

**Intramyokardiale Transplantation von humanen,
mesenchymalen Progenitorzellen zur Therapie des akuten
Myokardinfarktes der Nacktratte**

Melanie Sarah Straub

Technische Universität München

Deutsches Herzzentrum München /
I. Medizinische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar

Intramyokardiale Transplantation von humanen, mesenchymalen Progenitorzellen zur Therapie des akuten Myokardinfarktes der Nacktratte

Melanie Sarah Straub

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

Vorsitzender:

Prüfer der Dissertation:

Univ-Prof. E. J. Rummeny

1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott

2. Univ-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 10.11.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 01.02.2012 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	4
1.1 Epidemiologie und Pathogenese der koronaren Herzerkrankung	4
1.2 Pathogenese der ischämischen Kardiomyozytenschädigung.....	5
1.2.1 Ultrastrukturelle Veränderungen	5
1.2.2 Histopathologische Veränderungen	6
1.3. Inflammationsphase	8
1.3.1 Initiation der Entzündungsreaktion	8
1.3.2 Mediatorzellen der Inflammation.....	9
1.3.3 Chemokin- und Zytokinkaskade und deren Bedeutung im Verlauf der Inflammation	13
1.4 Übergang von der Entzündungs- zur Proliferationsphase.....	20
1.4.1 Abräumen von nekrotischen Zellen und Fragmenten der zerstörten ECM.....	21
1.4.2 IL-10 und TGF- β als Mediatoren der Suppression der Inflammation	22
1.5 Proliferationsphase.....	24
1.5.1 Angiogenese im Granulationsgewebe	24
1.5.2 Umbau (Turn-over) der Extrazellulär-Matrix: Aktivierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten und Kollagendeposition im Granulationsgewebe.....	27
1.6 Ausreifung der Narbe.....	29
1.6.1 Veränderung der LV-Morphologie im Zeitverlauf: Makroskopie und Mikroskopie	29
1.6.2 An der Narbenreifung beteiligte Zytokine und Wachstumsfaktoren	30
1.6.3 Übergang zur chronischen myokardialen Insuffizienz – strukturelle und funktionelle Auswirkung des späten Remodelings	32
1.7 Geweberegeneration durch aus dem Knochenmark mobilisierte endogene Stammzellen	34
1.8 Apoptose	38
1.8.1 Aktivierung und Regulation der Apoptose.....	38
1.8.2 Apoptose im Verlauf des Myokardinfarktes	41
1.9. IGF-II nach AMI	43
1.10 Stammzelltherapie – Myokardregeneration als kausale Therapie der Myokardschädigung.....	46
1.10.1 Grundlagen und Hypothesen zum Wirkmechanismus der Stammzellen im Myokard	46
1.10.2 Adulte Stammzellen in der Therapie des Myokardinfarktes.....	53
1.11 Charakterisierung der verwendeten UV-MSc.....	58
1.11.1 Morphologie und Differenzierungspotential der verwendeten UV-MSc in vivo und in vitro	59
1.11.2 Genexpression im Vergleich zu MSc des Knochenmarks	60

2. MATERIAL UND METHODEN	61
2.1 Zellen	61
2.2. Tiermodel	61
2.3. Histologische Aufarbeitung der Proben	63
2.3.1 Histologische Standard Färbung: Masson-Trichrom-Färbung.....	63
2.3.2 Immunhistochemische Färbung der Myokardschnitte: CD68 und α -smc-aktin	64
2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung der Myokardschnitte: Ki67	70
2.4 Genexpressionsanalyse	72
2.4.1 RNA-Extraktion	72
2.4.2 Reverse Transkription	74
2.4.3 TaqMan-Real-Time-PCR	75
2.5 MRT	79
2.6 Statistische Berechnungen und Dokumentation	84
3. ERGEBNISSE	85
3.1. Morphologische Untersuchungen: Histologie, Immunhistologie und Immunfluoreszenz	85
3.1.1 Ergebnisse 3 Tage nach dem Infarkt.....	85
3.1.2 Ergebnisse zwei Wochen nach Infarkt.....	88
3.3. Zytokinexpression im Myokard nach Myokardinfarkt	91
3.5 Evaluation der myokardialen Pumpfunktion in vivo	97
4. DISKUSSION	99
4.1 Grundlegende Gliederung der Arbeit	99
4.2 Auswirkung der Transplantation auf die Inflammationsphase der Infarktheilung ..101	
4.2.1 Histomorphologische Ergebnisse: Evaluation von Entzündungs-infiltrat und Proliferationsrate	101
4.2.2 Genexpressionsanalyse.....	103
4.3 Auswirkung der Transplantation auf die Proliferationsphase der Infarktheilung107	
4.3.1 Histomorphologische und funktionelle Ergebnisse: Evaluation von Gefäßdichte, Infarktgröße und kontraktile Funktion.....	107
4.3.2 Genexpressionsanalyse.....	111
4.4 Die Ergebnisse im Kontext der physiologischen Infarktheilung	113
4.5 Diskussion der verwendeten MSC aus dem Subendothel der Umbilikalvene	115
4.6 Abschließende Gesamtbewertung des Versuchsergebnisses	117

4.7 Überblick über die Funktion der gemessenen Zytokine ohne signifikantes Ergebnis	120
5. ZUSAMMENFASSUNG	126
6. LITERATURVERZEICHNIS	130
7. TABELLENVERZEICHNIS	142
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	143
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	146
10. DANKSAGUNG	149

1. EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie und Pathogenese der koronaren Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung ist definiert als Manifestation der Atherosklerose in den Koronararterien im Sinne einer Makroangiopathie der großen epikardialen Gefäße. Durch flusslimitierende Stenosen der Herzkranzgefäße kommt es zu einer Koronarinsuffizienz, das heißt einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und –verbrauch im Myokard. Seltene Ursachen der Koronarinsuffizienz sind eine Mikroangiopathie der kleinen intramuralen Koronargefäße, Koronarspasmen, Koronaranomalien wie beispielsweise das Bland-White-Garland-Syndrom, arteriovenöse Koronarfisteln oder angeborene Myokardbrücken. Die aus der Koronarinsuffizienz resultierende Ischämie kann sich auf verschiedenen Weise manifestieren: Als Erstsymptom erleiden 50% der Patienten ein sogenanntes akutes Koronarsyndrom, das heißt eine instabile Angina pectoris, einen Non-ST-Hebungsinfarkt oder einen ST-Hebungsinfarkt. 40% der Patienten präsentieren sich mit Angina pectoris und weitere 10% versterben am plötzlichen Herztod. Die KHK ist in den Industrieländern die häufigste Todesursache, in Deutschland werden 20% der Todesfälle durch eine Manifestationsform der KHK verursacht.

Der akute Myokardinfarkt selbst wiederum ist definiert als ischämische Nekrose des Herzmuskels. Pathogenetisch liegt dem Infarkt in 95% der Fälle die Ruptur einer instabilen atherosklerotischen Plaque zu Grunde, der zur hochgradigen Stenosierung oder zum kompletten thrombotischen Verschluss der Koronararterie führt, was zu einer Ischämie des Myokards führt. Die restlichen 5% der Infarkte entstehen auf dem Boden der oben genannten seltenen Ursachen der Koronarinsuffizienz. Unterteilt wird der Herzinfarkt in einen transmuralen Infarkt („Q-Wave“-Infarkt), bei dem mehr als 50 % der Wanddicke des Myokards betroffen sind und einen nicht-transmuralen-Infarkt („non-Q-Wave“-Infarkt). Bei Letzterem ist nur die subendokardiale Innenschicht des Herzens betroffen. Der physiologische Verlauf des AMI gliedert sich in die erste Phase der Gewebsnekrose, wenn therapeutisch interventioniert wird folgt darauf die Reperfusion des Myokards und als abschließende Phase die Infarktheilung, in der sich eine kollagene Narbe ausbildet und es zum sogenannten Remodeling – also einem fibrosierenden Umbau des Herzmuskels durch kollagene Fasern kommt.

Die entstehenden Komplikationen werden in Früh- und Spätkomplikationen unterteilt. Innerhalb der ersten 48 Stunden stehen Herzrhythmusstörungen und/oder ein kardiogener

Schock durch Linksherzinsuffizienz im Vordergrund. Als Folge einer ausgedehnten Gewebnekrose kann es im Verlauf der ersten Woche zu einer Herzwand- oder Ventrikelseptumruptur oder einem Papillarmuskelabriss kommen. Danach steht die Gefahr der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz im Vordergrund, sowie die Entstehung eines Herzwandaneurysma, Arrhythmien, arterielle Embolien, Infarktrezidive und Perikarditiden.

Therapeutisch werden verschiedene Therapien angewendet, Goldstandard ist heute die Revaskularisierung des Herzmuskels mittels PTCA und anschließendem Stenting der betroffenen Koronararterie – oder, falls diese Option nicht verfügbar ist, Revaskularisation mittels Lysetherapie - und anschließend eine medikamentöse Langzeittherapie. Ziel ist es, ein Fortschreiten der Krankheit in Form des myokardialen Remodelings zu verhindern. Trotz optimaler Therapie kann es jedoch nach chronischer Myokardischämie oder Myokardnekrose zur Reduktion der ventrikulären Pumpfunktion des Herzens und damit zur Herzinsuffizienz kommen.

Die epidemiologische Bedeutung des Herzinfarktes und damit auch die Notwendigkeit einer effektiven Therapie wird deutlich, wenn man sich die folgenden Kennzahlen vor Augen hält: Die Inzidenz des Herzinfarktes (Infarkte/100.000/J) beträgt in Deutschland 300-400. Die Lebenszeitprävalenz liegt für Männer bei 30%, für Frauen bei 15%. Ca. 50% der Patienten versterben innerhalb der ersten 4 Wochen nach dem Infarkt. Weitere 5-10% erleiden innerhalb der ersten zwei Jahre nach dem Infarkt einen plötzlichen Herztod.

(KAPITEL KARDIOLOGIE in HEROLD, BASISLEHRBUCH DER INNEREN MEDIZIN, 2010)

1.2 Pathogenese der ischämischen Kardiomyozytenschädigung

1.2.1 Ultrastrukturelle Veränderungen

Der Verlust der Sauerstoffversorgung der Zellen führt innerhalb kürzester Zeit zu intrazellulären Veränderungen. Innerhalb von zehn Sekunden nach Gefäßokklusion stoppt der aerobe Stoffwechsel, was einerseits zum Mangel an energiereichen Phosphaten (ATP) und andererseits zur Akkumulation von Produkten des anaeroben Stoffwechsels (Lactat u.a.) führt. Fast gleichzeitig dazu kommt es zu einem signifikanten Verlust der Kontraktilität des betroffenen Myokards (FRANGOIANNIS N., 2008)

Als Korrelat einer noch reversiblen myokardialen Schädigung kann man elektronenmikroskopisch innerhalb der ersten halben Stunde nach Infarkt eine Relaxation der Myofibrillen, Glykogenepletion, und Schwellung von Mitochondrien und Kardiomyozyten als Folge des Versagens der Na/K-Pumpe erkennen (ROBBINS&COTRAN, 2005). Anhaltende Ischämie führt innerhalb von 40-60 min zu einer irreversiblen Zerstörung der kardialen Myozyten, die sich ebenfalls unter dem Elektronenmikroskop erkennen lässt: Durch Auseinanderreißen des Sarkolemmes und durch amorphe Verdichtung der Mitochondrien durch Schwellung der Cristae mitochondriales. (FRANGOIANNIS N., 2008)

1.2.2 Histopathologische Veränderungen

Die lichtmikroskopischen Veränderungen lassen sich in drei aufeinander folgende und sich teilweise überlappende Phasen gliedern: Die Inflammations-, die Proliferationsphase und die abschließende Ausreifung der Narbe.

Inflammationsphase

Die erste lichtmikroskopisch erkennbare Folge des Infarktes sind sogenannte „wavy fibers“, die sich nach 0,5 – 4 Stunden vor allem im Infarkttrandbereich ausbilden. Diese entstehen durch den Zug überlebender Muskelfasern an toten, wodurch diese sozusagen „verbogen“ werden und sich durch das Licht-Mikroskop gewellt darstellen. Im Randbereich des Infarkts kann man auch die sogenannte vakuoläre Degeneration erkennen, morphologisches Korrelat einer subletalen und reversiblen Schädigung der Myozyten. Nach 4 – 12 h beginnt sich im Bereich der letal geschädigten Myozyten eine Koagulationsnekrose auszubilden, begleitet von einem Ödem und möglichen fokalen Hämorrhagien im Myokard. Die Koagulationsnekrose selbst ist charakterisiert durch Kernverlust, Kernpyknose und eosinophile Anfärbung des Zytoplasmas der Myozyten. 12-24 h später beginnen – angezogen durch chemotaktisch wirksame Chemokine und Zytokine - neutrophile Granulozyten vom Randsaum der Nekrose ausgehend in das Infarktareal einzuwandern. Circa drei Tage nach Infarkt folgen schließlich Makrophagen in das nekrotische Gewebe. (ROBBINS&COTRAN, 2005, HORT W., 2001)

Proliferationsphase

Das v.a. durch die beschriebenen zwei Zelltypen – Neutrophile und Makrophagen - charakterisierte Entzündungsinfiltrat (weiterhin finden sich v.a. im Infarkttrand vermehrt dendritische Zellen und T-Helfer-Zellen) erreicht nach 2-3 Tagen sein Maximum. Das folgende Auseinanderreißen der Muskelfasern und die Phagozytose nekrotischer Myozyten

und Neutrophiler durch die Makrophagen lässt sich histologisch am ausgeprägtesten etwa 5 bis 10 Tage nach dem Infarkt ereignis darstellen. Anschließend kommt es zur Suppression der Entzündungsreaktion und vom Infarkttrand her zum Einwachsen eines aus Makrophagen, Kapillarsprossen und Fibroblasten bestehenden Granulationsgewebes. Dies initiiert eine „Transition from Inflammation to Fibrosis“, also den Übergang von Entzündung zu Fibrose/Vernarbung des Myokards, wie es N. Frangogiannis formuliert. Verantwortlich sind vor allem von Makrophagen produzierte Mediatoren, die die Aktivierung und Migration von Endothelzellen und kardialen Fibroblasten, den Hauptbestandteilen des Granulationsgewebes, koordinieren. (FRANGOIANNIS N., 2004, LAMBERT LM. et al, 2008, NIAN M. et al, 2004).

Zytokine und Chemokine	Wachstumsfaktoren
<ul style="list-style-type: none"> • Interferon α • Interleukin 1 α und β, -6, -8 • MCP-1 • TNF α • ACE • MMP -1, -3, -7, -8, -9, -12 • Plasmin • PAI 1 • u.a 	<ul style="list-style-type: none"> • bFGF • G-CSF, GM-CSF • IGF-I • TGF α und β • VEGF • u.a

Abb.1 Von Makrophagen sezernierte ausgewählte Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren, die zur Regulation von Phagozytose durch Makrophagen, Kollagendeposition durch Myofibroblasten und Proliferation und Angiogenese durch Gefäßendothelzellen im Rahmen des Granulationsgewebes nötig sind.

Ausreifung der Narbe

Das Infarktareal wird in den nachfolgenden Wochen in eine kollagenfaserreiche, zell- und gefäßarme Narbe umgebaut, wobei als Hauptproduzenten des Kollagens die Myofibroblasten nachgewiesen wurden. Lichtmikroskopisch sind die ersten kollagenen Fasern in der zweiten Woche nach Infarkt zu erkennen, eine verstärkte Expression von TypIII-Prokollagen mRNA wurde jedoch schon am zweiten Tag nach dem Infarkt gefunden. Ebenfalls in der Histologie zu sehen ist in dieser Phase eine Regression von Gefäßen und Myofibroblasten (LAMBERT JM. et al, 2008). Die Heilung des Infarktes erfolgt in einer Geschwindigkeit von ungefähr 1mm innerhalb von 10 Tagen vom Randbereich in Richtung Infarktzentrum (ROBBINS&COTRAN, 2005).

1.3. Inflammationsphase

1.3.1 Initiation der Entzündungsreaktion

Die Folge der myokardialen Ischämie ist die Induktion einer Inflammation. Diese ist charakterisiert durch Aktivierung residenter Zellen wie Mastzellen und Gefäßendothelzellen, Infiltration inflammatorischer Zellen – zunächst Thrombozyten und neutrophile Granulozyten, später mononukleäre Zellen – und der Sekretion von inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen und dient vor allem dem „Abräumen“ von Zelldebris und Fragmenten der zerstörten Extrazellulär-Matrix (Kollagen, Elastin, Fibronectin) aus dem Infarktgebiet. (NIAN M. et al, 2004, FRANGOIANNIS N., 2004)

Erforderlich dazu ist die Aktivierung wichtiger Transkriptionsfaktoren, die für die Inflammationsreaktion verantwortliche Gene kontrollieren: Das NF- κ B System, sowie die in neueren Studien untersuchte Transkriptionsfaktoren AP1, C/EBP- β , STAT3, PPAR- γ (NIAN M. et al, 2004) kontrollieren Gene, deren Produkte essentiell für die Inflammation nach kardialer Ischämie sind und die sich in verschiedenen Gruppen klassifizieren lassen:

- a. Chemokine und Zytokine (z.B. TNF- α , IL 6, CXCL1/Gro 1)
- b. Zelladhäsionsmoleküle/Zelloberflächenrezeptoren (z.B. ICAM-1, CD83)
- c. Transkriptionsfaktoren, die zur Selbstopplifikation der Entzündungsreaktion führen (z.B. NF- κ B)
- d. Antiinflammatorische/Antiapoptotische Proteine (z.B. BCL-2)

(BRASIER A., 2006, FRANGOIANNIS N., 2008).

Vor allem vier Mechanismen induzieren die genannten Transkriptionsfaktoren:

Mechanischer Stress, Aktivierung von TLR-Rezeptoren, reaktive Sauerstoffradikale (ROS), die im ischämischen Myokard und bei der Respiratory Burst Reaktion der Granulozyten entstehen und Aktivierung von Komponenten des Komplementsystems. (NIAN M. et al, 2004, FRANGOIANNIS N., 2008)

1) Mechanischer Stress aktiviert über potentielle Mechanosensoren (Integrine, Zytoskelettbestandteile, sarkolemmale Proteine) drei nachgeschaltete „downstream“ Signaltransduktionswege: MAP-K, STAT und calcineurinabhängige Signalwege, die wiederum NF- κ B und AP1 aktivieren. (NIAN et al, 2004)

2) TLR-Rezeptoren werden von zerstörten Bestandteilen der extrazelluläre Matrix (ECM), sowie aus nekrotischen Zellen freigesetzten Komponenten, wie beispielsweise

HeatShockProteinen, Hyaluronsäure- und Fibronectinfragmenten aktiviert. Beim akuten Myokardinfarkt spielt vor allem die Signaltransduktion über TLR 4 eine Rolle

3) ROS, deren toxische Wirkung im gesunden Myokard durch die Enzyme Katalase, Glutathion-Peroxidase, Superoxid-Dismutase und intrazelluläre Antioxidantien neutralisiert wird, entstehen nach Ischämie in hoher Konzentration und wirken durch direkte Modulation der DNA-Bindungsstelle von NF- κ B und AP-1.

4) Rossen et al zeigten bereits 1994, dass subzelluläre kardiophilinreiche mitochondriale Membranfragmente, die nach der Ischämie aus nekrotischen Zellen freigesetzt werden, die Komplementkomponente C1 binden können und dadurch nach AMI das Komplementsystem aktiviert wird.

(FRANGOIANNIS N., 2008, ROSSEN RD. et al, 1995)

1.3.2 Mediatorzellen der Inflammation

Die zelluläre Basis der Entzündungsreaktion besteht aus folgenden Zellen: Thrombozyten, neutrophile und vereinzelt baso- und eosinophile Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen und wenige Lymphozyten.

Näher charakterisiert werden sollen in dieser Einleitung zum Einen die Neutrophilen, da sie als erste Zellen im Infarkt für die Phagozytose von nekrotischen Kardiomyozyten und ECM-Fragmenten verantwortlich sind und dabei wichtige – auch in dieser Arbeit untersuchte - Chemokine und Zytokine sezernieren, die für den weiteren Verlauf der Infarktheilung essentiell sind. Sie sind weiterhin an der zusätzlich an der Kardiomyozytenschädigung nach Reperfusion verantwortlich, die sich zusätzlich zur primären ischämischen Schädigung in reperfundierten Infarkten entwickelt.

Der zweite genauer dargestellte Zelltyp sind die mononukleären Zellen, da diese, neben der Phagozytose von Zelldebris und ECM-Fragmenten – ebenso wie die Neutrophilen – wichtige Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren produzieren, die entscheidend für Inflammation, und im Granulationsgewebe später für Angiogenese und Fibroblastenproliferation sind. Sie haben ebenso entscheidenden Anteil an der Maturation der Narbe im Heilungsprozess, da sie am Remodeling der Extrazellulären Matrix durch Produktion von MMPs und TIMPs beteiligt sind (LAMBERT et al, 2008).

Neutrophile Granulozyten

Nach einem akuten Myokardinfarkt infiltrieren, angelockt von verschiedenen Mediatoren wie zunächst Komplementbestandteilen, v.a C5a, in der interstitiellen Flüssigkeit, lipidbasierten Mediatoren wie Leukotrien B₄ aus Neutrophilen und Platelet activatet Factor (PAF) aus aktivierten residenten Endothelzellen sowie Chemokinen und Zytokinen, als erste inflammatorische Zellen neutrophile Granulozyten in das ischämisch geschädigte Myokardareal (FRANGOIANNIS N. et al, 2002).

Der Ablauf der Transmigration ins Gewebe ist gut untersucht und auch lichtmikroskopisch nachzuvollziehen: Die Leukozyten „rollen“ zunächst mit einer signifikant unter der Fließgeschwindigkeit des Blutes liegenden Geschwindigkeit am Endothel der post-kapillären Venolen entlang. Offenbar als Reaktion auf lokale chemotaktische Reize hin, stoppen sie ab, ändern ihre Form in die charakteristische bipolare Form einer motilen Zelle und migrieren parazellulär durch Endothelzell-Verbindungen ins Gewebe. Für dieses „Rolling“ notwendig ist die Interaktion von bestimmten Molekülen auf den beteiligten Leukozyten und Endothelzellen, den Selektinen. Auf der Oberfläche der Leukozyten befindet sich das L-Selektin, Endothelzellen exprimieren E- und P-Selektin. Diese Interaktion wiederum führt zur Aktivierung von Integrinen auf den Leukozyten, die zur festen Anhaftung an Mitgliedern der Immunglobulin-superfamilie auf stimulierten Endothelzellen (ICAM-1 u.a) und folgende Transmigration essentiell sind. Erforderlich dazu ist nach Frangogiannis insbesondere die Aktivierung des Integrins β 2. Mikroskopisches Korrelat dieser Bindung von Integrinen an ICAMs ist das Abstoppen der inflammatorischen Zellen im Gefäß. (FRANGOIANNIS N. et al, 2002)

Im Rahmen der Transmigration spielt auch das in dieser Arbeit untersuchte Membranmolekül PECAM1/CD31 eine Rolle. Dieses wird auf der lateralen Seite der Gefäßendothelzellen in hoher Dichte exprimiert, in geringerer Dichte ist es auf hämatopoetischen Zellen und Zellen des Immunsystems wie Neutrophilen, Makrophagen, Thrombozyten und Weiteren zu finden. Die Stimulation von Endothelzellen durch proinflammatorische Mediatorstoffe führt nicht nur zur Neusynthese von CD31, sondern auch zur Expression präformierter CD31 Moleküle, die aus Invaginationen der Zellmembran an die laterale Oberfläche der Endothelien gebracht werden. Die Bindung zweier CD31 Moleküle führt in der inflammatorischen Zelle zu einer Expression der oben genannten Integrine α 6 β 1 und β 2, die zur Transmigration ins Gewebe wie bereits beschrieben unbedingt nötig sind. CD31 dient also gewissermaßen als Führungsschiene für die Transmigration durch Endothelzell-Verbindungen und die darunter liegende Basalmembran. (MAMDOUH Z. et al, 2003, WOODFIN A. et al, 2007)

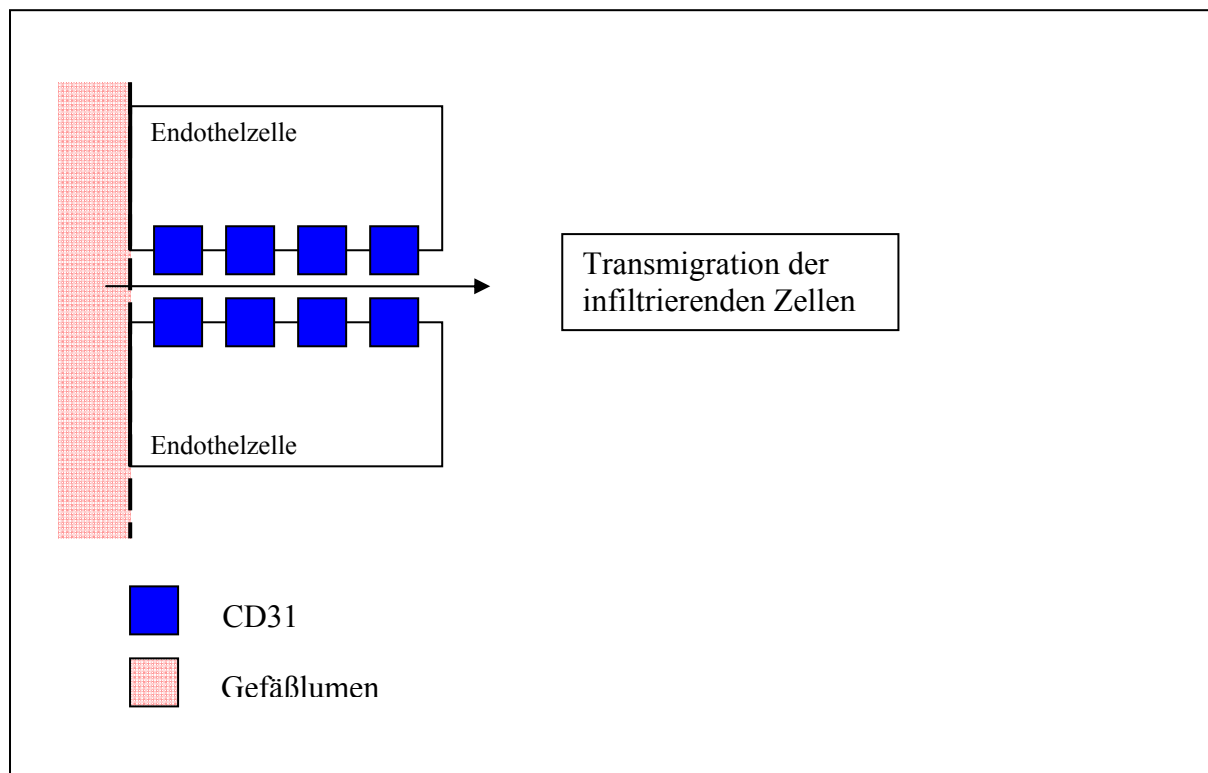


Abb.2 CD 31 wird auf der lateralen Seite der Endothelzellen sowie auf Neutrophilen, Makrophagen und Thrombozyten exprimiert. Die homologe Bindung zweier CD31 Moleküle führt die infiltrierenden Zellen sozusagen als „Leitschiene“ an der lateralen Seite der Endothelzellen entlang in das Myokard.

Die Diapedese der inflammatorischen Zellen ins Myokard ist jedoch nicht unbedingt von CD31 abhängig, da die Expression der oben genannten Integrine auch durch andere Stimuli als eben die homophile Verbindung der CD31 Moleküle erfolgen kann, und somit eine CD31-unabhängige Transmigration möglich ist. (NOURSHARG S. et al, 2006). So zeigte sich in verschiedenen Studien, dass die durch IL-1 β und L-NAME stimulierte Transmigration CD31-abhängig ist, wohingegen TNF- α und Thrombin eine CD31-unabhängige Transmigration ermöglichen (WOODFIN A. et al, 2007)

Mononukleäre Zellen / Makrophagen

Makrophagen sind die wichtigsten Zellen in der Inflammationsphase sowie auch der folgenden Proliferationsphase. Ihre Hauptfunktionen lassen sich in vier Gruppen zusammenfassen. Während die Funktion der Makrophagen in Punkt 1 und 2 vor allem in der Inflammationsphase wichtig sind, charakterisieren unter die Punkte 3 und 4 Vorgänge, die folgende Proliferationsphase:

1. Phagozytose nekrotischer und apoptotischer Kardiomyozyten und inflammatorischer Zellen

2. Chemotaktische Rekrutierung anderer Makrophagen in das Infarktareal durch Sekretion chemotaktisch wirksamer Stoffe wie MCP-1, u.a
3. Regulation der Narbenbildung durch Sekretion und Induktion der Expression von Wachstumsfaktoren wie TGF- β , und Matrixmetalloproteinasen wie MMP9 und Induktion der Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten
4. Regulation der Angiogenese durch Sekretion von Wachstumsfaktoren wie VEGF, bFGF u.a

(LAMBERT J. et al, 2008)

Die Makrophagen regulieren durch ihre Sekretionsprodukte sozusagen den Übergang von der Inflammation zur Ausbildung der kollagenen Narbe mit progredienter Fibrosierung des Myokards.

Der aktivierte Makrophage im Myokard hat eine längere Reifungsphase hinter sich. Ausgehend von CD34-positiven Progenitorzellen im Knochenmark entwickelt er sich über den Monoblasten zum Monozyten, der das Knochenmark dann verlässt. Angelockt von chemotaktischen Reizen aus geschädigten Geweben, z. B dem postischämischen Myokard, infiltrieren die Monozyten in dieses Gewebe und werden dort zum „fertigen“ funktionsfähigen Makrophagen aktiviert. (LAMBERT J. et al, 2008)

Die chemotaktisch wirksamen Reize sind vielfältig und werden wie bereits beschrieben im Myokard freigesetzt: ROS und Komplementbestandteile wie C5a in der frühen Phase innerhalb der ersten 3 Stunden nach dem akuten Infarkt, danach vor allem Zytokine wie TGF- β , CC-Chemokine wie MCP-1. (BIRDSALL HH. et al, 1997, FRANGOIANNIS N., 2008)

In reperfundierten Infarkten wurde interessanterweise ein im Vergleich zu nicht-reperfundierten Infarkten erhöhte Zahl von Makrophagen nachgewiesen. Die Ursache dafür ist folgende: Eine Studie von Kumar zeigt eine Hochregulation der mRNA des chemotaktisch wirksamen MCP-1 ausschließlich in reperfundierten Infarkten. (KUMAR AG. et al, 1997)

Untersuchungen zeigen, dass die Makrophagen im Infarkt keine uniforme Population von Zellen sind, sondern eine sehr heterogene. Sie zeigen im Verlauf der Infarktheilung zwei differentielle Phänotypen M1 und M2. Die Aktivierung zu diesen Phänotypen hängt von der nach der akuten Ischämie vergangenen Zeit und damit von dem für die jeweilige Heilungsphase typischen, durch freigesetzte Mediatorstoffe charakterisierten

Umgebungsmilieu ab. In einer Arbeit von Porcheray konnte gezeigt werden, dass zunächst der Typ M1 auftritt, der später vom Typ M2 abgelöst wird. (PORCHERAY F., 2005)

Die Mediatorstoffe, die die Ausprägung der jeweiligen Phänotypen vermitteln, zeigt Tabelle 1.

M1	M2
LPS	Glukokortikoide
T-Helfer-Zelle Typ1 Zytokine, z.B. TNF- α , IL-2	T-Helfer-Zelle Typ2 Zytokine, z.B. IL-4, IL-6, IL-10
CC-Chemokine, z.B. CCC-1	

Tab.1 Mediatoren, die zur Ausprägung der differentiellen Phänotypen M1 und M2 der Makrophagen führen.
Die Mediatorstoffe der Spalte M1 fördern den Phänotyp M1, die der Spalte M2 den Phänotyp M2.

Die beiden Phänotypen unterscheiden sich in ihren Funktionen und Sekretionsprodukten. Der klassische Typ M1 ist verantwortlich für Inflammation und Degradation der Extrazellulären Matrix, was sich in seinen Sekretionsprodukten, u.a IL-1, IL-6, TNF- α , MMPs, widerspiegelt. Zu finden ist dieser frühe Phänotyp somit in der Inflammationsphase des Infarktes. Die folgende Proliferationsphase ist gekennzeichnet durch den alternativen Typ M2. Dieser führt mittels Sekretion von u.a bFGF, VEGF, TGF- β zu Zellproliferation, Rekonstruktion der ECM und Angiogenese und ist damit essentiell an der koordinierten Entstehung und Funktion des die Proliferationsphase charakterisierenden Granulationsgewebes beteiligt. (LAMBERT J. et al, 2008)

Die Bedeutung der Makrophagen für den Verlauf der Heilung unterstreicht folgende interessante Beobachtung. Die Anzahl der Makrophagen im Infarktareal scheint direkt korreliert zu sein mit dem Ausmaß der späteren Kollagendeposition im ischämisch geschädigten Myokard. Damit ist die Anzahl dieser Zellen ein Prognoseparameter der späteren linksventrikulären Pumpfunktion, da eine vermehrte Kollagenablagerung eine Verminderung der Kontraktilität des Myokards nach sich zieht. (YANO T. et al, 2006)

1.3.3 Chemokin- und Zytokinkaskade und deren Bedeutung im Verlauf der Inflammation

Die beschriebenen inflammatorischen Zellen vermitteln die Entzündungsreaktion im geschädigten Myokard über diverse Mediatorstoffe. Grob kann man diese in Chemokine,

Zytokine und Wachstumsfaktoren einteilen, die im Weiteren mit ihren Hauptwirkungen dargestellt werden.

Nach der ischämischen Schädigung des Myokards kommt es zu einer raschen Akkumulation dieser proinflammatorisch wirksamen Stoffe. Der schnelle Anstieg der Konzentrationen der Mediatorstoffe wird durch drei Mechanismen erreicht:

1) Freisetzung *präformierter* Mediatorstoffe

Die sofortige reaktive Degranulation residenter Mastzellen nach der Ischämie führt, bereits 1998 nachgewiesen von einer Arbeitsgruppe um Frangiogiannis et al, zur Freisetzung präformierter Chemokine und Zytokine wie TNF- α und Histamin in das Myokard. (FRANGOIANNIS NG. et al, 1998)

2) Hochregulation der *Neusynthese* von Mediatorstoffen

Durch die freigesetzten präformierten Mediatorstoffe kommt es zur Aktivierung verschiedener Zelltypen wie u.a neutrophiler Granulozyten, Makrophagen, Endothelzellen. „Angeschaltet“ werden in diesen Zellen unterschiedliche Signaltransduktionswege, die gemeinsam in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B münden. Dies führt zur verstärkten Transkription und Sekretion der durch diesen Transkriptionsfaktor kontrollierten Gene: Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren. In einer positiven Feedback-Schleife erfolgt durch diese wiederum die Hochregulation von NF- κ B in benachbarten Zellen Auf diese Weise entsteht ein sich selbst amplifizierender Kreislauf aus Synthese und Sekretion proinflammatorischer Stoffe. (NIAN M. et al, 2004)

3) Chemotaxis von inflammatorischen Zellen

Chemo- und Zytokine locken als chemotaktisch wirksame Stoffe in hoher Zahl Neutrophile und mononukleäre Zellen ins Infarktgebiet, welche dadurch aktiviert werden und den beschriebenen sich selbst verstärkenden Amplifikationsmechanismus unterhalten. (NIAN M. et al, 2004)

Wie oben beschrieben, ist die „inflammatory Response“ nach Myokardinfarkt charakterisiert durch eine transiente starke Hochregulation der **Chemokin**expression, die zu einer schnellen Erhöhung der Konzentration dieser Stoffe im Myokard führt. Die Chemokine werden in vier Gruppen unterteilt: CXC-, CC- XCL1 und CX3C-Chemokine. Die sezernierenden Zellen - inflammatorische Zell, Endothelzellen, Kardiomyozyten zeigen dabei einen sogenannten Polyspeirismus, das heißt, eine Zelle kann gleichzeitig verschiedene Chemokine sezernieren. Die zellulären Rezeptoren für alle drei Gruppen von Mediatoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten heptahelikalen Rezeptoren. Sie sind nicht spezifisch, sondern können

verschiedene Chemokine binden. Ebenso kann ein Chemokin an verschiedenen Rezeptoren zur Signaltransduktion führen. (FRANGOGIANNIS N., 2004)

Chemokine sind eine Familie kleiner basischer Proteine mit auffallend ähnlicher Struktur (CLARK-LEWIS I. et al, 1995). Die Primärstruktur enthält immer vier Cysteine, die in der Tertiärstruktur jeweils zwischen dem ersten und dritten und dem zweiten und vierten Cystein Disulfidbindungen ausbilden. Anhand von Zahl und Anordnung der ersten zwei Cysteine in der Primärstruktur werden vier Gruppen unterschieden: CXC (das bedeutet, die Cysteine sind durch eine andere Aminosäure X voneinander getrennt), CC (in dieser Gruppe liegen die zwei ersten Cysteine entsprechend direkt hintereinander), CX3C (es finden sich drei Aminosäuren zwischengeschaltet) und XCL1 (die Mitglieder dieser Gruppe enthalten insgesamt nur zwei Cysteine). Die Gruppe der CXC Chemokine wird nochmals unterteilt. Es werden anhand der Präsenz des Tripeptid-Motivs Glutamat-Leucin-Arginin (ELR) am aminoterminalen Ende der Primärstruktur nochmals eine ELR-positive und eine ELR-negative Untergruppen unterschieden. (LUSTER AD., 1998).

CXC-Chemokine

Zur Gruppe der CXC-ELR-positiven Chemokine gehören unter anderem Gro- α (CXCL-1) und IL-8. Sezerniert werden sie vor allem durch inflammatorische Leukozyten und im Fall von IL-8 auch durch Endothelzellen (FRANGOGIANNIS N., 2004). Ihre Wirkung im Rahmen der Inflammationsphase wird vor allem durch den CXCR-2 Rezeptor übermittelt, durch den sie auf verschiedene Zellen - Leukozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Progenitorzellen im Knochenmark (FRANGOGIANNIS N., 2008) – einen chemotaktischen bzw. im Falle der Gefäßendothelzellen einen angiogenen Stimulus ausüben. Weiterhin wird in Neutrophilen durch Ligandenbindung an den CXCR-2 Rezeptor die Respiratory Burst Reaktion aktiviert, was zur Entstehung von ROS und der dadurch induzierten Triggerung der Inflammationsreaktion beiträgt. (FRANGOGIANNIS N., 2008).

CXC-ELR-negative Chemokine sind u.a PF-4, IP-10. Diese wirken im Gegensatz zu den oben genannten CXC-Chemokinen in Gegenwart von ELR-positiven Chemokine oder bFGF angiostatisch. (STRIETER LM. et al, 1995)

Besonders interessant ist die Funktion und Regulation des wie oben erwähnt angiostatisch und antifibrotisch wirksamen CXC-ELR – negativen Chemokins IP-10. In einer Arbeit von Frangogiannis et al zeigte sich, dass dieses durch TNF- α hoch-, und durch TGF- β herunterreguliert wird. In der Arbeit wird des Weiteren nachgewiesen, dass die Expression

von IP-10 im Zeitverlauf 24h nach Reperfusion eines induzierten Myokardinfarkts stark abnimmt, was mit der Expression des inflammationshemmenden Zytokins TGF- β korreliert. Die Autoren vermuten daher, dass IP-10 eine verfrühte Angiogenese und ECM-Formation im Infarktreal verhindert, bis Zelldebris und zerstörte ECM im Myokard durch phagozytierende Zellen abgeräumt sind (FRANGOIANNIS N. et al, 2000, FRANGOIANNIS N., 2004).

CC-Chemokine

Die Gruppe der CC-Chemokine erscheint funktionell divers und ihre Wirkungen beschränken sich nicht auf die Inflammationsphase. Wichtige Mitglieder sind beispielsweise MCP-1, MIP-1 α und β , RANTES u.a (FRANGOIANNIS N., 2004).

Genauer eingehen werde ich im Folgenden auf MCP-1. In der Inflammationsphase scheint dieses Protein einen Schlüssel-Faktor in der Rekrutierung von Makrophagen in den Infarkt darzustellen. In eleganten Experimenten konnte gezeigt werden, dass es chemotaktische Funktion auf die Subpopulation der Makrophagen ausübt, die den CCR-2 Rezeptor exprimiert (KAIKITA K. et al, 2004). Diese entsprechen den oben erwähnten Makrophagen des alternativen Aktivierungsweges – also dem Phänotyp M2. (MOSSER D., 2003, FRANGOIANNIS N., 2008).

Das Chemokin hat zum Zweiten ebenso zwei wichtige Funktionen in der Proliferationsphase des Infarkts: Erstens die Modulation des Phänotyps der Fibroblasten im Myokard. Hierbei kommt es zur Aktivierung der Zellen zu Myofibroblasten. Die Myofibroblasten synthetisieren und sezernieren Kollagen und leiten dadurch die progrediente Fibrosierung des Myokards ein. Weiterhin wird die Expression der MMPs herunter reguliert und hiermit die Degradation der ECM im Rahmen der Inflammationsphase supprimiert. Zweitens stimuliert das Chemokin die Angiogenese. (FRANGOIANNIS N., 2008).

CX3C-Chemokine und XCL-Chemokine

Die Expression und Wirkung der weiteren zwei Chemokin-Gruppen nach Myokardinfarkt ist bisher nicht geklärt.

Zytokine

Neben den Chemokinen zeigt sich bereits innerhalb der ersten Stunden nach Infarkt eine deutlich verstärkte Expression einer weiteren Gruppe proinflammatorischer Mediatoren - der **Zytokine** - sowohl im Infarktgebiet (bis zu 50fach) als auch im gesunden Myokard (bis zu 15fach). Sezerniert werden diese wie auch die Chemokine nach Stimulation von residenten

Zellen, also Kardiomyozyten und Endothelzellen, und infiltrierenden inflammatorischen Zellen, wie Makrophagen, Neutrophilen und Mastzellen. Zytokine zeigen ein hohes Maß an Pleiotropie und Redundanz in ihren Wirkungen, das heißt, ein Zytokin kann auf verschiedene Zelltypen einwirken und dabei unterschiedliche biologische Effekte vermitteln. Einteilen kann man die Zytokine grob in drei Gruppen: TNF- α -Familie, IL-1-Familie, IL-6-Familie. (DETEN A. et al, 2002, FRANGOIANNIS N., 2008)

TNF- α

TNF- α kann an zwei Rezeptoren zur Signaltransduktion führen: TNFR-1, und -2. In einer 2007 veröffentlichten Arbeit (MONDEN Y. et al, 2007) wird vermutet, dass über den TNFR-1 schädigende Wirkungen – Suppression der Kontraktilität der Herzmuskulatur, verstärkte Apoptose der Kardiomyozyten – vermittelt werden, während der TNFR-2 kardioprotektiv wirkt. So zeigte sich in TNFR-1 Knock-Out-Mäusen verminderte MMP-Aktivität und ein kleineres Ausmaß kardialer Dysfunktion nach Infarkt (SUN M. et al, 2004). TNF- α ist ein essentieller Mediator der Inflammationsreaktion über Stimulation der Expression von Mediatoren wie Chemokinen und Zytokinen ebenso wie Adhäsionsmolekülen in Leukozyten und Endothelzellen sowie der Regulation des Metabolismus der Extrazellulär-Matrix durch Stimulation der MMP-Aktivität in Fibroblasten und gleichzeitiger Suppression der Kollagen-Synthese. (SIWIK DA. et al, 2000).

IL-1-Familie

Die drei Mitglieder dieser Familie – IL-1 α , IL-1 β , IL-1Rezeptor Antagonist – führen ebenfalls zu konträren Wirkungen im postischämischen Myokard. Während erstere über Induktion von Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen proinflammatorisch wirken, und Knock-out des einzigen Rezeptors IL-1R zu einer verminderten Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen sowie im weiteren Verlauf zu deutlich verminderter Fibrose im Infarktareal führt, ist der IL-RA ein kardioprotektiv wirksames Zytokin. Gezeigt werden konnte in Transfektions-Experimenten eine verminderte Infarktgröße, begleitet von verminderter Apoptoserate und abgeschwächter Entzündungsreaktion (FRANGOIANNIS N., 2008).

IL-6-Familie

Die Mitglieder dieser Zytokin-Familie (IL-6, -11, Oncostatin-M, Cardiotrophin-1 u.a.) üben ihre Funktionen über Multi-Subunit-Rezeptoren aus, die das Transmembran-Glykoprotein gp130 als gemeinsame strukturelle Komponente beinhalten. Im postischämischen Myokard

wurde eine signifikante Erhöhung der Konzentration dieser Zytokine durch Sekretion aus Kardiomyozyten und inflammatorischen Zellen in diversen Arbeiten nachgewiesen. Auf Kardiomyozyten konnte ein anti-apoptotischer, hypertrophie-induzierender Effekt nachgewiesen werden, sowie eine verminderte Infarktgröße nach Cardiotrophin-1 Applikation. Die genaue Rolle dieser Zytokin-Familie ist jedoch unklar, was auch daran liegt, dass die Signaltransduktion über Aktivierung des JAK/STAT-Pathways verläuft, welcher von diversen Stimuli induziert werden kann, weshalb Knock-Out-Experimente schwer durchzuführen sind. (FRANGOIANNIS N., 2008)

1.3.4 Zusätzliche postischämischen Kardiomyozytenschädigung in der Inflammationsphase

Nach der letalen oder subletalen initialen Schädigung der Kardiomyozyten durch die Ischämie zeigt die folgende Inflammationsreaktion, also die infiltrierenden Entzündungszellen und ihre Sekretionsprodukte, Chemokine und Zytokine, Auswirkungen auf den Herzmuskel. Verschiedene Aspekte müssen betrachtet werden. Einerseits die *strukturelle* Auswirkung auf die einzelnen Kardiomyozyten und ebenso auf den Herzmuskel im Gesamten und andererseits die sich *funktionelle* Auswirkung der Inflammation auf die Myokardkontraktilität.

Strukturelle Auswirkung des Chemokin- und Zytokinsturmes

Schädigung von Kardiomyozyten durch ROS

Wie bereits zu Beginn der Einleitung (Initiation der Inflammationsreaktion) dargestellt, entstehen durch Überlastung der Radikalfängersysteme der Zelle nach Ischämie in hoher Konzentration ROS (O_2^- , OH^- , H_2O_2) im Myokard. Sie stammen vor allem aus aktivierten Neutrophilen, deren Stimulation durch proinflammatorische Zytokine zum „respiratory burst“, also der Aktivierung des NADPH-Oxidase Pathways führt. Auch Kardiomyozyten produzieren im Rahmen des wiedereinsetzenden aeroben Stoffwechsels während des Elektronentransports über die Atmungskette ROS. Die dritte Quelle der ROS sind Endothelzellen, in denen durch Ischämie eine Umwandlung der Xanthin-Dehydrogenase in eine Xanthin-Oxidase induziert wird, die zur Produktion und Freisetzung von Superoxid führt. Gleichzeitig wird durch die Ischämie die Funktion der endogenen Radikalfänger, Superoxyd-Dismutase, Katalase und Gluthathion, gehemmt.

Angriffspunkte der ROS sind intrazelluläre Proteine, Nukleinsäuren und Lipide. Die Folgen sind vielfältig: So werden Proteine geschädigt, die für die zelluläre Homöostase notwendig sind, wie z.B. CaATPase, Na/K-ATPase, wodurch es zu Membranpotentialverschiebung, Zellschwellung und Ca-Überladung der Kardiomyozyten kommt. Schädigung kontraktiler

Proteine führt zur klinisch erkennbaren kontraktile Dysfunktion. Peroxidation von Lipiden in Membranen führt zur Modifikation und Funktionsverlust von Membranen und den darin verankerten Proteinen. Aufgrund der räumlichen Nähe zur ROS-Bildung ist vor allem die mitochondriale DNA betroffen, was zu einer Alteration der Atmungskette und damit der Energieversorgung der Kardiomyozyten führt. (VINTEN-JOHANSEN J., 2004, KAMINSKI KA. et al, 2002)

Wirkung von freigesetzten Zytokinen auf die Kardiomyozyten

Neben den ROS wirken bekanntermaßen auch Chemo- und Zytokine auf die Kardiomyozyten. Dabei zeigt sich wiederum das pleiotrope Wirkungsprofil der freigesetzten Stoffe. Sie können einerseits zur Apoptose der Zellen und damit zu weiterem Kardiomyozytenverlust führen, auf der anderen Seite kann die Induktion von Hypertrophie der verbleibenden Zellen kardioprotektiv wirken.

Schädigung des Myokards durch Zytokine

TNF- α wirkt mittels zweier unterschiedlicher Mechanismen proapoptotisch. Der erste Weg verläuft über die Stimulation des Rezeptors TNF-R1. Dieser Rezeptor gehört zur Gruppe der sogenannten „Death Receptors“. Diese Rezeptoren trimerisieren nach Ligandenbindung und induzieren die Ausführung der Apoptose durch Signaltransduktion über TRADD und das Downstream-Molekül Fas-associated death domain, welches die Caspase 8 stimuliert. Der zweite Weg zur Apoptose durch TNF- α ist caspase-unabhängig und führt über die Rekrutierung des Proteins FAN welches mit der membran-gebundenen neutralen Sphingomyelinase interagiert und dadurch zur Bildung von Ceramid führt. Dieses wiederum triggert ebenso die Ausführung der Apoptose. (NIAN M. et al, 2004).

Auf die überlebenden Kardiomyozyten haben die freigesetzten Mediatorstoffen eine negativ inotrope Wirkung. So beeinträchtigt TNF- α die intrazelluläre Calcium-Balance und damit die Kontraktilität durch Zerstörung der sarkolemmalen Membranen und der L-Typ-Ca-Kanäle sowie durch verminderten Expression des Ca-Transporters SERCA2A, der essentiell für die Calcium-Wiederaufnahme nach Kontraktion des Myozyten ist. Weiterhin führt die Induktion der iNOS durch das Chemokin auf indirektem Wege zu einer negativ inotropen Wirkung, indem durch die erhöhte NO Konzentration im Myokard eine Desensibilisierung der Myofilamente für Calcium induziert wird. (GOLDHABER JI. et al, 1996, NIAN M. et al, 2004, KROWN KA. et al, 1995)

Kardioprotektive Wirkung von Zytokinen

Andererseits zeigt TNF- α auch kardioprotektive Wirkung. In zwei Studien konnte gezeigt werden, dass Exposition von Kardiomyozyten gegenüber dem Zytokin zu einer Erhöhung des Gehalts an Struktur- und kontraktilen Proteinen und damit zur Hypertrophie der Zelle führen. Gleiches gilt für die Exposition gegenüber Zytokinen der IL-6-Familie. (NIAN M. et al, 2004)

Postischämische Infarktexpansion/„frühes ventrikuläres Remodeling“ in der Inflammationsphase

Der Begriff „ventrikuläres Remodeling“ beschreibt die Veränderung von Größe, Gestalt und Funktion des Ventrikels als Reaktion auf mechanische, neurohormonelle und genetische Einflüsse. Dieser innerhalb weniger Stunden nach dem Myokardinfarkt einsetzende Prozess wurde willkürlich in eine frühe Phase innerhalb der ersten 72h nach Infarkt und eine darauf folgende späte Phase – die ich unter dem Kapitel „Narbenbildung“ näher beleuchten werde - eingeteilt. (SUTTON MG. et al, 2000)

Frühes Remodeling wird definiert als „akute Dilatation und Verschmälerung der postischämischen Ventrikelwand, die nicht durch zusätzliche Kardiomyozyten-Nekrose zu erklären ist“ (EFTING F. et al, 2004). Äquivalent wird hierfür auch der Begriff „Infarkt-Expansion“ verwendet. Ursächlich sind vor allem Serin-Proteasen wie Plasmin und MMPs aus Neutrophilen, die die kollagenen Verbindungen zwischen den Herzmuskelzellen zerstören. Dadurch kommt es zum Auseinanderdriften der Kardiomyozyten („myocyte slippage/Gefügedilatation“), die makroskopisch erkennbar ist als Dilatation, und nach dem Gesetz von La Plaz zu einer verstärkten Belastung der Ventrikelwand führt. (CLEUTJENS JP. et al, 1995)

Funktionelle Auswirkung des Chemokin- und Zytokinsturmes

Die funktionelle Folge des Infarktes ist eine Einschränkung der Pumpfunktion, die echokardiographisch oder kernspintomographisch als Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion nachgewiesen werden kann.

1.4 Übergang von der Entzündungs- zur Proliferationsphase

Wie in allen postmitotischen Organen führt die Reparatur des Gewebes nach Koagulationsnekrose auch im Herzmuskel zur Ausbildung einer kollagen-basierten Narbe. Um einen Übergang von der akuten Entzündung zur Proliferations- und Heilungsphase zu erreichen sind dazu grundsätzlich die zwei folgenden Vorgänge essentiell:

1. Das Infarktareal muss von Zelldebris, nekrotischen Kardiomyozyten sowie Zellen des Entzündungsinfiltrates, und Fragmenten der zerstörten extrazellulären Matrix „befreit“ werden. Ebenso muss die durch die Inflammation entstehende provisorische ECM, bestehend vor allem aus Fibrin, abgeräumt werden, um durch Angiogenese, Fibroblastenproliferation und Kollagendeposition eine neue stabile ECM aufzubauen.
2. Um eine weitere Schädigung des Myokards durch infiltrierende Leukozyten und toxische Wirkung von Chemo- und Zytokinen zu verhindern, muss deren Expression supprimiert werden. (FRANGOIANNIS N., 2008)

1.4.1 Abräumen von nekrotischen Zellen und Fragmenten der zerstörten ECM

Die nekrotischen Kardiomyozyten werden im Rahmen der Inflammationsphase zunächst durch neutrophile Granulozyten und im weiteren Verlauf durch mononukleäre Zellen phagozytiert. Die Granulozyten sterben anschließend vor allem durch Apoptose. Das Abräumen der entstehenden Apoptose-Körperchen übernehmen professionelle Phagozyten wie Makrophagen. Dieser Vorgang spielt eine entscheidende Rolle für das weitere Schicksal der Infarktheilung, da die professionellen Phagozyten dadurch zur Sekretion von inflammationshemmenden Mediatoren wie TGF- β und IL-10 stimuliert werden und auf diese Weise zur Suppression der Entzündung im Myokard und zum Übergang in der Inflammations- in die Proliferationsphase führen. (FRANGOIANNIS N., 2008)

Auch Fragmente der zerstörten Extrazellulären Matrix werden durch phagozytierende Zellen aus dem Myokard entfernt. Über Interaktion mit dem ubiquitär exprimierten Transmembran-Protein CD44, einem Rezeptor für Hyaluronsäurefragmente, Kollagen und MMPs sie an der Resolution der Inflammation entscheidend beteiligt: Die Bindung von Degradationsprodukten der ECM und die Bindung apoptotischer Neutrophiler an CD44 professioneller Phagozyten vermittelt deren Phagozytose. Die Bindung an CD44 führt außerdem zur Migration von kollagenproduzierenden Fibroblasten ins Infarktareal und damit zur Kollagendeposition und Narbenbildung im Myokard. (MACKAY CR. et al, 1994, FRANGOIANNIS N., 2008)

1.4.2 IL-10 und TGF- β als Mediatoren der Suppression der Inflammation

Die signifikant erhöhte proinflammatorische Chemokin- und Zytokinkonzentration im Myokard sinkt, bereits 1998 von Ono beschrieben, innerhalb der ersten Woche nach Ischämie wieder auf das Ausgangsniveau ab (ONO K. et al, 1998). Verantwortlich für diese Suppression der Expression sind vor allem zwei Mediatorstoffe: IL-10 und TGF- β .

IL-10

IL-10 wird vor allem von aktivierten T-Helfer-Zellen Typ2 und Makrophagen sezerniert. Es übt auf aktivierte Makrophagen einen antiinflammatorischen Effekt aus, indem es deren Expression der proinflammatorischen IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-8 verhindert. Durch die gleichzeitige Induktion der Expression von TIMP-1, welches durch Hemmung der MMPs die Degradation der ECM supprimiert, wirkt es zusätzlich stabilisierend auf die ECM. (LACRAZ S. et al, 1995)

TGF- β

Die Rolle von TGF- β wurde von N. Frangiogiannis kurz und prägnant als „Hauptschalter (Master switch)“ von der Inflammation zur Fibrose beschrieben, da es durch seine Pleiotropie sowohl an der Suppression der Inflammation als auch an der Promotion der Fibrose entscheidend beteiligt ist (FRANGOIANNIS N., 2008).

Der Hauptanteil des im postischämischen Myokard exprimierten TGF- β stammt zunächst aus ins Gewebe ausgetretenen Thrombozyten. In der proliferativen Phase des Infarktes scheinen dagegen Makrophagen und Fibroblasten die Hauptproduzenten dieses Zytokins darzustellen. TGF- β existiert in drei Isoformen und wird zunächst als inaktiver Large Latent Complex ins Gewebe sezerniert, das heißt, das TGF- β -Molekül ist an seinem aminoterminalen Ende verbunden mit dem sogenannten Latency Associated Protein (LAP). Zur Bildung des wirksamen TGF- β sind zwei Schritte nötig. Zunächst wird proteolytisch TGF- β von LAP getrennt, wobei die zwei Moleküle durch eine nicht-kovalente Bindung verbunden bleiben und als Small Latent Complex bezeichnet werden. Plasmin, MMP-2, MMP-9, Thrombospondin-1, Integrine, ROS, saurer pH u.a führen durch komplette Abspaltung des LAP zur endgültigen Aktivierung. (FRANGOIANNIS N., 2008, DEAN RG. et al, 2005).

Die Signaltransduktion des Moleküls wird vermittelt über den konstitutiv auf Zelloberflächen exprimierten TGF- β -Rezeptor-Typ-II. Der Rezeptor wird auf allen Zellen exprimiert, die an

der Heilung des Myokardinfarktes beteiligt sind, also Kardiomyozyten, inflammatorische Zellen, Endothelzellen und Myofibroblasten. Ligandenbindung an diesen Rezeptor führt zu dessen Autophosphorylierung an intrazellulären Serin- und Threonin-Resten und anschließend zur Transphosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des TGF- β -I-Rezeptors ebenfalls an Serin- und Threonin-Resten. (BUJAK M. et al, 2007, SHY Y. et al, 2003).

Der durch die Transphosphorylierung aktivierte TGF- β RI phosphoryliert konsekutiv die intrazellulären Signaltransduktionsmoleküle smad2 und smad3 an deren carboxy-terminalen Serin. Diese formen mit smad4 einen trimeren Komplex, der in den Zellkern wandert und dort die Transkription der TGF- β assoziierten Gene auslöst. Eine Verstärkung der Signaltransduktion erfolgt durch zusätzliche Sumoylierung, der Abbau des Rezeptors wird vermittelt durch Ubiquitylierung. (KANG JS. et al, 2009)

Die Signaltransduktion kann auf weiteren Signalwegen auch smad-unabhängig ablaufen. Smad-unabhängiges Downstream-Signaling kann durch die MAP-Kinasen, c-abl sowie weitere Signalwege übermittelt werden (FRANGOIANNIS N., 2008)

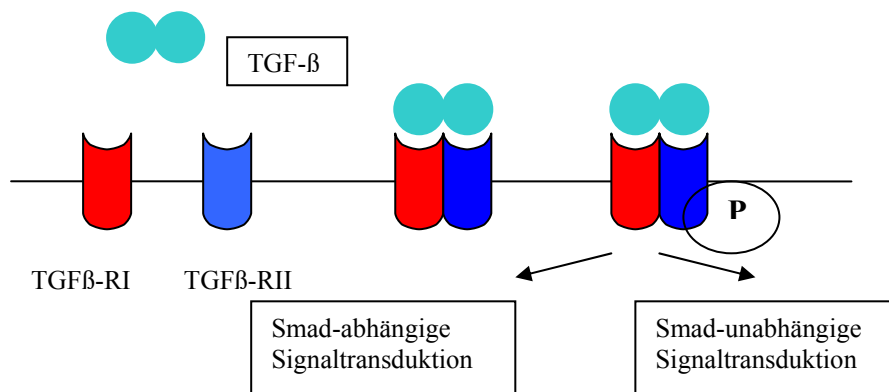


Abb.3 TGF- β : smad-abhängige und smad-unabhängige Signaltransduktion. (modifiziert aus KANG JS. et al, 2009)

Die folgende Tabelle zeigt die diversen Wirkungen des Zytokins im auf die verschiedenen Zelltypen im Myokard.

<u>Zelltyp</u>	<u>Wirkung</u>
Makrophagen	Deaktivierung Suppression der Chemokin- und Zytokinsynthese
Endothelzellen	Kontextabhängig angiogene oder angiostatische Wirkung Verminderte Expression von Adhäsions-Molekülen

Fibroblasten	Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten Stimulation der Synthese von Bestandteilen der ECM (Kollagen, Proteoglykane, Tenascin, Fibronektin) Proliferation Modulation des Verhältnisses sezernierter MMPs : TIMPs zugunsten der Inhibitoren
Kardiomyozyten	Hypertrophie

Tab. 2 Wirkungen von TGF- β auf verschiedene Zelltypen im Myokard (BUJAK M. et al, 2007).

1.5 Proliferationsphase

Diese zweite Phase der Heilung des Myokardinfarktes ist charakterisiert durch die Ausbildung eines extensiven mikrovaskulären Netzwerkes durch Angiogenese und Proliferation von Gefäßendothelzellen und die Produktion von Proteinen der Extrazellulär-Matrix durch zu Myofibroblasten aktivierten Fibroblasten – also der Ausbildung eines Granulationsgewebes. Das Granulationsgewebe besteht also charakteristischerweise aus proliferierenden Endothelzellen, Myofibroblasten und Makrophagen.

Schon 1995 wurde gezeigt, dass die Expression von Zytokinen im Herzmuskelgewebe nach dem im vorhergehenden Abschnitt beschrieben vorübergehenden Abfall zur Suppression der Inflammationsreaktion nach wenigen Tagen – sowohl im Infarktgebiet als auch im gesunden Myokard - in einer „zweiten Welle“ wieder signifikant ansteigt. Die Höhe der Konzentration an Zytokinen in dieser Phase des zweiten Zytokinanstieges ist direkt korreliert dem Ausmaß der Dilatation des geschädigten Myokards und damit der Pumpfunktion des Herzmuskels. (HERSKOWITZ A., 1995, NIAN M. et al, 2004).

1.5.1 Angiogenese im Granulationsgewebe

Angiogenese bedeutet das Aussproßen und Reifen neuer Gefäße aus bereits Vorhandenen. Die erste Stimulation der Angiogenese im Infarktreal erfolgt früh, im Myokard können bereits 24h nach Infarkt erste histologische Anzeichen von Gefäßbildung detektiert werden. (FRANGOIANNIS N. et al, 2002, CONWAY E. et al, 2001).

Für die Induktion der Angiogenese im physiologischen Ablauf der Infarktheilung spielen im Wesentlichen drei Mechanismen eine Rolle:

1. Durch die Hypoxie wird zunächst die Genexpression von HIF-1 α induziert. Dieses führt zur Expression des pro-angiogen wirksamen Proteins VEGF (FRANGOIANNIS N., 2008).
2. Präformierte Mediatorstoffe wie bFGF, IGF-1, TGF- β und auch das genannte VEGF u.a werden durch Degradation der extrazellulären Matrix durch MMPs und andere Proteasen, die im Rahmen der Inflammation im Myokard aktiviert werden, aus dieser freigesetzt. (CONWAY E. et al, 2001)
3. Inflammatorische Zellen wie Makrophagen sezernieren pro-angiogenetisch wirksame Mediatoren wie MCP-1, TGF- β u.a

Ablauf der Angiogenese

Die Angiogenese kann man grob in drei sich überlappende Schritte mit sich ebenfalls in ihren Wirkungen überlappenden Mediatoren einteilen:

- 1) Schaffung der Voraussetzung für Aussprossung von Gefäßen durch ECM-Degradation und Permeabilitätserhöhung vorhandener Gefäße.
- 2) Ausbildung der Gefäßaussprossungen
- 3) Überleben oder Regression der neugebildeten Gefäße

1) Die Proliferation und Migration von Endothelzellen zur Ausbildung neuer Gefäßschläuche erfordert zunächst die Auflösung von zwei physikalisch vorhandenen „Hindernissen“: Die Basalmembran der bestehenden Gefäße wird an bestimmten Stellen aufgelöst, und die extrazelluläre Matrix muss aufgelockert werden. Dazu fähig sind Proteinase wie die MMPs - 2, -3, -9, und insbesondere nach Myokardinfarkt uPA. Die Permeabilitätserhöhung der vorhandenen Gefäße führt zu einer Extravasation von Plasmaproteinen, die temporär als unterstützende Struktur für die migrierenden Endothelzellen fungieren. (CONWAY E. et al, 2001)

2) Aktivierte Endothelzellen proliferieren und migrieren entlang von Leitstrukturen wie den oben erwähnten Plasmaproteinen, Integrinen und Oberflächenmolekülen wie CD31. Zur Stabilisierung der neu gebildeten Gefäßschläuche ist zum Einen die Rekrutierung von perivaskulären Zellen, also Perizyten und/oder glatten Muskelzellen erforderlich. Zum Anderen muss eine neue stabile Extrazellulär-Matrix gebildet werden, wofür Myofibroblasten

durch die Produktion von Strukturproteinen wie Kollagen u.a verantwortlich sind. (CONWAY E. et al, 2001)

3) Die reife Narbe im Myokard ist bekanntermaßen kollagenreich und gefäßarm. Dies bedeutet, dass viele Gefäße des im Granulationsgewebe ausgebildeten kapillären Netzwerks wieder verschwinden. Verantwortlich dafür ist vor allem der apoptotische Untergang nicht benötigter Endothelzellen. (HELLSTROM M. et al, 1999)

Die wichtigsten zur Regulation und Koordination der Angiogenese beitragenden Mediatoren und ihre Hauptwirkungen innerhalb der Phasen der Heilung des Myokardinfarktes, also Inflammationsphase, Proliferationsphase und Narbenreifung, fasst die folgende Tabelle zusammen. (BECHARA C. et al, 2007, CONWAY E. et al, 2001, MORISHITA R. et al, 2002)

<u>Name</u>	<u>Hauptwirkung</u>	<u>Phase</u>
NO	Permeabilitätserhöhung	1
VEGF	Permeabilitätserhöhung Proliferation und Migration von Endothelzellen	1, 2
bFGF, MCP-1, gro- α	Angiogenetische Wirkung	2
PDGF-BB	Rekrutierung glatter Muskelzellen	2
TGF- β	Differenzierung von glatten Muskelzellen ECM-Produktion	2
HGF	Proliferation von Endothelzellen Anti-apoptotische Wirkung auf Endothelzellen	2, 3
CD31	Leitstruktur für Migration von Endothelzellen Antiapoptotische Wirkung auf Endothelzellen	2, 3

Tab.3 Mediatoren, die zur Stimulation der Angiogenese führen, deren Hauptwirkung und die Phase, in der diese Wirkung zum Tragen kommt. (1=Inflammationsphase, 2=Proliferationsphase, 3=Narbenreifung)

Die Angiogenese im heilenden Myokardinfarkt ist ein stark regulierter Vorgang. Um eine überschießende Gefäßbildung zu verhindern, stehen den dargestellten positiven angiogenen Stimuli negative Regulatoren gegenüber:

1. Mechanische Faktoren: Fehlende Blut – und damit Nährstoffversorgung durch Spasmen oder Thromben führt ebenso zu pro-apoptotischer Signaltransduktion in den

Endothelzellen wie fehlende Scherkräfte durch verminderten Blutfluss und fehlende Umhüllung mit Perizyten/glatten Muskelzellen. (CONWAY E. et al, 2001)

2. Humorale Faktoren: sezernierte angiostatisch wirksame Mediatoren wie Thrombospondin-1, IL-1, INF- α u.a aus Makrophagen hemmen direkt Proliferation und Migration von Endothelzellen. Des Weiteren wird der negative Regulator Angiostatin durch MMP-7 und -9 aus zirkulierendem Plasminogen gebildet (CONWAY E. et al, 2001, FRANGOIANNIS N., 2008, LAMBERT J. et al, 2008)
3. Regulation der Degradation von ECM und Basalmembran durch MMPs über deren Inhibitoren, die TIMPs.

1.5.2 Umbau (Turn-over) der Extrazellulär-Matrix: Aktivierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten und Kollagendeposition im Granulationsgewebe

Die Myofibroblasten sind die Hauptproduzenten von Kollagen und weiteren Komponenten der extrazellulären Matrix wie u.a Fibronectin und haben damit entscheidenden Anteil an der Ausbildung einer neuen stabilen ECM aus einer kollagen-basierten Narbe im Myokard. Sie sind nachweisbar im Granulationsgewebe, vor allem im Randgebiet des Infarktes, wo sie eine starke Proliferationsaktivität aufweisen, und werden apoptotisch, wenn die Narbe ausreift. (FRANGOIANNIS N., 2008)

Myofibroblasten entstehen aus Fibroblasten, die angelockt durch Zytokine wie TGF- β , PDGF, bFGF, IL-1 aus Thrombozyten, Neutrophilen, Makrophagen oder aktivierten Endothelzellen in das verletzte Gewebe migrieren und durch Stimulation ihren Phänotyp verändern. Der Phänotyp des Myofibroblasten im Gegensatz zum Fibroblasten ist charakterisiert durch die Ausbildung eines kontraktiven Apparates, die Expression von α -Smooth-Muscle-Actin und durch die Produktion und Sekretion von Prokollagen, welches im Myokard zum endgültigen Kollagen „verarbeitet“ wird und die ECM der Narbe ausbildet. (FRANGOIANNIS N., 2008, ROBBINS&COTRAN, 2005)

An der Aktivierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten sind verschiedenen Faktoren beteiligt. Das schon ausführlich beschriebene TGF- β spielt auch hier eine wichtige Rolle: Es reguliert die Expression von α -SMA und wahrscheinlich auch die Modulation der Morphologie, also des „äußeren“ lichtmikroskopisch sichtbaren Phänotyps der Fibroblasten. Auch Veränderungen in der Zusammensetzung der ECM können zur Wandlung zum Myofibroblast führen. Nachgewiesen wurde dies schon 1998 für die ED-A Spleiß-Variante von Fibronectin,

welche eben diese Wandlung in Fibroblasten induziert. Dieselbe Auswirkung haben auch mechanische Dehnung des Ventrikels sowie „relative Hyperoxie“ im Myokard, das heißt Rückkehr zum normalen pO₂ durch Reperfusion. (FRANGOIANNIS N., 2008)

Im Rahmen der Ausbildung der kollagen-basierten Narbe im Infarktareal ändert sich die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. MMPs und Serin-Proteasen wie Elastase und Plasmin bauen einerseits ECM-Komponenten ab (Proteoglykane, Fibronectin, Laminin, Kollagen) ab, andererseits wird durch Sekretion von Prokollagen aus Myofibroblasten und dessen Prozessierung zu Kollagen ein stabiles Narbengewebe aufgebaut. Die „Netto-Deposition“ von Kollagen hängt somit vom Verhältnis von Synthese zu Degradation von Komponenten der ECM ab. (ROBBINS&COTRAN, 2005, CLEUTJENS JP: et al, 1995).

Im zeitlichen Verlauf nach Myokardischämie überwiegt im Rahmen der Inflammationsphase zunächst die Matrixdegradation. So wiesen McGavigan et al einen Verlust von ungefähr 25% des Kollagengehaltes des Infarktareals innerhalb 24h nach AMI nach. (McGAVIGAN AD. et al, 2006). Die zeitliche Ausprägung der Expression der MMPs ist dabei spezies-spezifisch: Bei der in dieser Arbeit verwendeten Ratte ist MMP-Aktivität erst zwei Tage nach dem Infarkt nachweisbar, ihren Gipfel erreicht sie an Tag 7. Im Rahmen der Proliferationsphase werden anschließend verstärkt Komponenten der ECM, vor allem fibrilläres Kollagen I und III, synthetisiert und abgelagert (ROBBINS&COTRAN). Die Konzentration an Typ III mRNA steigt ab Tag 2, die des Typ I ab Tag 4, beide bleiben im Verlauf der Proliferationsphase nachweisbar - Typ III ungefähr drei Wochen, Typ I bis zu drei Monate. (CLEUTJENS JP. et al, 1995).

Der Umbau der ECM hin zu der endgültigen stabilen kollagenen Matrix liegt die im Kapitel 1.4 „Übergang von Inflammationsphase zur Proliferationsphase“, beschriebene Änderung des Zytokin-Milieus im Verlauf von Inflammations- zu Proliferationsphase zu Grunde (LINDSEY ML, 2004, FRANGOIANNIS N., 2008). Wie bereits ausführlich dargestellt dominieren in der Inflammationsphase proinflammatorische Chemo- und Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- α , die abgelöst werden von jenen, die unter Punkt 1.5.1 „Angiogenese“ und 1.5.2, „Turn-over der Extrazellulär-Matrix: Aktivierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten und Kollagendeposition im Granulationsgewebe“ beschrieben wurden, darunter TGF- β , bFGF, PDGF u.a.

Das beschriebene Turn-over der ECM ist, ebenso wie die im vorhergehenden Abschnitt dargestellte Angiogenese, ein stark regulierter Vorgang.

Regulation der für die Degradation der ECM verantwortlichen MMPs

Matrix-Metallo-Proteinase werden auf drei Ebenen kontrolliert: Ihre *Sekretion* wird durch inflammatorische Mediatoren (IL-1, TNF- α) induziert, während TGF- β sowie Glukokortikosteroide hemmend wirken. Die Enzyme werden als inaktive Pro-Enzyme sezerniert, so dass zur *Aktivierung* Proteasen wie Plasmin, Elastase u.a erforderlich sind. Zusätzlich existieren im Gewebe Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs), die von den meisten mesenchymalen Zellen produziert werden und zur sofortigen *Inaktivierung* aktivierter MMPs führen. (ROBBINS&COTRAN)

Regulation des Sekretionsprofil der für den Aufbau einer stabilen kollagen-basierten ECM verantwortlichen Myofibroblasten

Proinflammatorische Zytokine der Inflammationsphase führen zu einem „ECM-abbauenden“ Phänotyp der Fibroblasten. So wurde von Siwik et al gezeigt, dass Stimulation von Fibroblasten mit IL-1 und TNF- α eine verstärkte Expression von MMPs bei gleichzeitig verminderter Expression von Prokollagen zur Folge hat. (SIWIK DA. et al, 2000). Dagegen führen in der Proliferationsphase exprimierte Mediatorstoffe wie TGF- β und bFGF zu einer Änderung des Sekretionsmusters der Myofibroblasten: Es kommt zu einer deutlichen Erhöhung der Prokollagen-Sekretion in das Myokard und gleichzeitig zur Stimulation der Synthese von TIMPs, wodurch der Aufbau einer stabilen ECM durch Hemmung der MMPs unterstützt wird. (FRANGOIANNIS N., 2008)

1.6 Ausreifung der Narbe

1.6.1 Veränderung der LV-Morphologie im Zeitverlauf: Makroskopie und Mikroskopie

Das späte Remodeling des Myokards bezieht sich definitionsgemäß auf den Zeitraum mehr als 72h nach dem Infarkt. Im Gegensatz zum frühen Remodeling beziehen die späten Umbauvorgänge den gesamten Ventrikel – also sowohl Infarktgebiet, als auch Randbereich und gesundes Myokard - mit ein.

Makroskopisch sichtbar ist eine über drei bis vier Monate progrediente Dilatation des Infarktareals, während das primär nicht betroffene Myokard hypertrophiert und sich damit die Ventrikelwand verdickt. (GABALLA MA. et al, 2003). Unter dem Mikroskop sieht man ab Tag sieben vor allem im Infarktgebiet zunehmend Kollagen-Fibrillen, die die Narbe bilden. Der Bereich der Koagulationsnekrose ist nach ungefähr vier Wochen vollständig durch die kollagene Narbe ersetzt.

Zugleich kommt es zur kompensatorischen Hypertrophie der Kardiomyozyten im gesunden Myokard. Das Zellvolumen dieser Zellen nimmt um bis zu 70% zu. Da sich die Länge der Sarkomere nicht verändert, bedeutet dies, dass die Volumenzunahme auf einem Rearrangement der Myofibrillen beruht (SUTTON MG. et al, 2000, PFEFFER MA. et al, 1990). Bei Infarkten, die bis zu 20% des linksventrikulären Myokards einbeziehen, ist die Hypertrophie der Kardiomyozyten proportional zur Infarktgröße und ausreichend, die kontraktile Funktion des Myokards zu erhalten. Größere Infarkte scheinen die Anpassungsfähigkeit des überlebenden Myokards zu übersteigen, so dass im Vergleich zur Größe des Infarktes die Volumenzunahme zu gering ist, die ausgefallenen Kardiomyozyten nicht kompensiert werden können und die LVEF abnimmt. (GABALLA MA. et al, 2002).

Der Begriff „Spätes Remodeling“ beschreibt zusammenfassend die zwei Komponenten Hypertrophie der überlebenden Kardiomyozyten und Kollagendeposition vor allem im geschädigten, aber auch im zunächst gesund erscheinenden Myokard.

1.6.2 An der Narbenreifung beteiligte Zytokine und Wachstumsfaktoren

Die in Hypertrophie der Kardiomyozyten resultierenden Stimuli lassen sich in drei Gruppen gliedern:

- neurohormonelle Mediatoren, die zur funktionellen Anpassung an die reduzierte Pumpleistung des Ventrikels aktiviert/sezerniert werden (diese sind in der folgenden Abbildung blau unterlegt)
 - Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in der Inflammations – und Proliferationsphase freigesetzt werden
 - Auswirkung der mechanischen Belastung durch erhöhte Wandspannung des dilatierten Ventrikels auf die Genexpression der Kardiomyozyten
- (SUTTON MG. et al, 2000, GABALLA MA. et al, 2002)

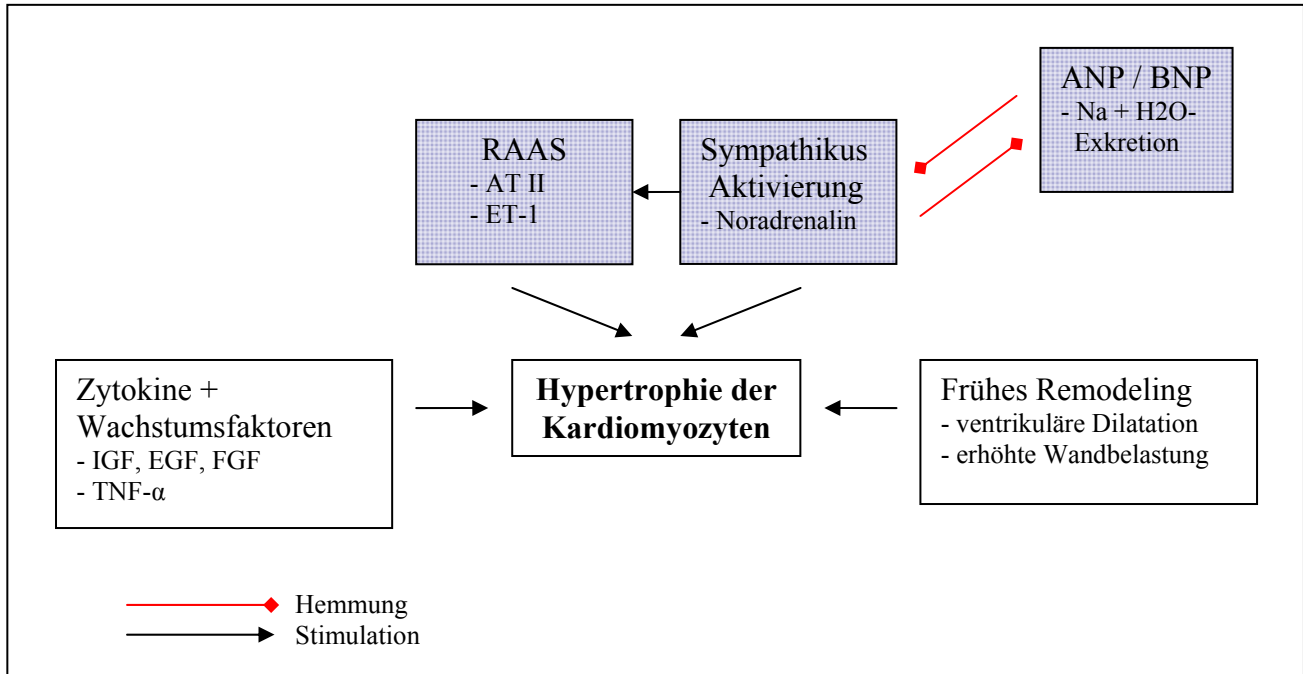


Abb.4 Induktion von Hypertrophie der überlebenden Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt durch die im Text beschriebenen Zytokine + Wachstumsfaktoren, neurohormonelle Mediatoren und erhöhte Wandspannung des Ventrikels (modifiziert nach SUTTON MG. et al, 2000, GABALLA MA., et al, 2002)

Neurohormonelle Anpassung

Die aus dem Verlust von Kardiomyozyten resultierende verminderte kardiale Pumpfunktion mit konsekutiver Kreislauf-Hypotonie führt zur systemischen Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit Katecholaminsekretion des Nebennierenmarks und der sympathischen Nervenendigungen. Im juxtaglomerulären Apparat der Niere wird Renin freigesetzt, das zur Aktivierung von Angiotensin II führt, wodurch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert wird. Noradrenalin und AT II stimulieren wiederum die Sekretion von Endothelin-1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System wird auch lokal im verletzten Myokard durch Aktivierung des Angiotensin-Converting-Enzyms durch Serin-Proteasen induziert. Weiterhin führen Endothelin-1 und mechanische Wandbelastung zur Sekretion von ANP und BNP aus atrialen bzw. ventrikulären Kardiomyozyten.

Die hypertrophie-induzierende Wirkung dieser Mediatorstoffe auf die Kardiomyozyten verläuft über einen gemeinsamen Signaltransduktionsmechanismus: Bindung an G-Proteingekoppelte Rezeptoren (NA über α_1 -Rezeptoren, AT-II über AT1-Rezeptoren, ET-1 über

ET1-Rezeptoren) und konsekutive Aktivierung von Signalwegen über die Protein-Kinase C, die MAP-Kinase und die S6-Kinase. Dadurch wird die Expression von wachstumsfördernden Genen (zunächst c-jun, c-myc, später α -actin, β -MyHC) vermittelt, die zu vermehrter Synthese von Strukturproteinen des kontraktile Apparates wie die Myosin Schwereketten, Troponinen u.a und damit zur Volumenzunahme und Hypertrophie der Zellen führt. (SUTTON MG. et al, 2000)

Zytokine und Wachstumsfaktoren

Auch die Effekte von Wachstumsfaktoren wie IGF I und II, bFGF, PDGF über ihre jeweiligen Rezeptoren, membrangebundene Tyrosinkinase, werden über G-Proteine vermittelt und führen zur Signaltransduktion über die MAP-Kinase. Zytokine und Wachstumsfaktoren münden mit den neurohormonellen Mediatorstoffen somit in einer gemeinsamen Endstrecke und haben daher ebenso wie diese die Volumenzunahme und Hypertrophie der Kardiomyozyten zur Folge. (GLENNON PE. et al, 1996)

Erhöhte Wandspannung durch Ventrikeldilatation im Rahmen des frühen Remodeling

Nach dem Gesetz von Laplace ist die Wandbelastung des Ventrikels direkt proportional zum Ventrikeldurchmesser und zum intraventrikulärem Druck, sowie indirekt proportional zur Wanddicke. Die Dilatation des geschädigten Ventrikels durch myokardiale Gefügedilatation, die wie beschrieben im Rahmen des frühen Remodeling auftritt, führt daher zu einer Erhöhung der Wandspannung (PFEFFER MA. et al, 1990). Dies führt zur Dehnung der Kardiomyozyten, wodurch aus zytoplasmatischen Granula Angiotensin II freigesetzt wird. Die dehnungsinduzierte Hypertrophie der Zellen wird somit ebenso wie die neurohormonell induzierte über AT1-Rezeptoren und damit den gleichen Downstream-Signalweg wie oben beschriebenen vermittelt. (SUTTON MG. et al, 2000)

1.6.3 Übergang zur chronischen myokardialen Insuffizienz – strukturelle und funktionelle Auswirkung des späten Remodelings

Das späte Remodeling, also der strukturelle Umbau des Myokards durch kollagene Fasern und Hypertrophie verbleibender Kardiomyozyten zieht konsekutiv funktionelle Auswirkungen nach sich. Klinisch stellt sich der Funktionsverlust des kontraktile Myokards als chronische Herzinsuffizienz, also die Unfähigkeit des Herzens eine adäquate Pumpfunktion zur Versorgung des Körpers zu gewährleisten, dar.

Die folgende Abbildung veranschaulicht die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz als Komplikation eines AMI.

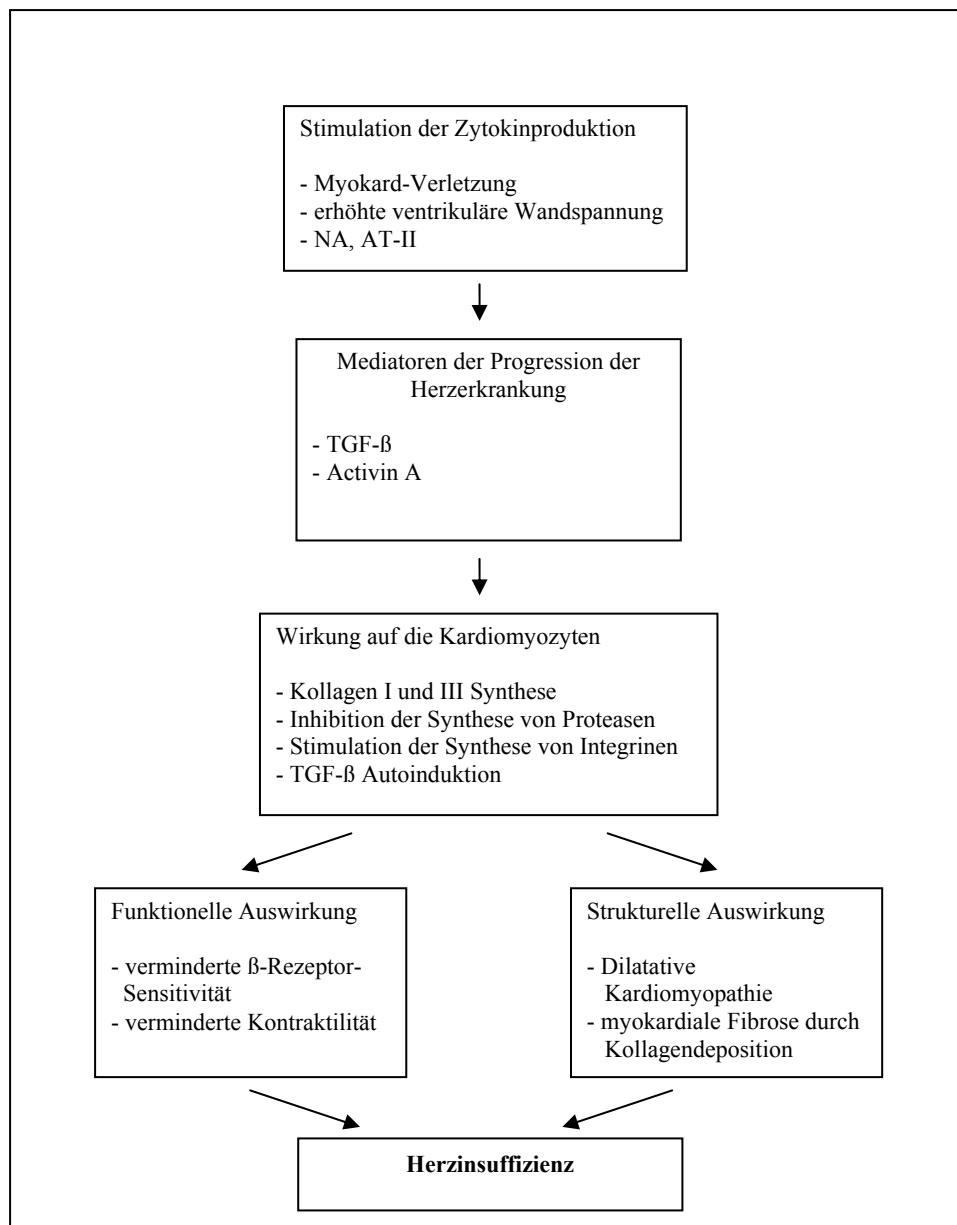


Abb.5 Progression zur Herzinsuffizienz nach akutem Myokardinfarkt. (modifiziert nach LIM H. et al, 2006)

Der reparative Umbau des Ventrikels durch Hypertrophie, Dilatation und Kollagendeposition schreitet so lange fort, bis ein Gleichgewicht zwischen den zur weiteren Dilatation des Ventrikels führenden Kräften (erhöhte Wandspannung, erhöhte Druckbelastung des einzelnen Kardiomyozyten durch Verlust von Herzmuskelzellen bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Pumpleistung) und der Zugbelastbarkeit der kollagenen Narbe erreicht ist. Bestimmt wird dieses durch die Größe und Lokalisation des Infarktes – antero-apikale Infarkte führen zu

einer besonders starken Erhöhung der Wandspannung und die trophische Situation des Herzmuskels, die von der Durchblutung abhängt (SUTTON MG. et al, 2000, PFEFFER MA. et al, 1990).

Funktionelle Auswirkung der Kollagendeposition ist die kontraktile Insuffizienz des Myokards, da Kollagen nicht kontraktionsfähig ist. Die kontraktile Insuffizienz wird verstärkt durch zusätzlich weitere Faktoren. Durch die prolongierte Exposition gegenüber proinflammatorischen Zytokinen kommt es zur Induktion der iNOS im Myokard. Die entstehenden Nitrate und Peroxynitrate führen durch die Nitrosylierung von Thiol-Resten kontraktiler Proteine zur weiteren Beeinträchtigung der Pumpfunktion. Weiterhin kommt es im Infarktbereich zu einer Verminderung der Sensitivität der β -Rezeptoren gegenüber Katecholaminen, wodurch deren positiv inotrope Wirkung nicht mehr zum tragen kommen kann. Die genaue molekulare Ursache dafür ist bisher unklar, es wurde jedoch in mehreren Arbeiten gezeigt, dass sich der Effekt, durch NOS-Antagonisten verhindern lässt, so dass die Induktion der iNOS auch für diesen Effekt verantwortlich zu sein scheint. (MEHRA V. et al, 2005)

1.7 Geweberegeneration durch aus dem Knochenmark mobilisierte endogene Stammzellen

Im Knochenmark ist neben den hämatopoetischen Progenitorzellen ein Pool von Vorläuferzellen vorhanden, der bei Endothelverletzung oder Myokardischämie mobilisiert werden kann. Nach dem sogenannten „homing“ am Ort der ischämischen Schädigung werden diese Progenitorzellen dort adhärent und können Strukturen wie Gefäße und Muskelzellen ausbilden und dadurch zur Regeneration des geschädigten Gewebes beitragen. Die Vorläuferzellen werden anhand der auf der Oberfläche exprimierten und in der Cluster-of-Differentiation Nomenklatur charakterisierten Marker in verschiedene Subpopulationen unterteilt. Sie weisen bereits frühe muskelspezifische, myokardialen oder endotheliale Marker auf. Das bedeutet, dass sie bereits einer Liniendifferenzierung zugehören, weshalb sie als gewebe-spezifische Vorläuferzellen (TSSC) bezeichnet werden. Bisher charakterisiert wurden neben den hämatopoetischen Progenitorzellen endotheliale Progenitorzellen, mesenchymale Progenitorzellen und vor kurzem Progenitorzellen mit frühen kardialen Markern. Allen gemeinsam ist, dass sie den Oberflächenrezeptor CXCR-4 tragen. Der spezifische Ligand dieses Rezeptors ist das Zytokin SDF-1. (WOJAKOWSKI W. et al, 2008)

Unklar ist bisher, ob die Progenitorzellen als TSSC aus dem Knochenmark mobilisiert werden, oder ob „echte“ Stammzellen (also Zellen, die noch fähig sind, sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren) aus dem Knochenmark im Gewebe in die verschiedenen bereits einer Liniendifferenzierung zugehörigen Zelltypen differenzieren. (WOJAKOWSKI W. et al, 2008, WOJAKOWSKI W. et al, 2005)

Die stammzell-basierte Regeneration des Myokards benötigt das Zusammenwirken von Zytokinen, die im Rahmen eines akuten Koronarsyndromes verstärkt exprimiert werden und die man in zwei Gruppen unterteilen kann:

1. Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark und Homing im Gewebe:

G-CSF, GM-CSF, SDF-1, IL-8, Gro- α /KC ,

VEGF

2. Proliferation, Differenzierung und Überleben der Stammzellen:

EPO, VEGF, TGF- β , HGF

Das komplexe Zusammenspiel der Mediatoren zur Koordination von Mobilisierung, Homing im Myokard und Proliferation, Differenzierung und Überleben der Stammzellen im Myokard verdeutlicht die folgende Abbildung. (VANDERFELDE S. et al, 2005)

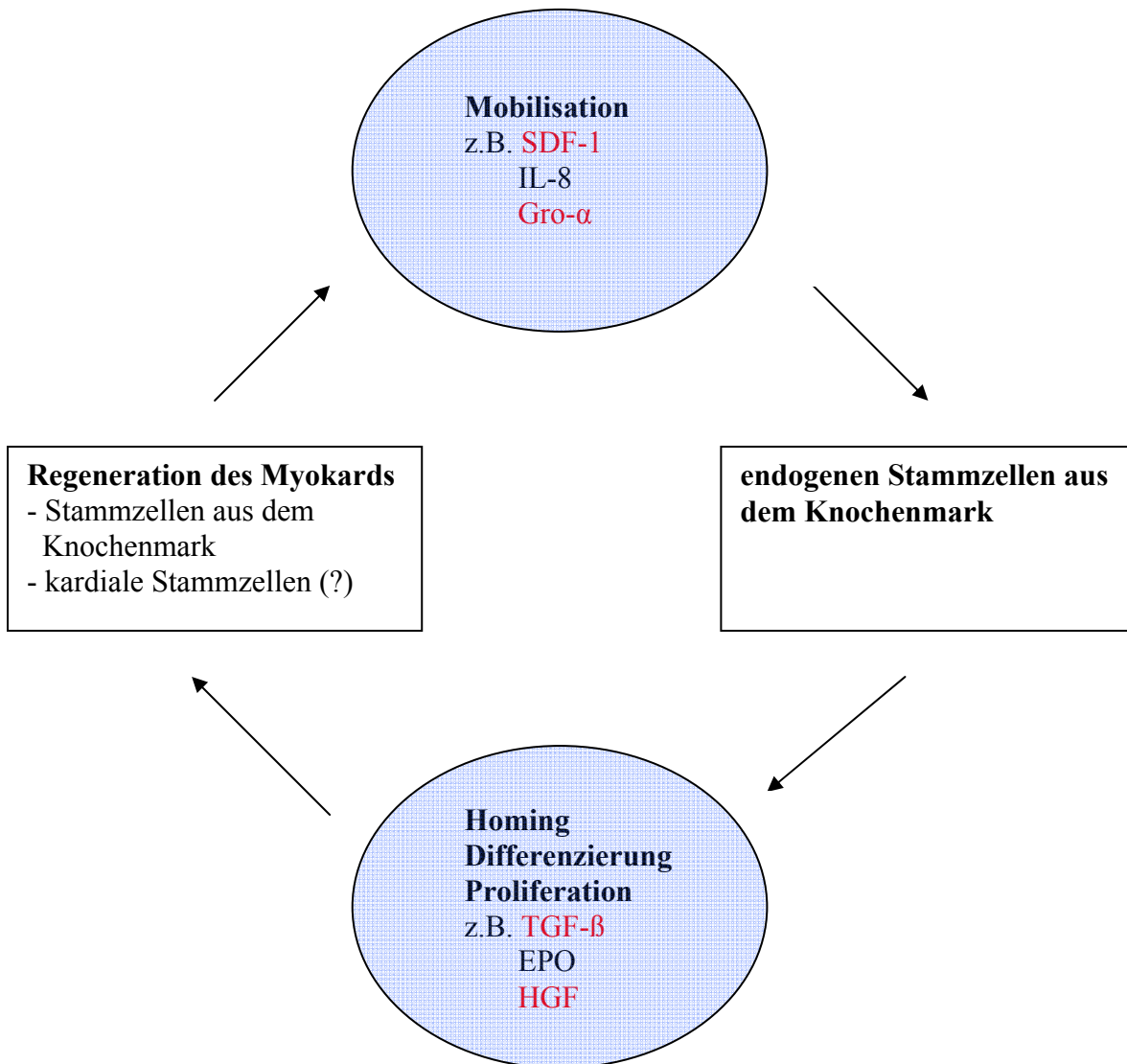


Abb.6 Koordination der stammzellbasierten Reparatur des Myokards durch parakrine Wirkung von Mediatorstoffe/Zytokinen (in der Abbildung blau hinterlegt), die im Rahmen der Inflammationsphase nach ischämischer Schädigung des Myokards exprimiert werden. Rot geschrieben sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zytokine. (modifiziert nach VANDERFELDE S. et al, 2005)

Da eine nähere Betrachtung aller Mediatorstoffe den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, werde ich im Folgenden nur auf die Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten Zytokine auf die Stammzellen eingehen.

SDF-1

SDF-1 hat über zwei Wege entscheidenden Einfluss auf die Stammzellmobilisierung. Zum Einen trägt dabei zur Freisetzung der Stammzellen aus dem Knochenmark bei, indem es zur Aktivierung der Protease MMP-9 aus Neutrophilen führt. Diese baut die Bindung der Zellen

an die ECM des Knochenmarkes ab, indem es den „soluble Kit-Ligand“ von dem c-kit Oberflächenrezeptor auf Progenitorzellen trennt und damit die c-kit-tragenden Zellen in die Zirkulation „entlässt“ (HEISSIG B. et al, 2002). Zum Anderen ist SDF-1 der spezifische Ligand für den CXCR-4, über den es auf die TSSC, die ja wie beschrieben durch CXCR-4 Expression charakterisiert sind, einen starken chemotaktischen Stimulus ausübt. Die CXCR-4/SDF-1 Achse hat damit den entscheidenden Anteil an Chemotaxis und Homing der TSSC im ischämischen Myokard. (WOJAKOWSKI W. et al, 2008)

HGF

HGF übt analog zu SDF-1 eine chemotaktische Wirkung auf rezeptortragende Vorläuferzellen aus. Der spezifische Rezeptor dieses Zytokins ist c-met. Des Weiteren ist HGF fähig, im Zielgewebe selbst, also dem geschädigten Myokard, ein adhäsionsförderndes lokales Umgebungsmilieu zu schaffen, dass das Anwachsen und Überleben der Zellen im Myokard gewährleistet.

(WOJAKOWSKI W. et al, 2008, VANDERFELDE S. et al, 2005)

Die folgende Abbildung summiert kurz die diversen Wirkungen der verschiedenen Zytokine

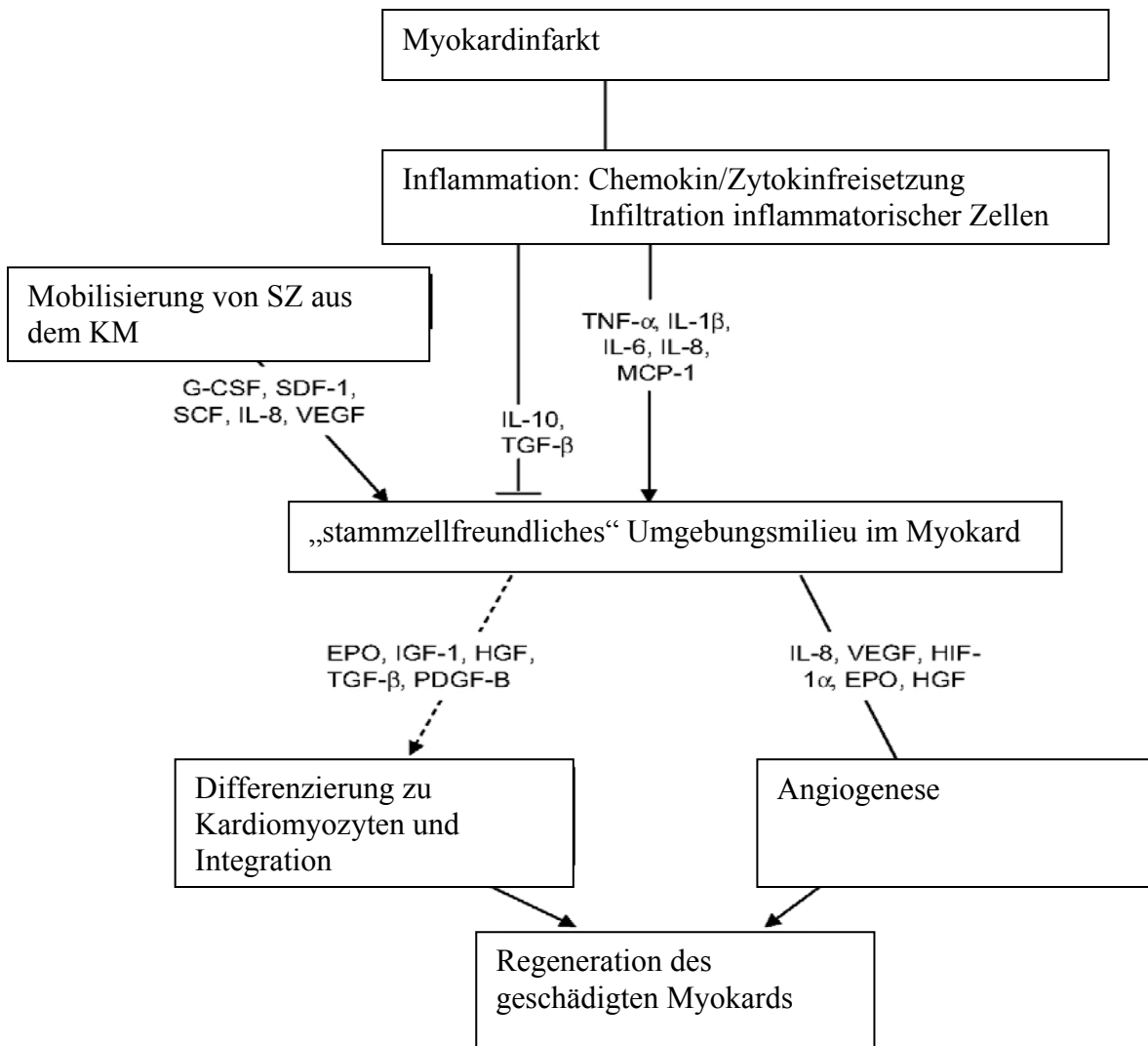


Abb.7 Schlüsselfaktoren zur stammzellbasierten Herzmuskelregeneration. (modifiziert nach VANDERFELDE S. et al, 2005)

1.8 Apoptose

Sowohl in akuten, als auch in subakuten und alten Myokardinfarkten kommt es neben dem Zelltod durch Nekrose - charakterisiert durch frühe Zerstörung der Zellmembran mit Austreten von intrazellulären Komponenten ins Gewebe und konsekutiver massiver Entzündungsreaktion - zur Apoptose von Kardiomyozyten und nicht-kardialen Zellen wie Gefäßendothelzellen und inflammatorischen Zellen. Nach intrazellulärer Chromatin- (Pyknose) und Kernfragmentation (Karyorhexis) bei intakter Zellmembran werden die entstehenden Apoptose-Körperchen durch Heterophagie eliminiert. Dabei kommt es im Gegensatz zur Nekrose nicht zu einer begleitenden Entzündungsreaktion (YAOITA H. et al, 2000).

1.8.1 Aktivierung und Regulation der Apoptose

Der molekulare Ablauf des programmierten Zelltodes lässt sich in drei Phasen einteilen. Initiation, Determination/Integration und Exekution.

Die *Initiation* kann auf zwei Wegen erfolgen: Die extrinsische Aktivierung erfolgt nach Ligandenbindung an „death receptors“ auf der Zelloberfläche. Die am besten charakterisierten dieser Rezeptoren sind der TNFR-1 und der Fas-Rezeptor mit ihren jeweiligen Bindungspartnern TNF- α und FasL (YAOITA H. et al, 2000, LEE Y. et al, 2009). Für die intrinsische Aktivierung sind pro-apoptotische Mitglieder der bcl-2 Familie wie Bax und/oder Bak verantwortlich. Diese inaktiv im Zytosol vorliegenden Proteine ändern nach Stimulation ihre Konformation und bilden dann auf den Mitochondrien makromolekulare Komplexe. Dadurch führen sie zur Permeabilitätssteigerung der inneren und äußeren mitochondrialen Membran und zur Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol. Bax scheint auch auf das sarkoplasmatische Retikulum zu wirken und darüber zu einer Alteration der Ca-Homöostase der Zelle zu führen. Auch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann über die Aktivierung Ca-abhängiger Proteasen wie Calpain zur Initiation der Apoptose führen. (MANI K., 2008)

Die *Determination/Integration* führt die zwei Aktivierungswege zusammen. Dazu werden sogenannte Initiator-Caspasen, inaktiv im Zytosol vorliegende Pro-Enzyme, aktiviert – der extrinsische Pathway verläuft u.a. über die Caspase 8, der intrinsische über Caspase 9. Für die Aktivierung der Caspase 9 benötigt Cytochrom c dabei Apaf-1. Dieser Schritt verbraucht Energie in Form von ATP, so dass der intrinsische Weg zur Apoptose bei anaerober Stoffwechsellage nicht ausgeführt werden kann. Die Initiator-Caspasen aktivieren anschließend die Effektor-Caspasen -3, -6 und -7, die als finalen Schritt die *Exekution* der Apoptose durch Fragmentierung von DNA und Strukturproteinen ausführen. Angemerkt sei, dass erst der Übergang zur Exekutionsphase, also die Aktivierung der Effektor-Caspasen, endgültig zum Zelltod führt. Zuvor kann durch Suppression pro-apoptotischer und verstärkte Expression anti-apoptotischer Mediatoren aus der Familie der bcl-2-Proteine die Ausführung gestoppt werden. (YAOITA H. et al, 2000, MANI K., 2008)

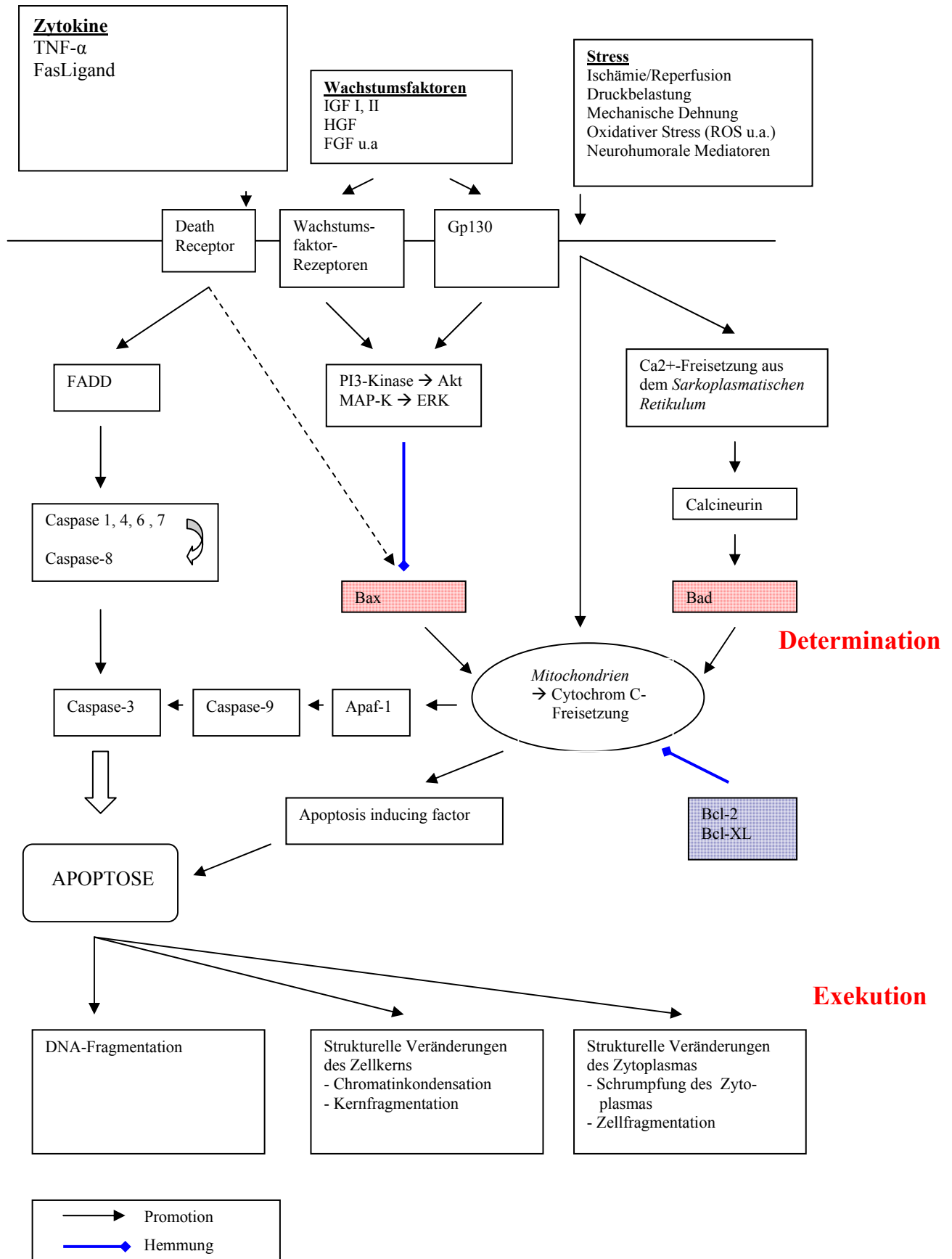


Abb.8 Phasen der Apoptose. Das intrazelluläre Milieu, das die Schwelle des Überganges von der Determinations- zur Exekutionsphase bestimmt, wird durch die beschriebenen pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie bestimmt. (modifiziert nach TAKEMURA G. et al, 2004, EEFTING F. et al, 2004)

Die Familie der Bcl-2-Proteine spielt für die entscheidende Rolle für Initiation und Determination des kontrollierten Zelltodes. Die Mitglieder zeichnen sich durch eine oder mehrere Bcl-homology Domänen in ihrer Struktur aus. Sie haben entweder anti-apoptotische, z.B. Bcl-2, Bcl-XL – oder pro-apoptotische Wirkung, unter anderem die schon erwähnten Bax und Bak. Das intrazelluläre Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Proteinen entscheidet darüber, ob eine Zelle die Schwelle zur irreversiblen Exekutionsphase der Apoptose überschreitet (LEE Y. et al, 2009) und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Moduliert wird dieses Verhältnis durch verschiedene Stimuli: Die Expression und Aktivierung pro-apoptotischer Bcl-2-Proteine wird durch Hypoxie, ROS, β -adrenerge Stimulation u.a. induziert. Wie in der Abbildung 8 dargestellt, führen dagegen verschiedene Wachstumsfaktoren über den IGF-R und den FGF-R mittels Verminderung der Expression von Bax ebenso zu einer Suppression pro-apoptotischer Signale wie die Aktivierung von Signalwegen wie PI-3/Akt durch Ligandenbindung an die gp130 Rezeptor-Untereinheit von Rezeptoren der IL-6-Zytokinfamilie (MANI K., 2008, TAKEMURA G. et al, 2004).

1.8.2 Apoptose im Verlauf des Myokardinfarktes

Im Verlauf aller Phasen des heilenden Infarktes sind im Myokard Apoptosen zu beobachten. Diese betreffen Kardiomyozyten ebenso wie inflammatorische Zellen, Myofibroblasten und Endothelzellen.

Apoptose im akuten Myokardinfarkt

Im Zentrum eines akuten Myokardinfarktes kommt es durch die bestehende Anoxie primär zum Zelltod durch Nekrose. Die Randzone wird durch Minderperfusion und damit Hypoxie und oxidativen Stress mitgeschädigt. In dieser Zone wurden in verschiedenen Studien Apoptose-Körperchen nachgewiesen. So waren in einer Arbeit von Olivetti et al 12% der Kardiomyozyten in der Infarkt-Penumbra in humanen Gewebeproben TUNEL-positiv und damit apoptotisch. (OLIVETTI G. et al, 1996, MANI K., 2008).

Vermittelt wird die Apoptose über die zwei bereits beschriebenen Wege. Die Aktivierung des extrinsischen Pfades läuft dabei zunächst über TNF- α , das im Rahmen der Inflammationsphase in erhöhter Konzentration im Myokard zu finden ist (GUSTAFSSON AB. et al, 2003). Die pro-apoptotische Wirkung des Fas-R kommt erst später zum Tragen. So wurde in Experimenten festgestellt, dass Knock-Out des FasL zu keiner Veränderung der Infarktgröße zwei Tage nach Infarkt führt. Hingegen zeigte sich eine verminderte

Apoptoserate im Granulationsgewebe. In Verbindung mit weiteren Experimenten kommen Lee und Gustafsson in ihrer Review zu dem Schluss, dass der zur Apoptose führende FasL – sezerniert von infiltrierenden mononukleären Zellen - erst ungefähr drei Tage nach Infarkt eine entscheidende Rolle spielt. (LEE Y. et al, 2009)

Reperfusion eines ischämischen Myokardareals führt zu Akzeleration der Apoptose von Kardiomyozyten auch in der zentralen Zone des Infarktes. Dabei ist das Ausmaß der gemessenen Apoptoserate abhängig von der Dauer der Reperfusion. Die erhöhte Apoptoserate beruht vor allem auf der im Vergleich zur permanenten Okklusion deutlich vermehrten Freisetzung von ROS und dem dadurch verstärkten oxidativen Stress (EEFTING F. et al, 2004, GUSTAFSSON AB. et al, 2003). So wurde 2001 gezeigt, dass Kardiomyozyten als initiale Antwort auf Ischämie/oxidativen Stress die Initiation der Apoptose einleiten. Der Verlust der Energieproduktion durch die Zelle führt dann zur Unterbrechung des Programmes, da die Ausführung des programmierten Zelltodes wie beschrieben energieabhängig ist. Durch die Wiederherstellung der Nährstoff – und Sauerstoffversorgung kommt es zum Wiedereinsetzen des Energiestoffwechsels, wodurch genügend Energie in Form von ATP bereitsteht, die eingeleitete Apoptose endgültig auszuführen (SCARABELLI T. et al, 2001). Zellen, die ohne Reperfusion nekrotisch geworden wären, können dadurch in Apoptose gehen, wodurch sich das Verhältnis Nekrose: Apoptose in Richtung der Apoptose verschoben wird. (EEFTING F. et al, 2004).

Apoptose im Übergang von Inflammations- zu Proliferationsphase

Apoptotische Zellen werden durch professionelle Phagozyten, also Makrophagen und dendritische Zellen, abgebaut. Erkannt werden sie mit Hilfe des PS-Rezeptors der Phagozyten, der an Phosphatidyl-Serin bindet, einem Phospholipid, dass ausschließlich von apoptotischen Zellen auf der Oberfläche exprimiert wird. Wie bereits dargestellt, induziert dies die Expression potenter antiinflammatorischer Zytokine, TGF- β und IL-10, durch die phagozytierenden Zellen und führt dadurch zur Suppression der akuten Inflammation und den Übergang in die Proliferationsphase (THUM T. et al, 2005).

Apoptose im subakuten und alten Infarkt

Während die Apoptoserate im Infarkt und dessen Randzone schnell abnimmt, steigt diese Rate im umgebenden gesund erscheinenden Myokard signifikant und beständig auf bis zu 0,2% der Kardiomyozyten. Begleitet wird dies von einer deutlichen Steigerung der

Expression des proapoptotischen Bax im zunächst verschonten Myokard (YAOITA H. et al, 2000). Man muss sich hierbei vor Augen halten, dass im bekanntermaßen postmitotischen Herzmuskel eine Rate von nur 0,1% apoptotischer Kardiomyozyten einen Verlust von ungefähr 37% der Kardiomyozyten im Verlauf eines Jahres bedeutet. Dieser progrediente Verlust von Zellen trägt im weiteren Verlauf entscheidend zur Entwicklung einer myokardialen Insuffizienz bei.

Nicht nur Kardiomyozyten werden apoptotisch. Aus dem zellreichen Granulationsgewebe wird im Verlauf der Proliferationsphase und der folgenden Narbenreifung eine kollagenbasierte zellarme Narbe. Die Elimination der Zellen des Granulationsgewebes, Myofibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Leukozyten erfolgt dabei durch apoptotischen Zelltod und anschließende Phagozytose. (TAKEMURA G. et al, 2004).

Die Apoptose nicht-kardialer Zellen ist essentiell für den geregelten Ablauf der Narbenbildung im Myokard. Inflammatorische Zellen - Makrophagen und Leukozyten - speichern intrazellulär wie bereits ausgeführt Zytokine und Proteasen. Eine Freisetzung dieser zytotoxischen Substanzen würde zu einer massiven Entzündungsreaktion und zur letalen Schädigung der umgebenden überlebenden Kardiomyozyten führen und wird durch den programmierten Zelltod effektiv verhindert. Die Elimination der Myofibroblasten ist notwendig um eine überschießende Kollagendeposition und damit „Versteifung“ des Herzmuskels und daraus folgende kontraktile Dysfunktion zu verhindern. (YAOITA H. et al, 2000).

1.9. IGF-II nach AMI

Struktur und Signaltransduktion von IGF-II

IGF-II wird als Präprohormon sezerniert. Die strukturelle Reifung des 89 Aminosäuren zählenden funktionsfähigen Proteins erfordert die Abspaltung der E-Domäne am Carboxy-Terminus und eines Signal-Peptids am Amino-Terminus der Primärsequenz. Das „fertige“ prozessierte IGF-II enthält drei Domänen: A, B und C, die entscheidend an der Rezeptorbindung beteiligt sind.

Vermittelt wird die Wirkung über drei verschiedene Rezeptoren – den Insulin-Rezeptor, den IGF-Typ1-Rezeptor und den IGF-Typ2-Rezeptor: Die Bindung an den Insulin-Rezeptor und an den IGF-Typ1-Rezeptor erfolgt über Aminosäuren der B-Domäne. Der IGF-Typ2-Rezeptor erkennt Residuen in der A-Domäne. (O'DELL SD. et al, 1998).

Die zellulären Wirkungen nach Ligandenbindung durch die jeweiligen Rezeptoren zeigt die folgende Abbildung

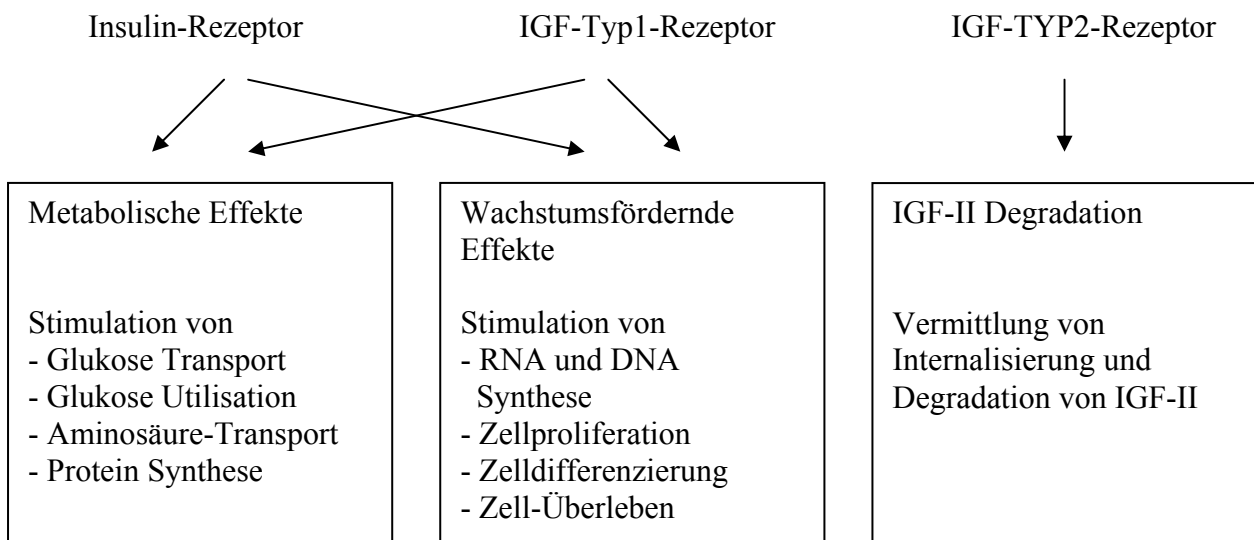


Abb.9 Wirkungen von IGF II, die über drei verschiedene Rezeptoren vermittelt werden und differentielle zelluläre Auswirkungen zeigen (modifiziert nach O'DELL SD. et al, 1998)

Jones und Clemmons stellten 1995 fest, dass die intrazelluläre Signaltransduktion vor allem über den IGF-Typ1-R verläuft, der sowohl IGF-I und – II als auch Insulin bindet. Die Bindung von IGF-II erfolgt mit einer ca. 5-12fach niedrigeren Affinität als die von IGF-I. Insulin bindet der Rezeptor mit einer 100-1000fach niedrigeren Affinität. Der IGF-Typ1-Rezeptor ist ein Tyrosinkinaserzeptor, der sich nach extrazellulärer Ligandenbindung an intrazellulären Tyrosinresiduen autophosphoryliert. Die weitere Signaltransduktion kann über zwei verschiedene Wege laufen. Durch die Phosphorylierung von Insulin Rezeptor Substrat (IRS) Proteinen und deren Bindung an Grb2 kommt es zur Aktivierung von ras und der MAP Kinase. Weitere Mitglieder der MAP-Kinase-Familie, p38 und die JN-Kinase werden ebenfalls aktiviert. Der zweite Signalweg wird ebenfalls durch die phosphorylierten IRS Proteine „angeschaltet“. Diese aktivieren die Phosphatidylinositol-3-Kinase, welche wiederum die 3-phosphoinositol-abhängigen Kinasen PDK-1 und -2 aktiviert, wodurch konsekutiv Akt phosphoryliert wird, ein Protein, dass die nachfolgenden Effekte vermittelt.

Beide Signalwege können zur Induktion von Zellproliferation führen, indem sie zur Translation von Zyklinen wie den Zyklinen D1, D2, D3 führen, welche wiederum in Assoziation mit den zugehörigen Kinasen CDK 4/6 zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F führen. Dadurch kommt es zum Übergang von der G1 Phase in die S-Phase des Zellzyklus und damit zur Progression des Zellzyklus und zur Proliferationsinduktion.

Der Insulinrezeptor vermittelt seine Wirkung ebenfalls über Autophosphorylierung, der sich eine Phosphorylierung des IRS-1 anschließt, wodurch es zur Downstream Signaltransduktion über die PI3-Kinase und die MAP-Kinase kommt.

Der IGF-Typ2-Rezeptor besteht hauptsächlich aus einer extrazellulären Domäne. Der an die Zelloberfläche gebundene Rezeptor bewirkt bei Ligandenbindung die Internalisierung des Komplexes in die Zelle und darauf folgend die Degradation von IGF-II in Lysosomen. Damit ist er maßgeblich an der Regulierung der extrazellulären IGF-II Konzentration beteiligt. (DUPONT J. et al, 2003, JONES JI. et al, 1995).

Wirkung von IGF II im Myokardinfarkt

Expression von IGF-II scheint sich nach Myokardischämie positiv auf den Verlauf der Infarktheilung auszuwirken. In diversen Arbeiten wurden eine Verminderung der Infarktgröße (VOGT AM. et al, 1997), eine Verbesserung der regionalen Myokardfunktion (KOTLYAR AA. et al, 2001) und der systolischen Funktion des linken Ventrikels bei Überexpression (BATTLER A. et al, 1995) gezeigt. Diese Wirkung beruht wahrscheinlich auf den folgenden Mechanismen:

Kardioprotektion

IGF-II kann auf zwei Ebenen kardioprotektiv wirken. Zum Einen zeigt das Protein eine anti-apoptotische Wirkung. So wurde 2002 festgestellt, dass eine Überexpression von IGF-II in Kardiomyozyten zu einer fast kompletten Verhinderung der experimentellen Induktion von Apoptose durch Hitze und Ischämie/Reperfusion führt (SU EJ. et al, 2003). Weitere Studien von Battler, Kotlyar und anderen bestätigen diesen Effekt (BATTLER A. et al, 1995, KOTLYAR AA. et al, 2001, SU EJ. et al, 2003). Angemerkt sei auch, dass IGF-I, das über denselben Rezeptor wirkt, über Inhibition des pro-apoptotischen bcl-2 und Stabilisation der mitochondrialen Membran den programmierten Zelltod verhindert, so dass spekuliert werden kann, dass IGF-II über denselben Rezeptor auch die selbe Wirkung vermittelt (WANG L. et al, 1998).

Zum Anderen induziert IGF-II in den Kardiomyozyten die Expression von Strukturproteinen und kontraktile Proteinen und bewirkt dadurch eine Hypertrophie der Zellen. So wurde vier Wochen nach Ischämie in durch IGF-II stimulierten Kardiomyozyten eine deutlich erhöhte Konzentration an Aktin und Desmin gemessen (KOTLYAR AA. et al, 2001). Auch in einer Arbeit von Huang 2002 (HUANG CY. et al, 2002) konnte eine Steigerung der Transkription muskelspezifischer Gene und eine Erhöhung des gesamten intrazellulären Proteingehalts

nachgewiesen werden. Die Autoren zeigen, dass die Hypertrophie auf zwei Wegen induziert wird. Neben der Signaltransduktion über den IGF-Typ1-Rezeptor existiert ein Lysosomen-abhängiger zweiter „Pathway“.

Stimulation der Angiogenese

IGF II wirkt angiogen über die Induktion von HIF-1 α und damit die Stimulation der Expression von VEGF. In vitro bewirkt das Protein eine verstärkte Migration von Endothelzellen. Dieser Effekt spielt auch in vivo eine Rolle: mikroembolische Applikation von IGF-II führte zu einer erhöhten Gefäßdichte im Myokard sowie zu einer deutlich erhöhten Zahl an CD34+ Progenitorzellen im Infarktareal (BATTLER A. et al, 1995, KOTLYAR AA. et al, 2001, SU EJ. et al, 2003, FELDSER D. et al, 1999)

1.10 Stammzelltherapie – Myokardregeneration als kausale Therapie der Myokardschädigung

1.10.1 Grundlagen und Hypothesen zum Wirkmechanismus der Stammzellen im Myokard

Stammzellen sind Zellen, die sich durch zwei Fähigkeiten auszeichnen: Einerseits die Fähigkeit zur „Self-Renewal“. Dies bedeutet, dass aus einer Stammzelle weitere identische Klone derselben entstehen können, was zur Aufrechterhaltung des Stammzellkompartiments nötig ist. Andererseits können sich Stammzellen in spezialisierte Zellen ausdifferenzieren.

Stammzellen werden vor allem durch ihr ontogenetisches Alter und ihr Differenzierungspotenzial unterschieden: die ontogenetisch frühesten Stammzellen sind die *pluripotenten* embryonalen Stammzellen, aus denen später die primitiven Keimzellstammzellen, sowie die *multipotenten* somatischen Stamm- und Progenitorzellen hervorgehen. Diese besitzen ein eingeschränktes Differenzierungspotential, sie sind „lineage-restricted“, d.h. ihre Liniendifferenzierungsfähigkeit ist bereits eingeschränkt.

(REINECKE H. et al, 2008).

Neue Forschungsergebnisse haben jedoch gezeigt, dass gewebsspezifische adulte Stammzellen die Fähigkeit zur Plastizität/Transdifferenzierung besitzen, das heißt, sie haben die Fähigkeit zur Keimblatt-überschreitenden Differenzierung. (DENGLER TJ. et al, 2002). Diese Erkenntnis bietet die faszinierende Möglichkeit, nekrotisches Herzmuskelgewebe durch adulte Stammzellen zu ersetzen, aus denen sich funktionsfähige Kardiomyozyten entwickeln

können und mit Hilfe der entstehenden Kardiomyozyten einen Myokardinfarkt kausal durch die Regeneration des Organs zu therapieren.

Eine erfolgreiche Zelltransplantation beruht auf drei Säulen:

1. Zeitpunkt der Zelltransplantation: Die Proliferation der Kardiomyozyten muss bereits kurz nach dem Infarkt beginnen, damit die Pumpfunktion aufrechterhalten werden kann. Somit muss möglichst früh nach der akuten Ischämie transplantiert werden.
2. Gleichzeitige Revaskularisation: Wiedereinsetzen der Perfusion des ischämischen Areals ist essentiell, um das Überleben der transplantierten Zellen zu ermöglichen.
3. Das neugebildete Myokard muss sich in das existierende Gewebe integrieren, um eine Störung der elektrischen Kopplung der Kardiomyozyten über gap junctions und damit die synzytiale Kontraktion des Herzmuskels zu erhalten um die Entwicklung von Arrhythmien zu verhindern. (DENGLER TJ. et al, 2002)

Die Stammzelltherapie soll also durch Regeneration des zerstörten Gewebes verhindern, dass die Pumpfunktion des geschädigten Herzens im Zeitverlauf insuffizient wird. Dazu müssen zum einen Perfusion und Kontraktilität aufrechterhalten werden, und zum anderen die progrediente Dilatation und der Elastizitätsverlust des Ventrikels durch das Remodeling des Myokards verhindert werden. Dies erfordert das Zusammenspiel verschiedener Wirkmechanismen, die in der folgenden Abbildung dargestellt sind: Myogenese, Angiogenese, Aufbau einer stabilen ECM, Inhibition der progredienten Apoptose von Kardiomyozyten. (BARBASH IM. et al, 2006).

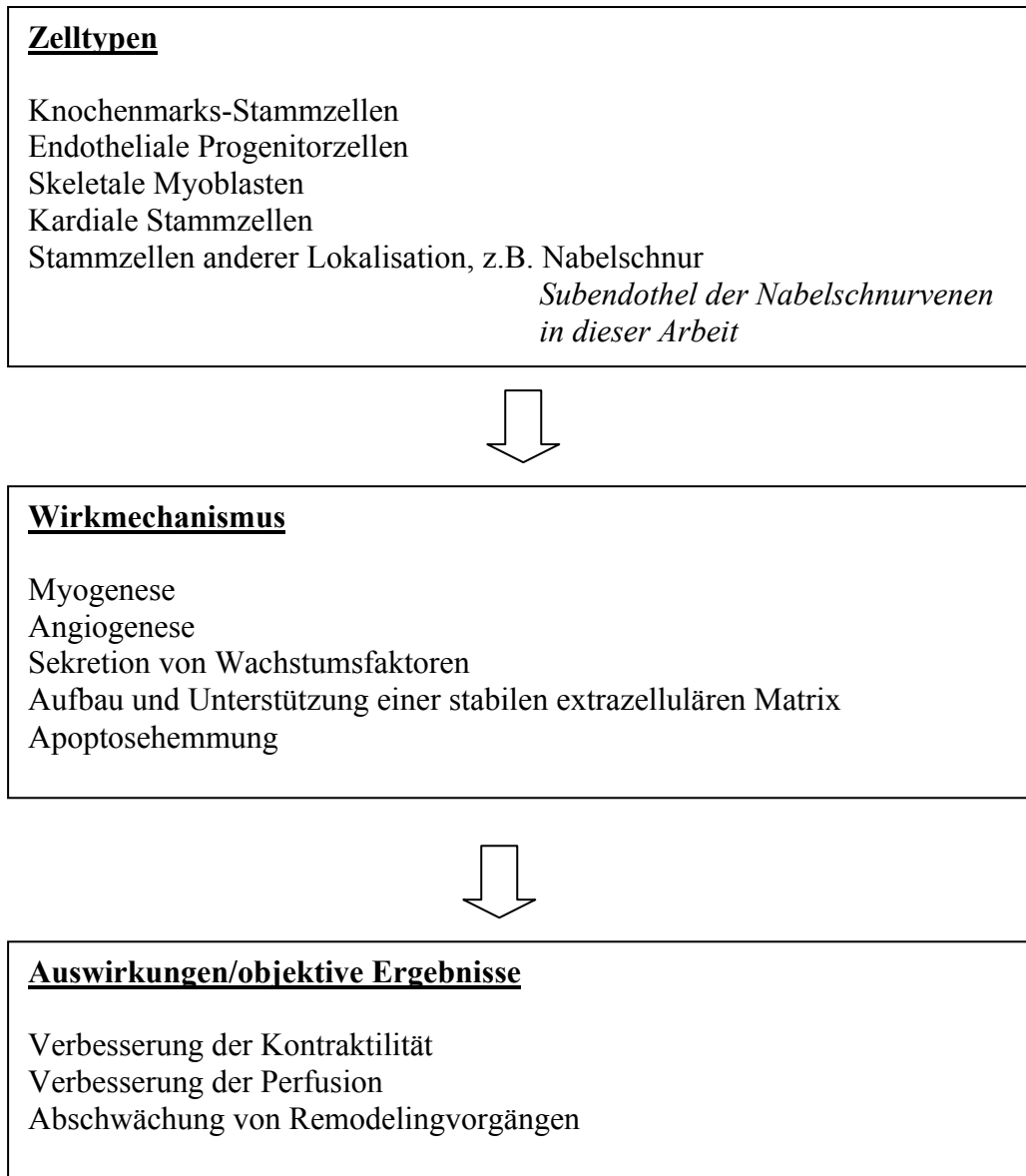


Abb.10 Regeneration des Herzmuskels nach Stammzelltherapie nach: Darstellung der verschiedenen Quellen von adulten Stammzellen, des Wirkmechanismus und der objektiv messbaren Ergebnisse. (modifiziert nach BARBASH IM. et al, 2006)

Die Wirkmechanismen sollen durch die Transplantation der Stammzellen induziert/vermittelt werden. Es existieren drei Hypothesen, auf welchem Weg die Zellen dies erreichen können. Die Hypothesen schließen sich gegenseitig nicht aus, sondern tragen im Zusammenspiel gemeinsam zum Erfolg einer Therapie bei.

1. Entstehung neuer Kardiomyozyten durch Stammzell-Plastizität/Transdifferenzierung
2. parakrine Wirkung durch Stammzellen sezernierter Mediatorstoffe auf im Myokard residente Zellen (Fibroblasten, SMC, Endothelzellen, inflammatorische Zellen, CSC)
3. „Dying StemCell Hypothesis“

Im Folgenden soll auf die drei Hypothesen im Einzelnen genauer eingegangen werden.

1.) Seit den eleganten Experimenten von Hsieh 2007 ist klar, dass auch im adulten Herz – nicht im normalen Alterungsprozess, jedoch sehr wohl nach ischämischer Schädigung - verlorene Kardiomyozyten durch neugebildete Kardiomyozyten aus Vorläuferzellen ersetzt werden können. Diese werden, was für die Pumpfähigkeit des Myokards und die gleichzeitige Verhinderung von Arrhythmien unbedingt nötig ist, auch funktionell integriert. Die Repopulation des Herzmuskels erfolgte in dem beschriebenen Versuch aus *endogenen* Progenitorzellen. (HSIEH PC. et al, 2007)

Im Rahmen der Stammzelltherapie können verschieden Typen von Stammzellen auch von *exogen* in das zerstörte Gewebe eingebracht werden. Man stellt sich vor, dass diese transplantierten Zellen im Myokard einen kardialen Phänotyp annehmen, das heißt, sie transdifferenzieren in Kardiomyozyten und regenerieren auf diese Weise den Herzmuskel. Diese sogenannte Stammzellplastizität ist das Thema kontroverser Diskussionen. Die Anwendung neuer Techniken wie „Quantum-dot“ gelabelter Antikörper zum Verhindern von Autofluoreszenzphänomenen beim immunhistochemischen Markieren bestimmter Antigene oder die Verwendung genetischer Marker (Y-Chromosom, kardiomyozytenspezifische Gene) zum Nachweis transdifferenzierter Zellen, geben bedeutende Hinweise darauf, dass die Transdifferenzierung in funktionsfähige und in das bestehende Myokard integrierte Kardiomyozyten tatsächlich möglich ist.

In diversen *in vitro* und *in vivo* Experimenten zeigen verschiedene adulte Stammzelllinien unterschiedliches Transdifferenzierungspotential in Endothelzellen, Kardiomyozyten u.a. Nachweisbar ist dies durch Expression bestimmter Linienmarker und gleichzeitiger Ausbildung eines charakteristischen Phänotyps. So lassen sich beispielsweise Kardiomyozyten durch die Expression von GATA4, Connexin43 und MEF2C charakterisieren. Auf das Differenzierungspotential der verschiedenen Stammzelllinien werde ich im Weiteren genauer eingehen. (LERI A. et al, 2005)

2.) Parakrine Mechanismen zur Myokardregeneration

Da sich gezeigt hat, dass die Zahl neugebildeter Kardiomyozyten zu gering ist, um die signifikante Verbesserung der kardialen Funktion zu erklären, wird vermutet, dass positive Effekte auch über von den transplantierten Zellen freigesetzte lösliche Faktoren auf parakrinem Weg vermittelt werden. Man weiß, dass adulte Stammzellen diverse Zytokine sezernieren können. Auch konditioniertes Medium dieser Zellen kann die positiven Effekte

einer Stammzelltherapie auslösen, so dass von der Wirkung löslicher Mediatoren ausgegangen werden kann. (GNECCHI M. et al, 2008). „Zielzellen“ sind die residenten Zellen des Herzmuskels: Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, kardiale Stammzellen. Die vielfältigen Wirkungen der Mediatorstoffe auf diese Zellen stellt die folgende Abbildung dar.

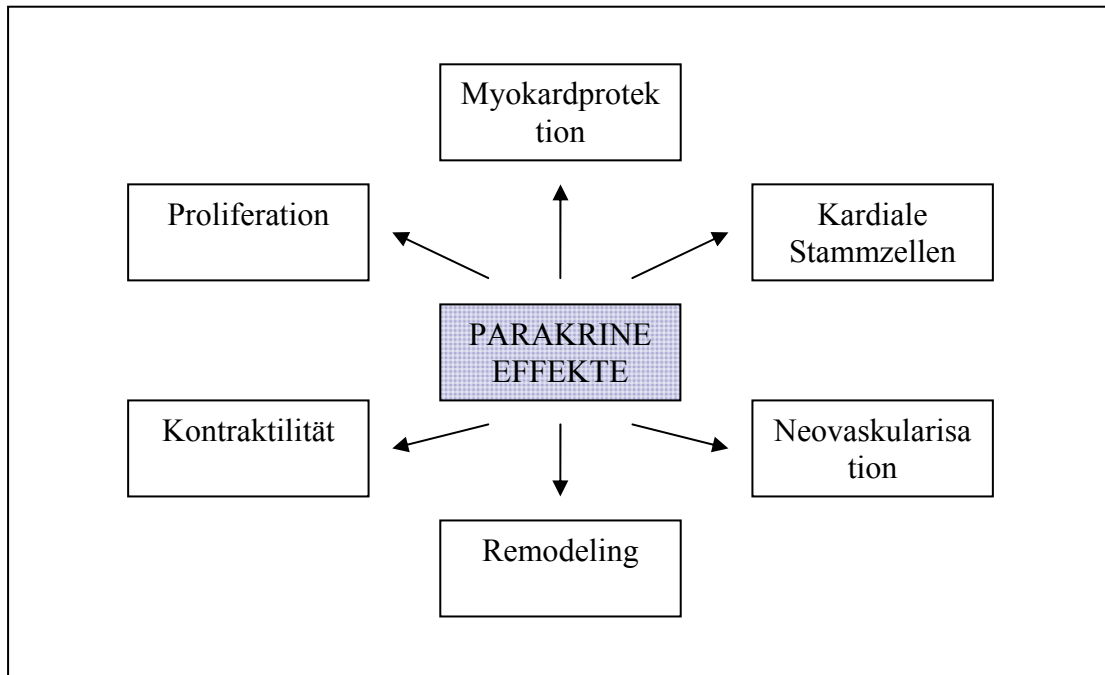


Abb.11 Parakrine Effekte der Stammzelltherapie. (GNECCHI M. et al, 2008)

Mögliche parakrine Faktoren aus adulten Stammzellen sind in der Abb. 12 aufgelistet, die einem im Nov. 2008 veröffentlichten Review-Artikel von Gnechi M. entnommen ist. Diese Stoffe werden interessanterweise durchwegs stärker exprimiert, wenn die Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert werden.

Funktion	Parakrine Faktoren
Zellprotektion Zellproliferation	Endothelin-1
Zellproliferation Zellmigration	FGF-2
Zellprotektion Zellmigration Kontraktilität	IGF-1
Homing der Stammzellen	SDF-1
Zellreifung Zellproliferation	TGF-β
Angiogenese Proliferation	VEGF

Zellprotektion	
----------------	--

Tab.4 Auswahl wichtiger parakriner Regulatorstoffe, die im Rahmen der Stammzellmobilisation, des Homings, sowie Proliferation und Differenzierung eine Rolle spielen. (modifiziert nach GNECCHI M. et al, 2008)

Im Folgenden werde ich nun auf wichtige Mediatorstoffe und ihre in der Abbildung dargestellten Auswirkungen eingehen.

Myokardprotektion

Dass nach Stammzelltherapie mit mesenchymalen Stammzellen (BM-MSK) aus dem Knochenmark eine Hochregulation der Expression von zytoprotektiven Faktoren wie bFGF, HGF, SDF-1, IGF-1 erfolgt, wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen in diversen Versuchstieren nachgewiesen (GNECCHI M. et al, 2008). Auch nach Injektion von ausschließlich konditioniertem Medium dieser MSK in Ratten 30min nach Okklusion der LAD zeigte sich nach 72h eine signifikante Reduktion von Infarktgröße und Apoptose-Index der Kardiomyozyten. (GNECCHI M. et al, 2005).

Neovaskularisation

Analog zu den oben beschriebenen Experimenten konnte am ischämischen Schweineherzen sowohl durch mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark als auch durch konditioniertes Medium dieser Zellen eine erhöhte Kapillardichte im Myokard drei Wochen nach Infarkt erreicht werden. Gleiches gilt für die Transplantation von EPC. Vermutlich beteiligte Zytokine sind unter anderem VEGF, SDF1, bFGF und HGF. (TAKAHASHI M. et al, 2006).

Remodeling

Von Berry konnte demonstriert werden, dass Injektion von humanen BM-MSK in ischämische Rattenherzen zu Verminderung von Fibrose und linksventrikulärer Dilatation bei gleichzeitig erhöhter Dicke der Ventrikelwand führt. (BERRY MF. et al, 2006). Dieser Effekt der BM-MSK beruht wahrscheinlich darauf, dass die normal nach ischämischer Schädigung verstärkt nachweisbare Expression und Sekretion von Kollagen I und III sowie TGF- β durch Fibroblasten durch die SZT abgeschwächt wird. Diese Wirkung wurde auch durch konditioniertes Medium alleine ausgelöst. Assoziiert mit der Transplantation von BM-MSK ist des Weiteren die Expression von Genen antioxidativ wirksamer Enzyme und Enzymen der DANN-Reparatur sowie eine verminderte Expression des chemotaktisch wirksamen MCP-1 mit konsekutiv vermindertem inflammatorischem Zellinfiltrat im Infarktgebiet. (GNECCHI M. et al, 2008)

Myokardkontraktilität

Nach SZT ist die Pumpfunktion des geschädigten Ventrikels deutlich verbessert, was bereits durch viele Studien nachgewiesen wurde. Diesem klinisch entscheidenden Effekt der SZT liegt die Verminderung der Infarktgröße, und damit der Erhalt vitaler Kardiomyozyten durch die Transplantation zu Grunde. (GNECCHI M. et al, 2008).

Die Myokardkontraktilität scheint auch durch parakrin vermittelte positiv inotrope Wirkung von Zytokinen verbessert zu werden. So konnte nachgewiesen werden, dass konditioniertes Medium von BM-MSCs zu synchronen Kontraktionen von Ratten-Kardiomyozyten führt. Welche Zytokine diesen Effekt bewirken, ist allerdings bisher unklar. (TAKAHASHI M. et al, 2006)

Regeneration des Myokards durch endogene kardiale Stammzellen

Der direkte Beweis, dass parakrine Zytokine die Proliferation und Differenzierung von im Herz vorhandenen kardialen Stammzellen stimulieren, wurde bisher noch nicht erbracht. Es gibt jedoch deutliche Hinweise darauf. So proliferieren CSC im Infarkttrand bei Injektion von HGF und IGF-1, und man weiß gleichzeitig, dass diese Zytokine von adulten Stammzellen sezerniert werden. Für unfraktionierte humane Stammzellen des Knochenmarks (hBMC) wurde gezeigt, dass intramyokardiale Transplantation zu Proliferation von Kardiomyozyten des Empfängers im Infarkttrand ebenso wie im gesunden Myokard führt. Gleichzeitig waren in diesem Experiment die mRNA Konzentrationen von HGF, IGF-1, VEGF und bFGF signifikant erhöht. (YOON YS. et al, 2005, GNECCHI M. et al, 2008)

3.) „Dying stem cell“ Hypothese - Apoptose der transplantierten Zellen als Stimulus kardialer Regeneration

Wie bereits unter Punkt 1.8 - Apoptose - beschrieben, führt die Aufnahme von apoptotischen Körperchen durch professionelle Phagozyten wie Makrophagen und dendritische Zellen zu einer Modulation von deren Sekretionsprofil. Durch verstärkte Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie TGF- β und IL-10 wird die Expression inflammatorischer Mediatoren wie IL-1, TNF- α herabreguliert und dadurch die Entzündungsreaktion supprimiert. Im Gegenzug wird die durch diese Zytokine die Entstehung des Granulationsgewebes und dadurch die Wundheilung vermittelt. Werden nun Stammzellen vor allem in den Infarkttrand transplantiert, gehen dort in Apoptose und werden anschließend analog zu den endogenen Zellen phagozytiert, so hat dies eine akzelerierte Resolution der

Inflammation und Beschleunigung der Heilung zur Folge. Außerdem wird eine weitere Expansion des Infarktes durch späte Remodeling-Vorgänge eingeschränkt. (THUM T. et al, 2005)

1.10.2 Adulte Stammzellen in der Therapie des Myokardinfarktes

Verschiedene Typen adulter Stammzellen wurden bisher in der Therapie des akuten Myokardinfarktes angewandt: Stammzelllinien des Knochenmarks, endotheliale Vorläuferzellen des peripheren Blutes und Nabelschnurblutes, Skelettmuskel-Progenitorzellen und kardiale Stammzellen.

1.10.2.1 Stammzelllinien im Knochenmark

Hämatopoetische Stammzellen

Funktionell werden HSC durch ihre Fähigkeit zur Replikation, Bildung von Kolonien von Klonen und Ausreifung zu allen reifen hämatopoetischen Zelllinien definiert. Für verschiedene Spezies existieren unterschiedliche charakteristischen Epitope. Zur Identifizierung humaner HSC wird beispielsweise das Antigen CD34 verwendet. Des Weiteren wurde der Marker CD133 beschrieben. Bis heute allerdings ist kein für die HSC *spezifisches* Epitop identifiziert, zum Nachweis der Zellen wird eine Kombination von Antigenen verwendet. (LERI A. et al, 2005) Für CD133 positive Zellen wurde Transdifferenzierung in reife Endothelzellen und Integration in ischämisches Gewebe nachgewiesen, so dass durch diese Zellen eine Neovaskularisation von ischämischem Myokard und dadurch eine Verbesserung von Perfusion und Kontraktilität erreicht werden kann. (WOLLERT KC. et al, 2005). Auch Transdifferenzierung in Kardiomyozyten scheint möglich zu sein: So wurde 9 Tage nach HSC Transplantation in einem Maus-Infarkt-Modell Neubildung von Myokard in zwei Dritteln des Infarktareales nachgewiesen und diese Ergebnisse vor kurzem in einem Folge-Experiment unter Verwendung spezifisch kardialer Marker und Y-Chromosom-in-situ-Hybridisierung bestätigt (ORLIC D. et al, 2001, ROTA M. et al, 2007)

Mesenchymale Stammzellen

Diese heterogene Zellpopulation repräsentiert die CD34-negative und CD133-negative Stammzellpopulation im Knochenmark und anderen mesenchymalen Geweben (WOLLERT KC. et al, 2005).

Morphologisch besitzen MSC einen schmalen, spindelförmigen Zellkörper mit langen, dünnen Ausläufern. Charakteristisch ist ein großer Nukleus mit einem prominenten Nukleolus und fein darum verteilten Chromatin, was dem Kern ein klares Aussehen verleiht. (RYAN JM. et al, 2005) MSC zeichnen sich durch Expression bestimmter Oberflächenmarker, CD 29, 44, 71, 90, 106, 120a und 124, aus (REINECKE H. et al, 2008). Im Laufe ihrer Reifung können sie sich in Chondrozyten, Osteozyten, Fibroblasten und Adipozyten, also alle mesenchymalen Zelllinien, differenzieren. In vitro wurde eine Transdifferenzierungsfähigkeit in Kardiomyoblasten und Myoblasten (BARBASH IM. et al, 2006) nachgewiesen. Dies konnte in vivo nach Transplantation in Infarktgewebe bestätigt werden, begleitet von Abschwächung von Remodeling-Vorgängen und Wandbewegungsstörungen im Myokard. (WOLLERT KC. et al, 2005).

Immunogenität der MSC

Humane MSC sind für die Therapie vor allem deshalb interessant, weil sie fähig sind, der Immunabwehr des Transplantatempfängers zu entgehen – sie können die Alloerkennung, durch drei Mechanismen umgehen:

- 1) Hypoimmunogenität
- 2) Modulation der Immunantwort der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen
- 3) Ausbildung eines die Stammzellproliferation und – Differenzierung fördernden Umgebungsmilieus

(RYAN JM. et al, 2005)

1) Hypoimmunogenität

MSC tragen auf ihrer Oberfläche den MHC-I Rezeptor, während sie gleichzeitig MHC-II negativ sind. Auch kostimulatorische Moleküle - CD40, CD40L, CD80 oder CD86 – die zusätzlich zur Antigenpräsentation durch den MHC-II Rezeptor zur Induktion einer Immunantwort durch CD4⁺ T-Helferzellen nötig sind, werden nicht exprimiert. Die Folge dieses Oberflächen-Antigenmusters ist eine verminderte Immunogenität der MSC, da zum einen die MHC-I Positivität bedeutet, dass die Stammzellen nicht durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zerstört werden, da diese Abwehrzellen auf die Herabregulation bzw. das Fehlen von MHC-I reagieren. Zum anderen führt das Fehlen des potenten Antigens MHC-II zu einer herabgesetzten Immunreaktion durch die CD4⁺ T-Helfer-Zellen, die das MHC-II Molekül und die kostimulatorischen Moleküle für ihre Aktivierung benötigen. (RYAN JM. et al, 2005)

2) Modulation der Immunantwort der CD4+ und CD8+ T-Helfer Zellen

Die T-Zell-Antwort wird von den MSC auf zwei verschiedenen Weisen beeinflusst:

Direkte Modulation der T-Zell-Antwort

Durch konstitutive Expression der COX-2 produzieren MSC Lipidmetabolite wie PGE-2 aus Arachidonsäure. PGE-2 führt zu einer Hemmung der Proliferation von CD4- und CD8-positiven T-Helfer-Zellen. Vermittelt wird dies vermutlich durch Inhibition des Zyklins D2 and Hochregulation des cyclin dependent kinase inhibitor p27kip1. Dieselbe Wirkung hat die Induktion des Enzyms Indoleamine-2,3-deoxygenase in Anwesenheit von $\text{INF}\gamma$ – also in einem inflammatorischen Umgebungsmilieu. Der Abbau von Tryptophan wird beschleunigt führt zu einer Akkumulation von Metaboliten wie Kynurenine, welche – ebenso wie PGE2 – über eine Inhibition von Zyklin D2 die Proliferation der T-Zellen hemmen.

Weiterhin ändert sich das Sekretionsprofil der CD4+ Zellen in Anwesenheit von MSC, so sinkt u.a. die Produktion von $\text{INF}\gamma$. Die T-Helfer-Zellen zeigen somit in Bezug auf ihre Zytokinsekretion in Anwesenheit der Progenitorzellen einen antiinflammatorischen Phänotyp. (RYAN JM. et al, 2005, YAGI H. et al, 2010)

Indirekte Modulation der T-Zell-Antwort durch Modulation des Phänotyps antigenpräsentierender Zellen.

Zur Induktion einer Immunantwort ist die Präsentation von Antigenen mittels MHC-II Rezeptor reifer professioneller APCs nötig. Dafür maßgeblich verantwortlich sind dendritischen Zellen, welche wiederum durch Ko-Kultivierung mit MSC beeinflusst werden. Die Reifung der dendritischen Zellen wird behindert, was sich in einer verminderten Expression von CD40, CD80, CD86, and HLA-DR äußert. Dadurch behalten diese Zellen einen unreifen inflammationshemmenden Phänotyp, der aufgrund der fehlenden kostimulatorischen Moleküle zu einer abgeschwächten T-Zell-Antwort führt.

(ZHANG W. et al, 2004, RYAN JM. et al, 2005)

3) Ausbildung eines die Stammzellproliferation und –Differenzierung fördernden Umgebungsmilieus

MSC exprimieren konstitutiv diverse Interleukine, IL-6, -7, -8, -11, -12, -14, -15, -27, leukaemia inhibitory factor, macrophage colony-stimulating factor, stem cell factor. Diese inflammatorischen Mediatoren fördern die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen. Das ebenfalls von einigen MSC sezernierte Zytokin HGF hat anti-apoptische und proliferationsfördernde Wirkung auf endotheliale Vorläuferzellen und dient damit der Angiogenese im verletzten Gewebe, was wiederum die Wundheilung positiv

beeinflusst. Dies ist auch für das ischämisch geschädigte Myokard nach AMI von essentieller Bedeutung.

(XIN X. et al, 2001, RYAN JM. et al, 2005)

Interessanterweise scheint vor allem die Kultivierung der MSC in einem die Zytokine HGF und TGF- β enthaltenden Mikromilieu zu der Ausbildung des dargestellten hypoimmunogenen Phänotyps der MSC zu führen. Dies steht auch in Zusammenhang mit der von Ryan publizierten Erkenntnis, dass die Fähigkeit der MSC zur Modulation der Immunabwehr verstärkt ist, wenn sich die Zellen in einem inflammatorisch veränderten Mikromilieu befinden, in dieser Arbeit charakterisiert durch erhöhte Interferon- γ Level. Im Rahmen des therapeutischen Einsatzes der Stammzellen bei Myokardinfarkt werden die Zellen in das ischämisch geschädigte inflammatorisch veränderte Myokard transplantiert. Die Erkenntnis, dass MSC den hypoimmunogenen Phänotyp besonders in diesem Mikromilieu ausbilden, macht sie für die Stammzelltherapie besonders interessant.

(RYAN JM. et al, 2007, DI NICOLA M. et al, 2002)

Endotheliale Progenitorzellen

Endotheliale Vorläuferzellen des Knochenmarks, sogenannte Angioblasten, sind c-kit und CD34 positive Zellen, für die in Transplantationsexperimenten von Kocher nachgewiesen wurde, dass sie im Infarktgebiet Neoangiogenese induzieren können. Durch die verbesserte Mikrozirkulation kann so eine anhaltende Verbesserung der kardialen Funktion durch verminderte Kollagendeposition und gleichzeitig verminderte Apoptoserate der überlebenden Kardiomyozyten erreicht werden. (KOCHER AA. et al, 2001)

Die drei oben beschriebenen Stammzelltypen finden sich alle im Knochenmark. In den meisten bisher durchgeführten Versuchen zur Regeneration myokardialen Gewebes wurde deshalb nicht eine dieser Zelllinien verwendet, sondern eine meist heterogene Population angereicherter HSC mit variablen Anteilen an MSC und EPC. Aus diesem Grund eignet sich der Begriff Knochenmark-Stammzellen (BMC) besser, um die verwendeten Stammzellen zu benennen. Erstmals von Orlic et al 2001 nachgewiesen, hat sich mittlerweile in mehreren Studien übereinstimmend ein positiver Effekt der BMC-Transplantation auf die Funktion des durch AMI geschädigten Myokards gezeigt. (LERI A. et al, 2005)

1.10.2.2 Vorläuferzellen des peripheren Blutes und Nabelschnur

Aus peripherem Blut und aus der Umbilikalvene der Nabelschnur isolierte endotheliale Vorläuferzellen sind reifere Progenitoren von Endothelzellen als die Angioblasten. Oberflächenmarker dieser Zellen sind CD34, CD133, Flk-1 (REINECKE H. et al, 2008). Diese Zellen führen durch Ausdifferenzierung zu Gefäßendothel zu Vaskulogenese im ischämischen Gewebe. Es hat sich gezeigt, dass sie auch die Fähigkeit zur Transdifferenzierung in Kardiomyozyten haben, und auf diese Weise ebenfalls zur Regeneration des Myokards beitragen können. Interessanterweise sind EPC in der Zirkulation von Patienten nach AMI in erhöhter Zahl zu finden, was auf eine endogene Regeneration des Herzmuskels durch Mobilisation dieser EPCs in der Peripherie hinweist. (DENGLER TJ. et al, 2002).

1.10.2.3 Skelettmuskel-Progenitorzellen

Zu finden sind diese sogenannten „Satelliten-Zellen“ im Ruhezustand unter der Basalmembran reifer Skelettmuskelfasern. Resultat ihrer Transplantation in infarziertes Myokard in Tiermodellen ist eine Verbesserung der systolischen und diastolischen Funktion des Herzens, obwohl die sich ausbildenden Zellen elektromechanisch von den Kardiomyozyten isoliert bleiben und so die Gefahr der Entstehung von Arrhythmie-foci erhöht ist. Sie sind deshalb nur bedingt für die Therapie geeignet. (WOLLERT KC. et al, 2005)

1.10.2.4 Kardiale Stammzellen

Die Erkenntnis, dass sich im Myokard selbst Stammzellen finden, und dass diese aus Herzmuskelbiopsien klonal expandiert werden können, stammt aus dem Jahr 2002. Verschiedene Populationen von CSC wurden bisher beschrieben. Ihre Verwendungsmöglichkeiten in der Stammzelltherapie sind bisher ungenügend untersucht.

- „Side Population“-Zellen: Diese Zellen können sich in vitro in Kardiomyozyten ausdifferenzieren.
- C-kit-positive Zellen: Nachgewiesen wurde im Reagenzglas und im Tierversuch eine Ausdifferenzierung in Herzmuskel- und Endothelzellen.

- Sca-1-positive/c-kit-negative Zellen: Diese Zellen konnten bisher allerdings nur aus Mäuseherzen isoliert werden.
- sogenannte Cardiosphären, die endotheliale (u.a. CD31) und Stammzellmarker (CD34, c-kit, sca-1) exprimieren: Das Differenzierungspotential umfasst die Fähigkeit zur Entwicklung zu Kardiomyozyten, SMCs und Endothelzellen.
- Isl1-positive Zellen: Gezeigt werden konnte in vitro und in vivo eine Differenzierung in funktionsfähige Kardiomyozyten.

(REINECKE H. et al, 2008)

1.11 Charakterisierung der verwendeten UV-MSC

Mesenchymale Stammzellen scheinen, vor allem wegen ihrer Hypoimmunogenität und immunmodulatorischer Fähigkeiten und ihres Sekretionsprofils, prädestiniert für die stammzellbasierte Therapie des AMI. Ihre Verwendung wird jedoch durch mehrere Faktoren eingeschränkt: Bei älteren Stammzell-Donoren sowie auch bei längerer Kultivierung und damit höherer Populationszahl nimmt ihre Anzahl und ebenso das Differenzierungspotential stark ab. So wurde in Studien nach längerer Kultivierung eine Verminderung der Sekretion von alkalischer Phosphatase gezeigt, was auf einen Verlust der osteogenen Differenzierungsfähigkeit hindeutet. Ebenso wurde ein Verlust der chondrogenen Differenzierungsfähigkeit nachgewiesen. (ZHENG H. et al, 2007, ROOBROUCK et al, 2008) In einer interessanten Studie von Jiang wurde die altersabhängige Sekretion von angiogenen Faktoren in vitro untersucht. Gezeigt wurde eine signifikante Verminderung der Expression von HIF-1 α , HO-1, VEGF und FGF-2 durch ältere MSC sowohl unter normoxischen als auch unter anaeroben Bedingungen. Zudem reagierten die alten MSCs empfindlicher auf apoptotische Stimuli. (JIANG S. et al, 2008).

Die beschriebenen Probleme und die Tatsache, dass die MSC im Knochenmark häufig durch virale Infektionen kontaminiert sind, erklären die Notwendigkeit, alternative Quellen für die Gewinnung mesenchymaler Stammzellen zu finden. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit aus dem Subendothel der Umbilikalvene isolierte mesenchymale Progenitorzellen auf ihr Potential zur Stammzelltherapie beim akuten Myokardinfarkt hin untersucht.

1.11.1 Morphologie und Differenzierungspotential der verwendeten UV- MSC in vivo und in vitro

Aus dem Subendothel der Umbilikalvene können MSC-artige Zellen (UV-MSC) isoliert und kultiviert werden. Im Vergleich mit den aus dem Knochenmark gewonnenen „Standard“ MSC zeigen die Zellen ein ähnliches Oberflächenprofil. Sie sind charakterisiert durch die Expression typischer Marker mesenchymaler Stammzellen, CD90+, CD73+, CD105+, CD44+, und MHC-I, während auf ihrer Oberfläche weder hämatopoetische (CD 34, 45, 133), monozytäre (CD14) noch endotheliale Marker (KDR, cadherin-5, CD31, 133) nachgewiesen werden können. Die Zellpopulationen unterscheiden sich nur in Bezug auf zwei Epitope: UV-MSC zeigen eine Expression von N-CAM bei gleichzeitig fehlender Expression von VCAM-1, MSC des Knochenmarkes exprimieren VCAM-1, während sie negativ für N-CAM sind.

Phänotypisch zeigen die Zellen in vitro eine den MSC ähnliche spindelzellige fibroblastoide Morphologie. Das Differenzierungspotential der UV-MSC unter Kulturbedingungen in vitro zeigt eine Differenzierungsfähigkeit in Osteoblasten und Adipozyten.

(ROMANOV YA. et al, 2003, ROCHE S. et al, 2009)

	KM-MSC	UV-MSC
CD90	++	++
CD73	++	++
CD105	++	++
CD44	++	++
CD106 (VCAM-1)	++	-
CD45	-	-
CD34	-	-
CD56 (N-CAM)	-	++
CD31	-	-
CD166	++	++

Tab.5 Vergleich der Oberflächenexpressionsprofile von KM-MSC und den verwendeten UV-MSC (modifiziert nach Roche S. et al, 2009)

1.11.2 Genexpression im Vergleich zu MSC des Knochenmarks

Von Panepucci et al wurde das Genexpressionsprofil von aus dem Knochenmark isolierten MSC mit den verwendeten UV-MSC verglichen. Die Arbeitsgruppe wies ein hohes Maß an Übereinstimmung der Genexpression nach, darunter die Expression von TGF- α , Transgelin, Cofilin-1, Vimentin und anderen.

Interessanterweise weisen die gefundenen Unterschiede darauf hin, dass BM-MSC eher osteoblastische oder adipozytäre Differenzierungsmuster zeigen, während das Expressionsprofil der UV-MSC eher eine angiogene Liniendifferenzierung vermuten lässt. (PANEPUCCI RA. et al, 2004)

BM-MSC	Wirkung	UV-MSC	Wirkung
Lysozym Defensine	antimikrobiell	CXCL-6 IL-8 CXCL-1	Angiogenese
Biglycan Vitronectin	Osteogenese	MMP1	ECM-Turn-over
Kollagen I Laminin Fibronectin	Adhärenz von Osteoblasten		

Tab.6 Unterschiede im Genexpressionsprofil von BM-MSC und UV-MSC.

Diese Tatsache lässt die UV-MSC als prädestiniert für die Regeneration des Myokards nach AMI erscheinen, da die Neoangiogenese – wie beschrieben – einen essentiellen Wirkmechanismus der Stammzelltherapie darstellt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellen

Die verwendeten Zellen wurden dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von ROBERT A.J. OOSTENDORP (3. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München). Sie wurden in zwei Schritten aus dem Subendothel der Umbilikalvene von zeitgerecht geborenen Neugeborenen gewonnen und deswegen im Weiteren als „Umbilical-cord-vein mesenchymal stem cells“ (UV-MSC) bezeichnet. Isolation und Kultur sind in der Literatur beschrieben (KALTZ N. et al, 2008)

2.2. Tiermodel

Die Versuche wurden an einem Infarkt/Reperusionsmodell der RNU-Ratte durchgeführt. Dieser Stamm wird seit 1994 von der Firma Charles River (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) gezüchtet, hervorgegangen ist er aus einer Mutation von Rowett Hooded Ratten (Schottland). Charakteristischerweise besitzen die Tiere keinen Thymus und sind damit immundefizient. Im homozygoten Zustand sind die Ratten nackt oder flaumig behaart.

Als pathogenfreie Labornagetiere werden die Ratten regelmäßig bakteriologisch, pathologisch und parasitologisch untersucht. Sie unterliegen einem Gesundheitsüberwachungsprogramm nach Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association).

Im Rahmen meiner Arbeit wurden ausschließlich männliche Ratten verwendet. Diese waren zu Versuchsbeginn zwischen 4 bis 5 Wochen alt und zwischen 180g und 280g schwer. Die Tiere waren im Tierbereich des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung im Klinikum rechts der Isar eingestallt. Die Untersuchungen, chirurgischen Eingriffe sowie die Organentnahme erfolgten in den Operationsräumen im Zentrum für präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar, München. Im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums wurden die Paraffinpräparate histologisch aufbereitet. Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgen in den Räumlichkeiten der Experimentellen Kardiologie des Deutschen Herzzentrums, München. Am 27.09.2004 wurde das Tiervorhaben gemäß §8 Tierschutzgesetz durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Versuchsplan

Chirurgischer Eingriff und Voruntersuchungen

Die Ratten wurden fünf Tage vor dem geplanten Eingriff sonographisch untersucht, um die physiologischen Parameter der Herzfunktion zu ermitteln. Am Tag 0 wurde eine Thorakotomie mit anschließender Ligatur der LAD (left anterior descending artery) und Reperfusion nach 30 Minuten durchgeführt.

Versuchsgruppe 1

Diese Gruppe bestand aus 9 Ratten, von denen drei Tiere 1Mio. humane UV-MSK in 150 µl PBS (Versuchsgruppe) und sechs Tiere 150 µl PBS (Kontrollgruppe) intramyokardial appliziert bekamen. Die Injektion erfolgte in der frühen Reperfusionsphase an definierten Stellen des Myokards in der Periinfarktzone. 3 Tage nach der Operation wurden die Ratten euthanasiert und das Herz entnommen und in Formalin fixiert.

Versuchsgruppe 2

Diese Gruppe bestand aus 33 Tieren. Die Versuchsdauer betrug 14 Tage. Analog zur Versuchsgruppe 1 wurden 12 der Ratten 1Mio. humane UV-MSK in 150 µl PBS (Versuchsgruppe) und 21 Ratten 150 µl PBS (Kontrollgruppe) intramyokardial injiziert. In der Versuchsgruppe 2 erfolgte vor der Euthanasierung an Tag 14 eine MRT zur Untersuchung der Herzfunktion. Anschließend erfolgte ebenso die Explantation des Herzens. Das entnommene Herz wurde mit einem Schnitt durch die Transversalebene in zwei Hälften geteilt. Die distale Hälfte der formalinfixierten Herzen wurde paraffineingebettet, der Rest bei -80°C schockgefroren.

Einen Überblick über die Versuchsplanung gibt die folgende Abbildung.

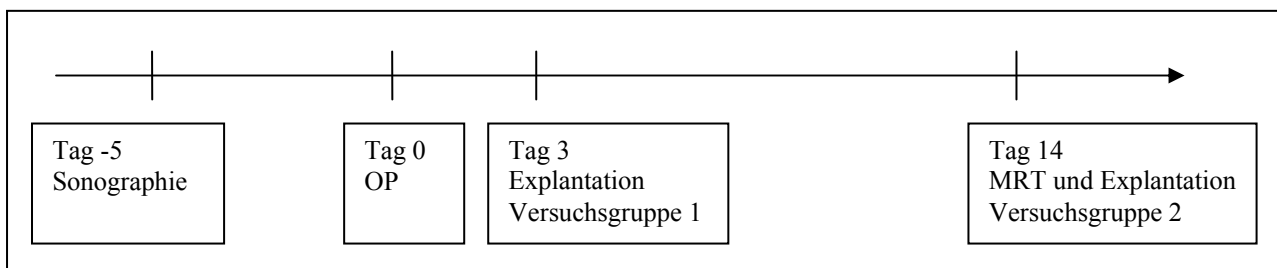


Abb.12 Überblick über die Versuchsplanung: Die Euthanasierung der Tiere der Versuchsgruppe 1 erfolgt an Tag 3 post-operativ, die Tiere der Versuchsgruppe 2 wurden am Tag 14 post-operativ euthanasiert

Exakte Informationen über den chirurgischen Eingriff, sowie peri- und postoperative Komplikationen gibt die Inaugural-Dissertation „Intramyokardiale Transplantation von humanen, mit IGF-II transduzierten, endothelialen Progenitorzellen in Nacktratten im akuten Myokardinfarktmodell“ von Wiebke Sitz.

2.3. Histologische Aufarbeitung der Proben

Dazu wurden die Präparate nach der 24-stündiger Fixierung in 6% Formalin in Einbettkapseln gelegt, für 12 Stunden entwässert, vorparaffiniert und anschließend in 60 Grad heißes Paraffin eingelegt. Zum Abkühlen wurden die Paraffinblöcke auf eine Kühlplatte verbracht (TBS 88 Paraffin Embedding System, Thermal Unit, Cool Unit, Dispenser Unit, MEDITE Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland). Die erstarrten Proben wurden danach nach 20 min Kühlung auf einer -20°C kalten Platte mit einem Serienschnittmikrotom (Microm HM 335 E, Fa.: MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) in ca. 2-3 µm dicke Schnitte geschnitten, wodurch die Herzen in 16 – 24 Ebenen, bestehend aus jeweils 10 einzelnen Schnitten, geteilt wurden. Der Abstand zwischen den Ebenen betrug 30 µm.

Die so entstandenen Schnitte wurden anschließend „entfaltet“ und dazu für ca. 1 Minute in ein 40 °C warmes Wasserbad (Paraffin Streckbad, TF35, MEDITE Medizintechnik, Burgdorf) gelegt und jeweils zwei auf SuperFrost®Objektträger (Roth, Karlsruhe) und acht auf SuperFrostPlus-Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen. Letztere wurden zuvor mit einer Klebermischung (Pritt®-Bastelkleber, Henkel, Düsseldorf + Poly-L-Lysin Lösung, Sigma Diagnostic INC., St. Luis) bestrichen, um ein gutes Anhaften der histologischen Präparate während Weiterverarbeitung zu gewährleisten.

2.3.1 Histologische Standard Färbung: Masson-Trichrom-Färbung

Die **Masson-Trichrom-Färbung** zur Bestimmung der Infarktgröße erfolgte nach 15min trocknen der SuperFrostObjektträger im Inkubator bei 37 °C. Gefärbt wurde standardmäßig mit einem Spezialfärbeprogramm eines Färbautomaten (Tissue Strainer, TST 30, Medite, Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland). Im histologischen Präparat stellen sich die Zellkerne leuchtend rot, das Zytoplasma rosa, die Erythrozyten orangegelb und das Bindegewebe blau dar.

Histomorphometrie

Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden die Schnitte zunächst in zehnfacher Vergrößerung photographiert und mit dem Programm „AXIO VISION“ (Zeiss, München-Halbergmoos) archiviert. Ausgewertet wurden von jedem Tier drei Schnitte in drei aufeinander Folgenden Ebenen. Mit dem PC kann mit Hilfe des digitalen Bildanalyseprogramms „Sigma Scan Pro 5, Image Analysis Version 5.0.0“ nach einer Kalibrierung der prozentuale Anteil des Infarktgebietes ermittelt werden. Dazu benötigt man drei Parameter: Die infarzierte Fläche (infarction area) – in der Masson-Trichrom-Färbung blau dargestellt, die gesamte linke Ventrikelwand (LV area), und das Lumen des linken Ventrikels (cavity area).

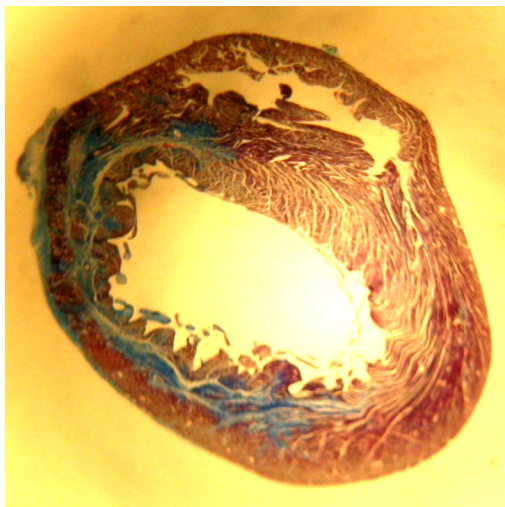


Abb.13 Masson-Trichrom-Standardfärbung eines Querschnittes aus dem Myokard. Die Zellkerne stellen sich leuchtend rot, das Zytoplasma rosa, die Erythrozyten orangegelb und das Bindegewebe blau dar.

Diese werden mit Hilfe der Computermaus umkreist und dadurch markiert und aus den Werten der prozentuale Anteil der Infarktgröße (infarction area/LV area) und der prozentuale Anteil des linksventrikulären Lumens (cavity area/LV area) berechnet.

2.3.2 Immunhistochemische Färbung der Myokardschnitte: CD68 und α -smc-aktin

Das Trocknen der SuperFrostPlus-Objekträger erfolgte über Nacht in einem Brutschrank bei 56 °C. Anschließend wurden die Schnitte 2 mal 10 min. in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert:

10 Minuten in 100 Vol. % Ethanol

10 Minuten in 96 Vol. % Ethanol

5 Minuten in 70 Vol. % Ethanol

5 Minuten in 50 Vol % Ethanol

5 Minuten in Aqua dest.

Hitzeinduzierte Antigendemaskierung

Die Formalinfixierung beruht auf der Immobilisation von Proteinen und löslichen Antigenen über die Quervernetzung von basischen Aminosäuren über Hydroxymethylenbrücken. Das ermöglicht eine gute Erhaltung des Gewebes, kann jedoch auch zur sogenannten Maskierung antigener Strukturen durch deren Konformationsänderung führen. Diese reversiblen Änderungen können durch proteolytische und/oder hitzeinduzierte Antigendemaskierung wieder rückgängig gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden die Objektträger nach der oben beschriebenen Entparaffinierung und Rehydrierung dafür 30min in einem mit Aqua dest. und Trispuffer (pH6) (DAKO Target Retrieval Solution 1:10 verdünnt mit Aqua dest.) gefüllten Dampfgartopf gekocht und anschließend langsam abgekühlt. Die beschriebene Retrieval-Lösung wurde zuvor vortemperiert.

Detektion mittels LSAB-AP Methode

Diese Methode basiert auf der hohen Affinität des Vitamins Biotin zu dem Eiweißmolekül Streptavidin. Dieses wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert und ist ein Protein mit vier Bindungsstellen für Biotin.

Der grundsätzliche Ablauf der Reaktion ist folgender: Zunächst bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das zu untersuchende Epitop. Dieser reagiert anschließend mit einem mit Biotin markierten Brückenantikörper (Sekundärantikörper), welcher in einem dritten Schritt von enzym-gelabelten Streptavidin gebunden wird. Mit Hilfe einer chromogenen Substratlösung kann anschließend der Primärantikörper sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde als Enzymmarker alkalische Phosphatase verwendet. Durch die AP werden Naphtholphosphatester des Substrats in Phenolverbindungen und Phosphate gespalten. Die Phenole reagieren mit farblosen Diazoniumsalzen des Chromogens, so dass sich unlösliche Azofarbstoffe bilden und der AG-Komplex visualisiert wird. Als Chromogen wird Liquid Permanent Red verwendet, wodurch das Zielantigen rot angefärbt wird.

Detektion mittels ABC-AP Methode

Die Darstellung des zu untersuchenden Epitops erfolgt analog zur LSAB-AP Methode. Statt enzymgelabeltem Streptavidin wird hier zur Bindung des Sekundärantikörpers allerdings ein

sogenannter AB-Komplex – bestehend aus Avidin und Biotin – verwendet (ABC-AP Methode, Reagent A und Reagent B in Antikörper-Diluent verdünnt). Chromogen ist in diesem Fall Fast Red.

Dargestellte Antigene

CD 68 ist ein O-glykosliertes mucin-artiges Membranprotein, dessen Sequenz eine signifikante Homologie zur Familie der lysosomalen/plasma membran shuttling proteine besitzt. Es wird v.a. auf Makrophagen und Monozyten exprimiert, und wird deshalb als pan-makrophagen Antigen betrachtet. Angefärbt wurden in dieser Arbeit die Makrophagen im Entzündungsinfiltrat im Myokard 3 Tage nach dem Infarkt. Durch die Färbung kann also die Quantität der Entzündungsreaktion im Randgebiet des Infarktes dargestellt werden.

Alpha-smc-Aktin, also glattes Muskelzellaktin, kann in glattem Muskel, in myoepithelialen Zellen sowie in von diesen Geweben ausgehenden Tumoren nachgewiesen werden. Es wird standardmäßig zur Detektion von Gefäßen verwendet und diente auch in dieser Arbeit als Marker zur Analyse der Gefäßdichte im Infarkt / Rand / gesunden Bereich.

Durchführung der immunistochemischen Anfärbung des CD68-Antigens

Die Präparate wurden wie bereits beschrieben entparaffiniert und nach 10 minütigem Abkühlen anschließend die Antigene mit Hilfe des Trispuffers demaskiert. Danach folgte ein 40 minütiges Blocken mittels Horse Normal Serum, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Anschließend wurde der gegen das CD68-Antigen gerichtete Primärantikörper, verdünnt im Verhältnis 1:100 mit Antikörper-Diluent, aufgetragen und 1h inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit Trispuffer folgte der biotinylierte Sekundärantikörper - verdünnt im Verhältnis 1:400. Die Präparate wurden anschließend 30 min. inkubiert und nochmals dreimalig mit Trispuffer gespült. Danach wurde die ABC-AP Reagentlösung (Reagent A und Reagent B in Antikörper-Diluent verdünnt) aufgetragen und 1h inkubiert. Wiederum dreimaligem Spülen mit Trispuffer folgte das Aufbringen des Chromogens Fast Red und eine 10 minütige Inkubation. Die Gegenfärbung mit Hämalaun wurde nach nochmals dreimaligem Spülen durchgeführt. Die Inkubationszeit war hier eine Minute. Abschließend wurden die Präparate mit warmem Wasser gebläut, mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert und mit Eindeckelmedium eingedeckelt.

Primär-Antikörper	mouse anti-rat CD68 (Monoclonal Mouse Anti-Rat CD68, Serotec, Düsseldorf, Deutschland)
Sekundär-Antikörper	biotinylierte Sekundärantikörper (IgG Maus-Antikörper, Vectastain, Fa.Linaris, Wertheim, Deutschland)
Enzymkonjugat	ABC-AP (Vectastain-ABC-AP Reagentlösung, Vectastain, Fa.Linaris, Wertheim, Deutschland)
Chromogen	Chromogen Fast Red (Dako Real, Detection System, Glostrup, Dänemark)
Gegenfärbung	Hämalaun (Merck, Darmstadt)
Puffer	Trispuffer (60,5g Trizma-Base, 700 ml Aqua dest., 2N HCL, 90 g NaCl)
Blockreagenz	Horse Normal Serum (Vectastain, Fa.Linaris, Wertheim, Deutschland)
Eindeckmedium	Pertex® (Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland)

Tab.7 Reagenzien zur immunhistochemischen Darstellung des CD68-Antigens mittels der im Text beschriebenen ABC-AP Methode.

Ermittlung der Dichte des Entzündungsinfiltrates

Wie schon bei der Masson Trichrom Färbung wurde auch hier die Software Sigma Scan Pro 5 Image Analysis Version 5.0.0 (Aspire Software International, Ashburn, USA) verwendet.

Ausgewertet wurden pro Tier jeweils drei Gesichtsfelder in zwanzigfacher Vergrößerung. Nachdem zunächst eine bestimmte auszuwertende Fläche definiert wurde, wurden alle im Bereich dieser Fläche vorhandenen deutlich rot gefärbten Zellen markiert, deren Gesamtfläche das CD68+ Entzündungsinfiltrat repräsentiert.

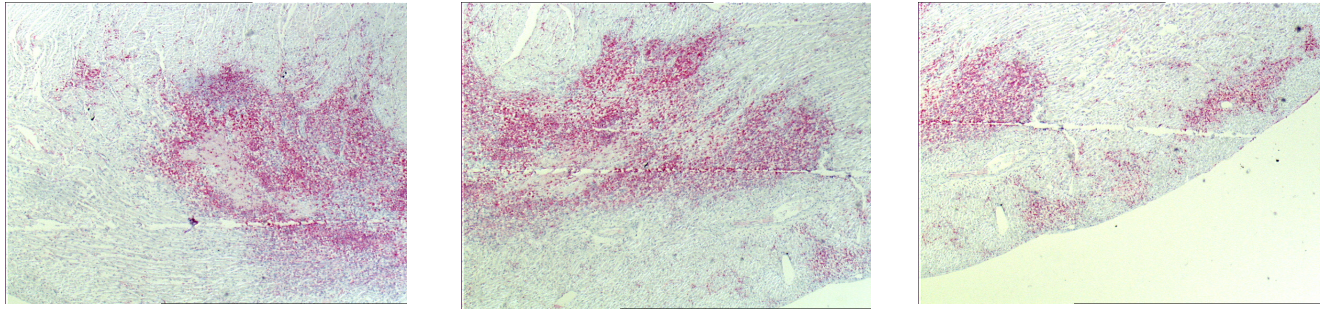


Abb.14 Darstellung des Entzündungsinfiltrates durch immunhistochemische Färbung des CD68-Antigens auf den Makrophagen im Myokard. Die rot gefärbten Zellen sind CD68-positiv.

Danach wurde die Fläche des zu Beginn definierten Areal gemessen. Aus diesen beiden Werten kann anschließend der prozentuale Anteil der Entzündungszellen berechnet werden, wozu folgende Formel genutzt wird:

$$\frac{\text{Gesamtfläche der CD68+ Zellen} * 100}{\text{ausgewertete Gesamtfläche}} = \text{Dichte des Makrophageninfiltrats in \%}$$

Durchführung der immunhistochemischen Färbung des α -smc-aktin-Antigens

Auch diese Präparate wurden nach einer Nacht im Brutschrank bei 56°C entparaffiniert und mit Trispuffer gewaschen. Für die immunhistochemische Färbung wurde anschließend analog zu der CD68-Färbung vorgegangen, der Primärantikörper war in diesem Fall ein monoklonaler Maus-anti-human- α -smooth-muscle-Aktin-AK, die Inkubationsdauer betrug im Gegensatz zu der CD68-Färbung nur 10min. Das weitere Vorgehen war wiederum identisch der beschriebenen Färbung, als Detektionssystem wurde hier allerdings die LSAB-AP Methode gewählt.

Primär-Antikörper	Maus-anti-humanes- α -smc-Aktin-IgG2a Klon monoklonal (1A4) (Dako Corporation, Carpinteria, USA)
Sekundär-Antikörper	biotinylierte Sekundärantikörper (IgG anti-Kaninchen-anti-Maus, Dako Corporation, Carpinteria, USA)
Enzymkonjugat	LSAB-AP (Dako Corporation, Carpinteria, USA)

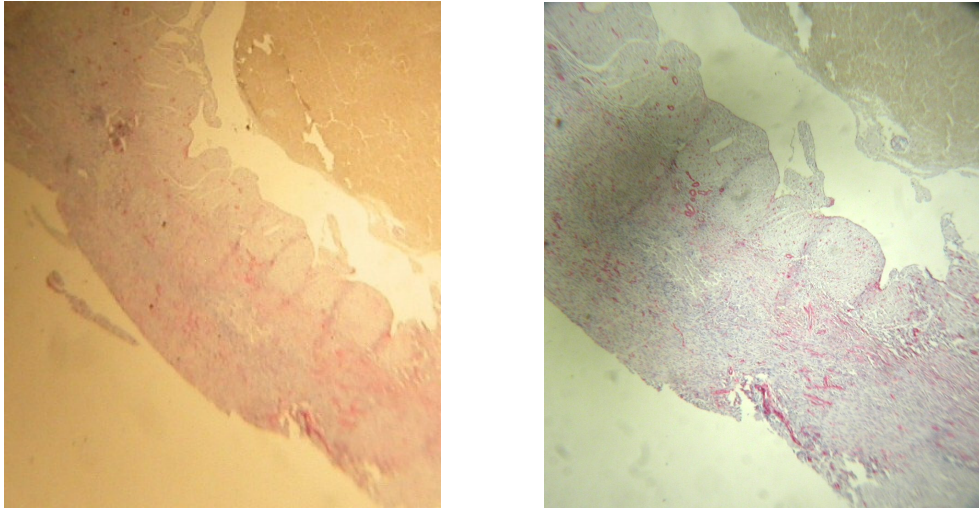
Chromogen	Liquid Permanent Red (DakoCytomation, Dänemark)
Gegenfärbung	Hämalaun (Merck, Darmstadt)
Puffer	Trispuffer (60,5g Trizma-Base, 700 ml Aqua dest., 2N HCL, 90 g NaCl)
Blockreagenz	Horse Normal Serum (Vectastain, Fa.Linaris, Wertheim, Deutschland)
Eindeckmedium	Pertex® (Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland)

Tab.8 Reagenzien zur immunhistochemischen Darstellung des α -smooth-muscle-Aktin zur Darstellung der myokardialen Gefäße mittels der im Text beschriebenen LSAB-AP Methode

Ermittlung der Gefäßdichte

Die so entstandenen Schnitte des Myokards wurden unter dem Mikroskop betrachtet und jeweils die drei Ebenen ausgewählt, auf denen der Infarkt die größte Fläche einnimmt. Archiviert wurden davon jeweils acht Gesichtsfelder im Periinfarktgebiet in zwanzigfacher Vergrößerung mit dem Programm Axiovision 3.1 (Carl Zeiss Vision GmbH).

Zur Auswertung der Gefäßdichte wurde die Software S.CORE online image analysis (S.CO GmbH Garching) verwendet. Dieses Programm erkennt automatisch Gefäße und kennzeichnet kleine Gefäße gelb, mittelgroße Gefäße orange und große Gefäße rot. Es berechnet sowohl die Gesamtzahl der unterschiedlich großen Gefäße pro Gesichtsfeld, als auch den prozentualen Anteil der Gefäße an der Gesamtfläche des jeweiligen Gesichtsfeldes.



a)
Abb.15 α -SMC-aktin Färbung der Myokardschnitte
a) vor Bearbeitung durch Axiovision 3.1
b) nach Bearbeitung durch Axiovision 3.1

2.3.3 Immunfluoreszenzfärbung der Myokardschnitte: Ki67

Antigene können auch mit Hilfe von Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Diese Methode beruht – ebenso wie die oben beschriebene Immunhistochemie – auf der Bindung eines Primärantikörpers an ein bestimmtes Antigen, und dessen Markierung durch einen Sekundärantikörper, an den in diesem Fall ein sog. Fluorochrom gekoppelt ist. Fluorochrome haben die Eigenschaft, nach Anregung mit monochromatischem Licht spezifischer Wellenlänge mit einer Emission eines Fluoreszenzspektrums zu reagieren. Sie zeichnen sich jeweils durch eine charakteristische Fluoreszenzfärbung aus, so z.B. zeigt das hier verwendete Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) nach Anregung eine gelbgrüne Fluoreszenz. Das Absorptionsspektrum liegt bei 495 nm, das Emissionsspektrum bei 528 nm. Als Gegenfärbung wird der blaue Farbstoff DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindol) verwendet. Dieser lagert sich vor allem an AT-reiche DNA-Abschnitte an. Dadurch entsteht als Gegenfärbung zur gelbgrünen Fluoreszenz des markierten Antigens eine blaue Fluoreszenz des Zellkerns durch Anfärbung der darin enthaltenen DNA. Das Absorptionsmaximum der entstehenden Verbindung von DAPI und doppelsträngiger DNA liegt bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm. Eine Negativ-Kontrolle ohne jegliche Färbung wurde mitgeführt, um gegebenenfalls eine Autofluoreszenz des Gewebes bei der Auswertung der Präparate berücksichtigen zu können.

Dargestelltes Antigen: Ki67

Ki 67 ist ein im Zellkern gebildeter Marker der Proliferationsaktivität. Es wird sowohl in der späten G1, S und G2 als auch in der Mitose gebildet. In ruhenden Zellen (G0) ist Ki-67 nicht nachweisbar. In der Interphase wird das Antigen ausschließlich innerhalb des Kerns gefunden, wohingegen es sich während der Mitose auf der Oberfläche der Zellen befindet und dort nachgewiesen werden kann. Ein Vorteil dieses Markers besteht darin, dass es nicht in die Reparatur von DNA involviert ist und dadurch nicht bei Reparaturprozessen gebildet wird. In der vorliegenden Arbeit wurde es zur quantitativen Analyse der Proliferationsaktivität im Infarktbereich, im Randbereich des Infarktes und im gesunden Myokard verwendet. (MacCALLUM DE. et al, 2000)

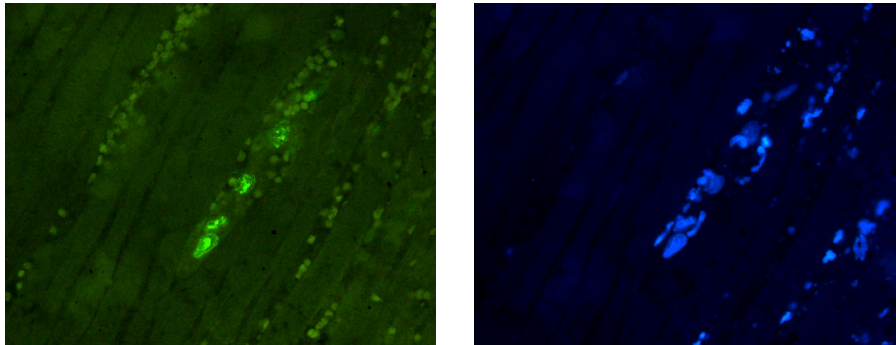
Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Wie bereits beschrieben wurden die Präparate getrocknet und entparaffiniert. Sie wurden anschließend bei 4°C über Nacht in Trispuffer gelagert. Die Antigen-Demaskierung erfolgt wie ebenfalls beschrieben im Dampfgerät. Danach wurde der Primärantikörper Anti-Ki67-IgG1 im Verhältnis 1:50 mit einem Diluenten aufgetragen und 1h lichtgeschützt in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Trispuffer erfolgte das Auftragen des an FITC gekoppelte Sekundärantikörpers auf die Objektträger verdünnt im Verhältnis 1 : 50. Wiederum wurden die Präparate in der feuchten Kammer bei 4°C 1h lichtgeschützt inkubiert. Dem anschließenden Waschen mit Trispuffer folgte die Gegenfärbung der Kerne mit dem Mounting Medium DAPI (4',6-diamidino-2-Phenylindol) und das abschließende Eindeckeln der Objektträger.

Primär-Antikörper	Maus-anti-Ki67-IgG1 Klon monoklonal (B56) (Pharmingen BD, Heidelberg, Deutschland)
Sekundär-Antikörper	Esel-anti-Maus-IgG, H+L (Dianova, Hamburg, Deutschland)
Fluorochrom	FITC (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK)
Gegenfärbung	DAPI (Dako, Hamburg)

Tab.9 Reagenzien zur Darstellung von Ki67 mittels Immunfluoreszenzfärbung.

Die Zahl der fluoreszierenden proliferierender Zellen wurde im Infarktbereich, im Randbereich und im Gesunden (Septum) gezählt und ins Verhältnis gesetzt. Anhand der Morphologie der Schnitte kann hier auch der Zelltyp, Makrophagen, Myofibroblasten oder Endothelzellen bestimmt werden.



a) b)
Abb.16 Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung des Proliferationsindex
a) Anfärbung von Ki67 mittels FITC, Darstellung proliferierender Zellen (hier Myofibroblasten)
b) Gegenfärbung mit DAPI, Darstellung der Zellkerne von proliferierenden und ruhenden Zellen

2.4 Genexpressionsanalyse

Die RNA wurde aus den bei -80°C schockgefrorenen und asservierten Myokardstücken isoliert. Der Infarktbereich, der sich makroskopisch als hellrot-weiß verfärbtes Areal darstellt, wurde hierzu vom gesunden Gewebe getrennt und die beiden Gewebestücke nach dem unter 2.4.1 beschriebenen Protokoll verarbeitet.

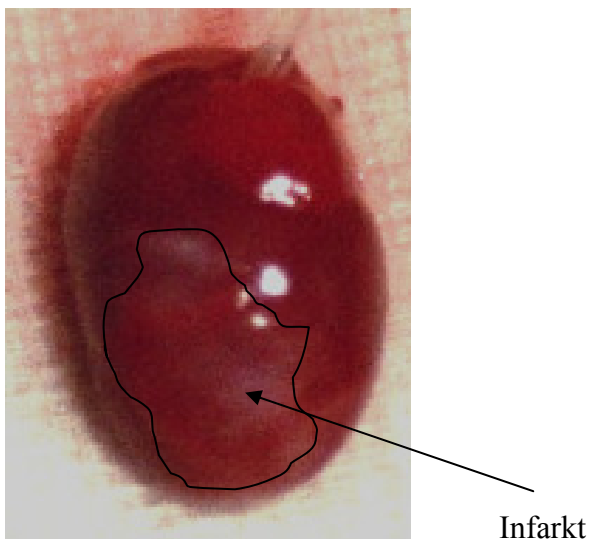


Abb. 17) Ansicht auf den linken Ventrikel mit Myokardinfarkt. Die Infarktzone stellt sich hellrot-weißlich dar. Sie wurde zur weiteren Verarbeitung vom gesunden Myokard getrennt.

2.4.1 RNA-Extraktion

Zur Isolation von RNA aus dem Myokard wurde der RNeasy Mini Kit® der Firma QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden), bestehend aus RNase freiem Wasser, RPE-Puffer, RW1-Puffer RLT-Puffer und RNeasy Mini Spin Columns, gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dieser nutzt die selektive Bindungseigenschaft einer aus Silikagel basierenden Membran zur RNA-Extraktion.

Die Homogenisierung des Muskelgewebes erfolgte mit dem Ultra-Turrax. Um dieses Dispergierwerkzeug RNase frei zu halten, wurde das Gerät zwischen der Verarbeitung der Proben nacheinander mit 70% Ethanol, 0,1% DEPC-H₂O und RNase ZAP gereinigt.

Zunächst wurde das auf Eis aufgetaute Gewebestück in 600µl β-Mercaptoethanol enthaltendem RLT-Buffer aufgenommen und gekühlt mit dem Ultra-Turrax dispergiert. Der verwendete Buffer enthält Guanidinisothiocyanat, welches RNasen sofort effektiv inaktiviert und somit die Isolierung intakter RNA ermöglicht. Das homogenisierte Gewebe wurde anschließend in einen QuiaShredder pipettiert und 3min bei 13000 Upm in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Zu dem 600 µl messende Überstand wurde 600µl 70%-iger reiner Alkohol zugegeben. Durch das Ethanol werden optimale Bindebedingungen zwischen Silikgel-Membran und Gesamt-RNA hergestellt. Diese bindet also an die Membran, während andere Substanzen in den drei folgenden Waschsritten ausgewaschen werden. Zunächst wurde mit 700µl RW1-Buffer bei 10000 Upm zentrifugiert, anschließend zweimal mit jeweils 500µl RPE-Buffer und ebenfalls 10000 Upm. Die an der Membran gebundenen RNA wurde anschließend mit 40 µl RNase freiem Wasser eluiert und bei - 80°C in RNAlater™ RNA Stabilization Reagent gelagert.

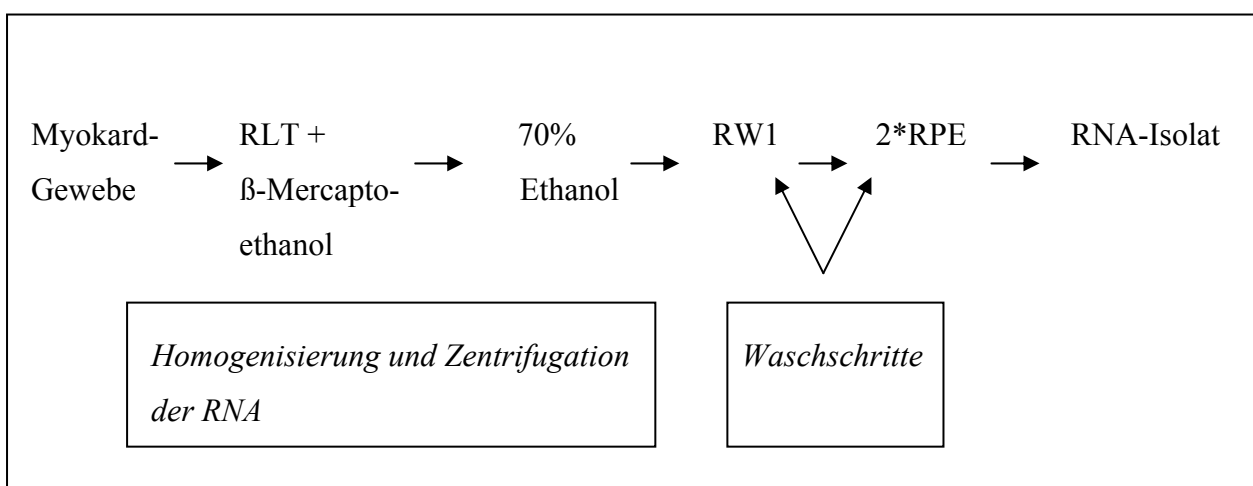


Abb.18 Extraktion der Gesamt-RNA aus dem Myokard durch Homogenisierung des Gewebes, Zentrifugation und Bindung der RNA an eine Silikagel-Membran und anschließende Auswaschung verunreinigender Substanzen.

Die verwendeten Reagenzien zeigt die folgende Tabelle

RNeasy Mini Kit® QIAGEN RNeasy Mini-Spinsäulen 1,5-ml-Collection-Tubes 2-ml-Collection-Tubes RLT-Puffer RPE-Puffer RW1-Puffer 0,1% RNase freies DEPC H ₂ O (entsprechend dem RNeasy Mini Handbuch 12h bei 37°C unter dem Abzug inkubiert und dann autoklaviert) RNAlater™ RNA Stabilization Reagent	QIAGEN GmbH Hilden, Deutschland
RNase ZAP	QIAGEN GmbH Hilden, Deutschland
70% Ethanol	Ethanol absolut Merck, Darmstadt und RNase freiem 0,1% DEPC H ₂ O
Ultra-Turrax Dispergierwerkzeug	IKA-Werke Staufen, Deutschland

Tab.10 Reagenzien zur Extraktion der RNA aus dem Myokard mit Hilfe des RNeasy Mini Kit® der Firma QIAGEN

Mit Hilfe des GeneQuantProClassic (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) wurde die exakte Konzentration der im Eluat enthaltenen RNA bestimmt.

2.4.2 Reverse Transkription

Da die gewonnene RNA nicht direkt als Template für die Real-Time-PCR eingesetzt werden kann, muss sie zunächst in einem als Reverse Transkription bezeichneten Reaktionsschritt in einsträngige DNA umgeschrieben werden. Dazu benötigt wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Reverse Transkriptase. Um die Spezifität der Reaktion zu erhöhen, verfügt die in dieser Arbeit eingesetzte reverse Transkriptase „Omniscript“ zusätzlich über eine RNA-DNA-Hybrid-abhängige Exonukleaseaktivität, das heißt, sie baut spezifisch RNA aus RNA-DNA-Hybridmolekülen ab, nicht jedoch reine RNA. Das Reaktionsprodukt, die cDNA, kann anschließend zur Untersuchung der Genexpression mittels Real-Time-PCR verwendet werden.

Durchführung Reversen Transkription

Um 20 µl cDNA zu erhalten wurde folgendes Arbeitsprotokoll verwendet:

Im Ansatz befanden sich

...µl RNA (300ng, Menge abhängig von der mit Hilfe des GeneQuantProClassic ermittelten
Konzentration des jeweiligen RNA-Isolats)

2 µl 10xBuffer (RT Buffer, 10fach konzentriert)

2 µl dNTP-Mix

1 µl Random Primer (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

0,25 µl RNase Inhibitor (Superase-In®, Ambion Ltd., Huntington, Cambridgeshire, UK)

1 µl Omniscript Reverse Transkriptase

...µl DEPC H²O (der Reaktionsansatz wurde jeweils auf 20µl aufgefüllt,

verwendet wurde 0,1% DEPC H²O, wiederum dem RNeasy Mini Handbuch
entsprechend)

Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler bei 37°C 60 min inkubiert, um das Annealing der Primer und die Synthese des Gegenstranges zu ermöglichen. Zur Denaturierung wurde anschließend bei 93°C 5 min. inkubiert. Die entstandene cDNA wurde anschließend entweder sofort für die Real-Time-PCR verwendet oder bei - 20°C gelagert.

Falls nicht anders gekennzeichnet, entstammen alle Materialien dem Omniscript-Reverse-Transcriptions-Kit® der Firma QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden).

2.4.3 TaqMan-Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR zur Amplifikation von DNA und ermöglicht zusätzlich deren Quantifizierung. Diese erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen in Echtzeit während der PCR-Zyklen, wobei die Fluoreszenz von der Menge der eingesetzten DNA abhängt.

Vor Beginn der PCR wird zu jeder Probe eine Oligonukleotid-Sonde hinzugegeben, die an ihrem 5' Ende mit einem Donor Fluorochrom (Reporter) und an ihrem 3' Ende mit einem Akzeptor Fluorochrom (Quencher) markiert ist, und die spezifisch an die DNA-Matrize bindet. Ein als Fluorescence resonance energy transfer (FRET) bezeichneter Effekt führt dazu, dass der Quencher das Fluoreszenzsignal des Reporters „auslöscht“. Der FRET ist abhängig vom räumlichen Abstand der beiden Fluorochrome, das bedeutet, dass eine Vergrößerung des Abstandes zu Verstärkung des Reporter-Signals führt. In der Elongationsphase der PCR trifft

nun die Taq DNA Polymerase auf die gebundene Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5' → 3' Exonukleaseaktivität DNA Polymerase aktiviert und die Sonde abgeschnitten wird und so die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben wird. Die dadurch steigende Reporter Fluoreszenz kann nun am Ende jedes Elongationszyklus gemessen werden. Da ausschließlich an der Matrize gebundene Sonde gespalten wird, ist das gemessene Signal proportional zur Konzentration der eingesetzten Zielsequenz.

Das Ergebnis der Real Time PCR stellt man in Form eines Graphen dar, bei dem die Zunahme der Fluoreszenz gegen die Zahl der Zyklen aufgetragen wird.

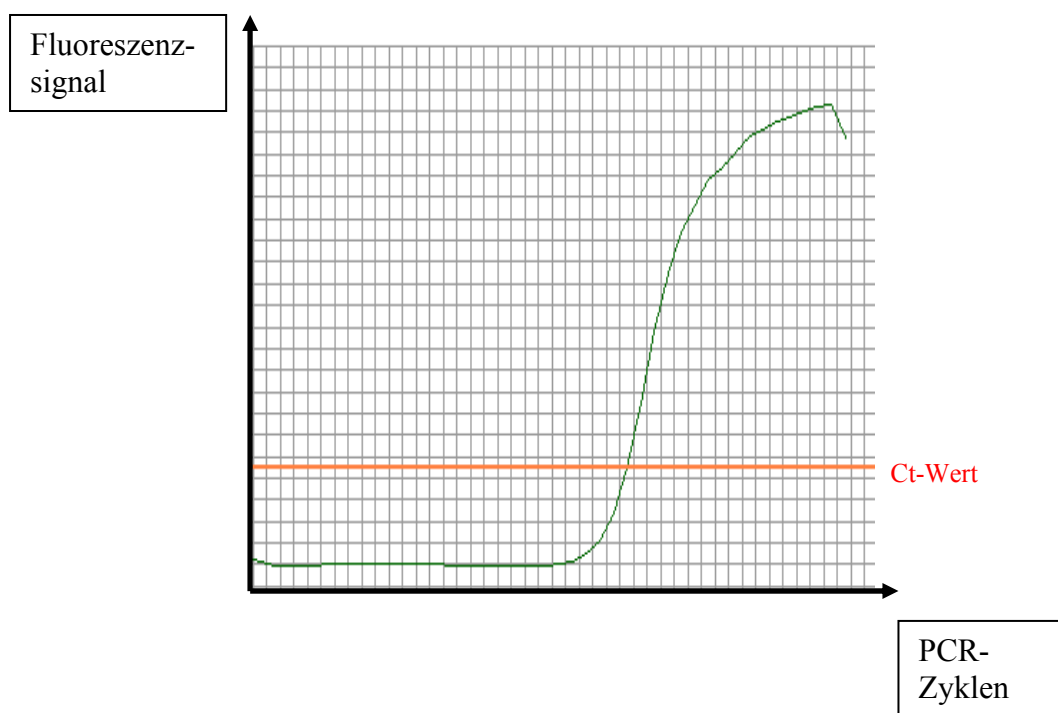


Abb.19 Auftragung des Fluoreszenzsignals (Y-Achse) gegen die Anzahl der PCR-Zyklen (X-Achse). Der Ct-Wert (crossing threshold) bezeichnet dabei jene Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

Der Ct-Wert (crossing threshold) bezeichnet dabei jene Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Je kleiner also der gemessene Ct-Wert, desto höher war die Konzentration der in der Probe vorhandenen Zielsequenz.

Zur relativen Quantifizierung der in der Probe vorhandenen DNA wird die gemessene Kopienzahl auf die Transkriptzahl eines sog. Housekeeping-Gens bezogen, welches mit jeder Probe zusätzlich bestimmt wird. Das Housekeeping-Gens sollte so gewählt werden, dass seine Expression durch das durchgeführte Experiment nicht beeinflusst wird, weshalb in dieser

Arbeit die gemessenen Werte auf die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) normalisiert wurden.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte über die $\Delta\Delta Ct$ -Methode: Zunächst wird für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens von dem Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen (ΔCt -Wert). Nach dieser Normierung wird anschließend vom ΔCt -Wert der experimentell behandelten Proben - also der Genexpression in der Infarktzone – der ΔCt -Wert einer Kontrolle – also der Genexpression im gesunden Myokard subtrahiert und man erhält den $\Delta\Delta Ct$ -Wert. Mithilfe der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ kann man den Expressionsunterschied des untersuchten Gens zwischen „behandelt“ und „Kontrolle“, also zwischen Myokardinfarktzone und gesundem Gewebe bestimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TaqMan-Real-Time-PCR zur semiquantitativen Untersuchung der Genexpression der in der folgenden Tabelle dargestellten Gene genutzt:

Angiogenetische Wirkung	Inflammation	Apoptose-marker	Zellproliferation- und Differenzierung	Remodelling
CD 31 human	Gro 1	BAX	IGF II	Kollagen III alpha 1
CD 31 rat	CD 45	Bcl-2	TGFβ-RII	
HGF			SHH	
SDF 1				

Tab.11 Mit Hilfe der TaqMan-Real-Time-PCR untersuchte Gene und ihre Hauptwirkungen im Rahmen des akuten Myokardinfarktes (genaue Darstellung von Überschneidungen und exakte Wirkung in der Diskussion der jeweiligen Gene).

Durchführung TaqMan-Real-Time-PCR

Für ein Reaktionsvolumen von 25µl wurde folgender Ansatz gewählt und in ein Well einer 96-well Optical Reaction plate pipettiert:

Universal MasterMix	12,50 µl
Control/Target Mix	1,25 µl
H ² O steril	9,25 µl
cDNA	2,00 µl

Die 96-well Optical Reaction plate wurde anschließend zum Schutz vor der im Detektor entstehenden Hitze mit einem Optical Adhesive Cover abgedeckt. Der Reaktionsansatz wurde

in einem ABI PRISM® Sequence Detector 7700 amplifiziert, wobei folgendes Programm verwendet wurde:

Zyklus 1

AmpErase und Aktivierung	50°C	2 min
AmpliTaQ Aktivierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	15 sec
Annealing und Extension	60°C	1 min

Zyklus 2-40

Denaturierung	95°C	15 sec
Annealing und Extension	60°C	1 min

Die verwendeten Reagenzien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

TaqMan qPCRMasterMix	Eurogentec Köln, Deutschland
96-well Optical Reaction plate Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems

Tab. 12 Verwendete Materialien zur Durchführung der TaqMan-Real-Time-PCR.

Als Control/Target Mix wurden die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Primer/Assays-on-Demand der Firma Applied Biosystems verwendet:

Assay-on-Demand	Bestellnummer	Referenzsequenz
CD 31 human	Hs00169777_m1	NM_000442.3
CD 31 rat	Rn01467259_m1	NM_031591.1
HGF	Rn00566673_m1	NM_017017.1
SDF 1	Rn00573260_m1	NM_001033882.1
Gro 1	Rn00578225_m1	NM_030845.1
CD 45	Rn01483481_m1	NM_138507.2
IGF II	Rn01454518_m1	NM_031511.1
TGFβ-RII	Rn00579682_m1	NM_031132.3
SHH	Rn00568129_m1	NM_017221.1

BAX	Rn02532082_m1	NM_017059.1
Bcl-2	Rn99999125_m1	NM_016993.1
Kollagen III alpha 1	Rn01437651_m1	NM_032085.1
GAPDH	Rn99999916_s1	NM_017008.3

Tab.13 Zur Genexpressionsanalyse verwendete Assays-on-Demand der Firma Applied Biosciences

2.5 MRT

Zur Ermittlung der globalen kardialen Ejektionsfraktion wurde bei der Gruppe der zwei Wochen alten Tiere eine kernspintomographische Untersuchung durchgeführt. Der verwendete 1,5 Tesla Phillips Achieva MR Scanner wurde von der nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar der TU München bereitgestellt und es wurde jeweils ein spezifisches kardiales Softwarepaket (R 1.2.2) und ein klinisches Gradientensystem (30mT/m, 150mT/m/ms) genutzt.

Als Messsequenzen wurden schnelle Gradientenecho-sequenzen (Turbo-Field-Echo, TFE) verwendet, was die Darstellung der Myokardperfusion in mehreren Schichten erlaubt und dadurch eine hohe Sensitivität der Messung gewährleistet. Die dabei gewählten Parameter waren: TR/TE=14/4,5, Flipwinkel=30° (bei schnellen Sequenzen statt eines 90 Grad Impulses gewählte Auslenkungswinkel), averages=1, Matrix=128, FOV=35mm (betrachteter Bildausschnitt, der bei der jeweils gewählten Matrix die Pixelgröße bestimmt).



Abb.20 1,5 Tesla Phillips Achieva MR Scanner der nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar

Der Ablauf der Untersuchung war folgender: Die Ratten wurden zunächst mit 0,2 ml MMF (Midazolam, Medetomidin, Fentanyl) i.m. in Narkose gelegt, diese wurde alle 45 min. mit weiteren 0,1 ml MMF i.m. verlängert. Über eine Atemmaske wurde ihnen reiner Sauerstoff

zugeführt, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung bei der in freier Atmung durchgeführten Untersuchung zu gewährleisten. Um ein Auskühlen zu verhindern wurden die Ratten bis zum Ende des Scans zwischen zwei mit warmem Wasser gefüllten Einmalhandschuhen gelegt. Um ein Feuchthalten der Kornea zu gewährleisten, wurde den Ratten außerdem Augensalbe aufgetragen.

Die verwendete Spule war eine 47mm durchmessende Mikroskopiespule von Phillips Medical Systems (Best, NL), auf der die Ratte in Brust-Bauch-Lage so platziert wurde, dass sich das Herz der Ratte im Zentrum der Spule befand.

EKG-Ableitung

Ein kardiales MRT erfordert ein Ausgleichen der Bewegungsartefakte, die durch die Pumpfunktion des Herzens entstehen, das sog. „Cardiac Gating“. Dazu muss die Untersuchung echokardiographisch getriggert durchgeführt werden, wozu die Ratten an ein spezielles Kleintier-EKG (1025-MR, SA Instruments Inc., Stony Brook, New York) angeschlossen wurden. Die EKG-Sonden werden hierbei subkutan am ventralen Thorax auf Höhe des vierten Interkostalraumes angebracht und mit dem eigentlichen EKG verbunden, welches die Signale auf einen damit verbundenen Laptop überträgt. Als Triggerimpuls verwendet man die R-Zacke des QRS-Komplexes. Bei einer Herzfrequenz unter 250/min dient jede Zacke, bei einer Herzfrequenz über 250/min jede zweite R-Zacke als Startpunkt für die nächste Messung.

Durch die Ableitung des Echokardiogrammes ist gleichzeitig eine kontinuierliche Überwachung der Tiere während des Scans möglich.

Durchführung der Kernspintomographie

Zunächst wurden Übersichtsaufnahmen in der kurzen Achse im Zwei- und im Vier – Kammerblick aufgenommen. Diese stellen die Position der Ratte im MRT und die genaue Anatomie des Rattenherzens dar („Localizer“) und werden weiterhin zur geometrischen Planung der Messequenzen benötigt.

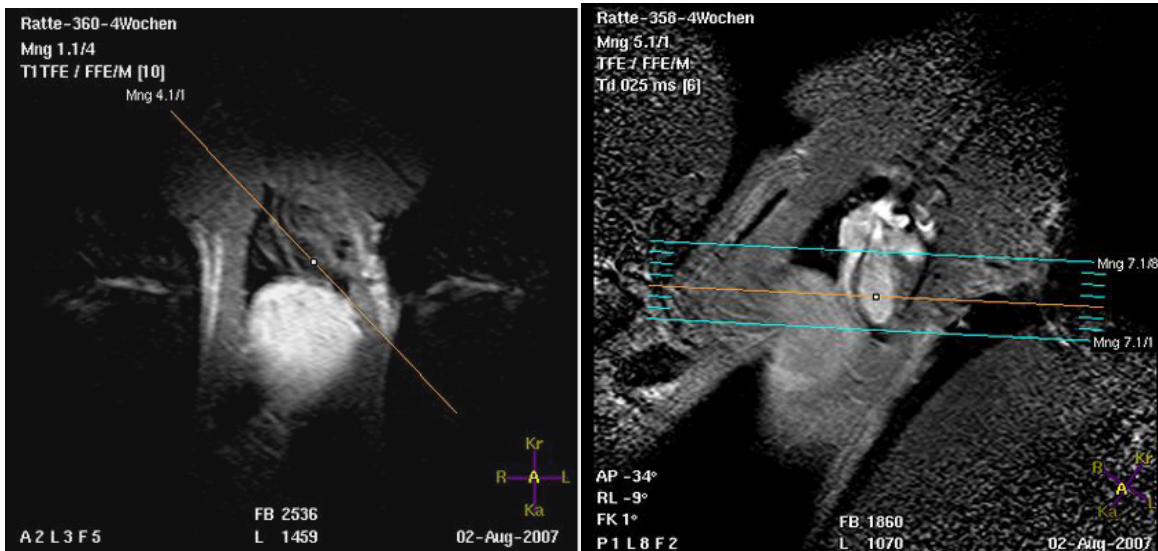


Abb.21 MRT Scan eines Rattenherzens

Ermittlung der Ejektionsfraktion des linken Ventrikels

Danach wurde das Herz in Längs- und Kurzsachse im Zwei- und Vier-Kammerblick abgebildet. Die Schichtdicke der Schnitte durch das Herz ist dabei 2mm, die Bildauflösung $0,31 \times 0,31 \text{ mm}^2$. Die aufgenommenen Bilder können entweder einzeln oder entsprechend dem Zeitverlauf von Diastole und Systole als Film hintereinander betrachtet werden.

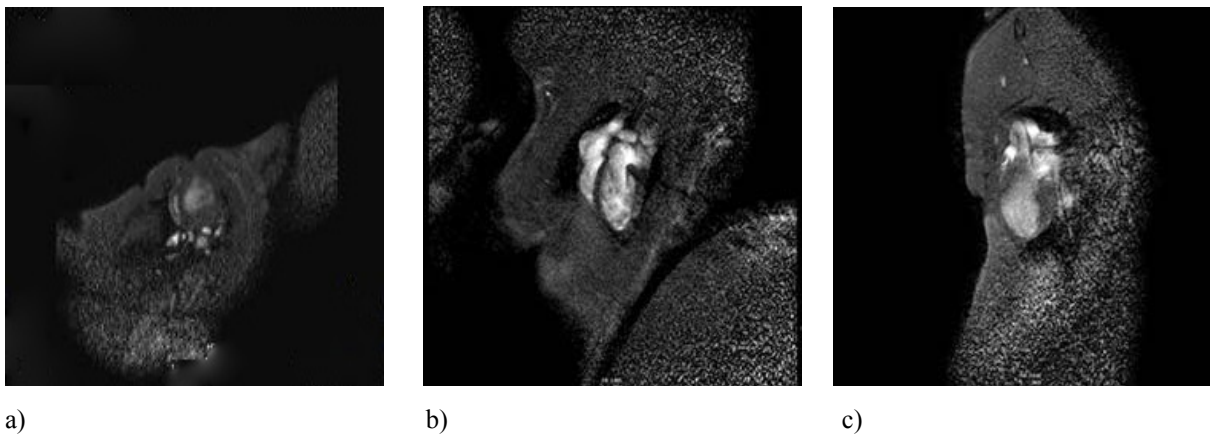


Abb.22 MRT Schnitte zur Berechnung der LVEF
 a) Kurzachsenschnitt
 b) Vierkammerblick in der Längsachse
 c) Zweikammerblick in der Längsachse

Auswertung: Ermittlung der LVEF

Ausgewertet wurde mit Hilfe der Software „Munich Heart“ (Dr. Stefan Nikkola der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der technischen Universität München, Deutschland). Auf den Schnittebenen durch das Herz müssen zunächst

diejenigen gewählt werden, die das Herz am Ende der Diastole und am Ende der Systole zeigen. Auf diesen wird mit dem Cursor der Computermaus die Kontur des Endokards in der maximalen Diastole und der maximalen Systole nachgezeichnet und markiert.

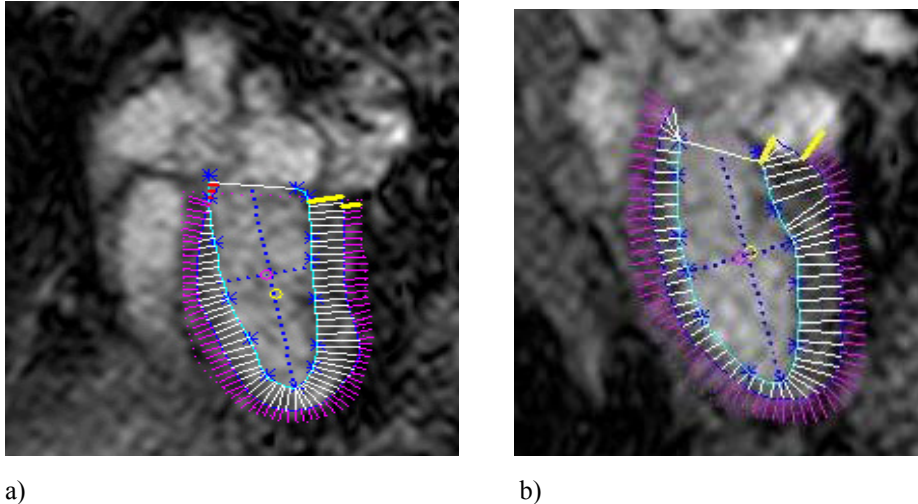


Abb.23 Markierung der maximalen Systole (türkise Linie) sowie der maximalen Diastole (blaue Linie)
a) im Zweikammerblick
b) im Vierkammerblick

Zur Auswertung wird das Herz gemäß des standardisierten 17-Segment-Modells der American Heart Association in Segmente aufgeteilt. Die Längsachse wird in drei Abschnitte unterteilt: apikal, mid-kavitär und basal. Das apikale Segment umfasst die apikalen 30% des linken Ventrikels, das mid-kavitäre und das basale Segment jeweils 35%. In der Kurzachse werden die so definierten Abschnitte nochmals unterteilt. Das apikale Segment erhält vier Bereiche, die jeweils 90° betragen, aus dem mid-kavitären und dem basalen Segment entstehen jeweils sechs 60° messende Einzelsegmente. Alle Segmente werden sowohl numerisch als auch nach ihrer jeweiligen Lokalisation bezeichnet.

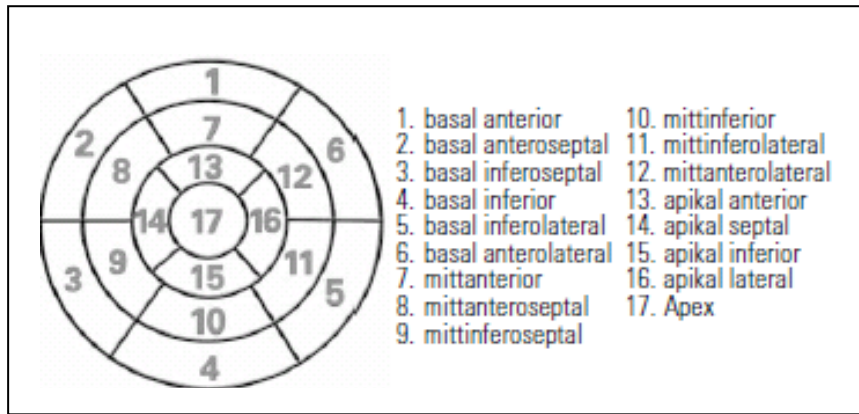


Abb.24 Bull's Eye Plot des von der AHA standardisierten 17-Segmentmodells mit Nomenklatur und Lokalisation der daraus entstandenen Segmente. (modifiziert aus Cerquerira MD. et al, 2002)

Die definierten Segmente wurden wie beschrieben durch Markieren der maximalen Systole und der maximalen Diastole ausgemessen. Begonnen wurde jeweils an der septalen Wand des linken Ventrikels, anschließend wurde die Messung nach lateral fortgesetzt, so dass sich im Vierkammerblick folgende Reihenfolge ergab: 2, 3, 8, 9, 14, 17, 16, 11, 12, 5, 6. Im Zweikammerblick erfolgte die Messung in der Reihenfolge 4, 10, 15, 17, 13, 7, 1. Zur anschaulichen Darstellung der beschriebenen Abfolge vergleiche die vorangestellte Abbildung. Das Programm „Munich Heart“ berechnet anschließend mit Hilfe der folgenden Formel die Kontraktionseigenschaften des linksventrikulären Myokards für jedes der definierten Segmente.

$$\frac{\text{Linksventrikuläre Wanddicke (systolisch)} - \text{Linksventrikuläre Wanddicke (diastolisch)}}{\text{Linksventrikuläre Wanddicke (systolisch)}} = \text{Wandkontraktilität}$$

Abb.25 Formel zur Berechnung der regionalen Kontraktion (Angabe in %) der einzelnen Wandsegmente des linken Ventrikels zwischen Systole und Diastole

Als Ergebnis der Messung erhält man schließlich die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, das linksventrikuläre enddiastolische – und endsystolische Volumen sowie die Verkürzung der Herzwand in mm.

2.6 Statistische Berechnungen und Dokumentation

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden für beide Gruppen (Kontrolle, UV-MSK) als Mittelwert zusammen mit dem Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe der SPSS Version 10.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Mittelwertsunterschiede zwischen den beiden verglichenen Gruppen wurden anhand von t-Tests auf Signifikanz geprüft. Als statistisch signifikant gilt ein Wert, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ ist. Der Wert zeigt eine statistische Tendenz an, wenn $p < 0,1$ ist.

3. ERGEBNISSE

3.1. Morphologische Untersuchungen: Histologie, Immunhistologie und Immunfluoreszenz

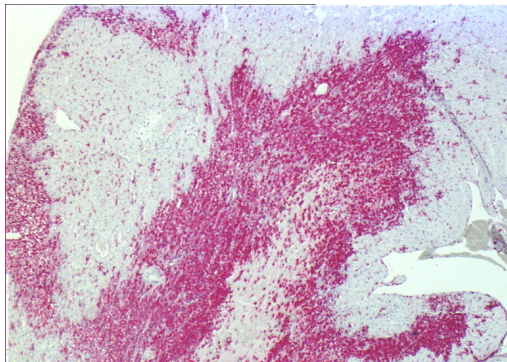
3.1.1 Ergebnisse 3 Tage nach dem Infarkt

Analyse der Entzündungsreaktion im Myokard 3 Tage nach Infarkt

Dazu wurden die Versuchstiere aus der Gruppe der UV-MSC – transplantierten Tiere und aus der Kontrollgruppe drei Tage nach dem Infarkt geopfert und das Myokardgewebe wie bereits beschrieben immunhistochemisch mit Anti-CD68 angefärbt, um das Entzündungsinfiltrat im Infarkt zu diesem Zeitpunkt zu beurteilen.

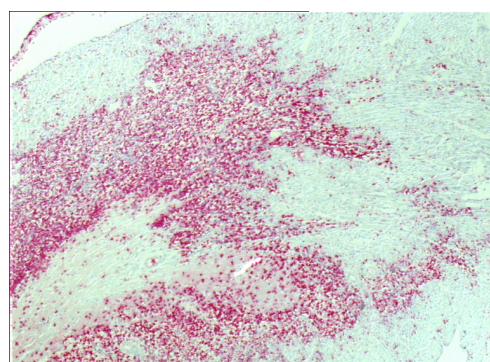
Die folgenden repräsentativen Photographien der angefertigten Präparate zeigen das rot angefärbte, CD68+ Makrophagen Infiltrat im Bereich des Myokardinfarktes.

Kontrolle

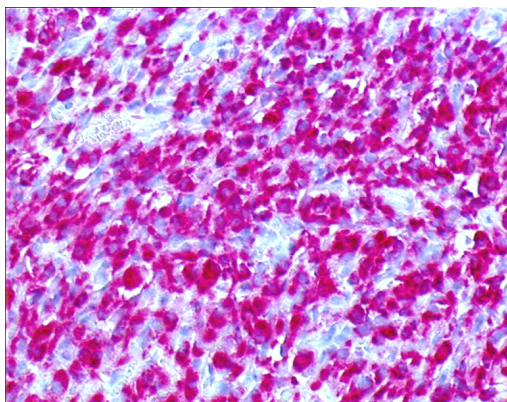


a)

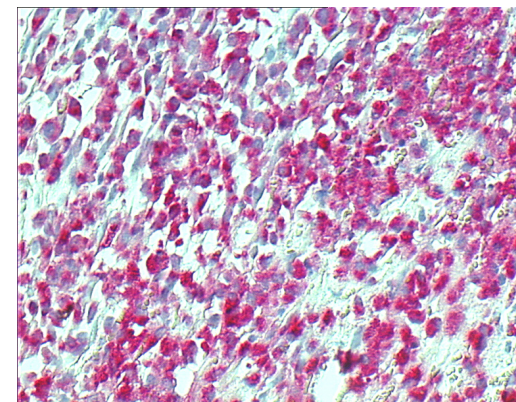
UV-MSC



b)



c)



d)

Abb.26 a-d) CD68+ Zellen im Myokard (CD68-positive Zellen sind rot angefärbt);

a) und c) Kontrolle; b) und d)UV-MSC

a) und b) Übersichtsaufnahmen

c) und d) in zwanzigfacher Vergrößerung

Die Größe des Infarktgebietes - ausgezählt in Pixel – betrug bei den transplantierten Tieren $55713,543 \pm 6607,97$ (MW \pm SD), die Anzahl der CD68-positiven Zellen $122085,08 \pm 34926,04$ (MW \pm SD). Analog hierzu ergaben sich für die Kontrollgruppe folgende Werte: Infarktgröße $68089,10 \pm 36388,47$ (MW \pm SD), CD 68+ Entzündungsinfiltrat $157674,24 \pm 43102,78$ (MW \pm SD). Wenn man diese beiden Parameter ins Verhältnis setzt erhält man die Dichte des Entzündungsinfiltrates im Infarktgebiet.

In der Kontrollgruppe lag die Dichte des CD68+-positiven Infiltrates im Mittel bei $60\% \pm 12,92\%$ (MW \pm SD), in der Gruppe der UV-MSC-transplantierten Tiere bei $59,55\% \pm 11,67\%$ (MW \pm SD). Auch die ermittelten absoluten Werte zeigten dementsprechend in beiden Gruppen ähnliche Ergebnisse, so ergab das Verhältnis von Entzündung zu Infarkt in der UV- MSC-Gruppe $3,13 \pm 1,74$ (MW \pm SD) und in der Kontrollgruppe $3,5 \pm 4,07$ (MW \pm SD). In der statistischen Auswertung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen, die im T-Test ermittelten p-Werte ergaben für den berechneten Mittelwert $p = 0,92$, für die Absolutwerte $p = 0,60$.

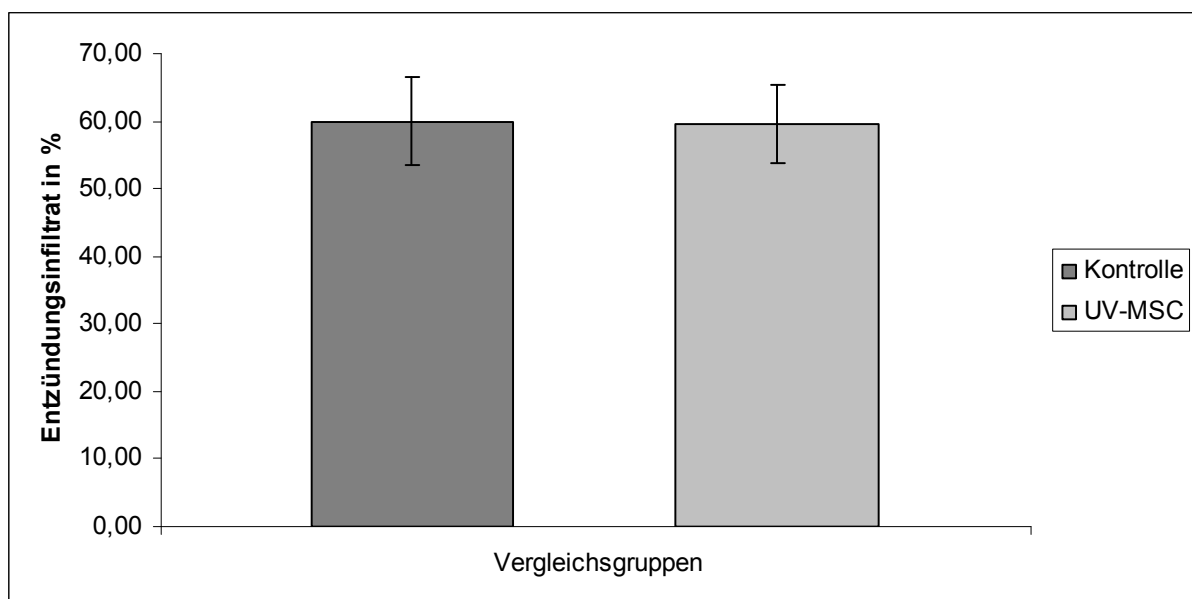
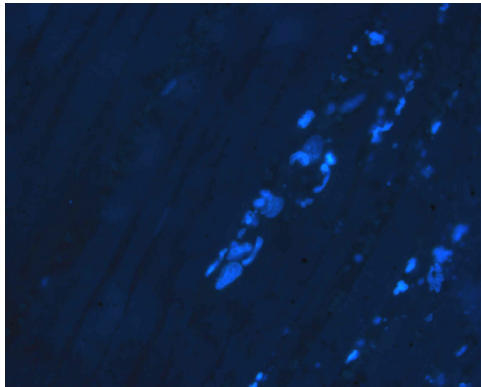


Abb.27 Dichte des CD68+ Entzündungsinfiltrates im Infarktgebiet der UV-MSC-transplantierten Ratten und der Kontrollgruppe drei Tage nachdem Infarkt (Angabe in Prozent)

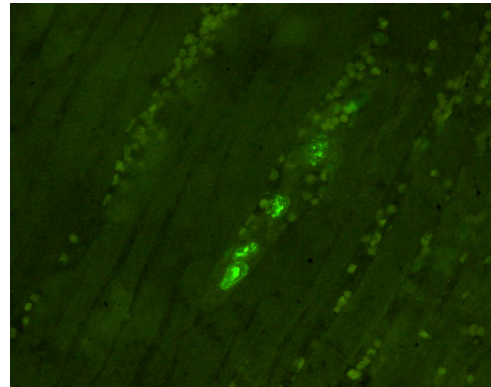
Analyse der Zellproliferation im Myokard 3 Tage nach Infarkt

Die Myokardschnitte der geopferten Tiere wurden des weiteren wie bereits beschrieben mit einem Fluorochrom-markierten Antikörper gegen das Ki67 Protein angefärbt, um die Zellproliferation, das heißt die Zahl der Ki67+ Zellen in dem für die Infarktheilung relevanten Bereich des Granulationsgewebes im zentralen Infarktgebiet und dessen Randbereich unter dem Fluoreszenzmikroskop zu beurteilen. Die folgenden Photographien zeigen repräsentativ

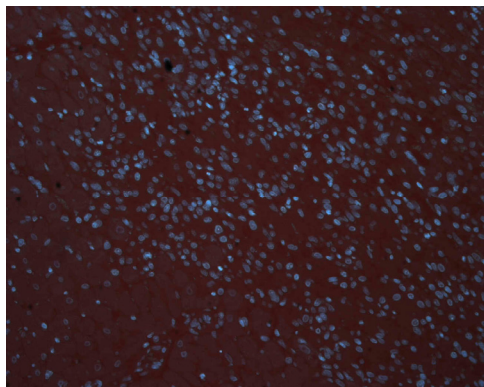
Myokardschnitte aus den untersuchten Bereichen jeweils aus Kontrollgruppe und behandelten Tieren. Es stellen sich die Ki67+ proliferierenden Zellen grün dar, die Gegenfärbung mit DAPI lässt die Kerne aller Zellen blau fluoreszieren.



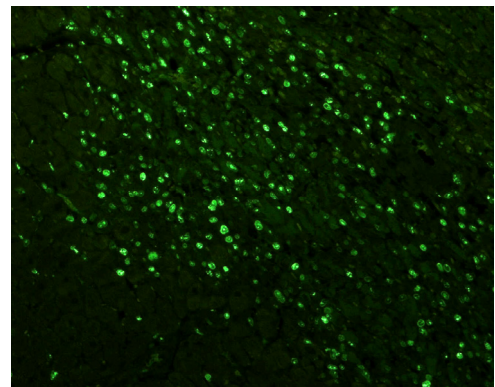
a)



b)



c)



d)

Abb.28 Ki67 Immunfluoreszenz, Myokard einer MSC transplantierten Ratte 3 Tage nach Infarkt

- in a), c) blaue Fluoreszenz aller der Zellen durch Anfärbung der Kerne mit DAPI
- in b), d) grüne Fluoreszenz ausschließlich der proliferierenden Zellen durch Anfärbung von Ki67
- a), b) Infarktareal (40fache Vergrößerung)
- c), d) Randbereich des Infarktes (20fache Vergrößerung)

Bei der UV-MSC-Gruppe wurden im Randbereich des Infarktes im Durchschnitt $133,0 \pm 30,1$ (MW \pm SD) proliferierende Zellen gezählt, im Infarktgebiet betrug dieser Wert $157,9 \pm 174,5$ (MW \pm SD). Die Vergleichswerte in der Kontrollgruppe waren folgende: Randbereich $198,0 \pm 82,5$ (MW \pm SD), Infarkt $148,9 \pm 203,9$ (MW \pm SD).

Zur Verdeutlichung der erhaltenen Ergebnisse dient die folgende Abbildung

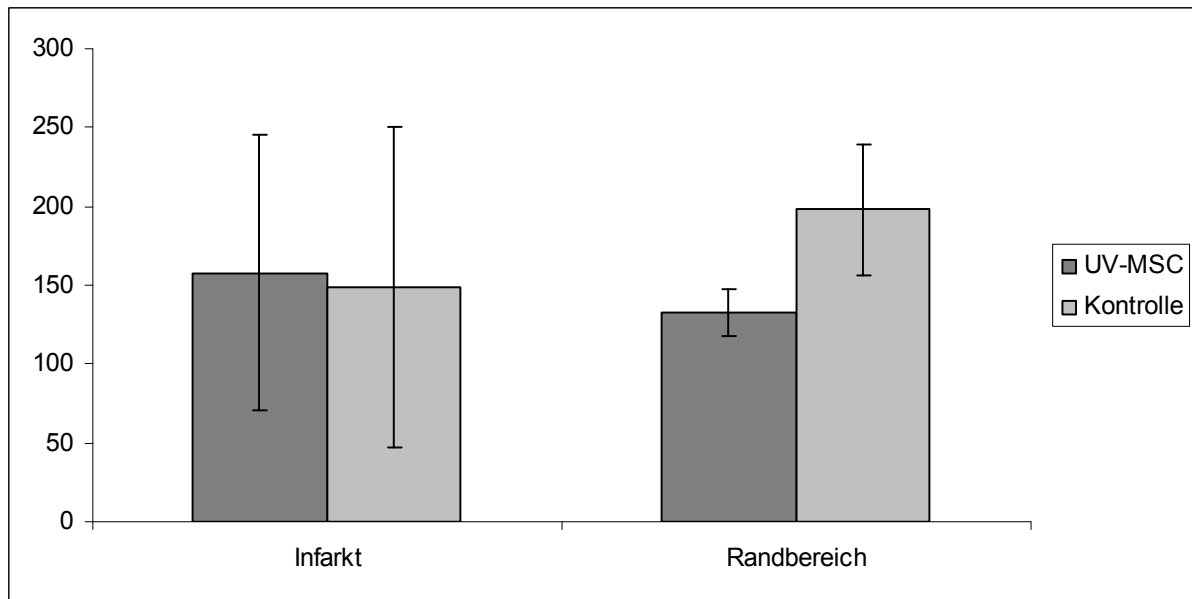


Abb.29 Proliferierende Zellen im Infarktbereich und Infarkttrandbereich, markiert durch Anfärbung des Ki67 Antigens. Vergleich von transplantierten Ratten und Kontrollgruppe 3 Tage nach dem Infarkt.

Die statistische Auswertung des Vergleichs der beiden Gruppen ergab im Infarktbereich einen p-Wert $p = 0,95$, im Randbereich lag dieser Wert bei $p = 0,13$. Die gemessenen Unterschiede der beiden Gruppen in Bezug auf die Proliferationsrate in Infarkt- und Infarkttrandbereich sind somit statistisch nicht signifikant.

3.1.2 Ergebnisse zwei Wochen nach Infarkt

Analyse der Infarktgröße zwei Wochen nach Myokardinfarkt

Anhand der mit Masson Trichrom gefärbten Myokardschnitten der zwei verglichenen Gruppen der zwei Wochen nach Infarkt geopferten Ratten (UV-MSC $n=12$, Kontrolle $n=21$) wurde die Größe des Infarktgebietes zu diesem Zeitpunkt bestimmt. Wie man auf den folgenden repräsentativen Photographien der histologischen Präparate der jeweiligen Gruppen sieht, ist der Bereich des Vorderwandinfarktes durch die blaue Anfärbung des kollagenen Bindegewebes deutlich zu erkennen. Die Auswertung erfolgte wie bereits in Material und Methoden beschrieben.

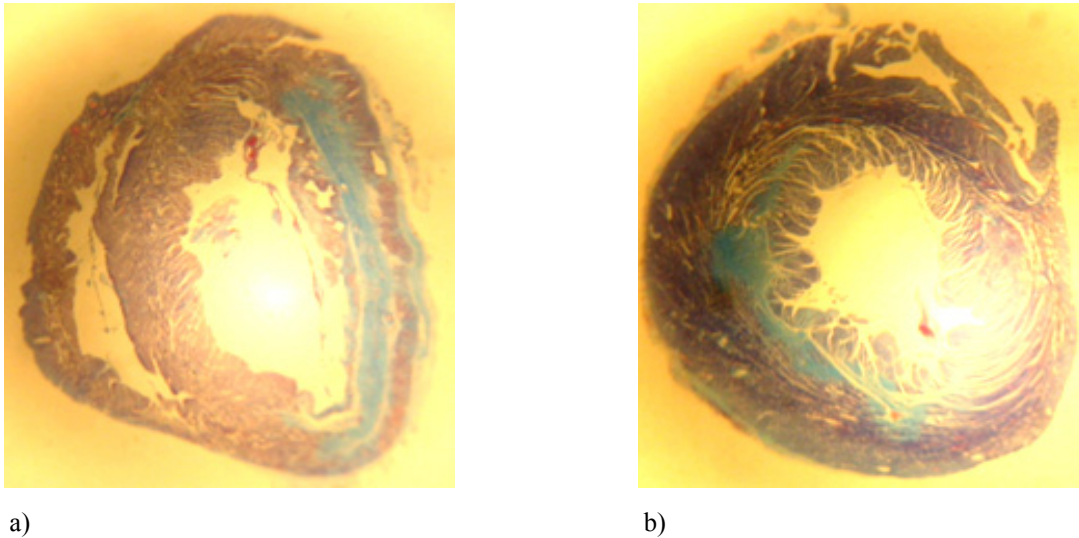


Abb.30 Masson-Trichrom-Standardfärbung des Myokards. Die kollagenen Narbe zwei Wochen nach AMI stellt sich in dieser Färbung blau dar
 a) repräsentativer Myokardschnitt einer UV-MSC transplantierten Ratte
 b) repräsentativer Myokardschnitt einer Ratte aus der Kontrollgruppe

Die Größe des Infarktes betrug in der Gruppe der Kontrolltiere durchschnittlich $0,20 \pm 0,028$ (MW \pm SD) , während die Ratten, die mesenchymale Stammzellen erhalten hatten, ein im Durchschnitt größeres Infarktareal aufwiesen mit einem Mittelwert von $0,34 \pm 0,055$ (MW \pm SD). Dieser Unterschied erwies sich jedoch statistisch als nicht signifikant. Der zugehörige p-Wert lag bei $p = 0,07$.

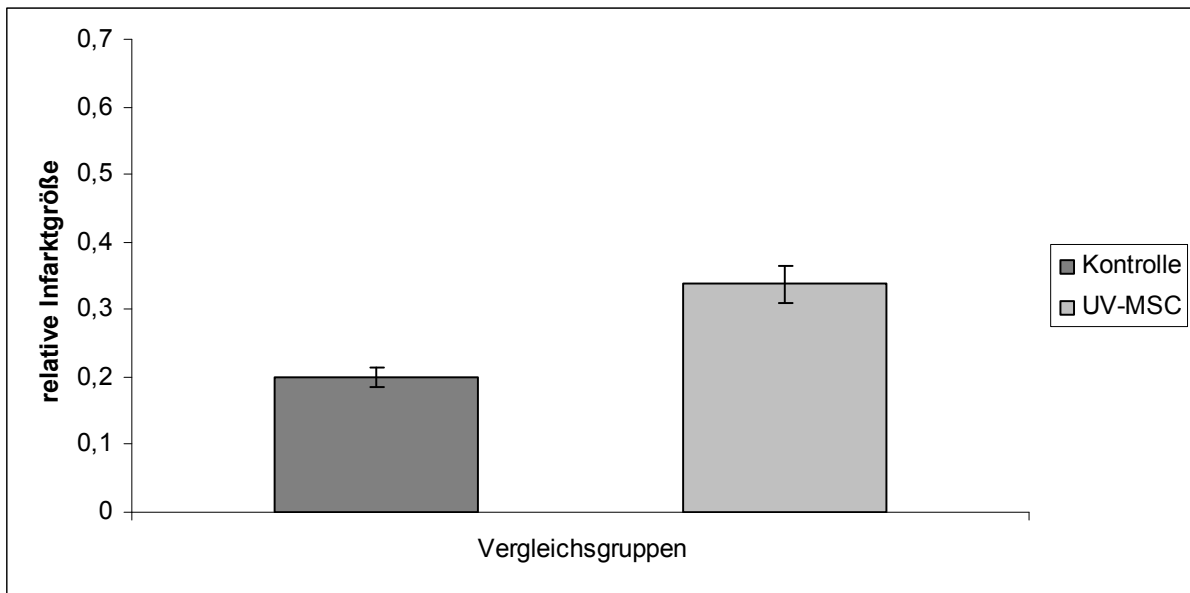


Abb.31 Vergleich der Infarktgröße der Vergleichsgruppen

Analyse der Gefäßdichte zwei Wochen nach Myokardinfarkt

Mit Hilfe der in Material und Methoden beschriebenen immunhistochemischen Anfärbung von α -smooth-muscle-cell-actin wurde in den Vergleichsgruppen der nach 2 Wochen euthanasierten Tiere (UV-MSK n=12, Kontrolle n=21) ausgewertet, wie sich zwei Wochen nach Myokardinfarkt die Gefäßversorgung des Myokards darstellt.

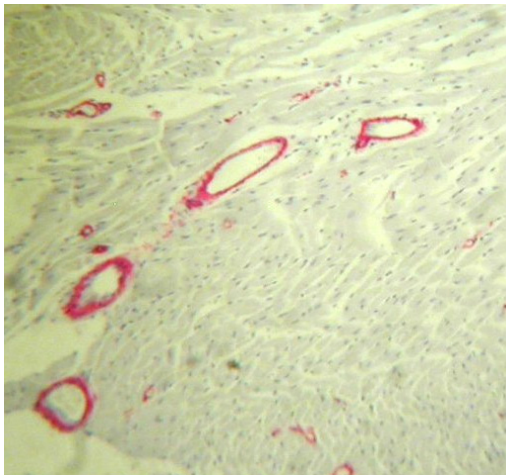


Abb.16 Immunhistochemische Anfärbung von α -smc-aktin in myokardialen Gefäßwänden zwei Wochen nach Transplantation von UV-MSK.

Sowohl bei transplantierten Tieren als auch bei der Vergleichsgruppe zeigt sich ein deutlicher Unterschied an α -smc-actin positiven Zellen im Vergleich Infarkt/Infarkttrandbereich und gesundem Myokard. Die Vaskularisation im Infarktgebiet stellte sich unabhängig von der therapeutischen Intervention folgendermaßen dar: Jeweils im Infarktbereich fand sich die größte Anzahl α -smc-actin positiver Gefäßendothelzellen, gefolgt vom Randbereich des Infarktes. Die geringste Anzahl detektierte die verwendete Software im Bereich des gesunden Myokards.

Im Infarktbereich der Kontrollgruppe konnten durchschnittlich $10,57 \pm 1,66$ (MW \pm SD) smc actin+ Zellen gezählt werden, während dieser Wert bei der behandelten Gruppe bei $9,3 \pm 2,06$ (MW \pm SD) lag. Im Randbereich des Infarktes lag der ermittelte Wert bei $4,64 \pm 0,70$ (MW \pm SD) in der Kontrollgruppe und $5,24 \pm 1,29$ (MW \pm SD) bei den UV-MSK-Tieren, im gesunden Myokard wurden im Mittel in der Kontrollgruppe $1,73 \pm 0,48$ (MW \pm SD) positive Zellen gezählt. Die Auswertung des Myokards der transplantierten Tiere ergab $3,59 \pm 0,96$ (MW \pm SD) smc actin+ Zellen.

Die folgende Abbildung veranschaulicht die Ergebnisse in den für die Infarkttheilung entscheidenden Bereichen – zentrales Infarktareal und Infarkttrand.

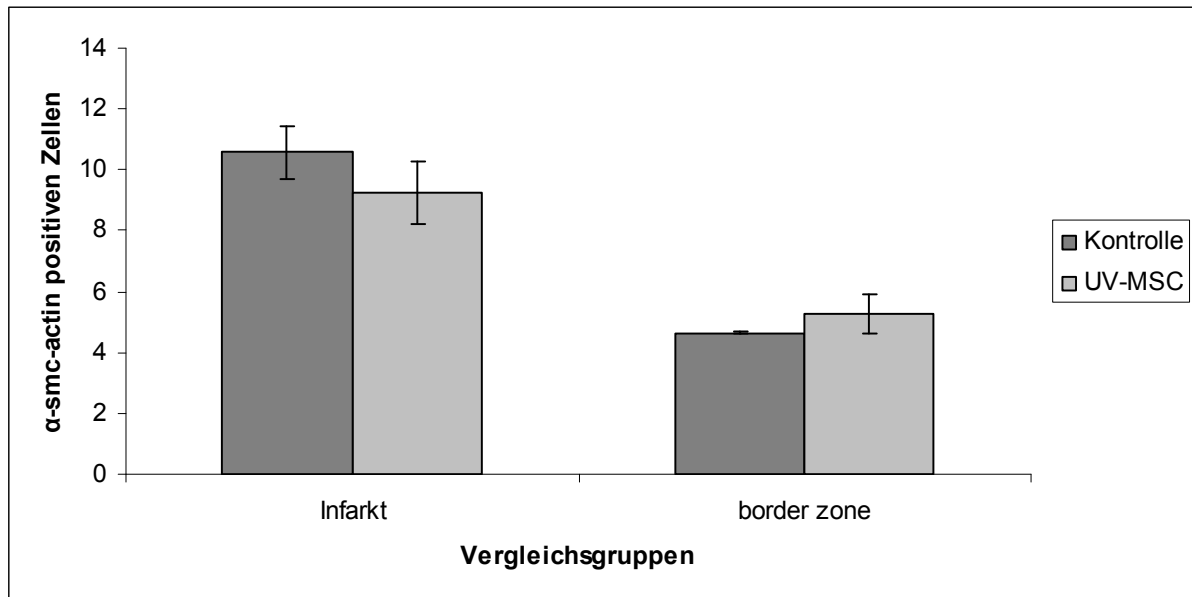


Abb.33 Vergleich der Gefäßdichte zwei Wochen nach Myokardinfarkt anhand Anfärbung der Gefäßendothelzellen mittels α -smc-actin Immunhistochemie jeweils im Infarkt und dessen Randbereich.

Statistisch waren die sich ergebenden Unterschiede in keinem der drei ausgewerteten Bereiche des Myokards statistisch signifikant. Für den Infarktbereich ergab sich ein p-Wert von $p = 0,8$, im Randbereich lag der ebenfalls bei $p = 0,8$ und im gesunden Myokard $p = 0,1$.

3.3. Zytokinexpression im Myokard nach Myokardinfarkt

Mithilfe der reversen Transkription und der daran anschließenden Real Time PCR kann der Gehalt an für ein bestimmtes Protein kodierender mRNA in einem Gewebe quantitativ bestimmt werden, und damit auf die Genexpression zu diesem Zeitpunkt rückgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurde die Expression von für diverse Zytokine kodierenden Genen in den jeweiligen Vergleichsgruppen zum einen drei Tage (Kontrolle $n=6$, UV-MSc-Gruppe $n=3$) und zum anderen zwei Wochen (Kontrolle $n=10$, UV-MSc $n=5$) nach Myokardinfarkt untersucht und semiquantitativ deren Gehalt im Infarktgebiet zu jenem im gesunden Myokard ins Verhältnis gesetzt. Gleichzeitig wird davon ausgegangen, dass die Genexpression im Myokard vor Induktion des Vorderwandinfarktes ausgeglichen ist, das heißt das Verhältnis Infarkt/gesundes Gewebe ist eins.

Die untersuchten Zytokine können nach ihrem maßgeblichen Wirkmechanismus in Gruppen eingeteilt werden, die sich natürlich gegenseitig überschneiden und zusammenspielen (für genauere Erläuterungen siehe „Diskussion der Ergebnisse“)

- 1) angiogenetische und progenitorzell-mobilisierende Wirkung
- 2) inflammatorische / chemotaktische Wirkung
- 3) Marker für apoptotischen Zelluntergang
- 4) Zellproliferation und Induktion von Hypertrophie
- 5) Remodeling

Im Einzelnen waren dies die in Material und Methoden bereits aufgeführten folgenden Zytokine

1)	2)	3)	4)	5)
CD 31 human	Gro 1	BAX	IGF II	Kollagen TypIII alpha 1
CD 31 rat	CD45	Bcl-2	SHH	TGF-β-RII
HGF				
SDF 1				

Tab.14 Untersuchte Gene und die (sich zum Teil überschneidende) Hauptwirkungen der jeweils translatierten Proteine

- 1) angiogenetische und progenitorzell-mobilisierende Wirkung
- 2) inflammatorische / chemotaktische Wirkung
- 3) Marker für apoptotischen Zelluntergang
- 4) Zellproliferation und Hypertrophie
- 5) Remodeling

Drei Tage nach Myokardinfarkt wurde sowohl in der UV-MSK Gruppe als auch in der Vergleichsgruppe eine signifikant erhöhte mRNA Konzentration von CD 31 rat und IGF II im Infarktareal im Vergleich zum gesunden Myokard gemessen.

Für das Zytokin IGF II ergab sich in der UV-MSK-Gruppe ein statistisch signifikant erhöhter Wert von $1,56:1 \pm 1,70$ (MW \pm SD, p-Wert 0,01), in der Vergleichsgruppe lag das ebenfalls statistisch signifikant erhöhte Verhältnis bei MW/SD $1,56:1 \pm 0,53$ (MW \pm SD, p-Wert 0,03).

Die Genexpressionsanalyse von CD31 rat ergab in der UV-MSK Gruppe einen Wert $1,06:1 \pm 0,25$ (MW \pm SD), in der Kontrollgruppe zeigte sich ebenso eine erhöhte Expression im Infarktareal mit einem Ergebnis $1,45:1 \pm 0,44$ (MW \pm SD). Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test geprüft und ergab in der UV-MSK-Gruppe einen p-Wert 0,06 und somit einen statistischen Trend und in der Vergleichsgruppe eine statistisch signifikant verstärkte Expression mit einem p-Wert von 0,03.

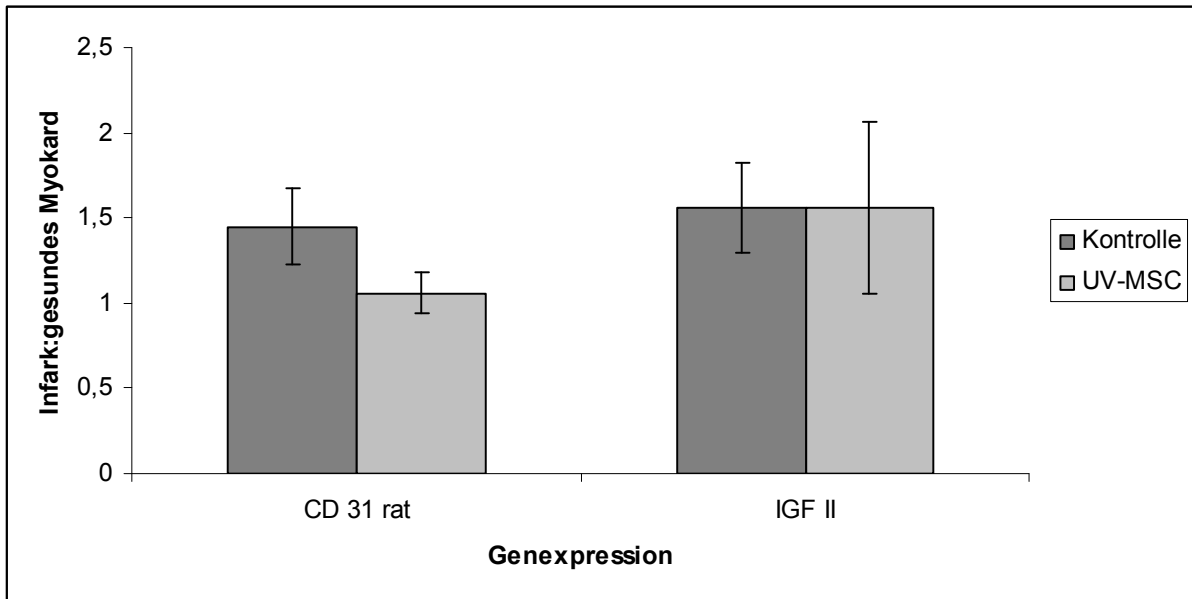
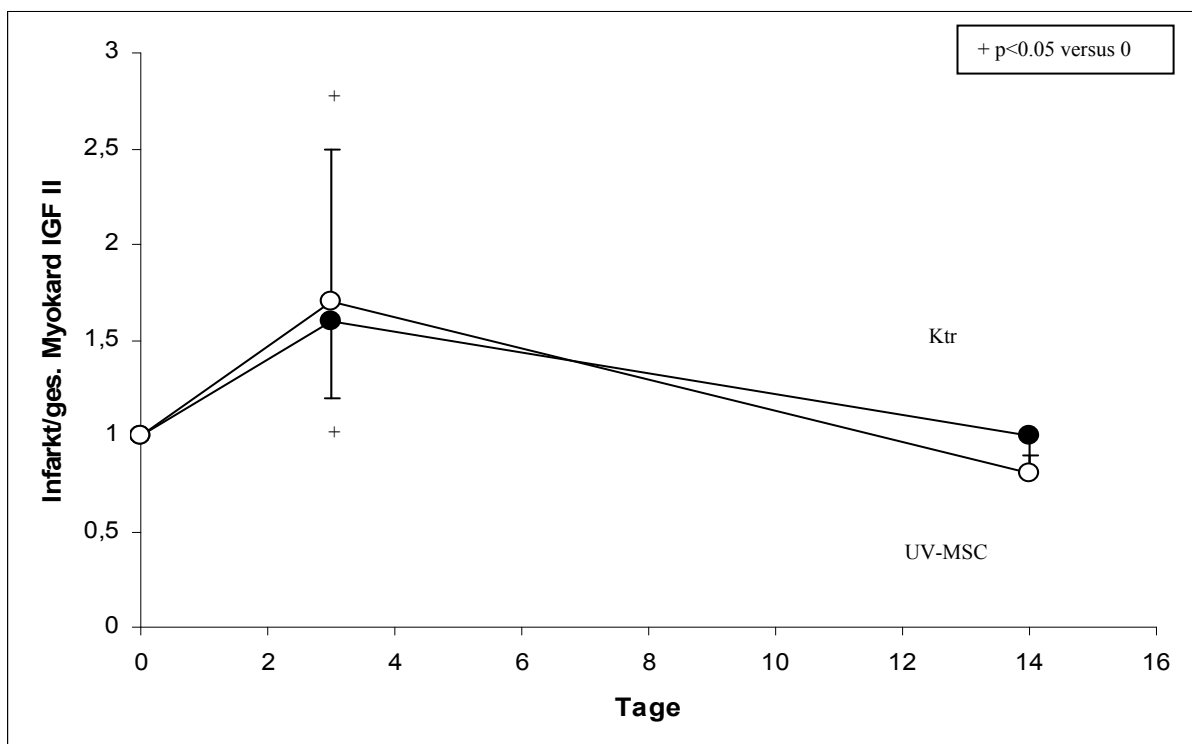
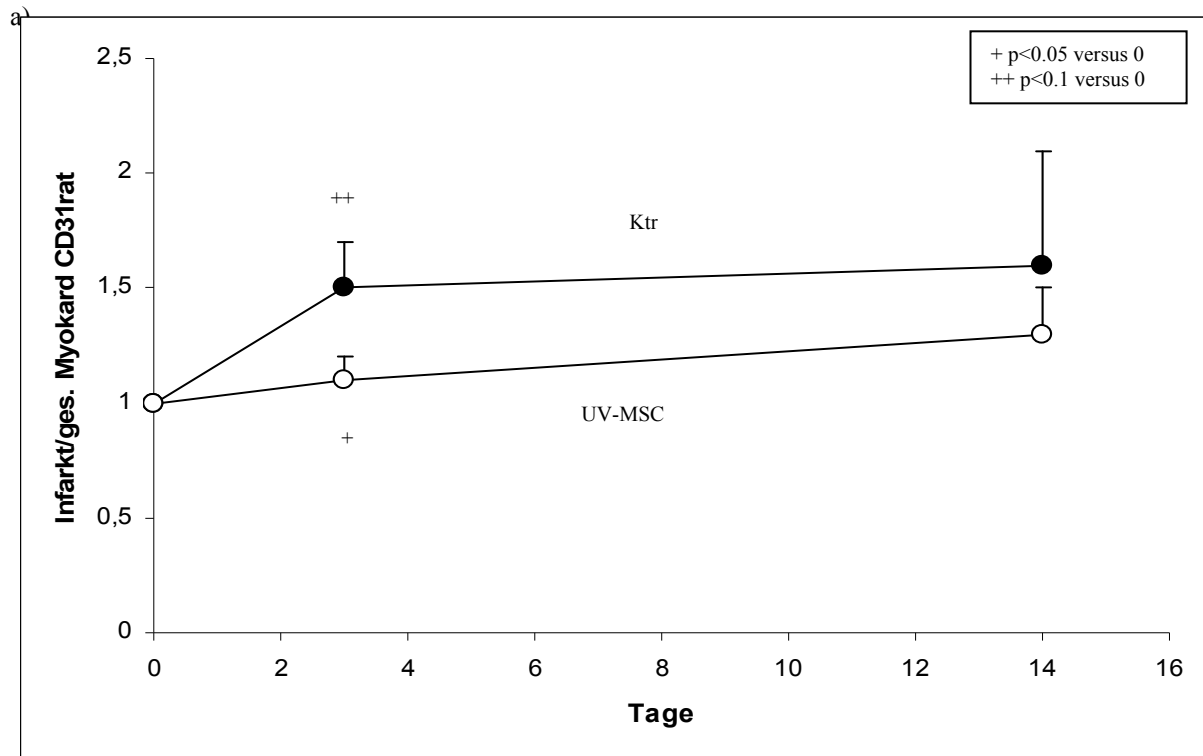


Abb.34 Genexpression von CD 31 rat und IGF II drei Tage nach Myokardinfarkt. Die dargestellten Werte geben das Verhältnis der absoluten mRNA Konzentrationen dieser Zytokine im Infarktbereich verglichen mit dem gesunden Myokard an.

Im weiteren Zeitverlauf nach 14 Tagen zeigt IGF II in beiden Vergleichsgruppen im Infarktareal wieder abfallende Werte: Der in der Transplantatgruppe ermittelte Wert lag bei $1,26:1\pm 0,5$ (MW \pm SD), in der Kontrollgruppe bei (MW \pm SD) $1,01:1\pm 0,9$. Beide Werte zeigen statistisch weder gegenüber dem Ausgangswert 1:1 an Tag 0 noch gegenüber dem Wert an Tag 3 statistische Signifikanz. Die folgenden Abbildungen illustrieren den Zeitverlauf der Genexpression von IGFII und CD31 rat.





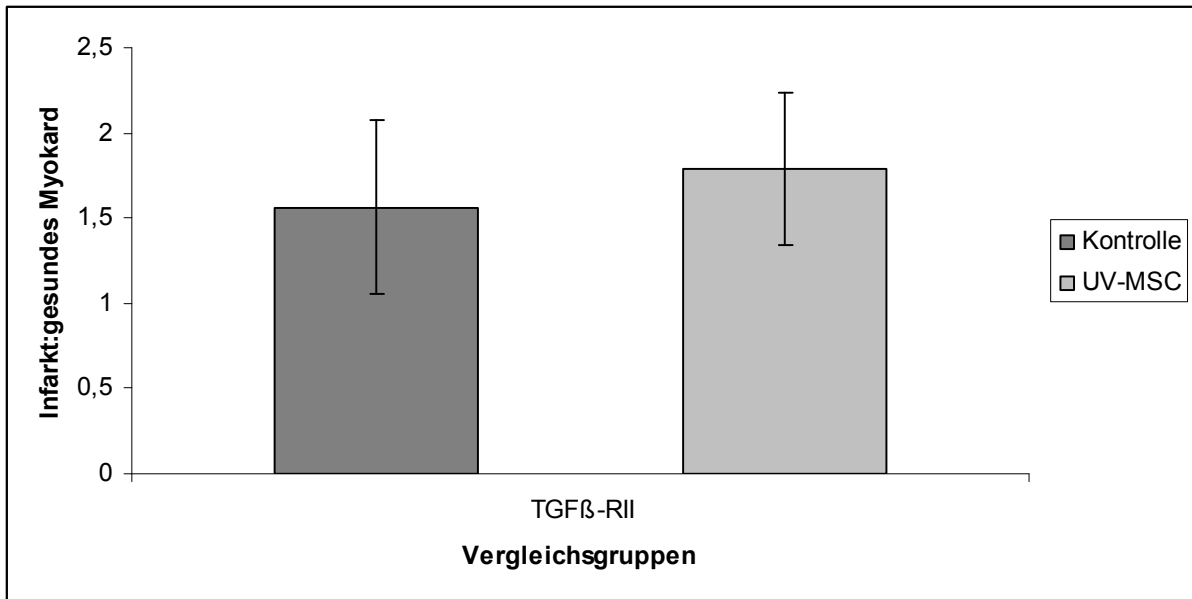
b)
 Abb. 35 Zeitverlauf der Expression von IGFII und CD31rat in den Vergleichgruppen. Dargestellt ist das Verhältnis der mRNA Konzentrationen in Infarktbereich und gesundem Myokard.

- a) IGF II
- b) CD31rat

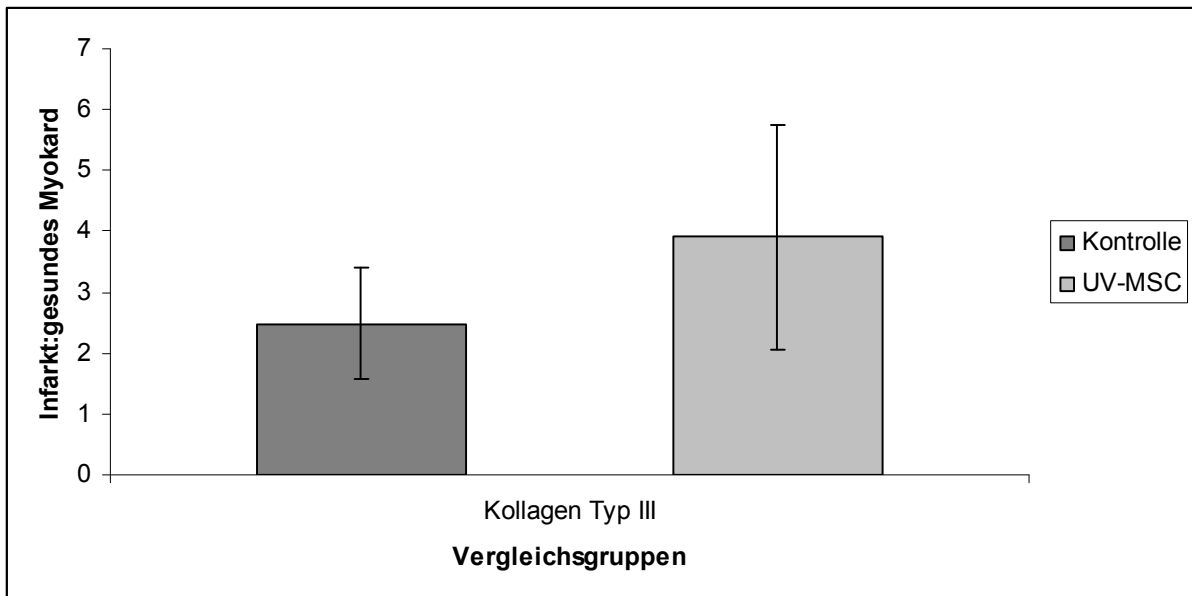
In der Genexpressionsanalyse zwei Wochen nach Myokardinfarkt zeigten zwei weitere Gene eine statistisch relevant verstärkte Expression im Infarktareal, die sowohl in der Gruppe der UV-MSC transplantierten Tiere als auch in der Gruppe der Kontrolltiere nachweisbar war: TGF β -TypII-Rezeptor und Kollagen Typ III alpha 1.

Das ermittelte Expressionsverhältnis Infarkt:gesundes Myokard von TGF- β -RII ergab in der UV-MSC-Gruppe 1,79:1 \pm 1,03 (MW \pm SD), in der Kontrollgruppe 1,56:1 \pm 0,89 (MW \pm SD). Die Auswertung mittels T-Test ergab einen p-Wert p=0,09 in beiden Vergleichsgruppen, so dass hier in beiden Gruppen eine statistischer Trend vorliegt.

Auch die Konzentration der Kollagen III alpha 1 mRNA war im Infarktbereich der untersuchten Herzen im Vergleich zum gesunden Myokard in beiden Gruppen stark erhöht. In der Gruppe der transplantierten Ratten wurde eine Verhältnis 3,91:1 \pm 3,669 (MW \pm SD) ermittelt, in der Kontrollgruppe lag dieses bei 2,48:1 \pm 1,84 (MW \pm SD). In beiden Gruppen ist dieses Ergebnis mit einem p-Wert p=0,03 in der UV-MSC und p=0,01 in der Kontrollgruppe statistisch signifikant.



a)



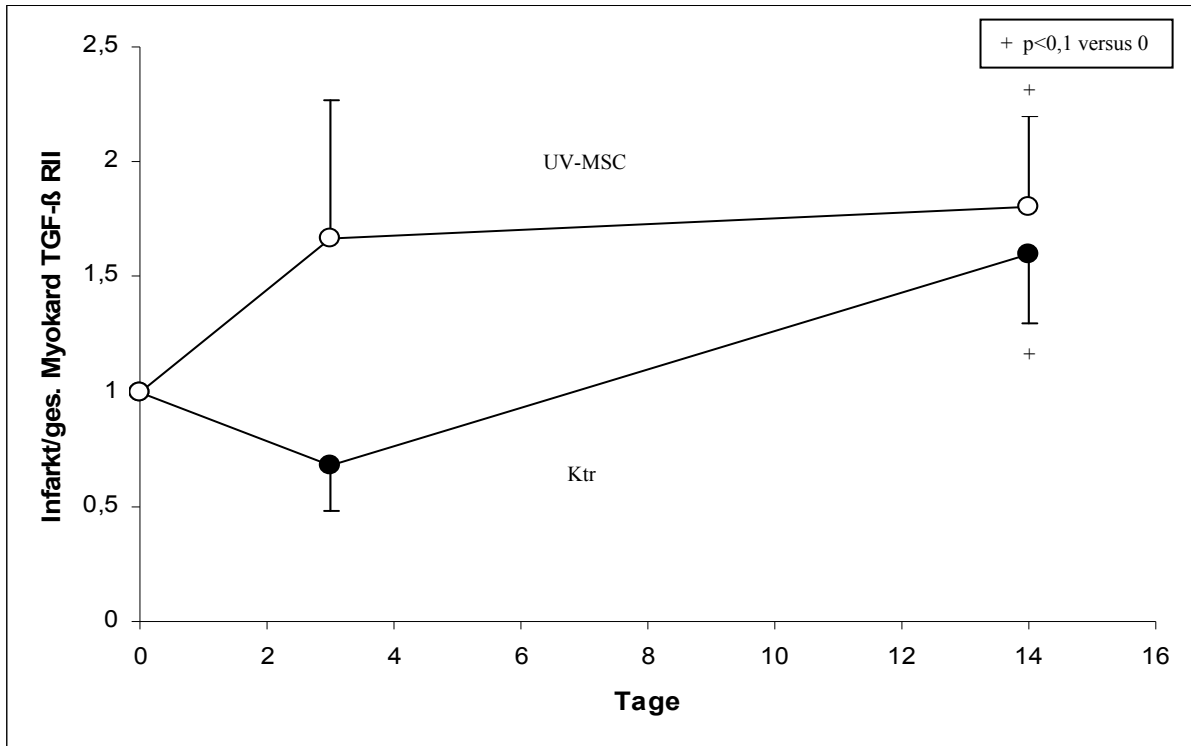
b)

Abb.36 Genexpression von TGFβ-RII und Kollagen III alpha 1 zwei Wochen nach Myokardinfarkt. Die dargestellten Werte geben das Verhältnis der absoluten mRNA Konzentration dieses Gens im Infarktbereich verglichen mit dem gesunden Myokard an.

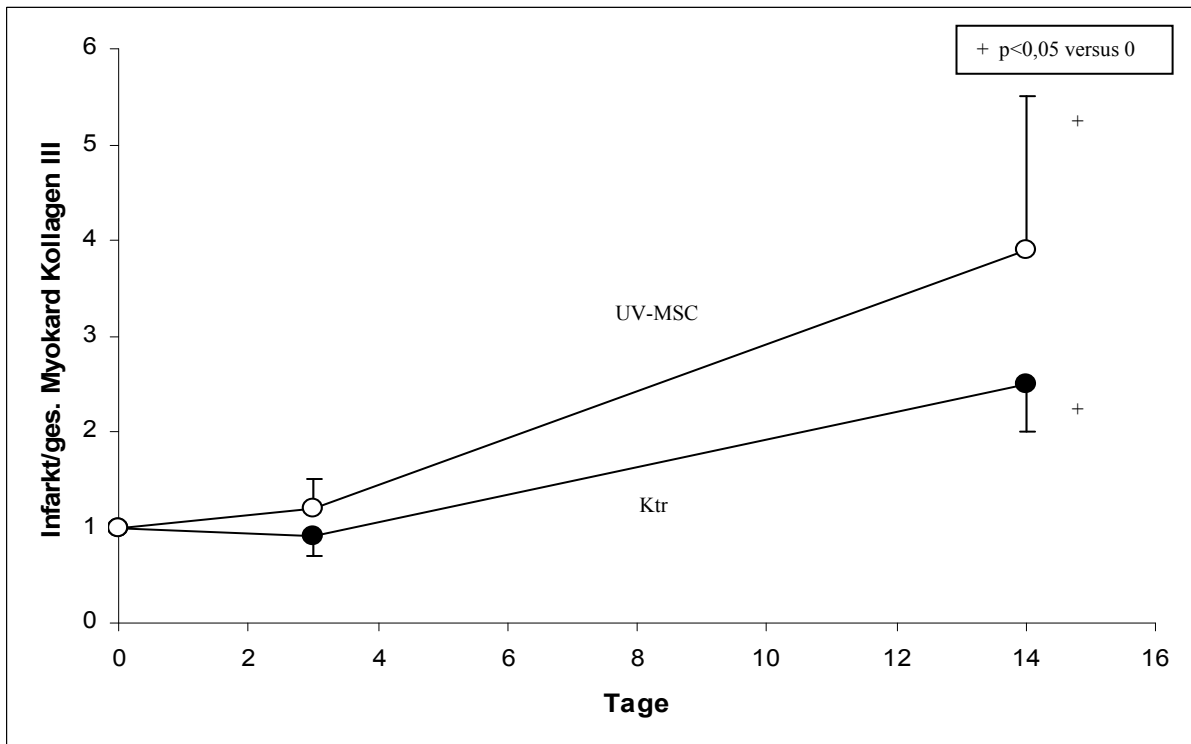
a) TGFβ-RII

b) Kollagen III alpha 1

Statistisch relevante Ergebnisse ergab für beide Gene nur die Expressionsanalyse nach 14 Tagen. Die bereits nach 3 Tagen ermittelten Unterschiede der Werte für TGFβ-RII - in der UV-MSC Gruppe $1,68:1 \pm 1,01$ (MW±SD), in der Kontrollgruppe $0,67:1 \pm 0,50$ (MW±SD) – und Kollagen III alpha 1 – in der UV-MSC-Gruppe $1,25:1 \pm 0,57$ (MW±SD), in der Kontrollgruppe $0,90:1 \pm 0,60$ (MW±SD) – sind statistisch weder gegenüber dem Ausgangswert noch gegenüber dem Wert nach 14 Tagen signifikant. Die folgende Abbildung illustriert den Zeitverlauf der Genexpression dieser beiden Proteine.



a)



b)

Abb.37 Zeitverlauf der Expression von TGF β -RII und Kollagen III alpha 1 in den Vergleichsgruppen. Dargestellt ist das Verhältnis der mRNA Konzentrationen in Infarktbereich und gesundem Myokard.

- a) TGF β -RII
- b) Kollagen III alpha 1

Die gemessenen Unterschiede der Genexpressionsanalyse der weiteren betrachteten Gene, CD31 human, HGF, SDF1, Gro1, CD45, BAX, Bcl, SHH, waren statistisch nicht signifikant.

Mittels T-Test untersucht wurde des Weiteren, ob sich statistisch signifikante Unterschiede in Bezug auf die Genexpression im Vergleich der beiden Vergleichsgruppen ergaben. Es wurde also jeweils die Expression der jeweiligen mRNA im Infarktbereich des Myokards der UV- MSC Ratten mit derjenigen im Infarktbereich der Kontrollgruppe verglichen. Analog dazu wurden die Konzentrationen im jeweiligen gesunden Myokard verglichen. Keines der untersuchten Zytokine zeigte statistisch signifikante Unterschiede. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sich die Expressionsprofile aller untersuchten Gene im Infarktbereich und im gesunden Myokard weder nach drei Tagen noch nach zwei Wochen unterscheiden.

3.5 Evaluation der myokardialen Pumpfunktion in vivo

Als wichtigster Parameter zur Bestimmung der klinischen Funktion des linken Ventrikels zwei Wochen nach Vorderwandinfarkt wurde die prozentuale linksventrikuläre Ejektionsfraktion ermittelt und die Herzen der Ratten dafür kernspintomographisch untersucht.

Im Durchschnitt lag die Auswurfleistung des linken Ventrikels der Gruppe der transplantierten Tiere (n = 9) bei 45,0 %±13,2% (MW±SD). In der Kontrollgruppe (n = 8) wurde ein Wert von 50,6 %±11,2 % (MW±SD) ermittelt.

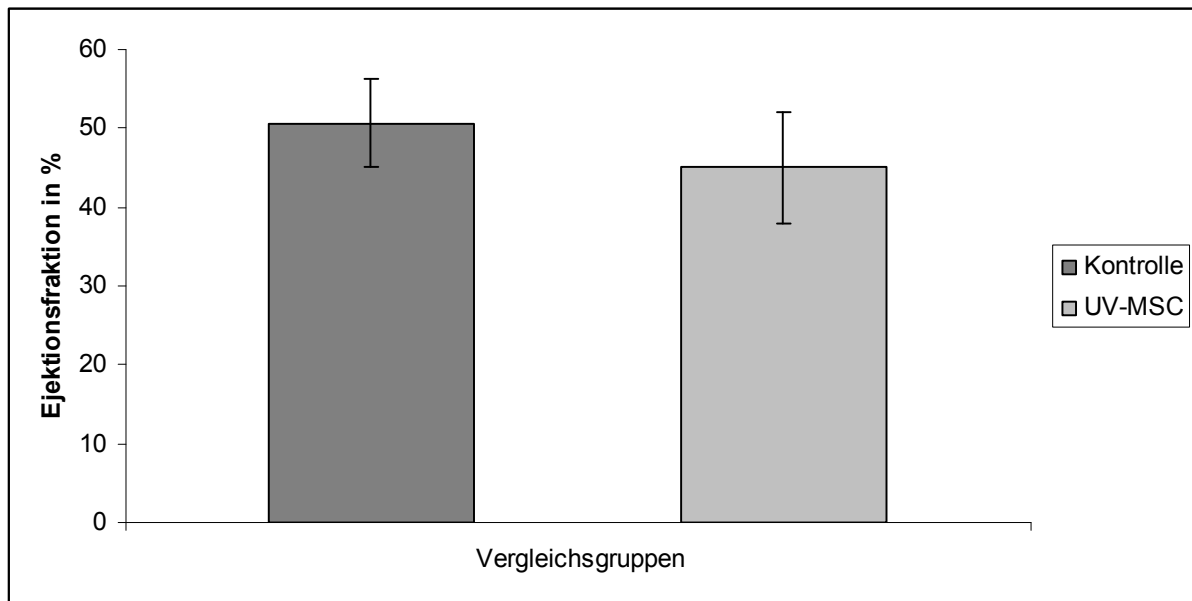


Abb. 38 LVEF der verglichenen Gruppen in der MRT

Die statistische Auswertung mittels T-Test zeigte, dass dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ist, der p-Wert betrug $p = 0,344$.

Wie beschrieben wurden weiterhin die Determinanten der LVEF bestimmt, also endsystolisches und enddiastolisches Volumen des linken Ventrikels sowie das Schlagvolumen. Die Messung ergab in der Gruppe der Ratten, die UV-MSC erhalten hatten, folgende Werte: EDV $0,35 \pm 0,18$ (MW \pm SD), ESV $0,19 \pm 0,08$ (MW \pm SD), SV $0,16 \pm 0,09$ (MW \pm SD). Für die Kontrollgruppe wurde als EDV $0,52 \pm 0,09$ (MW \pm SD) berechnet, das ESV betrug $0,33 \pm 0,09$ (MW \pm SD) und das SV $0,20 \pm 0,04$ (MW \pm SD). Analog zur globalen LVEF waren auch diese Unterschiede statistisch nicht signifikant, die jeweils ermittelten p-Werte ergaben für das EDV $p=0,40$, für das ESV $p=0,19$ und für das SV $p=0,71$.

4. DISKUSSION

4.1 Grundlegende Gliederung der Arbeit

Zu Beginn der Diskussion soll kurz auf das verwendete Myokardinfarktmodell eingegangen werden, da dieses die Basis der Versuche darstellt. Wie in Material und Methoden ausführlich beschrieben, wurde von unserer Arbeitsgruppe ein Ischämie-Reperfusionmodell des Myokardinfarktes gewählt, bei dem zunächst die LAD der Versuchstiere für 30min okkludiert und dann wiedereröffnet wurde. Das ischämische Areal wurde zunächst visuell beurteilt und es wurden nur die Tiere mit einem makroskopisch vergleichbar großen Infarkt in die weitere Untersuchung einbezogen. Die Transplantation (UV-MSK in der Untersuchungsgruppe versus PBS-Medium in der Kontrollgruppe) wurde anschließend in der frühen Reperfusionsphase durchgeführt. Zur Vermeidung von Manipulationen und systematischen Fehlern erfolgte die Transplantation geblendet, so dass der Operateur nicht wusste, welche Suspension injiziert wurde.

Der Wahl dieses Modells gingen Vorversuche zum Vergleich von Reperfusionmodell und permanenter Ligatur in unserer Arbeitsgruppe voraus. (Weidl E., 2007, Kühnel S., 2007) Das Reperfusionmodell hat im Vergleich zu einer permanenten Ligatur den Nachteil, dass sich vier Wochen nach dem Infarkt relativ kleine Infarkte ergeben. 30min Ligaturzeit sind jedoch ausreichend, um eine ischämische Nekrose der Kardiomyozyten und damit einen Infarkt hervorzurufen. Weiterhin entspricht das Reperfusionmodell eher der klinischen Realität als die permanente Okklusion, da als Goldstandard der Therapie die Revaskularisation mittels PTCA und Stenting oder Lyse angewendet wird und daher mittlerweile die meisten Infarkte revaskularisiert werden (Wayman et al, 2003). Das Reperfusionmodell erschien uns daher als das für das Ziel der Untersuchung – die Darstellung der Auswirkung der Transplantation der UV-MSK und deren eventuelle spätere tatsächliche klinische Anwendung – als das geeignetere Modell. Ein weiterer Vorteil ist ebenso die weitaus geringere Mortalität der Versuchstiere bei Anwendung des Ischämie/Reperfusionmodells. Diese betrug in dieser Arbeit 8,6%. Die für die permanente Okklusion beschriebenen Werte liegen zwischen 10-50% (Ye et al, 1997, Kompa et al, 2000).

Post-operativ verstarben zwei weitere Tiere (3,4%). Eine histologische Aufarbeitung zeigte hier die Zeichen einer akuten Lungenstauung mit Hämorrhagie des Lungenparenchyms als todesursächlich. Diese Stauung entsteht durch die akute Linksherzinsuffizienz mit Rückstau des Blutes in die Lungenstrombahn als Folge des Myokardinfarktes.

Zwischen den Vergleichsgruppen bestand weder in Bezug auf die intraoperative noch auf die post-operative Mortalität ein signifikanter Unterschied, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Injektion der Zellen keinen Einfluss auf die auftretenden Komplikationen und die Sterblichkeit hat.

In dieser Arbeit wurden die UV-MSK sowie das PBS in der Kontrollgruppe direkt intramyokardial injiziert, im Gegensatz zu der häufiger angewandten intravenösen Applikation. Dieses Vorgehen erscheint jedoch sinnvoll vor dem Hintergrund, dass nach ischämischer Schädigung Perfusionsstörungen im Infarktareal - direkt durch Schwellung geschädigter Endothelzellen sowie indirekt durch Stenosierung der Gefäße durch Schwellung geschädigter Kardiomyozyten - entstehen und dadurch bei dieser Art der Applikation im Gegensatz zur direkten Injektion nur ein Teil der transplantierten Zellen im Infarktbereich ankommt. In Studien von Kawamoto A. et al 2003 mit endothelialen Progenitorzellen, in denen die unterschiedlichen Arten der Applikation verglichen wurden, war bei der direkten Injektion eine um das zwanzigfache niedrigere Zellzahl notwendig, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten (KAWAMOTO A. et al, 2003)

Um einen möglichst vollständigen Überblick über die Wirkung der transplantierten UV-MSK zu auf die verschiedenen Phasen der Infarktheilung zu erhalten, wurde die Arbeit zeitlich in zwei Teile gegliedert: Ein Teil der Ratten wurde nach drei Tage euthanasiert, das heißt, man kann zu diesem Zeitpunkt die Unterschiede zwischen beiden Gruppen am Übergang der Inflammations - in die Proliferationsphase untersuchen. Der zweite Zeitpunkt wurde nach 14 Tagen gewählt, das heißt, in der späteren Reifungsphase der Narbe. Somit erhält man die Möglichkeit, Veränderungen in Inflammations - und Proliferationsphase mit einem späteren Zeitpunkt zu vergleichen, in dem die Maturation der Narbe schon weit genug fortgeschritten ist, um den endgültigen und damit klinisch relevanten Erfolg der Therapie ausreichend beurteilen zu können.

Die Aufarbeitung selbst basierte auf drei Säulen:

a) Morphologische Darstellung des Myokards

Drei Tage nach dem Infarkt wurde das Entzündungsinfiltrat durch immunhistochemische Anfärbung der CD68-positiven Makrophagen dargestellt und die erhöhte Proliferationsaktivität von Endothelzellen, Myofibroblasten und Makrophagen im Granulationsgewebe mittels Ki67-Immunfluoreszenz nachgewiesen. Zwei Wochen nach dem Infarkt wurden zwei Parameter quantifiziert: die Infarktgröße mittels Masson Trichrom

Standardfärbung sowie die Gefäßdicke immunhistochemisch durch Markierung von α -smc-actin.

b) Charakterisierung der Genexpression im Myokard durch RT-PCR

Die mRNA-Konzentrationen der folgenden Gene wurden nach drei Tagen und nach zwei Wochen semiquantitativ gemessen:

- Angiogenese - Mobilisation von Progenitorzellen	- Chemotaxis - Inflammation	- Apoptose	- Zellproliferation - Hypertrophie	- Remodeling
CD 31 human	Gro 1	BAX	IGF II	Kollagen TypIII alpha 1
CD 31 rat	CD 45	Bcl-2	SHH	TGF- β -RII
HGF				
SDF 1				

Tab. 15 Mittels RT-PCR untersuchte Proteine und deren Funktion im Myokard

c) In vivo Bildgebung des Myokards mittels MRT Scan

Diese nach zwei Wochen vor der Euthanasierung der Ratten durchgeführte Untersuchung diente zur Beurteilung der LVEF und damit der Pumpfunktion des linken Ventrikels als aussagekräftigstem Parameter des klinischen Outcomes.

4.2 Auswirkung der Transplantation auf die Inflammationsphase der Infarktheilung

4.2.1 Histomorphologische Ergebnisse: Evaluation von Entzündungs-infiltrat und Proliferationsrate

Zur Beurteilung der Auswirkung der Transplantation auf die histopathologischen Veränderungen im Myokard im Rahmen der Inflammationsphase wurden bei den nach drei Tagen geopfert Versuchstieren wie oben kurz beschrieben, zwei Untersuchungen durchgeführt. Zum einen wurde das Entzündungsinfiltrat mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung der Makrophagen charakterisiert. Zum zweiten wurde die Proliferationsaktivität der verschiedenen Zelltypen (Myofibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen/Granulozyten, Kardiomyozyten) im zu diesem Zeitpunkt entstehenden Granulationsgewebe unter dem Immunfluoreszenzmikroskop durch Färbung des Ki67 Antigens ermittelt.

Die Darstellung des Entzündungsinfiltrates erfolgte durch immunhistochemische Anfärbung des auf Makrophagen stark exprimierten lysosomalen Antigens CD68 und die Quantifizierung der dadurch leuchtend rot angefärbten Zellen. Wie erwartet zeigt sich eine starke Infiltration von Makrophagen in das Infarktgebiet, bei Versuchstieren und Kontrolltieren ergaben sich jedoch weder im Verhältnis von Entzündung zu Infarktgröße noch im prozentualen Anteil des Entzündungsinfiltrates am infarzierten Myokard signifikante Unterschiede. Dies bedeutet vermutlich, dass die zur Rekrutierung der Entzündungszellen in das Infarktareal verantwortlichen Mechanismen, also mechanischer Stress, Aktivierung von TLR-Rezeptoren, im ischämischen Myokard und bei der Respiratory Burst Reaktion der Granulozyten entstehende Reactive Oxygen Species und Aktivierung von Komponenten des Komplementsystems (NIAN M. et al, 2004, FRANGOIANNIS N., 2008) sowie die konsekutive Chemokin- und Zytokinausschüttung durch die Transplantation der UV-MSC weder im Zeitablauf noch in ihrer Ausprägung beeinflusst werden.

Von Yano wurde 2006 eine Korrelation der Zahl an in das Infarktgebiet infiltrierenden Makrophagen mit der konsekutiven Kollagendeposition gefunden. Das Ausmaß der Myokardfibrose als Spätfolge des AMI ist damit abhängig von dem in dieser Arbeit CD68+ Makrophageninfiltrat. Somit ist zu erwarten, dass diese Folge des AMI durch UV-MSC-Transplantation im weiteren Verlauf ebenso vermutlich nicht beeinflusst werden kann. (YANO T. et al, 2006)

Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist, dass in vor kurzem publizierten Experimenten gezeigt wurde, dass BMC-Transplantation zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führt. Während die Anzahl und Kinetik der Neutrophilen im Infarkt unbeeinflusst blieb, zeigte sich zwischen Tag 3 und 7 eine erhöhte Zahl von Makrophagen. (SUN J. et al, 2009) Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten UV-MSC scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Zahl und Infiltrationskinetik der Makrophagen nach dem Myokardinfarkt zu haben.

Die Immunfluoreszenz-Färbung des Proteins Ki67 markiert diejenigen Zellen, die sich gerade in Proliferation befinden, da ausschließlich diese Zellen das Antigen exprimieren. Wie zu erwarten, finden sich in Infarktareal und Randbereich von UV-MSC-Tieren und Kontrolltieren ein hoher Anteil proliferierender Zellen. Die Proliferationsaktivität in den Vergleichsgruppen zeigt weder in Infarkt- noch im Infarkttrandbereich signifikante Unterschiede.

Bei den proliferierenden Zellen in diesen Myokardbereichen handelt es sich im Wesentlichen um Zellen des Granulationsgewebes: Makrophagen, Myofibroblasten und Endothelzellen.

Gestützt wird dies durch Literaturangaben zum Zeitverlauf des Myokardinfarktes. Angelockt durch chemotaktisch wirksame Chemokine und Zytokine (IL-1, TNF- α , IL-6) erreicht die Zahl der neutrophilen Granulozyten am 2.Tag nach AMI ein Maximum und fällt anschließend kontinuierlich ab. Beginnend ab dem 2. Tag, folgen Makrophagen und Lymphozyten, deren Zahl ab dem 4. bzw. 7. Tag wieder abfällt. Obwohl große Mengen an Neutrophilen im Infarkt nachweisbar sind, zeigen diese keine Proliferationsaktivität (MOSSER DM., 2003). Im Gegensatz dazu wurde eine Proliferation der Makrophagen (Histiozyten) nachgewiesen. Gleiches gilt für endotheliale Zellen, deren maximale Teilungsaktivität am 4. Tag nachweisbar ist. Auch die Anzahl sich in Teilung befindende Myofibroblasten steigt bis zum 4. Tag und reduziert sich anschließend wieder. (MORALES C. et al., 2002; YANG F. et al., 2002; VIRAG JI, 2003). Somit spiegeln die Ergebnisse in UV-MSC-transplantierten Ratten und Vergleichsgruppe die physiologische Entwicklung des Granulationsgewebes im postischämischen Herzmuskel wieder, die durch die UV-MSC unbeeinflusst bleiben.

Wie von Barbash anschaulich gezeigt, erwartet man sich von der Stammzell-Transplantation eine Stimulation der Angiogenese und/oder der Myogenese durch entweder Transdifferenzierung oder Rekrutierung von zirkulierenden Progenitorzellen oder kardialen Stammzellen und deren anschließende Proliferation im Myokard. Weiterhin soll die Therapie zu einer Stützung der ECM durch Proliferation und Differenzierung von Myofibroblasten führen. (BARBASH IM., 2006). Daher sollte das Myokard der UV-MSC transplantierten Tiere durch verstärkte nachweisbare Proliferationsaktivität der Endothelzellen, Progenitorzellen und Myofibroblasten im Infarktbereich – also eine verstärkten Expression von Ki67 – charakterisiert sein. Erwartet wird diese vor allem im Randbereich, da hauptsächlich hier nach BMC-Transplantation eine erhebliche Stimulation der Angiogenese gezeigt wurde. (SUN J. et al, 2009). Dass dies nicht der Fall ist, spricht dafür, dass die UV-MSC-Transplantation auch auf den Ablauf der proliferativen Phase des Infarktes – also der Phase, in der diese Vorgänge im Rahmen des Granulationsgewebes ablaufen - keinen Einfluss nehmen kann. (FRANGOIANNIS N., 2008)

4.2.2 Genexpressionsanalyse

Die Analyse der Genexpression mit Hilfe der RT-PCR ergab bei zwei untersuchten Genen signifikante Veränderungen. Sowohl die mRNA Konzentration von CD31 rat als auch von IGF II war im Infarktbereich im Vergleich zum gesunden Myokard signifikant erhöht nachweisbar.

CD31 wird in hoher Dichte an der lateralen Seite von Endothelzellen exprimiert, auf inflammatorischen und hämatopoetischen Zellen (Makrophagen/Monozyten, Neutrophile, Thrombozyten, naive T- und B-Zellen, NK-Zellen) ist es ebenfalls in geringer Dichte nachweisbar. (JACKSON DE., 2003).

Im Granulationsgewebe drei Tage nach Infarkt lässt sich, wie bereits beschrieben, eine starke Proliferationsaktivität unter anderem der Endothelzellen nachweisen. Auf deren Oberfläche findet sich CD31 in hoher Dichte, so dass dieses Molekül in der Immunhistologie ein oft genutzter Marker für Endothelzellen ist. (REN G. et al, 2002) In meiner Arbeit wurde die Genexpression von CD31 als Grundlage für die Oberflächen-Expression dieses Moleküls, und damit als Marker für die Angiogenese im Granulationsgewebe untersucht, wobei ich hier davon ausgehe, dass der größte Teil der nachgewiesenen mRNA aus proliferierenden Endothelzellen stammt. Diese Annahme stützt sich darauf, dass die weiteren stark proliferierenden Zelltypen – Myofibroblasten und Makrophagen - CD31 nicht exprimieren. (JACKSON DE., 2003) Auch in der Literatur finden sich weitere Arbeiten, die sich ebenfalls den Nachweis von CD31 mRNA als Angiogenesemarker zu Nutze machen (IWASAKI H. et al, 2006, HU C. et al, 2009).

Auf Ebene der Genexpression wurde in den beiden untersuchten Gruppen eine signifikant verstärkte Expression der CD31 mRNA im Infarktgebiet nachgewiesen. Das Verhältnis der gemessenen CD31 Konzentrationen im Infarkt gegenüber dem gesunden Herzmuskel lag bei den MSC Ratten bei 1,06 (p-Wert 0,06) und in der Kontrollgruppe bei 1,45 (p-Wert 0,03) Die hier gezeigte verstärkte CD31 Expression ist ein Prädiktor der folgenden morphologisch fassbaren Angiogenese im Granulationsgewebe des Infarktes. Da der Unterschied zwischen den verglichenen Versuchsgruppen statistisch nicht signifikant ist, scheint die Transplantation der UV-MSK keinen Einfluss auf die Revaskularisation des Myokards zu haben.

Die verstärkte Expression stimmt mit den Daten überein, die über den Verlauf der Angiogenese nach Myokardinfarkt in der Literatur zu finden sind. Die frühesten histologisch nachweisbaren Kapillaren sind im Infarktreal bereits 24h nach Ischämie zu detektieren (FRANGOIANNIS N. et al, 2002). CD 31 selbst ist kurz nach Ischämie/Reperfusion und im weiteren Verlauf 7 Tage nach dem Infarkt verstärkt in den aussprossenden Gefäßen des Granulationsgewebes exprimiert, während 28 Tage nach dem Infarkt die Expression auf ein normales Level zurückgeht (REN G. et al, 2002)

Nach Myokardinfarkt stehen drei Wirkungen des CD31 im Vordergrund:

1. Migration von Leukozyten in das Myokard

Durch homophile Interaktion der CD31-Moleküle auf Endothel und Leukozyten wird deren parazelluläre Transmigration aus den Gefäßen in das Myokard vermittelt. Auch an der transzellulärer Migration scheint CD31 beim Durchtritt durch die Basalmembran beteiligt zu sein, durch Vermittlung der Translokation des dafür benötigten Integrins $\alpha 5\beta 1$ an die Zelloberfläche von Neutrophilen (WOODFIN A. et al, 2007)

2. Migration von Endothelzellen

CD31 moduliert die Migration von Endothelzellen und ist dadurch an der Regulation der Angiogenese beteiligt. So wurde gezeigt, dass Antikörper gegen das Oberflächenmolekül zu gestörter Gefäßbildung führt. Ebenso konnte durch Antikörper Elongation und Migration von Endothelzellen reduziert werden (JACKSON DE., 2003)

3. Anti-apoptotische Wirkung

CD31 scheint - vermittelt über homophile CD31 Bindung an BAX - die durch BAX induzierte Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien verhindern zu können, und dadurch eine anti-apoptotische Wirkung zu besitzen (WOODFIN A. et al, 2007)

Die verschiedenen durch Ligandenbindung an CD31 vermittelten Effekte werden wie beschrieben durch homophile Bindung von CD31 oder heterophile Bindung anderer Liganden, u.a. Integrin $\alpha 5\beta 3$, CD38 vermittelt (JACKSON DE., 2003). Nach intrazellulärer Phosphorylierung von Tyrosin - und Serin/Threonin-Resten an sogenannten ITIMs (immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs) erfolgt die weitere Signaltransduktion über verschiedene Phosphatasen (SHP-1/2 und SHIP) und die Phospholipase C- $\gamma 1$.

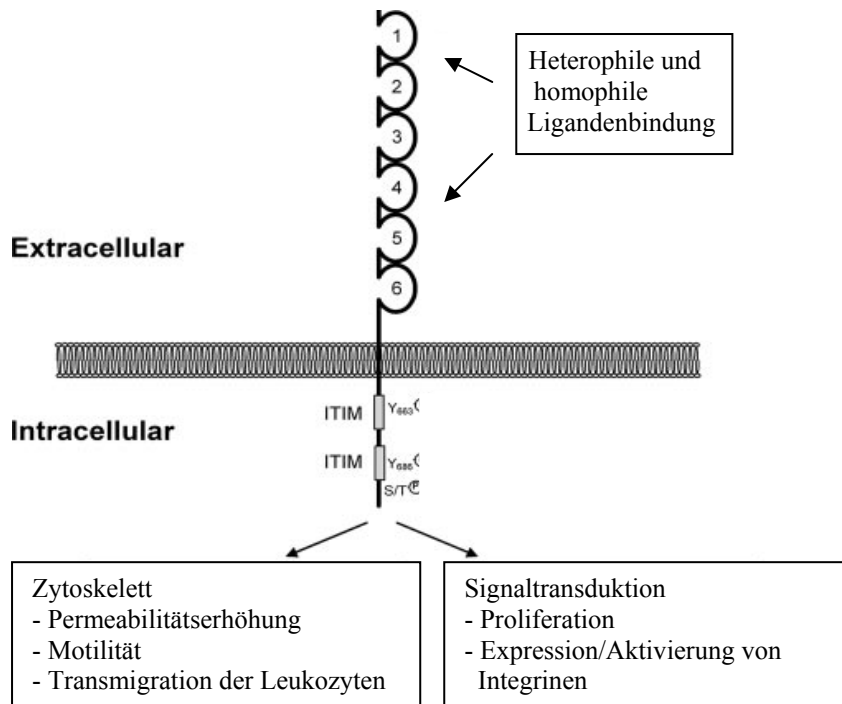


Abb. 39 CD31-vermittelte Signaltransduktion und deren Auswirkung auf Zytoskelett und intrazelluläre Signaltransduktion (modifiziert nach WOODFIN A. et al, 2007)

Auch IGF II war in beiden Gruppen im Infarktbereich drei Tage nach Infarkt in beiden untersuchten Gruppen signifikant verstärkt exprimiert. Die mRNA Konzentrationen im Infarktbereich im Vergleich zu gesundem Myokard bei UV-MSC und Kontrollgruppe lagen jeweils bei 1,56 : 1 (p-Werte 0,01 bzw. 0,03). Dieses Ergebnis wird bestätigt durch bisher durchgeführte Experimente, in denen, wie von Kluge bereits 1995, eine erhöhte Expression von IGF II im Myokard nach Okklusion der LAD und Reperfusion des entstehenden Infarktes, gezeigt wurde. Auch wiederholte kurze myokardiale Ischämiephasen führen zu einer signifikanten Erhöhung der IGF II mRNA im Myokard. In beiden Untersuchungen wurde die erhöhte Expression bereits innerhalb der ersten 3h nach Ischämie nachgewiesen. IGF II blieb im Versuchsverlauf in der Studie von Kluge et al innerhalb der folgenden 7h verstärkt nachweisbar. Über den weiteren Zeitverlauf der Expression finden sich in der Literatur keine Daten, so dass die Ergebnisse dieser Arbeit einen interessanten Hinweis darauf liefern, dass die Produktion von IGF II im weiteren Verlauf der Inflammationsphase nach dem Infarkt erhöht bleibt und anschließend im Verlauf der Proliferationsphase wieder auf ein normales Level abfällt. So zeigten sich nach 14 Tagen in der Genexpressionsanalyse weder in der Versuchs - noch in der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede im Vergleich von mRNA Level in Infarktbereich und gesundem Myokard. (KLUGE A. et al, 1995, VOGT AM. et al, 1997).

IGF II scheint im Myokard verschiedene Funktionen auszuüben:

Wie in der Einleitung beschrieben, ist es über den IGF-1-Rezeptor an der Angiogenese beteiligt und übt – durch hypertrophie-induzierende sowie anti-apoptotische Wirkung auf die überlebenden Kardiomyozyten – eine protektive Wirkung auf das Myokard aus. Auch der ECM-Turn-over wird über diesen Rezeptor beeinflusst. Via PI-3-Kinase Signaltransduktion kann die Expression der MMP2 und dadurch Degradation von Kollagen IV und Gelatin induziert werden (ZHANG D. et al, 2003, ZHANG D. et al, 2004).

Das Protein bindet an einen weiteren Rezeptor, den IGF II/M-6-P-Rezeptor. Dessen Signaltransduktion hat verschiedene Auswirkungen. 2008 wurde gezeigt, dass die Interaktion dieses Rezeptors mit IGF II nicht ausschließlich zur Degradation von IGF II führt, sondern über die Aktivierung der Protein-Kinase C/CaMK II die Hypertrophie von kardialen Zellen und die Sekretion von BNP vermittelt, sowie die Expression der MMP 9, die ebenfalls Kollagen IV und Gelatin abbaut, bewirkt. Auch über diese Proteinase ist IGF II somit am Turn-over der ECM – dem Remodeling des Myokards - beteiligt (CHU CH. et al, 2008).

4.3 Auswirkung der Transplantation auf die Proliferationsphase der Infarktheilung

4.3.1 Histomorphologische und funktionelle Ergebnisse: Evaluation von Gefäßdichte, Infarktgröße und kontraktile Funktion

Die Wirkung der Stammzelltransplantation auf die Proliferationsphase der Infarktheilung wurde mit Hilfe dreier Untersuchungen untersucht. Eine immunhistologische Anfärbung der Gefäße mittels α -smc-actin-IHC diente zur Quantifizierung der Vaskularisation des Myokards. Zur Ermittlung der Infarktgröße erfolgte eine Masson Trichrom Standardfärbung. Die funktionelle Auswirkung der entstehenden Myokardnarbe auf die kontraktile Funktion des Herzens wurde mit Hilfe der Berechnung der LVEF aus in vivo MRT Scans gezeigt.

Verstärkte Neovaskularisation nach Stammzelltherapie wurde bereits in verschiedenen Arbeiten als Ursache einer Verbesserung der Linksventrikulären Funktion erkannt (KAWAMOTO A. et al., 2001; MUROHARA T., 2001; OTT I. et al., 2005). Insbesondere da die UV-MSK durch ihr Genexpressionsprofil (siehe Punkt 1.11.2) prädestiniert scheinen, die Angiogenese zu fördern – sie sezernieren die angiogenetisch wirksamen Chemokine CXCL-1, -6, IL-8 - wurde eine Verbesserung der Revaskularisation des Myokards erwartet und die Gefäßdichte im Myokard der nach 14 Tagen geopfertten Ratten verglichen.

Im Infarktgebiet wurde in beiden Gruppen mit Werten von 10,7 bzw. 9,3 smc actin positiven Zellen in Kontrollgruppe bzw. UV-MSK-Gruppe eine im Vergleich zu Randbereich und vor allem gesundem Myokard (ermittelte Werte Randbereich 4,6 bzw. 5,2, gesundes Myokard: 1,7 bzw. 3,6) deutlich erhöhte Gefäßdichte nachgewiesen. Diese ist im „normalen“ Zeitverlauf nach dem Myokardinfarkt in der Entwicklung des Granulationsgewebes und der nachfolgenden Heilung begründet (siehe Punkt 1.6.1). Die transplantierten UV-MSK scheinen jedoch keinen Einfluss auf die Gefäßversorgung auszuüben, da sich im Vergleich der zwei Gruppen keine signifikanten Unterschiede erkennen lassen. Die transplantierten Zellen scheinen sich also weder in Endothelzellen differenzieren zu können, noch gibt es Hinweise auf eine parakrine Stimulation der Angiogenese, da auch die gemessenen angiogenetisch wirksamen Zytokine HGF, SDF1, Gro- α nicht signifikant ansteigen. Der fehlende Unterschied in der Gefäßdichte nach 14 Tagen bestätigt auch den fehlenden Unterschied in der Genexpression von CD31 nach 3 Tagen in den Vergleichsgruppen.

Seit langem ist klar, dass die Infarktgröße direkt korreliert ist mit der ventrikulären Pumpfunktion und auch dem Überleben der Patienten. (PFEFFER MA. et al, 1990) Auch die Entwicklung einer Herzinsuffizienz als Langzeitfolge des Myokardinfarktes hängt entscheidend vom Ausmaß des Verlustes an Kardiomyozyten, zunächst durch Nekrose und im weiteren Verlauf in steigendem Maße durch Apoptose, ab. (TAKEMURA G. et al, 2004)

Ein vorrangiges Ziel der Therapie muss es daher sein, den Verlust von Herzmuskelzellen, also primär die Nekrose und später den zusätzlichen apoptotischen Zelltod von Kardiomyozyten, und damit die Infarktausdehnung und das späte Remodeling zu minimieren. Die Evaluation des Erfolges kann dann auf morphologischer und auf funktioneller Ebene erfolgen: In der vorliegenden Arbeit habe ich die Infarktgröße histologisch mit Hilfe der Masson Trichrom Färbung bestimmt, wobei hier die relative Größe des Infarktes im Vergleich zum erhaltenen Myokard berechnet wurde, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Das funktionelle Outcome wurde durch die magnetresonanztomographische Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion erfasst.

Das MRT wurde gewählt, da es mittlerweile der „Gold-Standard“ der kardialen Funktionsdiagnostik ist. Es ist im Gegensatz zu der Echokardiographie unabhängig vom Untersucher und ermöglicht durch Schichtbildgebung eine genaue Darstellung des gesamten Herzens, auch des Inferobasal-Bereiches, der im Echo schlecht einzusehen ist (ORLIC D. et

al, 2002, HAZIROLAN T. et al, 2007). Vor allem bei kleinen Populationen wie in der hier vorliegenden ist das MRT dem Echo bei Weitem überlegen. (EEFTING F. et al, 2004)

Die endgültige Infarktgröße hängt zum einen ab vom Ausmaß der akuten ischämisch bedingten Kardiomyozytennekrosen. Zum zweiten kommt es in den ersten 72h zum frühen Remodeling und damit zur weiteren „Infarktexpansion“. Durch die Aktivierung von Serin-Proteasen und MMPs, sowie durch Apoptose von Kardiomyozyten – dies akzeleriert vor allem in reperfundierten Infarkten – dehnt sich der Infarkt weiter aus und die Ventrikelwand dilatiert und verschmälert sich. (EEFTING F. et al, 2004, SUTTON MG. et al, 2000)

Die Stammzelltransplantation soll durch verschiedenen Mechanismen eben diese Expansion des Infarktgebietes verhindern und so zu einer Reduktion der Infarktgröße führen. Diese konnte in verschiedenen Studien mit aus dem Knochenmark isolierten BMCs bereits nachgewiesen werden und war auch das Ziel der Transplantation der UV-MSC in dieser Arbeit. (WOLLERT KC. et al, 2005). In verschiedenen Tierversuchen wurde die Infarktgröße zusätzlich auf eine Reduktion der Apoptoserate durch parakrine Wirkung kardioprotektiver Zytokine wie die auch von mir untersuchten HGF, SDF-1 u.a zurückgeführt (GNECCHI M. et al, 2008). Eine Expansion des Infarktes soll weiterhin dadurch verhindert werden, dass die transplantierten Zellen im Infarkttrand apoptotisch werden. Sie werden durch Makrophagen phagozytiert, die wiederum dadurch zur Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie TGF- β angeregt werden und so die Inflammation und den durch inflammatorische Zellen verursachten zusätzlichen Kardiomyozytenschaden verhindern („Dying Stem Cell Hypothese“). (THUM T. et al, 2005)

Vor diesem Hintergrund wurden dementsprechend im Rahmen dieser Arbeit die sich in der Masson Trichrom Färbung nach 14 Tagen darstellenden relativen Infarktgrößen nach Transplantation von UV-MSC mit denjenigen der unbehandelten Ratten verglichen. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, und auch die Expression der kardiomyozyten-protectiven Zytokine zeigt keine Unterschiede. Damit kann ein erhoffter direkter Effekt der Stammzelltherapie durch Transdifferenzierung der UV-MSC in Kardiomyozyten, sowie ein indirekter Effekt durch zytoprotektive Zytokine oder Apoptose der UV-MSC die jeweils für sich bzw. in Kombination zu einer Verringerung der Infarktgröße führen würden, nicht gezeigt werden.

Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion in Kombination mit linksventrikulärem endsystolischem und enddiastolischem Volumen sind die messbaren Parameter der kardialen

Kontraktilität, die in Abhängigkeit von der endgültigen Infarktgröße und dem daraus entstehenden Ausmaß der Myokardnarbe abnehmen.

Ein AMI kann auf verschiedenen Wegen Einfluss auf die Pumpfunktion nehmen. Bereits 2 Minuten nach dem Infarkt führt der Verlust des aeroben Stoffwechsels zu einer Abnahme der Kontraktilität. Etwa 6 Std. nach Okklusion hat die Ischämie im gesamten von der betroffenen Koronararterie versorgten Gebiet zu einer Koagulationsnekrose der Kardiomyozyten geführt. Das Ausmaß dieser Kardiomyozytennekrosen determiniert die Infarktgröße und ist direkt proportional zum Absinken der LVEF (ROBBINS&COTRAN, 2005, PFEFFER MA. et al, 1990). Weiterhin wirken wie unter Punkt 1.4 beschrieben in der Inflammationsphase ausgeschüttete Zytokine wie TNF- α , IL-6 negativ inotrop.

Der weitere Verlauf nach Myokardinfarkt ist charakterisiert durch die späten Remodeling-Vorgänge im Myokard, die sich strukturell in progredienter Dilatation und Fibrosierung des Myokards und funktionell in progredienter kontraktiler Dysfunktion äußern (vgl. Abb.5 – Punkt 1.6.2). Diese wird zusätzlich verstärkt durch weiteren Kardiomyozytenverlust durch Apoptose von Herzmuskelzellen im subakuten Infarkt. Speziell im reperfundierten Infarkt kennt man das Phänomen des „Stunning“ des Myokards, das heißt eine reversible Dysfunktion von Herzmuskelzellen, die zwar viabel, aber nicht funktionsfähig sind, was in einer Dysfunktion der Energienutzung und der Calciumhomöostase begründet ist (DÖRGE H. et al, 1998).

Im Zusammenspiel führen die oben aufgeführten Mechanismen zur kontraktilen Dysfunktion des Myokards, das heißt zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Charakteristisch ist die folgende Veränderung der funktionellen Parameter: Endsystolisches Volumen und enddiastolisches Volumen steigen, gleichzeitig sinkt die linksventrikuläre Ejektionsfraktion ab (PFEFFER MA. et al, 1979, FLETCHER PJ. et al 1981).

Ziel der Stammzelltherapie ist es, durch Myokardprotektion sowie Beeinflussung von Kardiomyozytenmetabolismus, Neoangiogenese und Remodeling ein Absinken der LVEF und damit die Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu verhindern und gleichzeitig möglicherweise eine Regeneration des verlorenen Myokards durch parakrine Stimulation der Progenitorzell-Rekrutierung und/oder Transdifferenzierung der Stammzellen, hier also die transplantierten UV-MSK zu erreichen und dadurch die Kontraktilität des Herzmuskels zu verbessern.

Man erwartet sich somit in der UV-MSK Gruppe eine gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Ejektionsfraktion in der MRT. Leider konnte diese nicht nachgewiesen werden, so dass die Transplantation der Stammzellen zumindest 14 Tage nach dem Infarkt keine Verbesserung

der Pumpfunktion bewirken konnte. Dieses Ergebnis ist das funktionelle Korrelat zum fehlenden Therapieerfolg auf morphologischer Ebene. Dies bedeutet, dass das funktionelle Outcome in den beiden Vergleichsgruppen unabhängig von der Stammzelltransplantation ist – die UV-MSK diesen Parameter also nicht verbessern konnten.

4.3.2 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse zwei Wochen nach dem Infarkt ergab signifikante Veränderungen der mRNA Konzentrationen bei zwei der untersuchten Proteine: Sowohl TGF β -RII als auch Kollagen III alpha 1 waren im Infarktbereich gegenüber dem gesunden Myokard verstärkt exprimiert.

TGF β -RII

In der Literatur zu finden sind die folgenden Informationen über den Zeitverlauf der TGF β Expression nach AMI:

TGF β existiert in drei Isoformen, deren Wirkung über den von mir untersuchten Rezeptor vermittelt wird. Diese Isoformen zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster. Während TGF β 1 und 2 bereits 12 h nach AMI im Infarktgebiet nachweisbar sind, und nach einem Maximum an Tag drei bis über 12 Tage nach dem Infarkt abfallen, aber deutlich erhöht bleiben, steigt die TGF β 3 mRNA erstmals 6 Tage nach Infarkt und danach kontinuierlich weiter an. Die Expression ist vor allem im Randbereich des Infarktes lokalisiert und stammt aus Makrophagen und Fibroblasten. (DETEN A. et al, 2001, DEAN RG. et al, 2005)

Von mir untersucht wurde die Expression des TGF β -RII, über den im Zusammenspiel mit dem TGF-RI die Wirkung der drei TGF β Isoformen vermittelt werden (siehe Einleitung Punkt 1.4.2). Auf Ebene der Genexpression sieht man sowohl in der UV-MSK-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe einen deutlichen Trend (p-Wert jeweils 0,09): 14 Tage nach dem Infarkt steigt die mRNA von TGF β -RII im Infarktgebiet im Vergleich zum gesunden Myokard an, bei den UV-MSK-Tieren beträgt das Verhältnis Infarkt:gesundes Myokard 1,79, bei den Kontroll-Tieren 1,56, nachdem 3 Tage nach dem Infarkt noch keine Änderung des Expressionsmusters zu erkennen war.

In der Literatur finden sich zur zeitlichen Veränderung der Expression des TGF β -Typ II-Rezeptors nach AMI keine Angaben, so dass der in dieser Arbeit gezeigte Trend – der sich unabhängig von der SZ-Transplantation in beiden Vergleichsgruppen ergeben hat – ein interessantes Indiz dafür ist, dass die sich die Zellen möglicherweise an die erhöhte

Konzentration von TGF- β im Myokard in dieser Phase der Infarktheilung durch verstärkte Expression des Rezeptors anpassen. Weiterhin kann der vermehrte Nachweis der TGF- β -RII mRNA auch darauf beruhen, dass im Rahmen des Granulationsgewebes eine starke Proliferation der diesen Rezeptor exprimierenden Zellen, also inflammatorischen Zellen, Myofibroblasten und Endothelzellen, stattfindet.

Wie in der Abbildung 40 dargestellt, ist TGF- β über den untersuchten TGF-RII im Zusammenspiel mit dem TGF-RI entscheidend verantwortlich für die Suppression der Entzündungsreaktion im Myokard.

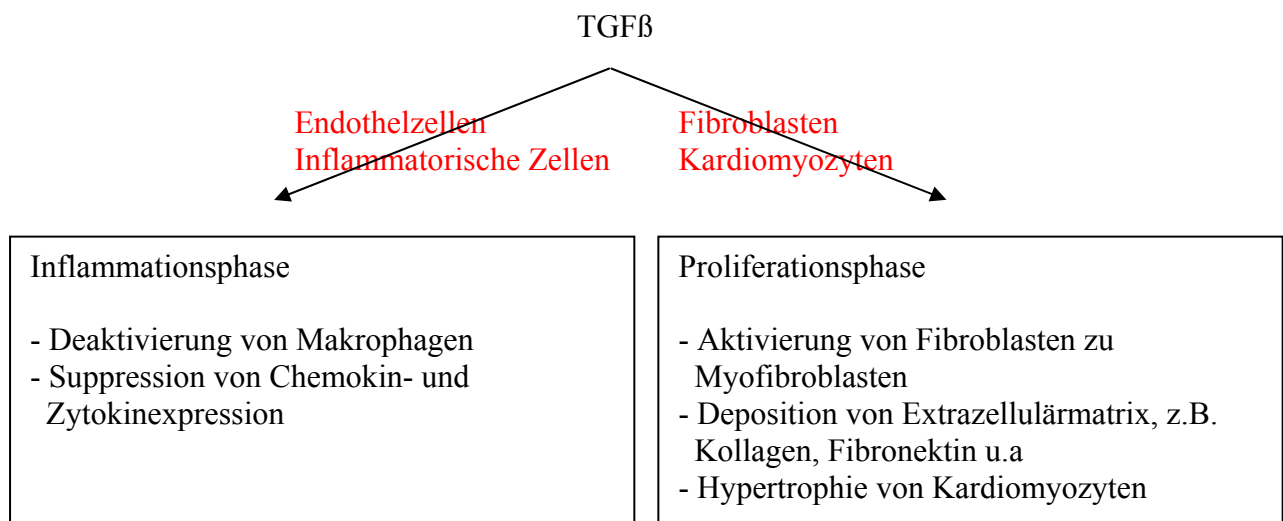


Abb.40 Pleiotrope Wirkung von TGF- β nach AMI in Inflamations- und Proliferationsphase.

Supprimiert wird die Sekretion proinflammatorischer Chemokine und Zytokine aus Makrophagen und aktivierten Endothelzellen.

Die Signaltransduktion über den TGF β -RII auf Fibroblasten und Kardiomyozyten trägt entscheidend zum pathologischen Remodeling und somit zur Entwicklung der Herzinsuffizienz nach AMI bei. Zum Einen wird in überlebenden Kardiomyozyten Hypertrophie induziert, zum Zweiten wird die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten stimuliert und damit die Synthese und Sekretion von Kollagen Typ I und III. Durch die Kollagendeposition entsteht eine progrediente Fibrosierung und konsekutive kontraktile Insuffizienz des Myokards (BUJAK M. et al, 2007).

Kollagen III alpha 1

Die Biosynthese des Kollagens im Myokard verläuft folgendermaßen: Stimuliert durch TGF- β , Angiotensin II und Endothelin I wird in Myofibroblasten und glatte Muskelzellen verstärkt Prokollagen mRNA transkribiert und an den Ribosomen in die Aminosäuresequenz des Prä-Prokollagen translatiert. Nach Abspaltung des Präpeptids und Hydroxylierung von Prolin und

Lysin-Resten bilden jeweils drei Prokollagen-Moleküle eine Triple-Helix, die in die ECM sezerniert wird. Extrazelluläre Proteasen spalten daraus Kollagen ab, das dann durch Oxidation von spezifischen Lysin und Hydroxylysin-Resten durch die Lysyl-Oxidase die fertigen Kollagen-Fibrillen ausbildet. (ROBBINS&COTRAN, SWYNGHEDAUW B., 1999)

Betroffen von der Kollagendeposition ist vor allem das Gebiet des Infarktes, aber auch im primär nichtbetroffenen Myokard lässt sich ein erhöhter Kollagen-Gehalt nachweisen. Die definitive myokardiale Narbe enthält von den 27 beim Menschen bekannten Kollagenen vor allem die fibrillären Typen I, III und V, ihr Verhältnis beträgt ungefähr 40% : 35% : 25% . Durch den vermehrten Kollagengehalt im Myokard erhöht sich die Steifheit des geschädigten Ventrikels. Dies führt zu systolischer und diastolischer Dysfunktion, die sich wie bereits oben beschrieben unter anderem in einer Verminderung der LVEF äußert.

(ROBBINS&COTRAN, 2005, SWYNGHEDAUW B., 1999, BUJAK M. et al, 2007)

Die Literaturangaben über den zeitlichen Verlauf der Genexpression sind folgende: Die Konzentration an Typ III mRNA steigt ab Tag 2, die des Typ I ab Tag 4, beide bleiben im Verlauf der Proliferationsphase nachweisbar - Typ III ungefähr drei Wochen, Typ I bis zu drei Monate. (CLEUTJENS JP. et al, 1995). Daher ist es nicht überraschend, dass auch in der vorliegenden Arbeit ein deutlicher Anstieg der Kollagen Typ III alpha 1 mRNA in den Herzen der nach 14 Tagen geopfert Tiere beider Gruppen nachzuweisen ist. Das Verhältnis Infarktbereich : gesundes Myokard der mRNA Konzentrationen lag bei den UV-MSCTieren bei 3,91 (p-Wert = 0,03) und bei den Kontrolltieren bei 2,48 (p-Wert = 0,01). Der Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant, so dass auch hier ein Einfluss der Stammzelltherapie auf die Entstehung der Narbe sowohl in Bezug auf den zeitlichen Verlauf als auch auf den Kollagen-Gehalt vermutlich ausgeschlossen werden kann. Die verstärkte Kollagen-Expression steht wie beschrieben in direktem Zusammenhang mit der ebenfalls erhöhten TGFβ-RII Expression und Signaltransduktion. Bestätigt wird der fehlende Unterschied in den zwei untersuchten Gruppen durch die in UV-MSCTieren und Kontrolltieren gleich stark ausgeprägte Verminderung der LVEF im MRT.

4.4 Die Ergebnisse im Kontext der physiologischen Infarktheilung

Ausgewertet wurde in dieser Arbeit die Auswirkung der UV-MSCT Stammzelltransplantation auf den physiologischen Verlauf der Inflammationsphase und der Proliferationsphase der Infarktheilung. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen und der Genexpressionsanalyse in der Inflammationsphase drei Tag nach der Myokardischämie

wurden ausführlich diskutiert unter Punkt 4.2. Die Diskussion der Ergebnisse der histologischen und der funktionellen Untersuchungen sowie der Genexpressionsanalyse in der Proliferationsphase findet sich unter Punkt 4.3.

Explizit sei darauf hingewiesen, dass sich in keiner der durchgeführten Untersuchungen, weder drei Tage noch 14 Tage nach dem Infarkt, signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen ergaben. Die transplantierten Zellen haben also weder einen positiven noch einen negativen Einfluss auf die Infarktheilung. Die Ergebnisse der Arbeit können daher als die physiologische Reaktion des Myokards auf ischämische Schädigung interpretiert werden.

Drei Tage nach dem Infarkt spiegeln die Infiltration von Makrophagen, dargestellt durch die immunhistochemische Anfärbung des CD68-Antigens, und die Ausbildung des Granulationsgewebes – angiogenetische Aktivität der Endothelzellen, Proliferation inflammatorischer Zellen und Differenzierung und Kollagenproduktion der Myofibroblasten, dargestellt in der Ki67-Immunfluoreszenzfärbung – den Ablauf der Inflammationsphase im Myokard wieder. Die zu diesem Zeitpunkt signifikant verstärkte Genexpression von CD31 und IGFII war ebenfalls in beiden Vergleichsgruppen nachweisbar. Es ist somit davon auszugehen, dass diese zwei Proteine im physiologischen Ablauf der Inflammationsphase unabhängig von einer Therapie – in dieser Arbeit der Transplantation der UV-MSK – vermehrt gebildet werden, was vor allem im Fall des IGFII ein interessantes Ergebnis darstellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen nach 14 Tagen bilden die physiologischen Vorgänge der Proliferationsphase ab. Die histologische Darstellung der Infarktgröße, die immunhistochemische Färbung der Gefäße und die Ermittlung der myokardialen Funktion mittels MRT ergaben im Vergleich der beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied, so dass auch zu diesem Zeitpunkt von einer physiologisch verlaufenden und von der Transplantation unabhängigen Reaktion des Herzmuskels auf den Infarkt ausgegangen werden kann. Nachgewiesen wurde bei den Untersuchungen 14 Tage nach dem Infarkt eine verstärkte Expression von Kollagen Typ III alpha 1 und des TGF β -TypII-Rezeptors. Die Änderung im Expressionsmuster dieser beiden Proteine ist somit als Folge der Infarktheilung zu interpretieren. Insbesondere die verstärkte Expression des TGF β -RII ist dabei eine bisher noch nie untersuchte physiologische Folge des AMI

4.5 Diskussion der verwendeten MSC aus dem Subendothel der Umbilikalvene

Mesenchymale Stammzellen sind für die zellbasierte Therapie ideal geeignet, da sie fähig sind, sich in verschiedene Zelllinien mesenchymalen Ursprungs (Adipozyten, Chondrozyten, Osteozyten, sowie auch Myo- und Kardiomyozyten) zu differenzieren und da sie gleichzeitig durch sezernierte Zytokine und Zell-Zell-Kontakte eine Schlüsselrolle in der Hämatopoese spielen. (DEANS RJ. et al, 2000, MINGUELL JJ. et al, 2000, PANEPUCCI R. et al, 2004).

Aus dem Knochenmark isolierte MSC konnten bereits erfolgreich in der Therapie des AMI eingesetzt werden, wobei in vivo eine Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten gezeigt werden konnte (WOLLERT KC. et al, 2005). Da, wie in der Einleitung dargestellt, die Zahl und das Differenzierungspotential dieser Zellen im Knochenmark mit steigendem Alter der Donoren und mit andauernder Kultivierung und steigender Populationszahl und damit erhöhter Zahl von Mitosen abnimmt, ist man auf der Suche nach alternativen Quellen zur Expansion von MSC. (JIANG S. et al, 2008, ROOBROUCK V. et al, 2008)

In meiner Arbeit wurden aus dem Subendothel der Umbilikalvene isolierte mesenchymale Stammzellen auf ihr Potential in der Therapie des akuten Myokardinfarktes untersucht. In Vorarbeiten von ROMANOV YA. et al, 2003, PANEPUCCI R. et al, 2004 und KALTZ N. et al, 2008 – in denen die verwendeten subendothelialen mesenchymalen Zellen nach dem gleichen Protokoll wie in der vorliegenden Arbeit isoliert wurden - wurden die UV-MSK mit „konventionellen“ mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks in Bezug auf Morphologie und Sekretion, Differenzierungspotential, Oberflächenmarker sowie Genexpressionsprofil verglichen.

- Morphologie und Sekretion:

UV-MSK zeigen in vitro eine fibroblastoide Zellform und bilden eine ECM aus Fibronectin und Typ I Kollagen. Diese zwei Proteine sind Bestandteile eines myelosupportiven Stromas, welches auch charakteristischerweise von den verglichenen MSC des Knochenmarks gebildet wird. Beide Charakteristika sprechen für UV-MSK als mesenchymale Vorläuferzellen. (ROMANOV YA. et al, 2003)

- Differenzierungspotential:

In vitro können sich UV-MSK und BM-MSK in adipozytäre und osteoblastäre Zelllinien differenzieren. Eine Expression chondrogener Oberflächenmarker konnte nur in BM-MSK erreicht werden. In vivo konnte die Differenzierungsfähigkeit der UV-MSK in adipozytäre und osteoblastäre Zelllinien - im Gegensatz zu BM-MSK – jedoch nicht bestätigt werden. Die Ursache dieser fehlenden Differenzierungsfähigkeit in vivo wurde von Kaltz N. et al in einer neuen Arbeit gefunden, die erst nach den Experimenten dieser Arbeit durchgeführt und

deshalb in unseren Überlegungen noch nicht berücksichtigt wurde. Die Studie zeigt, dass UV- MSC kein funktionsfähiges POU5F1 Protein – ein Protein, das als entscheidender Transkriptionsfaktor für die Fähigkeit der embryonalen Stammzellen zur Pluripotenz gilt - bilden und die in RT-PCR nachgewiesene mRNA von nicht funktionsfähigen Splice-Varianten stammt. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass die UV- MSC keine Pluripotenz besitzen. (KALTZ N. et al, 2008)

- Oberflächenmarker:

Die Zellen weisen den klassischen Phänotyp humaner MSC auf (CD90+, CD73+, CD105+, CD44+, CD45-) und zeigen keine Expression hämatopoetischer und/oder leukozytärer Marker. Im Vergleich mit den aus dem Knochenmark gewonnenen BM- MSC zeigen die Zellen eine Expression von N-CAM bei fehlender Expression von VCAM-1. (ROCHE S. et al, 2009)

- Genexpressionsprofil:

In der Arbeit von Panepucci zeigte sich, dass die Genexpressionsprofile der zwei Zelllinien sehr ähnlich sind. Nur 0,8% der von UV- MSC exprimierten Gene finden sich nicht in den BM- MSC, umgekehrt sind es 2,7%. Die gefundenen Unterschiede scheinen sogar einen Einsatz der UV- MSC gegenüber den BM- MSC zu favorisieren, da die Gene, die ausschließlich oder in signifikant stärkerer Ausprägung von den UV- MSC exprimiert werden, alle in Angiogenese (z.B. IL-8, Gro- α) und ECM-Remodeling (z.B. MMP-1) involviert (siehe Punkt 1.11.2). (PANEPUCCI R. et al, 2004).

Zusammenfassend war die Arbeitshypothese in dieser Arbeit daher, dass die UV- MSC die Revaskularisation des ischämischen Myokards durch Stimulation der Angiogenese und Verbesserung der Resolution der in der Inflammationsphase entstehenden provisorischen ECM durch Stimulation des ECM-Turn-overs verbessern können. Aufgrund ihrer vermuteten angiogenen Liniendifferenzierung erschienen die UV- MSC dafür im Vergleich zu BM- MSC als die prädestinierte Zellpopulation. Als Hauptwirkmechanismus wurde aufgrund des Genexpressionsprofils ein über parakrine Mediatoren vermittelter Effekt erwartet, so dass bei der Aufarbeitung großer Wert auf die Untersuchung der Genexpression im Myokard gelegt wurde.

In der umfangreichen Aufarbeitung der Genexpressionsanalyse zeigten sich jedoch wie bereits diskutiert keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. Eine Differenzierung in Endothelzellen und/oder Transdifferenzierung in Kardiomyozyten erschien

bereits von Beginn an eher unwahrscheinlich, da dieses Differenzierungspotential bereits in vitro nicht nachweisbar war und ließ sich auch in dieser Arbeit nicht nachweisen.

4.6 Abschließende Gesamtbewertung des Versuchsergebnisses

Die Wirkungsmechanismen der SZT, dargestellt in der Einleitung Punkt 1.10.1 sind die folgenden: Myogenese, Neoangiogenese, Sekretion von Wachstumsfaktoren, Aufbau einer stabilen ECM, Inhibition von Apoptose der Kardiomyozyten. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass durch Transplantation von UV-MSC keiner dieser Mechanismen beeinflussbar ist.

Myogenese

Neuentstehung von Kardiomyozyten kann wie in der Einleitung beschrieben auf doppeltem Wege erfolgen: Direkte Transdifferenzierung der transplantierten Stammzellen oder Proliferation endogener Vorläuferzellen nach parakriner Stimulation. Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben ist eine Transdifferenzierung der UV-MSC sehr unwahrscheinlich. Im Falle einer Induktion der endogenen Regeneration würde man im Myokard eine signifikant erhöhte Proliferationsaktivität erwarten. Mittels der Ki67-Färbung wurde gezeigt, dass dies nicht der Fall ist. Von den beschriebenen Zytokine, die zu einer Stimulation von CSC und Knochenmarks-Progenitorzellen führen, HGF, IGF-1, VEGF und bFGF, wurde die Expression von HGF untersucht.(GNECCHI M. et al, 2008) Ebenfalls betrachtet wurde die Expression von IGF-II, das über den IGF-I Rezeptor (JONES JI. et al, 1995) wirkt und daher ebenfalls vermutlich auf die endogene myokardiale Regeneration Einfluss haben kann. Zwischen den untersuchten Gruppen ergaben sich weder bei der Expression von HGF noch IGF II signifikanten Unterschiede, so dass ein Einfluss der transplantierten Zellen auf die Myogenese sehr unwahrscheinlich ist.

Neoangiogenese

Direktes Maß der myokardialen Neoangiogenese ist die Gefäßdichte, die in dieser Arbeit in der Gruppe der 14 Tage alten Tiere immunhistochemisch durch die Anfärbung von α -smc-actin bestimmt wurde. Indirekt erwarten würde man im Fall der Beeinflussung der Angiogenese auch eine Erhöhung des Ki67 Proliferationsindex im Granulationsgewebe nach 3 Tagen durch gesteigerte Proliferation von Endothelzellen und/oder eine Erhöhung der mRNA Konzentration pro-angiogenetisch wirksamer Zytokine wie VEGF, SDF1, bFGF und HGF im Infarktgebiet. (GNECCHI M. et al, 2008) Keiner dieser Parameter ist in der UV-

MSC-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verändert. Die vorrausgehende verstärkte Expression von CD31 rat war gleichzeitig in beiden Gruppen nachweisbar und spricht daher ebenfalls für einen fehlenden Einfluss der transplantierten Zellen. Man kann also davon ausgehen, dass die UV-MSC keine Verbesserung der Vaskularisation des Myokards bewirken.

Metabolismus: Expression von Wachstumsfaktoren und ECM-Turn-over

Induktion von Wachstumsfaktoren im Myokard führt zu einer verstärkten Proliferation von inflammatorischen Zellen (Makrophagen), Myofibroblasten und Endothelzellen (siehe Punkt 6. Proliferationsphase) Der fehlende Unterschied der beiden Vergleichsgruppen in Bezug auf Ki67 ist auch hier ein starkes Indiz, dass in der Gruppe der transplantierten Tiere keine verstärkte Proliferation dieser Zellen stattfindet. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass vermutlich keine verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren stattfindet und die UV-MSC damit ihre erhoffte Wirkung verfehlen. Dies zeigt auch die Analyse des Genexpressionsmuster von transplantierten Ratten und Kontrollgruppe: weder nach 3 noch nach 14 Tagen unterscheiden sich die Vergleichsgruppen in Bezug auf proliferations- und hypertrophieinduzierende Zytokine wie TGF- β und IGF-II.

Inhibition von Apoptose

Um diesen Parameter zu bewerten, wurde nach 3 und nach 14 Tagen jeweils die mRNA Konzentration des pro-apoptotischen BAX und des antiapoptotischen Bcl-2 mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Das Gleichgewicht dieser Gegenspieler spielt – wie in der Einleitung ausführlich beschrieben - eine entscheidende Rolle für Induktion und Determination der Apoptose im Myokard. Es konnten weder signifikante Änderungen innerhalb der Gruppen, noch im Gruppenvergleich festgestellt werden. Somit kann über den Einfluss der UV-MSC auf frühe und späte Apoptose im Myokard leider aus den vorliegenden Daten keine Aussage getroffen werden. Da jedoch in Bezug auf alle anderen untersuchten Parameter kein Unterschied zu erkennen war, ist eine positive Wirkung der UV-MSC-Transplantation auf die Inhibition von Apoptosen überlebender Kardiomyozyten sehr unwahrscheinlich.

Evaluation des Gesamtergebnisses durch Beurteilung der Perfusion, Kontraktilität und dem pathologischen Remodeling des Myokards

Jedwede Therapie des Myokardinfarktes, so auch die Transplantation von UV-MSC, wird unter der Zielvorstellung durchgeführt, drei Hauptparameter der Herzfunktion, dargestellt in

Abb. 12, positiv zu beeinflussen: Perfusion, Kontraktilität und Remodeling. (BARBASH IM. et al, 2006)

Durch die α -smc-actin Immunhistochemie wurde die Gefäßdichte als Maß der *Perfusion* in Infarkt, Rand und gesundem Myokard von behandelten Tieren und Kontrollgruppe nach 14 Tagen untersucht. Das Ergebnis in beiden Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede, so dass die UV-MSC – entgegen der von Panepucci aufgrund des Genexpressionsprofils vermuteten proangiogenetischen Wirkung (vgl. 1.12 Charakterisierung der verwendeten UV-MSC) – keinen Einfluss auf die Neovaskularisation in der Proliferationsphase haben. (PANEPUCCI R. et al, 2004)

Die *Kontraktilität* wurde mit Hilfe der im MRT ermittelten Ejektionsfraktion evaluiert. Auch hier zeigt sich kein Unterschied zwischen Kontrollgruppe und UV-MSC-Tieren.

Das *Remodeling* des Myokards, also Ventrikeldilatation und Myokardhypertrophie sowie Kollagendeposition, kann einerseits indirekt durch die EF bewertet werden, da wie beschrieben durch die Dilatation und die Myokardfibrose die Kontraktilität und somit die EF abnimmt. (PFEFFER MA. et al, 1979, FLETCHER PJ. et al 1981). In den Vergleichsgruppen zeigt sich jedoch kein Unterschied in der gemessenen LVEF.

Die Kollagendeposition ist die Folge verstärkter Expression von Prokollagen I und III. Sie kann somit direkt durch Quantifizierung der Expression des Prokollagens beurteilt werden, wofür in dieser Arbeit mittels RT-PCR nach 3 Tagen und nach 14 Tagen die mRNA Konzentration im Myokard untersucht wurde. Nach 14 Tagen zeigt sich in beiden Gruppen eine signifikante Erhöhung der Prokollagen-mRNA-Konzentration. Wiederum ergaben sich jedoch keine Unterschiede zwischen MSC- transplantierten Tieren und Kontrollgruppe.

Eine Abschwächung des Remodelings wurde auch gezeigt in Zusammenhang mit verminderter Expression von TGF- β (GNECCHI M. et al, 2008) im Myokard behandelter Tiere. In dieser Arbeit zeigte sich zwar ein signifikant erhöhtes Level der TGF β -RII mRNA in beiden Gruppen nach 14 Tagen, das den zu erwarteten Verlauf nach AMI abbildet, ein Vergleich der zwei Gruppen zeigt jedoch keinen Unterschied.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die Transplantation von UV-MSC keinen Einfluss auf die Hauptdeterminanten des Outcomes, Perfusion, Kontraktilität und Remodeling, hat.

Das Ergebnis der Arbeit, also die fehlende Auswirkung der Stammzelltherapie auf den Heilungsverlauf des Infarktes muss im Rahmen des Versuchsaufbaues betrachtet werden. Wie in der Einleitung dargestellt, beruht eine erfolgreiche Stammzelltherapie auf drei wesentlichen

Säulen: Frühe Transplantation, gleichzeitige Revaskularisierung und Integration der Zellen in das Myokard.

Die Transplantation fand in diesem Versuch nach Öffnung der Ligatur nach 30 min statt, also nach Beginn der Reperfusion. Die ersten zwei Bedingungen für einen positiven Effekt können also als erfüllt angesehen werden. Die Integration der Zellen in das Myokard wurde nur indirekt untersucht: Es ließ sich jedoch histologisch keine verstärkte Angiogenese -was für Transdifferenzierung der UV-MSC und/oder parakrine Stimulation der Gefäßbildung sprechen würde – nachweisen. Des Weiteren konnte die Untersuchung der Genexpression keine mRNA von humanem CD31 nachweisen, was man im Falle der Proliferation der UV-MSC erwarten würde. In Zusammenschau mit der Klinik – also der fehlenden Verbesserung der LVEF in der MRT - muss davon ausgegangen werden, dass die transplantierten Zellen aus dem Myokard ausgewaschen wurden, bevor sie sich in das Gewebe integrieren zu konnten.

4.7 Überblick über die Funktion der gemessenen Zytokine ohne signifikantes Ergebnis

Die Genexpression der im Folgenden genauer dargestellten Zytokine wurden mittels RT-PCR 3 Tage und 14 Tage nach dem AMI untersucht. Die untersuchten Zytokine wurden untersucht, da sie alle wichtigen Mediatorstoffe im Verlauf der Heilung nach Myokardinfarkt darstellen. Vermutet wurde jeweils ein Einfluss der Stammzelltherapie auf das Expressionsmuster im Vergleich von Infarktbereich und gesundem Myokard innerhalb einer Gruppe sowie auch im Vergleich von Infarktbereich und gesundem Myokard der Versuchsgruppen untereinander. Es ergaben sich jedoch weder im Vergleich von Infarktbereich zu überlebendem Myokard innerhalb der beiden Gruppen noch im Vergleich der beiden Gruppen statistisch signifikante Unterschiede.

SDF-1

SDF-1 wird im erwachsenen Herzen konstitutiv exprimiert. Nach Myokardinfarkt konnte eine Hochregulation dieser Expression gezeigt werden. Das Zytokin hat dabei, vermittelt über seinen spezifischen Rezeptor CXCR-4 auf den Zielzellen, einen positiven Einfluss auf den Verlauf nach AMI durch drei Wirkungen:

1. Aktivierung der MMP-9 führt zur Freisetzung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark, indem deren Bindung an den löslichen c-Kit-Ligand und damit an die ECM des Knochenmarks über den c-kit-Rezeptor gespalten wird

2. SDF-1 übt auf die mobilisierten CXCR-4 positiven Zellen einen chemotaktischen Reiz aus, was zu deren Migration entlang eines SDF-1 Gradienten ins geschädigte Myokard führt. Die CXCR-4/SDF-1 Achse ist somit entscheidend an Rekrutierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das geschädigte Myokard beteiligt
3. SDF-1 scheint auch Einfluss auf die Neoangiogenese im postischämischen Herzmuskel zu haben. So führte in Experimenten von Askari Überexpression von SDF-1 durch kardiale Fibroblasten in Kombination mit G-CSF Therapie zur Mobilisation von KM-Progenitorzellen zu einer deutlich erhöhten Gefäßdichte des Infarktgebietes. (VANDERFELDE S. et al, 2005, ASKARI AT. Et al, 2003)

HGF

Induziert durch proinflammatorische Mediatorstoffe wie IL-1, bFGF, PDGF wird die Expression der mRNA des Wachstumsfaktors HGF nach AMI hochreguliert und bleibt für mindestens 14 Tage erhöht im Myokard nachweisbar. Die Signaltransduktion erfolgt über den für HGF spezifischen Rezeptor c-met. Dieses Protein wirkt auf Angiogenese und Stammzell-homing sowie auch auf die Kardiomyozyten selbst:

1. HGF fördert die Angiogenese durch Erhöhung der Proliferationsaktivität von Endothelzellen über Stimulation der PI-3-Kinase und dadurch der Protein-Kinase C sowie über Stimulation der MAP-Kinase durch den aktivierten c-met Rezeptor (MORISHITA R. et al, 2002)
2. Das Protein scheint verantwortlich zu sein für die Ausbildung eines lokalen Mikromilieus, das die Haftung von Stammzellen in verschiedenen Geweben wie Knochenmark und Herzmuskel fördert. So wurde bei G-CSF behandelten Patienten eine inverse Korrelation zwischen HGF-Serumspiegel und mobilisierten Knochenmarksstammzellen festgestellt. Die Bildung solch eines adhäsiv wirksamen lokalen Umgebungsmilieu stimuliert HGF vermutlich auch im Myokard und führt damit zu verbesserter „Haftung“ und Integration mobilisierter Stammzellen im Herzmuskel (VANDERFELDE S. et al, 2005)
3. Anti-apoptotische Wirkung zeigt HGF auf Kardiomyozyten. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte ein vermehrtes Überleben von Herzmuskelzellen unter ischämischen Bedingungen nachgewiesen werden. Vermittelt wird diese Wirkung nach Ligandenbindung durch ebenfalls durch die Protein-Kinase C, die dazu führt, dass in den Kardiomyozyten verstärkt das anti-apoptotische Bcl-2 exprimiert wird (VANDERFELDE S. et al, 2005)

Bcl-2/Bax

Wie in der Einleitung unter Punkt 9 ausgeführt, spielt der apoptotischer Zelltod nach Myokardinfarkt sowohl für den akuten Zellverlust direkt nach Ischämie als Folge der Reperfusion als auch für den chronischen Zellverlust im Rahmen von Remodelingvorgängen im Myokard und dem Übergang zur chronischen Herzinsuffizienz eine Rolle. Lokalisiert wurden apoptotische Zellen in verschiedenen Arbeiten vor allem im Randbereich des Infarktes und im Bereich des Myokards, der primär nicht vom Infarkt betroffen war (LEE Y. et al, 2009).

Auch Zellen nicht myokardialen Ursprungs – Endothelzellen, Myofibroblasten, Leukozyten, Makrophagen – gehen in der subakuten Phase des Infarktes durch programmierten Zelltod unter. Dadurch wird, wie in der Einleitung erklärt, eine exzessive Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen ins Myokard verhindert, der Phänotyp der Makrophagen zur Sekretion antiinflammatorischer und profibrotischer Mediatoren (TGF- β u.a) moduliert und so die Inflamationsreaktion supprimiert. (YAOITA H. et al, 2000)

Der Ablauf der Apoptose gliedert sich in die drei Phasen: Induktion, Determination und Exekution. Im Rahmen der Determination entscheidet das intrazelluläre Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Mediatoren über die Exekution des Zelltodes, wobei eine Verschiebung hin zu den pro-apoptotischen Stimuli nicht gleichbedeutend mit Auslösung von Apoptose ist. Es macht die Zelle empfänglicher für zusätzlichen Stress und vermindert dadurch die Schwelle zur Ausführung der Exekutionsphase.

Die Ausführung der Apoptose kann in den ersten zwei Phasen durch Expression antiapoptotischer Faktoren gestoppt werden, mit Beginn der Exekutionsphase ist der Prozess irreversibel. (TAKEMURA G. et al, 2004).

Pro- und antiapoptotische Mediatorstoffe gehören einer gemeinsamen Gruppe von Proteinen an, der Familie der Bcl-2 Proteine. Vertreter sind u.a Proteine Bcl-2, Bcl-XL, Bax und Bad. Gemeinsames Strukturmerkmal dieser Moleküle ist die Bcl-2 Homology (BH-) Domäne, wobei die antiapoptotisch wirksamen Proteine wie Bcl-2, Bcl-XL vier BH-Domänen enthalten, die pro-apoptotischen wie Bax, Bak hingegen entweder eine oder drei. (LEE Y. et al, 2009) Die in der Einleitung dargestellte Abbildung zeigt die an der Entstehung eines pro- bzw. antiapoptotischen intrazellulären Milieus entscheidend beteiligten Proteine.

Wirkungsmechanismus der pro-apoptischen Proteine ist die Freisetzung von Cytochrom C und AIF aus den Mitochondrien über Öffnung spezieller Poren, die sogenannte Permeabilitätstransition. Bcl-2 und Bcl-XL wirken dem entgegen, indem die Schwelle zur Öffnung dieser Poren erhöht wird. (LEE Y. et al, 2009)

In meiner Arbeit habe ich die Expression der Proteine Bcl-2 (antiapoptisch) und Bax (proapoptisch) gemessen. Erwartet wurde, dass die Transplantation der UV-MSC zu einer verstärkten Expression von Bcl-2 und/oder Suppression von Bax und damit zu Kardioprotektion über eine Verminderung des intrazellulären Verhältnisses der pro- zu antiapoptisch wirksamen Faktoren führt. Leider konnte in keiner der Vergleichsgruppen ein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden.

Sonic Hedgehog

Sonic Hedgehog ist eines der drei beim Säugetier bekannten Mitglieder der Hedgehog Familie. Die Signaltransduktion dieser Proteine erfolgt über den Rezeptor Ptc1. Bindung des Liganden führt zur Aktivierung des Signaltransduktionsmoleküls smoothed, welches durch Regulation der Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie die Expression der Zielgene modifiziert.

Das Protein hat im Rahmen der Embryogenese entscheidenden regulatorischen Einfluss auf epithelial-mesenchymale Interaktionen bei der Ausbildung u.a des Magen-Darm-Traktes, der Lungen und des Knochen. SHH-Rezeptor-knock-out Mäuse zeigen weiterhin eine gestörte Kardiogenese.

Für meine Untersuchung entscheidend ist, dass SHH auch nach Ischämie im Myokard eine Rolle zu spielen scheint. 2005 wurde gezeigt, dass Kardiomyozyten den Ptc1 Rezeptor exprimieren und dass die Expression von SHH vier Tage nach Infarkt im Infarktgebiet in Rattenherzen hochreguliert ist. (POLA R. et al, 2001, KUSANO KF. et al, 2005)

Das Protein scheint drei Hauptfunktionen zu besitzen:

1. Induktion von Angiogenese.

SHH stimuliert die Sekretion der angiogenetischen Zytokine VEGF und Angiopoetin durch Fibroblasten. Zusätzlich führt es zur verstärkten Expression von SDF-1 und dadurch zur Rekrutierung zusätzlicher endothelialer Progenitorzellen in das Infarktgebiet. Die verbesserte Neovaskularisation bei Überexpression von SHH ist vor allem im Randgebiet des Infarktes nachweisbar.

(POLA R. et al, 2001, KUSANO KF. et al, 2005)

2. Anti-apoptotische Wirkung:

Gen-Therapie mit SHH hat einen antiapoptotischen Effekt auf Kardiomyozyten. Dieser scheint zum einen durch die verstärkte Expression von IGF-1 vermittelt zu sein, zum anderen zeigt das Protein in vitro auch eine direkte anti-apoptotische Wirkung auf die Herzmuskelzellen.

(POLA R. et al, 2001, KUSANO KF. et al, 2005)

3. Differenzierung mesenchymaler Zellen:

Gianakopoulos konnte zeigen, dass SHH in mesenchymalen Zellen zur Ausbildung kardialer Marker in mesenchymalen Zelllinien, also zur Differenzierung in Kardiomyozyten führen kann (GIANAKOPOULOS PJ. et al, 2005)

Angemerkt sei, dass SHH auch die Expression von IGF-II zu beeinflussen scheint. In vitro und in vivo wurde eine verstärkte Expression von IGF-II mRNA durch mesenchymale Zellen nach Behandlung mit bzw. Überexpression von SHH gezeigt. Auch konstitutive Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren resultiert in erhöhten IGF-II Konzentrationen. (CHAO W. et al, 2008) Leider hat sich in dieser Arbeit in der Kontrollgruppe weder nach drei noch nach 14 Tagen eine verstärkte SHH Expression nachweisen lassen, und auch die Transplantation von UV-MSK führte nicht zu der erhofften verstärkten messbaren mRNA Expression dieses Gens.

Humanes CD31

Die Transplantation der UV-MSK war auch verbunden mit der Erwartung, dass diese Zellen die Vaskularisation des Infarktgebietes durch Differenzierung in Endothelzellen verbessern könnte. Da Proliferation von Endothelzellen zu verstärkter Expression von CD31 führt, würde in diesem Fall eine erhöhte Konzentration von humaner CD31 mRNA im Myokard nachweisbar sein. Die Analyse der mRNA mittels RT-PCR konnte aber im Myokard der UV-MSK-Ratten keine Expression von humanem CD31 zeigen, so dass – vor allem in Zusammenschau mit der Gefäßdichtemessung mittels α -smc-aktin – von einem kompletten Wash-Out der Zellen aus dem Myokard ausgegangen werden muss.

CD45

CD45 ist ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche aller hämatopoetischer Zellen mit Ausnahme von reifen Thrombozyten und Erythrozyten und einiger erythrozytärer Progenitorzellen exprimiert wird. Durch seine Tyrosinphosphataseaktivität ist es an der Regulation der B- und T-Zell-Aktivierung und – Reifung und an der Signaltransduktion verschiedener Zytokine wie CXCL-4 entscheidend beteiligt.

Es wird als Marker inflammatorischer Zellen verwendet, und auch in dieser Arbeit wurde eine Alteration der mRNA Konzentration im Myokard - bedingt durch Proliferation inflammatorischer Zellen in den verschiedenen Phasen der Infarktheilung – erwartet, welche leider nicht nachzuweisen war. (DAHLKE M. et al, 2004)

Gro- α

Gro- α ist ein das ELR-Motiv tragendes CXC-Chemokin, das über Bindung an den CXCR-2 Rezeptor chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten und Monozyten ausübt und deren Aktivierung im Myokard und die folgende Produktion von ROS durch Induktion der Respiratory burst Reaktion und die Freisetzung von pro-inflammatorischen Enzymen wie Elastase – bewirkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es vor allem wegen einer weiteren wichtigen Funktion untersucht: Das Chemokin hat, ebenfalls über Bindung an den CXCR-2 Rezeptor, chemotaktische und die Proliferation stimulierende Wirkung auf Gefäßendothelzellen. Dadurch spielt es eine entscheidende Rolle in der Angiogenese und Revaskularisation des geschädigten Myokards. Es wurde durch die Transplantation der UV-MSC die Induktion einer verstärkten Expression des Chemokins erwartet, die sich jedoch, passend zu den Ergebnissen der morphologischen Untersuchungen, nicht nachweisen ließ. (BECHARA C. et al, 2007)

5. ZUSAMMENFASSUNG

Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (BM-MSK) sind in der Therapie des akuten Myokardinfarktes bereits gut untersucht. Da jedoch mit steigendem Alter der Donoren und/oder längerer Kultivierung und damit erhöhter Zahl von Mitosen die Anzahl und Differenzierungsfähigkeit der BM-MSK sinkt, ist man auf der Suche nach alternativen Quellen zur Isolation mesenchymaler Stammzellen. In der vorliegenden Arbeit wurden aus dem Subendothel von Umbilikalvenen isolierte mesenchymale Progenitorzellen (UV-MSK), die sowohl morphologisch als auch auf Ebene der Genexpression und bezüglich ihres Differenzierungspotentials starke Ähnlichkeit mit den BM-MSK aufweisen, auf ihr Potential zur Regeneration des Myokards nach akutem ischämischen Myokardinfarkt untersucht.

Der Versuchsaufbau der Arbeit war folgender: Durch Ligatur der LAD für 30min wurde im Myokard athymischer Nacktratten ein akuter Myokardinfarkt induziert. Nach Wiedereröffnung des Gefäßes und Reperfusion des Myokards erfolgte intramyokardial die Applikation von UV-MSK bzw. PBS-Medium in der Kontrollgruppe. Um anschließend einen möglichst vollständigen Überblick über die Wirkung der transplantierten Zellen auf die verschiedenen Phasen der Infarktheilung zu erhalten, wurde die Arbeit zeitlich in zwei Teile gegliedert. Ein Teil der Ratten wurde nach drei Tage euthanasiert um die therapieinduzierten Unterschiede zwischen den Gruppen am Übergang der Inflammations- in die Proliferationsphase zu untersuchen. Der zweite Zeitpunkt wurde nach 14 Tagen gewählt, das heißt, in der Reifungsphase der Narbe. Nach diesem Zeitraum ist die Maturation der Narbe weit genug fortgeschritten, um den endgültigen Erfolg der Therapie beurteilen zu können.

Die Aufarbeitung selbst basierte auf drei Säulen:

a) Morphologische Darstellung des Myokards:

Drei Tage nach dem Infarkt wurde das Entzündungsinfiltrat durch immunhistochemische Anfärbung der CD68-positiven Makrophagen dargestellt und die erhöhte Proliferationsaktivität von Endothelzellen, Myofibroblasten und Makrophagen im Granulationsgewebe mittels Ki67-Immunfluoreszenz verglichen. Zwei Wochen nach dem Infarkt wurden zwei Parameter quantifiziert: die Infarktgröße mittels Masson Trichrom Standardfärbung sowie die Gefäßdichte immunhistochemisch durch Markierung von α -smc-actin.

b) Charakterisierung der Genexpression im Myokard durch RT-PCR:

Drei Tage und zwei Wochen nach dem Infarkt wurde die Genexpression verschiedener an der Infarktheilung beteiligter Proteine untersucht.

- Angiogenese/Mobilisation von Progenitorzellen (CD31 human, CD31 ratte, HGF, SDF1)
- Chemotaxis/Inflammationsreaktion (Gro1, CD45)
- Apoptose (BAX, Bcl-2)
- Zellproliferation/Hypertrophie (IGFII, SHH)
- Remodeling (Kollagen III alpha 1, TGFβ-RII)

c) In vivo Bildgebung des Myokards mittels MRT Scan

Diese nach zwei Wochen vor der Euthanasierung der Ratten durchgeführte Untersuchung diente zur Beurteilung der LVEF und damit der Pumpfunktion des linken Ventrikels als aussagekräftigstem Parameter des klinischen Therapieerfolges.

Die Untersuchung drei Tage nach dem Infarkt diente vor allem dazu, Unterschiede im Verlauf der Entzündungsreaktion direkt nach dem Infarkt darzustellen.

Da die Zahl der Makrophagen im Infarktgebiet direkt mit der späteren Kollagendeposition im Infarktareal und damit der Pumpfunktion des betroffenen Myokards korreliert wurde mittels immunhistochemischer Anfärbung des CD68 Antigens die Anzahl dieser Zellen im Infarktgebiet quantitativ dargestellt. Im Vergleich der UV-MSK transplantierten Ratten mit der Kontrollgruppe ergaben sich in Bezug auf diesen prognostisch entscheidenden Parameter keine signifikanten Unterschiede. Ein weiterer wichtiger Parameter des Therapieerfolges ist die Quantität und die Zusammensetzung des Granulationsgewebes. Die Proliferationsaktivität der Zellen dieses Gewebes, Makrophagen, Myofibroblasten und Endothelzellen, wurde unter dem Immunfluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Darstellung des Ki67 Antigens untersucht. Untersucht wurden der zentrale Infarkt und dessen Randbereich. Es konnten in dieser Untersuchung die Ergebnisse anderer Arbeiten bestätigt und eine hohe Anzahl proliferierender Zellen in beiden untersuchten Myokardbereichen nachgewiesen werden. Der Vergleich der transplantierten Tiere mit der Kontrollgruppe ergab jedoch keine Unterschiede. Zusammenfassend scheint die Transplantation der UV-MSK somit weder den Verlauf der Entzündungsreaktion noch die Zusammensetzung und Ausprägung des Granulationsgewebes beeinflussen zu können.

Die Genexpressionsanalyse zu diesem Zeitpunkt bestätigte die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung. Im Infarktgebiet zeigte sich eine im Vergleich zum übrigen

Myokard signifikant erhöhte Transkription von zwei Genen, deren Genprodukte jeweils wichtige Funktionen im heilenden Myokard ausüben: Das signifikant verstärkt exprimierte CD31 Gen kodiert ein auf der lateralen Seite von Endothelzellen exprimiertes Protein und ist ein weithin verwendeter Marker der Angiogenese. Ebenso erhöht war die Konzentration der für das Protein IGF II kodierenden mRNA. Auch IGF II ist an der Angiogenese beteiligt - über Bindung an den IGF-1-Rezeptor. Es übt weiterhin durch hypertrophie-induzierende sowie anti-apoptotische Wirkung auf die überlebenden Kardiomyozyten eine kardioprotektive Wirkung aus. Die Expression beider Proteine war in beiden Vergleichsgruppen im Infarktareal signifikant verstärkt. Somit bestätigt sich auch auf der Ebene der Genexpression, dass die therapeutische Transplantation der UV-MSC keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion im Myokard hat.

Ziel der Untersuchung der Versuchstiere nach zwei Wochen war es, den tatsächlichen Erfolg der therapeutischen Intervention zu beurteilen.

Der klinisch entscheidende Parameter hierfür ist die verbleibende LVEF nach Ausbildung der Infarktnarbe im Myokard. Diese wurde in vivo mittels MRT Scan ermittelt. Die Basis für die verbleibende LVEF wiederum stellt die endgültige Größe der Infarktnarbe dar, die ja durch die Transplantation der UV-MSC vermindert werden sollte und daher in der Gruppe der transplantierten Tiere signifikant kleiner erwartet wurde als in der Vergleichsgruppe. In dieser Arbeit wurde das Ausmaß der myokardialen Kollagendeposition mit Hilfe der Masson Trichrom Standardfärbung quantifiziert. Da in vielen Vorarbeiten eine erhöhte Gefäßdichte im Infarktareal als ursächlich für die geringere Ausdehnung des Infarktes angesehen wurde, wurde die Vaskularisation des Myokards durch Anfärbung der Gefäße mittels α -smc-actin-Immunhistochemie ermittelt. In keinem der untersuchten Parameter ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen: Die transplantierten Tiere zeigten klinisch keine Verbesserung der LVEF. Die zugrunde liegenden morphologischen postischämischen Veränderungen im Myokard bestätigten dieses Ergebnis. Die Transplantation der UV-MSC konnte weder die Infarktgröße verringern noch die Vaskularisation entscheidend verbessern. Zusammenfassend kann daher davon ausgegangen werden, dass die UV-MSC keinen Einfluss auf den Ablauf der Proliferationsphase nach Myokardinfarkt ausüben können.

Analog zu der Untersuchung nach drei Tagen, wurde auch die myokardiale Genexpression zwei Wochen nach dem Infarkt untersucht. In beiden Vergleichsgruppen zeigte sich eine im Vergleich von Infarktareal zu nicht geschädigtem Myokard erhöhte Expression des TGF β Rezeptors TGF β -RII und von Kollagen III alpha 1. Diese Resultate bestätigen den

physiologischen Heilungsverlauf nach AMI. TGF- β bildet gewissermaßen den „Hauptschalter“ für den Übergang von der Inflammations- zur Proliferationsphase, da es einerseits die Inflammationsreaktion supprimiert und andererseits einen starken Stimulus auf Myofibroblasten zur Sekretion von Kollagen ausübt. In dieser Arbeit konnte nun in beiden Gruppen einer statistischer Trend gezeigt werden, dass post-ischämisch der Rezeptor des Proteins – TGF β -RII - verstärkt exprimiert wird, möglicherweise ein Indiz dafür, dass sich die Zellen an die erhöhte Konzentration von TGF- β im Myokard in dieser Phase der Infarktheilung durch verstärkte Expression des Rezeptors anpassen. Die im Rahmen der Proliferationsphase erwartete verstärkt nachweisbare Produktion von Kollagen III durch Myofibroblasten spiegelt die Ausbildung der endgültigen kollagenen Narbe im Myokard wieder. Auch diese Alteration der Genexpression konnte in beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ließ sich in den durchgeführten Untersuchungen weder ein positiver noch ein negativer Einfluss der transplantierten Zellen auf den Ablauf der verschiedenen Stadien der Infarktheilung und die - klinisch relevante - Pumpfunktion des post-ischämischen Myokards nachweisen. Explizit darauf hingewiesen sei, dass die gemessenen statistisch signifikant veränderten Parameter im Genexpressionsprofil jeweils in beiden Vergleichsgruppen gleichermaßen nachweisbar waren. Die Alterationen des Expressionsprofils können daher als Teil der physiologischen Heilung des ischämisch geschädigten Myokards angesehen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M
Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy
Lancet 362 (2003) 697–703

Barbash IM, Leor J
Myocardial Regeneration by Adult Stem Cells
IMAJ 8 (2006) 283–287

Battler A, Hasdai D, Goldberg I, Ohad D, Di Segni E, Bor A, Varda-Bloom N, Vered Z, Kornowski R, Lake M
Exogenous insulin-like growth factor II enhances post-infarction regional myocardial function in swine
Eur Heart J 16 (1995) 1851–1859

Bechara C, Chai H, Lin PH, Yao Q, Chen C
Growth related oncogene-alpha (GRO-a): Roles in atherosclerosis, angiogenesis and other inflammatory conditions
Med Sci Monit 13 (2007) RA87-90

Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, Morine KJ, Gardner TJ, Discher DE, Sweeney HL
Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance
Am J Physiol Heart Circ Physiol 290 (2006) H2196–H2203

Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, Mac Kay CR
Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion.
Circulation 95 (1997) 684–692

Brasier AL
The NF-KB regulatory network
Cardiovasc Toxicol 06 (2006) 111-130

Braunwald E, Kloner RA
Myocardial Reperfusion: A Double-edged Sword?
J Clin Invest 76 (1985) 1713-1719

Bujak M, Frangogiannis NG
The role of TGF- β Signaling in Myocardial Infarction and Cardiac Remodeling
Cardiovasc Res 74 (2007) 184–195

Cerquerira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, Pennell DJ, Rumberger JA, Ryan T, Verani MS
Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from Cardiac Imaging Committee of the Council of Clinical Cardiology of the American Heart Association
Circ 105 (2002) 539-542

Chao W, D'Amore PA
IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease
Cytokine Growth Factor Rev 19 (2008) 111–120

Chu CH, Tzang BS, Chen LM, Kuo CH, Cheng YC, Chen LY, Tsai FJ, Tsai CH, Kuo WW, Huang CY
IGF-II/mannose-6-phosphate receptor signaling induced cell hypertrophy and atrial natriuretic peptide/BNP expression via Galphaq interaction and protein kinase C-alpha/CaMKII activation in H9c2 cardiomyoblast cells
J Endocrinol. 197 (2008) 381-390

Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B
Structure-activity relationships of chemokines
J Leukoc Biol 57 (1995) 703–711

- Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E
Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction
J Mol Cell Cardiol 27 (1995) 1281–1292
- Conway E, Collen D, Carmeliet P
Molecular mechanisms of blood vessel growth
Cardiovasc Res 49 (2001) 507–521
- Dahlke MH, Larsen SR, Rasko JEJ, Schlitt HJ
The Biology of CD45 and its Use as a Therapeutic Target
Leuk Lymphoma 45 (2004) 229–236
- Dean RG, Balding LC, Candido R, Burns WC, Cao Z, Twigg SM
Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction
J Histochem Cytochem 53 (2005) 1245–1256
- Deans RJ, Moseley AB
Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical use
Exp Hematol 28 (2000) 875–884
- Dengler TJ, Katus HA
Stem Cell Therapy for the Infarcted Heart (“Cellular Cardiomyoplasty”)
Herz 27 (2002) 598–610
- Deten A, Hölzl A, Leicht M, Barth W, Zimmer HG
Changes in Extracellular Matrix and in Transforming Growth Factor Beta Isoforms After Coronary Artery
Ligation in Rats
J Mol Cell Cardiol 33 (2001) 1191–1207
- Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG
Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies
in rats
Cardiovasc Res 55 (2002) 329–340
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM
Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific
mitogenic stimuli
Blood 99 (2002) 3838–3843
- Dupont J, Pierre A, Froment P, Moreau C
The Insulin-like Growth Factor Axis in Cell Cycle Progression
Horm Metab Res 35 (2003) 740–750
- Eefting F, Rensing B, Wigman J, Willem Jan Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ, Doevendans PA
Role of apoptosis in reperfusion injury
Cardiovasc res 61 (2004) 414–426
- Feldser D., Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL
Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2
Cancer Res 59 (1999) 3915–3918
- Fletcher PJ Pfeffer JM
Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic
function
Circ Res 49 (1981) 618–626
- Frangogiannis NG
Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis
Inflam Res 58 (2004) 585–595

Frangogiannis NG

The immune system and cardiac repair
Pharmacol Res 58 (2008) 88-111

Frangogiannis NG, Smith WC, Entman ML

The inflammatory response in myocardial infarction
Cardiovasc res 53 (2002) 31-47

Frangogiannis NG, Lindsey ML, Michael LH, Youker KA, Bressler RB, Mendoza LH
Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion
Circulation 98 (1998) 699-710

Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW
IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury
J Immunol 165 (2000) 2798-2808

Gaballa MA, Goldman S

Ventricular Remodeling in Heart Failure
J Card Fail 8 (2002) 476-485

Ghahary A, Shen Q, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE

Induction of Transforming Growth Factor b1 by Insulin-Like Growth Factor-1 in Dermal Fibroblasts
J Cell Physiol 174 (1998) 301-309

Gianakopoulos PJ, Skerjanc IS

Hedgehog Signaling Induces Cardiomyogenesis in P19 Cells
J Biol Chem 280 (2005) 21022-21028

Glennon PE, Daddoura S, Sale EM

Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes
Circ Res 78 (1996) 954-961

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

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau V

Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy
Circ Res 103 (2008) 1204-1219

Goldhaber JJ

Free radicals enhance Na⁺/Ca²⁺ exchange in ventricular myocytes
Am J Physiol 271 (1996) H823-H833

Gustafsson AB, Gottlieb RA

Mechanisms of Apoptosis in the Heart
J Clin Immunol, 23 (2003) 447-459

Hazirolan T, Tasbas B, Dağoğlu MG, Canyığıt M, Abali G, Aytimir K, Oto A, Balkancı F

Comparison of short and long axis methods in cardiac MR imaging and echocardiography for left ventricular function
Diagn Interv Radiol 13 (2007) 33-38

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR

Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand
Cell 109 (2002) 625-637

- Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C
Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse
Development 126 (1999) 3047–3055
- Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselinght S
Cytokine mRNA Expression in Postischemic / Reperfused Myocardium
Am J Pathol 146 (1995) 419-428
- Hort W
Pathologie des akuten Herzinfarktes
Internist (Berl.) 42 (2001) 631-640
- Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, Robbins J, Lee RT
Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury
Nat Med 13 (2007) 970 –974
- Hu C, Li Z, Du Z, Zhang A, Yang D, Wu G
Human umbilical cord-derived endothelial progenitor cells promote growth cytokines-mediated neovascularization in rat myocardial infarction
Chin Med J 122 (2009) 548-555
- Huang CY, Hao LY, Buetow DE
Insulin-like growth factor-II induces hypertrophy of adult cardiomyocytes via two alternative pathways
Cell Biology International 26 (2002) 737–739
- Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, Sadamoto K, Horii M, Matsumoto T, Murasawa S, Shibata T, Suehiro S, Asahara T
Dose-Dependent Contribution of CD34-Positive Cell Transplantation to Concurrent Vasculogenesis and Cardiomyogenesis for Functional Regenerative Recovery After Myocardial Infarction
Circulation 113 (2006) 1311-1325
- Jackson DE
The unfolding tale of PECAM-1
FEBS Letters 540 (2003) 7-14
- Jiang S, Haider HK, Ahmed RPH, Idris NM, Salim A, Ashraf M
Transcriptional profiling of young and old mesenchymal stem cells in response to oxygen deprivation and reparability of the infarcted myocardium
J Mol Cell Cardiol 44(3) (2008) 582–596
- Jones JI, Clemmons DR
Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions
Endocr Rev 16 (1995) 3-34
- Kaikita K, Hayasaki T, Okuma T, Kuziel WA, Ogawa H, Takeya M
Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodelling after experimental myocardial infarction
Am J Pathol 165 (2004) 439–447
- Kaltz N, Funari A, Hippauf S, Delorme B, Noël D, Riminucci M, Jacobs VR, Häupl T, Jorgensen C, Charbord P, Peschel C, Bianco P, Oostendorp RA
In vivo osteoprogenitor potency of human stromal cells from different tissues does not correlate with expression of POU5F1 or its pseudogenes
Stem Cells 26 (2008) 2419-2424
- Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ
Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia / reperfusion injury
Int J Cardiol 86 (2002) 41–59

- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T
Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial Ischemia
Circulation 103 (2001) 634-637
- Kawamoto A, Tkebuchava T
Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia
Circulation 107(3) (2003) 461-468
- Kang JS, Liu C, Derynck R
New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function
Trends Cell Biol 19 (2009) 385-394
- Kluge A, Zimmermann R, Munkel B, Verdouw PD, Schaper J, Schaper W
Insulin-like growth factor II is an experimental stress inducible gene in a porcine model of brief coronary occlusions. *Cardiovasc Res* 29 (1995) 708-716
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S
Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function
Nature Med 7 (2001) 430
- Kompa AR, Summers RJ
Lidocaine and surgical modification reduces mortality in a rat model of cardiac failure induced by coronary artery ligation
J Pharmacol Toxicol Methods 43(3) (2000) 199-203
- Kotlyar AA, Vered Z, Goldberg I, Chouraqui P, Nas D, Fridman E, Chen-Levy Z, Fytlovich S, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Orlandi A, Savion N, Eldar M, Scheinowitz M
Insulin-like growth factor I and II preserve myocardial structure in postinfarct swine
Heart 86 (2001) 693-700
- Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, Sabbadini RA
TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca₂₊ current and Ca₂₊ transients
FEBS Lett 376 (1995) 24-30
- Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH
Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium
Circulation 3 (1997) 693-700
- Kühnel S.
Lokale Applikation von Erythropoietin und endothelialen Progenitorzellen zur Regeneration des experimentellen Myokardinfarktes der Nacktratte
2007
- Kusano KF, Pola R, Murayama T, Curry C, Kawamoto A, Iwakura A, Shintani S, Ii M, Asai J, Tkebuchava T, Thorne T, Takenaka H, Aikawa R, Goukassian D, von Samson P, Hamada H, Yoon YS, Silver M, Eaton E, Ma H, Heyd L, Kearney M, Munger W, Porter JA, Kishore R, Losordo DW
Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signalling
Nat Med 11 (2005) 1197-1204
- Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM
IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear Phagocytes
J Clin Invest 96 (1995) 2304-2310
- Lambert JM, Lopez EF, Lindsey ML
Macrophage roles following myocardial infarction
Int J Cardiol 130 (2008) 147-158

Laterveer L, Lindley IJ, Heemskerk DP, Camps JA, Pauwels EK, Willemze R
Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of interleukin-8
Blood 87 (1996) 781–788

Lee Y, Gustafsson AB
Role of apoptosis in cardiovascular disease
Apoptosis 14 (2009) 536–548

Leri A, Kajstura J, Anversa P
Cardiac Stem Cells and Mechanisms of Myocardial Regeneration
Physiol Rev 85 (2005) 1373–1416

Lim H, Zhu YZ
Role of transforming growth factor- β in the progression of heart failure
Cell Mol Life Sci 63 (2006) 2584–2596

Lindsey ML
MMP induction and inhibition in myocardial infarction
Heart Fail Rev 9 (2004) 7–19

Luster AD
Chemokines — chemotactic cytokines that mediate inflammation
N Engl J Med 338 (1998) 436–445

MacCallum DE, Hall PA
The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle
J Pathol 180 (2000) 537–544

Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Günthert U
Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans
J Cell Biol. 124 (1994) 71–82

Mamdouh Z, Chen X, Pierini LM, Maxfield FR, Muller WA
Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis
Nature 421 (2003) 748–753

Mani K
Programmed cell death in cardiac myocytes: strategies to maximize post-ischemic salvage
Heart Fail Rev 13 (2008) 193–209

Matthews KG, Devlin GP, Conaglen JV, Stuart SP, Mervyn Aitken W, Bass JJ
Changes in IGFs in cardiac tissue following myocardial infarction
J Endocrinol 163 (1999) 433–445

McGavigan AD, Maxwell PR, Dunn FG
Serological evidence of altered collagen homeostasis reflects early ventricular remodelling following acute myocardial infarction
Int J Cardiol 111 (2006) 267–274

Mehra VC, Ramgolam VS, Bender JR
Cytokines and cardiovascular disease
J Leukoc Biol 78 (2005) 805–818

Minguell JJ, Conget P, Erices A
Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells
Braz J Med Biol Res 33 (2000) 881–887

- Monden Y, Kubota T, Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T
 Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction
Am J Physiol Heart Circ Physiol 293 (2007) 743–753
- Morales C, Gonzalez GE, Rodriguez M, Bertolasi CA, Gelpi RJ
 Histopathologic time course of myocardial infarct in rabbit hearts
Cardiovasc Pathol 11 (2002) 339-345
- Morishita R, Aoki M, Yo Y, Ogihara T
 Hepatocyte growth factor as cardiovascular hormone: role of HGF in the pathogenesis of cardiovascular disease
Endocr J 49 (2002) 273-284
- Mosser D
 The many faces of macrophage activation
J Leukoc Biol 73 (2003) 209-212
- Murohara T
 Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors
Trends Cardiovasc Med 11 (2001) 303-307
- Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P
 Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling
Circ Res 94 (2004) 1543-1553
- Nourshargh S, Krombach F, Dejana E
 The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissue
J Leukoc Biol 80 (2006) 714-718
- O'Dell SD, Day INM
 Molecules in focus: Insulin-like growth factor II (IGF II)
Int J Biochem Cell Biol 30 (1998) 767-771
- Olivetti G, Quaini F, Sala R
 Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart
J Mol Cell Cardiol 28 (1996) 2005–2016
- Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S
 Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodelling
Circulation 98 (1998) 149–156
- Orlic D, Hill JM, Arai AE
 Stem cells for myocardial regeneration
Circ Res 91 (2002) 1092-1102
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P
 Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium
Nature 410 (2001) 701–705
- Ott I, Keller U, Knoedler M, Gotze KS, Doss K, Fischer P, Urbauer K, Debus G, Von Bubnoff N, Rudelius M, Schomig A, Peschel C, Oostendorp RA
 Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction
Faseb J 19 (2005) 992-994
- Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, Covas DT, Zago MA
 Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells
Stem cells 22 (2004) 1263-1278

- Pfeffer MA, Braunwald E
Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications
Circulation 81 (1990) 1161-1172
- Pfeffer MA, Pfeffer JM
Myocardial infarct size and ventricular function in rats
Circ Res 44 (1979) 503-512
- Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T, Isner JM
The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors
Nat Med 7 (2001) 706-711
- Porcheray F.
Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation
Clin Exp Immunol 142 (2005) 481-489
- Pruijt JF, Fibbe WE, Laterveer L, Pieters RA, Lindley IJ, Paemen L,
Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9)
Proc Natl Acad Sci 96 (1999) 10863-10868
- Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP
Chimerism of the transplanted heart.
N Engl J Med 346 (2002) 5-15
- Reinecke H, Minami E, Zhu WZ, Laflamme MA
Cardiogenic Differentiation and Transdifferentiation of Progenitor Cells
Circ. Res. 103 (2008) 1058-1071
- Ren G, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG
Morphological Characteristics of the Microvasculature in Healing Myocardial Infarcts
J Histochem Cytochem 50 (2002) 71-79
- Roche S, Delorme B, Oostendorp RA, Barbet R, Caton D, Noel D, Boumediene K, Papadaki HA, Cousin B, Crozet C, Milhavel O, Casteilla L, Hatzfeld J, Jorgensen C, Charbord P, Lehmann S
Comparative proteomic analysis of human mesenchymal and embryonic stem cells: Towards the definition of a mesenchymal stem cell proteomic signature
Proteomics. 9(2) (2009) 223-232
- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN
Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord
Stem Cells 21 (2003) 105-110
- Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM
Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells
Exp Cell Res 314 (2008) 1937-1944
- Rossen RD, Michael LH, Hawkins HK, Youker K, Dreyer WJ, Baughn RE
Cardiolipin-protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion
Circ Res 75 (1994) 546-555
- Rota M, Kajstura J, Hosoda T, Bearzi C, Vitale S, Esposito G, Iaffaldano G, Padin-Iruegas ME, Gonzalez A, Rizzi R, Small N, Muraski J, Alvarez R, Chen X, Urbanek K, Bolli R, Houser SR, Leri A, Sussman MA, Anversa P
Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo.
Proc Natl Acad Sci USA 104 (2007) 17783-17788

Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP
Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection
J Inflamm (Lond) 2 (2005) 8

Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP
Interferon-g does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells
Clin Exp Immunol 149 (2007) 353-363

Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N
Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury
Circulation 104 (2001) 253–256

Shi Y, Massague J
Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus
Cell 113 (2003) 685–700

Sitz Wibke
Intramyokardiale Transplantation von humanen, mit IGF-II transduzierten, endothelialen Progenitorzellen in Nacktratten im akuten Myokardinfarktmodell
2006

Siwik DA, Chang DL, Colucci WS
Interleukin-1beta and tumor necrosis factoralpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro
Circ Res 86 (2000) 1259–1265

Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Kunkel SL
The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis
Shock 4 (1995) 155–160

Su EJ, Cioffi CL, Stefansson S, Mittereder N, Garay M, Hreniuk D, Liao D
Gene therapy vector-mediated expression of insulin-like growth factors protects cardiomyocytes from apoptosis and enhances neovascularisation
Am J Physiol Heart Circ Physiol 284 (2003) H1429–H1440

Sun M, Dawood F, Wen WH, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA
Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction
Circulation 110 (2004) 3221–3228

Sun J, Li SH, Liu SM, Wu J, Weisel RD, Zhuo Y, Yau TM, Li RK, Fazel SS
Improvement in cardiac function after bone marrow cell therapy is associated with an increase in myocardial inflammation
Am J Physiol Heart Circ Physiol 296 (2009) H43–H50

Sutton MG, Sharpe N
Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy
Circulation 101 (2000) 2981-2988

Swynghedauw B
Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling
Physiol Rev 79 (1999) 215-262

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
Am J Physiol Heart Circ Physiol 291 (2006) H886–H893

Takemura G, Fujiwara H
Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction
Pharmacol Ther 104 (2004) 1– 16

Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk HD, Anker SD
The Dying Stem Cell Hypothesis - Immune Modulation as a Novel Mechanism for Progenitor Cell Therapy in Cardiac Muscle
JACC 46 (2005) 1799–1802

Vandervelde S, van Amerongen MJ, Tio RA, Petersen AH, van Luyn MJ, Harmsen MC
Increased inflammatory response and neovascularization in reperfused vs. non-reperfused murine myocardial infarction
Cardiovasc Pathol 15 (2006) 83-90

Vandervelde S, van Luyn MJA, Tio RA, Harmsen MC
Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium
J Mol Cell Cardiol 39 (2005) 363–376

Vinten-Johansen J
Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury
Cardiovasc Res 61 (2004) 481– 497

Virag JJ, Murry CE
Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair
Am J Pathol 163 (2003) 2433-2440

Vogt AM, Htun P, Kluge A
Insulin-like growth factor-II delays myocardial infarction in experimental coronary artery occlusion
Cardiovasc Res 33 (1997) 469–477

Wang L, Ma W, Markovich R, Wen Chen JW, Wang HP
Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor
Circ Res 83 (1998) 516–522

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS
NF-kappaB antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation
Science 281 (1998) 1680–1683

Wayman NS, McDonald, MC
Models of coronary artery occlusion and reperfusion for the discovery of novel antiischemic and anti-inflammatory drugs for the heart
Methods Mol Biol 225 (2003) 199-208

Weidl, E.
Die Transplantation humaner endothelialer und angiogener Zellen verbessert die linksventrikuläre Funktion im Myokardinfarktmodell der Nacktratte.
2007

Wojakowski W, Kucia M, Kazmierski M, Ratajczak MZ, Tendera M
Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: relevant reparatory mechanism?
Heart 94 (2008) 27–33

Wojakowski W, Tendera M
Mobilization of bone marrow-derived progenitor cells in acute coronary syndromes
Folia Histochem Cytobiol 43 (2005) 229-232

Wollert KC, Drexler H
Clinical Applications of Stem Cells for the Heart
Circ Res 96 (2005) 151-163

Woodfin A, Voisin M, Nourshargh S
PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology
Arterioscler Thromb Vasc Biol 27 (2007) 2514-2523

Xin X, Yang S, Ingle G, Zlot C, Rangell L, Kowalski J, Schwall R, Ferrara N, Gerritsen ME
Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo
Am J Pathol 158 (2001) 1111-1120

Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML
Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing
Cell Transplant. 2010 Jun 3 Epub ahead of print

Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA,
Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice
Exp Physiol 87 (2002) 547-555

Yano T, Miura T, Whittaker P
Macrophage colony-stimulating factor treatment after myocardial infarction attenuates left ventricular
dysfunction by accelerating infarct repair
J Am Coll Cardiol 47 (2006) 626-634

Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y
Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction
Cardiovasc Res 45 (2000) 630-641

Ye J, Yang L
A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced
mortality
Mol Cell Biochem 176(1997) 227-233

Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, Hanley A, Scadova H, Qin G, Cha DH,
Johnson KL, Aikawa R, Asahara T, Losordo DW
Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after
myocardial infarction
J Clin Invest 115 (2005) 326-338

Zhang D, Bar-Eli M, Meloche S, Brodt P
Dual Regulation of MMP-2 Expression by the Type 1 Insulin-like Growth Factor Receptor
J Biol Chem 279 (2004) 19683-19690

Zhang D, Samani AA, Brodt P
The Role of the IGF-I Receptor in the Regulation of Matrix Metalloproteinases, Tumor Invasion and Metastasis
Horm Metab Res 35 (2003) 802-808

Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, Deng W, Zhao RC
Effects of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation and Function of Human Monocyte-Derived
Dendritic Cells
Stem Cells Dev 13 (2004) 263-271

Zheng H, Martin JA, Duwayri Y, Falcon G, Buckwalter JA
Impact of aging on rat bone marrow-derived stem cell chondrogenesis,
J Gerontol A Biol Sci Med Sci 62 (2007) 136-148

BÜCHER

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Schoen JF
Kapitel "The Heart" in:
Kumar V, Abbas AK, Fausto N (Hrsg.)
Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (7.Edition)
Elsevier Saunders, Philadelphia (2005) 555-619

Kumar V, Abbas AK, Fausto N
Kapitel "Tissue Renewal and Repair: Regeneration, Healing, and Fibrosis" in:
Kumar V, Abbas AK, Fausto N (Hrsg.)
Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (7.Edition)
Elsevier Saunders, Philadelphia (2005) 87-119

Kumar V, Abbas AK, Fausto N
Kapitel "Acute and Chronic Inflammation" in:
Kumar V, Abbas AK, Fausto N (Hrsg.)
Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (7.Edition)
Elsevier Saunders, Philadelphia (2005) 47-87

Giannitsis E, Krautzig S, Kurowski V, Renz-Polster H, Schwabe K, Stierle U
Kapitel "Herz" in:
Renz-Polster H., Krautzig S, Braun J (Hrsg)
Basislehrbuch Innere Medizin (3. Auflage)
Urban & Fischer, München (2004) 28-100

Herold G.
Kapitel Kardiologie in: Herold G): Innere Medizin (10. Auflage)
Köln (2010); 226-253

7. TABELLENVERZEICHNIS

- Tab.1 Mediatoren, die zur Ausprägung der differentiellen Phänotypen M1 und M2 der Makrophagen führen. Die Mediatorstoffe der Spalte M1 fördern den Phänotyp M1, die der Spalte M2 den Phänotyp M2.
- Tab.2 Wirkungen von TGF- β auf verschiedene Zelltypen im Myokard.
- Tab.3 Mediatoren, die zur Stimulation der Angiogenese führen, deren Hauptwirkung und die Phase, in der diese Wirkung zum Tragen kommt. (1=Inflammationsphase, 2=Proliferationsphase, 3=Narbenreifung)
- Tab.4 Auswahl wichtiger parakriner Regulatorstoffe, die im Rahmen der Stammzellmobilisation, des Homings, sowie Proliferation und Differenzierung eine Rolle spielen. (modifiziert nach GNECCHI M. et al, 2008)
- Tab.5 Vergleich der Oberflächenexpressionsprofile von KM-MSC und den verwendeten UV-MSC (modifiziert nach Roche S. et al, 2009)
- Tab.6 Unterschiede im Genexpressionsprofil von KM-MSC und UV-MSC.
- Tab.7 Reagenzien zur immunhistochemischen Darstellung des CD68-Antigens mittels der im Text beschriebenen ABC-AP Methode.
- Tab.8 Reagenzien zur immunhistochemischen Darstellung des α -smooth-muscle-Aktin zur Darstellung der myokardialen Gefäße mittels der im Text beschriebenen LSAB-AP Methode
- Tab.9 Reagenzien zur Darstellung von Ki67 mittels Immunfluoreszenzfärbung.
- Tab.10 Reagenzien zur Extraktion der RNA aus dem Myokard mit Hilfe des RNeasy Mini Kit® der Firma QIAGEN
- Tab.11 Mit Hilfe der TaqMan-Real-Time-PCR untersuchte Gene und ihre Hauptwirkungen im Rahmen des akuten Myokardinfarktes (genaue Darstellung von Überschneidungen und exakte Wirkung in der Diskussion der jeweiligen Gene).
- Tab.12 Verwendete Materialien zur Durchführung der TaqMan-Real-Time-PCR.
- Tab.13 Zur Genexpressionsanalyse verwendete Assays-on-Demand der Firma Applied Biosciences
- Tab.14 Untersuchte Gene und die (sich zum Teil überschneidende) Hauptwirkungen der jeweils translatierten Proteine
- angiogenetische und progenitorzell-mobilisierende Wirkung
 - inflammatorische / chemotaktische Wirkung
 - Marker für apoptotischen Zelluntergang
 - Zellproliferation und Hypertrophie
 - Remodeling
- Tab. 15 Mittels RT-PCR untersuchte Proteine und deren Funktion im Myokard

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb.1 Von Makrophagen sezernierte ausgewählte Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren, die zur Regulation von Phagozytose durch Makrophagen, Kollagen-deposition durch Myofibroblasten und Proliferation und Angiogenese durch Gefäßendothelzellen im Rahmen des Granulationsgewebes nötig sind.
- Abb.2 CD 31 wird auf der lateralen Seite der Endothelzellen sowie auf Neutrophilen, Makrophagen und Thrombozyten exprimiert. Die homologe Bindung zweier CD31 Moleküle führt die infiltrierenden Zellen sozusagen als „Leitschiene“ an der lateralen Seite der Endothelzellen entlang in das Myokard.
- Abb.3 TGF- β : smad-abhängige und smad-unabhängige Signaltransduktion. (modifiziert aus KANG JS. et al, 2009)
- Abb.4 Induktion von Hypertrophie der überlebenden Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt durch die im Text beschriebenen Zytokine + Wachstumsfaktoren, neurohormonelle Mediatoren und erhöhte Wandspannung des Ventrikels. (modifiziert nach SUTTON MG. et al, 2000, GABALLA MA., et al, 2002)
- Abb.5 Progression zur Herzinsuffizienz nach akutem Myokardinfarkt. (modifiziert nach LIM H. et al, 2006)
- Abb.6 Koordination der stammzellbasierten Reparatur des Myokards durch parakrine Wirkung von Mediatorstoffe/Zytokinen (in der Abbildung blau hinterlegt), die im Rahmen der Inflammationsphase nach ischämischer Schädigung des Myokards exprimiert werden. Rot geschrieben sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zytokine. (modifiziert nach VANDERFELDE S. et al, 2005)
- Abb.7 Schlüsselfaktoren zur stammzellbasierten Herzmuskelregeneration. (modifiziert nach VANDERFELDE S. et al, 2005)
- Abb.8 Phasen der Apoptose. Das intrazelluläre Milieu, das die Schwelle des Überganges von der Determinations- zur Exekutionsphase bestimmt, wird durch die beschriebenen pro- und antiapoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie bestimmt. (modifiziert nach TAKEMURA G. et al, 2004, EEFTING F. et al, 2004)
- Abb.9 Wirkungen von IGF II, die über drei verschiedene Rezeptoren vermittelt werden und differentielle zelluläre Auswirkungen zeigen (modifiziert nach O'DELL SD. et al, 1998)
- Abb.10 Regeneration des Herzmuskels nach Stammzelltherapie nach: Darstellung der verschiedenen Quellen von adulten Stammzellen, des Wirkmechanismus und der objektiv messbaren Ergebnisse. (modifiziert nach BARBASH IM. et al, 2006)
- Abb.11 Parakrine Effekte der Stammzelltherapie. (GNECCHI M. et al, 2008)
- Abb.12 Überblick über die Versuchsplanung: Die Euthanasierung der Tiere der Versuchsgruppe 1 erfolgt an Tag 3 post-operativ, die Tiere der Versuchsgruppe 2 wurden am Tag 14 post-operativ euthanasiert
- Abb.13 Masson-Trichrom-Standardfärbung eines Querschnittes aus dem Myokard. Die Zellkerne stellen sich leuchtend rot, das Zytoplasma rosa, die Erythrozyten orangegelb und das Bindegewebe blau dar.
- Abb.14 Darstellung des Entzündungsinfiltrates durch immunhistochemische Färbung des CD68-Antigens auf den Makrophagen im Myokard. Die rot gefärbten Zellen sind CD68-positiv.

Abb.15 α -SMC-aktin Färbung der Myokardschnitte

- a) vor Bearbeitung durch Axiovision 3.1
- b) nach Bearbeitung durch Axiovision 3.1

Abb.16 Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung des Proliferationsindex

- a) Anfärbung von Ki67 mittels FITC, Darstellung proliferierender Zellen (hier Myofibroblasten)
- b) Gegenfärbung mit DAPI, Darstellung der Zellkerne von proliferierenden und ruhenden Zellen

Abb.17 Ansicht auf den linken Ventrikel mit Myokardinfarkt. Die Infarktzone stellt sich hellrot-weißlich dar.

Abb.18 Extraktion der Gesamt-RNA aus dem Myokard durch Homogenisierung des Gewebes, Zentrifugation und Bindung der RNA an eine Silikagel-Membran und anschließende Auswaschung verunreinigender Substanzen.

Abb.19 Auftragung des Fluoreszenzsignals (Y-Achse) gegen die Anzahl der PCR-Zyklen (X-Achse). Der Ct-Wert (crossing threshold) bezeichnet dabei jene Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

Abb.20 1,5 Tesla Phillips Achieva MR Scanner der nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar

Abb.21 MRT Scan eines Rattenherzens

Abb.22 MRT Schnitte zur Berechnung der LVEF

- a) Kurzachsenschnitt
- b) Vierkammerblick in der Längsachse
- c) Zweikammerblick in der Längsachse

Abb.23 Markierung der maximalen Diastole (türkise Linie) sowie der maximalen Systole (blaue Linie)

- a) im Zweikammerblick
- b) im Vierkammerblick

Abb.24 Bull's Eye Plot des von der AHA standardisierten 17-Segmentmodells mit Nomenklatur und Lokalisation der daraus entstandenen Segmente. (modifiziert aus Cerquerira MD. et al, 2002)

Abb.25 Formel zur Berechnung der regionalen Kontraktion (Angabe in %) der einzelnen Wandsegmente des linken Ventrikels zwischen Systole und Diastole

Abb.26 a-d) CD68+ Zellen im Myokard (CD 68 positive Zellen sind rot angefärbt);

- a) und c) Kontrolle; b) und d) MSC
- a) und b) Übersichtsaufnahmen
- c) und d) in zwanzigfacher Vergrößerung

Abb.27 Dichte des CD68+ Entzündungsinfiltrates im Infarktgebiet der UV-MSCTransplantierten Ratten und der Kontrollgruppe drei Tage nachdem Infarkt (Angabe in Prozent)

Abb.28 Ki67 Immunfluoreszenz, Myokard einer MSC transplantierten Ratte 3 Tage nach Infarkt

- in a), c), e) blaue Fluoreszenz aller der Zellen durch Anfärbung der Kerne mit DAPI
- in b), d), f) grüne Fluoreszenz ausschließlich der proliferierenden Zellen durch Anfärbung von Ki67
- a), b) Infarktareal
- b), d) Randbereich des Infarktes

- c), e) gesundes Myokard
- Abb.29 Proliferierende Zellen in Infarktbereich, Infarkttrandbereich und gesundem Myokard markiert durch Anfärbung des Ki67 Antigens. Vergleich von transplantierten Ratten und Kontrollgruppe 3 Tage nach dem Infarkt.
- Abb.30 Masson-Trichrom-Standardfärbung des Myokards. Die kollagenen Narbe zwei Wochen nach AMI stellt sich in dieser Färbung blau dar
- a) repräsentativer Myokardschnitt einer UV-MSC transplantierten Ratte
 - b) repräsentativer Myokardschnitt einer Ratte aus der Kontrollgruppe
- Abb.31 Vergleich der Infarktgröße der Vergleichsgruppen
- Abb.32 α -SMC-aktin Färbung der Myokardschnitte
- a) vor Bearbeitung durch Axiovision 3.1
 - b) nach Bearbeitung durch Axiovision 3.1
- Abb.33 Vergleich der Gefäßdichte zwei Wochen nach Myokardinfarkt anhand Anfärbung der Gefäßendothelzellen mittels α -smc-actin Immunhistochemie jeweils im Infarkt, dessen Randbereich und dem gesunden Myokard der Versuchstiere.
- Abb.34 Genexpression von CD 31 rat und IGF II drei Tage nach Myokardinfarkt. Die dargestellten Werte geben das Verhältnis der absoluten mRNA Konzentrationen dieser Zytokine im Infarktbereich verglichen mit dem gesunden Myokard an.
- Abb.35 Zeitverlauf der Expression von IGFII und CD31rat in den Vergleichsgruppen. Dargestellt ist das Verhältnis der mRNA Konzentrationen in Infarktbereich und gesundem Myokard.
- a) IGF II
 - b) CD31rat
- Abb.36 Genexpression von Kollagen III alpha 1 zwei Wochen nach Myokardinfarkt. Die dargestellten Werte geben das Verhältnis der absoluten mRNA Konzentration dieses Gens im Infarktbereich verglichen mit dem gesunden Myokard an.
- a) TGF β -RII
 - b) Kollagen III alpha 1
- Abb.37 Zeitverlauf der Expression von TGF β -RII und Kollagen III alpha 1 in den Vergleichsgruppen. Dargestellt ist das Verhältnis der mRNA Konzentrationen in Infarktbereich und gesundem Myokard.
- a) TGF β -RII
 - b) Kollagen III alpha 1
- Abb.38 LVEF der verglichenen Gruppen in der MRT
- Abb.39 CD31-vermittelte Signaltransduktion und deren Auswirkung auf Zytoskelett und intrazelluläre Signaltransduktion (modifiziert nach WOODFIN A. et al, 2007)
- Abb.40 Pleiotrope Wirkung von TGF- β nach AMI in Inflammations- und Proliferationsphase.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC-AP Avidine-Biotin-Complex alkaline phosphatase method
 ACE Angiotensin converting enzyme
 AK Antikörper
 AP alkalische Phosphatase
 AP1 activator protein
 AT II Angiotensin II
 ATP Adenosin-tri-phosphat
 AMI Akuter Myokardinfarkt
 ANP Atrial natriuretic peptide
 APC Antigen presenting cell
 BAX Bcl-2-associated X protein
 BCL-2 B-cell lymphoma
 BMC Bone marrow derived stem cells
 BM-MSC Bone marrow derived mesenchymal stem cell
 BNP Brain natriuretic peptide
 bFGF basic fibroblast growth factor
 C Complement factor
 Ca Calcium
 C/CaMK Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases
 CABG coronary artery bypass graft
 CD cluster of differentiation
 cDNA copyDNA
 CDK Cyclin-dependent kinase
 C/EBP- β CCAAT/Enhancer Binding Protein
 COX Cyclooxygenase
 CSC Cardiac stem cells
 Ct-Wert crossing threshold
 CXCL Chemokine (C-X-C motif) ligand
 DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole
 DEPC Diethylpyrocarbonate
 DNA Deoxyribonucleic acid
 ECM extracellular matrix
 EDV Enddiastolisches Volumen
 EGF Epidermal growth factor
 EKG Elektrokardigramm
 EPC Endothelial progenitor cell
 EPO Erythropoietin
 ERK extracellular-signal-regulated kinases
 ESV Endsystolisches Volumen
 ET-1 Endothelin
 FADD Fas-Associated protein with Death Domain
 FAN factor associated with neutral SMase activation
 FELASA Federation of European Laboratory Animal Science Association
 FGF Fibroblast growth factor
 FITC Fluoreszeinisothiozyanat
 FOV Field of View
 FRET Fluorescence resonance energy transfer
 GAPDH Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
 G-CSF Granulocyte colony stimulating factor
 GM-CSF Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
 gp Glykoprotein
 Gro 1/IL 8 melanoma growth stimulating activity, alpha

H₂O Wasser
H₂O₂ Hydrogen peroxide
(h)BMC (human) bone-marrow derived stem cell
HIF Hypoxia induced factor
HGF Hepatocyte growth factor
HKG Housekeeping-Gen
HPC Hematopoietic progenitor cell
ICAM Intercellular adhesion molecules
Ig Immunglobulin
IGF Insulin-like growth factor
IHC Immunhistochemie
IL Interleukin
IL-RA IL-1 Receptor Antagonist
INF Interferone
iNOS inducible nitric oxide synthase
IP-10 Interferon gamma-induced protein
IRS Insulin Rezeptor Substrat
ITIM immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs
JAK Janus kinase/ Just another kinase
JN c-Jun N-terminal
JNK c-Jun N-terminal kinases
K Kalium
KDR Kinase insert domain receptor
KHK Koronare Herzerkrankung
KM Knochenmark
Ktr Kontrolle
LAD left anterior descending artery
LAP Latency Associated Protein
LPR Liquid Permanent Red
LPS Lipopolysaccharides
LSAB-AP labeled streptavidin biotin – alkaline phosphatase
LV Left ventricle
LVEF Left ventricular ejection fraction
Min Minute
MAP-K mitogen-activated protein kinase
MCP1 Monocyte chemotactic Protein
MHC major histocompatibility complex
Mio Million
MIP Macrophage inflammatory protein
MMF Medetomidin, Midazolam, Fentanyl
MMP Matrix-metalloproteinase
mRNA messenger ribonucleic acid
MRT Magnetic Resonance Tomography
MSC Mesenchymal stem cells
MW Mittelwert
MyHC Myosin heavy chain
Na Natrium
NA Noradrenalin
NADPH Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
N-CAM Neural Cell Adhesion Molecule
NF-κB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO Nitric oxide
NOS Nitric oxide synthase
NTP Nucleoside triphosphate
O₂- superoxide
OH- Hydroxyl radical

PAI Plasminogen-aktivator Inhibitor
PBS phosphate buffered saline
PCR polymerase chain reaction
PDGF-BB Platelet-derived growth factor subunit B
PKD 3-phosphoinositide dependent protein kinase
PGE Prostaglandin E
PI3K Phosphatidylinositol 3-kinase
PS Phosphatidyl-Serin
PTCA Perkutane transluminale coronare Angioplastie
RAAS Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RANTES regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RT-PCR Real-Time PCR
SCF Stem Cell Factor/kit-ligand
SD Standardabweichung
SHH Sonic hedgehog
SMC Smooth muscle cells
STAT Signal Transducer and Activator of Transcription
SV Schlagvolumen
SZ Stammzelle
SZT Stammzelltherapie
TE Echozeit
TFE Turbo-Field-Echo
TGF Transforming growth factor
TGF- β R Transforming growth factor β receptor
TIMP tissue inhibitors of metalloproteinases
TLR Toll-like receptors
TNF Tumor necrosis factor
TNFR Tumor necrosis factor receptor
TR Repetitionszeit
TRADD Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TSSC Tissue specific stem cell
TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UV-MSC Umbilical vein derived mesenchymal stem cell
uPA urokinase-type plasminogen activator
PAF Platelet activated Factor
PDGF Platelet-derived growth factor
PECAM Platelet endothelial cell adhesion molecule
PF4 Platelet factor
PPAR peroxisome proliferator-activated receptor
PTCA Percutaneous transluminal coronary angioplasty
ROS Reactive oxygen species
SDF Stromal cell-derived factor
SZT Stammzelltherapie
UV-MSC Umbilical-vein derived mesenchymal stem cells
 α -SMA α - Smooth-Muscle-Actin
VCAM Vascular cell adhesion protein
VEGF Vascular endothelial growth factor

10. DANKSAGUNG

Zu allererst herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof Dr. med. I. Ott für die Ermöglichung der Arbeit, für die engagierte und gute Betreuung und für ihr immer offenes Ohr bei allen Problemen während der Zeit der Promotion und auch jetzt.

Bei Herrn Dr. phil. Robert Oostendorp bedanke ich mich für die Bereitstellung der transplantierten Zellen.

Ganz besonders danke ich allen Tierärztinnen für ihre Unterstützung für das Gelingen dieser Arbeit.

Großer Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Bothner, A. Keithahn und S. Schachoff für die Hilfe und die stets sehr freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen im MRT und bei der Auswertung der Daten. Vielen Dank an Herrn Dr. med S. Nikkola für die Bereitstellung des Computerprogrammes „Munich Heart“ und Dr. med. M. Makowski für die Hilfe bei der Anwendung des Programms und der Auswertung der Ergebnisse.

Weiterhin möchte ich mich bei den MTAs Frau C. Bauer, A. Stobbe und B. Campbell für ihre Hilfe bedanken.

Ganz großes Danke an Richard, der während dieser Zeit und davor und danach immer für mich da war, und einfach ein ganz toller Mensch ist. Und ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt hat und ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre!