solange IGF1 und 2 im gebundenen Zustand sind, sind sie biologisch inaktiv (Bell et al., 1985; Clemmons, 2001).

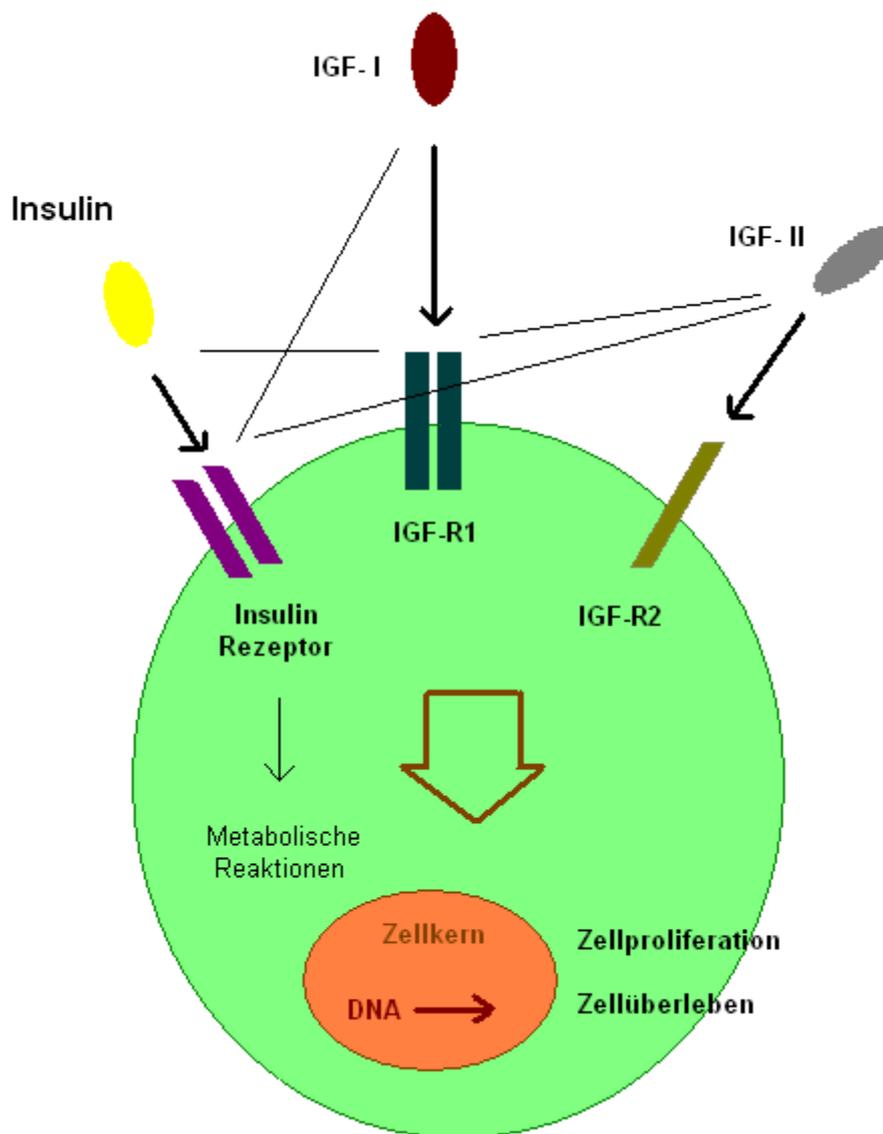


Abbildung 4: Überblick über die Wirkung der Wachstumsfaktoren der Insulinfamilie auf die Zelle (modifiziert nach Pavelic et al, 2007).

Es ist bekannt, dass IGF1 viele, wenn nicht die meisten anabolischen Effekte der Wachstumshormone vermittelt, die des Herzens eingeschlossen (Decker et al., 1995). Bei Wachstumsfaktormangel bewirkt die Therapie mit humanem rekombinantem Wachstumshormon (rhGH) eine Erhöhung des kardialen Outputs und der LVEF. Ein ähnlicher Effekt wurde auch nach Gabe von IGF1 beobachtet. Außerdem wurde gezeigt, dass IGF1 eine direkte Wirkung auf Myokardzellen hat (Duerr et al., 1995).

Die Überexpression von IGF1 und 2 in transgenen Mäusen beeinflusst die Migration der Kardiomyozyten auf positive Art und Weise bei Myokardinfarkt. Es zeigte sich

eine schnellere Myokardverkürzung und eine verbesserte zelluläre Compliance. Außerdem konnte die Apoptose von Kardiomyozyten verhindert werden (Su et al., 2003).

Die exogene Administration von IGF1 verbesserte die kardiale Funktion in Kardiomyopathie, Ischämie und Reperfusion und Herzversagen, sowie bei Zustand nach Myokardinfarkt (Buerke et al., 1995).

Beide IGF-Varianten sind mit myokardialer Angiogenese assoziiert. Die wichtige Rolle von IGF1 bei entzündungs-gekoppelter Angiogenese konnte in einem Versuchsmodell nach Mikroembolisation im Schweineherz gezeigt werden. Zudem begünstigt IGF1 die Neovaskularisation, indem es die Expression des VEGF Gens erhöht. Auch IGF2 kann die Levels an VEGF mRNA erhöhen, was in hepatischen Tumorzellen demonstriert wurde (Akagi et al., 1998).

2001 zeigten Kotylar und Kollegen in einem experimentellen porcinen Mikroembolisationsmodell, dass die exogene Applikation von IGF1 und IGF2 bei akutem Myokardinfarkt die myokardiale Funktion verbessert. Das Troponin I im Serum und die DNA-Fragmentation, ein Marker für den Zelltod, waren infolgedessen erniedrigt, das Aktin in der Infarkt- und in der Randzone erhöht. Zudem waren mehr Kapillaren in der Infarkt- und Randzone nachweisbar als in der Kontrollgruppe (Kotylar et al., 2001).

Die adenovirale Transduktion von Kardiomyozyten mit IGF1 und -2 führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Expression von IGF-Proteinen, was interessanterweise wiederum zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose führte. Durch die Produktion und somit den Anstieg der IGF-Konzentration wird ein nahezu kompletter Schutz vor Ischämie-/Reoxidationsstress erreicht (Su et al., 2003). Außerdem verbesserte die exogene Applikation von IGF2 im infarzierten Schwein die Herzfunktion (Battler et al., 1995; Le Roith, 1997).

Problemstellung

Die bisherigen Standardmaßnahmen beim akutem Myokardinfarkt zielen in erster Linie darauf ab, den resultierenden Ischämieschaden möglichst zu begrenzen. Die neuen Therapiemöglichkeiten könnten imstande sein, den Schaden zu „reparieren“.

Ein wichtiger Mechanismus des myokardialen Zellunterganges ist die Apoptose. Nach intramyokardialer Applikation von humanen expandierten endothelialen Progenitorzellen EPCs im experimentellen Myokardinfarkt soll mittels immunhistochemischen Färbungen die Anzahl apoptotischer Zellen im Verlauf der Therapie mit und ohne IGF2 analysiert werden. Weiterhin soll die Bedeutung von IGF2, das in den EPC nach adenoviralen Gentransfer überexprimiert wird, untersucht werden.

Material und Methoden

Versuchsplan

Um den histologischen Verlauf des Myokardinfarktes und insbesondere der daraus resultierenden Apoptose zu beobachten, wird bei Nacktratten durch eine 30-minütige Ligatur der LAD ein Myokardinfarkt mit nachfolgender Reperfusion induziert (Tag 0).

Die Tiere werden 3 Tage nach Versuchsbeginn beziehungsweise nach 2 Wochen euthanasiert, die Herzen explantiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mittels Hämatoxylin–Eosin (HE)-Färbung, Elastica van Gieson (EvG)-Färbung und schließlich Immunfluoreszenz Troponin I-TUNEL-Färbung untersucht. Humane Endothelzellen wurden mittels hCD31Antikörpern identifiziert.

Mithilfe des gleichen Versuchsaufbaus wird die Wirkung von unterschiedlichen therapeutisch injizierten humanen Stammzelllinien auf die Ausdehnung der Apoptose erforscht.

Es werden in die Herzen (in der Infarkt- und Perinfarktzone) der Versuchstiere nach der LAD Ligatur jeweils entweder mesenchymale Stammzellen, early und late endotheliale Progenitorzellen injiziert. Während die Gruppen mit Zelltherapie jeweils 1 Million Zellen gelöst in 150 µl PBS ohne Zusätze erhalten, werden der Kontrollgruppe 150 µl phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; Cambrex, Walkersville, USA) ohne Zusätze injiziert, und anschließend wird die Wirkung des Wachstumsfaktors IGF2 auf die Apoptose in Kombination mit oder ohne Zelltherapie untersucht. In dieser Versuchsreihe werden zusätzlich Ratten nach 7 Tagen euthanasiert. Es wird entweder nur IGF2 („medium-IGF2“) injiziert oder IGF2 in Kombination mit EPCs („EPC + IGF2“) oder EPCs, die durch einen retroviralen Gentransfer IGF2 überexprimieren („IGF2-Zellen“). Als Kontrolle fungieren EPCs, die mit einem Leervektor transfiziert wurden („LV“). All diese Gruppen werden ebenfalls mittels der oben genannten Färbungen untersucht.

Gruppengröße (n=x) bei early EPCs, late EPCs, der Kontrollgruppe, die nach 3 Tagen geopfert werden, und der LV-und IGF2-Zellengruppe, die nach 7 Tagen euthanasiert werden, ist jeweils n=5 Tiere, in allen anderen Gruppen ist n=3 Tiere.

Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen, 4-5 Wochen alten athymischen RNU-Ratten von Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland), mit einem Körpergewicht von 180-280g durchgeführt.

Die Aufstallung, die Operation und die Organentnahme wurden in den Räumen des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München durchgeführt, und erfolgten gemäß den Tierschutzrichtlinien der Regierung von Oberbayern.

Die histologischen Laboruntersuchungen erfolgten im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München.

Anästhesie

Die RNU-Ratten erhalten eine Narkosemischung aus Midazolam (DORMICUM® 2 mg/kg KG), Medetomidin (DOMITOR® 0,15 mg/kg KG) und Fentanyl (FENTANYL® 0,005 mg/kg KG). Diese wird intramuskulär (i.m.) appliziert und hält ca. 1,5-2 Stunden an.

Unmittelbar nach Applikation der Anästhetika wird die Ratte mit Hilfe eines modifizierten Kinderlaryngoskops mit einer 16GA Venenverweilkanüle (VENFLON PRO, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) intubiert.

Die intubierte Ratte wird dann auf einer durch ein steriles Tuch abgedeckten Wärmeplatte in Rückenlage fixiert. Eine reguläre Atmung wird durch eine volumengesteuerte Beatmungspumpe (Anesthesia Workstation, Voelker GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland) sichergestellt. Die kontrollierte Beatmung erfolgt mit 100% Sauerstoff bei einer Atemfrequenz von 50 bis 60 Atemzüge pro Minute.

Durch eine Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) wird die Cornea vor dem Austrocknen geschützt.

Während der Operation werden Puls und Sauerstoffsättigung durch ein Pulsoxymeter (Nonin 8600V, Plymouth, USA), das an dem Mittelfußknochen der Hintergliedmaße befestigt wird, erfasst. Die Temperatur wird durch eine rektale Sonde gemessen und durch eine unterliegende Wärmeplatte konstant zwischen 36,8° C – 37,3° C gehalten.

Nach der Operation erfolgt die Antagonisierung der Narkose durch die Injektion von Antipamezol („Antisedan“ 0,75 mg/kg KG) und Flumazenil („Anexate“ 0,2 mg/kg KG) subcutan (s.c.).

Zum Zwecke der postoperativen Analgesie für 3 Tage werden innerhalb dieses Zeitraums 2-mal im Abstand von 12 Stunden Buprenorphin (Temgesic® 0,1 mg/kg KG) subcutan (s.c.) und Metamizol (Novalgine®) 2-mal im Abstand von 6 Stunden verabreicht.

Wegen der langsamen Anflutung von Buprenorphin wird die Primärdosis 20 Minuten vor der Antagonisierung der Anästhesie intramuskulär (i.m.) verabreicht.

Operation und intramyokardiale Zelltransplantation

Nach der Anästhesie wird die Ratte auf der rechten Seite gelagert. Die linke Thoraxhälfte wird enthaart und die Haut desinfiziert. Die linke Vordergliedmaße wird

nach kranial verlagert und fixiert, das Operationsfeld mit einem sterilem Lochtuch abgedeckt.

Die Thorakotomie erfolgt erst bei völlig erloschenen Reflexen. Der Hautschnitt ist ca. 1,5 cm lang und erfolgt auf Herzhöhe, einen Finger breit hinter dem kaudalen Rand der Skapula parallel zu den Rippen. Dann werden der M. cutaneus trunci und Anteile des M. latissimus dorsi und des M. ventralis thoracis durchtrennt. Der Thorax wird durch das Durchtrennen der Mm. intercostales zwischen der 3. und 4. Rippe eröffnet. Zugang zum Herzen gewinnt man durch Verwendung eines Rippenspreizers. Mit Hilfe eines feuchten Wattetupfers wird der Lungenanteil über dem Herzen nach dorsal verlagert. Das Perikard wird eröffnet und das Herz aus dem Perikard heraus verlagert.

Der Ramus interventricularis paracoronalis der A. coronaria sinistra wird unterhalb des linken Herzohrlandes umstoßen. Ein doppelter Knoten wird vorgelegt, ein ca. 5 mm langes Fadenstück (Vicryl 6-0) untergeschoben und der Knoten über diesem Fadenstück zugezogen. Die Ischämie zeigt sich durch ein Erblässen und eine spätere Zyanose des Myokards. Die Ischämiezeit beträgt 30 Minuten.

Im Falle des Auftretens von Kammerflimmern oder einer absoluten Arrhythmie wird ein kardialer Schlag mit einem sterilen Wattestäbchen auf die linke Ventrikelwand ausgeübt und 0,1 ml Amiodaron (Cordarex®) auf das Herz geträufelt.

Die Reperfusionphase beginnt mit der Eröffnung der Ligatur, die mit Hilfe eines Mikrodissektors durchtrennt wird. Die ersten 5 Minuten der Reperfusionphase werden direkt am Herzen beobachtet, um bei eventuellem Auftreten von Kammerflimmern und Arrhythmien intervenieren zu können. Die Injektion der Stammzellsuspension mittels einer Insulinspritze (Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) erfolgt in der Infarkt- und in der Periinfarktzone. Es werden jeweils 100 µl Zellsuspension oder 100 µl der Trägersubstanz an 5 Seiten in 1-2 mm Abstand langsam, um eine Perfusion des umliegenden Gewebes zu ermöglichen, injiziert.

Die Thoraxhöhle wird mit NaCl gespült, um Verklebungen zu verhindern. Der Thorax wird durch das Umschlingen der dritten und vierten Rippe mit zwei Einzelklammern, die Muskulatur mit einer fortlaufenden Naht und die Haut mit Einzelklammern verschlossen. Nach der Antagonisierung der Anästhesie wird die Ratte nach Wiedereinsetzen des Schluckreflexes extubiert und auf den Bauch gelegt.

Die Sauerstoffsättigung wird weiterhin überwacht. Im Falle eines Absinkens unter 95% wird die Atemluft mit Sauerstoff angereichert, bis die Ratte eine normale

Sauerstoffsättigung bei Raumluft konstant aufrechterhalten kann. Bis zum vollständigen Erwachen bleibt die Ratte auf der Wärmeplatte.

Die postoperative Versorgung erfolgt wie oben beschrieben.

Euthanasie und Probengewinnung

Nach 3, 7 oder 14 Tagen werden die Ratten durch eine Überdosis eines Anästhetikums (80 - 100 mg/kg KG Pentobarbital, Narcoren®, Rhone-Merieux GmbH, Laupheim, Deutschland) euthanasiert. Das Herz wird entnommen und horizontal halbiert. Der untere Teil mit der Herzspitze wird in 4 %-igem Formalin fixiert, der obere Teil sofort bei - 80°C eingefroren.

Aufarbeitung der Paraffinschnitte

Die formalin-fixierten Herzen werden innerhalb von 24 Stunden in Einbettkapseln (Sakura Finetec, Zoeterwoude, Netherlands) überführt und anschließend über Nacht entwässert.

Die Präparate werden in flüssiges Paraffin (ca. 60°C) eingebettet und auf einer Kühlplatte abgekühlt („TBS 88 Paraffin Embedding System“: Thermal Unit, Cool Unit, Dispenser Unit, Fa.: MEDITE Medizintechnik, Burgdorf, Germany).

Das gesamte Herz wird mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM 335 E, MICROM GmbH, Walldorf, Deutschland) mit einem Abstand von 30µm pro Ebene von proximal nach distal durchgeschnitten. Es werden Schnitte mit einer Schichtdicke von 2 µm angefertigt. Jeweils 2 Schnitte einer Ebene werden auf SUPERFROST Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen, und nach einer Färbung mit Elastica van Giesson und H&E histomorphologischen untersucht.

8 Schnitte werden auf SUPERFROST Plus aufgezogen. Damit die Schnitte bei der immunhistochemischen Behandlung nicht abschwimmen, werden vorher die Objektträger mit einer PRITT®-Kleber-Mischung vorbehandelt (1 Teil PRITT®-Bastelkleber Fa.: HENKEL, Düsseldorf, Deutschland und 2 Teile Poly-L-Lysine-Lösung, Fa: SIGMA DIAGNOSTICS INC., P.O. BOX 14508 St. Luis, USA).

Hämatoxylin – Eosin – Färbung (HE-Färbung)

Die Schnitte werden in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol 3x2 min, Alkohol 100%, 2x 96%, 70% jeweils 25 sec) entwässert, entparaffiniert und anschließend im Wasserbad 25 sec gespült. Danach werden sie 2x 3 min in Hämatoxylin-Mayer

(HTX) eingetaucht. Nach zwei Waschschrinen (2x 2 min) werden die Schnitte anschließend 2 min in Eosin getaucht.

Nach Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 sec in 96%igen Alkohol und 2-mal 25 sec in 100%igen Alkohol) und 2x 1,5 min in Xylol werden die Schnitte mit Pertex (medite; Burgdorf, Deutschland) eingedeckelt und können mikroskopisch betrachtet werden.

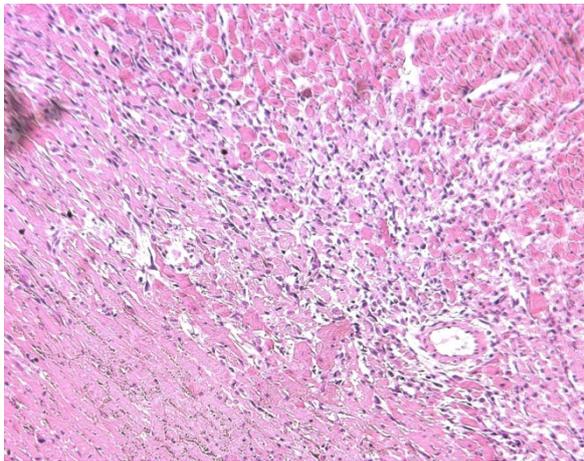


Abbildung 5 (Vergrößerung 10x): Bild aus dem Herzen einer Ratte 3 Tage nach Infarkt. Die Kerne und das basophile Zytoplasma stellen sich blau dar und das Zytoplasma, das Kollagen und die Erythrozyten rot.

HE-Auswertung

Bei der mikroskopischen Auswertung (mit einem Leica DMRB Mikroskop – Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland) der HE-Schnitte wird das Ausmaß des Infarktes beurteilt.

Innerhalb des Infarktes wird die Nekrose, das Zellinfiltrat sowie dessen Zusammensetzung (Entzündungszellen und Fibroblasten) semiquantitativ bewertet. Dies erfolgt auf einer Skala von 0 bis 5. 0 steht für das nicht Vorhandensein des zu Bewertenden Merkmals, und 5 für die maximale Ausprägung.

Elastica-van-Giesson-Färbung (EvG-Färbung)

Die Schnitte werden automatisch entparaffiniert und gefärbt (Tissue Stainer TST40 von medite, Burgdorf, Deutschland).

Sie werden zur Entwässerung und Entparaffinierung in frisches Xylol (3 mal 2 min.) und in einer Alkoholreihe mit absteigender Konzentration (Alkohol 100%, 2x 96%, 70% für jeweils 25 sec) eingetaucht und anschließend in Aqua dest. 25 sec lang gespült. Danach werden sie für 20 min mit Resorcinfuchsin gefärbt. Anschließend

werden sie 2x 1,5 min in 96% Alkohol eingetaucht und 8 min in HTX-Weigert-Lösung gebadet. Auf 5 min Wasserbad und 2 min in Pikrofuchsin folgt eine aufsteigende Alkoholreihe (30 sec in 96% Alkohol und 2x 25 sec in 100% Alkohol) und 2x 1,5 min Xylol. Nach dem Eindeckeln ist die Färbung beendet.

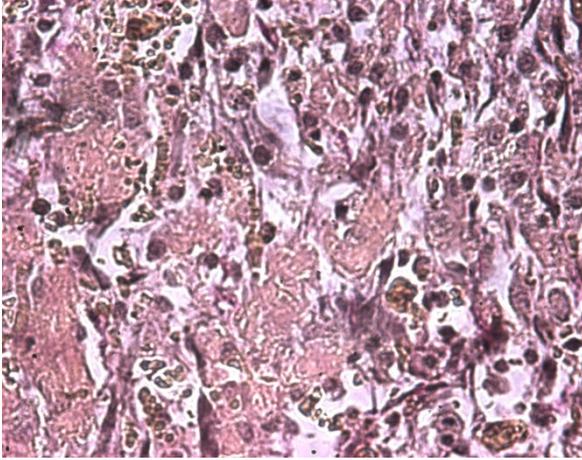


Abbildung 6 (Vergrößerung 40x): Infarkt nach 3 Tagen. Beim Mikroskopieren erscheinen die kollagenen Fasern rot, die Muskulatur gelb und die elastischen Fasern sowie die Zellkerne schwarz.

EvG-Auswertung

Bei der Auswertung wird mittels der schon oben beschriebenen Skala von 0 bis 5, die Ausdehnung der Kollagenfasern im Infarktgebiet und somit der narbige Umbau des Gewebes bewertet.

Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird das Gewebe mit einem Antikörper (Primärantikörper) inkubiert, der das gewünschte Epitop spezifisch erkennt und daran bindet. Nach der Inkubation werden überschüssige Antikörper durch einen Waschschrift eliminiert. Im zweiten Schritt erfolgt eine Inkubation mit einem Sekundär-Antikörper, der spezifisch an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet und mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop kann man diesen Farbstoff mittels (Laser-) Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen und somit indirekt die gesuchten Strukturen darstellen.

Primärantikörper	CD31 Mouse anti human IgG1	Cardiac Troponin I Mouse anti human IgG1, k	TUNEL <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein
Firma	Serotec Ltd., Kidlington, Oxford, UK	Biomeda Corporation Foster City, USA	Roche Diagnostic GmbH, Penzberg Deutschland
Austestung erfolgt an	Zellpellet aus zentrifugierten EC, in Paraffin eingebettet	Herzgewebe der Ratte in Paraffin eingebettet	
Verdünnung der Handfärbung	1 : 75	1 : 40	Fertigmischung
Detektionssystem	Indirekte Methode	Indirekte Methode	
Zu färbende Strukturen	Membranfärbung, Oberflächenantigen	Proteinfärbung	Kernfärbung
Ziel der Anfärbung	Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten und B- Zellen	Kardiale Muskelfibrillen	Apoptotische Zellen

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper

Verarbeitung der Paraffinschnitte mit der Fluoreszenz-Doppelfärbung Troponin I und TUNEL

Beide Färbungen werden am gleichen Tag durchgeführt, und die Schnitte verbleiben über Nacht im Brutschrank bei 56°C.

Zur Entwässerung und Entparaffinierung werden die Schnitte in frisches Xylol und in eine Alkoholreihe mit absteigender Konzentration eingetaucht und anschließend mit Aqua dest. kurz gespült.

Zur Antigendemaskierung kommen die Schnitte in einen Dampfgerar in TRIS-Puffer, pH 6,0 (DAKO® Target Retrieval Solution, USA). Der Dampfgerar wird 20 min vorgeheizt, die TRIS-Puffer-Lösung dabei in einem Mikrowellengefäß erhitzt. Dann gibt man die Schnitte in die Pufferlösung und erhitzt sie für weitere 30 min.

Anschließend nimmt man das Mikrowellengefäß aus dem Dampfgarer und lässt die Schnitte 10 min in dem heißen Puffer abkühlen. Es folgt eine dreimalige Spülung mit TRIS-Puffer.

Nach Zugabe des Primärantikörpers gegen Cardiac Troponin I (Biomedica) bei einer Verdünnung von 1:40 werden die Schnitte eine Stunde lang inkubiert. Es folgt ein dreimaliges Spülen mit TRIS-Puffer.

Nun wird der polyklonale Cy3-markierte Sekundär-Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) in der Verdünnung 1:50 aufgetragen und die Schnitte werden bei 37°C eine Stunde im Brutschrank lichtgeschützt inkubiert. Es erfolgt eine dreimalige Spülung mit dem TRIS-Puffer.

Auf jeden Schnitt gibt man 50 µl des TUNEL-Reaktionsgemisches (Roche). Um dieses herzustellen werden 100 µl aus der Labelsolution entnommen (für zwei Negativkontrollen), dann werden 50 µl (Gesamtvolumen) Enzymsolution in das verbleibende Volumen der Labelsolution (450µl) gegeben um 500 µl TUNEL-Reaktionsgemisch zu erhalten.

Die Schnitte werden bei 37°C im Brutschrank lichtgeschützt eine Stunde lang inkubiert. Es erfolgt eine dreimalige Spülung mit TRIS-Puffer und die Schnitte werden anschließend eingedeckelt.

Auswertung der Troponin I –TUNEL Färbung:

Bei dieser Färbung bindet ein Antikörper an das Troponin I der Herzmuskelzelle. Diese leuchtet somit rot und die TUNEL-Färbung leuchtet grün. Mit dieser Färbung können also apoptotische Herzmuskelzellen erfasst werden. In diesem Falle sieht man die roten Muskelfasern im Zytoplasma und einen grünen Zellkern in der Mitte.

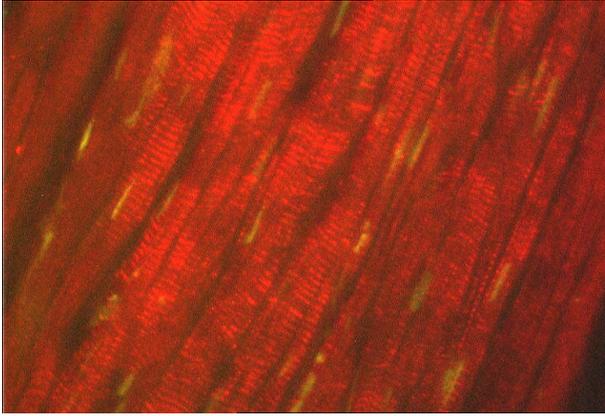


Abbildung 7 (20x Vergrößerung): Die Troponin I – Färbung zeigt die Querstreifung der Herzmuskelzelle und die grünen Kerne zeigen dass diese Herzmuskelzellen apoptotisch sind.

Bei der TUNEL-Troponin I-Doppelfärbung zählt man die doppelt gefärbten, sprich die Troponin I- und TUNEL-positiven Zellen (= die apoptotischen Herzmuskelzellen) aus. Wes werden 8 Gesichtsfelder im Infarktgebiet, im Randgebiet und im Gesunden (Septum) in der 40fachen Vergrößerung mittels Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) ausgezählt.

Verarbeitung der Paraffinschnitte mit der Fluoreszenz-Doppelfärbung: anti-humanes CD31 und TUNEL

Beide Färbungen werden am gleichen Tag durchgeführt und die Schnitte verbleiben über Nacht im Brutschrank bei 56°C.

Zur Entwässerung und Entparaffinierung werden die Schnitte in frisches Xylol und in eine Alkoholreihe mit absteigender Konzentration eingetaucht und anschließend mit Aqua dest. kurz gespült.

Zur Antigendemaskierung kommen die Schnitte in einem Dampfgerar in TRIS-Puffer, pH 6,0 (DAKO® Target Retrieval Solution, USA). Der Dampfgerar wird 20 min vorgeheizt, die TRIS-Puffer-Lösung dabei in einem Mikrowellengefäß erhitzt. Dann gibt man die Schnitte in die Pufferlösung und erhitzt sie für weitere 30 min. Anschließend nimmt man das Mikrowellengefäß aus dem Dampfgerar und lässt die Schnitte noch für 10 min in dem heißen Puffer abkühlen. Es folgt eine dreimalige Spülung mit dem TRIS-Puffer.

Nach Zugabe des Primäantikörpers, einem monoklonalen anti CD31 (Serotec) mit der Verdünnung 1:75, werden die Schnitte 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt ein dreimaliges Spülen mit TRIS-Puffer.

Nun wird der polyklonale Cy3-markierte Sekundär-Antikörper (Dianova) bei einer Verdünnung von 1:50 aufgetragen und die Schnitte werden bei 37°C eine Stunde im Brutschrank lichtgeschützt inkubiert. Es folgt eine dreimalige Spülung mit TRIS-Puffer. Auf jeden Schnitt gibt man 50 µl des TUNEL-Reaktionsgemisches (Roche). Für das TUNEL-Reaktionsgemisch werden 100 µl aus der Labelsolution entnommen (für zwei Negativ-Kontrollen), dann werden 50 µl (Gesamtvolumen) Enzymsolution in das verbleibende Volumen der Labelsolution (450µl) gegeben um dann 500 µl TUNEL-Reaktionsgemisch zu erhalten.

Die Schnitte werden bei 37°C im Brutschrank lichtgeschützt eine Stunde inkubiert. Es erfolgt eine dreimalige Spülung mit TRIS-Puffer.

Gegengefärbt wird mit DAPI (4', 6 Diamidino-2-Phenyl-indole) Mounting Medium (Vector). Zum Schluss werden die Schnitte eingedeckelt.

Auswertung der hCD31 – TUNEL Färbung

Um zu analysieren, ob sich die injizierten humanen Zellen in das Rattenmyokard inkorporiert haben, werden diese mittels anti-humaner CD31 Färbung gefärbt und können so detektiert werden. Die Bilder zeigen die Anwesenheit von humanen endothelialen Zellen 3 Tage nach dem Myokardinfarkt in der Ratte. Es wurde ein anti-humaner CD31 Antikörper verwendet. Die positiven humanen Zellen leuchten rot. Apoptotische Zellen werden mittels TUNEL-Färbung gefärbt (grün). Zellkerne werden mit DAPI blau gefärbt.

Bei Überlagerung der Bilder zeigen doppelpositive Zellen, also diejenigen humanen Progenitorzellen die apoptotisch sind, aufgrund der blau-grünen Mischung einen hellblauen Kern und eine rote Zelloberfläche.

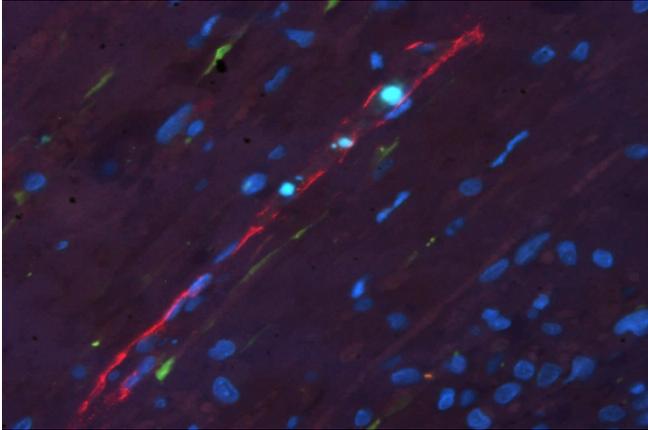


Abbildung 8 (20x Vergrößerung): Im Infarktgebiet zeigen sich ein Konglomerat an CD31 humanen positiven Zellen (rot), Zelltrümmer von apoptotischen Zellen (grün) und Zellkerne (blau) angefärbt sind. Die hellblau leuchtende Zelle ist eine injizierte Progenitorzelle, die apoptotisch ist.

Bei der hCD31-TUNEL-Färbung wird das ganze Herz nach CD31 humanen positiven Zellen abgesucht, die anschließend ausgezählt werden.

Statistische Berechnung und Dokumentation

Die statistische Auswertung erfolgt mit SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Mittelwertunterschiede zwischen den Gruppen werden anhand von t-Tests auf Signifikanz geprüft. P-Werte $(p) < 0,05$ wurden als signifikant, $(p) < 0,01$ als hochsignifikant bewertet. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardfehler (SEM).

Ergebnisse

Ergebnisse der Kontrolltiere

Im Folgenden wird der typische Verlauf eines Herzinfarktes bei Ratten, in diesem Falle bei Kontrolltieren, anhand der HE- und der EvG-Färbung beschrieben:

Die Schnitte wurden in der HE-Färbung auf Ausdehnung der Nekrose, des Zellinfiltrates sowie dessen Zusammensetzung (Entzündungszellen und Fibroblasten) und Gefäßanzahl semiquantitativ bewertet.

Die mit EvG gefärbten Schnitte wurden ebenfalls ausgewertet. Bei der Auswertung wird mittels der bereits oben beschriebenen Skala von 0 bis 5, die Ausdehnung der Kollagenfasern im Infarktgebiet und somit der narbige Umbau des Gewebes bewertet. Aus den ermittelten Zahlen wurden Mittelwerte berechnet.

Drei Tage nach dem Infarkt zeigt sich in der HE-Färbung mitten im Infarktgebiet ein großes Nekroseareal (Abbildung 9), umgeben von einem dichten, unorganisierten Zellinfiltrat. Dieses besteht vor allem aus Entzündungszellen (vor allem Monozyten und neutrophilen Granulozyten) und vereinzelt Fibroblasten. Außerdem sprossen erste Kapillaren in das Grenzgebiet ein. Dieses zellreiche Infiltrat befindet sich vor allem im Randgebiet des Infarktes (Abbildung 10), während das Zentrum weniger von Zellen besetzt ist und vor allem aus eosinophilem Trümmernmaterial besteht.

Die EvG-Färbung bestätigt diese Beobachtung: In den Schnitten sind nur wenige Kollagenfasern vorhanden.

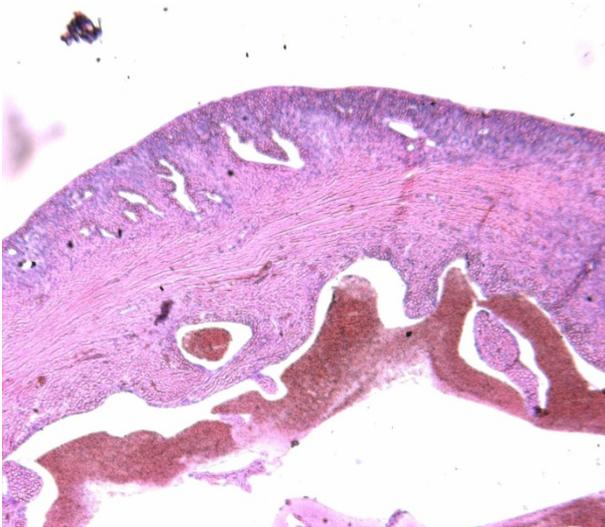


Abbildung 9: Übersicht über das Infarktgebiet, 3 Tage nach Infarkt (HE-Färbung, 2,5x Vergrößerung).

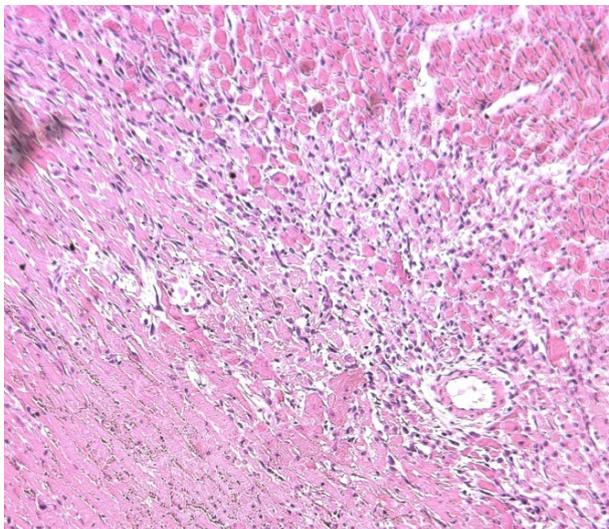


Abbildung 10: Ausschnitt aus dem Randgebiet des Infarktes, 3 Tage nach Infarkt (HE-Färbung, 10x Vergrößerung). Das Infarktgebiet ist durch eosinophiles nekrotisches und apoptotisches Gewebe gekennzeichnet. Vom Rand aus wandern Entzündungszellen ein.

Nach 1 Woche sind kaum noch Zelltrümmer vorhanden, das Entzündungsinfiltrat wirkt aufgelockert und ist mit vielen Fibroblasten durchsetzt, die sich teilweise fischzugartig organisieren (Abbildungen 11 und 12). Das Gewebe ist mit wenigen mittelgroßen Kapillaren durchsetzt.

Die in der HE-Färbung beobachteten Fibroblasten bilden Kollagen, was in der EvG-Färbung gut sichtbar ist.

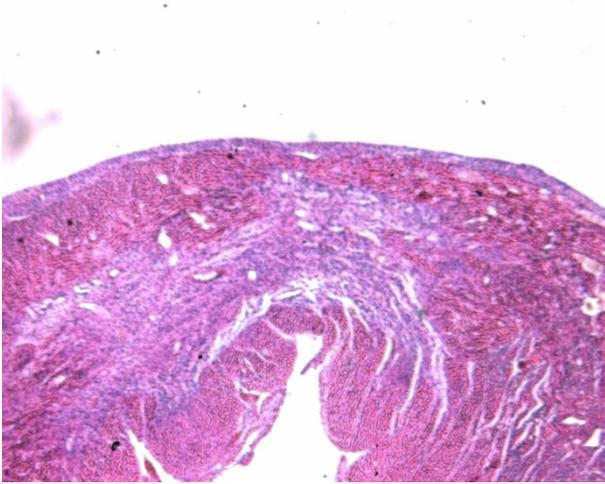


Abbildung 11: Übersicht über das Infarktareal, 1 Woche nach Infarkt (HE-Färbung, 2,5x).

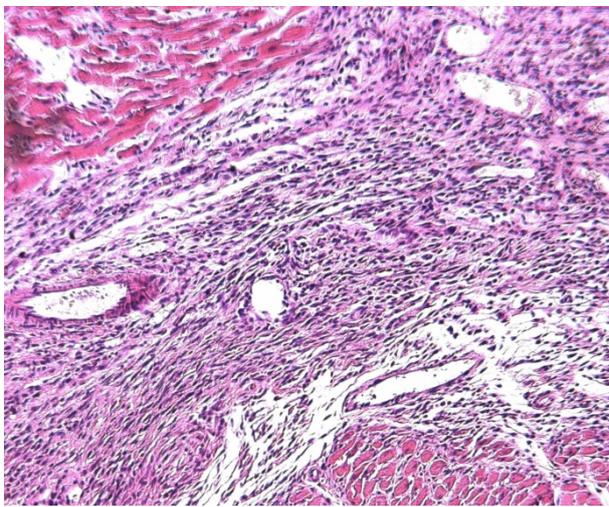


Abbildung 12: Aufnahme des Infarktgebietes, 1 Woche nach Infarkt (HE-Färbung, 10x), welches ein aufgelockertes Entzündungsinfiltrat und einwandernde Fibroblasten aufweist.

Nach 2 Wochen ist kein Zelluntergang mehr zu sehen. Das betroffene Gewebe erscheint narbig organisiert (Abbildung 13), die Fibroblasten sind fischzugartig angeordnet und eingebettet in Kollagen (Abbildung 14), wie auch die EvG-Färbung in den Abbildungen 15 und 16 bestätigt. Es sind vereinzelt Entzündungszellen zu sehen, sowie auch kleine bis mittelgroße Gefäße.

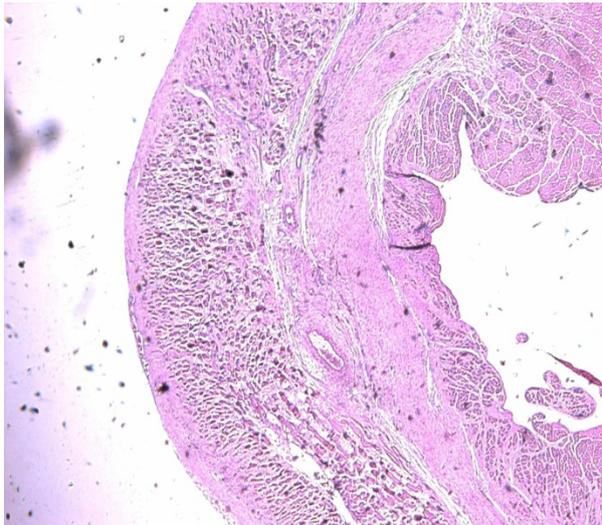


Abbildung 13: Hier ist die Übersicht über das Infarktgebiet zu sehen (**HE-Färbung, 2,5x**, 2 Wochen nach Infarkt).

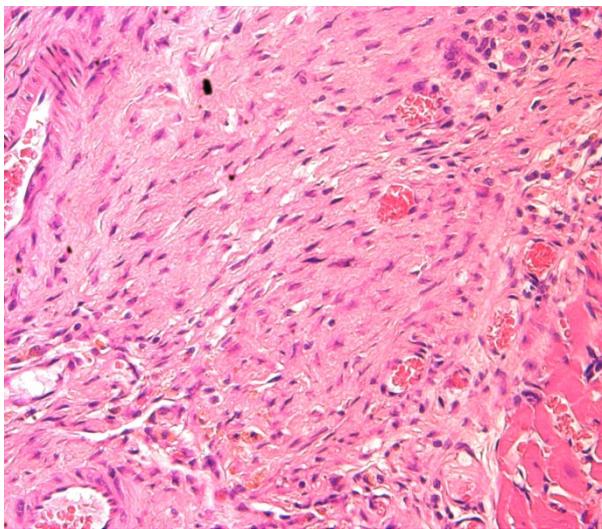


Abbildung 14: Auf dieser Abbildung ist die Vergrößerung des vollständig fibrosierten Gewebe abgebildet (**HE-Färbung, 20x**, 2 Wochen nach Infarkt).

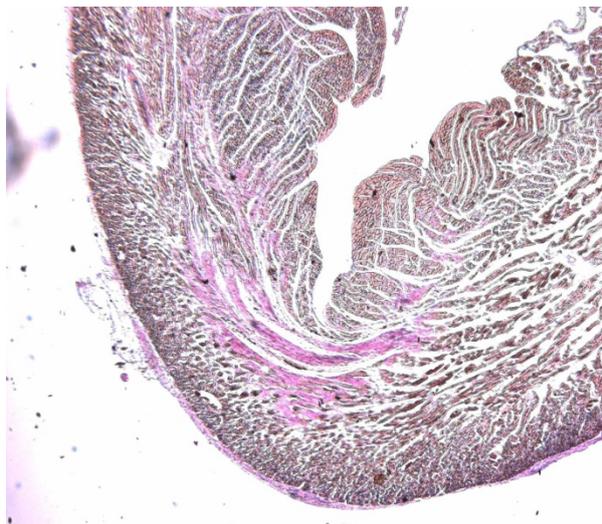


Abbildung 15: Diese Abbildung zeigt ein mit **EvG** gefärbtes infarziertes Rattenmyokard nach 2 Wochen. Das Bild zeigt in der Übersicht das fibrosierte Gewebe, dass sich rot darstellt (**2,5x**).

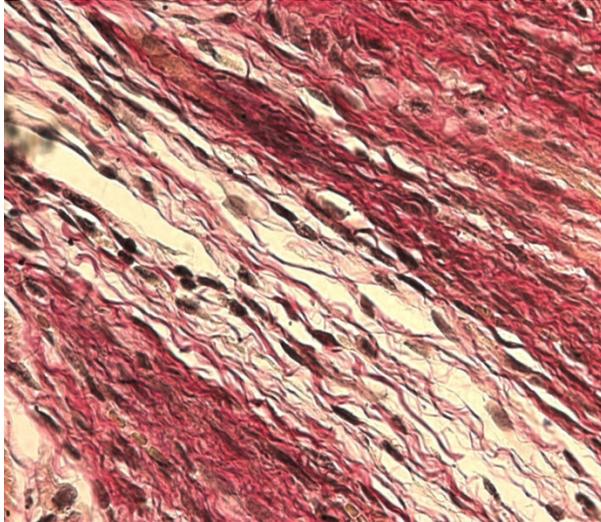


Abbildung 16: In diesem Bild sind in der **40-fachen** Vergrößerung rot gefärbte Kollagenfibrillen abgebildet (**EvG-Färbung**, 2 Wochen nach Infarkt).

Semiquantitativ kam es zu folgenden Ergebnissen:

	Größe des Infarkt-areals	Größe der Nekrose	Dichte und Verteilung des Infiltrates	Menge Granulozyten	Menge Fibroblasten	Menge Gefäße	Menge Kollagen
3 Tage	4	3	Dichtes Zellinfiltrat, am Rand Nekrose	4	2	3 – 4	0 - 1
1 Woche	3	1 – 2	Locker	3	3	3	3
2 Wochen	3	0	Organisiert	1 – 2	5	3	5

Tabelle 5: Auswertung der HE- und EvG-Färbung der Kontrolltiere jeweils nach 3 Tagen, 1 und 2 Wochen. Hier wurden anhand einer Skala von 0 bis 5 die Ausdehnung des Infarktareals, der Nekrose, der Menge an Granulozyten, Fibroblasten, Gefäße und Kollagen semiquantitativ gemessen, sowie die Dichte des Infarktes beschrieben. 0 steht für das nicht Vorhandensein und 5 für die maximale Ausdehnung des Merkmales.

Immunfluoreszenz in der Kontrollgruppe

Bei der hCD31-TUNEL-Färbung waren, wie zu erwarten, keine hCD31 positive Zellen nachweisbar (Abbildung 17).

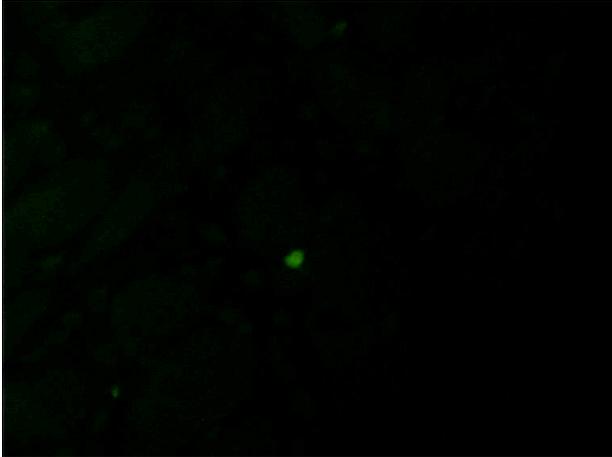


Abbildung 17 (hCD31-TUNEL-Färbung): Kontrolltier 3 Tagen nach Herzinfarkt. Apoptotische Zelle (grün). hCD31 positive Zellen sind nicht zu sehen (**40x Vergrößerung**).

Die Troponin I-TUNEL-Färbung zeigt, dass es ausgehend vom Infarktgebiet aus über den Rand ins Normalgewebe zu einem Absinken der Zahl an apoptotischen Zellen kommt (siehe Abbildungen 18 - 20).

Im Infarkt- und Randgebiet ist dagegen die Anzahl der apoptotischen Herzmuskelzellen gleich. Im Gesunden nimmt sie ab.

Dies stellt sich nach 3 Tagen, 1 Woche und 2 Wochen dar mit dem Unterschied, dass nach 1 und 2 Wochen die Zahl der apoptotischer Herzmuskelzellen im Infarktgebiet niedriger ist als im Infarktgebiet nach 3 Tagen. Exemplarisch werden im folgenden Diagramm die apoptotischen Zellen (und ebenfalls im speziellen die Herzmuskelzellen) nach 3 Tagen dargestellt.

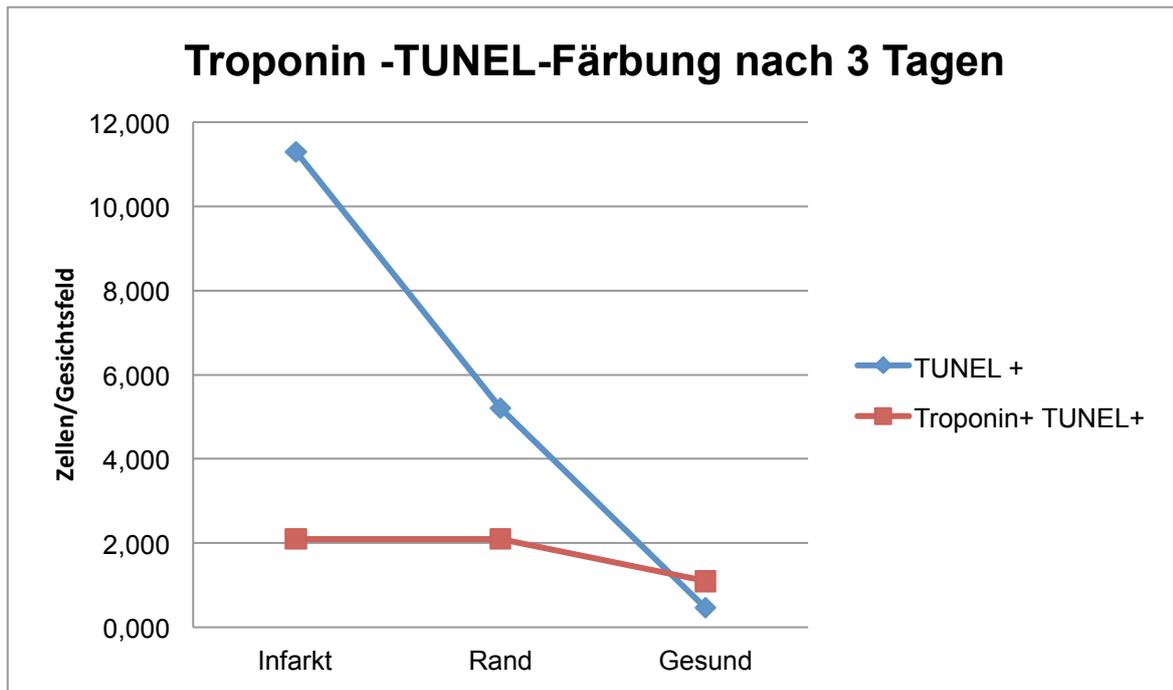


Diagramm 3: Verteilung apoptotischer Zellen im infarzierten Herzen nach 3 Tagen bei Kontrolltieren. Die Zahl apoptotischer Zellen nimmt bei zunehmender Entfernung zum Infarktgebiet stetig ab (blaue Linie). Die Zahl apoptotischer Herzmuskelzellen ist im Infarkt und im Randbereich annähernd gleich hoch (rote Linie).

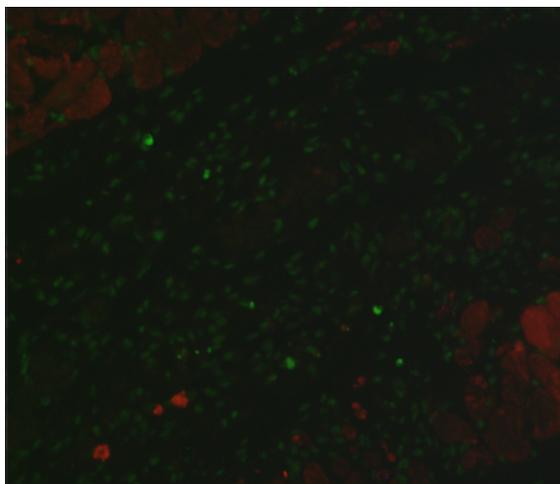


Abbildung 18 (Troponin-TUNEL-Färbung): Kontrolltiere 3 Tage nach Infarkt, Infarktgebiet (**10x Vergrößerung**). Die rote Färbung zeigt die Troponin-Fibrillen, und die grüne Färbung zeigt die TUNEL positive Zellen.

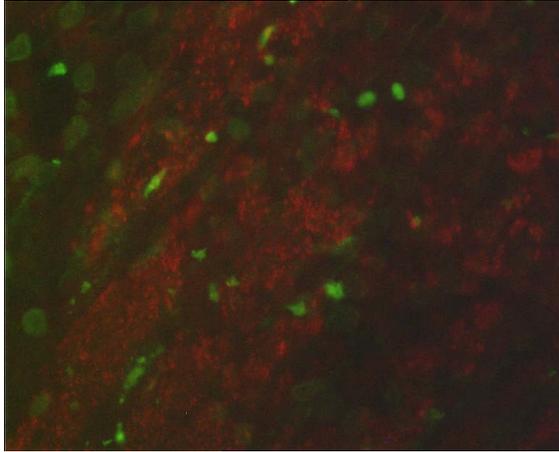


Abbildung 19 (Troponin-TUNEL-Färbung): Kontrolltiere 3 Tage nach Infarkt, Randgebiet (**20x Vergrößerung**). Die rote Färbung zeigt die Troponin-Fibrillen, und die grüne Färbung zeigt die TUNEL positive Zellen.

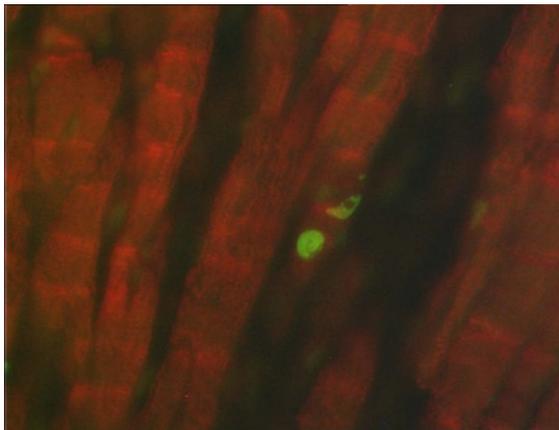


Abbildung 20 (Troponin-TUNEL-Färbung): Kontrolltiere 3 Tage nach Infarkt, im Gesunden (**40x Vergrößerung**). Die rote Färbung zeigt die Troponin-Fibrillen, und die grüne Färbung zeigt die TUNEL positive Zellen.

Die grünen Kerne zeigen apoptotische Zellen; bei gleichzeitiger roter Färbung handelt es sich um apoptotische Herzmuskelzellen.

In den oberen Abbildungen (Abbildung 18 bis 20) zeigt sich das Gefälle der Anzahl der apoptotischen Zellen vom Infarktgebiet bis zum Gesunden, wovon jedoch nur die wenigsten Herzmuskelzellen sind.

Diese Untersuchung zeigt somit, dass im Infarktgeschehen die Apoptose eine große Rolle spielt. Aber die Kardiomyozyten sind davon nur zum kleinen Teil betroffen.

Auswertung der Zelltherapie und der Zelltherapie mit Wachstumsfaktoren

Zelltherapie in der HE und EvG-Färbung:

Im folgendem wird der Verlauf des Herzinfarktes bei Ratten analysiert, die mit Progenitorzellen therapiert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Heilungsprozess nach 3 und nach 14 Tagen beobachtet. Es wurden verschiedene Arten von Progenitorzellen getestet: MSCs, early EPCs und late EPCs. Wie bereits

oben beschrieben wurde zur Quantifizierung von verschiedenen Merkmalen die Skala von 0 bis 5 benützt.

Analyse 3 Tage post Infarkt:

Bei Betrachtung der HE-Schnitte fällt in den Zelltherapiegruppen (MSC-, early EPC- und late EPC-Gruppe) ein vergleichbar großer Infarktareal, sowie eine vergleichbar große Nekrose im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bezüglich der Entzündungsreaktion zeigen sich auch hier im Vergleich zur Kontrolle im allen Gruppen (MSC, early EPC und late EPC) ähnliche Ergebnisse (Abbildungen 21, 22, 24 und 25). Auch die EvG-Färbung zeigt das in den MSC- (Abbildung 23) den early EPC- und in den late EPC-Gruppen ähnlich viel Kollagen vorhanden ist als in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 6).

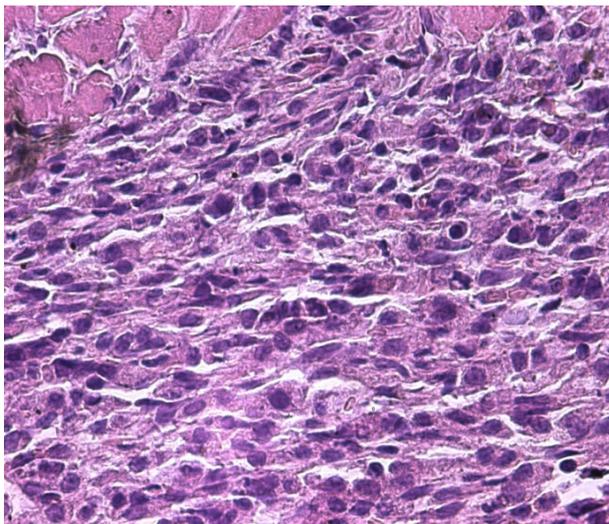


Abbildung 21: MSC-Gruppe, 3 Tage nach Infarkt, **HE-Färbung**. Dort zeigen sich leicht mehr Leukozyten und Fibroblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe. **(40x Vergrößerung)**

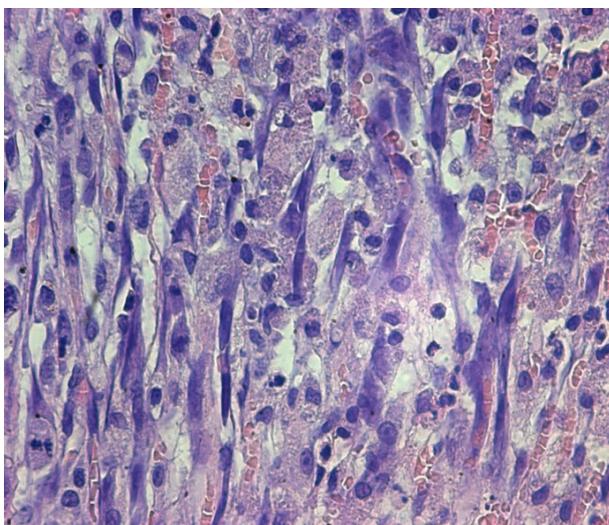


Abbildung 22: Dieses Bild stammt aus der MSC-Gruppe und zeigt ein 3 Tage alter Infarkt. Es ist mit der **HE-Färbung** gefärbt und zeigen ähnlich viele Leukozyten und Fibroblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe **(40x Vergrößerung)**.

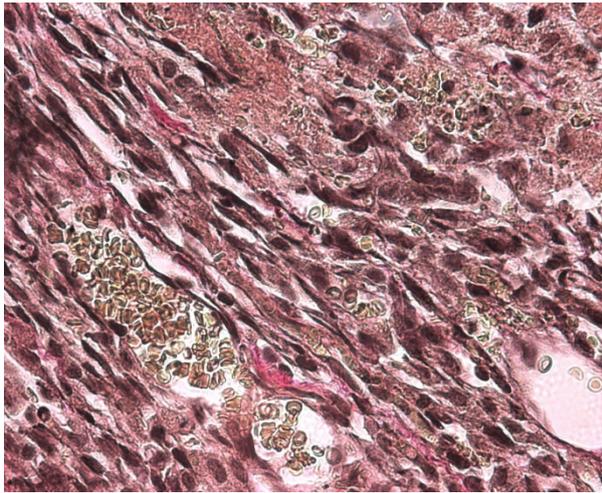


Abbildung 23: MSC-Gruppe, 3 Tage alter Infarkt. Dieses Bild zeigt ein mit **EvG** gefärbtes Rattenmyokard 3 Tage nach dem Infarkt, dort sind vereinzelte Kollagenfibrillen rot angefärbt (**40x Vergrößerung**).

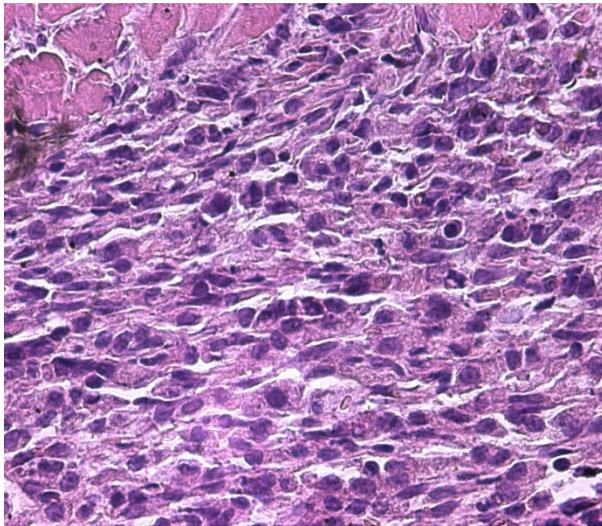


Abbildung 24 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung): Diese Abbildung zeigt ein dichtes Entzündungsinfiltrat mit Leukozyten und Fibroblasten (early EPC-Gruppe 3 Tage).

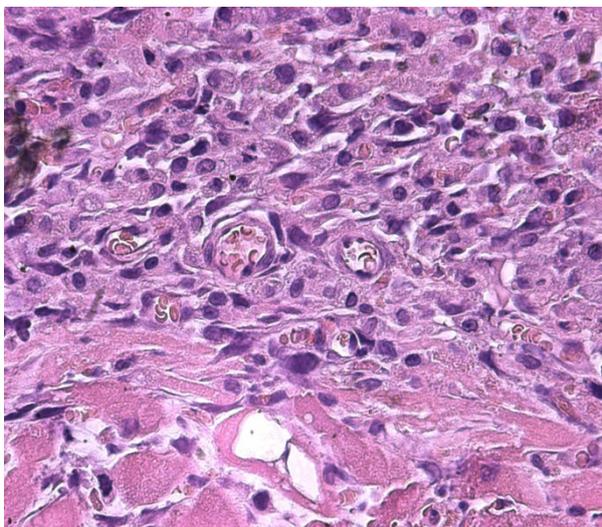


Abbildung 25 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung): Das Bild zeigt Kapillaren und kleine Gefäße im Infarkttrandgebiet der late EPC-Gruppe nach 3 Tagen.

Analyse 2 Wochen post Infarkt:

Sowohl in der MSC-, early- als auch in der late EPC-Gruppe zeigen sich nach 14 Tagen eine ähnlich hohe Gefäß- und Zellzahl als in der Kontrollgruppe (Abbildungen 26 und 27). Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich ähnlich wie in der Kontrollgruppe

ebenfalls eine Reduktion des Nekroseareals und der Infarktgröße. Die Entzündungsreaktion ist ebenfalls vergleichbar zu Kontrollgruppe in der MSC- in der early- und in der late EPC-Gruppe ähnlich rückläufig.

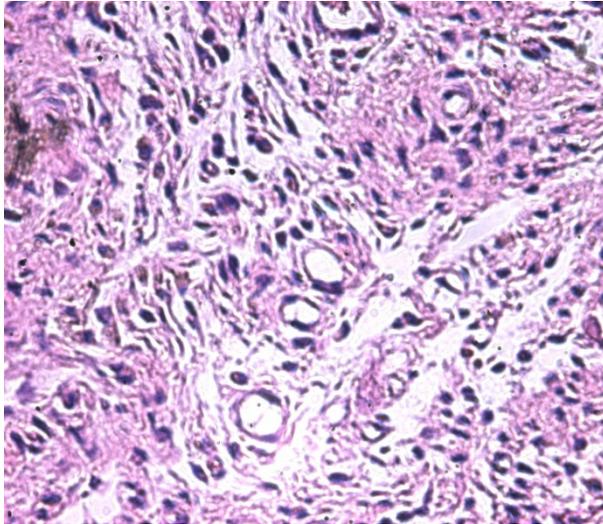


Abbildung 26 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung): Zwei Wochen nach dem Infarkt zeigt sich in der early EPC-Gruppe eine leicht vermehrte Gefäßbildung im Infarkt- und im Randgebiet im Vergleich zur Kontrollgruppe (Bilder Kontrollgruppe: siehe im oberen Abschnitt – Ergebnisse der Kontrolltiere).

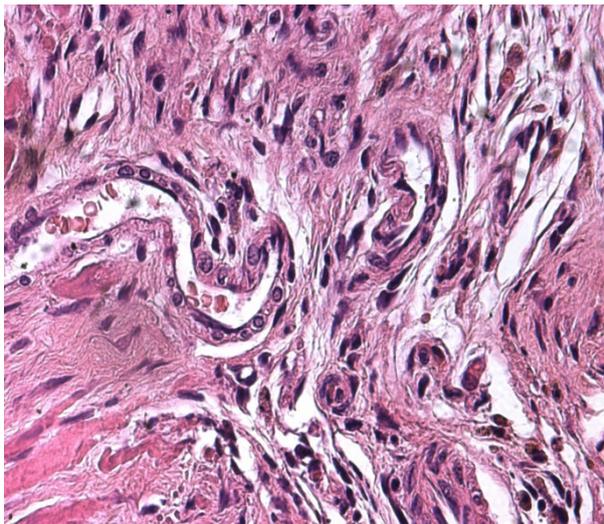


Abbildung 27 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung): Hier ebenfalls zwei Wochen nach dem Infarkt zeigt sich in der late EPC-Gruppe (rechts) eine leicht vermehrte Gefäßbildung im Infarkt- und im Randgebiet im Vergleich zur Kontrollgruppe (Bilder Kontrollgruppe: siehe im oberen Abschnitt – Ergebnisse der Kontrolltiere).

Zelltyp	Untersuchungszeitpunkt	Größe des Infarktareals	Größe der Nekrose	Dichte und Verteilung des Infiltrates	Menge Granulozyten	Menge Fibroblasten	Menge Gefäße	Menge Kollagen
Kontrolle	3 Tage	4	3	Dichtes Zellinfiltrat, am Rand Nekrose	4	2	3 – 4	0 -1
	1 Woche	3	1 – 2	Locker	3	3	3	3
	2 Wochen	3	0	Organisiert	1 – 2	5	3	5

MSC	3 Tage	3	2 – 3	Dicht, unorganisiert	5	3	3	1 – 2
	2 Wochen	3	0	Locker, organisiert	1	5	3	5
Early EPCs	3 Tage	4	4	Am Rand dicht, unorganisiert	3 - 4	3	3	1
	2 Wochen	2 - 3	0	Locker, organisiert	2	4	3 – 4	5
Late EPCs	3 Tage	4	3	Dicht, unorganisiert	4	2	3	2
	2 Wochen	4	1	In Fischzügen organisiert	1 - 2	5	3 – 4	5

Tabelle 6: HE- und EvG- Auswertung der Zelltherapie-Gruppen nach 3 Tagen bzw. 2 Wochen. Hier wurden anhand einer Skala von 0 bis 5 die Ausdehnung des Infarktareals, der Nekrose, der Menge an Granulozyten, Fibroblasten, Gefäße und Kollagen semiquantitativ gemessen, sowie die Dichte des Infiltrates beschrieben. 0 steht für das nicht Vorhandensein und 5 für die maximale Ausdehnung des Merkmales.

Zelltherapie und Wachstumsfaktor IGF2 in der HE- und EvG-Färbung:

Anschließend wurde zum einen die alleinige Gabe von IGF2 (im weiteren Verlauf „medium-IGF2“ genannt), zum anderen die Injektion von EPCs und IGF2 („EPC+IGF2“), außerdem EPCs, die das IGF2 überexprimieren („IGF2-Zellen“) und als deren Kontrolle EPCs, die mit einem Leervektor transfiziert wurden, und die somit keine Überexpression des Wachstumsfaktors aufweisen („LV“) untersucht. Wie bereits oben beschrieben wurde zur Quantifizierung von verschiedenen Merkmalen die Skala von 0 bis 5 benützt.

Analyse nach 3 Tagen:

In der IGF2-Zellen-Gruppe zeigt sich nach 3 Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe die Entzündungsreaktion etwas stärker ausgeprägt, und es sind mehr Leukozyten und Kapillaren nachweisbar (Abbildung 28 und 29). In der EPC+IGF2-Gruppe zeigt

sich kein Unterschied zur Kontrolle. In der LV-Gruppe zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine ähnliche ausgeprägte Ausbreitung von Granulozyten und in der EvG-Färbung eine minimal vermehrte Kollagenbildung (Abbildung 30). In der medium-IGF2-Gruppe wurde ähnlich wie in der Kontrollgruppe eine ausgeprägte Entzündungsreaktion beobachtet.

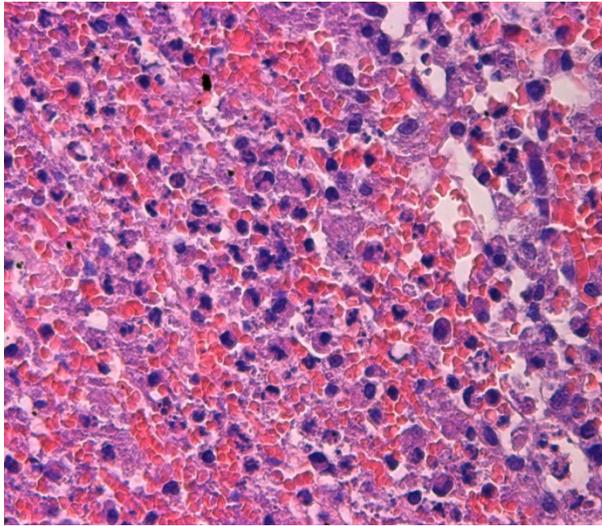


Abbildung 28 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung):

Das Bild stammt aus der IGF2 Zellen – Gruppe und zeigt die Entzündungsreaktion im Infarzierten Gewebe, 3 Tage nach Infarkt.

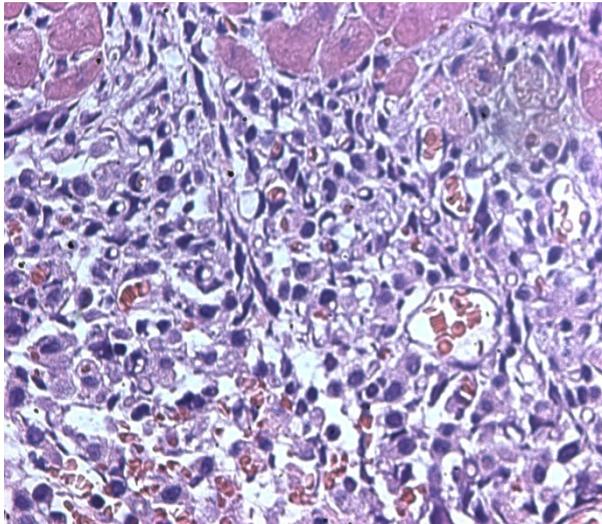


Abbildung 29 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung):

Kapillarbildung in der IGF2-Zellen-Gruppe 2 Tage nach Infarkt.

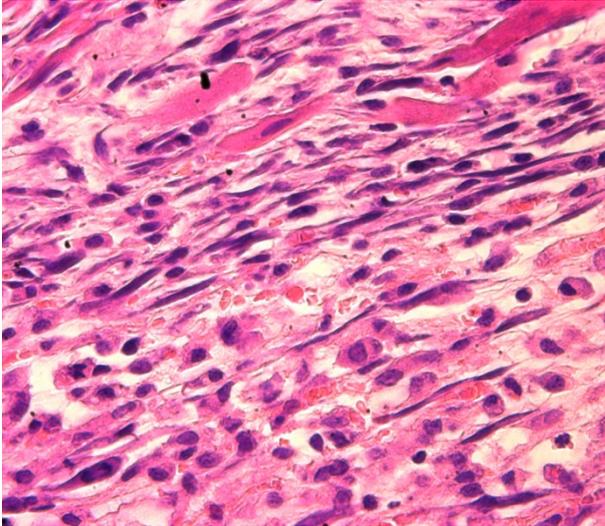


Abbildung 30 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung):

Das Bild stammt aus der LV-Gruppe und zeigt Fibroblasten im Gewebe 3 Tage nach Infarkt.

Analyse nach 1 Woche:

Auch nach einer Woche ähnlich wie in der Kontrollgruppe, zum gleichen Zeitpunkt, zeigen sich in der LV-, in der IGF2-Zellen-, in der EPC+IGF2-Gruppe eine noch bestehende Entzündungsreaktion (Abbildung 31 und 32). Außerdem ist eine etwas gesteigerte Neovaskularisation im Vergleich zur Kontrollgruppe in der IGF2-Zellen Gruppe, sowie in der medium-IGF2-Gruppe zu sehen.

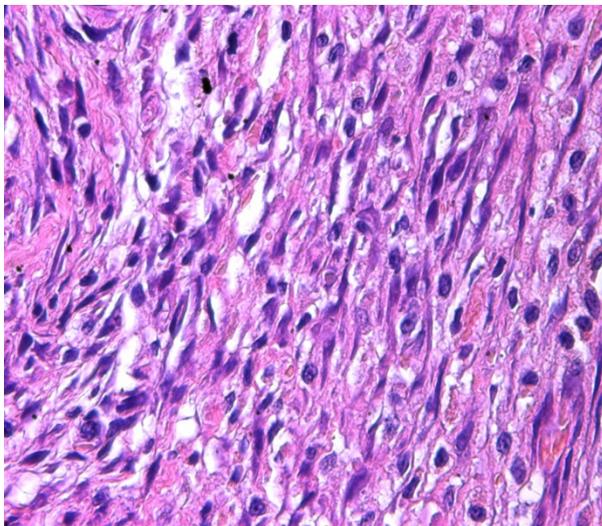


Abbildung 31 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung): Die Abbildung aus der LV-Gruppe zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnlich viele Lympho- und Monozyten sowie Gefäße im Infarkt- und Randgebiet auf.

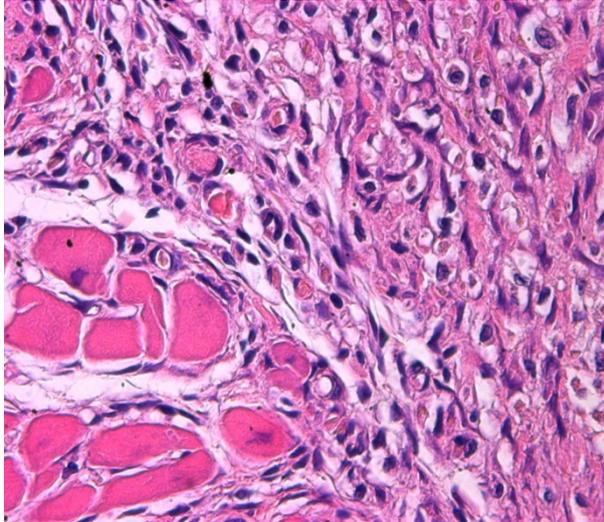


Abbildung 32 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung): Diese Abbildung aus der LV-Gruppe weist im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnlich viele Lympho- und Monozyten sowie Gefäße im Infarkt- und Randgebiet auf.

Analyse nach 2 Wochen:

Die Entzündungsreaktion geht nach zwei Wochen fast vollständig zurück, dies ist wie in der Kontrolle auch in allen Gruppen (LV-, IGF2-Zellen-, EPC+IGF2- und medium-IGF2-Gruppe) nachweisbar. In den IGF2-Zellen- und medium-IGF2-Gruppen sind etwas mehr Gefäße (3-4 Punkte bei beiden Gruppen) zu finden (Abbildung 33 und 34).

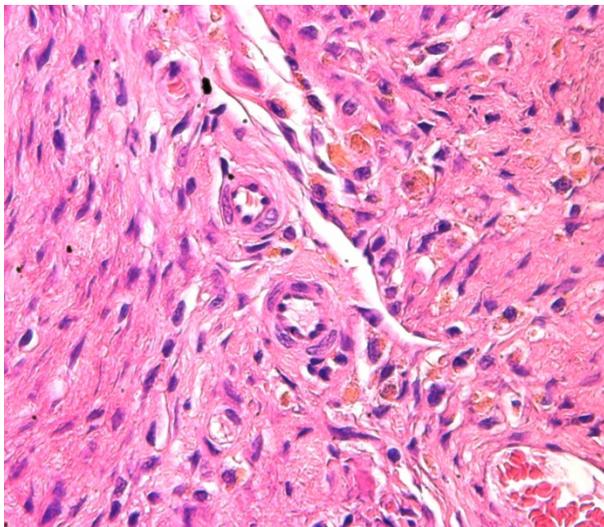


Abbildung 33 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung): Nach 2 Wochen zeigt sich in der IGF2-Zellen-Gruppe eine leicht vermehrte Gefäßbildung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

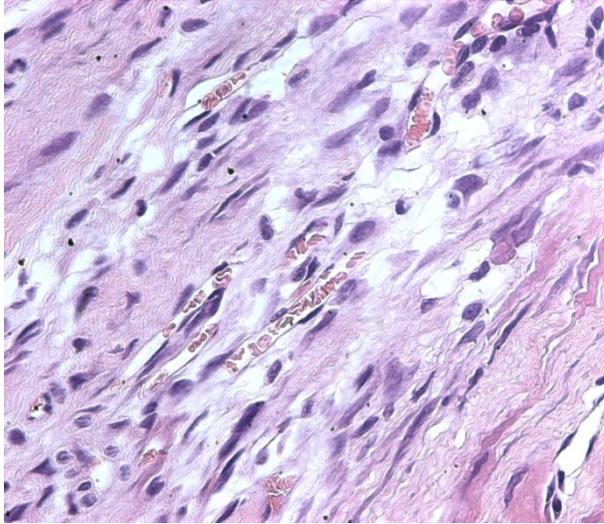


Abbildung 34 (HE-Färbung, 40x Vergrößerung): Hier ebenfalls nach 2 Wochen zeigt sich in der medium-IGF2-Gruppe eine leicht vermehrte Gefäßbildung im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Zelltyp	Untersuchungszeitpunkt	Größe des Infarkt-areals	Größe der Nekrose	Dichte und Verteilung des Infiltrates	Menge Granulozyten	Menge Fibroblasten	Menge Gefäße	Menge Kollagen
Kontrolle	3 Tage	4	3	Dichtes Zellinfiltrat, am Rand Nekrose	4	2	3 - 4	0 - 1
	1 Woche	3	1 - 2	Locker	3	3	3	3
	2 Wochen	3	0	Organisiert	1 - 2	5	3	5
LV	3 Tage	3	3	Dicht, unorganisiert	3	2 - 3	3	2
	1 Woche	3	1	Mittel dicht	3 - 4	3	3	3
	2 Wochen	4	0	Locker, organisiert	2	4 - 5	3	5
IGF2-Zellen	3 Tage	3	3	Locker, unorganisiert	4 - 5	2	4	0 - 1
	1 Woche	4	1 - 2	Viele Zellen, beginnende Organisation	4	2 - 3	3 - 4	4
	2							

	Wochen	3	0	Organisiert locker	2 - 3	4 - 5	3 - 4	5
Medium-IGF2	3 Tage	3 - 4	3	Dicht, unorganisiert	5	2 - 3	3	1
	1 Woche	4	1	Locker, organisiert	3	4	3 - 4	4
	2 Wochen	4	0	Organisiert	2	5	3 - 4	5
EPC+ IGF2	3 Tage	4	3	Dicht, unorganisiert	4	2	3	1
	1 Woche	3 - 4	1	Teils dicht, teils locker angeordnet	3	4	3	3 - 4
	2 Wochen	4	0	Narbe	2	5	2 - 3	5

Tabelle 7: Auswertung der HE- und EvG- Färbungen in den Zelltherapie mit IGF2 – Gruppen.

Hier wurden anhand einer Skala von 0 bis 5 die Ausdehnung des Infarktareals, der Nekrose, der Menge an Granulozyten, Fibroblasten, Gefäße und Kollagen semiquantitativ gemessen, sowie die Dichte des Infiltrates beschrieben. 0 steht für das nicht Vorhandensein und 5 für die maximale Ausdehnung des Merkmales.

Auswertung der Immunfluoreszenz:

Bei einzelner Betrachtung der verschiedenen Gruppen sind folgende Ergebnisse nachweisbar:

Zelltherapiegruppen ohne Wachstumsfaktoren:

MSCs: 3 Tage nach Infarkt zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung insgesamt eine höhere Zahl an TUNEL-positiven- bzw. an apoptotischen Zellen (Infarkt- und Randbereich). Ausgenommen hiervon ist der gesunde Bereich in dem sich im Vergleich zur Kontrolle weniger apoptotische Zellen nachweisen lassen. Jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant, und lediglich im Randgebiet zeigte sich ein Trend an ($p=0,096$). Anders bei den doppelpositiven Zellen: die apoptotischen Kardiomyozyten sind in der Gruppe die mit MSCs behandelt wurden 3 Tage nach Infarkt in allen Bereichen in geringerer Zahl nachweisbar als in der Kontrollgruppe, im

Randgebiet zeigt sich ein Trend an ($p=0,066$) und im Normalgewebe zeigt sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p=0,044$).

2 Wochen nach dem Infarkt zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung in jedem Bereich eine Erhöhung der Apoptose in den Zellen, die im Infarktbereich signifikant ist ($p=0,045$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz zur Analyse nach 3 Tagen zeigt sich hier im Randbereich und im Gesunden eine Erhöhung der apoptotischen Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In der hCD31-TUNEL-Färbung konnten nach 3 Tagen und nach 2 Wochen keine menschlichen Zellen entdeckt werden, da die MSCs kein CD31 exprimieren (siehe Tabelle 8).

Early EPCs: 3 Tage nach Infarkt zeigen sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung wie auch in den anderen Gruppen eine gleiche Anzahl apoptotischer Zellen im Infarkt- und Randgebiet im Vergleich zur Kontrolle. Im gesunden Gewebe ist kaum Apoptose zu beobachten. Allerdings sind im gesamten Herzen weniger doppelpositive Zellen vorhanden, im gesunden Gewebe signifikant weniger im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,028$). Nach 2 Wochen zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Troponin I-TUNEL-Färbung insgesamt eine niedrigere Apoptoserate im gesamten Herzen, mit einem signifikanten Unterschied im Infarktgebiet im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,01$). Dagegen sind im Randgebiet und im Gesunden mehr apoptotische Herzmuskelzellen im Vergleich zur Kontrolle gezählt worden.

Mit der hCD31-TUNEL-Färbung waren nach 3 Tagen und nach 2 Wochen keine menschlichen Zellen nachweisbar (siehe Tabelle 8).

Late EPCs: In der mit late EPCs behandelten Gruppe zeigten sich 3 Tage nach Infarkt in der Troponin I-TUNEL-Färbung im Vergleich zur Kontrolle mehr apoptotische Zellen im Infarkt- und Randgebiet. Im gesunden Gewebe war kein Unterschied nachweisbar. Im Gesunden sind dagegen etwas mehr doppelpositive Zellen zählbar als in der Kontrollgruppe. Im Infarkt- und im Randgebiet zeigen sich weniger apoptotische Herzmuskelzellen als in der Kontrollgruppe. Im Randgebiet ist der p-Wert 0,08 und zeigt somit einen Trend zu geringerer Apoptoserate an.

In der hCD31-TUNEL-Färbung waren in der late EPC-Gruppe 3 Tage nach Infarkt menschliche Zellen nachweisbar, von denen nur ein kleiner Prozentsatz apoptotisch war (1,5%). Nach 2 Wochen zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung in jedem

Bereich eine Verminderung der Apoptoserate. Im Infarktgebiet zeigt sich kein Unterschied der doppelpositiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Im Randgebiet lassen sich etwas weniger und im Gesunden etwas mehr apoptotische Kardiomyozyten Zellen zählen als in der Kontrollgruppe, jedoch war der beobachtete Unterschied nicht statistisch signifikant.

Nach 2 Wochen waren keine hCD31 positive Zellen mehr nachweisbar.

Wenn man den Vergleich zur early EPC-Gruppe zieht, zeigt sich 2 Wochen nach dem Infarkt ein signifikanter Unterschied zur late EPC-Gruppe, in der signifikant mehr apoptotische Zellen im Infarktgebiet nachweisbar waren als in der early EPC-Gruppe (siehe Tabelle 8).

	TUNEL+	Troponin I- TUNEL+	hCD31+	hCD31 - TUNEL+
Infarkt 3Tage				
Kontrolle	11,29±1,4	2,1±1,6	0	0
MSC	28,04±10,4	2,6±0,5	0	0
early EPC	14,31±4,2	1,2±1,2	0	0
late EPC	12,1±2,1	1,2±0,4	0	0
Rand 3 Tage				
Kontrolle	5,2±0,7	2,1±0,7	0	0
MSC	8,2±1,5+	0,7±0,2+	0	0
early EPC	6,9±1,6	4,0±1,6	0	0
late EPC	5,7±1	0,7±0,3+	66,5±14,2+	1,3±0,7
Gesund 3 Tage				
Kontrolle	0,5±0,1	1,1±0,4	0	0
MSC	0,4±0,1	0,3±0,1*	0	0
early EPC	0,2±0,2	0,3±0,1	0	0
late EPC	0,4±0,8	22±5,7*	0	0
Infarkt 2 Wochen				
Kontrolle	2,9±0,5	0	0	0
MSC	4,25±0,3	0	0	0
early EPC	1,1±0,3	0	0	0
late EPC	2,5±0,3	0	0	0
Rand 2 Wochen				
Kontrolle	1,3±0,3	0,8±0,3	0	0
MSC	2±0,2*	0,7±0,4	0	0
early EPC	0,8±0,2*	0,9±0,3	0	0
late EPC	1,2±0,2	0,7±0,2	0	0
Gesund 2 Wochen				
Kontrolle	0,25±0,1	1,1±0,3	0	0
MSC	0,6±0,2	2,8±0,7+	0	0

early EPC	0,2±0,0	1,4±0,2	0	0
late EPC	0,2±0,0	1,3±0,4	0	0

Tabelle 8: In dieser Tabelle wurden alle Ergebnisse der Zelltherapiegruppen im Vergleich zur Kontrolle zusammengefasst. Es werden die Mittelwerte ± die SEM angegeben. Die Signifikanten Unterschiede sind mit einem * markiert. Die mit einem + gekennzeichneten Werte zeigen einen Trend an.

Signifikante Werte bestehen ab eine p Wert von $p < 0,05$, ein Trend besteht ab einem $p = 0,05$ bis $< 0,1$.

Zelltherapiegruppen mit dem Wachstumsfaktor IGF2:

LV-Gruppe: 3 Tage nach Infarkt zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung in allen drei untersuchten Bereichen eine höhere Apoptoserate, im Infarktbereich zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,025$). Dagegen sind die Kardiomyozyten weniger apoptotisch als in der Kontrollgruppe. Im Randbereich zeigt sich lediglich ein Trend zur geringeren Apoptose ($p = 0,059$). Nach 1 Woche zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung im Infarkt und Randgebiet insgesamt weniger, im Gesunden hingegen mehr Apoptose. Im Vergleich zur Kontrollgruppe sind im Infarkt- und Randgebiet mehr apoptotische Kardiomyozyten vorhanden, im Gesunden dagegen weniger als in der Kontrollgruppe.

Interessanterweise sind die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen allesamt nicht signifikant. 2 Wochen nach Infarkt sind in der LV-Gruppe in Troponin I-TUNEL-Färbung mehr apoptotische Zellen nachweisbar, und zwar sowohl im Infarkt- als auch im Randgebiet. Im Infarktbereich ist der Unterschied zur Kontrollgruppe signifikant ($p = 0,03$), während sich im Randbereich lediglich ein Trend ($p = 0,094$) zeigt. Im gesunden Normalgewebe und im Randgebiet zeigt sich etwas weniger Apoptose als in der Kontrollgruppe während im Infarktbereich in etwa gleich viele doppelpositive Zellen nachgewiesen werden können.

Interessanterweise konnten in der LV Gruppe zu keinem Zeitpunkt hCD31 positive Zellen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 9).

IGF2-Zellen: In dieser Gruppe zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung ein Trend zu mehr Apoptose im Infarktgebiet ($p = 0,074$). Im Randgebiet und im Gesunden ist

die Apoptose ebenfalls erhöht. In allen Gebieten sind weniger doppelpositive Zellen zu zählen als in der Kontrollgruppe. Im Randgebiet und im Gesunden ist der Unterschied signifikant (Randgebiet: $p=0,021$, Gesund: $p=0,043$). Nach 1 Woche zeigten sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung weniger TUNEL positive Zellen als in der Kontrollgruppe. Während sich im Infarktgebiet lediglich ein Trend beobachten ließ, wurde der Unterschied im Randgebiet und im gesunden Gewebe statistisch signifikant (Randgebiet: $p=0,018$, Gesund: $p=0,036$). Bei den doppelpositiven Zellen war im Infarktgebiet kein Unterschied nachweisbar, jedoch im Randgebiet mehr und im Gesunden weniger apoptotische Kardiomyozyten als in der Kontrollgruppe. 2 Wochen post Infarkt zeigten sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung im Infarktgebiet und im Gesunden weniger apoptotische Zellen. Im Randbereich war kein Unterschied zur Kontrolle zu beobachten. Im Vergleich zur Kontrolle waren im Randgebiet und im Gesunden weniger apoptotische Kardiomyozyten nachweisbar. Im Infarktgebiet zeigt sich kein nennenswerter Unterschied. Insgesamt ließen sich zu diesem Untersuchungszeitpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede feststellen. Anders im Vergleich zur LV-Gruppe: Hier zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung nach einer Woche eine signifikante Erhöhung apoptotischer Zellen im Gesunden ($p=0,049$). 2 Wochen post Infarkt dagegen zeigt sich im Vergleich zur LV-Gruppe im Gesunden eine Verminderung der apoptotischen Kardiomyozyten ($p=0,027$). In der hCD31-Färbung konnte man 3 Tage und 1 Woche nach dem Infarkt menschliche Zellen nachweisen: nach 3 Tagen waren lediglich 1,6% davon apoptotisch, nach 1 Woche waren hingegen von den nachgewiesenen Kardiomyozyten keine mehr apoptotisch (siehe Tabelle 9).

EPC+IGF2: 3 Tage nach dem Infarkt zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung im Infarkt- und Randgebiet eine Erhöhung der Apoptoserate. Im Infarktgebiet zeigt sich ein Trend an ($p=0,075$), im Randgebiet ist der Unterschied signifikant ($p=0,042$). Im Gesunden dagegen zeigt sich eine nicht signifikante Verminderung apoptotischer Zellen. Unter den Kardiomyozyten kann man dank der simultanen Behandlung mit IGF2 in allen untersuchten Bereichen eine verminderte Apoptoserate beobachten. Im Randgebiet ist der Unterschied signifikant ($p=0,047$) während sich im Gesunden lediglich ein Trend ($p=0,083$) abzeichnet. 1 Woche nach Infarkt zeigt sich in der

Troponin I-TUNEL-Färbung im Infarktgebiet mehr Apoptose als in der Kontrollgruppe. Im Randgebiet und im Gesunden ist dagegen eine Verminderung zu verzeichnen. Im Gesunden zeigt sich ein Trend an ($p=0,077$). Unter den doppelpositiven Zellen war im Infarktgebiet kein Unterschied, im Randgebiet eine Verminderung und im Gesunden eine Erhöhung der apoptotischen Kardiomyozyten nachweisbar. 2 Wochen nach Infarkt zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung im Infarkt- und Randgebiet eine Erhöhung der Apoptoserate, im Gesunden dagegen eine Verminderung. Im Infarktgebiet sind gleich viele apoptotische Kardiomyozyten zu zählen wie in der Kontrollgruppe, im Randgebiet etwas weniger und im Gesunden etwas mehr als in der Kontrollgruppe. Im Vergleich zur medium-IGF2-Gruppe zeigt sich eine signifikante Verminderung der TUNEL positive Zellen ($p=0,003$) und es sind signifikant weniger doppelpositive Zellen ($p=0,002$) im Gesunden nachweisbar. In der hCD31-TUNEL-Färbung sind 3 Tage nach Infarkt apoptotische Zellen nachweisbar. Interessanterweise ist davon aber nur ein kleiner Teil apoptotisch gewesen (1,14%) (siehe Tabelle 9).

Medium-IGF2: 3 Tage nach Infarkt zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung eine signifikante Erhöhung der Apoptose im Randgebiet ($p=0,011$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Infarktgebiet und im Gesunden ist ebenfalls eine leichte aber nicht signifikante Erhöhung der Apoptose zu verzeichnen. Bei den doppelpositiven Zellen zeigt sich im Infarkt- und Randgebiet eine Verminderung der Apoptose, im Gesunden zeigt sich dagegen eine Erhöhung der Apoptose.

1 Woche nach dem Infarkt zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung im Infarktgebiet eine Verminderung, im Randgebiet eine Erhöhung und im Gesunden wiederum eine Verminderung der Apoptose. Bei den doppelpositiven Zellen zeigt sich eine Erhöhung im Infarktgebiet und im Gesunden. Im Randgebiet war jedoch kein Unterschied zu beobachten.

2 Wochen nach Induktion des Myokardinfarktes zeigt sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung eine Erhöhung der Apoptose im Infarkt- und Randgebiet, im Gesunden zeigt sich dagegen eine Verminderung der Apoptose ($p=0,065$). Unter den Kardiomyozyten zeigt sich im Randgebiet und im Gesunden insgesamt eine Verminderung der Apoptoserate: Im Randgebiet ist der Unterschied signifikant ($p=0,049$), im Infarktgebiet dagegen zeigt sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe.

In der hCD31-TUNEL-Färbung können zu keinem der 3 Zeitpunkte doppeltpositive Zellen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 9).

Infarkt 3 Tage	TUNEL+	Troponin I-TUNEL+	hCD31+	hCD31 - TUNEL+
Kontrolle	11,29±1,4	2,1±1,6	0	0
LV	26,1±5,6*	1,7±1,0	0	0
IGF2-Zellen	22,1±5,5+	0	64,4±33,5	1±0,4
EPC+IGF2	14,2±1,4+	0,1±0	35,6±10,3	0,4±0,3
Medium-IGF2	15,5±2,5	0,2±0	0	0
Rand 3d				
Kontrolle	5,2±0,7	2,1±0,7	0	0
LV	5,8±1,0	0,6±0,2+	0	0
IGF2-Zellen	7,4±1,2	0,3±0,1*	0,6±0,3	0
EPC+IGF2	7,1±0,7*	0,5±0,3*	0	0
Medium-IGF2	8,9±1,1*	0,9±0,2	0	0
Gesund 3d				
Kontrolle	0,5±0,1	1,1±0,4	0	0
LV	0,6±0,2	0,4±0,2	0	0
IGF2-Zellen	1,3±0,7	0,3±0,1*	0	0
EPC+IGF2	0,3±0,1	0,4±0,2+	0	0
Medium-IGF2	0,6±0,1	1,6±0,2	0	0
Infarkt 1Woche				
Kontrolle	9,1±1,1	0	0	0
LV	8,7±1	0,7±0,5	0	0
IGF2-Zellen	6,7±0,6+	0	0,6	0
EPC+IGF2	9,9±1,3	0	0	0
Medium-IGF2	9,1±1,5	0,2±0,1	0	0
Rand 1 Woche				
Kontrolle	5,4±0,6	0,8±0,3	0	0
LV	4,8±0,6	1,1±0,3	0	0
IGF2-Zellen	3,4±0,3*	0,6±0,3	0	0
EPC+IGF2	5,2±0,6	0,4±0,2	0	0
Medium-IGF2	5,6±0,7	0,8±0,4	0	0
Gesund 1 Woche				
Kontrolle	0,4±0,1	0,8±0,4	0	0
LV	0,5±0,1	0,9±0,3	0	0

IGF2-Zellen	0,2±0,0*	0,7±0,3	0	0
EPC+IGF2	0,2±0,0+	1,1±0,4	0	0
Medium-IGF2	0,3±0,1	1±0,6	0	0
Infarkt 2 Wochen				
Kontrolle	2,9±0,5	0	0	0
LV	4,4±0,3*	0	0	0
IGF2-Zellen	2,0±0,2	0	0	0
EPC+IGF2	3,3±0,5	0	0	0
Medium-IGF2	3,1±0,2	0	0	0
Rand 2 Wochen				
Kontrolle	1,3±0,3	0,7±0,3	0	0
LV	2±0,3+	0,2±0,2	0	0
IGF2-Zellen	1,1±0,2	0,6±0,4	0	0
EPC+IGF2	1,4±0,2	0,4±0,2	0	0
Medium-IGF2	1,7±0,2	0,1±0,1*	0	0
Gesund 2 Wochen				
Kontrolle	0,25±0,1	1,1±0,3	0	0
LV	0,2±0,1	0,7±0,2	0	0
IGF2-Zellen	0,2±0,1	0,9±0,2	0	0
EPC+IGF2	0,2±0,1	1,4±0,4	0	0
Medium-IGF2	0,1±0,0+	0,6±0,2	0	0

Tabelle 9: In dieser Tabelle werden die Ergebnisse der verschiedenen Zelltherapiegruppen mit dem Wachstumsfaktor IGF2 im Vergleich zur Kontrolle zusammengefasst. Es werden die Mittelwerte ± die SEM angegeben. Die signifikanten Unterschiede sind mit einem * markiert. Die mit einem + gekennzeichneten Werte zeigen einen Trend an. Signifikante Werte bestehen ab einem p Wert von $p < 0,05$, ein Trend besteht ab einem $p = 0,05$ bis $< 0,1$.

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse fällt auf, dass sich die größten Unterschiede innerhalb der ersten 3 Tage post Infarkt zeigen. Im Randgebiet zeigen die IGF2-Zellen-Gruppe und die EPC+IGF2-Gruppe eine signifikante Verminderung der Apoptose in Kardiomyozyten im Gegensatz zur Kontrollgruppe (IGF2-Zellen: $p = 0,021$ und EPC+ IGF2 $p = 0,047$). Die Untersuchung der Gruppen Leervektor, MSC und late EPC ergibt ebenfalls eine nicht signifikante Verringerung der Apoptoserate bei Herzmuskelzellen und zeigten einen Trend an ($p = 0,06$; $p = 0,07$ und $p = 0,08$).

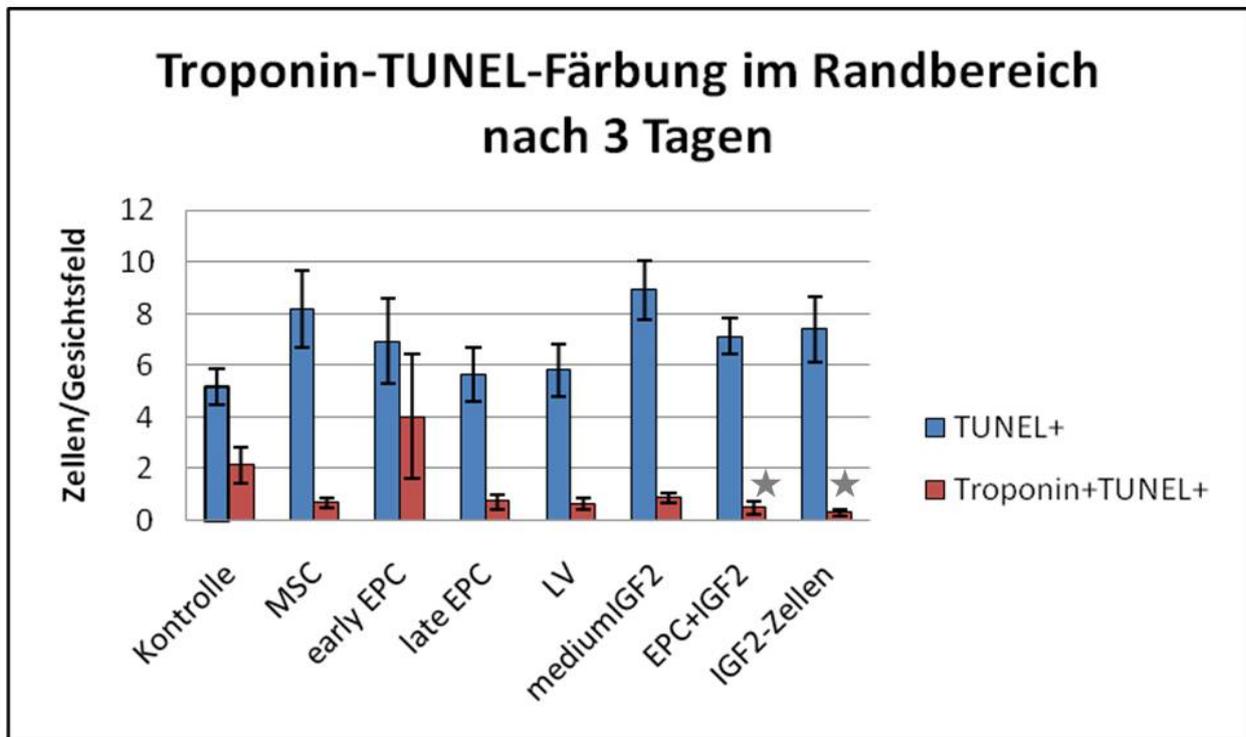


Diagramm 4: Troponin I-TUNEL-Färbung im Randbereich nach 3 Tagen. Die blauen Balken stellen die Gesamtmenge apoptotischer Zellen dar, die roten Balken entsprechen der Menge an apoptotischen Herzmuskelzellen die pro Gesichtsfeld gezählt wurden. In der IGF2-Zellen- und der EPC+IGF2-Gruppe zeigt sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle, diese Gruppen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikanz besteht bei einem $p < 0,05$.

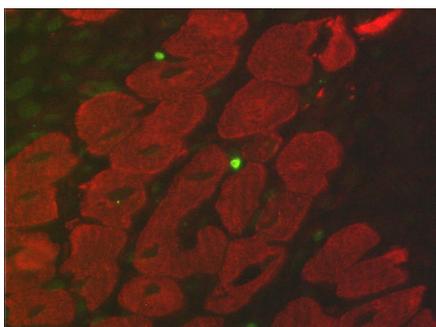


Abbildung 35: Diese Abbildung stammt aus der late-EPC-Gruppe 3 Tage nach Infarkt und zeigt zwei apoptotische Zellen (grüne Zellen) im Randbereich. Die Herzmuskelzellen stellen sich rot dar. Bei den Kardiomyozyten sind die Kerne mittelständig. Diese zeigen sich wie schwarze Aussparungen mitten in den Muskelzellen. In diesem Bild zeigt sich, dass die Kardiomyozyten nicht apoptotisch sind.

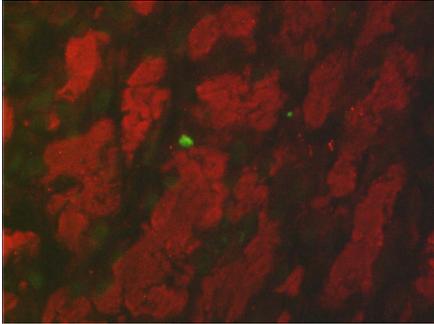


Abbildung 36: Die Abbildung (Kontrollgruppe 3 Tage) zeigt nekrotische Kardiomyozyten, sichtbar an der aufgelockerten Struktur, und eine apoptotische Zelle (grüne Zelle).

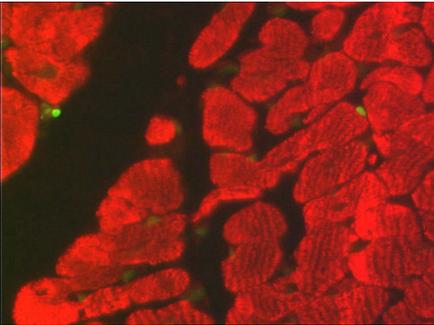


Abbildung 37: Die Abbildung zeigt zwei apoptotische Zellen im Randbereich. Wieder sind diese grün dargestellt. Die roten Zellen stellen die Kardiomyozyten dar. In dieser Abbildung sind die gewellten Troponinfibrillen besonders gut zu sehen (Kontrollgruppe 3 Tage).

Abbildungen 35-37: Troponin I-TUNEL-Färbung, 20x Vergrößerung

In den oben dargestellten Bildern (Abbildungen 35 bis 37) ist jeweils der Randbereich des Infarktes in der Troponin I-TUNEL-Färbung dargestellt. Die grün fluoreszierenden Zellen sind TUNEL-positive Zellen und somit apoptotisch. Die roten Strukturen sind Troponin-Fibrillen und markieren die Herzmuskelzellen. Es sind im Vergleich zum Infarktgebiet immer nur vereinzelte apoptotische Zellen zu sehen, wie in den obigen Abbildungen gezeigt. Die meisten Bilder stammen aus der Kontrollgruppe, da in dieser deutlich mehr apoptotische Herzmuskelzellen zu finden waren.

Im Gegensatz zum Randgebiet ist die Apoptose im Infarktgebiet erhöht. Es zeigt sich aber kaum apoptotisches Geschehen bei Kardiomyozyten. Insbesondere die Leervektor-Gruppe zeigt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle auf ($p = 0,025$), aber auch die IGF2-Zellen-Gruppe ($p = 0,074$) und die EPC + IGF2-Gruppe ($p = 0,075$) weisen einen Trend zur erhöhten Apoptoserate der Nicht-Kardiomyozyten auf.

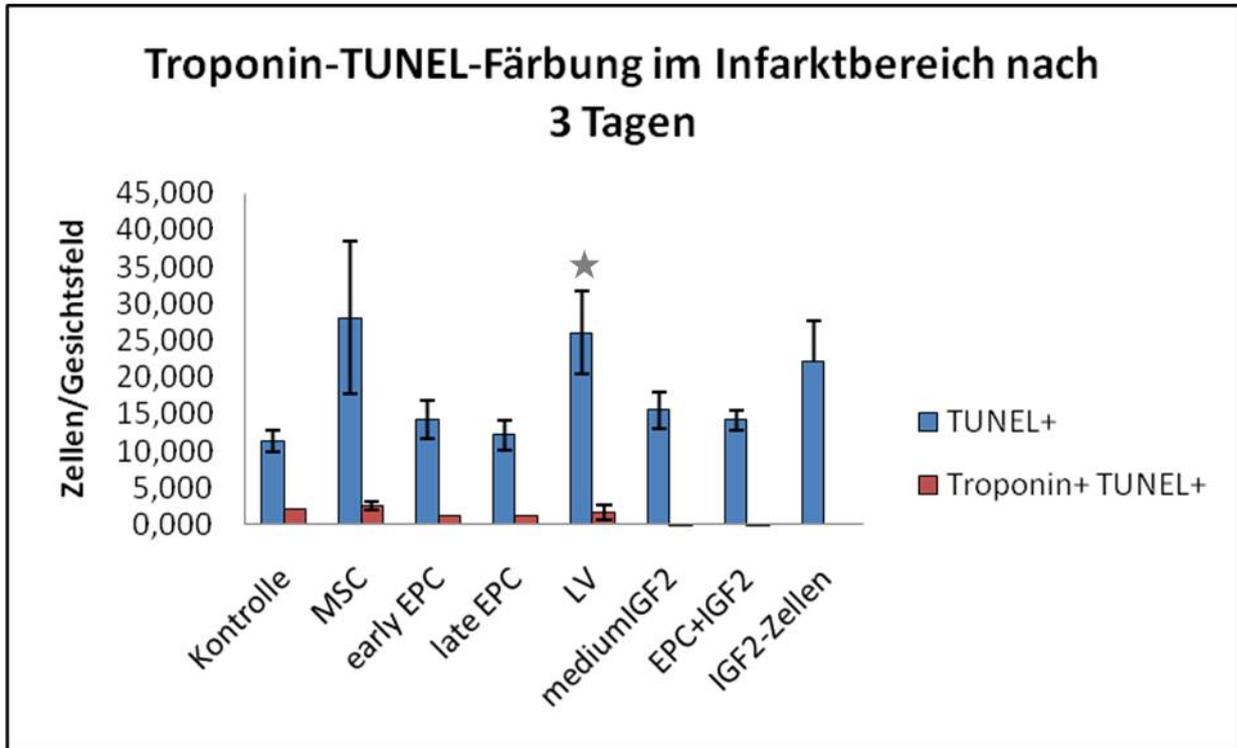


Diagramm 5: Hier werden die Ergebnisse der Troponin I-TUNEL-Färbung nach 3 Tagen im Infarktbereich dargestellt. Die blauen Balken stellen die Gesamtmenge aller apoptotischen Zellen dar, die roten Balken entsprechen der Menge an apoptotischen Herzmuskelzellen die pro Gesichtsfeld gezählt wurden. In der LV-Gruppe zeigt sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle, und ist mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikanz besteht bei einem $p < 0,05$.

Das Diagramm zeigt deutlich, dass in den Testgruppen insgesamt ein Anstieg der Apoptose stattgefunden hat. Außerdem ist ersichtlich, dass die Kardiomyozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe davon weniger betroffen sind als im Randbereich.

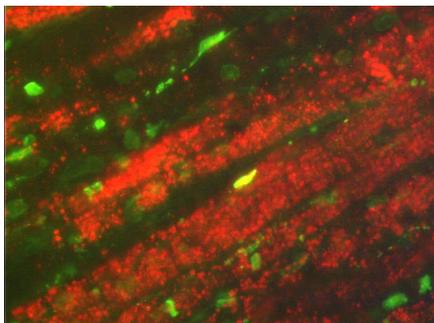


Abbildung 38: Troponin I-TUNEL-Färbung, LV-Gruppe, 3 Tage nach Infarkt: apoptotische Kardiomyozyten (rote Filamente mit grünem Kern) im Infarktgebiet zusammen mit anderen apoptotischen Zellen (grün dargestellt).

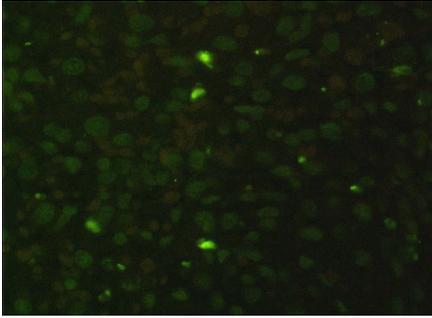


Abbildung 39: Troponin I-TUNEL-Färbung des Infarktgebiets in der EPC+IGF2-Gruppe 3 Tage nach Infarkt: apoptotische Zellen (grün). Bei den apoptotischen Zellen handelt es sich hier nicht um Kardiomyozyten. Diese würden sich um den Kern herum rot darstellen.

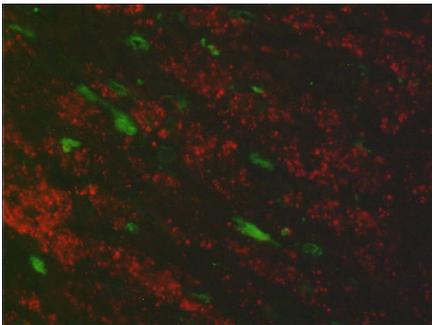


Abbildung 40: Diese Abbildung zeigt apoptotische Kardiomyozyten. Die Myofibrillen zeigen keine normale Struktur mehr - ein Zeichen der fortgeschrittenen Apoptose (early EPC-Gruppe 3 Tage nach Infarkt, **Troponin I-TUNEL-Färbung**).

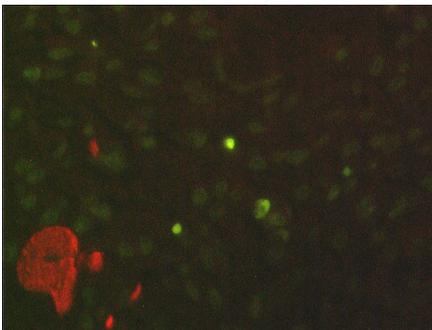


Abbildung 41: Hier sind wieder apoptotische Zellen im Infarktgebiet der late EPC-Gruppe (3 Tage nach Infarkt, **Troponin I-TUNEL-Färbung**) zu sehen. Es handelt sich dabei nicht um Kardiomyozyten. Ein nicht apoptotischer Kardiomyozyt ist links unten im Bild zu sehen (rot).

Die Abbildungen 38-41 sind in 20 x Vergrößerung aufgenommen worden.

1 Woche nach Infarkt fällt in der Troponin I-TUNEL-Färbung auf, dass in der IGF2-Zellen-Gruppe die meisten signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen sind, da in allen drei untersuchten Zonen weniger TUNEL+ Zellen vorhanden sind.

2 Wochen nach Infarkt dagegen zeigen sich in der Troponin I-TUNEL-Färbung die meisten Unterschiede in der MSC- in der early EPC und in der LV-Gruppe. Dort zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse: In der MSC- und in der LV-Gruppe kommt es wieder zu einer Erhöhung der Apoptose im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der early EPC-Gruppe kommt es hingegen zu einer Verminderung der TUNEL positive Zellen. Unter den doppelpositiven Zellen kommt es im Randgebiet zu einer signifikanten Verminderung der apoptotischen Kardiomyozyten.

Wenn man die hCD31-TUNEL-Färbung gesondert betrachtet fällt folgendes auf:

Nach 3 Tagen sind sowohl in der IGF2-Zellen-Gruppe, der EPC+IGF2-Gruppe und der late EPC-Gruppe jeweils Progenitorzellen nachweisbar. Interessanterweise sind

nach einer Woche nur noch in der IGF2-Zellen-Gruppe Progenitorzellen sichtbar. Hieraus lässt sich folgern, dass mit IGF2 vorbehandelte Zellen länger am Leben bleiben.

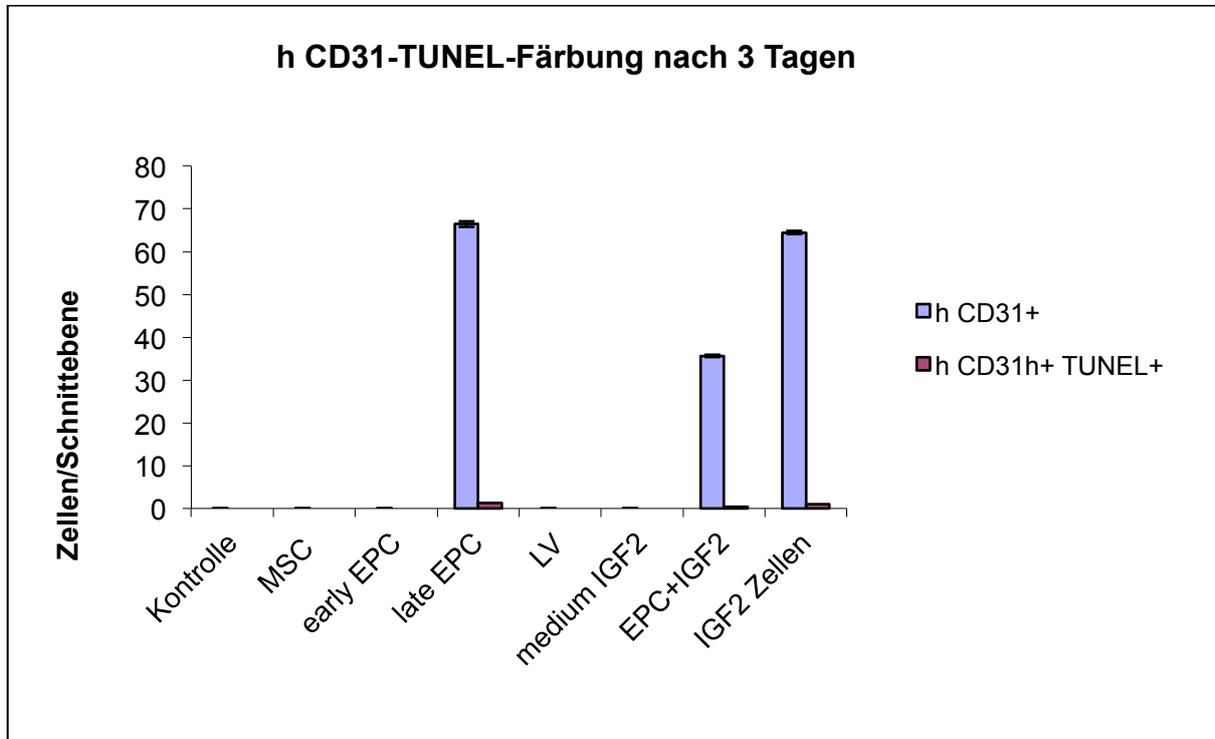


Diagramm 6: hCD31-TUNEL-Färbung 3 Tage post Infarkt. Die blauen Balken zeigen die gezählten hCD31+ Zellen. Die roten Balken stellen die apoptotischen humanen Kardiomyozyten dar. Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass nur in der late EPC-, in der EPC+IGF2 und in der IGF2-Zellen-Gruppe humane Zellen nachweisbar waren. Nur 1-2% der humanen Zellen sind apoptotisch.

Die folgenden Abbildungen stammen aus den Gruppen, die in der oben stehenden Tabelle aufgeführt sind und zeigen CD31+ humane Zellen, die in das Herz injiziert wurden (Abbildung 42 bis 46).

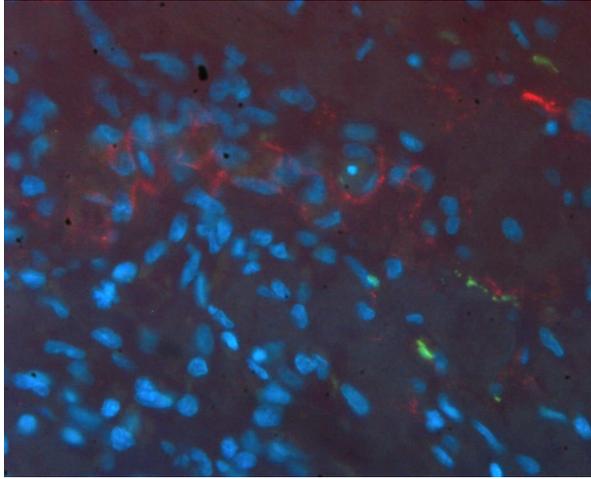


Abbildung 42 (hCD31-TUNEL-Färbung, 20x): Die Abbildung zeigt humane Zellen (rot) im Rattenmyokard (IGF2-Zellen-Gruppe, 3 Tage nach Infarkt).

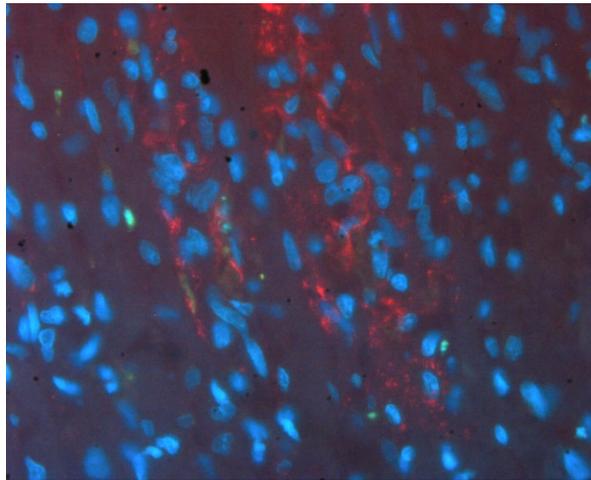


Abbildung 43 (hCD31-TUNEL-Färbung, 20x): Hier ebenfalls zeigt die Abbildung humane Zellen (rot) im Rattenmyokard (IGF2-Zellen-Gruppe, 3 Tage nach Infarkt).

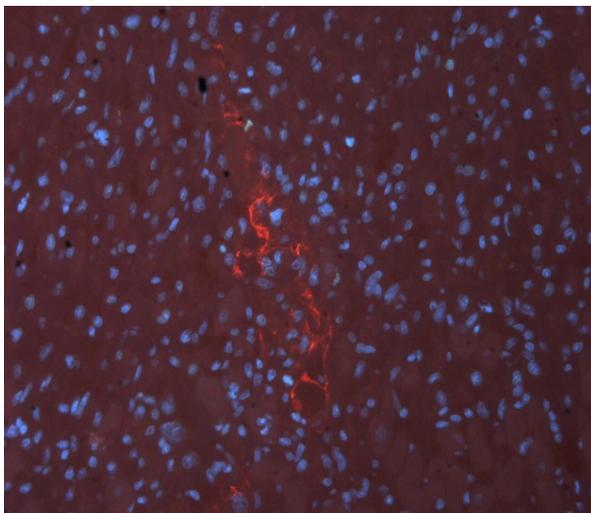


Abbildung 44 (hCD31-TUNEL-Färbung, 10x): Die Abbildung zeigt humane Zellen (rot). Die Zellkerne sind blau gefärbt (Late-EPC Gruppe, 3 Tage nach Infarkt).

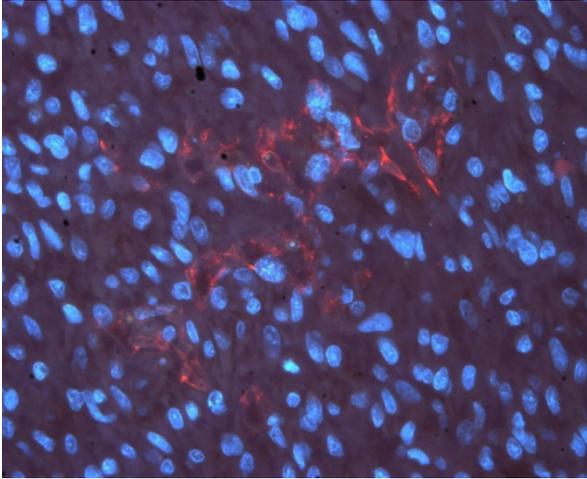


Abbildung 45 (hCD31-TUNEL-Färbung, **20x**): Hier sind ebenfalls humane Zellen rot angefärbt. Zellkerne sind blau gefärbt (Late-EPC Gruppe, 3 Tage nach Infarkt).

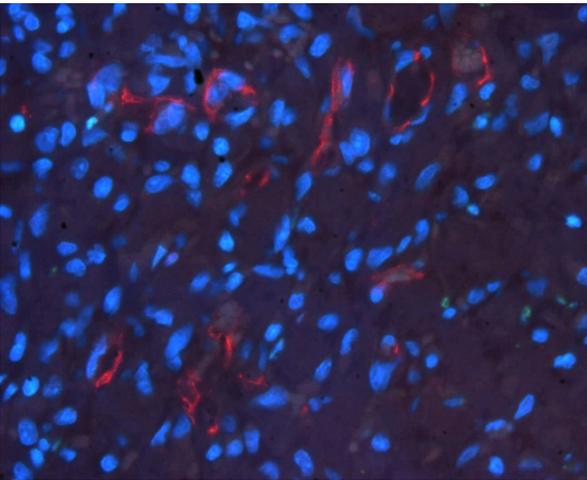


Abbildung 46 (**20x**): Die Abbildung stammt aus der EPC+IGF2-Gruppe, 3 Tage nach Infarkt und wurde mit **hCD31-TUNEL** gefärbt. Abgebildet sind zirkulär angeordnete CD31+ humane Zellen.

Aus den obigen Abbildungen wird insbesondere ersichtlich, dass sich die humanen Zellen zirkulär angeordnet haben (Abbildungen 42 bis 46). Dies lässt den Eindruck entstehen sie hätten sich als Gefäße angeordnet.

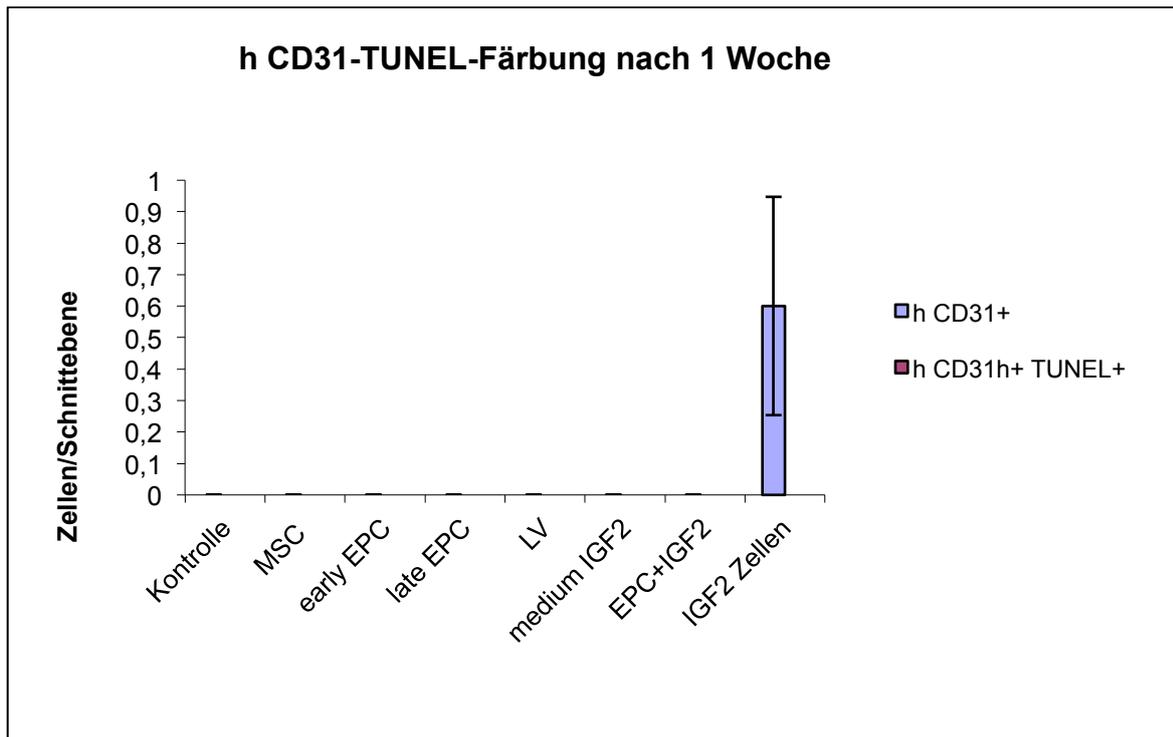


Diagramm 7: hCD31-TUNEL-Färbung nach 1 Woche. Die blauen Balken zeigen die gezählten hCD31+ Zellen. Die roten Balken stehen für die apoptotischen menschlichen Zellen. Nach einer Woche sind nur IGF2- Zellen noch auffindbar. Davon sind keine apoptotisch.

1 Woche post Infarkt waren nur in der IGF2-Zellen-Gruppe menschliche CD31 positive Zellen nachweisbar. Interessanterweise waren innerhalb dieser Gruppe alle diese Zellen TUNEL negativ und somit nicht apoptotisch.

Nach 2 Wochen waren keine hCD31 positive Zellen mehr nachweisbar.

Diskussion

In dieser Arbeit zeigen sich folgende Ergebnisse:

Bei der TUNEL-Färbung zeigt sich vergleichbar zur Kontrollgruppe drei Tage nach Infarkt ein Gefälle der apoptotischen Zellzahl vom Infarkt- zum gesunden Normalgewebe in allen Gruppen (MSC, early EPC, late EPC, LV, IGF2-Zellen, EPC+IGF2, medium-IGF2). Drei Tage nach Infarkt sind im Infarktgebiet die meisten apoptotischen Zellen aufzufinden. Die Zahl an TUNEL-positiven Zellen sinkt mit zunehmendem Abstand zum Infarktgebiet und mit zunehmendem Zeitabstand zum Infarktgeschehen ab. Auffällig ist aber, dass alle untersuchten Gruppen (MSC, early EPC, late EPC, LV, IGF2-Zellen, EPC+IGF2, medium-IGF2), drei Tage nach Infarkt mehr apoptotische Zellen im Infarktgebiet aufweisen als die Kontrollgruppe, insbesondere die LV-Gruppe zeigte einen signifikanten Unterschied auf. IGF2-Zellen- und EPC+IGF2-Zellen -Gruppe zeigten einen Trend an.

Die Troponin I-TUNEL-Färbung zeigt speziell das Verhalten der apoptotischen Kardiomyozyten im Infarktgeschehen auf. Grundsätzlich fällt auf das sowohl in der Kontrollgruppe wie auch in den anderen Gruppen (MSC, late EPC, LV, IGF2-Zellen, EPC+IGF2, medium-IGF2) bis auf die early EPC-Gruppe die apoptotischen Herzmuskelzellen nur einen geringen Teil der apoptotischen Zellen im Infarktgeschehen ausmachen. Bis auf die bereits erwähnte early EPC-Gruppe scheint sich dieser Effekt durch die Zelltherapie (MSC, late EPC-Gruppe) und durch die Zelltherapie mit Wachstumsfaktor (LV, medium-IGF2, IGF2-Zellen, EPC+IGF2) noch zu verstärken.

Die EPC + IGF2- und die IGF2-Zellen-Gruppe zeigen in dieser Färbung, drei Tage nach Infarkt, einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf.

Mit der hCD31-Färbung wurden transplantierte endotheliale Progenitorzellen detektiert. Drei Tage nach Infarkt waren in der lateEPC-, in der EPC+IGF2-Zellgruppe sowie in der IGF2-Zellen-Gruppe menschliche Progenitorzellen nachweisbar. Eine Woche nach Infarkt waren diese nur noch in der IGF2-Zellen-Gruppe nachweisbar.

Bei der hCD31-TUNEL-Färbung waren drei Tage nach Infarkt nur 1-2 % der nachgewiesenen hCD31 positiven Zellen in den oben beschriebenen Gruppen apoptotisch. Nach einer Woche waren keine doppelpositive Zellen mehr nachweisbar.

Drei Tage nach Infarkt zeigt sich im Infarktgebiet eine erhöhte Apoptoserate. Auffällig ist ebenfalls eine erhöhte Leukozyten- und Fibroblastenzahl bei Zelltherapie mit und ohne Wachstumsfaktoren, im Vergleich zur Kontrollgruppe, die sich im Infarktgebiet in der HE-Färbung darstellt. Ein injektionsbedingtes Artefakt ist eher unwahrscheinlich. Da die Kontrollgruppe ebenfalls eine Injektion mit PBS erhielt, müsste sie konsequenterweise ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate zeigen, was jedoch nicht der Fall war. Des Weiteren wäre dieser Effekt nicht nur auf das Infarktgebiet begrenzt. Der beobachtete Effekt könnte auch durch die Progenitorzellen selbst ausgelöst werden, die als exogen eingebrachte Xenografts eine verstärkte Entzündungsreaktion hervorrufen könnten. Da die injizierten Zellen jedoch eher im Randbereich, nahe ihrer Injektionsstelle gefunden wurden, müsste dieser Effekt dort besonders stark auftreten. Doch dort zeigt sich die Apoptose erniedrigt im Vergleich zum Infarktgebiet. Eine weitere mögliche Hypothese wäre, dass das IGF2 alleine bzw. die Progenitorzellen durch Zytokinsekretion die Entzündungszellen anlocken, dadurch die Bildung von Granulationsgewebe fördern und somit gleichzeitig die Entzündungsreaktion verstärken. Einige zum Teil bereits in der Einleitung erwähnte Studien zeigten, dass Stammzellen nach Herzinfarkt durch parakrine Wirkungen die Wundheilung fördern und die Größe des Infarktgebietes reduzieren (Kupatt et al. 2005; Gneccchi et al. 2005; Uemura et al. 2006, Yoon et al., 2005, Gneccchi et al. 2008). Dies könnte hier zutreffen wie in den obengenannten Studien, die den positiven Effekt der Stammzellentherapie und von Wachstumsfaktoren auf das Remodeling und die Funktion aufzeigten (Kupatt et al. 2005; Gneccchi et al. 2005; Uemura et al. 2006, Yoon et al., 2005, Gneccchi et al. 2008).

Wie bereits oben erwähnt kommt es durch die Zelltherapie mit und ohne Wachstumsfaktoren zu einer Erhöhung der Apoptoserate im Infarktbereich, was sich außerdem in einer stärker ausgeprägten Entzündungsreaktion in der HE-Färbung widerspiegelte. Bereits Hori und Nishida zeigten einen unmittelbaren Zusammenhang der Entzündungsreaktion bei Myokardinfarkt und Apoptose. Die durch den Myokardinfarkt ausgeschütteten reaktiven Sauerstoffspezies und inflammatorische Zytokine regulieren über den TNF die Apoptose (Hori und Nishida, 2008).

Im Randbereich des Infarktareals hingegen kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Apoptose in Herzmuskelzellen. Signifikant ist dieser Effekt in der Versuchsgruppe, die zusätzlich mit Wachstumsfaktoren therapiert worden ist. Schon andere Gruppen wie zum Beispiel Takahashi und Kollegen konnten zeigen, dass die Stammzelltherapie einen protektiven Effekt bei ischämischen Herzmuskelzellen durch parakrine Sekretion hat (Takahashi et al., 2006; Yoon et al., 2005; Uemura et al., 2006).

Ein weiterer Grund für die reduzierte Apoptose wäre die von uns beobachtete gesteigerte Neovaskularisation. In den Randbereichen des Infarktgebietes sind die Zellen am längsten der Hypoxie ausgesetzt. Durch die vermehrte Kapillarbildung, die in beiden Gruppen vorhanden, aber in der Wachstumsfaktorgruppe am stärksten sichtbar war, kommt es früher zur gesteigerten Sauerstoffzufuhr und damit zur Normoxie, was den Untergang von Herzmuskelzellen reduzieren kann (Uemura et al. 2006; Hinkel. et al. 2008; Mirotsov et al. 2007; Alfaro et al., 2008).

Die oben genannten Beobachtungen stimmen gut mit den Ergebnissen bisheriger Studien überein: Yoon und Kollegen zum Beispiel zeigten anhand eines Ischämie-modells, dass die Implantation der Zellgruppen early und late EPC sowohl einzeln, aber insbesondere zusammen zu einer generellen Verminderung der apoptotischen Kardiomyozyten führt. In beiden Untersuchungen konnte ebenfalls eine antiapoptotische Wirkung der Zelltherapie auf Kardiomyozyten gezeigt werden (Yoon et al, 2005; Jiang et al. 2008).

In der late EPC-Gruppe waren zum Untersuchungszeitpunkt noch humane Zellen nachweisbar. Interessanterweise weisen diese Zellen in unserem Infarktmodell zudem einen nachhaltigen kardioprotektiven Effekt auf. Wir gehen davon aus, dass dies unter anderem auf eine starke Wirkung parakrin sezernierter Faktoren zurückzuführen ist, die kürzlich von Dubois und Kollegen beschrieben wurde. Die Autoren der erwähnten Studie konnten bei Implantation von late EPCs in einem porcinen Myokardinfarkt-Modell eine erhöhte PLGF-Sekretion nachweisen, die eine antiapoptotische Wirkung hatte (Dubois et al., 2010).

Bei Betrachtung der Zelltherapiegruppen mit dem Wachstumsfaktor IGF2 zeigt sich ebenfalls eine generelle Erhöhung der Apoptose im Infarktgebiet und eine Verminderung der apoptotischen Kardiomyozyten im Randgebiet. Auch hier sind die

stärksten Veränderungen 3 Tagen post Infarkt zu sehen. In der IGF2-Zellen-Gruppe und der medium-IGF2-Gruppe war zu diesem Zeitpunkt eine stärker ausgeprägte Entzündungsreaktion als in den anderen Gruppen zu sehen.

An dem Beobachtungszeitpunkt: 1 Woche nach Infarkt waren in der IGF2-Zellen-Gruppe die meisten Unterschiede zu verzeichnen. Es zeigten sich in der HE-Färbung mehr Gefäße, Mono- und mehr Granulozyten als in der Kontrollgruppe aber vor allem eine verringerte Apoptose in allen Bereichen. Die IGF2-Zellen-Gruppe war jedoch die einzige Gruppe, in der humane CD31 positive Zellen auch 1 Woche nach Infarkt nachgewiesen werden konnten.

Zudem waren 2 Wochen nach Infarkt etwas mehr Gefäße in der IGF2-Zellen-Gruppe zu zählen. Dieses Phänomen zeigte sich ebenfalls in der medium-IGF2-Gruppe. Humane Progenitorzellen (hCD31 positive Zellen) wurden sowohl in der IGF2-Zellen-Gruppe und in der EPC+IGF2-Gruppe entdeckt.

Interessant ist ebenfalls die Anordnung der hCD31 positiven Zellen. Die zirkuläre Anordnung der auf diese Art identifizierten Endothelzellen lässt die Neuformation von Gefäßen vermuten, was mit der von uns gezeigten vermehrten Gefäßbildung in den Versuchsgruppen mit Gabe von IGF2 korrelieren würde.

Diese Ergebnisse, der HE-Färbung und der morphologischen Beschreibung der Zellanordnung sind rein semiquantitativer Natur und sind mit den bisherigen Studien konkordant, in der IGF2 proangiogenetische Wirkungen aufweist, wie zum Beispiel in der Studie von Kotylar und Kollegen, die die Wirkung des IGF2 auf das infarzierte Herz von Schweinen untersuchten (Kotylar et al., 2001).

Die von uns beobachteten positiven Effekte waren vorrangig in der IGF2-Zellen-Gruppe sowie in der medium-IGF2-Gruppe zu verzeichnen. In diesem Falle hebt sich wieder die Wichtigkeit des schon vorher beschriebenen vermutlich parakinen Effektes hervor, der in diesem Falle durch IGF2 mediiert wird. Kim und Kollegen und Kwon und Kollegen beobachteten in ihren Studien den proangiogenetischen Effekt des IGF2s über die Regulierung der Expression des Faktors VEGFs welches wiederum zur verstärkten Neovaskularisation führte (Kim et al., 2005, Kwon et al., 2004, Chao and D'Amore, 2008).

Wenn man die Zellgruppen mit und ohne Wachstumsfaktor miteinander vergleicht sind die meisten Unterschiede in der IGF2-Zellen-Gruppe zu sehen. Wie schon oben beschrieben ist es die einzige Gruppe in der die CD31 humanen positiven Zellen nach 3 und nach 7 Tagen nachgewiesen werden konnten, außerdem deutet sich

eine vermehrte Gefäßneubildung im Vergleich zur Kontrollgruppe, zu allen 3 Zeitpunkten an. Das IGF2, welches von der IGF2-Zellen-Gruppe vermehrt sezerniert wird (Sitz, 2006), wirkt sich somit positiv auf die Neoangiogenese aus und wirkt kardioprotektiv auf die gefährdeten Kardiomyozyten vor allem im Randbereich. Diese Mechanismen könnten sich positiv auf das Remodeling und somit auch auf die Funktion auswirken. Somit würde sich die These über die vorrangige Rolle des parakrinen Mechanismus im Heilungs- und Remodeling-Prozess bei Myokardinfarkt bestätigen (Gnecchi et al., 2009; Nguyen et al., 2010; Dubois et al., 2010).

Beim Vergleich der zwei untersuchten Therapiegruppen treten in erster Linie zwei große Unterschiede zutage: Wie schon oben angesprochen, ist die antiapoptotische Wirkung auf die Herzmuskelzellen im Randbereich in den IGF2 Behandlungsgruppen ausgeprägter. Dies könnte auf eine direkt antiapoptotische Wirkung des Wachstumsfaktors selbst zurückzuführen sein: Kotylar und Kollegen konnten bei der Administration von IGF1 und -2 bei Herzinfarkt an weiblichen Schweinen eine signifikante Reduktion des Zelltodes in Kardiomyozyten zeigen, was unter anderem zur Selektion von IGF2 für dieses Studienprotokoll führte.

Die in den von uns durchgeführten hCD31-Färbungen beobachteten Morphologien legen außerdem nahe, dass die gefärbten Zellen sich zu Gefäßen angeordnet haben (Abbildungen 44 - 45). Dieser Effekt lässt sich ebenfalls durch die Proliferations-induzierende Wirkung des IGF2 erklären (Kotylar et al., 2001; Clemmons 2001).

Interessanterweise bleibt jedoch unklar, was mit den injizierten Zellen weiter geschieht. In dieser Arbeit konnten sie in allen Gruppen zwar nach 3 Tagen nachgewiesen werden, jedoch nur in der IGF2-Gruppe noch nach einer Woche detektiert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen einer anderen Studie, die ebenfalls EPCs bis zu einer Woche nach Injektion in ischämisches Gewebe nachweisen konnte. Doch Suzuki und Kollegen fanden heraus, dass 80% der eingebrachten Myoblasten innerhalb der ersten 24 Stunden durch oxydativen Stress und freie Radikale, die im geschädigten Herzen gehäuft vorkommen, zugrunde gehen. Weitere 8,6% sterben durch die Zytokin-vermittelte Entzündungsreaktion innerhalb der ersten 72 Stunden (Suzuki et al. 2004). Somit verbleibt nur ein sehr kleiner Prozentsatz der injizierten Zellen, um den erhofften therapeutischen Effekt zu erzielen. In der Tat können auch hier relativ wenige Zellen (ca. 60 Zellen pro

Gesichtsfeld) im Vergleich zur injizierten Anzahl aufgefunden werden. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass (unabhängig vom Zelltyp) der größte Anteil der Zellen innerhalb der ersten Wochen stirbt (Balsam et al., 2004, Noiseux et al., 2006, Nakamura et al., 2007). Denkbar wäre ebenfalls eine Anti-Transplant-Reaktion. Die Versuche wurden zwar an thymuslosen Ratten durchgeführt, doch kann eine Immunreaktion nicht ausgeschlossen werden, die zu einem gewissen Maß an Abstoßung geführt haben könnte, der die menschlichen Zellen zerstört hat. Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir nur einen geringen Prozentsatz (1-2%) der Zellen identifizieren, die apoptotisch werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die injizierten Zellen nekrotisch werden. Jedoch müsste sich das Milieu 3 Tage post Infarkt bei fortbestehender Perfusion soweit stabilisiert haben, dass es die Zellen nicht mehr weiter schädigt. Auch Empfängerzellen werden zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nekrotisch. Die wahrscheinlichste Möglichkeit ist, dass die Zellen sich weiterentwickeln und ausdifferenzieren und infolgedessen ihre „normale“ Markerexpression verlieren. Infolge dieser sogenannten „Transdifferenzierung“ wären sie durch unsere Färbungen nicht mehr zu identifizieren. Suzuki und Kollegen konnten außerdem nachweisen, dass es ab der 24sten Stunde zu einer Proliferation der Myoblasten kommt. Ein weiteres Argument, das für die Differenzierung spricht ist die Gefäßanordnung, die sich in den schon oben besprochenen Bildern zeigt (Abbildungen 44 - 45). Diese zeigen, dass sich die Zellen in das Zielgewebe integrieren und dort eine Funktion ausüben (Kupatt et al., 2005; Suzuki et al., 2004).

Tierversuche und erste klinische Studien zeigten nach Injektion von Stammzellen eine Verbesserung der Funktion schon wenige Tage post Infarkt. Dieser schnelle Effekt und der deutliche Benefit sind jedoch vermutlich weniger auf die Transdifferenzierung, Fusion oder die Entstehung neuer Kardiomyozyten zurückzuführen. Vielmehr wird nach und nach ein Konsens erreicht, dass diese Effekte vielmehr durch parakrine Sekretion der Stammzellen verursacht werden: Sie fördern dadurch die Angiogenese, verhindern die Apoptose der Herzmuskelzellen und aktivieren die ortsansässigen Stammzellen (Fuchs et al., 2001; Kamihata et al., 2001; Kocher et al., 2001; Uemura et al., 2006; Cho et al., 2007).

Ob die Gruppen, die zusätzlich mit dem IGF2 behandelt wurden einen - wie zu erwarten - positiven Effekt auf das Remodeling und eine bessere Funktion aufweisen wird derzeit im Rahmen einer weiteren Arbeit untersucht.

Limitationen: In dieser Studie ist untersucht worden ob und wie viele Zellen apoptotisch sind und ob insbesondere die Kardiomyozyten betroffen sind. Doch welche Zellen apoptotisch sind bleibt weiter unklar. Interessant wäre eine zusätzliche Färbung mit einem Leukozyten-Marker. Bereits in der HE-Färbung hat sich eine Erhöhung der Entzündungsreaktion angedeutet. Mit einer spezifischen Färbung könnte eine Erhöhung der Leukozyten bewiesen werden, gleichzeitig könnte man untersuchen ob und in welchem Ausmaß diese Zellen apoptotisch werden um somit ihre Rolle im Infarktgeschehen besser einordnen zu können, zudem würde ein Gefäßmarker uns erlauben die Wirkung der Zelltherapie mit und ohne Wachstumsfaktoren auf die Gefäßneubildung quantitativ zu erforschen.

Schlussfolgerung

Die beobachteten Effekte (proangiogentischen Effekt, Augmentation der Entzündungsreaktion und antiapoptotischer Effekt auf Kardiomyozyten), sind am ehesten auf die parakrine Sekretion der Progenitorzellen beziehungsweise auf das IGF2 zurückzuführen. Im Infarktbereich kommt es durch Chemotaxis zu einer ausgeprägteren Entzündungsreaktion mit einer erhöhten Anzahl von Entzündungszellen. Dementsprechend sind dort auch mehr apoptotische Zellen nachweisbar.

Im Gegensatz dazu wird im Randbereich die antiapoptotische Wirkung der Stammzellen offensichtlich. Interessanterweise ist diese Wirkung bei simultaner Applikation von IGF2 noch ausgeprägter. Ähnliche Effekte treten auch im Rahmen der beobachteten Neovaskularisation auf: Eine Behandlung mit IGF2 führt zu einer gesteigerten Gefäßneubildung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch diese erhöhte Gefäßdichte wird die Ischämiezeit der Zellen in der Periinfarktzone verkürzt, was in einer weiteren Reduktion der Apoptose resultiert.

Insgesamt ist die Rolle, die die Apoptose im Verletzungs- und Heilungsprozess beim Myokardinfarkt spielt, nicht vollständig geklärt, und weitere detaillierte Untersuchungen werden nötig sein. Ein tieferes Verständnis der Prozesse, die zu Apoptose bzw. Nekrose beim Herzinfarkt führen sind jedoch verbunden mit der Hoffnung, diese jeweils besser kontrollieren und eventuell positiv beeinflussen zu können. Trotz intensiver Forschung im Bereich der Stammzelltherapie bei akutem Myokardinfarkt ist es jedoch leider bisher noch nicht gelungen das Verfahren als klinische Standardtherapie zu etablieren. Von der Darreichungsform der Zellen über den richtigen Zeitpunkt, und die Art der verwendeten Stammzellen, bis zur Therapie mit oder ohne Wachstumsfaktoren: viele Details bedürfen noch weiterer Optimierung. Doch die vorgelegte Arbeit zusammen mit bisherigen Studien zeigen dass die Stammzelltherapie - insbesondere in Kombination mit IGF2 – ein großes therapeutisches Potential besitzt und einen weiteren notwendigen Schritt zur verbesserten Therapie des Myokardinfarktes darstellt.

Zusammenfassung

In einem Herzinfarktmodell bei der Nacktratte wurden die Effekte einer Transplantation von Progenitorzellen und der Einfluss von IGF2 auf die lokale Apoptose und Entzündungsreaktion untersucht. Es zeigte sich im Infarktbereich eine gesteigerte Entzündungsreaktion und eine erhöhte Apoptoserate von Zellen, die keine Herzmuskelmarker exprimieren. Im Randbereich fanden sich mehr Gefäße und weniger apoptotische Herzmuskelzellen. Dies könnte durch parakrine Effekte der Progenitorzellen erklärt werden.

Literaturverzeichnis

Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori V M, Perin E C, Hornung C A, Zuba-Surma E K, Al-Mallah M, Dawn B

Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis

Arch Intern Med. 2007 May 28;167(10):989-97

Adams J M, Cory S

The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival

Science. 1998 Aug 28;281(5381):1322-6

Akagi Y, Liu W, Zebrowski B, Xie K, Ellis L M

Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I

Cancer Res. 1998 Sep 1;58(17):4008-14

Alfaro M P, Pagni M, Vincent A, Atkinson J, Hill M F, Cates J, Davidson J M, Rottman J, Lee E, Young P P

The Wnt modulator sFRP2 enhances mesenchymal stem cell engraftment, granulation tissue formation and myocardial repair

Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Nov 25;105(47):18366-71. Epub 2008 Nov 18

Anversa P, Olivetti G, Leri A, Liu Y, Kajstura J

Myocyte cell death and ventricular remodeling

Curr Opin Nephrol Hypertens. 1997 Mar;6(2):169-76

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattenman G and Isner J M

Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.

Science 1997;275(5302): 964-7

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner J M

Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization
Circ Res 1999; 85: 221-228

Ashkenazi A, Dixit V M

Death receptors: signaling and modulation

Science. 1998 Aug 28;281(5381):1305-8. Review.PMID: 9721089

Balsam L B, Wagers A J, Christensen J L, Kofidis T, Weissman I L, Robbins R C
Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium

Nature. 2004 Apr 8;428(6983):668-73. Epub 2004 Mar 21

Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W

Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety
Circulation. 2005 Aug 30;112(9 Suppl):I178-83

Battler A, Hasdai D, Goldberg I, Ohad D, Di Segni E, Bor A, Varda-Bloom N, Vered Z, Kornowski R, Lake M, D. Nass, N. Savion

Exogenous insulin-like growth factor II enhances post-infarction regional myocardial function in swine

Eur Heart J. 1995 Dec;16(12):1851-9

Bell G I, Gerhard D S, Fong N M, Sanchez-Pescador R, Rall L B

Isolation of the human insulin-like growth factor genes: insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous

Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Oct;82(19):6450-4

Beitnes JO, Hopp E, Lunde K, Solheim S, Arnesen H, Brinchmann J E, Forfang K, Aakhus S

Long-term results after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: the ASTAMI randomised, controlled

study

Heart.2009 Dec;95(24):1983-9. Epub 2009 Oct 14

Blütmann B D, Kirkpatrick C J, Baba H A

Herz, Normale Struktur und Funktion und Myokardinfarkt

In „Pathologie“

Böcker W, Denk H, Heitzh P H U

Elsevier Urban & Fischer 3. Auflage München, Jena, 2004,442-443 und 465-469

Brown J M

Cell status--dead or alive?

Nat Med. 1996 Oct;2(10):1055-6

Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K, Lefer A M

Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 15;92(17):8031-5

Buller N, Gillen D, Casciano R, Doyle J, Wilson K

A pharmaco-economic evaluation of the Myocardial Ischaemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) study in the United Kingdom.

Pharmacoeconomics. 2003;21 Suppl 1:25-32

Burt R K, Loh Y, Pearce W, Beohar N, Barr W G, Craig R, Wen Y, Rapp J A, Kessler J

Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases

JAMA. 2008 Feb 27;299(8):925-36

Busk M, Maeng M, Rasmussen K, Kelbaek H, Thayssen P, Abildgaard U, Vigholt E, Mortensen L S, Thuesen L, Kristensen S D, Nielsen T T, Andersen H R; DANAMI-2 Investigators

The Danish multicentre randomized study of fibrinolytic therapy vs. primary angioplasty in acute myocardial infarction (the DANAMI-2 trial): outcome after 3 years follow-up.

Eur Heart J. 2008 May;29(10):1259-66. Epub 2007 Oct 23

Cao J M, Fishbein M C, Han J B

Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia
Circulation 2000;101:1960-1969

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A

Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele

Nature. 1996 Apr 4;380(6573):435-9

Chao W, D'Amore P A

IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease.

Cytokine Growth Factor Rev. 2008 Apr;19(2):111-20. Epub 2008 Mar 4. Review.

Chen S, Liu Z, Tian N, Zhang J, Yei F, Duan B, Zhu Z, Lin S, Kwan T W

Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery

J Invasive Cardiol. 2006 Nov;18(11):552-6.

Cheng E H, Kirsch D G, Clem R J, Ravi R, Kastan M B, Bedi A, Ueno K, Hardwick J M

Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases

Science. 1997 Dec 12;278(5345):1966-8

Cho HJ, Lee N, Lee JY, Choi YJ, Li M, Wecker A, Jeong JO, Curry C, Qin G, Yoon

YSRole of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart

J Exp Med. 2007 Dec 24;204(13):3257-69. Epub 2007 Dec 10

Cleary M L, Smith S D, Sklar J

Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation

Cell. 1986 Oct 10;47(1):19-28

Clemmons D R

Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships

Endocr Rev. 2001 Dec;22(6):800-17

Collucci W

Apoptosis in the heart

The New England Journal of Medicine 1996, 335:1124-1226

Crozatier B, Ashraf M, Franklin D, Ross J Jr

Sarcomere length in experimental myocardial infarction: evidence for sarcomere overstretch in dyskinetic ventricular regions

J Mol Cell Cardiol (1977); 9: 785-797

Cryns V L, Byun Y, Rana A, Mellor H, Lustig K D, Ghanem L, Parker P J, Kirschner M W, Yuan J

Specific proteolysis of the kinase protein kinase C-related kinase 2 by caspase-3 during apoptosis. Identification by a novel, small pool expression cloning strategy

J Biol Chem.1997 Nov 21;272(47):29449-53

Decker R S, Cook M G, Behnke-Barclay M, Decker M L

Some growth factors stimulate cultured adult rabbit ventricular myocyte hypertrophy in the absence of mechanical loading.

Circ Res. 1995;77:544 –555.

Dill T, Schächinger V, Rolf A, Möllmann S, Thiele H, Tillmanns H, Assmus B, Dimmeler S, Zeiher A M, Hamm C

Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left

ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy

Am Heart J. 2009 Mar;157(3):541-7. Epub 2009 Jan 31

Doerr, Seifert, Uehlinger

Durchblutungsstörungen des Myokard

In: „Pathologische Anatomie des Herzens und seiner Hüllen 1“

Spezielle pathologische Anatomie

Hort W

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2000: 727-728

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D J, Horwitz E

Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement

Cytotherapy. 2006;8(4):315-7

Donehower L A, Harvey M, Slagle B L, McArthur M J, Montgomery C A Jr, Butel J S, Bradley A

Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours

Nature. 1992 Mar 19;356(6366):215-21

Dubois C, Liu X, Claus P, Marsboom G, Pokreisz P, Vandenwijngaert S, Dépelteau H, Streb W, Chaothawee L, Maes F, Gheysens O, Debyser Z, Gillijns H, Pellens M, Vandendriessche T, Chuah M, Collen D, Verbeken E, Belmans A, Van de Werf F, Bogaert J, Janssens S.

Differential effects of progenitor cell populations on left ventricular remodeling and myocardial neovascularization after myocardial infarction.

J Am Coll Cardiol. 2010 May 18;55(20):2232-43.

Duerr R L, Huang S, Miraliakbar H R, Clark R, Chien K R, Ross J Jr

Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure

J Clin Invest. 1995 Feb;95(2):619-27

Elsässer A, Suzuki K, Schaper J.

Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure.

J Mol Cell Cardiol. 2000 May;32(5):711-24. Review.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S

A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD

Nature. 1998 Jan 1;391(6662):43-50

Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diedrich K W, Emmrich F, Kluge R, Kendziorra K, Sabri O, Schuler G and Hambrecht R

Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study

Circ Res 2005;97(8): 756-62

Fabiato A

Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum

Am J Physiol (1983); 245: C1-14

Fleischhauer K

Das Herz, Makroskopische Anatomie des Herzens

Benninghoff, Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen

Drenckhahn D., Zenker W.

Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 1994, 15. Auflage, Band 1, 623-630

Fox KA, Mehta SR, Peters R, Zhao F, Lakkis N, Gersh BJ, Yusuf S

Benefits and risks of the combination of clopidogrel and aspirin in patients undergoing surgical revascularization for non-ST-elevation acute coronary syndrome: the Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events (CURE) Trial.

Circulation. 2004 Sep 7;110(10):1202-8. Epub 2004 Aug 16

Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J.

Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion.

J Mol Cell Cardiol. 2000 Feb;32(2):197-208.

Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, Weissman NJ, Leon MB, Epstein SE, Kornowski R

Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia

J Am Coll Cardiol. 2001 May;37(6):1726-32

Ge J, Li Y, Qian J, Shi J, Wang Q, Niu Y, Fan B, Liu X, Zhang S, Sun A, Zou Y

Efficacy of emergent transcatheter transplantation of stem cells for treatment of acute myocardial infarction (TCT-STAMI)

Heart. 2006 Dec;92(12):1764-7. Epub 2006 Jun 14

Genoni M, Malacrida R, Sessa F, Siegrist P, Maggioni A P, Moccetti T Z

Long-term safety of an early ACE-inhibitor treatment of patients with acute myocardial infarction: results of the 3 year follow-up period on 696 Swiss patients randomized to the ISIS-4 trial. ISIS-Switzerland Study Group

Kardiol. 2000 Feb;89(2):81-3

Gnecchi M, He H, Liang O D, Melo L G, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt R E, Ingwall J S, Dzau V J

Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells

Nat Med. 2005 Apr;11(4):367-8

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau V J
Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy
Circ Res. 2008 Nov 21;103(11):1204-19

Gottlieb R A, Burleson K O, Kloner R A, Babior B M, Engler R L
Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes
The Journal of Clinical Investigation, 1994, 94: 1621-1628

Gould S E
Pathology of the heart and blood vessels
Thomas, Springfield Ill, 1968

Green D R, Reed J C
Mitochondria and apoptosis
Science. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12

Gulati R, Jevremovic D, Peterson T E, Chatterjee S, Shah V, Vile R G and Simari R
D
Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult
human blood
Circ Res 2003;93(11): 1023-5

Haimovitz-Friedman A, Kan C C, Ehleiter D, Persaud R S, McLoughlin M, Fuks Z,
Kolesnick R N
Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate
apoptosis
J Exp Med. 1994 Aug 1;180(2):525-35

Hakem R, Hakem A, Duncan G S, Henderson J T, Woo M, Soengas M S, Elia A, de
la Pompa J L, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman S A, Lowe S W,
Penninger J M, Mak T W
Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo
Cell. 1998 Aug 7;94(3):339-52.PMID: 9708736

Hale A J, Smith C A, Southerland L C, Stoneman V E A, Longthorne V L, Culhane A C, Williams G T

Replikation und Gentechnik

Originalartikel:Apoptosis: molecular regulation of cell death

Eur. J. Biochem. 1996; 236: 1-26

Löffler G, Petrides P E

In: „Biochemie & Pathobiochemie“

Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Hongkong London Mailand Paris Tokyo
2003 214-215

Hierholzer K, Schmidt R F

Herz, Allgemeine Pathophysiologie der Myokardischämie

In „Pathophysiologie des Menschen“

Edition medizin VHC Weinheim, Basel, New York, NY, 1991, S. 16.13-16.14

Hinkel R, El-Aouni C, Olson T, Horstkotte J, Mayer S, Müller S, Willhauck M, Spitzweg C, Gildehaus FJ, Münzing W, Hannappel E, Bock-Marquette I, DiMaio J M, Hatzopoulos A K, Boekstegers P, Kupatt C

Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection

Circulation. 2008 Apr 29;117(17):2232-40. Epub 2008 Apr 21

Hockenbery D M, Oltvai Z N, Yin X M, Milliman C L, Korsmeyer S J

Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis

Cell. 1993 Oct 22;75(2):241-51

Hori M, Nishida K

Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction.

Cardiovasc Res. 2009 Feb 15;81(3):457-64

Hur J, Yoon C H, Kim H S, Choi J , Hoi H , Kang H J, Hwang K K, Oh B H, Lee M M and Park Y B

Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24(2): 288-93

Iwami Y, Masuda H, Asahara T.

Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future.

J Cell Mol Med. 2004 Oct-Dec;8(4):488-97. Review

Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lièvre F

Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny

Development. 1998 Nov;125(22):4575-83

James T N

Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias

Circulation. 1994 Jul;90(1):556-73

Jayasankar V, Woo Y J, Pirolli T J, Bish L T, Berry M F, Burdick J, Gardner T J, Sweeney H L

Induction of angiogenesis and inhibition of apoptosis by hepatocyte growth factor effectively treats postischemic heart failure

J Card Surg. 2005 Jan-Feb;20(1):93-101

Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F

Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial

Lancet 2006 367, 113-121

Jennings R B und Reimer K A,

Lethal myocardial ischemic injury

Am J Pathol. 1981, 102:241-255

Jennings R B, Hawkins H K, Lowe J E, Hill M L, Klotman S, Reimer K A

Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog

Am J Pathol. 1978; 92:187-214

Jennings R B, Reimer K A

The cell biology of acute myocardial ischemia

Annu Rev Med. 1991;42:225-46

Jennings R B, Ganote C E, Kloner R A, Whalen D A Jr, Hamilton D G

Explosive swelling of myocardial cells irreversibly injured by transient ischemia.

Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism, 1975, 6:405-413

Jiang S, Haider H Kh, Idris N M, Salim A, Ashraf M.

Supportive interaction between cell survival signaling and angiocompetent factors enhances donor cell survival and promotes angiomyogenesis for cardiac repair.

Circ Res. 2006 Sep 29;99(7):776-84. Epub 2006 Sep 7. Erratum in: Circ Res. 2006 Oct 27;99(9):e85

Jin H, Wyss J M, Yang R, Schwall R

The therapeutic potential of hepatocyte growth factor for myocardial infarction and heart failure

Curr Pharm Des. 2004;10(20):2525-33

Joester A, Faissner A

The structure and function of tenascins in the nervous system.

Matrix Biol. 2001;20:13-22

Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed J C, Quaini F, Sonnenblick E H, Anversa P

Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart

Exp Cell Res. 1995 Jul;219(1):110-21

Kam P C, Ferch N I

Review article: apoptosis: mechanisms and clinical implications
Anaesthesia, 2000, 55: 1081-1093

Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T
Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines.
Circulation. 2001 Aug 28;104(9):1046-52

Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics
Br. J. Cancer, 1972, 26, 239-257

Kiess W, Yang Y, Kessler U, Hoeflich A
Insulin-like growth factor II (IGF-II) and the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor: the myth continues
Horm Res. 1994;41 Suppl 2:66-73

Kim H J, Kim T Y
Insulin-like growth factor-II regulates the expression of vascular endothelial growth factor by the human keratinocyte cell line
HaCaTJ Invest Dermatol. 2004 Jul;123(1):152-8

Kobayashi K, Neely J R
Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle
Circ Res (1979); 44: 166-175

Kocher A A, Schuster M D, Szabolcs M J, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards N M, Itescu S.
Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function.

Nat Med. 2001 Apr;7(4):430-6

Kornfeld S

Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors

Annu Rev Biochem. 1992;61:307-30

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry T J, Kirschner M W, Koths K, Kwiatkowski D J, Williams L T

Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis

Science. 1997 Oct 10;278(5336):294-8

Kotlyar A A, Vered Z, Goldberg I, Chouraqui P, Nas D, Fridman E, Chen-Levy Z, Fytlovich S, Sangiorgi G, Spagnoli L G, Orlandi A, Savion N, Eldar M, Scheinowitz M
Insulin-like growth factor I and II preserve myocardial structure in postinfarct swine Heart. 2001 Dec;86(6):693-700

Kuida K, Haydar T F, Kuan C Y, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su M S, Rakic P, Flavell R A

Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9

Cell. 1998 Aug 7;94(3):325-37

Kupatt C, Hinkel R, Lamparter M, von Brühl M L, Pohl T, Horstkotte J, Beck H, Müller S, Delker S, Gildehaus F J, Büning H, Hatzopoulos A K, Boekstegers P

Retroinfusion of embryonic endothelial progenitor cells attenuates ischemia-reperfusion injury in pigs: role of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase

Circulation. 2005 Aug 30;112(9 Suppl):I117-22

Kwon Y W, Kwon K S, Moon H E, Park J A, Choi K S, Kim Y S, Jang H S, Oh C K, Lee Y M, Kwon Y G, Lee Y S, Kim K W.

Insulin-like growth factor-II regulates the expression of vascular endothelial growth factor by the human keratinocyte cell line

HaCaT J Invest Dermatol. 2004 Jul;123(1):152-8

Lai A C, Wallner K, Cao J M

Colocalization of tenascin and sympathetic nerves in a canine model of nerve sprouting and sudden cardiac death

J Cardiovasc Electrophysiol. 2000;11:1345-1351

Lee K W, Ladinsky H, Stuckey J H

Decreased Ca²⁺ uptake by sarcoplasmic reticulum after coronary artery occlusion for 60 and 90 minutes

Circ Res (1967); 21: 439-444

Le Roith D

Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors

N Engl J Med. 1997 Feb 27;336(9):633-40

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X

DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis

Cell. 1997 Apr 18;89(2):175-84

Losordo D W, Schatz R A, White C J, Udelson J E, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh K K, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse J H, Olson R E, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano K F, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry T D.

Intramyocardial transplantation of autologous CD34⁺ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial

Circulation 115, 3165-3172

Maclellan W R, Schneider M D

Death by design, programmed cell death in cardiovascular biology and disease

Circulation Research, 1997, 81: 137-144

Majno G, Joris I

Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death

Am J Pathol. 1995 Jan;146(1):3-15

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S.

Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.

J Clin Invest. 1999 Mar;103(5):697-705

Matsumoto K, Nakamura T

Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases

Kidney Int. 2001 Jun;59(6):2023-38

Mellwig K P, Schmidt H K

Koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt

In „Innere Medizin, Eine vorlesungsorientierte Darstellung, 2005“

Herold G. und Mitarbeiter (Hrsg.),

Köln, 2005, 198-207

Min J Y, Sullivan M F, Yang Y

Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs

Ann Thorac Surg. 2002;74:1568-1575

Mirotsov M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gnecci M, Noiseux N, Mu H, Pachori A, Dzau V

Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jan 30;104(5):1643-8. Epub 2007 Jan 24

Miyashita T, Reed J C

Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene

Cell. 1995 Jan 27;80(2):293-9

Muller D W M, Ellis S G , Topol E J

Experimental models of coronary artery restenosis.

J Am Coll Cardiol 1992;19:418-432

Murohara T, Ikeda H, Duan J

Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization.

J Clin Invest 2000;105:1527–1536

Nakamura Y, Wang X, Xu C, Asakura A, Yoshiyama M, From A H, Zhang J

Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Stem Cells. 2007 Mar;25(3):612-20. Epub 2006 Nov 9

Nguyen M, Shing Y, Folkman J

Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane

Microvasc Res. 1994 Jan;47(1):31-40

Nicholson D W, Thornberry N A

Caspases: killer proteases.

Trends Biochem Sci. 1997 Aug;22(8):299-306. Review

Noiseux N, Gnecci M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon S D, Deb A, Dzau V J, Pratt R E

Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation

Mol Ther. 2006 Dec;14(6):840-50. Epub 2006 Sep 11

Ohno M, Takemura G, Ohno A, Misao J, Hayakawa Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H

"Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling

Circulation. 1998 Oct 6;98(14):1422-30

Pak H N, Qayyum M, Kim D T, Hamabe A, Miyauchi Y, Lill M C, Frantzen M, Takizawa K, Chen L S, Fishbein M C, Sharifi B G, Chen P S, Makkar R
Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction

J Cardiovasc Electrophysiol. 2003 Aug;14(8):841-8

Pavelić J, Matijević T, Knezević J

Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family

Indian J Med Res. 2007 Apr;125(4):511-22

Pollak M N

Insulin-like growth factors and neoplasia

Novartis Found Symp. 2004;262:84-98

Reed J C

Cytochrome c: can't live with it--can't live without it

Cell. 1997 Nov 28;91(5):559-62

Reed J C

Mechanisms of apoptosis

Am J Pathol. 2000 Nov;157(5):1415-30

Rehman J, Li J, Orschell C M, March K L

Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors

Circulation. 2003 Mar 4;107(8):1164-9

Rhéaume E, Cohen L Y, Uhlmann F, Lazure C, Alam A, Hurwitz J, Sékaly R P, Denis F

The large subunit of replication factor C is a substrate for caspase-3 in vitro and is cleaved by a caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis

EMBO J. 1997 Nov 3;16(21):6346-54

Riede U N, Förstermann U, Drexler H

Inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle of patients with chronic heart failure

J Am Coll Cardiol. 1998 Oct;32(4):964-9

Rotonda J, Nicholson D W, Fazil K M, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson E P, Rasper D M, Ruel R, Vaillancourt J P, Thornberry N A, Becker J W

The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis

Nat Struct Biol. 1996 Jul;3(7):619-25

Roy N, Mahadevan M S, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, Salih M, Aubry H, Tamai K, Guan X, Ioannou P, Crawford T O, de Jong P J, Surh L, Ikeda J E, Korneluk R G, MacKenzie A

The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy

Cell. 1995 Jan 13;80(1):167-78

Rudel T, Bokoch G M

Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2

Science. 1997 Jun 6;276(5318):1571-4

Rudin C M, Thompson C B

Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death

Annu Rev Med. 1997;48:267-81

Saleh A, Srinivasula S M, Acharya S, Fishel R, Alnemri E S

Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation

J Biol Chem. 1999 Jun 18;274(25):17941-5

Salvesen G S, Dixit V M

Caspases: intracellular signaling by proteolysis

Cell. 1997 Nov 14;91(4):443-6

Scarabelli T M, Stephanou A, Pasini E, Comini L, Raddino R, Knight R A, Latchman D S

Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury

Circ Res. 2002 Apr 5;90(6):745-8

Schächinger V, Assmus B, Britten M B, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali N D, Vogl T J, Hofmann W K, Martin H, Dimmeler S, Zeiher A M

Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial

J Am Coll Cardiol. 2004 Oct 19;44(8):1690-9.PMID: 15489105

Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators

Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction

N Engl J Med. 2006 Sep 21;355(12):1210-21

Schaefer A, Meyer G P, Fuchs M, Klein G, Kaplan M, Wollert K C, Drexler H

Impact of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: results from the BOOST trial

Eur Heart J. 2006 Apr;27(8):929-35. Epub 2006 Mar 1.PMID: 16510465

Scharper W

Der aktuelle Stand der Herzinfarktforschung

Z Kardiol 1990 79:811-818

Selwyn A P, Braunwald E

Ischemic heart disease

In "Harrison's Principles of Internal Medicine",
Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo, Jameson (Ed.), The McGraw-Hill
Companies, USA, Taiwan, Singapore, (Split) Croatia, (Paris) France, (Berlin)
Germany, (Athens) Greece, (Milan) Italy, (Tokyo) Japan, (Seoul) Korea, (Lublin)
Poland, (Rio de Janeiro) Brazil, (Bucharest) Romania, (Bosnia & Herzegovina)
Republic of Serbia, (Madrid) Spain, (Istanbul) Turkey, 2005, Sixteenth Edition,
Volume II, 1434-1449

Sepulchre M A, Fechner G
Detection of ischemic myocardial damage
Beitr Gerichtl Med. 1992;50:161-7

Shake J G, Gruber P J, Baumgartner W A
Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment
and functional effects
Ann Thorac Surg. 2002;73:1919-1925

Sitz W.
Intramyokardiale Transplantation von humanen, mit IGF-II transduzierten,
endothelialen Progenitorzellen in Nacktratten im akuten Myokardinfarktmodell
Inauguraldissertation der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München, 2006; 75

Staemmler M
Die Kreislauforgane
In: Staemmler M
Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie, 11. und 12. Aufl, Bd I/1.
de Gruyter, Berlin, S93 ff

Statistisches Bundesamt 2007
(<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.psml>)

(<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/GestorbeneAnzahl,templateId=renderPrint.psml>)

Stand: 14.09.2008

Stone G W, Gersh B J

Facilitated angioplasty: paradise lost

Lancet. 2006 Feb 18;367(9510):543-6

Su E J, Cioffi C L, Stefansson S, Mittereder N, Garay M, Hreniuk D, Liao G

Gene therapy vector-mediated expression of insulin-like growth factors protects cardiomyocytes from apoptosis and enhances neovascularization

Am J Physiol Heart Circ Physiol (2003); 284: H1429-1440

Sunni S, Geer J C, Kent S P

Staining in normal and ischemic human myocardium. A study of myoglobin, IgG, glycogen, and diastase-PAS

Arch Pathol Lab Med 1984;108:649-653

Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp J R, Smolenski R T, Varela-Carver A, Fukushima S, Copen S R, Partridge T A, Yacoub M H

Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart

FASEB J. 2004 Jul;18(10):1153-5. Epub 2004 May 20

Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K

Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury

Br J Dermatol. 2006 Aug;291(2):H886-93. Epub 2006 Apr 7

Takemura G, Fujiwara H

Morphological aspects of apoptosis in heart diseases

J Cell Mol Med. 2006 Jan-Mar;10(1):56-75

Tang S H, Yang D H, Huang W, Zhou M, Zhou H K, Lu X H, Ye G
Differential promoter usage for insulin-like growth factor-II gene in Chinese
hepatocellular carcinoma with hepatitis B virus infection
Cancer Detect Prev. 2006;30(2):192-203. Epub 2006 May 12

Tanuma S, Shiokawa D
An endonuclease responsible for apoptosis
Prog Mol Subcell Biol. 1996;16:1-12

Thornberry N A, Rano T A, Peterson E P, Rasper D M, Timkey T, Garcia-Calvo M,
Houtzager V M, Nordstrom P A, Roy S, Vaillancourt J P, Chapman K T, Nicholson D
W
A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and
granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis
J Biol Chem. 1997 Jul 18;272(29):17907-11

Thornberry N A, Lazebnik Y
Caspases: enemies within
Science. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6

Toma C, Pittenger M F, Cahill K S, Byrne B J, Kessler P D
Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the
adult murine heart
Circulation. 2002 Jan 1;105(1):93-8

Tuch B E
Stem cells--a clinical update
Aust Fam Physician. 2006 Sep;35(9):719-21

Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M
Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through
paracrine signaling
Circ Res. 2006 Jun 9;98(11):1414-21. Epub 2006 May 11

Vaux D L, Weissman I L, Kim S K

Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2
Science. 1992 Dec 18;258(5090):1955-7

Walker N P, Talanian R V, Brady K D, Dang L C, Bump N J, Ferez C R, Franklin S, Ghayur T, Hackett M C, Hammill L D, Herzog L, Hugunin M, Houy W, Mankovitch J A, McGuinness L, Orlewicz E, Paskind M, Pratt C A, Reis P, Summani A, Terranova M, Weich J P, Xiong L, Möller A, Tracey D E, Kamen R, Wong W W

Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer
Cell. 1994 Jul 29;78(2):343-52

Wallach D, Varfolomeev E E, Malinin N L, Goltsev Y V, Kovalenko A V, Boldin M P
Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms
Annu Rev Immunol. 1999;17:331-67

Wallner K, Sharifi B G, Shah P K

Adventitial remodeling after angioplasty is associated with expression of tenascin mRNA by adventitial myofibroblasts
J Am Coll Cardiol 2001;37:655-661

Wang W, Yang Z J, Ma D C, Wang L S, Xu S L, Zhang Y R, Cao K J, Zhang F M, Ma W Z

Induction of collateral artery growth and improvement of post-infarct heart function by hepatocyte growth factor gene transfer
Acta Pharmacol Sin. 2006 May;27(5):555-60

Wen L P, Fahrni J A, Troie S, Guan J L, Orth K, Rosen G D

Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis
J Biol Chem. 1997 Oct 10;272(41):26056-61

Wilson M T, Antonini G, Malatesta F, Sarti P, Brunori M

Probing the oxygen binding site of cytochrome c oxidase by cyanide

J Biol Chem. 1994 Sep 30;269(39):24114-9

Xue D, Horvitz H R

Caenorhabditis elegans CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor

Nature. 1997 Nov 20;390(6657):305-8

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim C N, Ibrado A M, Cai J, Peng T I, Jones D P, Wang X

Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked

Science. 1997 Feb 21;275(5303):1129-32

Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y

Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction

Cardiovasc Res. 2000 Feb;45(3):630-41

Yoon C H, Hur J, Park K W, Kim J H, Lee C S, Oh I Y, Kim T Y, Cho H J, Kang H J,

Chae I H, Yang H K, Oh B H, Park Y B, Kim H S

Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases

Circulation. 2005 Sep 13;112(11):1618-27. Epub 2005 Sep 6

Yuan J

Transducing signals of life and death

Curr Opin Cell Biol. 1997 Apr;9(2):247-51

Zatloukal K, Roth J, Denk H

Zell- und Gewebereaktionen, Formen des Zelltodes

In „Pathologie“

Böcker W, Denk H, Heitzh P H U

Elsevier Urban & Fischer 3. Auflage München, Jena, 2004, 66-70

Zou H, Henzel W J, Liu X, Lutschg A, Wang X

Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3
Cell. 1997 Aug 8;90(3):405-13

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Professor Dr. med. Ilka Ott herzlich für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Promotionsarbeit bedanken.

Herrn Dr. med. Stephan Seidel aus dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München danke ich für die wertvollen Ratschläge und Frau Christina Bauer danke ich für die freundliche Unterstützung.

Meinen besonderen Dank gilt meinen Eltern, meinem Großvater und Patrick Hermann ohne deren Hilfe die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.