

Aus dem Health Science Center der Tulane University in New Orleans,
Section of Cardiology
(Vorstand: Professor of Medicine Patrice Delafontaine, M.D., FACC, FAHA)

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. E. U. Alt

Vorgelegt über Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. J. Hirschberger
Medizinische Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Intrakoronare Applikation von autologen adulten Stammzellen aus dem
subkutanen Fettgewebe: Erste Erfahrungen mit einem Infarktmodell
beim Schwein**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Nadine Matthias
aus
Wolfenbüttel

München 2006

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

Tag der Promotion: 28. Juli 2006

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	4
2.1	Das Schwein als Infarktmodell in der Humanmedizin	4
2.1.1	Koronararterien	4
2.1.2	Versorgung des Herzens	7
2.1.3	Kollateralsystem	7
2.2	Herzinfarkt	10
2.2.1	Koronare Herzkrankheit	10
2.2.2	Myokardinfarkt	11
2.3	Stammzellen	16
2.3.1	Embryonale Stammzellen	16
2.3.2	Adulte Stammzellen	17
2.3.3	Applikation der Stammzellen	21
3.	Eigene Untersuchungen	23
3.1	Problemstellung und Zielsetzung	23
3.2	Versuchsablauf	24
3.3	Versuchdurchführung	27
3.4	Ergebnisse	43
3.4.1	Ergebnisse der Pilotstudie	43
3.4.2	Ergebnisse der Hauptstudie	44
4.	Diskussion	55
4.1	Material und Methoden	55
4.1.1	Das Schwein als Infarktmodell	55
4.1.2	Methodik der Infarktinduktion	56
4.1.3	Narkose	57
4.2	Eigene Ergebnisse	58
4.2.1	Überlebensrate	58
4.2.2	Pathologische und Immunhistologische Befunde	60
4.2.3	Die Identifikation der Stammzellen	62

4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	65
5.	Zusammenfassung	66
6.	Summary	68
7.	Anhang	70
7.1	Literaturverzeichnis	70
7.2	Abbildungsverzeichnis	83
7.3	Abkürzungsverzeichnis	84
7.4	Tabellenverzeichnis	85
8.	Danksagung	86

1. Einleitung

Der Myokardinfarkt mit seinen Komplikationen zählt heute mit 43% zu der führenden Todesursache in den westlichen Industrienationen. Allein in den USA erkrankten 13,2 Millionen Menschen an der Koronaren Herzkrankheit, davon erleiden 7,2 Millionen einen Myokardinfarkt (American Heart Association 2003). Die Therapieverfahren basieren überwiegend auf Maßnahmen, die das Ziel haben, das Infarktgebiet zu begrenzen und Infarktkomplikationen, wie Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz zu vermeiden. Mechanische Verfahren, wie Katheter und Stents dienen dazu, das verschlossene Gefäß wieder zu eröffnen und Stenosen zu beseitigen. Pharmakologische Maßnahmen bestehen aus Thrombolyse und herzentlastender Medikation. Die Komplikationen resultieren in strukturellen Umbauvorgängen, ein sogenanntes Remodelling des Herzens nach einem Infarkt. Hat sich ein „transmuraler“ Myokardinfarkt manifestiert, kommt es zu einer Schädigung des Myokards mit Untergang der Kardiomyozyten. Nur in begrenztem Umfang kommt es zu einer Regeneration durch teilungsfähige Vorläuferzellen (Beltrami et al. 2001). Die Infarktzone ist zentral nekrotisch und vernarbt. In Abhängigkeit von der Infarktgröße entwickelt sich über Monate und Jahre eine Dilatation des linken Ventrikels, die mit abnehmender Pumpleistung des Herzens einhergeht. Trotz sofortiger Revaskularisation mittels mechanischer Therapieform und medikamentöser Postinfarkttherapie, kann das myokardiale Remodelling nur bedingt vermindert werden. Das irreversibel geschädigte Myokard kann nicht ersetzt werden und es verbleibt eine Myokardnekrose. Daher geht die regenerative Forschung dahin, eine Reparatur und Regeneration des ischämisch geschädigten Myokards anzustreben. Mit einer Zelltherapie könnte eine Restitution erreicht werden durch eine Neogenese von Kardiomyozyten und Endothelzellen.

Die ersten Erfolge im Bereich der Zelltherapie konnten durch Transplantation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark bei Leukämiepatienten Ende der Fünfziger Jahre gezeigt werden. Thomas et al. (1957) standardisierten die Methode der Entnahme und Infusion von hämopoetischen Progenitoren aus dem Knochenmark und die Gruppe von

Mathé et al. (1963) beschrieben dies in einer Langzeitstudie bei einem Leukämiepatienten. Friedenstein et al. beschrieben 1988 Zellen aus dem Knochenmark, die eine plastische Adhärenz zeigen und die Fähigkeit besitzen, sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren. Die ersten Studien auf dem Gebiet der Neogenese zeigten Asahari et al. 1997, indem sie nachweisen konnten, dass sich endotheliale Progenitorzellen in vitro zu reifen Endothelzellen differenzieren. In einem weiteren Schritt gelang es ihm neu, diese Zellen in vivo ins ischämische Gewebe zu inkorporieren, und es kommt zu einer Induktion der Angiogenese in dem geschädigten Bereich. In weiteren Studien zeigten Jackson et al. (2001), dass endotheliale Vorläuferzellen direkt an der Reparatur des geschädigten Myokards nach einem Infarkt beteiligt sind.

Thompson et al. isolierten 1998 humane Zellen mit den pluripotenten Eigenschaften von embryonalen Stammzellen. Kehat et al. (2001) gelang die Kultivierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Zellen. Dies ermöglichte neue Wege der Stammzelltherapie in der klinischen Anwendung, geschädigtes Gewebe wieder zu regenerieren. Der Nachteil erwies sich in ihrer Immunreaktion, eventuellen Karzinogenität und ethischer Problematik. Daher gingen die Bemühungen zu erforschen, ob adulte Stammzellen das gleiche Potential aufweisen. Erstmals wurde dies von Makino et al. (1999) berichtet. Es konnten aus dem Knochenmark multipotente Stammzellen identifiziert werden, welche das Potential besitzen, sich in verschiedene Gewebe, wie Knochen, Knorpel, Fett, Skelettmuskulatur sowie Herzmuskel zu differenzieren.

Orlic et al. publizierten 2001 die Regeneration von ischämisch geschädigten Myokard durch die Applikation von Stammzellen aus dem Knochenmark im Mausmodell. Es wurden seitdem viele Forschungen in dieser Richtung unternommen, die jedoch zu unterschiedlichen Schlussfolgerungen kamen, was eine Etablierung dieser Therapieform schwierig macht.

Eine zusätzliche Quelle zum Knochenmark sind Stammzellen aus dem subkutanen Fettgewebe. Sie besitzen das Potential, sich in verschiedene Zelltypen wie auch Kardiomyozyten zu differenzieren (Zuk et al. 2001, Planat-Bernard et al. 2003). Der entscheidende Vorteil ist die leichtere Verfügbarkeit, die subkutanes Fettgewebe hat.

Bisher gibt es noch keine Untersuchung zum Einsatz von Stammzellen aus dem subkutanen Fettgewebe im Grosstiermodell.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welchen Effekt Stammzellen aus dem subkutanen Fettgewebe auf das ischämisch geschädigte Myokard nach einem Infarkt in einem Tiermodell, dem Schwein, das dem Menschen hinsichtlich seiner kardiovaskulären Strukturen sehr ähnlich ist, haben.

2. Schrifttum

2.1 Das Schwein als Infarktmodell in der Humanmedizin

Das Schwein hat in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung als Tiermodell im kardiovaskulären Bereich der Humanmedizin aufgrund seiner anatomischen und physiologischen Ähnlichkeit zum menschlichen Herzen zugenommen (Swindle et al. 1984-1988). Im Vergleich zum Hund, der zuvor sehr lange als Tiermodell in kardiovaskulären Studien gedient hatte, besitzt das Schwein ein Koronarsystem mit weniger ausgebildeten Kollateralen und Anastomosen (White et al. 1986, Maxwell et al. 1997, Schaper et al. 1967). Die physiologische Funktion hinsichtlich der koronaren Blutversorgung des Myokards als auch das Erregungsleitungssystem zeigen viele Parallelen (Hughes et al. 1986). Bharati et al. (1991) kamen nach näheren Untersuchungen des Erregungsleitungssystems zum Schluss, dass das Schwein einige Differenzen aufweist und für Studien über den plötzlichen Herztod und Herzrhythmusstörungen mit Vorsicht betrachtet werden muss. Parameter wie Herzfrequenz, Herzgröße und Verhältnis zum Körpergewicht entsprechen bei einem 25-30kg Schwein gegenüber anderen Spezies dem Menschen am ehesten: Die Herzfrequenz beim Schwein sind 60-120 Schläge pro Minute, beim Menschen 70-80 Schläge pro Minute (Bollen et al. 1999, Silbernagl et al. 1998). Das Verhältnis Herz zum Körpergewicht liegt bei beiden Spezies bei 0,5%.

2.1.1 Koronararterien

Die Koronararterien entspringen aus der Aorta direkt nach der Aortenklappe und umgehen das Herz kranzförmig, um den Herzmuskel mit Blut zu versorgen. Es gibt eine linke und rechte Koronararterie, die A. coronaria sinistra und die A. coronaria dextra.

Die linke Koronararterie (LCA) verläuft beim Schwein und Menschen als Truncus communis zwischen dem Conus arteriosus und linken Herzohr und teilt sich nach etwa 1 cm in den R. circumflexus und den R. interventricularis paraconalis.

Beim Menschen ist die Bezeichnung R. interventricularis anterior oder left anterior descending (LAD). Die LAD verläuft kaudal im Sulcus interventricularis anterior bzw. paraconalis bis zur Herzspitze und gibt weitere Seitenäste ab, die als Septaläste bezeichnet werden. Beim Schwein spricht man vom R. collateralis prox. und R. collateralis dist., beim Menschen ist es der R. lateralis prox. und dist. (Schummer et al. 1984, Feneis et al. 2000). Für die Koronarangiographie wird die LAD in drei Abschnitten unterschieden: 1. proximaler Abschnitt bis zum Abgang des R. lateralis prox., 2. mittlerer Abschnitt zwischen R. lateralis prox. und dist. und 3. distales Drittel ab Abgang des R. lateralis dist. (Winkhardt et al. 2005). Der R. circumflexus (LCX-left circumflex artery) verläuft im Sulcus coronarius fast immer posterior. Im proximalen Abschnitt zweigt beim Schwein als erstes der R. prox. ventriculi sin. ab, beim Menschen ist es der R. marginalis. Die LCX nimmt ihren Verlauf zum kaudalen Rand des Herzens und verzweigt sich in weitere Äste, die zum linken Ventrikel und Vorhof ziehen (Schummer et al. 1984, Feneis et al. 2000, Winkhardt et al. 2005).

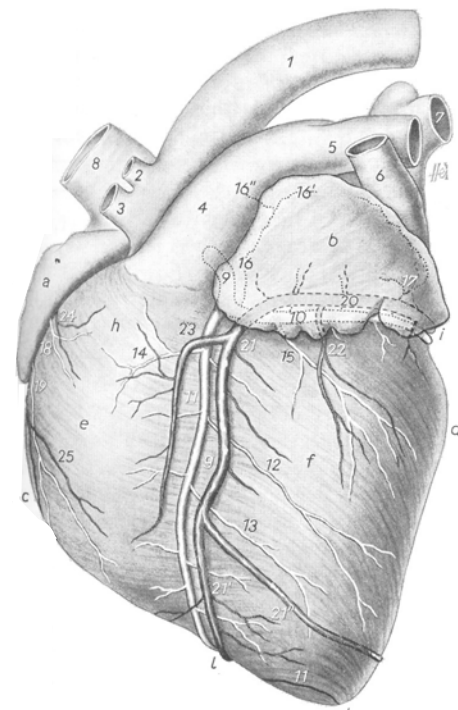


Abb.1: Koronararterien eines Schweineherzens
(aus Schummer und Habermehl, 1984)

- a. rechtes Herzohr; b. Linkes Herzohr; c. Margo ventricularis dext.; d. Margo ventricularis sin.; e. Ventriculus sin.; g. Sulcus interventricularis paraconalis; h. Conus arteriosus; i. Sulcus coronarius sin.; k. Apex cordis; l. Incisura apicis
1. Arcus aorta; 2. A.subclavia sin.; 3. A.brachiocephalica; 4. Truncus pulmonalis; 5. A.pulmonalis sin.; 6. V.azygos sin.; 7.linke Lungenvenen; 8. V.cava cran.; 9. A.coronaria sin.; 10. ihr R.circumflexus; 11. R.interventricularis paraconalis; 12. R.collateralis prox.; 13. R.collateralis dist.; 14. A.coni arteriosi; 15. R.prox.ventriculi sin.; 16. R.prox.atrui sin.; 17. R.intermed. atrii sin.; 18. A.coni arteriosi der A.coronaria dext.; 19. R.prox.ventriculi dex.; 20 21 V. cordis magna, 20. ihr R.circumflexus, 21. ihr R.interventricularis paraconalis; 22. V.ventriculi sin.; 23. Begleitast d. R.interventricularis paraconalis d. V.cordis magna; 24. V.coniarteriosi; 25.R.ventricularis dext. der V.semicircumflexa dext.

Schummer (1984) und Barone (1996) beschreiben einen weiteren Ast, die A. coni arteriosi, die im oberen Part der LAD entspringt, die zum Conus arteriosus des rechten Ventrikels ziehen. Das Auftreten dieser Arterie tritt beim Schwein weniger, beim Menschen viel häufiger auf (Rodrigues et al. 2005).

Die rechte Koronararterie läuft zwischen Conus arteriosus und rechtem Herzohr zum rechten Abschnitt des Sulcus coronarius. Im proximalen Teil zweigt beim Schwein der R. marginis

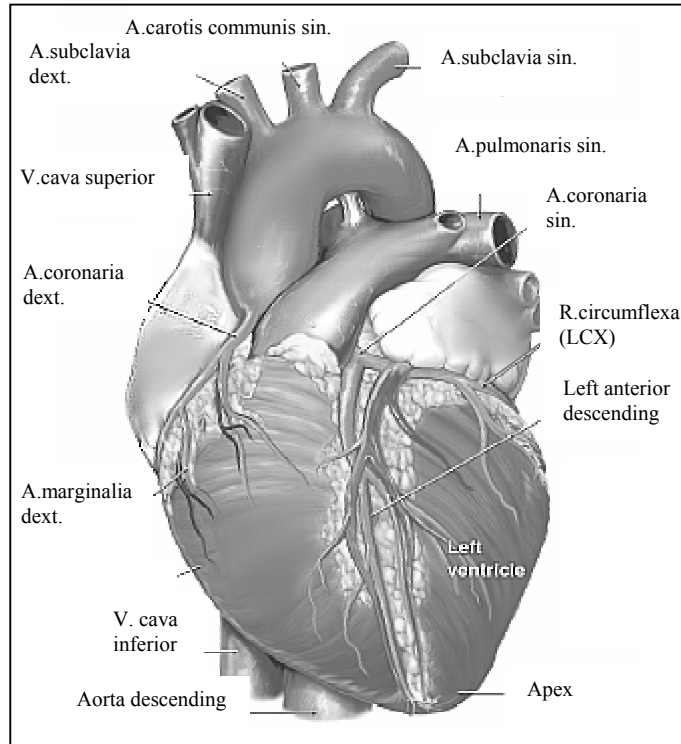


Abb.2: Koronararterien des Herzens beim Menschen

ventricularis dext. ab, bevor er als R. circumflexus bis zur Fazie subsinuosa zieht. Weitere kleinere Abzweigungen gehen zum Ventrikel und Vorhof ab und der R. circumflexus verläuft vom Sulcus coronarius in den Sulcus interventricularis subsinuosus als R. interventricularis subsinuosus und zieht bis zur Herzspitze hinunter (Schummer et al. 1984). Dort gibt er Septaläste ab, die beim Schwein kürzer und schwächer ausgebildet sind als beim Menschen (Rodrigues et al. 2005). Beim Menschen ist der Verlauf der rechten Koronararterie sehr ähnlich. Im proximalen Teil gehen Abzweigung zum Sinusknoten und als R. atriales zum Vorhof ab. Im weiteren Verlauf des Sulcus coronarius teilt diese sich unter vorherige Abzweigung des R. marginalis dext. in den R. posterolateralis, der im Sulcus coronarius folgt, und in den R. interventrikularis posterior, der im Sulcus interventricularis posterior bis zur Herzspitze folgt (Feneis et al. 2000, Winkhardt et al. 2005).

2.1.2 Versorgung des Herzens

Die linke Koronararterie ist für die Versorgung des linken Vorhofs, des linken Ventrikels zuständig und übernimmt einen Großanteil des Septums interventrikulare und einen Teil der Vorderwand des rechten Ventrikels. Die LAD versorgt mit 49% den linken Ventrikel, mit 27,6% den rechten Ventrikel und mit 58% des Septum interventrikulare. Die LCX übernimmt mit 25,5% die Versorgung des linken Ventrikels. Die rechte Koronararterie versorgt den rechten Vorhof, den rechten Ventrikel und den hinteren Teil des Septum interventrikular (42%). Das Erregungsleitungssystem wird von der rechten Koronararterie versorgt (Weaver et al. 1986). Wenn die LAD Teile der Hinterwand des rechten Ventrikels und des Erregungsleitungssystems übernimmt, wird vom Linksversorgertyp gesprochen. Breitet die rechte Koronararterie mit seinem R. interventrikulare posterior bzw. subsinuus sich auf den linken Ventrikel aus, handelt es sich um einen Rechtsversorgertyp. Beim Menschen und Schwein sind beide Koronararterien zu gleichen Teilen ausgebildet (Intermediärtyp) (Schummer et al. 1984).

2.1.3 Kollateralsystem

Kollaterale sind kleine Blutgefäße, die bei Verschluss eines Hauptastes die Blutversorgung über Umwegen übernehmen und größer werden (Allwork et al. 1987). Im Vergleich zum Hund ist das Kollateralsystem beim Schwein ähnlich dem Menschen sowohl in seiner Anzahl als auch Ausbildung weniger stark entwickelt. Es wird bei den Kollateralen am Herzen in zwei Gruppen unterschieden. Die eine sind die extrakardialen Kollateralen, diese versorgen die epikardiale Region, die zweite sind die Intrakoronaren und sind myokardial und endokardial lokalisiert (Schaper et al. 1967, Bloor et al. 1965). Die extrakardialen Kollateralen kommen beim Schwein in geringer Anzahl vor und verlaufen zwischen A. bronchialis, A. internal mammaria und R. retrokardialis. Sie verbinden diese und das Perikard miteinander.

In ihrer Ausprägung erreicht ihre Wanddickenstärke nur 80 % im Vergleich zu den normalen Ateriolen, die Entwicklung von Endothel und Muskelgewebe ist sehr gering ausgeprägt (White et al. 1992).

Die intrakoronaren Kollateralen sind in ihrer Entwicklung noch schwächer und kleiner als die Extrakardialen und ihre Wanddickenstärke erreicht nur 50-70% (White et al. 1992). Ursache ist ihre innere Lokalisation im Myokard. Dort limitiert der Ventrikeldruck und erhöhte enddiastolische Druck den Koronarfluss und damit auch die Ausbildung der Kollateralgefäße (Russell et al. 1977). White and Bloor et al. beschreiben den Verlauf der intrakoronaren Kollateralen zwischen den Seitenästen der LAD und LCX. Schaper et al. beschrieb diesen Verlauf der Kollateralen zwischen LAD und LCX, die besonders oberhalb der Papillarmuskeln entlangziehen (Schaper et al. 1967). Rodrigues et al. beschreiben in ihrer neuen Studie Kollateralen am linken Ventrikel, die von linken Ventrikelästen der LCX über den subatrialen Papillarmuskel zu den rechten Septalästen der LAD ziehen. Des Weiteren ziehen Kollateralen am Papillarmuskel major des rechten Ventrikels von den rechten Ventrikelästen der rechten Koronararterie zum Trabekelast der linken Koronararterie. Eine weitere Verbindung beschreibt er zwischen dem atrioventrikulären Ast der rechten Koronararterie und den Trabekelästen und interventrikulären Ästen der linken Koronararterie, die zum Septum verlaufen. Auch er beschreibt die Ausbildung der Kollateralen als sehr dünne Gefäße und gering in ihrer Anzahl.

Die Entwicklung der Kollateralen erreicht nach 8 Wochen ihren Höhepunkt (White et al. 1992) und kann durch körperliches Training oder Pharmaka beschleunigt werden (Bloor et al. 1984, White et al. 1989, 1998).

Im menschlichen Myokard findet sich ein Netzwerk von funktionellen Kollateralen. Sie sind hauptsächlich intrakoronar im Endokardium und Myokardium lokalisiert (Cohen et al. 1985). Extrakardiale Kollateralen sind weniger ausgebildet, sind aber postmortem und in Angiographien nachgewiesen worden (James et al. 1961). In ihrer Ausprägung sind diese kleiner und zeigen eine Schwäche an Muskelgewebe ähnlich wie beim Schwein (Bloor et al. 1965).

Das Netzwerk an Kollateralen, vorwiegend intrakoronare, führen sowohl durch ihre verminderte Anzahl, ihrer verminderten Größe hinsichtlich Wanddicke und Durchmesser zu einem verminderten Koronarfluss. Die Versorgung des betreffenden Myokards kann nicht in gleichem Umfang wieder hergestellt werden. Daher ist die Induzierung, Häufigkeit und Ausbreitung eines Infarktes im Gegensatz zum Hund stärker und mit dem Menschen vergleichbar.

Die wichtigsten anatomischen Ähnlichkeiten kurz zusammengefasst:

- Versorgung des Myokards über LCA ist dominanter gegenüber der RCA
- Ursprung aus der Aorta und Verlauf von LCA und RCA ist gleich
- Die LCA ist sehr kurz und teilt sich in LAD und LCX, diese gibt Äste an linken Ventrikel und Vorhof ab
- LAD gibt Septaläste ab
- Die RCA versorgt hauptsächlich rechten Vorhof und Ventrikel
- Kollateralen sind wenig ausgebildet und verlaufen meist intrakoronar

2.2 Herzinfarkt

2.2.1 Koronare Herzkrankheit (KHK)

Die koronare Herzkrankheit ist eine Erkrankung der Herzkranzgefäße. Darunter ist die Atherosklerose zu verstehen, die eine Ablagerung und Einengung der Koronargefäße darstellt. Ausgangspunkt ist eine initiale Läsion des Endothels, die besonders in Bereichen vorkommt, die einem erhöhten Druck ausgesetzt sind. Es kommt zu einer lokalen Entzündung in diesem Bereich mit einer erhöhten Permeabilität des Endothels und somit zu einer „Dysfunktion des Endothels“ (Ross et al. 1999). Die weitere Migration von Leukozyten, Makrophagen und Lipiden in die Intima führten zur Bildung von Schwammzellen und geben ihr ein fettiges Aussehen, die sogenannte „Fatty streaks“ (Ross et al. 1999). Es wird durch die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen eine extrazelluläre Matrix in der Intima gebildet. Es kommt zur Verdickung der Intima, die Versorgung der Zellen ist nicht mehr gewährleistet und führt zum Zelltod mit Ablagerung von Lipiden. Diese lagern sich mit nekrotischem Zellmaterial extrazellulär ab und formen einen nekrotischen Kern, der wie ein Fremdkörperreiz wirkt und eine Verstärkung der Entzündung und Ausschüttung von Mediatoren nach sich zieht. Es entsteht ein „fibrinöser Plaque“, der aus Kollagen, Myofibroblasten, Lipiden, abgestorbenem Zellmaterial besteht. Diese Plaques bewirken eine stenotische Veränderung innerhalb des Gefäßes, die Blutzufuhr und damit auch die Sauerstoffversorgung ist reduziert. Unter Belastung kann es unter diesen Umständen zu relativen Ischämien kommen. Nimmt die Gefäßobstruktion weiter zu, verlangsamt sich der Blutstrom bis zur Stase und eine totale Ischämie ist in diesem Bereich die Folge. Die Umbauvorgänge innerhalb des Plaques einerseits und die Scherkräfte, die auf ihn einwirken, andererseits bewirken eine Instabilität und Möglichkeit einer Ruptur. Ist dieser Plaque rupturiert, folgen weiterer Thrombozytenaggregationen, und die Gefahr eines totalen Gefäßverschlusses mit Infarzierung der abgehenden Gefäßregion ist sehr hoch (Ross et al. 1999).

In Abhängigkeit der Gefäßobstruktion und der damit verminderten Blutversorgung kommt es zu folgenden Komplikationen:

- Angina Pectoris
- Arrhythmien
- Myokardinfarkt

Die Angina Pectoris ist das Leitsymptom der KHK und äußert sich als ein Schmerzempfinden und Engegefühl in der Brustgegend, ausgelöst durch die Minderdurchblutung im Herzen. Diese tritt besonders unter körperlicher oder seelischer Belastung auf. Die instabile Angina Pectoris tritt auf deutlich niedrigerem Belastungsniveau oder in Ruhe auf. Die Hauptkomplikation besteht in der Entwicklung eines Myokardinfarktes, dieser tritt auf, wenn aus einem noch nicht verschliessenden Thrombus sich ein intrakoronarer Verschluss entwickelt (Terres et al. 2001).

2.2.2 Myokardinfarkt

Unter einem Myokardinfarkt ist eine Koagulationsnekrose von Herzmuskelzellen zu verstehen, die durch eine anhaltende Durchblutungsstörung der Koronararterien entsteht. Ursache ist in den meisten Fällen eine Atherosklerose der Koronargefäße. Die Myokardperfusion ist soweit reduziert, dass das Angebot an Sauerstoff und Nährstoffen den Bedarf des Herzens nicht mehr deckt und es zu einem irreversiblen Zelltod der Kardiomyozyten führt (American Heart Association 2003). Die folgenden Auswirkungen auf die Ischämie verlaufen in verschiedenen Prozessen ab und münden in Umbauvorgängen, das sogenannte Remodelling. Diese spielen sich auf verschiedenen Ebenen ab, die in Form, makroskopischer Struktur und histologischen Aufbau des Herzens erkennbar sind (Pfeffer et al. 1990, Jugdutt et al. 1993, 2003). Die Ausbildung des Remodelling des Herzens ist abhängig von der Länge und Lokalisation der Infarktes (Pfeffer et al. 1990).

Akute Ischämie

Aufgrund des geringen Sauerstoffgehaltes kommt es zur Abnahme der ATP-Produktion in den Mitochondrien und zu einer Zunahme des anaeroben Energiestoffwechsels. Veränderungen des Zellmilieus und der Transportvorgänge innerhalb des Kardiomyozyten sind die Folge. Die Hemmung der Na/K-ATPase führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Na^+ und zu einem verstärktem K^+ Ausstrom. Folge sind einerseits Arrhythmien durch den veränderten Kaliumspiegel und andererseits kommt es zu einem verstärkten Wassereinstrom infolge des erhöhten intrazellulären Na^+ und Cl^- -Ionen, was nachhaltig zu einer Schwellung der Zelle führt (Buja et al. 2005, Jennings et al. 1991).

In einem weiteren Stadium kommt es zu einer irreversiblen Zellschädigung. Durch die Zunahme des anaeroben Stoffwechsels werden Proteasen und Phospholipasen aktiviert, diese resultieren in einer Schädigung des Zytoskeletts und der Zellmembran und damit zur Instabilität der Zelle. Veränderung des Ca^{2+} - Spiegels führen weiterhin zum Verlust von kontraktile Strukturen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Akkumulation von Stoffwechselendprodukten, Radikalbildungen und Aktivierung von Peroxidasen, die zur Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran führen. Schließlich kommt es zu einem Zerreißen der Membran und somit zu einer irreversiblen Zerstörung des Kardiomyozyten (Buja et al. 2005).

Mikroskopisch sind die irreversiblen Veränderungen bereits nach 30-60 min. sichtbar. Die Mitochondrien sind geschwollen und zeigen eine Fragmentierung der Cristae. Innerhalb der mitochondrialen Matrix erscheinen amorphe Körperchen, die im Zentrum des Infarktes am ehesten auf Ausfällungen von Lipiden und Proteinen zurückzuführen sind. In der Peripherie des Infarktes handelt es sich dagegen eher um Kalziumphosphat-Ausfällungen. Das Zellkernchromatin ist marginalisiert. Die Myofibrillen sind peripher als kontraktile Banden sichtbar, zentral sind diese entspannt und vergleichbar mit denen im gesunden Myokard (Buja et al. 2005, Jennings et al. 1990). Die Ausbreitung des Infarktes erfolgt

von subendokardial zu subepikardial und ist meist nach 3-4 std. abgeschlossen (Reimer et al. 1977).

Die Komplikationen während der ischämischen Phase sind aufgrund der veränderten elektrophysiologischen Vorgänge akute Arrhythmien (Ramaswamy et al. 2000). Durch den Verlust von kontraktilen Strukturen kommt es im weiteren Verlauf zur Einschränkung der ventrikulären Funktion. Das Herz ist in seiner Kontraktionsfähigkeit im Infarktgebiet in der Systole eingeschränkt mit der Folge eines verminderten Herzzeitvolumens und Herabsetzung der gesamten Leistungsfähigkeit (Bogen et al. 1980).

Nekrose

Die nekrotische Phase schließt sich der akuten Ischämie direkt an. Diese beginnt einige Stunden nach der akut einsetzenden Ischämie und endet, wenn Fibroblasten und gesundes Kollagengewebe beginnen, das Infarktgebiet zu ersetzen. Beim Menschen dauert diese Phase 7 Tage (Holmes et al. 2005, Fishbein et al. 1978).

Makroskopische Veränderungen sind nach 8-12 Std. sichtbar. Der nekrotische Bereich hebt sich gegenüber dem gesunden Gewebe durch eine Abblässung und lehmigelbe Verfärbung ab. Die Randzone ist durch einen roten, hyperämischen Saum demarkiert.

Die nekrotisch veränderten Myozyten zeigen ein intrazelluläres Ödem und eine Veränderung des Zellkernes, die "Karyolyse" (Buja et al. 2005). Auf histologische Ebene finden sich in diesem Stadium viele Entzündungszellen, wie Monozyten und Makrophagen, die die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (TGF- β 1) ankurbeln (Jugdutt et al. 1993). Diese sind für die Fibrosierung und die Expression von Kollagen verantwortlich, die sich ab dem vierten Tag in Form von Fibroblasten und Kollagenfasern (Typ I und III) im Infarktgewebe zu finden sind (Jugdutt et al. 1996).

Die Hauptkomplikation während dieser Zeit zeichnet sich in der Gefahr von einer Infarktruptur ab. Dadurch, dass es sich um nekrotisches Gewebe handelt und noch nicht durch Kollagenfasern ersetzt worden ist, ist dieser Bereich sehr brüchig in seiner Beschaffenheit (Wehrens et al. 2004). Das Infarktgebiet ist dilatiert, die Kontraktilität

nimmt ab und limitiert die Dehnungsfähigkeit des Herzens, was zu einer Belastung auf die Ventrikelwand führt. Gleichzeitig hypertrophiert das gesunde Myokard und nach dem Laplace-Gesetz führt diese zu einer Abnahme des „Wandstress“. Eine Kompensation des Herzens ist dadurch über längere Zeit noch möglich (Gaudron et al. 1992).

Fibrotische Phase

Nach etwa einer Woche beginnen Fibroblasten und kollagene Fasern das infarzierte Myokard zu ersetzen (Holmes et al. 2005, Fishbein et al. 1978). Diese bilden eine dreidimensionale Struktur aus und führen zur Verstärkung der myokardialen Infarktnarbe (Holmes et al. 1997). Dadurch nimmt die Compliance des Ventrikels ab und resultiert in einer verminderten enddiastolischen Füllung und limitierten systolischen Kontraktion, die schließlich zu einer Abnahme des Herzzeitvolumens mündet (Bogen et al. 1980).

Makroskopisch ist neben in der Randzone der Nekrose dunkelrotes bis bräunliches Granulationsgewebe zu sehen, dass nach zwei Wochen einsinkt. Später ist dies als weißliches Narbengewebe zu sehen.

Remodelling

Auf längere Sicht führen die Beeinträchtigung der Diastole und Systole und die damit verbundene Volumenbelastung zu Umbauvorgängen im linken Ventrikel. Die Belastung auf die Ventrikelwand nimmt zu und resultiert in einer Dilatation des Ventrikels. Es wird anfangs weniger eine Vergrößerung beobachtet, sondern es entwickelt sich eine Veränderung des Querschnittes (Linzbach et al. 1960). Der normale Ventrikel hat eine ellipsiale Form, diese geht nun in eine rundliche Formation. Die Folge ist, dass sich der Druck auf die Wand insbesondere im Bereich, wo sich die kurzen Achsen der Ellipsenform verlängert haben, weiter verstärkt. Das enddiastolische Volumen nimmt weiter zu, die Belastung auf die Ventrikelwand führen zu den weiteren mechanischen Umbauvorgängen. Die Wanddicke nimmt ab, es kommt zur Überdehnung mit weiterer Dilatation. Eine erhöhte Nachlast und ein verringertes Herzzeitvolumen sind die Folge.

Der enddiastolische Druck wirkt sich auf die subendokardiale Perfusion aus. Phasenweise Hypoperfusion reduziert weiter die Pumpfunktion (Douglas und Mann et al. 2005).

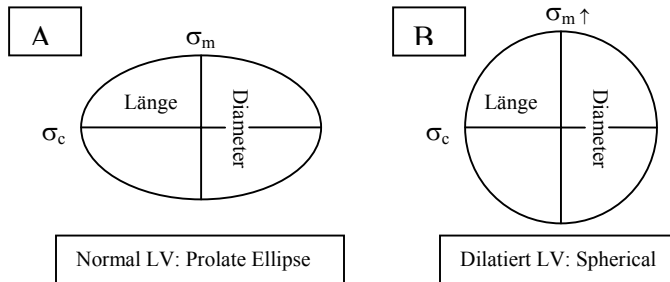


Abb.3.: Vergleich der Ventrikelform zwischen gesundem Ventrikel und dilatierten Ventrikel und die unterschiedliche Belastung auf die Ventrikelwand

Zusätzlich sind strukturelle Umbauvorgänge, wie weiterer Myozytenverlust und Bindegewebszunahme auch im nichtinfarzierten Myokard mit für das Remodelling verantwortlich (Beltrami et al. 1994). Die erhöhte Wandspannung führt neben Aktivierung des Angiotensinssystems über Genexpression zur Proliferation von Fibroblasten und Myozyten (Puri et al. 1995). Es kommt überwiegend zur Proliferation von Bindegewebe, das in Form von Hyperplasie von Fibroblasten mit Neubildung von Kollagen gekennzeichnet ist. Morphologisch ist die „reaktive“ Fibrose im nichtinfarzierten Gewebe von der „reparativen“ Fibrose im Infarkt zu unterscheiden. Die Compliance des Ventrikels nimmt durch diese Strukturveränderung ab und schwächt die Kontraktilität. Dystolische Dysfunktion, Volumenüberlastung des linken Ventrikels resultieren in eine Dilatation des linken Ventrikels (Weber et al. 1997).

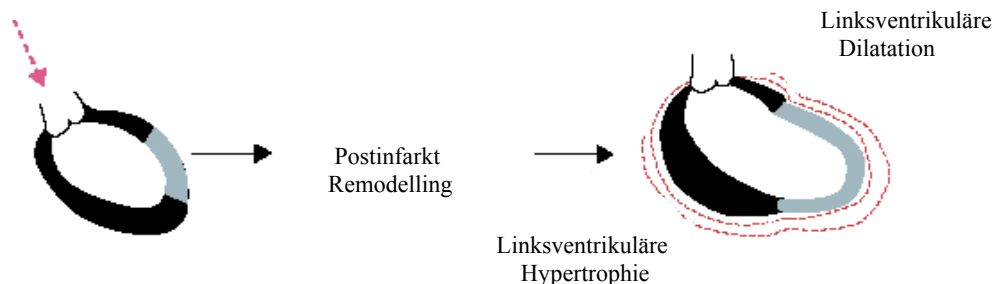


Abb.4: Remodelling, Postinfarkt

2.3 Stammzellen

Stammzellen sind noch nicht ausdifferenzierte Zellen, deren Entwicklung noch nicht festgelegt ist und die sich in die unterschiedlichsten Organgewebe differenzieren können (prospektive Potenz). Sie können sich einmal beliebig vermehren („Self renewal“) und dabei ihre Multipotenz beibehalten, zum anderen können sie sich unter dem Einfluss verschiedenster Faktoren (Wachstumsfaktoren, genetische Faktoren, Nährstoffe und noch unbekannte Faktoren) des Umgebungsmilieus zu verschiedenen Organzellen und Gewebe differenzieren, wobei es durch Zunahme der Differenzierung zur Abnahme der Potenz kommt (Pschyrembel 2003).

2.3.1 Embryonale Stammzellen

Unter embryonalen Stammzellen sind die Zellen zu verstehen, die aus Blastozysten gewonnen werden und noch nicht ausdifferenziert sind (Martin et al. 1981, Evans et al. 1981, Thomson et al. 1998). Den ersten Schritt in dieser Forschung erreichten Martin et al. 1981, indem aus einem Mausembryo Stammzellen isoliert und identifiziert werden konnten. Es erfolgten weitere Bestrebungen in dieser Richtung, die Isolation von primaten (Thomson et al. 1995) und humanen (Thomson et al. 1998) Blastozysten ermöglichten neue Wege in der regenerativen Medizin. Die Zellen zeigen in vitro ein großes Potential sich in verschiedene Zelltypen, wie Osteoblasten, Hepatozyten, Neuronen, Hämopoetische Progenitorzellen und auch Herzmuskelzellen zu differenzieren (Odorico et al. 2001, Cowan et al. 2004). Weiter lassen sich diese Zellen kultivieren, es konnten verschiedene Stammzelllinien etabliert werden (Kehat et al. 2001). Einen entscheidenden Nachteil erweist sich in einer heftigen Immunreaktion, die sie bei Inkorporation in das fremde, geschädigte Gewebe auslösen können. Dies kann durch Kerntransfer von somatischen Zellen, einer Technik, die unlängst beschrieben wurde, aufgehoben werden (Tada et al. 2001). Ein weiteres Problem erweist sich in ihrer potentiellen Karzinogenität (Thomson et al. 1998). Auch besitzen diese Zellen ein

Potential Arrhythmien auszulösen nach intramyokardialer Transplantation, was die Probleme nach einem Infarkt eher komplizieren (Zhang et al. 2002).

2.3.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen lassen sich aus vollentwickelten Geweben, wie das Knochenmark isolieren. Eine ethische Problematik besteht bei den adulten Stammzellen nicht. Sie besitzen ein hohes Potential sich in verschiedene Zelllinien zu differenzieren und eignen sich für Regeneration und Reparatur von geschädigtem oder degeneriertem Gewebe. Ein entscheidender Vorteil erweist sich, da es sich um autologe Zellen handelt, es zu keiner Immunreaktion bei Applikation in das betreffende Gewebe kommt (Strauer et al. 2001).

Endotheliale Progenitoren

Endotheliale Progenitoren (Angioblasten) kommen im peripheren Blut insbesondere im Nabelschnurblut und im Knochenmark vor. Ihre Differenzierungsfähigkeit zu reifen Endothelzellen konnte in vitro und in vivo bewiesen werden (Asahara et al. 1997). Sie eignen sich zur therapeutischen Angiogenese, indem sie an der Bildung von neuen Blutgefäßen in ischämischen Gebieten direkt beteiligt sind. Indirekt verhindert die Neoangiogenese die Apoptose hypertrophierter Myozyten im Perinfarktareal und trägt zu einer signifikanten Reduktion von Kollagenablagerungen und somit zu einer anhaltenden Verbesserung der Herzfunktion bei (Kocher et al. 2001). In weiteren Studien konnte bewiesen werden, dass injizierte Zellen aus dem Knochenmark sich nicht nur in Endothelzellen weiterentwickelten und die Angiogenese verbesserten, sondern es konnten auch in geringem Ausmaß Kardiomyozyten gefunden werden (Jackson et al. 2001).

Physiologisch werden bei einer Ischämie im Rahmen eines von der Natur angelegten Reparatursystems Progenitorzellen aus dem Knochenmark durch die Bildung von Botenstoffen (VEGF: vascular epithelial growth factor) mobilisiert (Gill et al. 2001). Im

ischämischen Gewebe werden Rezeptoren und Mediatoren exprimiert, welche die Adhäsion, Migration und Differenzierung steuern (Liesveld et al. 2001). Dieses Reparatursystem ist jedoch nur für kleine Verletzungen ausgelegt und die physiologische Kapazität ist bei einem Myokardinfarkt überfordert. Durch die Gabe externer Progenitorzellen in das Infarktgebiet könnten diese Reparaturmechanismen verstärkt werden. In der TOPCARE-AMI-Studie wurde die Wirkung von zirkulierenden Endothelvorläuferzellen bei Patienten nach direkter intrakoronarer Injektion mit akutem Herzinfarkt evaluiert und ein positiver Effekt auf das Remodelling festgestellt werden (Schächinger et al. 2004). Problem bei diesen Stammzellen ist die geringe Verfügbarkeit und andererseits ist ungeklärt, wie die besten Progenitorzellen identifiziert werden sollen, da klassische Oberflächenmarker nicht sicher mit den tatsächlichen Progenitorfunktionen der Zellen korrelieren. Um den Effekt dieser Zellen hinsichtlich Differenzierung, Mobilisierung, Migration zu verstärken, könnte dies durch begleitende Pharmakotherapien geschehen.

Stammzellen aus dem Knochenmark (MSC)

Stammzellen aus dem Knochenmark zeigen in vitro ein großes Potential sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren (Pitinger et al. 1999). Neben Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten konnte bewiesen werden, dass sie sich auch in Kardiomyozyten weiterentwickeln können (Makino et al. 1999). In vivo gelangen es Liechty et al. 2000 ihr Differenzierungspotential in Kardiomyozyten an einem Schafmodell zu beweisen. Nach Transplantation von mesenchymalen Stammzellen (MSC) in utero entwickelten diese sich weiter in Chondrozyten, Osteozyten, Adipozyten, Myozyten und Kardiomyozyten.

Die Fähigkeit zur Regeneration im ischämischen geschädigten Myokard wurden 2001 von Orlic et al. erstmals beschrieben. Sie isolierten autologe Knochenmarksstammzellen über CD117 und injizierten diese 3-5 Stunden nach Verschluss der LAD beim Mausmodell in das Periinfarktareal. Es kam zu einer deutlichen Verbesserung der

Herzfunktion, neben Endothelzellen, glatte Muskelzellen konnten auch Kardiomyozyten im Infarktareal nachgewiesen werden (Orlic et al. 2001). Seitdem folgten weitere Studien in diese Richtung: Ihre Fähigkeit zur therapeutischen Angiogenese im ischämischen Bezirk, ihre Auswirkung auf die Perfusion (Al-Khaldi et al. 2003) und auf die Herzfunktion (Nagaya et al. 2005) konnte von anderen bestätigt werden. Damit die injizierten Knochenmarkstammzellen nicht wieder ins Knochenmark zurück wandern, sondern in das Infarktgebiet integrieren, werden diese durch Signalstoffe im ischämischen Myokard aktiviert. Diese migrieren und differenzieren sich weiter (Bittira et al. 2003).

Strauer et al. führten 2002 in einer nicht randomisierten Studie die Applikation von Stammzellen aus dem Knochenmark nach einem Myokardinfarkt erstmals beim Menschen durch. Nach drei Wochen kam es zu einer signifikanten Verbesserung der Herzfunktion. Die Infarktgröße reduzierte sich um 30%, die Wandbewegungsgeschwindigkeit verdoppelte sich und die Perfusion verbesserte sich signifikant.

Stammzellen aus subkutanem Fettgewebe (ADC)

Eine weitere Quelle zur Gewinnung von Stammzellen ist subkutanes Fettgewebe. Im Vergleich zu Stammzellen aus dem Knochenmark lassen sich Zellen aus dem subkutanen Fettgewebe (Adipose tissue derived stromal cells – ADC) viel leichter entnehmen. Die Gewinnung aus dem Knochenmark ist generell mit 40ml und 1.2×10^9 Zellen limitiert. Eine weitere Zunahme des Volumens, um eine adäquate therapeutische Dosis zu erhalten, ist aus folgenden Gründen schwierig. Einmal kommt es bei größeren Volumina zu einer stärkeren Verdünnung der Stammzellfraktion durch einen höheren Anteil an stammzellfreiem Blut (Bacigalupo et al. 1992) und weiterhin ist die Morbidität erhöht (Strem et al. 2005). Um eine therapeutische Menge zu erhalten, ist somit eine weitere Kultivierung notwendig. Dagegen sind aus dem Fettgewebe leicht Mengen bis zu 200ml zu gewinnen, diese erhalten pro 100ml Lipoaspirat 2×10^8 Zellen. Daraus ergeben sich

1×10^6 Stammzellen, was fast 40mal soviel ist, wie aus einem 40ml Knochenaspirat (Aust et al. 2004).

Weiterhin ähneln sich beide Zelltypen in ihrer Zelloberflächencharakteristik. Bekannte Oberflächenmarker wie CD105, STRO-1 und CD166 sind Marker für Zellen mit Potential sich in verschiedene Zellen zu differenzieren und sie sind bei beiden Stammzellen vertreten. Der Rezeptor für Stammzellsfaktor CD117 findet sich ebenfalls auf beiden Oberflächen.

Andere zellspezifische Oberflächenmarker wie CD29, der eine Rolle bei der Angiogenese spielt, und CD49e, der ein wichtiger Faktor bei der Adhäsion für Fibronectin ist, werden ebenfalls von beiden exprimiert. Jedoch gibt es einen Unterschied zwischen den Rezeptoren VLA-4 (CD49d) und seinem verwandten Rezeptor VCAM-1 (CD106). Während CD49d von den ADC-Zellen präsentiert wird, nicht aber von den Knochenmarkstammzellen, findet sich CD106 auf den MSC-Zellen, nicht aber auf den ADC-Zellen (De Ugarte et al. 2003).

Das Potential zur Differenzierung in verschiedenen Zelltypen ist mit denen aus dem Knochenmark vergleichbar. Es konnten Differenzierungen in mesenchymale Zelllinien bestätigt werden: Adipogenese, Chondrogenese und Osteogenese (Zuk et al. 2002). Nichtmesenchymale Linien für Neogenese und Myogenese sind ebenfalls aus diesen Zellen zu gewinnen (Zuk et al. 2002).

Die Fähigkeit sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren, konnte mehrmals in vitro gezeigt werden. In Kultur genommene Zellen aus dem subkutanen Fettgewebe formatieren sich unter Zusatz von 5-Azacytidine oder Extrakt aus Kardiomyozyten zu kontraktilen Strukturen. In einem weiteren Schritt konnten Planat-Bernhard et al. dies ohne vorherige Kulturselektion demonstrieren, indem frisch gewonnenen Stammzellen direkt in ein semisolid Medium kultiviert wurde. Nach drei Wochen konnten bereits Zellen mit spontanen kontraktilen Strukturen beobachtet werden. Phänotypische Eigenschaften konnten sowohl hinsichtlich der Morphologie und Elektrophysiologie als auch in pharmakologischen Merkmalen von Kardiomyozyten bestätigt werden.

Ebenfalls konnte die Fähigkeit zur Angiogenese von ADC-Zellen *in vitro* nachgewiesen werden. Durch Sekretion von Zytokinen, die einmal die Angiogenese stimulieren und andererseits die Apoptose hemmen, unterstützen sie die Regeneration von zerstörtem Gewebe (Rehman et al. 2004). Zusätzlich haben sie eine Vehikelfunktion für Genexpression, die die Regeneration von Zellen unterstützt (Morizono et al. 2003).

2.3.3 Applikation der Stammzellen

Die Route der Zellenapplikation ins geschädigte Gewebe ist mit ausschlaggebend für den Erfolg der Reparatation und Regeneration des Myokards.

1. Die transendokardiale oder transepikardiale Applikation erfolgt direkt unter Sicht am offenen Herzen. Diese ist in Tiermodellen und auch schon am Menschen unternommen worden. Bei diesen Methoden können die Zellen gezielt ins betroffene Gewebe appliziert werden. Jedoch limitiert sich die Verabreichung auf eine einmalige Injektion der Zellen. Ein weiteres Problem besteht darin, dass durch Manipulationen es zu einer Verletzung des Myokards kommen kann und Komplikationen wie Arrhythmien zur Folge haben kann. Die intramyokardiale Injektion am offenen Herzen ist sowohl mit Knochenmarksstammzellen als auch mit Skelettmuskelzellen getestet worden. Ein Vorteil ist, das Embolierisiko besonders bei größeren Zelltypen zu minimieren. Jedoch besteht auch hier das erhöhte Risiko von Arrhythmien.

2. Die intravenöse Applikation ist die einfachste Methode. Jedoch erreicht hier nur eine geminderte Zellzahl der Injektion das Zielgebiet. Einerseits limitiert sich ihr Effekt durch vorherige transpulmonale Passage und andererseits verteilen sich die Zellen durch die Zirkulation auch auf andere Organe und nur ein geringere Anteil erreicht das Infarktgebiet in der LAD.

3. Die intrakoronare Applikation der Zellen über Katheter ist die häufigste angewandte Technik. Die Stammzellen können gezielt durch den Katheter in das Infarktgebiet injiziert werden. Dadurch können sie in ihrer Effizienz und Konzentration direkt dort optimal zur Wirkung kommen. In Studien mit Knochenmarksstammzellen ist dieser Weg der Applikation sowohl in Tiermodellen als auch schon beim Menschen erprobt worden (Strauer et al. 2003).

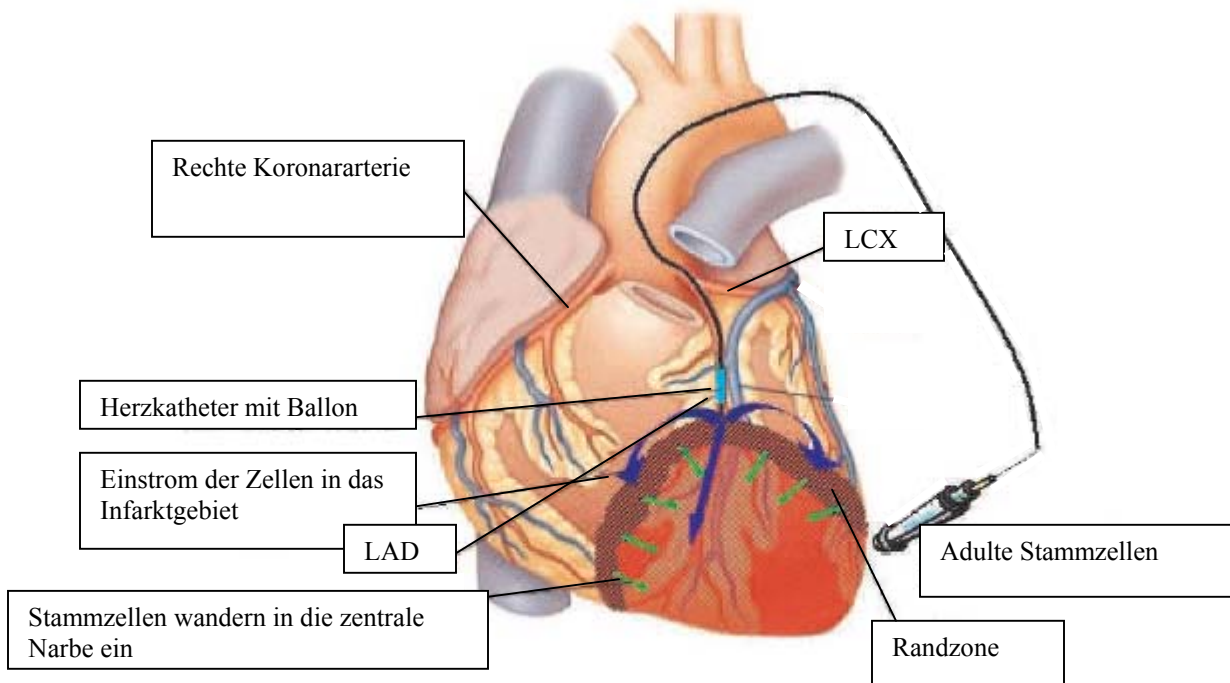


Abb.5: Intrakoronare Applikation der adulten Stammzellen aus dem subkutanem Fettgewebe. Die Injektion erfolgt über das Lumen eines angioplastischen Ballons, der in die LAD eingeführt ist. Die Anheftung der Zellen ins Kapillarbett wird durch den aufgeblasenen Ballon ermöglicht.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Problemstellung und Zielsetzung

Auf dem Gebiet der Stammzellforschung sind viele Studien in den letzten Jahren unternommen worden, in wie weit es möglich ist, ischämisch geschädigtes Myokard zu regenerieren. Es sind adulte Stammzellen aus dem Knochenmark, die sowohl in vitro als auch in vivo zu positiven Ergebnissen geführt haben. Als Alternative haben sich Stammzellen aus subkutanem Fettgewebe erwiesen. Es gilt nun zu untersuchen, welchen Effekt die applizierten Stammzellen auf das ischämisch geschädigte Myokard nach einem Infarkt haben. Um eine höhere klinische Relevanz in der Humanmedizin zu haben, soll die Studie am Schwein durchgeführt werden. Dazu ist es notwendig, ein Infarktmodell am Schwein zu entwickeln, um ähnliche Bedingungen zu schaffen, wie sie auch beim Menschen nach einem Infarkt bestehen. Infarktkomplikationen wie Arrhythmien und Veränderungen in der Hämodynamik sind dabei zu berücksichtigen und zu untersuchen. Die Zellen sollen in erster Linie auf ihre Sicherheit und Pathologie getestet werden, um zu klären, inwieweit die Zellen Einfluss auf die Hämodynamik nach dem Infarkt bei ihrer Applikation nehmen und ob es zu einer weiteren Verlegung der LAD kommt. Im weiteren Verlauf gilt es zu untersuchen, welchen Effekt die Zellen auf die myokardiale Funktion haben.

Wir verfolgen in unsere Studie zwei Ziele:

- 1.: Entwicklung eines Infarktmodells am Schwein
- 2.: Untersuchung der Stammzellen auf ihre Pathologie

3.2 Versuchsaufbau

Die Studie gliedert sich in eine Pilotstudie, in der 13 Tiere untersucht werden, und in eine Hauptstudie, die aus 29 Tieren besteht.

Die Pilotstudie dient dazu, den Versuchsablauf zu optimieren und die optimale Zellkonzentration und die Sicherheit in ihrer Anwendung zu ermitteln. Hinsichtlich der Sicherheit soll ermittelt werden, welches Trägermedium sich für die Injektion der Zellen am besten eignet und in welchem zeitlichen Ablauf die Applikationen erfolgen soll. Anästhesie, die operative Vorgehensweise und die Entnahme der Zellen aus dem subkutanen Fettgewebe sind mit derer in der Hauptstudie vergleichbar. Nach Infarktinduktion erfolgt die Applikation der Zellen, die mittels zwei verschiedenen Trägersubstanzen erfolgt. Einmal werden zwischen $35\text{--}155 \times 10^6$ Zellen bis zu $2,1\text{--}5,0 \times 10^6$ Zellen per ml mit Plasmalyte® (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL, USA) vermischt, das andere mal werden sie mit 6% Hetastarch in einer 0,9% Kochsalzlösung (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL, USA) angereichert und in die LAD infundiert. Um die akuten Durchblutungseigenschaften des Herzens direkt nach dem Infarkt zu ermitteln, erfolgt direkt im Anschluss eine Angiographie und eine spezielle Messung der Flusseigenschaften der Koronargefäße. In der folgenden Tabelle sind die Tiere der Pilotstudie und derer Untersuchungen zu ersehen.

Gruppe	N	Untersuchung
Histologie	4	Histologie und Immunhistochemie
Nachuntersuchung	6	Vergleich nach 8 Wochen
Zellinjektion	3	Vergleich zwischen Plasmalyte/Hetastarch, ADC/Microbeads Effekt

Tabelle 1: Pilotstudientiere und Untersuchungen

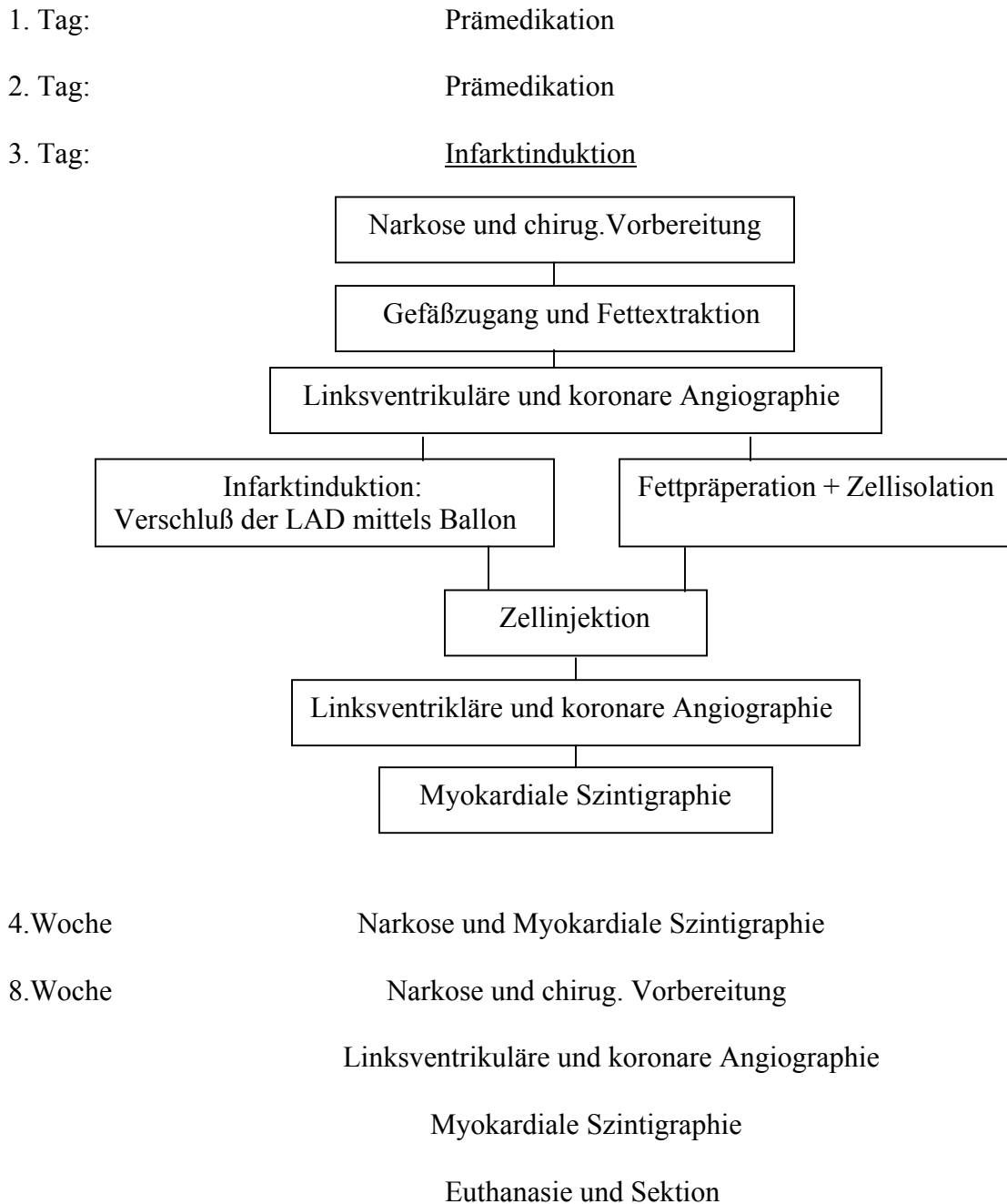
In der Hauptstudie wird die Effizienz und Sicherheit der Zellen in ihrer Anwendung auf die kardiale Funktion nach einem Myokardinfarkt ermittelt. Die dafür erforderliche Anzahl und Konzentration der Zellen werden in der vorhergehenden Pilotstudie bestimmt. Die Untersuchungen gliedern sich in zwei Gruppen. Gruppe 1 ist die Kontrollgruppe und erhält eine verdünnte Trägerlösung ohne Zellen injiziert, Gruppe 2 erhält die gewonnenen Zellen aus dem subkutanen Fettgewebe (Adipose tissue derived stromal cells – ADC). Die Tiere werden hinsichtlich der Effizienz und Sicherheit auf die kardiale Funktion nach unterschiedlichen Kriterien beurteilt:

1. Hämodynamik: Herzfrequenz, Herzzeitminutenvolumen, Aortendruck und Druck im linken Ventrikel.
2. Arrhythmien
3. Laborparameter: Troponin I, CK, CRP, CK-MB
4. Pathologie: Infarktgröße

Folgende Bedingungen müssen erfüllt sein:

1. Die Tiere mit einem Perfusionsdefekt über 15% des linken Ventrikels, der mittels ^{99m}Tc -Sesta-MIBI gemessen wird, werden in die Studie eingeschlossen.
2. Weiterhin werden die Tiere, bei denen die Anzahl an lebenden Zellen vor der Zellapplikation nicht unter 75% des totalen Zellvolumens liegt, mit in die ADC-Gruppe eingeschlossen.

Der zeitliche Ablauf der Studie ist im folgenden Flussdiagramm schematisch dargestellt:



Tab. 2: Versuchsablauf

3.3 Versuchsdurchführung

Tierspezies

Für diese Studie werden insgesamt 42 klinisch gesunde Schweine des amerikanischen Farmschweins beiderlei Geschlechts verwendet. Ihr Gewicht beträgt im Durchschnitt zwischen 28 – 43 kg und sie befinden sich im Alter von zwei bis drei Monaten.

Sie stammen von einem staatlich anerkannten Zuchtbetrieb und werden zehn Tage vor Beginn der Studie in die Stallungen der Tulane Universität gebracht. Die Unterbringung erfolgt in Einzelboxen mit einer Größe von 3qm² und diese sind so konzipiert, dass die Tiere untereinander Sichtkontakt haben. Jedes Tier erhält zur Identifikation eine Ohrmarke. Die Temperatur beträgt 21 ° Celsius und die Luftfeuchtigkeit beträgt zwischen 50 – 70 %. Beleuchtet werden die Boxen mit maximal 500 Lux, die in einem Tag und Nachtrhythmus geschaltet ist. Gefüttert werden die Schweine mit einem speziellen Schweinefutter in pelletierter Form und Wasser stehen ihnen ad libitum jederzeit zur Verfügung. Täglich werden sie tierärztlich kontrolliert.

Anästhesie

Die Tiere werden sediert mit Telazol® (Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, USA) und Xylazin (Butler, Columbus, OH, USA). Die Dosierung für Telazol® beträgt 5mg/kg und für Xylazin 4mg/kg, die Injektion erfolgt in einer Mischspritze intramuskulär. In beide Ohren wird jeweils ein Venenverweilkatheter gelegt und es erfolgt die Intubation. Nach Rasur und Reinigung der Operationsfelder am Hals und im Inguinalbereich werden die Tiere in das Katheterlabor gebracht. Dort werden sie in Rückenlage fixiert und an das Beatmungsgerät angeschlossen.

Um die kardiale Funktion so wenig wie möglich zu beeinträchtigen, wird die Narkose im Rahmen einer „Balanced Anesthesia“ mittels einer Konzentration von Isofluran, Propofol und Fentanyl aufrechterhalten. Beatmet werden sie mit einer Mischung aus Sauerstoff

und Isofluran (Abott Laboratories, Chicago, IL, USA), wobei der Anteil an Isofluran nicht mehr als 1% beträgt.

Die Applikation von Propofol (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) erfolgt über einen Perfusor intravenös in einer Dosierung von 3-7mg/kg/std. Fentanyl (Baxter, Deerfield, NJ, USA) wird präoperativ und jeweils alle 30 Minuten in einer Dosierung von 0,017mg per Bolus intravenös verabreicht, um eine ausreichende Analgesie zu erreichen. Zur Narkoseüberwachung werden folgende Vitalfunktionen kontrolliert: Herzfrequenz, Atemfrequenz, systolischer arterieller Blutdruck, Sauerstoffpartialdruck und etCO₂, und spontane Abwehrbewegung des Tieres. Um die Tiere vor Hypothermie zu schützen, wird die physiologische Körpertemperatur durch Heizmatten konstant gehalten. Gegen Ende der Prozedur erhalten die Tiere als Analgetium Bruphemorphin (Bruprenex®, Reckitt Benckiser Healthcare Ltd., Hull, England) in einer Dosierung von 0,06ml/kg intramuskulär verabreicht. Zusätzlich erhalten sie in den darauffolgenden 48 Stunden zweimal täglich Bruprenex® injiziert. Als Antibiotikum bekommen sie nach der Szintigraphie 20.000 – 40.000 U/kg Penicillin G (Combi- Pen®, Bimeda Animal Health Inc., Irwindale, CA, USA) i.m. appliziert. Die Tiere werden in den letzten fünf Minuten mit 100% Sauerstoff beatmet und solange am Beatmungsgerät angeschlossen, bis die Spontanatmung eintritt.

Sie werden in ihre Box zurück gebracht und solange weiter überwacht, bis sie bei ausreichender Spontanatmung extubiert werden können.

Medikation

Zur Minimierung des Koagulationsrisikos bei der Infarktinduktion mittels Ballon werden die Tiere zwei Tage vor und nach dem Eingriff mit Aspirin® (Wallgreens Co, Deerfield, IL, USA) und Clopidogrel (Plavix®, Sanofi Pharma, Paris, Frankreich) mediziert. Sie erhalten Clopidogrel in einer Anfangsdosis von 225mg und an den darauffolgenden Tagen in einer Dosis von 75mg, von Aspirin erhalten sie 325mg täglich. Zusätzlich bekommen sie den Betablocker Bisoprolol (Concor®, Merck KGaA, Darmstadt,

Deutschland) in einer Dosierung von 1,25mg zwei Tage vor und fünf Tage danach appliziert. Während der gesamten Prozedur erhalten die Tiere als Flüssigkeitssubstitution Ringerlactat in einer Dosierung von 5-10ml/kg/std. infundiert.

Nachdem der Gefäßzugang gelegt ist, erhalten sie als Antikoagulantien einmalig 500mg Acetylsalicylat (Aspisol®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) i.v. und 1mg/kg Enoxaparin (Lovenox®, Aventis Pharma, Le trait, Frankreich) i.v. injiziert. Einen weiteren Bolus Enoxaparin von 0,5mg/kg i.v. wird vier Stunden später und am Ende der Untersuchung in einer Dosierung von 1mg/kg subkutan gegeben.

Zusätzlich werden Eptifabotide (Integrilin®, SP Europe, Bruxelles, Belgien) in Form von zwei Boli kurz vor der Infarktinduktion in einer Dosierung von jeweils 180µg/kg i.v. appliziert und während des Infarktes als Infusion (2µg/kg/min in 500ml Ringerlactat) infundiert. Weiterhin erhalten sie jeweils nach 60 Minuten 50mg Magnesiumsulfat (APP, Schaumburg, IL, USA) i.v. appliziert, um das Risiko von ventrikulären Arrhythmien während des Infarktes zu minimieren. Bei Auftreten von Arrhythmien werden weitere Magnesiumboli und zusätzlich das Antiarrhythmikum Amiodarone (Cordarex®, Sanofi – Synthelabo GmbH, Berlin, Deutschland) in Form von 25mg per Boli i.v. gegeben.

Labordiagnostik

Zur Bestimmung der Serum-Herzenzymaktivität und Entzündungsparameter werden Blutproben entnommen, um die Auswirkungen des Infarktes auf dem gesamten Organismus des Tieres zu ermitteln.

Diese erfolgen in folgenden Zeitabständen: 1) Vor dem Infarkt (Referenzbereich), 2) nach dem Infarkt und der Zellinjektion, 3) nach vier Wochen und 4) nach acht Wochen.

Dazu werden die Proben unter Verwendung eines Kalium-EDTA-Gefäßes für die Hämatologie (3 ml, BD Vacutainer®, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) und zwei Serumröhrchens (10 ml, BD Vacutainer®) aus der V. jugularis entnommen und zur Analyse in das Department of Pathology und Laboratory Medicine der Tulane University Hospital & Clinic gebracht. Es werden die Serum-Herzenzymaktivität und

Entzündungsparameter bestimmt, die in der folgenden Tabelle mit ihren Referenzbereichen aufgelistet sind. Zusätzlich wird 1ml Serum in ein 1,5ml Mikroteströhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei -20°C für spätere Analysen aufbewahrt.

Parameter	Referenzbereich (Mensch)	Referenzbereich (Schwein)
Troponin I	0 - 1 ng/ml	< 10 ng/ml
CK	25 - 185 U/l	≤ 1500 U/l
CK-MB	0 - 5 µg/l	< 10 µg/l
BNP	0 - 100 pg/ml	< 100 pg/ml
CRP	< 0,9 mg/dl	< 10 mg/dl
Leukozyten	9 000 - 30 000/µl	10 000 - 20 000/µl
Hb	12 – 15 g/dl	10,8 – 14,8 g/dl
Hk	53 - 65%	33 – 45%
Thrombozyten	140 000 - 290 000/µl	175 000 – 580 000/µl

Tabelle 3: Laborparameter und Referenzbereiche

Operatives Vorgehen

Fettextraktion

Nach Erreichen eines adäquaten Anästhesiestadiums werden die in Rückenlage ausgebundenen Tiere in der Inguinalregion chirurgisch vorbereitet. Sie werden nach vorher erfolgter Rasur und gründlicher Säuberung mit Betaisadona und Alkohol desinfiziert und mit einem sterilen Tuch abgedeckt. Der Hautschnitt erfolgt auf beiden Seiten inguinal und es wird aus dem subkutanen Fettgewebe zwischen 5 – 15 Gramm Gewebe gewonnen. Eventuelle Blutungen werden mittels Elektrokauter unterbunden und es erfolgt eine Drainagelegung beidseits, die nach 24 Stunden gezogen wird. Der

Wundverschluss erfolgt durch eine fortlaufende Unterhautnaht mit einem 3-0 Vicrylfaden (Ethikon GmbH, Norderstedt, Deutschland) und durch eine Einzelheft-Hautnaht mit einem 2-0 PDS Faden (Ethikon GmbH, Norderstedt, Deutschland).

Gefäßzugang

Für den Gefäßzugang wird die linke Halsseite wie die Inguinalregion desinfiziert und steril abgedeckt. Der Hautschnitt erfolgt auf einer gedachten Linie zwischen Manubrium sterni und Kiefernwinkel. Die A. carotis communis sinistra und die V. jugularis interna werden entlang der Trachea lokalisiert und freipräpariert, wobei unter besonderer Rücksichtnahme der N. vagus isoliert wird. Der Gefäßzugang wird nun mittels der Seldinger Methode durchgeführt: 1.) Dazu werden Vene und Arterie punktiert, 2.) ein weicher Führungsdraht durch die Punktionsnadel ins Gefäß eingeführt, 3.) die Punktionsnadel wird entfernt, 4.) die Schleuse wird über den Draht ins Gefäß platziert und 5.) der Draht danach wiederum entfernt. Für die Arterie wird eine 7 French Schleuse und für die Vene wird eine 8 French Schleuse verwendet (Cordis Corporation, Miami, FL, USA).

Vitalfunktion und Hämodynamik

Folgende Vitalfunktionen werden kontinuierlich über einen Überwachungsmonitor (Welch Allyn Medical Products, Skaneateles Falls, NY, USA) gemessen und alle 10 Minuten in ein Anästhesieprotokoll dokumentiert: Herzfrequenz, Atemfrequenz, Sauerstoffpartialdruck, EtCO₂ und Körpertemperatur. Zusätzlich erfolgt eine externe EKG Ableitung.

Über die venöse Schleuse wird ein 7,5 French Thermistor-Swan-Ganzkatheter (Edwards Lifesciences LCC, Irvine, CA, USA) in die Pulmonalarterie eingeführt und mit einem Monitor (Vigilance, Edwards Lifesciences LCC, Irvine, CA, USA) verbunden, der kontinuierlich das Herzzeitvolumen aufzeichnet.

Zusätzlich wird dieses auf ein zweites Monitoringsystem (BIOPAC Systems Inc., Goleta, CA, USA) übertragen. Dieser ist an einen PC (HP Pavilion ze1210, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) gekoppelt und die aufgenommenen Daten werden unter Anwendung der Software Acknowledge (BIOPAC Systems Inc.) übertragen und gespeichert. Für die Messung des arteriellen Blutdruckes, des Pulmonaldruckes und des linksventrikulären Druckes werden zwei Druckabnehmer (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA) verwendet, die an das Biopacsystem angeschlossen werden.

Beide Druckabnehmer werden jeweils über einen mit NaCl gespülten Perfusionsschlauch mit den jeweiligen Schleusen verbunden, die pulmonale Druckmessung erfolgt über die venöse Seite, die des arteriellen und des linksventrikulären Druckes über die arterielle Seite.

Linksventrikuläre Angiographie

Die myokardiale Funktion des Herzens wird mittels einer linksventrikulären Angiographie in zwei Ebenen zu folgenden Zeitpunkten festgehalten: 1) Vor dem Infarkt (Baseline), 2) nach dem Infarkt, 3) nach vier Wochen und 4) nach acht Wochen.

Die Aufnahme erfolgt in einer linksanterioren 30° Grad Projektion (LAO) und in einer rechtsanterioren 30° Grad Projektion (RAO) mit einer monoplanen Durchleuchtungseinheit (Advantx LC mit DLX3-C 1024 Digitalsystem, GE Medical Systems, Fairfield, CT, USA). Ein 6 French Pigtailkatheter (Cordis Corp., Miami Lakes, FL, USA) wird über einen 0.035-inch Führungsdraht in die Aorta ascendens und in den linken Ventrikel vorgeschoben. Zur Darstellung des linken Ventrikels wird jodhaltiges Kontrastmittel (Omnipaque™, Schering AG, Berlin, Deutschland oder Isovue®, Bracco Diagnostics Inc., Princeton, NJ, USA) über den Katheter injiziert.

Das Ventrikulogramm erfolgt in 30 Bildern und wird für spätere Analysen im Heartlab Archival System im DICOM Standard (Heartlab Inc., Westerly, RI, USA) gespeichert.

Die Auswertung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) erfolgt in beiden Projektionen mit dem Programm ENCOMPASS (Heartlab Inc.). Dazu werden die

enddiastolische und endsystolische Aufnahme verwendet, der Füllungsgrad des Ventrikels wird markiert und mit Hilfe der Dodge Methode kalkuliert.

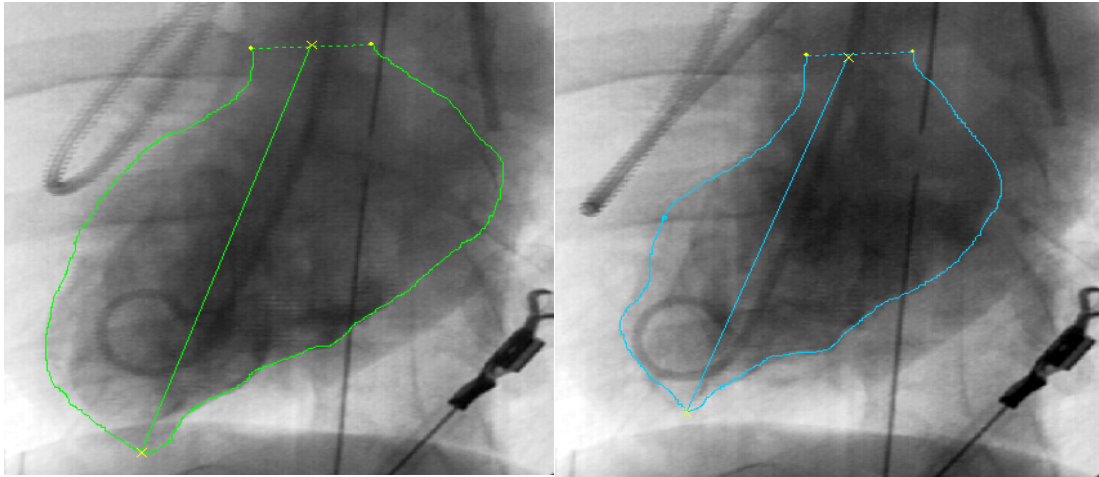


Abb. 6: Messung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (ENCOMPASS Review)

Links: Enddiastole; Rechts: Endsystole

Angiographie des Koronarsystems

Im weiteren Schritt wird eine Angiographie zur Darstellung des Koronarsystems gemacht und um deren Perfusion anzuzeigen. Die Aufnahme erfolgt 1) vor der Infarktinduktion, 2) direkt nach dem Infarkt, 3) nach der dritten Zellinjektion, 4) nach der letzten Zellinjektion und 5) nach acht Wochen. Nach Injektion von 200 μ g Nitroglycerin (American Regent Laboratories Inc., Shirley, NY, USA) in die LAD wird Kontrastmittel intrakoronar gegeben und es erfolgt eine Aufnahme, die wie bei der linksventrikulären Angiographie, wie oben beschrieben, gespeichert wird.

Infarktinduktion

Die Infarktinduktion erfolgt durch einen Verschluss der LAD mittels Ballon. Dafür wird ein angioplastischer Ballon (Länge 9 mm, Durchmesser 2,5, 3,5 oder 4 mm, Maverick

OTW, Boston Scientific, Natick, MA, USA oder Titan, Cordis Corp., Miami, FL, USA) verwendet, der über ein Judkins-Left-3,5-Katheter (Cordis Corporation, Miami, FL, USA) in die LAD geführt wird. Um den Führungskatheter richtig zu platzieren, wird ein 0,014-inch Floppyführungsdraht (Boston Scientific, Natick, MA, USA) durch den Ballon gezogen.

Der aufgeblasene Ballon verbleibt für drei Stunden in der LAD und seine Position wird alle 30 Minuten unter Durchleuchtung kontrolliert.

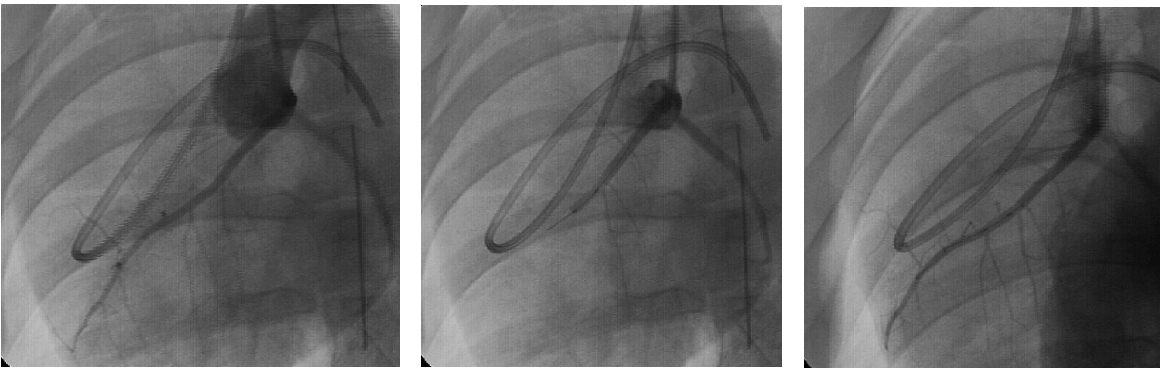


Abb.7: Myokardinfarkt durch Verschluss der mittleren LAD mittels eines Ballons
Links: Vor dem Infarkt; Mitte: Verschluss der LAD; Rechts: Nach dem Infarkt

Koronarfluss

Die myokardiale Durchblutung wird nach acht Wochen durch einen 0.014-inch Doppler-Führungsdraht übertragen und in Spektralformat wiedergegeben. Messungen erfolgen in der proximalen LCX, in der proximalen und distalen LAD. Die erste Messung wird ohne pharmakologische Stimulans als Referenz gewertet und die zweite Messung erfolgt unter Injektion von 20 μ g Adenosin (Adenocard®, Fujisawa Haelthcare Inc., Deerfield, IL, USA), um eine maximale Durchblutung zu erreichen.

In jedem Fall werden sowohl die absolute Durchschnittsflussgeschwindigkeit (Average peak velocity - APV, cm/s) als auch die Durchschnittsflussgeschwindigkeit Vergleich Diastole zur Systole (DSVR) bestimmt. Die koronare Flussreserve

(coronary flow reserve – CFR) wird kalkuliert aus der Differenz von der absoluten Flussgeschwindigkeit unter Adenosineinfluß und ohne pharmakologische Stimulans. Unter der Benutzung des Computerprogramms Metamorph® (Molecular Devices Corp., Downingtown, PA, USA) werden die Durchflussrate ohne Adenosin und unter Adenosineinfluss berechnet. Dafür werden die Ausdrücke eingescannt und die Berechnung erfolgt planimetrisch.

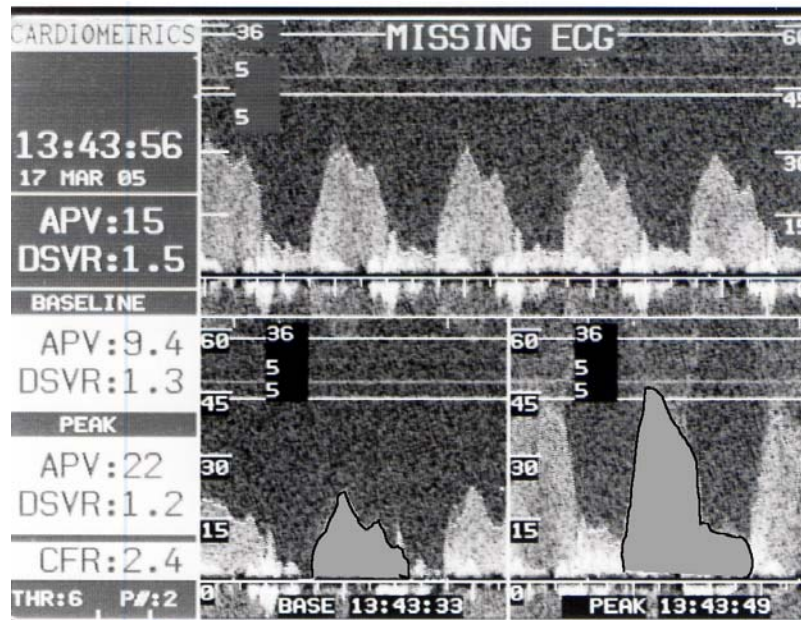


Abb.8: Messung der myokardialen Durchblutung; Oben: Koronare Flussgeschwindigkeit mit kleinem systolischen und großen diastolischen Anteil; Unten links: Baseline; Unten rechts: Hyperämie

ADC-Zellinjektion

Nach der dreistündigen Verschlussperiode der LAD wird der Ballon wieder abgelassen, entfernt, um in einer weiteren Angiographie die Durchblutung der LAD zu ermitteln. Nach 15 Minuten Reperfusion wird der Ballon wieder in die LAD eingeführt und für die Zellinjektion aufgeblasen.

Die Tiere der ADC Gruppe erhalten $1,5 \times 10^6$ Zellen/kg Körpergewicht in einer Konzentration $2,5 \times 10^6$ /ml. Die Kontrollgruppe erhält eine vergleichbare Menge an

Plasmalyte® ohne ADC injiziert. Die Injektion von 3 ml Zell- oder Kontroll suspension erfolgt langsam durch das Zentrallumen des Ballons in das Infarktgebiet in einem Zeitraum von 30-60 Sekunden. Der Ballon bleibt noch weitere 30-60 Sekunden aufgeblasen, um die Anheftung der Zellen ins Kapillargebiet zu ermöglichen. Dann wird der Ballon wieder abgelassen, um das Risiko einer weiteren Ischämie zu minimieren.

Die Injektionen der einzelnen Boli erfolgen, so oft bis das Zielvolumen erreicht ist. Nach der dritten und der letzten Injektion erfolgen weitere Kontrollangiographien des Koronarsystems.

Untersuchungen nach vier und acht Wochen

Die Tiere stehen nach der Infarktinduktion die nächsten acht Wochen unter tierärztlicher Aufsicht. Die erste Nachuntersuchung erfolgt nach vier Wochen. Dafür werden die Tiere narkotisiert, Blutproben werden entnommen und eine weitere myokardiale Szintigraphie wird durchgeführt. Die zweite Untersuchung ist nach acht Wochen. Die Tiere werden narkotisiert und die weitere Anästhesie und Überwachung verläuft wie bei der Infarktinduktion. Nach Gefäßzugang und Katheterlegung wird sowohl eine linksventrikuläre als auch eine koronare Angiographie zur Kontrolle der myokardialen Funktion gemacht. Weiterhin wird Blut entnommen und es erfolgt eine dritte myokardiale Szintigraphie. Zusätzlich wird die koronare Durchflussrate bestimmt.

Aufzeichnung von Arrhythmien und Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)

Herzrhythmusstörungen sind bei Infarktpatienten eine der häufigsten Komplikationen nach einer Zelltransplantation. Zur Auswertung von diesen Arrhythmien wird ein Eventrekorder (Reveal Plus®, Medtronic Corp., MN, USA) verwendet. Dieser wird subkutan auf der linken Brustwand in Höhe der 5. und 6. Rippe implantiert und es erfolgt die kontinuierliche Aufzeichnung eines einfach abgeleiteten EKGs.

Im Falle einer Bradykardie und Tachykardie werden die vorhergehenden und nachfolgenden Events aufgezeichnet und gespeichert. Insgesamt können 14 Events, von denen jedes einzelne 3 Minuten aufgezeichnet wird, gespeichert werden. Die gespeicherten Daten werden alle 1-2 Tage mittels Telemetrie abgefragt, auf ein Computersystem übertragen und dort gespeichert.

Nach acht Wochen erfolgt eine invasive elektrophysiologische Untersuchung, um die Auslösbarkeit von Arrhythmien mittels Schrittmacherimpulsen zu ermitteln. Dafür wird die rechte Ventrikelspitze mit insgesamt 8 S1 Impulsen (Intervall von 500ms) und bis zu 3 zusätzlichen Impulsen stimuliert. Danach werden die Längen der ventrikulären Zyklen nach 1 und nach 10 Sekunden mit einem speziellen Mapping-Katheter für den rechten Ventrikel gemessen.

Sektion, Euthanasie und Probenentnahme

Nach Beendigung der Studie werden die Tiere mit einer Dosierung von 1ml/5kg Pentobarbital (Beuthanasia®, Schering, Union, NJ, USA) euthansiert. Unmittelbar danach wird der Brustkorb auf Höhe der Knochenknorpelgrenze eröffnet, das Perikard wird vorsichtig aufgetrennt und das Herz wird unter Absetzung der zu- und ableitenden Gefäße herausgenommen. Weiterhin werden für die histologischen Untersuchungen Gewebeproben von Lunge, Milz, Leber und Niere entnommen.



Abb.9: Herz von Tier 139 (Infarkt im Apexbereich)

Makroskopische Untersuchung

Anschließend wird das entnommene Herz mit 0,9% Kochsalzlösung gespült und es werden 3-5 transversale Schnitte mit einem Durchmesser von 1 cm (Apex zu Basis) angefertigt.

Für die Bestimmung der Infarktgröße mittels Planimetrie und für spätere Dokumentationszwecke werden die einzelnen Schnitte von beiden Seiten photographisch festgehalten. Die planimetrische Messung der Infarktgröße des linken Ventrikels beinhaltet die Fläche, den Umfang vom Infarkt und gesundem Myokard und die Wanddicke. Die Bestimmung und Berechnung erfolgt mit dem Computerprogramm Metamorph® (Molecular Devices Corp., Downingtown, PA, USA).

Für die Bestimmung der Infarktgröße werden nur die von basal gemachten Aufnahmen der linken Ventrikel verwendet. Nach Kalibrierung wird die Fläche des Infarktes und des gesunden Myokards farblich markiert und berechnet. Die Infarktgröße wird verglichen zum gesunden Myokard auf den gesamten linken Ventrikel bezogen und in Prozent wiedergegeben.

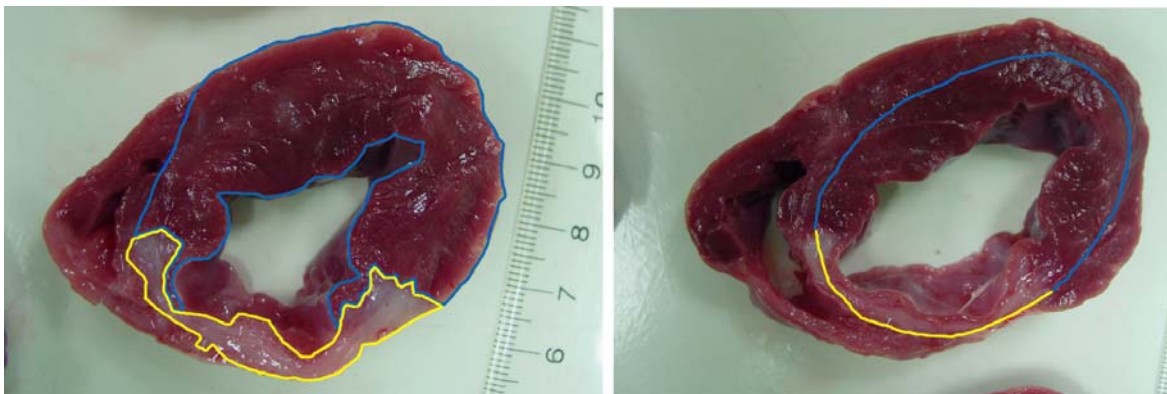


Abb.10: Flächen- (links) und Umfangsmarkierung (rechts) von Infarkt und gesundem Myokard des linken Ventrikels

Die Berechnung für den Umfang und der Wanddicke des Infarktes und Myokards erfolgen ähnlich. Bei der Umfangsbestimmung wird eine Linie durch Infarkt und durch

gesundes Myokard gezogen. Die Länge der Linien wird separat berechnet und in Prozent wiedergegeben.

Die Wanddicke wird im Infarktgebiet, im gesunden Myokard und in der Randzone bestimmt. Dafür wird jeweils eine Linie von der endokardialen Seite zur epikardialen Seite gezogen, wobei für die Randzone zwei Linien an beiden Seiten der Infarktzone markiert werden. Alle vier Messungen (Infarkt, Myokardium, Randzone 1 und Randzone 2) werden mit Metamorph® berechnet und untereinander im Verhältnis gesetzt.

Immunhistochemie

In der immunhistochemischen Untersuchung geht es darum, die Neoangiogenese in dem infarktgeschädigten Bereich zu ermitteln. Hierfür dient der von-Willebrand-Faktor als Antigen und die DAB-Lösung als Chromogen zur Markierung der Gefäße.

Der im Endothel der Gefäße vorkommende von-Willebrand-Faktor dient als Antigen, dieser geht mit dem primären Antikörper die erste Konjugation ein.

Es erfolgt eine weitere Konjugation mit einem sekundären biotinylierten Antikörper, dieser konjugiert mit dem Streptavidin. Die mit dem Streptavidin gekoppelte Peroxidase setzt das Chromogen um und erzeugt eine spezifische Farbmarkierung.

Die in Paraffin eingebetteten Schnitte werden zuerst in einer Xylen – Ethanolreihe (100%, 95%, 70%) deparaffiniert und rehydriert. Danach erfolgt zur Verbesserung der Immunreaktion die Erhitzung in einer Antigen-Retrieval-Lösung (DakoCytomation®, Glostrup, Dänemark) bei 95° Celsius. Nach Abkühlen, Spülen und Waschen in PBS (Phosphate buffered salt, Cellgro®, Herndon, VA, USA) werden die Schnitte für weitere 10 Minuten in eine Peroxidase quenching-Lösung getaucht (4° Celsius). Es erfolgt ein weiterer Waschschrift in PBS bevor zum Verhindern unspezifischer Antikörperbindung mit einer 10% Lösung von Ziegenerum geblockt wird (10 Minuten). Danach wird der primäre Antikörper (Kaninchen-polyclonal-anti-Von Willebrand Factor-IGG Antikörper, DakoCytomation®, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen und für eine Stunde bei 37° Celsius inkubiert. Es erfolgt wieder die Waschung in PBS,

um darauf den sekundären biotinylierten Antikörper (Zymed®, Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) aufzutragen und für weitere 20 Minuten zu inkubieren. Als dritter Schritt erfolgt nach PBS-Waschung die Applikation von Streptavidin-peroxidase und einer weiteren 20 min. Inkubation. Nach einer letzten Waschung in PBS wird die DAB-Lösung auf die Schnitte appliziert und die einsetzende Färbung unter dem Lichtmikroskop begutachtet und gestoppt. Anschließend werden die fertigen Schnitte eingedeckelt.

Kapillarzählung

Die Dichte der Kapillaren wird mittels Metamorph® durch Zählung bestimmt. Es werden bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop zehn verschiedene Felder pro Schnitt ausgezählt. Diese Auszählung erfolgt unter Benutzung des manuellen Markierungstools von Metamorph®, wobei nur perpendikular angeschnittene Gefäße mit einem Durchmesser von unter 10 µm berücksichtigt werden. Bei jedem Tier wird die Kapillardichte im Infarktgebiet, im gesunden Myokard und in der Randzone bestimmt.

Abb.10 zeigt alle drei verschiedenen Bereiche eines ADC Tieres (113).

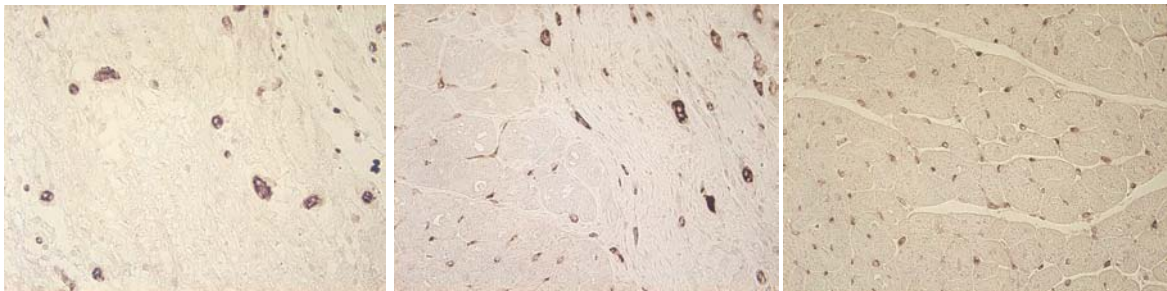


Abb.11: Infarktgebiet (links); Randzone (mitte); gesundes Myokard (rechts) von Tier 113

Analyse des Fibroseanteils in der Randzone

Die Analyse der Fibrose wird mit der Masson Trichom Färbung bestimmt, welche das Kollagen blau anfärbt und Myokard rot. Für jedes Tier werden zwei Gewebeschnitte der

Randzone genommen. Die Paraffinschnitte der Randzone, die sowohl gesundes Myokard als auch Infarkt enthalten, werden in einer Xylen-Alkoholreihe (100%, 95%, 70%) deparaffiniert und rehydriert. Danach werden die Schnitte mit Bouins Lösung (Poly Scientific, Bay Shore, NY, USA) bei 56° Celsius für eine Stunde fixiert. Nach Auskühlen (10 Minuten) und Spülen mit destilliertem Wasser werden sie mit einer Weigert's iron Hämatoxin (Poly Scientific, Bay Shore, NY, USA) für weitere 10 Minuten behandelt und wieder gewaschen. Schließlich erfolgt die Färbung in Biebrichs-Scarlet-Fuchsin-Lösung. Um das Kollagen zu entfärben, werden die Schnitte 10-15 Minuten in einer Phosphormolybdän-Phosphortungsten-Säurelösung getaucht. Danach erfolgt die Gegenfärbung in Anilinblau und in 1% Essigsäure. Schließlich werden sie in einer Alkohol-Xylolreihe (70%, 95%, 100%) dehydriert. Als Ergebnis dieser Färbung erscheinen die Zellkerne schwarz, das Kollagen blau und das Myokard rot.

Zur quantitativen Differenzierung des Fibroseanteils im Gewebe werden drei verschiedene Bereiche eines Gewebeschnittes unter einem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung photographiert. Pro Tier ergibt es sechs verschiedene Aufnahmen, die mit Metamorph® weiter analysiert werden. Zur Vergleichbarkeit werden die Ausschnitte so gelegt, dass die Myokardregion 45% des analysierten Ausschnittes ausmacht.

Der Anteil der Fibrose, des gesunden Gewebes und die Gesamtfläche werden mit Metamorph® berechnet und in Prozent angegeben.

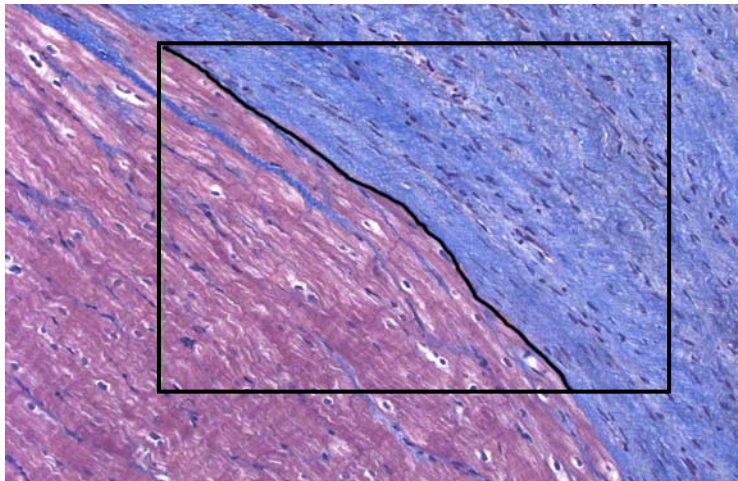


Abb.12: Analysierender Ausschnitt mit gesundem Gewebe (rot) und Fibrose (blau)

Die Bestimmung der Größe der Randzone erfolgt, indem pro Aufnahme eine Fläche markiert wird und in 25 Sektionen (25 μm / Sektion) unterteilt wird. In jeder Sektion werden die Anteile an Fibrose und Muskelgewebe bestimmt und in Prozentpunkten wieder gegeben. Die erste Grenze der Randzone wird definiert, wenn eine Sektion mehr als 5 Prozentpunkte Unterschied von Muskel/ oder Fibroseanteil im Vergleich zur darauffolgenden besitzt. Als zweite Grenze wird der letzte Abschnitt definiert, der wiederum mehr als 5 Prozentpunkte Unterschied im Vergleich zur vorherigen aufweist.

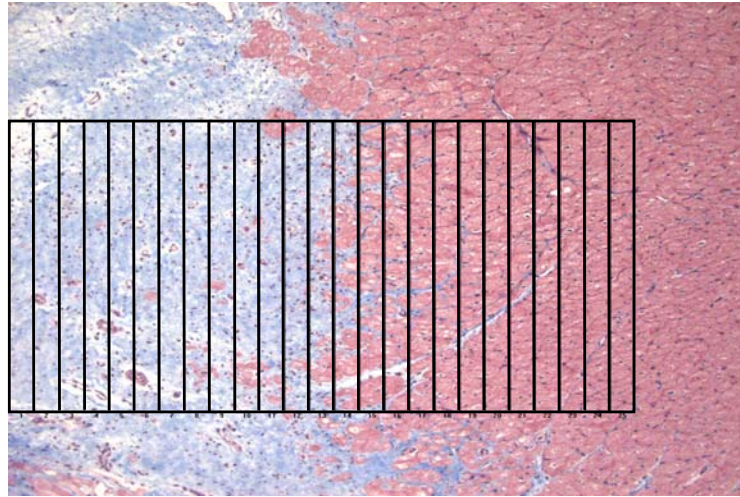


Abb.13: Aufteilung des gesamten Feldes in 25 Sektionen zur Bestimmung der Randzone

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Pilotstudie

In der Pilotstudie wird insgesamt 13 Tieren (Körpergewicht $29,8 \pm 3,5$ kg) ein Infarkt durch Verschluss der LAD mittels eines Ballons induziert. Elf Tieren wird subkutanes Fett entnommen und Zellen injiziert. Durchschnittlich wird 9 ± 3 g Fett aus der Inguinalregion gewonnen, die $92,1 \pm 48,3 \times 10^6$ ADC-Zellen pro Tier enthalten. Die Zellen werden kultiviert und zeigen einen Tag später eine Adhärenz von $12,1 \pm 4,8$ %.

Bei sechs Tieren werden zusätzlich Analysen zur Bestimmung der Oberflächenmoleküle mittels FACS unternommen (CD31-PE $44,8 \pm 0,3$, CD45-FITC $34,8 \pm 0,3$, CD90-APC $59,0 \pm 0,2$). Nach 12 Tagen Zellkultivierung werden durchschnittlich 18 ± 9 Kolonien pro Einheit/Schale gesehen. In Tabelle 4 sind alle Ergebnisse der 13 Tiere zu ersehen.

Bei drei Tieren wird untersucht, welches der beste Weg ist, die Zellen zu injizieren. Dazu werden die Zellen und Mikrobeads (Konzentration $2,5 \times 10^6$ /ml) mit unterschiedlichen Trägerlösungen (Plasmalyte® oder 6 % Hetastarch) appliziert. Die Tiere werden direkt nach Beendigung der Infarktinduktion euthanasiert und es werden das Herz und Gewebeproben für die Histologie entnommen. In einer zweiten Gruppe werden vier Tiere für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen direkt nach dem Infarkt und der Zellinjektion euthanasiert. In einer dritten Gruppe werden sechs Tiere für weitere acht Wochen nach der Infarktinduktion beobachtet und untersucht. Davon verstirbt ein Tier intraoperativ infolge eines Gefäßverschlusses, eines stirbt infolge von postoperativen Komplikationen und drei weitere Tiere erleiden den plötzlichen Herztod. Die anderen vier Tiere werden für 46 ± 0 Tage klinisch untersucht. Sie erhalten $49,2 \pm 9,9 \times 10^6$ ADC-Zellen. Innerhalb der nächsten acht Wochen verringert sich der Perfusionsdefekt von 36 ± 11 % zu 31 ± 1 %, während die LVEF (SPECT) konstant bleibt (MI 37 ± 12 %, nach 8 Wochen 37 ± 8 %).

Während der ganzen 8 Wochen nehmen die Tiere insgesamt von $33,2 \pm 3,9$ kg bis zu $41,3 \pm 4,4$ kg an Gewicht zu.

Eigene Untersuchungen

Schwein	Körpergewicht (kg)	ADC Injektion (x 10 ⁶)	ADC Konzentration (x 10 ⁶ /ml)	Trägersubstanz (ml)
Zellinjektionsgruppe				
103	27,7	68	2,5	27,2 (P)
116	32,5	60	2,5	24,0 (H)
115	29,9	46	2,3	20,0 (H)
Histologiegruppe				
104	26,2	155	4,3	36,0 (P)
105	26,3	48	5,0	9,6 (P)
106	27,6	-	-	-
107	26,9	60	5,0	12,0 (P)
8 – Wochengruppe				
108	30,5	55	2,2	25 (P)
110	27,2	-	-	-
112	37,6	52	2,1	24,0 (P)
111	35,2	60	2,4	24,5 (P)
102	29,4	44	2,5	17,5 (P)
101	30,3	35	2,5	14,0 (P)

Tabelle 4: Körpergewicht, Menge und Konzentration von Zell/Trägerlösung in der Pilotstudie. Plasmalyte® = (P), Hetastarch = (H)

3.4.2 Hauptstudie

Insgesamt wurden 29 Tiere in dieser Studie untersucht, von denen 13 Tiere starben oder während des Studienverlaufes ausgeschlossen wurden (Tabelle 5). Die entgeltliche Datenanalyse umfasst 16 Tiere (ADC n=9, Kontrolle n=7). Alle Tiere befanden sich in gutem gesundheitlichem Zustand und durchliefen die Nachuntersuchungsphase in einem Durchschnitt von 56±3 Tagen. Ein Tier verstarb in der 8-wöchigen Nachuntersuchung aufgrund eines Spasmus der LAD.

Die Daten der angiographisch ermittelten Ejektion Fraktion, der Infarktgröße und der myokardialen Szintigraphie von diesem Tier werden in die Studie mit eingeschlossen, jedoch gibt es keine Daten der szintigraphisch ermittelten Ejektion Fraktion, der Flussmessung und der ventrikulären Stimulation.

Zeitpunkt	N	Beschreibung
Gesamtstudie	16	ADC n=9, Kontrolle n=7.
Intraoperativ	1	Tier verstirbt während Intubation infolge einer Pneumonie
	1	Kardiogener Schock während des Infarktes
	1	Therapieresistente ventrikuläre Fibrillation (VF)
	2	Gefäßverschluss
	1	Verlegung des Ballons und darauffolgende Thrombusbildung
Postoperativ	3	Plötzlicher Herztod post Op
	1	Anal Prolaps (Tier musste euthanasiert werden)
Weitere	1	Permanenter Verschluss der LAD (weitere Erklärung im Text)
	1	Perfusionsdefekt < 15 %
	1	Kongenitaler ventrikulärer Septum Defekt

Tabelle 5: Ergebnisse der Studientiere

Vitalparameter und Hämodynamik

Das Körpergewicht der Tiere nimmt in den folgenden acht Wochen in der ADC-Gruppe von $34,7 \pm 4,5$ kg auf $43,2 \pm 7,3$ kg zu und in der Kontrollgruppe von $30,8 \pm 5,6$ kg auf $36,0 \pm 2,8$ kg zu. Die Gewichtszunahme in der ADC-Gruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Bei den Vitalparametern und allen hämodynamischen Parametern gibt es bis auf die Körpertemperatur keinen signifikanten Unterschied in beiden Gruppen. Die Temperatur ist in beiden Gruppen im Vergleich vor und nach dem Infarkt signifikant erhöht. Atemfrequenz, Sauerstoffpartialdruck und expiratorisches CO₂ bleiben unter kontinuierlicher Narkoseüberwachung konstant. Nach acht Wochen sind die

Werte in beiden Gruppen verglichen zum Zeitpunkt der Infarktinduktion signifikant verändert. Die Herzfrequenz ist signifikant erhöht, das Herzzeitvolumen, der systolische Aortendruck und der systolische linksventrikuläre Druck sind signifikant verringert.

Laborparameter

Es gibt zwischen der ADC-Gruppe und der Kontrollgruppe bei allen Laborparametern keinen signifikanten Unterschied. Die Serum-Herzmuskelenzymaktivität und Troponin I sind direkt nach dem Infarkt erhöht, gehen aber nach acht Wochen wieder in den Referenzbereich zurück. Die Werte des Kreatinins sind beim Tier direkt nach dem Infarkt als auch nach acht Wochen noch erhöht. BNP als Marker für geschädigtes Gewebe bei Herzversagen ist hier nicht nachweisbar. Die Entzündungsparameter bleiben ohne pathologischen Befund.

Medikation

Zwischen beiden Gruppen gibt es bei der Medikation bis auf die Gabe von Magnesium keinen signifikanten Unterschied. Die Magnesiumgabe ist in der ADC-Gruppe ($294,4 \pm 80,0 \text{mg}$) verglichen zur Kontrollgruppe ($217,9 \pm 31,3 \text{mg}$) vor der Randomisierung signifikant erhöht.

Zeit der Untersuchungen

Der Zeitrahmen für den kompletten Versuch während der Infarktinduktion (Tabelle 6) und bei der Nachuntersuchung nach 8 Wochen (Tabelle 7) bleibt zwischen beiden Gruppen gleich.

Die Zeitdauer für die Anästhesie, OP, Infarktlegung und Zellinjektion zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen ADC-Gruppe und Kontrollgruppe.

	Anästhesie	Chirurgie	Infarkt	Injektion
Kontrolle	8,06±0,03	6,08±0,04	3,08±0,00	1,11±0,01
ADC	8,39±0,03	6,15±0,03	3,08±0,01	1,49±0,03

Tabelle 6: Zeitdauer (Std.) während des Infarktes

	Anästhesie	Chirurgie
Kontrolle	4,50±0,10	3,16±0,10
ADC	4,42±0,04	3,11±0,06

Tabelle 7: Zeitdauer (Std.) bei der Untersuchung nach 8 Wochen

Ballongröße und Myokardinfarkt

Bei allen Tieren wird ein Infarkt induziert und anhand von Änderungen im EKG und der Serum-Herzenzymaktivität bestätigt. Die Induktion des Infarktes erfolgt mit angioplastischen Ballonkathetern der Firma Maverick in der Größe OTW 2,5 x 9 mm (n=7) und OTW 3,5 x 9 mm (n=8) und der Firma Titan in der Größe 4 x 9 mm (n=1). Der Ballon ist mit einem durchschnittlichen Druck von 3,3±2,0 atm (Bereich 1 – 8 atm) aufgeblasen, um einen totalen Verschluss der mittleren LAD zu erreichen. Die durchschnittliche Infarktdauer beträgt 3,08±0,01 Stunden (Tabelle 6). Auf den angiographischen Aufnahmen wird der Gefäßdurchmesser vor der Ballonlegung und während des aufgeblasenen Ballons berechnet und die Differenz bestimmt. Bei vier Tieren kommt es zu einer Überdehnung, die definiert wird, wenn der Durchmesser des aufgeblasenen Ballons mehr als 1,2-mal die natürliche Gefäßdicke überschreitet (Schwein 129, 132, 133, 136).

Eigene Untersuchungen

Tier	LAD Durchmesser (mm)	Aufgeblasener Ballon (mm)	Ballon/Arterien	Ballon Typ			Druck (atm)
				Durchmesser (mm)	Länge (mm)	Marke	
118	1,9	2,0	1,0	2,5	9	M	2,5
117	1,8	2,0	1,1	2,5	9	M	7,0
114	n/a	n/a	n/a	2,5	9	n/a	4,0
132	2,2	2,8	1,3	3,5	9	M	2,0
133	1,9	2,5	1,3	3,5	9	M	1,5
137	2,1	2,3	1,1	2,5	9	M	6,0
138	2,4	2,9	1,2	4,0	9	T	3,0

Tabelle 8: Kontrollgruppe: Infarktinduktion durch Verschluss der mittleren LAD mittels Ballon in Abhängigkeit des Gefäßdurchschnittes. M = Maverick OTW, T = Titan

Tier	LAD Durchmesser (mm)	Aufgeblasener Ballon (mm)	Ballon/Arterien	Ballon Typ			Druck (atm)
				Durchmesser (mm)	Länge (mm)	Marke	
120	1,9	2,2	1,2	2,5	9	M	8,0
113	2,1	2,2	1,1	2,5	9	M	3,0
125	2,1	2,3	1,0	2,5	9	M	4,0
126	2,3	2,4	1,0	3,5	9	M	2,0
129	1,8	2,2	1,3	3,5	9	M	1,0
130	2,0	2,3	1,1	3,5	9	M	1,0
134	2,3	2,4	1,0	3,5	9	M	3,0
136	2,5	2,9	1,3	3,5	9	M	2,5
139	2,3	2,9	1,1	3,5	9	M	3,0

Tabelle 9: ADC-Gruppe: Infarktinduktion durch Verschluss der mittleren LAD mittels Ballon in Abhängigkeit des Gefäßdurchschnittes. M = Maverick OTW, T = Titan

ADC-Zellinjektion

Die Zellen werden gewichtsabhängig mit $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Kilo Körpergewicht in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml appliziert. Während die ADC-Tiere $50,6 \pm 6,7 \times 10^6$ ADC-Zellen in $20,2 \pm 2,7$ ml Plasmalyte® erhalten, bekommen die Kontrolltiere eine vergleichbare Menge an Plasmalyte® von $18,2 \pm 3,6$ ml injiziert (Tabelle 10).

Die Zeitdauer der Injektion der Zellen beträgt $6,0 \pm 2,3$ min, während die aktuelle Geschwindigkeit mit der die Zellen injiziert werden $3,7 \pm 1,6$ ml/min. betragen. Hierbei besteht zwischen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied (Tabelle 10).

Schwein	Körpergewicht (kg)	ADC-Injektion ($\times 10^6$ Zellen)	Plasmalyte® (ml)
118	27,5	-	14,5
117	29,4	-	17,6
114	26,4	-	15,8
132	37,9	-	22,7
133	29,7	-	17,8
137	25,5	-	15,3
138	39,4	-	23,6
120	41,1	62	24,7
113	28,7	43	17,2
125	31,3	47	18,8
126	33,4	50	20,0
129	37,6	56	22,6
130	39,1	59	23,5
134	29,5	44	17,7
136	33,1	50	19,8
139	38,7	45	18,0

Tabelle 10: Körpergewicht, absolute Zellzahl und Trägersubstanz

Koronarfluss

Die Flusseigenschaften in dem Koronarsystem werden bei 11 Tieren nach acht Wochen gemessen. Bei zwei Tieren werden keine Daten in der proximalen LAD erhoben. Es gibt keine Unterschiede in den verschiedenen Durchflussparametern (APV and DSVR) und in der Flussreserve (CFR) zwischen beiden Gruppen sowohl vor der Gabe von Adenosin als auch unter Adenosinstimulation.

	LAD		LCX
	proximal	distal	proximal
Kontrolle	2,1±0,4	2,6±0,9	2,3±0,7
ADC	2,1±0,5	2,4±0,6	2,2±0,5

Tabelle 11: CFR (cm/s) der LAD und LCX nach 8 Wochen

Aufzeichnung von Arrhythmien und Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)

Die Aufzeichnung von Herzrhythmusstörungen erfolgte bei den 16 Studientieren (ADC 42.6±13.1 und Kontrolle 30±16.6 Tage) für insgesamt 592 Tage. Zwei Tiere, ein ADC-Tier und ein Kontrolltier, verstarben drei Tage nach dem Infarkt infolge von ventrikulären Fibrillationen, welche mit Hilfe des Reveals aufgezeichnet wurden (Abb.14). Andere Arrhythmien wie Tachykardien über 165/min. und Bradykardien unter 45/min., wurden nicht aufgezeichnet und vermerkt.

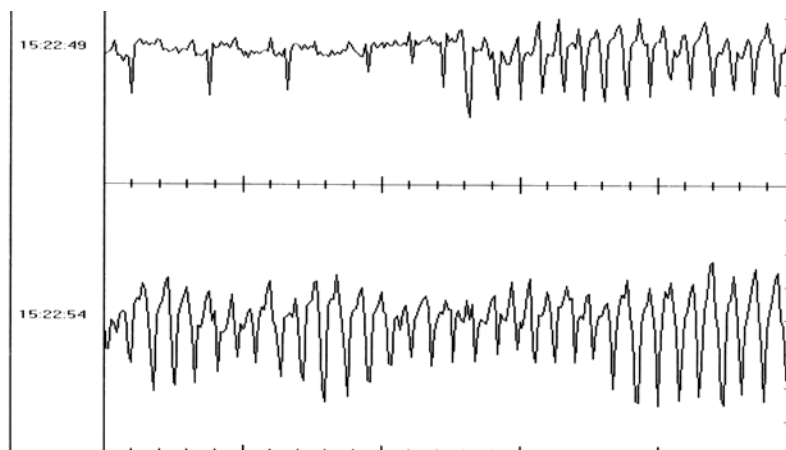


Abb.14: Aufzeichnung der ventrikulären Fibrillation

Die invasive elektrophysiologische Untersuchung wurde bei 8 Tieren der ADC-Gruppe und bei 7 Tieren der Kontrollgruppe durchgeführt. Bei zwei Tieren, davon eines der ADC-Gruppe und eines der Kontrollgruppe konnten keine Arrhythmien ausgelöst werden. Bei den verbleibenden ADC-Tieren sind mittels Stimulationsimpulsen ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern auslösbar, bei 5 Tieren waren 2 Impulse notwendig, bei den übrigen 3 Tieren wurden 3 Impulse gesetzt. In der Kontrollgruppe wurden bei 5 Tieren mit 2 Impulsen und bei einem Tier mit 3 Impulsen schwere Arrhythmien ausgelöst. In der angefügten Tabelle sind die Anzahl und die Zykluslänge der einzelnen Stimuli aufgeführt, die benötigt wurden, um eine Arrhythmie auszulösen. Die Zykluslänge des Kammerflimmerns wird im rechten Ventrikel nach einer Sekunde und nach 10 Sekunden der Arrhythmieinduktion gemessen und miteinander verglichen. Die Art und Länge der Arrhythmien zu den zwei verschiedenen Zeitpunkten sind in der folgenden Tabelle zu ersehen. In der ADC-Gruppe ist kein signifikanter Unterschied in der Zykluslänge zwischen den verschiedenen Zeitpunkten zu sehen.

	Kontrolle (ms)	ADC (ms)
S1	500	500
S2	268±24	286±21
S3	218±18 (n=5)	265±78 (n=2)
S4	190±0 (n=1)	246±80 (n=5)

Tabelle 12: Anzahl und Zykluslängen der Impulse, die zur Auslösung von Arrhythmien benötigt werden (*p>0.05)

Kontrolle				ADC			
1 s		10 s		1 s		10 s	
VT (n=2)	205±14ms	VT (n=2)	198±7	VT (n=5)	256±48	VT (n=3)	199±4
VF (n=4)	176±18*	VF (n=4)	118±28	VF (n=2)	213±28	VF (n=4)	136±13

Tabelle 13: Art und Länge der Arrhythmien nach 1 und nach 10 Sekunden der Induktion

Planimetrie: Infarktgröße und Wanddicke

Es gibt bei der initialen Infarktgröße nach Induktion keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Fläche des Infarktes im linken Ventrikel bei den ADC-Tieren beträgt $16 \pm 6\%$ und bei den Kontrolltieren $14 \pm 3\%$. Der Umfang des Infarktes ist in der ADC-Gruppe bei $32,88 \pm 9\%$ und in der Kontrollgruppe bei $33,05 \pm 7\%$ und zeigt auch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Die Daten der Wanddickenmessungen zeigen dagegen einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. Sowohl im Infarktgebiet, als auch in der Randzone ist die Dicke der linken Ventrikelwand in ADC behandelten Tieren signifikant höher als die der Kontrolltiere. Bei den ADC-Tieren beträgt diese $5,9 \pm 2$ mm im Infarktgebiet und $11,2 \pm 2,2$ mm in der Randzone, während bei der Kontrollgruppe die Wanddicke im Infarkt $3,6 \pm 1,2$ mm und in der Randzone $8,6 \pm 1,6$ beträgt ($p \leq 0,05$). Die Wanddicke des gesunden Myokards ist beiden Gruppen annähernd gleich.

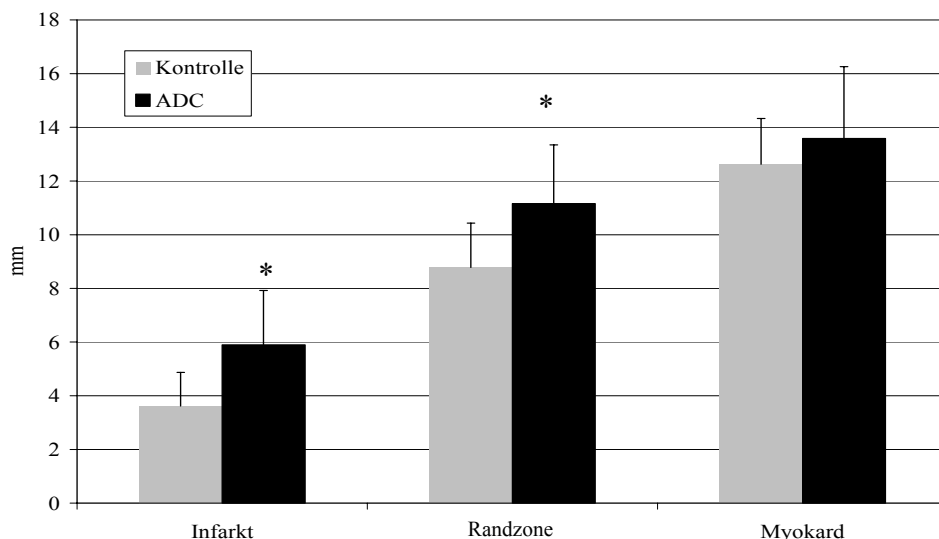


Abb.15: Wanddicke im Infarkt, in der Randzone und im gesunden Myokard im Vergleich zwischen ADC-Gruppe und Kontrolle (*= $p \leq 0,05$)

Kapillardichte

Die Anzahl an Kapillaren ist in der Randzone der ADC-Gruppe signifikant höher als die der Kontrollgruppe ($p \leq 0,05$). Im Infarktgebiet und im gesunden Myokard ist die Dichte der Kapillaren zwischen beiden Gruppen annähernd gleich.

	Infarkt	Randzone	Myokard
Kontrolle	25,7±14,2	32,9±12,6	99,4±29,9
ADC	25,3±15,4	41,6±17,9 *	103±20,9

Tabelle 14: Kapillardichte gezählt in 0,1mm² Feldern

Fibrose

Der Anteil an Fibrose in der ADC-Gruppe und in der Kontrollgruppe zeigt im gesunden Myokard, im Infarkt und somit auch im gesamten Feld keinen signifikanten Unterschied. Dagegen ist der Anteil an Muskelgewebe im gesamten Feld und im gesunden Myokard bei den ADC-Tieren verglichen zur Kontrolle signifikant erhöht (Tabelle 15).

	Muskelanteil in %			Fibroseanteil in %		
	Total	Myokard	Infarkt	Total	Myokard	Infarkt
Kontrolle	40,5±3,6	79,4±10,5	9,1±4,2	51,5±6,6	9,7±5,6	84,9±10,1
ADC	38,0±6,1*	72,7±13,1*	10,5±6,0	49,6±9,7	10,2±8,0	81,3±13,6

Tabelle 15: Anteil an Muskelgewebe und an Fibrose bei ADC-Gruppe und Kontrolle (*= $p \leq 0,05$).

Breite der Randzone

Die Ergebnisse der Randzonenbreite sind sowohl im Bezug auf die Messungen des Muskelanteils als auch die des Fibroseanteils bei beiden Gruppen unterschiedlich. Die Breite der Randzone in der ADC-Gruppe umfasst $420 \pm 159 \mu\text{m}$ im Bezug auf Muskelgewebe und $408 \pm 151 \mu\text{m}$ für den Fibroseanteil. In der Kontrollgruppe beträgt diese $378 \pm 162 \mu\text{m}$ (Muskelanteil) und $378 \pm 164 \mu\text{m}$ (Fibroseanteil). Der Unterschied zwischen ADC-Tieren und Kontrolle ist nicht signifikant.

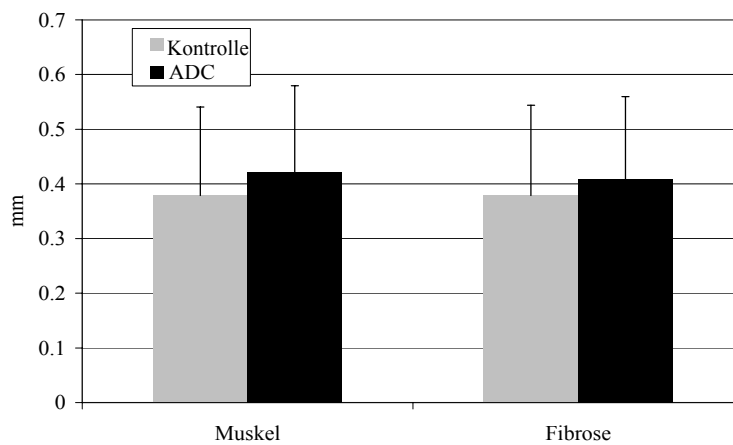


Abb.16: Vergleich der Randzonebreite beider Gruppen auf Muskelanteil und auf Fibroseanteil bezogen

4. Diskussion

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Das Schwein als Infarktmodell

Das Schwein eignet sich aufgrund seiner anatomischen Ähnlichkeiten zum menschlichen Herzen als Versuchsspezies in der Humanmedizin als Infarktmodell.

Seine Ausprägung des Koronarsystems ist dem Menschen insbesondere in der Entwicklung und im Verlauf der linken Koronararterie mit LAD und LCX sehr ähnlich. (Schummer et al. 1984, Winkhardt et al. 2005, Swindle et al. 1984-1988).

Das Kollateralsystem ist bei beiden Spezies weniger stark entwickelt (White et al. 1986, Maxwell et al. 1997, Schaper et al. 1967). Ihr intrakoronarer Verlauf, ihre verminderte Anzahl, die schwache Entwicklung ihrer Wanddickenstärke und ihre Größe, die nicht die normalen Arteriolenstärke erreicht, hat zur Folge, dass bei Verschluss der LAD das betroffene Myokard nicht im gleichen Umfang wieder durchblutet werden kann. Folglich kommt es zum Absterben von Gewebe. Die Inzidenz und Größe eines Infarktes ist dadurch beim Schwein viel stärker als beim Hund. Dieser hat ein viel besser entwickeltes Kollateralsystem, die Auslösbarkeit eines Infarktes ist umso schwieriger. Daher eignet sich der Hund weniger als Infarktmodell (Schaper et al. 1967, White et al. 1986).

Ein weiterer Vorteil ist das Verhältnis Herzgewicht/ Körpergewicht, das mit 0,5% bei 25-30kg Schweinen mit dem Menschen übereinstimmt. Sind die Schweine schwerer, stimmt das Größenverhältnis nicht mehr, weiterhin gibt es bei diesen Tieren mehr Komplikationen sowohl intraoperativ als auch postoperativ. Sie zeigen verstärkt Arrhythmien, die zu Kammerflimmern und zum plötzlichen Herztod führen. Außerdem ist die Behandlung kleiner Tiere gegenüber einem 100kg schweren Farmschwein einfach handlicher und sicherer, was den ganzen Versuchsaufbau erheblich erleichtert.

Im Bereich Koronarer Herzerkrankungen hat das Schwein bereits in verschiedenen Tiermodellen in den letzten Jahren in anderen Studien immer mehr Bedeutung

bekommen. Es gibt Stenosemodelle zur Untersuchung von chronischen Ischämien, die einerseits das Verständnis der Pathophysiologie aufklären sollten und andererseits die Fähigkeit zur therapeutischen Angiogenese untersucht haben (Fallavollita et al. 1997, Roth et al. 1987, Litvak et al. 1957).

4.1.2 Methodik der Infarktsetzung

Ein myokardialer Infarkt in Tiermodellen wurde bisher meist in Thorakotomien gezeigt, wobei der Infarkt unter Sicht durch Ligation der LAD gelegt wurde (Litvak et al. 1957, Fuchs et al. 2001, Liu et al. 2004). Die Überlegung eines Infarktmodells mittels Ballon hat gegenüber von Thorakotomien entscheidende Vorteile. Das chirurgische Trauma ist bei einer Thorakotomie viel größer als bei der Induktion mittels Ballon. Die damit verbundenen Komplikationen sind höher und verbunden mit einer höheren Mortalitätsrate. Zumal der Infarkt selber schon eine starke Beeinträchtigung für das Tier bewirkt, ist es sinnvoll zusätzliche Belastungen so gering wie möglich zu halten. Der Eingriff bei der Balloninfarktlegung ist dagegen ein minimal invasiver Eingriff, der sich nur auf den Gefäßzugang bezieht (Kraitchman et al. 2000, Naslund et al. 1992).

Außerdem haben Erfahrungen gezeigt, dass die Thorakotomie selber Einfluss auf die kardiale Funktion nach einem Infarkt und auf den Infarkt hinsichtlich der Größe zeigen. Weiterhin sind Artefakte bei der myokardialen Szintigraphie beobachtet worden, diese treten bei diesen Methoden häufiger auf als bei geschlossenen Modellen. Die kardiale Funktion insbesondere das Herzzeitminutenvolumen wird außerdem durch einen höheren Einsatz an Anästhesie und Analgesie, die bei so einem großem chirurgischen Einsatz wie der Thorakotomie notwendig ist, beeinträchtigt und die Belastung ist für das Tier erheblicher.

Weiterhin erlaubt der Verschluss des Gefäßes mittels Ballon eine weitgehende Kontrolle über Lokalisation und Länge des Infarktes. In anderen Studien, die mit Injektion von thrombogenen Materialien gearbeitet haben, ist die Infarktlänge schwer kontrollierbar und das Risiko für weitere nicht vorhersehbare Thrombosen durch Abschwemmen dieser

Materialien in weitere Gefäßabschnitte erhöht (Dogen et al. 2005, Suzuki et al. 1999, Herr et al. 1988).

Die Anwendung von Kathetern und Ballon ist im klinischen Bereich bereits standardisiert. Die Vorbereitung ist hier einfacher und schneller in ihrem Ablauf. Nach eingeleiteter Anästhesie und erfolgtem Gefäßzugang, kann die Katheterisierung der LAD und die Platzierung des Ballons bereits in 10 Minuten vollzogen werden. Die Lokalisation und Zeitdauer sind exakt kontrollierbar und eine sofortige Reperfusion ist möglich (Reffermann et al. 2004, Krombach et al. 2005). Die intrakoronare Applikation der Stammzellen kann direkt nach der Reperfusion kontrolliert vollzogen werden.

4.1.3 Narkose

Ziel ist eine möglichst schonende Narkose, die insbesondere die kardiale Funktion so wenig wie möglich beeinträchtigen soll. Im Sinne einer "Balanced Anesthesia" werden mehrere Präparate miteinander kombiniert, wobei die erwünschten Eigenschaften sich ergänzen und die Nebenwirkungen und die Dosis verringern sollen (Erhardt et al. 1992). Isofluran hat eine geringere kardiodepressive Wirkung als die anderen Inhalationsanästhetika (Herzstopindex 3,0) und ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Vasodilatation, die zur Senkung des arteriellen Blutdrucks führt (Paddleford et al. 1988, Muir et al. 1989). Propofol bewirkt ebenfalls eine Depression auf den Kreislauf, jedoch verhält sich Propofol ganz anders als Isofluran. Die Depression auf den Basoreflex ist bei Isofluran stärker ausgebildet und resultiert in einer stärkeren Abnahme der Herzfrequenz (Nishikawa et al. 2004, Sellgren et al. 1992). Propofol bewirkt durch Abnahme der arteriellen Elastance und Zunahme der Compliance eine bessere Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks als Isofluran (Deryck et al. 1997). Auch eine bessere Aufrechterhaltung des Herzzeitvolumens konnte beim Propofol beobachtet werden (Goodchild et al. 1989). Durch die Kombination beider kann der negative Effekt auf die Kardiovaskularität gemindert werden. Zusätzlich haben Kokita et al. nachgewiesen, dass Propofol eine kardioprotektive Wirkung hat, indem sie die negativen

Auswirkungen im ischämischen Myokard nach der Reperfusion minimieren (Lim et al. 2005, Kokita et al. 1998, Ko et al. 1997).

Für die Analgesie bietet sich die Kombination mit Fentanyl an. Fentanyl hat eine ausgezeichnete analgetische Wirkung, zählt zu den kurzzeitigen Opioiden und wirkt synergistisch auf die Plasmakonzentration von Propofol (Paddleford et al. 1988, Vuyk et al. 1997). Der Nachteil des Fentanyls ist die Auslösung einer Bradykardie am Herzen, die durch eine Dauerperfusion besser als durch Boligaben kontrollierbar ist.

Mit dieser Kombination der Balanced Anesthesia, indem eine geringe Konzentration von Isofluran (max 1%) mit Dauertropfinfusionen von Propofol und Fentanyl kombiniert wurden, konnten gute Erfahrungen beim Hund gemacht werden. Auch bietet sich diese Kombination bei geriatrischen Patienten an, die durch eingeschränkte Herz-Kreislauffunktion einen verminderten Cardiac Output haben (Erhardt et al. 1988).

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Überlebensrate

Neun von den elf verstorbenen Tieren sind hauptsächlich an kardiogen bedingten Komplikationen verendet. Bei vier Tieren kam es zu schweren Herzrhythmusstörungen, die zum Herztod geführt haben, drei davon starben postoperativ, eines intraoperativ.

Als Ursache kommen Irritationen und kleine Verletzungen in Frage, die durch die Intervention mit Katheter und Führungsdrähten, das Aufblasen des Ballons hervorgerufen werden. Diese bewirken eine Reizung des Erregungsleitungssystems, was zu diesen schweren Arrhythmien führen kann. Besonders Schweine sind prädisponierter als andere Tierspezies (Dogne et al. 2005, Kraitchman et al. 2000, Naslund et al. 1992).

Durch die prophylaktische Gabe von β -Blockern, Cordarex, Magnesium und Nitroglycerin kann die Gefahr von Arrhythmien gemindert werden. Bei unseren Schweinen konnten wir dies durch eine längere Verabreichung an β -Blockern von 2

Tagen postoperativ in der Pilotstudie auf 7 Tagen in der Hauptstudie beobachten, die Anzahl von schweren Arrhythmien konnte gesenkt werden. Aus der Humanmedizin ist bekannt (American Heart Association 2006), dass die Überlebensrate höher ist, wenn die Möglichkeit einer sofortigen Defibrillation gegeben ist. Dadurch konnte auch bei unseren Tieren ein Kammerflimmern intraoperativ in den meisten Fällen bis auf ein Tier (Schwein 124), das trotz sofortigem Einsatz und Medikation mit Magnesium und Cordarex nicht gerettet werden konnte, minimiert werden.

Andere Ursachen sind Gefäßverschlüsse, die durch Thromben, Spasmen und durch die injizierten Zellen hervorgerufen werden. Schwein 109 starb durch Verlegung des Ballons mit darauffolgender Thrombusbildung. Bei den beiden Gefäßverschlüssen (Schwein 127 und 135) handelt es sich jeweils um ein Kontrolltier und ein ADC-Tier. Die postoperativ gestorbenen Tiere, sind zwei Kontrolltiere und ein ADC-Tier.

Die Entwicklung einer Stenose konnte bei einigen Tieren nach 8 Wochen festgestellt werden. Als Ursache kommt eine durch Überdehnung des Ballons ausgelöste Endothelverletzung mit folgender Plaquebildung in Frage.

Eine weitere Beobachtung ist, dass alle Tiere, die ein Anfangsgewicht von über 50 kg hatten, entweder intraoperativ oder kurz nach dem Infarkt gestorben sind. Es ist anzunehmen, dass es zu einem Missverhältnis zwischen Herz und Körpergewicht kommt. Das Herz ist verglichen zum Körpergewicht zu klein, um eine ausreichende Blutversorgung zu gewährleisten. In der Angiographie erschien die LAD als stark gebogenes Gefäß, was ein Indikator für eine über einen längeren Zeitraum anhaltende Druckbelastung oder eine bestehende hypertrophe Kardiomyopathie ist. Nach Platzieren des Ballons in die LAD, begann schweres Kammerflimmern, das nur durch mehrere Defibrillationen unter Kontrolle gebracht werden konnte. Durch die Platzierung weiter distal wurde versucht, diese Komplikationen zu minimieren, jedoch ist dann die Infarktgröße kleiner als bei den anderen Tieren und führt zum Ausschluss dieser Tiere aus der Studie. Komplikationen dieser Art in diesem frühen Stadium sind in anderen Studien bisher noch nicht beobachtet worden, auch bei Schweinen kleinerer Größe ist dies nicht beschrieben worden. Dieses Tier (Schwein 121) erlitt nach weiteren

wiederholten Kammerflimmern einen kardiogenen Schock. Die Sektion ergab eine linksventrikuläre Hypertrophie. Wir kommen zur Schlussfolgerung, dass Farmschweine über 50 kg sich nicht als Infarktmodell eignen, sie entwickeln entsprechend ihrer Rasse als Farmschwein eine überdurchschnittliche Muskelmasse, welche unproportional zum Herzen ist. Schwein 124 und 122 erlitten in der ersten Nacht postoperativ eine ventrikuläre Tachykardie, die zum Herzversagen führte.

Drei Tiere starben an nicht kardiogen bedingte Komplikationen: Tier 123 erlitt innerhalb der ersten zwei Wochen einen Analprolaps und musste euthanasiert werden. Schwein 141 starb direkt nach Einleitung der Anästhesie, die anschließende Sektion zeigte, dass das Tier an einer enzootischen Pneumonie erkrankt war, die oft klinisch inapparent verlaufen kann (Waldmann et al. 2004). Bei Schwein 140 stellte sich in der Angiographie ein Ventrikelseptumdefekt fest, dieser wurde in der anschließenden Sektion bestätigt.

Kammerflimmern und ventrikuläre Tachykardien sind als Komplikationen nach einem Infarkt bekannt und mit einer relativen hohen Mortalität (Kraitchman et al. 2000) verbunden. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der ADC-Gruppe, die darauf schließen lässt, dass die intrakoronaren applizierten Zellen zu stärkeren Komplikationen führen und einen Verschluss der LAD bewirken.

4.2.2 Pathologische und Immunhistologische Befunde

In unserer Studie konnten wir bei allen Tieren einen Infarkt auslösen, der sich neben den klinischen Parametern in den pathologischen Ergebnissen bestätigen ließ. Makroskopisch ist der Infarkt als weißes Narbengewebe distal der LAD im Bereich des linken Ventrikels bis zur Herzspitze sichtbar. Histologisch ist im Infarktgebiet die Anzahl der Kapillaren signifikant niedriger als im gesunden Myokard, der Anteil an Fibrose gegenüber Muskelgewebe ist bei beiden Gruppen hoch. Alle sind sichere Indikatoren für einen Infarkt. Die Tiere, denen die Stammzellen appliziert wurden, zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Infarktgröße gegenüber den Kontrolltieren. Damit lässt sich nicht beweisen, dass die Zellen selber bei ihrer Applikation das Risiko einer Verlegung der

LAD und dadurch eine Verschlimmerung des Infarktes bewirken. Auch konnten wir das verstärkte Risiko an Thrombosen und Gefäßverschlüssen bei den ADC-Tieren beobachten.

Im Gegensatz dazu konnten wir in unserer Studie zeigen, dass die Tiere, denen die Stammzellen appliziert wurden, einen signifikanten Ansatz zur Verbesserung auf die Heilung nach einem Myokardinfarkt zeigen. Die Anzahl an Kapillaren ist in der Randzone des Infarktgebietes gegenüber den Kontrolltieren signifikant erhöht. Normalerweise wird bei einer Ischämie die Angiogenese durch Expression von Rezeptoren und Mediatoren, die die Adhäsion, Migration und Differenzierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark leiten, gesteuert. Diese zieht sich vom gesunden Gewebe in Richtung Infarktzentrum fort, in der Randzone einer Ischämie sind als erstes die Ansätze einer Gefäßneubildung zu sehen. Für die höhere Anzahl an Kapillaren in der Randzone, kommen zwei Ursachen in Betracht: Erstens sind weniger Gefäße abgestorben als im Zentrum des Infarktes und zweitens sind die Neubildungen dieser Gefäße am Rand einer Ischämie als erstes zu sehen.

Die signifikante Zunahme der Neogenese bei den ADC-Tieren lässt darauf schließen, dass die Stammzellen einen positiven Effekt auf diese Entwicklung haben. In Studien mit Stammzellen aus dem Knochenmark konnte mehrmals gezeigt werden, dass sie zur Erhöhung der Kapillardichte beitragen (Nagaya et al. 2005), weiterhin zeigen sie eine Differenzierungsfähigkeit in glatten Gefäßmuskelzellen und die Produktion von Angiogenese-Faktoren (VEGF) (Al-Khaldi et al. 2003, Tse et al. 2003, Tateishi-Yuyama et al. 2002). Alle diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass diese Stammzellen die Neogenese induzieren können und somit zu einer Verbesserung der Durchblutung im ischämischen Herzen beitragen. Die Erhöhung der Kapillardichte bei den ADC-Tieren lassen darauf schließen, dass die Stammzellen die Fähigkeit, die Neogenese zu induzieren, ebenfalls besitzen.

Eine weitere Beobachtung ist die signifikante Wanddickenzunahme im linken Ventrikel innerhalb des Infarktes und der Randzone. Normalerweise ist die Wand des infarzierten Gewebes dünn, nekrotisch, dilatiert und später durch Bindegewebe ersetzt. In Studien

konnte nach Behandlung mit Knochenmarksstammzellen eine Wanddickenzunahme und eine Infarktverkleinerung festgestellt werden (Orlic et al. 2001). In unserer Studie ist die Infarktgröße bei beiden Gruppen gleich, jedoch ist eine Zunahme der Wanddicke bei den ADC-Tieren signifikant. Die Zunahme der Wanddicke im Zusammenhang mit dem höheren Anteil an Muskelgewebe bei den ADC-Tieren lässt auf eine Verbesserung der Myokardstruktur nach einem Infarkt und somit auf eine verbesserte Herzfunktion schließen.

4.2.3. Die Identifikation der Stammzellen

Die eindeutige Identifikation von adulten mesenchymalen Stammzellen mittels eines spezifischen Markers ist heute weiterhin noch nicht geklärt und steht immer wieder in der Diskussion. Es gibt eine Reihe von Oberflächenantigenmarkern, die für Stammzellen aus dem Knochenmark und aus dem subkutanem Fettgewebe analysiert worden sind (Zuk et al. 2002, Strem et al. 2005). Insbesondere die Bedeutung von STRO-1, der sowohl positiv für MSCH als auch für ADC ist, ist anfangs als vielversprechender Marker für die Identifikation von mesenchymalen Stammzellen diskutiert worden, wurde aber dann von anderen Arbeitsgruppen wieder relativiert (Dennis et al. 2002). Die alleinige Benutzung von Oberflächenmarkern zur Identifikation von Stammzellen reicht daher nicht aus. Die Charakterisierung anhand der Morphologie ist ebenfalls schwierig, da die Stammzellen sich nicht von den undifferenzierbaren Fibroblasten unterscheiden lassen.

Die mögliche Identifikation erfolgt durch die Kombination von Oberflächenexpressionsmuster der Zellen, Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit, beide, die als Charaktermerkmale von undifferenzierten Stammzellen definiert sind (Hall et al. 1989).

Wir untersuchten unsere Zellen, nachdem diese aus dem subkutanem Fettgewebe gewonnenen wurden, auf Expression der Oberflächenmarker, Proliferationsfähigkeit und inwieweit sie sich weiter differenzieren können. Nachdem sie nach einem von Bjornorp et al. 1978 etablierten Verfahren isoliert worden sind, wurde ein Teil von jeder Zellfraktion, die dem Schwein injiziert wurde, zur weiteren Charakterisierung in Kultur

genommen. Bereits nach 24 Stunden wurden diese adhären. Die darauffolgende FACS Analyse ergab eine starke Präsenz für CD 90, der als ein Marker für mesenchymale Stammzellen gilt und eine schwache Präsenz für CD 31, der ein Indikator für hämatopoetische Linien ist, und für CD 45, der ein Indikator für Leukozytenkontamination in der Zellfraktion darstellt. Das bedeutet für unsere Zellfraktion, die injiziert wurde, dass sie trotz Separation und mehrfacher Filtrationsschritte nicht vollständig rein ist, aber der Anteil an nicht mesenchymalen Zellen bedeutend gering ist. Schlussfolgernd lässt sich somit nicht nur eine qualitative sondern auch eine quantitative Aussage über die Zellpopulation treffen. Weiterhin sind unsere ADC-Zellen positiv für CD 44, CD 105 und CD 117 getestet worden.

Die Untersuchung der Proliferationsrate bei unserer Zellpopulation wurde in einem weiteren Verfahren analysiert. Dabei wurden farblich markierte Kolonien einer bestimmten Zellanzahl über einen bestimmten Zeitraum verfolgt und gezählt.

Die Differenzierungsfähigkeit in verschiedene Zelltypen, die sowohl für Stammzellen aus dem Knochenmark als auch aus subkutanem Fettgewebe (Zuk et al. 2002) analysiert worden ist, konnten wir bei unserer Zellpopulation ebenfalls beobachten. Dabei konnten isolierte ADC in folgende mesenchymale und nichtmesenchymale Linien differenziert werden: 1. Adipogenese, 2. Osteogenese, 3. Chondrogenese (mesenchymal) und 4. Neurogenese (nichtmesenchymal). Abb. 17 zeigt die Differenzierung in Adipozyten, wobei die Zellen mit Red Oil O angefärbt werden und Fetttröpfchen im Zytoplasma lichtmikroskopische als rote Akkumulationen zu erkennen sind. Abb. 18 stellt osteogene Differenzierung mittels Alizarin-Rot-Färbung dar, wobei der Mineralisierungsgrad von Gewebe durch die Ausfällung von Calcium definiert wird.

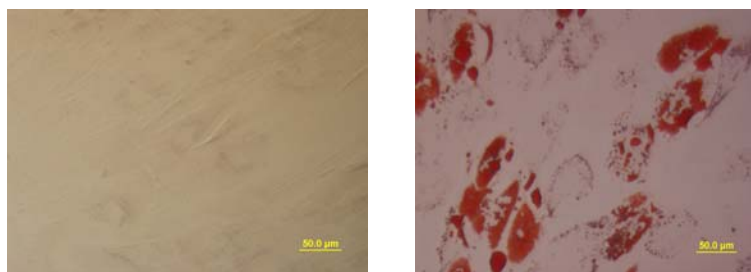


Abb. 17: Zellkultur nach 3 Wochen in Kontrollmedium (links) und adipogenen Medium (rechts)

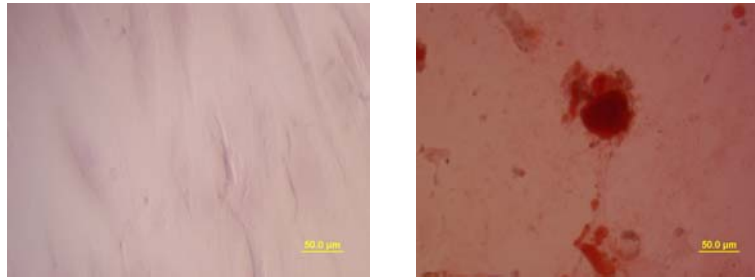


Abb. 18: Zellkultur nach 3 Wochen in osteogenen Medium (rechts) und in Kontrollmedium (links)

Ein weiterer interessanter Faktor ist die Aktivität und das Schicksal der injizierten ADC-Zellen. Studien mit Knochenmarksstammzellen haben gezeigt, dass sich die injizierten Zellen im Infarktgebiet mittels histologischen und immunhistochemischen Analysen nachweisen lassen (Orlic et al. 2001, Bittira et al. 2003). In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnten Stammzellen aus dem Knochenmark, die mit GFP markiert waren, im Infarktgewebe mit Hilfe immunhistochemischer Färbung identifiziert werden. Dabei wurde die gleiche Methodik der Infarktinduktion und Zellapplikation angewandt wie bei unseren ADC-Zellen. Mit dem Unterschied, dass es sich bei den ADC-Zellen im Gegensatz zu den Knochenmarksstammzellen um frisch isolierte und nicht um kultivierte Zellen handelt. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Zellen in erster Linie auf ihre Sicherheit und Pathologie zu testen waren und ihre Entnahme, Aufbereitung mit in das Infarktmodell zu integrieren, erzielt worden ist. Das Schicksal dieser Zellen, ihre Aktivität und inwieweit die Fähigkeit der Differenzierungsfähigkeit im applizierten Gewebe besteht, ist noch nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Unseren Ergebnissen zur Folge konnten wir ein Infarktmodell am Schwein mittels einer minimal invasiven Methode entwickeln. Die hohe Inzidenz von ventrikulären Tachykardien und Kammerflimmern sind die häufigsten Komplikationen nach einem Myokardinfarkt und mit einer hohen Mortalität verbunden. Durch prophylaktische Gabe von Antiarrhythmika und Antikoagulantien, die Auswahl kleinerer Schweine und Optimierung des Versuchablaufs konnten diese Probleme minimiert werden. Dieses Modell eignet sich durch optimale Kontrolle der Lokalisation und Dauer des Infarktes für MI-Studien und erlaubt im Bereich der Stammzellforschung neue Möglichkeiten.

Die Verwendung von adulten Stammzellen zur Prevention des Remodelling nach einem akuten Herzinfarkt ist ein neues Therapiekonzept. Anders als die bisherigen Therapieformen eröffnet sie neue Perspektiven, die Herzfunktion zu regenerieren. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass die Stammzellen aus dem subkutanen Fettgewebe einen positiven Effekt auf die Neovaskularisation und das Remodelling nach einem akuten Myokardinfarkt haben und zur Verbesserung der Herzfunktion beitragen. Weiter ist es notwendig die Komponenten der Reparaturmechanismen zu untersuchen und zu verstärken, es gilt näher zu untersuchen, welche Botenstoffe und Signalstoffe vom ischämischen Herzen produziert werden und zur Chemoattraktion der Stammzellen führt. Durch besseres Verständnis dieser Mechanismen (Mobilisation, Homing, Differenzierung) kann die Differenzierungsfähigkeit und die Funktionalität der Zellen nach der Transplantation optimiert werden.

5. Zusammenfassung

Die Transplantation von adulten autologen Stammzellen ist ein vielversprechender Ansatz für die Regeneration nach einem Myokardinfarkt. Das Ziel dieser Studie war ein Infarktmodell beim Schwein zu entwickeln und den Effekt von Stammzellen aus dem subkutanen Fettgewebe auf die myokardiale Funktion nach einem Infarkt zu untersuchen.

Versuchsdurchführung: In 17 Schweinen (33 ± 5 kg, ADC Tiere $n=8$, Kontrolle $n=7$) wurde ein Infarkt durch Verschluss der mittleren LAD mittels eines angioplastischen Ballons über 3 Stunden induziert. Zur gleichen Zeit wurden Stammzellen aus dem subkutanen Fettgewebe gewonnen. Nach Reperfusion wurden diese in einer Zellsuspension (1.5 Millionen autologe Zellen/kg Körpergewicht) oder Kontrolllösung durch den Ballon direkt in das Infarktgebiet injiziert. Direkt im Anschluss und 4 Wochen später erfolgte eine myokardiale Szintigraphie (Gated SPECT, ^{99m}Tc -SestaMIBI), um die Funktion und Reperfusion des linken Ventrikels zu ermitteln. Während der folgenden 8 Wochen wurde ein EKG durch ein Aufzeichnungsgerät ermittelt, auftretende Events gespeichert und mittels Telemetrie auf einen PC übertragen. Nach 8 Wochen wurde der Koronarfluss untersucht und im Anschluss erfolgte eine elektrophysiologische Untersuchung und dritte myokardiale Szintigraphie. Die Tiere wurden euthanasiert, die Herzen wurden entnommen und in 1cm breite Sektionen geschnitten (Herzspitze zur Herzbasis). Die Infarktgröße und Wanddicke des linken Ventrikels wurde durch Planimetrie bestimmt. Weiterhin wurden die Kapillardichte und der Fibroseanteil in der Randzone ermittelt.

Ergebnisse: Es konnte bei allen Tieren ein Infarkt induziert werden, der durch Veränderungen im EKG und Anstieg der Serum-Herzenzymaktivität bestätigen ließ. Vier Tiere starben durch schwere Arrhythmien, die zum Herzversagen führten. Zwei Tiere entwickelten eine Stenose in dem Bereich, in dem der Ballon platziert war. Zwischen der ADC-Gruppe und der Kontrollgruppe gab es sowohl im Koronarfluss, den hämodynamischen Parametern und Laborparametern keine Unterschiede. Bei der elektrophysiologischen Untersuchung konnte bis auf 2 Tiere ein Kammerflimmern

ausgelöst werden, zwischen beiden Gruppen konnte kein Unterschied festgestellt werden. Die Wanddicke im Infarktgebiet und in der Randzone ist bei den ADC-Tieren signifikant dicker, die Kapillardichte in der Randzone ist bei den ADC-Tieren signifikant stärker entwickelt ($p \leq 0.05$).

Ausblick: In dieser Studie konnten wir erfolgreich ein Infarktmodell beim Schwein entwickeln. Die größten Komplikationen haben sich in Form von Kammerflimmern und Verlegung der LAD unabhängig von einer Zellinjektion gezeigt. Weiterhin konnte ein positiver Effekt der Stammzellen auf die Wanddicke und Kapillardichte nach einem Myokardinfarkt gezeigt werden. Unseren Ergebnissen zur Folge haben Stammzellen aus dem subkutanen Fettgewebe einen positiven Effekt auf die Neovaskularisation und das Remodelling nach einem akuten Myokardinfarkt und tragen zu einer Verbesserung der Herzfunktion bei.

6. Summary

Background: Transplantation of adult autologous stem cells is considered a promising approach for cardiac regeneration after myocardial infarction (MI). The aim of this study was to design an infarct model in pigs and to determine the effect of adipose derived stem cells (ADCs) in pigs following acute MI.

Methods: MI was induced in 17 pigs (33±5 kg, ADC animals n=8, control n=7) by occlusion of the mid LAD with an angioplasty balloon for three hours. In the same procedure stem cells were harvested from subcutaneous fat tissue and processed. After reperfusion a cell suspension containing the ADCs (1.5 million autologous cells/kg body weight) or control solution was injected through the balloon. Nuclear scan (Gated SPECT, ^{99m}Tc-SestaMIBI) was performed immediately and after 4 weeks to assess the global and regional perfusion and function of the left ventricle. During the following 8 weeks the pigs were monitored by an ECG loop recorder, triggering events were recorded, stored and downloaded via telemetry. After 8 weeks the animals underwent programmed ventricular stimulation and the hemodynamic functional measurements, coronary flow measurements and a third nuclear imaging scan were performed. The animals were euthanized, the hearts removed and sliced in 1 cm sections (apex to basis) to investigate the infarct size, wall thickness by planimetry, the fibroses in the border zone and the capillary density.

Results: An acute myocardial infarction could be successfully induced in all pigs and was confirmed by changes in ECG and cardiac enzymes. Four animals died from ventricular defibrillation, two animals had developed a stenosis at the former site of balloon placement at 8-week follow up. There were no differentiates in the flow measurement, hemodynamic and laboratory parameters between ADC group and control group. Except 2 animals ventricular fibrillation could be induced in all animals, there were no differentiation between both groups. The wall in the infarct area was significantly thicker in the ADC group compared to the control group as well as in the

border zone. The capillary density in the border zone of the ADC group was significantly increased ($p \leq 0.05$) compared to the control group.

Conclusion: In this study we could performed successful an infarct model in pigs. Major problem has been shown in ventricular fibrillation and occlusion of the LAD independent of cell injection. Further this study shows a positive effect of ADCs on wall thickness and capillary density after acute MI. Our data suggest that subcutaneous adipose tissue exhibits a beneficial effect on vascular density and remodeling and therefore might be a valuable alternative source of cells to improve cardiac regeneration after acute MI.

7. Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

Allwork S.P.

The applied anatomy of the arterial blood supply to the heart in man
J Anat. 1987, 153:1-16

Al-Khaldi A., Al-Sabti H., Galipeau J., Lachapelle K.

Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model
Ann Thorac Surg. 2003, 75(1):204-9

Al-Khaldi A., Eliopoulos N., Martineau D., Lejeune L., Lachapelle K., Galipeau J.

Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo
Gene Ther. 2003, 10(8):621-9

American Heart Association

Statistic Updates, Dallas, 2003

Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M.

Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis
Science 1997, 275(5302):964-7

Aust L., Devlin B., Foster S.J., Halvorsen Y.D., Hicok K., du L.T., Sen A., Willingmyre G.D., Gimble J.M.

Yield of human adiposederived adult stem cells from liposuction aspirates
Cytotherapy 2004, 6: 7-14

Bacigalupo A., Tong J., Podesta M., Piaggio G., Figari O., Colombo P., Sogno G., Tedone E., Moro F., Van Lint M.T.

Bone marrow harvest for marrow transplantation: effect of multiple small (2 ml) or large (20 ml) aspirates
Bone Marrow Transplant. 1992, 9: 467-470

Beltrami A.P., Urbanek K., Kajstura J., Yan S.M., Finato N., Bussani R., Nadal-Ginard B., Silvestri F., Leri A., Beltrami C.A., Anversa P.

Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction
N Engl J Med. 2001, 344(23):1750-7

Beltrami C.A., Finato N., Rocco M., Feruglio G.A., Puricelli C., Cigola E., Quaini F., Sonnenblick E.H., Olivetti G., Anversa P.

Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans
Circulation 1994, 89(1):151-63

Bharati S., Levine M., Huang S.K., Handler B., Parr G.V., Bauernfeind R., Lev M.

The conduction system of the swine heart
Chest. 1991, 100(1):207-12

Bittira B., Shum-Tim D., Al-Khaldi A., Chiu R.C.

Mobilization and homing of bone marrow stromal cells in myocardial infarction
Eur J Cardiothorac Surg. 2003, 24(3):393-8

Bjorntorp P., Karlsson M., Pertoft H., Pettersson P., Sjostrom L., Smith U.

Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes
J Lipid Res. 1978, 19:316-24

Bloor C.M., Liebow A.A.

Coronary Collateral Circulation
Am J Cardiol. 1965, 16:238-52

Bloor C.M., White F.C., Sanders T.M.

Effects of exercise on collateral development in myocardial ischemia in pigs
J Appl Physiol. 1984, 56(3):656-65

Bogen D.K., Rabinowitz S.A., Needleman A., Mc Mahon T.A., Abelmann W.H.

An analysis of the mechanical disadvantage of myocardial infarction in the canine left ventricle
Circ Res. 1980, 47:728-41

Bollen P.J.A., Hansen A.K., Rasmussen H.J.

The Laboratory Swine
CRC Press, Boca Raton, FL, 1999

Buja L.M.

Myocardial ischemia and reperfusion injury
Cardiovasc Pathol. 2005, 14(4):170-5

Cohen M., Rentrop K.P.

Limitation of myocardial ischemia by collateral circulation during sudden controlled coronary artery occlusion in human subjects: a prospective study
Circulation 1986, 74(3):469-76

Cowan C.A., Klimanskaya I., Mc Mahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., Mc Mahon A.P., Powers D., Melton D.A.

Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts
N Engl J Med. 2004, 350(13):1353-6

Dennis J.E., Carbillet J.P., Caplan A.I., Charbord P.

The STRO-1+ marrow cell population is multipotential
Cells Tissues Organs. 2002, 170(2-3):73-82

De Ugarte D.A., Alfonso Z., Zuk P.A., Elbarbary A., Zhu M., Ashjian P., Benhaim P., Hedrick M.H., Fraser J.K.

Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow
Immunol Lett 2003, 89: 267-270

Deryck Y.L., Brimiouille S., Maggiorini M., de Canniere D., Naeije R.

Systemic vascular effects of isoflurane versus propofol anesthesia in dogs
Anesth Analg. 1996, 83(5):958-64

Dogne J.M., Rolin S., Petein M., Tchana-Sato V., Ghuysen A., Lambermont B., Hanson J., Magis D., Segers P., Pirotte B., Masereel B., Drion P., D'Orio V., Kolh P.

Characterization of an original model of myocardial infarction provoked by coronary artery thrombosis induced by ferric chloride in pig
Thromb Res. 2005, 116(5):431-42

Erhardt W., Haberstroh J., Schindele M., Niehaus B., Vick K.P., Blumel G.

The principle of "balanced anesthesia" in high risk canine patients
Tierarztl Prax. 1988, 16(2):179-85

Fallavollita J.A., Perry B.J., Canty J.M. Jr.

18F-2-deoxyglucose deposition and regional flow in pigs with chronically dysfunctional myocardium. Evidence for transmural variations in chronic hibernating myocardium
Circulation 1997, 95(7):1900-9

Feneis H., Dauber W.

in: Pocketatlas of the human anatomy-4th edition
Based on the International Nomenclature
Thieme, New York, USA, 2000

Fishbein M.C., Maclean D., Maroko P.R.

The histopathologic evolution of myocardial infarction
Chest. 1978, 73(6):843-9

Fuchs S., Baffour R., Zhou Y.F., Shou M., Pierre A., Tio F.O., Weissman N.J., Leon M.B., Epstein S.E., Kornowski R.

Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia
J Am Coll Cardiol. 2001, 37(6):1726-32

Gaudron P., Eilles C., Ertl G., Kochsiek K.

Compensatory and noncompensatory left ventricular dilatation after myocardial infarction: time course and hemodynamic consequences at rest and during exercise
Am Heart J. 1992, 123(2):377-85

Gill M., Dias S., Hattori K., Rivera M.L., Hicklin D., Witte L., Girardi L., Yurt R., Himel H., Rafii S.

Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR 2(+) AC 133(+) endothelial precursor cells
Circ Res. 2001, 88(2): 167-74

Goodchild C.S., Serrao J.M.

Cardiovascular effects of propofol in the anaesthetized dog
Br J Anaesth. 1989, 63(1):87-92

Gupta K.B., Ratcliffe M.B., Fallert M.A., Edmunds L.H. Jr., Bogen D.K.

Changes in passive mechanical stiffness of myocardial tissue with aneurysm formation
Circulation 1994, 89:2315-26

Hall P.A., Watt F.M.

Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity
Development 1989, 106(4):619-33

Herr M.D., McInerney J.J., Copenhaver G.L., Morris D.L.

Coronary artery embolization in closed-chest canines using flexible radiopaque plugs
J Appl Physiol. 1988, 64(5):2236-9

Holmes J.W., Nunez J.A., Covell J.W.

Functional implications of myocardial scar structure
Am J Physiol. 1997, 272:H 2123-30

Holmes J.W., Borg T.K., Covell J.W.

Structure and mechanics of healing myocardial infarcts
Annu Rev Biomed Eng. 2005;7:223-53

Hughes H.C.

Swine in cardiovascular research
Lab Anim Sci. 1986, 36(4):348-50

**Jackson K.A., Majka S.M., Wang H., Pocius J., Hartley C.J., Majesky M.W.,
Entman M.L., Michael L.H., Hirschi K.K., Goodell M.A.**

Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells
J Clin Invest. 2001, 107(11):1395-402

James T.N.

In: Anatomy of the Coronary Arteries
Harper & Row Publishers, Hagerstown, NY, 1961

Jennings R.B., Murry C.E., Steenbergen C.Jr., Reimer K.A.

Development of cell injury in sustained acute ischemia
Circulation 1990, 82(3 Suppl):II2-12

Jennings R.B., Reimer K.A.

The cell biology of acute myocardial ischemia
Annu Rev Med. 1991, 42:225-46

Jugdutt B.I.

Prevention of ventricular remodelling post myocardial infarction: timing and duration of therapy
Can J Cardiol. 1993, 9(1):103-14

Jugdutt B.I., Joljart M.J., Khan M.I.

Rate of collagen deposition during healing and ventricular remodeling after myocardial infarction in rat and dog models
Circulation 1996, 94(1):94-101

Jugdutt B.I.

Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough?
Circulation 2003, 108(11):1395-403

**Kehat I., Kenyagin-Karsenti D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E.,
Binah O., Itskovitz-Eldor J., Gepstein L.**

Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes
J Clin Invest. 2001, 108(3): 407-14

Ko S.H., Yu C.W., Lee S.K., Choe H., Chung M.J., Kwak Y.G., Chae S.W., Song H.S.

Propofol attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart
Anesth Analg. 1997, 85(4):719-24

Kocher A.A., Schuster M.D., Szabolcs M.J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N.M., Itescu S.

Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function
Nat Med. 2001, 7(4): 430-6

Kokita N., Hara A., Abiko Y., Arakawa J., Hashizume H., Namiki A.

Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts
Anesth Analg. 1998, 86(2):252-8

Kraitchman D.L., Bluemke D.A., Chin B.B., Heldman A.W., Heldman A.W.

A minimally invasive method for creating coronary stenosis in a swine model for MRI and SPECT imaging
Invest Radiol. 2000, 35(7):445-51

Krombach G.A., Kinzel S., Mahnken A.H., Gunther R.W., Buecker A.

Minimally invasive close-chest method for creating reperfused or occlusive myocardial infarction in swine
Invest Radiol. 2005, 40(1):14-8

Liechty K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F., Radu A., Moseley A.M., Deans R., Marshak D.R., Flake A.W.

Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep
Nat Med. 2000, 6(11):1282-6

Liesveld J.L., Rosell K., Panoskaltsis N., Belanger T., Harbol A., Abboud C.N.

Response of human CD34+ cells to CXC, CC, and CX3C chemokines: implications for cell migration and activation
J Hematother Stem Cell Res. 2001, 10(5):643-55

Lim K.H., Halestrap A.P., Angelini G.D., Suleiman M.S.

Propofol is cardioprotective in a clinically relevant model of normothermic blood cardioplegic arrest and cardiopulmonary bypass
Exp Biol Med (Maywood). 2005, 230(6):413-20

Linzbach A.J.

Heart failure from the point of view of quantitative anatomy
Am J Cardiol. 1960, 5:370-82

Litvak J., Siderides L.E., Vineberg A.M.

The experimental production of coronary artery insufficiency and occlusion
Am Heart J. 1957, 53(4):505-18

Liu J., Hu Q., Wang Z., Xu C., Wang X., Gong J.G., Mansoor A., Lee J., Hou M., Zeng L., Zhang R., Jerosch-Herold M., Guo T., Bache R.J., Zhang J.

Autologous stem cell transplantation for myocardial repair
AJP - Heart 2004, 287: 501-511

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

Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro
J Clin Invest. 1999, 103: 697-705

Mann D.L.

Left ventricular size and shape: determinants of mechanical signal transduction pathways
Heart Fail Rev. 2005, 10(2):95-100

Martin G.R.

Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells
Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78(12):7634-8

Mathé G., Amiel J.L., Schwarzenberg L., Cattan A., Schneider M.

Hemopoietic chimera in man after allogeneic (homologous) bone marrow transplantation. Control of secondary syndrome. Specific tolerance due to the chimerism
Br Med J., 1963, 2: 1633-1635

Maxwell M.P., Hearse D.J., Yellon D.M.

Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction
Cardiovasc Res. 1987, 21(10):737-46

Morizono K., De Ugarte D.A., Zhu M., Zuk P., Elbarbary A., Ashjian P., Benhaim P., Chen I.S., Hedrick M.H.

Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles
Hum Gene Ther. 2003, 14(1):59-66

Muir W.W., Hubbell J.A.E., Skarda R.

Handbook of veterinary anesthesia
C.V. Mosby Company, St.Louis, MS, USA, 1989

Nagaya N., Kangawa K., Itoh T., Iwase T., Murakami S., Miyahara Y., Fujii T., Uematsu M., Ohgushi H., Yamagishi M., Tokudome T., Mori H., Miyatake K., Kitamura S.

Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy
Circulation 2005, 112(8):1128-35

Naslund U., Haggmark S., Johansson G., Marklund S.L., Reiz S.

A closed-chest myocardial occlusion-reperfusion model in the pig: techniques, morbidity and mortality
Eur Heart J. 1992, 13(9):1282-9

Nishikawa K., Kanaya N., Kawamata M., Namiki A.

Left ventricular mechanical performance in elderly patients after induction of anaesthesia. A comparison of inhalational induction with sevoflurane and intravenous induction with fentanyl and propofol
Anaesthesia. 2004, 59(10):948-53

Odorico J.S., Kaufman D.S., Thomson J.A.

Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines
Stem Cells 2001, 19(3): 193-204

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P.

Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium
Nature 2001, 410(6829):701-5

Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Limana F., Jakoniuk I., Quaini F., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P.

Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival
Proc Natl Acad Sci USA 2001, 98(18):10344-9

Paddleford R.R.

In: Manual of small animal anesthesia
Churchill Livingstone Inc., New York, 1988

Paddleford R.R., Erhardt W.

Allgemeinanästhesie
In: Paddleford R.R., Erhardt W.
Anästhesie bei Kleintieren, Schattauer, Stuttgart, 1992b

Pfeffer M.A., Braunwald E.

Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications

Circulation 1990, 81(4):1161-72

Pittenger M.F., Alastair M.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.

Multilineage Potential of adult human mesenchymal stem cells

Science 1999, 284(5411):143-7

Planat-Bénard V., Menard C., André M., Puceat M., Perez A., Garcia-Verdugo J. M., Pénicaud L., Casteilla L.

Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation from Adipose Tissue Stroma Cells

Circ Res. 2004, 94: 223-229

Scherbaum W.A.

Psyhyrembel Wörterbuch Diabetologie

Walter de Gruyter GmbH, Berlin, 2003

Puri P.L., Avantaggiati M.L., Burgio V.L., Chirillo P., Colleparado D., Natoli G., Balsano C., Levrero M.

Relate Reactive oxygen intermediates mediate angiotensin II-induced c-Jun.c-Fos heterodimer DNA binding activity and proliferative hypertrophic responses in myogenic cells

J Biol Chem. 1995, 270(38):22129-34

Ramaswamy K., Hamdan M.H.

Ischemia, metabolic disturbance, arrhythmogenesis: mechanisms and management

Crit Care Med. 2000, 28(10):N151-7

Reffelmann T., Sensebat O., Birnbaum Y., Stroemer E., Hanrath P., Uretsky B.F., Schwarz E.R.

A novel minimal-invasive model of chronic myocardial infarction in swine

Coron Artery Dis. 2004, 15(1):7-12

Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L.

Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells

Circulation 2004, 109(10):1292-8

Reimer K.A., Lowe J.E., Rasmussen M.M., Jennings R.B.

The wavefront phenomenon of ischemic cell death

1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs

Circulation 1977, 56(5):786-94

Ross R.

Atherosclerosis--an inflammatory disease
N Engl J Med. 1999, 340(2):115-26

Roth D.M., Maruoka Y., Rogers J., White F.C., Longhurst J.C., Bloor C.M.

Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium
Am J Physiol. 1987, 253(5 Pt 2):H1279-88

Russell R.E., Chagrasulis R.W., Downey J.M.

Inhibitory effect of cardiac contraction on coronary collateral blood flow
Am J Physiol. 1977, 233:H541-H546

Schaper W., Jageneau A., Xhonneux R.

The development of collateral circulation in the pig and dog heart
Cardiologia 1967, 51(6):321-35

Schächinger V., Assmus B., Zeiher A.M.

Stammzelltherapie bei ischämischer Herzkrankheit
Kliniker 2004, 33 (3): 68–73

Schummer A., Habermehl K.H.

Blutgefäßsystem
In: Nickel R., Schummer A., Seiferle E.
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III, 2.Auflage
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 1984

Sellgren J., Biber B., Henriksson B.A., Martner J., Ponten J.

The effects of propofol, methohexitone and isoflurane on the baroreceptor reflex in the cat
Acta Anaesthesiol Scand. 1992, 36(8):784-90

Silbernagl S.

Herz und Kreislauf
In: Silbernagl S., Lang F.
Taschenatlas der Pathophysiologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998

Strauer B. E., Kornowski R.

Stem Cell Therapy in Perspective
Circulation 2003, 107: 929-934

Strem B.M., Hicok K.C., Zhu M., Wulur I., Alfonso Z., Schreiber R.E., Fraser J.K., Hedrick M.H.

Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells
Keio J Med 2005, 54 (3): 132–141

Suzuki M., Asano H., Tanaka H., Usuda S.

Development and evaluation of a new canine myocardial infarction model using a closed-chest injection of thrombogenic material
Jpn Circ J. 1999, 63(11):900-5

Swindle M.M.

Swine as replacements for dogs in the surgical teaching and research laboratory
Lab Anim Sci. 1984, 34(4):383-5

Swindle M.M., Horneffer P.J., Gardner T.J., Gott V.L., Hall T.S., Stuart R.S., Baumgartner W.A., Borkon A.M., Galloway E., Reitz B.A.

Anatomic and anesthetic considerations in experimental cardiopulmonary surgery in swine
Lab Anim Sci. 1986 Aug;36(4):357-61

Swindle M.M., Smith A.C., Hepburn B.J.

Swine as models in experimental surgery
J Invest Surg. 1988, 1(1):65-79

Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T.

Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells.
Curr Biol. 2001, 11(19):1553-8

Tateishi-Yuyama E., Matsubara H., Murohara T., Ikeda U., Shintani S., Masaki H., Amano K., Kishimoto Y., Yoshimoto K., Akashi H., Shimada K., Iwasaka T., Imaizumi T.

Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial
Lancet. 2002, 360(9331):427-35

Terres W.

Koronare Herzkrankheit
In: Bob A. und K.
Innere Medizin
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2001

Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M.

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts
Science 1998, 282(5391):1145-7

Thomas E.D., Lochte H.L., Lu W.C., Ferrebee J.W. ,

Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving
radiation and chemotherapy
N Engl J Med. 1957, 257: 491-496

Thomson J.A., Kalishman J., Golos T.G., Durning M., Harris C.P., Becker R.A., Hearn J.P.

Isolation of a primate embryonic stem cell line
Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92(17): 7844-8

Tse H.F., Kwong Y.L., Chan J.K., Lo G., Ho C.L., Lau C.P.

Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow
mononuclear cell implantation.
Lancet. 2003, 361(9351):47-9

Waldmann K.H., Wendt M.

Lehrbuch der Schweinekrankheiten
4.Auflage
Parey Verlag, Hamburg und Berlin, 2004

Weber K.T.

Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II
generation
Circulation 1997, 96(11):4065-82

Wehrens X.H., Doevendans P.A.

Cardiac rupture complicating myocardial infarction
Int J Cardiol. 2004, 95:285-92

White F.C., Roth D.M., Bloor C.M.

Coronary collateral reserve during exercise induced ischemia in swine
Basic Res Cardiol. 1989, 84(1):42-54

White F.C., Carroll S.M., Magnet A., Bloor C.M.

Coronary Collateral Development in Swine After
Coronary Artery Occlusion
Circulation Research 1992, 71:1490-1500

White F.C., Roth D.M., Bloor C.M.

The pig as a model for myocardial ischemia and exercise
Lab Anim Sci. 1986, 36(4):351-6

Winkhard M.

In: Das Herzkatheterlabor
Einführung in die Aufgabenbereiche des kardiologischen Assistenzpersonals
Steinkopffverlag, Darmstadt, 2005

Zhang Y.M., Hartzell C., Narlow M., Dudley S.C.

Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential.
Circulation 2002, 106(10):1294-9

**Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Y.C.,
Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H.**

Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells
Molecular Biology of the Cell 2002, 13: 4279–4295

7.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Koronararterien eines Schweineherzens	5
Abb. 2: Koronararterien des Herzens beim Menschen	6
Abb. 3: Ventrikelform	15
Abb. 4: Ventrikeldilatation	15
Abb. 5: Intrakoronare Applikation von Stammzellen	22
Abb. 6: Linksventrikuläre Angiographie – Ejektionsfraktion	33
Abb. 7: Koronare Angiographie – Infarktlegung	34
Abb. 8: Koronarflussmessung	35
Abb. 9: Herz von Tier 139 nach der Sektion	37
Abb. 10: Planimetriebestimmung des linken Ventrikels	38
Abb. 11: Kapillariendichtebestimmung bei Tier 113	40
Abb. 12: Fibrosebestimmung	41
Abb. 13: Bestimmung der Randzone	42
Abb. 14: Aufzeichnung der ventrikulären Fibrillation	50
Abb. 15: Wanddickenmessung	52
Abb. 16: Bestimmung der Randzonenbreite	54
Abb. 17: Zellkultur in adipogenen Medium	63
Abb. 18: Zellkultur in osteogenen Medium	64

7.3 Abkürzungsverzeichnis

ADC:	Adipose tissue derived stem cell
APV:	Average peak velocity
BNP:	Brain-natriuretic-peptid
CK:	Creatinin Kinase
CK-MB:	Creatinin Kinase Myoglobin
CRP:	C-reaktives Protein
CFR:	Coronary Flow Reserve
DAB :	3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DSVR:	Diastolic to Systolic Velocity Ratio
EPU:	Elektrophysiologische Untersuchung
EtCO ₂ :	expiratorischer CO ₂
Hb:	Hämoglobin
Hk:	Hämatokrit
KHK:	Koronare Herzkrankheit
LAD:	Left anterior descending
LAO:	Left anterior oblique
LCX:	Left circumflex coronary artery
LVEF:	Left ventricle ejektion fraction
MSC:	Mesenchymale Stem Cell
OTW-balloon:	Over the wire balloon
PBS:	Phospate buffered salt
RAO:	Right Anterior Oblique
TGF-β1:	Transforming Growth Factor Beta 1
SPECT:	Single photon emission computed tomography
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
^{99m} Tc-Sesta-MIBI:	Technetium 99 Sestamibi, radioisotop

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Pilotstudientiere und Untersuchungen	24
Tab. 2: Versuchsablauf	26
Tab. 3: Laborparameter und Referenzbereiche	30
Tab. 4: Körpergewicht, Zellkonzentration, Trägersubstanz in der Pilotstudie	44
Tab. 5: Ergebnisse der Studientiere	45
Tab. 6: Zeitdauer während des Infarktes	47
Tab. 7: Zeitdauer bei der Untersuchung nach 8 Wochen	47
Tab. 8: Parameter der Infarktlegung mittels Ballon (Kontrollgruppe)	48
Tab. 9: Parameter der Infarktlegung mittels Ballon (ADC-Gruppe)	48
Tab. 10: Körpergewicht, absolute Zellzahl und Trägersubstanz in der Hauptstudie	49
Tab. 11: Koronarfluss	50
Tab. 12: EPU - Anzahl und Zykluslängen der Impulse	51
Tab. 13: EPU- Art und Länge der Arrhythmien	51
Tab. 14: Kapillardichte	53
Tab. 15: Anteil an Muskelgewebe und an Fibrose	53

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. J. Hirschberger danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit an die tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. E. U. Alt für die Überlassung des Themas, die Arbeitsmöglichkeit an der Tulane University in New Orleans und für seine tatkräftige Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. P. Fotuhi für seine hervorragende Unterstützung und Betreuung, die mir jederzeit zu teil wurde. Und mich mit seiner freundschaftlichen konstruktiven Kritik in die richtige Richtung unterstützt hat.

Herrn Dr. med. K. Pinkernell danke ich für seine Betreuung und Zusammenarbeit bei dieser Studie.

Weiter möchte ich mich bei Frau Dr. med. vet. M. Knoedler für ihre nette Betreuung bei der Einarbeitung des Projektes und für ihre organisatorische Hilfe bedanken, die das Einleben in New Orleans erheblich erleichterte.

Bei Frau K. Daehmen möchte ich mich herzlich für die nette Zusammenarbeit bei der Studie bedanken.

Chris Burks danke ich sehr für die Bedienung des Biopacksystems und seine Unterstützung bei der statistischen Auswertungen dieser Studie.

Bei Herrn Dr. M. Schwarzer möchte ich mich bedanken, der mir bei allen computertechnischen Fragen mit Rat zur Seite stand.

Ganz persönlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir bis zum letzten Schritt dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.