

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I – Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

**Die Unterschiede der endogenen Stammzellzirkulation  
bei toxischer und ischämischer Kardiomyopathie im Mausmodell  
als Basis für innovative Stammzell-therapeutische Ansätze**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
**Eva Frank, geb. Hirsch**

aus  
Mainz

2010

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W.- M. Franz  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. M. Sperandio  
PD Dr. med. W. Thasler  
Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. H. D. Theiss  
Dr. med. S. M. Brunner  
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR  
Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2010

---

Meinen Eltern und meinem Ehemann.

---

## **Abkürzungsverzeichnis**

AE	Arterial elastance (arterielle Nachlast)
BNP	Brain natriuretic peptide (Typ B natriuretisches Peptid)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD31/PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule (Thrombozyten-Endothel-Zelladhäsionsmolekül)
CD34	Hämatopoetischer Stammzellmarker
CD45/PTPRC	Proteintyrosinphosphatase
c-kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
CPC	Kardiale Progenitorzelle
CSC	Residente kardiale Stammzelle
CXCR4	Chemokin-Rezeptor 4
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
Dip	Diprotin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Doxo	Doxorubicin
DPP-IV/CD26	Dipeptidylpeptidase IV
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
et al.	Et alii bzw. et aliae/und andere
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FL	Fluoreszenzintensität
FSC	Forwardscatter (Vorwärtsstreulicht)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GFP	Green fluorescent protein (Grün fluoreszierendes Protein)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF/HR	Herzfrequenz

---

HGF	Hepatozytenwachstumsfaktor
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HZV	Herzzeitvolumen
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
IGF	Insulin-like growth factor (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
iPS	Induzierte pluripotente Stammzelle
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
Kontr.	Kontrolle
LAD	Left anterior descending artery (Ramus interventricularis anterior)
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
maGSC	Multipotente adulte Keimbahnstammzelle
MAPC	Multipotente adulte Progenitorzelle
MI	Myokardinfarkt
MNC	Mononukleäre Zellen
MRT	Magnetresonanz Tomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
n	Anzahl
NaCl	Natrium-Chlorid-Lösung
p	Signifikanz
PB	Peripheres Blut
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
qRT-PCR	Quantitative real time-polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RVU	Relative volume units (relative Volumeneinheiten)
Sca-1	Stammzellantigen-1

---

SCF	Stammzellfaktor
SDF-1 $\alpha$	Stromal cell-derived factor 1 $\alpha$ (Stromazell-abgeleiteter Faktor 1 $\alpha$ )
SM	Skelettmyoblasten
SSC	Sidescatter (Seitwärtsstreulicht)
StZG	Stammzellgesetz
SV	Schlagvolumen
SW	Strokework (Schlagarbeit)
SZ	Stammzelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
USSC	Umbilikale somatische Stammzelle
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Gefäßendothel-Wachstumsfaktor)
VSEL-SC	Very small embryonic-like stem cell (sehr kleine embryonal-ähnliche Stammzelle)
WB	Wandbewegung
WHO	World health organisation (Weltgesundheitsorganisation)

---

## **GLIEDERUNG**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
1.1	Epidemiologie der ischämischen Herzerkrankungen und Kardiomyopathien ...	11
1.2	Pathophysiologie der ischämischen Herzerkrankungen und Kardiomyopathien	12
1.3	Stammzellen .....	13
1.3.1	Embryonale Stammzellen.....	13
1.3.2	Adulte Stammzellen .....	14
1.4	Stammzellzirkulation und -homing .....	16
1.5	Studien mit adulten Stammzellen beim akuten Myokardinfarkt und bei der ischämischen Kardiomyopathie .....	19
1.6	Fragestellung und Versuchsaufbau .....	21
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
2.1	Materialien .....	24
2.1.1	Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel .....	24
2.1.2	Materialien für DNA- und RNA-Methoden .....	24
2.1.3	Materialien für Protein-Methoden .....	25
2.1.4	Antikörper.....	25
2.1.5	Pharmaka .....	25
2.1.6	Färbungen .....	26
2.1.7	Versuchstiere .....	26
2.1.8	Operationszubehör.....	26
2.1.9	Hämodynamik-Zubehör .....	27
2.1.10	Laborgeräte und sonstige Materialien .....	27
2.1.11	Hard- und Software .....	28
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Mausmodell .....	28
2.2.1.1	Haltung.....	29
2.2.1.2	Gabe der kardiotoxischen Substanz Doxorubicin.....	29

---

2.2.1.3	Infarktinduzierung.....	30
2.2.1.4	Gabe des DPP-IV-Inhibitors Diprotin A.....	32
2.2.2	Hämodynamische Messungen.....	33
2.2.2.1	Conductance-Methode.....	33
2.2.2.2	Durchführung und Aufzeichnung der Messung.....	36
2.2.2.3	Parameter der Messung.....	36
2.2.3	Histologische Schnitte.....	37
2.2.3.1	Färbungen.....	38
2.2.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	38
2.2.3.3	Masson-Goldner-Trichromfärbung.....	38
2.2.3.4	Infarktgröße.....	38
2.2.3.5	Wanddicke im Infarkt- und im Remote-Areal.....	39
2.2.3.6	Granulationsgewebe.....	40
2.2.4	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS).....	40
2.2.4.1	Prinzip der FACS-Analyse.....	40
2.2.4.2	Vorbereitung der Proben und Messung.....	42
2.2.5	Blutanalyse.....	44
2.2.6	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	45
2.2.6.1	cDNA-Synthese.....	45
2.2.6.2	Quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR).....	46
2.2.7	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA).....	47
2.2.8	Statistische Auswertung.....	49
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Toxisch induzierte versus ischämische Kardiomyopathie.....</b>	<b>50</b>
3.1.1	Überleben der Doxorubicin-behandelten Mäuse an Tag 90.....	50
3.1.2	Hämodynamische Messungen.....	50
3.1.2.1	Herzfrequenz.....	50
3.1.2.2	Ejektionsfraktion.....	51
3.1.2.3	Enddiastolisches Volumen.....	51
3.1.2.4	Weitere hämodynamische Parameter und Übersicht über die Hämodynamik..	52
3.1.3	Histologische Evaluation – Wanddicken im Infarkt- und Remote-Areal.....	54
3.1.4	Blutanalyse.....	55
3.1.5	Analyse der Stammzellen mittels Durchflusszytometrie.....	57



3.1.6	Ergebnisse der qRT-PCR .....	60
<b>3.2</b>	<b>DPP-IV-Inhibition nach Myokardinfarkt.....</b>	<b>61</b>
3.2.1	Ergebnisse des Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA).....	61
3.2.2	Blutanalyse .....	62
3.2.3	Analyse der Stammzellen mittels Durchflusszytometrie .....	63
3.2.4	Hämodynamische Messungen .....	65
3.2.4.1	Herzfrequenz .....	65
3.2.4.2	Ejektionsfraktion .....	66
3.2.4.3	Enddiastolisches Volumen .....	66
3.2.4.4	Weitere hämodynamische Parameter und Übersicht über die Hämodynamik..	67
3.2.5	Histologische Evaluation nach Myokardinfarkt.....	69
3.2.5.1	Infarktgröße.....	69
3.2.5.2	Wanddicke im Infarkt- und Remote-Areal .....	70
3.2.5.3	Granulationsgewebe.....	71
3.2.6	Überleben nach Myokardinfarkt an Tag 30.....	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>74</b>
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	74
4.2	Vermindertes Homing von Stammzellen in der toxisch induzierten Kardiomyopathie im Mausmodell .....	75
4.3	Diprotin A als Therapieoption – Status quo und Ausblick .....	77
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGEN UND TABELLEN .....</b>	<b>98</b>
7.1	Abbildungen.....	98
7.2	Tabellen .....	99
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>100</b>

---

**9 DANKSAGUNG ..... 102**

**10 LEBENSLAUF ..... 103**

## **1 Einleitung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zirkulation von CD34<sup>+</sup>-Stammzellen bei der toxisch induzierten und ischämischen Kardiomyopathie umfassend untersucht und darauf basierend ein Stammzell-therapeutischer Ansatz mit Hilfe des DPP-IV-Inhibitors Diprotin A evaluiert.

### **1.1 Epidemiologie der ischämischen Herzerkrankungen und Kardiomyopathien**

In Deutschland stehen die akuten und chronischen Herzerkrankungen im Jahr 2007 mit einem Anteil von 34,9 % der Verstorbenen an erster Stelle der häufigsten Todesursachen. Somit erlagen über 288.000 Menschen einer akuten oder chronischen Herzschiidigung im Jahr 2007, was einer Zunahme im Vergleich zum Vorjahr von 18,1 % entspricht (119, 120). Zudem wird die volkswirtschaftliche Bedeutung der Herz-Kreislauf-Erkrankungen durch die jiihrlichen Therapiekosten von iiber 35,2 Mrd. Euro untermauert (118).

Trotz optimaler Akutbehandlung des Myokardinfarktes entwickeln viele Patienten konsekutiv eine progrediente Herzinsuffizienz. Hier stehen symptomatische Therapieoptionen wie ACE-Hemmer, Diuretika, Digitalis-Priiiparate, Betablocker, und AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten zur Verfiigung. Dariiber hinaus existieren als therapeutische Miiglichkeiten die Implantation eines Cardioverter-Defibrillators, die Resynchronisationstherapie, die intra-aortale Ballonpumpe oder Assist-Systeme.

Der einzige kausale Therapieansatz und ultima ratio ist auch heute noch die Herztransplantation (38). Im Jahr 2008 wurden in Deutschland insgesamt 719 Menschen fiir eine Herztransplantation angemeldet, bei 378 Patienten stellten Kardiomyopathien die Indikation dar. 2008 konnten in Deutschland jedoch nur 382 Herztransplantationen durchgefiihrt werden, weil im Eurotransplant-Gebiet immer weniger Spender zu Verfiigung stehen (86, 87).

Diese Situation zeigt, dass neue, alternative Therapieformen aus medizinischen, ethischen, aber auch wirtschaftlichen Aspekten in Zukunft dringend notwendig sind. Eine neue, hoffnungsvolle Option stellt hierfiir die Stammzelltherapie dar.

## **1.2 Pathophysiologie der ischämischen Herzerkrankungen und Kardiomyopathien**

Um weitere Behandlungsoptionen auf zelltherapeutischer Ebene entwickeln zu können, gilt es zunächst, die Pathophysiologie der ischämischen Herzerkrankungen und der Kardiomyopathien zu verstehen. Pathophysiologisch ist die ischämische Herzerkrankung durch ein unzureichendes myokardiales Sauerstoffangebot oder nach akutem Myokardinfarkt durch mangelnde Perfusion gekennzeichnet. Die daraus resultierende ischämische Herzinsuffizienz führt bei den Patienten zu Symptomen wie geringere Leistungsfähigkeit, Dyspnoe, Asthma cardiale oder periphere Ödeme.

Als weitere Folge daraus kann sich eine Kardiomyopathie entwickeln. Diese wird von der World Health Organisation (WHO) als eine Herzmuskelerkrankung definiert, die mit einer Fehlfunktion des Herzens einhergeht (101, 139). Der häufigste Grund für eine Kardiomyopathie ist die Ischämie, entstanden durch einen akuten Herzinfarkt oder eine chronische koronare Herzkrankheit. Die ischämische Kardiomyopathie (ICM) zählt zu den sekundären und zu den spezifischen Kardiomyopathien, da ihre Ätiologie und Pathogenese bekannt sind. Sie ist durch eine kardiale Dysfunktion des nicht ischämischen oder des nicht direkt infarktgeschädigten Myokards gekennzeichnet. Somit liegt die Ursache hierfür in einer Überlastung des nicht infarzierten Herzmuskels und dem architektonischen Umbau des Herzens, dem sogenannten kardialen Remodeling, mit einer reduzierten Pumpleistung. Unter kardialen Remodeling versteht man eine Hypertrophie der Kardiomyozyten, Ausbildung von interstitiellem Bindegewebe und eine perivaskuläre Fibrose in Begleitung einer chronisch ischämischen Herzerkrankung (50). Häufig finden sich in diesem Zusammenhang Arrhythmien, besonders ventrikulärer Art (38).

Für diese Arbeit ist zudem die medikamentös-toxische Kardiomyopathie relevant, die in den Industrieländern durch Alkoholkonsum, aber auch lebensnotwendige Chemotherapeutika verursacht wird. Sie entsteht aufgrund eines Abusus von Arznei-, Genussmitteln oder Drogen. Alkohol wird in bis zu 30 % der dilatativen Kardiomyopathien (DCM) als Ursache angenommen, allerdings ist die auslösende Dosis nicht bekannt (38, 70, 113). Als kardiotoxische Medikamente gelten verschiedene Psychotherapeutika, Kathecholamine in hoher Dosis und auch Doxorubicin und weitere Anthrazykline. Letztere verursachen unter den Chemotherapeutika-induzierten Kardiomyopathien die schwersten kumulativen, Dosis-limitierenden und -abhängigen Kardiomyopathien (69). Die Kardiomyopathie nach Doxorubicin-Behandlung ist irreversibel und charakterisiert durch geringe Vergrößerung des linken Ventrikels und eine globale systolische Dysfunktion (61). Die Ursachen für eine

Kardiomyopathie können mannigfaltig sein – neben ischämischer und toxischer Entstehung existieren seltenere genetische, postmyokarditische oder metabolische Genesen (38).

### **1.3 Stammzellen**

Das Herz ist im Gegensatz zu anderen Organen nicht ausreichend in der Lage, geschädigtes Gewebe selbst zu reparieren. Daher wird in der sogenannten Regenerativen Medizin versucht, mittels Stammzellen eine myokardiale Regeneration zu erzielen. Die Stammzelltherapeutischen Möglichkeiten umfassen den Einsatz von embryonalen und vor allem adulten Stammzellen, auf dem Wege der Stammzelltransplantation und -mobilisation. Im Folgenden wird auf die embryonalen und adulten Stammzellen eingegangen.

#### **1.3.1 Embryonale Stammzellen**

Embryonale Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich in vivo und in vitro in alle drei Keimblätter und damit in über 210 Zelltypen des Körpers auszudifferenzieren (26) – sie sind somit pluripotent. Embryonale Stammzellen werden nach der Befruchtung im Stadium der Blastozyste aus der Inneren Zellmasse gewonnen, in Kultur gebracht und differenziert. Humane embryonale Stammzellen können zu Kardiomyozyten ausdifferenzieren (85) und im Ratten-Tiermodell konnte durch Transplantation der embryonalen Stammzellen sogar eine Pumpfunktionsverbesserung erreicht werden (82). Die Vorteile der embryonalen Stammzellen liegen in ihrer ausgeprägten Pluripotenz; Nachteile bestehen in der möglichen Ausbildung von Teratomen und der ethischen Kontroverse über die embryonalen Stammzellen, die seit der Einführung des Stammzellgesetzes (StZG) die humane embryonale Stammzell-Forschung in Deutschland erschwert. Bedenken existieren auch hinsichtlich einer möglichen Arrhythmogenität, Immunogenität oder Verunreinigungen der Kulturen. 2007 gelang es Forschergruppen in Japan und den USA, Hautzellen in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) umzuwandeln. Aus diesen reprogrammierten Zellen – welche die Eigenschaften von embryonalen Stammzellen besitzen – konnte unter anderem Herzmuskelgewebe gezüchtet werden (43, 91, 124). Die Herstellung der iPS ohne Vektor- oder transgene Sequenzen oder mit Hilfe rekombinanter Proteine ist ein neuer Fortschritt (146, 149). Im Folgenden soll jedoch die Betonung auf adulten Stammzellen liegen.

### 1.3.2 Adulte Stammzellen

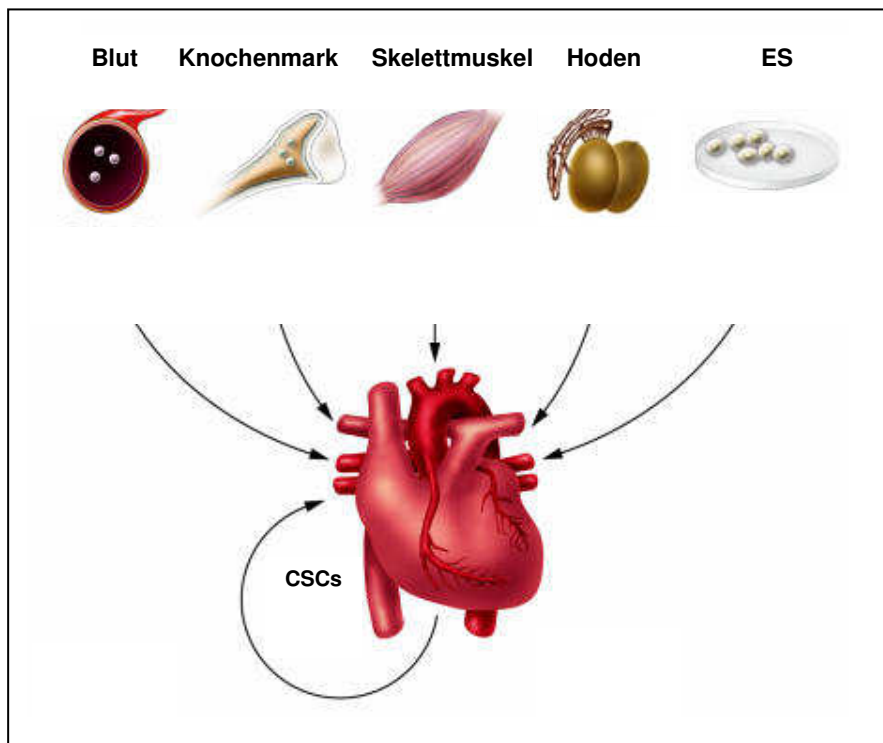
Adulte Stammzellen finden sich auch nach der Geburt in verschiedenen Organen des Körpers (z. B. im Knochenmark, in der Haut, in der Leber und in der Nabelschnur). Sie besitzen nur noch ein eingeschränktes Differenzierungspotential und werden daher als multipotent bezeichnet. Vorteile der adulten Stammzellen zeigen sich in der einfachen Gewinnung, der fehlenden Malignität und der ethischen Unbedenklichkeit. Auch können sie aufgrund ihrer immunologischen Kompatibilität für autologe Transplantationen im Bereich des Tissue Engineering eingesetzt werden. Sie versprechen somit eine pragmatische und sichere Verwendung im klinischen Einsatz (92).

Zu den adulten Stammzellen zählen Nabelschnurstammzellen, Knochenmarksstammzellen, mesenchymale Stammzellen, multipotente Progenitorzellen, hämatopoetische Stammzellen und kardial ortsständige Stammzellen (31). In neueren Publikationen wurden die small embryonic-like stem cells und die multipotenten germline stem cells analysiert, die aber noch nicht in größeren Studien eingesetzt worden sind (42, 67, 141). In der vorliegenden Arbeit wurden hämatopoetische Stammzellen untersucht, die in endotheliale Stammzellen differenzieren können. Sie tragen als Oberflächenmarker unter anderem CD34, CD45, CD31, Chemokin-Rezeptor 4 (CXCR4), Stammzellantigen-1 (Sca-1) und Stammzellfaktor-Rezeptor (c-kit). Eine Charakterisierung der adulten Stammzellen ist in Tabelle I zu finden. Die darauf folgende Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über Ressourcen für die adulte und embryonale Stammzelltherapie.

Zelltyp	Quelle	Charakteristika	Literatur
Hämatopoetische Stammzellen (HSC)	Knochenmark	CD34 <sup>+</sup> , CD45 <sup>+</sup> , CD133 <sup>+</sup> , c-kit <sup>+</sup> bzw. CD117 <sup>+</sup> , Sca-1 <sup>+</sup> , Lin <sup>-</sup> , CXCR4 <sup>+</sup> , CD31 <sup>+</sup>	(30)
Mesenchymale Stammzellen (MSC)	Knochenmark	CD44 <sup>+</sup> , CD90 <sup>+</sup> , CD105 <sup>+</sup> , Str-1 <sup>+</sup> , CD34 <sup>-</sup> , CD45 <sup>-</sup> , CD133 <sup>-</sup>	(95)
Multipotente adulte Progenitorzellen (MAPC)	Knochenmark	Subtyp der MSCs	(56)
Umbilikale somatische Stammzellen (USSC)	Nabelschnurblut	Subtyp der MSCs	(65)

Endotheliale Progenitorzellen (EPC)	Peripheres Blut	Isolation aus mononukleären Zellen, CD31 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> , CD45 <sup>+</sup> , KDR <sup>+</sup>	(5)
SkelettmYOblasten (SM)	Skelettmuskel	Isolation aus Skelettmuskelbiopsien, CD56 <sup>+</sup>	(79)
Residente kardiale Stammzellen (CSC)	Herz	Isolation aus Myokard-Biopsien, CD34 <sup>-</sup> , CD45 <sup>-</sup> , c-kit <sup>+</sup> , Sca-1 <sup>+</sup>	(13)
Very small embryonic-like stem cells (VSEL-SC)	Knochenmark	CXCR4 <sup>+</sup> , SSEA-1 <sup>+</sup> , Oct-4 <sup>+</sup> , Nanog <sup>+</sup> , Nkx2.5/Csx <sup>+</sup> , VE-cadherin <sup>+</sup> , GFAP	(67, 141)
Multipotent adult germline stem cells (maGSC)	Maus-Hoden	Ras1 <sup>+</sup> , Gro1 <sup>+</sup> , Oct3/4 <sup>+</sup> , Nanog <sup>+</sup> , Utf1 <sup>+</sup> , Esg1 <sup>+</sup> , Rex1 <sup>+</sup> ; Proliferation und Differenzierung zu Kardiomyozyten	(41, 42)

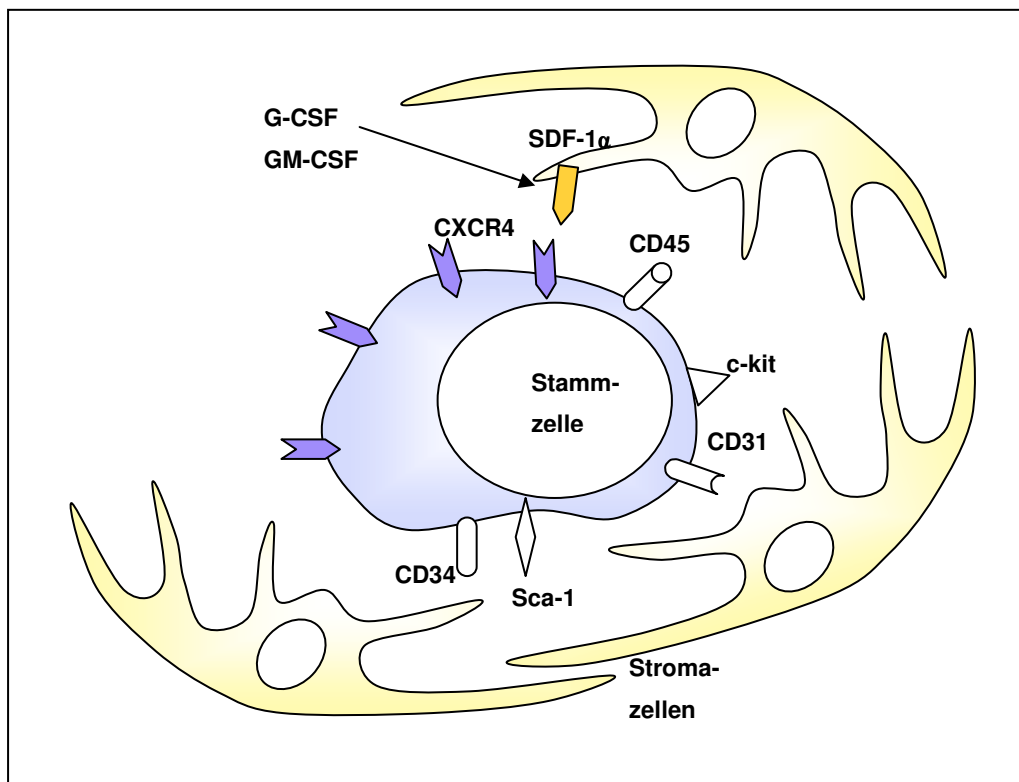
**Tabelle I:** Adulte Stammzellen für die Stammzelltherapie am Herzen, modifiziert nach Engelmann et al. (31)



**Abbildung 1:** Ressourcen für die Stammzelltherapie, modifiziert nach Dimmeler et al. (30); ES: embryonale Stammzellen

## 1.4 Stammzellzirkulation und -homing

Da sich die vorliegende Arbeit der möglichen Verbesserung des Stammzellhomings widmet, sollen die zu Grunde liegenden Mechanismen beleuchtet werden. Im Rahmen der endogenen Stammzellmobilisation migrieren Stammzellen aus dem Knochenmark zum geschädigten Myokard. Physiologischer Weise werden hämatopoetische Stammzellen aus ihrer Nische im Knochenmark, wo sie von den Stromazellen umgeben werden, ausgeschüttet (siehe Abbildung 2). Sie differenzieren sich zu endothelialen Progenitorzellen, zirkulieren im peripheren Blut und migrieren in Richtung der Myokardschädigung. (45, 93).



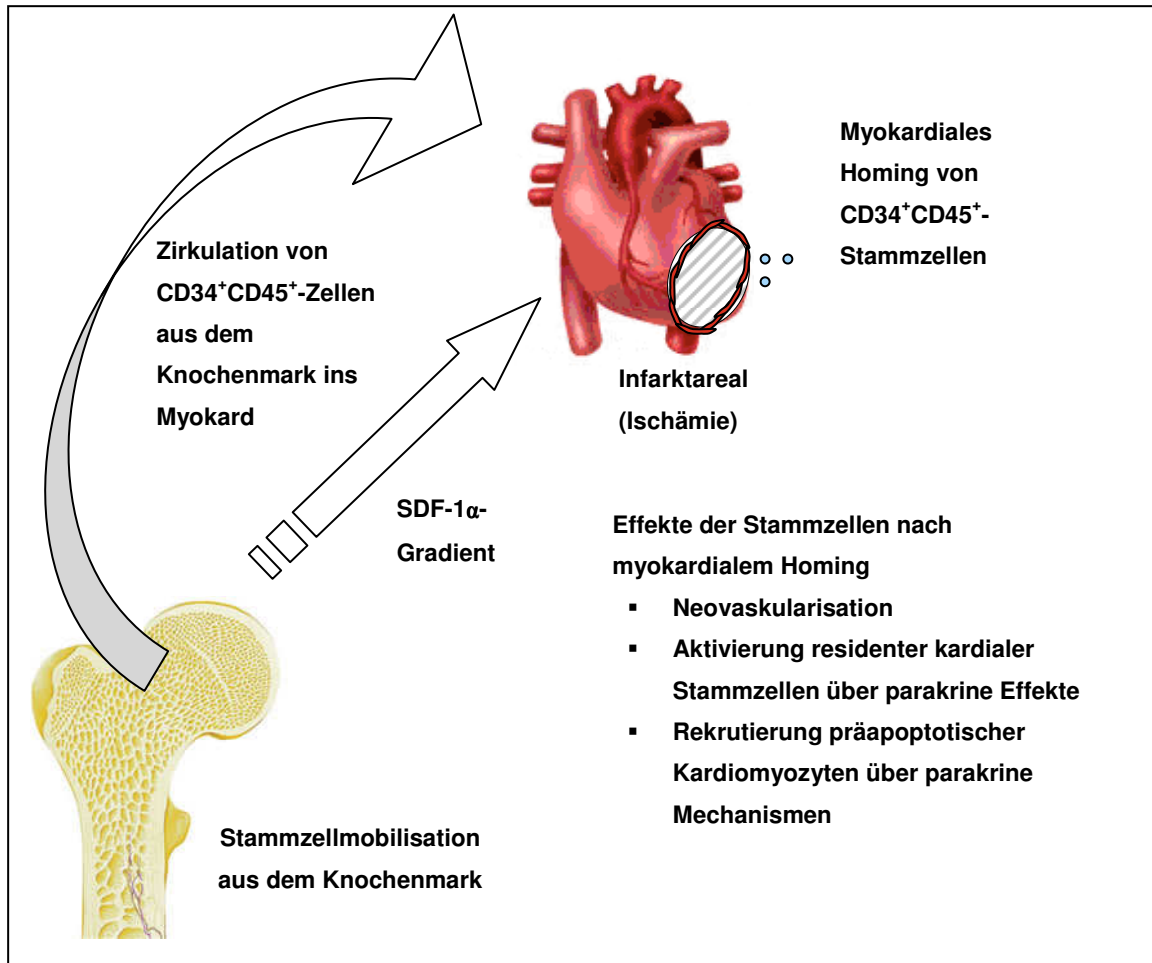
**Abbildung 2:** Stammzell-Nische im Knochenmark, in Anlehnung an Frühauf et al. (35)

Dort erfolgt die Einwanderung der Stammzellen in das geschädigte Myokard, das sogenannte „Homing“. Faktoren wie der hepatocyte growth factor (HGF) und stem cell factor (SCF) spielen hierbei eine Rolle (33, 34). Essentiell für das Homing sind der Chemokin-Rezeptor CXCR4 auf der Zellmembran der Stammzelle und sein Ligand stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 $\alpha$ ) im myokardialen Zielgewebe (6, 19, 34). SDF-1 $\alpha$  ist ein Chemokin, das von endothelialen Zellen in ischämischem Gewebe sezerniert wird und positiv chemotaktisch auf humane CD34<sup>+</sup>-Zellen wirkt (2, 19). Es wurde als erster chemoattraktiver Stoff für CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen in den 90er Jahren als Ligand für den HIV-1 Kofaktor LESTR entdeckt (2, 14). Nach akutem Myokardinfarkt lassen sich vermehrt CD34<sup>+</sup>-Stammzellen im peripheren Blut finden. Dabei ist der SDF-1 $\alpha$ -Spiegel erhöht und für das Homing unter ischämischen



Bedingungen von großer Bedeutung (1, 109). Entlang des SDF-1 $\alpha$ -Gradienten wandern die Zellen in Richtung des geschädigten Myokards, wobei die Expression von SDF-1 $\alpha$  48 Stunden nach Infarkt ihr Maximum erreicht (6, 93). Auch im Zusammenhang mit anderen ischämischen Geweben, z. B. bei einem Apoplex, stellt die Interaktion mit SDF-1 $\alpha$  einen wichtigen Schritt für das Homing dar (49, 136). Ebenso werden bei der chronischen Herzinsuffizienz physiologischer Weise vermehrt Progenitorzellen ausgeschüttet, die über SDF-1 $\alpha$  einwandern können (34, 132). Askari et al. konnten durch SDF-1 $\alpha$ -transfizierte Kardiomyozyten ein Homing in das Myokard erreichen (6). Der Spiegel von zirkulierenden CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>-endothelialen Progenitorzellen zeigt eine inverse Korrelation mit kardialen Risikofaktoren und besitzt einen prognostischen Wert für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (138).

In tierexperimentellen Studien konnten Knochenmarkstammzellen im Myokard die Neovaskularisation, die Herzfunktion und das Überleben verbessern (64, 88). Als weitere zu Grunde liegende Mechanismen für eine Funktionsverbesserung werden Effekte wie die Aktivierung residenter kardialer Stammzellen und die Rekrutierung präapoptotischer Kardiomyozyten über parakrine Mechanismen diskutiert. Dabei können über Chemokin-Ausschüttung der Stammzellen die Blutflussgeschwindigkeit, Kapillardichte und Herzfunktion verbessert und dadurch eine Verminderung der Apoptose erreicht werden (13, 39, 130). Demgegenüber sind die Dogmen der Transdifferenzierung und der Fusion wieder verlassen worden (11, 83). Die folgende Abbildung 3 verdeutlicht die Mechanismen von Stammzellzirkulation und -homing nach Myokardinfarkt.



**Abbildung 3:** Stammzellzirkulation und -homing nach Myokardinfarkt

Eine verstärkte Mobilisation der Stammzellen aus dem Knochenmark wird ebenfalls durch die Gabe von Wachstumsfaktoren wie Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), Chemokinen oder Hormonen erzielt, die die Bindung der Stammzelle zum umgebenden Stroma unterbrechen (28, 32), wie speziell für G-CSF gezeigt werden konnte (71). Die endogene Mobilisation hat gegenüber einer Transplantation exogener Zellen den entscheidenden Vorteil, keine immunologischen Reaktionen auszulösen und weniger invasiv zu sein. Eine G-CSF-induzierte Mobilisation von Stammzellen zeigte in ersten Patientenstudien eine linksventrikuläre Funktionsverbesserung (32, 53, 68). Somit könnte die endogene Mobilisation noch schonendere therapeutische Ansätze verfolgen.

Um das Homing zu betrachten, wenden wir uns im Folgenden der möglichen Stabilisation von SDF-1 $\alpha$  zu, das von CD26 abgebaut wird. CD26 kommt bei zahlreichen hämatopoetischen Zellen vor (58) und ist eine membrangebundene extrazelluläre Peptidase, die ein Dipeptid vom N-Terminus von Polypeptiden nach Prolin oder Alanin abschneidet – auch bei SDF-1 $\alpha$ . Folglich vermindert CD26 über Spaltung von SDF-1 $\alpha$  das Stammzell-

Homing (22). Eine CD26-Inhibition verspricht also ein verstärktes Homing ins Myokard aufgrund des verzögerten Abbaus des SDF-1 $\alpha$  und stellt damit einen Ansatz zur Stammzelltherapie dar. Diese CD26-Inhibition kann durch Applikation von Diprotin A erreicht werden.

### **1.5 Studien mit adulten Stammzellen beim akuten Myokardinfarkt und bei der ischämischen Kardiomyopathie**

Zur Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Literatur wollen wir die Studienlage mit adulten Stammzellen betrachten. In mehreren Studien am Menschen mit intrakoronarer oder transkoronarer Applikation unselektierter Knochenmarkstammzellen nach Myokardinfarkt konnte größtenteils eine Reduktion der Infarktgröße evaluiert und eine Verbesserung der globalen Myokardfunktion nach 4-6 Monaten durch Knochenmarkzelltransfer nachgewiesen werden. Die Anwendung von adulten Stammzellen nach akutem Myokardinfarkt stellt sich zudem als sicher heraus, gravierende Komplikationen traten nicht auf. Einzelnen Patienten musste wegen Arrhythmien ein Cardioverter-Defibrillator eingesetzt werden. Die Langzeitergebnisse nach 18 bzw. 24 Monaten zeigen jedoch ein gemischtes Bild hinsichtlich der Verbesserung der Myokardfunktion (143).

Beim akuten Myokardinfarkt ist die Stammzellzirkulation ausführlich evaluiert worden, jedoch nicht bei der Kardiomyopathie und im Besonderen nicht bei den verschiedenen Formen der Kardiomyopathie. Studien mit Myoblasten bei Herzinsuffizienz zeigten Erfolge hinsichtlich der linksventrikulären Ejektionsfraktion und der Wandbeweglichkeit. In einer Patientenstudie fand sich eine Verbesserung hinsichtlich der Ejektionsfraktion und Perfusion nach CD133<sup>+</sup>-Knochenmarkstammzell-Injektion und Bypass. Einen Überblick über Studien bei Herzinsuffizienz geben Wollert et al. (142), siehe Tabelle II. In Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse fällt auf, dass die Effekte hinsichtlich des Homings bei Kardiomyopathie geringer sind als nach akutem Myokardinfarkt. Um diesem Ergebnis auf den Grund zu gehen, eruierten Theiss et al. daher die Unterschiede zwischen Patienten mit ICM und DCM. Sie fanden eine vermehrte Anzahl zirkulierender CD34<sup>+</sup>-Stammzellen im peripheren Blut bei der DCM, aber eine deutlich verringerte Expression des Homingfaktors SDF-1 $\alpha$  im Myokard von DCM-Patienten im Vergleich zur ICM. Die BNP-Spiegel (brain natriuretic peptide) waren – als Maß für eine Kardiomyozytenschädigung – in gleichem Maße erhöht (125). Diese Konstellation könnte für eine verminderte Homingkapazität sprechen und für den mangelnden Erfolg verantwortlich sein. Diese Situation bildete für uns die Motivation und den Grundstein für unser tierexperimentelles Versuchsdesign und die Fragestellung, ob

eine bestimmte Entität der Kardiomyopathien für ein innovatives Stammzell-therapeutisches Konzept in Frage kommt.

Studie/Autor (Jahr)	Patientenzahl (behandelt + unbehandelt)	Zellzahl und -art	Zeitpunkt der Tx in Wochen bzw. Monaten	Wesentliche Ergebnisse	Referenz
Menasche (2003)	10 + 0	Myoblasten 8,7x10 <sup>8</sup>	3-288 Mo	WB ↑ LVEF ↑	(80, 81)
Herreros (2003)	11 + 0	Myoblasten 1,9x10 <sup>8</sup>	3-168 Mo	WB ↑ LVEF ↑	(37, 48)
Siminiak (2004)	10 + 0	Myoblasten 0,04- 5x10 <sup>7</sup>	4-108 Mo	WB ↑ LVEF ↑	(110)
Chachques (2004)	20 + 0	Myoblasten 3,0x10 <sup>8</sup>		WB ↑ LVEF ↑	(20)
Smits (2003)	5 + 0	Myoblasten 2,0x10 <sup>8</sup>	24-132 Mo	WB ↑ LVEF ↑	(114)
Stamm (2003)	12 + 0	CD133+ 1,0-2,8x10 <sup>6</sup>	3-12 Wo	LVEF↑ P↑ LVEDV↓	(116, 117)
Assmus (2006)	51 MNC, 35 CPC, 16 unbeh.	MNC 1,7x10 <sup>8</sup> , CPC 2,3x10 <sup>7</sup>	3-144 Mo	LVEF↑	(8)

**Tabelle II:** Patientenstudien zur Stammzelltransplantation bei Kardiomyopathie:

*Tx, Transplantation; Mo: Monate; Wo: Wochen; WB, Wandbewegung; LVEF, linksventrikuläre Ejektionsfraktion; LVEDV, linksventrikuläres enddiastolisches Volumen; CPC, kardiale Progenitorzellen; MNC, mononukleäre Zellen; ↑, verbessert; ↓, verschlechtert; modifiziert nach Wollert et al. (142)*

## 1.6 Fragestellung und Versuchsaufbau

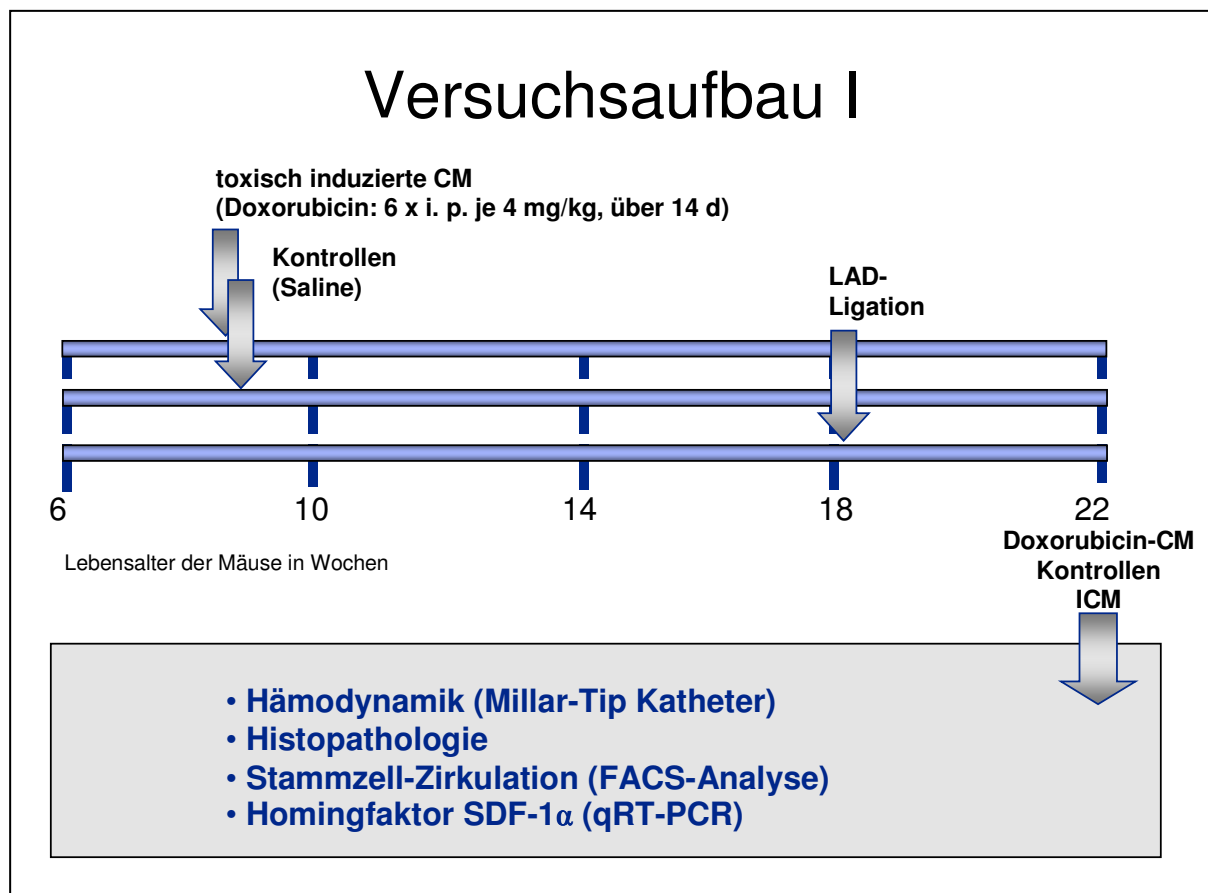
Erste Studien am Menschen haben Unterschiede zwischen ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie hinsichtlich der Stammzellsubpopulationen und Homingfaktoren aufgezeigt. So konnte unsere Arbeitsgruppe analysieren, dass bei Patienten mit DCM im Vergleich zu ICM keine Aufregulation der myokardialen Expression von SDF-1 $\alpha$  stattfindet (125). Die Interaktion von SDF-1 $\alpha$  und CXCR4 spielt die zentrale Rolle beim myokardialen Homing und liegt damit im Fokus der Stammzell-Therapie; allerdings ist dieser Prozess bisher hinsichtlich der unterschiedlichen Ursachen der Kardiomyopathien wenig untersucht. Bei der nicht-ischämischen Kardiomyopathie sind Ausmaß und Wirksamkeit dieses bedeutenden physiologischen Prozesses bis dato unklar. Deshalb verspricht ein direkter Vergleich der Stammzellsubpopulationen im Mausmodell Einblicke in wesentliche Mechanismen der Stammzellzirkulation bei den Kardiomyopathien unterschiedlicher Genese. Um eine krankheitsspezifische Therapie ins Auge fassen zu können, sind tiefer gehende tierexperimentelle Untersuchungen notwendig. Hierfür gilt das Mausmodell für die ischämische und toxisch induzierte Kardiomyopathie als gut etabliert (105, 129). Ziel dieser Arbeit ist es,

- I. die endogene Stammzell-Zirkulation bei der – mittels Doxorubicin – toxisch induzierten und der – mittels LAD-Ligation induzierten – ischämischen Kardiomyopathie an Tag 30 zu vergleichen (Abbildung 4):
  - a. Verifizierung der Kardiomyopathie mittels Hämodynamik-Messungen (Herzfrequenz, Ejektionsfraktion, enddiastolisches Volumen), histologischer Schnitte (HE, Masson-Trichrom, Wanddicken) und Überleben
  - b. Blutanalyse, FACS-Analyse zur Definition der Stammzellsubpopulationen im peripheren Blut und im Knochenmark (CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>)
  - c. Analyse des Homingfaktors SDF-1 $\alpha$  auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR.
  
- II. darauf aufbauend eine Krankheitsentität herauszugreifen und ein erstes Therapie-Regime mittels CD26-Inhibition zur Stabilisierung von myokardialem SDF-1 $\alpha$  mit Diprotin A an Tag sechs und Tag 30 zu untersuchen (Abbildung 5).
  - a. Effektivität der CD26-Inhibition anhand von Hämodynamik-Messungen (Herzfrequenz, Ejektionsfraktion, enddiastolisches Volumen), histologischer

Schnitte (HE, Masson-Trichrom, Wanddicken, Granulationsgewebe) und Überleben

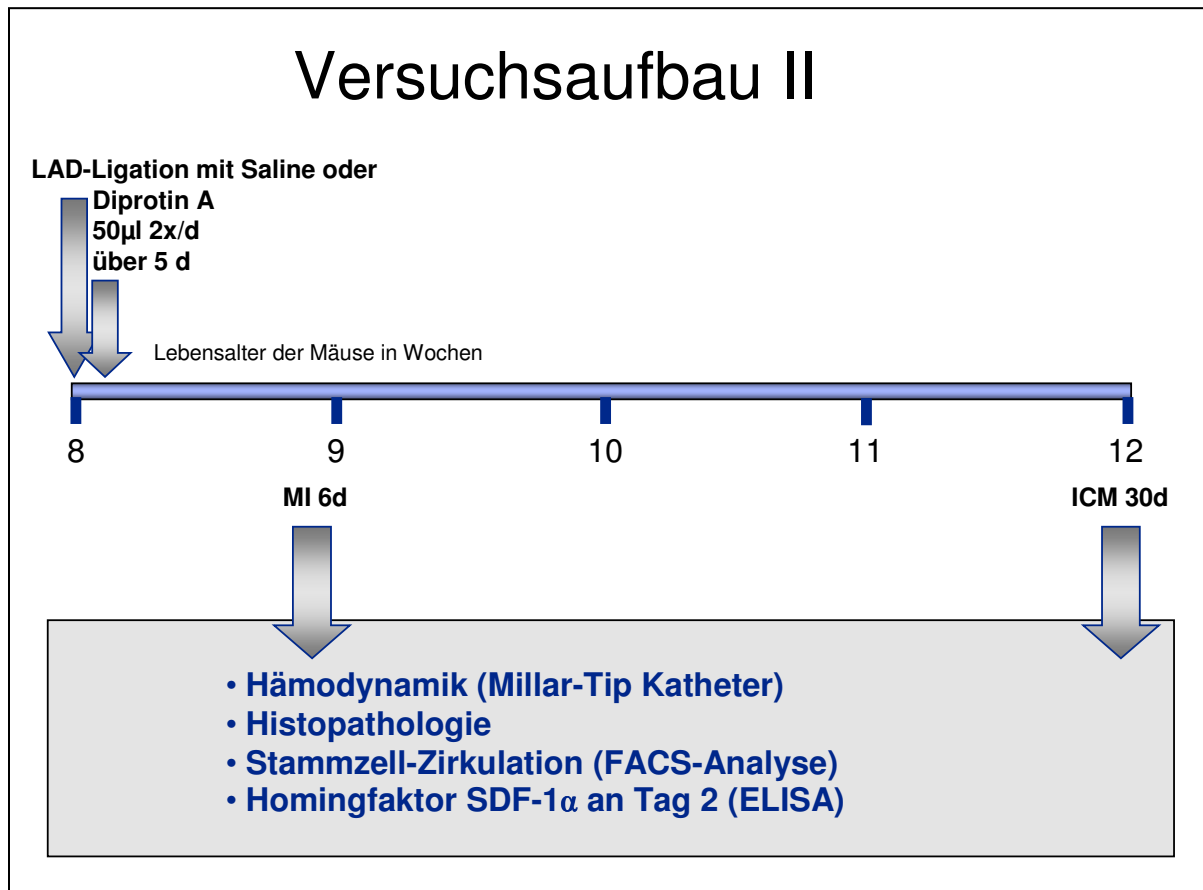
- b. Blutanalyse, FACS-Analyse zur Definition der Stammzellsubpopulationen im peripheren Blut und im Knochenmark ( $CD34^+/CD45^+/CD31^+$ ,  $CD34^+/CD45^+/CXCR4^+$ ,  $CD34^+/CD45^+/Sca-1^+$ ,  $CD34^+/CD45^+/c-kit^+$ )
- c. Analyse des Homingfaktors SDF-1 $\alpha$  auf Proteinebene mittels ELISA an Tag zwei.

Die Gruppen des ersten Teils werden in allen weiteren Teilen dieser Arbeit mit den Abkürzungen Kontr. für Kontrolle, Doxo für Doxorubicin-Behandlung und ICM für ischämische Kardiomyopathie benannt. Für den Teil zwei werden die Bezeichnungen Kontr., MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d und ICM 30d + Dip gewählt, wobei MI für Myokardinfarkt und 6d nach sechs Tagen sowie 30d nach 30 Tagen steht. Dip entspricht dem Pharmakon Diprotin A.



**Abbildung 4:** Versuchsaufbau in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM;

CM: Kardiomyopathie, LAD: left anterior descending artery, qRT-PCR: quantitative real time-polymerase chain reaction, FACS: fluorescence activated cell sorting



**Abbildung 5:** Versuchsaufbau in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip;  
MI: Myokardinfarkt

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

Aqua ad injectabilia	B Braun, Melsungen
BSA (bovines Serumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Cellpack	Sysmex Deutschland, Norderstedt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Clenz-Lösung	Beckman Coulter, Fullerton, USA
EDTA (Dinatriumsalzdihydrat)	Roth, Karlsruhe
Eisessig, Acetic acid glacial	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 96 %, vergällt	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Formalin (Formaldehyd 4 %)	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O dest.	Millipore, Billerica, USA
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
Isotone Natrium-Chlorid-Lösung	B Braun, Melsungen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sheath-Fluid	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien in p.A.-Qualität (von höchstem Reinheitsgrad) bezogen.

#### 2.1.2 Materialien für DNA- und RNA-Methoden

100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Ipswich, USA
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe
DNase I	Invitrogen, Carlsbad, USA
DNase I reaction buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Omniskript RT-Kit (Buffer RT, dNTP 5 mM, Omniskript, RNase-free water)	Qiagen, Hilden



Primer SDF-1 $\alpha$	MWG Biotech, Ebersberg
Random-Primer (3 $\mu$ g/ $\mu$ l)	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNAasin-Inhibitor	Promega, Madison, USA
SYBR Green Supermix (Taq-Polymerase, PCR Puffer)	BioRad, Hercules, USA

### 2.1.3 Materialien für Protein-Methoden

Kollagenase Typ IV 0,1 %	Invitrogen, Carlsbad, USA
Quantikine Mouse CXCL12/SDF-1 $\alpha$ (MCX120) enthält folgende Bestandteile:	R&D Systems, Minneapolis, USA
Microplate 96 well, Conjugate, Standard, Kit Control, AssayDiluent RD1-55, Calibrator Diluent RD6Q, Wash Buffer Concentrate, Color Reagent A and B, Stop Solution, Plate Covers	

### 2.1.4 Antikörper

CD31 (PECAM-1; PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD34 (FiTC, anti-mouse)	eBioscience, San Diego, USA
CD45 (LCA; PerCP, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
C-kit (CD117; PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CxCr4 (CD184; PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
FITC (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
PE (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
PerCP (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
Sca-1 (PE, anti-mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg

### 2.1.5 Pharmaka

Dexpanthenol (Bepanthen Augensalbe)	Bayer, Leverkusen
Doxorubicin hydrochloride	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Heparin-Na 25000 iE	B Braun, Melsungen
Il-Pro-II (Diprotin A)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ketaminhydrochlorid (Ketamin-Inresa 5 %)	Inresa, Freiburg
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2 %)	Bayer, Leverkusen

### 2.1.6 Färbungen

Eosin	BD Pharmingen, Heidelberg
Hämatoxylin	BD Pharmingen, Heidelberg
Masson	BD Pharmingen, Heidelberg
Trichrom	BD Pharmingen, Heidelberg

### 2.1.7 Versuchstiere

Alle Versuche wurden an 8 bis 12 Wochen alten männlichen Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6 mit einem Körpergewicht von 20 bis 25 g durchgeführt (Charles River, Sulzfeld).

### 2.1.8 Operationszubehör

Baktolin wash	Bode Chemie, Hamburg
Braunol-Lösung	B Braun, Melsungen
Dreieckige Saugtupfer unsteril (SUGI)	Kettenbach Medical, Eschenburg
Chirurgisches Nahtmaterial (Ethibond excel, Prolene)	Ethicon, Norderstedt
Chirurgisches Operationsbesteck	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Durapore 1,25 cm x 9,1 m	3M Health Care, Neuss
elca Enthaarungscreme	Asid Bonz, Herrenberg
Feather disposable Scalpel No. 11	Feather safety razor, Osaka, Japan
Haushaltsfaden cotton	Gütermann, Gutach
Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Microlance 3 Einmal-Injektions-Kanülen der Größen 0,9 mm x 40 mm und 0,3 mm x 13 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Schutzhandschuhe unsteril (sempercare)	Semperit, Wien, Österreich
Spritzen zu 1 und 2 ml (BD plastipak)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen BD Micro-Fine + 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterillium	Bode Chemie, Hamburg
Zellstoff-Ecken (Zelletten)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf

### 2.1.9 Hämodynamik-Zubehör

Millar Tip-Katheter (1.4 French)	Millar Instruments, Houston, USA
Millar Aria Pressure-Volume-Conductance System	Millar Instruments, Houston, USA
OP- Mikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena
Mouse-Ventilator Minivent 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500	Opto, Gräfelfing
Wärmeplatte mit Rektalkatheter TKM-0902	Föhr Medical Instruments, Seeheim

### 2.1.10 Laborgeräte und sonstige Materialien

Autoklav Varioklav Dampfsterilisatoren	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
Blutbild-Analyser Sysmex XE-2100	Sysmex Deutschland, Norderstedt
Chemikalienlöffel	Roth, Karlsruhe
Eppendorf Cups 1,5 ml/2ml	Eppendorf, Hamburg
Elektrophorese E 802 mit Gelkammern	Consort, Turnhout, Belgien
FACS (Analysegerät) Coulter Epics XL	Beckman Coulter, Fullerton, USA
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Finnpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Finntip Stepper 5,0 ml, 50 Stück	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Floureszenz-Kamera Gel Doc 2000	BioRad, Hercules, USA
Gefrierschrank Hera freeze -80°C	Heraeus Holding, Hanau
Glaszylinder, 500 ml	Schott, Mainz
Heizblock HTM 130	HLC BioTech, Bovenden
Kühlschrank/Gefrierschrank Premium	Liebherr, Biberach
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop-Photokamera Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena
Mikrowelle Microwave 800	Severin Elektrogeräte, Sundern
Multipipette (20-200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Petrischale Steriplan	Roth, Karlsruhe
Pipetten 2,5/20/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Rotilabo Reaktionsgefäßständer	Roth, Karlsruhe
Schüttelgerät Polymax 10/40	Heidolph Instruments, Schwabach

Thermocycler Biometra t-personal combi	Biometra, Göttingen
Ultraschallhomogenisator Sonopuls	Bandelin Electronic, Berlin
Vortex-Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage Scout Pro	Ohaus, Giessen
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Mikro 20	Hettich, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifugenröhrchen 15 ml/50 ml	Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz

### 2.1.11 Hard- und Software

Adobe Photoshop 7.0	Adobe, San Jose, USA
Axio Vision V4.3	Carl Zeiss, Jena
Dell Desktop PC Optiplex GX 260	Dell, Round Rock, USA
ELISA reader TECAN Genios	Tecan, Schweiz
Expo 32 ADC	Beckman Coulter, Fullerton, USA
HSE Isoheart	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
LG Desktop PC	LG Electronics, Seoul, Korea
MPCU2PV.exe	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
PVAN 2.9.	Millar Instruments, Houston, USA
QuantityOne	BioRad, Hercules, USA
Siemens Desktop PC Scenic L 1850 PM	Siemens, Berlin und München
Siemens Desktop PC Scenic Pro M7	Siemens, Berlin und München
XFlour TECAN Software	Tecan, Schweiz

Markennamen wurden in der gesamten vorliegenden Arbeit nicht explizit gekennzeichnet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mausmodell

Für die vorliegende Arbeit wurden Tierexperimente an der Maus entsprechend den Vorschriften der Tierschutzverordnung durchgeführt. Die durchgeführten Arbeiten wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Az: 55.2-1-54-2531-63-06).

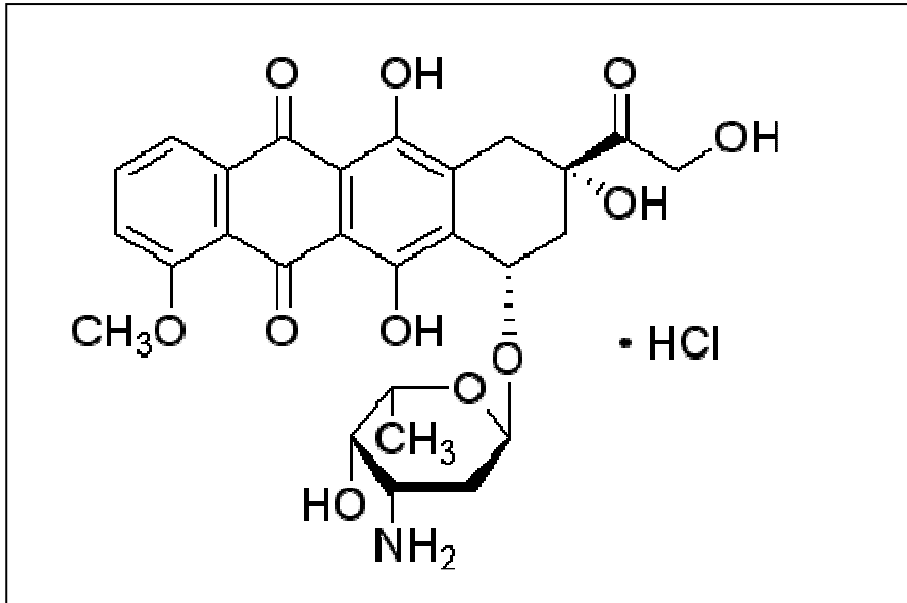
### **2.2.1.1 Haltung**

Für das Mausmodell wurden ausschließlich männliche 20 – 25 g schwere C57BL/6 Mäuse verwendet. Futter und Wasser standen ihnen 24 Stunden pro Tag zur Verfügung. Sie wurden in Einzelkäfigen mit ausreichender Belüftung auf Holzspäne-Einstreu gehalten. Auch ein regelmäßiger 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus, eine konstante Temperatur des Stalles von 22 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit wurden gewährleistet.

### **2.2.1.2 Gabe der kardiotoxischen Substanz Doxorubicin**

Die toxische Kardiomyopathie wurde durch eine sechsmalige Gabe von jeweils 154 µl (2,5 mg/kg KG) Doxorubicin intraperitoneal innerhalb von 14 Tagen pro Versuchstier induziert (129). Zu Vergleichszwecken wurde den Kontroll- und Infarkttieren 150 µl 0,9 %-NaCl-Lösung intraperitoneal zu denselben Zeiten gespritzt.

Doxorubicin ist ein Anthrazyklin-Antibiotikum, das zur Chemotherapie bei Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphom, akuten Leukämien, Weichteilsarkomen, Mamma-, Ovar- und Schilddrüsen-Krebs verwendet wird. Seine wesentlichen Nebenwirkungen sind Knochenmarksdepression und Kardiotoxizität, einhergehend mit Herzrhythmusstörungen und Kardiomyopathie mit Herzinsuffizienz (60). Die starke kardiotoxische Wirkung von Doxorubicin – auch als Adriamycin bezeichnet – wurde von Balazs et al., Deglin et al. und Bristow et al. in den Jahren um 1980 beschrieben (10, 16, 27). Die Schädigung beim Menschen führt meist zu einer dilatativen Kardiomyopathie. Die Gesamtprävalenz dieser Kardiomyopathie liegt bei 7/100.000 und die 10-Jahres-Überlebensrate einer dilatativen Kardiomyopathie bei 10 - 20 % (38). Doxorubicin führt über eine kumulative, zeitabhängige Dosis (127), die im Menschen 550 mg/m<sup>2</sup> überschreiten muss, in 6 - 10 % der Erwachsenen zur kardialen Schädigung (69). Doxorubicin hat ein Molekulargewicht von 579,98 und seine Summenformel lautet C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub> (3); seine Strukturformel ist in Abbildung 6 dargestellt. Es interkaliert mit der DNA und führt zur Apoptose (15, 40, 145). Als wesentliche Mechanismen der chronischen Herzschädigung werden oxidativer Stress durch freie Radikale mit Zerstörung myokardialer Organellen und Membranen, eine Veränderung der Calciumhomeostase, die Freisetzung kardiotoxischer Mediatoren aus Mastzellen und Aufregulierung proapoptotischer Proteine diskutiert (25, 94, 112, 128). Als möglicher Signalweg wird der Caspase 3-Weg diskutiert (131).



**Abbildung 6:** Strukturformel von Doxorubicin (Sigma-Aldrich)

Als Großtiermodell der toxisch induzierten Kardiomyopathie wurde Doxorubicin an Schweinen, Schafen und Hunden eingesetzt (97). Ab Mitte der 70er Jahre war das Ratten-, kurze Zeit später das Mausmodell etabliert (55, 137). Eine gute Verlässlichkeit des etablierten Modells konnten Robert et al. nachweisen (102, 133). Als Dosis wählten wir die in der Literatur als sicher über der Schwelle liegende Menge von 2,5 mg/kg KG. Als Beobachtungszeitraum entschieden wir uns für drei Monate nach Abschluss der Doxorubicin-Injektionen, um mit Sicherheit kardiotoxische Langzeitschäden beobachten zu können (121, 129).

### 2.2.1.3 Infarktinduzierung

Die Einleitung der Narkose erfolgte Gewichts-adaptiert mit Xylazinhydrochlorid (9 mg/kg KG) und Ketaminhydrochlorid (80 mg/kg KG) intraperitoneal. Eine für die Operation ausreichende Toleranz wurde nach ca. 4 Minuten erreicht und dauerte 40 Minuten an.

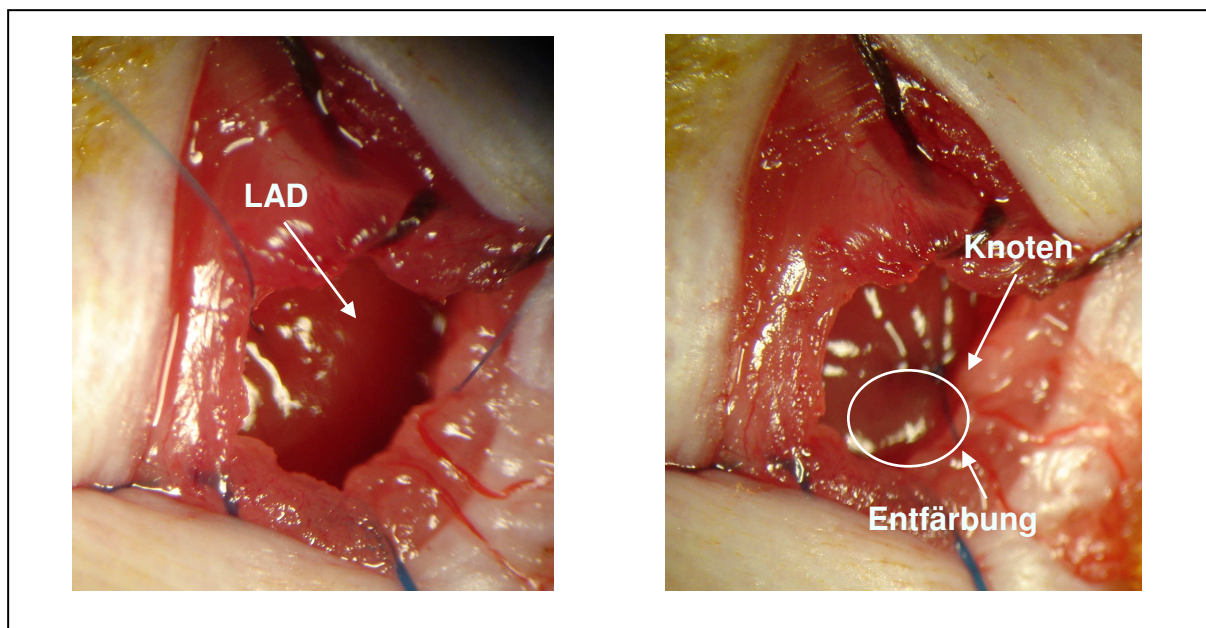
Dann erfolgten die Fixierung der Maus mit Klebestreifen auf einer Wärmeplatte und der Augenschutz mit Bepanthen-Augensalbe. Die Körpertemperatur der Maus wurde durch ein Rektalthermometer gemessen und über die Wärmeplatte auf ca. 37,5 °C gehalten.

Nach Eröffnung der Halshaut und stumpfen Präparation der Glandulae mandibularis et parotis erfolgte bei fixiertem Oberkiefer die Intubation der Trachea unter Sicht mit einer Metallkanüle. Die korrekte Intubation wurde durch Heben und Senken des Thorax und

suffiziente Sauerstoffversorgung der Maus validiert. Die Maus wurde mit 150 Atemzügen pro Minute und einem Volumen von 200  $\mu$ l beatmet. Der Schnitt am Hals der Maus wurde mit einem 5-0-Faden in einer fortlaufenden Naht versorgt und nochmals desinfiziert.

Nun wurden die Haare über der linken Thoraxhälfte mittels einer Enthaarungscreme entfernt. Restliche Haare konnten mit einem Klebestreifen abgenommen werden. Das Operationsfeld wurde mit einer mit Braunol getränkten Zellette desinfiziert und das Versuchstier samt Wärmeplatte unter das Mikroskop gelegt.

Zu Beginn der Operation wurde ein Hautschnitt unterhalb der linken Axilla der Maus gesetzt, parallel zu den Rippen verlaufend und ca. 1 cm lang ab dem Sternum gemessen. Im Folgenden wurden die Muskelschichten (Musculus pectoralis major et minor und Musculi intercostales) über dem zweiten Interkostalraum linksthorakal aufgesucht und vorsichtig mit einer feinen Schere durchtrennt, ohne dabei die Arteria mammaria zu verletzen. Mit Hilfe eines weiteren 5-0-Fadens, der um die zweite und dritte Rippe gestochen und mit Klebestreifen fixiert wurde, konnte der Thorax aufgespreizt werden. Im Operationsfeld wurde zuerst das Perikard eröffnet, um den Blick auf die arterielle Versorgung des Herzens zu gewährleisten. Dann wurde die LAD (left anterior descending artery) aufgesucht und kurz unterhalb des Herzohres mit einem 8-0-Faden unterstochen und mittels mehrerer Knoten fest und dauerhaft ligiert. Das Myokard blasste als Zeichen eines effektiven Infarktes deutlich ab (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7:** OP-Situs einer Maus vor (links) und nach LAD-Ligation (rechts).

*Zu sehen ist der Ligationsfaden und eine leichte Abblassung kaudal des Knotens.*

Nach Kontrolle der LAD-Ligation wurde der Operationsbereich trocken getupft und die Spreizfäden heraus gezogen. Anschließend wurden die Rippen sorgsam mit einem 5-0-Faden und mindestens drei Stichen im zweiten und vierten Interkostalraum mit einer fortlaufenden Naht genäht. Die Muskuli pectoralis major et minor und darauf folgend die Haut wurden ebenso mit einem 5-0-Faden vernäht. Abschließend wurde die Naht mit Braunol desinfiziert. Nach ca. 35 Minuten wurde die Maus mit nachlassender Narkose wacher und sobald wie möglich extubiert.

Mit einer Infrarot-Lampe wurde die Temperaturregelung noch geraume Zeit unterstützt, bis die Maus sich wieder von alleine in ihrer gepolsterten Box bewegen konnte. Nach Bedarf wurden 50 – 150 µl isotone Natriumchlorid-Lösung intraperitoneal zum Volumenausgleich injiziert und eine Stunde später 0,05-0,1 mg/kg KG Buprenorphin intraperitoneal zur Schmerzlinderung gespritzt. In die statistische Auswertung wurden nur Versuchstiere einbezogen, die den Operationstag (mindestens 16 Stunden) überlebten.

#### 2.2.1.4 Gabe des DPP-IV-Inhibitors Diprotin A

Diprotin A, ein Dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV/CD26)-Inhibitor, wurde zweimal pro Tag jeweils ca. 50 µl (75 mg/kg KG) subkutan in die Nackenfalte fünf Tage in Folge injiziert. Zu Vergleichszwecken wurde den Kontroll- und Infarkttieren 50 µl 0,9 %-NaCl-Lösung subkutan zu denselben Zeiten gespritzt.

Diprotin A – auch als Ile-Pro-Ile oder CD26-Inhibitor bezeichnet – hat ein Molekulargewicht von 341,45, seine Summenformel lautet  $C_{17}H_{31}N_3O_4$  (4) und die Strukturformel ist in Abbildung 8 zu sehen.

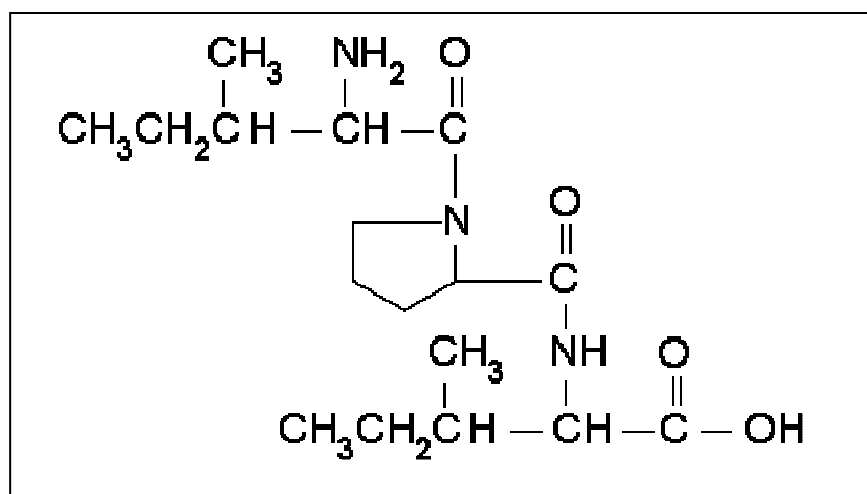


Abbildung 8: Strukturformel von Diprotin A (Sigma-Aldrich)



DPP-IV-Inhibitoren sind aufgrund dessen, dass sie auch Inkretinhormone inaktivieren können, Hoffnungsträger der oralen Therapie des Diabetes mellitus (29, 77, 100, 140). Unter dem Namen Januvia® (Sitagliptin) hat die Firma Merck als erstes zugelassenes Medikament dieser Gruppe einen DPP-IV-Inhibitor auf den Markt gebracht (47, 59). Die Therapie mittels klinisch zugelassenem CD26-Inhibitor zur Unterstützung des SZ-Homings könnte einen wesentlichen Beitrag zur Behandlung der Folgen eines akuten Myokardinfarktes leisten.

## 2.2.2 Hämodynamische Messungen

### 2.2.2.1 Conductance-Methode

Mit Hilfe des Millar-Tip-Katheters (1.4 French = 0,462 mm) ist eine kontinuierliche Messung des linksventrikulären Drucks und der relativen Volumina eines schlagenden Herzens möglich. Des weiteren können Druck-Volumen-Schleifen (siehe Abbildung 9), so genannte Frank-Starling-Kurven, generiert werden und mehrere Herzzyklen aufgezeichnet und verglichen werden. Mittels des Katheter-Systems ist letztendlich eine Aussage über wichtige kardiale Funktionsparameter an Versuchstieren und ein Rückschluss auf den Zustand ihres Herzens möglich.

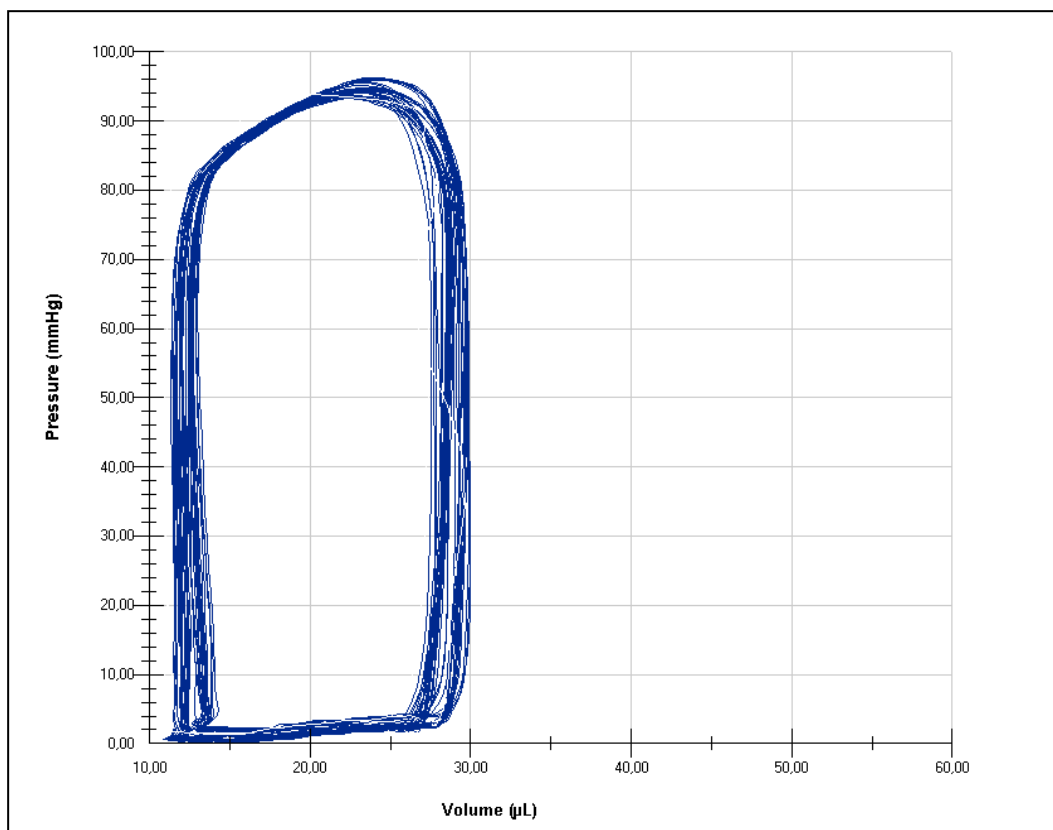
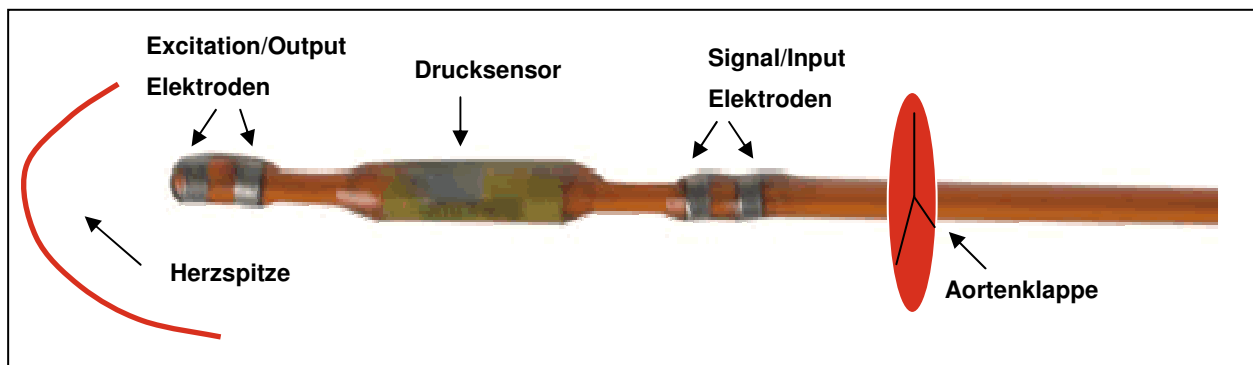


Abbildung 9: Druck-Volumen-Schleife einer gesunden Maus

Die Kathetermessung liefert Daten von Druck-Volumen-Kurven (siehe Abbildung 9). Die Bestimmung beruht auf der Conductance-Methode, erstmals von Baan et al. Anfang der achtziger Jahre untersucht (9), die eine Ableitung von linksventrikulärem Druck und Volumen aufgrund der sich ändernden Leitfähigkeit des Blutes zulässt. Auch in Korrelation zu modernen bildgebenden Verfahren, wie der Magnetresonanz Tomographie (MRT), zeigt die Conductance-Methode eine gute Zuverlässigkeit hinsichtlich der Volumenbestimmung (84). Am Ende des Katheters befinden sich vier Platinelektroden und dazwischen ein Drucksensor. Der Katheter wird über die rechte Arteria carotis bis in den linken Ventrikel des Versuchstieres vorgeschoben und kommt so zu liegen, dass die distalen Elektroden sich in der Herzspitze und die proximalen unterhalb der Aortenklappe befinden (siehe Abbildung 10). Zwischen diesen Platinelektroden baut sich mit Hilfe eines Wechselstromes ein elektrisches Feld mit der Leitfähigkeit  $G(t)$  (Conductance genannt) auf. Während des Herzzyklus ändert sich das Blutvolumen im Ventrikel und damit auch die Leitfähigkeit.



**Abbildung 10:** Millar-Tip-Katheter (1.4 French)

An den Elektroden werden unterschiedliche Spannungspotentiale gemessen und mit Hilfe folgender Gleichung in Volumina umgerechnet, wobei das Volumen eines elektrischen Leiters proportional der elektrischen Leitfähigkeit ist:

$$V(t) = (1/\alpha) \times (L^2/\sigma b) \times (G(t) - G(p))$$

$V(t)$ : zeitabhängiges Ventrikelvolumen

$\alpha$ : Korrekturfaktor (Schlagvolumen<sub>Conductance</sub>/Schlagvolumen<sub>Referenzmethode</sub>)

$L$ : Elektrodendistanz

$\sigma b$ : spezifische Leitfähigkeit des Blutes

$G(t)$ : Gesamtleitfähigkeit

$G(p)$ : Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes = parallele Conductance

Allerdings registrieren die Elektroden sowohl die Leitfähigkeit des Blutes als auch die des Herzmuskels, so dass die Leitfähigkeit des Herzmuskels ( $G(p)$ ) rechnerisch abgezogen werden muss, um später ein korrigiertes Ventrikelvolumen zu erhalten. Daher wird eine hypersaline Lösung (10  $\mu$ l 15 % Natriumchlorid-Lösung) über einen Vena jugularis-Katheter gespritzt, wodurch sich kurzfristig die Leitfähigkeit des Blutes ändert. Das Volumen des umliegenden Gewebes wird durch den Schnitt zweier Geraden berechnet: Die erste Gerade enthält die Werte der hypersalinen Injektion, die Gleichung der zweiten Geraden lautet:

$$\text{Enddiastolisches Volumen (Ved)} = \text{Endsystolisches Volumen (Ves)}.$$

Diese Gerade entspricht dem Zustand einer leeren Herzkammer. Der Schnittpunkt beider Geraden ergibt auf der y-Achse das Volumen des umliegenden Gewebes, dargestellt in Abbildung 11. Dadurch findet die Blutkalibrierung statt und relative Volumeneinheiten werden in reale, korrigierte Volumina umgerechnet.

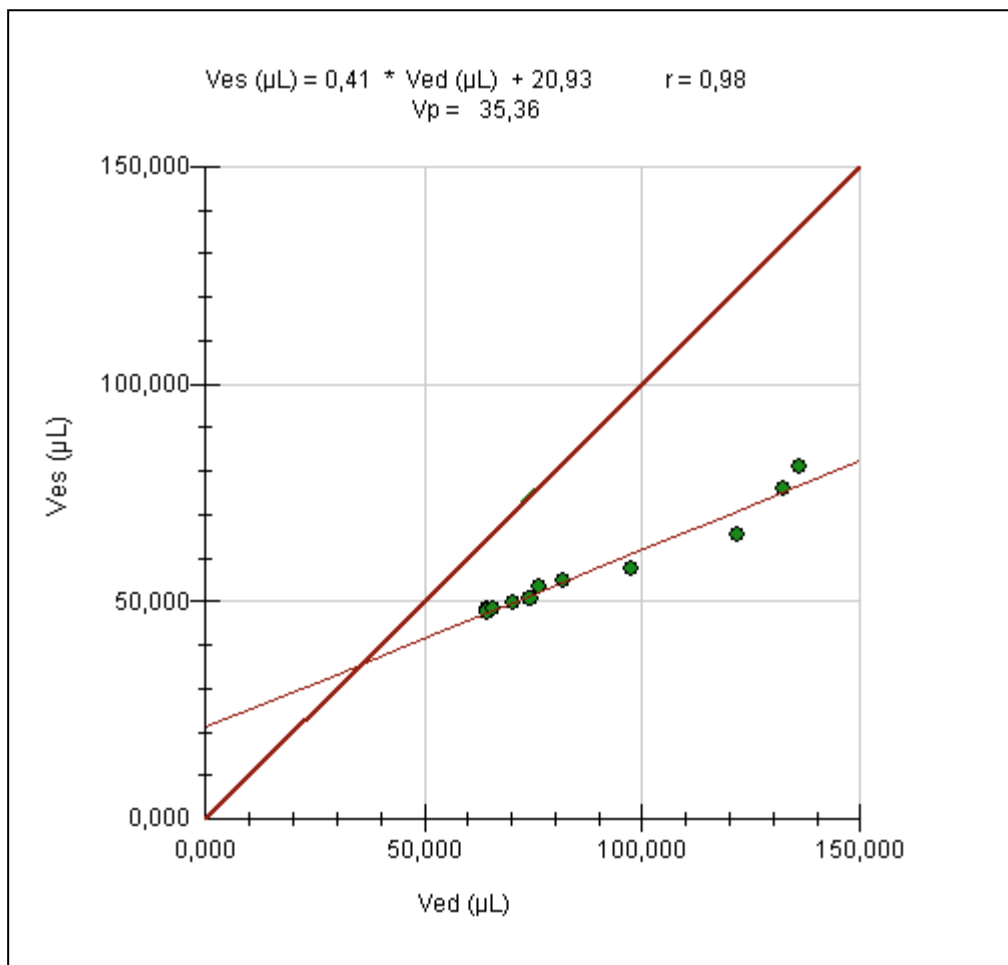


Abbildung 11: Saline-Kalibrierung

### **2.2.2.2 Durchführung und Aufzeichnung der Messung**

Zur Vorbereitung der Messung wurde der Katheter in einer isotonen Natriumchlorid-Lösung nach relativen Volumeneinheiten und Druck geeicht.

Eine 20 – 25 g schwere männliche C57BL/6 Maus wurde gewichtsadaptiert mit Xylazinhydrochlorid (9 mg/kg KG) und Ketaminhydrochlorid (80 mg/kg KG) intraperitoneal narkotisiert. Anschließend wurde sie wiederum auf eine selbstregulierende Wärmeplatte gelegt, fixiert und über eine Rektalsonde überwacht.

Die Haut über dem Hals wurde eröffnet und die Trachea wie oben beschrieben frei präpariert. Nach Intubation wurde die Beatmung wieder auf 150/min. und ein Volumen von unter 200 µl eingestellt und die Platte samt Maus unter das Mikroskop gelegt. Unter Sicht und ständigem Befeuchten mit isotoner Natriumchlorid-Lösung wurde die rechte Arteria carotis vorsichtig stumpf frei präpariert – unter Schonung des nahe verlaufenden Nervus vagus. Eine Metallklammer wurde zur Stabilisierung unter das Gefäß gelegt und zwei Baumwollfäden distal zur späteren Blutstillung und proximal zur Fixierung und zur Verstärkung des Blutrückstaus angebracht.

Möglichst weit entfernt vom Herzen wurde mit einer kleinen Kanüle ein Loch in die Wand der Karotis gestochen. Mittels einer großen gebogenen Kanüle konnte die eine Seite der Karotiswand hoch gehalten und mit der anderen Hand der Millar-Tip-Katheter vorsichtig in das Gefäß eingeführt und vorwärts geschoben werden. Nun wurde die Aufzeichnung gestartet und der Katheter über den Widerstand der Klappe hinweg in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Für die Auswertung wurden nur Druck-Volumen-Kurven ausgewählt, die während einer korrekten Platzierung des Katheters und in hämodynamisch stabilem Zustand aufgezeichnet wurden. Zur Berechnung des realen Volumens wurden 10 µl einer hypersalinen 15 %igen Natriumchlorid-Lösung mehrmals über einen Katheter in die linke Vena jugularis injiziert.

Das Versuchstier wurde nach Ende der Messung durch Genickbruch oder eine Überdosis von Narkotika sachgerecht getötet.

### **2.2.2.3 Parameter der Messung**

Die Signale des Katheters wurden über einen Signalaufnehmer (Millar ARIA) auf einem Computer aufgenommen und mittels des Programms „HSE Isoheart“ aufgezeichnet und mit Hilfe der Software „Millar PVAN 2.9“ ausgewertet. Folgende Parameter sind hervorzuheben:

- Herzfrequenz (HR) in Schlägen/min.
- Maximales Volumen ( $V_{max}$ ) in  $\mu\text{l}$
- Minimales Volumen ( $V_{min}$ ) in  $\mu\text{l}$
- Endsystolisches Volumen ( $V_{es}$ ) in  $\mu\text{l}$
- Enddiastolisches Volumen ( $V_{ed}$ ) in  $\mu\text{l}$
- Ejektionsfraktion (EF) in % =  $SV/EDV$
- Schlagvolumen (SV) =  $V_{max} - V_{min}$  in  $\mu\text{l}$
- Maximaler Blutdruck ( $P_{max}$ ) in mmHg
- Minimaler Blutdruck ( $P_{min}$ ) in mmHg
- Endsystolischer Blutdruck ( $P_{es}$ ) in mmHg
- Enddiastolischer Blutdruck ( $P_{ed}$ ) in mmHg
- Herzzeitvolumen (HZV) (= Cardiac Output (CO)) =  $SV \times HR$  in  $\mu\text{l}/\text{min}$ .
- Schlagarbeit (SW) in mmHg x l
- Arterielle Nachlast (AE) =  $P_{es}/SV$  in mmHg/l

### 2.2.3 Histologische Schnitte

Die Anfertigung und Auswertung der Histologischen Schnitte wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der LMU München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Müller-Höcker durchgeführt.

Nach Tötung eines Tieres wurde sofort der Thorax eröffnet und das Herz nach Durchtrennung der Gefäße herausgenommen, retrograd über die Aorta durchspült und gleich darauf in Formaldehyd 4 % fixiert. Nach 24 Stunden wurde das Herz in 70 %-igen Alkohol gelegt und entwässert. Daraufhin wurde die Einbettung des Herzens in Parafin vorgenommen, mit einem Mikrotom in 4  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger platziert (135).

### 2.2.3.1 Färbungen

#### 2.2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämatoxylin wird aus dem Blauholzbaum gewonnen und zu Hämalaun aufbereitet. Hämalaun färbt alle basophilen Strukturen blau, insbesondere Zellkerne mit DNA. Eosin ist ein synthetischer, saurer Farbstoff und färbt alle eosinophilen Strukturen rot, so dass vor allem die Zellplasmaproteine erfasst werden (103, 135).

#### 2.2.3.3 Masson-Goldner-Trichromfärbung

Es werden nach der Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert drei disperse Farbstoffe (Säurefuchsin, Ponceau de Xylidin, Anilinblau) gleichzeitig angewendet. Im Färbeergebnis stellen sich kollagenes Bindegewebe, wie z.B. Myokardinfarkt Narben, grün dar, Zellkerne braunschwarz und alle übrigen Strukturen in Rottönen (103).

#### 2.2.3.4 Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde planimetrisch bestimmt. Unter dem Mikroskop wurden pro Versuchstier jeweils vier Herzschnitte von der Herzspitze bis zur Herzbasis ausgewertet (siehe Abbildung 12). Dabei wurde für jeden Schnitt der Quotient aus infarzierter Fläche und der Gesamtfläche der Wand des linken Ventrikels bestimmt. Dieser Wert entsprach dem prozentualen Infarktanteil. Um auch die Längsausdehnung des Infarktes zu berücksichtigen, wurde anschließend noch der Quotient aus Längsausdehnung der Infarktfläche und der Gesamtlänge des linken Ventrikels berechnet. Dieser Wert wurde mit dem Mittelwert der vier prozentualen Infarktanteile multipliziert. Daraus ergab sich die gesamte Infarktgröße in Prozent.

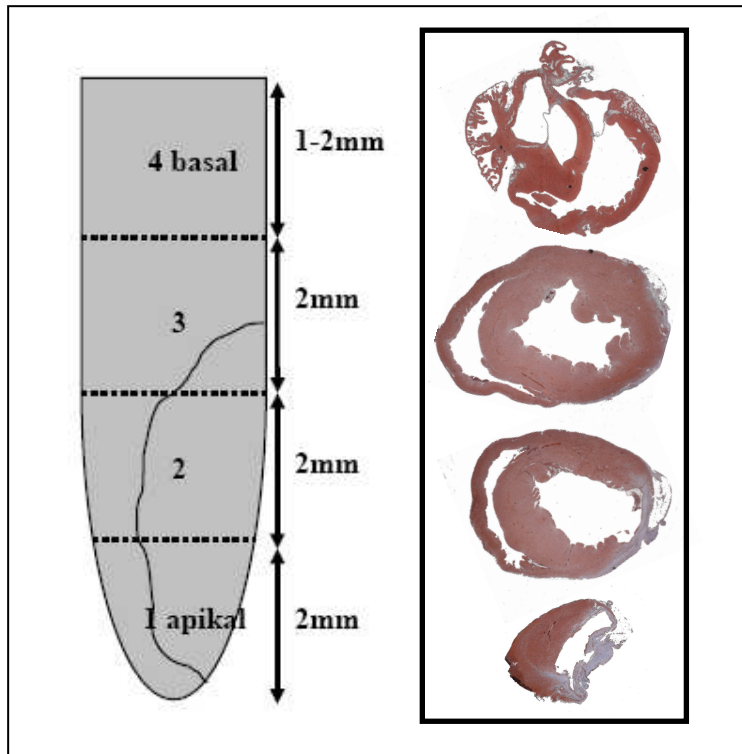
$$\text{Infarktgröße} = \frac{IL}{GL} \cdot \frac{1}{4} \cdot \left( \frac{IF_1}{GF_1} + \frac{IF_2}{GF_2} + \frac{IF_3}{GF_3} + \frac{IF_4}{GF_4} \right)$$

IL: Längenausdehnung des Infarktes in mm

GL: Gesamtlänge des Ventrikels in mm

IF: Infarzierte Fläche in mm<sup>2</sup>

GF: Gesamtfläche in mm<sup>2</sup>



**Abbildung 12:** Infarktgrößenbestimmung im Schema und anhand von vier histologischen Schnitten von der Basis bis zur Herzspitze

### 2.2.3.5 Wanddicke im Infarkt- und im Remote-Areal

Die Wanddicke wurde mit Hilfe der Software Axiovision (Vergrößerung 1,25- und 15-fach) bestimmt und jeweils auf Höhe der Papillarmuskeln gemessen. Dazu wurden im Infarktgebiet die Grenzen des infarzierten Areals festgelegt und der Mittelpunkt des linken Ventrikels mit den zwei Infarktgrenzen verbunden (sogenannte Grenzradien). Der Winkel zwischen den Grenzradien wurde durch fünf geteilt, so dass zwischen den Radien fünf winkelgleiche Segmente entstanden. Anschließend wurde in jedem der fünf Segmente die Stelle mit der kleinsten Wanddicke aufgesucht und die Dicke mittels Lot bestimmt. Der Mittelwert der fünf Werte wurde als Wanddicke im Infarktgebiet angegeben. Ebenso wurde die Ausmessung der Wanddicke im Remoteareal – als Maß der möglichen reaktiven Hypertrophie – durchgeführt. Da als Remoteareal der nicht infarzierte linke Ventrikel definiert wird, wurde das dem Infarktgebiet direkt gegenüber liegende Wandstück anhand einer Verlängerung der Grenzradien nach denselben Kriterien (Mittelwert der fünf kleinsten Wanddicken in fünf gleichwinkligen Segmenten) und wie in unserer Arbeitsgruppe schon vorbeschrieben (28) ausgemessen.

### 2.2.3.6 Granulationsgewebe

Ebenfalls auf Papillarmuskelebene wurde das Granulationsgewebe als Maß des Alters und der Organisation des Myokardinfarktes in Prozent erfasst. Daraufhin wurden die nekrotischen Areale mittels der Software „Axiovision“ erfasst. Das Granulationsgewebe – angegeben in Prozent der gesamten Infarktfläche – konnte durch Subtraktion ermittelt werden:

$$\text{Granulationsgewebe (in \%)} = \frac{\text{Infarzierte Fläche in mm}^2 - \text{Fläche aller nekrotischen Areale in mm}^2}{\text{Infarzierte Fläche in mm}^2}$$

## 2.2.4 Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS)

### 2.2.4.1 Prinzip der FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie wird als automatisierte Fluoreszenzmikroskopie von Einzelzellen in einem kontinuierlichen Probendurchfluss definiert (126). Mit der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen anhand ihrer Oberflächenproteine durch mehrere monoklonale, fluorochrom-konjugierte Antikörper klassifizieren. Dieses Verfahren wird auch als Immunphänotypisierung bezeichnet. Die Zellsuspension wird aus dem Glasröhrchen gesaugt und mit hoher Geschwindigkeit durch eine Stahlkapillare geführt. In der umgebenden Küvette mit der Trägerflüssigkeit wird ein laminarer Hüllstrom erzeugt. Mit Eintreten in die Messkammer werden die Zellen so stark beschleunigt, dass sie vereinzelt werden, eine sogenannte hydrodynamische Fokussierung findet direkt am Messpunkt statt (siehe Abbildung 14). Ein blauer Argon-Ionen-Laserstrahl erfasst die Zellen bei 488 nm Wellenlänge, d. h. die Laser-Exzitation liegt für alle drei Farbstoffe bei 488 nm. Der Emissions-Spektralbereich liegt für PE (Phycoerythrin) bei 575 nm, für FITC (Fluorescein Isothiocyanat) bei 494 nm und für PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein) bei 675 nm. Über die entstehende Lichtstreuung können Größe, Granularität und Fluoreszenz erfasst werden. Eine Streuung von 0-10° wird im Vorwärtsstreulicht (FSC = Forwardscatter) entsprechend der Zellgröße, eine Streuung von 90° im Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidescatter) entsprechend der Granularität, erfasst. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht in verschiedene Farbbereiche (FL1-4 = Fluoreszenzintensität 1-4) aufgeteilt und nach elektronischer Verstärkung durch Photomultiplier auf Photodetektoren erfasst. Abbildung 13 zeigt den Aufbau eines Durchflusszytometers.



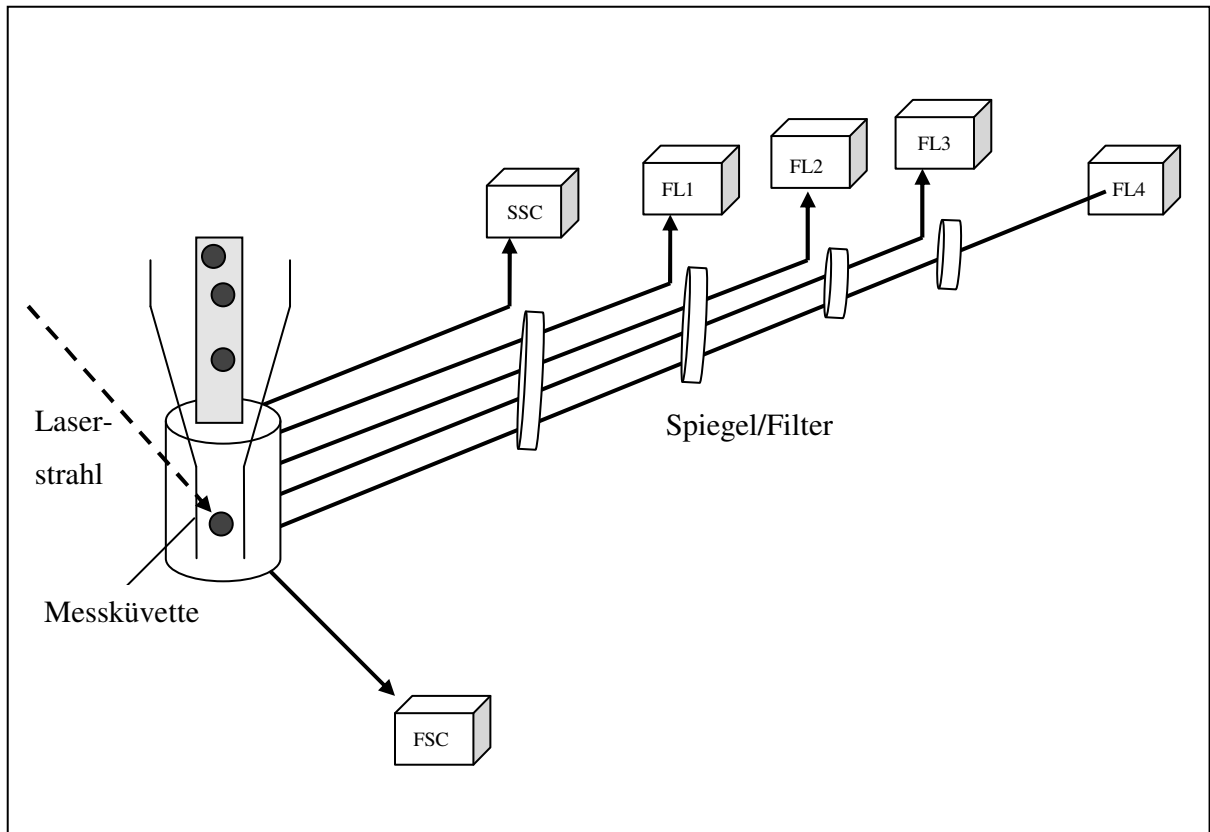


Abbildung 13: Aufbau eines Durchflusszytometers, modifiziert nach (126)

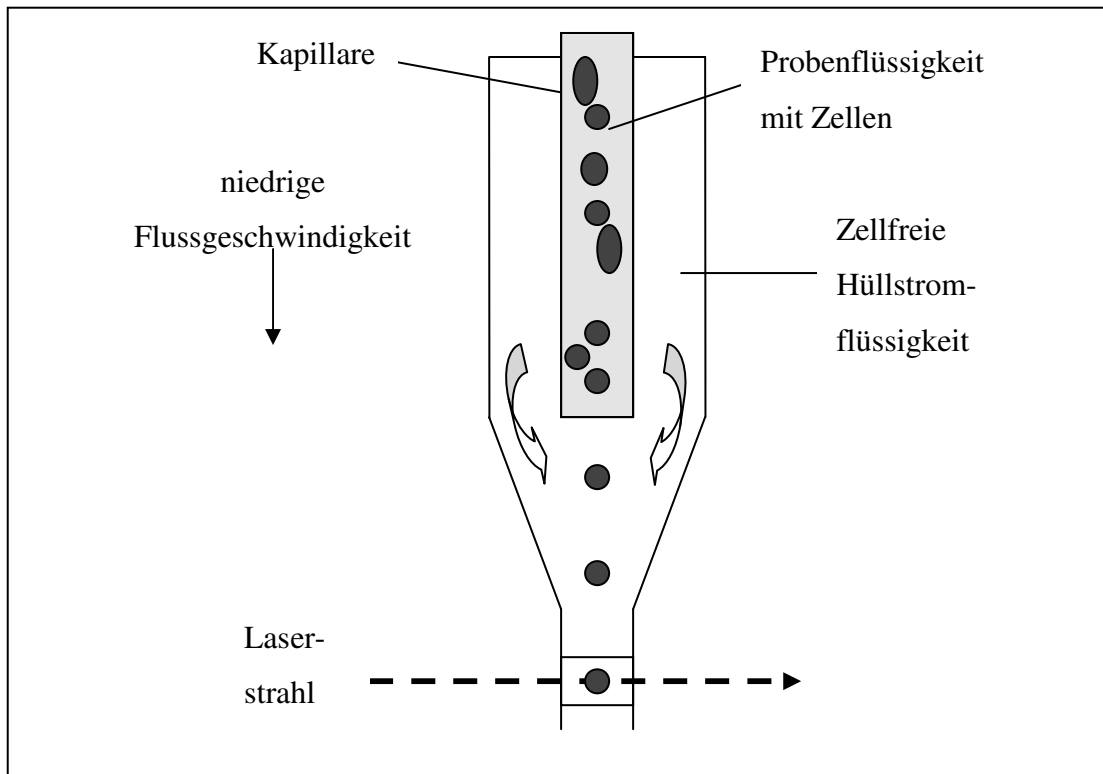


Abbildung 14: Hydrodynamische Fokussierung, modifiziert nach (126)

### **2.2.4.2 Vorbereitung der Proben und Messung**

Zur Entnahme des Blutes wurde die narkotisierte Maus unter dem Mikroskop auf einer Wärmeplatte fixiert, intubiert und beatmet. Darauf hin wurde mit einer 2 ml Spritze mit 150 µl Heparin-Natrium das Blut aus der durchschnittenen Karotis der Maus entnommen. Blut und Heparin wurden gut gemischt, in ein Eppendorf-Cup überführt und 100 µl mit 150 µl Cellpack vermischt und zur Analyse in das Hämatologische Labor gegeben (siehe Kapitel 2.2.5). 1 ml Histopaque wurde anschließend vorsichtig mit dem restlichen Blut überschichtet. Zur Entnahme des Knochenmarks (KM) wurden Haut und Fell an den Oberschenkeln der Maus mit einer Schere eröffnet, das Ligamentum patellae durchtrennt und der Femur exartikuliert. Nach Säuberung und Abtrennung der Kondylen konnten beide Femur-Schäfte mit PBS durchspült und das Knochenmark aufgefangen werden. Auf 4 ml Histopaque wurden vorsichtig die 4 ml Knochenmark-Suspension überschichtet.

Im Weiteren wurden die Proben für Blut und Knochenmark gleichermaßen behandelt. Zur Trennung der Phasen wurden die Proben zentrifugiert (1100 rpm, 30 min., 4 °C) und mittels Ficoll-Dichtegradient (1077 g/mol) aufgereinigt. Die mononuklearen Zellen sammelten sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Ficoll an und wurden in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend fanden drei Waschschrte (1100 rpm, 12 min., 4°C) statt. Zur Herstellung des Probenpuffers PBS + BSA 2 % wurden 49 ml PBS und 1 g Albumine bovine serum (BSA) verwendet. Das Pellet wurde mit 250 µl PBS+BSA 2 % gelöst und zu jeder Antikörper-Mischung (siehe Tabelle III) 50 µl der Probe zugegeben. Alle Bestandteile werden 1:100 verdünnt, bis auf CD 34 1:1 und CD 45 1:80 (nach laborinterner Austestung).

Probenname	Iso A	CD 31	CxCr4	Sca 1	c-kit
PBS+BSA 2%	20	30	30	30	30
Iso A-PE	10				
Iso A-FITC	10				
Iso A-PerCP	10				
CD 45 (PerCP)		10	10	10	10
CD 34 (FITC)		1	1	1	1
CD 31 (PE)		10			
CxCr4 (PE)			10		
Sca-1 (PE)				10	
c-kit (PE)					10
Probe	50	50	50	50	50

**Tabelle III:** Antikörper,  
alle Angaben in  $\mu\text{l}$

Die Proben wurden nach guter Durchmischung bei 4 °C 45 – 90 Minuten kühl und dunkel gestellt. Wiederum erfolgten zwei Waschschrirte mit PBS+BSA 2 % (2000 rpm, 5 min., 4 °C) und das resultierende Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  PBS+BSA 2 % resuspendiert. In FACS-Röhrchen wurden für Blut 400  $\mu\text{l}$  PBS+BSA 2 %, für KM 800  $\mu\text{l}$  PBS+BSA 2 % vorgelegt und jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Probe zugegeben und gut gemischt. Im Anschluss daran wurde sofort die FACS-Messung durchgeführt.

Zur Analyse der Stammzellpopulation wurde eine 3-Farben-Durchflusszytometrie durchgeführt. Bei jeder Messung für Blut- und Knochenmarkzellen wurde eine repräsentative Auswahl von 30.000 Zellen analysiert. Um unspezifische Antikörperbindungen von spezifischen Bindungen unterscheiden zu können, wurden Isotypen (jeweils PE-, FITC- und PerCP-markiert) eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht

ihrer Größe und Granularität nach erfasst und anschließend die Population der mononukleären Zellen mit Hilfe der Darstellung der Intensität selektioniert. Dieser Schritt wird als „Gating“ bezeichnet. Die Messungen erfolgten am Durchflusszytometer „Coulter Epics XL“, die Auswertungen mit dem Programm „Expo 32 ADC“.

### 2.2.5 Blutanalyse

Die Analyse des Blutes wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. D. Seidel durchgeführt. Das Ziel dieser Untersuchung war es, zu sehen, ob andere hämatologische Parameter – abgesehen von den Stammzell-spezifischen Veränderungen – vergleichbar waren.

Dazu wurden 100 µl des Blutes mit 150 µl Cellpack verdünnt, einem Blutbild-Analyser (Sysmex XE-2100) zugeführt und ein Differentialblutbild bestimmt sowie die Retikulozytenzahl ermittelt. Die korrigierten Werte konnten mit Hilfe eines Verdünnungsfaktors ermittelt werden, der sich wie folgt zusammen setzt:

$$\frac{Mg}{Mb} \cdot \frac{Ma}{Mab} \approx 2,9$$

Mg: Gesamtmenge (x µl Blut + 150 µl Heparin)

Mb: Blutmenge (x µl Blut)

Ma: Analysemenge (150 µl Cellpack + 100 µl Blut = 250 µl)

Mab: Analyseblutmenge (100 µl)

Die folgende Tabelle IV zeigt Standardwerte für das Differentialblutbild einer gesunden, männlichen C57BL/6 Maus.

Parameter	Standard (Taconic) C57BL/6 Male
Leukozyten in 10 <sup>3</sup> /µl	6,61 ± 2,63
Erythrozyten in 10 <sup>6</sup> /µl	8,36 ± 0,61
Hämoglobin in g/dL	13,1 ± 0,9

Hämatokrit in %	41,8 ± 3,3
MCV in fL	50 ± 2
MCH in pG	15,7 ± 0,3
MCHC in %	31,5 ± 0,7
Thrombozyten in 10 <sup>3</sup> /μl	1775 ± 171
Neutrophile Granulozyten in 10 <sup>3</sup> /μl	1,276 ± 0,639
Lymphozyten in 10 <sup>3</sup> /μl	5,182 ± 2,081
Monozyten in 10 <sup>3</sup> /μl	0,156 ± 0,178
Eosinophile Granulozyten in 10 <sup>3</sup> /μl	0
Basophile Granulozyten in 10 <sup>3</sup> /μl	0
Retikulozyten in 10 <sup>6</sup> /μl	-

**Tabelle IV:** *Mittlere Normblutwerte von männlichen C57BL/6 Mäusen (123)*

## 2.2.6 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

### 2.2.6.1 cDNA-Synthese

Nach Entnahme des Herzens oder der Gewebeanteile eines Herzens wurde zuerst eine RNA-Isolierung mit TRI-Reagent vorgenommen. Das ultrazerkleinerte Gewebe wurde mittels TRI-Reagent und Chloroform in einem Waschschrift in RNA und Gewebereste aufgetrennt. Nach zwei weiteren Waschschriften mit Isopropanol und Ethanol konnte ein Pellet gewonnen werden. Um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Proben mittels DNase (DNase-Verdau Kit der Firma Invitrogen) behandelt. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80 °C.

Zur Herstellung der cDNA wurden 4 μl der RNA eingesetzt. Anschließend wurde die cDNA in einem Volumen von 20 μl in 60 Minuten bei 37 °C mit dem Omniscript RT-Kit der Firma Qiagen nach dem Protokoll synthetisiert. Daraufhin wurde das Volumen durch 20 μl RNase-free water verdoppelt und die cDNA bei Bedarf wiederum bei -80 °C konserviert.

### 2.2.6.2 Quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR)

Die quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion und stellt zugleich die Möglichkeit einer Quantifizierung während der Messung dar (daher die Bezeichnung real-time). Die Quantifizierung wird durch Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht, die während der Reaktion in die DNA interkalieren. Die Zunahme der Fluoreszenz entspricht der Zunahme der Target-DNA. Die qRT-PCR ermöglicht im Vergleich zum Northern Blot eine schnellere Erhebung der Daten, Einsatz geringer Mengen RNA bzw. cDNA, Vermeidung vom Umgang mit radioaktiven Stoffen und eine Fokussierung auf spezielle Transkripte.

Zu Anfang wurden für die einzelnen Gene die entsprechenden Primer generiert. Für die Amplifikation im Thermocycler wurde 5 µl der cDNA eingesetzt, mit einem Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes von 25 µl, sodass die Konzentration 200 nM entsprach. Als Enzym wurde iTaq DNA Polymerase verwendet, die im iQ SYBR Green Supermix Kit der Firma BioRad enthalten war. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green verwendet. Exzitations- und Emissionsmaxima von SYBR liegen bei 498 nm (blau) und 522 nm (grün).

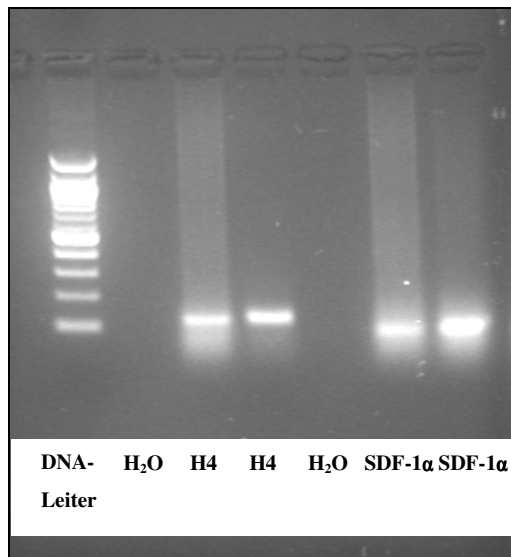
Initial wurden die Proben auf 95 °C erhitzt. Im Folgenden liefen 40 Zyklen von Denaturierung (30 Sekunden auf 95 °C), Annealing, auch Hybridisierung genannt, (30 Sekunden auf 56 °C) und Elongation (10 Sekunden auf 72 °C) ab. In Tabelle V sind die Primer samt Annealing-Temperaturen aufgeführt:

	SDF-1 $\alpha$	H4
Sequenz oben:	5'-GAG CCA ACG TCA AGC ATC TG-3'	5'-GTT CTC CGC GAT AAC ATC C-3'
Sequenz unten:	5'-CAA TGC ACA CTT GTC TGT TG-3'	5'-CAG GAA CAC CTT CAG CAC AC-3'
Primerlänge:	95 bp (36-131)	125 bp (64-189)
Annealing-Temperatur:	59,4°C	56,7°C

**Tabelle V:** Primer mit Sequenzen und Annealing-Temperaturen

Für die Elektrophorese wurden 1 %iges Agarosegel (TAE-Puffer: Tris, Eisessig, EDTA) und 20 µl Ethidiumbromid zusammen mit dem Auftragspuffer und der Probe (Endprodukt der qRT-PCR) in eine Gelkammer gegeben. Es wurde eine Spannung von 120 Volt für 45 Minuten angelegt. 100 bp-DNA-Leiter, Negativprobe und H4 als Standard liefen mit. Die Banden wanderten dabei vom Minus- zum Plus-Pol. Das Ergebnis als Kontrolle der Primer konnte unter UV-Licht (Ethidiumbromid fluoresziert bei 366 nm orange-rot) mit Hilfe einer Fluoreszenz-Kamera (Gel Doc 2000 der Firma BioRad) demonstriert werden (siehe Abbildung 15). Für die Aufnahme wurde das Programm "QuantityOne" der Firma BioRad verwendet.

Es erfolgte zusätzlich eine quantitative Auswertung mit Histon H4 als Referenzgen, dem sogenannten house keeping gene.



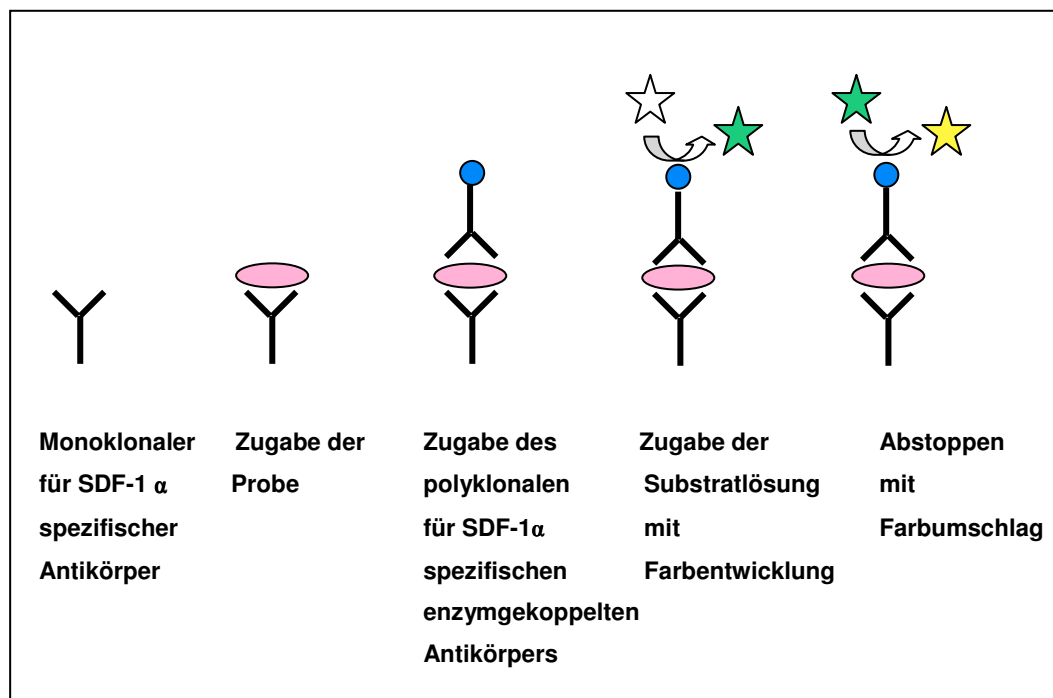
**Abbildung 15:** Testung des SDF- 1α-Primers, mit DNA-Leiter, Referenz und H<sub>2</sub>O

### 2.2.7 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Der Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstest dient zur Quantifizierung von murinem SDF-1α und stellt ein immunologisches Nachweisverfahren dar, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert (75). Für die Durchführung existierte ein Kit (Quantikine Mouse CXCL12/SDF-1α von R&D Systems), der alle Reagenzien enthält.

Zur Vorbereitung wurden die entnommenen murinen Herzen in 0,1 %iger Kollagenase für 45 Minuten verdaut und mit Hilfe eines Ultraschallhomogenisators lysiert. Dann wurden im ersten Schritt alle Reagenzien von 4°C auf Raumtemperatur erwärmt, laut Anleitung (98) vorbereitet und ein monoklonaler, für SDF-1α spezifischer Antikörper (50 µl Assay Diluent)

auf eine Mikrotiterplatte (96 well) ausgebracht. 50 µl Standard, Kontrolle oder Proben wurden auf die Vertiefungen pipettiert, wodurch sich SDF-1 $\alpha$  an den immobilisierten Antikörper innerhalb von zwei Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur auf dem Schüttler binden konnte. Nachdem die ungebundenen Substanzen durch vierfache Aspiration abgewaschen wurden, wurde ein polyklonaler für SDF-1 $\alpha$  spezifischer enzymgekoppelter Antikörper (100 µl Conjugate, verbunden mit Meerrettichperoxidase) zugegeben und wiederum bei Raumtemperatur für zwei Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem weiteren vierfachen Waschschrift wurden 200 µl der Substratlösung (Color Reagents A and B) zugegeben, die für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert, und zu einer der SDF-1 $\alpha$  Menge proportionalen grün-blauen Farbentwicklung führte. Die Farbentwicklung wurde nach komplettem Substratumsatz abgestoppt (50 µl Stop Solution, Schwefelsäure, Farbumschlag zu gelb) und mit Hilfe eines Densometrie-Gerätes (Absorption bei 450 nm, Referenz bei 560 nm) gemessen. Mittels der Software „XFlour“ konnten die Extinktionswerte aus der kinetischen Kurve mit einer Geraden proportional in die Menge von SDF-1 $\alpha$ -Protein umgerechnet werden. In der folgenden Abbildung 16 ist die Technik des ELISA dargestellt.



**Abbildung 16:** Prinzip des Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA), modifiziert nach (75)



### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Ergebnisse wurden als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) angegeben. Die Statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Student's t-test bzw. bei Auswertungen für mehr als zwei Gruppen mit Hilfe der ANOVA-Analyse (analysis of variance) vorgenommen. Als signifikant wurde ein Wert von  $<0,05$  angesehen und in den Abbildungen entsprechend markiert. Überlebensraten wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Toxisch induzierte versus ischämische Kardiomyopathie

Im ersten Teil der Ergebnisse werden die Analysen der Gruppen Doxorubicin, ICM und Kontrollen im Vergleich dargestellt.

##### 3.1.1 Überleben der Doxorubicin-behandelten Mäuse an Tag 90

Zunächst wurde das kumulative Überleben der Doxorubicin-behandelten Tiere 90 Tage nach Behandlung ermittelt (Abbildung 17). Die Evaluierung der Überlebensdauer im Modell der toxisch induzierten Kardiomyopathie zeigte eine kontinuierliche Sterblichkeit innerhalb der 90 Tage des Messzeitraumes, wie in der Literatur vorbeschrieben (129). 42,6 % der Tiere überlebten die Behandlung 90 Tage. Dieses Ergebnis spricht für die kardiotoxische Wirksamkeit von Doxorubicin im Sinne einer andauernden Kardiomyopathie.

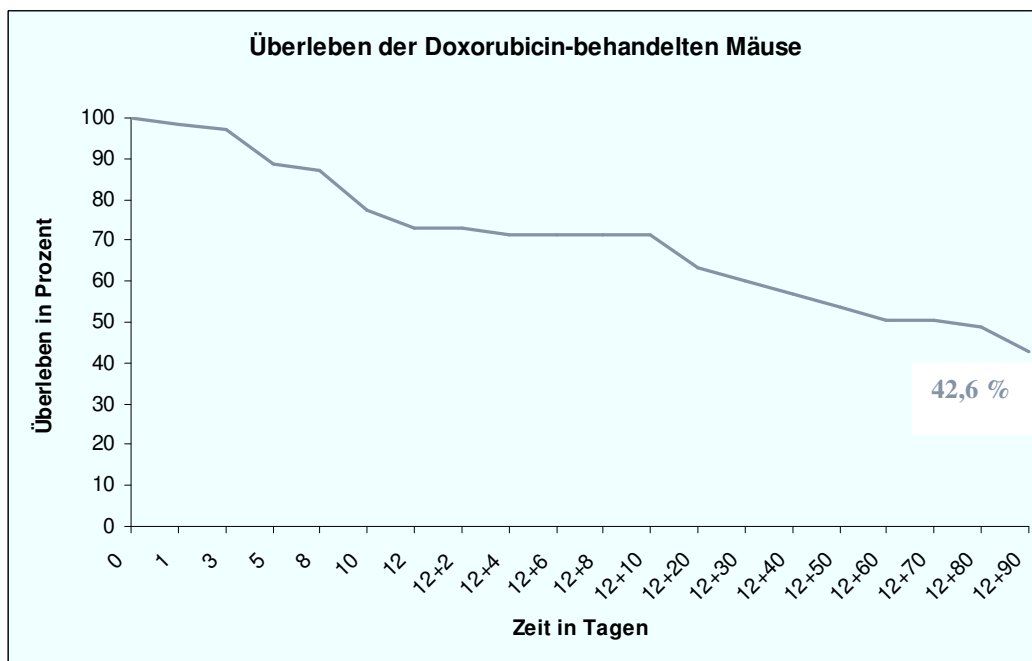


Abbildung 17: Überleben der Doxorubicin-behandelten Mäuse 90d nach Behandlung (Kaplan-Meier-Kurve)

#### 3.1.2 Hämodynamische Messungen

##### 3.1.2.1 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz lag bei gesunden Tieren im Bereich von  $339 \pm 30$  Schlägen pro Minute. Es war kein signifikanter Unterschied zu den behandelten Gruppen messbar, sodass von einer hämodynamischen Vergleichbarkeit der verschiedenen Gruppen ausgegangen werden kann

(Doxorubicin  $360 \pm 27$  Schläge/min.,  $p=0,61$ ; ICM  $366 \pm 17$  Schläge/min.,  $p=0,46$ ; siehe Tabelle VI).

### 3.1.2.2 Ejektionsfraktion

Bei der Ejektionsfraktion konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und kranken Tieren ermittelt werden (siehe Abbildung 18). Mit  $34,0 \pm 6,5$  % Ejektionsfraktion bei den toxisch geschädigten Mäusen ( $p=0,03$ ) und  $24,5 \pm 3,6$  % bei den ischämisch belasteten Tieren ( $p=0,004$ ) lag sie deutlich unter der Auswurfraction eines gesunden Tieres mit  $59,9 \pm 7,1$  % (1,76- bzw. 2,44-fach).

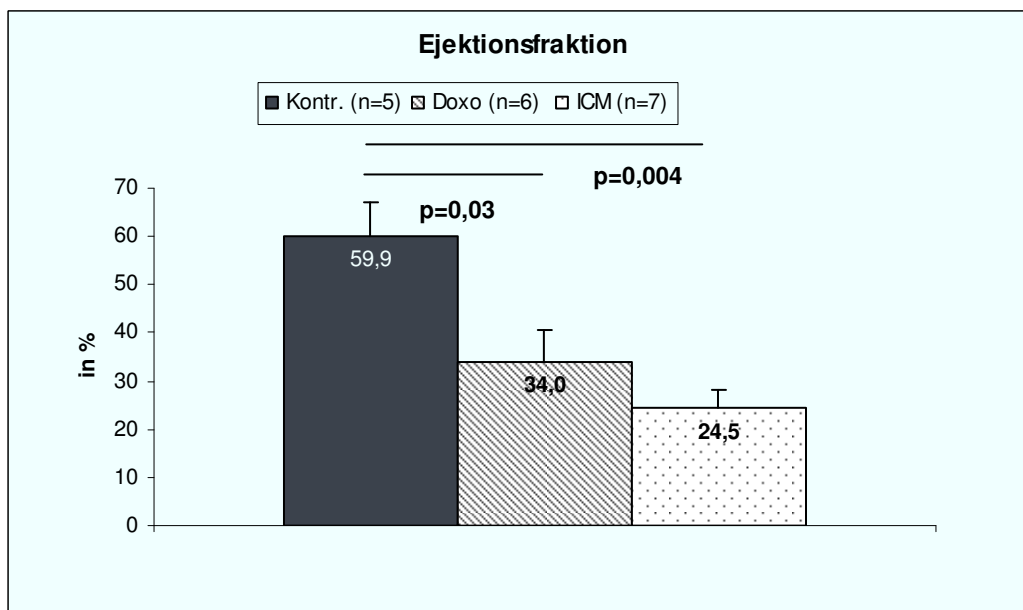
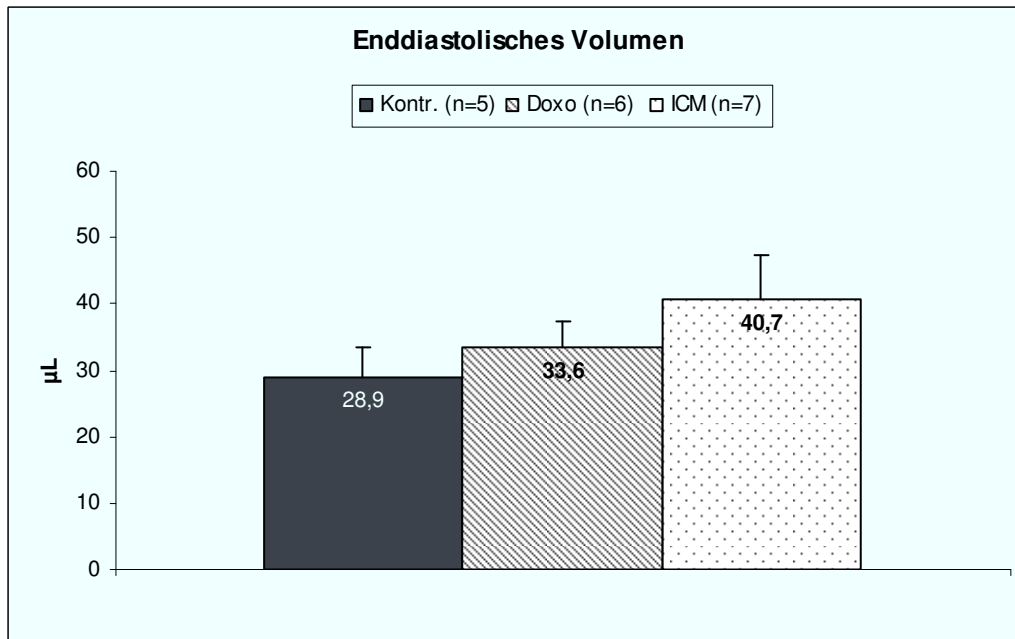


Abbildung 18: Vergleich der Ejektionsfraktion in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM

### 3.1.2.3 Enddiastolisches Volumen

In der Erhebung des enddiastolischen Volumens zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und Tieren mit toxisch induzierter ( $p=0,46$ ) bzw. ischämischer Kardiomyopathie ( $p=0,16$ ) (siehe Abbildung 19). Allerdings war bei Tieren mit ischämischer Kardiomyopathie das enddiastolische Volumen im Trend erhöht (Kontrolle  $28,9 \pm 4,6$   $\mu$ l, Doxorubicin  $33,6 \pm 3,9$   $\mu$ l, ICM  $40,7 \pm 6,5$   $\mu$ l).



**Abbildung 19:** Vergleich der enddiastolischen Volumina in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM, nicht signifikant (nach Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse  $p < 0,05$ ).

### 3.1.2.4 Weitere hämodynamische Parameter und Übersicht über die Hämodynamik

Versuchstiere mit toxisch induzierter und ischämischer Kardiomyopathie zeigten – wie erwartet – eine wesentlich schlechtere Herzfunktion als gesunde Kontrolltiere.

Die Schlagarbeit Doxorubicin-geschädigter Tiere mit  $615 \pm 222$  mmHg x  $\mu$ l ( $p=0,03$ ) und die Schlagarbeit bei Tieren mit ischämischer Kardiomyopathie mit  $626 \pm 114$  mmHg x  $\mu$ l ( $p=0,01$ ) waren signifikant vermindert gegenüber gesunden Kontrollen ( $1369 \pm 196$  mmHg x  $\mu$ l). Auch das Herzzeitvolumen als Parameter für die Auswurfleistung behandelter Tiere war signifikant reduziert im Vergleich zu gesunden Tieren (Kontrolle  $6126 \pm 480$   $\mu$ l/min., Doxorubicin  $3866 \pm 845$   $\mu$ l/min.,  $p=0,05$ ; ICM  $3490 \pm 484$   $\mu$ l/min.,  $p=0,003$ ). Die arterielle Nachlast stellt einen Parameter zur Beurteilung des Gefäßwiderstandes dar. Im Vergleich von gesunden Tieren zu Tieren mit ischämischer Kardiomyopathie war ein signifikanter Unterschied messbar (Kontrolle  $5,7 \pm 0,7$  mmHg/ $\mu$ l, ICM  $15,0 \pm 2,6$  mmHg/ $\mu$ l). Doxorubicin-behandelte Tiere wiesen hingegen mit  $15,5 \pm 5,6$  mmHg/ $\mu$ l ( $p = 0,13$ ) nur eine Tendenz zu erhöhten Werten, d. h. einen gering erhöhten Gefäßwiderstand, auf.

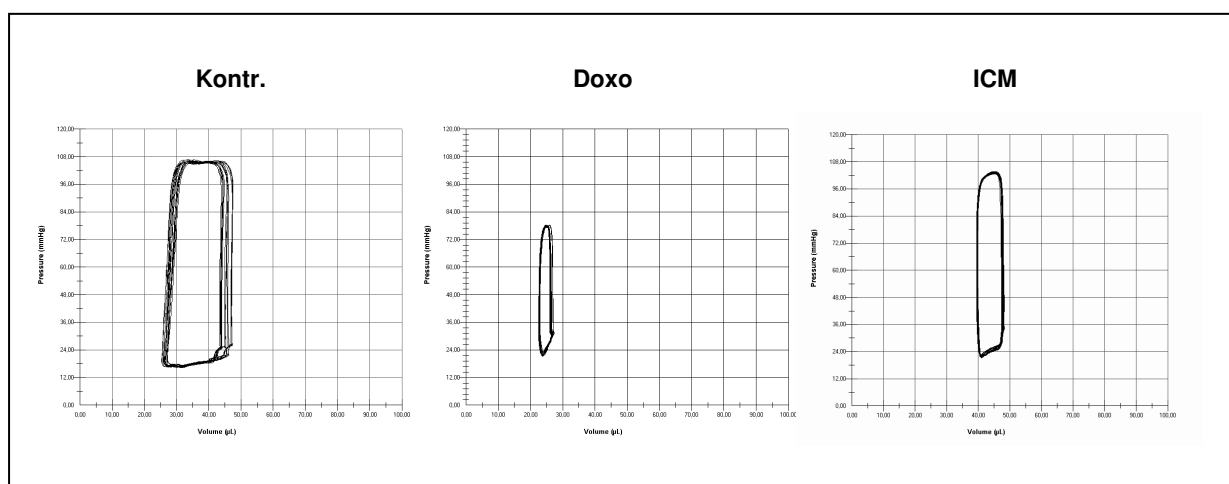
Die hämodynamischen Parameter der drei Gruppen (Kontrolle, Doxorubicin und ICM) sind in Tabelle VI zusammengefasst.

## Ergebnisse

Parameter	Kontr.	Doxo	ICM
	n=5	n=6	n=7
HF in Schlägen/min.	$339 \pm 30$	$360 \pm 27$	$366 \pm 17$
EF in %	$59,9 \pm 7,1$	$34,0 \pm 6,5^*$	$24,5 \pm 3,6^{**}$
EDV in $\mu\text{l}$	$28,9 \pm 4,6$	$33,6 \pm 3,9$	$40,7 \pm 6,5$
HZV in $\mu\text{l}/\text{min.}$	$6126 \pm 480$	$3866 \pm 845^*$	$3490 \pm 484^{**}$
SW in $\text{mmHg} \times \mu\text{l}$	$1369 \pm 196$	$615 \pm 222^*$	$626 \pm 114^{**}$
AE in $\text{mmHg}/\mu\text{l}$	$5,7 \pm 0,7$	$15,5 \pm 5,6$	$15,0 \pm 2,6^*$

**Tabelle VI:** *Hämodynamische Parameter für die Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM in der Übersicht (Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse. \*:  $p < 0,05$  Doxo vs. Kontr.; \*\*:  $p < 0,05$  ICM vs. Kontr.).*

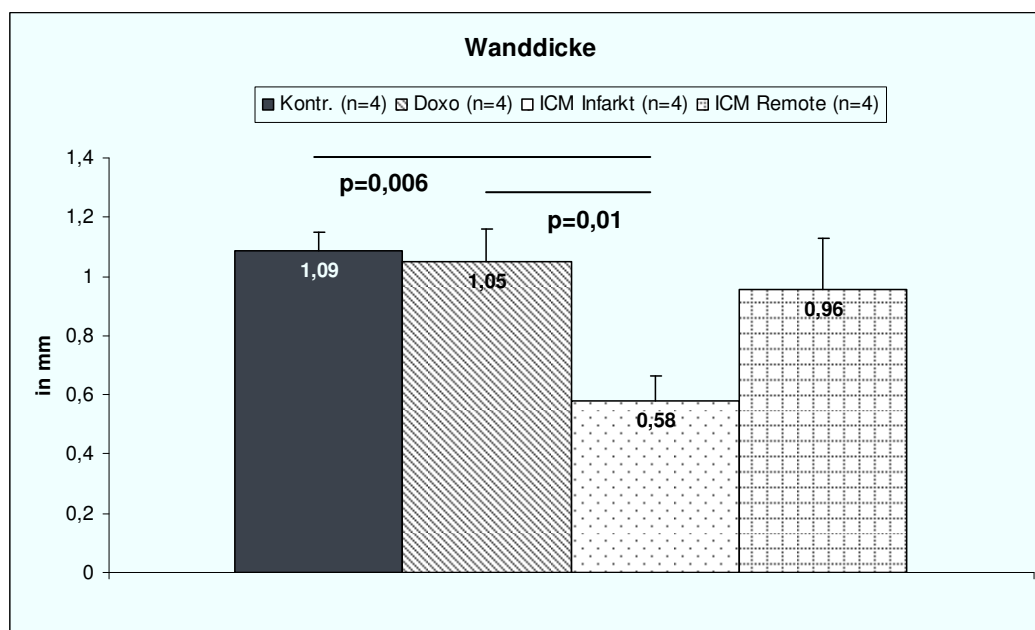
In den für die jeweiligen Gruppen repräsentativen Druck-Volumen-Schleifen ist die geminderte Ejektionsfraktion in den Kardiomyopathiegruppen erkennbar (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** *Repräsentative Druck-Volumen-Schleifen in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM. Die Ejektionsfraktion betrug bei diesen Schleifen 58 % (Kontrolle), 19 % (Doxorubicin), 32 % (ICM).*

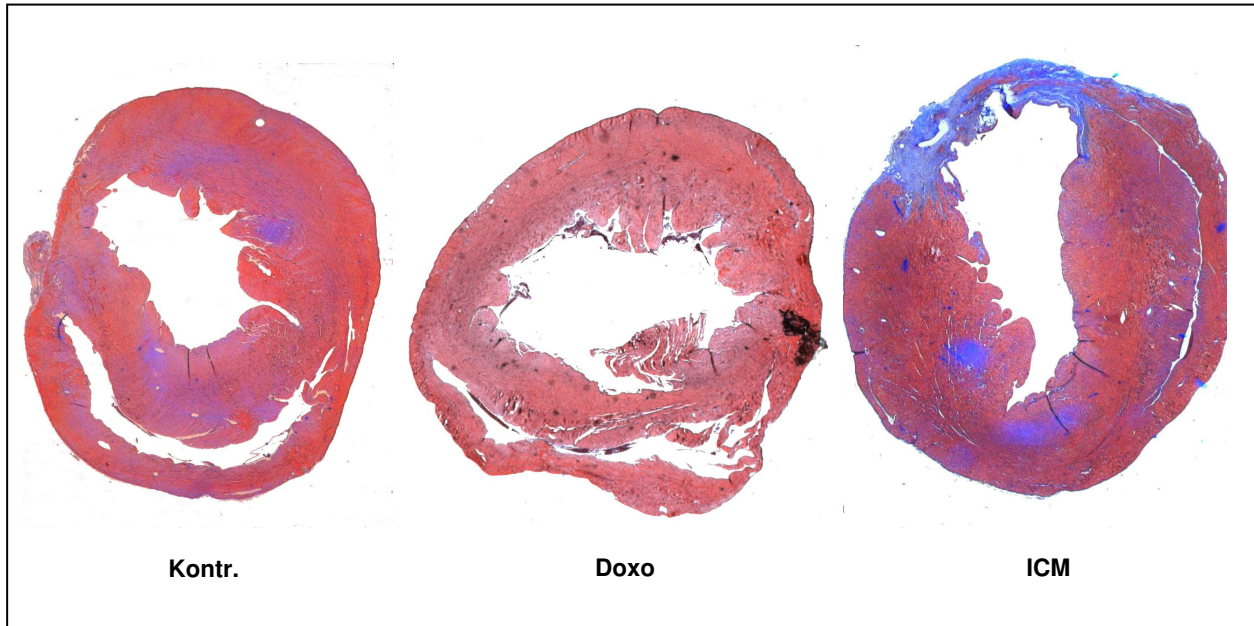
### 3.1.3 Histologische Evaluation – Wanddicken im Infarkt- und Remote-Areal

Die Analyse der Wanddicken ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll-Tieren und Doxorubicin-behandelten Tieren. Es konnte jedoch eine deutlich verminderte Wanddicke im Infarktareal im Rahmen der Narbenbildung bei Tieren mit ischämischer Kardiomyopathie ermittelt werden mit  $0,58 \pm 0,08$  mm versus  $1,09 \pm 0,06$  mm bei Kontrolltieren ( $p=0,006$ ) und  $1,05 \pm 0,11$  mm bei Doxorubicin-behandelten Tieren ( $p=0,01$ ). Zusätzlich wurde bei Tieren mit ischämischer Kardiomyopathie die Wanddicke im Remote-Areal vermessen, die jedoch keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Wanddicke bei nicht-infarzierten Tieren zeigte (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Vergleich der Wanddicken im Infarkt-Areal in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM

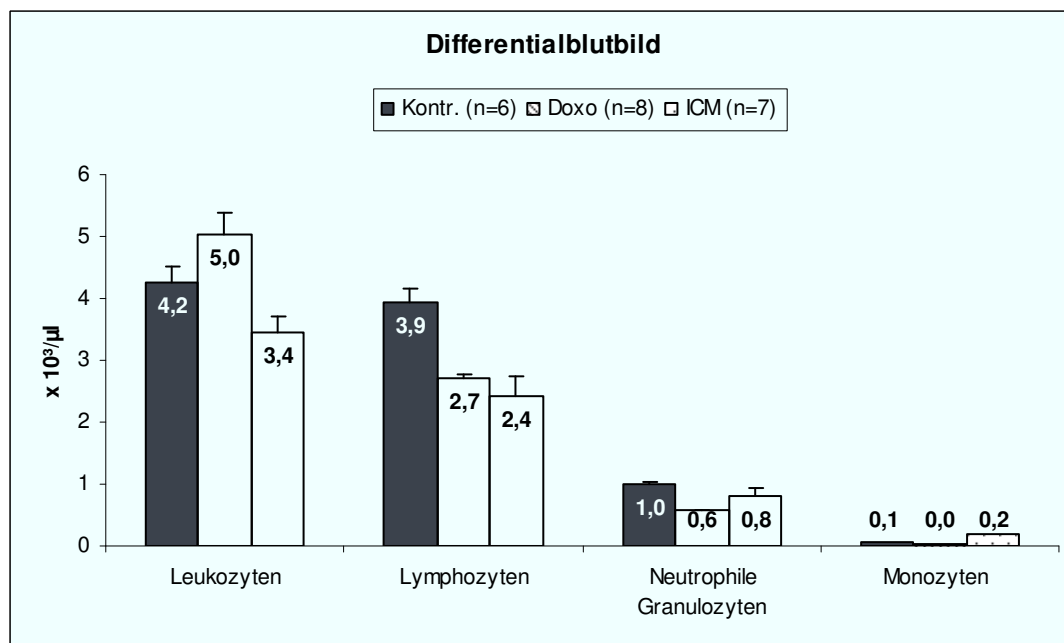
In Abbildung 22 wurden drei repräsentative Schnitte aus den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM ausgewählt.



**Abbildung 22:** Repräsentative Histologieschnitte in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM  
Die Herzschnitte sind in Masson-Trichrom gefärbt, auf Höhe des Papillarmuskels und in 1,25facher Vergrößerung aufgenommen.

### 3.1.4 Blutanalyse

Vor Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde ein Differentialblutbild einschließlich Retikulozyten erstellt, um relevante Unterschiede der hämatopoetischen Grundparameter, wie z. B. eine Linksverschiebung oder eine Knochenmarkssuppression in der chronischen Phase, auszuschließen. Die Messung beinhaltete gesunde Kontrolltiere, Tiere mit einer ischämischen Kardiomyopathie und Doxorubicin-behandelte Tiere. Zwischen den Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede finden. Eine Übersicht über das Differentialblutbild findet sich in Abbildung 23 und ein Überblick über wesentliche Blutwerte in der Tabelle VII.



**Abbildung 23:** Vergleich von Leukozyten-, Lymphozyten-, Neutrophile Granulozyten- und Monozyten-Zahl in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM, nicht signifikant (nach Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse  $p < 0,05$ ).

Blutwert	Kontr.	Doxo	ICM
	n=6	n=8	n=7
Hämoglobin g/dL	11,5 ± 0,2	10,5 ± 0,4	10,7 ± 0,2
Retikulozyten x10 <sup>6</sup> /µl	0,24 ± 0,01	0,18 ± 0,04	0,26 ± 0,01
Thrombozyten x10 <sup>3</sup> /µl	339 ± 86	312 ± 43	204 ± 41
Leukozyten x10 <sup>3</sup> /µl	4,24 ± 0,79	5,04 ± 0,95	3,44 ± 0,61
Lymphozyten x 10 <sup>3</sup> /µl	3,95 ± 0,28	2,72 ± 0,34	2,41 ± 0,26
Neutrophile Granulozyten x 10 <sup>3</sup> /µl	1,01 ± 0,20	0,58 ± 0,05	0,80 ± 0,35
Monozyten x 10 <sup>3</sup> /µl	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,20 ± 0,12

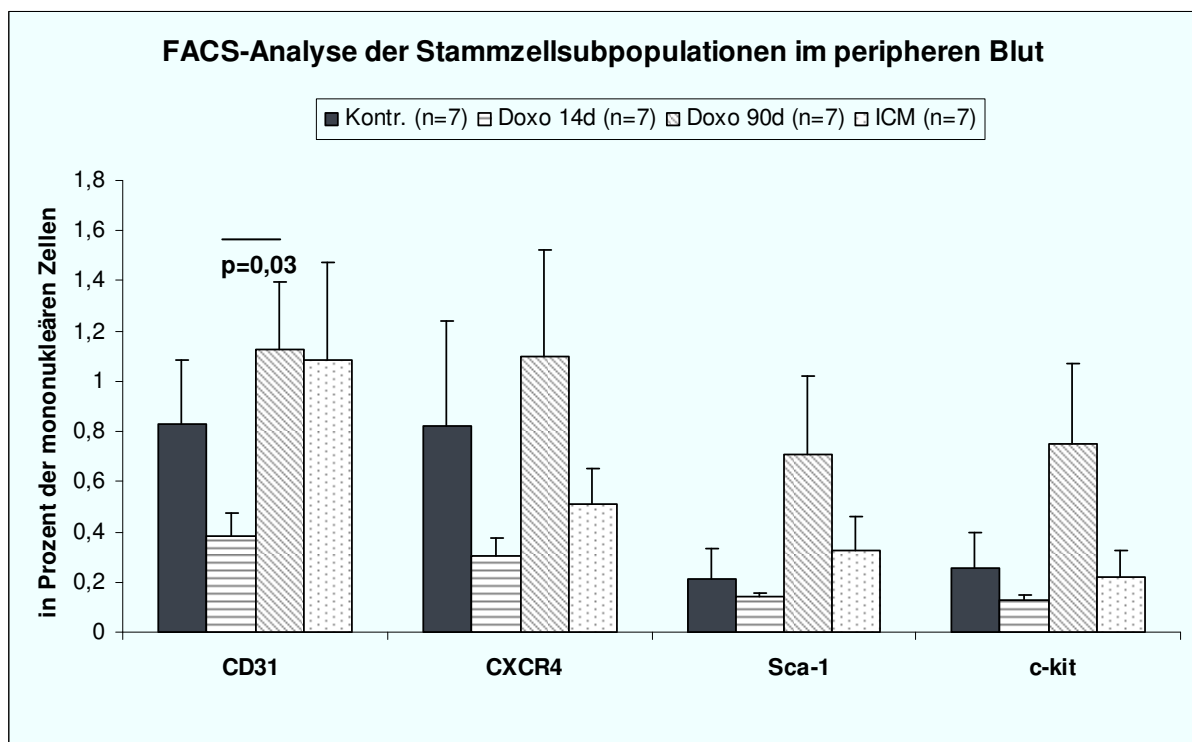
**Tabelle VII:** Blutwerte in der Übersicht in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM, keine signifikanten Unterschiede (nach Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse  $p < 0,05$ ).



### 3.1.5 Analyse der Stammzellen mittels Durchflusszytometrie

Im Anschluss an die Blutanalyse wurde eine Durchflusszytometrie aller mononukleären Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark durchgeführt, um die Stammzellen zu bestimmen. Dabei wurden als Subpopulationen CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>-Zellen untersucht, die als dritte Oberflächenmarkierung Antigene für CD34, CXCR4, Sca-1 oder c-kit trugen.

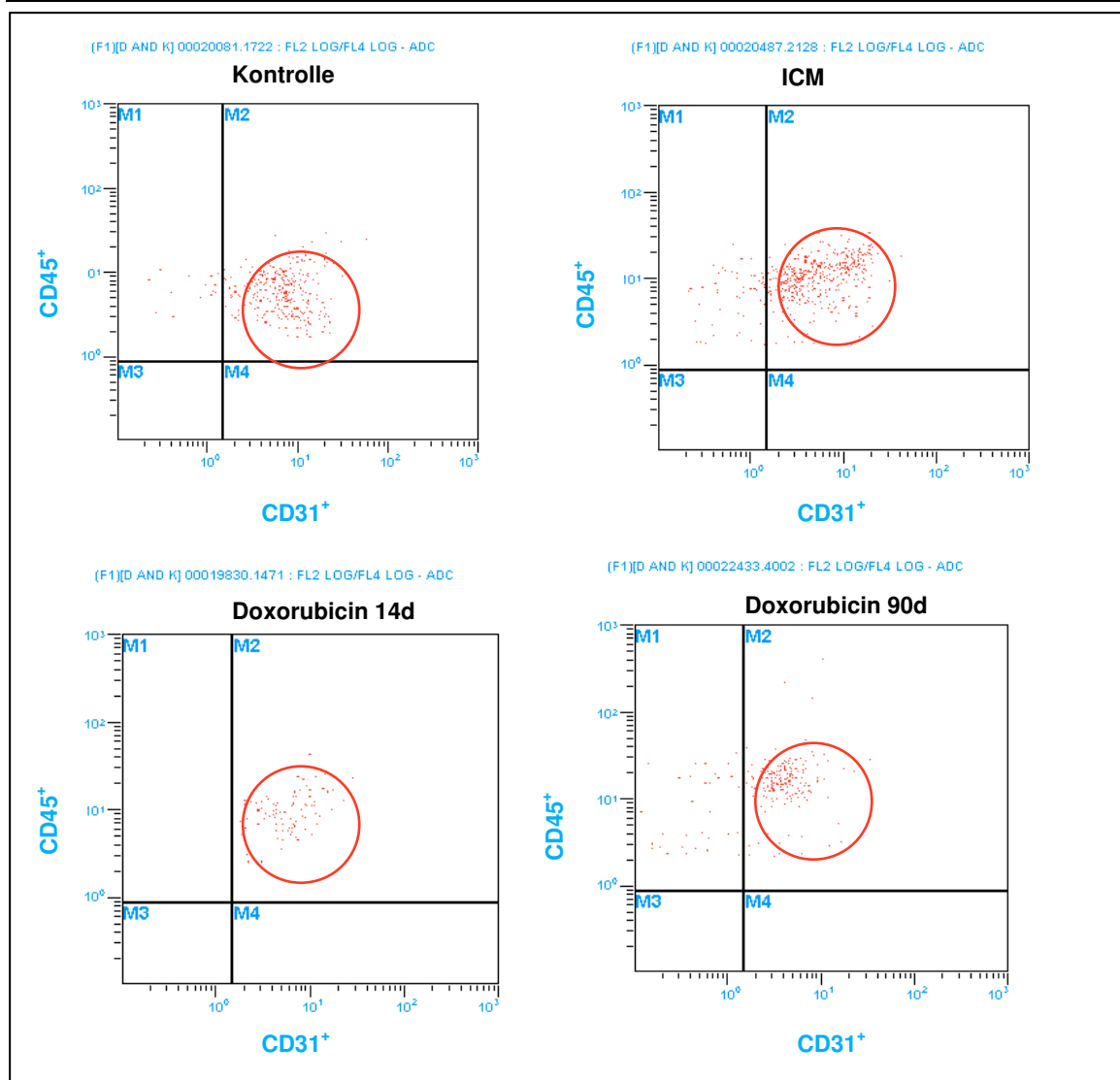
Im chronischen Stadium, 90 Tage nach Doxorubicin-Gabe, fanden sich im Trend gesteigerte Spiegel zirkulierender Stammzellen. Eine zusätzliche FACS-Analyse 14 Tage nach Beginn der Behandlung, also unmittelbar nach Doxorubicin-Gabe, zeigte eine verminderte Stammzell-Zirkulation im Sinne einer Suppression (z. B. CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> p=0,03). Die FACS-Analyse und ausgewählte Bilder der Analyse des peripheren Blutes sind in Abbildung 24 und Abbildung 25 dargestellt. Im Knochenmark konnte keine Veränderung der Subpopulation gemessen werden, wie Abbildung 26 zeigt. Als Beispiel einer FACS-Analyse wurde ein repräsentatives Bild aus der Knochenmarksanalyse ausgewählt (Abbildung 27).



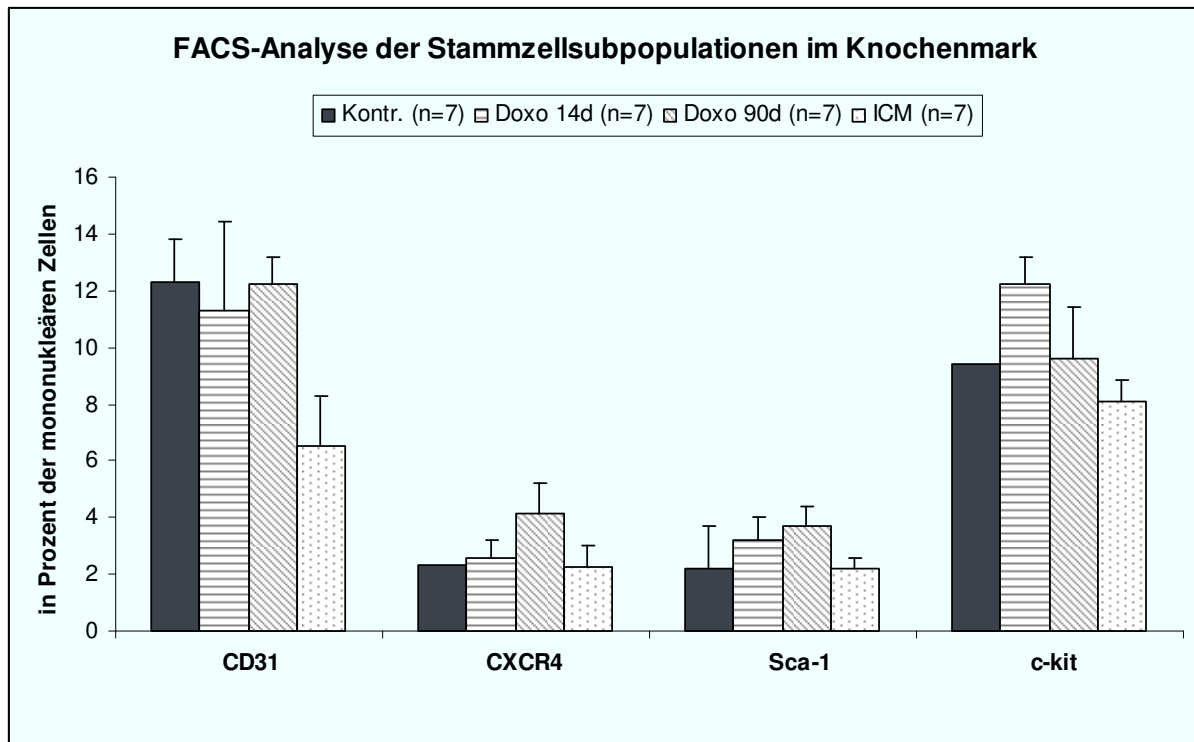
**Abbildung 24:** Vergleich der FACS-Analysen im peripheren Blut in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin 14d, Doxorubicin 90d und ICM

Signifikante Erhöhung der CD31<sup>+</sup>-Subpopulation in der Doxorubicin-Gruppe nach 90d im Vergleich zur Messung nach 14d.

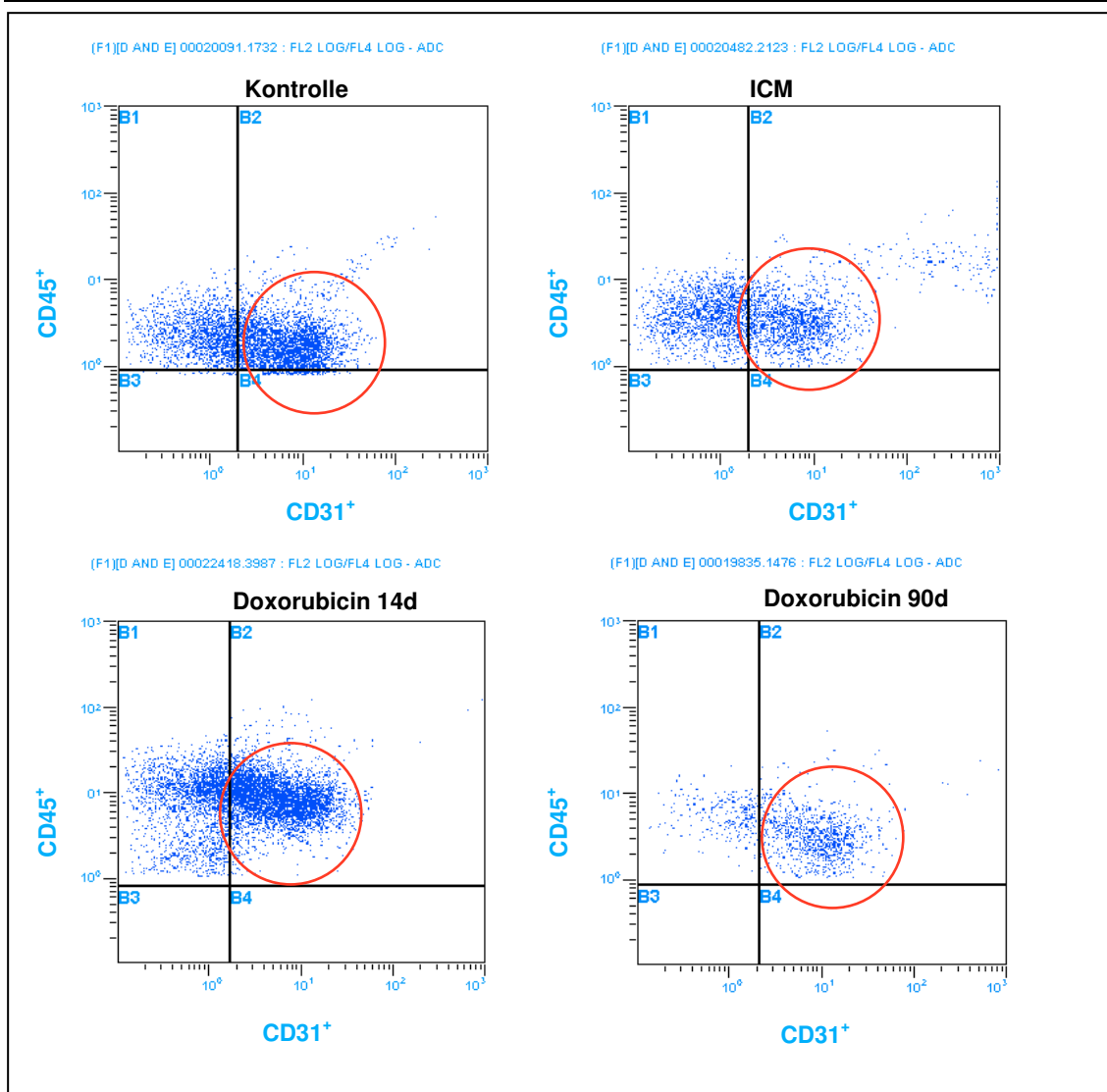
## Ergebnisse



**Abbildung 25:** Bilder der FACS-Analysen des Knochenmarks in den Gruppen Kontrolle (oben links), ICM (oben rechts), Doxorubicin 14d (unten links) und Doxorubicin 90d (unten rechts)  
Auf der Abszisse sind CD31<sup>+</sup>-Zellen, auf der Ordinate CD45<sup>+</sup>-Zellen dargestellt; zuvor waren die Zellen nach CD34<sup>+</sup>-Positivität selektioniert.



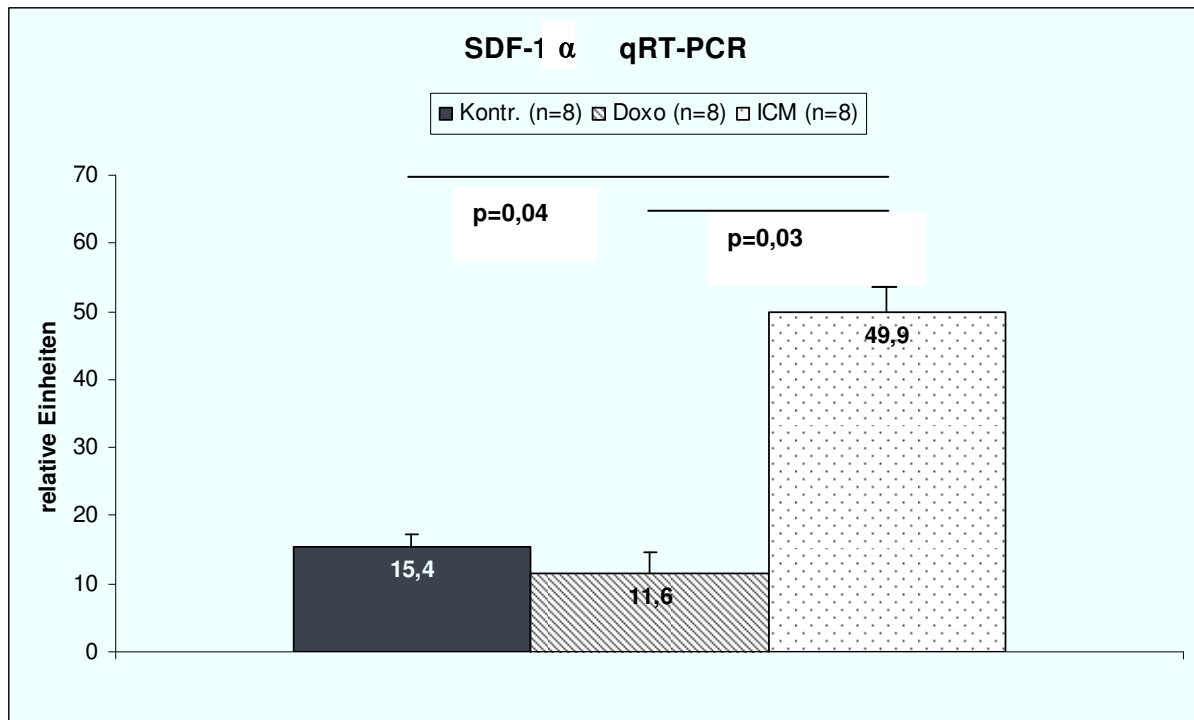
**Abbildung 26:** Vergleich der FACS-Analysen im Knochenmark in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin 14d, Doxorubicin 90d und ICM, nicht signifikant (nach Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 27:** Bilder der FACS-Analysen des Knochenmarks in den Gruppen Kontrolle (oben links), ICM (oben rechts), Doxorubicin 14d (unten links) und Doxorubicin 90d (unten rechts)  
Auf der Abszisse sind CD31<sup>+</sup>-Zellen, auf der Ordinate CD45<sup>+</sup>-Zellen dargestellt; zuvor waren die Zellen nach CD34<sup>+</sup>-Positivität selektioniert.

### 3.1.6 Ergebnisse der qRT-PCR

Auf mRNA-Ebene zeigte sich im Myokard eine Aufregulation des Homingfaktors SDF-1 $\alpha$  mit  $49,9 \pm 13,5$  relativen Einheiten bei Tieren mit ischämischer Kardiomyopathie gegenüber einem Wert von  $15,4 \pm 1,5$  relativen Einheiten bei Kontrolltieren. Auch zwischen der Doxorubicin-Gruppe und Tieren mit ischämischer Kardiomyopathie war der Unterschied signifikant (Abbildung 28). Die Gruppe der Doxorubicin-behandelten Tiere wies keinen Unterschied zu Kontrolltieren auf.



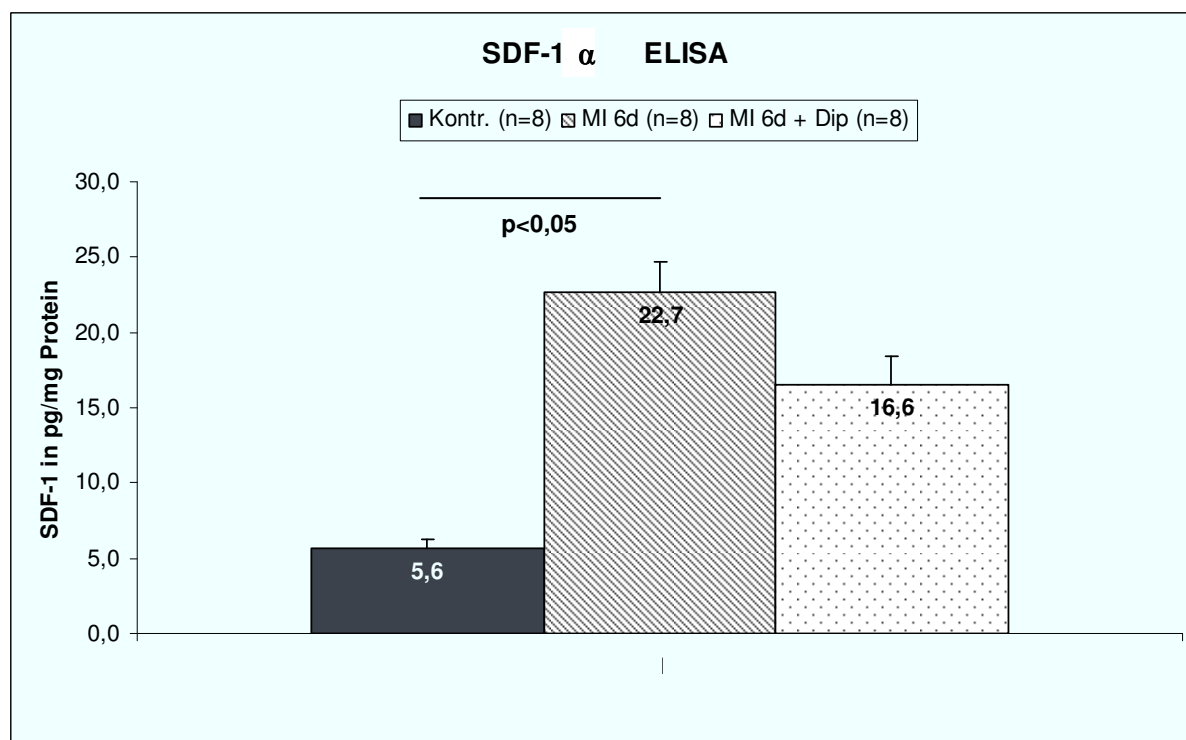
**Abbildung 28:** Vergleich der Expression von SDF-1 $\alpha$  auf mRNA-Ebene in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM

### 3.2 DPP-IV-Inhibition nach Myokardinfarkt

Da das Ergebnis der qRT-PCR des ersten Teils in der ICM-Gruppe eine signifikante Aufregulation von SDF-1 $\alpha$  zeigte, entschieden wir uns, im zweiten Teil der Arbeit im Modell der ischämischen Kardiomyopathie den Homingprozess mittels CD26-Inhibition und konsekutiver SDF-1 $\alpha$ -Stabilisation positiv zu beeinflussen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen der Gruppen sechs und 30 Tage nach Myokardinfarkt mit und ohne CD26-Inhibitor durch Diprotin A dargestellt.

#### 3.2.1 Ergebnisse des Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA)

Da die Expression auf Proteinebene wesentlich aussagekräftiger ist, wurde ein ELISA von SDF-1 $\alpha$  durchgeführt. SDF-1 $\alpha$  war bei Tieren mit Myokardinfarkt im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich aufreguliert ( $p < 0,05$ ), jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen Tieren mit oder ohne Diprotin A-Behandlung. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung 29 zu sehen.



**Abbildung 29:** Vergleich der Expression von SDF-1 $\alpha$  auf Proteinebene mittels ELISA in den Gruppen Kontrolle, MI 2d und MI 2d + Dip

### 3.2.2 Blutanalyse

Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde auch in diesem Versuchsaufbau Blut für ein Differentialblutbild mit Retikulozyten gewonnen und untersucht, um Unterschiede in den hämatopoetischen Grundparametern auszuschließen. Die einzelnen Gruppen konnten keine signifikanten Differenzen in hämatologischen Parametern erkennen lassen.

Nachfolgende Tabelle VIII zeigt eine Übersicht über die verschiedenen, relevanten Blutparameter.

Blutwert	Kontr.	MI 6d	MI 6d +Dip	ICM 30d	ICM 30d + Dip
	n=8	n=7	n=8	n=7	n=7
Hämoglobin g/dL	11,2 $\pm$ 0,3	11,8 $\pm$ 0,2	9,7 $\pm$ 0,7	11,6 $\pm$ 0,3	11,6 $\pm$ 0,4
Retikulozyten $\times 10^6/\mu\text{l}$	0,29 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,04	0,28 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,02

## Ergebnisse

Thrombozyten x10 <sup>3</sup> /μl	330 ± 40	247 ± 81	245 ± 51	294 ± 61	265 ± 52
Leukozyten x10 <sup>3</sup> /μl	4,32 ± 0,55	4,49 ± 0,74	4,94 ± 1,26	3,53 ± 0,93	5,35 ± 1,25
Lymphozyten x10 <sup>3</sup> /μl	3,55 ± 0,41	3,25 ± 0,64	2,11 ± 0,39	1,77 ± 0,59	1,66 ± 0,25
Neutro. Granulozyten	0,64 ± 0,17	0,83 ± 0,15	0,83 ± 0,25	0,39 ± 0,04	1,15 ± 0,39
Monozyten x10 <sup>3</sup> /μl	0,40 ± 0,35	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,10	0,05 ± 0,03	0,18 ± 0,08

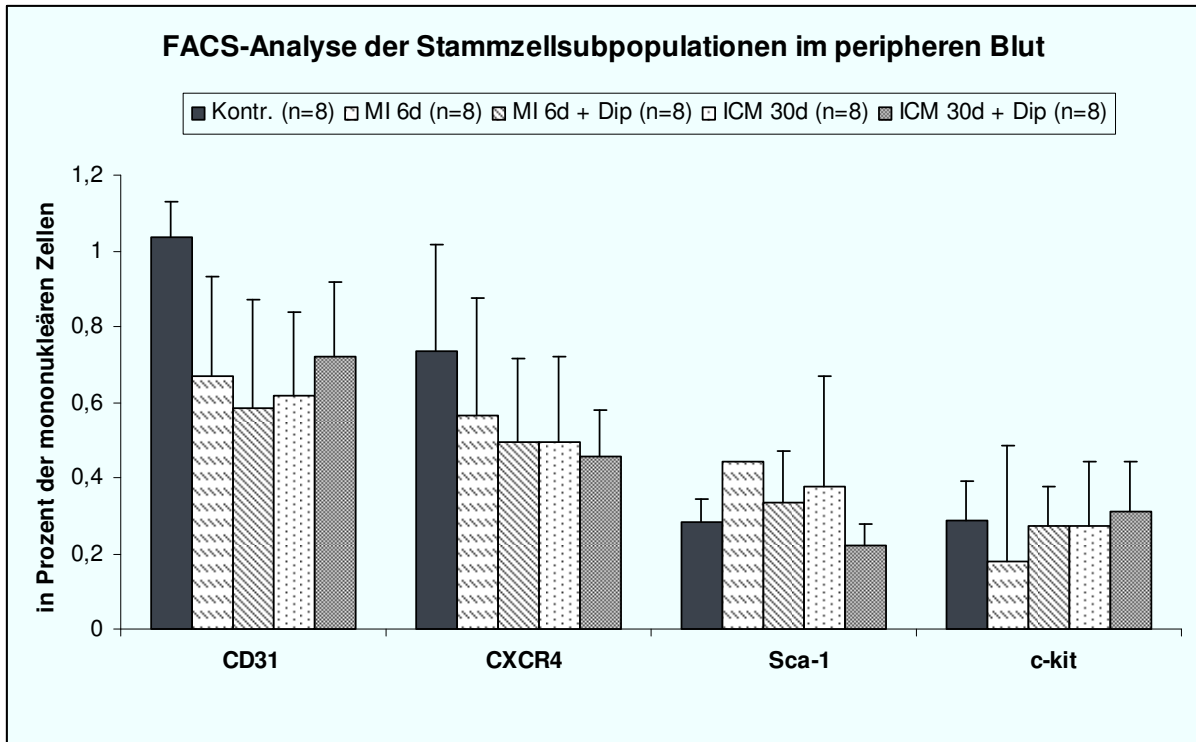
**Tabelle VIII:** Blutwerte in der Übersicht in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip,

keine signifikanten Unterschiede (nach Student's t-test bzw. ANOVA- Analyse  $p < 0,05$ ).

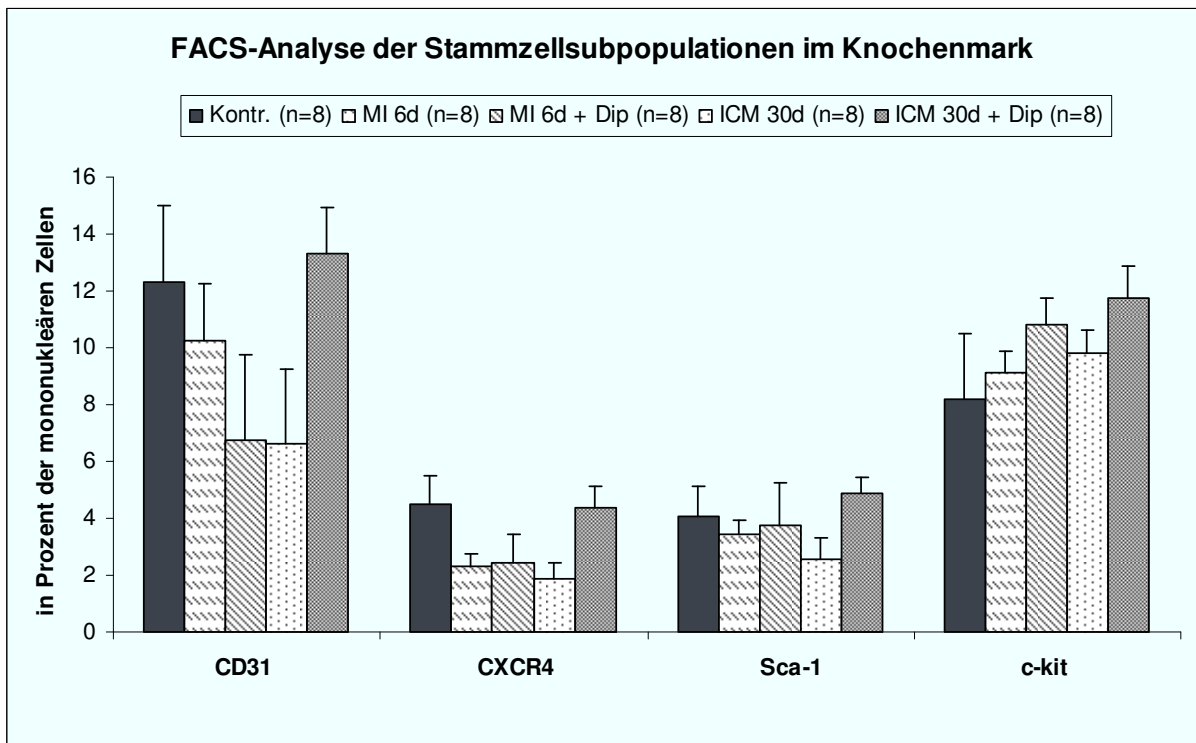
### 3.2.3 Analyse der Stammzellen mittels Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse wurde im peripheren Blut und im Knochenmark durchgeführt. In der Analyse der Subpopulationen im peripheren Blut zeigte sich sowohl bei der Subpopulation von CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>-Stammzellen, als auch bei CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Stammzellen, CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>-Stammzellen und CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>-Stammzellen keine Unterschiede in den verschiedenen Gruppen (Abbildung 30).

In der Analyse der Subpopulationen im Knochenmark zeigte sich sowohl bei der Subpopulation von CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>-Stammzellen, als auch bei CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Stammzellen, CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>-Stammzellen und CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/c-kit<sup>+</sup>-Stammzellen keine Unterschiede in den verschiedenen Gruppen, wie in Abbildung 31 zu erkennen ist.



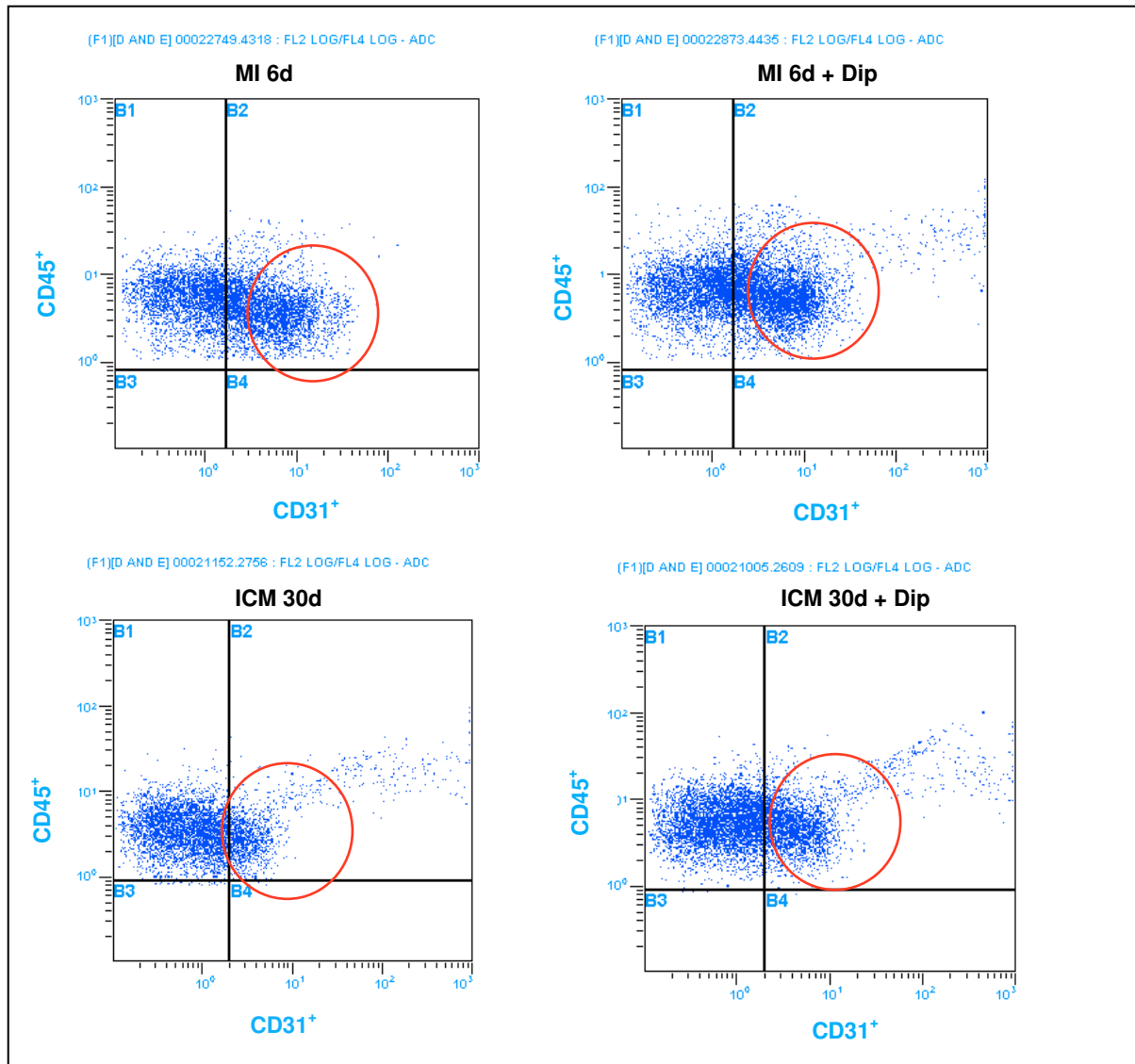
**Abbildung 30:** Vergleich der FACS-Analysen des peripheren Blutes in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip, nicht signifikant (nach Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 31:** Vergleich der FACS-Analysen des Knochenmarks in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip, nicht signifikant (nach Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse  $p < 0,05$ ).



Nachfolgend sind in Abbildung 32 repräsentative Bilder der FACS-Analyse im Knochenmark ausgewählt.



**Abbildung 32:** FACS-Analysen des Knochenmarks in den Gruppen Kontrolle, MI 6d (oben links), MI 6d + Dip (oben rechts), ICM 30d (unten links) und ICM 30d + Dip (unten rechts)  
 Auf der Abszisse sind CD31<sup>+</sup>-Zellen, auf der Ordinate CD45<sup>+</sup>-Zellen dargestellt, zuvor waren die Zellen nach CD34<sup>+</sup>-Positivität selektioniert.

### 3.2.4 Hämodynamische Messungen

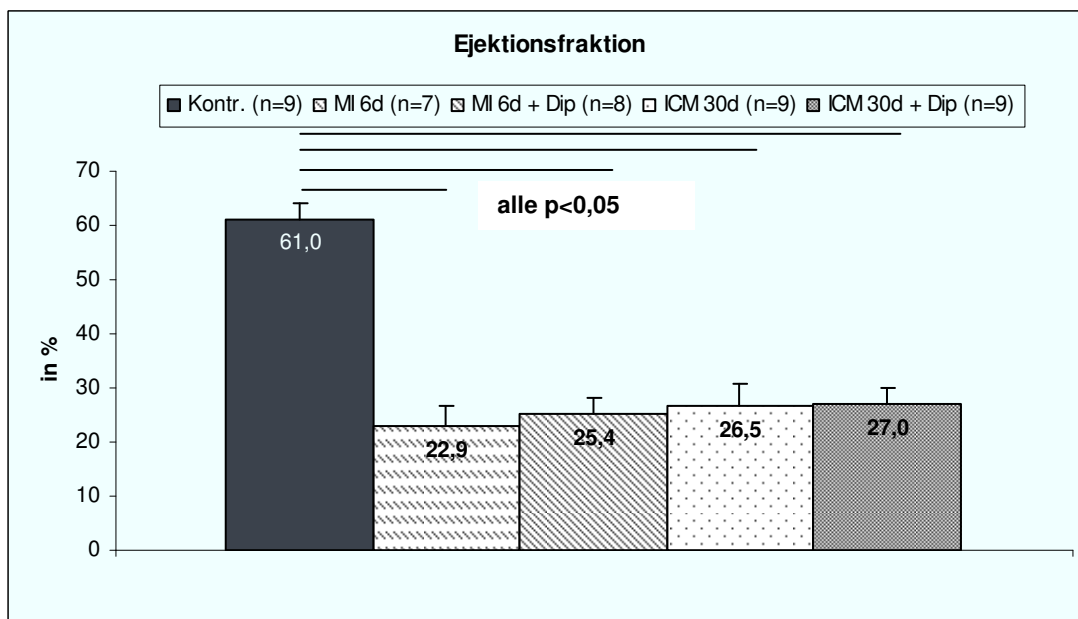
#### 3.2.4.1 Herzfrequenz

Die Analyse der Herzfrequenz ergab keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. In allen Gruppen lag die Herzfrequenz zwischen 310 und 380 Schlägen pro Minute

im Sinne einer hämodynamischen Vergleichbarkeit als Basis für die Validität der weiteren hämodynamischen Parameter (siehe Tabelle IX).

### 3.2.4.2 Ejektionsfraktion

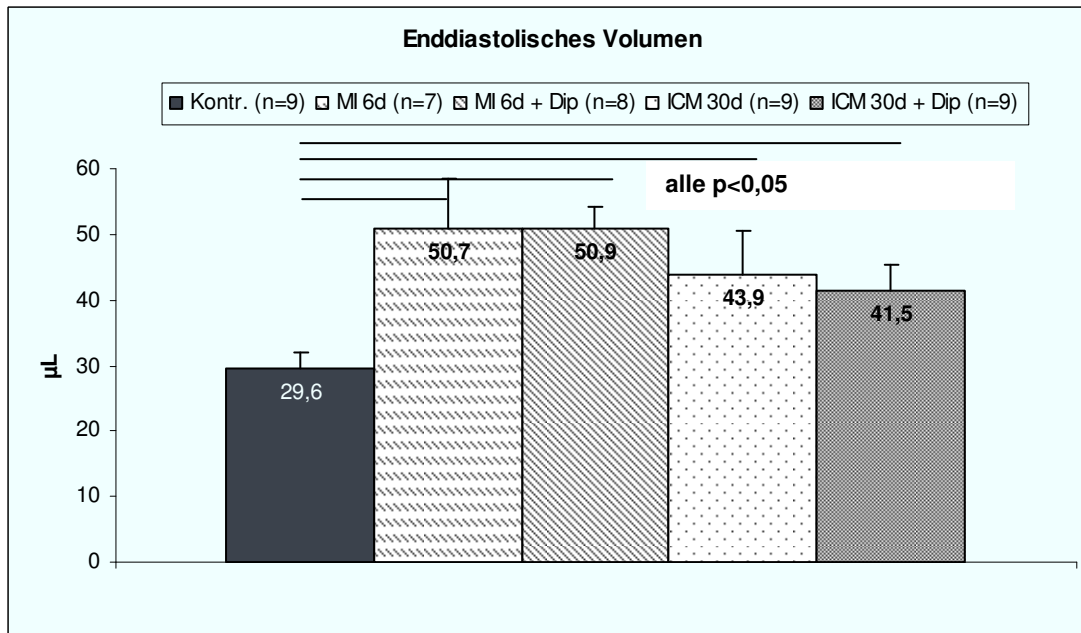
Alle vier behandelten Gruppen wiesen eine signifikant verminderte Ejektionsfraktion gegenüber Kontrolltieren auf (Kontrolle  $61,0 \pm 3,0$  %, MI 6d  $22,9 \pm 3,7$  %, MI 6d + Dip  $25,4 \pm 4,1$  %, ICM 30d  $26,5 \pm 2,8$  %, ICM 30d + Dip  $27,0 \pm 2,9$  %). Zwischen den mit Diprotin A behandelten und unbehandelten Gruppen stellten sich keinerlei Unterschiede heraus, wie Abbildung 33 zeigt.



**Abbildung 33:** Vergleich der Ejektionsfraktion in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip

### 3.2.4.3 Enddiastolisches Volumen

In den Gruppen mit Myokardinfarkt an Tag sechs stellte sich bei der Untersuchung mit  $50,7 \pm 7,8$   $\mu$ l in der Gruppe ohne Diprotin A-Behandlung bzw. mit  $50,9 \pm 6,7$   $\mu$ l in der mit Diprotin A-behandelten Gruppe ein signifikant erhöhtes enddiastolisches Volumen im Vergleich zur Kontrolle mit  $29,6 \pm 2,3$   $\mu$ l dar ( $p=0,04$  bzw.  $0,02$ ). Auch Tiere an Tag 30 mit oder ohne Diprotin A-Gabe zeigten einen signifikant erhöhten Wert. Wie zuvor bei der Ejektionsfraktion zeigt sich kein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Gruppen. Die Abbildung 34 stellt den Vergleich der Gruppen dar.



**Abbildung 34:** Vergleich der enddiastolischen Volumina in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip

### 3.2.4.4 Weitere hämodynamische Parameter und Übersicht über die Hämodynamik

Hämodynamische Parameter wurden in fünf Gruppen evaluiert. Dabei zeigte sich eine deutlich schlechtere Herzfunktion der infarzierten Tiere im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Herzzeitvolumen und Schlagarbeit waren bei den behandelten Gruppen vermindert, das enddiastolische Volumen erhöht. Zwischen den behandelten Gruppen waren keine Unterschiede messbar.

An Tag sechs nach Myokardinfarkt war die Schlagarbeit am stärksten auf  $520 \pm 73$  mmHg x  $\mu$ l reduziert und zeigte damit eine signifikante Erniedrigung gegenüber der Kontrolle mit  $1394 \pm 102$  mmHg x  $\mu$ l ( $p < 0,001$ ). Ebenso waren alle weiteren behandelten Gruppen im Vergleich zu Kontrolltieren in ihrer Schlagarbeit signifikant reduziert. Jedoch waren zwischen den mit Diprotin A behandelten und den unbehandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Bei dem Parameter des Herzzeitvolumens fand sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Kontrolle mit allen weiteren Gruppen (Kontrolle  $6459 \pm 509$   $\mu$ l/min., alle  $p < 0,02$ ), welche untereinander keine signifikanten Differenzen zeigten. Als Parameter für den Gefäßwiderstand wurden die Werte der arteriellen Nachlast ausgewertet. An Tag sechs nach LAD-Ligation war die arterielle Nachlast mit  $16,8 \pm 2,6$  mmHg/ $\mu$ l stark erhöht, und damit signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe mit  $4,8 \pm 0,2$  mmHg/ $\mu$ l,  $p = 0,001$ . Die weiteren behandelten Gruppen konnten signifikante Unterschiede zur Kontrolle

## Ergebnisse

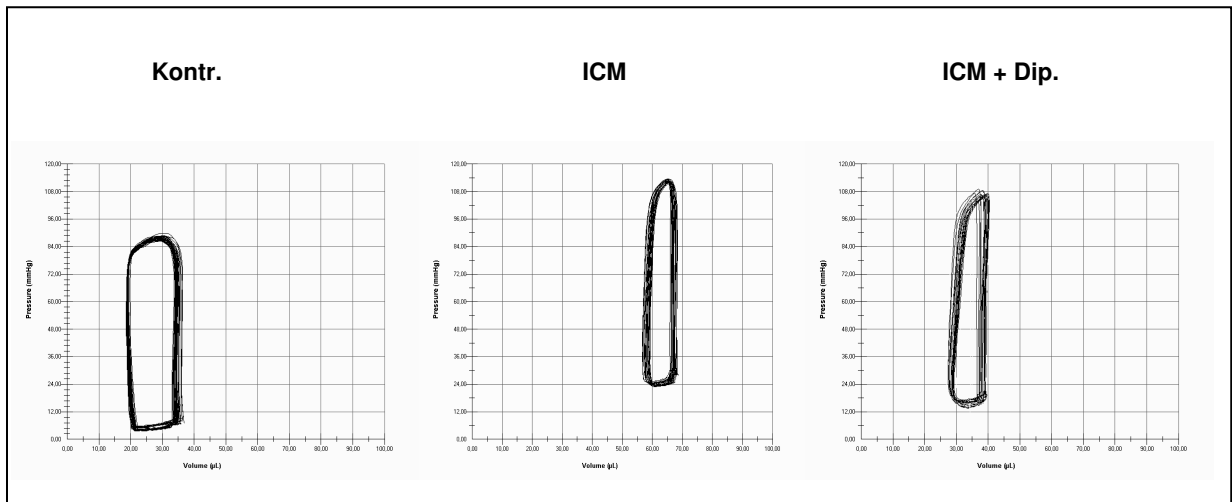
erkennen lassen, überdies an Tag sechs nach Infarkt mit Diprotin A-Behandlung auch im Vergleich zur Gruppe MI 6d. In der Gruppe MI 6d + Dip war die arterielle Nachlast signifikant auf  $9,8 \pm 0,9$  mmHg/ $\mu$ l reduziert. Tabelle IX gibt einen Überblick über wesentliche hämodynamische Parameter.

Parameter	Kontr.	MI 6d	MI 6d + Dip	ICM 30d	ICM 30d + Dip
	n=9	n=7	n=8	n=9	n=9
HF in Schlägen/min.	351 $\pm$ 27	339 $\pm$ 18	379 $\pm$ 25	314 $\pm$ 18	334 $\pm$ 23
EF in %	61,0 $\pm$ 3,0	22,9 $\pm$ 3,7*	25,4 $\pm$ 4,1**	26,5 $\pm$ 2,8#	27,0 $\pm$ 2,9##
EDV in $\mu$ l	29,6 $\pm$ 2,3	50,7 $\pm$ 7,8*	50,9 $\pm$ 6,7	43,9 $\pm$ 3,4	41,5 $\pm$ 3,7
HZV in $\mu$ l/min.	6459 $\pm$ 509	3347 $\pm$ 432*	4549 $\pm$ 513**	3412 $\pm$ 223#	3731 $\pm$ 421##
SW in mmHg x $\mu$ l	1394 $\pm$ 102	520 $\pm$ 73*	704 $\pm$ 80**	762 $\pm$ 94#	894 $\pm$ 108##
AE in mmHg/ $\mu$ l	4,81 $\pm$ 0,15	16,83 $\pm$ 2,59*	9,75 $\pm$ 0,85**†	10,31 $\pm$ 1,30#	12,12 $\pm$ 2,25##

**Tabelle IX:** Hämodynamische Parameter für die Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip in der Übersicht

(Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse. \*:  $p < 0,05$  MI 6d vs. Kontr.; \*\*:  $p < 0,05$  MI 6d + Dip. vs. Kontr.; #:  $p < 0,05$  ICM 30d vs. Kontr.; ##:  $p < 0,05$  ICM 30d + Dip. vs. Kontr.; †:  $p < 0,05$  MI 6d + Dip. vs. MI 6d).

Zur Veranschaulichung der Ejektionsfraktion sind in der Abbildung 35 exemplarisch Druck-Volumen-Schleifen der Gruppen Kontrolle, ICM 30d und ICM 30d + Dip aufgezeigt.

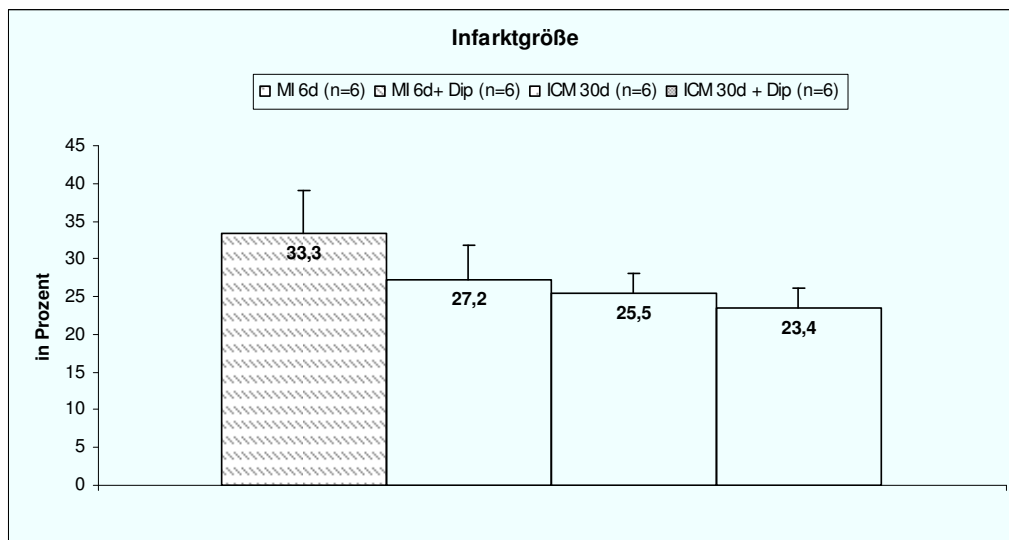


**Abbildung 35:** Repräsentative Druck-Volumen-Schleifen in den Gruppen Kontrolle (EF 62 %), ICM 30d (EF 23 %) und ICM 30d + Dip (EF 26 %)

### 3.2.5 Histologische Evaluation nach Myokardinfarkt

#### 3.2.5.1 Infarktgröße

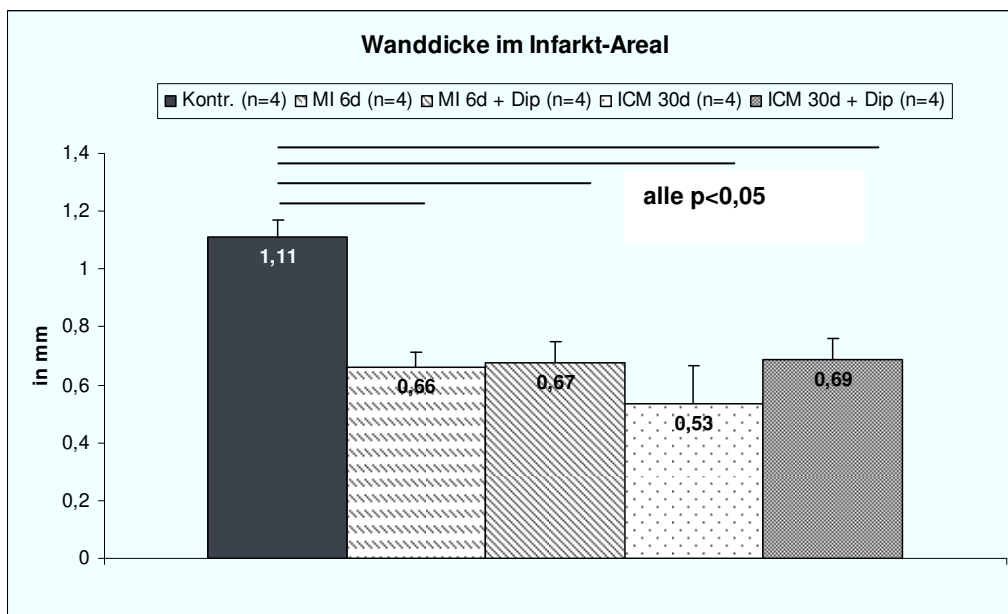
Sechs und 30 Tage nach Myokardinfarkt wurde in den Gruppen mit und ohne Diprotin A-Gabe die Infarktgröße bestimmt (Abbildung 36). Am Tag sechs betrug die Infarktgröße ohne Behandlung  $33,3 \pm 4,7$  %, mit Diprotin A  $27,2 \pm 2,7$  %,  $p=0,28$ . An Tag 30 lag die Infarktgröße bei  $25,5 \pm 2,7$  % ohne Behandlung und bei  $23,4 \pm 2,4$  % mit Diprotin A-Behandlung,  $p=0,58$ . Somit fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Infarktgröße.



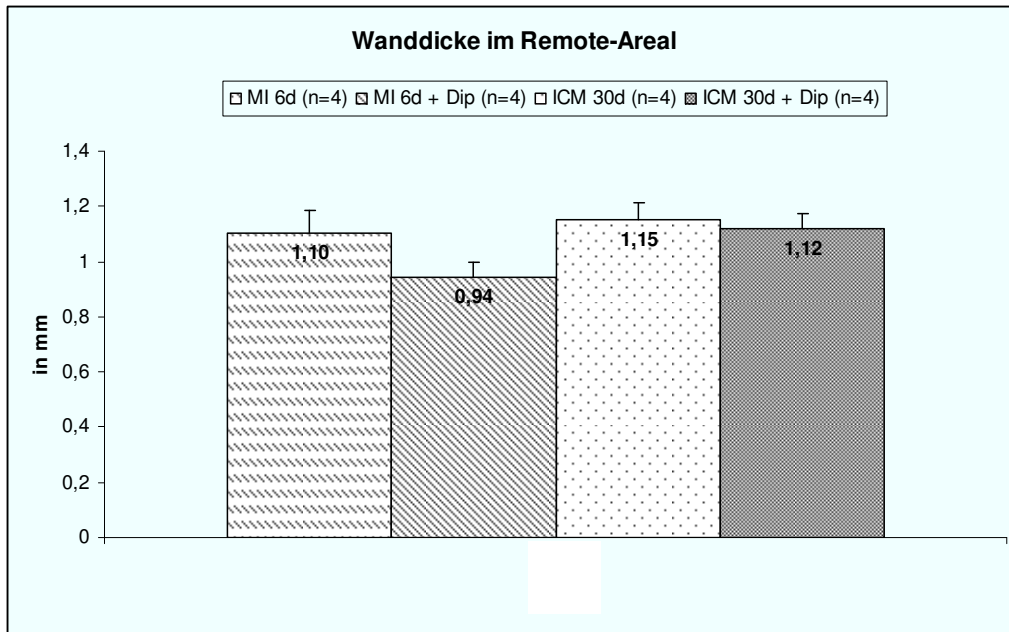
**Abbildung 36:** Vergleich der Infarktgröße in den Gruppen MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip, nicht signifikant (nach Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse  $p<0,05$ ).

### 3.2.5.2 Wanddicke im Infarkt- und Remote-Areal

Die Ausmessung der Wanddicken zeigte eine signifikante Verminderung der Dicke von behandelten Tieren im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ( $1,11 \pm 0,06$  mm), was eine Narbenbildung nach Infarkt widerspiegelt. Sowohl an Tag sechs als auch an Tag 30 nach Infarkt war mit Diprotin A-Gabe einen Trend zur Zunahme der Dicke zu erkennen (MI 6d  $0,66 \pm 0,05$  mm versus MI 6d + Dip  $0,67 \pm 0,08$  mm und ICM 30d  $0,53 \pm 0,07$  mm versus ICM 30d + Dip  $0,69 \pm 0,07$  mm;  $p=0,08$ ), wie Abbildung 37 zeigt. Abbildung 38 zeigt die Wanddicken im Remote-Areal nach Infarkt, die keine Unterschiede untereinander oder zur gesunden Kontrolle erkennen lassen.



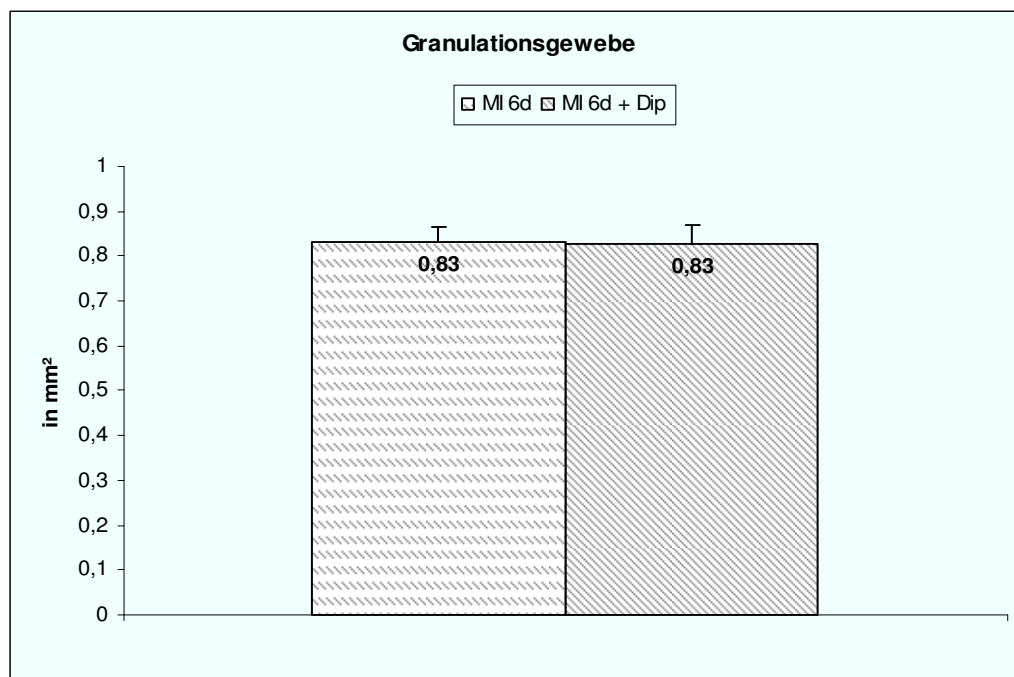
**Abbildung 37:** Vergleich der Wanddicken im Infarktareal in den Gruppen MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d und ICM 30d + Dip



**Abbildung 38:** Vergleich der Wanddicken im Remote-Areal in den Gruppen MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d und ICM 30d + Dip, nicht signifikant (nach Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse  $p < 0,05$ ).

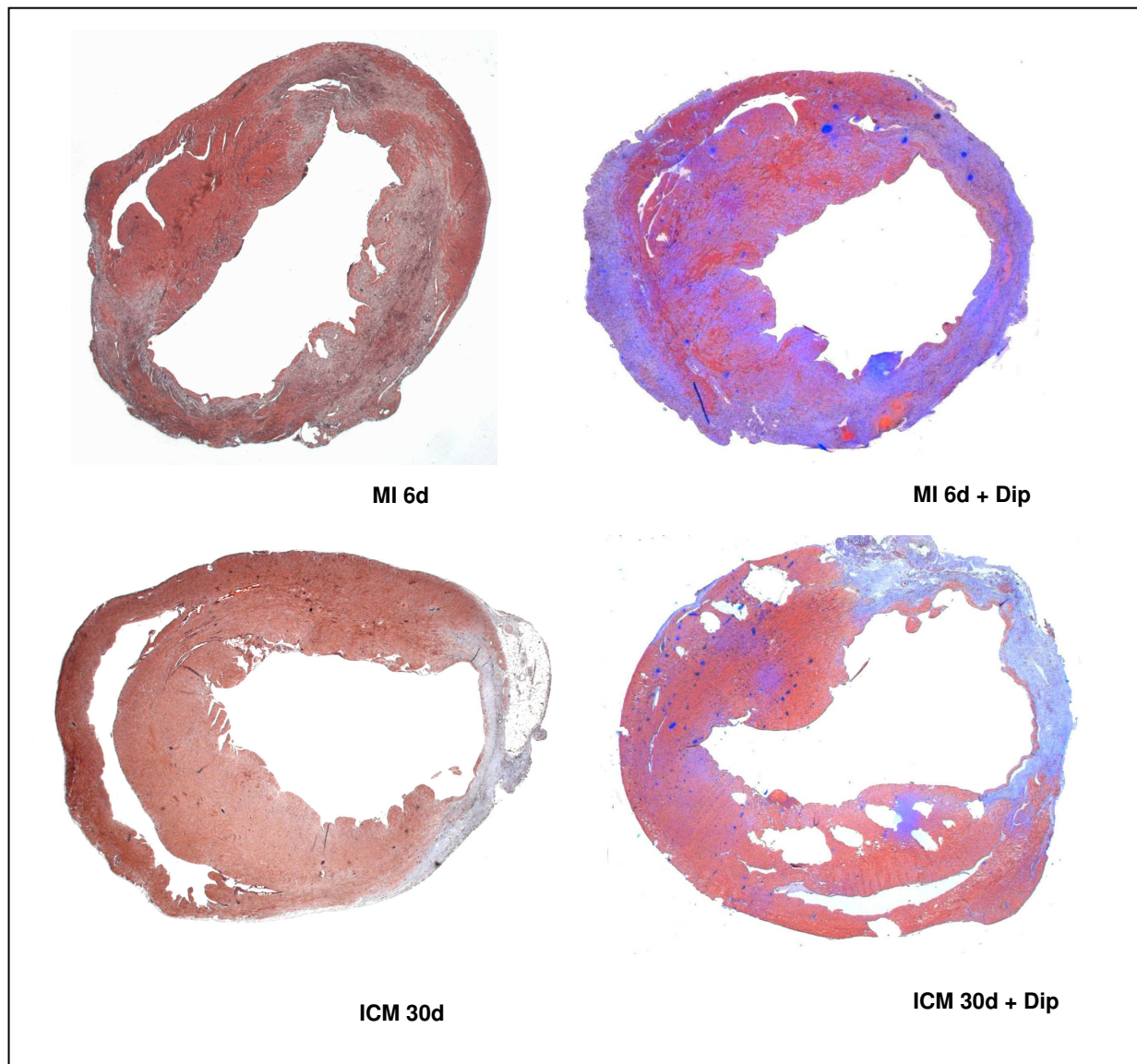
### 3.2.5.3 Granulationsgewebe

An Tag sechs konnte zusätzlich die Ausmessung des Granulationsgewebes vorgenommen werden. Abbildung 39 stellt den Vergleich zwischen den zwei Gruppen dar, wobei kein Unterschied vorliegt.



**Abbildung 39:** Vergleich des Granulationsgewebes in den Gruppen MI 6d und MI 6d + Dip, nicht signifikant (nach Student's t-test bzw. ANOVA-Analyse  $p < 0,05$ ).

Die folgende Abbildung 40 zeigt repräsentative, histologische Schnitte der Gruppen sechs Tage und 30 Tage nach Myokardinfarkt mit und ohne Diprotin A-Gabe.



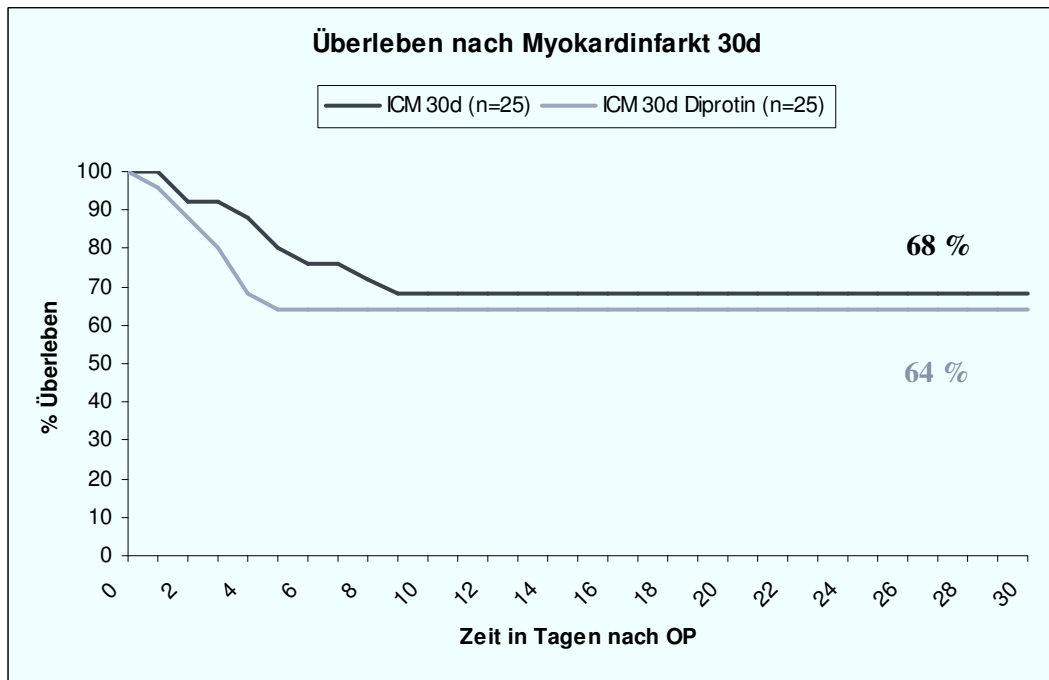
**Abbildung 40:** Repräsentative Schnitte in den Gruppen MI 6d (oben links) und MI 6d + Dip (oben rechts), ICM 30d (unten links) und ICM 30d + Dip (unten rechts)

Die Herzschnitte sind in Masson-Trichrom gefärbt, auf Höhe des Papillarmuskels und in 1,25facher Vergrößerung aufgenommen.

### 3.2.6 Überleben nach Myokardinfarkt an Tag 30

Die Evaluierung der Überlebensdauer an Tag 30 ergab im Vergleich zwischen den Gruppen Diprotin A-behandelte Tiere mit 64 % und unbehandelte Tiere mit 68 % keinen signifikanten Unterschied. Die folgende Abbildung 41 zeigt die Überlebenskurven 30 Tage nach Myokardinfarkt im Vergleich.





**Abbildung 41:** Überleben der infarzierten Tiere 30 Tage nach Infarkt, ohne und mit Diprotin A-Behandlung (Kaplan-Meier-Kurve), nicht signifikant

## **4 Diskussion**

### **4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Der erste Schritt dieser Arbeit bestand aus der grundlegenden Evaluierung der endogenen Stammzellzirkulation bei der toxisch induzierten Kardiomyopathie und der ICM im Mausmodell. Dabei wurden erstmals die Stammzellsubpopulationen im Blut und im Knochenmark, sowie der myokardiale Homingfaktor SDF-1 $\alpha$  auf mRNA-Ebene im Vergleich beider Kardiomyopathie-Modelle gemessen. Im zweiten Schritt wurde bei der ICM ein Therapieansatz mit dem DPP-IV-Inhibitor Diprotin A zur Stabilisation von SDF-1 $\alpha$  getestet. Hierbei wurden das Überleben, die Herzfunktion und Gewebeeigenschaften analysiert.

#### **Toxisch induzierte im Vergleich zur ischämischen Kardiomyopathie:**

- Sowohl im toxischen als auch im ischämischen Modell konnte eine relevante Kardiomyopathie induziert werden: nach Doxorubicin-Gabe waren die Überlebensraten stark vermindert; in beiden Mausmodellen war die linksventrikuläre Ejektionsfraktion gleichermaßen reduziert.
- 14 Tage nach Doxorubicin-Gabe zeigte sich aufgrund der toxischen Knochenmarkssuppression von Doxorubicin eine Verminderung der Stammzellsubpopulationen im peripheren Blut; 90 Tage nach Doxorubicin-Gabe waren aufgrund der physiologischen Antwort reaktiv vermehrt Stammzellen im peripheren Blut messbar.
- Der Vergleich der Stammzell-Subpopulationen im Knochenmark bei der ICM und toxisch induzierten Kardiomyopathie ergab keine relevanten Unterschiede.
- Der Homingfaktor SDF-1 $\alpha$  wurde bei der ischämischen im Gegensatz zur toxisch induzierten Kardiomyopathie auf mRNA-Ebene aufreguliert.

#### **Therapieansatz mit Diprotin A sechs und 30 Tage nach Myokardinfarkt:**

- Der Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) zeigte einen Unterschied der SDF-1 $\alpha$ -Expression zwischen Kontrollen und Tieren nach Infarkt, allerdings ohne Unterschied zwischen Diprotin A-behandelten und -unbehandelten Tieren.

- Die Untersuchung der Stammzellzirkulation im peripheren Blut ergab keinen Anstieg der Stammzellsubpopulationen nach sechs oder 30 Tagen, auch im Knochenmark zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.
- Die Behandlung mit Diprotin A singularär führte weder zu einer signifikant verbesserten Überlebensrate, noch zu einer signifikant verbesserten Herzfunktion oder Histologie.
- Zusammenfassend scheint eine alleinige DPP-IV-Inhibition mit Diprotin A die Ausbildung einer ischämischen Kardiomyopathie nach Infarkt nicht zu verhindern.

#### **4.2 Vermindertes Homing von Stammzellen in der toxisch induzierten Kardiomyopathie im Mausmodell**

In unserer Arbeit untersuchten wir zwei verschiedene Formen der Kardiomyopathie, die ischämische und die toxisch induzierte Kardiomyopathie. Die Effektivität der Doxorubicin-Gabe zur Induktion der toxischen Kardiomyopathie konnte durch hohe Sterberaten bestätigt werden. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass nach Doxorubicin-Gabe die Überlebensraten mit 42,6 % stark vermindert sind. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Aussage von Tomita et al., dass nach Doxorubicin-Gabe in toxischen Dosen im Mausmodell die Überlebensraten – hier sogar mit zusätzlichem Effekt von G-CSF – nur bei 50 % lagen (129).

Sowohl bei der toxischen Kardiomyopathie als auch bei der ICM fand sich eine deutlich verschlechterte Herzfunktion. Eine hämodynamische Verschlechterung im toxischen Modell wurde schon am Hasen von Wanless et al. (137) demonstriert. Dort fiel der kardiale Index (Herzzeitvolumen in Bezug auf das Körpergewicht) von den Versuchstieren stark ab.

Eine Abnahme der Ejektionsfraktion ist als verlässlicher klinischer Marker einer toxisch induzierten Kardiomyopathie etabliert (61, 78). In verschiedenen, toxischen Tiermodellen haben sich andere frühe Marker wie Troponin T, Troponin I oder BNP als nützlich erwiesen (46, 66). Eine BNP-Messung – erhöhte BNP-Expressionslevel werden bei Dehnung der Kardiomyozyten durch intraventrikuläre Volumenzunahme gemessen (7, 76) – ist bei Mäusen auf Proteinebene allerdings nicht möglich. Beim Menschen steht BNP hingegen als etablierter klinischer Parameter zur Beurteilung der Kardiomyopathie zur Verfügung (38). Die geringe Überlebensrate und die verminderten Ejektionsfraktionen sprechen für eine effektive und irreversible Schädigung in beiden Modellen.

Es bestehen zudem Unterschiede zwischen der idiopathischen DCM beim Menschen - wie in der Studie von Theiss et al. untersucht (125) – und einer toxisch induzierten Kardiomyopathie in der Maus: Im Lichtmikroskop zeigt sich bei toxisch behandelten Mäusen histologisch kein Gewebeschaden, sowohl hinsichtlich einer Dilatation als auch hinsichtlich einer Fibrose. In anderen Gruppen wurde gefunden, dass auf elektronenmikroskopisch aufgenommenen Abbildungen eine Zerstörung von Myofibrillen, Mitochondrien und der fundamentalen Architektur der Zellen, einschließlich Vakuolisierung des Zytoplasmas existieren (111, 129, 134). Eine dilatative Ausprägung dieser Kardiomyopathie wird beim Menschen beschrieben, jedoch nicht im Tiermodell (115). Wir nehmen daher an, dass die signifikante Kardiomyopathie sich über bislang unbekannte Mechanismen entwickelt. Auf die Histologie der ICM wird in Kapitel 4.3 eingegangen.

Es ist bekannt, dass Doxorubicin das hämatopoetische System supprimiert (24, 90). 90 Tage nach Doxorubicin-Gabe waren vermehrt Stammzellen im peripheren Blut messbar. Wir stellten die Hypothese auf, dass eine reaktiv vermehrte, physiologische Produktion nach toxischer Suppression von Progenitorzellen im Knochenmark stattfindet, die anschließend ausgeschüttet werden. Deshalb wurde zusätzlich eine Analyse 14 Tage nach Doxorubicin-Gabe durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde in Anbetracht des zu beobachtenden Minimums der Zellzahlen (Nadir) bei Patienten um den Tag 14 gewählt. Auch in Kleintiermodellen hat sich ein Nadir von 8-17 Tagen gezeigt (57, 99, 122). Unsere Untersuchung an Tag 14 zeigte tatsächlich eine Suppression der Stammzellsubpopulationen, entsprechend einer toxischen Schädigung des Knochenmarks durch Doxorubicin. Unsere Messungen im Knochenmark von Tieren mit ICM und toxischer Kardiomyopathie zeigten jedoch keine Unterschiede. Möglicherweise wirkt sich die Suppression auf die Menge der ins periphere Blut ausgeschütteten Zellen aus, jedoch nicht auf die Anzahl der Zellen im Knochenmark selbst. Dieser Mechanismus könnte auch bei der pathophysiologischen Entstehung der Kardiomyopathie eine wichtige Rolle spielen. Die Blutanalyse ergab keine hämatologischen Differenzen zwischen den Gruppen, die als Voraussetzung einer Vergleichbarkeit der FACS-Analysen der verschiedenen Gruppen galt.

Der Homingfaktor SDF-1 $\alpha$  wurde bei der ICM auf mRNA-Ebene aufreguliert, im toxischen Modell jedoch nicht. Auch das entsprach unserer anfangs aufgestellten These, die auf der Arbeit von Theiss et al. beruht. Diese besagt, dass aufgrund der ausbleibenden Aufregulation von SDF-1 $\alpha$  und daraufhin vermindertem Homing vermehrt zirkulierende Stammzellen im peripheren Blut bleiben (125). Ein möglicher Grund ist die Tatsache, dass SDF-1 $\alpha$  direkt auf ischämische Reize reagiert, nicht jedoch auf die Mechanismen, die der toxischen

Kardiomyopathie zugrunde liegen, siehe Kapitel 1.2. Wir stellen daher zusammenfassend die Hypothese auf, dass bei der toxisch induzierten Kardiomyopathie im Mausmodell aufgrund der nicht vorhandenen Aufregulation von SDF-1 $\alpha$  im Gegensatz zur ICM ein vermindertes Stammzell-Homing vorliegt.

Nichtsdestotrotz sind Möglichkeiten zur Protektion vor Doxorubicin-Schäden vorhanden und werden in jüngster Zeit erforscht. Eine Möglichkeit des Schutzes vor den kardiotoxischen Nebenwirkungen sind die verzögerte Infusion von Doxorubicin inklusive eines engen kardiologischen Monitorings, der Einsatz anderer, geringer kardiotoxischer Analoga, die liposomale Verkapselung (99, 108), eine Rezeptor-Blockierung oder der Einsatz von Antikörpern (102). Einen Überblick über zur Prävention einsetzbare Medikamente geben Shan et al. (107). Klinisch eingesetzt wird zur Zeit nur der Eisenchelator Dexrazoxane bei Patientinnen mit Mammakarzinom (12, 51, 52, 54, 62, 72). Erythropoetin, Ibuprofen, Flavonoide oder G-CSF und Antioxidantien wie Vitamin E als Schutz vor Doxorubicin-induzierten Schäden werden diskutiert (73, 89). Auf dem Mechanismus der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie durch Apoptose (150) scheint eine erfolgversprechende Therapieoption mittels antiapoptotisch wirkendem G-CSF zu beruhen (73). Untersuchungen des Stammzell-Homings wurden im Modell der toxischen Kardiomyopathie bis heute noch nicht durchgeführt und könnten Aufschluss über detaillierte Mechanismen der Pathogenese geben.

Der erste Teil dieser Arbeit hat wesentliche Unterschiede zwischen toxischer und ischämischer Kardiomyopathie aufgedeckt. Die SDF-1 $\alpha$ -Aufregulation im ischämischen Modell bot uns einen wesentlichen Ansatz für die Verbesserung des Homings. Daher widmeten wir uns im zweiten Teil dieser Arbeit dem Therapieansatz bei der ICM.

### **4.3 Diprotin A als Therapieoption – Status quo und Ausblick**

Im Vergleich der ischämischen und der toxisch induzierten Kardiomyopathie erschien die Stabilisierung von SDF-1 $\alpha$  im ischämischen Modell vielversprechender, daher wurde dieses Modell mittels Diprotin A für den zweiten Teil der Arbeit evaluiert.

Die LAD-Ligation gilt als gut etabliertes, quantifizierbares und reproduzierbares Modell in der kardiologischen Forschung (105). Dabei entsprechen die histologischen Veränderungen durch den Infarkt denen beim Menschen: Es zeigt sich sechs Tage nach Myokardinfarkt eine beginnende lymphozytäre Infiltration, ab Tag sieben proliferieren Fibroblasten, an Tag 21 ist die Narbenformation abgeschlossen. Nach zwei Wochen ist der Myokardschaden maximal in

den Parametern der Herzfunktion sichtbar. Bis auf eine höhere Überlebensrate bei Mäusen im Vergleich zu Menschen bildet das Mausmodell alle Zeichen einer postischämischen Kardiomyopathie mit Herzinsuffizienz aus (96, 144). So konnten wir an Tag sechs eine Infiltration und an Tag 30 eine Narbenformation sehen, die sich jedoch in allen Gruppen nicht unterschied. Auch die Wanddicken im Remote-Areal nach Infarkt zeigten keinerlei reaktive Hypertrophie. Erwartungsgemäß zeigte die Kontrolle keine Veränderungen.

Obwohl das in dieser Arbeit eingesetzte ischämische Mausmodell einschließlich der LAD-Ligation in der Forschung etabliert ist, führen einige Unterschiede zum Menschen dazu, dass eine Übertragung auf den Menschen und eine genaue Interpretation für den klinischen Einsatz nur begrenzt möglich ist. So weisen Menschen Vorerkrankungen oder Risikofaktoren auf, die im Mausmodell nicht nachgebildet werden können. Auch zielt eine optimale Therapie in Form einer Lyse-Therapie, einer perkutanen Ballondilatation (PTCA) oder der Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern beim Menschen darauf ab, möglichst Schaden zu begrenzen oder zu vermeiden. Im Speziellen ist ein Unterschied in den Voraussetzungen zur humanen Studie von Theiss et al. darin zu sehen, dass das Patientenkollektiv geschlechtergemischt und multimorbide war und sich teilweise im kardiogenen Schock befunden hat (125). Auf der Grundlage tierexperimenteller Forschungsarbeiten sind Studien an Probanden und Patienten nötig, um eine Übertragung in die Klinik leisten zu können. Da SDF-1 $\alpha$  in humanen Studien hochreguliert wird, liegt in der SDF-1 $\alpha$ -Stabilisierung bei ischämischen Erkrankungen ein großes Potential.

Wir haben uns im zweiten Teil der Arbeit dafür entschieden, SDF-1 $\alpha$  auf Proteinebene mittels eines ELISA zu untersuchen, da eine posttranslationale Stabilisierung von SDF-1 $\alpha$  wichtiger und aussagekräftiger als eine transkriptionale Aktivierung auf mRNA-Ebene ist. Da kein Unterschied zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe zu erkennen war, hypothesieren wir folgendes: das Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktiviertem SDF-1 $\alpha$  wird durch die Diprotin A-Behandlung verschoben und ist – da der Antikörper polyklonal ist – im ELISA nicht detektierbar. Um unterscheiden zu können, ob die Diprotin A-Behandlung eine Kappung des Dipeptits effektiv verhindern kann, würde sich eine Massenspektroskopie anbieten.

Die Untersuchung der Stammzellmobilisation im ischämischen Modell im peripheren Blut ergab keinen Anstieg der Stammzellpopulationen nach sechs oder 30 Tagen. Um die Stammzellen vermehrt ins Herz einwandern zu lassen, müssten ausreichend Zellen im peripheren Blut vorhanden sein. Wir gehen davon aus, dass die physiologische Stammzellmobilisierung nicht suffizient genug ist, um vermehrt zirkulierende Stammzellen

ins periphere Blut zu bringen. Diprotin A scheint ohne zusätzliche Mobilisation die Stammzellen in ihrer Nische im Knochenmark zu halten, weil dort die Funktion von CD26 ebenso unterbunden wird (36). Damit kann auch erklärt werden, weshalb wir im Knochenmark ebenfalls keine signifikanten Unterschiede sahen.

Die Blutanalyse ergab auch in diesen Gruppen keine Differenzen in den hämatopoetischen Grundparametern, als Voraussetzung einer Vergleichbarkeit der FACS-Analysen.

In der Synopse führte die Behandlung mit Diprotin A singularär zwar zu keiner signifikant verbesserten Überlebensrate, einer signifikant verbesserten Herzfunktion oder einem günstigeren histologischen Bild, jedoch bietet die Konstellation folgende Ansatzpunkte als Konzept für ein weiteres Vorgehen:

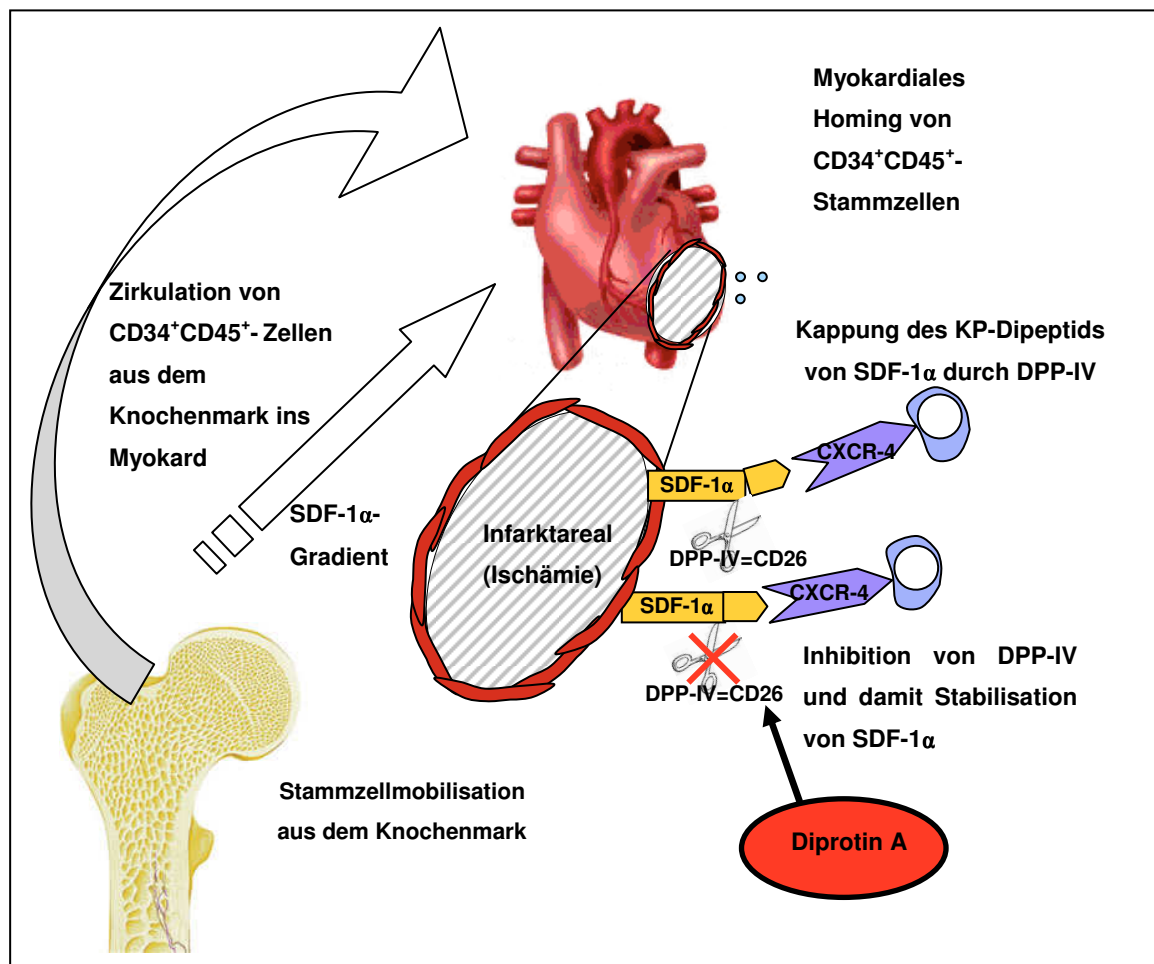
Das Hinzunehmen eines anderen DPP-IV-Inhibitors wie z. B. Val-Pyr oder eines weiteren Stoffes wie CTCE0021, ein SDF-1 $\alpha$ -Agonist, oder die Injektion von Erythropoetin ins Myokard (17, 21, 22, 36, 63, 74) sind Möglichkeiten, eine Verbesserung des Homings zu erzielen. Eine CD26-Inhibition alleine scheint in dieser Dosierung nicht ausreichend zu sein. Entweder könnte die Dosis von Diprotin A erhöht werden oder ebenso erscheint eine genetische Inhibition mittels CD26-Knockout sinnvoll, da sie stärkere Effekte erbringt. Dieser Ansatz wird durch das CD26-Knockout-Modell unterstützt (18, 147). Mit Hilfe eines Western Blots oder Aktivitätsassays könnte die CD26-Aktivität ermittelt werden.

Ein verstärktes Homing von Stammzellen ist erstrebenswert, weil CD34<sup>+</sup>-Zellen durch die Freisetzung angiogener Faktoren zur Neoangiogenese beitragen. Durch die von den Stammzellen angelieferten Faktoren – Insulin-like growth factor (IGF) und vascular endothelial growth factor (VEGF) (104), intrinsisch durch G-CSF über den Jak-Stat-pathway (44) oder durch von SDF-1 $\alpha$  phosphoryliertem Akt (106) – finden Mechanismen der Anti-Apoptose statt, die zur Regeneration des Myokards beitragen. Die Untersuchung des Homings mittels kardialem FACS wäre hierbei interessant. Infarzierten Mäusen könnten green fluorescent protein (GFP)-positive Stammzellen transplantiert werden, die den Nachweis für ein Homing ins Myokard direkt erbringen können.

G-CSF ist als Mittel zur Stammzellmobilisation am Menschen und im Mausmodell etabliert (28, 36). Über die Gabe von G-CSF können vermehrt Stammzellen in die Zirkulation gebracht werden, die dann über SDF-1 $\alpha$  und CXCR4 besser in das Myokard einwandern könnten. Die von Christopherson et al. gezeigte G-CSF-Behandlung führte in vitro zu einer vermehrten CD26 Expression (21-23). Eine unmittelbar postoperative Applikation von G-CSF zur verstärkten Mobilisation und eine gleichzeitige Gabe von Diprotin A zur Erhöhung

der Homingkapazität könnte – basierend auf der vorliegenden Arbeit – eine therapeutische Möglichkeit zur Verhinderung einer ischämischen Kardiomyopathie darstellen. Die abschließende Abbildung 42 stellt die Zusammenhänge des Einflusses von Diprotin A auf das Stammzell-Homing dar.

Weitere Untersuchungen wurden auf Grundlage dieser Hypothese der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Diese konnten tatsächlich ein neues therapeutisches Konzept mittels Diprotin A und G-CSF-Administration für ischämische Erkrankungen etablieren, wobei sich im Mausmodell eine deutliche kardiale Funktionsverbesserung und bessere Überlebensraten zeigten ((148) Zaruba et al. *Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. Cell Stem Cell 4 (4): 313-23, 2009*).



**Abbildung 42:** Einfluss von Diprotin A auf das Stammzellhoming

Hypothese: Stabilisierung von SDF-1α durch CD26-Inhibition und somit verbessertes Stammzell-Homing.



## 5 Zusammenfassung

Die aus ischämischer oder toxischer Kardiomyopathie resultierende Herzinsuffizienz stellt die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Aufgrund der Zunahme dieser Erkrankungsgruppen und der limitierten Behandlungsoptionen ist eine myokardiale Regeneration durch die Verbesserung von Stammzellmobilisation und -homing von größtem Interesse. Die Interaktion von SDF-1 $\alpha$  mit CXCR4 ist in Studien mehrfach als essentiell wichtig für den Homingprozess evaluiert worden. Eine verstärkte Aufregulation von SDF-1 $\alpha$  bei Patienten mit ICM gegenüber DCM wurde von Theiss et al. in einer Patientenstudie berichtet. Ziel dieser Arbeit war es, in einem Mausmodell grundlegende Unterschiede zwischen ICM und DCM zu untersuchen und darauf aufbauend einen Stammzelltherapeutischen Ansatz zu finden.

Die Gabe von Doxorubicin zur toxisch induzierten Kardiomyopathie und die LAD-Ligation zur ischämisch induzierten Kardiomyopathie sind wirksame und gut etablierte Tiermodelle. Sowohl im toxischen als auch im ischämischen Modell konnte eine relevante Kardiomyopathie, sichtbar an stark verminderten Überlebensraten, gleichermaßen reduzierten linksventrikulären Ejektionsfraktionen und bei der ICM deutlichen histologischen Infarktfolgen, induziert werden. Eine Analyse 14 Tage nach Doxorubicin-Gabe zeigte eine Verminderung der Stammzellsubpopulationen, 90 Tage nach Doxorubicin-Gabe waren reaktiv vermehrt Stammzellen im peripheren Blut messbar, im Sinne einer vorangegangenen toxischen Suppression, ohne jedoch die Zellzahl im Knochenmark zu beeinflussen. Wir stellen daher zusammenfassend die Hypothese auf, dass bei der toxisch induzierten Kardiomyopathie im Mausmodell aufgrund der nicht vorhandenen Aufregulation von SDF-1 $\alpha$  im Gegensatz zur ICM ein vermindertes Stammzell-Homing vorliegt.

Aufgrund der Aufregulation des myokardialen Homingfaktors SDF-1 $\alpha$  auf mRNA-Ebene bei der ischämischen Kardiomyopathie entschieden wir uns für einen Ansatz zur Verbesserung des Homings mit Hilfe des DPP-IV-Inhibitors Diprotin A zur konsekutiven Stabilisation von SDF-1 $\alpha$  bei der ICM. Zwar führte die Behandlung mit Diprotin A singularär zu keiner verbesserten Überlebensrate, Herzfunktion, Histologie oder einer stärkeren Expression von SDF-1 $\alpha$  auf Proteinebene. Wir gehen aber von einer Verschiebung des Gleichgewichts von inaktivem zu aktivem SDF-1 $\alpha$  aus, der wegen des polyklonalen Antikörpers nicht detektiert werden kann. Und da die Untersuchung der Stammzellzirkulation im peripheren Blut nach Diprotin A-Gabe keinen Anstieg der Stammzellpopulationen ergab, wäre bei mehr zur Verfügung stehenden Stammzellen im peripheren Blut – z. B. durch G-SCF – und aufgrund

der Verschiebung des Gleichgewichts hin zu aktivem SDF-1 $\alpha$  ein verstärktes Homing ins Myokard möglich. Diese Arbeit hat erste Therapieansätze mit Diprotin A evaluiert und bekräftigt eine Fokussierung auf therapeutische Strategien mittels SDF-1 $\alpha$ -Aufregulation und einem mobilisierenden Agens. Weitere Untersuchungen wurden auf Grundlage dieser Hypothese der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Diese konnten tatsächlich ein neues therapeutisches Konzept mittels Diprotin A und G-CSF-Administration für ischämische Erkrankungen etablieren, wobei sich im Mausmodell eine deutliche Funktionsverbesserung und bessere Überlebensraten zeigten.

**6 Literaturverzeichnis**

1. **Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ.** Stromal cell-derived factor-1alpha 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* 110 (21): 3300-5, 2004.
2. **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* 185 (1): 111-20, 1997.
3. **Aldrich S.** D1515 Sigma Doxorubicin hydrochloride =98% (TLC), 2009.
4. **Aldrich S.** I9759 Sigma Ile-Pro-Ile =97% (HPLC), 2009.
5. **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275 (5302): 964-7, 1997.
6. **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* 362 (9385): 697-703, 2003.
7. **Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, Tonn T, Seifried E, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM.** Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res* 100 (8): 1234-41, 2007.
8. **Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM.** Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 355 (12): 1222-32, 2006.
9. **Baan J, Jong TT, Kerkhof PL, Moene RJ, van Dijk AD, van der Velde ET, Koops J.** Continuous stroke volume and cardiac output from intra-ventricular dimensions obtained with impedance catheter. *Cardiovasc Res* 15 (6): 328-34, 1981.
10. **Balazs T, Herman EH.** Toxic cardiomyopathies. *Ann Clin Lab Sci* 6 (6): 467-76, 1976.

11. **Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC.** Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428 (6983): 668-73, 2004.
12. **Bast A, Kaiserova H, den Hartog GJ, Haenen GR, van der Vijgh WJ.** Protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity: flavonoids. *Cell Biol Toxicol* 23 (1): 39-47, 2007.
13. **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* 114 (6): 763-76, 2003.
14. **Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA.** The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382 (6594): 829-33, 1996.
15. **Box VG.** The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nogalamycin. *J Mol Graph Model* 26 (1): 14-9, 2007.
16. **Bristow MR.** Toxic cardiomyopathy due to doxorubicin. *Hosp Pract (Off Ed)* 17 (12): 101-8, 110-1, 1982.
17. **Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Campbell T, Ito S, Mantel C.** AMD3100 and CD26 modulate mobilization, engraftment, and survival of hematopoietic stem and progenitor cells mediated by the SDF-1/CXCL12-CXCR4 axis. *Ann N Y Acad Sci* 1106: 1-19, 2007.
18. **Campbell TB, Broxmeyer HE.** CD26 inhibition and hematopoiesis: a novel approach to enhance transplantation. *Front Biosci* 13: 1795-805, 2008.
19. **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* 10 (8): 858-64, 2004.
20. **Chachques JC, Herreros J, Trainini J, Juffe A, Rendal E, Prosper F, Genovese J.** Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol* 95 Suppl 1: S29-33, 2004.
21. **Christopherson KW, 2nd, Cooper S, Broxmeyer HE.** Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells. *Blood* 101 (12): 4680-6, 2003.

22. **Christopherson KW, 2nd, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE.** Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science* 305 (5686): 1000-3, 2004.
23. **Christopherson KW, Cooper S, Hangoc G, Broxmeyer HE.** CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26-/- mice. *Exp Hematol* 31 (11): 1126-34, 2003.
24. **Colinas RJ, Burkart PT, Lawrence DA.** The effects of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha on in vitro colony formation by human hematopoietic progenitor cells exposed to doxorubicin or hydroquinone. *Exp Hematol* 23 (12): 1247-55, 1995.
25. **Combs AB, Acosta D.** Toxic mechanisms of the heart: a review. *Toxicol Pathol* 18 (4 Pt 1): 583-96, 1990.
26. **Dai W, Hale SL, Kloner RA.** Stem cell transplantation for the treatment of myocardial infarction. *Transpl Immunol* 15 (2): 91-7, 2005.
27. **Deglin SM, Deglin JM, Chung EK.** Drug-induced cardiovascular diseases. *Drugs* 14 (1): 29-40, 1977.
28. **Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, Huber B, Mehl U, Assmann G, Hoefler IE, Mueller-Hoecker J, Franz WM.** G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *Faseb J* 20 (7): 956-8, 2006.
29. **Demuth HU, McIntosh CH, Pederson RA.** Type 2 diabetes--therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1751 (1): 33-44, 2005.
30. **Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD.** Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 115 (3): 572-83, 2005.
31. **Engelmann MG, Franz, W. M.** Stem cell therapy after myocardial infarction: Ready for clinical application? *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 8(5) (396-414), 2006.
32. **Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE, Schoenberg SO, Steinbeck G, Franz WM.** Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol* 48 (8): 1712-21, 2006.

33. **Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, Verma S, Weisel RD, Keating A, Li RK.** Cardioprotective c-kit<sup>+</sup> cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest* 116 (7): 1865-77, 2006.
34. **Franz WM, Zaruba M, Theiss H, David R.** Stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 362 (9385): 675-6, 2003.
35. **Fruehauf S, Seeger T.** New strategies for mobilization of hematopoietic stem cells. *Future Oncol* 1 (3): 375-83, 2005.
36. **Fruehauf S, Seggewiss R.** It's moving day: factors affecting peripheral blood stem cell mobilization and strategies for improvement [corrected]. *Br J Haematol* 122 (3): 360-75, 2003.
37. **Gavira JJ, Herreros J, Perez A, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Martin-Herrero F, Canizo C, Martin-Arnau A, Marti-Climent JM, Hernandez M, Lopez-Holgado N, Gonzalez-Santos JM, Martin-Luengo C, Alegria E, Prosper F.** Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction: 1-year follow-up. *J Thorac Cardiovasc Surg* 131 (4): 799-804, 2006.
38. **Gerd Herold uM.** Innere Medizin, Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Köln, 2005.
39. **Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ.** Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 103 (11): 1204-19, 2008.
40. **Goto S, Ihara Y, Urata Y, Izumi S, Abe K, Koji T, Kondo T.** Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase pi. *Faseb J* 15 (14): 2702-14, 2001.
41. **Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G.** Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440 (7088): 1199-203, 2006.
42. **Guan K, Wagner S, Unsold B, Maier LS, Kaiser D, Hemmerlein B, Nayernia K, Engel W, Hasenfuss G.** Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* 100 (11): 1615-25, 2007.
43. **Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R.** Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318 (5858): 1920-3, 2007.

44. **Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I.** G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 11 (3): 305-11, 2005.
45. **Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitariano MS, Crystal RG, Raffi S, Moore MA.** Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 97 (11): 3354-60, 2001.
46. **Herman EH, Zhang J, Lipshultz SE, Rifai N, Chadwick D, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ.** Correlation between serum levels of cardiac troponin-T and the severity of the chronic cardiomyopathy induced by doxorubicin. *J Clin Oncol* 17 (7): 2237-43, 1999.
47. **Herman GA, Stevens C, Van Dyck K, Bergman A, Yi B, De Smet M, Snyder K, Hilliard D, Tanen M, Tanaka W, Wang AQ, Zeng W, Musson D, Winchell G, Davies MJ, Ramael S, Gottesdiener KM, Wagner JA.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: results from two randomized, double-blind, placebo-controlled studies with single oral doses. *Clin Pharmacol Ther* 78 (6): 675-88, 2005.
48. **Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Sanchez PL, Canizo C, Rabago G, Marti-Climent JM, Hernandez M, Lopez-Holgado N, Gonzalez-Santos JM, Martin-Luengo C, Alegria E.** Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 24 (22): 2012-20, 2003.
49. **Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, Maeda M, Fagan SC, Carroll JE, Conway SJ.** SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 63 (1): 84-96, 2004.
50. **Himbert D, Guiomard A, Aumont MC, Gourgon R.** [Ischemic cardiomyopathy: remodeling, hypertrophy, subendocardial risk. Can processes be controlled?]. *Rev Prat* 42 (17): 2156-61, 1992.
51. **Hou XW, Son J, Wang Y, Ru YX, Lian Q, Majiti W, Amazouzi A, Zhou YL, Wang PX, Han ZC.** Granulocyte colony-stimulating factor reduces cardiomyocyte

- apoptosis and improves cardiac function in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 20 (2): 85-91, 2006.
52. **Imondi AR, Della Torre P, Mazue G, Sullivan TM, Robbins TL, Hagerman LM, Podesta A, Pincioli G.** Dose-response relationship of dexrazoxane for prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, rats, and dogs. *Cancer Res* 56 (18): 4200-4, 1996.
53. **Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D, Kische S, Freund M, Nienaber CA.** Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* 112 (9 Suppl): I73-80, 2005.
54. **Inchiosa MA, Jr., Smith CM.** Effects of ibuprofen on doxorubicin toxicity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 67 (1): 63-78, 1990.
55. **Jaenke RS.** An anthracycline antibiotic-induced cardiomyopathy in rabbits. *Lab Invest* 30 (3): 292-304, 1974.
56. **Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM.** Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30 (8): 896-904, 2002.
57. **Jimenez JJ, Huang HS, Hindahl M, Pearson FC, Yunis AA.** Protection from chemotherapy-induced neutropenia by ImuVert. *Am J Med Sci* 303 (2): 83-5, 1992.
58. **Kahne T, Lendeckel U, Wrenger S, Neubert K, Ansorge S, Reinhold D.** Dipeptidyl peptidase IV: a cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (review). *Int J Mol Med* 4 (1): 3-15, 1999.
59. **Karasik A, Aschner P, Katzeff H, Davies MJ, Stein PP.** Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor for the treatment of patients with type 2 diabetes: a review of recent clinical trials. *Curr Med Res Opin* 24 (2): 489-96, 2008.
60. **Karow TL-R, Ruth.** Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie - Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden, 2005.
61. **Keefe DL.** Anthracycline-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* 28 (4 Suppl 12): 2-7, 2001.
62. **Kim KH, Oudit GY, Backx PH.** Erythropoietin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 324 (1): 160-9, 2008.



63. **Klopsch C, Furlani D, Gabel R, Li W, Pittermann E, Ugurlucan M, Kundt G, Zingler C, Titze U, Wang W, Ong LL, Wagner K, Li RK, Ma N, Steinhoff G.** Intracardiac injection of erythropoietin induces stem cell recruitment and improves cardiac functions in a rat myocardial infarction model. *J Cell Mol Med* 13 (4): 664-79, 2009.
64. **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* 7 (4): 430-6, 2001.
65. **Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P.** A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200 (2): 123-35, 2004.
66. **Koh E, Nakamura T, Takahashi H.** Troponin-T and brain natriuretic peptide as predictors for adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circ J* 68 (2): 163-7, 2004.
67. **Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ.** A population of very small embryonic-like (VSEL) stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 20 (5): 857-69, 2006.
68. **Kueth F, Krack A, Fritzenwanger M, Herzau M, Opfermann T, Pachmann K, Sayer HG, Werner GS, Gottschild D, Figulla HR.** Treatment with granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction. Evidence for a stimulation of neovascularization and improvement of myocardial perfusion. *Pharmazie* 61 (11): 957-61, 2006.
69. **Lacko A, Wlodarska I, Zymlinski R, Mazur G, Wrobel T, Gisterek I.** [Cardiac toxicity in cancer therapy]. *Pol Merkur Lekarski* 13 (73): 79-85, 2002.
70. **Lee WK, Regan TJ.** Alcoholic cardiomyopathy: is it dose-dependent? *Congest Heart Fail* 8 (6): 303-6, 2002.
71. **Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ.** Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 111 (2): 187-96, 2003.
72. **Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, Kanamori H, Khai NC, Maruyama R, Ogino A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.** Preventive effect

- of erythropoietin on cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation* 113 (4): 535-43, 2006.
73. **Li L, Takemura G, Li Y, Miyata S, Esaki M, Okada H, Kanamori H, Ogino A, Maruyama R, Nakagawa M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.** Granulocyte colony-stimulating factor improves left ventricular function of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Lab Invest* 87 (5): 440-55, 2007.
74. **Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hubel K, Cooper S, Hangoc G, Bridger GJ, Henson GW, Calandra G, Dale DC.** Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 102 (8): 2728-30, 2003.
75. **Löffler GP, Petro.** *Biochemie & Pathobiochemie*. Vol. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2003.
76. **Maggia J, Vuolteenaho O, Tokola H, Marttila M, Ruskoaho H.** B-type natriuretic peptide: a myocyte-specific marker for characterizing load-induced alterations in cardiac gene expression. *Ann Med* 30 Suppl 1: 39-45, 1998.
77. **Mari A, Sallas WM, He YL, Watson C, Ligueros-Saylan M, Dunning BE, Deacon CF, Holst JJ, Foley JE.** Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, improves model-assessed beta-cell function in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (8): 4888-94, 2005.
78. **Mazzarello GP, Morra L.** [Anthracyclines and the heart]. *Recenti Prog Med* 89 (9): 459-64, 1998.
79. **Menasche P.** Skeletal myoblast for cell therapy. *Coron Artery Dis* 16 (2): 105-10, 2005.
80. **Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA.** The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 117 (9): 1189-200, 2008.
81. **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* 41 (7): 1078-83, 2003.
82. **Min JY, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, Morgan JP, Xiao YF.** Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by

- transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125 (2): 361-9, 2003.
83. **Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, 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* 428 (6983): 664-8, 2004.
84. **Nielsen JM, Kristiansen SB, Ringgaard S, Nielsen TT, Flyvbjerg A, Redington AN, Botker HE.** Left ventricular volume measurement in mice by conductance catheter: evaluation and optimization of calibration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (1): H534-40, 2007.
85. **Nir SG, David R, Zaruba M, Franz WM, Itskovitz-Eldor J.** Human embryonic stem cells for cardiovascular repair. *Cardiovasc Res* 58 (2): 313-23, 2003.
86. **Organtransplantation DSO.** Indikationen für eine Herztransplantation, 2008.
87. **Organtransplantation DSO.** Neuanmeldungen und Transplantationen, Herztransplantationen Deutschland. 2008.
88. **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* 98 (18): 10344-9, 2001.
89. **Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J.** Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *Int J Cardiol* 117 (1): 6-15, 2007.
90. **Pannacciulli I, Muzzulini C, Massa G, Bogliolo G.** Cytotoxic effect of dose and schedule on normal murine hematopoietic progenitor cells following the administration of 4'-deoxydoxorubicin. *Br J Cancer* 50 (5): 647-56, 1984.
91. **Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ.** Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451 (7175): 141-6, 2008.
92. **Passier R, Mummery C.** Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res* 58 (2): 324-35, 2003.
93. **Peter J. Quesenberry GAC.** Disorders of Hematopoiesis. *Harrisons Principles Internal Medicine*. Vol. 16. Auflage: Mcgraw-Hill Professional, pp. 653-660, 2004.
94. **Petit T.** [Anthracycline-induced cardiotoxicity]. *Bull Cancer* 91 Suppl 3: 159-65, 2004.

95. **Pittenger MF, Martin BJ.** Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 95 (1): 9-20, 2004.
96. **Pons S, Fornes P, Hagege AA, Heudes D, Giudicelli JF, Richer C.** Survival, haemodynamics and cardiac remodelling follow up in mice after myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30 (1-2): 25-31, 2003.
97. **Power JM, Tonkin AM.** Large animal models of heart failure. *Aust N Z J Med* 29 (3): 395-402, 1999.
98. **R&D Systems.** Quantikine Mouse CXCL12/SDF-1 alpha Immunoassay. Minneapolis, USA, pp. 15, 2004.
99. **Rahman A, White G, More N, Schein PS.** Pharmacological, toxicological, and therapeutic evaluation in mice of doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes. *Cancer Res* 45 (2): 796-803, 1985.
100. **Reimer MK, Holst JJ, Ahren B.** Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves glucose tolerance and preserves islet function in mice. *Eur J Endocrinol* 146 (5): 717-27, 2002.
101. **Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P.** Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93 (5): 841-2, 1996.
102. **Robert J.** Preclinical assessment of anthracycline cardiotoxicity in laboratory animals: predictiveness and pitfalls. *Cell Biol Toxicol* 23 (1): 27-37, 2007.
103. **Romeis B.** Mikroskopische Technik. Vol. 17., neubearbeitete Auflage. München: Böck, Beiträge von H. Denk, H. Künzle, H. Plenk jr., J. Rüschoff, W. Sella, p. 497-499, 1989.
104. **Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, Klein H, Alt E.** The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun* 363 (3): 674-9, 2007.
105. **Salto-Tellez M, Yung Lim S, El-Oakley RM, Tang TP, ZA AL, Lim SK.** Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovasc Pathol* 13 (2): 91-7, 2004.
106. **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* 117 (17): 2224-31, 2008.

107. **Shan K, Lincoff AM, Young JB.** Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med* 125 (1): 47-58, 1996.
108. **Shinozawa S, Gomita Y, Araki Y.** Protective effects of various drugs on adriamycin (doxorubicin)-induced toxicity and microsomal lipid peroxidation in mice and rats. *Biol Pharm Bull* 16 (11): 1114-7, 1993.
109. **Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T.** Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103 (23): 2776-9, 2001.
110. **Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, Kurpisz M.** Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 148 (3): 531-7, 2004.
111. **Singal PK, Iliskovic N.** Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 339 (13): 900-5, 1998.
112. **Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D.** Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *Faseb J* 11 (12): 931-6, 1997.
113. **Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N.** Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem* 207 (1-2): 77-86, 2000.
114. **Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountiukos M, Onderwater EE, Lee CH, Maat AP, Serruys PW.** Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 42 (12): 2063-9, 2003.
115. **Spotnitz MD, Lesch M.** Idiopathic dilated cardiomyopathy as a late complication of healed viral (Coxsackie B virus) myocarditis: historical analysis, review of the literature, and a postulated unifying hypothesis. *Prog Cardiovasc Dis* 49 (1): 42-57, 2006.
116. **Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, David A, Liebold A, Nienaber C, Zurakowski D, Freund M, Steinhoff G.** Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 133 (3): 717-25, 2007.
117. **Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G.** Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361 (9351): 45-6, 2003.

118. **Statistisches Bundesamt Deutschland B.** Gesundheit - Krankheitskosten 2002, 2004 und 2006 Tabellen zur Krankheitskostenrechnung mit methodischer Beschreibung des Rechensystems und einem erläuterndem Ergebnisteil inkl. Grafiken., 2008.
119. **Statistisches Bundesamt Deutschland B.** Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2006, Sterbefälle nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht; Gestorbene in Deutschland. Version: 2.24.0 / 31.08.2007 ed, 2007.
120. **Statistisches Bundesamt Deutschland B.** Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2007, Sterbefälle nach ausgewählten Todesursachen, Altersgruppen und Geschlecht; Gestorbene in Deutschland. Vol. Fachserie 12 Reihe 4 - 2007, pp. 49, 2008.
121. **Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, Heller G, Murphy ML.** Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *Jama* 266 (12): 1672-7, 1991.
122. **Sweatman TW, Seshadri R, Israel M.** Pharmacology of N-benzyladriamycin-14-valerate in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol* 43 (5): 419-26, 1999.
123. **Taconic TL.** B6 Physiological Data Summary, 2004.
124. **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S.** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 (5): 861-72, 2007.
125. **Theiss HD, David R, Engelmann MG, Barth A, Schotten K, Naebauer M, Reichart B, Steinbeck G, Franz WM.** Circulation of CD34+ progenitor cell populations in patients with idiopathic dilated and ischaemic cardiomyopathy (DCM and ICM). *Eur Heart J* 28 (10): 1258-64, 2007.
126. **Thews A.** Einführung in die Durchflusszytometrie und ihre Anwendungen. *Coulter-Immunotech Diagnostics Durchflusszytometrie*, pp. 15, 2001.
127. **To H, Ohdo S, Shin M, Uchimar H, Yukawa E, Higuchi S, Fujimura A, Kobayashi E.** Dosing time dependency of doxorubicin-induced cardiotoxicity and bone marrow toxicity in rats. *J Pharm Pharmacol* 55 (6): 803-10, 2003.
128. **Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U.** New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol* 41 (3): 389-405, 2006.
129. **Tomita S, Ishida M, Nakatani T, Fukuhara S, Hisashi Y, Ohtsu Y, Suga M, Yutani C, Yagihara T, Yamada K, Kitamura S.** Bone marrow is a source of regenerated cardiomyocytes in doxorubicin-induced cardiomyopathy and granulocyte colony-stimulating factor enhances migration of bone marrow cells and attenuates

- cardiotoxicity of doxorubicin under electron microscopy. *J Heart Lung Transplant* 23 (5): 577-84, 2004.
130. **Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M.** Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res* 98 (11): 1414-21, 2006.
131. **Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, Yamaguchi I.** Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci* 101 (2): 151-8, 2006.
132. **Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R.** CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 110 (10): 1209-12, 2004.
133. **van Acker SA, Kramer K, Voest EE, Grimbergen JA, Zhang J, van der Vijgh WJ, Bast A.** Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitored by ECG in freely moving mice. A new model to test potential protectors. *Cancer Chemother Pharmacol* 38 (1): 95-101, 1996.
134. **van der Vijgh WJ, van Velzen D, van der Poort JS, Schluper HM, Mross K, Feijen J, Pinedo HM.** Morphometric study of myocardial changes during doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24 (10): 1603-8, 1988.
135. **W. Böcker HD, Ph. U. Heitz.** Pathologie. Vol. 3., völlig überarbeitete Auflage. München, 2004.
136. **Wang Y, Deng Y, Zhou GQ.** SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain Res* 1195: 104-12, 2008.
137. **Wanless RB, Anand IS, Poole-Wilson PA, Harris P.** An experimental model of chronic cardiac failure using adriamycin in the rabbit: central haemodynamics and regional blood flow. *Cardiovasc Res* 21 (1): 7-13, 1987.
138. **Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G.** Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353 (10): 999-1007, 2005.
139. **WHO.** Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 44 (6): 672-3, 1980.

140. **Wiedeman PE.** DPPIV inhibition: promising therapy for the treatment of type 2 diabetes. *Prog Med Chem* 45: 63-109, 2007.
141. **Wojakowski W, Tendera M, Kucia M, Zuba-Surma E, Paczkowska E, Ciosek J, Halasa M, Krol M, Kazmierski M, Buszman P, Ochala A, Ratajczak J, Machalinski B, Ratajczak MZ.** Mobilization of bone marrow-derived Oct-4+ SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 53 (1): 1-9, 2009.
142. **Wollert KC, Drexler H.** Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 96 (2): 151-63, 2005.
143. **Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H.** Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364 (9429): 141-8, 2004.
144. **Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA.** Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol* 87 (5): 547-55, 2002.
145. **Yokochi T, Robertson KD.** Doxorubicin inhibits DNMT1, resulting in conditional apoptosis. *Mol Pharmacol* 66 (6): 1415-20, 2004.
146. **Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA.** Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*, 2009.
147. **Zaruba MM MU, Theiss H, Huber B, Brunner S, Assmann G, Höcker JM, Franz WM.** G-CSF treatment of CD26 knock out mice promotes homing of CD34+/CXCR4+ stem cells and attenuates late ischemic cardiomyopathy. 2008.
148. **Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Fischer R, Krieg L, Hirsch E, Huber B, Nathan P, Israel L, Imhof A, Herbach N, Assmann G, Wanke R, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G, Franz WM.** Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell* 4 (4): 313-23, 2009.
149. **Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, Ding S.** Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*, 2009.
150. **Zhu W, Soonpaa MH, Chen H, Shen W, Payne RM, Liechty EA, Caldwell RL, Shou W, Field LJ.** Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced



inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation* 119 (1): 99-106, 2009.

## 7 Abbildungen und Tabellen

### 7.1 **Abbildungen**

Abbildung 1: <i>Ressourcen für die Stammzelltherapie, modifiziert nach Dimmeler et al. (30);</i> .....	15
Abbildung 2: <i>Stammzell-Nische im Knochenmark, in Anlehnung an Frühauf et al. (35)</i> .....	16
Abbildung 3: <i>Stammzellzirkulation und -homing nach Myokardinfarkt</i> .....	18
Abbildung 4: <i>Versuchsaufbau in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM;</i> .....	22
Abbildung 5: <i>Versuchsaufbau in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip;</i> ....	23
Abbildung 6: <i>Strukturformel von Doxorubicin (Sigma-Aldrich)</i> .....	30
Abbildung 7: <i>OP-Situs einer Maus vor (links) und nach LAD-Ligation (rechts).</i> .....	31
Abbildung 8: <i>Strukturformel von Diprotin A (Sigma-Aldrich)</i> .....	32
Abbildung 9: <i>Druck-Volumen-Schleife einer gesunden Maus</i> .....	33
Abbildung 10: <i>Millar-Tip-Katheter (1.4 French)</i> .....	34
Abbildung 11: <i>Saline-Kalibrierung</i> .....	35
Abbildung 12: <i>Infarktgrößenbestimmung im Schema und anhand von vier histologischen Schnitten von der Basis bis zur Herzspitze</i> .....	39
Abbildung 13: <i>Aufbau eines Durchflusszytometers, modifiziert nach (126)</i> .....	41
Abbildung 14: <i>Hydrodynamische Fokussierung, modifiziert nach (126)</i> .....	41
Abbildung 15: <i>Testung des SDF- 1<math>\alpha</math>-Primers, mit DNA-Leiter, Referenz und H<sub>2</sub>O</i> .....	47
Abbildung 16: <i>Prinzip des Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA), modifiziert nach (75)</i> .....	48
Abbildung 17: <i>Überleben der Doxorubicin-behandelten Mäuse 90d nach Behandlung (Kaplan-Meier-Kurve)</i> 50	
Abbildung 18: <i>Vergleich der Ejektionsfraktion in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM</i> .....	51
Abbildung 19: <i>Vergleich der enddiastolischen Volumina in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM,</i> ....	52
Abbildung 20: <i>Repräsentative Druck-Volumen-Schleifen in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM</i> ....	53
Abbildung 21: <i>Vergleich der Wanddicken im Infarkt-Areal in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM</i> 54	
Abbildung 22: <i>Repräsentative Histologieschnitte in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM</i> .....	55
Abbildung 23: <i>Vergleich von Leukozyten-, Lymphozyten-, Neutrophile Granulozyten- und Monozyten-Zahl in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM,</i> .....	56
Abbildung 24: <i>Vergleich der FACS-Analysen im peripheren Blut in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin 14d, Doxorubicin 90d und ICM</i> .....	57
Abbildung 25: <i>Bilder der FACS-Analysen des Knochenmarks in den Gruppen Kontrolle (oben links), ICM (oben rechts), Doxorubicin 14d (unten links) und Doxorubicin 90d (unten rechts)</i> .....	58
Abbildung 26: <i>Vergleich der FACS-Analysen im Knochenmark in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin 14d, Doxorubicin 90d und ICM,</i> .....	59
Abbildung 27: <i>Bilder der FACS-Analysen des Knochenmarks in den Gruppen Kontrolle (oben links), ICM (oben rechts), Doxorubicin 14d (unten links) und Doxorubicin 90d (unten rechts)</i> .....	60
Abbildung 28: <i>Vergleich der Expression von SDF-1<math>\alpha</math> auf mRNA-Ebene in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM</i> .....	61
Abbildung 29: <i>Vergleich der Expression von SDF-1<math>\alpha</math> auf Proteinebene mittels ELISA in den Gruppen Kontrolle, MI 2d und MI 2d + Dip</i> .....	62

## Abbildungen und Tabellen

Abbildung 30: Vergleich der FACS-Analysen des peripheren Blutes in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip, .....	64
Abbildung 31: Vergleich der FACS-Analysen des Knochenmarks in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip, .....	64
Abbildung 32: FACS-Analysen des Knochenmarks in den Gruppen Kontrolle, MI 6d (oben links), MI 6d + Dip (oben rechts), ICM 30d (unten links) und ICM 30d + Dip (unten rechts).....	65
Abbildung 33: Vergleich der Ejektionsfraktion in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip .....	66
Abbildung 34: Vergleich der enddiastolischen Volumina in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip .....	67
Abbildung 35: Repräsentative Druck-Volumen-Schleifen in den Gruppen Kontrolle (EF 62 %), ICM 30d (EF 23 %) und ICM 30d + Dip (EF 26 %).....	69
Abbildung 36: Vergleich der Infarktgröße in den Gruppen MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip, ....	69
Abbildung 37: Vergleich der Wanddicken im Infarktareal in den Gruppen MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d und ICM 30d + Dip .....	70
Abbildung 38: Vergleich der Wanddicken im Remote-Areal in den Gruppen MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d und ICM 30d + Dip, .....	71
Abbildung 39: Vergleich des Granulationsgewebes in den Gruppen MI 6d und MI 6d + Dip, .....	71
Abbildung 40: Repräsentative Schnitte in den Gruppen MI 6d (oben links) und MI 6d + Dip (oben rechts), ICM 30d (unten links) und ICM 30d + Dip (unten rechts) .....	72
Abbildung 41: Überleben der infarzierten Tiere 30 Tage nach Infarkt, ohne und mit Diprotin A-Behandlung (Kaplan-Meier-Kurve), nicht signifikant .....	73
Abbildung 42: Einfluss von Diprotin A auf das Stammzellhoming .....	80

## 7.2 Tabellen

Tabelle I: Adulte Stammzellen für die Stammzelltherapie am Herzen, modifiziert nach Engelmann et al. (31) .....	15
Tabelle II: Patientenstudien zur Stammzelltransplantation bei Kardiomyopathie: .....	20
Tabelle III: Antikörper, .....	43
Tabelle IV: Mittlere Normblutwerte von männlichen C57BL/6 Mäusen (123).....	45
Tabelle V: Primer mit Sequenzen und Annealing-Temperaturen .....	46
Tabelle VI: Häodynamische Parameter für die Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM in der Übersicht .....	53
Tabelle VII: Blutwerte in der Übersicht in den Gruppen Kontrolle, Doxorubicin und ICM,.....	56
Tabelle VIII: Blutwerte in der Übersicht in den Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip, .....	63
Tabelle IX: Häodynamische Parameter für die Gruppen Kontrolle, MI 6d, MI 6d + Dip, ICM 30d, ICM 30d + Dip in der Übersicht .....	68

## 8 Publikationen

### Originalarbeiten:

Zaruba MM, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Fischer R, Krieg L, **Hirsch-Frank E**, Huber B, Groebner M, Nathan P, Israel L, Imhoff A, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz WM.

*Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction.*

**Cell Stem Cell** 4 (4): 313-23, 2009.

### Abstracts:

Theiss HD, Vallaster M, Brunner S, **Hirsch-Frank E**, David R, Zaruba MM and Franz.WM. *Combined Application Of G-CSF and a CD26-inhibitor Improves Stem Cell Homing, Cardiac Function and Survival After Myocardial Infarction in a Mouse Model.* **Circulation** Oct 2008; 118: S\_396.

Vallaster M, Theiss HD, Brunner S, David R, **Hirsch-Frank E**, Zaruba MM and Franz WM. *The effect of combined application of G-CSF and a CD26-inhibitor on stem cell homing, cardiac function and survival after myocardial infarction in mice.* Proceedings of the **3. Congress of the German Stem Cell Society, Stuttgart, 2008.**

**Hirsch-Frank E**, Brunner S, Theiss HD, Leiss M, Fischer R, Vallaster M, Huber BC, David R, Keithahn A, Sauter M, Klingel K and Franz WM. *G-CSF treatment improves left ventricular function in postmyocarditic cardiomyopathy by enhanced circulation and homing of bone marrow-derived stem cells.* Proceedings of the **7<sup>th</sup> Dutch-German Meeting on Molecular Cardiology 2009.**

Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Krieg L, **Hirsch-Frank E**, Nathan P, Imhof A, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *Genetic or pharmacological CD26/DPP-IV inhibition combined with G-CSF application enhances homing of stem cells and improves survival after acute myocardial infarction.* Proceedings of the **7<sup>th</sup> Dutch-German Meeting on Molecular Cardiology 2009.**

Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, Krieg L, **Hirsch-Frank E**, Nathan P, Imhof A, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *Genetic or pharmacological CD26/DPP-IV inhibition combined with G-CSF administration enhances homing of stem cells and improves ventricular function after acute myocardial infarction.* **88. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Physiologie 2009.**

Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Brunner S, David R, Krieg L, **Hirsch-Frank E**, Nathan P, Imhof A, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *Combined application of G-CSF and a CD26-inhibitor leads to enhanced stem cell homing, cardiac function and survival after myocardial infarction in a mouse model.* **Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2009.**

Vallaster M\*, Theiss HD\*, Zaruba M, Mehl U, Brunner S, David R, Krieg L, **Hirsch-Frank E**, Nathan P, Imhof A, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *Enhanced homing of stem cells and improved survival by genetic or pharmacological CD26/DPP-IV inhibition combined with G-CSF application after acute myocardial infarction.* **Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2009.**

Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Brunner S, David R, Krieg L, **Hirsch-Frank E**, Nathan P, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *G-CSF application combined with CD26-inhibition as a new therapeutic concept enhances stem cell homing and cardiac function after myocardial infarction in mice.* **Jahreskongress der European Society of Cardiology 2009.**

Theiss HD, Zaruba M, Vallaster M, Brunner S, David R, Krieg L, **Hirsch-Frank E**, Nathan P, Imhof A, Mueller-Hoecker J, Steinbeck G and Franz.WM. *Genetic or pharmacological CD26/DPP-IV inhibition combined with G-CSF therapy enhances homing of stem cells, left ventricular function and improves survival after acute myocardial infarction.* **1. Workshop Kardiologie Stammzellen und Tissue Engineering der AG Stammzellen der DGK und AG Grundlagenforschung der DGTHG.**

### 9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz sehr für die Überlassung des Themas, sein Vertrauen, seine Führung, seinen steten Rat und seine Hilfe. In seiner Arbeitsgruppe konnte ich die Grundlagen wissenschaftlichen Denkens und Handelns erlernen. Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. med. Hans D. Theiss und Herrn Dr. med. Stefan M. Brunner für ihre sehr gute Betreuung, ihre stete Ermunterung und für die regen Diskussionen. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Franz, die mich mit ihrem Fachwissen unterstützt haben. Besonders möchte ich Frau Judith Arcifa und Herrn Marcus Vallaster für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der qRT-PCR und des ELISA hervorheben. Herrn Prof. Dr. med. Josef Müller-Höcker und Herrn Dr. med. Gerald Assmann danke ich für die freundliche und schnelle Durchführung der histologischen Schnitte. Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann danken für die Aufnahme in das Programm zur Förderung von Forschung und Lehre der LMU (FöFoLe). Schließlich habe ich mich sehr über die Unterstützung und Geduld meiner Eltern Sabine und Egbert Hirsch gefreut und über die Hilfe in technischen Fragen und für den steten Rückhalt meines Ehemannes Dipl.-Wirtsch.-Ing. Christoph M. Frank.

## 10 Lebenslauf

Name Eva Frank, geb. Hirsch

Studienadresse Engasserbogen 15, 80639 München

E-Mail-Adresse mail@evafrank.de

Geburtsdatum 6. März 1983

Geburtsort Mainz

Staatsangehörigkeit Deutsch

Familienstand Verheiratet

Eltern Hirsch, Rainer Egbert; Werbekaufmann  
Hirsch, Anna Elise Sabine, geb. Thiel; MTA

### **Schulbildung**

1989 – 1993 Grundschule Bennert, Leichlingen

1993 – 1995 Katholisches Gymnasium Marienschule, Leverkusen

1996 – 2002 Bischöfliches Gymnasium Josephinum, Hildesheim

### **Studium**

2002 – 2004 Medizinstudium an der MHH Hannover

2004 – 2009 Medizinstudium an der LMU München

### **Abgeschlossene Prüfungen**

2002 Abitur (Bisch. Gymnasium Josephinum, Hildesheim, Note 1,1, bestes Abitur des Jahrgangs, LK Latein und Chemie)

2004 Physikum (MHH Hannover, Note 2,33)

2009 Staatsexamen (LMU München, Note 2,0)

**Praktische Erfahrungen**

- 2002                      Praktikum bei der Solvay Arzneimittel GmbH, Hannover
- 2002                      Krankenpflegepraktikum in der Kardiologie und Nephrologie  
des Städt. Krankenhauses Hildesheim
- 2005                      Famulatur in der Kardiologie und Pulmonologie im  
Kreiskrankenhaus München-Pasing
- 2005                      Famulatur in der Gynäkologie in der Frauenklinik der  
Universität Heidelberg
- 2007                      Famulatur in der Anästhesie im Klinikum Großhadern der  
LMU München
- 2007                      Famulatur im Endokrinologikum München

**Praktisches Jahr**

- 2008                      Allgemeinchirurgie, John Radcliffe Hospital, Oxford,  
Großbritannien
- 2008                      Herzchirurgie, Texas Heart Institute, Houston, Texas, USA
- 2008                      Radiologie, Universitätsspital Zürich, Zürich, Schweiz
- 2008                      Innere Medizin, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der  
Universität München

**Stipendien**

- 2003 – 2009              Grundstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 2005 – 2007              Promotionsstudium des Programms zur Förderung von  
Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU München
- 2008                      Kurzstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes für  
das Praktische Jahr