

**Effekt einer transendokardialen kathetergestützten Applikation von
Stromal cell-derived factor 1 α auf die linksventrikuläre Funktion im
Herzinfarktmodell im Schwein**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Christos Rammos
aus Düsseldorf

Berichter: Herr Privatdozent
Dr. med. Karl-Christian Koch

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Rüdiger Autschbach

Tag der mündlichen Prüfung: 31. März 2009

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Myokardinfarkt	1
1.2. Diagnostik	2
1.3. Therapie	4
1.4. Stammzelltherapie	5
1.4.1. Regenerative Wirkung	5
1.4.2. Transdifferenzierung	6
1.4.3. Wirkung auf myokardiale Funktion und Perfusion:	7
Tierexperimentelle Daten	7
1.4.4. Wirkung auf myokardiale Funktion und Perfusion:	8
Klinische Studien	8
1.5. Der Homingfaktor Stromal cell derived factor 1 α	8
1.6. Zielsetzung der Arbeit	10
2. Material und Methodik	11
2.1. Versuchsablauf	11
2.2. Tierexperimentelle Instrumentation	12
2.3. Elektromechanisches Mapping	14
2.4. Transendokardiale SDF Injektion	16
2.5. Pathologie	18
2.6. Histologie	19
3. Statistik	22
4. Ergebnisse	23
4.1. Tierexperimentelle Instrumentation	23
4.2. Elektromechanisches Mapping	24
4.2.1. Enddiastolische und endsystolische Volumina	24
4.2.2. Schlagvolumen und Ejektionsfraktion	25

4.2.3. Herzminutenvolumen und Herzfrequenz	27
4.2.4. Elektrogrammamplitude	27
4.2.5. Lineare lokale Verkürzung	28
4.3. Pathologie	31
4.4. Histologie	32
4.5. Komplikationen	33
5. Diskussion.....	34
5.1. Tierexperimentelle Instrumentation	34
5.2. Elektromechanisches Mapping.....	35
5.3. Zellbasierte myokardiale regenerative Therapie	36
5.3.1. Adulte Stammzellen	36
5.3.2. Mobilisierung mittels SDF	37
5.3.3. Applikationsdauer	39
5.3.4. Applikationsmenge.....	40
5.3.5. Applikationsart	41
5.3.6. Applikationsort	43
5.3.7. Gefäßneubildung	43
5.3.8. Kombinationstherapie.....	44
5.3.9. Applikationszeitpunkt	45
5.3.10. Unerwünschte Wirkungen.....	47
5.3.11. Andere Indikationen	48
5.4. Schlussfolgerung	49
6. Zusammenfassung.....	50
7. Literaturverzeichnis.....	51
Danksagung.....	71
Erklärung zur Datenaufbewahrung	72
Curriculum Vitae.....	73

Abkürzungsverzeichnis

CCS	Canadian cardiovascular society
CXCL 12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCR4	CXC Chemokin Rezeptor 4
EDV	Enddiastolisches Volumen
EEM	Elektromechanisches endokardiales Mapping
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EPC	Endothelial progenitor cells, endotheliale Vorläuferzellen
ESV	Endsystolisches Volumen
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
HIF-1	Hypoxia inducible factor
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
BMSC	Bone marrow stem cell, Knochenmarkstammzellen
LAD	Left anterior descending artery, linke Koronararterie
LLS	Linear local shortening, lineare lokale Verkürzung
MCP-1	Macrophage chemoattractant protein
MMP-9	Matrix-Metallo-Proteinase-9
MSC	Mesenchymale Stammzellen
PBS	Phosphat Buffer Solution
RIVA	Ramus interventricularis anterior
SDF	Stromal cell-derived factor 1 α
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SPECT	Single photon emission computed tomography
SV	Schlagvolumen
TTC	Triphenyltetrazolium formazan
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWF	von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

Herz- und Kreislauferkrankungen stellen ein globales Gesundheitsproblem dar und sind seit vielen Jahren führend in den Todesursachenstatistiken der westlichen Industrienationen. Etwa ein Drittel aller Personen weltweit sterben an kardiovaskulären Erkrankungen, maßgeblich bedingt durch die chronisch ischämische Herzkrankheit und den akuten Myokardinfarkt (Thygesen 2007). Der Begriff Herzinfarkt beschreibt die Nekrose von Herzmuskelzellen auf Grund einer länger andauernden Durchblutungsstörung. Die Behandlung des akuten Myokardinfarkts hat in den letzten Jahrzehnten einen erheblichen Wandel erfahren, welches zu einer wesentlichen Senkung der Sterblichkeit geführt hat. Obwohl seit der Framingham Studie zudem vermehrt Wert auf präventive Maßnahmen mit Eindämmung der modifizierbaren kardiovaskulären Risikofaktoren gelegt wird, erleiden dennoch etwa 280.000 Menschen in Deutschland pro Jahr einen Herzinfarkt (Hamm 2004).

1.1. Myokardinfarkt

Die Mehrzahl der Herzinfarkte entsteht im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit bei bestehender Arteriosklerose der Koronargefäße durch die Ruptur von thromboembolisch wirkenden Plaques mit konsekutiver Durchblutungsstörung des Myokards (DeWood 1980). Die Symptome und Manifestationsformen eines Myokardinfarktes reichen von der asymptomatischen und stummen Ischämie über die instabile Angina pectoris bis hin zum transmuralen, hämodynamisch wirksamen Myokardinfarkt und dem konsekutiven plötzlichen Herztod.

Eine länger anhaltende Koronararterienokklusion von 15 bis 20 Minuten führt über eine Minderversorgung des Herzens mit Blut und Sauerstoff zunächst zu einer Gewebhypoxie und schließlich zu einer Gewebeanoxie. Es resultieren eine Gewebenekrose und ein Verlust von kontraktile Muskelmasse. Die Kardiomyozyten sind nicht in der Lage das nekrotische Gewebe zu regenerieren und das infarzierte Areal des Herzens vernarbt. Nach Infarkt findet im Herz ein ventrikuläres Remodeling statt, die Myozyten werden durch Bindegewebe ersetzt und das Herz dilatiert (Pfeffer 1990; Pfeffer 1993). Diese pathophysiologische Abfolge schien

lange Zeit nicht reversibel zu sein (Ho 1993). Es bildet sich eine Herzinsuffizienz aus, bei der das Herz nicht mehr fähig ist, dem Organismus genügend Blut und somit Sauerstoff zur Verfügung zu stellen.

1.2. Diagnostik

Die Klinik und Symptomatik der klassischen Angina pectoris ist wegweisend für die Diagnose eines Herzinfarktes. Als weitere definierende Hilfsmittel dienen spezifische Biomarker wie das Troponin I/T und die unspezifischeren Marker Kreatinkinase und Myoglobin (Thygesen 2007). Daneben spielt die Elektrokardiographie bei der Diagnostik eine entscheidende Rolle. Seit der ersten elektrokardiographischen Ableitung 1887 durch Waller an seinem Hund und der von Einthoven 1903 entwickelten Elektrokardiographie ist das Elektrokardiogramm (EKG) als einfaches nichtinvasives diagnostisches Verfahren unverzichtbar. Die aufgezeichneten elektrischen Potentialdifferenzen und Vektoren geben Aufschluss über die Herzachse, Herzfrequenz, Rhythmus, die Erregungsausbreitung in den verschiedenen Herzregionen und zeigen akute sowie chronische Infarktzeichen an.

Seitdem erkannt wurde, dass Ischämie und Infarkte des Myokards Veränderungen der abgeleiteten elektrischen myokardialen Signale verursachen, ist das Elektrokardiogramm unter Ruhe und Belastungsbedingungen diagnostisch hilfreich. Das elektromechanische endokardiale Mapping (EEM) ist, gleichsam als logische Fortführung des Elektrokardiogramms, 1996 erstmals von Ben-Haim et al. vorgestellt worden und wurde zunächst bei der electrophysiologischen Behandlung von kardialen Arrhythmien eingesetzt (Ben-Haim 1996). Dieses System ist ein nichtfluoroskopisches, endokardiales, kathetergestütztes Mappingsystem, welches einem electrophysiologischen Katheter die Navigation im Herzen ermöglicht und nicht nur elektrische, sondern auch anatomische und mechanische Informationen der endokardial abgetasteten Herzininnenfläche in Echtzeit liefert (Gepstein 1997).

Das besondere des EEM ist, dass es eine intramyokardiale Injektionstherapie steuern kann (siehe Abb. 1: Injektionskatheter). Hierbei enthält der für das Mapping verwendete electrophysiologische Katheter eine ausfahrbare Injektionsnadel bzw. einen Laserkanal, wodurch die Möglichkeit zur intramyokardialen Injektion oder der direkten myokardialen Revaskularisation mittels Laser gegeben wird. Mehrere

Arbeiten weisen auf die Effektivität und das Potential des elektromechanischen Mappingsystems in Kombination mit der kathetergestützten Injektion hin, da hiermit Substanzen in therapeutischer Zielsetzung direkt in das Gewebe appliziert werden können (Smits PC 2002; Kawamoto 2003). Die Technik der kathetergestützten transendokardialen Injektion mit Plasmiden oder Zellen ist in mehreren tierexperimentellen wie auch klinischen Studien validiert worden und gilt als zuverlässig und komplikationsarm (Fuchs 2001; Kastrup J 2001; Fuchs 2003; Kastrup 2005).

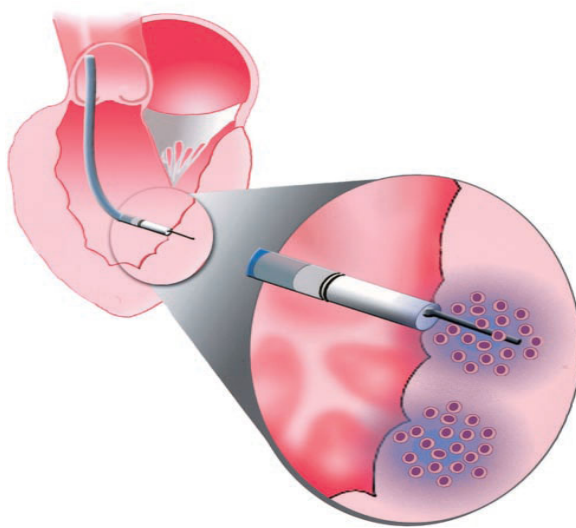


Abb. 1: Injektionskatheter

Der Myo-Star Injektionskatheter des NOGA-Systems (Biosense Webster, Cordis, Johnson & Johnson) wird retrograd über die Aortenklappe in den linken Ventrikel gebracht und ist wie ein elektrophysiologischer Katheter steuerbar. An seinem beweglichen Ende befindet sich eine ausfahrbare Nadel mit welcher transendokardiale Injektionen durchgeführt werden können (aus (Perin 2003)).

Die Linksherzkatheteruntersuchung ist der Goldstandard bei der Diagnostik sowie der Therapie der koronaren Herzkrankheit und des Herzinfarktes. Bei dieser invasiven Methode werden eine Ventrikulographie, eine Koronarangiographie sowie Bestimmungen der aortalen und linksventrikulären Drucke durchgeführt. Koronarstenosen können interventionell behandelt werden. Kontrastmittelunverträglichkeit, Myokardinfarkt, Kammerflimmern, Gefäßdissektionen, Thrombosen, Embolien sowie Hämatome, Aneurysmata und arteriovenöse Fisteln an der Punktionsstelle sind mögliche seltene Komplikationen.

1.3. Therapie

Der Myokardinfarkt bedarf einer schnellen und gezielten Behandlung, um das Überleben und die Lebensqualität der Patienten zu sichern (Hristov 2006). Die therapeutischen Optionen richten sich darauf aus, die Ausbildung einer myokardialen Nekrose zu verhindern bzw. aufzuhalten. Die medikamentöse Therapie in der Akutsituation zielt auf eine möglichst optimale Sauerstoffversorgung des Herzens, die Schmerzbekämpfung und eine Prophylaxe beziehungsweise Vermeidung weiterer Koronarthrombosen ab. Verabreicht werden Sauerstoff und Nitroglyzerin, welches eine Senkung der Vor- und Nachlast des Herzens und somit eine bessere Durchblutung der Herzzinnenschicht bewirkt sowie Morphinpräparate, Betablocker, ACE-Hemmer, die Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure und Clopidogrel sowie Heparin.

Das vordringlichste Ziel bei der Behandlung des Myokardinfarktes ist die Reperfusion, das heißt die möglichst rasche Rekanalisation des betroffenen und - in dieser Situation - meist okkludierten Herzkranzgefäßes (Hamm 2004). Es gilt, den Infarkt durch eine Herzkatheterbehandlung oder alternativ, wenn erst genanntes nicht verfügbar ist, durch eine Lysetherapie zu verhindern bzw. in seiner Ausdehnung aufzuhalten. Andreas Grüntzig hat 1977 die erste Ballondilatation eines Koronargefäßes am Menschen durchgeführt und somit eine neue Ära der kardiologischen Therapie eingeleitet (Gruntzig 1977). Diese primäre PTCA (perkutane transluminale Coronarangioplastie) ist die mechanische Aufdehnung eines verengten oder verschlossenen Gefäßes mit einem Ballonkatheter, wobei dies in Kombination mit einer Stentimplantation durchgeführt werden kann und die Methode der Wahl darstellt (Zeymer 2003; Elezi 2006).

Obwohl diese interventionellen Strategien meist eine Reperfusion der Koronarien sicherstellen können, gilt es bisher als nicht möglich, einmal verlorenes Myokard zu regenerieren (Dawn 2005). Auch von chirurgischer Seite her sind verschiedene therapeutische Konzepte entwickelt worden, die linksventrikuläre Funktion und Perfusion des Gewebes zu verbessern. Zu nennen sind die Kardiomyoplastie, mechanische Geräte zur Herz-Kreislauf-Unterstützung sowie die Transplantation (Singh 2005).

1.4. Stammzelltherapie

Neue therapeutische Ansätze sind entstanden, seitdem das regenerative Potential der Stammzellen entdeckt wurde (Losordo 2004, 2004). Die Stammzellforschung begann 1961 mit der Entdeckung der Blutstammzellen durch Till, McCulloch und Siminovitch. Sie wiesen nach, dass bestimmte Zellen die Fähigkeit haben sich selbst zu reproduzieren, sowie sich zu differenziertem Gewebe zu entwickeln (Siminovitch 1963; Siminovitch 1964).

Im Jahr 1998 isolierte James Thomson aus einem sieben Tage alten Embryo Stammzellen und züchtete daraus verschiedene Zellreihen an (Thomson 1998). Diese embryonale Stammzellforschung ist jedoch mit ethischen Fragen verbunden und somit in vielen Ländern nicht erlaubt, birgt das Risiko von Teratokarzinomen, einer möglichen proarrhythmogenen Wirkung im Herzen und wegen der nicht vermeidbaren Immunogenität die Nachteile einer erforderlichen Immunsuppression (Zhang 2002; Strauer 2003). In jüngster Zeit wird jedoch angenommen, dass sich nicht nur aus embryonalen omnipotenten Stammzellen Gewebe regenerieren lässt, sondern auch mit Hilfe der adulten autologen pluripotenten Stammzellen. Diese sind leichter verfügbar, werfen keine ethischen Fragen auf und können autolog, also am selben Organismus verwendet werden, so dass keine Immunsuppression nötig ist (Brehm 2002). Die adulten und autologen, also körpereigenen Stammzellen sind somit für mögliche klinische Einsätze den embryonalen Stammzellen vorzuziehen.

1.4.1. Regenerative Wirkung

Adulte Stammzellen sind in verschiedenen Organen lokalisiert, beispielsweise im Blut und im Knochenmark, aber auch in der Haut, Lunge, Leber und im Herzen (Wagers 2002; Urbanek 2003). Von diesen bilden die Knochenmarkszellen (BMSC, bone marrow stem cell) die am besten untersuchte Gruppe. Durch die diversen Marker und Oberflächenmoleküle werden unter anderem hämatopoetische Stammzellen (HSC), mesenchymale Stammzellen (MSC) und endotheliale Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPC) klassifiziert, wobei auch verschiedene physiologische Aufgaben von Bedeutung sind (Dawn 2005).

Die eigentliche physiologische Rolle und die Wirkungsweise der Stammzellen ist bisher nicht völlig verstanden worden. Während der embryonalen Entwicklung

wandern blutbildende Zellen mittels Blutzirkulation aus der Leber in die Peripherie und sammeln sich im Knochenmark an. Dort bilden sich viele reife und unreife Zellen aller Zelllinien aus, die ihrerseits wieder ins Blut gelangen, wobei ein kleiner Teil der nicht differenzierten Stammzellen im Knochenmark verbleibt (Morrison 1995). Bis heute ist die physiologische Aufgabe und der Verbleib dieser peripheren Stammzellen nicht ausreichend geklärt, ein mögliches Ziel kann jedoch sein, geschädigtes Knochenmark oder andere Organe zu regenerieren (Lapidot 2002). Im Falle einer Organschädigung migrieren Stammzellen zum Ort der Verletzung und differenzieren sich dort aus, so dass eine strukturelle und funktionelle Regeneration erfolgen kann (Li 2001; Orlic 2001).

Bei einer Gewebetraumatisierung, wie im Falle eines Herzinfarktes, lässt sich das regenerative Potential der Stammzellen durch verschiedene Wirkungsmechanismen erklären: Durch die direkte Differenzierung der Zellen in Kardiomyozyten (Beltrami 2003) oder durch zytokin-induziertes Wachstum und Vermehrung von noch vitalen Myokardzellen, besonders im Bereich des Periinfarktgebietes (Orlic 2001). Des weiteren durch Neo-Vaskulogenese (Ratajska 2006), durch die Stimulation von intrinsischen myokardialen, also endogenen Stammzellen (Leri 2002) oder durch die Induktion von Zellfusionen zwischen transplantierten Stammzellen und den im Herzen ansässigen Myozyten (Alvarez-Dolado 2003).

Die regenerative Wirkung äußert sich dementsprechend in Form von Vaskulo-, Angio- und Myogenese, also dem Erzeugen von neuen Blutgefäßen und Muskelzellen. Dies geschieht am ehesten im Infarkttrandbereich sowie im Infarktgebiet selber, da sich dort eine Erhöhung der mitotischen Aktivität zeigt (Anversa 2002).

1.4.2. Transdifferenzierung

Die in-vitro Versuche von Makino und Mitarbeitern wiesen erstmals darauf hin, wie Knochenmarkstammzellen mit fibroblastenartiger Morphologie nach einiger Zeit in entsprechendem Milieu myotubuli-ähnliche Strukturen bildeten, atriales natriuretisches Peptid sezernierten und schließlich auch dem Sinusknoten ähnliche Aktionspotentiale erzeugten (Makino 1999). Orlic hat 2001 im Tierexperiment gezeigt, dass aus markierten, lokal applizierten Knochenmarkstammzellen Myozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen entstehen, dass entsprechend de-novo

Myokard geschaffen werden kann, welches im Experiment das infarzierte Gewebe zu 68% ersetzte (Orlic 2001). Auch in anderen Infarktmodellen bei Schweinen konnte gezeigt werden, wie chirurgisch intramyokardial injizierte mesenchymale Stammzellen die kardiomyozyten-spezifischen Proteine wie Troponin T und Tropomyosin bildeten und so die Eigenschaften von Herzmuskelgewebe annahmen (Shake 2002).

Endotheliale Vorläuferzellen (EPC) transdifferenzieren sich in Kardiomyozyten, wenn sie im entsprechenden Medium oder Gewebe den passenden Reizen ausgesetzt werden (Condorelli 2001). In den Arbeiten von Ratajczak und Kollegen wurde schlussfolgernd die Hypothese aufgestellt, dass das Knochenmark als Reservoir undifferenzierter gewebespezifischer Stammzellen (tissue committed stem cell, TCSC) dient, welche sich durch entsprechende Reize zu verschiedenen nicht-hämatopoetischen Gewebetypen ausdifferenzieren können (Kucia 2004; Ratajczak 2004).

1.4.3. Wirkung auf myokardiale Funktion und Perfusion:

Tierexperimentelle Daten

Durch die induzierte Angiogenese und Myogenese verhindern implantierte Stammzellen sowie mesenchymale Vorläuferzellen im Herzinfarktmodell ferner eine Dilatation des Myokards in der Infarktregion und verbessern die regionale und globale Herzfunktion (Tomita 2002; Davani 2003; Nagaya 2004; Amado 2005).

Die Gruppe um Fuchs wies nach transendokardialer Applikation von Knochenmarkstammzellen in infarziertes Schweinemyokard eine vermehrte Kollateralenbildung und verbesserte linksventrikuläre Funktion nach. Hierbei sollen zusätzliche Faktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) und macrophage chemoattractant protein (MCP-1) wirksam sein, welche die Neoangiogenese verstärken (Fuchs 2001).

Hämangioblasten aus dem Knochenmark haben ebenfalls das Potential gezeigt, Angiogenese und Vaskulogenese im infarzierten Herzen zu fördern (Kocher 2001).

Kawamoto et al. untersuchten bei Schweinen und Ratten die Injektion von endothelialen Vorläuferzellen nach einem Myokardinfarkt und dokumentierten eine erfolgreiche Neovaskularisierung und eine verbesserte linksventrikuläre Funktion

(Kawamoto 2001; Kawamoto 2003). Die beschriebenen tierexperimentellen Studien weisen in ihrer Gesamtheit auf das Potential der Stammzellen hin. Dies wird jedoch, aufgrund von ausbleibender Differenzierung nach Transplantation, auch kontrovers diskutiert (Wagers 2002; Murry 2004).

1.4.4. Wirkung auf myokardiale Funktion und Perfusion:

Klinische Studien

Beim Menschen zeigte sich ebenfalls in vielen Studien bei akuter und chronischer Ischämie ein positiver Effekt einer Stammzell-Therapie. Die linksventrikuläre Funktion und Perfusion verbesserten sich bei Patienten, denen periphere, im Blut zirkulierende Stammzellen intrakoronar infundiert wurden (Kang 2004). Ein signifikanter Benefit zeigt sich ebenso bei aus autologem Knochenmark gewonnenen Stammzellen hinsichtlich der Kontraktilität, der Ejektionsfraktion und der Infarktgröße bei intrakoronarer Applikation, wie Strauer et al. in mehreren Studien zeigen konnte (Strauer 2001; Strauer 2002; Strauer 2005). Fuchs et al. wählten den transendokardialen Weg, um bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit autologe Stammzellen zu injizieren und berichteten, dass sich die Funktionsklasse nach CCS (canadian cardiovascular society) signifikant verbesserte (Fuchs 2003). Derselbe Applikationsweg, Knochenmarkstammzellen in Kombination mit dem elektromechanischen Mappingsystem NOGA zu verabreichen, wurde auch in der Studie von Perin et al. bei 21 Patienten mit ischämischem Herzversagen mit Erfolg eingesetzt. Hierbei verbesserten sich der myokardiale Blutfluss und die Funktion deutlich (Perin 2003). Die Transplantation autologer BMSC ist zudem sicher und wies bei der Behandlung von mittlerweile mehr als 200 Patienten nach Myokardinfarkt keine signifikanten, unerwünschten Reaktionen und Nebenwirkungen auf (Bolli 2005; Wollert 2005).

1.5. Der Homingfaktor Stromal cell derived factor 1 α

Die Stammzellen wandern nach einem Trauma in das geschädigte Gewebe, was man auch als „Homing“ bezeichnet (Jackson 2001). Dieses Homing wird als das aktive

Überschreiten der endothelialen Blut- oder Knochenmarkbarriere in spezifische Regionen beschrieben (Lapidot 2005).

Die Idee der Stammzellmigration durch die Blutzirkulation wurde von der Gruppe Anversa et al. vorgeschlagen, welche Herzen von weiblichen Spendern in männliche Empfänger transplantierten. Nach einiger Zeit fanden sich hämatopoetische Zellen und differenzierte Kardiomyozyten mit männlichem Chromosomensatz (Quaini 2002). Die Regeneration des Myokards durch Stammzellen und das Homing derselben in Richtung des geschädigten Gewebes legten nahe, dass lokale chemotaktische Faktoren existieren müssen. Es folgten Überlegungen, wie man diese Rekrutierung fördern könnte, ohne auf die sonst invasiven Methoden der Stammzellgewinnung angewiesen zu sein (Hofmann 2005). Das Chemokin Stromal cell-derived factor 1 α (SDF) und sein spezifischer Rezeptor CXCR4 werden benötigt, damit Stammzellen in das Knochenmark einwandern, wie Peled et al. demonstrierten (Peled 1999). CD34 positive Zellen, welche als hämatopoetische Stammzellen gelten, exprimieren den CXCR4 Rezeptor und migrieren in vitro in Richtung eines SDF-Gradienten (Mohle 1998). Das Chemokin scheint auch bei der Proliferation, Adhäsion und Transmigration von verschiedenen Stamm- als auch Vorläuferzellen eine besondere Rolle zu spielen (Lataillade 2000; Zimmet 2005). Es ist auch bekannt als CXCL12, wobei drei verschiedene mRNA Isoformen differenziert werden (α , β und γ). In nichtischämischen Herzen wurde es in kardialen Myozyten und endothelialen Zellen entdeckt und soll eine mögliche Rolle bei der Calciumhämöostase haben. In infarzierten Herzen dagegen konnte man es bislang nur in Endothel- und Entzündungszellen nachweisen (Segret 2007). SDF wird im adulten Herzen konstant exprimiert und nach einem Myokardinfarkt hochreguliert, was auf eine denkbare Beteiligung bei der Stammzellrekrutierung hinweist (Vandervelde 2005; Zimmet 2005). Es verstärkt die Mobilisierung der aus dem Knochenmark kommenden Stammzellen in ischämisches Gewebe, bewirkt dies jedoch nicht in Abwesenheit einer Ischämie (Abbott 2004). Ist der CXCR4 Rezeptor durch Antikörper blockiert wird eine Migration der Stammzellen trotz eines SDF Gradienten unterbunden (Petit 2002). Das Anlocken der mobilisierten Vorläuferzellen in ischämische Areale erfolgt in einem mehrschrittigen Prozess. Durch die induzierte Ischämie entsteht ein hypoxischer Gradient, der die Synthese des Proteins Hypoxia Inducible Factor (HIF-1) auslöst. HIF-1 reguliert wiederum die Expression von SDF und VEGF (Ceraadini 2004).

Die Tierexperimente von Askari et al. an infarzierten Mäuseherzen zeigten, dass die Transplantation von SDF-exprimierenden kardialen Fibroblasten im Periinfarktgebiet in Kombination mit G-CSF-Stimulation (granulocyte-colony stimulating factor) das Stammzellhoming in ischämisches Myokard fördert (Askari 2003). Askari stellte außerdem eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und durch ein rückläufiges Remodelling eine verringerte Dilatation des infarzierten Herzens fest. Die Gruppe um Yamaguchi injizierte in einer tierexperimentellen Studie SDF in ischämisches Muskelgewebe bei Mäusen und berichtete, dass dadurch Angiogenese induziert wurde, die damit angelockten EPCs die Neovaskularisation fördern und dass sich die Perfusion in diesem Gebiet im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verbesserte (Yamaguchi 2003). Diese Arbeiten demonstrieren das Potential des Homingfaktors Stromal Derived Factor-1 α hinsichtlich der verstärkten Rekrutierung und Mobilisation von CXCR4 positiven Stamm- und endothelialen Vorläuferzellen und der damit verbundenen Angiogenese sowie Myogenese zwecks myokardial regenerativer Therapie.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

In einem tierexperimentellen Herzinfarktmodell durch Mikroembolisation des peripheren Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie bei Schweinen sollte untersucht werden, ob die verstärkte Stammzellrekrutierung durch kathetergestützte transendokardiale Injektion des Homingfaktors SDF in die Infarkt- und Periinfarktregion zwei Wochen nach Infarkt die Angio- und Myogenese sowie die linksventrikuläre Funktion und Perfusion verbessern kann.

2. Material und Methodik

2.1. Versuchsablauf

In dieser tierexperimentellen Studie wurden 20 weibliche, 2 Monate alte, etwa 30 Kilogramm schwere deutsche Hausschweine als Versuchstiere verwendet.

Tabelle 1: Versuchsablauf

Tag 0	Infarktinduktion durch Mikroembolisation der peripheren LAD
2 Wochen (baseline)	NOGA-Mapping (Funktion und Vitalität) Gated SPECT (Perfusion und Funktion) SDF Injektion mittels NOGA-Katheter oder Sham-Intervention
7 Wochen (follow-up)	NOGA-Mapping (Funktion und Vitalität) Gated SPECT (Perfusion und Funktion) Infarktgröße (TTC), Histologie

Der Versuchsablauf gliederte sich in drei Abschnitte (siehe Tabelle 1: Versuchsablauf). Am ersten Tag wurde katheterinterventionell ein Herzinfarkt mittels Mikroembolisation der linken Koronararterie (LAD) induziert. Nach 2 Wochen wurde der infarzierte Ventrikel elektromechanisch untersucht (baseline) und SDF kathetergestützt transendokardial injiziert (n=12) beziehungsweise bei der Kontrollgruppe eine Sham-Intervention durchgeführt (n=8). Der Infarkt wurde echokardiographisch und angiographisch dokumentiert. 7 Wochen nach der Infarktsetzung wurden die Tiere geopfert, nachdem erneut der linke Ventrikel elektromechanisch abgetastet (follow-up) und nuklearmedizinische Untersuchungen durchgeführt worden waren (die nuklearmedizinischen Untersuchungen sind Teil einer anderen Dissertation). Den euthanasierten Tieren wurde das Herz via Sternotomie entnommen, um immunhistochemische Untersuchungen sowie planimetrische Berechnungen der Infarktgröße durchzuführen.

Alle Versuche wurden nach Genehmigung durch die Bezirksregierung Köln im Institut für Versuchstierkunde der RWTH-Aachen durchgeführt.

2.2. Tierexperimentelle Instrumentation

Die Schweine wurden 2 Wochen vor dem Versuchsbeginn im Tierstall der tierexperimentellen Abteilung der RWTH Aachen gehalten, um Infektionen auszuschließen und eine Gewöhnung an das Umfeld zu erreichen. Jeweils einen Tag vor dem jeweiligen Versuchstag wurde Nahrungskarenz eingehalten, um eventuelle Komplikationen während der Intubation und Untersuchung zu vermeiden. Der Prämedikation durch intramuskuläre Verabreichung von Azaperone (4 mg/kg) sowie Atropin (0,044 mg/kg) folgte 15 min später eine Verabreichung von Ketamin (15 mg/kg) intramuskulär. Die Narkose wurde nach Legen einer Venenverweilkanüle in die Ohrvene durch Pentobarbital (20-40 mg/kg) verdünnt in NaCl eingeleitet. Es folgte die orotracheale Intubation und das Legen eines Blasenkatheters. Nach Fixierung des Tieres in Rückenlage mit elastischen Binden am Versuchstisch, wurde das Schwein im IPPV-Modus (intermittent positive pressure ventilation) mit einem Beatmungsgerät (Fabius, Draeger Medical) beatmet. Die Narkose wurde durch Isofluran 0,8% - 1% in Lachgas/Sauerstoff ($\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$ (1:3 vol/vol)) aufrechterhalten (siehe Abb. 2: Versuchsaufbau). Ein EKG Monitoring wurde in den drei bipolaren Standardableitungen nach Einthoven durchgeführt, um Herzfrequenz, Rhythmus und ST-Strecken Veränderungen zu dokumentieren. Eine Hydrierung der Schweine wurde durch Infusion physiologischer Kochsalzlösung gewährleistet. Wärmelampen und Decken sicherten eine konstante Körpertemperatur (38° Celsius).



Abb. 2: Versuchsaufbau

Das Versuchstier ist in Rückenlage am Versuchstisch fixiert und wird mit dem Beatmungsgerät durchgehend beatmet.

Zugangsweg für die Herzkatheteruntersuchung der linken Kammer und der Koronargefäße war bei allen Schweinen die Arteria femoralis. Die Punktion des Gefäßes mit einer Hohnadel in einem Winkel von etwa 45° sowie das Einbringen des Führungsdrahtes erfolgten nach dopplersonographischer Kontrolle. In Seldinger-Technik wurde nach Rückzug der Hohnadel eine 7 French Schleuse über den liegenden Draht in das Gefäß eingeführt. Die Schleuse ermöglichte das Einbringen aller nötigen Instrumentarien, wie Führungskatheter, Ballonkatheter oder Mappingkatheter. Durch den Seitenarm der Schleuse konnte kontinuierlich der arterielle Blutdruck gemessen werden. 10.000 Einheiten Heparin wurden durch die Schleuse gegeben um Thrombosierungen des Katheters und der Schleuse zu vermeiden.

Der Führungskatheter (7F rechter Amplatz mit Seitenlöchern) wurde unter radiologischer Kontrolle bis zum Ostium der linken Koronararterie (LAD) vorgeschoben und die linke Kranzarterie durch Injektion von jodhaltigem und röntgenpositivem Kontrastmittel (Optiray 320, tyco Healthcare/ Mallinckrodt) angiographisch dargestellt. Dann wurde durch den Führungskatheter hindurch ein Führungsdraht (balance middle weight guide wire) unter radiologischer Durchleuchtung distal des zweiten Diagonalastes des Ramus interventricularis anterior (RIVA) platziert und die richtige Lage in einer erneuten angiographischen Darstellung dokumentiert. Ein Ballonkatheter (10 mm Länge, 2 mm Durchmesser, over-the-wire balloon, Stormer, Medtronic) wurde über den Führungsdraht distal des 2. Diagonalastes vorgeschoben und dann der Führungsdraht entfernt.

Vor Induktion des Infarktes wurden 2 mg/kg Pethidine, in 8 ml NaCl verdünnt, zur Schmerztherapie intravenös verabreicht. Zur Infarktinduktion mittels Mikroembolisation wurde der Ballon mit 2 atm für 1 Minute aufgeblasen (Medflator, Medtronic) und durch das Innenlumen des Katheters Agarosekugeln (Bio-Rad, Durchmesser 75-150 µm, 100 µl in 7ml NaCl Lösung) über eine Minute langsam in das Koronargefäß injiziert. Dadurch wurde das Gefäß peripher embolisiert. Nach einer Minute wurde der Ballon entblockt und die Okklusion der distalen LAD angiographisch dokumentiert. Nach der erfolgreichen Infarktinduktion wurden die Versuchstiere jeweils für 3-4 Stunden mit arterieller Druckmessung und EKG überwacht, bis sich Rhythmus und Blutdruck normalisiert hatten. Eventuelle Rhythmusstörungen in Form von Kammerflimmern wurden durch elektrische Kardioversion behoben. Schmerztherapeutisch wurde Carprofen (4 mg/kg)

intramuskulär injiziert, die arterielle Schleuse nach dreißigminütiger manueller Kompression entfernt und die Schweine anschließend vom Beatmungsgerät entwöhnt. Nach Einsetzen der Spontanatmung wurden die Tiere in den Stall gebracht, extubiert und der Blasenkatheter entfernt.

2.3. Elektromechanisches Mapping

Das elektromechanische Mapping des linken Ventrikels wurde zwei (baseline) und sieben Wochen (follow-up) nach der Infarzierung mit dem NOGA™ System (Biosense-Webster, Diamond Bar, California) durchgeführt. Die Versuchstiere befanden sich dazu wie beschrieben in Narkose und wurden beatmet. Die Femoralarterie wurde in Seldingertechnik wie oben dargestellt punktiert. Nach erfolgreicher Punktion und Einführen einer 8 French Schleuse erfolgte die Einbringung der Mapping- und Injektionskatheter. Das dreieckige „location pad“ mit den an den Ecken angeordneten Spulen, welche ein schwaches elektromagnetisches Feld erzeugen, wurde unterhalb des Herzens der Versuchstiere unter dem Tisch befestigt. Ein fixer Referenzkatheter, welcher einen elektromagnetischen Sensor enthält, wurde am Rücken des Versuchstieres angebracht. Anschließend wurde der NOGA-Mappingkatheter Ref-Star (Cordis Webster, Belgium), der in der beweglichen Spitze mit einem elektromagnetischen Sensor ausgestattet ist, durch die liegende Schleuse retrograd über die Aortenklappe in das linksventrikuläre Cavum eingeführt. Auf diese Weise konnte der linke Ventrikel mit dem Mappingkatheter abgetastet werden.

In der NOGA Silicon Graphics Workstation wird durch die Komponenten des NOGA-Systems „online“ ein dreidimensionales Modell des linken Ventrikels rekonstruiert. Durch die Bewegung der flexiblen Mappingkatheterspitze an verschiedene linksventrikuläre endokardiale Orte werden durch die Workstation zwei farbkodierte Karten errechnet. Zum einen die endokardiale „voltage map“, welche die myokardiale elektrische Aktivität anzeigt und zum anderen die „linear local shortening map“, welche die regionale linksventrikuläre Funktion darstellt.

Wenn die loop stability unter 2,5 mm war (loop stability = Schleifenstabilität, mittlerer Abstand der biegsamen Katheterspitze über zwei konsekutive Herzschläge zu korrespondierenden Zeitpunkten im kardialen Zyklus) wurden die endokardial

abgetasteten Orte aufgezeichnet. Bei einer loop stability über 2,5 mm wurde der entsprechende Punkt verworfen und nicht in die Studie einbezogen. Mit der Silicon Graphics Workstation (Silicon Graphics, Mt. View, CA) gelang durch die erfassten Daten die computergestützte Erstellung einer elektroanatomischen Karte. Die Abbildung des Herzens wird in Echtzeit dreidimensional dargestellt und spiegelt mit hoher Präzision die elektrische und mechanische Aktivität wieder (Ben-Haim 1996; Gepstein 1997; Smeets 1998). Die Punkte wurden am Ende der Untersuchung mittels eines Filteralgorithmus ausgewählt. Dabei wurden Punkte verworfen, die außerhalb festgesetzter Bereiche für die loop stability, die location stability (= Ortsstabilität, Abstand der enddiastolischen Lokalisierung der Katheterspitze über zwei aufeinander folgende Herzschläge) oder die Zyklusstabilität lagen. Ebenso wurde bei einer Abweichung der Morphologie von zwei konsekutiven QRS-Komplexen im Oberflächenkardiogramm verfahren.

Die Herzspitze wurde an der Silicon Graphics Workstation manuell ausgewählt. Entlang einer Achse vom Zentrum der Masse des rekonstruierten Ventrikels zum Apex wurde der linke Ventrikel polar auf eine Ebene projiziert. Die „Bulls-eye“-Graphik wurde in 12 Regionen unterteilt (Koch 2001). Die Regionen gliedern sich von innen nach außen in Apex, Ventrikelmitte und Basis sowie im Uhrzeigersinn in septal, anterior, lateral und inferior (siehe Abb. 3 Elektromechanisches endokardiales Mapping).

Für jede Region wurden die Mittelwerte der „peak to peak“ Amplituden der in dieser Region abgeleiteten unipolaren Elektrogramme berechnet. Die mechanischen Karten wurden ermittelt, indem die Funktion des linear local shortening (= LLS, lineare lokale Verkürzung) als Maß der Kontraktilität benutzt wurde. LLS (p) ist die durchschnittliche lokale Verkürzung der Abstände eines Punktes zu den endokardialen Nachbarn und ist umso größer, je mehr die Abstände der benachbarten Punkte in der Systole abnehmen. LLS wird kleiner bzw. negativ, wenn die Abstände der umliegenden Punkte während der Systole größer werden. Die unipolaren Elektrogrammamplituden und die lokalen Verkürzungen wurden für die jeweiligen Regionen gemittelt. Für die Auswertung des local shortening und der unipolaren Elektrogramme erfolgte eine Zusammenfassung der septalen, anterioren, lateralen und posterioren Regionen. Anhand der durch das Mapping gewonnenen anatomischen Informationen ist zusätzlich das enddiastolische und endsystolische Volumen, das Schlagvolumen und die Ejektionsfraktion berechnet worden.

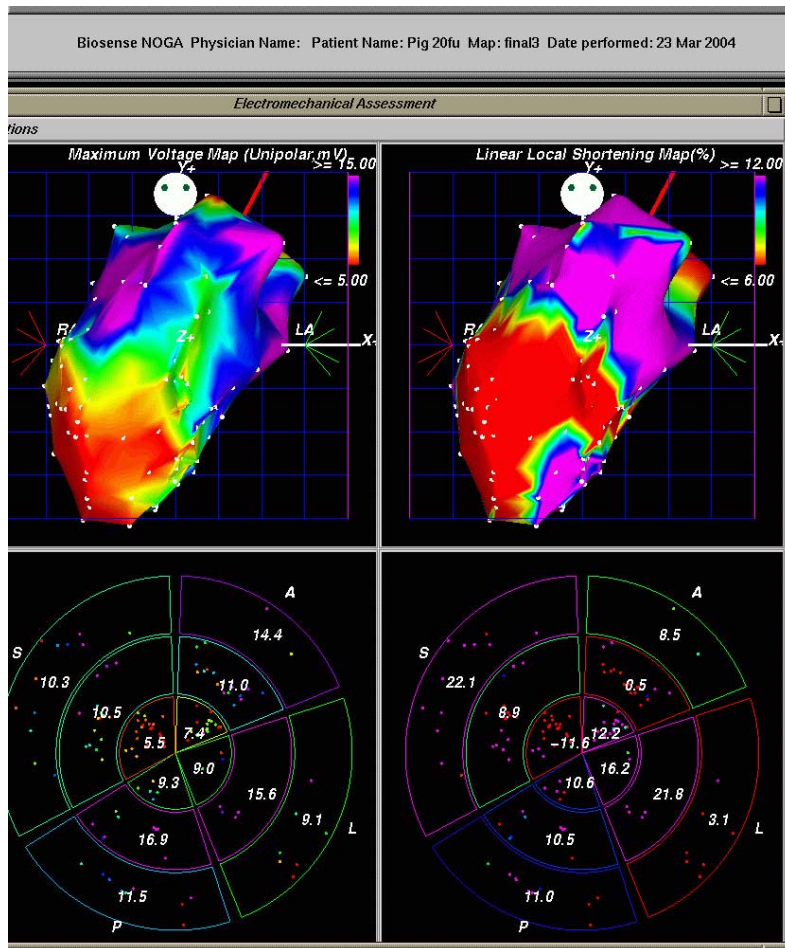


Abb. 3:

Elektromechanisches endokardiales Mapping

Elektromechanische linksventrikuläre Karten eines Versuchstieres (follow-up). Darstellung der maximalen unipolaren elektrischen Spannung (mV, links oben) und der linearen lokalen Verkürzung (% , rechts oben). Unten Darstellung der einzelnen Regionen in Bulls-eye Projektion (S= septal, A= anterior, L= lateral und P= posterior).

2.4. Transendokardiale SDF Injektion

Zwei Wochen nach Infarktinduktion wurden die Versuchstiere wie beschrieben prämediziert, sediert, intubiert, beatmet und am Tisch fixiert. Das endokardiale elektromechanische Mapping ermöglichte das NOGA™ System (Biosense Webster, Cordis, Johnson & Johnson) durch eine liegende 8F Schleuse (Koch 2001). Nachdem eine komplette elektromechanische Karte durch endokardiales Abtasten des Ventrikels mit dem NOGA-Katheter (Biosense Webster, Cordis, Johnson & Johnson) aufgezeichnet worden war, wurde bei der Verumgruppe (n=12) menschliches SDF (Peprotec, Rocky-Hill, NJ) durch den Mapping-/Injektionskatheter Myo-Star des NOGA-Systems (Biosense Webster, Cordis, Johnson & Johnson) in das Myokard appliziert (siehe Abb. 4: NOGA-Injektionskatheter). Pro Schwein erfolgten 18 langsame Injektionen (5µg SDF in 100µml NaCl Lösung, etwa 20 Sekunden pro Injektion) in die Infarkt- und Periinfarktregion (Smits 2002). Die Injektionen wurden nur durchgeführt, wenn die Katheterspitze senkrecht zum linksventrikulären

Endokard ($\pm 30^\circ$) stand, eine loop stability von < 2 mm erreicht wurde und das Ausfahren der Nadel in das Myokard eine ventrikuläre Extrasystole auslöste. Die erzeugte ventrikuläre Extrasystole, die konstante loop stability und die Lage der Katheterspitze gelten als qualitätssichernde Kriterien einer korrekten endokardialen Injektion (Ripa 2006).

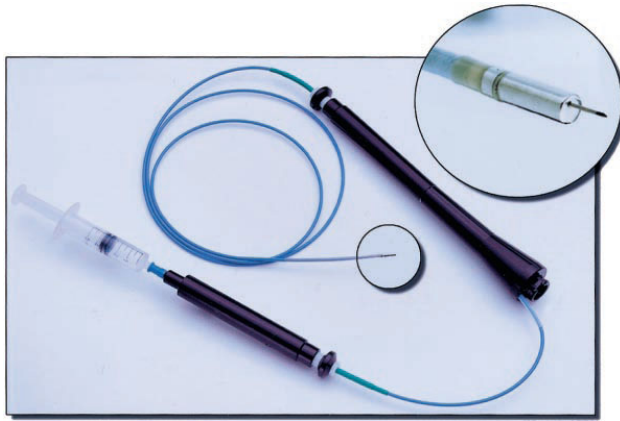


Abb. 4: NOGA-Injektionskatheter

Der elektrophysiologische Myo-Star Katheter mit der ausfahrbaren Nadel zur transendokardialen SDF-Applikation (aus (Perin 2003)).

Die Aufzeichnung der Injektionsstellen erfolgte mit dem NOGA-System (siehe Abb. 5: Elektromechanisches Mapping: Injektionen). Bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe (n=8) erfolgte dieselbe Prozedur ohne Injektion. Echokardiographisch wurde anschließend ein Perikarderguß und eine Ruptur ausgeschlossen.

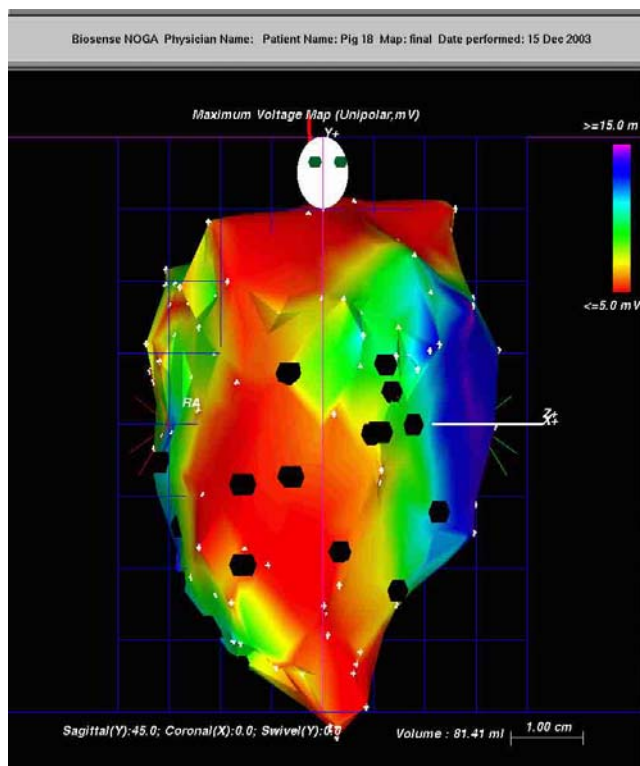


Abb. 5: Elektromechanisches Mapping: Injektionen

Unipolare Elektrogrammamplitude des linken Ventrikels eines Tieres nach SDF Injektion. Die Farbskala ist von 5 mV (rot, niedrigste endokardiale Spannung) bis zu 15 mV (violett, höchste endokardiale Spannung) gewählt. Die schwarzen Punkte im Infarkt- und Perinfarktgebiet kennzeichnen die transendokardialen SDF-Injektionsstellen.

2.5. Pathologie

Am letzten Untersuchungstag, sieben Wochen nach Infarktsetzung, wurde bei den Versuchstieren erneut der linke Ventrikel elektromechanisch und echokardiographisch, wie oben beschrieben, untersucht. Zusätzlich wurden nuklearmedizinische Untersuchungen durchgeführt.

Nach der Euthanasierung der Schweine durch einen Narcoren-Bolus von 30 ml wurde das Herz via Sternotomie rasch aus dem Brustkorb entnommen und makroskopisch begutachtet (siehe Abb. 6: Infarkt).



Abb. 6: Infarkt

Makroskopisches Bild des Herzens eines Versuchstieres. Der Apex Cordis ist sichtbar infarziert. Die periphere linke Koronararterie und einige Diagonaläste sind durch die Mikroembolisation mit Agarosegelkugeln blau gefärbt.

Anschließend wurde es von koagulierte Blut befreit und in 6-7 möglichst dünne Scheiben ($d = 4-15$ mm) senkrecht zur Herzachse geschnitten. Angefangen mit der Herzspitze wurde jede zweite Scheibe für die Triphenyltetrazoliumchlorid Färbung verwendet (1,3,5-Triphenyltetrazolium formazan, TTC, Fa. Sigma-Aldrich). Die übrigen Scheiben wurden zur histologischen Aufarbeitung in 3,5% Formalin fixiert. Für die TTC-Färbung wurden die Scheiben 20 Minuten unter ständigem Schwenken bei 37° Celsius in TTC-Lösung (1 g TTC in 100 ml PBS) inkubiert. Bei diesem Vorgang färbt sich das vitale Gewebe rot an, avitale Zellen nehmen keinen Farbstoff auf (siehe Abb. 7: Tetrazolium). Die Färbung beruht auf der Eigenschaft von Dehydrogenasen, mit den Tetrazoliumsalzen zu reagieren und ein Formazanpigment zu bilden (Nachlas 1963; Klein HH 1981). Diese Methode ist etabliert, um vitales von avitalem Gewebe zu unterscheiden (Fishbein 1981).

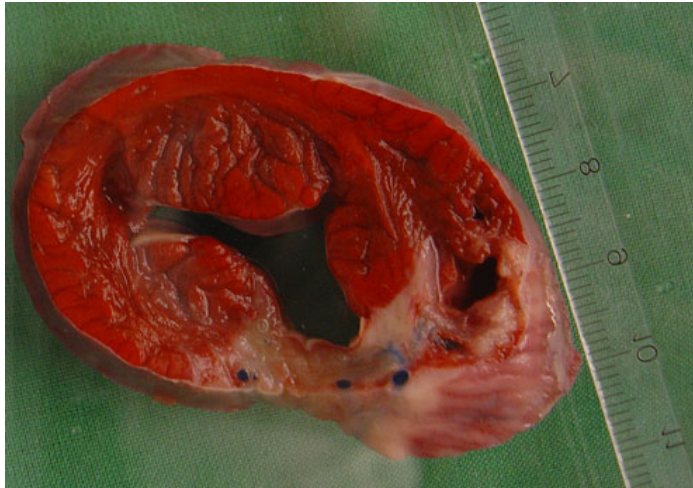


Abb. 7: Tetrazolium

Herzscheibe eines Versuchstieres nach Tetrazolium Färbung. Das vitale Gewebe wird durch die Reaktion von Dehydrogenasen mit den Tetrazoliumsalzen rot gefärbt, das infarzierte, nekrotische Narbengewebe stellt sich weiß dar.

Die mit TTC gefärbten Scheiben wurden ebenfalls in 3,5% Formalin eingelegt, digital fotografiert und computergestützt planimetrisch vermessen. Dazu wurde eine Herzscheibe zwischen zwei Plexiglasscheiben gelegt und auf eine gleichmäßige Dicke gepresst. Die Dicke wurde durch millimeterdicke Abstandhalter bestimmt, welche die Plexiglasscheiben auseinander hielten. Die Infarktgröße wurde auf den digital fotografierten Bildern mittels einer Bildauswertungs-Software (UTHSCSA ImageTool) planimetrisch ausgemessen. Durch Multiplikation mit der jeweiligen Dicke der Scheiben erhielt man das Infarktvolumen. Die auf diese Weise errechneten Infarktvolumina bzw. Muskelvolumina der einzelnen Scheiben eines Herzens wurden addiert. Dadurch ist das Muskelvolumen und das Infarktvolumen des Herzens absolut und in Relation zueinander bestimmt worden. Die planimetrische Messung und Auswertung der Daten erfolgte ohne Wissen über Zuordnung der beiden Versuchsgruppen.

2.6. Histologie

Die histologischen Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Gefäßdichte und gegebenenfalls eine Revaskularisierung darzustellen und zu analysieren. Die Gefäße wurden durch Färbung des von-Willebrand-Faktor (vWF oder Faktor VII), der in endothelialen Zellen exprimiert wird und mit deren Anzahl korreliert, immunhistochemisch dargestellt. Weiterhin wurden histologische Schnitte angefertigt um den Kollagengehalt zu bestimmen sowie Entzündungszellen nachzuweisen (diese Daten werden hier nicht beschrieben).

Die Herzpräparate wurden nach Formalinfixierung mittels eines Einbettautomaten 12 Stunden lang paraffiniert und nach entsprechender Abkühlung, mit einem Mikrotom in 5 µm dicke Präparate geschnitten. Diese wurden auf Objektträger gezogen und in folgender absteigender Alkoholreihe entparaffiniert: zweimal 15 Minuten Xylol, zweimal 5 Minuten 100% Alkohol, 5 Minuten 96% Alkohol, 5 Minuten 70% Alkohol. Dann wurden die Präparate, nachdem sie 5 Minuten in Phosphat Buffer Solution (PBS) eingestellt worden waren, mit einem hydrophoben Pap-Pen umrandet, um die zu inkubierenden Lösungen besser auf dem Objektträger zu fixieren. Die Immunhistologiefärbung wurde in Anlehnung an das Protokoll von DAKO EnVision System, Alkaline Phosphatase (K1396, DakoCytomation Ca, USA) durchgeführt. Auf jedem Objektträger fand sich Platz für ein mit primärem Antikörper inkubiertes Präparat sowie für eine Negativkontrolle, so dass jeweils die korrekte immunhistologische Färbung kontrolliert wurde (siehe Abb. 8: Histologie). Der Primärantikörper anti-Faktor VIII (polyclonal Rabbit anti-Human factor VII-related Antigen, DakoCytomation CA, USA) beziehungsweise die Negativkontrolle (DakoCytomation CA, USA) wurden so aufgetragen, dass das Präparat ausreichend bedeckt wurde. Es folgte die Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nachdem die Objektträger kurz mit PBS ausgewaschen worden waren, wurde der Sekundärantikörper (Alkaline Phosphatase labelled Polymer aus Dako EnVision System) appliziert und erneut für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit PBS abgewaschen und Fast Red aufgetragen (Substrate Chromogen Solution aus DAKO EnVision System, Alkaline Phosphatase). Dieses färbt den an den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörper rotfluoreszierend an. Die Lösung wurde 10 Minuten auf dem Präparat belassen und, nachdem mit PBS gespült worden war, Vecta-shield als mounting Medium appliziert.

Die angefärbten Gefäße der mikroskopischen Präparate wurden manuell ausgezählt (pro Versuchstier 40 ± 4 verschiedene Gesichtsfelder) und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMLB) digital fotografiert (siehe Abb. 8 Histologie). Die Zählung der Gefäße erfolgte ohne das Wissen der jeweiligen Gruppenzugehörigkeit.

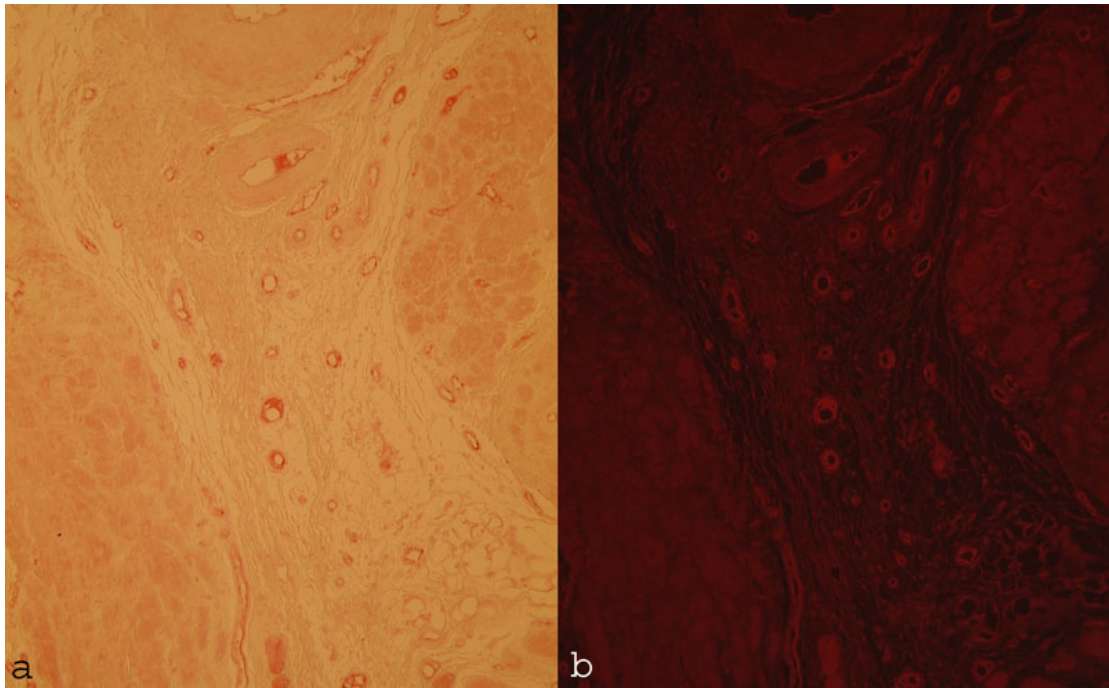


Abb. 8: Histologie

Mikroskopisches Bild des Infarkttrandbereiches eines Schweines: Repräsentatives histologisches Bild einer VWF Färbung. Angefärbt wurden jeweils von-Willebrand-Faktor präsentierende endotheliale Zellen. Das intakte Herzmuskelgewebe durchsetzt von Bindegewebe ist deutlich zu erkennen.

a. Gesichtsfeld ohne Fluoreszenz. b. Gesichtsfeld unter dem Fluoreszenzmikroskop.

3. Statistik

Die Ergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert $\pm$ SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Unterschiede zwischen der SDF- und Kontrollgruppe wurden nach Berechnung der Differenzen zwischen follow-up und baseline durch den Student's t-Test für unverbundene Stichproben überprüft. Unterschiede zwischen baseline und follow-up derselben Gruppe wurden durch den Student's t-Test für verbundene Stichproben analysiert. Die Normalverteilung der Daten wurde durch den Kolmogorov-Smirnov Test überprüft, um die parametrische Vorgehensweise zu verifizieren. Für die segmentale Analyse wurde eine mehrfaktorielle multivariate Varianzanalyse ANOVA (Analysis of variance) benutzt. Pearsons Korrelationskoeffizienten wurden bestimmt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5% galt als signifikant (p-Wert $<0,05$). Die statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS 12.0.1 (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Tierexperimentelle Instrumentation

In die Studie gingen von 34 Versuchstieren 20 in die Auswertung ein. Bei 34 Schweinen wurde eine akute myokardiale Ischämie durch Mikroembolisation der distalen linken Koronararterie, wie oben beschrieben, ausgelöst. Kurz nach der Induktion des Infarktes verstarben 13 Tiere (38%) an therapierefraktärem Kammerflimmern und kardiogenem Schock. Ein Tier der SDF Gruppe verstarb 7 Wochen nach Infarkt während des follow-up Mappings.

Der Infarkt war bei allen Tieren nach Mikroembolisation des distalen Ramus interventricularis anterior (RIVA) im anteroseptalen Bereich lokalisiert. Der erfolgreiche Verschluss der peripheren linken Koronararterie wurde durch koronarangiographische Bilder dokumentiert (siehe Abb. 9: Koronarangiographie).

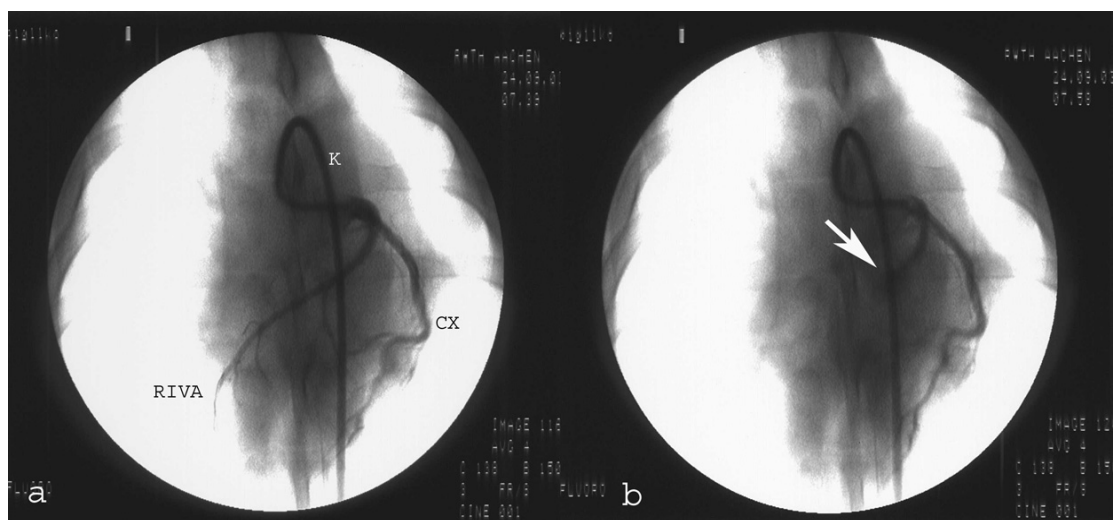


Abb. 9: Koronarangiographie

Koronarangiographie eines Versuchstieres in anteroposteriorer Projektion.

a: vor Infarkt (RIVA =Ramus interventricularis anterior, CX =Ramus circumflexus, K =Herzkatheter im Ostium der linken Kranzarterie).

b: nach Infarktinduktion durch Mikroembolisation. Der Pfeil zeigt auf den Verschluss des RIVA.

Bei 20 Versuchstieren konnte die Studie erfolgreich abgeschlossen werden: 12 Versuchstiere erhielten 2 Wochen nach Infarkt eine transendokardiale SDF Injektion, 8 Tiere bekamen dieselbe Infarktprozedur, jedoch ohne kathetergestützte Injektion und dienten somit als Kontrolltiere.

Kein Tier zeigte während des gesamten Versuchsablaufes klinische Anzeichen für eine Infektion und bei keinem Versuchstier konnten vor oder nach Infarktinduktion bzw. SDF-Applikation Auffälligkeiten im Sinne von Apathie oder Nahrungsverweigerung festgestellt werden.

4.2. Elektromechanisches Mapping

Das elektromechanische Mapping wurde zwei sowie sieben Wochen nach Infarktinduktion durchgeführt. Bei der baseline Untersuchung (2 Wochen nach Infarkt) wurden 130 ± 12 endokardiale Punkte und bei der Untersuchung nach 7 Wochen (follow-up) 125 ± 18 endokardiale Punkte gespeichert und in die Wertung einbezogen (kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen).

Enddiastolisches Volumen, endsystolisches Volumen, Schlagvolumen sowie die Ejektionsfraktion wurde durch die Workstation des Systems zu den beiden Zeitpunkten (baseline, follow-up) berechnet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte ohne Wissen über die Zugehörigkeit zu den beiden Versuchsgruppen.

4.2.1. Enddiastolische und endsystolische Volumina

Nach 2 Wochen betrug das enddiastolische Volumen (EDV) 79 ± 5 ml für die Kontrollgruppe und 76 ± 4 ml für die SDF-Gruppe. In der follow-up Untersuchung zeigte sich ein enddiastolisches Volumen von 92 ± 9 ml (Kontrollgruppe) bzw. 79 ± 4 ml (SDF-Gruppe). Das endsystolische Volumen (ESV) betrug nach 2 Wochen 48 ± 4 ml in der Kontrollgruppe und 43 ± 3 ml bei den mit SDF behandelten Tieren, nach 7 Wochen errechnete sich ein ESV von 56 ± 6 ml für die Kontrolltiere und 50 ± 5 ml für die SDF-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der enddiastolischen und endsystolischen Volumina wurde nicht beobachtet (siehe Tabelle 2: Elektromechanisches Mapping: EDV und ESV).

Tabelle 2: Elektromechanisches Mapping: EDV und ESV

Kontroll- und SDF-Gruppe nach 2 (baseline) und 7 Wochen (follow-up). Volumina in ml, jeweils Mittelwert $\pm$ SEM. ns = nicht signifikant.

	Kontrolle	SDF-1	p	p Differenz
Enddiastolisches Volumen (ml)				
baseline	79 $\pm$ 5	76 $\pm$ 4	ns	
follow-up	92 $\pm$ 9	79 $\pm$ 4	ns	
p	ns	ns		ns
Endsystolisches Volumen (ml)				
baseline	48 $\pm$ 4	43 $\pm$ 3	ns	
follow-up	56 $\pm$ 6	50 $\pm$ 5	ns	
p	ns	ns		ns

4.2.2. Schlagvolumen und Ejektionsfraktion

Das Schlagvolumen blieb bei den mit SDF behandelten Schweinen unverändert (33 $\pm$ 2 ml in der baseline und 30 $\pm$ 4 ml in der follow-up Untersuchung) und zeigte einen Trend zur Verbesserung in der Kontrollgruppe (31 $\pm$ 4 ml nach 2 Wochen und 48 $\pm$ 6 ml nach 7 Wochen). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war signifikant (siehe Tabelle 3: Elektromechanisches Mapping: Schlagvolumen und Ejektionsfraktion und Abb. 10: Elektromechanisches Mapping: Schlagvolumen).

Tabelle 3: Elektromechanisches Mapping: Schlagvolumen und Ejektionsfraktion

Kontroll- und SDF-Gruppe nach 2 (baseline) und 7 (follow-up) Wochen, jeweils Mittelwert $\pm$ SEM. ns= nicht signifikant.

	Kontrolle	SDF-1	p	p Differenz
Schlagvolumen (ml)				
baseline	31 $\pm$ 4	33 $\pm$ 2	ns	
follow-up	48 $\pm$ 6	30 $\pm$ 4	<0,05	
p	ns	ns		<0,05
Ejektionsfraktion (%)				
baseline	39 $\pm$ 4	43 $\pm$ 2	ns	
follow-up	46 $\pm$ 3	38 $\pm$ 4	ns	
p	ns	ns		0,05

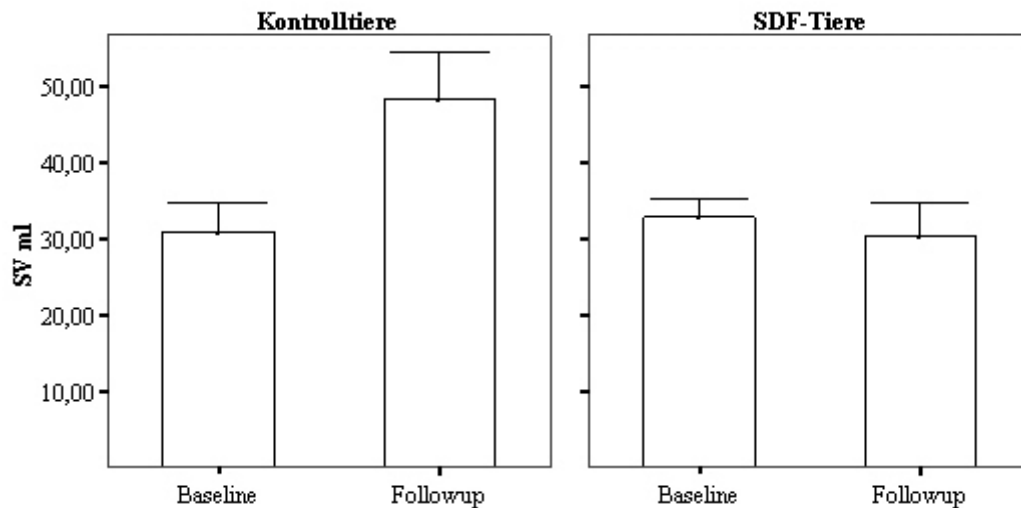


Abb. 10: Elektromechanisches Mapping: Schlagvolumen

Das Schlagvolumen in der follow-up Untersuchung zeigt einen Trend zur Verbesserung in der Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war signifikant. SV= Schlagvolumen. Balken stellen Mittelwerte dar, Fehlerbalken den SEM.

Die Ejektionsfraktion zeigte in der Kontrollgruppe einen Trend zur Verbesserung von $39 \pm 4\%$ nach 2 Wochen auf $46 \pm 3\%$ nach 7 Wochen, während sie sich in der SDF Gruppe tendenziell eher verringerte (EF von $43 \pm 2\%$ baseline auf $38 \pm 4\%$ follow-up, $p = \text{ns}$). Der Unterschied zwischen den Gruppen zeigte einen starken Trend ($p = 0,05$) (siehe Abb. 11: Elektromechanisches Mapping: Ejektionsfraktion und Tabelle 3: Elektromechanisches Mapping: Schlagvolumen und Ejektionsfraktion).

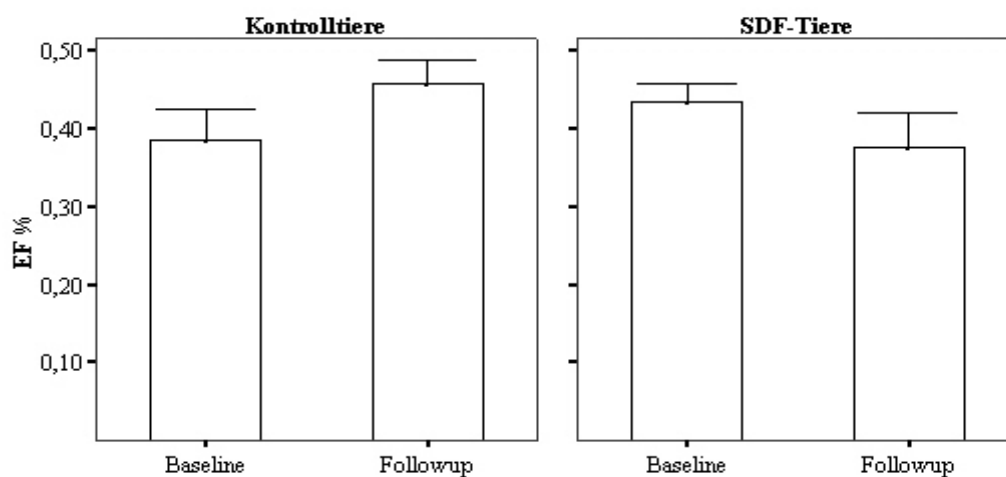


Abb. 11: Elektromechanisches Mapping: Ejektionsfraktion

Die Ejektionsfraktion in der Kontrollgruppe zeigte einen Trend zur Verbesserung, während in der SDF Gruppe eine Tendenz zur Verschlechterung dokumentiert wurde. EF= Ejektionsfraktion. Balken stellen Mittelwerte dar, Fehlerbalken den SEM.

4.2.3. Herzminutenvolumen und Herzfrequenz

Die Auswertung des Herzzeitvolumens zeigte in der Kontrollgruppe einen Trend zum Anstieg von $3,0 \pm 0,4$ l/min auf $4,2 \pm 0,5$ l/min und in der SDF-Gruppe eine Tendenz zur Verringerung von $3,0 \pm 0,2$ l/min auf $2,8 \pm 0,4$ l/min. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen war nicht signifikant.

Auch die Herzfrequenz war während der baseline Untersuchung in beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (94 ± 4 /min in der Kontrollgruppe und 92 ± 2 /min in der SDF-Gruppe). In der Kontrollgruppe hingegen fand sich in der follow-up Untersuchung eine signifikante Verringerung der Herzfrequenz. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war signifikant (siehe Tabelle 4: Elektromechanisches Mapping: Herzzeitvolumen und Herzfrequenz).

Tabelle 4: Elektromechanisches Mapping: Herzzeitvolumen und Herzfrequenz

Kontroll- und SDF-Gruppe nach 2 (baseline) und 7 (follow-up) Wochen. ns= nicht signifikant.

	Kontrolle	SDF-1	p	p Differenz
Herzzeitvolumen (l/min)				
baseline	$3,0 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,2$	ns	
follow-up	$4,2 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,4$	ns	
p	ns	ns		0,06
Herzfrequenz (1/min)				
baseline	94 ± 4	92 ± 2	ns	
follow-up	86 ± 4	93 ± 2	ns	
p	<0,05	ns		<0,05

4.2.4. Elektrogrammamplitude

Die Werte der unipolaren Elektrogrammamplituden wurden für jede der 12 Regionen pro Versuchstier zusammengefasst (Mittelwert). Die globalen Werte der unipolaren Elektrogramme wurden durch die Mittelung der Elektrogrammamplituden aller 12 Regionen pro Tier errechnet und als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben (siehe Tabelle 5: Elektromechanisches Mapping: Globale unipolare Elektrogrammamplitude). Für die segmentale Analyse der unipolaren Elektrogramme wurden die Segmente als Mittelwert $\pm$ SEM zusammengefasst (siehe Tabelle 6: Elektromechanisches Mapping: Segmentale Analyse der unipolaren Elektrogramme).

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der globalen und der segmentalen Elektrogrammamplituden zwischen den Versuchsgruppen.

Tabelle 5: Elektromechanisches Mapping: Globale unipolare Elektrogrammamplitude

Kontroll- und SDF-Gruppe nach 2 (baseline) und 7 Wochen (follow-up) in mVolt. ns= nicht signifikant.

	Kontrolle	SDF-1	p	p Differenz
Unipolar Voltage (mV)				
baseline	10,4 ± 1,0	10,7 ± 0,6	ns	
follow-up	9,7 ± 0,6	9,6 ± 0,5	ns	
p	ns	ns		ns

Tabelle 6: Elektromechanisches Mapping: Segmentale Analyse der unipolaren Elektrogramme.

Kontroll- und SDF-Gruppe nach 2 und 7 Wochen in mVolt, Mittelwert ± SEM.

	Septal	Anterior	Lateral	Posterior
Kontrollgruppe				
baseline	8,9 ± 0,5	10,8 ± 1,2	10,4 ± 1,4	11,5 ± 1,4
follow-up	8,7 ± 0,5	11,0 ± 1,2	9,2 ± 0,5	10,2 ± 0,8
SDF-Gruppe				
baseline	9,7 ± 1,0	11,2 ± 0,8	10,1 ± 0,7	11,4 ± 0,8
follow-up	9,4 ± 0,5	11,3 ± 0,7	8,6 ± 0,7	9,0 ± 0,7

4.2.5. Lineare lokale Verkürzung

Die Werte der linearen lokalen Verkürzung als zusätzlicher Parameter der linksventrikulären Funktion wurden für jede der 12 Regionen pro Versuchstier zusammengefasst (Mittelwert).

Die globalen Werte der linearen lokalen Verkürzung sind durch die Mittelung der Werte aller 12 Regionen pro Tier errechnet worden und als Mittelwert ± SEM angegeben. Für die segmentale Analyse der linearen lokalen Verkürzung wurden die jeweiligen Segmente als Mittelwert ± SEM zusammengefasst.

Die lineare lokale Verkürzung veränderte sich in der Kontrollgruppe nicht ($11,4 \pm 1,3\%$ nach 2 Wochen und $11,5 \pm 0,5\%$ nach sieben Wochen, $p = ns$). In der SDF-Gruppe zeigte sich jedoch eine signifikante Verringerung der linearen lokalen Verkürzung ($12,1 \pm 0,9\%$ nach zwei Wochen und $8,4 \pm 0,9\%$ nach sieben Wochen, p

<0,05). Der Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen war signifikant ($p < 0,05$, siehe Tabelle 7: Elektromechanisches Mapping: Lineare lokale Verkürzung).

In der segmentalen Analyse zeigte sich in den lateralen und posterioren Segmenten ein Rückgang der linksventrikulären Funktion (lateral $13,9 \pm 1,8\%$ auf $7,3 \pm 2,2\%$, $p < 0,05$; posterior $13,1 \pm 1,3\%$ auf $8,6 \pm 0,9\%$, $p < 0,05$, siehe Tabelle 8: Elektromechanisches Mapping: Segmentale Analyse der lokalen Verkürzung).

Tabelle 7: Elektromechanisches Mapping: Lineare lokale Verkürzung

Kontroll- und SDF-Gruppe zur baseline und follow-up Untersuchung in Prozent, Mittelwert $\pm$ SEM. ns= nicht signifikant.

	Kontrolle	SDF-1	p	p Differenz
Lineare lokale Verkürzung (%)				
baseline	$11,4 \pm 1,3$	$12,1 \pm 0,9$	ns	
follow-up	$11,5 \pm 0,5$	$8,4 \pm 0,9$	$<0,05$	
p	ns	$<0,05$		$<0,05$

Tabelle 8: Elektromechanisches Mapping: Segmentale Analyse der lokalen Verkürzung.

Kontroll- und SDF-Gruppe zur baseline und follow-up Untersuchung in Prozent, Mittelwert $\pm$ SEM.

	Septal	Anterior	Lateral	Posterior
Kontrollgruppe				
baseline	$9,5 \pm 1,2$	$10,9 \pm 2,1$	$14 \pm 1,4$	$11,1 \pm 1,4$
follow-up	$8,2 \pm 1,4$	$11,3 \pm 1,1$	$13,5 \pm 1,3$	$13,2 \pm 0,7$
SDF-Gruppe				
baseline	$9,1 \pm 1,4$	$12,1 \pm 1,1$	$13,9 \pm 1,8$	$13,1 \pm 1,3$
follow-up	$6,5 \pm 1,1$	$11,3 \pm 2,1$	$7,3 \pm 2,2$	$8,6 \pm 0,9$

Eine signifikante Korrelation ergab sich zwischen der Ejektionsfraktion bzw. dem Schlagvolumen und der linearen Verkürzung für die baseline und die follow-up Untersuchung (EF und LLS baseline $r = 0,71$, follow-up $r = 0,49$, SV und LLS baseline $r = 0,59$, follow-up, $r = 0,46$). Die Veränderung in der lokalen Verkürzung korrelierte ebenfalls mit den Veränderungen des Schlagvolumens ($r = 0,46$) und der Ejektionsfraktion ($r = 0,52$). Keine Korrelation ergab sich zwischen der lokalen Verkürzung und dem enddiastolischen Volumen oder zwischen dem enddiastolischen Volumen und der Ejektionsfraktion (EDV und LLS baseline $r = -0,03$, follow-up, $r = 0,12$, EF und EDV baseline $r = -0,04$, follow-up $r = 0,05$).

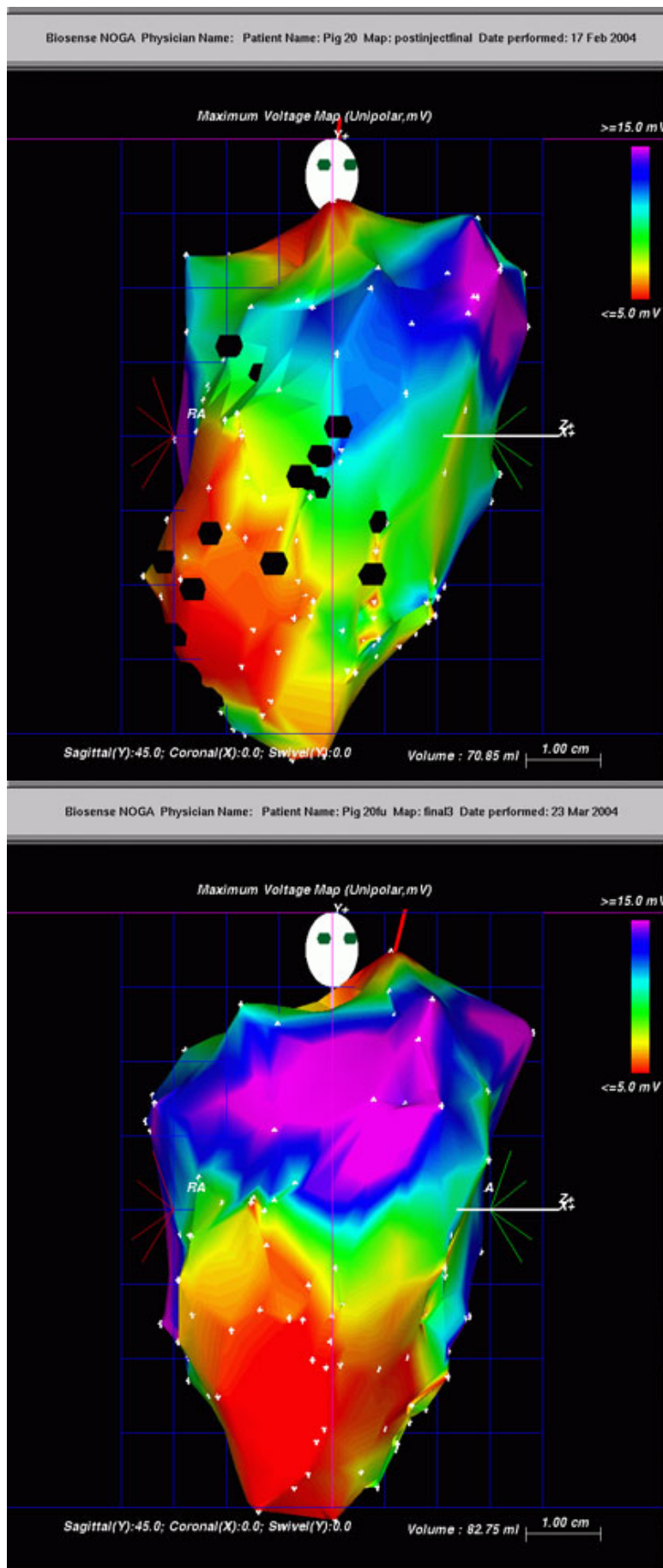


Abb.

12:

Elektromechanisches Mapping, unipolare Elektrogrammamplituden.

Darstellung der elektromechanischen Karte des linken Ventrikels eines Versuchstieres der SDF-Gruppe in RAO (right anterior oblique)-Projektion. Der Farbbereich wurde von 5 mV (rot, niedrigste endokardiale Spannung) bis zu 15 mV (violett, höchste endokardiale Spannung) gewählt. Das rote Areal repräsentiert das durch Mikroembolisation erzeugte Infarktgebiet.

Obere Abbildung: Linker Ventrikel nach SDF-Injektion bei der baseline Untersuchung (2 Wochen nach Infarktsetzung). Die schwarzen Punkte im Infarkt- und Periinfarktbereich kennzeichnen die kathetergestützten transendokardialen SDF-Injektionsstellen.

Untere Abbildung: Gleiches Versuchstier bei der follow-up Untersuchung (7 Wochen nach Infarktsetzung).

4.3. Pathologie

Der Myokardinfarkt war bei allen Versuchstieren anteroseptal lokalisiert. Die Infarktgröße in Prozent des Muskelvolumen des linken Ventrikels betrug $8,9 \pm 3,1\%$ in der Kontrollgruppe und $8,9 \pm 1,2\%$ in der SDF-Gruppe (kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen, siehe Abb. 13: Infarktvolumen). Das linksventrikuläre Muskelvolumen ($82,9 \pm 14,4$ ml Kontrollgruppe vs. $95,6 \pm 9,7$ ml SDF-Gruppe) sowie das Infarktvolumen ($6,4 \pm 1,9$ ml Kontrollgruppe vs. $8,3 \pm 1,2$ ml SDF-Gruppe) war in beiden Versuchsgruppen ähnlich (kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, siehe Tabelle 9: Ergebnisse der Tetrazoliumfärbung).

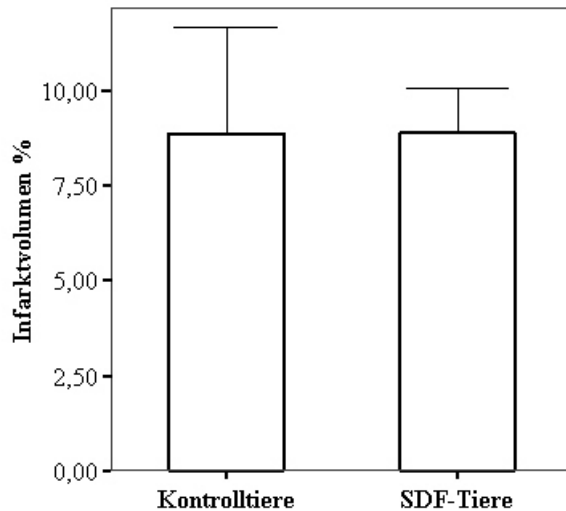


Abb. 13: Infarktvolumen

Das Infarktvolumen (%) des Herzmuskels zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Balken stellen Mittelwerte dar, Fehlerbalken den SEM.

Tabelle 9: Ergebnisse der Tetrazoliumfärbung

Muskel- und Infarktvolumen in ml sowie Infarktvolumen in Prozent der Muskelmasse der Kontroll- und SDF-Gruppe, jeweils Mittelwert $\pm$ SEM, ns= nicht signifikant .

	Muskelvolumen (ml)	Infarktvolumen (ml)	Infarktvolumen (%)
Kontrollgruppe	$82,9 \pm 14,4$	$6,4 \pm 1,9$	$8,9 \pm 3,1$
SDF-Gruppe	$95,6 \pm 9,7$	$8,3 \pm 1,2$	$8,9 \pm 1,2$
p	ns	ns	ns

4.4. Histologie

Die Gefäße im Infarkt- und Infarkttrandgebiet wurden sieben Wochen nach Infarkt durch Färbung des von-Willebrand-Faktors (vWF) immunhistochemisch dargestellt. Pro Versuchstier wurden 40 ± 4 Gesichtsfelder manuell ausgezählt (siehe Abb. 15: Immunhistochemie). In der SDF-Gruppe fanden sich 349 ± 17 vWF positive Gefäße pro mm^2 , während in der Kontrollgruppe 276 ± 21 Gefäße pro mm^2 nachweisbar waren. Der Unterschied zwischen den Gruppen war signifikant ($p < 0,05$; siehe Abb. 14: vWF positive Gefäße).

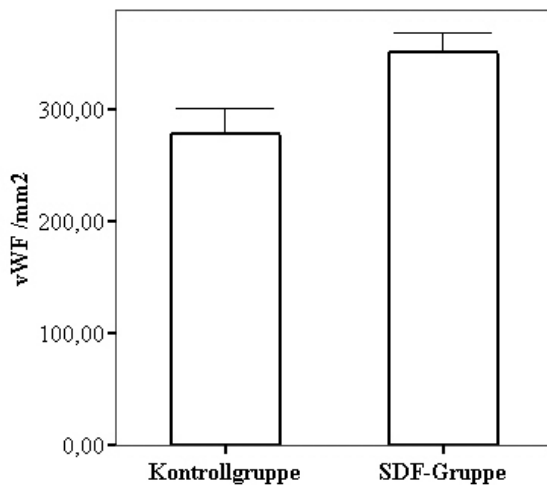


Abb. 14: vWF positive Gefäße.

Von-Willebrand-Faktor (vWF) positive Gefäße (pro mm^2). In der SDF-Gruppe zeigte sich eine signifikant höhere Gefäßdichte verglichen mit der Kontrollgruppe ($349 \pm 17 /\text{mm}^2$ vs. $276 \pm 21 /\text{mm}^2$, $p < 0,05$). Balken stellen Mittelwerte dar, Fehlerbalken den SEM.

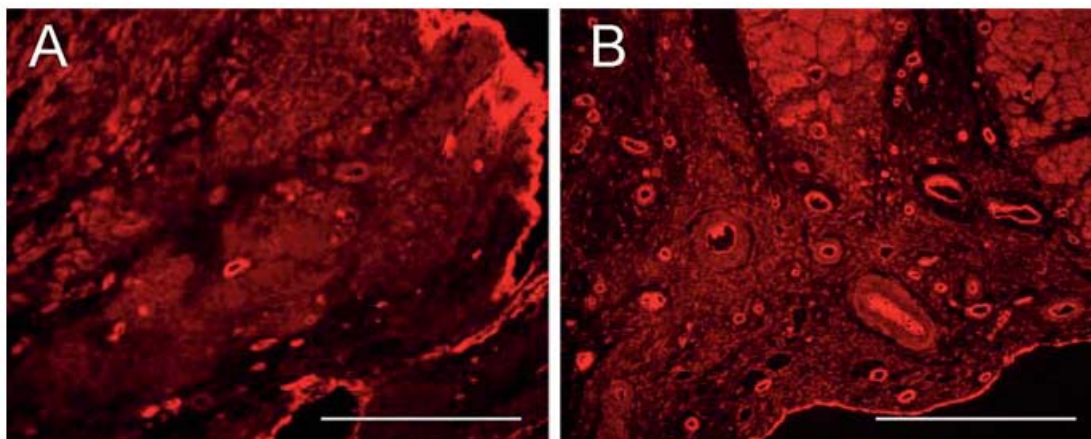


Abb. 15: Immunhistochemie

Immunhistochemische mikroskopische Bilder des Periinfarktgebietes von Versuchstieren der Kontrollgruppe (A) und der SDF-Gruppe (B). Vermehrte Gefäßdichte im Periinfarktgebiet des mit SDF-Injektionen behandelten Tieres. Der Maßstab repräsentiert 100 μm .

4.5. Komplikationen

Von insgesamt 34 Versuchstieren verstarben dreizehn Schweine (38%) am ersten Versuchstag während der Infarktprozedur durch therapierefraktäres Kammerflimmern oder kardiogenen Schock. Gründe hierfür waren meist ein proximaler Verschluss des RIVA evtl. auch mitbedingt durch Koronarspasmen. Ein Tier der SDF Gruppe verstarb 7 Wochen nach der Infarktinduktion aufgrund von therapierefraktären Herzrhythmusstörungen während des follow-up Mappings. Kammerflimmern bzw. –flattern trat nach erzeugtem Infarkt bei nahezu allen Versuchstieren auf und wurde durch sofortige Defibrillation behandelt. Bei vier Tieren der SDF-Versuchsgruppe wurde bei der Präparation des Herzens eine Perikarditis erkannt, zwei Tiere hatten einen hämodynamisch nicht signifikanten Perikarderguß (siehe Abb. 16: Perikarditis). Die Perikarditiden und Ergüsse wurden mikrobiologisch und histopathologisch nicht näher untersucht.

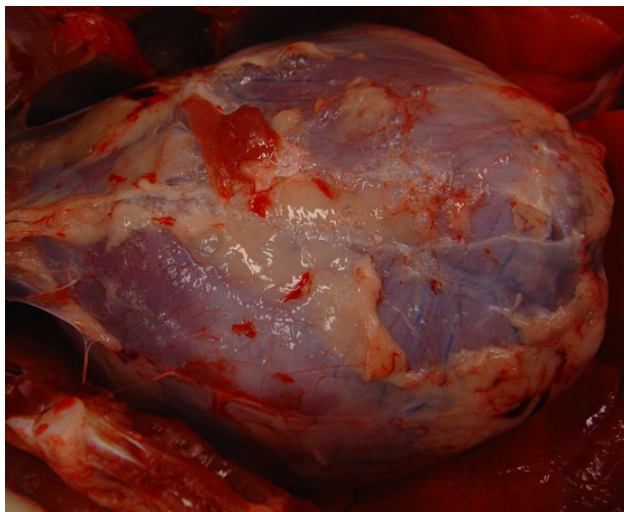


Abb. 16: Perikarditis

Makroskopisches Bild eines Herzens mit teilweise eröffnetem Perikardbeutel eines Versuchstiers bei der Präparation aus dem Brustkorb. Man erkennt eine fibrinöse Perikarditis.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit konnte nachweisen, dass die kathetergestützte transendokardiale Applikation von SDF im Herzinfarktmodell bei Schweinen die Gefäßdichte in der Periinfarktregion erhöht. Weiterhin konnte dargestellt werden, dass die Infarktgröße nach SDF-Injektion unverändert bleibt und dass die SDF-Applikation negative Auswirkung auf die linksventrikuläre Funktion hat.

5.1. Tierexperimentelle Instrumentation

In diese Studie gingen 20 von 34 Tieren in die Auswertung ein. 13 Versuchstiere verstarben während der akuten Phase des Infarktes an therapierefraktärem Kammerflimmern oder kardiogenem Schock. Schweine sind in Modellen myokardialer Ischämie gut vergleichbar mit den anatomischen und physiologischen Konstellationen des Menschen (White 1986). Bei der hohen Verlustrate von 38% in unserer Studie muss die Methode der Mikroembolisation zur Infarktinduktion kritisch hinterfragt werden. Weitere tierexperimentelle Modelle akuter myokardialer Ischämie verwenden die Methode der Ballonokklusion der Koronargefäße mit geringeren Verlusten (Sasano 2008; Schuleri 2008). Eine Verlustrate von nur 20% wurde in der tierexperimentellen Studie Horackovas dargestellt, wobei dort die chirurgische Ligatur der linken Koronararterie benutzt wurde um einen Infarkt auszulösen (Horackova 2004). Jedoch ist zudem bei Mikroembolisationsmodellen im Vergleich zu anderen Methoden der experimentellen Ischämieauslösung von anderen pathophysiologischen Zusammenhängen auszugehen, wie der reaktiven Hyperämie nach Mikroembolisation, der lokalen inflammatorischen Reaktion und der reduzierten ischämischen Toleranz (Grund 1999).

Nahezu alle Versuchstiere unserer Untersuchungsreihe erlitten schwerwiegende Herzrhythmusstörungen und prozedurbedingte Koronarspasmen. Ein Tier der SDF-Gruppe verstarb aufgrund von Kammerflimmern während der Mappingprozedur 7 Wochen nach der Infarktinduktion, wobei eine erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität nach transendokardialer Applikation eine mögliche Ursache darstellen könnte.

5.2. Elektromechanisches Mapping

Das nichtfluoroskopische endokardiale perkutane elektromechanische Mappingsystem, durch welches elektrische, anatomische und mechanische Informationen des Endokards in Echtzeit als dreidimensionale Karten geliefert werden, wurde in klinischen und tierexperimentellen Studien ausführlich untersucht. Zuerst wies Gepstein et al. auf die Genauigkeit der örtlichen Lagebestimmung des Katheters sowie der volumetrischen Berechnungen hin (Gepstein 1997). Weitere Studien untersuchten mittels elektromechanischem Mapping die elektrische und mechanische Aktivität des Herzens sowie den therapeutischen Nutzen bei verschiedenen Arrhythmien (Gepstein 1998; Natale 1998). Kornowski und Mitarbeiter verglichen erstmals endokardiale Elektrogrammamplituden vor und nach koronarer Okklusion bei Hunden und zeigten, dass sich die uni- und bipolaren Elektrogramm-Amplituden um die Hälfte verringerten. Ebenso reduzierte sich die lokale endokardiale Verkürzung nach 24 Stunden um 88% (Kornowski 1998). Ferner wurde festgestellt, dass die Größe der elektromechanisch ermittelten Infarktareale mit den histologisch, pathologisch und echokardiographisch ermittelten Größen übereinstimmen und dass sogar die Transmuralität eines Infarktes bestimmt werden kann (Lessick 2000; Wolf 2001). Das elektromechanische Mapping (EEM) hat sich als eine sensitive Technik erwiesen, um mechanische Veränderungen des linken Ventrikels darzustellen (Koch 2001; Lessick 2002; Jorgensen 2005). Andere Studien verglichen das NOGA-System mit nuklearmedizinischen bildgebenden metabolischen Verfahren, wie z.B. PET oder SPECT, und wiesen auf den Stellenwert des elektromechanischen Mappings in der kardiologischen Vitalitätsdiagnostik hin (Koch 2000; Koch 2001).

Die zahlreichen Studien, welche sich mit dem EEM beschäftigt haben, deuten auf die therapeutischen Möglichkeiten hin, die das Mappingsystem insbesondere in Kombination mit der kathetergestützten transendokardialen Injektion hat. Hierbei können Substanzen direkt in das durch elektrische, anatomische und mechanische Informationen charakterisierte Gewebe appliziert werden (Smits 2002; Kawamoto 2003). Die ersten Machbarkeits- und Sicherheitsstudien an Patienten über die NOGA-gesteuerte perkutane Applikation von VEGF (vascular Endothelial growth factor) kodierenden Genen publizierte die Gruppe um Isner et al. (Vale 2001). In der randomisierten, kontrollierten und geblindeten Studie Euroinject One wurde die

Technik der intramyokardialen Injektion mit einer 6mm langen Nadel des NOGA-Katheters am Menschen durchgeführt. Bei den Patienten, die während der Prozedur jederzeit hämodynamisch stabil waren, traten keine relevanten Arrhythmien oder Perikardergüsse auf (Kastrup 2005). Die Gruppe um Fuchs injizierte ebenfalls erfolgreich bei Tieren und Menschen durch den NOGA-Katheter transendokardial autologe Knochenmarkstammzellen (0,2 ml pro Injektion) in nichtinfarzierte, jedoch ischämische Areale und zeigte, dass sich die Perfusion und Funktion dadurch besserte (Fuchs 2001; Fuchs 2003). Zu erwähnen ist, dass das endokardiale Mappingsystem hohes manuelles Geschick erfordert. Das Trauma, das bei der Injektion entsteht, wird im allgemeinen als nicht relevant und die Methode der transendokardialen Applikation als sicher und unbedenklich beschrieben (Fuchs 2006). Denkbar ist, dass die injizierte Flüssigkeit bei zu großem Injektionsvolumen durch osmotische Effekte ein Ödem auslösen könnte. Ebenso kann eine zu große Injektionstiefe durch eine lange Nadel zu perikardialen Injektionen führen mit der Folge eines Perikardergusses oder einer Perikarditis. Die in unserer Studie bei der Sektion entdeckten Perikarditiden und Perikardergüsse sind nicht näher untersucht worden, könnten jedoch durch die oben beschriebenen Mechanismen entstanden sein.

5.3. Zellbasierte myokardiale regenerative Therapie

5.3.1. Adulte Stammzellen

Nach früherer Auffassung ist das Herz als postmitotisches Organ nicht in der Lage, sich selbst zu regenerieren (Bolli 2005). Dieses Dogma ist in der letzten Zeit jedoch aufgegeben worden. Ein viel versprechender Ansatz zur Regeneration von Myokard ist, wegen ihres Differenzierungspotentials und Selbsterneuerungsvermögens, die Behandlung mit pluripotenten Stammzellen. Autologe Stammzellen weisen pluripotente Merkmale auf und können sich in vitro und in vivo in diverse Gewebetypen differenzieren (Bolli 2005). Experimentelle Studien zeigen, dass der Transfer von Stamm- und Vorläuferzellen in verletztes Herzmuskelgewebe einen günstigen Effekt hinsichtlich der Gewebepfusion und der kontraktilen Leistung hat (Wollert 2005).

Die Unterscheidung der adulten körpereigenen Stammzellen in verschiedene Subklassen, wie die gewebespezifischen Stammzellen (tissue committed stem cells,

TCSC), hämatopoetischen Stammzellen (HSC), mesenchymalen Stammzellen (MSC), im Blut zirkulierenden Stammzellen (peripheral blood stem cells, PBSC), endothelialen Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPC), side population cells (SP), CXCR4 Rezeptor positive oder aber CXCR4 Rezeptor negative Stammzellen wirft die Frage auf, welche dieser endogenen Zellen die gewünschte myokardiale Regeneration am besten realisieren kann (Kamihata 2002; Dawn 2005). Die myokardialen Vorläuferzellen könnten einerseits sowohl aus ansässigen kardialen Stammzellen (resident cardiac stem cells, CSC) als auch aus zirkulierenden, von der Peripherie in das Herz migrierten Stammzellen entstehen (Anversa 2002). Undifferenzierte Zellen mit stammzellspezifischen Antigenen wurden im adulten Herzen identifiziert. Jede spezifische Subpopulation hat ihr eigenes Profil an Vorteilen, Limitationen und Praktikabilität unter den verschiedenen klinischen Gegebenheiten (Wollert 2005). Ein zukünftiger Ansatz könnten die gezielte Vermehrung und Aufbereitung der Zellen sein, so dass diese als Standardtherapeutika ohne Zeitverlust zur regenerativen Therapie gegeben werden könnten (Zimmet 2005).

5.3.2. Mobilisierung mittels SDF

Bei der Rekrutierung von Stamm- und Vorläuferzellen zur Angio- und Myogenese wird ein mehrdimensionaler Vorgang durchlaufen. Dabei spielt die Mobilisierung, die Rekrutierung, Chemosensibilisierung, Adhäsion, Transmigration, Gewebeeinfiltration und schließlich die Transdifferenzierung eine Rolle (Urbich 2004). Unter den bisher bekannten Chemokinen spielt das Protein Stromal-derived factor-1 α (SDF oder CXCL12), primär gebildet durch Bindegewebszellen des Knochenmarks, eine Schlüsselrolle in der Regulierung CD34 positiver Zellen (Aiuti 1997; Mohle 1998; Peled 1999). Es wurde gezeigt, dass SDF als wesentlicher Homingfaktor chemotaktisch auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen in vitro wirkt (Zou 1998). Dieses Homing der zirkulierenden hämatopoetischen Zellen ist ein Prozess, der nicht länger als 2 Tage dauert und das aktive Überschreiten der endothelialen Blut- und Knochenmarkbarriere in spezielle Nischen bedeutet (Lapidot 2005). Diese Nischen beschreiben ein spezielles Milieu innerhalb verschiedener Gewebe, charakterisiert durch diverse Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), Zelloberflächenmarker und Chemokine mit bestimmten dynamischen chemotaktischen Eigenschaften (Quesenberry 2005; Colmone 2008).

SDF ist ferner ein essentieller Faktor in der Regulierung der Hämatopoese. Im Zusammenspiel mit seinem Rezeptor CXCR4 ist SDF pränatal unentbehrlich für die B-Zell Lymphopoese, die Myelopoese im Knochenmark und sogar für die Kardiogenese, wie Nagasawa zeigen konnte (Nagasawa 1996). In der postnatalen Hämatopoese vermittelt SDF das Stammzellhoming, welches vom Knochenmark ausgeht, sowie die Retention von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen bei intravenöser Infusion (Peled 2000). Zusätzlich kann SDF die Proliferation und, durch antiapoptotische Mechanismen und Regulierung des Zellzyklus, das Überleben verschiedener Zelltypen beeinflussen (Lataillade 2002). SDF erhöht den prozentualen Anteil der CD34 positiven Zellen, welche sich in der S-Phase befinden und kann die Zeit der G1 Phase verkürzen, so dass die Ansprechbarkeit der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus gesteigert wird (Roberts 1995).

Verschiedene Faktoren sind ferner für die Empfindlichkeit der Zellen auf SDF über Wechselwirkungen mit dem Rezeptor CXCR4 verantwortlich. Lapidot und Kollegen berichteten, dass die CXCR4 Expression ein dynamischer Vorgang ist, welcher komplizierten Regulationsmechanismen unterliegt (Lapidot 2005). Die Stimulation mit Cytokinen wie Stem cell factor, Interleukin 6 oder hepatocyte growth factor führt zu einer Hochregulation der CXCR4 Expression von CD34 positiven Zellen in 24-48 Stunden. Durch SDF wird dann eine verstärkte Migration und ein verbessertes Homing in vivo bewirkt (Kollet 2003). In die Regulierung der CXCR4 Expression sind weitere Faktoren involviert wie beispielsweise Zell-Oberflächenkontakte und Zell-Zell Kontakte zwischen CD34 positiven Zellen und anderen mononukleären Zellen, wobei auch Adhäsionsmoleküle (Selektine und Integrine) eine große Rolle spielen (Lataillade 2000).

Ein weiterer vorgeschlagener Mechanismus der Stammzellmobilisierung mittels SDF aus dem Knochenmark ist, dass SDF eine Hochregulierung der Aktivität der Metalloproteinase-9 bewirkt, welche wiederum über eine Erhöhung des löslichen Liganden (Stem cell Factor, SCF) vermehrt c-Kit positive Stammzellen in die Zirkulation entlässt (Heissig 2002). MMP-9 Knockout Mäuse haben jedoch keine gestörte Stammzellmobilisierung gezeigt, so dass auch andere Faktoren und Wege in Betracht gezogen werden müssen (Levesque 2004).

Ceradini untersuchte den Einfluss von Hypoxie auf Gewebe und konnte mittels RNA-Analysen eine erhöhte SDF Genexpression sowie eine gesteigerte Rezeptordichte des Rezeptors CXCR4 nachweisen. Diese werden über die Transkription des Proteins

hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), welches bei Sauerstoffmangel vermehrt gebildet wird, reguliert (Ceradini 2004). Sandri et al. beschreiben eine symptomatische Gewebsischämie als eine der Grundvoraussetzungen zur Mobilisation von zirkulierenden Vorläuferzellen. Dies führen die Autoren auf erhöhte Konzentrationen des vascular endothelial growth factor (VEGF) zurück (Sandri 2005). VEGF bewirkt dies durch eine Modulation der Kinetik der Vorläuferzellen (Kalka 2000). Wie die beschriebenen Mechanismen zusammenspielen und ob eine Gabe von Stem cell factor und Interleukinen oder eine zusätzliche zur bestehenden Ischämie erzeugte kurzzeitige ischämische oder hypoxische Präkonditionierung wichtiger ist, ist noch nicht geklärt.

In unserer Studie hätte man eine zusätzliche Ischämie z.B. durch wiederholte Ballonokklusion des Gefäßes und eine erhöhte CXCR4 Genexpression über vorherige Interleukingaben oder die Inkubation von Stammzellen, wie von Peled vorgeschlagen wurde (Peled 1999), erreichen können. Es muss darüber hinaus diskutiert werden, ob die in unserem Experiment während des Herzinfarktes erzeugte Ischämie - insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass die SDF Injektion zwei Wochen nach Infarzierung stattgefunden hat- ein ausreichender Stimulus war, um eine effektive Rezeptorendichte der rekrutierten Stammzellen zu erreichen.

5.3.3. Applikationsdauer

In den Arbeiten von Hattori et al. wird berichtet, dass eine Erhöhung des SDF-Plasmaspiegels die Stamm- und Vorläuferzellmobilisierung induziert sowie die Vaskulogenese positiv beeinflusst. Sie injizierten einen adenoviralen, SDF-kodierenden Vector intravenös und sicherten somit eine langandauernde und ausreichende Plasmakonzentration des Proteins (Hattori 2001). Hiasa und Kollegen haben ebenfalls einen SDF Gentransfer untersucht. Dieser wurde im Tierexperiment intramuskulär verabreicht und bewirkte sowohl eine ischämieinduzierte Vaskulogenese als auch eine Angiogenese (Hiasa 2004). Das Konzept der prolongierten SDF Expression ist bereits von Abbott vorgeschlagen worden (Abbott 2004). Eine nicht ausreichende Wirkung auf CXCR4 positive Zellen oder eine zu geringe Menge der rekrutierten Zellen könnte die Folge einer nur einmaligen Applikation von SDF-Protein in der vorliegenden Studie sein. Die SDF Injektion erhöhte in unserem Versuchsmodell jedoch die Gefäßdichte, so dass vermutet werden

kann, dass nur eine angiogenesefördernde Wirkung durch endotheliale Vorläuferzellen oder parakrine Mechanismen, nicht jedoch eine myogenesefördernde Wirkung hervorgerufen wurde. Versuche der transendokardialen kathetergestützten Injektion mit SDF-kodierenden Vektoren müssten folgen, um einen möglicherweise positiveren Effekt einer Gentherapie zu unterstützen.

Eine reduzierte migratorische Antwort bei einer einmaligen SDF Gabe beschrieb zudem Kucia in Mäusen, wobei das Alter der Versuchstiere eine Rolle zu spielen schien (Kucia 2004). Auch Heeschen stellte trotz ähnlicher Zellzahlen eine verringerte Mobilisierung der mononukleären Zellen in Richtung des SDF Gradienten bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit verglichen mit gesunden Probanden dar (Heeschen 2004). Das Phänomen der „poor mobilizer“, also eine verringerte Stammzellmobilisierung in Richtung der Homingfaktoren kann eine Hürde in der klinischen Praktikabilität bedeuten (Ripa 2006). Das Alter der Patienten und die migratorische Fähigkeit der Zellen im Zusammenhang mit möglichen Komorbiditäten stellen somit wesentliche Variablen dar (Vandervelde 2005).

5.3.4. Applikationsmenge

Die optimale Zellzahl, die transplantiert werden soll, ist bislang unbekannt (Brehm 2002). Ebenso steht auch die Menge an Homingfaktoren bislang nicht fest, welche eine bestmögliche Stammzellrekrutierung bewirken und somit das geschädigte Herz regenerieren sollen. Abbott stellte fest, dass die SDF-Wirkung dosisabhängig ist und dass Stammzellen in Anwesenheit einer Verletzung in Richtung dieses Gradienten migrieren (Abbott 2004). Weiterhin wurde beschrieben, dass die Wirkung des SDF eine glockenförmige Dosis-Wirkungs-Beziehung hat. Eine SDF Konzentration von 0,05 ng/mL bis 10 ng/mL hatte keinen signifikanten Effekt weder auf die Zahl, noch auf die Koloniegröße CD34 positiver Knochenmarkstammzellen, eine maximale Aktivität zeigt sich bei Konzentrationen von 0,1 ng/mL bis 0,05 ng/mL. Diese geringen Spiegel sollen die feine und genaue Regulierung der Hämatopoese widerspiegeln (Lataillade 2000). Gotoh beschrieb ebenfalls eine nichtproportionale Beziehung der CXCR4 Expression und SDF Aktivität (Gotoh 1999). Denkbar wäre eine Downregulierung oder Desensibilisierung der Vorläuferzellen in einer SDF-reichen Umgebung, wie es typisch für G-Protein gekoppelte Prozesse ist, wozu auch die CXCL12/ CXCR4 Achse gehört.

Eine Verbesserung der ventrikulären Funktion, Neoangiogenese sowie eine Reduktion der Narbe im Infarktmodell wurde zuletzt von Saxena et. al beschrieben, wobei 600 ng SDF pro Mäuseherz verabreicht wurde (Saxena 2008).

Wir haben in dieser Versuchsreihe 18 Injektionen mit 5 µg SDF in 100 µml Kochsalzlösung benutzt, um die Effizienz der kathetergestützten Applikation sicherzustellen (Smits 2002). Möglicherweise hätte eine kleinere oder auch höhere SDF-Dosis eine Verbesserung der Perfusion und der linksventrikulären Funktion gezeigt. Bisher stehen keine weiteren Daten zur Dosis-Wirkungs-Beziehung einer transendokardialen kathetergestützten SDF Injektion zur Verfügung.

5.3.5. Applikationsart

Es gibt verschiedene Applikationsarten der Stammzelltransplantation: Transepikardial via Thorakotomie, transendokardial durch Injektionskatheter (wie den in unserem Versuch gebrauchten NOGA Myo-Star), intrakoronar, durch den Koronarsinus und intravenös (Zimmet 2005). Bei intravenöser Injektion erreicht nur ein geringer Anteil der infundierten Zellen das Infarktgebiet. Die Zellen müssen nach dem first-pass durch die Lunge rezirkulieren, um die Infarktregion zu erreichen, wobei sie in dieser Rezirkulationsphase auch in anderen Organen aufgrund von verschiedenen Reizen und Homingfaktoren festgehalten werden können (Brehm 2002). Die intrakoronare Injektion, als einfach zu praktizierende Applikationsart, wurde in vielen Studien aufgrund ihrer leichten Handhabung und der relativ sicheren Einschwemmung der Stammzellen verwendet. Sie wurde mit Knochenmarkstammzellen in der TOPCARE-AMI Studie am Menschen mit Erfolg und ohne relevante unerwünschte Wirkungen eingesetzt (Assmus 2002; Britten 2003). Dabei erreichen die Zellen das noch durchblutete Periinfarktgebiet während der ersten Passage, jedoch wird das nicht mehr perfundierte Gewebe ausgespart (Strauer 2003). Zudem muss bei der intraarteriellen Gabe die Adhäsion und Transmigration der Zellen durch das Endothel gewährleistet werden, um eine möglichst große Anzahl an Zellen im Infarktgebiet zu retinieren (Wollert 2005). Das eigentliche Infarktareal wird nur durch die intramuskuläre, also entweder transendokardiale oder transepikardiale Injektion (während Bypasschirurgie oder durch Injektionskatheter (z.B. NOGA Myo-Star Katheter)) erreicht.

Verschiedene tierexperimentelle und klinischen Studien zeigten, dass die perkutane kathetergestützte transendokardiale Injektion von autologen Zellen realisierbar, praktikabel und zuverlässig ist (Fuchs 2001; Perin 2003; Tse 2003). Dabei wird unter Erstellung einer dreidimensionalen elektromechanischen Karte des linken Ventrikels das infarzierte Areal des Herzens lokalisiert, so dass Injektionen direkt in das Infarkt- und Periinfarktgebiet durchgeführt werden können. Der Injektionskatheter kann ventrikuläre Extrasystolen, Tachykardien und, wie auch in unserer Studie, Kammerflimmern verursachen bzw. den Ventrikel traumatisieren und sogar perforieren. Losordo et al. beschrieben bei insgesamt 114 kathetergestützten Injektionen keine Komplikationen im Sinne von Arrhythmien, systemischer Embolisierung oder schwerwiegender myokardialer Traumatisierung (Losordo 2002). Die Verletzung des Herzens durch das Ausfahren der Nadel des Injektionskatheters wird im Allgemeinen als minimal beschrieben. Trotzdem kann jedoch eine zu tiefe Injektion (bei langer Nadel) die Wand perforieren. In dieser Studie haben wir die Nadellänge auf 6 mm begrenzt, um diese Komplikation zu vermeiden. Dieses Vorgehen wurde jedoch nicht an offenen Herzpräparaten getestet.

Eine myokardiale Verletzung könnte jedoch günstig hinsichtlich myokardialer Regeneration wirken. Eine vermehrte Angiogenese entsteht als unspezifische wundheilungsfördernde Reaktion auf einen Gewebeschaden, wie zum Beispiel bei der transmyokardialen Laser-Revaskularisation (Malekan 1998). Die erhöhte Gefäßdichte bei den mit SDF behandelten Tieren könnte so auf den Mechanismus der unspezifischen Reaktion auf die traumatisierende Nadel zurückgeführt werden. Jedoch gibt es auch bei den transmyokardialen Laser-Revaskularisationsstudien kontroverse Ergebnisse über die Verbesserung der klinischen Symptomatik oder der linksventrikulären Funktion (Schofield 1999; Goldberg 2005). Bislang haben die kathetergestützten Injektionen in anderen Studien unveränderte oder sogar eine verbesserte linksventrikuläre Funktion bewirken können (Fuchs 2007). Eine Verschlechterung der linksventrikulären Funktion mit verringerter Ejektionsfraktion und reduzierter linearer lokaler Verkürzung, wie in dieser Studie, war bisher nicht beschrieben worden.

5.3.6. Applikationsort

Bei Betrachtung der verschiedenen Methoden der Zelltransplantation ergibt sich die Frage, in welchem Bereich des Herzens bzw. des Infarktes die Applikation am günstigsten wirkt, im perfundierten Periinfarktgebiet oder im geschädigten und infarzierten Gewebe. In Studien, in denen VEGF zur Neoangiogenese verabreicht wurde, zeigte sich eine verbesserte Perfusion nur nach transendokardialer Verabreichung, nicht jedoch bei intrakoronarer Infusion (Hendel 2000; Losordo 2002; Fuchs 2003). Andere Arbeiten zeigten auch bei intrakoronarer Applikation von Stammzellen bei Patienten nach Myokardinfarkt eine verbesserte Perfusion und linksventrikuläre Funktion, so dass die optimale Art und der Bereich der Verabreichung noch unklar ist (Wollert 2005).

Anversas Arbeiten zufolge findet nach einer myokardialen Ischämie mehr Zellwachstum im Randbereich des infarzierten Areals als im nekrotischen und vernarbten Muskelgewebe statt (Anversa 2002). In der Randregion ist die mitotische Aktivität und die Zellteilungsrate drei bis viermal höher, verglichen mit Gebieten des nichtinfarzierten Herzens (Beltrami 2001). Im Infarktgebiet, in welchem sich hibernierendes Myokard befinden könnte, findet eine unzureichende Blutversorgung und Perfusion der verbleibenden Kardiomyozyten statt (Hirzel 1976). In der Periinfarktregion wurde in unseren Versuchen bei den mit SDF-Injektionen behandelten Tieren verglichen mit der Kontrollgruppe eine vermehrte Gefäßdichte gefunden. Die meisten SDF-Injektionen haben auch in diesem Bereich stattgefunden, so dass dort eine direkte Korrelation gesehen werden kann und dies für eine verbesserte Regeneration spricht. Unsere Arbeit liefert jedoch keinen Beweis dafür, dass die Angiogenese durch die SDF-Injektion verursacht wurde.

5.3.7. Gefäßneubildung

Der signifikante Unterschied der Gefäßdichte im Periinfarktareal zwischen beiden Versuchsgruppen zeigte keine Auswirkungen hinsichtlich der linksventrikulären Funktion. De-novo entstehende Kapillaren sind oftmals noch nicht funktionsfähig, da Vorgänge der Vaskulo-, Angio- und Arteriogenese durchlaufen werden müssen (Buschmann 2003). Periphere endotheliale Vorläuferzellen und lokale

Wachstumsfaktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) oder basic fibroblast growth factor (bFGF) spielen dabei eine bedeutende Rolle (Asahara 1999; Carmeliet 2000). Die **Vaskulogenese** erfordert endotheliale Vorläuferzellen und erfolgt durch Bildung von Endothelzellen in nicht-vaskularisiertem Gewebe (Asahara 1999). Verschiedene Wachstumsfaktoren wie VEGF und Angiopoetin bewirken eine Stabilisierung der Gefäßwand, indem Endothelzellen feste interzelluläre Verbindungen eingehen und sich um diese herum Perizyten und Myozyten differenzieren. Die **Angiogenese** basiert auf der Proliferation und Migration von endothelialen Zellen aus vorbestehenden vaskulären Strukturen auf bestimmte angiogene Reize, wie Hypoxie. Die **Arteriogenese** begründet sich auf einer Vergrößerung des Kalibers der Blutgefäße mittels Zellvermehrung sowohl von endothelialen Zellen wie auch von glatten Muskelzellen, reguliert durch den Blutfluss und die entstehenden Druckverhältnisse (Couffinhal 2001).

Der in dieser Studie verfolgte eindimensionale Ansatz, der darin besteht, lediglich die Stammzellrekrutierung zu erhöhen, hatte offenbar nicht den gewünschten Effekt einer erfolgreichen Gefäßneubildung mit der Folge einer verbesserten Perfusion und Funktion. Eine fehlende hämodynamische Wirkung auf die neu gebildeten Gefäße, eine mangelnde sprossende Angiogenese durch fehlenden Einfluss von VEGF und Angiopoetin könnten als eine der Ursachen angesehen werden. Weitere Versuche der SDF-Injektion in Kombination mit den Wachstumsfaktoren VEGF und anderen proliferationsfördernden Faktoren sind sinnvoll.

5.3.8. Kombinationstherapie

Eine Kombination von verschiedenen Substanzen und Faktoren wurde bereits von Lataillade vorgeschlagen. Er beschrieb, wie der chemotaktische Faktor SDF die Koloniegröße von CD34 positiven Zellen beeinflusst, jedoch geschah dies nur in Synergie mit SCF (Stem cell factor). Interleukin 3 und der Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierende Faktor (GM-CSF) sollen zu einer noch stärkeren Vermehrung der CD34 positiven Kolonie führen (Lataillade 2000). Eine Potenzierung der Effekte erreichte auch Kawamoto bei einer Kombination von VEGF und vorherigen Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen mit Cytokinen zwecks Angiogenese bei experimenteller Myokardischämie (Kawamoto 2004). Bei den Versuchen von Askari et al. wurde eine vermehrte Kapillardichte und zudem

auch eine verbesserte ventrikuläre Funktion nach intramyokardialer Transplantation SDF-exprimierender Fibroblasten beschrieben, wenn zuvor eine systemische G-CSF Gabe durchgeführt wurde (Askari 2003). In einer vor kurzem von Kastrup et al. publizierten Studie wurde bei Patienten mit chronischer ischämischer Herzkrankheit nach der kathetergestützten Injektion von VEGF, G-CSF zur Verstärkung der Angiogenese systemisch appliziert. Obwohl eine signifikant höhere zirkulierende CD34 positive Stammzellzahl erreicht wurde, konnte bei den Patienten keine verbesserte myokardiale Perfusion oder klinische Symptomatik erzielt werden. Die Autoren schlussfolgern, dass höhere Dosen oder auch eine Kombination der oben genannten Substanzen mit SDF in Betracht gezogen werden müssen (Ripa 2006). Insbesondere fördert die G-CSF Therapie die Mobilisierung der hämatopoetischen Stammzellen durch Senkung des SDF Spiegels im Knochenmark mit gleichzeitiger Erhöhung der peripheren CXCR4 Rezeptoren (Petit 2002). Das komplexe Zusammenspiel von SDF, SCF, G-CSF und VEGF muss entsprechend in weiteren Studien untersucht werden, um die faktorenspezifischen Eigenschaften und Interaktionen auf das Zellhoming und die Angiogenese auszunutzen.

5.3.9. Applikationszeitpunkt

Nach einem Herzinfarkt kommt es sowohl zu einer akuten und chronischen inflammatorischen Reaktion als auch zur myokardialen Fibrose (Fishbein 1978). Ein therapeutisches Ziel nach einem Herzinfarkt ist es, das myokardiale Remodeling aufzuhalten. Li und Kollegen beschäftigten sich in Tierexperimenten mit der Frage, zu welchem Zeitpunkt nach einem myokardialen Trauma eine erfolgreiche Kardiomyozytentransplantation das beste Resultat in Bezug auf die linksventrikuläre Funktion zeigt. Sie induzierten bei Rattenherzen ein Kryotrauma und transplantierten fetale Kardiomyozyten sofort nach der Verletzung, sowie 2 und 4 Wochen später. Sie stellten fest, dass die sofort transplantierten Zellen aufgrund des inflammatorischen Milieus zu Grunde gehen und sich kein Benefit durch die Transplantation ergab. Ebenso zeigte eine Applikation nach 4 Wochen einen geringeren Vorteil als eine Transplantation nach 2 Wochen, da die Narbenbildung zu weit vorangeschritten sei (Li 2001). Eine Stammzelltransplantation nach Abklingen der Inflammation hat demnach möglicherweise den größtmöglichen Nutzen. Während der postinfarziellen Entzündungsreaktion werden zudem Chemokine freigesetzt, welche eine Proliferation

von mononukleären Zellen bewirken (Frangogiannis 2002). Die in dieser Zeit applizierten pluripotenten Zellen könnten aufgrund einer proinflammatorischen Wirkungsweise den Entzündungsprozess sogar aufrechterhalten und so zu einem verschlechterten Remodeling führen, statt es aufzuhalten (Strauer 2002).

Bei Hunden zeigte sich sieben Tage nach myokardialer Ischämie mit anschließender Reperfusion eine vermehrte Kapillardichte und endotheliale Brückenbildungen (Ren 2002). Nach 28 Tagen erschien eine muskuläre Kapillarwand, welche eine erschwerte Transmigration der Stammzellen bewirken kann. So zeigt eine Transplantation intravenöser mesenchymaler Stammzellen nach einem Herzinfarkt eine Anreicherung im Herzen, wenn diese nach einigen Tagen, nicht aber nach Wochen oder Monaten gegeben werden (Rosenthal 2003; Zimmet 2005).

In den Experimenten von Ma et al. verbesserte sich die myokardiale Funktion bei intravenöser mesenchymalen Stammzelltransplantation vier Tage nach einem Herzinfarkt (Ma 2005). Dies wurde auf den Homingfaktor SDF sowie auf die Rezeptoren zurückgeführt, welche vom traumatisierten Geweben exprimiert werden und die (Trans-) Migration, Adhäsion und schließlich Infiltration von Stammzellen erleichtern sollen (Orlic 2002). Cerradini berichtete, dass die ersten 6 Stunden nach ischämischem Ereignis kritisch für den Prozess des Homings von Stammzellen sein sollen, da in dieser Zeit erhöhte SDF-mRNA Mengen gefunden wurden (Cerradini 2004). Die Gruppe um Abbott beschrieb, dass die SDF Expression kurz nach einem Herzinfarkt vor allem im Perinfarktgebiet gesteigert wird, dem Ort, in welchem die hauptsächliche Rekrutierung der knochenmarkansässigen Stammzellen stattfindet (Jackson 2001; Abbott 2004). Die SDF Serumspiegel fielen jedoch 48-72 Stunden nach myokardialer Ischämie ab. Eine kardioprotektive Wirkung durch reduzierten Zelltod, stattgehabte Neoangiogenese und Verbesserung der kardialen Funktion erreichte ferner Saxena et. al durch eine transepikardiale SDF Injektion, welche sogar zeitgleich mit dem ischämischen Ereignis stattgefunden hat (Saxena 2008). Daher könnte auch eine frühere SDF Applikation von größerem Nutzen sein als eine Injektion nach 2 Wochen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde.

Diese experimentellen Studien weisen auf die Bedeutung des Zeitpunktes einer SDF-Wirkung nach einem Herzinfarkt hin. Die physiologische Rolle der SDF/CXCR4 Achse auf die verschiedenen Zellsysteme in ihrer zeitlichen Abhängigkeit ist noch nicht endgültig geklärt. Weiterhin gibt es bislang keine Daten, welche bei therapeutischer SDF Applikation die Frage des Zeitpunktes untersuchten. Dies ist

jedoch in zukünftigen experimentellen Modellen zu klären, um einerseits proinflammatorische Wirkungen zu umgehen und andererseits innerhalb des physiologischen Zeitfensters die Wirkung von SDF auszunutzen.

5.3.10. Unerwünschte Wirkungen

In unseren Versuchen verstarb ein Tier nach Auftreten von Kammerflimmern während der follow-up Untersuchung, ein zweites konnte erfolgreich elektrisch kardiovertiert werden. Eine vermehrte arrhythmogene Neigung nach der Transplantation von skeletalen Myoblasten wurde in mehreren klinischen Studien beschrieben, wobei sich die Art der Applikation unterschied (Ben-Dor 2006). Menasche berichtete von einer erfolgreichen transepikardialen Applikation skeletaler Myoblasten, wobei 11 bis 22 Tage nach der Prozedur 40% der Patienten anhaltende ventrikuläre Tachykardien erlitten (Menasche 2003). Andererseits sind in zahlreichen Studien, in denen Knochenmarkszellen transplantiert wurden, keine schweren Arrhythmien aufgetreten (Galinanes 2004; Fuchs 2006). Es gibt sogar Hinweise aus einer tierexperimentellen Studie von Mills et al., dass die Infusion von mesenchymalen Stammzellen die ventrikuläre Vulnerabilität günstig beeinflusst (Mills 2007). Das arrhythmogene Potential von Kardiomyozyten, welche aus pluripotenten embryonalen Stammzellen und embryonalen Karzinomzellen entstanden sind, wurde zuletzt von Zhang und Kollegen untersucht. Die elektrischen Potentialaufzeichnungen zeigten, dass beide Zelltypen Spontanaktivitäten, verlängerte Aktionspotentiale und leicht auslösbare Arrhythmien aufwiesen (Zhang 2002). Diese Studienlage lässt Vorsicht bei der therapeutischen zellgestützten Angio- und Myogenese hinsichtlich proarrhythmogener Wirkungen angeraten erscheinen. Weitere mögliche unerwünschten Wirkungen einer SDF-Applikation und der damit zusammenhängenden Mobilisierung von Vorläuferzellen wie z.B. ein karzinogener Effekt, wie etwa beim multiplen Myelom, sollten kritisch überprüft werden (Zhang 2005). Außerdem müssen ungünstige Effekte auf Koronargefäße ausgeschlossen werden, welche Kang in klinischen Studien beschrieben hat. Bei 7 von 10 Patienten, welche mit G-CSF Infusionen zwecks Mobilisierung von Stammzellen behandelt wurden, verbesserte sich die linksventrikuläre Funktion, jedoch zeigte sich auch eine signifikant erhöhte koronare In-Stent Restenoserate (Kang 2004). Dies kann auf die verstärkte Rekrutierung von CXCR4 positiven Zellen zurückzuführen sein, zu denen

auch ausgereifte Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen gehören, da G-CSF ebenso wie SDF eine Hochregulation der CXCR4 Rezeptoren bewirkt (Mohle 1998; Petit 2002).

Das Homing von Entzündungszellen stellt einen weiteren unerwünschten Effekt der SDF Wirkung dar, insbesondere in unserem Infarktmodell der Mikroembolisation. Die lokale Entzündungsreaktion spielt eine wesentliche Rolle in der myokardialen kontraktile Dysfunktion nach Mikroembolisation einer Koronararterie (Skyschally 2004). SDF ist ein Homingfaktor nicht nur für Stamm- und Vorläuferzellen, sondern auch für Lymphozyten und Monozyten, vermittelt durch den CXCR4 Rezeptor (Bleul 1996). Für eine proinflammatorische Wirkung spricht, dass das Protein in atherosklerotischen Plaques gebildet wird, nicht jedoch in gesunden Blutgefäßen (Abi-Younes 2000). Damas et al. berichteten dagegen von einer antiinflammatorischen Wirkung bei hohen SDF Konzentrationen durch eine reduzierte Freisetzung von Monocyte chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Interleukin-8 und Matrix Metalloproteinasen (Damas 2002). Die Leukozytenzahlen in der Periinfarktregion, sieben Wochen nach Auslösung der myokardialen Ischämie, haben in den hier dargestellten Versuchen keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ergeben (Daten nicht dargestellt).

5.3.11. Andere Indikationen

Die bereits durchgeführte intramuskuläre Transplantation von humanen adulten Knochenmarkstammzellen bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit hat gezeigt, dass es zu einer Verbesserung der Perfusion kommen kann (Tateishi-Yuyama 2002). Auch bei mikroangiopathischen Gefäßprozessen, wie einem diabetischem Fußsyndrom, soll die Transplantation autologer Stammzellen einen signifikanten Benefit erbringen (Bartsch 2005). Möglicherweise kann auch bei diesen mikroangiopathischen und ischämischen Krankheitsbildern die therapeutische Applikation von SDF Anwendung finden.

5.4. Schlussfolgerung

Die vorgelegten Daten zeigen, dass die kathetergestützte transendokardiale Applikation von Stromal cell derived Factor 1 α im Herzinfarktmodell eine Vermehrung vaskulärer Strukturen im Periinfarktgebiet induziert. Die Daten lassen keinen Rückschluss darauf zu, ob die Angiogenese durch mobilisierte Stammzellen erfolgte, auf herzspezifische Stammzellen zurückzuführen war, durch eine mögliche anderweitige lokale, parakrine Wirkung von SDF induziert wurde oder als eine unspezifische Reaktion durch das Trauma der intramyokardialen Injektion zu werten ist. Die Größe des Infarktareals veränderte sich nicht, zudem konnte eine Verschlechterung der linksventrikulären Funktion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse demonstrieren die Risiken, die eine kathetergestützte transendokardiale Applikation des Homingfaktors SDF nach myokardialer Ischämie in sich birgt.

Weitere Daten werden benötigt, um die Wirkung von SDF auf Vorläuferzellen zu untersuchen. Außerdem stellen sich Fragen hinsichtlich der Funktionsweise, des Applikationsweges, des Zeitpunktes der Applikation, der Dosis sowie des Ortes einer Injektion. Antworten zu diesen Themen sind notwendig, wenn das therapeutische Potential der Homingfaktoren und der körpereigenen Zellen ausgeschöpft und ihre klinische Rolle bei der Behandlung von Myokardinfarkten oder anderen ischämischen Erkrankungen festgestellt werden soll.

6. Zusammenfassung

Diese tierexperimentelle Studie hatte das Ziel, den Effekt einer kathetergestützten transendokardialen Applikation von Stromal cell-derived factor 1 α (SDF) im Infarktmodell bei Schweinen zu untersuchen.

Bei Hausschweinen konnte katheterinterventionell durch Mikroembolisation der distale Anteil des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie infarziert werden. In das Infarkt- und Periinfarktgebiet wurde nach zwei Wochen kathetergestützt SDF transendokardial appliziert (n=12). In einer Kontrollgruppe wurde keine Intervention durchgeführt (n=8). Zwei und sieben Wochen nach erzeugtem Infarkt erfolgte die Untersuchung des linken Ventrikels mittels elektromechanischem endokardialem Mapping hinsichtlich Veränderungen der linksventrikulären Funktion (Ejektionsfraktion, Schlagvolumen, unipolare Elektrogrammamplituden und lineare lokale Verkürzung). Weiterhin wurde die Infarktgröße durch Tetrazoliumfärbung planimetrisch ausgewertet und die Gefäßdichte sowie das myokardiale Remodeling mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen dargestellt.

Bei den Versuchstieren der SDF-Gruppe zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der Gefäßdichte in der Periinfarktregion. Die Infarktgröße war in beiden Gruppen gleich. Die Ejektionsfraktion sowie das Schlagvolumen, ermittelt durch das elektromechanische Mapping, verringerten sich bei den mit SDF behandelten Tieren. Die lineare lokale Verkürzung, als weiterer Parameter der linksventrikulären Funktion, veränderte sich bei den Kontrolltieren nicht, bei den Versuchstieren der SDF-Gruppe zeigte sich eine signifikante Abnahme.

Die kathetergestützte transendokardiale SDF Applikation steigerte im Herzinfarktmodell bei Schweinen die Gefäßdichte, die Infarktgröße blieb jedoch unbeeinflusst und es kam zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Funktion. Obwohl der Homingfaktor SDF die Stammzellrekrutierung fördert und einen viel versprechenden therapeutischen Ansatz darstellt, sind weitere Untersuchungen zum Einsatz von SDF zur regenerativen myokardialen Therapie notwendig.

7. Literaturverzeichnis

Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ: Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, 2004, 110(21): 3300-5.

Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD: The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res*, 2000, 86(2): 131-8.

Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC: The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*, 1997, 185(1): 111-20.

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A: Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 2003, 425(6961): 968-73.

Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM: Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(32): 11474-9.

Anversa P, Nadal-Ginard B: Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature*, 2002, 415(6868): 240-3.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Wagner M, Isner JM: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, 85(3): 221-8.

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM: VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J*, 1999, 18(14): 3964-72.

Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS: Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*, 2003, 362(9385): 697-703.

Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM: Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 2002, 106(24): 3009-17.

Bartsch T, Brehm M, Falke T, Kogler G, Wernet P, Strauer BE: [Rapid healing of a therapy-refractory diabetic foot after transplantation of autologous bone marrow stem cells]. *Med Klin (Munich)*, 2005, 100(10): 676-80.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 2003, 114(6): 763-76.

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2001, 344(23): 1750-7.

Ben-Dor I, Fuchs S, Kornowski R: Potential hazards and technical considerations associated with myocardial cell transplantation protocols for ischemic myocardial syndrome. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48(8): 1519-26.

Ben-Haim SA, Osadchy D, Schuster I, Gepstein L, Hayam G, Josephson ME: Nonfluoroscopic, in vivo navigation and mapping technology. *Nat Med*, 1996, 2(12): 1393-5.

Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA: A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*, 1996, 184(3): 1101-9.

Bolli R, Jneid H, Dawn B: Bone marrow cell-mediated cardiac regeneration a veritable revolution. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(9): 1659-61.

Brehm M, Zeus T, Strauer BE: Stem cells--clinical application and perspectives. *Herz*, 2002, 27(7): 611-20.

Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM: Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*, 2003, 108(18): 2212-8.

Buschmann I, Katzer E, Bode C: Arteriogenesis - is this terminology necessary? *Basic Res Cardiol*, 2003, 98(1): 1-5.

Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 2000, 6(4): 389-95.

Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC: Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 2004, 10(8): 858-64.

Colmone A, Sipkins DA: Beyond angiogenesis: the role of endothelium in the bone marrow vascular niche. *Transl Res*, 2008, 151(1): 1-9.

Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G: Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(19): 10733-8.

Couffinhal T, Dufourcq P, Daret D, Duplaa C: [The mechanisms of angiogenesis. Medical and therapeutic applications]. *Rev Med Interne*, 2001, 22(11): 1064-82.

Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Ueland T, Muller F, Eiken HG, Holm AM, Halvorsen B, Froland SS, Gullestad L, Aukrust P: Stromal cell-derived factor-1alpha in unstable angina: potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects. *Circulation*, 2002, 106(1): 36-42.

Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P, Etievent JP, Kantelip JP: Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation*, 2003, 108 Suppl 1: II253-8.

Dawn B, Bolli R: Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(6): 494-503.

DeWood MA, Spores J, Notske R, Mouser LT, Burroughs R, Golden MS, Lang HT: Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1980, 303(16): 897-902.

Elezi S, Dibra A, Schomig A, Kastrati A: Current drug-eluting stents in complex patients and lesions. *Minerva Cardioangiol*, 2006, 54(1): 5-22.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR: Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol*, 1978, 90(1): 57-70.

Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W: Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J*, 1981, 101(5): 593-600.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML: The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 2002, 53(1): 31-47.

Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, Weissman NJ, Leon MB, Epstein SE, Kornowski R: Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37(6): 1726-32.

Fuchs S, Battler A, Kornowski R: Catheter-based stem cell and gene therapy for refractory myocardial ischemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007, 4 Suppl 1: S89-95.

Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, Satler LF, Smits PC, Okubagzi P, Baffour R, Aggarwal A, Weissman NJ, Cerqueira M, Waksman R, Serruys P, Battler A, Moses JW, Leon MB, Epstein SE: Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol*, 2006, 97(6): 823-9.

Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour R, Waksman R, Weissman NJ, Cerqueira M, Leon MB, Epstein SE: Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(10): 1721-4.

Galinanes M, Loubani M, Davies J, Chin D, Pasi J, Bell PR: Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant*, 2004, 13(1): 7-13.

Gepstein L, Evans SJ: Electroanatomical mapping of the heart: basic concepts and implications for the treatment of cardiac arrhythmias. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1998, 21(6): 1268-78.

Gepstein L, Hayam G, Ben-Haim SA: A novel method for nonfluoroscopic catheter-based electroanatomical mapping of the heart. In vitro and in vivo accuracy results. *Circulation*, 1997, 95(6): 1611-22.

Gepstein L, Hayam G, Shpun S, Ben-Haim SA: Hemodynamic evaluation of the heart with a nonfluoroscopic electromechanical mapping technique. *Circulation*, 1997, 96(10): 3672-80.

- Goldberg RF, Fass AE, Frishman WH: Transmyocardial revascularization: defining its role. *Cardiol Rev*, 2005, 13(1): 52-5.
- Gotoh A, Reid S, Miyazawa K, Broxmeyer HE: SDF-1 suppresses cytokine-induced adhesion of human haemopoietic progenitor cells to immobilized fibronectin. *Br J Haematol*, 1999, 106(1): 171-4.
- Grund F, Sommerschild HT, Lyberg T, Kirkeboen KA, Ilebekk A: Microembolization in pigs: effects on coronary blood flow and myocardial ischemic tolerance. *Am J Physiol*, 1999, 277(2 Pt 2): H533-42.
- Gruntzig A, Schneider HJ: [The percutaneous dilatation of chronic coronary stenoses-experiments and morphology]. *Schweiz Med Wochenschr*, 1977, 107(44): 1588.
- Hamm CW: [Guidelines: Acute coronary syndrome (ACS). II: Acute coronary syndrome with ST-elevation]. *Z Kardiol*, 2004, 93(4): 324-41.
- Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitoriano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA: Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, 2001, 97(11): 3354-60.
- Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S: Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation*, 2004, 109(13): 1615-22.
- Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S: Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 2002, 109(5): 625-37.
- Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, Bonow RO: Effect of intracoronary recombinant human vascular

endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation*, 2000, 101(2): 118-21.

Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M, Ichiki T, Takeshita A, Egashira K: Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation*, 2004, 109(20): 2454-61.

Hirzel HO, Nelson GR, Sonnenblick EH, Kirk ES: Redistribution of collateral blood flow from necrotic to surviving myocardium following coronary occlusion in the dog. *Circ Res*, 1976, 39(2): 214-22.

Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D: Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation*, 1993, 88(1): 107-15.

Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H: Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*, 2005, 111(17): 2198-202.

Horackova M, Arora R, Chen R, Armour JA, Cattini PA, Livingston R, Byczko Z: Cell transplantation for treatment of acute myocardial infarction: unique capacity for repair by skeletal muscle satellite cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(4): H1599-608.

Hristov M, Weber C: The therapeutic potential of progenitor cells in ischemic heart disease--Past, present and future. *Basic Res Cardiol*, 2006, 101(1): 1-7.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 2001, 107(11): 1395-402.

Jorgensen E, Madsen T, Kastrup J: Comparison of the left ventricular electromechanical map before percutaneous coronary stent revascularization and at

one-month follow-up in patients with a recent ST elevation infarction. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005, 64(2): 153-9.

Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T: Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*, 2000, 86(12): 1198-202.

Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Amano K, Iba O, Imada T, Iwasaka T: Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(11): 1804-10.

Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB: Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, 2004, 363(9411): 751-6.

Kastrup J, Drvotab V, et al: Intramyocardial injection of genes with a novel percutaneous technique: initial safety data of the Euroinject One study. *Heart Drug*, 2001, 1: 299-404.

Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzyllo W, Botker HE, Dudek D, Drvota V, Hesse B, Thuesen L, Blomberg P, Gyongyosi M, Sylven C: Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(7): 982-8.

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*, 2001, 103(5): 634-7.

Kawamoto A, Murayama T, Kusano K, Ii M, Tkebuchava T, Shintani S, Iwakura A, Johnson I, von Samson P, Hanley A, Gavin M, Curry C, Silver M, Ma H, Kearney M,

Losordo DW: Synergistic effect of bone marrow mobilization and vascular endothelial growth factor-2 gene therapy in myocardial ischemia. *Circulation*, 2004, 110(11): 1398-405.

Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T: Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*, 2003, 107(3): 461-8.

Klein HH PS, Schaper J, et al: The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch*, 1981, 393: 287-297.

Koch KC, vom Dahl J: Electromechanical mapping of the heart. *Curr Opin Cardiol*, 2000, 15(5): 337-42.

Koch KC, vom Dahl J, Wenderdel M, Nowak B, Schaefer WM, Sasse A, Stellbrink C, Buell U, Hanrath P: Myocardial viability assessment by endocardial electroanatomic mapping: comparison with metabolic imaging and functional recovery after coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 38(1): 91-8.

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. *Nat Med*, 2001, 7(4): 430-6.

Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T: HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*, 2003, 112(2): 160-9.

Kornowski R, Hong MK, Gepstein L, Goldstein S, Ellahham S, Ben-Haim SA, Leon MB: Preliminary animal and clinical experiences using an electromechanical

endocardial mapping procedure to distinguish infarcted from healthy myocardium. *Circulation*, 1998, 98(11): 1116-24.

Kucia M, Dawn B, Hunt G, Guo Y, Wysoczynski M, Majka M, Ratajczak J, Rezzoug F, Ildstad ST, Bolli R, Ratajczak MZ: Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res*, 2004, 95(12): 1191-9.

Kucia M, Ratajczak J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ: Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis*, 2004, 32(1): 52-7.

Lapidot T, Dar A, Kollet O: How do stem cells find their way home? *Blood*, 2005, 106(6): 1901-10.

Lapidot T, Petit I: Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*, 2002, 30(9): 973-81.

Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, Herodin F, Dupuy C, Jasmin C, Le Bousse-Kerdiles MC: Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood*, 2002, 99(4): 1117-29.

Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, Le Bousse-Kerdiles MC: Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood*, 2000, 95(3): 756-68.

Leri A, Kajstura J, Anversa P: Myocyte proliferation and ventricular remodeling. *J Card Fail*, 2002, 8(6 Suppl): S518-25.

Lessick J, Hayam G, Zaretsky A, Reisner SA, Schwartz Y, Ben-Haim SA: Evaluation of inotropic changes in ventricular function by NOGA mapping: comparison with echocardiography. *J Appl Physiol*, 2002, 93(2): 418-26.

Lessick J, Smeets JL, Reisner SA, Ben-Haim SA: Electromechanical mapping of regional left ventricular function in humans: comparison with echocardiography. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2000, 50(1): 10-8.

Levesque JP, Liu F, Simmons PJ, Betsuyaku T, Senior RM, Pham C, Link DC: Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood*, 2004, 104(1): 65-72.

Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Rao V, Jia ZQ: Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Ann Thorac Surg*, 2001, 72(6): 1957-63.

Losordo DW, Dimmeler S: Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation*, 2004, 109(21): 2487-91.

Losordo DW, Dimmeler S: Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*, 2004, 109(22): 2692-7.

Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE: Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 2002, 105(17): 2012-8.

Ma J, Ge J, Zhang S, Sun A, Shen J, Chen L, Wang K, Zou Y: Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(3): 217-23.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 1999, 103(5): 697-705.

Malekan R, Reynolds C, Narula N, Kelley ST, Suzuki Y, Bridges CR: Angiogenesis in transmyocardial laser revascularization. A nonspecific response to injury. *Circulation*, 1998, 98(19 Suppl): II62-5; discussion II66.

Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D: Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(7): 1078-83.

Mills WR, Mal N, Kiedrowski MJ, Unger R, Forudi F, Popovic ZB, Penn MS, Laurita KR: Stem cell therapy enhances electrical viability in myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(2): 304-14.

Mohle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L: The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34⁺ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 1998, 91(12): 4523-30.

Mohle R, Rafii S, Moore MA: The role of endothelium in the regulation of hematopoietic stem cell migration. *Stem Cells*, 1998, 16 Suppl 1: 159-65.

Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL: The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11: 35-71.

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JJ, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ: Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 2004, 428(6983): 664-8.

Nachlas MM, Shnitka TK: Macroscopic identification of early myocardial infarcts by alterations in dehydrogenase activity. *Am J Pathol*, 1963, 42: 379-405.

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow

myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 1996, 382(6592): 635-8.

Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S: Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(6): H2670-6.

Natale A, Breeding L, Tomassoni G, Rajkovich K, Richey M, Beheiry S, Martinez K, Cromwell L, Wides B, Leonelli F: Ablation of right and left ectopic atrial tachycardias using a three-dimensional nonfluoroscopic mapping system. *Am J Cardiol*, 1998, 82(8): 989-92.

Orlic D, Hill JM, Arai AE: Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res*, 2002, 91(12): 1092-102.

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*, 2001, 410(6829): 701-5.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(18): 10344-9.

Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T: The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, 2000, 95(11): 3289-96.

Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T: Dependence of human stem

cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*, 1999, 283(5403): 845-8.

Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT: Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, 2003, 107(18): 2294-302.

Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T: G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*, 2002, 3(7): 687-94.

Pfeffer MA, Braunwald E: Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, 1990, 81(4): 1161-72.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Lamas GA: Development and prevention of congestive heart failure following myocardial infarction. *Circulation*, 1993, 87(5 Suppl): IV120-5.

Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P: Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*, 2002, 346(1): 5-15.

Quesenberry PJ, Colvin G, Abedi M: Perspective: fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: a journey to niches and beyond. *Exp Hematol*, 2005, 33(1): 9-19.

Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J: Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia*, 2004, 18(1): 29-40.

Ratajska A, Czarnowska E: Vasculogenesis of the embryonic heart: contribution of nucleated red blood cells to early vascular structures. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2006, 6(3): 219-25.

Ren G, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG: Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50(1): 71-9.

Ripa RS, Wang Y, Jorgensen E, Johnsen HE, Hesse B, Kastrup J: Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor-A165 plasmid followed by granulocyte-colony stimulating factor to induce angiogenesis in patients with severe chronic ischaemic heart disease. *Eur Heart J*, 2006, 27(15): 1785-92.

Roberts AW, Metcalf D: Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines. *Blood*, 1995, 86(4): 1600-5.

Rosenthal N: Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med*, 2003, 349(3): 267-74.

Sandri M, Adams V, Gielen S, Linke A, Lenk K, Krankel N, Lenz D, Erbs S, Scheinert D, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R: Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies. *Circulation*, 2005, 111(25): 3391-9.

Sasano T, Abraham MR, Chang KC, Ashikaga H, Mills KJ, Holt DP, Hilton J, Nekolla SG, Dong J, Lardo AC, Halperin H, Dannals RF, Marban E, Bengel FM: Abnormal sympathetic innervation of viable myocardium and the substrate of ventricular tachycardia after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(23): 2266-75.

Saxena A, Fish JE, White MD, Yu S, Smyth JW, Shaw RM, DiMaio JM, Srivastava D: Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction. *Circulation*, 2008, 117(17): 2224-31.

Schofield PM, Sharples LD, Caine N, Burns S, Tait S, Wistow T, Buxton M, Wallwork J: Transmyocardial laser revascularisation in patients with refractory angina: a randomised controlled trial. *Lancet*, 1999, 353(9152): 519-24.

Schuleri KH, Amado LC, Boyle AJ, Centola M, Saliaris AP, Gutman MR, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Zimmet JM, Young RG, Heldman AW, Lardo AC, Hare JM: Early improvement in cardiac tissue perfusion due to mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(5): H2002-11.

Segret A, Rucker-Martin C, Pavoine C, Flavigny J, Deroubaix E, Chatel MA, Lombet A, Renaud JF: Structural localization and expression of CXCL12 and CXCR4 in rat heart and isolated cardiac myocytes. *J Histochem Cytochem*, 2007, 55(2): 141-50.

Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ: Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*, 2002, 73(6): 1919-25; discussion 1926.

Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE: The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol*, 1963, 62: 327-36.

Siminovitch L, Till JE, McCulloch EA: Decline in Colony-Forming Ability of Marrow Cells Subjected to Serial Transplantation into Irradiated Mice. *J Cell Physiol*, 1964, 64: 23-31.

Singh RR, Lisle TC, Kron IL: Surgical treatment of the failing heart. *Minerva Cardioangiol*, 2005, 53(4): 287-97.

Skyschally A, Haude M, Dorge H, Thielmann M, Duschin A, van de Sand A, Konietzka I, Buchert A, Aker S, Massoudy P, Schulz R, Erbel R, Heusch G: Glucocorticoid treatment prevents progressive myocardial dysfunction resulting from experimental coronary microembolization. *Circulation*, 2004, 109(19): 2337-42.

Smeets JL, Ben-Haim SA, Rodriguez LM, Timmermans C, Wellens HJ: New method for nonfluoroscopic endocardial mapping in humans: accuracy assessment and first clinical results. *Circulation*, 1998, 97(24): 2426-32.

Smits PC LML, Lee RCH: Preliminary experience of catheter based transendocardial delivery of autologous skeletal myoblasts for cellular cardiomyoplasty. *Eur Heart J*, 2002, 4: 506.

Smits PC, van Langenhove G, Schaar M, Reijs A, Bakker WH, van der Giessen WJ, Verdouw PD, Krenning EP, Serruys PW: Efficacy of percutaneous intramyocardial injections using a nonfluoroscopic 3-D mapping based catheter system. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2002, 16(6): 527-33.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kogler G, Wernet P, Muller HW, Kostering M: Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(9): 1651-8.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P: [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2001, 126(34-35): 932-8.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P: Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 2002, 106(15): 1913-8.

Strauer BE, Kornowski R: Stem cell therapy in perspective. *Circulation*, 2003, 107(7): 929-34.

Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002, 360(9331): 427-35.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391): 1145-7.

Thygesen K, Alpert JS, White HD: Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2007, 28(20): 2525-38.

Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumati LC, Allidina Y, Liu P, Li RK: Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 123(6): 1132-40.

Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP: Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*, 2003, 361(9351): 47-9.

Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E, Anversa P: Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(18): 10440-5.

Urbich C, Dimmeler S: Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, 2004, 95(4): 343-53.

Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, McDonald MC, Gravelin LM, Curry CM, Esakof DD, Maysky M, Symes JF, Isner JM: Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 2001, 103(17): 2138-43.

Vandervelde S, van Luyn MJ, Tio RA, Harmsen MC: Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39(2): 363-76.

Wagers AJ, Christensen JL, Weissman IL: Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther*, 2002, 9(10): 606-12.

Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL: Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*, 2002, 297(5590): 2256-9.

White FC, Roth DM, Bloor CM: The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. *Lab Anim Sci*, 1986, 36(4): 351-6.

Wolf T, Gepstein L, Dror U, Hayam G, Shofti R, Zaretzky A, Uretzky G, Oron U, Ben-Haim SA: Detailed endocardial mapping accurately predicts the transmural extent of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37(6): 1590-7.

Wollert KC, Drexler H: Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res*, 2005, 96(2): 151-63.

Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T: Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 2003, 107(9): 1322-8.

Zeymer U, Schroder R, Machnig T, Neuhaus KL: Primary percutaneous transluminal coronary angioplasty accelerates early myocardial reperfusion compared to thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 2003, 146(4): 686-91.

Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smith EL, Maroney J, Chen L, Dai K, Berenson JR, Hussain MM, Klueppelberg U, Norin AJ, Akman HO, Ozcelik T, Batuman OA: Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood*, 2005, 105(8): 3286-94.

Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, Dudley SC, Jr.: Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation*, 2002, 106(10): 1294-9.

Zimmet JM, Hare JM: Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(6): 471-81.

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR: Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 1998, 393(6685): 595-9.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. Peter Hanrath, ehemaliger Direktor der Medizinischen Klinik I Kardiologie, Angiologie und Pneumologie, und bei Univ.-Prof. Dr. med. Christian Weber, Direktor des Instituts für Molekulare Herz-Kreislauf-Forschung, für die Möglichkeit zur Durchführung der Dissertation an der RWTH Aachen bedanken.

Besonders möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Karl-Christian Koch für die freundliche Bereitstellung des interessanten Themas, für die hervorragende Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft während des experimentellen Teils, Korrektur des Manuskriptes und das Heranführen an die experimentelle Kardiologie danken.

Dr. med. Elisa Liehn danke ich für die hilfreiche Unterstützung, für die wertvollen Ratschläge und exzellente Einarbeitung bei der Laborarbeit. Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Herz-Kreislauf-Forschung, insbesondere Sandra Knarren, für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft im Labor.

Herrn. Prof. Dr. Werner Küpper, ehemaliger Direktor des Instituts für Versuchstierkunde, danke ich für die Möglichkeit den tierexperimentellen Teil an seinem Institut durchführen zu können. Insbesondere möchte ich mich bei Thaddäus Stopinski für die unabdingbare Hilfe bei der tierexperimentellen Arbeit bedanken.

Univ.-Prof. Dr. med. Büll, ehemaliger Direktor der Nuklearmedizinischen Klinik, und Prof. Dr. med. Dr. rer. medic. Dipl.-Phys. Wolfgang Schäfer danke ich für die Mitarbeit und Bereitstellung der nuklearmedizinischen Stoffe und Geräte.

Ein persönlicher Dank geht an Dominik Müller, den ich während der Tierexperimentellen- und Laborarbeit sowie als Kollegen und Freund geschätzt habe. Meiner Familie danke ich für die fortwährende Unterstützung während meines Studiums und für die Ermunterung zur ständigen Fortführung der Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt Barbara Bremer, die mich durch Motivation, Rückhalt und Verständnis in allen Abschnitten der Dissertationserstellung begleitet hat.

Erklärung zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei mir, Christos Rammos, Kastanienhof 21, 40225 Düsseldorf, und bei meinem Betreuer, Priv.-Doz. Dr. med. Karl-Christian Koch, Medizinische Klinik I, des Universitätsklinikums Aachen, hinterlegt sind.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Christos Rammos
Geburtsdatum	24.07.1980
Geburtsort	Düsseldorf
Nationalität	griechisch
Familienstand	ledig
Familie	Vater: Prof. Dr. med. Spyros Rammos Mutter: Dipl. Philologin Sophia Rammos, geb. Travlou Bruder: Dipl. Jurist Athanasios Rammos

Schulische Ausbildung

1986-1990	Christophorus Grundschule, Düsseldorf
1990-1995	Görres Gymnasium, Düsseldorf
1995-1999	Dörpfeld Gymnasium, Deutsche Schule Athen, Griechenland

Universitäre Ausbildung

1999-2005	Medizinstudium, RWTH Aachen
09.2001	Ärztliche Vorprüfung
04.2003	1. Staatsexamen
04.2005	2. Staatsexamen
2005-2006	Medizinstudium, Technische Universität München
05.2006	3. Staatsexamen, Approbation

Klinische Ausbildung

Seit 09.2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Univ.-Prof. Dr. med. B.-E. Strauer
--------------	--