

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

**Myokardiale Regeneration
im Glukagon-like-peptide-1 Rezeptor
knock out Mausmodell**

von Stefanie Ebner

aus Bobingen

München, 2015

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Rüdiger Wanke

Mitbetreuung:

PD Dr. med. vet. Nadja Herbach, Dr. med. vet. Andreas Blutke

Angefertigt am Klinikum der Universität München

Campus Großhadern

Mentor: PD Dr. med. Hans Theiss

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	4
2.1.	Regenerative Therapien.....	4
2.1.1.	Zellgestützte Verfahren nach Myokardinfarkt	4
2.1.2.	Stammzellmobilisierung	6
2.1.2.1.	G-CSF.....	10
2.1.3.	Stammzellhoming	11
2.1.3.1.	SDF-1 α	11
2.1.3.2.	Dipeptidylpeptidase IV	12
2.1.3.3.	DPP-IV-Inhibitoren	12
2.2.	Das Konzept der dualen Stammzelltherapie	13
2.2.1.	Übersicht	13
2.2.2.	Tiermodell	14
2.2.3.	Klinische Studien	14
2.3.	Glukagon-like-Peptide-1	16
2.3.1.	Übersicht	16
2.3.2.	GLP-1 Rezeptor	17
2.3.3.	GLP-1R $^{-/-}$ Mäuse	18
2.3.4.	Kardioprotektive Effekte durch GLP-1	19
2.3.5.	Klinische Studien	21
2.4.	Zielsetzung der Arbeit	22
III.	VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN	23
3.1.	Versuchsdesign	23
3.1.1.	Behandlungsprotokoll	23
3.1.1.1.	Analgesie	23
3.1.1.2.	Duale Stammzelltherapie	23
3.1.1.3.	Kontrollgruppe	24
3.1.2.	Zeitverlauf	24
3.1.3.	Material	25

3.2.	Versuchstiere	26
3.2.1.	Haltungsbedingungen.....	26
3.2.2.	Gesetzliche Bestimmungen.....	26
3.2.3.	Mausstamm und Zucht der verwendeten Tiere	26
3.3.	Genotypisierung	27
3.3.1.	Material	27
3.3.2.	Primer.....	28
3.3.3.	DNA-Isolierung.....	28
3.3.4.	PCR	29
3.3.5.	Gelelektrophorese.....	29
3.3.5.1.	Gelherstellung	29
3.3.5.2.	Durchführung der Elektrophorese	30
3.4.	Infarktmodell.....	31
3.4.1.	Material	31
3.4.2.	Anästhesie	31
3.4.3.	Analgesie	32
3.4.4.	LAD-Ligatur.....	32
3.4.5.	Gewebegewinnung.....	33
3.4.5.1.	Blutentnahme	33
3.4.5.2.	Herzentnahme.....	34
3.5.	Massenspektrometrie	34
3.5.1.	Prinzip der Massenspektrometrie	34
3.5.2.	Probengewinnung.....	35
3.5.3.	Quantifizierung von Sitagliptin.....	35
3.6.	Durchflusszytometrie	38
3.6.1.	Material	38
3.6.2.	Prinzip der Durchflusszytometrie	38
3.6.3.	Probenaufbereitung	39
3.6.3.1.	Blutaufbereitung.....	39
3.6.3.2.	Herzaufbereitung.....	39
3.6.3.3.	Gemeinsame Probenprozessierung	39
3.6.4.	Antikörper	40
3.6.4.1.	Verwendete Antikörper	40
3.6.4.2.	Vorbereitung der Antikörper.....	40

3.6.5.	Durchführung der Messung und Auswertung	41
3.7.	Millar Tip Katheter.....	41
3.7.1.	Material	41
3.7.2.	Prinzip der Conductance-Messung.....	42
3.7.3.	Durchführung der Messung.....	44
3.7.4.	Aufzeichnung und Parameter der Messung	46
3.8.	Histologie, Morphometrie und quantitative Stereologie	47
3.8.1.	Material	47
3.8.2.	Gewebevorbereitung	48
3.8.2.1.	Fallstromperfusion	48
3.8.2.2.	Paraffineinbettung und Schnittherstellung.....	50
3.8.3.	Färbemethoden	51
3.8.3.1.	Paraffinextraktion und Rehydrierung.....	51
3.8.3.2.	Hämatoxylin-Eosin.....	51
3.8.3.3.	Masson-Trichrom.....	51
3.8.3.4.	Turnbullblau nach Quinckes	52
3.8.4.	Morphometrie und quantitative Stereologie.....	52
3.8.4.1.	Bestimmung des Herzvolumens.....	53
3.8.4.2.	Ermittlung des Infarktareals am Herzgewebe	53
3.8.4.3.	Bestimmung des absoluten Infarktvolumens	54
3.8.4.4.	Volumenanteile spezifischer Gewebekomponenten am Infarktareal.....	55
3.8.5.	Analyse systemischer Folgen	55
3.8.5.1.	Auswirkungen auf das Lungengewebe	56
3.8.5.2.	Auswirkungen auf das Lebergewebe	57
3.9.	Statistik.....	58
IV.	ERGEBNISSE	59
4.1.	Sitagliptinkonzentration im Blut	59
4.2.	Stammzellmobilisierung und -homing	60
4.2.1.	Stammzellmobilisierung ins periphere Blut.....	60
4.2.1.1.	CD45 ⁺ CD34 ⁺ Stammzellen im Blut.....	60
4.2.1.2.	Koexpression CD45 ⁺ CD34 ⁺ Stammzellen im Blut	62
4.2.2.	Stammzellhoming in das ischämische Herz.....	64
4.2.2.1.	CD45 ⁺ CD34 ⁺ Stammzellen im Herz	64

4.2.2.2.	Koexpression CD45 ⁺ CD34 ⁺ Stammzellen im Herz	66
4.3.	Hämodynamische Funktionsparameter	68
4.3.1.	6 Tage post Myokardinfarkt.....	68
4.3.1.1.	Übersicht der Funktionsparameter Tag 6 pMI	68
4.3.1.2.	Ejektionsfraktion	69
4.3.1.3.	Herzzeitvolumen	70
4.3.2.	28 Tage post Myokardinfarkt.....	71
4.3.2.1.	Übersicht der Funktionsparameter Tag 28 pMI	71
4.3.2.2.	Ejektionsfraktion	72
4.3.2.3.	Herzzeitvolumen	73
4.4.	Morphometrische Befunde	74
4.4.1.	6 Tage post Myokardinfarkt.....	74
4.4.2.	28 Tage post Myokardinfarkt.....	76
4.4.3.	180 Tage post Myokardinfarkt.....	80
4.4.4.	Übersicht im Zeitverlauf	82
4.4.4.1.	Herzvolumen	82
4.4.4.2.	Infarktanteil	83
4.4.4.3.	Absolute Infarktvolumina	84
4.4.5.	Systemische Folgen.....	84
4.4.5.1.	Stauungslunge	85
4.4.5.2.	Stauungsleber	86
V.	DISKUSSION	88
5.1.	Validierung des Therapiekonzepts im GLP-1R^{-/-} Mausmodell	88
5.2.	Effekte des Therapiekonzepts im GLP-1R^{-/-} Mausmodell.....	89
5.3.	Die duale Stammzelltherapie.....	90
5.3.1.	Zytokin-induzierte Stammzellmobilisierung	90
5.3.2.	DPP-IV-Inhibition durch Sitagliptin	91
5.3.3.	Stammzellhoming über Stabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse.....	92
5.3.4.	Auswirkungen auf die kardiale Architektur	93
5.3.5.	Auswirkungen auf die Herzfunktion	95
5.4.	Limitationen der Arbeit.....	97
5.4.1.	Anästhesie im GLP-1R ^{-/-} Mausmodell	97
5.4.2.	Infarktmodell.....	99

5.4.3.	Verlaufsuntersuchungen.....	100
5.4.4.	GLP-1R unabhängige Wirkungen	101
5.5.	Zellbasierte Therapien vs. GLP-1.....	103
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	108
VII.	SUMMARY.....	110
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	112
IX.	DANKSAGUNG	134

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
ASZ	Adulte Stammzelle
BNP	Natriuretisches Peptid Typ B
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c-kit	Stammzellfaktor Rezeptor
Ca ²⁺	Kalzium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
ca	Zirka
CD	Cluster of differentiation
CD 26 ^{-/-}	CD 26 knock out
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
D.m.	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxyribonukeosidtriphosphat
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
Ea	Arterielle Nachlast
EDV	Enddiastolisches Volumen
ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinase
ESV	Endsystolisches Volumen
ESZ	Embryonale Stammzelle
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GIP	Glucoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP-1	Glukagon like peptide-1
GLP-1R	Glucagon-like-peptide 1 Rezeptor
GLP-1R ^{-/-}	Glucagon-like-peptide 1 Rezeptor knock out
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GZ	Geschäftszeichen
HCL	Salzsäure
HF	Herzfrequenz
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
HZV	Herzzeitvolumen
Ig	Immunglobulin

i.p.	Intraperitoneal
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
I/R	Ischämie/Reperfusion
i.v.	Intravenös
KCl	Kaliumchlorid
KM	Körpermasse
LAD	Left anterior descending artery
MRI	Magnetic resonance imaging
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
lv	Linksventrikulär
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
n.s.	Nicht signifikant
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCI	Percutaneous cardiovascular intervention
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PerCP	Peridininchlorophyll
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI3K	Phosphoinositolkinase 3
PKA	Proteinkinase A
pMI	Post Myokardinfarkt
p.os	Peroral
PTH	Parathormon
RT PCR	Realtime PCR
RNA	Ribonukleinacid
s.c.	subkutan
sca-1	Stem cell antigen-1
SCF	Stem cell factor
SDF-1 α	Stromal cell-derived factor 1 α
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SPECT	Single photon emission computed tomography
SV	Schlagvolumen
SZ	Stammzelle
TAE	Tris-Aacetat-EDTA
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vgr	Vergrößerung
VLA-4	Very late antigen 4
vs	Versus
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. EINLEITUNG

Obwohl in der medizinischen Forschung enorme Fortschritte erzielt wurden, zählen die Erkrankungen des Herzkreislaufsystems nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Darunter führend in der Statistik finden sich die chronisch ischämische Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz [1]. Der Komplex der ischämischen Kardiomyopathie, induziert durch einen partiellen oder totalen Verschluss der Koronargefäße, welcher nicht selten in einen Myokardinfarkt mit konsekutiver Herzinsuffizienz mündet, zählt somit zu den bedeutendsten medizinischen Problemen. Zu den Hauprisikofaktoren des Myokardinfarkts sind neben Bluthochdruck, Rauchen und Dyslipidämie auch eine Vorerkrankung an Diabetes mellitus zu nennen [2-5]. Kritisches Moment beim Auftreten eines Gefäßverschlusses ist die Minderversorgung des Gewebes. Die einsetzende Ischämie führt nach intrazellulärem Energie- und Sauerstoffdefizit mit gleichzeitiger Anhäufung von Stoffwechselendprodukten letztendlich zu nekrotischen Prozessen im Myokard mit konsekutiver Narbenbildung. Die mangelnde Regenerationsfähigkeit im Sinne einer Restitutio ad Integrum des Herzmuskels manifestiert sich in einem Verlust kontraktiler Kardiomyozyten zugunsten von narbigem Reparationsgewebe. Dies verursacht weitere Umbauprozesse und fortschreitende Funktionseinschränkungen. Dieses kardiale Remodeling führt zu einer Abnahme der Wandstärke, Ausdehnung des kollagenen Bindegewebes und Dilatation des Ventrikels. Die Veränderungen der kardialen Architektur bedingen progrediente Funktionseinschränkungen des infarzierten Herzens und führen zu Leistungseinbußen bis hin zur Herzinsuffizienz. Die Ultima Ratio im fortgeschrittenen Stadium einer insuffizienten Pumpfunktion liegt einzig in einer Herztransplantation, welche durch den Mangel an zur Verfügung stehenden Spenderorganen oft nicht realisierbar ist.

Infolgedessen zielen neue Therapieoptionen aus dem Gebiet der regenerativen Medizin auf eine positive Beeinflussung der Regenerationsfähigkeit des Herzmuskels, um die kardiale Funktionalität zu erhalten. Ein vielversprechender Ansatz steht in Form der dualen Stammzelltherapie, bestehend aus einer Kombination von G-CSF und Sitagliptin zur Verfügung. Dieses zellbasierte Konzept vermittelte im Mausmodell über die pharmakologische Beeinflussung endogener Stammzellen, respektive der Stabilisierung des

Stammzellhomingfaktors SDF-1 α durch den DPP-IV-Inhibitor Sitagliptin, eindrucksvolle kardioprotektive Effekte auf die myokardiale Regeneration [6-8].

Aufgrund des stark erhöhten Risikos für kardiovaskuläre Komplikationen bei Patienten mit einer Vorerkrankung an Diabetes mellitus ist die Inzidenz des Myokardinfarkts in dieser Bevölkerungsgruppe besonders hoch [3-5]. So wurde man durch die Nutzung Inkretin-basierter Therapien im Rahmen einer Diabeteserkrankung auf das kardioprotektive Potential des Inkrethinormons GLP-1 aufmerksam, in welchem eine weitere pharmakologische Therapiemöglichkeit des Myokardinfarkts gesehen wird. Dabei ließ sich mit exogen zugeführtem Glukagon-like-peptide-1, GLP-1 Rezeptoragonisten oder der Stabilisierung des endogenen Inkretins über DPP-IV-Inhibitoren in einer Vielzahl von Studien, ähnlich der dualen Stammzelltherapie, ein relevanter kardialer Benefit erzielen [9-15].

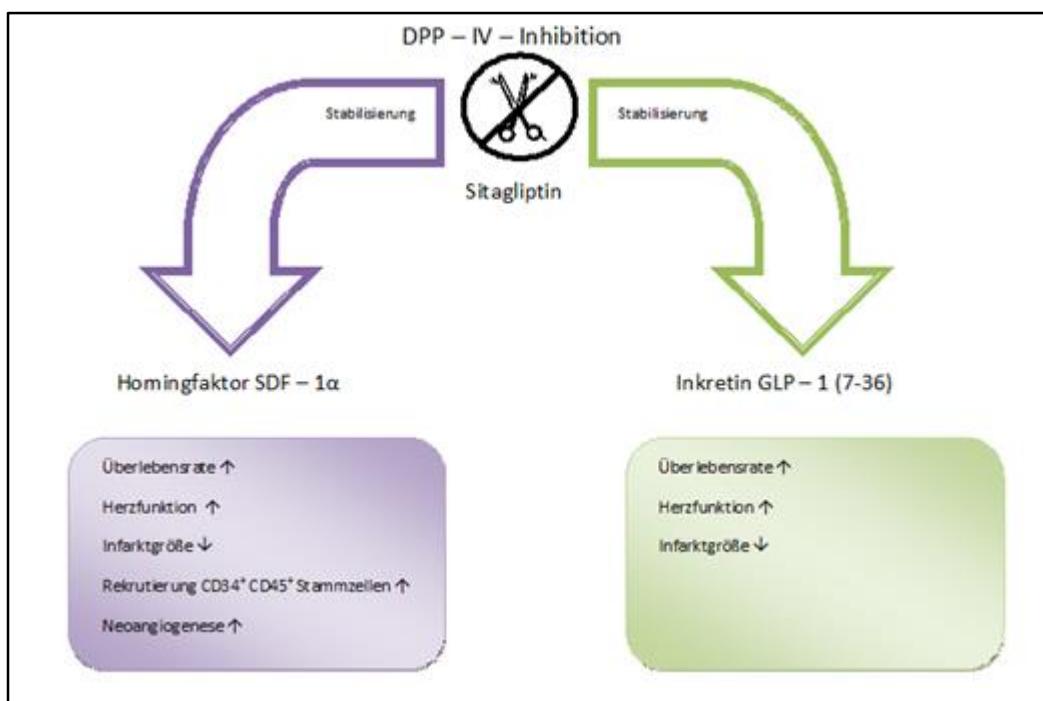


Abbildung 1: Aufgrund der unspezifischen Wirkung der DPP-IV-Inhibitoren werden mit dem Einsatz von Sitagliptin parallel zwei kardioprotektive Mechanismen vermittelt: die Stabilisierung sowohl des Stammzellhomingfaktors SDF-1 α als auch des Inkretins GLP-1.

Die Schnittstelle von dualer Stammzelltherapie und Inkretin-basierter Therapie findet sich in der beiderseitigen Verwendung von DPP-IV-Inhibitoren. Infolgedessen wird durch die Hemmung der DPP-IV die Spaltung ihrer Substrate, allen voran die Inaktivierung des Homingfaktors SDF-1 α und des Inkretins GLP-1 verhindert [16-18]. Durch die Stabilisierung dieser essentiellen Faktoren in der Vermittlung kardioprotektiver Effekte, werden abhängig von dem zugrundeliegenden Therapiekonzept, zwei unterschiedliche kardioprotektive Wege beschritten, die es galt in der vorliegenden Arbeit voneinander abzugrenzen.

Ziel war demnach die Evaluierung der individuellen Relevanz der einzelnen Wirkmechanismen im Kontext der eingesetzten DPP-IV-Inhibition. Die Möglichkeit einer isolierten Betrachtung der stammzellspezifischen Wirkung einer kombinierten Sitagliptin und G-CSF Therapie auf die Regeneration des geschädigten Myokards wurde durch die Aufhebung der rezeptorvermittelten GLP-1 Signaltransduktion in der Verwendung eines GLP-1R $^{-/-}$ Mausmodells geschaffen. Damit konnte gezielt die Relevanz der SDF-1 α /CXCR4-Achse im Rahmen der dualen Stammzelltherapie [7] untersucht und unabhängig von der GLP-1 Wirkung evaluiert werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Regenerative Therapien

2.1.1. Zellgestützte Verfahren nach Myokardinfarkt

In vielversprechenden Ansätzen der regenerativen Medizin wird versucht, den infolge eines Myokardinfarkts funktionell beeinträchtigten Herzmuskel durch zellgestützte Therapien zu regenerieren und dadurch seine Funktionalität zu erhalten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass in Folge eines myokardialen Infarkts ein Zellverlust von bis zu 10^9 Kardiomyozyten auftreten kann, in etwa 25 Prozent des gesamten myokardialen Zellvolumens [19]. Um diesen Verlust zu kompensieren, wird der Einsatz sogenannter Stammzellen unterschiedlichster Herkunft untersucht. Grundsätzlich wird auf Stammzellebene zwischen embryonalen und adulten Stammzellen unterschieden. Embryonale Stammzellen stellen, obwohl ihrer Pluripotenz, das heißt der Möglichkeit in jede Zelle des Körpers zu differenzieren, eine der interessantesten Optionen dar. Trotz ihres hohen regenerativen Potentials auf dem Gebiet des Zellersatzes suchte man aufgrund ihrer nachteiligen Eigenschaften nach Alternativen. Zu den negativen Aspekten embryonaler Stammzellen gehört das Risiko einer Teratombildung, die Notwendigkeit einer Immunsuppression durch das Einbringen von heterologem Material und auch die ethische Bedenklichkeit in der Verwendung humaner embryonaler Stammzellen [20]. Daher versuchte man in neuen Ansätzen der regenerativen Medizin mit der Verwendung adulter Stammzellen auf autologe Zellen zurückzugreifen. Damit entfallen die Nachteile einer eventuellen tumorösen Entartung, Immunsuppression und die durch die Gesetzgebung streng regulierten Einsatzmöglichkeiten embryonaler Zelllinien [21]. Da adulte Stammzellen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen nur noch ein eingeschränktes Differenzierungspotential besitzen, wurden in verschiedenen Arbeiten adulte Stammzellen, insbesondere aus den Kompartimenten Blut, Knochenmark, Muskulatur und Fettgewebe, auf ihr jeweiliges regeneratives Potential hin untersucht [22], um Zelllinien mit einem möglichst hohen kardioprotektiven Potential aus der Vielzahl an Möglichkeiten zu filtrieren.

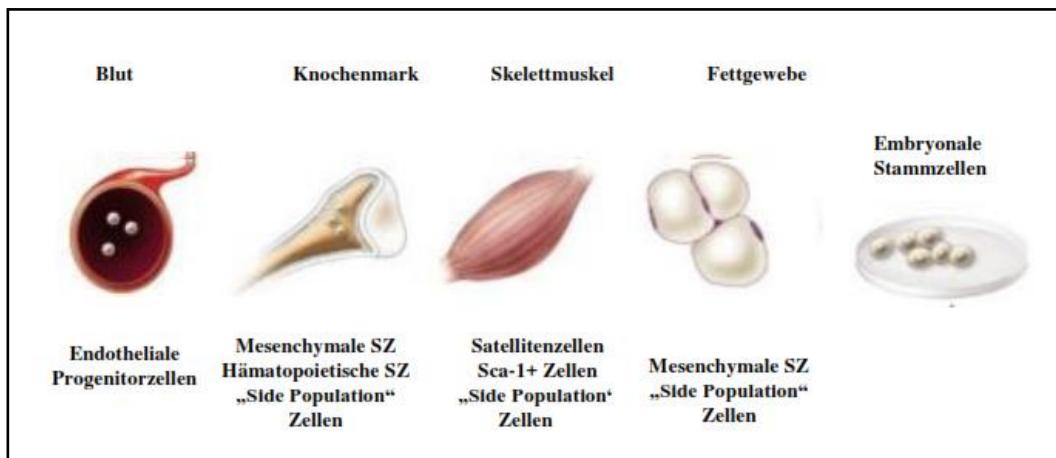


Abbildung 2: Stamm- und Vorläuferzellen unterschiedlichster Herkunft im Einsatz der regenerativen Medizin; modifiziert nach Dimmler et al. [22].

Als eine der ersten Zellarten wurden Myoblasten der Skelettmuskulatur auf ihr Potential untersucht, das verletzte Myokard zu regenerieren. Während in Tiermodellen an Maus, Ratte und Schaf gezeigt wurde, dass ein Myoblastentransfer aus der Skelettmuskulatur in den infarzierten Herzmuskel zu einer Funktionsverbesserung führt [23-25], blieb dieser Effekt dagegen im Rahmen einer klinischen Studie aus. Innerhalb der MAGIC Studie erhielten Infarktpatienten mit Indikation zur chirurgischen Intervention eine intramyokardiale Myoblasteninjektion. Im Follow-Up nach 6 Monaten zeigte sich anstelle einer Verbesserung der Pumpfunktion eine höhere Inzidenz von Arrhythmien im Patientenkollektiv mit Myoblastentransfer [26].

Die meisten Studien jedoch bewegen sich auf dem Gebiet der knochenmarkstämmigen Vorläuferzellen. Hierunter finden sich diverse Zelltypen aus hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen, aber auch endotheliale Progenitorzellen [22,27-29]. So wurde erstmals 2001 eine autologe Stammzelltransplantation in den ischämischen Herzmuskel am Patienten durchgeführt. Während einer Koronarerterien-Bypass-Operation wurden Stammzellen aus dem Knochenmark in das Randgebiet des Infarkts injiziert [30]. Eine Alternative zur direkten Injektion in den Herzmuskel stellt die koronare Infusion von Stammzellsuspensionen im Rahmen einer PCI dar, wie sie unter anderem in den klinischen Studien BOOST, REPAIR-AMI und TOPCARE-AMI untersucht wurde [31-33].

Ein weiterer Ansatz in der Gewinnung von Stammzellen bietet sich durch die Verwendung von Fettgewebe. Durch das ubiquitäre Vorkommen stellt es eine leicht zugängliche Quelle zur Gewinnung mesenchymaler Stammzellen dar [34,35]. Als ein Vorteil gilt die einfache Zellgewinnung, die für den Patienten weit weniger invasiv ist, als eine Punktion zur Knochenmarksentnahme [36]. In einer ersten klinischen Studie erhielten Infarktpatienten im Rahmen einer PCI eine mittels Liposuktion gewonnene Stammzellsuspension. Es zeigte sich allerdings keine Funktionsverbesserung, jedoch waren die Infarktgrößen stammzellbehandelter Patienten signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe [37].

So unterschiedlich wie die eingesetzten Zelltypen sind bislang auch die Verfahren, die angewandt werden, um eine bestmögliche und auch sichere Anwendung der Zellen am Herzen zu ermöglichen. Die Zelltransplantation wird immer eine invasive Methode darstellen, sei es als direkte intramyokardiale Injektion während eines chirurgischen Eingriffs, oder auch als kathetergestützte myokardiale Injektion sowie als Koronarinfusion im Zuge einer PCI [22]. All diese Verfahren stellen jedoch aufgrund ihrer Invasivität ein gewisses Risiko dar, so dass die Bemühungen unserer Arbeitsgruppe in Richtung einer gezielten medikamentösen Mobilisierung und Nutzung endogener Stammzellen aus Blut und Knochenmark gingen.

2.1.2. Stammzellmobilisierung

Die Freisetzung oder auch Mobilisierung von Knochenmarkstamm- und Progenitorzellen durch den Einsatz von Chemotherapeutika oder Zytokinen wird seit über 30 Jahren vor allem in der Hämatonkologie genutzt [38]. Seit im letzten Jahrzehnt in den regenerativen Zelltherapien ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung von ischämischen Herzerkrankungen erkannt wurde, hat die Verwendung insbesondere von knochenmarkstämmigen Zellen in präklinischen und klinischen Studien stark zugenommen [22,39,40]. Dabei findet die Nutzung endogener Stammzellen, respektive die gezielte medikamentöse Beeinflussung von Mobilisierung und Homing besonderes Interesse. Vorteil dieser Methode ist die geringe Invasivität und damit die sichere Anwendbarkeit am Patienten.

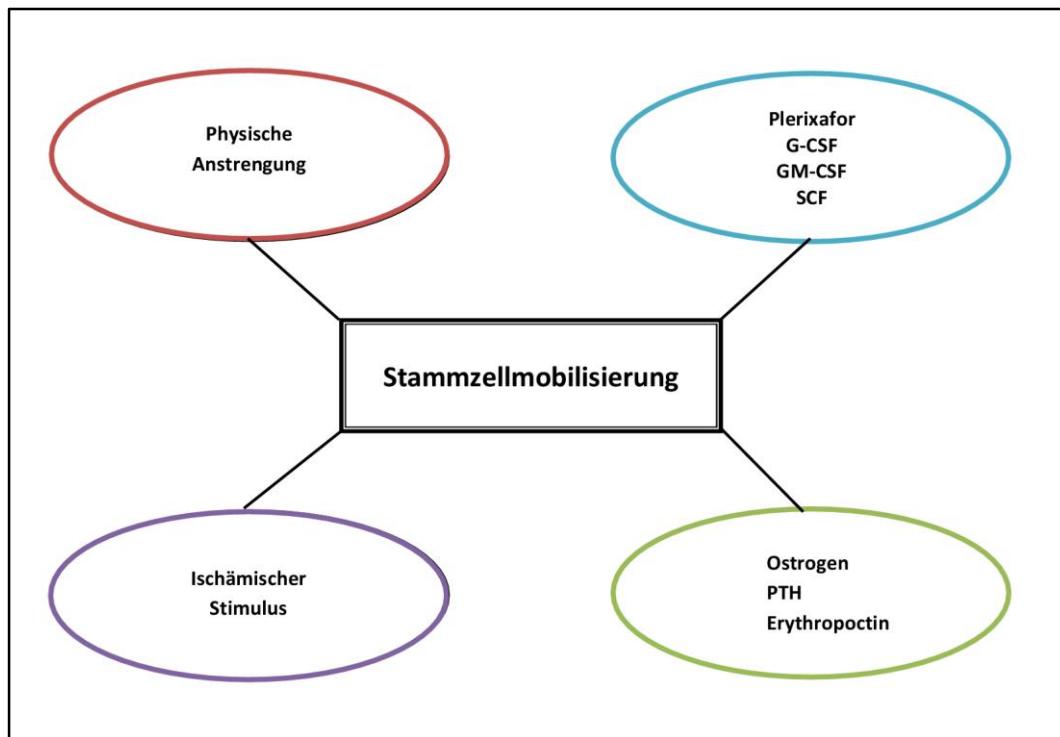


Abbildung 3: Eine Stammzellmobilisierung erfolgt bereits unter physiologischen Bedingungen wie körperlicher Anstrengung und wird verstärkt durch den pathophysiologischen Reiz einer Ischämie, Hormone oder pharmakologische Beeinflussung; modifiziert nach *Brunner et al.* [41].

Die Stammzellmobilisierung aus dem Knochenmark in die Zirkulation besteht aus einem multifaktoriellen Ineinandergreifen von Einzelprozessen und beruht auf der Loslösung der Progenitorzellen von den Stromazellen des Knochenmarks unter anderem in Abhängigkeit von Zytokinen und Chemokinen [42]. Aber schon unter physiologischen Bedingungen werden endotheliale Vorläuferzellen durch physische Anstrengung, Nitritoxid und VEGF-vermittelt aus dem Knochenmark mobilisiert [43]. Bei Mäusen im Laufrad-Training wurde dieses Phänomen durch eine erhöhte Anzahl von endothelialen Vorläuferzellen in der Zirkulation nachgewiesen [44]. Ein analoges Resultat ergaben auch die Untersuchungen zur Zellmobilisierung nach physischer Anstrengung beim Menschen [45]. Für ischämische Krankheitsbilder, darunter für den Komplex der ischämischen Kardiomyopathie, konnte ein starker pathophysiologischer Mechanismus nachgewiesen werden, der zu einer Ausschüttung von knochenmarkstämmigen Stammzellen führt [46,47]. Zu den stammzellmobilisierenden Agenzien werden auch die Hormone Östrogen, Parathormon und Erythropoetin gerechnet.

Diesen Botenstoffen wurden Wirkungen am Knochenmark zugewiesen. So wurde in einem Infarktmodell der Ratte mit permanentem Verschluss der LAD gezeigt, dass Östrogen Mobilisierung und Homing von Knochenmarkstammzellen in das Myokard fördert und dadurch die Kapillardichte im Myokard nach Infarkt erhöht [48]. Ein weiteres Hormon mit mobilisierender Wirkung findet sich im Parathormon wieder. *Brunner et al.* konnten im Mausmodell nachweisen, dass PTH durch endogene G-CSF Freisetzung effizient die Mobilisierung von Vorläuferzellen induziert [49]. Eine weitere Studie unserer Arbeitsgruppe von *Zaruba et al.* konnte bei PTH behandelten Tieren nach Myokardinfarkt eine signifikant bessere Pumpfunktion und besseres Überleben durch ein geringer ausgeprägtes kardiales Remodeling nachweisen. Auch die verstärkte Migration von CD34⁺CD45⁺ Vorläuferzellen in den Herzmuskel ließ sich dem PTH Effekt zuschreiben [50]. In der Folgestudie wurde in einem G-CSF knock out Mausmodell gezeigt, dass die kardioprotektiven Effekte des PTH sich unabhängig von endogener G-CSF Freisetzung und Stammzellmobilisierung verhalten, und sich daher dem PTH vorwiegend eine Rolle während des Homingprozesses zuschreiben ließ [51].

Als etablierte Methode in der medikamentösen Stammzellmobilisierung gelten die hochwirksamen Zytokine GM-CSF und G-CSF, die in vielen präklinischen als auch klinischen Studien ebenso wie im klinischen Alltag der Hämatonkologie zur Zellausschüttung verwendet werden. Dennoch zielt das Streben der medizinischen Forschung auf eine noch effizientere Nutzung der bekannten Mechanismen sowie eine Weiterentwicklung dieser Pharmaka. Schon vor etlichen Jahren wurde das Hormon Erythropoetin auf seine mobilisierende Wirkung hin untersucht, und zeigte in Kombination mit G-CSF eine exzellente synergistische Aktivität in der Mobilisierung von hämatopoietischen Vorläufern [52]. Auch von unserer Arbeitsgruppe konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass nach Myokardinfarkt die Migrationsrate von knochenmarkstammigen Zellen in den ischämischen Herzmuskel durch eine Erythropoetinbehandlung erhöht wird [53].

Ein weiteres effizientes Cytokin sah man in der Nutzung von SCF, dem Stammzellfaktor und Liganden von c-kit [54], dennoch wird dieses Zytokin trotz seines guten synergistischen Effekts mit G-CSF aufgrund seiner unerwünschten Wirkungen wie dem Auftreten von anaphylaktoiden Reaktionen nicht mehr angewandt [43].

Zur Unterstützung der Stammzellmobilisierung mit G-CSF steht seit 2009 auch das Bizekklam Plerixafor zur Verfügung, welches einen selektiven CXCR4 Inhibitor darstellt, der hämatopoetische Stammzellen innerhalb weniger Stunden mobilisieren kann [55].

Trotz dieser verschiedenartigen Mobilisierungsfaktoren ist immer noch G-CSF das wohl am meisten verwendete Agens, welches zur Mobilisierung endogener Stammzellen genutzt wird. Durch G-CSF Applikation kommt es zu einer Ausschüttung einer Reihe von Proteasen, darunter die neutrophile Elastase, Kathepsin G und MMPs. Diese sind unter anderem für die Inaktivierung von VCAM-1 auf den Stromazellen verantwortlich. Damit wird die Bindung mit VLA-4, welches auf der Zelloberfläche von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird verhindert [56]. Kathepsin G und Elastase spalten und inaktivieren im Knochenmark nicht nur VCAM-1 sondern führen auch zu einer Degradation von SDF-1 α [56,57]. Die freigesetzten Proteasen inaktivieren zusätzlich den c-kit Rezeptor auf der Oberfläche hämatopoetischer Stammzellen [58], der somit auch einen Beitrag zur Freisetzung der Progenitorzellen leistet.

In erster Linie wird davon ausgegangen, dass die Stammzellretention im Knochenmark über zwei Hauptmechanismen vermittelt wird: zum einen über die VCAM-1/VLA-4-Achse [59-61] und zum anderen über eine SDF-1 α /CXCR4 Interaktion. Dabei wird der SDF-1 α /CXCR4-Achse die Hauptverantwortung in Zusammenhang mit Mobilisierung und Homing zugeschrieben [62-64]. Diese Annahme begründet sich unter anderem durch die Beobachtung, dass eine Überexprimierung von SDF-1 α zu einer vermehrten Ausschüttung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark führt [65]. Neben den Hauptfaktoren SDF-1 α /CXCR4 und VCAM-1/VLA-4 wurde in neueren Arbeiten eine Mitbeteiligung weiterer Faktoren aufgedeckt. So konnte für die chemotaktischen Faktoren Sphingosin-1-Phosphat und Ceramid-1-Phosphat, beides Produkte des Fettstoffwechsels, sowie für die Komplementkaskade, Plasminogen und die MMPs eine Beteiligung am Prozess der Stammzellmigration gezeigt werden [66-70].

2.1.2.1. G-CSF

G-CSF ist das am häufigsten eingesetzte Agens im Rahmen der Stammzellmobilisierung mit zwei ihm eigenen Wirkmechanismen: zum einen löst es durch proteolytische Inaktivierung von Oberflächenfaktoren die Zellverankerung im Knochenmarkstroma, zum anderen kommt es zu einem Anstieg von Zytokinen und Wachstumsfaktoren im Serum [66,71]. Zugrunde liegender Effekt einer G-CSF Applikation ist die Ausschüttung von Elastase und Laktoferrin aus neutrophilen Granulozyten. Dadurch erfolgt eine Aktivierung neutrophiler Vorläufer im Knochenmark mit nachfolgender Degranulierung und Ausschüttung von Elastase und Kathepsin G ins Stroma, bevor die Vorläuferzellen in die Zirkulation migrieren. Die freigesetzten Proteasen inaktivieren im Knochenmarkstroma eine Reihe von Proteinen, die für die Retention der Zellen im Knochenmark verantwortlich sind. Zu den Substraten dieser proteolytischen Faktoren zählen VCAM-1, SDF-1 α , CXCR4 und der c-kit-Rezeptor [57,72]. Infolge einer G-CSF induzierten Stammzellausschüttung sind infolge dessen weniger c-kit, VLA-4, und CXCR4-Antigene auf der Oberfläche der zirkulierenden Stammzellen exprimiert als in der ursprünglichen Population im Knochenmark [73]. In der klinischen Anwendung stellen die Wirkstoffe Filgrastim bzw. Lenograstim in einer Dosierung von 10 µg/kg/Tag das Mittel der Wahl zur Induktion einer effizienten Stammzellmobilisierung dar [74]. In klinischen Studien [75-79], darunter die FIRSTLINE-AMI [79] oder die GCSF-STEMI [75] versprach man sich durch die Applikation von G-CSF und der damit verbundenen Stammzellmobilisierung eine Verbesserung der Pumpfunktion und eine Reduktion im linksventrikulären Remodeling. Jedoch wurde in der von unserer Arbeitsgruppe initialisierten placebo-kontrollierten G-CSF-STEMI Studie kein positiver Effekt einer G-CSF Monotherapie im Sinne einer verbesserten Herzfunktion oder einer geringeren Mortalität bei Patienten mit Myokardinfarkt erzielt [75]. Auch eine Meta-Analyse G-CSF-basierter Studien zeigte keinen positiven Effekt einer G-CSF Monotherapie am Menschen nach Myokardinfarkt [80].

2.1.3. Stammzellhoming

Ein effektives Homing spielt die entscheidende Rolle in der Nutzung endogener Stammzellen in unserem regenerativen Therapiekonzept. Im Infarktgeschehen wird die kardiale Rekrutierung der Progenitorzellen in erster Linie über die Interaktion des im ischämischen Gewebe vermehrt exprimierten Stromal-cell-derived-factor SDF-1 α und dem zellulären CXC-Rezeptor-4 CXCR4 vermittelt [7,46,47,81,82]. So wurde am Infarktmodell der Ratte eine erhöhte Expression von SDF-1 α unmittelbar nach Gefäßverschluss demonstriert und diese für die Induktion eines therapeutischen Stammzellhomings ins verletzte Myokard verantwortlich gemacht [46]. Auch im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sich in Abhängigkeit einer Ischämie die SDF-1 α /CXCR4-Achse für die Stammzellrekrutierung als der essentielle Faktor erwies [81].

2.1.3.1. SDF-1 α

Das Chemokin SDF-1 α wird von verschiedenen Zellarten, darunter Zellen des Knochenmarkstromas exprimiert und von Osteoblasten, Endothelzellen und Retikulumzellen sezerniert. Es fungiert als potentes Chemokin hämatopoetischer Stammzellen und ist mitverantwortlich für Zelladhäsion, das Überleben der Zellen und den Status des Zellzyklus [83]. In Gebieten zellulärer Verletzung ist seine Expression essentiell für die Migration und das Homing von Stamm- und Progenitorzellen [64,84]. Der Homingfaktor SDF-1 α wird daher von der Mehrzahl der Autoren als wichtigster Faktor in der Stammzellrekrutierung angesehen [62,85]. Dreh- und Angelpunkt im ischämischen Therapiemodell ist die vermehrte SDF-1 α Sekretion von Endothelzellen im verletzten Gewebe. So wird durch die Sekretion von SDF-1 α im geschädigten Gewebe ein Gradient geschaffen, der die Einwanderung CXCR4 positiver Zellen erleichtert. Die im ischämischen Gebiet stattfindende SDF-1 α Sekretion wird über HIF-1 α aktiviert und die gezielte Einwanderung über den CXCR4 der Progenitorzellen vermittelt [47].

2.1.3.2. Dipeptidylpeptidase IV

Die DPP-IV, auch bekannt als CD 26, ist eine ubiquitär vorkommende Serinprotease, die spezifisch Dipeptide am N-terminalen Ende von Oligopeptiden oder Proteinen abspaltet, die an ihrer Position 2 ein Alanin oder Prolin besitzen [17]. Dadurch wird die biologische Aktivität ihrer Substrate verändert oder inaktiviert. Die DPP-IV kommt sowohl als membranständiges Oberflächenprotein unter anderem in Muskel- und Endothelzellen, als auch in gelöster Form als zirkulierendes Protein vor [16-18,86]. Zu den potentiell kardioaktiven Substraten der DPP-IV gehören die beiden Inkretinhormone GIP und GLP-1, SDF-1 α , Substanz P und BNP [87]. Besondere Bedeutung im Rahmen ihres kardioprotektiven Potentials erlangten allen voran die beiden DPP-IV Substrate GLP-1 und SDF-1 α . Durch ihre Stabilisierung wurden zahlreiche kardioprotektive Effekte in Zusammenhang mit ischämischen Krankheitskomplexen nachgewiesen [6-8,88-92].

2.1.3.3. DPP-IV-Inhibitoren

Das Inkretin GLP-1(7-36) wird als Substrat der DPP-IV unter physiologischen Bedingungen schnell in seinen Metaboliten GLP-1(9-36) umgewandelt [93-97]. Gleichermassen unterliegt auch SDF-1 α einer schnellen Spaltung und Inaktivierung durch die ubiquitär vorkommende Serinprotease [16-18]. Um den enzymatischen Abbau des Schlüsselements im Homingprozess zirkulierender Stammzellen zu verhindern, galten die Bemühungen unserer Arbeitsgruppe einer Stabilisierung des myokardialen SDF-1 α . Die Umsetzung führte erst über eine genetische und dann pharmakologische Inaktivierung der DPP-IV im Mausmodell. Dadurch konnte eine bessere Einwanderung von Progenitorzellen ins ischämische Gewebe erreicht werden [6,8]. Mit den für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 klinisch zugelassenen DPP-IV Inhibitoren Sitagliptin, Vildagliptin und Saxagliptin stehen mit der Wirkstoffklasse der Gliptine effiziente und sichere Pharmaka für die DPP-IV Inhibition zur Verfügung [87,97]. In der Anwendung dieser relativ unspezifischen Therapieoption wird jedoch das komplette Spektrum der DPP-IV-Substrate vor dem Abbau bewahrt. Infolgedessen kann eine Multikausalität der vermittelten Kardioprotektivität nicht ausgeschlossen werden.

2.2. Das Konzept der dualen Stammzelltherapie

2.2.1. Übersicht

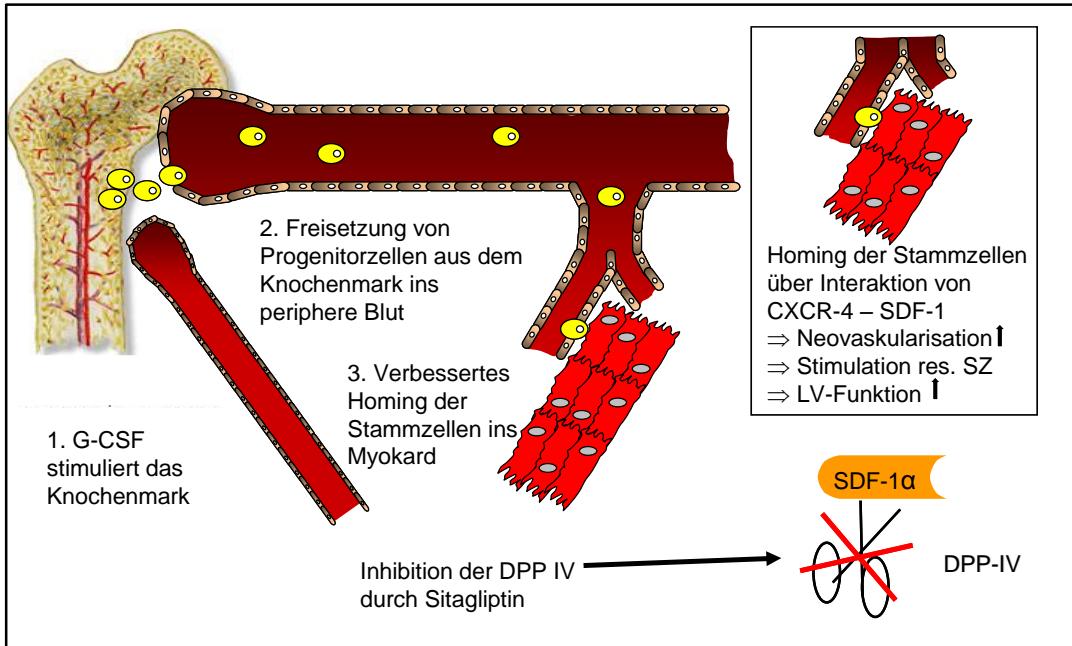


Abbildung 4: Das Konzept der dualen Stammzelltherapie besteht aus einer pharmakologischen Beeinflussung von Stammzellmobilisierung und dem anschließenden Homingprozess; aus Theiss *et al.* [98]; mit freundlicher Genehmigung der Mediengruppe Oberfranken

Das von unserer Arbeitsgruppe etablierte Konzept der dualen Stammzelltherapie beruht auf der Kombination einer optimierten Mobilisierung und verstärktem kardialem Homing knochenmarkstämmer Progenitorzellen [6-8]. Die physiologische Reaktion einer Stammzellausschüttung auf einen ischämischen Reiz [65] wird durch die Applikation des stammzellmobilisierenden Zytokins G-CSF verstärkt. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Mobilisierung von knochenmarkstämmigen Zellen in die periphere Zirkulation. Hauptverantwortlich für die anschließende Einwanderung der zirkulierenden Zellen ist der im ischämischen Gewebe verstärkt exprimierte Homingfaktor SDF-1 α [46,47,82]. Da dieser einer raschen Inaktivierung durch die DPP-IV unterliegt, zielt der zweite Pfeiler der dualen Stammzelltherapie auf die pharmakologische Hemmung dieser Serinprotease, mit daraus resultierender Stabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse [7]. Dadurch wird eine verstärkte Einwanderung der Stammzellen ins ischämische Gewebe erreicht.

2.2.2. Tiermodell

Von unserer Arbeitsgruppe konnte in verschiedenen präklinischen Arbeiten der kardiale Benefit des dualen Stammzellkonzepts nach Myokardinfarkt gezeigt werden. So wurde in einer ersten Studie belegt, dass sowohl eine genetische Ausschaltung der DPP-IV gezeigt in einem CD 26^{-/-} Mausmodell, als auch eine pharmakologische Hemmung der DPP-IV über Diprotin A, in Kombination mit einer G-CSF-Gabe zu vielfältigen kardioprotektiven Effekten führt. Gezeigt werden konnte eine Reduktion der myokardialen DPP-IV Aktivität, eine effiziente Einwanderung zirkulierender CXCR4 positiver Stammzellen ins ischämische Herz, eine Infarktgrößenreduktion und eine verbesserte Herzfunktion mit erhöhter Überlebensrate der einem Infarkt unterzogenen Tiere [6]. In der Folgestudie wurde der DPP-IV Inhibitor Diprotin A durch die zwei Vertreter Sitagliptin und Vildagliptin aus der Wirkstoffklasse der Glipptine ersetzt, die zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zugelassenen wurden. Auch in diesem Versuchsdesign konnte mit dem pharmakologischen Einsatz von Sitagliptin, analog zu den Ergebnissen der genetischen DPP-IV-Inhibition, eine vermehrte Einwanderung zirkulierender CXCR4 positiver Stammzellen ins ischämische Herz, kleinere Infarktgrößen und eine verbesserte Herzfunktion mit höheren Überlebensraten der Infarkttiere erreicht werden [8].

2.2.3. Klinische Studien

Der erste Schritt im Transfer der dualen Stammzelltherapie in die klinische Anwendung basierte auf der Verwendung von G-CSF, welches als effektives stammzellmobilisierendes Agens in der Hämatonkologie genutzt wird [38]. In den präklinischen Studien zur Zytokin-induzierten Stammzellmobilisierung wurden im Mausmodell mit permanenter Ligatur der Koronararterien gute Erfolge in der kardialen Regeneration erzielt. Dazu zählten höhere Überlebensraten, kleinere Infarktgrößen, verminderte ventrikuläre Dilatation und in Folge eine Verbesserung der hämodynamischen Funktion [28,99]. Basierend auf der im Mausmodell nachgewiesenen G-CSF vermittelten Kardioprotektivität wurde von unserer Arbeitsgruppe die klinische Studie G-CSF in STEMI bei Infarktpatienten nach

Revaskularisierung durch Stentimplantation umgesetzt [75]. Die Patienten erhielten G-CSF (Filgrastim) in einer Dosierung von 10 µg/kg s.c. Es wurde nach 3 Monaten, unabhängig von der erhaltenen Therapie eine transiente Verbesserung der Ejektionsfraktion nachgewiesen, die sich jedoch im Follow-Up nach einem Jahr wieder auf dem Ausgangsniveau nach Infarkt einpendelte. Damit konnte in der klinischen Studie durch die Verwendung von G-CSF im Gegensatz zu den hervorragenden Resultaten im Tiermodell [99] keine Verbesserung der myokardialen Funktion nachgewiesen werden [75]. Auch in anderen klinischen Studien konnten bei Infarktpatienten nach erfolgreicher Revaskularisierung mit einer G-CSF induzierten Stammzellmobilisierung keine positiven Effekte auf Infarktgröße, linksventrikuläre Pumpfunktion oder die Restenosisraten erzielt werden [76-78]. In einer zusammenfassenden Gegenüberstellung von *Moazzami et al.* konnte für G-CSF als Monotherapeutikum in keiner der untersuchten Studien ein positiver Effekt auf die linksventrikulären Funktionsparameter festgestellt werden [80]. Da sich die klinischen Ergebnisse des therapeutischen G-CSF Einsatzes bei Patienten nach Myokardinfarkt nicht deckungsgleich zu den Resultaten aus den tierexperimentellen Arbeiten verhielten, suchte man nach einer Optimierung des Versuchdesigns und konzentrierte sich auf die Einwanderung der Vorläuferzellen in den ischämischen Herzmuskel. Man nutzte im Homingprozess den Hauptfaktor SDF-1 α und erreichte über dessen Stabilisierung eine vermehrte Stammzellmigration in das Myokard. Im Tiermodell wurde die SDF-1 α Stabilisierung durch genetische DPP-IV-Inhibition in CD 26 knock out Mäusen bzw. medikamentös durch den DPP-IV-Inhibitor Diprotin A untersucht und dadurch höhere Überlebensraten, kleinere Infarktgrößen und eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion erreicht [6]. Die essentielle Rolle der SDF-1 α /CXCR4-Achse für den Homingprozess der Vorläuferzellen in den ischämischen Herzmuskel und damit für die Wirksamkeit der dualen Stammzelltherapie wurde in einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe bestätigt [7]. Damit war das Konzept der dualen Stammzelltherapie etabliert und akkreditiert. Im Anschluss wurde die DPP-IV-Inhibition anstelle von Diprotin A durch den pharmakologischen Einsatz des für die Therapie des D.m. Typ 2 bereits klinisch zugelassenen Wirkstoffes Sitagliptin im Mausmodell überprüft [8]. Die kardioprotektiven Ergebnisse dieser präklinischen Studie, innerhalb welcher die Kombination aus G-CSF und Sitagliptin jener der G-CSF-Monotherapie signifikant überlegen waren, gaben den

Impuls für die Initiierung der klinischen Studie SITAGRAMI. Innerhalb dieser Studie wurde die Wirksamkeit einer kombinierten G-CSF und Sitagliptin Therapie nach erfolgreicher Revaskularisierung bei Infarktpatienten anhand der linksventrikulären Funktionsparameter evaluiert [100].

2.3. Glukagon-Like-Peptide-1

2.3.1. Übersicht

GLP-1 gehört zur Proglukagon Familie der Inkretine und reguliert unter anderem Appetit und Sättigungsgefühl, die glucoseabhängige Insulinsekretion, die β -Zellproliferation und -apoptose sowie die Hemmung der Glukagonsekretion [87,101-106]. In Korrelation zur weitläufigen Expression des GLP-1R wird über seine Signaltransduktion eine Vielzahl von weiteren GLP-1 Effekten in den verschiedenen Organsystemen vermittelt. So kommt es im Gastrointestinaltrakt über GLP-1R Agonisten zu einer Hemmung der Magensäuresekretion und Magenentleerung. Dadurch wird der postprandiale Glukosespiegel sowohl in Diabetes mellitus Typ 1 als auch Typ 2 Patienten reduziert [106-109].

Auch im ZNS wurden GLP-1-Rezeptoren in diversen Gebieten nachgewiesen. Diese Regionen sind verantwortlich für Nahrungsaufnahme, Motilität des Magens, Glucoregulierung und kardiovaskuläre Funktionen [103]. Neben den zentral medierten metabolischen und autonomen Funktionen konnte für GLP-1 und seine Stabilisierung durch DPP-IV-Inhibition ein neuroprotektiver Effekt in verschiedenen Krankheitsmodellen nachgewiesen werden [110].

Die GLP-1 Sekretion wird unter anderem durch den Stimulus der Nahrungsaufnahme im Dünndarm, vor allem aber im distalen Ileum und Colon aus enteroendokrinen L-Zellen angeregt [111-113]. Die Sekretion erfolgt kontinuierlich auf einem basalen Level. Nach Nahrungsaufnahme steigt die Plasmakonzentration auf das zwei- bis dreifache an [114-116].

Unter den verschiedenen sezernierten Formen des GLP-1 galt das GLP-1(7-36) lange Zeit als der eigentliche biologisch aktive Metabolit. Die Halbwertszeit des bioaktiven GLP-1(7-36) beträgt lediglich ein bis zwei Minuten [94,95,117], da es

als DPP-IV Substrat durch die Abspaltung eines Dipeptids am aminoterminalen Ende inaktiviert wird. Auf diese Weise wird also auch GLP-1 in kürzester Zeit durch die DPP-IV gespalten und in seinen Metaboliten GLP-1(9-36) umgewandelt [86,94,96,97]. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die DPP-IV unter anderem in Endothelzellen zu finden ist, so auch in Gefäßen, die die intestinale Mukosa flankieren, so dass die Hälfte des sezernierten GLP-1(7-36) bereits inaktiviert ist, bevor es das portale Gefäßsystem erreicht [117].

Um die insulinotrope Wirkung der Inkretine in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 nutzen zu können, wurden zwei Wirkstoffklassen entwickelt: Zum einen die DPP-IV-Inhibitoren, darunter Sitagliptin, Vildagliptin und Saxagliptin. Zum anderen die GLP-1R Agonisten Exenatid, Liraglutid und Albiglutid.

2.3.2. GLP-1 Rezeptor

Der GLP-1 Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und vermittelt den Großteil des GLP-1 Effekts über die spezifische Bindung von GLP-1(7-36) [118,119]. Der ursprünglich in pankreatischen Inselzellen entdeckte GLP-1R wurde in zahlreichen Lokalisationen wie Lunge, Niere, Nervensystem, auf Lymphozyten, sowie in Herz und Blutgefäßen aufgezeigt [120,121]. Nachgewiesen wurde der kardiale GLP-1 Rezeptor in Maus und Ratte über mRNA Transkripte mittels RT-PCR [12,121], im menschlichen Herz mittels Ribonuklease Protection Assays [120] und im Hund mittels immunhistochemischer Analysen in Kardiomyozyten, Endokard, Endothel und in glatten Muskelzellen der Koronararterien sowie mittels Western Blotting auch in Sarcolemembranen von Herzmuskelzellen [12]. Lange ging man davon aus, dass die GLP-1-Wirkung nur über die rezeptorinduzierte Signaltransduktion durch die biologisch aktive Form GLP-1(7-36) ausgeübt wird. Doch gibt es Hinweise, vor allem im kardiovaskulären System, dass es auch rezeptorunabhängige Wirkungen von GLP-1(7-36) und seinem lange als unwirksam geltenden Metaboliten GLP-1(9-36) gibt [12].

2.3.3. GLP-1R^{-/-} Mäuse

GLP-1R^{-/-} Mäuse durchlaufen eine normale Entwicklung mit einem physiologischen Körpergewicht und zeigen keine Auffälligkeiten bezüglich Nahrungsaufnahme, Verhalten oder Fortpflanzung. Nach oraler und nach intraperitonealer Glukosestimulation weisen diese Tiere einen erhöhten Blutglukosespiegel in Verbindung mit erniedrigten Insulinkonzentrationen auf [122]. Da der GLP-1R in vielen Organen, darunter auch im zentralen Nervensystem und im Herz exprimiert wird, zeigen GLP-1R^{-/-} Mäuse Besonderheiten im kardiovaskulären System sowie im Stressverhalten [123,124].

Im Alter von acht Wochen wurden eine reduzierte Herzruhefrequenz und ein erhöhter linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen in Millar Tip Katheteruntersuchungen gemessen [123]. Im Gegensatz dazu lassen sich bei fünf Monate alten Tieren anhand der Funktionsparameter keine signifikanten Unterschiede zwischen GLP-1R^{-/-} Mäusen und Wildtypen aufzeigen [123]. Auf histologischer Ebene hingegen zeigt sich mit fortschreitendem Alter eine Zunahme der ventrikulären Wandstärke der Herzen von GLP-1R^{-/-} Mäusen [123].

Abweichungen in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse der GLP-1R^{-/-} Tiere äußern sich in einer atypischen Kortikosteronantwort auf Stress [124]. Und obwohl in zahlreichen pharmakologischen Studien exzitatorische Wirkungen für GLP-1 nachgewiesen wurden [125], zeigten Experimente an Mäusen mit einem ubiquitären GLP-1R knock out eine verspätete, dann aber oft überschießende Schreckreaktion. Auf geringe Reize reagierten die Tiere mit einer erhöhten Kortikosteron Freisetzung, was auf einen stress-inhibitorischen Effekt der GLP-1R Aktivierung im ZNS schließen lässt [124].

2.3.4. Kardioprotektive Effekte durch GLP-1

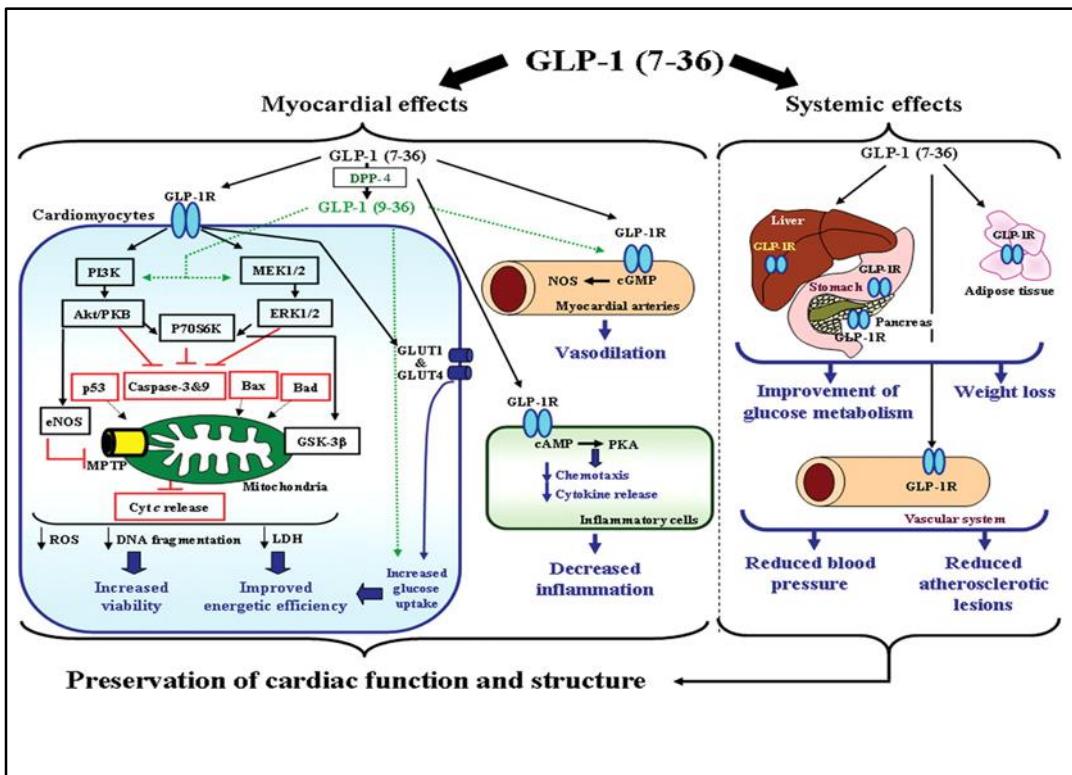


Abbildung 5: Direkte myokardiale und indirekte systemische Signalwege, welche die GLP-1R-induzierte Kardioprotektivität vermitteln; aus Ravassa *et al.*[126]; mit freundlicher Genehmigung der Oxford University Press

Erste Arbeiten zeigten in einer Kardiomyozytenkultur der Ratte für GLP-1 zwar eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, jedoch ohne Beeinflussung von Ca^{2+} Konzentration und Kontraktilität [127]. Mittels Patch-Clamp-Technik hingegen konnte in kaninen ventrikulären Herzmuskelzellen ein Proteinkinase-abhängiger Ca^{2+} Anstieg nach GLP-1 nachgewiesen werden [128].

Auch auf die Apoptoseinduktion scheint die GLP-1 vermittelte Wirkung einen positiven Einfluss zu haben, wie unter anderem in einer Apoptosereduzierung durch natives GLP-1 in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte gezeigt wurde [129]. Mittels des GLP-1R Agonisten Exendin-4 wurde in einer neonatalen Kardiomyozytenkultur der Maus eine Zunahme der Phosphorylierung von AKT und ERK beobachtet [130]. Der gleiche Effekt, nämlich eine direkte Aktivierung von PI3K/AKT und ERK, mit dem Resultat einer verminderter Apoptose, wurde unter Verwendung von GLP-1 in murinen Kardiomyozyten nachgewiesen.

Eine Besonderheit in diesem Versuchsdesign bestand in der Simulierung der Risikofaktoren einer diabetischen Grunderkrankung [131]. Auch für Liraglutid als weiteren GLP-1R Agonisten konnten antiapoptotische Effekte in neonatalen murinen Kardiomyozyten durch eine verminderte Kaspase-3-Spaltung gezeigt werden [13].

Weitere wichtige Erkenntnisse stammen aus Untersuchungen an isolierten Organen. So wurde unter aerober Perfusion nach GLP-1 Applikation eine verbesserte myokardiale Glukoseaufnahme gezeigt [11,12]. Auch kam es im Ischämie-Reperfusionsmodell an isolierten Herzen von Maus und Ratte unter dem Einfluss von GLP-1 und Exendin-4 zu einer Erholung des LVEDP [11,12,132]. Während sich in einer Studie unter Langendorffperfusion der LVEDP nach GLP-1 Zugabe reduzierte [11], konnte in einem ähnlichen Modell nach Hinzufügen von GLP-1 zum Perfusat eine Verbesserung des LVEDP um 20 % erreicht werden. Interessanterweise wurde dieser Effekt sowohl an Wildtyporganen als auch an Herzen von GLP-1R^{-/-} Mäusen beobachtet [12].

Erste Erkenntnisse zu kardiovaskulären GLP-1-Wirkungen im Tiermodell wurden mit intravenösen GLP-1 Injektionen gewonnen. Humanes synthetisches GLP-1 i.v. erhöhte den systolischen und diastolischen Blutdruck sowie die Herzfrequenz in der Ratte [133]. Später konnte gezeigt werden, dass der Effekt nur in Abhängigkeit vom GLP-1R erzielt werden konnte [134]. Neben der Beeinflussbarkeit von Herzfrequenz und Blutdruck durch GLP-1 konnten in zahlreichen präklinischen Arbeiten kardioprotektive Effekte von sowohl nativem GLP-1 als auch von GLP-1R Agonisten eindrucksvoll demonstriert werden [11-15]. So reduzierte eine GLP-1 Infusion im Ischämie-Reperfusionsmodell der Ratte die Infarktgröße [14,15]. Ebenfalls im Modell der Ratte konnte gezeigt werden, dass eine längere Gliptinbehandlung zur DPP-IV-Inhibition glukoseabhängig zu einer Reduktion der Infarktgröße über die GLP-1-Rezeptor-PKA Signaltransduktion führte [89].

Im Großtiermodell konnte neben einem reduzierten Infarktareal auch eine verbesserte linksventrikuläre Funktion mit Exendin-4 erreicht werden [135], während eine eindeutige Kardioprotaktivität mit rekombinanten GLP-1 [136] oder mit einer Liraglutid-Applikation [137] nicht nachgewiesen werden konnte.

2.3.5. Klinische Studien

Aufgrund der Verstärkung der glukoseabhängigen Insulinsekretion und zeitgleichen Einschränkung der Glukagonsekretion [87,102] wurde der DPP-IV-Inhibitor Sitagliptin zur Stabilisierung von GLP-1 und damit Senkung des Blutzuckerspiegels als Antidiabetikum zur Therapie des D.m. Typ 2 zugelassen. Durch die GLP-1 induzierte Blutzuckerkontrolle wird indirekt ein positiver Effekt auf kardiovaskuläre Komplikationen bei Diabetespatienten erreicht, zumal eine solche Vorerkrankung zu den Hauptrisikofaktoren für das Auftreten eines Myokardinfarkts zählt [2-5]. In präklinischen wie auch klinischen Studien erfolgte mehrfach der Nachweis, dass GLP-1 durch seinen begünstigenden Effekt auf die kardiovaskulären Risikofaktoren einerseits einen positiven Einfluss auf den kardiovaskulären Metabolismus ausübt, andererseits wurde man auf seine direkten kardioprotektiven Wirkungen aufmerksam [138].

Die erste Umsetzung der Ergebnisse aus den Tiermodellen in die klinische Forschung erfolgte in einer klinischen Pilotstudie, welche die kardioprotektive GLP-1-Wirkung nach akutem Myokardinfarkt untersuchte. Eine GLP-Infusion nach erfolgreicher Revaskularisierung verbesserte signifikant die linksventrikuläre Ejektionsfraktion [10]. In einer weiteren Studie wurden die Effekte des GLP-1 Analogons Exenatid untersucht. Die Therapie begann im Vorfeld einer PCI zur Revaskularisierung eines ST-Hebungssinfarkts. Trotz Reduktion des Infarktareals unter Exenatidtherapie blieben Mortalität und linksventrikuläre Pumpfunktion unbeeinflusst [139]. Studien mit Einsatz von DPP-IV-Inhibitoren wiederum bestätigten den Benefit auf die kardiale Pumpfunktion: So konnte die im Rahmen einer Dobutamin-Stress-Echokardiografie oder einer PCI auftretende linksventrikuläre Dysfunktion und das myokardiale Stunning durch die Verwendung des DPP-IV-Inhibitors Sitagliptin abgeschwächt werden [140,141].

2.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Konzept der dualen Stammzelltherapie, das zum einen die zytokininduzierte Mobilisierung von Progenitorzellen und zum anderen die Hemmung der DPP-IV umfasst, führte zu einem verbesserten Homing mobilisierter Vorläuferzellen, einem reduzierten Remodeling, besserer Herzfunktion und höheren Überlebensraten im präklinischen Mausmodell [6,8]. Auch die Bedeutung der SDF-1 α /CXCR4-Achse für die Wirksamkeit der Stammzelltherapie konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden [7].

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse suchten wir nun einerseits nach einem tieferen Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen für die Kardioprotektivität der dualen Stammzelltherapie und zum anderen versuchten wir diese vom kardialen Benefit des GLP-1-Effekts auf das ischämische Myokard abzugrenzen. Um die spezifische Wirksamkeit der Stammzelltherapie zu demonstrieren, verwendeten wir in der vorliegenden Arbeit ein GLP-1R $^{-/-}$ Mausmodell. Dieses Tiermodell ermöglichte uns, die durch die DPP-IV-Hemmung erzielte Kardioprotektivität am GLP-1R auszuschalten und die Stammzelltherapie unabhängig davon zu untersuchen.

Zusätzlich zur Klärung dieser essentiellen Fragestellung untersuchten wir in dieser Arbeit die Auswirkungen eines Myokardinfarkts auf weitere Organsysteme, die durch die eingeschränkte Pumpfunktion im progredienten Verlauf einer Herzinsuffizienz betroffen sind.

Somit versuchten wir in unserem Modell folgende Hypothesen zu evaluieren:

- 1) Eine effiziente Mobilisierung und ein effektives Homing der Progenitorzellen sind vom GLP-1 Rezeptor unabhängig.
- 2) Die kardioprotektiven Effekte der dualen Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt sind ohne Aktivierung des GLP-1-Signalwegs an seinem Rezeptor nachweisbar.
- 3) Die duale Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt führt zu einer ausreichenden Stabilisierung der Herzfunktion, so dass eine Beeinträchtigung anderer Organsysteme verhindert wird.

III. VERSUCHSTIERE, MATERIAL UND METHODEN

3.1. Versuchsdesign

3.1.1. Behandlungsprotokoll

3.1.1.1. Analgesie

Alle Tiere erhielten unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit eine Schmerztherapie mit Buprenorphin in der Dosierung 0,1 mg/kg KM. Unmittelbar vor Operationsbeginn wurde mit der Medikation begonnen, um zu gewährleisten, dass die Tiere postoperativ ausreichend analgetisch versorgt sind. Die Analgesie wurde über fünf Tage mit intraperitonealen Buprenorphininjektionen im Abstand von acht Stunden aufrechterhalten.

3.1.1.2. Duale Stammzelltherapie

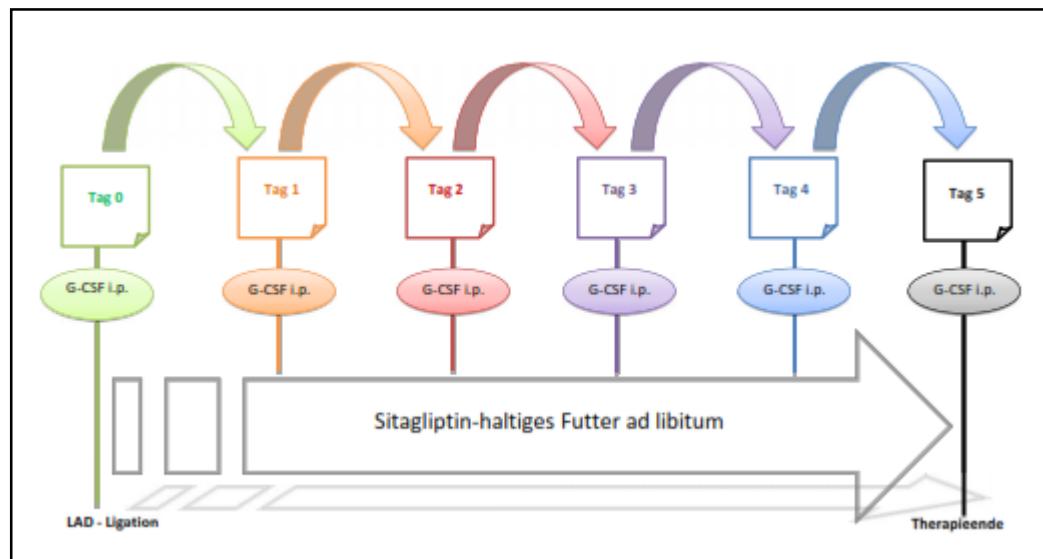


Abbildung 6: Behandlungsprotokoll der dualen Stammzelltherapie, unter welcher den Tieren über sechs Tage einmal täglich G-CSF i.p. injiziert wurde, während Sitagliptin-haltiges Futter zur freien Verfügung stand.

Nach induziertem Myokardinfarkt wurde den Tieren 50 µl des stammzellmobilisierenden Zytokins G-CSF einmal täglich über sechs Tage intraperitoneal injiziert. Während dieser Zeit erhielten die Tiere aus der Versuchsgruppe Sitagliptin-haltiges (2550 mg/kg) Futter ad libitum [8].

3.1.1.3. Kontrollgruppe

Den Tieren aus der Kontrollgruppe wurde einmal täglich über sechs Tage 50 µl einer physiologischen Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht. Als Futter stand den Tieren eine Standarddiät (ssniff) ad libitum zur Verfügung.

3.1.2. Zeitverlauf

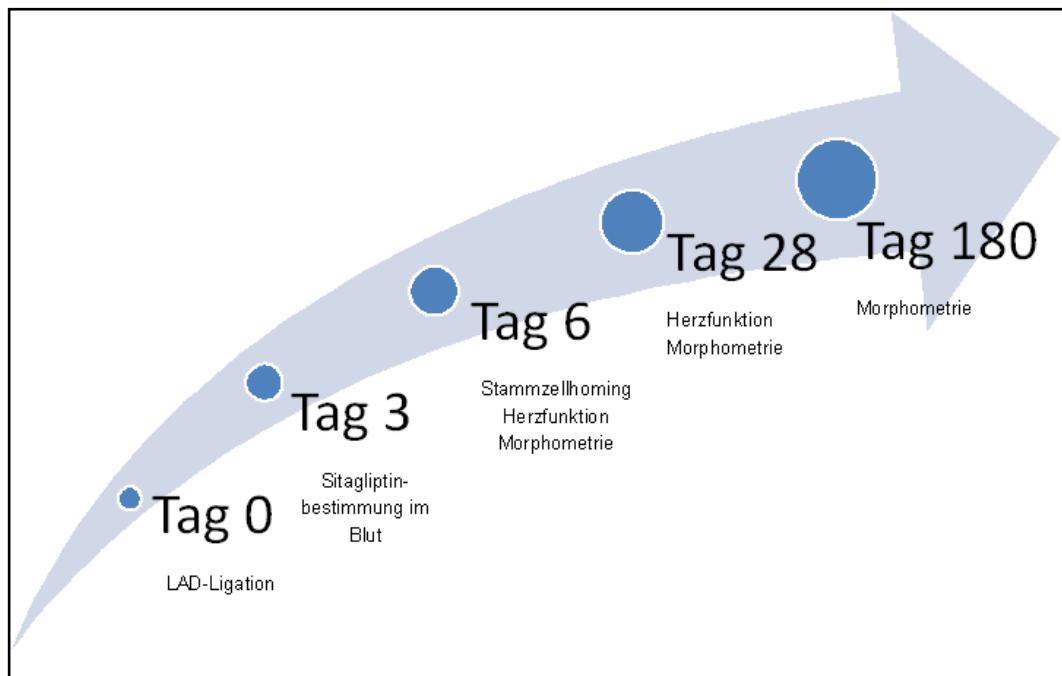


Abbildung 7: Zeitliche Abfolge des Versuchsdesigns zur Evaluierung der dualen Stammzelltherapie im GLP-1R^{-/-} Mausmodell.

Die Tiere wurden an Tag 0 einem chirurgischen Eingriff unterzogen. Während der durchgeführten Thorakotomie führte ein permanenter Verschluß der LAD zum linksventrikulären Infarkt. Zur Überprüfung einer ausreichenden Sitagliptinsättigung im peripheren Blut wurde postoperativ nach drei Tagen eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Mit durchflusszytometrischen Analysen sechs Tage nach Infarktinduzierung wurde die Effizienz der Sitagliptintherapie hinsichtlich Stammzellmobilisierung und Homing verifiziert. Die linksventrikulären Funktionsparameter wurden anhand einer Herzkatheteruntersuchung an Tag sechs und Tag achtundzwanzig erhoben. Zudem wurden die morphometrischen Analysen zusätzlich zu den frühen Zeitpunkten an Tag 6 und Tag 28 noch einmal nach 180 Tagen durchgeführt. Damit wurden in unserer Arbeitsgruppe erstmals die extrakardialen Langzeitauswirkungen eines Infarkts auf Lunge und Leber evaluiert.

3.1.3. Material

Buprenorphin	0,1 mg/kg KM i.p.	Temgesic®
Eppendorf-Cups		Eppendorf, Hamburg
G-CSF	2,76 µg/50 µl i.p.	Filgrastim®
NaCl 0,9%		Braun, Melsungen
Sitagliptin	500 mg/kg KM	Januvia®
Sitagliptin-haltige Standarddiät 2550 mg/kg p.os		ssniff
Standarddiät		ssniff
Spritzen 1ml BD Micro-Fine		Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 1: Auflistung der Materialien und Medikamente im Rahmen der Behandlungsprotokolle

3.2. Versuchstiere

3.2.1. Haltungsbedingungen

Die Zucht und Haltung der GLP-1R^{-/-} Mäuse erfolgte in einem offenen Haltungssystem an den Standorten Medizinische Klinik und Poliklinik I und Institut für Tierpathologie am Zentrum für klinische Tiermedizin. Die Mäuse wurden in klimatisierten Räumen mit einem 12 Stunden Tag/Nacht-Lichtzyklus in Standardkäfigen vom Typ II long gehalten. Ausgestattet waren die Käfige mit Plastikhäuschen und Zellstofftücher als Nestbaumaterial. Als Einstreu wurde JRS Lignocel Hygienestreu verwendet. Die Tiere erhielten Wasser und eine Standarddiät ad libitum. Der Tierbestand wurde in regelmäßigen Abständen gemäß FELASA Empfehlungen mikrobiologisch untersucht.

3.2.2. Gesetzliche Bestimmungen

Gemäß §8 Tierschutzgesetz wurde die experimentelle Durchführung durch die Regierung von Oberbayern unter den GZ: 55.2-1-54-2531-56-11 und 55.2-1-54-2531-58-13 genehmigt.

3.2.3. Mausstamm und Zucht der verwendeten Tiere

Für die Versuche wurden GLP-1R^{-/-} Mäuse in einem Alter von 8-12 Wochen verwendet. Diese Linie wurde 1996 generiert [122]. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere entstammten einer eigenen Zucht der Medizinischen Klinik und Poliklinik I und des Instituts für Tierpathologie am Zentrum für klinische Tiermedizin. Die erste Generation an Zuchtpaaren wurde von einem auf die Generierung genetisch modifizierter Mäuse spezialisierten Züchter bezogen (Taconic, Dänemark).

3.3. Genotypisierung durch PCR

Der genetische knock out des GLP-1 Rezeptors wurde durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion verifiziert. Das PCR-Protokoll wurde 2007 von Rhonda Wideman etabliert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die für die Genotypisierung benötigte DNA wurde aus Ohrstanzen gewonnen. Im Zuge der Tier-Kennzeichnung beim Absetzen wurde dieses Gewebe genutzt und bis zur Durchführung der PCR bei –20°C konserviert.

3.3.1. Material

Agarose	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Braun, Melsungen
DTT	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
GLP1R/F2 und /R2	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
IMR 13 und 14	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
KCL	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP's	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
TAE-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Taq DNA Polymerase (rekombinant)	Fermentas, St. Leon-Rot

Tabelle 2: Auflistung der Materialien und Substanzen im Rahmen der PCR

3.3.2. Primer

Um die Ausschaltung des GLP-Rezeptor-Gens nachzuweisen, wurden folgende Oligonukleotid-Primer eingesetzt:

Primerbezeichnung	Sequenz	
OIMR0013	CTTGGGTGGAGAGGCTATT	280 bp Fragment des NeoR Gens
OIMR0014	AGGTGAGATGACAGGAGATC	
GLP1R F2	TACACAATGGGGAGCCCTA	437 bp Fragment des GLP-1R Gens (im Intron 6)
GLP1R R2	AAGTCATGGATGTGTCTGGA	

Tabelle 3: Auflistung der im Rahmen der PCR verwendeten Primersequenzen

3.3.3. DNA Isolierung

Die Ohrstanzen wurden über Nacht mit je 150 µl des Prämix in einem Heizblock (HLC, Bovenden) bei 55°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben gevortext (Scientific Industries, NY, USA) und anschließend zentrifugiert (Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Um die Proteinase zu inaktivieren wurden die Proben für 30 min bei 90°C inkubiert.

Verdaupuffer (10x)		Prämix (n=10)
500 mM KCL		Verdaupuffer (10x) 150 µl
100 mM Tris-HCl, pH 8,3		SDS 10 % 0,75 µl
25 mM MgCl ₂		0,2 M DTT 175 µl
0,1 mg/ml Gelatine		10 mg/ml Proteinase K 30 µl
		Aqua dest. 1170 µl

Tabelle 4: Pipetterschema zur Herstellung des Prämix für die DNA-Isolierung

3.3.4. PCR

3 µl der isolierten DNA wurden zu 22 µl Mastermix in PCR-Analyse Cups pipettiert. Die DNA eines Wildtyps diente als Negativ- und H₂O als Qualitätskontrolle.

PCR Ansatz									
DNA	PCR-Puffer (10x)	MgCl ₂ (25mM)	d NTP (10mM)	GLP-1R/F2	GLP-1R/R2	IMR 13	IMR 14	Aqua dest.	Taq
3,0 µl	2,5 µl	1,5 µl	0,5 µl	1,25 µl	1,25 µl	0,94 µl	0,94 µl	12,92 µl	0,2 µl

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung des Mastermix für die PCR-Analyse

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) mit folgendem Programm durchgeführt: es wurden jeweils für 1 min: 94°C, 59°C, und 72°C in 40 Zyklen wiederholt.

3.3.5. Gelelektrophorese

3.3.5.1. Gelherstellung

4 g Agarose wurden in einen Erlenmeyerkolben abgewogen und 200 ml TAE Puffer hinzugefügt. In einer Mikrowelle wurde die Lösung bei 530 W für 5 min aufgekocht. Auf einem Röhrtisch (Heidolph, Schwabach) ließ man das Gemisch bei 700 rpm für 30 min rühren, bis es auf 60°C abgekühlt war. Anschließend wurden 20 µl Ethidiumbromid dazugegeben und das Gel in eine Gelkammer (Consort, Turnhout, Belgien) gegossen.

3.3.5.2. Durchführung der Elektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese, bei 140 V für 45 min nach ihrer Größe aufgetrennt.

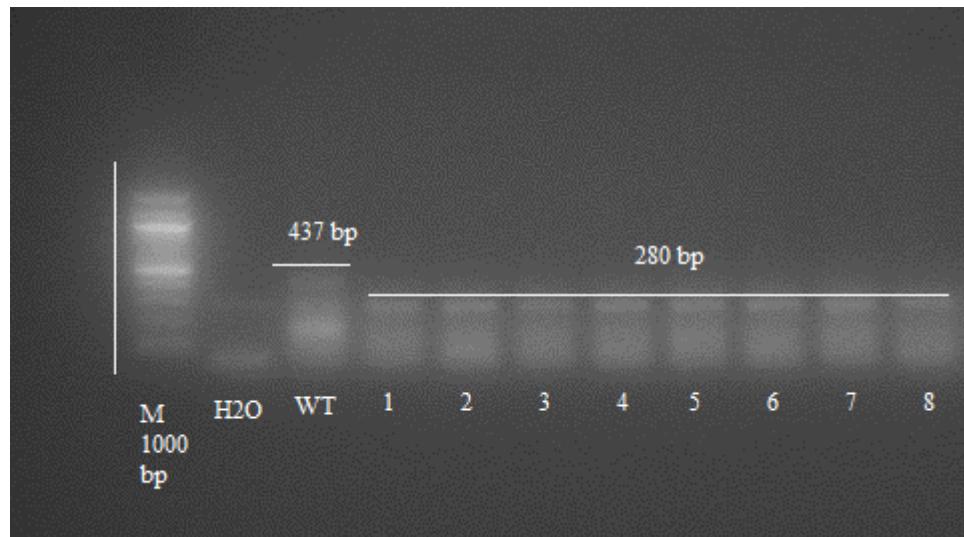


Abbildung 8: Repräsentatives Beispiel einer durchgeföhrten Gelelektrophorese zur Genotypisierung der GLP-1R^{-/-} Mäuse mit einem PCR Produkt bei 280 bp.

Anhand der Anzahl von Basenpaaren konnten der GLP-1R knock out in den GLP-1R^{-/-} Mäusen von der GLP-1R Expression der Wildtypen unterschieden werden. Das PCR-Produkt des unveränderten GLP-1R im CD1 Wildtyp bestand aus 437 bp. Bei GLP-1R^{-/-} Mäusen entstand das PCR-Produkt des veränderten Rezeptors bei 280 bp.

3.4. Infarktmodell

3.4.1. Material

Acepromacin, Vetranquil® 1%	Ceva, Düsseldorf
Buprenorphinhydrochlorid, Temgesic®	Essex Pharma, München
Dexpanthenol-Augensalbe, Bepanthen®	Bayer, Leverkusen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Enthaarungscreme, Veet	Reckitt Benckiser, Mannheim
Heparin-Natrium 25.000 I.E./5 ml	Braun, Melsungen
Ketaminhydrochlorid, Ketamin-Inresa® 5%	Inresa, Freiburg
NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen
Kanülen, Sterican	Braun, Melsungen
Klebestreifen, Durapore	3M Healthcare, Neuss
Mikrochirurgische Instrumente	FST, Heidelberg
Nahtmaterial, Prolene 5-0, 8-0	Ethicon, Norderstedt
Povidon-Iod, Braunol®	Braun, Melsungen
Spritzen, 1 ml, 2 ml, 10 ml BD Plastipak	Beckton Dickinson, Heidelberg
Xylazinhydrochlorid, Rompun® 2%	Bayer, Leverkusen

Tabelle 6: Auflistung der Materialien und Medikamente im Rahmen der Infarktinduktion durch LAD-Ligatur

3.4.2. Anästhesie

Präoperativ wurden die Tiere für die gewichtsadaptierte Dosisbestimmung der Anästhetika gewogen (ScoutPro, Ohaus, Pine Brook, USA). Zur Prämedikation erhielten die Tiere 2 mg/kg KM Acepromacin i.p. Nach durchschnittlich zwanzig Minuten trat eine deutliche Sedation auf und die Tiere wurden mit einer Kombination aus 13 mg/kg KM Xylazin und 65 mg/kg KM Ketamin i.p. anästhesiert.

3.4.3. Analgesie

Die Tiere erhielten zur Schmerztherapie Buprenorphin intraperitoneal in der Dosierung 0,1 mg/kg KM. Die erste Injektion wurde vor Operationsbeginn verabreicht, um eine vollständige postoperative Analgesie zu gewährleisten. Die analgetische Medikation wurde über fünf Tage mit intraperitonealen Buprenorphininjektionen in einem Abstand von acht Stunden durchgeführt.

3.4.4. LAD-Ligatur

Das Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde durch einen erloschenen Zwischenzehenreflex sichergestellt. Um ein Austrocknen der Kornea während des Eingriffs zu verhindern wurde eine Dexpanthenol-Augensalbe verwendet. Eine stabile dorsale Lagerung der Tiere auf der Wärmeplatte wurde mittels Klebestreifen über den Gliedmaßen erreicht. Zur kontinuierlichen Temperaturkontrolle wurde eine rektale Messsonde verwendet. Durch dieses Mess-Wärmesystem (FMI, Seeheim) konnte eine konstante Körpertemperatur von 37,5°C gewährleistet werden. Das OP-Feld wurde mit 70 %igem Ethanol entfettet, mit einer Enthaarungscreme enthaart und mit Jod antiseptisch vorbereitet. Nach Fixierung des Oberkiefers über ein dünnes Gummiband an der Wärmeplatte wurde über den Glandulae mandibularis ein ca. 0,7 mm langer Hautschnitt angelegt und die Speicheldrüsen in der Mitte stumpf getrennt. Dadurch erreichte man eine freie Sicht auf die Trachea. Nun wurden die Tiere unter Sicht intubiert, der Tubus mittels Klebeband fixiert und die Haut mit einem 5-0 Faden in einer fortlaufenden Naht wieder verschlossen. Die Tiere wurden über ein Minivent-Beatmungssystem (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) mit einem Atemzugvolumen von 200 µl und einer Frequenz von 150 Zügen/min beatmet. Vor Beginn der Thorakotomie erfolgte die erste intraperitoneale Buprenorhinjektion mit 0,1 mg/kg KM. Die Tiere wurden nun auf der Wärmeplatte unter einem Mikroskop (Leica A60, Wetzlar) platziert. Der chirurgische Zugang lag über dem zweiten Interkostalraum. Der ca. 1 cm lange Hautschnitt wurde parallel zu den Rippen verlaufend zwischen Sternum und der linken Axilla angelegt. Die Thorakotomie erfolgte durch die Durchtrennung des Musculus pectoralis und des Musculus intercostalis. Um eine freie Sicht auf das

Herz zu ermöglichen wurden jeweils die zweite und dritte Rippe mit einem 5-0 Faden umstochen, der Interkostalraum aufgespreizt und die Haltefäden mit Klebestreifen an der Unterlage fixiert. Zur besseren Darstellbarkeit der koronaren Blutgefäße wurde das Perikard stumpf abpräpariert. Nun erfolgte die Ligatur der LAD mit einem 8-0 Faden. Der korrekte Sitz der Ligatur konnte am Auftreten einer Ischämie des Myokards erkannt werden. Der Wiederverschluss des Thorax erfolgte durch drei Einzelknopfhefte, die jeweils die zweite und dritte Rippe umspannten. Anschließend wurden die Muskelschichten und die Haut mit einem 5-0 Faden fortlaufend verschlossen. Abschließend wurde das Operationfeld mit Braunol behandelt, die Tiere nach Wiedereinsetzen der Reflexe extubiert und bis zum vollständigen Erwachen aus der Anästhesie unter einer Rotlichtlampe gehalten.

3.4.5. Gewebegewinnung

Für die jeweilige Gewebeentnahme wurden die Tiere analog der unter Punkt 3.4.2. beschriebenen Methode anästhetisiert. In tiefer Narkose wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

3.4.5.1. Blutentnahme

Das Tier wurde in dorsaler Lage mittels Klebestreifen auf einer Unterlage fixiert. Haut und Abdominalmuskulatur wurden durchtrennt und der Schnitt bis zum Proc. xiphoideus erweitert. Dieser wurde mithilfe einer Pinzette angehoben, um den Thorax ausgehend vom Xiphoideum V-förmig durch Durchtrennung der Rippen zu eröffnen. Das noch schlagende Herz wurde vorsichtig an seiner Basis mit einer Pinzette in seiner Position fixiert. Mittels einer 20 G Kanüle wurde der linke Ventrikel apikal punktiert und das Blut langsam in eine mit 150 µl Heparin-Natrium befüllten 2 ml Spritze aspiriert.

3.4.5.2. Herzentnahme

Das Herz wurde an der Einmündung der großen Gefäße angehoben und von diesen getrennt. In einer Petrischale wurden beide Ventrikel mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gespült, um im Lumen verbleibendes Blut zu entfernen. Anschließend wurden die Herzohren und die Gefäßstümpfe vom Herzen abpräpariert.

3.5. Massenspektrometrie

Um die Wirksamkeit der oralen Sitagliptintherapie in der GLP-1R^{-/-} Maus zu überprüfen, wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt und die Sitagliptinkonzentration im peripheren Blut ermittelt. Dazu wurden die Analysen sowohl bei gesunden, als auch bei Tieren nach Infarkt durchgeführt. In der Versuchsgruppe erhielten die Tiere nach LAD-Ligatur über 3 Tage ein mit Sitagliptin versetztes Futter ad libitum in der Konzentration von 2550 mg/kg Futter. Die Kontrollgruppe bestand aus gesunden Tieren, denen ebenfalls über 3 Tage Sitagliptin-haltiges Futter zur freien Verfügung angeboten wurde.

3.5.1. Prinzip der Massenspektrometrie

Eine Probenlösung wird durch eine Kapillare in die Kammer gesprührt. Diesem Sprühnebelstrahl entgegengerichtet strömt ein Trockengas. Zwischen Kapillare und Kammermantel ist ein Potential von mehreren Kilovolt angelegt, wodurch geladene Tröpfchen entstehen. Durch das elektrische Feld werden diese durch eine Glaskapillare in den Analysatorvorraum gelenkt, durch elektrostatische Linsensysteme fokussiert und in einen Quadrupol-Massenanalysator gelenkt. Die Ionentrennung erfolgt durch Ablenkung der Massen im elektrischen Feld. Vier parallel zur z-Achse angeordnete Metallstäbe sind elektrisch miteinander verbunden und führen zur Oszillierung der injizierten Ionen entlang der z-Achse in x- und y-Richtung. Unter bestimmten Spannungsverhältnissen führt ein spezifisches Ion in Abhängigkeit seiner Masse eine stabile Oszillierung aus und erreicht den Detektor, womit die Massentrennung vollzogen ist [142].

3.5.2. Probengewinnung

Zur Analyse wurde heparinisiertes Vollblut herangezogen. Dazu wurde für die intrakardiale Blutentnahme eine mit 150 µl Heparin-Natrium befüllte 2 ml Spritze verwendet. Die intrakardiale Blutentnahme erfolgte wie unter 3.4.5.1. beschrieben. Das auf diese Weise gewonnene Blut wurde durch vorsichtiges Schwenken heparinisiert, in ein Eppendorf-Cup überführt und auf –20°C gefroren.

3.5.3. Quantifizierung von Sitagliptin

Die weitere Prozessierung der Proben und Durchführung der Messung wurden von Frau Dr. Katrin König im Institut für klinische Chemie der LMU am Campus Großhadern mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. med. Michael Vogeser durchgeführt.

Die Quantifizierung der Vollblut-Konzentration von Sitagliptin erfolgte durch Liquid Chromatography (LC)-Tandem-Massenspektrometrie über eine Waters Alliance 2795 HPLC (Waters, Milford, USA) gekoppelt an ein Quadrupol-Massenspektrometer (Micromass Quattro LC quadrupole tandem mass spectrometer, Manchester, England) wie zuvor beschrieben [143]. Vor der Probenvorbereitung erfolgte eine Proteinfällung mittels MeOH/ZnSO₄-Lösung, welcher ein interner Standard (Sitagliptin-d4) zugesetzt war.

Die Probenvorbereitung erfolgte mit einer Oasis HLB Extraktionssäule (2.1 x 20 mm; 25 µm; Fluss 4.0 ml/min) nach einem generischen Protokoll der Oasis HLB. Zur HPLC-Trennung wurde eine Sunfire C18 Säule (2.1 nm x 100 nm; 3,5 µm; Fluss 0,4 ml/min) verwendet. Als Eluenten dienten Wasser/Methanol 90/10 (Eluent A) und Methanol/Acetonitrile 90/10 (Eluent B).

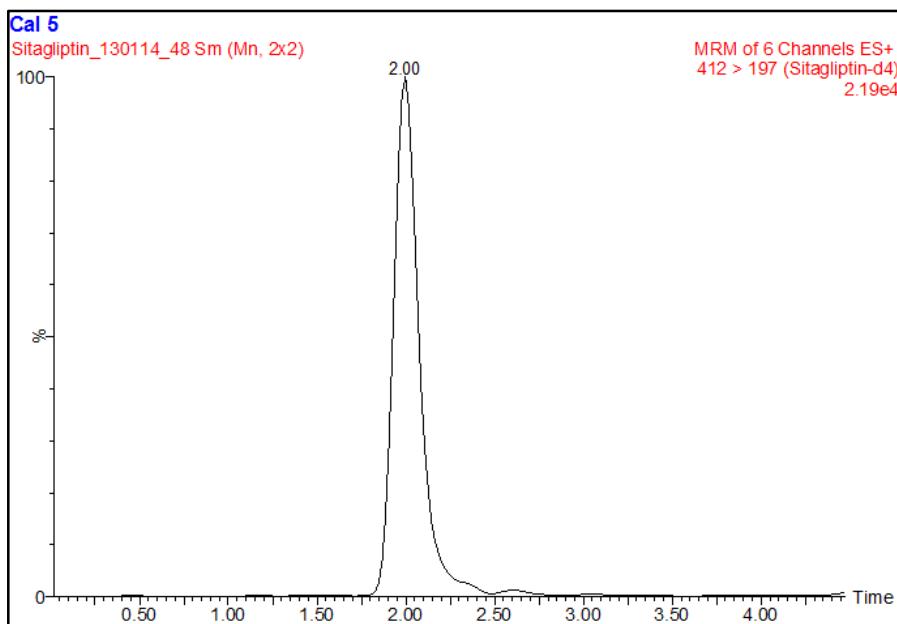


Abbildung 9: Chromatogramm des Massenübergangs des internen Standards Sitagliptin-d4. Die Messung erfolgte im MRM Mode, wobei für den internen Standard folgender Massenübergang zur Detektion verwendet wurde: $412,0 \rightarrow 197,0$ Da.

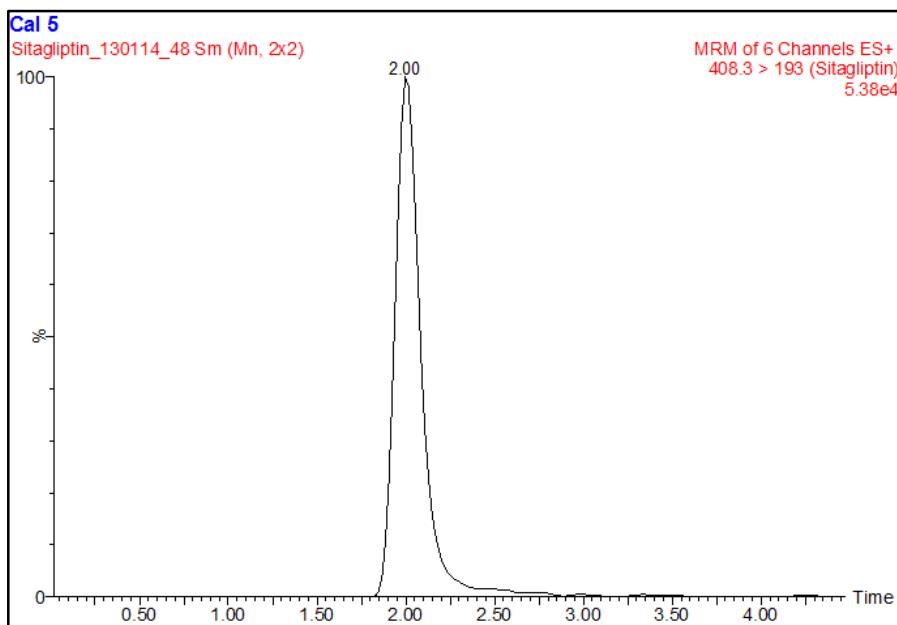


Abbildung 10: Chromatogramm des Massenübergangs von Sitagliptin. Die Messung erfolgte im MRM Mode, wobei für Sitagliptin folgender Massenübergang zur Detektion verwendet wurde: $408,3 \rightarrow 193,0$ Da.

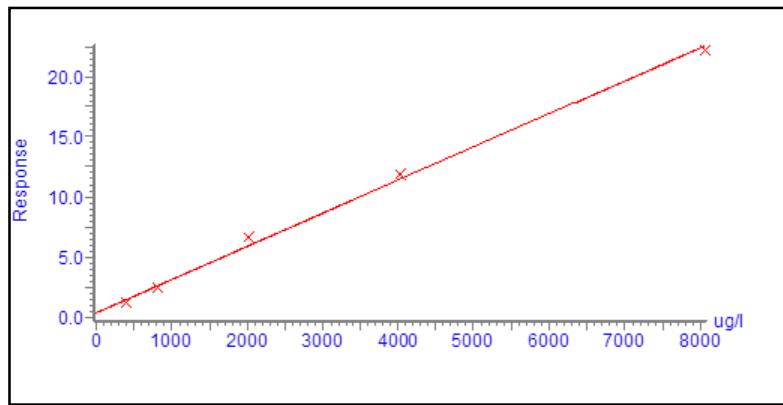


Abbildung 11: Lineare Kalibrationskurve, die sich im Bereich von 8.06 $\mu\text{g/L}$ bis 8060 $\mu\text{g/L}$ erstreckte.

Die Messung erfolgte im Positivmodus mit einer ESI-Quelle. Die Quantifizierung erfolgte an Hand des Internen Standards und einer linearen Kallibrationskurve, die sich von 8.06 $\mu\text{g/L}$ bis zu 8060 $\mu\text{g/L}$ erstreckte.

3.6. Durchflusszytometrie

3.6.1. Material

BSA	Roth, Karlsruhe
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Ficoll	GE HealthCare, USA
Heparin-Natrium, 25.000 I.E. /5 ml	Braun, Melsungen
Iso Flow Sheath Fluid	Beckman Coulter, München
Kanülen, Sterican 20 G	Braun, Melsungen
Kollagenase	Life Technologies, Darmstadt
PBS	Invitrogen, Darmstadt
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	Pfm medical, Köln
Spritzen 2 ml, 10 ml	Beckton Dickinson
Zellkulturschale	Roth, Karlsruhe
Zellsieb 70 µm	Beckton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz

Tabelle 7: Auflistung der Materialien und Substanzen im Rahmen der Durchflusszytometrie

3.6.2. Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Subpopulationen innerhalb einer Zellsuspension differenziert werden. Dazu werden spezifische, gegen Oberflächenantigene gerichtete Antikörper verwendet, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Die Zellen werden durch eine Kapillare gedrückt, sodass ein Strom einzelner Zellen entsteht, der dann von einem Laserstrahl erfasst wird. Fotodetektoren messen die Lichtstreuung, die ein Maß für die Größe und die Granularität einer Zelle darstellt, und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe [144].

3.6.3. Probenaufbereitung

3.6.3.1. Blut

Analysiert wurde heparinisiertes Vollblut. Dazu wurde für die intrakardiale Blutentnahme eine mit 150 µl Heparin befüllte Spritze verwendet. Die Blutentnahme erfolgte wie unter 3.4.5.1. dargelegt. Das auf diese Weise gewonnene Blut wurde mit dem Heparin durch Schwenken sorgfältig durchmischt. In einem 15 ml Röhrchen wurden 3 ml Ficoll vorpipettiert und das heparinisierte Blut vorsichtig überschichtet. Die Probe wurde für 30 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde die mittlere trübe Phase in ein neues Zentrifugenrörchen überführt und bis auf 10 ml mit PBS auffgefüllt, durchmischt und nochmals bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert.

3.6.3.2. Herz

Die Herzentnahme erfolgte wie unter 3.4.5.2. beschrieben. Das isolierte Herz wurde in einer mit Kollagenase-Lösung befüllten Zellkulturschale mit einem Skalpell zerkleinert und in dieser für 40 min bei 37°C im Brutschrank (Binder CB150, Tuttlingen) inkubiert. Nach sorgfältiger Resuspension wurde die Herzlösung durch ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenrörchen gefiltert, in ein 15 ml Röhrchen überführt, mit PBS auf 10 ml auffgefüllt, durchmischt und nochmals bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert.

3.6.3.2.1. Gemeinsame Probenprozessierung

Ab diesem Schritt gestaltete sich das anschließende Prozedere unabhängig vom Ausgangsmaterial. Herz und Blut wurden gleichermaßen behandelt. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, das Pellet bis auf 5 ml mit PBS-BSA aufgefüllt, durchmischt und bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder vorsichtig abgekippt, das Pellet bis auf 5 ml in diesem Schritt mit PBS auffgefüllt, durchmischt und bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert.

3.6.4. Antikörper

3.6.4.1. Verwendete Antikörper

Antikörper (eBioscience)	
Anti-Mouse-CD31(PECAM)PE	Iso A-PE IgG _{2a}
Anti-Mouse-CD184(CXCR4)PE	Iso A-FITC IgG _{2a}
Anti-Mouse-CD117(C-KIT)PE	Iso A-PerCP IgG _{2b}
Anti-Mouse-CD-LY-6A/E(SCA-1)PE	
Anti-Mouse-CD34-FITC	
Anti-Mouse-CD45-PerCP	

Tabelle 8: Auflistung der im Rahmen der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper

3.6.4.1.1. Vorbereitung der Antikörper

In einem ersten Schritt wurden die Antikörper mit Ausnahme von CD34 und CD45 1:100 verdünnt. CD34 wurde als 1:1 Lösung angesetzt, während CD45 1:80 verdünnt wurde. Anschließend wurden die Eppendorf-Cups nach folgendem Pipettierprotokoll vorbereitet:

Isotyp	Iso A	CD 31 rat IgG _{2a}	c-kit rat IgG _{2b}	Sca 1 rat IgG _{2a}	CXCR 4 rat IgG _{2b}
PBS+BSA 2%	20	20	20	20	20
Iso A PE IgG _{2a}	10				
Iso A FITC IgG _{2a}	10				
Iso A PerCP IgG _{2b}	10				
CD 45 PerCP		10	10	10	10
CD 34 FITC		1	1	1	1
CD 31 PE		10			
c-kit PE			10		
Sca-1 PE				10	
CXCR 4 PE					10
Probe	100	100	100	100	100

Tabelle 9: Pipettierschema der verwendeten Antikörper (Angaben in µl)

3.6.5. Durchführung der Messung

Um den Anteil der Stammzellen am Gesamtzellvolumen zu ermitteln, wurde eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse mit PE, FITC und PerCP durchgeführt. Um unspezifische von spezifischen Antikörperbindungen differenzieren zu können, wurden für jeden Farbstoff Isotypen verwendet. Für jede Antikörperkombination in Blut und Herz wurde die quantitative Zusammensetzung mittels eines Durchflusszytometers (Beckman Coulter Epics XL) nach Streulicht- und Fluoreszenzparametern analysiert. Die Analyse erfolgte mit dem Programm Expo 32 ADC.

3.7. Millar Tip Katheter

3.7.1. Material

Enthaarungscreme, Veet	Reckitt Benckiser, Mannheim
Ethanol 70%	Roth, Karlsruhe
Büroklammer 32 mm	Herlitz, Berlin
Nähgarn	Gütermann, Gutach-Breisgau
Mikrochirurgische Instrumente	FST, Heidelberg
Millar tip Katheter	Fmi
NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen
NaCl, hyperton	Roth, Karlsruhe
Povidon-Iod, Braunol®	Braun, Melsungen
Saugtupfer, Sugi®	Kettenbach, Eschenburg
Sterican, 30 G	Braun, Melsungen
Spritzen 1 ml BD Plastipak	Becton Dickinson, Heidelberg

Tabelle 10: Auflistung der Materialien und Lösungen im Rahmen der Millar Tip

Katheteruntersuchung

3.7.2. Prinzip der Conductance Messung

Zur Erhebung der kardialen Funktionsparameter wurde ein Millar Tip Katheter (1,4 French) verwendet. Der Katheter besitzt mehrere Ringeletroden, die einen Drucksensor flankieren. Durch das äußere Elektrodenpaar wird ein elektrisches Feld mit der Conductance oder Leitfähigkeit $G(t)$ erzeugt. Dieses elektrische Feld erfasst Blut, Ventrikelwand und umgebende Strukturen.

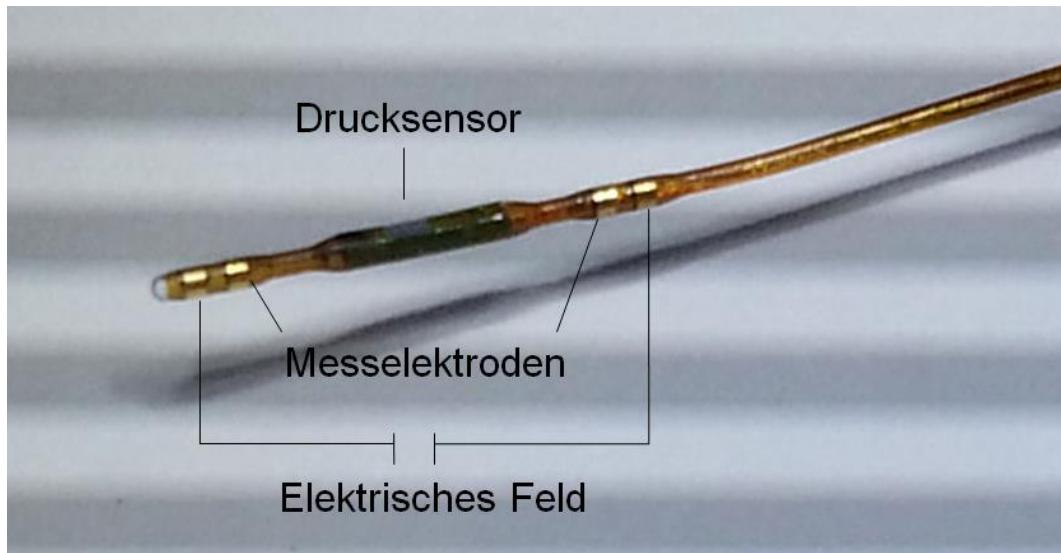


Abbildung 12: Aufbau des Millar Tip Katheters

Während der Messung wurde der Katheter entlang der Längsachse des linken Ventrikels so platziert, dass die distalen Elektroden in der Herzspitze und die Proximalen direkt unterhalb der Aortenklappe zu liegen kamen.

Während des Herzzyklus kommt es durch die Schwankungen des intraventrikulären Blutvolumens zur Veränderung der Leitfähigkeit. Diese Potentialdifferenzen werden über die zwei inneren Elektroden gemessen und nach folgender Gleichung in das linksventrikuläre Volumen umgerechnet:

$$V(t) = \left(\frac{1}{\alpha} \right) \times \left(\frac{L^2}{\sigma b} \right) \times (G(t) - G(p))$$

Gleichung 1: Berechnung des linksventrikulären Volumens V(t)

V(t): zeitabhängiges linksventrikuläres Volumen

α : Korrekturfaktor = SV_{Conductance} / SV_{Referenzmethode}

L: Elektrodendistanz

σb : spezifische Leitfähigkeit des Blutes

G(t): Gesamtleitfähigkeit

G(p): Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes

Da die Messelektroden nicht zwischen der Beschaffenheit der verschiedenen Gewebe unterscheiden, sondern nur die Gesamtleitfähigkeit G(t) aller Strukturen ermitteln, muss die Leitfähigkeit des Blutes rechnerisch bestimmt werden. Dazu wird die Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes G(p), die als konstant angesehen wird, von der Gesamtleitfähigkeit G(t) subtrahiert.

Zur Bestimmung der Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes G(p) wurde über die Injektion einer hypertonen NaCl Lösung kurzfristig die Leitfähigkeit des Blutes verändert. Die Leitfähigkeit G(p) bzw. das Volumen des umliegenden Gewebes V(p) wird durch den Schnittpunkt zweier Geraden bestimmt, wobei die erste Gerade aus der hypersalinen Injektion berechnet wird und die zweite sich definiert als Zustand einer leeren Herzkammer: folglich aus dem enddiastolischen Volumen (V_{ED}) und dem endsystolischen Volumen (V_{ES})

3.7.3. Durchführung der Messung

Die analog 3.4.2. anästhesierte Maus wurde mit Klebestreifen in dorsaler Lage auf der Wärmeplatte fixiert und die rektale Messsonde eingeführt. Durch dieses Messsystem konnte eine konstante Körpertemperatur von 37,5°C gewährleistet werden. Das OP-Feld wurde mit 70 %igem Ethanol entfettet, mit einer Enthaarungscreme enthaart und mit Jod antiseptisch vorbereitet. Nach Fixierung des Oberkiefers an der Unterlage über ein dünnes Gummiband wurde am Kinnwinkel beginnend die Haut bis zum Brusteingang eröffnet. Die Speicheldrüsen wurden stumpf getrennt und auf die Seite gezogen, um eine freie Sicht auf die Trachea zu ermöglichen. Die Maus wurde intubiert und der Tubus mittels Klebeband fixiert. Die Beatmung wurde über ein Minivent-System mit einem Atemzugvolumen von 200 µl und einer Frequenz von 150 Zügen/min konstant gehalten.

Unter dem Mikroskop (Leica A60, Wetzlar) wurde die rechte A. carotis durch Eröffnung der Vagusscheide und größtmöglicher Schonung des darin verlaufenden N. vagus freipräpariert. Um eine Fixierung und Blutleere der A. carotis zu erreichen, wurde eine Metallklammer unter das Gefäß geschoben und über einen handelsüblichen Bindfaden am kranialen Ende gespannt. Das Gefäß wurde im Anschluss durch Punktions mit einer 30 G Kanüle eröffnet.

Über diese Öffnung wurde der Millar Tip Katheter in die A. carotis eingeführt und über die Aortenklappe hinweg bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Über die Aufzeichnungen der Druck-Volumen-Kurven, die direkt am Monitor zu verfolgen waren, wurde eine korrekte Plazierung des Katheters gewährleistet. Zur späteren Berechnung des tatsächlichen Blutvolumens wurden über die Jugularvene 15 µl einer hypertonen NaCl-Lösung injiziert. Im Anschluss an die Messung wurde das anästhetisierte Tier durch zervikale Dislokation getötet.

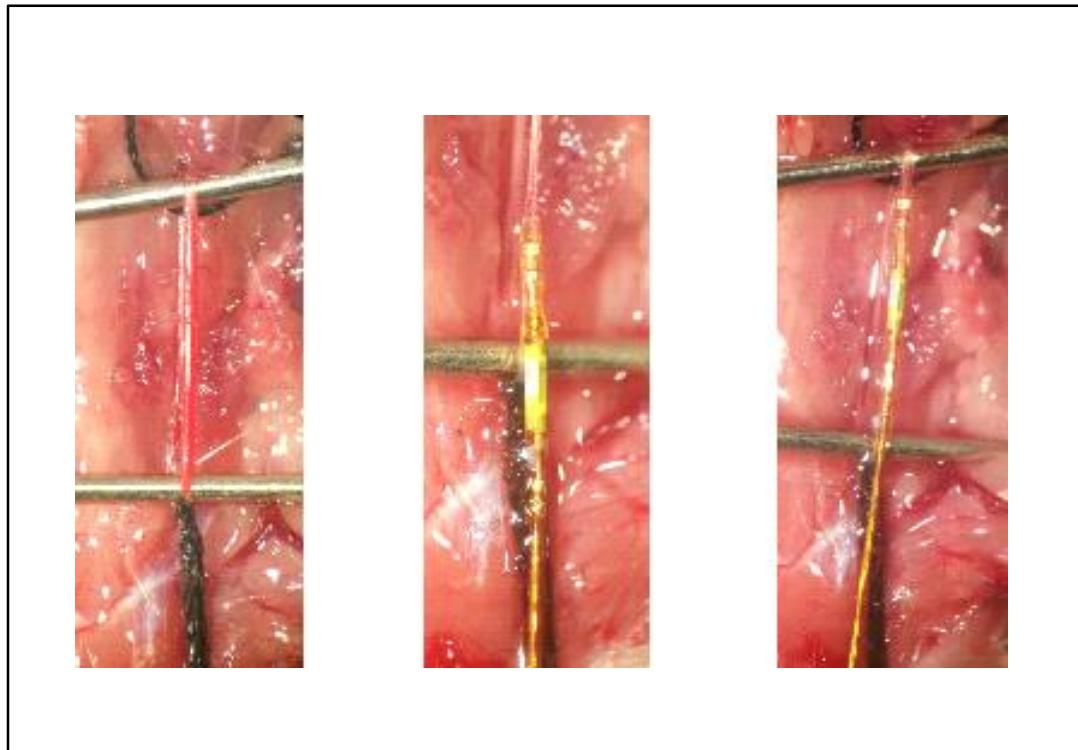


Abbildung 13: Millar Tip Katheter in Situ. Die linke Abbildung zeigt die Verwendung einer Büroklammer zur Fixierung der A. carotis. In der Mitte wird das Einbringen des Katheters in die eröffnete Arterie dargestellt und die rechte Abbildung zeigt den Katheter vor Eintritt in den Thorax.

3.7.4. Aufzeichnung und Parameter der Messung

Die Kathettermessung wurde über das System Millar Aria durchgeführt und über die Software HSE Isoheart aufgezeichnet. Die direkt auf den angeschlossenen PC übertragenen Daten wurden im Anschluß mit der Software Millar PVAN 2.9. ausgewertet.

Folgende Parameter wurden erhoben:

Linksventrikuläre Funktionsparameter
Herzfrequenz HF [bpm]
Maximaler linksventrikulärer Druck P_{max} [mmHg]
Minimaler linksventrikulärer Druck P_{min} [mmHg]
Endsystolisches Volumen ESV [μ l]
Enddiastolisches Volumen EDV [μ l]
Schlagvolumen SV [μ l] = EDV - ESV
Ejektionsfraktion EF [%] = (EDV - ESV) / EDV x 100
Herzzeitvolumen HZV [μ l/min] = HF x SV
Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt_{max} [mmHg/sec]
Tau_{weis} [msec]
Arterielle Nachlast Ea [mmHg/ml] = Endsysstolischer Druck P _{ES} /SV

Tabelle 11: Auflistung der im Rahmen der Millar Tip Katheteruntersuchung erhobenen Funktionsparameter

3.8. Histologie, Morphometrie und quantitative Stereologie

3.8.1. Material

Aluminiumsulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfid (20%)	Merck, Darmstadt
Anilinblau	Merck, Darmstadt
Aqua dest	Hauseigene Anlage
Azophloxin	Schmid GmbH, Darmstadt
Deckgläschen	Menzel, Braunschweig
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde
Einbettschälchen	Engelbrecht, Edermünde
Eisenchlorid	Merck, Darmstadt
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol	CNL, Niederhummel
Essigsäure 0,5%	CNL, Niederhummel
Formaldehyd 4%	CNL, Niederhummel
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HCl-Alkohol 0,5%	CNL, Niederhummel
Histokitt	Hecht, Sontheim/Rhön
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck, Darmstadt
Kanülen, Sterican, 20G, 18G	Braun, Melsungen
Kernechtrot	Merck, Darmstadt
Lidocain 2%	Braun, Melsungen
Mayer`s Hämalaun	Merck, Darmstadt
Mikrotomklingen	Engelbrecht, Edermünde
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
Orange G	Merck, Darmstadt
Paraffin	Engelbrecht, Edermünde
PBS	Invitrogen, Darmstadt
Salzsäure 25%	NeoLab Migge, Heidelberg

Säurefuchsin	Merck, Darmstadt
Wolframatphosphorsäure-Hydrat	Merck, Darmstadt
Xylol	CNL, Niederhummel
Xyldine Ponceau	Waldeck, Münster
Zellkulturschale	Roth, Karlsruhe

Tabelle 12: Auflistung der Materialien im Rahmen der histologischen Analysen

3.8.2. Gewebevorbereitung

Das nach 3.4.2. anästhesierte Tier wurde durch zervikale Dislokation getötet und in dorsaler Lage mittels Kanülen auf einer Styroporunterlage fixiert. Haut und Muskulatur wurden umbilikal durchtrennt und der Schnitt bis zum Proc. Xiphoideus erweitert. Dieser wurde mit Hilfe einer Pinzette angehoben und der Thorax ausgehend vom Xiphoideum V-förmig eröffnet. Im Anschluss wurde das Sternum nach kranial gezogen und mit einer Kanüle an der Unterlage fixiert.

3.8.2.1. Fallstromperfusion

Das verwendete System zur Fallstromperfusion bestand aus zwei Perfusionslösungsbehältern, die zum einen eine 4 %ige Formaldehydlösung, zum anderen PBS-Puffer enthielten. Diese waren auf einer Höhe von 120 cm angebracht. Zur schnellen Umschaltung der Perfusionslösungen war das Schlauchsystem über einen 3-Wegehahn miteinander gekoppelt. Mit einer am Ende des Schlauchsystems befestigten 18 G Kanüle wurde im Zuge der indirekten Fallstromperfusion der rechte Ventrikel punktiert und zeitgleich die V. cava caudalis auf Höhe zwischen Leber und Zwerchfell durchtrennt. Um einen diastolischen Herzstillstand herbeizuführen, wurden zunächst 2 ml einer 2 %igen Lidocainlösung über das Schlauchsystem in das Herz eingebracht und anschließend das Gefäßsystem 5 min mit PBS gespült. Im weiteren Verlauf wurde mit der 4 %igen Formaldehydlösung für weitere 5 min die Perfusionsfixierung durchgeführt.

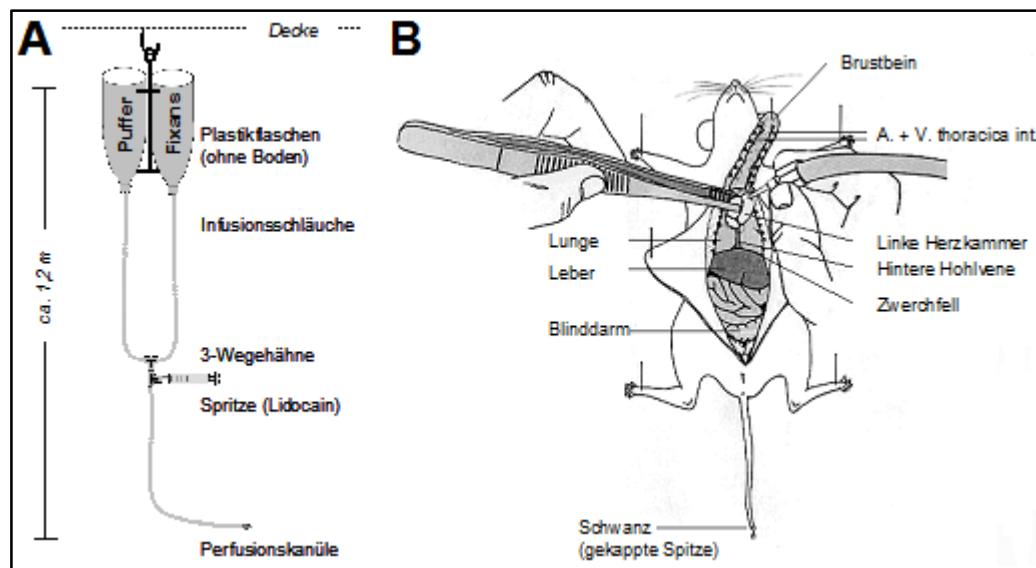


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Fallstromperfusion mit freundlicher Genehmigung von A. Blutke, Tierpathologie München; A) Darstellung der Perfusionsvorrichtung; B) Darstellung der kardialen Perfusion an der Maus

Das perfundierte Herz wurde nach Durchtrennung von Aorta und A. pulmonalis entnommen und in eine Petrischale überführt. Dort wurden die Gefäßstümpfe und Herzohren abpräpariert. Anschließend wurde das Organ in einer Einbettkassette für weitere 24 Stunden durch Immersion in einer 4 %igen Formaldehydlösung nachfixiert. Zur Bestimmung des Herzgewichts wurde nach Abschluß der Fixierung das Herz aus der Formaldehydlösung entnommen und mit Zellstoff die verbleibende Flüssigkeit aus den Ventrikeln entfernt. Nun wurde das Herzgewicht auf einer Feinwaage (Sartorius, Göttingen) bestimmt und das Organ in 70 %iges Ethanol überführt.

3.8.2.2. Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Im Autotechnikum (Histomaster 2050/DI, Bavimed, Birkenau) wurden die Herzen über Nacht in aufsteigender Alkoholreihe nach folgendem Protokoll entwässert:

Autotechnikum	
Zeit	Substanz
0,5 h	Aqua dest.
1,5 h (2x)	Ethanol 70 %
1,5 h (2x)	Ethanol 96 %
1,5 h (2x)	Ethanol 100 %
0,5 h (2x)	Xylol
1,5 h	Xylol
2,0 h	Paraffin bei 60°C
3,0 h	Paraffin bei 60°C

Tabelle 13: Programm des Autotechnikums

Am folgenden Tag wurden die Herzen an der Ausgießstation (TBS 88 Paraffin Embedding System, Medite GmbH, Burgdorf) aus dem Paraffintank entnommen und lamelliert. Dazu wurden, beginnend an der Herzspitze bis hin zur Basis, ca. 1 mm dicke planparallele Scheiben mit einer Mikrotomklinge angefertigt, mit der rechtsseitigen Fläche nach unten in ein Einbettenschälchen gelegt und ausgegossen. Nach Abkühlung der Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte bei -14°C wurden mit einem Rotationsmikrotom (HM 315 Mikrom, Walldorf) Paraffinschnitte mit einer nominellen Dicke von 3-4 µm erstellt. Diese wurden in ein 38°C warmes Wasserbad (Daglef Platz, Wankendorf) überführt und auf einen Objektträger aufgezogen. In einem Färbekasten wurden die Objektträger für 24 h bei 40°C in einem Wärmeschrank (Memmert, Schwabach) getrocknet.

3.8.3. Färbemethoden

3.8.3.1. Paraffinextraktion und Rehydrierung

Zum Entparaffinieren verblieben die Herzschnitte für 20 min in Xylol. Im Anschluss erfolgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe: Ethanol 100 % (2x), Ethanol 96 % (2x), Ethanol 70 % und Aqua dest.

3.8.3.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Hämalaun-Eosin-Färbung wurden die Herzschnitte zunächst für 5 min in Mayer`s Hämalaun getaucht, anschließend während weiteren 5 min mit fließendem, warmen Wasser gebläut. Nach der Differenzierung in HCl-Alkohol (0,5 %) wurden die Objektträger erneut gewässert, bevor sie für 2 min in Eosin verbracht wurden. Nach der Spülung mit Aqua dest. durchliefen die Schnitte eine aufsteigenden Alkoholreihe: Ethanol 70 %, Ethanol 96 %, Ethanol 100 %, Xylol, bevor sie mit Deckgläschen und Histokitt eingedeckt wurden.

3.8.3.3. Masson-Trichrom-Färbung

Für die Masson-Trichrom-Färbung wurden die Schnitte 5 min in Weigert`s Eisenhämatoxylin belassen, anschließend für 5 min gewässert und in HCl-Alkohol differenziert. Nach erneutem Wässern wurden die Objektträger für 15 min in rote Farbe verbracht. Nach einem kurzen Spülen in Aqua dest. wurden sie über Essigsäure (0,5 %) in Phosphorwolframsäure-Orange G für 3 min überführt. Darauf wurden sie erneut mit Aqua dest. gespült und über Essigsäure (0,5 %) für 30 Sekunden in Anilinblau getaucht. Wieder wurden die Herzschnitte mit Aqua dest. und Essigsäure gespült und einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt: Ethanol 96 %, Ethanol 100 %, Xylol. Abschließend wurden die Objektträger analog zur Hämalaun-Eosin-Färbung eingedeckt.

3.8.3.4. Turnbullblau-Färbung nach Quinckes

Für die Turnbullblau Färbung nach Quinckes verblieben die Schnitte für 1 Std. in 10 %igem Ammoniumsulfid, wurden im Anschluss mit Aqua dest. gespült und dann für 10 min in 20 %iges Kaliumhexacyanoferrat getaucht. Nach einer weiteren Aqua dest. Spülung wurden die Objektträger für 5 min in 0,1 %igem Kernechtrot belassen, abschließend gespült und nach einer aufsteigenden Alkoholreihe mit abschließendem Xyloolbad mittels Histokitt eingedeckt.

3.8.4. Morphometrie und quantitative Stereologie

Für die stereologische Auswertung der Herzen wurden die histologischen Schnittpräparate der Herzlamellen in der Masson-Trichromfärbung in 16 facher Vergrößerung auf einem Photomikroskop (M 400, Heer, Wildbrugg, Schweiz) und daran angeschlossener Kamera (Leica Firecam DFC 320, Solms) fotografiert. Über diese Bilddarstellung wurde mit Hilfe von Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems, USA) ein Raster gelegt. Anhand des Rasters wurde eine Punktezählung nach dem Prinzip von Delesse [145] zur Bestimmung der Volumendichte der Zielstruktur (Infarktbereich) im Referenzkompartiment (Herzgewebe) durchgeführt.

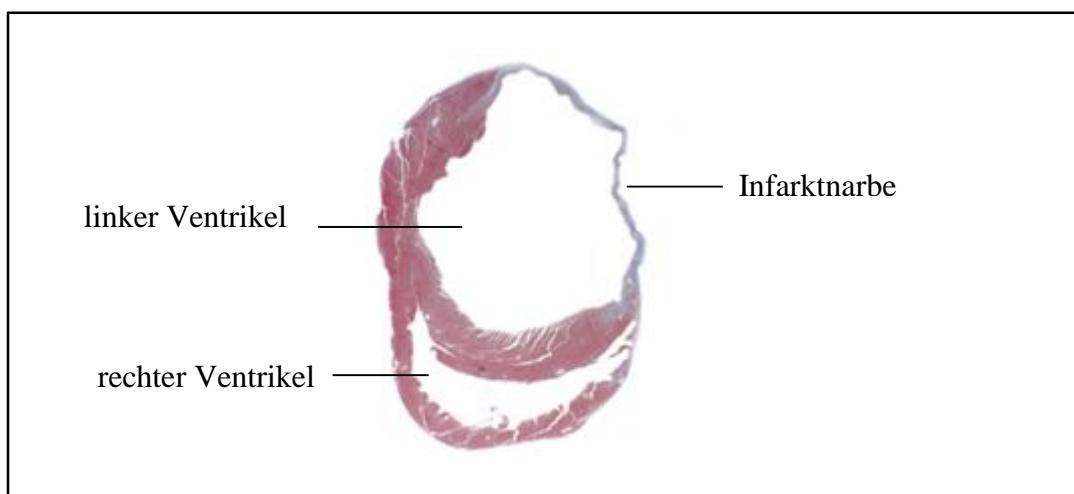


Abbildung 15: Histologisches Schnittpräparat des Herzens, 28 Tage post MI, orig. Vgr. x 16,
Masson-Trichrom

3.8.4.1. Bestimmung des Herzvolumens

Das Herzvolumen V_{Herz} , definiert als Volumen des reinen Herzgewebes, ohne Berücksichtigung der Kavitäten, errechnete sich aus dem Herzgewicht dividiert durch das spezifische Gewicht.

$$V_{Herz} [mm^3] = \frac{Herzgewicht [mg]}{spezifischesGewicht \left[\frac{mg}{mm^3} \right]}$$

Gleichung 2: Berechnung des Herzvolumens V_{Herz}

Das Herzgewicht wurde im Anschluss an die Perfusionsfixierung (siehe unter 3.8.2.1) bestimmt. In einer Pilotstudie wurde in einer Stichprobe an murinen Herzen das spezifische Gewicht über die Verdrängung einer isotonen Natriumchloridlösung nach der auf dem Prinzip von Archimedes basierenden Submersionsmethode nach Scherle [145] ermittelt und der dabei erhaltene Wert von 1,055 mg/mm³ für die Berechnung des Herzvolumens herangezogen.

3.8.4.2. Ermittlung des Infarktanteils am Herzgewebe

Die Volumendichte des Infarkts im Herzgewebe V_v (Inf./Herz) wurde anhand einer Masson-Trichromfärbung bestimmt. Als Referenzkompartiment wurde das gesamte Herzgewebe herangezogen, während das Infarktareal als Zielstruktur definiert wurde.

$$V_v (Inf./Herz) = \frac{\sum P_{Inf}}{\sum P_{Herz}}$$

Gleichung 3: Berechnung des Infarktanteils am Herzgewebe V_v (Inf./Herz)

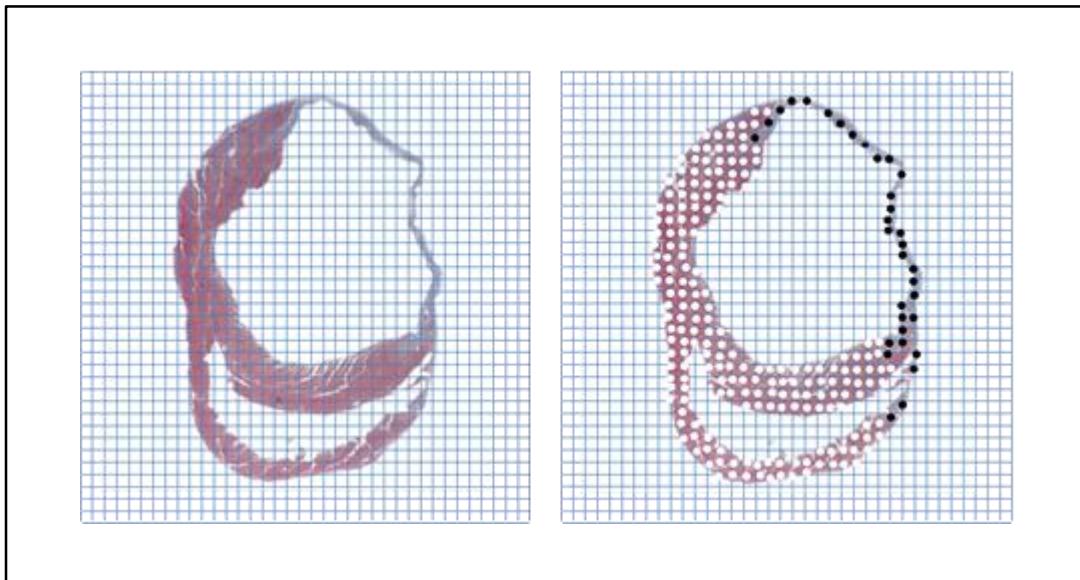


Abbildung 16: Histologisches Schnittpräparat des Herzens, 28 Tage post MI, orig. Vgr. x 16,
Masson-Trichrom; links) mit Raster; rechts) mit Raster und durchgeführter Punktezählung

3.8.4.3. Bestimmung des absoluten Infarktvolumens

Das absolute Infarktvolumen V (Inf, Herz) errechnete sich als Produkt aus dem Volumenanteil des Infarktbereichs am Herzgewebe V_v (Inf./Herz) und dem Herzvolumen V_{Herz} :

$$V(\text{Inf}, \text{Herz})[\text{mm}^3] = V_v(\text{Inf.}/\text{Herz}) \times V_{\text{Herz}}$$

Gleichung 4: Berechnung des absoluten Infarktvolumens V (Inf, Herz)

3.8.4.4. Bestimmung der Volumenanteile spezifischer Gewebekomponenten am Infarktareal

Um die Zusammensetzung des Infarktbereichs zu ermitteln, wurden die Volumendichten der spezifischen Gewebekomponenten kollagenes Bindegewebe, Kapillaren, Lymphgefäße und Kardiomyozyten im Infarktareal analysiert. Dazu wurden die histologischen Schnittpräparate der Herzlamellen in einer 400 fachen Vergrößerung mit dem Programm newCast (Visiopharm, Hoershol, Dänemark) morphometriert. Als Referenzkompartiment wurde das Infarktareal herangezogen und darin die Volumenendichten der einzelnen Zielstrukturen ermittelt.

$$V_V(Gew./ Inf.) = \frac{\sum P_{Gew.}}{\sum P_{Inf.}}$$

Gleichung 5: Berechnung der Volumenanteile spezifischer Gewebekomponenten am Infarkttareal

3.8.5. Analyse systemischer Folgen eines Myokardinfarkts

Zur Untersuchung der konsekutiven Folgen eines Myokardinfarkts wurden histologische Schnittpräparate von Lunge und Leber einer deskriptiven Auswertung unterzogen. Die Analyse erfolgte an einem Mikroskop (Leica Microsystems AG, Solms) mit angeschlossener Kamera (Leica Firecam DFC 320, Leica Microsystems AG, Solms) in 250 und 400 facher Vergrößerung. Mittels Meander Sampling wurde die Gesamtheit der Gesichtsfelder ausgewertet.

3.8.5.1. Auswirkungen auf das Lungengewebe

Zur Überprüfung systemischer Konsequenzen eines linksventrikulären Myokardinfarkts wurden Lungenschnitte in einer Turnbullblau-Färbung nach Quinkes und einer Masson-Trichrom-Färbung untersucht. Die Turnbullblau-Färbung diente zur Darstellung Hämosiderin-haltiger Alveolarmakrophagen, während man sich die Masson-Trichrom Färbung zur besseren Visualisierung kollagener Fasern im Rahmen einer Lungeninduration zu Nutze machte. Nachfolgend wurden die Befunde in Anlehnung an *Mc Gavin et al.* [146] anhand der pathologischen Veränderungen in vier Schweregrade eingestuft.

Auswirkungsgrad	Lungenbefunde
0 = physiologischer Lungenbefund	
1 = akute Stauungslunge	hochgradige Hyperämie interstitielles und / oder alveoläres Ödem
2 = chronische Stauungslunge Grad 1	geringgradige Hyperämie interstitielles und / oder alveoläres Ödem Turnbull positive Alveolarmakrophagen
3 = chronische Stauungslunge Grad 2	geringgradige Hyperämie interstitielles und / oder alveoläres Ödem Turnbull positive Alveolarmakrophagen Lungenfibrose

Tabelle 14: Einteilung der Lungenbefunde in verschiedene Auswirkungsgrade

Die Klassifizierung erfolgte analog den Pathomechanismen im Verlauf der Entstehung einer Stauungslunge [146]. Grad 0 beschreibt den Zustand einer gesunden Lunge ohne besonderen Befund. Eine reduzierte linksventrikuläre Pumpleistung führt nach Dekompensation zu einem Rückstau in den kleinen Kreislauf. Dies führt zu einer ausgedehnten Hyperämie der Kapillaren in Zusammenhang mit interstitiellen und alveolären Ödemen, dem Anfangsstadium einer akuten Stauungslunge Grad 1. Als Folge der Hyperämie kommt es im Stadium 2 zu einem Übertritt der Erythrozyten in das Interstitium und die Alveolen.

Nach Phagozytose durch Alveolarmakrophagen werden die Erythrozyten zu Hämosiderin abgebaut und so in der Turnbullblau-Färbung als sogenannte Herzfehlerzellen darstellbar. Aus einer chronischen Lungenstauung entwickelt sich im Stadium 3 eine Fibrosierung der Alveolarsepten, die sich durch eine Zunahme von kollagenen Fasern in der Masson-Trichrom Färbung darstellt.

3.8.5.2. Auswirkungen auf das Lebergewebe

Für die weitere Analyse einer reduzierten Herzfunktion und ihrer systemischen Konsequenzen wurden histologische Schnittpräparate der Leber untersucht. Auch hier wurde eine Masson-Trichrom-Färbung angewandt, um eine Zunahme an kollagenem Bindegewebe darzustellen.

Auswirkungsgrad	Leberbefunde
0 = physiologischer Leberbefund	
1 = akute Stauungsleber	hochgradige Hyperämie durch Dilatation der Zentralvenen und der zentrolobulären Sinusoide
2 = chronische Stauungsleber Grad 1	mittelgradige Hyperämie perizinäre Zelldegeneration
3 = chronische Stauungsleber Grad 2	geringgradige Hyperämie zentrolobuläre Zelldegeneration
4 = chronische Stauungsleber Grad 3	geringgradige Hyperämie zentrolobuläre Fibrose Phlebosklerose

Tabelle 15: Einteilung der Leberbefunde in verschiedene Auswirkungsgrade

Angesichts einer Rechtsherzinsuffizienz entsteht eine passive Hyperämie der Leber. Als Folge der kardialen Funktionsstörung steigt der Druck in der V. cava caudalis, den Lebervenen und folglich auch im tributären Gebiet. Je nach Dauer und Schweregrad der Abflussstörung des venösen Blutes variiert der histologische Befund. Das Ausmaß der Leberschädigung wurde in Anlehnung an *Mc Gavin et al.*[146] in fünf Grade eingeteilt.

Grad 0 beschreibt einen physiologischen Leberbefund ohne histopathologische Veränderungen. Grad 1 zeigt mit einer Dilatation der Zentralvenen und der zentrolobulären Sinusoide das Anfangsstadium einer akuten Stauungsleber. Bleibt der venöse Rückstau über einen längeren Zeitraum bestehen, manifestiert sich dies im Bild der chronischen Stauungsleber, welches nochmals in 3 Untergrade unterteilt wurde. Grad 2 bezeichnet die frühe Manifestation einer chronischen Rechtsherzinsuffizienz, in der Atrophie und Verlust von Hepatozyten vorerst nur in einem keilförmigen Bereich um die Zentralvene auftreten. Im Stadium 3, der zentrolobulären Nekrose, weitet sich die Degeneration der Leberzellen zirkulär um die Zentralvene aus und mündet schließlich in Grad 4 mit einer Fibrosierung des Gewebes um die Zentralvenen.

3.9. Statistische Auswertung

Da bei der Wahrscheinlichkeitsverteilung der gemessenen funktionellen und morphometrischen Werte nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurde zur Überprüfung der Signifikanzen der Wilcoxon-Mann-Whitney Test, als nicht-parametrischer Test mit einem Konfidenzintervall von 95% eingesetzt [147].

Bei der Auswertung der Daten aus der Durchflusszytometrie zeigten sich bei einer ONE-WAY-ANOVA Abweichungen von Mittelwerten, die unter Zuhilfenahme des Post-Hoc-Test Fisher LSD, als paarweiser T-Test unter Verwendung der gesamten Varianz aller Gruppen, hinsichtlich ihrer Signifikanzen überprüft wurden [148].

IV. ERGEBNISSE

4.1. Bestimmung der Sitagliptinkonzentration im Blut

Ein wichtiger Pfeiler im Modell der dualen Stammzelltherapie ist die Stabilisierung des Homingfaktors SDF-1 α . Dies erfolgte in unserem Versuchsdesign durch Hemmung der Dipeptidylpeptidase IV über orale Sitagliptintherapie. Grundvoraussetzung für die Wirksamkeit der Therapie war ein ausreichender Sitagliptinspiegel im Blut der behandelten Tiere. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die DPP-IV Aktivität durch Sitagliptin dosisabhängig reduziert wird [8]. Die dabei ermittelte optimale Sitagliptindosis von 500 mg/kg KM wurde mit einer Sitagliptinkonzentration im Futter von 2550 mg/kg erreicht. Zur Überprüfung, ob Sitagliptin auch in GLP-1R $^{-/-}$ Mäusen effizient verstoffwechselt werden kann, wurde heparinisiertes Vollblut von gesunden Tieren und Tieren mit Myokardinfarkt unter Sitagliptintherapie massenspektrometrisch untersucht. Die Sitagliptinkonzentration im Blut (siehe Abb. 17) herzgesunder Tiere war mit $3,9 \pm 0,8 \mu\text{g/L}$ um den Faktor 1,7 erhöht im Vergleich zu den Tieren mit Myokardinfarkt mit einem Gliptinspiegel von $2,3 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ ($p = 0,13$).

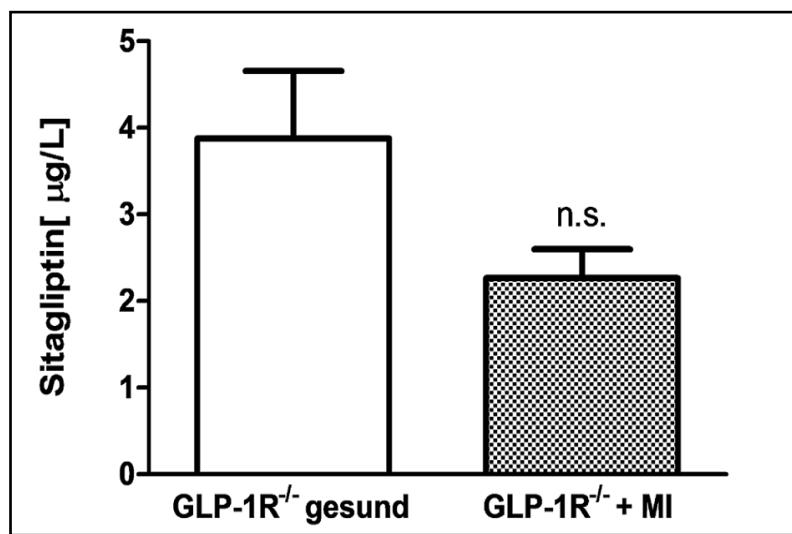


Abbildung 17: Sitagliptinkonzentration im peripheren Blut von gesunden GLP-1R $^{-/-}$ Mäuse und von Tieren nach LAD-Ligatur, $n = 4$, Mittelwert \pm SEM, student's t-test [n.s.]: $p = 0,13$

4.2. Stammzellmobilisierung und Homing

Der Nachweis der Stammzellmobilisierung aus dem Knochenmark wurde anhand der Durchflusszytometrie erhoben. Analog dazu wurde das Homing zirkulierender Stammzellen in das ischämische Myokard analysiert. Im Fokus lagen mononukleäre Zellen mit den stammzellspezifischen Oberflächenmarkern CD45 und CD34, die zusätzlich CD31-, c-kit-, CXCR4- oder sca-1-Antigen auf ihrer Oberfläche exprimierten.

4.2.1. Stammzellausschüttung in das periphere Blut

Die Stammzellausschüttung aus dem Knochenmark wurde über Durchflusszytometrieanalysen des peripheren Blutes untersucht. Die Blutentnahme erfolgte wie unter Punkt 3.4.5.1. und die Durchführung der Messung wie unter Punkt 3.6. beschrieben. Zur Detektierung der Stammzellen wurde eine CD45/CD34-Antikörperkombination verwendet und zusätzlich die Koexpression stammzellspezifischer Oberflächenproteine evaluiert.

4.2.1.1. CD45⁺CD34⁺ Stammzellen im Blut

Anhand der durchflusszytometrischen Analysen konnte in Abhängigkeit der Therapie ein hochsignifikanter Effekt in der Mobilisierungsrate der Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut beobachtet werden (siehe Abb. 18 und 19). Der Basalwert der Stammzellpopulation im Blut der Kontrollgruppe lag bei $0,4 \pm 0,02\%$. In der Gruppe unter Sitagliptin Monotherapie war der prozentuale Anteil der CD45⁺CD34⁺ Zellen im Blut mit $1,1 \pm 0,06\%$ um das 2,8-fache erhöht. Eine weitere hochsignifikante Steigerung der Ausschüttung zeigten die Tiere unter dualer Stammzelltherapie mit $2,0 \pm 0,2\%$.

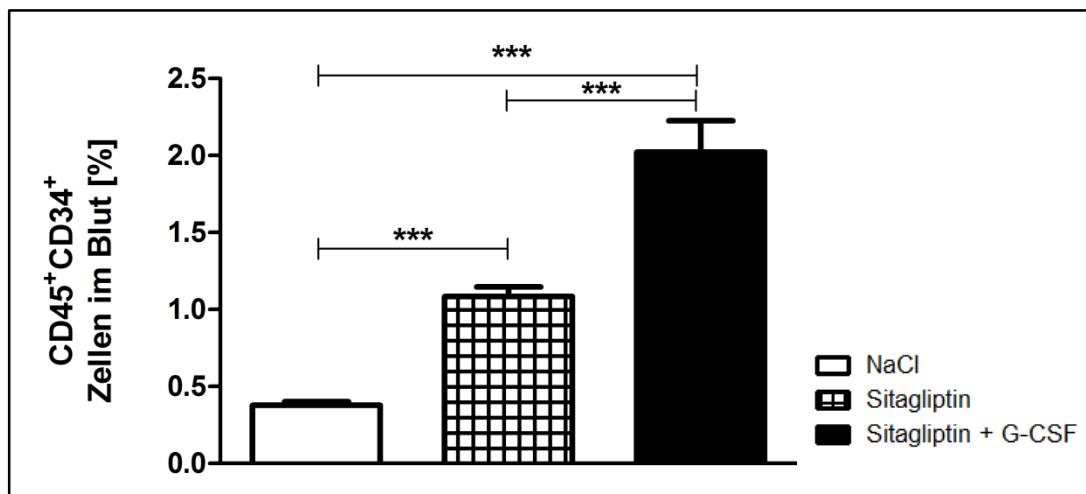


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der mobilisierten CD45⁺CD34⁺ Zellen im Blut

NaCl: n = 5, Sitagliptin: n= 6, Sitagliptin + G-CSF: n = 7

Mittelwert \pm SEM, ANOVA [n.s.]: p \geq 0,05, [*]: p < 0,05, [**]: p < 0,005, [***]: p < 0,001

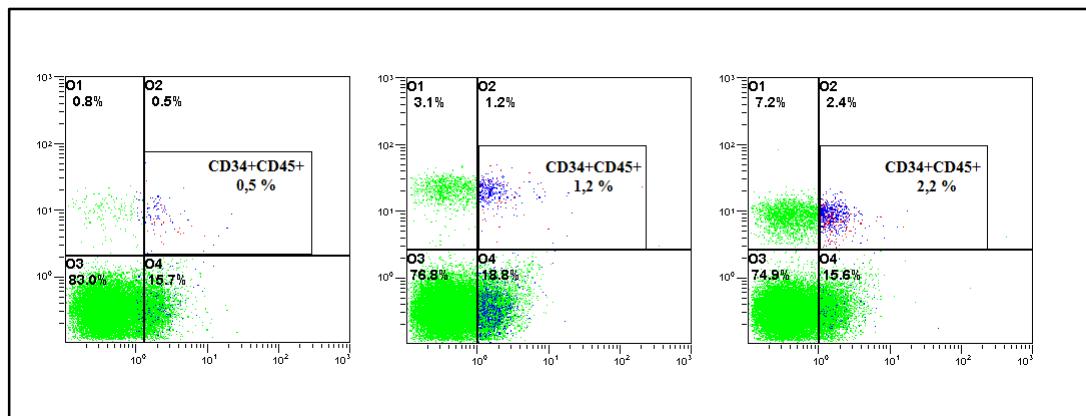


Abbildung 19: Stammzellmobilisierung, dargestellt anhand von repräsentativen dot plot

Diagrammen von CD45⁺CD34⁺ Zellen im Blut (x-Achse: CD34 FITC, y-Achse: CD45 PerCP). In Abhängigkeit von der eingesetzten Therapie konnte von links: NaCl, über Mitte: Sitagliptin, bis rechts: Sitagliptin + G-CSF eine Steigerung der Mobilisierungsrate erzielt werden.

4.2.1.2. Koexpression weiterer Oberflächenantigene auf CD45⁺CD34⁺ Stammzellen im Blut

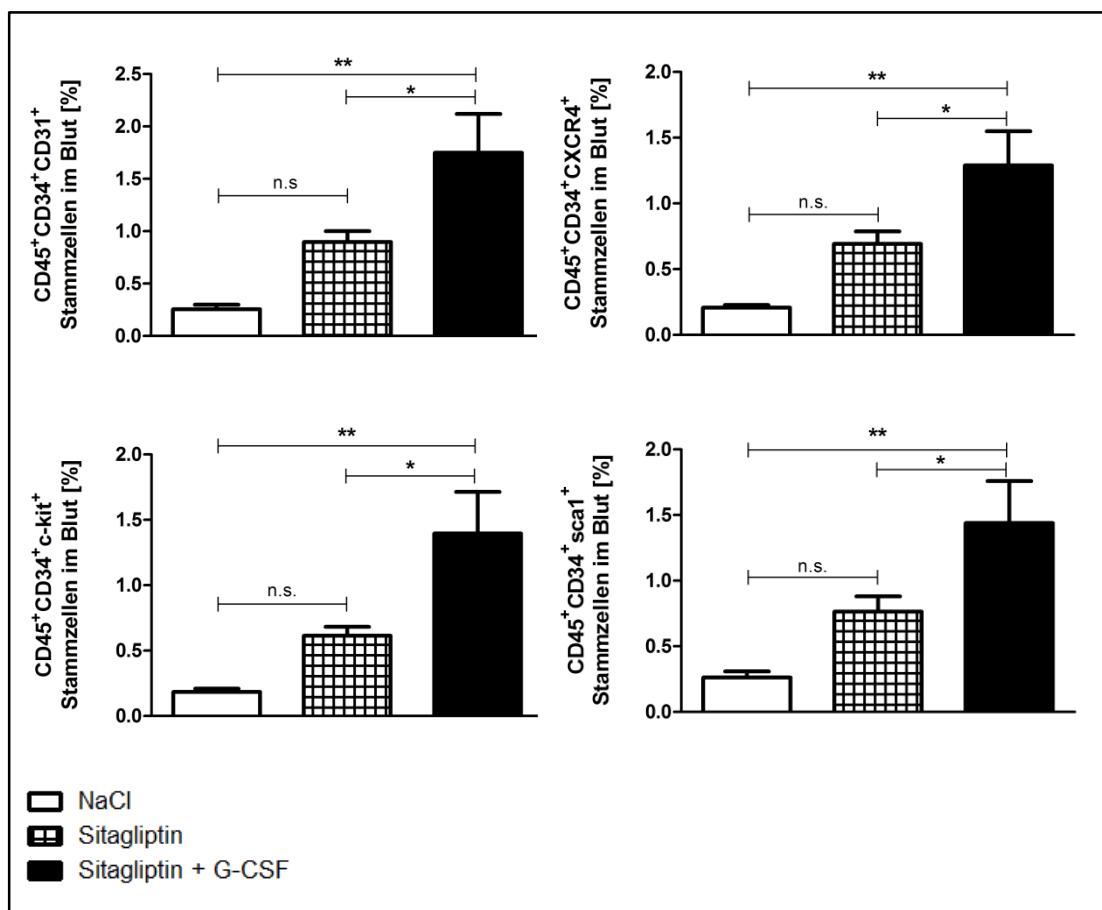


Abbildung 20: Quantifizierung des prozentualen Anteils der mobilisierten CD45⁺CD34⁺ Zellen mit Koexpression von CD31, c-kit, CXCR4 und sca-1 im Blut. Unter dualer Stammzelltherapie konnte eine signifikante Steigerung der Mobilisierungsraten erzielt werden.

NaCl: n = 5, Sitagliptin: n = 6, Sitagliptin + G-CSF: n = 7

Mittelwert \pm SEM, ANOVA [n.s.]: p \geq 0,05, [*]: p < 0,05, [**]: p < 0,005, [***]: p < 0,001

Aus der Stammzellpopulation der CD45⁺CD34⁺ Zellen wurden verschiedene Subpopulationen anhand der zusätzlichen Expression spezifischer Oberflächenmarker definiert.

Der Oberflächenmarker CD31 der endothelialen Progenitorzellen zeigte in den verschiedenen Therapiegruppen im Blut folgende Verteilung: Im Blut der Kontrollgruppe zeigte sich ein Vorkommen der CD45⁺CD34⁺CD31⁺ Zellen von $0,3 \pm 0,04\%$. Dieser Anteil erhöhte sich unter Sitagliptin-Monotherapie auf $0,9 \pm 0,11\%$ ($p = 0,155$) und unter duality Stammzelltherapie auf $1,8 \pm 0,4\%$ ($p = 0,003$). Auch zwischen Sitagliptin-Monotherapie und der dualen Stammzelltherapie ließ sich ein signifikanter Anstieg beobachten ($p = 0,036$).

Das Oberflächenprotein CXCR4, welches einen großen Anteil sowohl am Mobilisierungs- als auch am Homingprozess trägt, konnte in den beiden Therapiegruppen im Blut in folgenden Anteilen nachgewiesen werden: Im Blut der Kontrollgruppe fand sich ein Vorkommen der CD45⁺CD34⁺CXCR4⁺ Zellen von $0,2 \pm 0,02\%$, dieser Anteil erhöhte sich unter Sitagliptin-Monotherapie auf $0,7 \pm 0,09\%$ ($p = 0,099$) und unter Addition von G-CSF auf $1,3 \pm 0,3\%$ ($p = 0,001$). Auch zwischen Sitagliptin-Monotherapie und der dualen Stammzelltherapie ließ sich ein signifikanter Anstieg beobachten ($p = 0,033$).

Die zusätzliche Untersuchung der stammzellspezifischen Oberflächenmarker c-kit bzw. sca-1 der hämatopoetischen Vorläufer zeigte im Blut, dargestellt als dreifachpositive CD45⁺CD34⁺c-kit⁺ bzw. CD45⁺CD34⁺sca-1⁺ Zellen, folgendes Verteilungsmuster: In der Kontrollgruppe erhielt man einen prozentualen Anteil von $0,2 \pm 0,03\%$ bzw. $0,3 \pm 0,05\%$. Dieser Prozentsatz stieg unter Sitagliptintherapie auf $0,6 \pm 0,07\%$ ($p = 0,212$) bzw. $0,8 \pm 0,11\%$ ($p = 0,160$) und unter Dualtherapie auf $1,4 \pm 0,3\%$ ($p = 0,002$ bzw. $p = 0,003$) in beiden Subpopulationen an. Auch zwischen Sitagliptin-Monotherapie und der dualen Stammzelltherapie ließ sich ein signifikanter Anstieg beobachten ($p = 0,021$ bzw. $p = 0,047$).

Zusammenfassend zeigte sich unter der Gliptintherapie im Vergleich zur Kontrolle eine vermehrte, wenn auch nicht statistisch signifikante Freisetzung aller untersuchten Stammzellpopulationen aus dem Knochenmark in die periphere Zirkulation, die sich unter der dualen Stammzelltherapie signifikant steigern ließ, im Vergleich zur Salinegruppe mit hochsignifikantem Ergebnis.

4.2.2. Stammzellhoming in das ischämische Herz

Zur Überprüfung eines effizienten Homings der knochenmarkstämmigen Zellen in das ischämische Myokard wurde über Durchflusszytometrieanalysen die zelluläre Zusammensetzung des Herzmuskels untersucht. Die Organentnahme erfolgte wie unter Punkt 3.4.5.2. und die Durchführung der Messung wie unter Punkt 3.6 beschrieben. Zur Detektierung der Stammzellen wurde analog zu den Blutanalysen eine CD45/CD34-Antikörperkombination verwendet und zusätzlich die Koexpression stammzellspezifischer Oberflächenproteine ausgewertet.

4.2.2.1. CD45⁺CD34⁺ Stammzellen im Herz

Das Homing der Vorläuferzellen aus dem Blut in den ischämischen Herzmuskel wurde analog der Blutanalyse mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen (siehe Abb. 21 und 22). So betrug der zelluläre Prozentsatz von CD45⁺CD34⁺ Zellen der Herzsuspension in der unbehandelten Kontrollgruppe $0,5 \pm 0,02\%$. Im Vergleich dazu war der Zellanteil von Vorläuferzellen in der Sitagliptin-Monotherapie mit $1,1 \pm 0,1\%$ hochsignifikant erhöht. Eine gleichermaßen hochsignifikante Optimierung wurde sowohl im Vergleich zur Saline als auch zur Sitagliptingruppe durch die duale Therapie mit einem Zellanteil von $1,9 \pm 0,1\%$ erreicht.

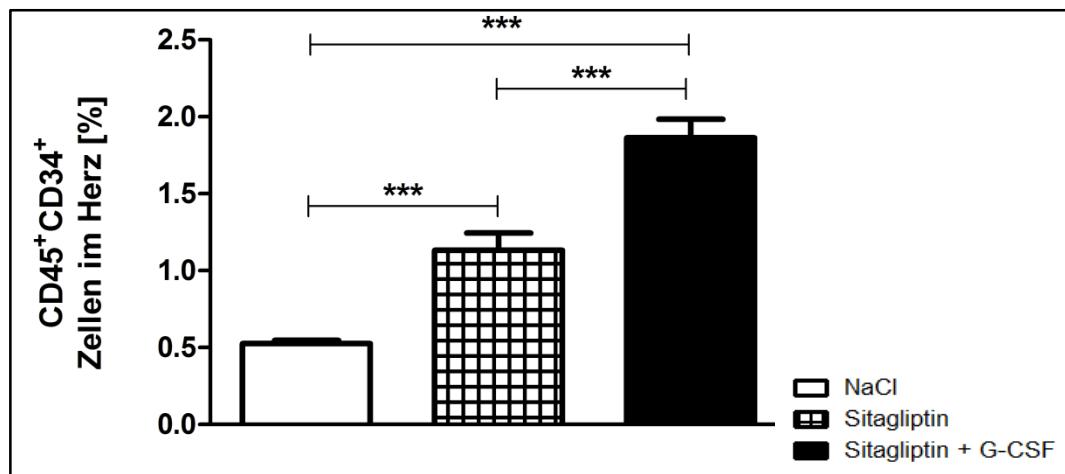


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse der prozentualen Homingraten der CD45⁺CD34⁺ Stammzellen ins Herz, NaCl: n = 5, Sitagliptin: n = 6, Sitagliptin + G-CSF: n = 7

Mittelwert \pm SEM, ANOVA [n.s.]: p \geq 0,05, [*]: p < 0,05, [**]: p < 0,005, [***]: p < 0,001

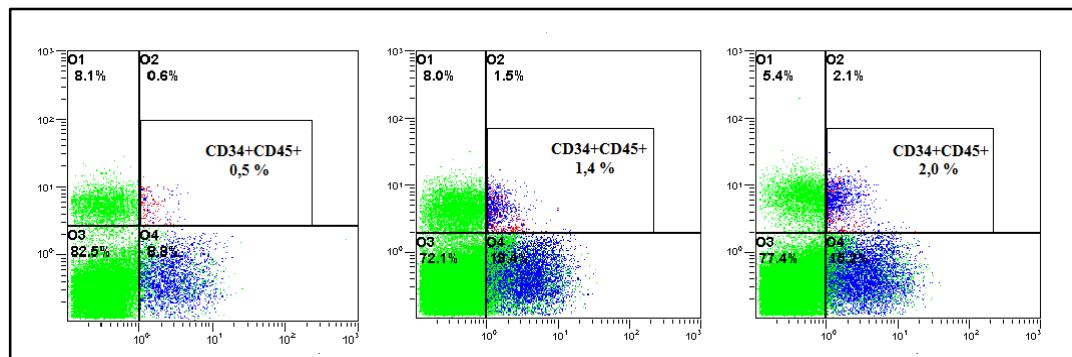


Abbildung 22: Stammzellhoming, dargestellt anhand von repräsentativen dot plot Diagrammen (x-Achse: CD34 FITC, y-Achse: CD45 PerCP) von in den Herzmuskel eingewanderten CD45⁺CD34⁺ Zellen. In Abhängigkeit von der eingesetzten Therapie konnte von links: NaCl, über Mitte: Sitagliptin, bis rechts: Sitagliptin + G-CSF ein verstärktes Homing beobachtet werden.

4.2.2.2. Koexpression weiterer Oberflächenantigene auf CD45⁺CD34⁺ Stammzellen im Herz

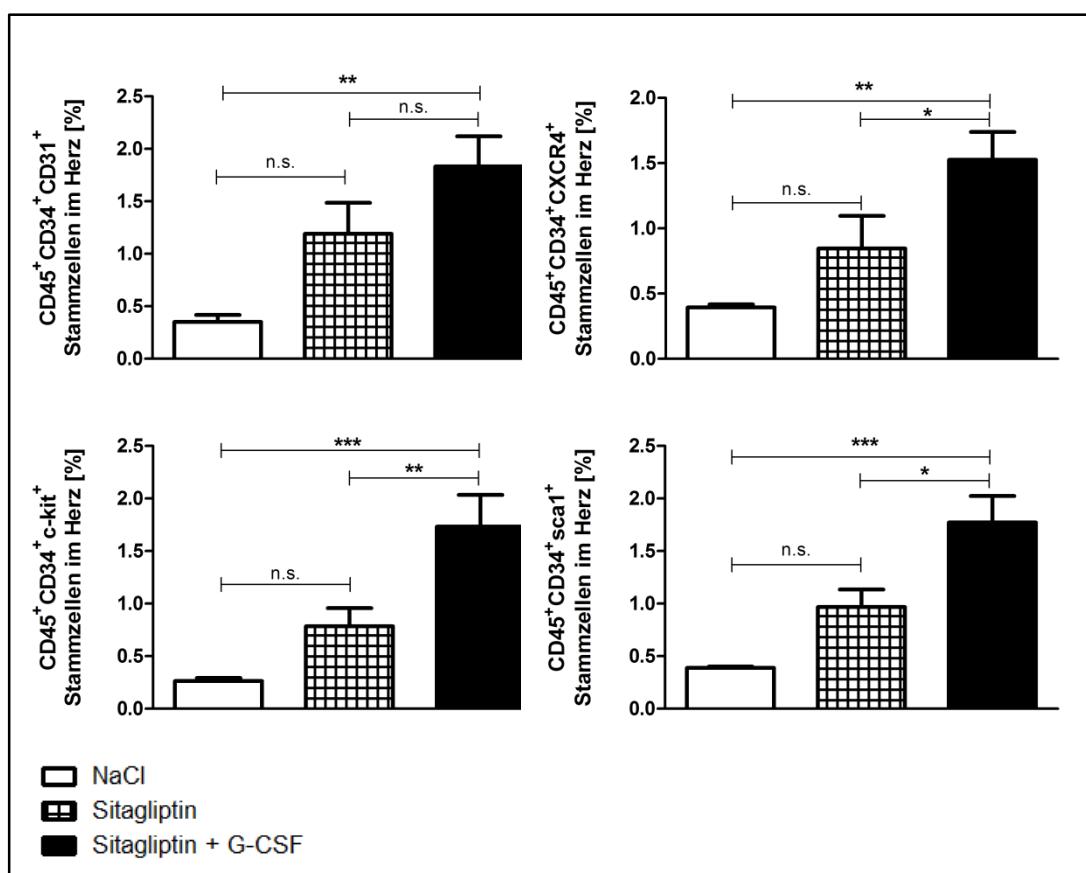


Abbildung 23: Quantifizierung der prozentualen kardialen Homingraten CD45⁺CD34⁺ Zellen mit Koexpression von CD31, c-kit, CXCR4 und sca-1.

NaCl: n = 5, Sitagliptin: n = 6, Sitagliptin + G-CSF: n = 7

Mittelwert \pm SEM, ANOVA [n.s.]: p \geq 0,05, [*]: p < 0,05, [**]: p < 0,005, [***]: p < 0,001

Analog zur Blutanalyse wurden in der HerzSuspension die Subpopulationen der CD45⁺CD34⁺ Stammzellen untersucht, die zusätzlich die Oberflächenmarker CD31, CXCR4, c-kit und sca-1 exprimierten.

Das Oberflächenantigen CD31 der endothelialen Vorläuferzellen war abhängig von der angewandten Therapie im Herzen in folgenden prozentualen Anteilen nachweisbar: In den Herzen des unbehandelten Kollektivs zeigte sich ein Vorkommen der $CD45^+CD34^+CD31^+$ Zellen von $0,4 \pm 0,07\%$. Dieser Anteil erhöhte sich unter Sitagliptin-Monotherapie auf $1,2 \pm 0,3\%$ ($p = 0,048$) und unter dualer Stammzelltherapie auf $1,8 \pm 0,3\%$ ($p = 0,001$).

Der Hauptvermittler im Homingprozess, der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 konnte in den verschiedenen Therapiegruppen in folgenden Anteilen im Herz nachgewiesen werden: In den Herzen der Kontrollgruppe fand sich ein Vorkommen der $CD45^+CD34^+CXCR4^+$ Zellen von $0,4 \pm 0,02\%$, dieser Prozentsatz erhöhte sich unter Sitagliptin-Monotherapie auf $0,8 \pm 0,3\%$ ($p = 0,160$) und unter Addition von G-CSF auf $1,5 \pm 0,2\%$ ($p = 0,002$).

Der Nachweis der stammzellspezifischen Oberflächenmarker c-kit bzw. sca-1 der hämatopoetischen Vorläufer zeigte im Herz, dargestellt als dreifachpositive $CD45^+CD34^+c\text{-}kit^+$ bzw. $CD45^+CD34^+sca\text{-}1^+$ Zellen, folgendes Verteilungsmuster: In der Kontrollgruppe erhielt man einen prozentualen Anteil von $0,3 \pm 0,03\%$ bzw. $0,4 \pm 0,01\%$. Dieser Prozentsatz stieg unter Sitagliptintherapie auf $0,8 \pm 0,2\%$ ($p = 0,149$) bzw. $1,0 \pm 0,2\%$ ($p = 0,066$) und unter Dualtherapie auf $1,7 \pm 0,3\%$ bzw. $1,8 \pm 0,3\%$, ($p = 0,009$).

Demnach zeigte sich unter der Gliptintherapie im Vergleich zur Kontrolle ein verbessertes Homing aller untersuchten Stammzellpopulationen ins ischämische Myokard, wenn auch nicht statistisch signifikant. In der dualen Stammzelltherapie ließ sich im Vergleich zur Salinegruppe eine deutliche bis hochsignifikante Steigerung der Stammzelleinwanderung in den Herzmuskel demonstrieren.

4.3. Hämodynamische Funktionsparameter

4.3.1. 6 Tage post Myokardinfarkt

4.3.1.1. Übersicht der Funktionsparameter an Tag 6 pMI

Hämodynamische Funktionsparameter 6 Tage post MI			
	GLP-1R ^{-/-} NaCl n = 5	GLP-1R ^{-/-} Sitagliptin + G-CSF n = 5	p-Werte
HF [bpm]	355 ± 15	417 ± 32	p = 0,121 [n.s.]
P_{max} [mmHg]	56 ± 8	55 ± 12	p = 0,937 [n.s.]
P_{min} [mmHg]	7 ± 3	6 ± 2	p = 0,662 [n.s.]
ESV [µl]	39 ± 4	41 ± 8	p = 0,833 [n.s.]
EDV [µl]	52 ± 4	53 ± 9	p = 0,904 [n.s.]
SV [µl]	15 ± 2	16 ± 1	p = 0,931 [n.s.]
EF [%]	29 ± 3	31 ± 4	p = 0,710 [n.s.]
HZV [µl/min]	5424 ± 616	6414 ± 322	p = 0,192 [n.s.]
dP/dt_{max} [mmHg/sec]	2915 ± 559	3286 ± 829	p = 0,722 [n.s.]
Tau_{weis} [msec]	13 ± 3	9 ± 2	p = 0,347 [n.s.]
Ea [mmHg/ml]	4 ± 0,7	3 ± 0,8	p = 0,870 [n.s.]

Tabelle 16: Hämodynamische Funktionsparameter 6 Tage post MI, Mittelwert ± sem,

NaCl: n = 5, Sitagliptin + G-CSF: n = 5, student's t-test [n.s.]: p ≥ 0,05

Die Herzfrequenz der Tiere nach Myokardinfarkt lag mit 355 ± 15 bpm in der NaCl-Gruppe geringfügig unter dem Niveau der behandelten Gruppe mit einer HF von 417 ± 32 bpm. Die linksventrikulären Drücke P_{max} und P_{min} zeigten ebenso wie die endsystolischen und enddiastolischen Volumina und das Schlagvolumen zwischen den Gruppen keinen Unterschied. Während sich die Ejektionsfraktion der behandelten Gruppe mit 31 ± 4 % gleichermaßen nicht wesentlich von der EF der Kontrolle mit 29 ± 3 % unterschied, zeigten die Kontraktilitätsparameter Herzzeitvolumen bzw. dP/dt_{max} in der behandelten Gruppe mit 6414 ± 322 µl/min bzw. 3286 ± 829 mmHg/sec tendenziell eine geringfügige Verbesserung zur Kontrolle mit 5424 ± 616 µl/min bzw. 2915 ± 559 mmHg/sec.

Der Relaxationsparameter \Tau_{weis} der behandelten Tiere war mit 9 ± 2 msec um den Faktor 1,4 erniedrigt im Verleich zu 13 ± 3 msec der Kontrollgruppe. Die arterielle Nachlast E_a war in der Sitagliptin und G-CSF Gruppe mit $3 \pm 0,8$ mmHg/ml geringer als in der Placebo-Gruppe mit $4 \pm 0,7$ mmHg/ml. Zusammenfassend kann 6 Tage post Myokardinfarkt kein signifikanter Unterschied in der Herzfunktion nach kombinierter Sitagliptin und G-CSF-Therapie dargestellt werden.

4.3.1.2. Ejektionsfraktion an Tag 6 pMI

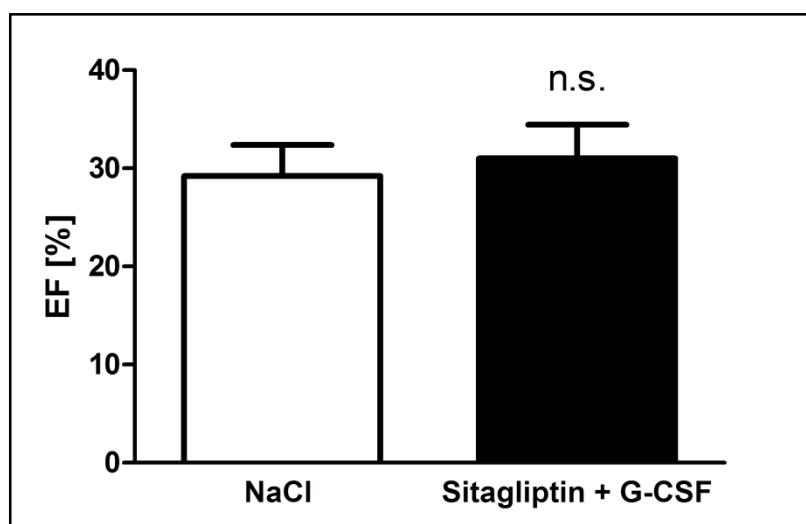


Abbildung 24: Anhand der Ejektionsfraktion an Tag 6 pMI zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Kollektiv unter dualer Stammzelltherapie und Kontrollgruppe, Mittelwert \pm SEM, NaCl: $n = 5$, Sitagliptin + G-CSF: $n = 5$, student's t-test [n.s.]: $p = 0,71$.

Der Hauptparameter der Funktionsanalysen, die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, zeigte an Tag 6 post Myokardinfarkt keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen. So fand sich in der unbehandelten Kontrollgruppe eine EF von 29 ± 3 % und die therapierten Tiere eine EF von 31 ± 4 % und damit eine nahezu identische linksventrikuläre Pumpfunktion ($p = 0,71$).

4.3.1.3. Herzzeitvolumen an Tag 6 pMI

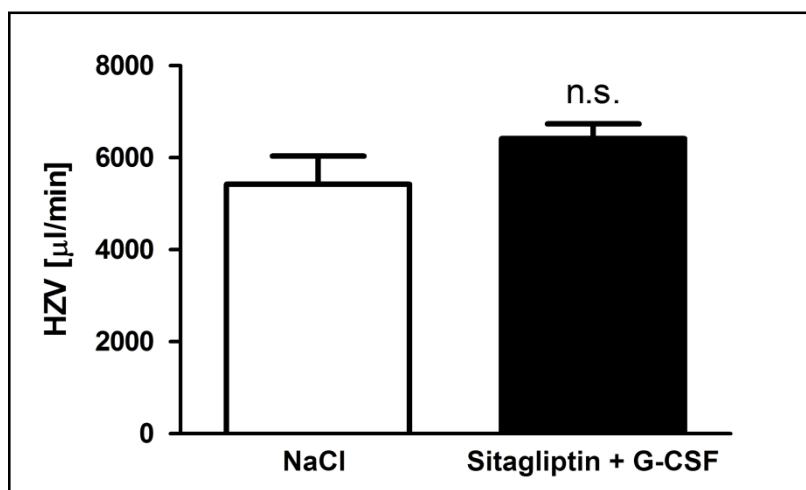


Abbildung 25: Der Vergleich des Herzzeitvolumens an Tag 6 pMI ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen therapierten Tieren und Kontrollgruppe. Mittelwert \pm SEM, NaCl: n = 5, Sitagliptin + G-CSF: n = 5, student's t-test [n.s.]: p = 0,192.

Das Herzzeitvolumen an Tag 6 post Myokardinfarkt war in der Gruppe unter dualer Stammzelltherapie mit $6414 \pm 322 \mu\text{l}/\text{min}$ im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem HZV von $5424 \pm 616 \mu\text{l}/\text{min}$ ohne statistische Signifikanz geringgradig erhöht (p = 0,192).

4.3.2. 28d post Myokardinfarkt

4.3.2.1. Übersicht der Funktionsparameter an Tag 28

Hämodynamische Funktionsparameter 28 Tage post MI			
	GLP-1R ^{-/-} NaCl n = 7	GLP-1R ^{-/-} Sitagliptin + G-CSF n = 7	p-Werte
HF [bpm]	344 ± 33	419 ± 33	p = 0,153 [n.s.]
P_{max} [mmHg]	73 ± 8	92 ± 8	p = 0,147 [n.s.]
P_{min} [mmHg]	3 ± 1	3 ± 1	p = 0,690 [n.s.]
ESV [µl]	44 ± 5	34 ± 7	p = 0,281 [n.s.]
EDV [µl]	49 ± 5	46 ± 7	p = 0,718 [n.s.]
SV [µl]	9 ± 1	15 ± 1 **	p = 0,004 [**]
EF [%]	18 ± 5	34 ± 4 *	p = 0,005 [*]
HZV [µl/min]	2894 ± 266	6067 ± 632 **	p = 0,001 [**]
dP/dt_{max} [mmHg/sec]	4413 ± 638	6457 ± 749	p = 0,066 [n.s.]
Tau_{weis} [msec]	10 ± 1	10 ± 1	p = 0,360 [n.s.]
Ea [mmHg/ml]	9 ± 2	6 ± 1	p = 0,125 [n.s.]

Tabelle 17: Hämodynamische Funktionsparameter 28 Tage post MI, Mittelwert ± sem,

NaCl: n = 7, Sitagliptin + G-CSF: n = 7,

student's t-test [*]: p < 0,05, [**]: p < 0,05, [n.s.]: p ≥ 0,05

Die Herzfrequenz der Therapiegruppe lag mit 419 ± 33 bpm um den Faktor 1,2 über dem Niveau der Kontrolle mit einer Frequenz von 344 ± 33 bpm. Während P_{max} unter der dualen Stammzelltherapie mit 92 ± 8 mmHg um 1,2 höher lag als in der Kontrolle mit 73 ± 8 mmHg, lag der P_{min} mit 3 ± 1 mmHg in beiden Gruppen auf demselben Niveau. Das endsystolische Volumen bei den therapierten Tieren war mit 34 ± 7 µl um den Faktor 1,3 geringer als das ESV von 44 ± 5 µl in der Kontrolle. Ein geringeres enddiastolisches Volumen von 46 ± 7 µl unter Therapie zeigte sich im Gegensatz zu 49 ± 5 µl in der Kontrolle. Eine hochsignifikante Verbesserung war nach Therapie im Schlagvolumen 15 ± 1 µl und Herzzeitvolumen 6067 ± 632 µl/min im Vergleich zur Kontrolle mit 9 ± 1 µl und 2894 ± 266 µl/min

zu beobachten. Auch eine signifikant effizientere Ejektionsfraktion mit $34 \pm 4\%$ konnte unter Therapie im Gegensatz zur Kontrolle mit $18 \pm 5\%$ erzielt werden. Auch die dP/dt_{max} war mit 6457 ± 749 mmHg/sec um den Faktor 1,5 höher als in der Kontrolle mit 4413 ± 638 mmHg/sec, wohingegen sich die Tau_{weis} in beiden Gruppen mit 10 ± 1 msec auf demselben Niveau befand. Einen weiteren tendenziellen Unterschied zeigte sich in der arteriellen Elastizität mit 9 ± 2 mmHg/ml in der Kontrolle versus 6 ± 1 mmHg/ml unter Therapie. Zusammenfassend ließ sich unter kombinierter Sitagliptin und G-CSF Therapie anhand der Kontraktilitätsparameter EF, HZV und dP/dt_{max} eine signifikant verbesserte systolische Herzfunktion an Tag 28 demonstrieren. Auch die diastolische Herzfunktion zeigte einen tendenziellen Effizienzgewinn mit einem geringeren enddiastolischem Volumen und damit geringerer Dilatation, trotz isovolumetrischem Relaxationsparameter Tau_{weis} auf gleichem Niveau.

4.3.2.2. Ejektionsfraktion an Tag 28 pMI

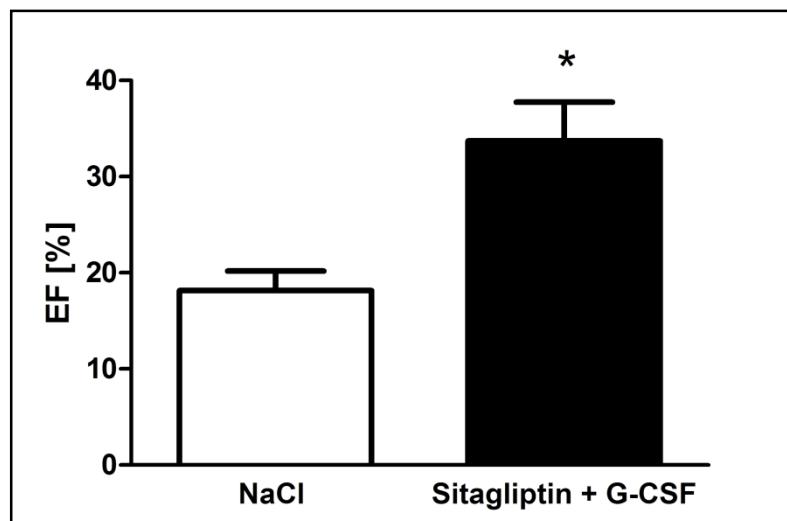


Abbildung 26: Anhand der Ejektionsfraktion an Tag 28 pMI wurde eine signifikant verbesserte Herzfunktion unter dualer Stammzelltherapie nachgewiesen. Mittelwert \pm sem, NaCl: n = 7, Sitagliptin + G-CSF: n = 7, student's t-test [*]: p = 0,005.

Die linksventrikuläre Pumpfunktion war in der Gruppe unter dualer Stammzelltherapie an Tag 28 mit einer EF von $34 \pm 4\%$ signifikant verbessert ($p = 0,005$). Im Vergleich dazu erreichte die EF lediglich $18 \pm 5\%$ in der Kontrollgruppe.

4.3.2.3. Herzzeitvolumen an Tag 28 pMI

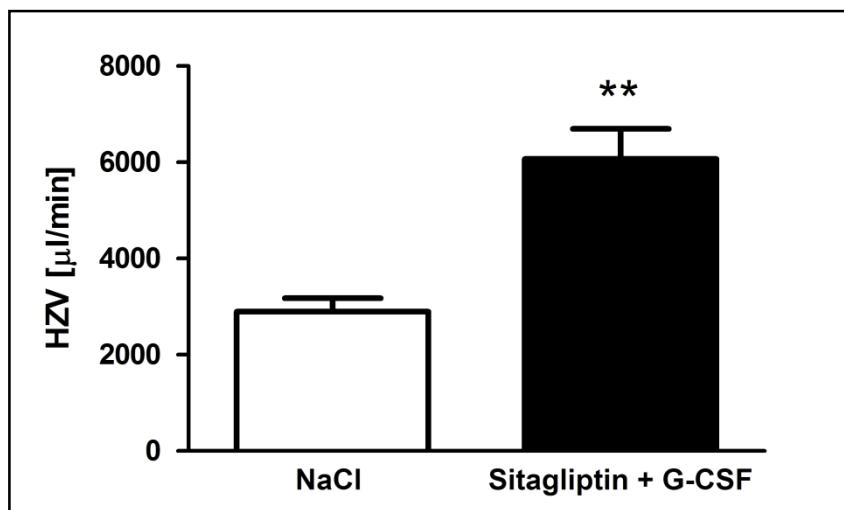


Abbildung 27: An Tag 28 pMI wurde ein hoch signifikanter Anstieg des Herzzeitvolumens unter dualer Stammzelltherapie beobachtet. Mittelwert \pm sem, NaCl: $n = 7$, Sitagliptin + G-CSF: $n = 7$, student's t-test [**]: $p = 0,001$.

Auch das Herzzeitvolumen der therapierten Tiere zeigte mit $6067 \pm 632 \mu\text{l}/\text{min}$ eine hoch signifikante Verbesserung ($p = 0,001$) an Tag 28 im Vergleich zu $2894 \pm 266 \mu\text{l}/\text{min}$ der Kontrollgruppe.

4.4. Morphometrische Befunde

4.4.1. Morphometrische Befunde an Tag 6 post Myokardinfarkt

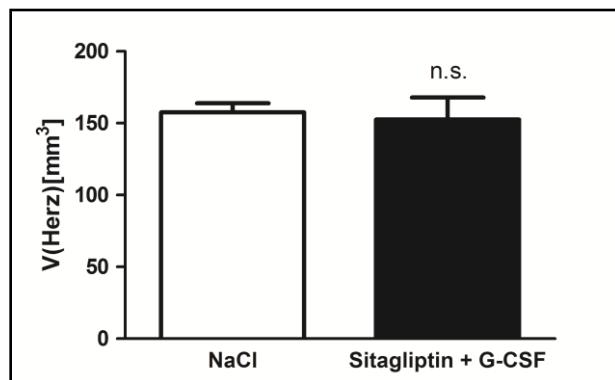


Abbildung 28: Vergleichende Darstellung des Herzvolumens V (Herz) an Tag 6 post MI;

NaCl: n = 7, Sitagliptin + G-CSF n = 8, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,78.

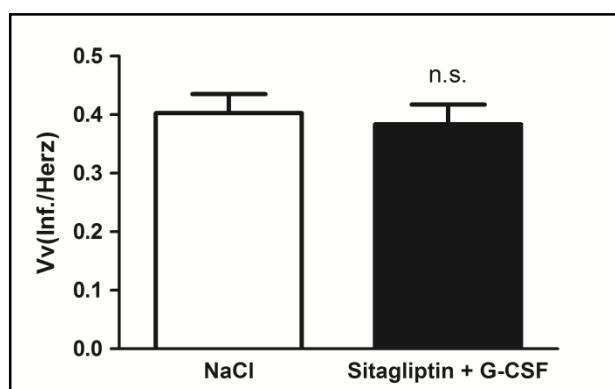


Abbildung 29: Vergleichende Darstellung des Infarktanteils V_v (Inf./Herz) an Tag 6 post MI;

NaCl: n = 7, Sitagliptin + G-CSF: n = 8, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,67.

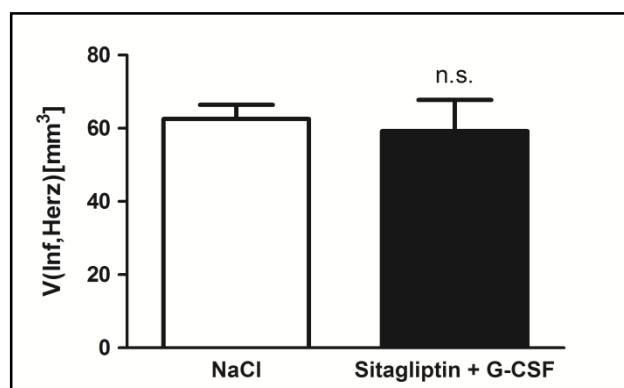


Abbildung 30: Vergleichende Darstellung des absoluten Infarktvolumens $V(\text{Inf}, \text{Herz})$ an Tag 6

post MI; NaCl: n = 7, Sitagliptin + G-CSF n = 8, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,74

Das Herzvolumen zeigte 6 Tage nach Infarktinduktion mit $158 \pm 6 \text{ mm}^3$ in der Kontrollgruppe im Vergleich zum Herzvolumen der behandelten Gruppe mit $153 \pm 15 \text{ mm}^3$ keinen Unterschied ($p = 0,78$). Ein analoges Ergebnis zeigte sich anhand des Infarktanteils, der sich mit $0,40 \pm 0,03$ bei den unbehandelten Tieren und $0,38 \pm 0,03$ bei den therapierten Tieren auf einem gleichwertigen Niveau befand ($p = 0,67$). Infolgedessen ließ sich ebenfalls keine signifikante Abweichung zwischen dem absoluten Infarktvolumen von $62,6 \pm 4 \text{ mm}^3$ der Kontrollgruppe und dem Infarktvolumen von $59,3 \pm 9 \text{ mm}^3$ bei den Individuen unter dauer Stammzelltherapie darstellen ($p = 0,74$).

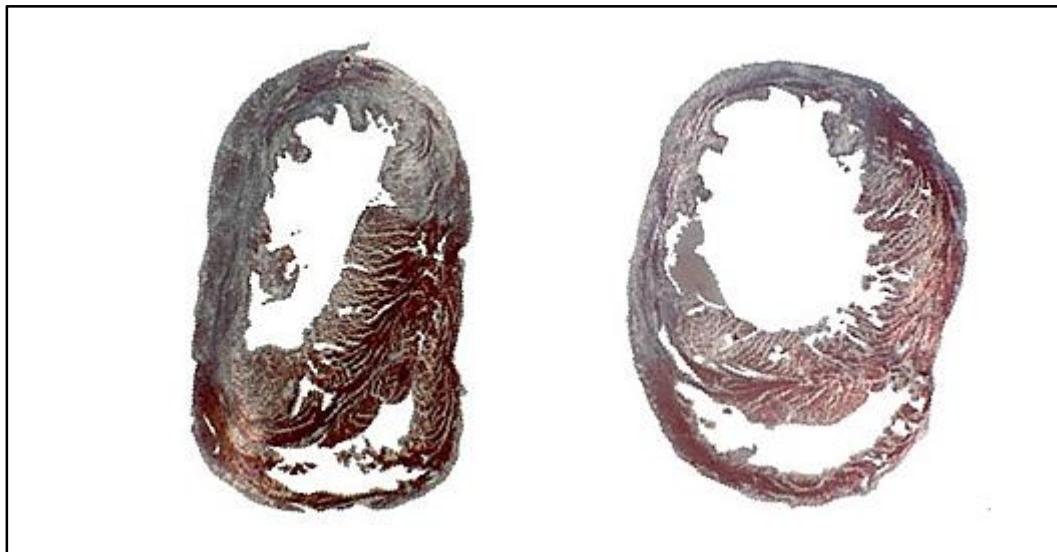


Abbildung 31: Histologische Schnittpreparate von zwei repräsentativen Herzen 6 Tage post MI, orig. Vgr. x 16, Masson-Trichrom; links: Sitagliptin + G-CSF, rechts: NaCl

4.4.2. Morphometrische Befunde an Tag 28 post Myokardinfarkt

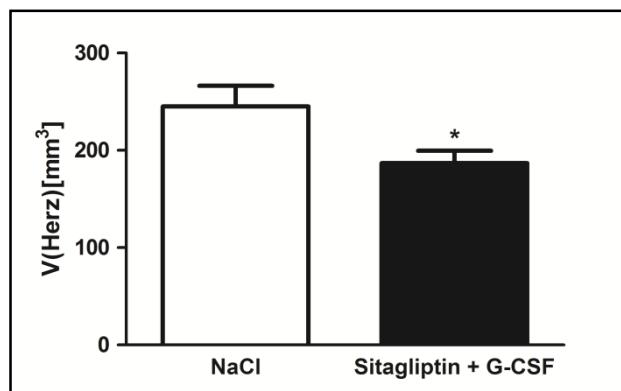


Abbildung 32: Vergleichende Darstellung des Herzvolumen $V(\text{Herz})$ an Tag 28 post MI;

NaCl: n = 6, Sitagliptin + G-CSF: n = 8, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,015.

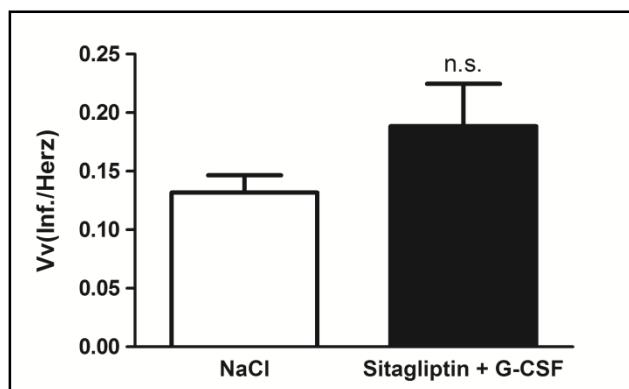


Abbildung 33: Vergleichende Darstellung des Infarktanteils $V_v(\text{Inf.}/\text{Herz})$ an Tag 28 post MI;

NaCl: n = 6, Sitagliptin + G-CSF: n = 8, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,096.

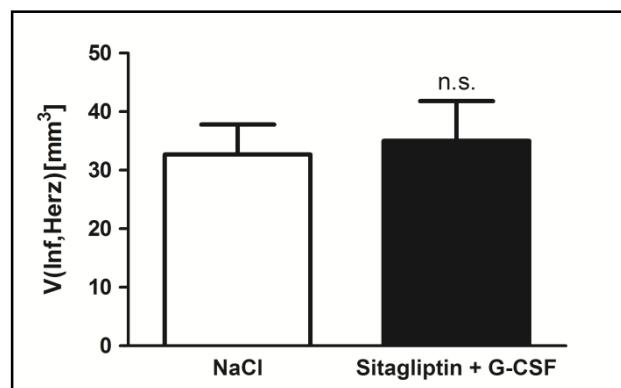


Abbildung 34: Vergleichende Darstellung des absoluten Infarktvolumens $V(\text{Inf}, \text{Herz})$ an Tag 28

post MI; NaCl: n = 6, Sitagliptin + G-CSF: n = 8, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,797.

28 Tage post Myokardinfarkt fand sich bei den unbehandelten Tieren ein mit $245 \pm 21 \text{ mm}^3$ signifikant höheres Herzvolumen im Vergleich zum Volumen der behandelten Gruppe mit $180 \pm 11 \text{ mm}^3$ ($p = 0,015$). Die Volumendichte des Infarkts zeigte sich mit $0,19 \pm 0,03$ der therapierten Tieren um den Faktor 1,5 erhöht, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren mit einer Volumendichte von $0,13 \pm 0,01$ ($p = 0,096$). Zwischen dem absoluten Infarktvolumen von $32,7 \pm 5 \text{ mm}^3$ der Kontrollgruppe und dem Infarktvolumen von $34,6 \pm 5 \text{ mm}^3$ im Kollektiv der dualen Stammzelltherapie ließ sich kein Unterschied darstellen ($p = 0,797$).

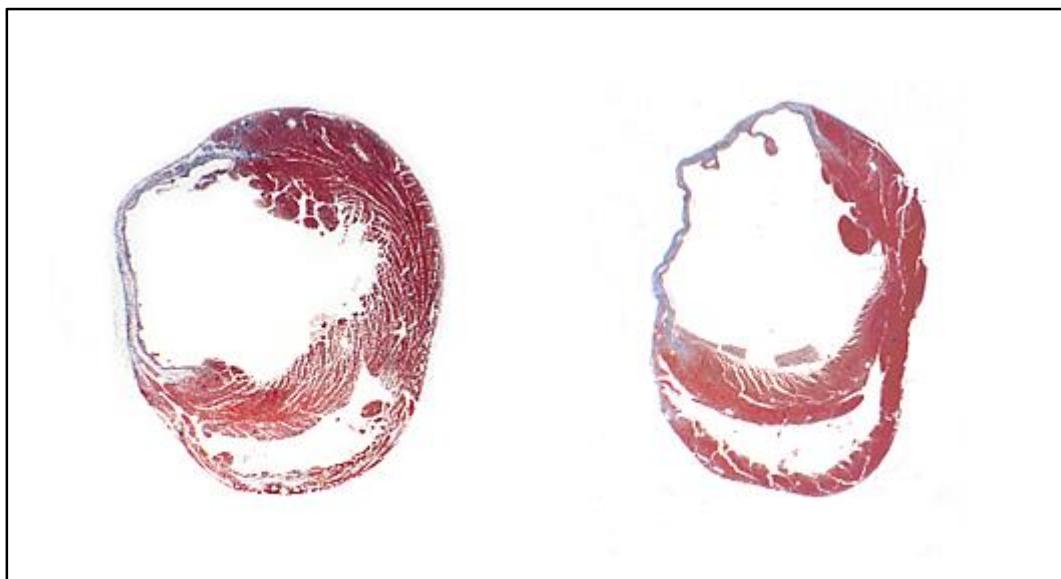


Abbildung 35: Histologische Schnittpräparate von zwei repräsentativen Herzen 28 Tage post MI, orig. Vgr. x 16, Masson-Trichrom; links: Sitagliptin + G-CSF, rechts: NaCl

Um eine detaillierte Aufschlüsselung des Infarktareals zu erhalten, wurde die Volumenfraktion der Hauptkomponenten, insbesondere der Anteil an kollagenem Bindegewebe, Kardiomyozyten, Kapillaren und Lymphgefäßen am Infarktgewebe, in einer Masson-Trichrom-Färbung in 400 facher Vergrößerung ermittelt (siehe Abb. 36).

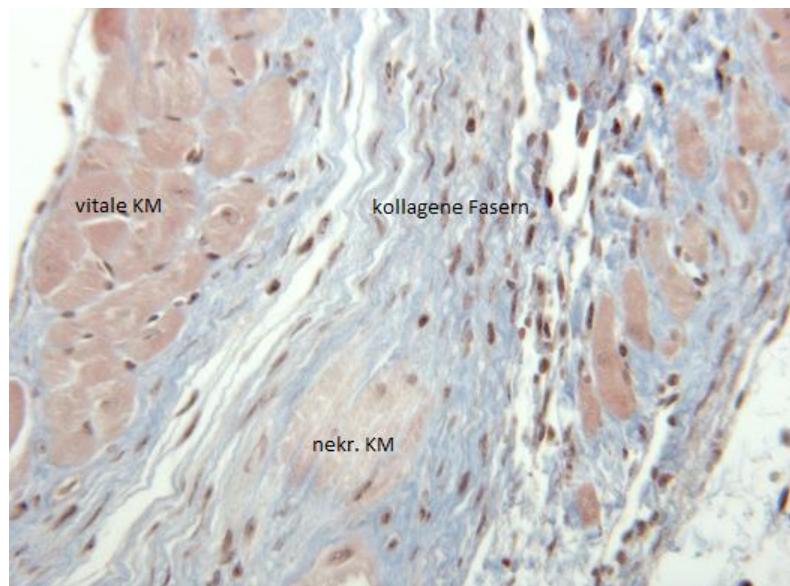


Abbildung 36: Histologisches Schnittpräparat eines Infarktareals 28 Tage post MI,
orig. Vgr. x 400, Masson-Trichrom

Der Anteil kollagener Fasern belief sich im Kollektiv der unbehandelten Tiere auf $32,7 \pm 0,04\%$ und unter Therapie auf $35,6 \pm 0,03\%$ ($p = 0,61$). Insgesamt wurde bei den Kontrolltieren ein Gesamtanteil von Kardiomyozyten im Infarktbereich von $29,3 \pm 0,06\%$ und unter Therapie von $30,3 \pm 0,01\%$ ($p = 0,88$) ermittelt. Dieses Größenverhältnis wurde durch Unterscheidung in vitale und nekrotische Kardiomyozyten weiter verfeinert. Unter dieser Voraussetzung wurde ein Prozentsatz vitaler Kardiomyozyten in der NaCl-Kontrolle von $15,4 \pm 0,03\%$ und in der Therapiegruppe von $14,6 \pm 0,01\%$ ($p = 0,81$) erhoben. Darüber hinaus wurde der kapilläre Anteil am Infarktgewebe bestimmt. Die unbehandelten Tiere wiesen einen Prozentsatz von $3,2 \pm 0,001\%$ und das Therapiekollektiv einen Anteil von $4,4 \pm 0,005\%$ an kleinen Gefäßen in der Infarktnarbe auf ($p = 0,13$). Das Lymphgefäßsystem war mit $17,5 \pm 0,08\%$ in dem Kollektiv unbehandelter Tiere tendenziell etwas ausgeprägter als in der Gruppe der mit Sitagliptin und G-CSF behandelten Tiere mit einem Anteil der Lymphgefäße am Infarktareal von $12,75 \pm 0,03\%$ ($p = 0,43$).

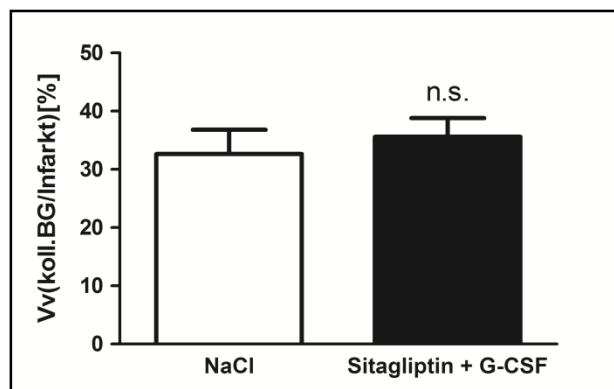


Abbildung 37: Anteil des kollagenen Bindegewebes am Infarktareal;

NaCl: n = 3, Sitagliptin + G-CSF: n = 3, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,61.

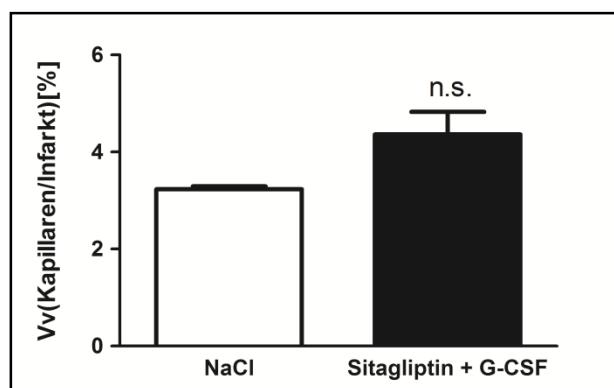


Abbildung 38: Anteil der Kapillaren am Infarktareal;

NaCl: n = 3, Sitagliptin + G-CSF: n = 3, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,13.

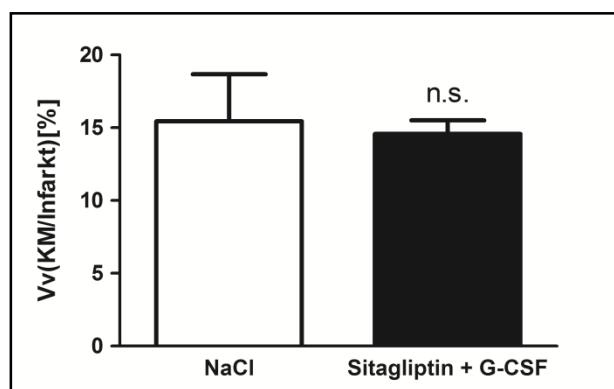


Abbildung 39: Anteil vitaler Kardiomyozyten am Infarktareal;

NaCl: n = 3, Sitagliptin + G-CSF: n = 3, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,81.

4.4.3. Morphometrische Befunde Tag 180 post Myokardinfarkt

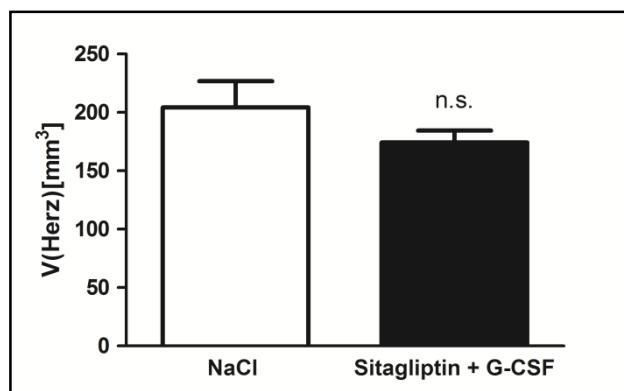


Abbildung 40: Vergleichende Darstellung des Herzvolumens $V(\text{Herz})$ an Tag 180 post MI;

NaCl: n = 6, Sitagliptin + G-CSF: n = 8, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,206.

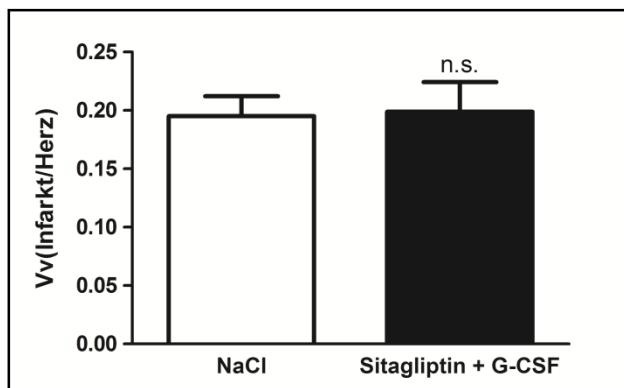


Abbildung 41: Vergleichende Darstellung des Infarktanteils $V_v(\text{Inf.}/\text{Herz})$ an Tag 180 post MI;

NaCl: n = 6, Sitagliptin + G-CSF: n = 8, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,912.

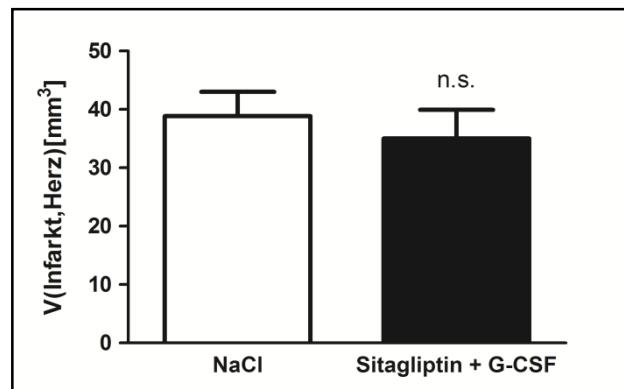


Abbildung 42: Vergleichende Darstellung des absoluten Infarktvolumens $V(\text{Inf}, \text{Herz})$ an Tag

180 post MI; NaCl: n = 6, Sitagliptin + G-CSF: n = 8, Mittelwert \pm sem, students t-test: p = 0,584.

Im Langzeitmodell 180 Tage nach Infarkt zeigte das Herzvolumen zwischen den unbehandelten Tieren mit einem Wert von $204 \pm 22 \text{ mm}^3$ keinen signifikanten Unterschied zum Herzvolumen der behandelten Gruppe mit $174 \pm 10 \text{ mm}^3$ ($p = 0,206$). Ein nahezu identisches Ergebnis zeigte sich anhand des Infarktanteils mit $0,20 \pm 0,02$ bei den unbehandelten Tieren und $0,20 \pm 0,03$ bei den therapierten Tieren ($p = 0,912$). Äquivalent zur Volumendichte des Infarktareals im Herzgewebe ließ sich auch zwischen absolutem Infarktvolumen von $38,8 \pm 4 \text{ mm}^3$ der Kontrollgruppe und dem Infarktvolumen von $35,0 \pm 5 \text{ mm}^3$ im Kollektiv unter dualer Stammzelltherapie kein Unterschied darstellen ($p = 0,584$).

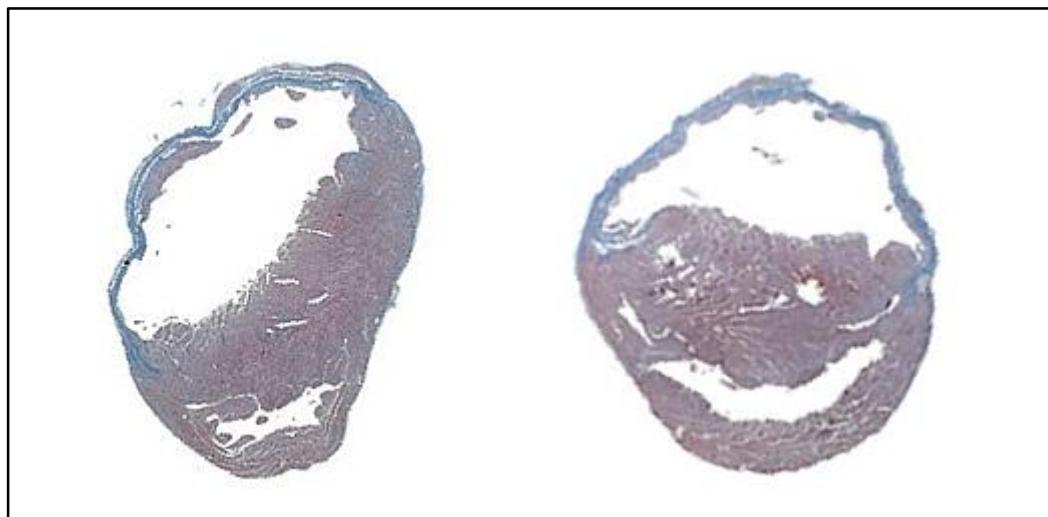


Abbildung 43: Histologische Schnittpräparate von zwei repräsentativen Herzen 180 Tage post MI, orig. Vgr. x 16, Masson-Trichrom; links: Sitagliptin + G-CSF, rechts: NaCl

4.4.4. Übersicht im Zeitverlauf

4.4.4.1. Herzvolumina post MI

Herzvolumina post MI		
	NaCl	Sitagliptin + G-CSF
V(Herz) Tag6 [mm³]	158 ± 6	153 ± 15
V(Herz) Tag28 [mm³]	245 ± 21	180 ± 11
V(Herz) Tag180 [mm³]	204 ± 22	174 ± 10

Tabelle 18: Übersicht über die Veränderung des Herzvolumens im Zeitverlauf

In der frühen Postinfarktphase nach 6 Tagen befand sich das Herzvolumen in beiden Gruppen auf einem ähnlichen Niveau mit 158 ± 6 bzw. 153 ± 15 mm³ und erhöhte sich bis zum Tag 28 in der Kontrollgruppe um den Faktor 1,6 auf 245 ± 21 mm³ bzw. weniger deutlich um den Faktor 1,2 in der behandelten Gruppe auf 180 ± 11 mm³. Die sich von Tag 28 bis zum Tag 180 anschließende Volumenreduzierung vollzog sich in der NaCl-Gruppe um den Faktor 1,2 auf 204 ± 22 mm³, während sich die Volumenänderung in der behandelten Gruppe von 180 ± 11 mm³ zu 174 ± 10 mm³ nur minimal äußerte. Zusammenfassend lässt sich therapieunabhängig festhalten, dass sich das Volumen der infarzierten Herzen von einem frühen Zeitpunkt an Tag 6 nach Infarkt bis zu Tag 28 erhöht, um sich dann auf lange Sicht auf einem wieder etwas niedrigeren Level einzupendeln, aber im Vergleich zu Tag 6 immer noch höheren Volumen. Diese Veränderungen im Herzvolumen waren in der behandelten Gruppe schwächer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe.

4.4.4.2. Volumendichte des Infarktareals post MI

Volumendichten post MI		
	NaCl	Sitagliptin + G-CSF
Vv(Inf./Herz) Tag6	0,40 ± 0,03	0,38 ± 0,03
Vv(Inf./Herz) Tag28	0,13 ± 0,01	0,19 ± 0,03
Vv(Inf./Herz) Tag180	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,03

Tabelle 19: Übersicht über die Veränderung der Volumendichte des Infarkts im Zeitverlauf

6 Tage post Infarkt fand sich der Infarktanteil am Herzen in beiden Gruppen auf einem nahezu identischen Level mit $0,4 \pm 0,03$ bzw. $0,38 \pm 0,03$. Dieser Ausprägungsgrad verringerte sich bis zum Tag 28 in der Kontrollgruppe um den Faktor 3,1 auf $0,13 \pm 0,01$ bzw. um den Faktor 2 in der behandelten Gruppe auf $0,19 \pm 0,03$. Zwischen Tag 28 und Tag 180 erhöhte sich die Volumendichte in der Kontrolle auf $0,2 \pm 0,02$ um den Faktor 1,5, während sich die Volumendichte in der behandelten Gruppe von $0,19 \pm 0,03$ und $0,20 \pm 0,03$ zwischen Tag 28 und Tag 180 nicht wesentlich unterschied. Therapieunabhängig ließ sich festhalten, dass sich die Volumendichte der Infarktnarbe von einem frühen Zeitpunkt an Tag 6 nach Infarkt bis zu Tag 28 reduziert, dabei unter der dualen Stammzelltherapie aber weniger deutlich ausgeprägt. An Tag 180 war die Volumendichte des Infarktareals beider Gruppen identisch mit 0,20 und hat sich in Bezug auf den Ausgangswert an Tag 6 um den Faktor 2 reduziert.

4.4.4.3. Absolute Infarktvolumina post MI

Absolute Infarktvolumina post MI		
	NaCl	Sitagliptin + G-CSF
V(Inf,Herz) Tag6 [mm³]	62,6 ± 4	59,3 ± 9
V(Inf,Herz) Tag28 [mm³]	32,7 ± 5	34,6 ± 5
V(Inf,Herz) Tag180 [mm³]	38,8 ± 4	35,0 ± 5

Tabelle 20: Übersicht über die Veränderung des absoluten Infarktvolumens im Zeitverlauf

Das aus Herzvolumen und Infarktanteil rechnerisch ermittelte absolute Infarktvolumen ergab an Tag 6 zwischen beiden Gruppen keinen wesentlichen Unterschied mit $62,6 \pm 4 \text{ mm}^3$ bzw. $59,3 \pm 9 \text{ mm}^3$. Dieses Infarktvolumen verringerte sich bis Tag 28 in der Kontrollgruppe um den Faktor 1,9 auf $32,7 \pm 5 \text{ mm}^3$ bzw. um den Faktor 1,7 in der behandelten Gruppe auf $34,6 \pm 5 \text{ mm}^3$. Zwischen Tag 28 und Tag 180 erhöhte sich das absolute Infarktvolumen in der Kontrolle auf $38,8 \pm 4 \text{ mm}^3$ um den Faktor 1,2 während es sich in der behandelten Gruppe mit $34,6 \pm 5 \text{ mm}^3$ und $35,0 \pm 5 \text{ mm}^3$ zwischen Tag 28 und Tag 180 nicht wesentlich unterschied. Demnach war zu beobachten, dass sich das absolute Infarktvolumen unabhängig von einer Therapie von Tag 6 bis Tag 28 deutlich reduziert und bis Tag 180 auf einem ähnlichen Wert verweilt.

4.4.5. Systemische Folgen

Im Langzeitmodell, 180 Tage nach Myokardinfarkt, wurde das Ausmaß der Herzinsuffizienz anhand von histopathologischen Veränderungen an Lunge und Leber beurteilt. Die Klassifizierung der Befunde erfolgte analog den Pathomechanismen im Entstehungsverlauf von Stauungslunge und -leber (siehe 3.8.5.).

4.4.5.1. Stauungslunge

Pulmonale Auswirkung einer Linksherzinsuffizienz 180d pMI		
Auswirkungsgrad	NaCl (n=6)	Sitagliptin + G-CSF (n=8)
0 = physiologischer Lungenbefund	-	-
1 = akute Stauungslunge	n = 3	n = 4
2 = chronische Stauungslunge Grad 1	n = 3	n = 3
3 = chronische Stauungslunge Grad 2	-	n = 1

Tabelle 21: Pulmonale Konsequenzen infolge eines Myokardinfarkts

180 Tage nach Myokardinfarkt war unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, bei keinem der untersuchten Tiere ein physiologischer Lungenbefund feststellbar. Der linksventrikuläre Myokardinfarkt resultierte 6 Monate nach Verschluss der LAD bei allen Tieren in einer insuffizienten Pumpfunktion, die sich in einer konsekutiven Schädigung der Lunge manifestierte. Die pulmonalen Stauungserscheinungen präsentierte sich in unterschiedlicher Ausprägung. So wiesen Tiere aus beiden Gruppen in ähnlicher Verteilung, sowohl histopathologische Befunde einer akuten Stauungslunge als auch Veränderungen eines chronischen Rückstaus auf. Die Befunde innerhalb des Bildes einer akuten Stauungslunge waren in beiden Gruppen nur dezent ausgeprägt und spiegelten den Beginn einer Dekompensation wieder. Der Hauptbefund präsentierte sich in einer unterschiedlich stark ausgeprägten Hyperämie mit einem geringgradigen interstitiellen Ödem. Ein alveoläres Ödem war nur in Einzelfällen und lediglich in partiellen Alveolarlumina nachweisbar. Der Symptomkomplex einer chronischen Lungenstauung ersten Grades mit den Befunden Hyperämie, interstitiellem und alveolärem Ödem und dem Nachweis von turnbull-positiven Alveolarmakrophagen, den sogenannten Herzfehlerzellen, war in beiden Gruppen gleichermaßen ausgeprägt. Das Bild einer chronischen Lungenstauung zweiten Grades mit einem ausgeprägten alveolären Lungenödem, einer mittelgradigen Ansammlung von Herzfehlerzellen im Alveolarlumen und einer beginnenden Fibrose der Alveolarsepten zeigte sich lediglich bei einem Tier aus der therapierten Gruppe.

Zusammenfassend war kein Unterschied in der Ausprägung der pulmonalen Konsequenzen zwischen therapierteter Gruppe unter dualer Stammzelltherapie und Kontrollgruppe nachweisbar.

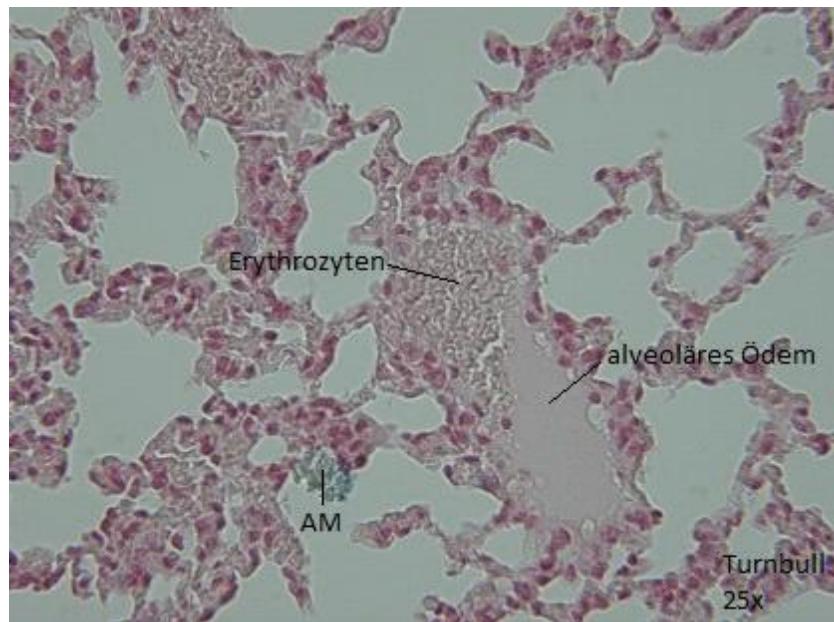


Abbildung 44: Histologischer Befund einer Stauungslunge mit alveolärem Ödem, Hyperämie und Hämosiderin-haltigen Alveolarmakrophagen (AM), 180 Tage pMI, Vgr. x 250, Turnbullblau

4.4.5.2. Stauungsleber

Hepatische Auswirkung einer Rechtsherzinsuffizienz 180d pMI		
Auswirkungsgrad	NaCl (n=6)	Sitagliptin + G-CSF (n=8)
0 = physiologischer Leberbefund	n = 6	n = 7
1 = akute Stauungsleber	-	n = 1
2 = chronische Stauungsleber Grad 1	-	-
3 = chronische Stauungsleber Grad 2	-	-
3 = chronische Stauungsleber Grad 2	-	-

Tabelle 22: Hepatische Konsequenzen infolge eines Myokardinfarkts

180 Tage nach linksventrikulärer Infarktinduktion gab es histopathologisch innerhalb beider Gruppen im Allgemeinen keinen Hinweis auf eine kardiale Leberstauung, verursacht durch eine eingeschränkte Rechtsherzfunktion. So wiesen alle 6 Tiere der Kontrollgruppe und 7 von 8 Tieren unter dualer Stammzelltherapie einen physiologischen Leberbefund auf. Lediglich bei einem Tier aus der behandelten Gruppe zeigte sich eine geringgradige Hyperämie der Zentralvenen und zentrolobulären Sinusoide. Dieser Leberbefund war vergesellschaftet mit einer chronischen Lungenstauung zweiten Grades, einem ausgeprägten alveolären Lungenödem, einer mgr. Ansammlung von Herzfehlerzellen im Alveolarlumen und einer beginnenden Fibrose der Alveolarsepten. Ein deutlicher Hinweise auf eine kardiale Globalinsuffizienz bei einem Individuum aus der behandelten Gruppe, während bei keinem der weiteren Tiere, unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit, ein Hinweis auf eine Rechtsherzinsuffizienz vorlag.

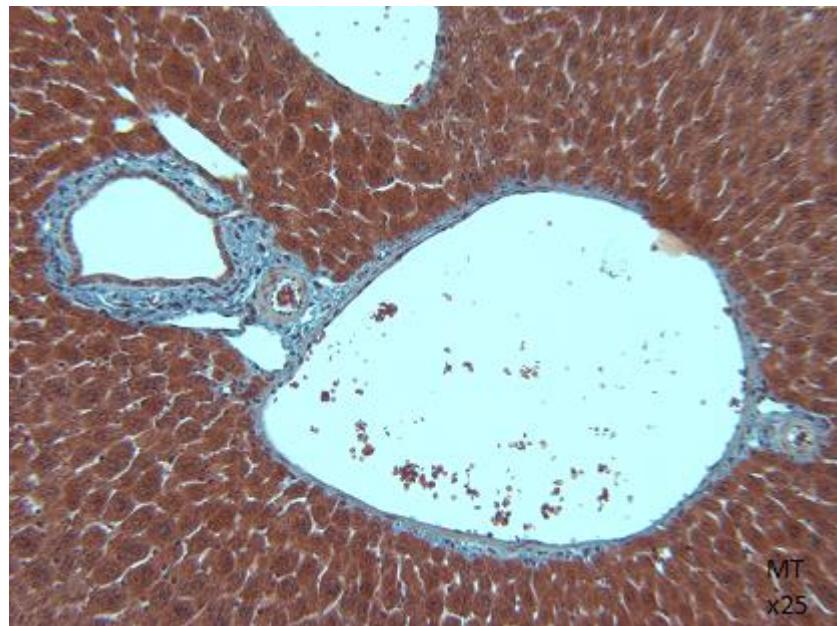


Abbildung 45: Physiologischer Leberbefund, 180 Tage pMI, Vgr. x 250, Masson-Trichrom

V. DISKUSSION

Durch den medikamentösen Einsatz von DPP-IV-Inhibitoren werden parallel eine Reihe von verschiedenen kardioprotektiven Faktoren stabilisiert [16-18]. Darunter der Homingfaktor SDF-1 α und das Inkretin GLP-1. In der vorliegenden Arbeit galt es die vom GLP-1R unabhängige Wirkung der dualen Stammzelltherapie zu demonstrieren. Durch die Verwendung des GLP-1R $^{-/-}$ Mausmodells schufen wir mit der Unterbindung der GLP-1 Signaltransduktion die Möglichkeit einer isolierten Betrachtung der stammzellspezifischen Wirkung einer kombinierten Sitagliptin und G-CSF Therapie auf die Regeneration des geschädigten Myokards.

5.1. Verifizierung des Therapiekonzepts im GLP-1R $^{-/-}$ Mausmodell

Als Basis des Therapiekonzepts wurde sichergestellt, dass der Wirkstoff Sitagliptin im Organismus der transgenen Tiere effizient verstoffwechselt werden kann. Die ermittelte Plasmakonzentration im Blut von GLP-1R $^{-/-}$ Mäusen entsprach einer ausreichenden Wirkstoffkonzentration, um eine DPP-IV-Inhibition zu gewährleisten. Damit war der Grundstein für die Wirksamkeitsüberprüfung der dualen Stammzelltherapie im GLP-1R $^{-/-}$ Mausmodell gelegt.

Der nächste Schritt führte über den Nachweis des Therapieeffekts auf die Stammzellmobilisierung. Durch die Sitagliptin-Monotherapie wurden bereits erhöhte Zellzahlen knochenmarkstämmiger CD34 $^{+}$ CD45 $^{+}$ Stammzellen im Blut der GLP-1R $^{-/-}$ Tiere nachgewiesen. Mit der Addition von G-CSF zur Therapie ließ sich die Mobilisierungsrate weiter steigern. Damit war auch die Ausschüttung knochenmarksstämmiger Vorläufer durch die kombinierte Sitagliptin und G-CSF Medikation in unserem Versuchsdesign realisierbar.

Der über die SDF-1 α /CXCR4-Achse vermittelte Homingprozess der Stammzellen zeigte in der transgenen Maus bereits unter alleiniger Gabe des DPP-IV Inhibitors eine Steigerung des Anteils von CD34 $^{+}$ CD45 $^{+}$ Stammzellen am Herzmuskel.

Der Prozentsatz knochenmarkstämiger Vorläufer nahm unter Doppeltherapie weiter zu. Anhand dieser Homingraten war auch im GLP-1R^{-/-} Mausmodell das Zusammenwirken des stabilisierten SDF-1α-Gradienten mit den CXCR4-Rezeptoren unter Beweis gestellt.

5.2. Effekte des Therapiekonzepts im GLP-1R^{-/-} Mausmodell

In einer Kurzzeitanalyse 6 Tage nach Infarktinduktion war anhand der hämodynamischen Analysen kein signifikanter Unterschied in den Funktionsparametern linksventrikuläre Ejektionsfraktion und Herzzeitvolumen nach Sitagliptin und G-CSF Therapie darstellbar. Der fehlende funktionelle Benefit der Dualtherapie korrelierte mit den morphometrischen Daten zu diesem Untersuchungszeitpunkt. Hinsichtlich Herzvolumen, Infarktanteil und absolutes Infarktvolumen war im Zeitintervall nach 6 Tagen kein kardioprotektiver Benefit nachweisbar.

Das Follow-Up nach 28 Tagen zeigte hingegen anhand der Größen linksventrikuläre Ejektionsfraktion und Herzzeitvolumen unter duality Stammzelltherapie eine signifikante Verbesserung der Herzfunktion. In der morphometrischen Analyse war ein signifikant reduziertes Herzvolumen und eine marginal höhere Kapillarisierung unter Therapie zu beobachten, während die Infarktgröße, gemessen an den Parametern Infarktfaktion und absolutes Infarktvolumen, keinen relevanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle aufwies.

Die abschließende Evaluierung erfolgte mit der Datenerhebung 180 Tage nach Infarktinduktion und zeigte keinen Unterschied in der kardialen Architektur gemessen an den Parametern Herzvolumen, Volumendichte des Infarkts und absolutes Infarktvolumen. Ebenso ergab die indirekte Evaluierung der Herzfunktion über die systemischen Auswirkungen auf Lunge und Leber keinen kardioprotektiven Benefit der dualen Stammzelltherapie.

5.3. Die duale Stammzelltherapie

5.3.1. Zytokin-induzierte Stammzellmobilisierung

Die duale Stammzelltherapie kombiniert eine Zytokin-induzierte Mobilisierung mit einem verstärktem Homing knochenmarkstämmer Progenitorzellen [8,100]. Die physiologische Reaktion einer Stammzellausschüttung auf einen ischämischen Reiz [46,47] wird durch die Applikation des stammzellmobilisierenden Zytokins G-CSF verstärkt. G-CSF galt in den letzten Jahren als Mittel der Wahl für eine effektive Stammzellmobilisierung. Die Zytokin-vermittelte Loslösung der Progenitorzellen aus dem Knochenmarkstroma läuft in erster Linie über die Unterbrechung der SDF-1 α /CXCR4- und VCAM/VLA-4-Achsen, welche für die Stammzellretention verantwortlich sind [56,57]. Durch den kombinierten Einsatz von G-CSF und Sitagliptin kam es im GLP-1R $^{-/-}$ Mausmodell, wie bereits im Wildtyp C57Bl\6 gezeigt [8], zu einer signifikant gesteigerten Ausschüttung von CD34 $^{+}$ CD45 $^{+}$ Zellen in die periphere Zirkulation. Interessanterweise wurde wie zuvor beschrieben auch im Kollektiv der GLP-1R $^{-/-}$ Mäuse allein unter Sitagliptin-Monotherapie eine Zunahme der Stammzellausschüttung nachgewiesen. Eine Erklärung für die Sitagliptin-induzierte Mobilisierung lieferten *Fadini et al.* durch die Sitagliptin vermittelte Stabilisierung von SDF-1 α in der Zirkulation. In einem Kollektiv von Diabetespatienten beschrieben die Autoren unter Sitagliptintherapie eine vermehrte Freisetzung knochenmarkstämmer Vorläuferzellen [149]. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die essentielle Bedeutung des durch DPP-IV-Hemmung stabilisierten SDF-1 α im Bereich stammzellgestützter Therapiemodelle. Dies wurde auch anhand einer induzierten Stammzellmobilisierung nach SDF-1 α -Überexpression im Mausmodell [65] oder nach Hochregulierung vaskulärer und angiogener Faktoren über die SDF-1 α /CXCR4-Achse nachgewiesen [85]. Vor diesem Hintergrund war die Mobilisierung durch die kombinierte Sitagliptin und G-CSF Medikation auch in unserem Versuchsdesign als hoch effizient zu bewerten.

5.3.2. DPP-IV-Inhibition durch Sitagliptin

Wesentlicher Bestandteil des Therapiekonzepts der dualen Stammzelltherapie in der vorliegenden Arbeit war die Verwendung des DPP-IV-Inhibitors Sitagliptin. Dieser ursprünglich für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 klinisch zugelassene Wirkstoff aus der Klasse der Gliptine steht als orales Pharmakon für die DPP-IV Inhibition seit 2008 zur Verfügung. Dadurch konnte der DPP-IV-Inhibitor Diprotin A aus vorangegangenen Arbeiten [6] durch ein klinisch zugelassenes Arzneimittel ersetzt werden. Nach oraler Verabreichung des Wirkstoffs über sitagliptinhaltiges Futter lag die ermittelte Plasmakonzentration der GLP-1R^{-/-} Tiere auf einem ausreichenden Konzentrationsniveau, um eine effiziente DPP-IV-Inhibition zu gewährleisten. Die verwendete Dosierung von 500 mg/kg KM in der Maus wurde anhand von massenspektrometrischen Analysen der Sitagliptinplasmakonzentration in Korrelation mit der kardialen DPP-IV-Aktivität in vorangegangenen Arbeiten etabliert [8]. Als Standard für eine effiziente DPP-IV-Inhibition wurde das Aktivitätsniveau des Enzyms in CD26^{-/-} Mäusen herangezogen [6,8]. Mit dieser Dosierung konnten auch unter dem Vorbehalt einer transienten postoperativen Inappetenz ein ausreichender Sitagliptinspiegel zur Hemmung der DPP-IV-Aktivität in der GLP-1R^{-/-} Maus erzielt werden. Als DPP-IV-Substrate mit postulierten Wirkungen auf das kardiovaskuläre System werden in der Literatur unter anderen GLP-1, SDF-1 α , natriuretisches Peptid Typ B, Substanz P und Neuropeptid Y beschrieben [87]. Während durch die BNP vermittelte Vasodilatation im Infarktmodell der Ratte eine bessere linksventrikuläre Pumpfunktion und ein geringeres kardiales Remodeling gezeigt wurden [150], beeinflusst das Neuropeptid Y in erster Linie kardiale Ionenkanäle [151] und für die Substanz P konnten negativ chronotrope und inotrope Wirkungen in der Langendorffperfusion aufgezeigt werden [152].

Eine umfangreichere Bedeutung aufgrund ihres evidenten kardioprotektiven Potentials erlangten unter den DPP-IV Substraten hingegen GLP-1 und SDF-1 α . Durch die genetische Inhibition der rezeptorvermittelten GLP-1 Wirkung in unserem Versuchsdesign wurde eine weitgehend isolierte Analyse des Wirkungspotentials einer SDF-1 α Stabilisierung durch Sitagliptin ermöglicht. Auf diese Weise konnte in unserem zellbasierten Therapieansatz die Interaktion von

SDF-1 α mit dem CXCR4 als essentieller Faktor in Hinblick auf das Homing zirkulierender Stammzellen [7], unabhängig vom GLP-1R nachgewiesen werden.

5.3.3. Stammzellhoming über Stabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse

Als hauptverantwortlich für die Einwanderung der zirkulierenden Zellen in den geschädigten Herzmuskel gilt der im ischämischen Gebiet verstärkt exprimierte Homingfaktor SDF-1 α [18,46,47,82]. Aufgrund seiner enzymvermittelten Spaltung und Inaktivierung zielt ein Pfeiler der dualen Stammzelltherapie über eine pharmakologische Hemmung der DPP-IV auf die Stabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse. Unter dualityer Stammzelltherapie kam es im GLP-1R $^{-/-}$ Mausmodell wie zuvor beschrieben [8] zu einem signifikant gesteigerten Homing der CD34 $^{+}$ CD45 $^{+}$ Zellen in den ischämischen Herzmuskel. Dieser Effekt war ebenfalls, wenn auch geringer ausgeprägt, unter Sitagliptin-Monotherapie nachweisbar. Anhand dieser Daten konnten wir belegen, dass sich Mobilisierung und effektives Homing der Progenitorzellen vom GLP-1Rezeptor unabhängig verhalten. Damit wird die Hypothese unserer Arbeitsgruppe gestützt, dass in diesem zellbasierten Versuchsdesign die essentielle Rolle der SDF-1 α /CXCR4-Achse zufällt [7]. Nach der Zelldifferenzierung innerhalb der eingewanderten Stammzellpopulation, anhand der spezifischen Oberflächenmarker CD31, c-kit, CXCR4 und sca-1, war respektive der effizienten Homingrate der CXCR4 $^{+}$ Vorläuferzellen wie zuvor bei Zaruba *et al.* [6] beschrieben, ein konstruktives Zusammenwirken des stabilisierten SDF-1 α -Gradienten mit den CXCR4-Rezeptoren unter Beweis gestellt. Durch die eingewanderten CD34 $^{+}$ CD45 $^{+}$ Stammzellen werden auto- und parakrine Mechanismen vermittelt, die letztendlich die kardioprotektiven Effekte erzielen [153]. Zu den induzierten parakrinen Mechanismen zählten in erster Linie Neoangiogenese und reduzierte Apoptoseraten, die durch eine Reihe aus Vorläuferzellen sezernierter Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren positiv beeinflusst werden [154]. Auch für humane CD34 $^{+}$ Stammzellen wurden Nachweise eines stammzellvermittelten parakrinen Benefits postuliert, mit positiven Auswirkungen auf Apoptoseinhibition und Endothelzellproliferation [155].

In den präklinischen Studien zur stammzellvermittelten Kardioprotektivität nach Myokardinfarkt wurden infolgedessen ein verminderter kardiales Remodeling, eine verbesserte Herzfunktion und konsekutiv höhere Überlebensraten nachgewiesen [6-8].

5.3.4. Auswirkung auf die kardiale Architektur

Die Einwanderung knochenmarkstämmer Vorläuferzellen zeigte im GLP-1R^{-/-} Mausmodell zu einem frühen Untersuchungszeitpunkt, 6 Tage nach Infarkt, respektive der Infarktgröße keinen Unterschied in der kardialen Architektur. Damit verhält sich der Datensatz aus der vorliegenden Arbeit analog zu den Ergebnissen der Vorläuferstudien von *Theiss et al.* und *Zaruba et al.*, in denen sich 6 Tage nach Myokardinfarkt die Infarktgrößen ebenfalls auf einem ähnlichen Niveau befanden [6,8]. Im Gegensatz zeigten Studien, die ein Ischämie-Reperfusionsmodell verwendeten, sowohl durch genetische als auch durch pharmakologische DPP-IV-Inhibition eine Reduktion des Infarktareals [88,89,156]. Darunter belegten *Ye et al.* in einem I/R Modell der Maus eine signifikante Reduktion der Infarktgröße nach Sitagliptin Vorbehandlung. Interessanterweise wurde der kardioprotektive Benefit durch den PKA-Inhibitor H-89 aufgehoben, was den Schluss nahelegt, dass der kardioprotektive Benefit auf das Infarktareal von der cAMP-abhängigen PKA-Aktivierung und dadurch vom GLP-1R abhängt [156]. Auch *Hausenloy et al.* demonstrierten im I/R Modell der Ratte unter pharmakologischer DPP-IV-Hemmung einen positiven Effekt auf die Infarktgröße. Dieser kardiale Benefit konnte allerdings nur in mittelalten, diabetischen Tieren nachgewiesen werden, während er in jungen, gesunden Tieren ausblieb. Auch in diesem Setting wurde nachgewiesen, dass die DPP-IV-Hemmung glukoseabhängig über die GLP-1R vermittelte PKA-Signalgebung die Infarktgröße limitiert [89]. Während diese beiden Autoren eine GLP-1R abhängige Wirkung der DPP-IV-Inhibition postulierten, machten *Ku et al.* einen rezeptorunabhängigen Signalweg bzw. eine GLP-1 unabhängige Wirkung geltend. Durch eine genetische DPP-IV-Inhibition im I/R Modell wurden, im Vergleich zu Wildtypen, positive Effekte auf die Infarktnarbe nachgewiesen, welche sich mit der Verwendung des GLP-1R-Antagonisten Exendin(9-36) nicht gänzlich revidieren ließen [88].

So stellt sich die Frage, ob ein früher kardioprotektiver Effekt in Hinblick auf eine Minimierung des Infarktareals durch GLP-1 an seinem Rezeptor vermittelt ist.

In den stammzellbasierten Arbeiten von *Theiss et al.* und *Zaruba et al.* konnten 28 Tage nach Myokardinfarkt unter pharmakologischer und genetischer DPP-IV-Hemmung eine signifikante Reduktion der Infarktnarbe erreicht werden. Der positive Effekt ließ sich dabei durch Addition des stammzellmobilisierenden Zytokins G-CSF noch verstärken [6,8]. Auch die Arbeit von *Sauvé et al.* konnte unter genetischer DPP-IV-Hemmung, wenn auch ohne statistische Signifikanz, vier Wochen nach Myokardinfarkt kleinere Infarktgrößen nachweisen [90]. In den morphometrisch erhobenen Daten dieser Arbeit war unter dualer Stammzelltherapie nach 28 Tagen der Infarktanteil geringgradig erhöht, während das signifikant reduzierte Herzvolumen zu einem vernachlässigbaren Unterschied des absoluten Infarktvolumens führte. Zusätzlich wurde hier die Infarktnarbe nach ihrer zellulären Zusammensetzung aufgeschlüsselt. Während sich das Verhältnis aus kollagenem Bindegewebe und verbleibenden Kardiomyozyten im Infarktareal zwischen den Gruppen nicht unterschied, war der prozentuale Anteil an Kapillaren unter dualer Stammzelltherapie marginal erhöht, so dass von einer effizienteren Perfusion und folglich einer noch weitgehenden Kontraktilität des Infarktgebiets ausgegangen werden kann. Auch *Connelly et al.* zeigten im Infarktmodell diabetischer Ratten unter Sitagliptintherapie 28 Tage nach MI eine erhöhte Dichte an Endothelzellen, im Gegensatz zum vorliegenden Datensatz hingegen weniger Kollagen im Infarktareal [91]. So können anhand der morphometrisch erhobenen Daten zum intermediären Untersuchungszeitpunkt im GLP-1R^{-/-} Mausmodell, respektive in Hinblick auf die Infarktgröße, die zuvor beschriebenen positiven Effekte der Stammzelltherapie auf die kardiale Architektur nicht bestätigt werden [6,8].

Die abschließende Evaluierung erfolgte mit der morphometrischen Datenerhebung 180 Tage nach Infarktinduktion und zeigte keinen Unterschied im kardialen Remodeling. Dieser Verlauf lässt sich weitgehend in den Datensatz von *Yin et al.* einordnen, die in ihrem Infarktmodell der Ratte unter Vildagliptin-vermittelter DPP-IV-Inhibition nach 3 Monaten zwar noch einen Trend hin zu kleineren Infarktgrößen nachwiesen, aber im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne statistische Signifikanz [92].

5.3.5. Auswirkung auf die Herzfunktion

In einer von *Ku et al.* initiierten I/R Studie an Ratten mit genetischer DPP-IV-Inhibition zeigte die millar Tip Untersuchung zwar eine geringer ausgeprägte Depression der kardialen Funktion, jedoch ohne statistische Signifikanz. Damit korrelierten in diesem Versuchsdesign die reduzierten Infarktgrößen nicht mit einer effizienteren Pumpfunktion [88]. Auch die im GLP-1R^{-/-} Mausmodell erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit, ließen nach der Kurzzeitanalyse 6 Tage post MI unter Sitagliptin-G-CSF-Kombination keinen positiven Effekt auf die linksventrikuläre Herzfunktion nachweisen, ein Befund, der jedoch in Einklang stand mit der Indifferenz des Infarktvolumens zwischen therapiertem Kollektiv und Kontrollgruppe.

Im Gegensatz dazu konnten *Theiss et al.* ungeachtet der vergleichbaren Infarktgrößen bereits 6 Tage nach LAD-Ligatur, sowohl unter duality Stammzell- als auch unter Sitagliptinmonotherapie eine signifikant effizientere Pumpfunktion, gemessen an Ejektionsfraktion und Herzzeitvolumen nachweisen [8]. Auch *Sauve et al.* demonstrierten im I/R Modell der Maus nach genetischer DPP-IV-Hemmung in der Langendorffperfusion eine bessere Erholung im Vergleich zu den Herzen von Wildtyp Mäusen. Außerdem wurde gezeigt, dass lediglich eine *in vivo* Sitagliptin-Applikation, nicht jedoch via der koronaren Zirkulation, zu einem kardioprotektiven und damit funktionellen Benefit führte. Somit ließe sich schlussfolgern, dass die kardioprotektiven Effekte der DPP-IV-Inhibition nicht streng glukoseabhängig sind, sondern eher durch multiple DPP-IV-Aktionen bedingt sind [90]. Damit ließe sich die Hypothese unserer Arbeitsgruppe stützen, dass die SDF-1α/CXCR4-vermittelten positiven funktionellen Stammzelleffekte den ausschlaggebenden Faktor im therapeutischen Einsatz der DPP-IV-Inhibitoren darstellen.

Während in einem Infarktmodell diabetischer Ratten unter Sitagliptintherapie von *Connelly et al.* zwar verbesserte passive diastolische Funktionsparameter, aber keine Verbesserung des aktiven Relaxationsparameters τ_{weis} oder der systolischen Herzfunktion 28 Tage nach MI nachgewiesen werden konnten [91], lieferten die von uns im GLP-1R^{-/-} Mausmodell generierten Daten zu einem intermediären Zeitpunkt, 28 Tage nach Myokardinfarkt positive Ergebnisse zur Kardioprotektivität der dualen Stammzelltherapie.

Dort konnte der kardiale Benefit der Therapie durch signifikante Verbesserung der Herzleistung, erhoben an linksventrikulärer Ejektionsfraktion und Herzzeitvolumen eindrücklich dargestellt werden. Damit entsprechen die positiven Effekte auf die Herzfunktion auch ohne GLP-1R vermittelte GLP-1-Wirkung nach 4 Wochen jenen der von *Theiss et al.* und *Zaruba et al.* zuvor beschriebenen Kardioprotektivität [6,8] und lieferten zum intermediären Untersuchungszeitpunkt einen konkreten Hinweis auf die Dominanz der stammzellvermittelten Effekte in der DPP-IV-Hemmung.

In einer Studie zur Herzfunktion nach Myokardinfarkt unter Vildagliptintherapie wurden Ratten nach 3 und 12 Wochen von *Yin et al.* untersucht. Alle Tiere zeigten gruppenunabhängig sowohl im 3 als auch im 12 Wochen Follow-Up Anzeichen eines Herzversagens, respektive eine linksventrikuläre Dilatation, wie auch eine systolische Minderfunktion. Obwohl sich die funktionelle Verschlechterung in der unbehandelten Gruppe anhand der Ejektionsfraktion im Zeitraum zwischen der 3. und 12. Woche nach Myokardinfarkt stärker ausgeprägt darstellte, war auf lange Sicht kein substantieller kardioprotektiver Effekt auf die kardiale Funktion nachzuweisen [92]. Die Ergebnisse aus unseren Untersuchungen im Langzeitmodell lassen nahtlos an diese Resultate anknüpfen. Denn die indirekte Evaluierung der Herzfunktion im GLP-1R^{-/-} Mausmodell, erhoben an den systemischen Auswirkungen auf Lunge und Leber, ließen auf lange Sicht keinen Rückschluß auf einen kardioprotektiven Benefit durch kombinierte Sitagliptin und G-CSF Therapie zu. Überraschenderweise waren die pulmonale Hyperämie und ein alveoläres Lungenödem als Anzeichen eines beginnenden Herzversagens unter dualer Stammzelltherapie sogar etwas deutlicher ausgeprägt als im Kollektiv der unbehandelten Tiere.

5.4. Limitationen der Arbeit

5.4.1. Anästhesie im GLP-1R^{-/-} Mausmodell

Ein erster Fallstrick in der Durchführung der Experimente bestand in der Narkoseproblematik bei den GLP-1R^{-/-} Tieren. Die beim kleinen Nager standardmäßig verwendeten Injektionsanästhesien Ketamin-Xylazin oder Midazolam-Medetomidin-Fentanyl [157] führten bei diesem Mausstamm zu einer erhöhten Inzidenz von Narkosezwischenfällen. Die bei den in unserem Labor verwendeten Wildtyp-Stämmen C57Bl\6, Balbc und CD1 gut wirksamen Anästhetikakombinationen erzielten bei den GLP-1R^{-/-} Tieren keine ausreichende Wirkung.

Im Fall der Ketamin-Xylazin-Kombination in einer Dosierung von 100 mg/kg KM Ketamin und 20 mg/kg KM für Xylazin kam es zu einem deutlich ausgeprägten Exzitationsstadium während der Anflutung dieser Anästhetikakombination. Diese Exzitationen waren partiell so stark ausgeprägt, dass die Tiere sich durch Hin- und Herspringen, tonisch-klonische Krämpfe und Anrennen gegen die Käfigwände mitunter verletzten. Nach dem Durchlaufen dieser Phase erreichten die Tiere mit dieser Standarddosierung nur in wenigen Ausnahmefällen das Stadium einer chirurgischen Toleranz. Das Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe und damit der analgetischen Wirkung wurde über den Zwischenzehenreflex überprüft. Erst mit dem Erlöschen des Reflexes wurde von einer ausreichenden Narkosetiefe ausgegangen. Diese wurde mit der für die Maus standardmäßig angegebenen Kombinationsdosierung für Ketamin-Xylazin von 100 mg/kg KM Ketamin und 20 mg/kg KM für Xylazin nur in Einzelfällen erreicht. Dadurch wurden wiederholt Nachdosierungen nötig, was in mehreren Fällen zum Tierverlust führte.

Als Mittel der Wahl unter den Injektionsanästhesien wird durch die vollständige Antagonisierbarkeit in der Kombination aus Midazolam-Medetomidin-Fentanyl gesehen [157]. Dadurch ließe sich die Gefahr einer Hypothermie der kleinen Nager durch lange Nachschlafzeiten vermeiden. Die als Standarddosierung angegebene Dosierung für Medetomidin 0,5 mg/kg KM, Midazolam 5 mg/kg KM und Fentanyl 0,05 mg/kg KM erwies sich als Anästhetikakombination zum Erreichen einer chirurgischen Toleranz im GLP-1R^{-/-} Mausmodell als völlig unzureichend.

So wurde im optimalen Fall eine gute Sedation, nie aber eine chirurgische Toleranz erreicht. Auch hier kam es durch die notwendigen Nachdosierungen zu Tierverlusten.

Um die Exzitationen in der Anflutung der Ketamin-Xylazin Anästhesie zu vermeiden, wurden die Tiere präoperativ mit 2 mg/kg KM Acepromacin i.p. sediert. Diese Prämedikation erhielten die Tiere in etwa 20 bis 30 Minuten vor Operationsbeginn um eine gute Sedation zu erreichen. Einzig unter der Prämisse, dass bei den Tieren eine gut erkennbare sedative Wirkung eintrat, erhielten sie die Xylazin-Ketamin Kombination in einer reduzierten Dosierung von 65 mg/kg KM Ketamin und 13 mg/kg KM Xylazin [158]. Die prämedizierten Tiere zeigten während der Narkoseanflutung keine Anzeichen einer Exzitation mehr und erreichten komplikationsarm eine chirurgische Toleranz ohne verlängerte Nachschlafzeiten. Infolgedessen waren auch keine anästhesiebedingten Todesfälle mehr zu verzeichnen. Der verbleibende Nachteil dieser Anästhesiemethode zeigte eine Analyse der Anästhesie-bedingten Beeinflussung der Herzfunktion von *Roth et al.*. Darin wurde nachgewiesen, dass die Verwendung einer kombinierten Ketamin-Xylazin-Anästhesie, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, einen stark kardiodepressiven Einfluss aufweist. Dieser äußerte sich in einer erniedrigten Herzfrequenz und Fractional Shortening sowie in einer Erhöhung des enddiastolischen Volumens [159]. Durch Addition des Neuroleptikums Acepromacin in unserem Versuchsdesign kann durch dessen blutdrucksenkende Wirkung davon ausgegangen werden, dass die Kardiodepressivität weiter verstärkt wird. Diese unerwünschten Wirkungen müssen kritisch in die Evaluierung der Funktionsparameter mit einfließen. Hinzu kommt, dass in der vorliegenden Arbeit durch die anfangs auftretenden Narkosezwischenfälle die Ergebnisse aus einem zahlenmäßig sehr geringen Tierkollektiv generiert wurden. Vor dem ethischen Hintergrund des Tierschutzes wird in den Tiermodellen mit möglichst kleinen Fallzahlen gearbeitet. Wenn sich diese Fallzahlen durch auftretende Komplikationen wie die in der vorliegenden Arbeit vorhandene Narkoseproblematik weiter verringern, sind die Resultate nicht uneingeschränkt mit den Ergebnissen aus klinischen Studien mit weit höheren Fallzahlen zu vergleichen.

5.4.2. Infarktmodell

In der vorliegenden Arbeit wurde als Infarktmodell die permanente Ligatur der LAD verwendet. Dieses standardmäßig eingesetzte Verfahren zeichnet sich aber durch variable Infarktgrößen aus, bedingt durch die individuelle Anatomie des Koronargefäßsystems der Maus. *Ahn et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass die Äste der murinen LAD das Myokard bereits nahe an ihrem Ursprung unter dem linken Herzohr penetrieren. Diese anatomische Konstellation bedingt eine blinde Ligatur und damit eine schwierig zu reproduzierende Induktion von Infarkten gleicher Größe und Lokalisation [160]. Demzufolge resultieren nach *Kumar et al.* durch die variable Infarktregion nur bedingt mit dem Menschen vergleichbare Infarkte [161]. *Van den Bos et al.* konnten hingegen in einem cryo-induzierten Infarkt der Maus reproduzierbare Infarktgrößen mit mäßigem kardialen Remodeling darstellen und postulieren dieses Modell als repräsentativer im Vergleich zu klinischen Studien [162]. Verantwortlich für die terminale Infarktgröße ist aber nicht nur das ischämische Geschehen per se, sondern auch der nach Revaskularisierung entstehende sogenannte Reperfusionsschaden. Folglich basiert der Pathomechanismus im Infarktgeschehen einerseits auf der Ischämie-vermittelten Noxe, die zu einem Defizit an Sauerstoff, Nährstoffen und Überlebensfaktoren zum einen und zum anderen zu einer Anhäufung von Stoffwechselendprodukten im Gewebe führt. Die dadurch ausgelösten Vorgänge bedingen die Gewebsnekrose, mit der Konsequenz eines hibernierenden Myokards und Einschränkung der Kontraktilität [163,164]. Andererseits kommt es im Fall einer Revaskularisierung zu einer additiven Gewebeschädigung. Durch die Tatsache, dass in dem verwendeten Modell der permanenten Ligatur der LAD keine Revaskularisierung des unterbundenen Gefäß stattfindet, wird der zusätzlich auftretende Reperfusionsschaden nur ungenügend abgebildet. Dieser führt zu freien Sauerstoffradikalen, Kalziumüberladung, Infiltration von Entzündungszellen und einer Entleerung der Energiespeicher, mit der Folge, dass in bis dato noch vitalen Kardiomyozyten apoptotische Vorgänge in Gang gesetzt werden. Dadurch dass bei Infarktpatienten, die Revaskularisierung über eine PCI zum Standardprotokoll gehört und die effektivste Methode zur Limitierung der Infarktgröße darstellt, sollte der damit verbundene negative Einfluss der Reperfusion auch in präklinischen Modellen mit berücksichtigt werden [165].

Denn letzten Endes setzt sich das endgültige Ausmaß der Infarktnarbe immer aus beiden Pathomechanismen, Ischämie abhängige Nekrose und durch Revaskularisierung bedingte Apoptose zusammen [163-165]. Durch den paradoxen Effekt, dass die eigentlich heilsame Revaskularisierung per se apoptotische Vorgänge auslöst, zielen aktuellen Bestrebungen auf eine Limitierung des Ischämie/Reperfusionsschadens. Zu den vielversprechenden therapeutischen Strategien zählen im Moment unter anderem ein ischämisches Post-Conditioning, therapeutische Hypothermie und Hyperoxämie ebenso wie eine pharmakologische Unterstützung über ANP, Cyclosporin A und das GLP-1 Analog Exenatid [165,166].

5.4.3. Verlaufsuntersuchungen

Ein weiterer limitierender Faktor der vorliegenden Arbeit ist in den Untersuchungsmethoden zu Herzfunktion und Infarktgrößen zu sehen. Durch die Verwendung der invasiven Herzkatheteruntersuchung über die A. carotis sind keine Verlaufsuntersuchungen an einem Tier über mehrere Zeitpunkte möglich. Die Millar Tip Katheterisierung einer Maus bedeutet invasivitäts-bedingt immer den Tod des Tieres und stellt damit lediglich eine singuläre Untersuchungsmöglichkeit dar. Die Vorteile einer Katheteruntersuchung hingegen zeichnen sich nach *Pacher et al.* durch ihre gut reproduzierbaren Ergebnisse aus. Dazu gehört die Unabhängigkeit von Vorlastbedingungen oder die dadurch bedingten Veränderungen in den Bewegungsparametern, wie sie bei Analysen in der Sonographie oder im MRI durchaus eine große Rolle spielen [167].

Auch die im Anschluss an die Katheteruntersuchung post-mortem durchgeföhrten histologischen Analysen stellen nur einen Einblick in den Status quo des jeweiligen Untersuchungszeitpunkts dar und lassen keinen Rückschluss auf die Veränderungen der kardialen Architektur des Individuums über die Zeit zu. Unter der Prämisse, dass die Infarktgröße primär von der Lokalisation der LAD-Ligatur abhängt [160-162], ist die vergleichende Bewertung der Infarktgröße oder der Herzfunktion verschiedener Individuen über die Zeit nur bedingt aussagekräftig. So sollte der Schwerpunkt gerade in Hinblick auf Verlaufsuntersuchungen auf nicht-invasive Untersuchungsmethoden gelegt werden, die serielle Follow-Up Analysen

ermöglichen. Darin kann ein wichtiger ethischer Ansatz, vor allem in Bezug auf die Möglichkeit einer maßgeblichen Reduktion der Tierzahlen innerhalb eines Versuchsvorhabens gesehen werden. Eine Option wäre die Beurteilung der Infarktgröße mittels SPECT oder PET-Analysen, innerhalb derer eine gute Korrelation zur histologischen Infarktgrößenbestimmung von verschiedenen Autoren bestätigt wurde [168-170].

Im Rahmen einer Evaluierung der Funktionsparameter beschrieben *Gao et al.* als nicht-invasive Methode die kardiale Sonographie als Möglichkeit von seriellen Follow-up Untersuchungen und sahen darin eine aussagekräftige Untersuchungsmethode von kardialer Struktur und Funktion über die Zeit [171]. Der diagnostische Goldstandard zur Evaluierung der Herzfunktion beim Menschen ist die MRI-Analyse. *Ross et al.* evaluierten diese Untersuchungsmethode an der Maus und konnten belegen, dass mit einer auf die Größenverhältnisse der murinen Anatomie adjustierten Auflösung die regionalen und temporären Veränderungen der kardialen Struktur und Funktion auch im Nager exakt wiedergegeben werden [172]. Diese Methode wurde unter anderem von *Alsaïd et al.* in einer neueren Studie verwendet, um die Korrelation von linksventrikulärem Remodeling und Lungenstauung im Zeitverlauf aufzuzeigen [173].

5.4.4. GLP-1R unabhängige Wirkungen

Die Intention der vorliegenden Arbeit zielte auf eine Abgrenzung der stammzell-spezifischen Wirkungen der DPP-IV-Inhibition von den GLP-1 vermittelten kardioprotektiven Effekten am GLP-1 Rezeptor. Lange Zeit wurde im wesentlichen GLP-1 in seiner ursprünglichen Form des GLP-1(7-36) als der biologisch wirksame Akteur angesehen und man ging davon aus, dass GLP-1(7-36) durch die DPP-IV-Spaltung zu einem unwirksamen Metaboliten in der Form des GLP-1(9-36) transferiert wird [87,101,102]. Der GLP-1 Rezeptor als Mitglied der Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren sollte den überwiegenden Anteil des GLP-1 Effekts über seinen spezifischen Liganden GLP-1(7-36) vermitteln [118,119]. Diese Hypothese wurde erstmals von *Ban et al.* in Frage gestellt, indem er einen funktionellen Benefit im I/R Modell nach GLP-1(9-36) Applikation in der Reperfusionsphase ebenso nachwies wie eine GLP-1(7-36) vermittelte zelluläre

Kardioprotektivität in GLP-1R^{-/-} Mäusen. Somit bestätigte er zum einen die postulierten kardioprotektiven Effekte von GLP-1(7-36) an dem bekannten GLP-1R, zum anderen zeigte er neuartige kardiale und vaskuläre Effekte auf. Sowohl von GLP-1(7-36) als auch seinem Metaboliten GLP-1(9-36), unabhängig vom bekannten GLP-1R [12]. In der Folgestudie wurde die Entdeckung, dass beide GLP-1 Formen, GLP-1(7-36) und GLP-1(9-36) ein kardioprotektives Potential aufweisen weiter evaluiert. Damit konnte ebenfalls von diesen Autoren gezeigt werden, dass GLP-1(9-36) in einer vom GLP-1R vollständig unabhängigen Weise für viele der initial dem GLP-1(7-36) zugeschriebenen Mechanismen verantwortlich ist [130]. Während in den letzten Jahren die Annahme einer im Herzen ubiquitären GLP-1R Expression als gesichert galt [120,121], war die Entdeckung von *Kim et al.*, dass sich das Vorkommen der GLP-1 Rezeptoren lediglich auf die Vorhöfe beschränkt und diese in ventrikulären Kardiomyozyten nicht exprimiert werden, nicht zu erwarten [174]. Diese Feststellung führt berechtigterweise zur Frage, wie es zur Übermittlung eines funktionellen kardialen Benefits GLP-1 gestützter Therapien kommt, ohne dass die Signaltransduktion am GLP-1R in den ventrikulären Herzmuskelzellen zur Verfügung steht. Zudem zielt die Mehrzahl der Studien zu den Themen Myokardinfarkt und Herzversagen direkt auf die Unterstützung der Ventrikelfunktion und somit kann die von *Kim et al.* nachgewiesene atriale GLP-1R Aktivität mit konsekutiver ANP Sekretion nicht ursächlich für eine effizientere Pumpfunktion angesehen werden [103,174]. *Ussher et al.* zeigten aufgrund der vorangegangenen Daten in ihrer bis dato jüngsten Studie, dass dem kardiomyozytären GLP-1R keine Bedeutung im Rahmen der endogenen physiologischen Reaktion im ischämischen Geschehen eines Myokardinfarkts zukommt. Dies vor allem vor dem Hintergrund, dass mit dem Rezeptoragonisten Liraglutid in Mäusen mit induzierbarem kardiomyozytären GLP-1R knock out (GLP-1R^{CM-/-}) kardioprotektive Effekte im Infarktmodell erzielt wurden [103]. Damit weisen diese Autoren auf die Unerlässlichkeit einer Reevaluierung GLP-1 vermittelnder Effekte hin und stellen unter anderem die Hypothese zur Diskussion die besagt, dass die rezeptorabhängigen kardioprotektiven Wirkungen *in vivo* über indirekte Mechanismen vermittelt werden. Einen Hinweis in diese Richtung erhielten *Ussher et al.* durch die mit Albiglutid erzielten metabolischen Veränderungen in der Herzmuskulatur im I/R Modell der Ratte. In den Herzen konnte in einer erhöhten Kohlenwasserstoffoxidation in Verbindung mit einer erniedrigten Fettsäurenoxidation ein metabolisches Profil gezeigt werden, in

welchem die Voraussetzung für eine bessere Effizienz der Kontraktilität zu sehen sein könnte [103]. Diese neuartigen Strömungen bedingen nach Meinung der Autoren die Notwendigkeit einer Umorientierung künftiger Studien. Auf dieser Grundlage sollte mit hoher Priorität die Frage geklärt werden, welche indirekten Mechanismen der nicht-kardiomyozytären GLP-1R Aktivierung zu stabiler Kardioprotektivität mit verbesserter linksventrikulärer Funktion führen [103].

5.5. Ausblick: Zellbasierte Verfahren vs. GLP-1 im Kontext regenerativer Medizin

Vor dem Hintergrund, dass Zellen aus dem Knochenmark durch einen ischämischen Stimulus, wie er im Rahmen eines Myokardinfarkts auftritt [46,47], vermehrt in die Zirkulation ausgeschüttet werden und anschließend in das geschädigte Gebiet migrieren, entstand die Idee der Verstärkung und therapeutischen Nutzung dieses Effekts im Rahmen der dualen Stammzelltherapie. Dabei entsprechen die freigesetzten Zellen jedoch keiner homogenen Population, sondern bestehen aus einem Potpourri von Zellen mit mannigfaltigem regenerativem Potential. Darunter zu finden sind hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen, endotheliale Vorläuferzellen und Zellen aus der sogenannten Side Population [22,27-29]. Da diese Zellen nicht über die Fähigkeit verfügen in Kardiomyozyten zu transdifferenzieren, wurde die Hypothese der Kardioprotektivität parakriner Mechanismen etabliert. Zum Aktionsradius jener parakrinen Wirkungen werden antiapoptotische Effekte auf die verbleibenden vitalen Kardiomyozyten des Infarktareals, die Anregung der Neoangiogenese und die Stimulation residenter kardialer Stammzellen gerechnet [40]. Ein erstrebenswerter Vorteil in der therapeutischen Nutzung dieser endogenen Zellen liegt in der geringen Invasivität und damit sicheren Anwendbarkeit am Patienten. Gerade nach den vielversprechenden kardioprotektiven Ergebnissen der dualen Stammzelltherapie aus den präklinischen Studien [6-8], wurde rasch der Transfer von der Grundlagenforschung in die klinische Anwendung vollzogen. Innerhalb der SITAGRAMI Studie, welche jene Translation der dualen Stammzelltherapie, bestehend aus der Kombination von Sitagliptin und G-CSF, in die klinische Anwendung leistete, war nach 6 Monaten jedoch kein kardioprotektiver Effekt auf

die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bei Infarktpatienten nachweisbar [175]. Demnach gelang es nicht, die imposanten kardioprotektiven Effekte aus den Mausmodellen erfolgreich in die klinische Anwendung zu übertragen. Infolgedessen stellt sich die Frage, welche Faktoren zu berücksichtigen sind, um den eindrucksvollen positiven Effekt der dualen Stammzelltherapie langfristig zu erhalten. Einen wichtigen Ansatzpunkt könnte die Arbeit von *Dimmler et al.* mit der Hypothese liefern, dass ein fortgeschrittenes Alter der Patienten und bestehende Vorerkrankungen den limitierenden Faktor für eine effiziente Zelltherapie darstellen [176]. Dabei vertreten die Autoren den Standpunkt, dass sowohl das Alter als auch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes, Hypercholesterinämie, Bluthochdruck und Rauchen die funktionelle Aktivität der endogenen Stamm- und Vorläuferzellen negativ beeinflussen [176-179]. Die zugrundeliegenden Mechanismen über welche der therapeutische Langzeiteffekt geshmälert wird, gilt es detailliert zu evaluieren. Diskutiert wird unter anderem eine Interferenz der kardiovaskulären Risikofaktoren und des Alters sowohl mit der Homingkapazität der Stammzellen als auch mit der parakrinen Funktion. Zudem beeinflussen Alter und die genannten Vorerkrankungen nicht nur die funktionelle Aktivität der Vorläuferzellen, sondern auch die Rahmenbedingungen im Zielgewebe [176]. Mit der Aufschlüsselung der limitierenden Faktoren könnte man mit einer Therapieoptimierung gegensteuern und den kardialen Benefit der dualen Stammzelltherapie langfristig erhalten.

Eine weitere Möglichkeit im Rahmen zellgestützter Therapien bietet sich im Einsatz exogener Stammzellen, die durch verschiedenartige Applikationswege und einer Vielzahl an Zellpopulationen ein großes Repertoire an erfolgsversprechenden Möglichkeiten bieten. Auch hier bediente man sich bei der leicht zugänglichen, wenn auch inhomogenen Population der Stammzellen aus dem Knochenmark. So wurde erstmals von *Stamm et al.* im Rahmen einer Koronararterien-Bypass-Operation eine autologe Stammzelltransplantation in den ischämischen Herzmuskel durchgeführt [30]. Ein weiterer Applikationsweg besteht in der kathetergestützten Injektion. Diese wurde unter anderem im Rahmen der TOPCARE-Studie durchgeführt, in der ebenfalls eine knochenmarkstammige Stammzellsuspension in das Myokard eingebracht wurde [31]. Eine Alternative zur direkten Injektion in den Herzmuskel stellt die koronare Infusion von Stammzellsuspensionen im Rahmen der PCI dar, wie sie unter anderem in der

BOOST oder REPAIR-AMI Studie untersucht wurde [32,33]. Auch in diesen Transplantationsstudien könnte der aufgezeigte kardiale Benefit durch eine Optimierung des regenerativen Potentials der eingesetzten Zellen über eine Limitierung von ungünstigen Rahmenbedingungen weiter gesteigert werden [176,180,181].

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der kardiovaskulären Erfolge ist in der Verwendung von Zellen mit höherem regenerativem Potential, im Speziellen mit einer ausgeprägten kardiomyogenen Differenzierungskapazität zu sehen. Eine Option bietet sich dabei zwar in der Generierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen [182], vor allem unter dem Aspekt, dass immer effizientere Differenzierungsverfahren entwickelt werden, um eine hohe Ausbeute an Herzmuskelzellen zu gewinnen und die Überlebensrate dieser Zellen nach Transplantation zu verbessern [183]. Dennoch schränken ethische Bedenken und gesetzliche Rahmenbedingungen die Anwendung dieser Zellen erheblich ein. Eine ebenbürtige Möglichkeit zur Generierung von Kardiomyozyten wurde in den induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) gefunden [184,185]. Diese Zellen besitzen eine den embryonalen Stammzellen äquivalente Pluripotenz und durch das Reprogramming autologer Fibroblasten entfällt die Notwendigkeit einer Immunsuppression, wie sie unter Verwendung heterologer embryonaler Stammzellen eingesetzt werden müsste. Dadurch bietet sich mit der Methode des Reprogramming eine vielversprechende Option für den Einsatz einer zellbasierten Therapie nach Myokardinfarkt. So zeigten *Nelson et al.* als erste das regenerative Potential induzierter pluripotenter Stammzellen im infarzierten Myokard der Maus [186]. Dieser iPS vermittelte kardiale Benefit wurde in nachfolgenden Studien sowohl im Nager [187], als auch im Großtiermodell [188] bestätigt. Bevor jedoch die Translation in die klinische Anwendung vollzogen wird, gilt es die Methode der Kardiomyozytengenerierung durch iPSs soweit zu optimieren, dass eine höhere Zellausbeute erzielt werden kann und das bestehende Teratomrisiko vermieden wird. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde von *Hong et al.* unternommen, die in ihrer Studie an Nichtprimaten in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen zeigen konnten, dass zwar undifferenzierte autologe iPSs zur Teratombildung neigen, nicht aber die aus iPSs generierten Vorläuferzellen [189]. Trotz der enormen Fortschritte auf dem Gebiet der regenerativen zellbasierten Verfahren im Umfeld der ischämischen Kardiomyopathie besteht immer noch

großer Forschungsbedarf. So bedarf es eines tieferen Verständnisses für die zellulären und molekularen Mechanismen, die im Prozess der stammzellbasierten kardialen Regeneration, vor allem in Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren und dem Alter der Patienten eine Rolle spielen. Nach Aufklärung dieser Fragestellungen müsste für die kardiovaskuläre Regeneration aus den verschiedenen Modellen der zellgestützten Therapien ein effizientes Verfahren zu identifizieren sein, das in Zukunft die hohen Erwartungen der regenerativen Forschung erfüllen kann.

Auch in der Nutzung der GLP-1 vermittelten Kardioprotektivität wird versucht die Folgen eines Myokardinfarkts zu minimieren. Dabei bediente man sich in erster Linie bei drei therapeutischen Möglichkeiten: der Einsatz von nativem GLP-1, die Verwendung von GLP-1 Rezeptoragonisten und die Applikation von DPP-IV-Inhibitoren. Für jede dieser Therapieoptionen wurden positive Auswirkungen auf den ischämischen Herzmuskel nachgewiesen. Wie jedoch dieser kardiale Benefit im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen vermittelt wird, ist eine von vielen noch zu klärenden Fragestellungen. Denn während man lange Zeit davon ausging, dass die positiven Effekte wie die Reduzierung der Infarktgröße und leistungsfähigere Pumpfunktion nach Infarkt direkt über den GLP-1 Rezeptor vermittelt wird, stellt sich nach den neuesten Studien, vor allem nach der Entdeckung, dass der GLP-1R lediglich in atrialen, nicht aber ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert wird [103,174] die Frage, wie die Kardioprotektivität, respektive eine verbesserte ventrikuläre Pumpfunktion über indirekte, vom GLP-1R unabhängige Mechanismen vermittelt werden kann. Auch dem lange als unwirksam geltenden Metaboliten GLP-1(9-36) wird nun ein hohes Maß an therapeutischem Potential zugesprochen [12,130]. Ein Sachverhalt, der die Frage aufwirft, ob der Einsatz von DPP-IV-Inhibitoren mehr schadet als nutzt. Denn wie ist die DPP-IV-Inhibition vor dem Hintergrund dieser neuen Betrachtungsweisen einzuschätzen? Zwar wird mit dem Einsatz von Sitagliptin der physiologische Level von GLP-1(7-36) stabilisiert, dabei aber die Bildung von GLP-1(9-36) verhindert, welches die eigentlichen kardioprotективen Wirkungen vermitteln könnte. Denn obwohl dieser Mechanismus hoch effektiv und arm an unerwünschten Wirkungen in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 für die GLP-1 vermittelte Blutzuckerregulation verwendet werden kann, könnte die DPP-IV-Inhibition im kardioprotективen Geschehen nach Myokardinfarkt unter der Hypothese, dass

GLP-1(9-36) über ein höheres regeneratives Potential als GLP-1(7-36) verfügt, sogar als kontraproduktiv angesehen werden. Dieser Hypothese widerspricht zwar die durch DPP-IV-Inhibition vermittelte Kardioprotektivität, die sowohl in der Mehrzahl der präklinischen Studien [90,156,190] als auch in klinischen Kurzzeitstudien, darunter auch an diabetischen Patienten [191,192] nachgewiesen wurde. Anders hingegen verhalten sich die Ergebnisse aus den Langzeitstudien. Ähnlich dem Ausgang der SITAGRAMI Studie [175], die Sitagliptin als DPP-IV-Inhibitor verwendete, zeigen sich auch die Resultate aus der SAVOR-TIMI 53 und EXAMINE-Studie, in deren Studiendesign in einem diabetischen Patientenkollektiv die DPP-IV-Inhibitoren Saxagliptin bzw. Alogliptin verwendet wurden, ebenfalls ohne signifikanten kardialen Benefit [193,194]. Grundsätzlich gilt es für die Zukunft, die unterschiedlichen Therapieansätze im Umfeld des GLP-1 voneinander abzugrenzen und ihre jeweiligen Wirkungen isoliert zu evaluieren. Denn erst wenn auch in den GLP-1-basierten Ansätzen der zugrundeliegende Ablauf der induzierten Kardioprotektivität abschließend geklärt ist, kann eine Therapieoptimierung erfolgen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Zu den häufigsten Todesursachen zählen nach wie vor die Erkrankungen aus dem Komplex der chronisch ischämischen Herzerkrankung und in ihrem Gefolge die Krankheitsbilder Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz. Die etablierten Verfahren in der Behandlung eines akuten Myokardinfarkts zielen auf eine rasche Revaskularisierung der obstruierten Gefäße. Als Therapiemethode der ersten Wahl hat sich die kathetergestützte Intervention mit Stentimplantation zur Reperfusion des ischämischen Herzareals etabliert. Dabei wird zwar das Ausmaß der muskulären Verletzung limitiert, ohne aber Einfluss auf die im Anschluss stattfindenden Reparations- und Regenerationsvorgänge im Myokard zu nehmen. Hier bietet sich der Anknüpfungspunkt für die Therapiemodelle der regenerativen Medizin zur langfristigen Wiederherstellung der myokardialen Pumpfunktion.

Ein vielversprechender Ansatz wurde mit dem Modell der dualen Stammzelltherapie entwickelt. Dieses Konzept basiert auf der pharmakologischen Unterstützung sowohl der endogenen Stammzellmobilisierung durch das Zytokin G-CSF, als auch auf der Verstärkung des kardialen Homingprozesses der Vorläuferzellen durch den DPP-IV-Inhibitor Sitagliptin. Da aber die weiteren DPP-IV-Substrate von der Sitagliptintherapie nicht unbeeinflusst bleiben, wird zusätzlich das Inkretin GLP-1, mit seiner ihm zugesprochenen Kardioprotektivität, vor einem enzymatischen DPP-IV-Abbau geschützt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, anhand des $\text{GLP-1R}^{-/-}$ Mausstamms zu verifizieren, ob die kardioprotektiven Effekte der dualen Stammzelltherapie letztlich auf die Stabilisierung der SDF-1 α /CXCR4-Achse zurückzuführen sind, oder vielmehr als positiver Effekt einer GLP-1 Wirkung zu werten sind.

Durch durchflusszytometrische Analysen konnten wir nachweisen, dass unter dem Einsatz der dualen Stammzelltherapie eine effiziente Mobilisierung und ein effektives kardiales Homing der Progenitorzellen unabhängig vom GLP-1-Rezeptor induzierbar ist. Dabei wurden bereits unter Sitagliptin-Monotherapie erhöhte Zellzahlen knochenmarkstämmiger CD34 $^{+}$ CD45 $^{+}$ Zellen sowohl im Blut als auch im Herzmuskel der $\text{GLP-1R}^{-/-}$ Tiere nachgewiesen. Mit der Addition von G-CSF zur Therapie wurden beide Vorgänge weiter verstärkt und gezeigt, dass

auch im GLP-1R^{-/-} Mausmodell das Zusammenwirken der beiden Mechanismen einen wesentlichen Beitrag zur Generierung des regenerativen Potentials liefert.

Nach 28 Tagen konnte der positive Stammzelleffekt unabhängig vom GLP-1R auf die funktionelle Regeneration des ischämischen Myokards eindrucksvoll anhand einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion dargestellt werden. Dieser imposante funktionelle Benefit der dualen Stammzelltherapie war in der frühen Datenerhebung nach 6 Tagen noch nicht und bis zum späten Follow-up nach 6 Monaten nicht mehr nachweisbar. Diese vom Untersuchungszeitpunkt abhängigen funktionellen Unterschiede des Therapieeffekts legen den Schluss nahe, dass für die frühe Erholung nach Infarkt die rezeptorvermittelte GLP-1-Wirkung den ausschlaggebenden kardioprotektiven Effekt auf die Kontraktilität induziert und auch einen großen Anteil zum langfristigen Regenerationsprozess beiträgt.

Vom Untersuchungszeitpunkt weitgehend unabhängig verhielten sich die Ergebnisse der morphometrischen Analysen. Die duale Stammzelltherapie erzielte keinen signifikanten Effekt auf die kardiale Architektur im GLP-1R^{-/-} Mausmodell. Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, dass die rezeptorvermittelte GLP-1 Wirkung einen essentiellen Beitrag entweder als singulärer Faktor oder in Addition zum Effekt der dualen Stammzelltherapie für die Limitation des kardialen Remodeling liefert.

Somit bleibt zu klären, durch welche flankierenden Maßnahmen der positive Effekt der dualen Stammzelltherapie langfristig erhalten werden kann, um eine dauerhafte Regeneration des ischämischen Herzmuskels zu gewährleisten und damit eine Herzinsuffizienz zu verhindern. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sind weiterführende Studien nötig, die ein tieferes Verständnis für die zellulären und molekularen Mechanismen im Umfeld der zellbasierten Therapien nach Myokardinfarkt entwickeln, um zu evaluieren, ob die pharmakologische Zellnutzung den entsprechenden Anforderungen gerecht werden kann, oder ob in Zukunft der Forschungsschwerpunkt auf den Transplantationsmodellen von Zellen mit einem höheren regenerativen Potential liegen sollte.

VII. SUMMARY

The complex of ischemic cardiomyopathy, including myocardial infarction and heart failure is the major cause of mortality to this day. The treatment of choice in the myocardial infarction is the percutaneous intervention for revascularization of the obliterated coronary arteries and stent implantation is accomplished to ensure a sufficient myocardial perfusion. The target of rapid revascularization is the limitation of ischemic injury, but there is no influence on the mechanisms of regeneration of the injured heart, where could be the link for regenerative therapies. The promising concept of dual stem cell therapy could be a new tool to achieve myocardial regeneration. This approach is based on the cytokine induced stem cell mobilization and the enhancement of cardiac homing of the bone marrow derived progenitor cells by the use of the DPP-IV-inhibitor Sitagliptin. Since the homing factor SDF-1 α is not the only substrate which is cleaved by the DPP-IV, all the other substrates with cardioprotective potential, first of all the incretin GLP-1, are influenced by DPP-IV inhibition. The aim of our project was, with the aid of a GLP-1R $^{-/-}$ mouse model, to differentiate the cardioprotective effects of the dual stem cell therapy via the SDF-1 α /CXCR4-axis from the cardial benefit induced by the stabilization of the incretin GLP-1. In this work we showed, that the administration of the dual stem cell therapy led to an increased mobilization of bone marrow derived progenitor cells and to an enhanced recruitment of CD34 $^{+}$ CD45 $^{+}$ cells to the ischemic heart, independent of the known GLP-1 receptor. By the singular administration of Sitagliptin we could already demonstrate a higher percentage of bone marrow derived progenitors both in the peripheral blood and in the myocardium of the GLP-1R $^{-/-}$ mice. These processes could be intensified mutually by the addition of the cytokine G-CSF. As a consequence we proved the crucial contribution of the dual stem cell therapy in this regenerative approach. The entire cardioprotective potential of the dual stem cell therapy became apparent 28 days post myocardial infarction, without signal transduction at the GLP-1 receptor in the GLP-1R $^{-/-}$ mouse model. The most impressive effect is the significantly improved leftventricular ejection fraction and the significantly improved cardiac output. This striking effect on the functional improvement of the ischemic heart at day 28 could not yet be seen at day 6 and faded within the long-term investigation at day 180. These functional differences relative to the date of investigation suggest,

that the pivotal impact on early and late recovery could be GLP-1 induced. The morphometric results are shown to be independent of the time of analysis and there is no significant effect of the dual stem cell therapy on cardiac architecture in GLP-1R^{-/-} mice at any time. As a consequence we hypothesize, that GLP-1 plays a great part in contributing to the limitation of the infarct size and the process of cardiac remodelling, either in a singular manner or in addition to the regenerative potential of the bone marrow-derived stem cells. Hence, we have to face the question, how to extend the functional cardiac benefit of dual stem cell therapy by supporting measures to acquire cardioprotection in the long term with the aim of regeneration of the injured myocardium and therefore prevention of cardiac failure. For answering these questions further studies are required to elucidate the cellular and molecular mechanisms in the context of cell-based therapies after myocardial infarction. Furthermore, we need to reevaluate the regenerative potential in the pharmacological utilization of endogenous progenitors in fulfilling the targeted expectations and possibly even see the future in cell-based therapies in the transplantation of cells with a higher potential of regeneration and transdifferentiation.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. DESTATIS, Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. Vol. 4 (2012).
2. Keil, U., Liese, A.D., Hense, H.W., Filipiak, B., Doring, A., Stieber, J. & Lowel, H. Classical risk factors and their impact on incident non-fatal and fatal myocardial infarction and all-cause mortality in southern Germany. Results from the MONICA Augsburg cohort study 1984-1992. Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases. *European heart journal* **19**, 1197-1207 (1998).
3. Booth, G.L., Kapral, M.K., Fung, K. & Tu, J.V. Recent trends in cardiovascular complications among men and women with and without diabetes. *Diabetes care* **29**, 32-37 (2006).
4. Fox, C.S., Coady, S., Sorlie, P.D., Levy, D., Meigs, J.B., D'Agostino, R.B., Sr., Wilson, P.W. & Savage, P.J. Trends in cardiovascular complications of diabetes. *Jama* **292**, 2495-2499 (2004).
5. Scheen, A.J., Radermecker, R.P., Philips, J.C., Rorive, M., De Flines, J. & Paquot, N. [European guidelines for the management of diabetes, prediabetes and cardiovascular disease. First part. Management of diabetes and cardiovascular risk factors]. *Revue medicale de Liege* **68**, 585-592 (2013).
6. Zaruba, M.M., Theiss, H.D., Vallaster, M., Mehl, U., Brunner, S., David, R., Fischer, R., Krieg, L., Hirsch, E., Huber, B., Nathan, P., Israel, L., Imhof, A., Herbach, N., Assmann, G., Wanke, R., Mueller-Hoecker, J., Steinbeck, G. & Franz, W.M. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell stem cell* **4**, 313-323 (2009).
7. Theiss, H.D., Vallaster, M., Rischpler, C., Krieg, L., Zaruba, M.M., Brunner, S., Vanchev, Y., Fischer, R., Grobner, M., Huber, B., Wollenweber, T., Assmann, G., Mueller-Hoecker, J., Hacker, M. & Franz, W.M. Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis. *Stem cell research* **7**, 244-255 (2011).
8. Theiss, H.D., Gross, L., Vallaster, M., David, R., Brunner, S., Brenner, C., Nathan, P., Assmann, G., Mueller-Hoecker, J., Vogeser, M., Steinbeck, G. & Franz, W.M. Antidiabetic gliptins in combination with G-CSF enhances myocardial function and survival after acute myocardial infarction. *International journal of cardiology* **168**, 3359-3369 (2013).

9. Dokken, B.B., La Bonte, L.R., Davis-Gorman, G., Teachey, M.K., Seaver, N. & McDonagh, P.F. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), immediately prior to reperfusion, decreases neutrophil activation and reduces myocardial infarct size in rodents. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* **43**, 300-305 (2011).
10. Nikolaidis, L.A., Mankad, S., Sokos, G.G., Miske, G., Shah, A., Elahi, D. & Shannon, R.P. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation* **109**, 962-965 (2004).
11. Zhao, T., Parikh, P., Bhashyam, S., Bolukoglu, H., Poornima, I., Shen, Y.T. & Shannon, R.P. Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **317**, 1106-1113 (2006).
12. Ban, K., Noyan-Ashraf, M.H., Hoefer, J., Bolz, S.S., Drucker, D.J. & Husain, M. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation* **117**, 2340-2350 (2008).
13. Noyan-Ashraf, M.H., Momen, M.A., Ban, K., Sadi, A.M., Zhou, Y.Q., Riazi, A.M., Baggio, L.L., Henkelman, R.M., Husain, M. & Drucker, D.J. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes* **58**, 975-983 (2009).
14. Bose, A.K., Mocanu, M.M., Carr, R.D., Brand, C.L. & Yellon, D.M. Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* **54**, 146-151 (2005).
15. Bose, A.K., Mocanu, M.M., Carr, R.D. & Yellon, D.M. Glucagon like peptide-1 is protective against myocardial ischemia/reperfusion injury when given either as a preconditioning mimetic or at reperfusion in an isolated rat heart model. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* **19**, 9-11 (2005).
16. Boonacker, E. & Van Noorden, C.J. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *European journal of cell biology* **82**, 53-73 (2003).
17. Brandt, I., Lambeir, A.M., Maes, M.B., Scharpe, S. & De Meester, I. Peptide substrates of dipeptidyl peptidases. *Advances in experimental medicine and biology* **575**, 3-18 (2006).

18. Matheussen, V., Jungraithmayr, W. & De Meester, I. Dipeptidyl peptidase 4 as a therapeutic target in ischemia/reperfusion injury. *Pharmacology & therapeutics* **136**, 267-282 (2012).
19. Hansson, E.M. & Lendahl, U. Regenerative medicine for the treatment of heart disease. *Journal of internal medicine* **273**, 235-245 (2013).
20. Abdelwahid, E., Siminiak, T., Guarita-Souza, L.C., Teixeira de Carvalho, K.A., Gallo, P., Shim, W. & Condorelli, G. Stem cell therapy in heart diseases: a review of selected new perspectives, practical considerations and clinical applications. *Current cardiology reviews* **7**, 201-212 (2011).
21. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. Stammzellgesetz. (2002).
22. Dimmeler, S., Zeiher, A.M. & Schneider, M.D. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *The Journal of clinical investigation* **115**, 572-583 (2005).
23. Taylor, D.A., Atkins, B.Z., Hungspreugs, P., Jones, T.R., Reedy, M.C., Hutcheson, K.A., Glower, D.D. & Kraus, W.E. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nature medicine* **4**, 929-933 (1998).
24. Ghostine, S., Carrion, C., Souza, L.C., Richard, P., Bruneval, P., Vilquin, J.T., Pouzet, B., Schwartz, K., Menasche, P. & Hagege, A.A. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* **106**, I131-136 (2002).
25. Al Attar, N., Carrion, C., Ghostine, S., Garcin, I., Vilquin, J.T., Hagege, A.A. & Menasche, P. Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovascular research* **58**, 142-148 (2003).
26. Menasche, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquet, L., Vilquin, J.T., Marolleau, J.P., Seymour, B., Larghero, J., Lake, S., Chatellier, G., Solomon, S., Desnos, M. & Hagege, A.A. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* **117**, 1189-1200 (2008).

27. 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. *The Journal of clinical investigation* **107**, 1395-1402 (2001).
28. 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* **410**, 701-705 (2001).
29. Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M. & Isner, J.M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research* **85**, 221-228 (1999).
30. Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H.D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C.A., Freund, M. & Steinhoff, G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361**, 45-46 (2003).
31. Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S. & Zeiher, A.M. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* **106**, 3009-3017 (2002).
32. Wollert, K.C., Meyer, G.P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A. & Drexler, H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* **364**, 141-148 (2004).
33. Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D.G., Hamm, C.W., Suselbeck, T., Werner, N., Haase, J., Neuzner, J., Germing, A., Mark, B., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S., Zeiher, A.M. & Investigators, R.-A. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *European heart journal* **27**, 2775-2783 (2006).
34. Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. & Hedrick, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell* **13**, 4279-4295 (2002).

35. Planat-Benard, V., Menard, C., Andre, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J.M., Penicaud, L. & Casteilla, L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circulation research* **94**, 223-229 (2004).
36. Naaijkens, B.A., van Dijk, A., Kamp, O., Krijnen, P.A., Niessen, H.W. & Juffermans, L.J. Therapeutic application of adipose derived stem cells in acute myocardial infarction: lessons from animal models. *Stem cell reviews* **10**, 389-398 (2014).
37. Houtgraaf, J.H., den Dekker, W.K., van Dalen, B.M., Springeling, T., de Jong, R., van Geuns, R.J., Geleijnse, M.L., Fernandez-Aviles, F., Zijlsta, F., Serruys, P.W. & Duckers, H.J. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **59**, 539-540 (2012).
38. To, L.B., Haylock, D.N., Simmons, P.J. & Juttner, C.A. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* **89**, 2233-2258 (1997).
39. Leri, A., Kajstura, J. & Anversa, P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiological reviews* **85**, 1373-1416 (2005).
40. Pfister, O., Della Verde, G., Liao, R. & Kuster, G.M. Regenerative therapy for cardiovascular disease. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* **163**, 307-320 (2014).
41. Brunner, S., Engelmann, M.G. & Franz, W.M. Stem cell mobilisation for myocardial repair. *Expert opinion on biological therapy* **8**, 1675-1690 (2008).
42. Papayannopoulou, T. Mechanisms of stem-/progenitor-cell mobilization: the anti-VLA-4 paradigm. *Seminars in hematatology* **37**, 11-18 (2000).
43. Bensinger, W., DiPersio, J.F. & McCarty, J.M. Improving stem cell mobilization strategies: future directions. *Bone marrow transplantation* **43**, 181-195 (2009).
44. Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jurgens, K., Miche, E., Bohm, M. & Nickenig, G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* **109**, 220-226 (2004).

45. Rehman, J., Li, J., Parvathaneni, L., Karlsson, G., Panchal, V.R., Temm, C.J., Mahenthiran, J. & March, K.L. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte/macrophage-derived angiogenic cells. *Journal of the American College of Cardiology* **43**, 2314-2318 (2004).
46. Askari, A.T., Unzek, S., Popovic, Z.B., Goldman, C.K., Forudi, F., Kiedrowski, M., Rovner, A., Ellis, S.G., Thomas, J.D., DiCorleto, P.E., Topol, E.J. & Penn, M.S. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* **362**, 697-703 (2003).
47. Ceradini, D.J., Kulkarni, A.R., Callaghan, M.J., Tepper, O.M., Bastidas, N., Kleinman, M.E., Capla, J.M., Galiano, R.D., Levine, J.P. & Gurtner, G.C. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine* **10**, 858-864 (2004).
48. Chen, Y., Jin, X., Zeng, Z., Liu, W., Wang, B. & Wang, H. Estrogen-replacement therapy promotes angiogenesis after acute myocardial infarction by enhancing SDF-1 and estrogen receptor expression. *Microvascular research* **77**, 71-77 (2009).
49. Brunner, S., Zaruba, M.M., Huber, B., David, R., Vallaster, M., Assmann, G., Mueller-Hoecker, J. & Franz, W.M. Parathyroid hormone effectively induces mobilization of progenitor cells without depletion of bone marrow. *Experimental hematology* **36**, 1157-1166 (2008).
50. Zaruba, M.M., Huber, B.C., Brunner, S., Deindl, E., David, R., Fischer, R., Assmann, G., Herbach, N., Grundmann, S., Wanke, R., Mueller-Hoecker, J. & Franz, W.M. Parathyroid hormone treatment after myocardial infarction promotes cardiac repair by enhanced neovascularization and cell survival. *Cardiovascular research* **77**, 722-731 (2008).
51. Brunner, S., Weinberger, T., Huber, B.C., Segeth, A., Zaruba, M.M., Theiss, H.D., Assmann, G., Herbach, N., Wanke, R., Mueller-Hoecker, J. & Franz, W.M. The cardioprotective effects of parathyroid hormone are independent of endogenous granulocyte-colony stimulating factor release. *Cardiovascular research* **93**, 330-339 (2012).
52. Olivieri, A., Offidani, M., Cantori, I., Ciniero, L., Ombrosi, L., Masia, M.C., Brunori, M., Montroni, M. & Leoni, P. Addition of erythropoietin to granulocyte colony-stimulating factor after priming chemotherapy enhances hemopoietic progenitor mobilization. *Bone marrow transplantation* **16**, 765-770 (1995).

53. Brunner, S., Huber, B.C., Weinberger, T., Vallaster, M., Wollenweber, T., Gerbitz, A., Hacker, M. & Franz, W.M. Migration of bone marrow-derived cells and improved perfusion after treatment with erythropoietin in a murine model of myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine* **16**, 152-159 (2012).
54. Glaspy, J.A., Shpall, E.J., LeMaistre, C.F., Briddell, R.A., Menchaca, D.M., Turner, S.A., Lill, M., Chap, L., Jones, R., Wiers, M.D., Sheridan, W.P. & McNiece, I.K. Peripheral blood progenitor cell mobilization using stem cell factor in combination with filgrastim in breast cancer patients. *Blood* **90**, 2939-2951 (1997).
55. Fricker, S.P. Physiology and pharmacology of plerixafor. *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* **40**, 237-245 (2013).
56. Levesque, J.P., Takamatsu, Y., Nilsson, S.K., Haylock, D.N. & Simmons, P.J. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **98**, 1289-1297 (2001).
57. Levesque, J.P., Hendy, J., Takamatsu, Y., Williams, B., Winkler, I.G. & Simmons, P.J. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Experimental hematology* **30**, 440-449 (2002).
58. Levesque, J.P., Hendy, J., Winkler, I.G., Takamatsu, Y. & Simmons, P.J. Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology* **31**, 109-117 (2003).
59. Craddock, C.F., Nakamoto, B., Andrews, R.G., Priestley, G.V. & Papayannopoulou, T. Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. *Blood* **90**, 4779-4788 (1997).
60. Ulyanova, T., Scott, L.M., Priestley, G.V., Jiang, Y., Nakamoto, B., Koni, P.A. & Papayannopoulou, T. VCAM-1 expression in adult hematopoietic and nonhematopoietic cells is controlled by tissue-inductive signals and reflects their developmental origin. *Blood* **106**, 86-94 (2005).
61. Chigaev, A., Winter, S.S. & Sklar, L.A. Is prolonged stem cell mobilization detrimental for hematopoiesis? *Medical hypotheses* **77**, 1111-1113 (2011).

62. Ghadge, S.K., Muhlstedt, S., Ozcelik, C. & Bader, M. SDF-1alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacology & therapeutics* **129**, 97-108 (2011).
63. Dar, A., Kollet, O. & Lapidot, T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. *Experimental hematology* **34**, 967-975 (2006).
64. Vagima, Y., Lapid, K., Kollet, O., Goichberg, P., Alon, R. & Lapidot, T. Pathways implicated in stem cell migration: the SDF-1/CXCR4 axis. *Methods in molecular biology* **750**, 277-289 (2011).
65. Hattori, K., Heissig, B., Tashiro, K., Honjo, T., Tateno, M., Shieh, J.H., Hackett, N.R., Quitoriano, M.S., Crystal, R.G., Rafii, S. & Moore, M.A. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* **97**, 3354-3360 (2001).
66. Alvarez, P., Carrillo, E., Velez, C., Hita-Contreras, F., Martinez-Amat, A., Rodriguez-Serrano, F., Boulaiz, H., Ortiz, R., Melguizo, C., Prados, J. & Aranega, A. Regulatory systems in bone marrow for hematopoietic stem/progenitor cells mobilization and homing. *BioMed research international* **2013**, 312656 (2013).
67. Gong, Y. & Hoover-Plow, J. The plasminogen system in regulating stem cell mobilization. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2012**, 437920 (2012).
68. Walter, D.H., Rochwalsky, U., Reinhold, J., Seeger, F., Aicher, A., Urbich, C., Spyridopoulos, I., Chun, J., Brinkmann, V., Keul, P., Levkau, B., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. & Haendeler, J. Sphingosine-1-phosphate stimulates the functional capacity of progenitor cells by activation of the CXCR4-dependent signaling pathway via the S1P3 receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 275-282 (2007).
69. Kim, C.H., Wu, W., Wysoczynski, M., Abdel-Latif, A., Sunkara, M., Morris, A., Kucia, M., Ratajczak, J. & Ratajczak, M.Z. Conditioning for hematopoietic transplantation activates the complement cascade and induces a proteolytic environment in bone marrow: a novel role for bioactive lipids and soluble C5b-C9 as homing factors. *Leukemia* **26**, 106-116 (2012).

70. Karapetyan, A.V., Klyachkin, Y.M., Selim, S., Sunkara, M., Ziada, K.M., Cohen, D.A., Zuba-Surma, E.K., Ratajczak, J., Smyth, S.S., Ratajczak, M.Z., Morris, A.J. & Abdel-Latif, A. Bioactive lipids and cationic antimicrobial peptides as new potential regulators for trafficking of bone marrow-derived stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Stem cells and development* **22**, 1645-1656 (2013).
71. Krankel, N., Spinetti, G., Amadesi, S. & Madeddu, P. Targeting stem cell niches and trafficking for cardiovascular therapy. *Pharmacology & therapeutics* **129**, 62-81 (2011).
72. Winkler, I.G. & Levesque, J.P. Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Experimental hematology* **34**, 996-1009 (2006).
73. Greenbaum, A.M. & Link, D.C. Mechanisms of G-CSF-mediated hematopoietic stem and progenitor mobilization. *Leukemia* **25**, 211-217 (2011).
74. Motabi, I.H. & DiPersio, J.F. Advances in stem cell mobilization. *Blood reviews* **26**, 267-278 (2012).
75. Engelmann, M.G., Theiss, H.D., Theiss, C., Henschel, V., Huber, A., Wintersperger, B.J., Schoenberg, S.O., Steinbeck, G. & Franz, W.M. G-CSF in patients suffering from late revascularised ST elevation myocardial infarction: final 1-year-results of the G-CSF-STEMI Trial. *International journal of cardiology* **144**, 399-404 (2010).
76. Zohlnhofer, D. G-CSF for left ventricular recovery after myocardial infarction: is it time to face reality? *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* **22**, 343-345 (2008).
77. Zohlnhofer, D., Dibra, A., Koppala, T., de Waha, A., Ripa, R.S., Kastrup, J., Valgimigli, M., Schomig, A. & Kastrati, A. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor for myocardial recovery after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology* **51**, 1429-1437 (2008).
78. Hibbert, B., Hayley, B., Beanlands, R.S., Le May, M., Davies, R., So, D., Marquis, J.F., Labinaz, M., Froeschl, M., O'Brien, E.R., Burwash, I.G., Wells, G.A., Pourdjabbar, A., Simard, T., Atkins, H. & Glover, C. Granulocyte colony-stimulating factor therapy for stem cell mobilization following anterior wall myocardial infarction: the CAPITAL STEM MI randomized trial. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **186**, E427-434 (2014).

79. Ince, H., Petzsch, M., Kleine, H.D., Eckard, H., Rehders, T., Burska, D., Kische, S., Freund, M. & Nienaber, C.A. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* **112**, I73-80 (2005).
80. Moazzami, K., Roohi, A. & Moazzami, B. Granulocyte colony stimulating factor therapy for acute myocardial infarction. *The Cochrane database of systematic reviews* **5**, CD008844 (2013).
81. Abbott, J.D., Huang, Y., Liu, D., Hickey, R., Krause, D.S. & Giordano, F.J. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* **110**, 3300-3305 (2004).
82. Hofmann, M., Wollert, K.C., Meyer, G.P., Menke, A., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., Knapp, W.H. & Drexler, H. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* **111**, 2198-2202 (2005).
83. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977-988 (2006).
84. Tang, Y.L., Qian, K., Zhang, Y.C., Shen, L. & Phillips, M.I. Mobilizing of haematopoietic stem cells to ischemic myocardium by plasmid mediated stromal-cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha) treatment. *Regulatory peptides* **125**, 1-8 (2005).
85. Wang, Y. & Luther, K. Genetically manipulated progenitor/stem cells restore function to the infarcted heart via the SDF-1alpha/CXCR4 signaling pathway. *Progress in molecular biology and translational science* **111**, 265-284 (2012).
86. Mentlein, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory peptides* **85**, 9-24 (1999).
87. Ussher, J.R. & Drucker, D.J. Cardiovascular biology of the incretin system. *Endocrine reviews* **33**, 187-215 (2012).

88. Ku, H.C., Chen, W.P. & Su, M.J. DPP4 deficiency preserves cardiac function via GLP-1 signaling in rats subjected to myocardial ischemia/reperfusion. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **384**, 197-207 (2011).
89. Hausenloy, D.J., Whittington, H.J., Wynne, A.M., Begum, S.S., Theodorou, L., Riksen, N., Mocanu, M.M. & Yellon, D.M. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and GLP-1 reduce myocardial infarct size in a glucose-dependent manner. *Cardiovascular diabetology* **12**, 154 (2013).
90. Sauve, M., Ban, K., Momen, M.A., Zhou, Y.Q., Henkelman, R.M., Husain, M. & Drucker, D.J. Genetic deletion or pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves cardiovascular outcomes after myocardial infarction in mice. *Diabetes* **59**, 1063-1073 (2010).
91. Connelly, K.A., Zhang, Y., Advani, A., Advani, S.L., Thai, K., Yuen, D.A. & Gilbert, R.E. DPP-4 inhibition attenuates cardiac dysfunction and adverse remodeling following myocardial infarction in rats with experimental diabetes. *Cardiovascular therapeutics* **31**, 259-267 (2013).
92. Yin, M., Sillje, H.H., Meissner, M., van Gilst, W.H. & de Boer, R.A. Early and late effects of the DPP-4 inhibitor vildagliptin in a rat model of post-myocardial infarction heart failure. *Cardiovascular diabetology* **10**, 85 (2011).
93. Deacon, C.F., Johnsen, A.H. & Holst, J.J. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **80**, 952-957 (1995).
94. Deacon, C.F., Nauck, M.A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B. & Holst, J.J. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes* **44**, 1126-1131 (1995).
95. Mentlein, R., Gallwitz, B. & Schmidt, W.E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *European journal of biochemistry / FEBS* **214**, 829-835 (1993).
96. Kieffer, T.J., McIntosh, C.H. & Pederson, R.A. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* **136**, 3585-3596 (1995).

97. Scheen, A.J. Cardiovascular effects of gliptins. *Nature reviews. Cardiology* **10**, 73-84 (2013).
98. Theiss, H.D. *Der bayerische Internist* **27**, 87-97 (2007).
99. Deindl, E., Zaruba, M.M., Brunner, S., Huber, B., Mehl, U., Assmann, G., Hoefer, I.E., Mueller-Hoecker, J. & Franz, W.M. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 956-958 (2006).
100. Theiss, H.D., Brenner, C., Engelmann, M.G., Zaruba, M.M., Huber, B., Henschel, V., Mansmann, U., Wintersperger, B., Reiser, M., Steinbeck, G. & Franz, W.M. Safety and efficacy of SITagliptin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial)--rationale, design and first interim analysis. *International journal of cardiology* **145**, 282-284 (2010).
101. Drucker, D.J. Minireview: the glucagon-like peptides. *Endocrinology* **142**, 521-527 (2001).
102. Baggio, L.L. & Drucker, D.J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* **132**, 2131-2157 (2007).
103. Ussher, J.R., Baggio, L.L., Campbell, J.E., Mulvihill, E.E., Kim, M., Kabir, M.G., Cao, X., Baranek, B.M., Stoffers, D.A., Seeley, R.J. & Drucker, D.J. Inactivation of the cardiomyocyte glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) unmasks cardiomyocyte-independent GLP-1R-mediated cardioprotection. *Molecular metabolism* **3**, 507-517 (2014).
104. Buteau, J., Foisy, S., Joly, E. & Prentki, M. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* **52**, 124-132 (2003).
105. Hare, K.J., Vilsboll, T., Asmar, M., Deacon, C.F., Knop, F.K. & Holst, J.J. The glucagonostatic and insulinotropic effects of glucagon-like peptide 1 contribute equally to its glucose-lowering action. *Diabetes* **59**, 1765-1770 (2010).
106. Willms, B., Werner, J., Holst, J.J., Orskov, C., Creutzfeldt, W. & Nauck, M.A. Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **81**, 327-332 (1996).

107. Dupre, J., Behme, M.T., Hramiak, I.M., McFarlane, P., Williamson, M.P., Zabel, P. & McDonald, T.J. Glucagon-like peptide I reduces postprandial glycemic excursions in IDDM. *Diabetes* **44**, 626-630 (1995).
108. Meier, J.J., Gallwitz, B., Salmen, S., Goetze, O., Holst, J.J., Schmidt, W.E. & Nauck, M.A. Normalization of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **88**, 2719-2725 (2003).
109. Brubaker, P.L. The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1070**, 10-26 (2006).
110. Holst, J.J., Burcelin, R. & Nathanson, E. Neuroprotective properties of GLP-1: theoretical and practical applications. *Current medical research and opinion* **27**, 547-558 (2011).
111. Mortensen, K., Christensen, L.L., Holst, J.J. & Orskov, C. GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regulatory peptides* **114**, 189-196 (2003).
112. Theodorakis, M.J., Carlson, O., Michopoulos, S., Doyle, M.E., Juhaszova, M., Petraki, K. & Egan, J.M. Human duodenal enteroendocrine cells: source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **290**, E550-559 (2006).
113. Orskov, C., Rabenholz, L., Wettergren, A., Kofod, H. & Holst, J.J. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes* **43**, 535-539 (1994).
114. Elliott, R.M., Morgan, L.M., Tredger, J.A., Deacon, S., Wright, J. & Marks, V. Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *The Journal of endocrinology* **138**, 159-166 (1993).
115. Vilsboll, T., Krarup, T., Deacon, C.F., Madsbad, S. & Holst, J.J. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes* **50**, 609-613 (2001).
116. Drucker, D.J. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology* **122**, 531-544 (2002).

117. Hansen, L., Deacon, C.F., Orskov, C. & Holst, J.J. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology* **140**, 5356-5363 (1999).
118. Mayo, K.E., Miller, L.J., Bataille, D., Dalle, S., Goke, B., Thorens, B. & Drucker, D.J. International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacological reviews* **55**, 167-194 (2003).
119. Thorens, B., Porret, A., Buhler, L., Deng, S.P., Morel, P. & Widmann, C. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* **42**, 1678-1682 (1993).
120. Wei, Y. & Mojsov, S. Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS letters* **358**, 219-224 (1995).
121. Bullock, B.P., Heller, R.S. & Habener, J.F. Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* **137**, 2968-2978 (1996).
122. Scrocchi, L.A., Brown, T.J., MaClusky, N., Brubaker, P.L., Auerbach, A.B., Joyner, A.L. & Drucker, D.J. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nature medicine* **2**, 1254-1258 (1996).
123. Gros, R., You, X., Baggio, L.L., Kabir, M.G., Sadi, A.M., Mungrue, I.N., Parker, T.G., Huang, Q., Drucker, D.J. & Husain, M. Cardiac function in mice lacking the glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* **144**, 2242-2252 (2003).
124. MacLusky, N.J., Cook, S., Scrocchi, L., Shin, J., Kim, J., Vaccarino, F., Asa, S.L. & Drucker, D.J. Neuroendocrine function and response to stress in mice with complete disruption of glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Endocrinology* **141**, 752-762 (2000).
125. Ghosal, S., Myers, B. & Herman, J.P. Role of central glucagon-like peptide-1 in stress regulation. *Physiology & behavior* **122**, 201-207 (2013).
126. Ravassa, S., Zudaire, A. & Diez, J. GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside. *Cardiovascular research* **94**, 316-323 (2012).

127. Vila Petroff, M.G., Egan, J.M., Wang, X. & Sollott, S.J. Glucagon-like peptide-1 increases cAMP but fails to augment contraction in adult rat cardiac myocytes. *Circulation research* **89**, 445-452 (2001).
128. Xiao, Y.F., Nikolskaya, A., Jaye, D.A. & Sigg, D.C. Glucagon-like peptide-1 enhances cardiac L-type Ca²⁺ currents via activation of the cAMP-dependent protein kinase A pathway. *Cardiovascular diabetology* **10**, 6 (2011).
129. Wang, S.X., Xie, Y., Zhou, X., Sha, W.W., Wang, W.L., Han, L.P., Wang, J.C. & Yu, D.M. [Effect of glucagon-like peptide-1 on hypoxia-reoxygenation induced injury in neonatal rat cardiomyocytes]. *Zhonghua xin xue guan bing za zhi* **38**, 72-75 (2010).
130. Ban, K., Kim, K.H., Cho, C.K., Sauve, M., Diamandis, E.P., Backx, P.H., Drucker, D.J. & Husain, M. Glucagon-like peptide (GLP)-1(9-36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9-39) yet does not require the known GLP-1 receptor. *Endocrinology* **151**, 1520-1531 (2010).
131. Ravassa, S., Zudaire, A., Carr, R.D. & Diez, J. Antiapoptotic effects of GLP-1 in murine HL-1 cardiomyocytes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **300**, H1361-1372 (2011).
132. Sonne, D.P., Engstrom, T. & Treiman, M. Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1(9-36) amide against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Regulatory peptides* **146**, 243-249 (2008).
133. Barragan, J.M., Rodriguez, R.E. & Blazquez, E. Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in rats. *The American journal of physiology* **266**, E459-466 (1994).
134. Barragan, J.M., Rodriguez, R.E., Eng, J. & Blazquez, E. Interactions of exendin-(9-39) with the effects of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide and of exendin-4 on arterial blood pressure and heart rate in rats. *Regulatory peptides* **67**, 63-68 (1996).
135. Timmers, L., Henriques, J.P., de Kleijn, D.P., Devries, J.H., Kemperman, H., Steendijk, P., Verlaan, C.W., Kerver, M., Piek, J.J., Doevedans, P.A., Pasterkamp, G. & Hoefer, I.E. Exenatide reduces infarct size and improves cardiac function in a porcine model of ischemia and reperfusion injury. *Journal of the American College of Cardiology* **53**, 501-510 (2009).

136. Kavianipour, M., Ehlers, M.R., Malmberg, K., Ronquist, G., Ryden, L., Wikstrom, G. & Gutniak, M. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide prevents the accumulation of pyruvate and lactate in the ischemic and non-ischemic porcine myocardium. *Peptides* **24**, 569-578 (2003).
137. Kristensen, J., Mortensen, U.M., Schmidt, M., Nielsen, P.H., Nielsen, T.T. & Maeng, M. Lack of cardioprotection from subcutaneously and preischemic administered liraglutide in a closed chest porcine ischemia reperfusion model. *BMC cardiovascular disorders* **9**, 31 (2009).
138. Angeli, F.S. & Shannon, R.P. Incretin-based therapies: can we achieve glycemic control and cardioprotection? *The Journal of endocrinology* **221**, T17-30 (2014).
139. Lonborg, J., Vejlstrup, N., Kelbaek, H., Botker, H.E., Kim, W.Y., Mathiasen, A.B., Jorgensen, E., Helqvist, S., Saunamaki, K., Clemmensen, P., Holmvang, L., Thuesen, L., Krusell, L.R., Jensen, J.S., Kober, L., Treiman, M., Holst, J.J. & Engstrom, T. Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *European heart journal* **33**, 1491-1499 (2012).
140. Read, P.A., Hoole, S.P., White, P.A., Khan, F.Z., O'Sullivan, M., West, N.E. & Dutka, D.P. A pilot study to assess whether glucagon-like peptide-1 protects the heart from ischemic dysfunction and attenuates stunning after coronary balloon occlusion in humans. *Circulation. Cardiovascular interventions* **4**, 266-272 (2011).
141. Read, P.A., Khan, F.Z. & Dutka, D.P. Cardioprotection against ischaemia induced by dobutamine stress using glucagon-like peptide-1 in patients with coronary artery disease. *Heart* **98**, 408-413 (2012).
142. Hesse, M., Meier, H. & Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, (Thieme, 2005).
143. Hess, C., Musshoff, F. & Madea, B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* **400**, 33-41 (2011).
144. Janeway, C.A. *Immunologie*, (Spektrum, Akad. Verlag, 2002).
145. Weibel, E.R. *Stereological methods: Practical methods for biological morphometry*, (Academic Press, 1979).

146. McGavin, D. & Zachary, J.F. *Pathologie der Haustiere: Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie*, (Elsevier Health Sciences Germany, 2011).
147. Wilcoxon, F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin* **1**, 80-83 (1945).
148. Hayter, A.J. The maximum familywise error rate of fisher's least significant difference test. *Journal of the American Statistical Association* **81**, 1000-1004 (1986).
149. Fadini, G.P., Boscaro, E., Albiero, M., Menegazzo, L., Frison, V., de Kreutzenberg, S., Agostini, C., Tiengo, A. & Avogaro, A. The oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin increases circulating endothelial progenitor cells in patients with type 2 diabetes: possible role of stromal-derived factor-1alpha. *Diabetes care* **33**, 1607-1609 (2010).
150. Moilanen, A.M., Rysa, J., Mustonen, E., Serpi, R., Aro, J., Tokola, H., Leskinen, H., Manninen, A., Levijoki, J., Vuolteenaho, O. & Ruskoaho, H. Intramyocardial BNP gene delivery improves cardiac function through distinct context-dependent mechanisms. *Circulation. Heart failure* **4**, 483-495 (2011).
151. Heredia, M.P., Fernandez-Velasco, M., Benito, G. & Delgado, C. Neuropeptide Y increases 4-aminopyridine-sensitive transient outward potassium current in rat ventricular myocytes. *British journal of pharmacology* **135**, 1701-1706 (2002).
152. Chiao, H. & Caldwell, R.W. Local cardiac effects of substance P: roles of acetylcholine and noradrenaline. *British journal of pharmacology* **114**, 283-288 (1995).
153. Gnechi, M., Zhang, Z., Ni, A. & Dzau, V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research* **103**, 1204-1219 (2008).
154. Caplan, A.I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue engineering* **11**, 1198-1211 (2005).
155. Majka, M., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., Ehrenman, K., Pietrzkowski, Z., Kowalska, M.A., Gewirtz, A.M., Emerson, S.G. & Ratajczak, M.Z. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* **97**, 3075-3085 (2001).

156. Ye, Y., Keyes, K.T., Zhang, C., Perez-Polo, J.R., Lin, Y. & Birnbaum, Y. The myocardial infarct size-limiting effect of sitagliptin is PKA-dependent, whereas the protective effect of pioglitazone is partially dependent on PKA. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **298**, H1454-1465 (2010).
157. Erhardt, W., Kölle, P., Henke, J., Haberstroh, J., Baumgartner, C. & Tacke, S. *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, (Schattauer, 2012).
158. Arras, M., Autenried, P., Rettich, A., Spaeni, D. & Rulicke, T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comparative medicine* **51**, 443-456 (2001).
159. Roth, D.M., Swaney, J.S., Dalton, N.D., Gilpin, E.A. & Ross, J., Jr. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **282**, H2134-2140 (2002).
160. Ahn, D., Cheng, L., Moon, C., Spurgeon, H., Lakatta, E.G. & Talan, M.I. Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **286**, H1201-1207 (2004).
161. Kumar, D., Hacker, T.A., Buck, J., Whitesell, L.F., Kaji, E.H., Douglas, P.S. & Kamp, T.J. Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coronary artery disease* **16**, 41-44 (2005).
162. van den Bos, E.J., Mees, B.M., de Waard, M.C., de Crom, R. & Duncker, D.J. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **289**, H1291-1300 (2005).
163. Rosano, G.M., Fini, M., Caminiti, G. & Barbaro, G. Cardiac metabolism in myocardial ischemia. *Current pharmaceutical design* **14**, 2551-2562 (2008).
164. Konstantinidis, K., Whelan, R.S. & Kitsis, R.N. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**, 1552-1562 (2012).

165. Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P. & Reiter, R.J. Cardioprotection and pharmacological therapies in acute myocardial infarction: Challenges in the current era. *World journal of cardiology* **6**, 100-106 (2014).
166. Frohlich, G.M., Meier, P., White, S.K., Yellon, D.M. & Hausenloy, D.J. Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *European heart journal* **34**, 1714-1722 (2013).
167. Pacher, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Batkai, S. & Kass, D.A. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nature protocols* **3**, 1422-1434 (2008).
168. Roelants, V., Delgaudine, M., Walrand, S., Lhommel, R., Beguin, Y., Jamar, F. & Vanoverschelde, J.L. Myocardial infarct size quantification in mice by SPECT using a novel algorithm independent of a normal perfusion database. *EJNMMI research* **2**, 64 (2012).
169. Wu, M.C., Gao, D.W., Sievers, R.E., Lee, R.J., Hasegawa, B.H. & Dae, M.W. Pinhole single-photon emission computed tomography for myocardial perfusion imaging of mice. *Journal of the American College of Cardiology* **42**, 576-582 (2003).
170. Stegger, L., Hoffmeier, A.N., Schafers, K.P., Hermann, S., Schober, O., Schafers, M.A. & Theilmeier, G. Accurate noninvasive measurement of infarct size in mice with high-resolution PET. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **47**, 1837-1844 (2006).
171. Gao, X.M., Dart, A.M., Dewar, E., Jennings, G. & Du, X.J. Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovascular research* **45**, 330-338 (2000).
172. Ross, A.J., Yang, Z., Berr, S.S., Gilson, W.D., Petersen, W.C., Oshinski, J.N. & French, B.A. Serial MRI evaluation of cardiac structure and function in mice after reperfused myocardial infarction. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* **47**, 1158-1168 (2002).
173. Alsaid, H., Bao, W., Rambo, M.V., Logan, G.A., Figueroa, D.J., Lenhard, S.C., Kotzer, C.J., Burgert, M.E., Willette, R.N., Ferrari, V.A. & Jucker, B.M. Serial MRI characterization of the functional and morphological changes in mouse lung in response to cardiac remodeling following myocardial infarction. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* **67**, 191-200 (2012).

174. Kim, M., Platt, M.J., Shibasaki, T., Quaggin, S.E., Backx, P.H., Seino, S., Simpson, J.A. & Drucker, D.J. GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nature medicine* **19**, 567-575 (2013).
175. Franz, W.M., Theiss, H.D., Brenner, C., . Safety And Efficacy Of Sitagliptin Plus Granulocyte-colony Stimulating Factor In Patients Suffering From Acute Myocardial Infarction - SITAGRAMI Trial. in *AHA Scientific Sessions*, Vol. Circulation 2013 2704-2722 (Dallas, Tx, 2013).
176. Dimmeler, S. & Leri, A. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circulation research* **102**, 1319-1330 (2008).
177. Vasa, M., Fichtlscherer, S., Adler, K., Aicher, A., Martin, H., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* **103**, 2885-2890 (2001).
178. Pirro, M., Schillaci, G., Menecali, C., Bagaglia, F., Paltriccia, R., Vaudo, G., Mannarino, M.R. & Mannarino, E. Reduced number of circulating endothelial progenitors and HOXA9 expression in CD34+ cells of hypertensive patients. *Journal of hypertension* **25**, 2093-2099 (2007).
179. Kondo, T., Hayashi, M., Takeshita, K., Numaguchi, Y., Kobayashi, K., Iino, S., Inden, Y. & Murohara, T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**, 1442-1447 (2004).
180. Muller-Ehmsen, J., Krausgrill, B., Burst, V., Schenk, K., Neisen, U.C., Fries, J.W., Fleischmann, B.K., Hescheler, J. & Schwinger, R.H. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* **41**, 876-884 (2006).
181. Penicka, M., Widimsky, P., Kobylka, P., Kozak, T. & Lang, O. Images in cardiovascular medicine. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcoronary transplantation in a patient with acute myocardial infarction. *Circulation* **112**, e63-65 (2005).
182. Boheler, K.R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H.T., Anisimov, S.V. & Wobus, A.M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circulation research* **91**, 189-201 (2002).

183. Laflamme, M.A., Chen, K.Y., Naumova, A.V., Muskheli, V., Fugate, J.A., Dupras, S.K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., O'Sullivan, C., Collins, L., Chen, Y., Minami, E., Gill, E.A., Ueno, S., Yuan, C., Gold, J. & Murry, C.E. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature biotechnology* **25**, 1015-1024 (2007).
184. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
185. Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature protocols* **2**, 3081-3089 (2007).
186. Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Yamada, S., Perez-Terzic, C., Ikeda, Y. & Terzic, A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* **120**, 408-416 (2009).
187. Carpenter, L., Carr, C., Yang, C.T., Stuckey, D.J., Clarke, K. & Watt, S.M. Efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells generates cardiac cells that provide protection following myocardial infarction in the rat. *Stem cells and development* **21**, 977-986 (2012).
188. Li, X., Zhang, F., Song, G., Gu, W., Chen, M., Yang, B., Li, D., Wang, D. & Cao, K. Intramyocardial Injection of Pig Pluripotent Stem Cells Improves Left Ventricular Function and Perfusion: A Study in a Porcine Model of Acute Myocardial Infarction. *PLoS One* **8**, e66688 (2013).
189. Hong, S.G., Winkler, T., Wu, C., Guo, V., Pittaluga, S., Nicolae, A., Donahue, R.E., Metzger, M.E., Price, S.D., Uchida, N., Kuznetsov, S.A., Kilts, T., Li, L., Robey, P.G. & Dunbar, C.E. Path to the clinic: assessment of iPSC-based cell therapies *in vivo* in a nonhuman primate model. *Cell reports* **7**, 1298-1309 (2014).
190. Huisamen, B., Genis, A., Marais, E. & Lochner, A. Pre-treatment with a DPP-4 inhibitor is infarct sparing in hearts from obese, pre-diabetic rats. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* **25**, 13-20 (2011).
191. Read, P.A., Khan, F.Z., Heck, P.M., Hoole, S.P. & Dutka, D.P. DPP-4 inhibition by sitagliptin improves the myocardial response to dobutamine stress and mitigates stunning in a pilot study of patients with coronary artery disease. *Circulation. Cardiovascular imaging* **3**, 195-201 (2010).

192. McCormick, L.M., Kydd, A.C., Read, P.A., Ring, L.S., Bond, S.J., Hoole, S.P. & Dutka, D.P. Chronic dipeptidyl peptidase-4 inhibition with sitagliptin is associated with sustained protection against ischemic left ventricular dysfunction in a pilot study of patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Circulation. Cardiovascular imaging* **7**, 274-281 (2014).
193. Scirica, B.M., Braunwald, E., Raz, I., Cavender, M.A., Morrow, D.A., Jarolim, P., Udell, J.A., Mosenzon, O., Im, K., Umez-Eronini, A.A., Pollack, P.S., Hirshberg, B., Frederich, R., Lewis, B.S., McGuire, D.K., Davidson, J., Steg, P.G., Bhatt, D.L., Committee, S.-T.S. & Investigators*. Heart failure, saxagliptin, and diabetes mellitus: observations from the SAVOR-TIMI 53 randomized trial. *Circulation* **130**, 1579-1588 (2014).
194. White, W.B., Bakris, G.L., Bergenstal, R.M., Cannon, C.P., Cushman, W.C., Fleck, P., Heller, S., Mehta, C., Nissen, S.E., Perez, A., Wilson, C. & Zannad, F. EXamination of cArDiovascular outcoMes with alogliptIN versus standard of carE in patients with type 2 diabetes mellitus and acute coronary syndrome (EXAMINE): a cardiovascular safety study of the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor alogliptin in patients with type 2 diabetes with acute coronary syndrome. *American heart journal* **162**, 620-626 e621 (2011).

IX. DANKSAGUNG

An dieser Stelle ist es an der Zeit, mich bei all denjenigen zu bedanken, die es mir durch ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation erst ermöglicht haben diese Dissertation zu erstellen. Ohne all die kleinen und großen Hilfestellungen wäre die Arbeit in der heutigen Form nicht möglich gewesen.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt dabei PD Dr. med. Hans Theiss, der mir durch die Überlassung dieses herausfordernden wissenschaftlichen Projekts großes Vertrauen entgegenbrachte und mir in den spannenden Jahren unserer großartigen Zusammenarbeit zu jeder Zeit sowohl mit wissenschaftlichem als auch freundschaftlichem Rat zur Seite stand.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. vet. Rüdiger Wanke für seine ausgezeichnete Betreuung, unsere vielen konstruktiven Gespräche, seinen unermüdlichen Einsatz und das ehrliche und herzliche Miteinander bedanken.

Mein großer Dank gilt PD Dr. med. vet. Nadja Herbach und Dr. med. vet. Andreas Blutke für das unermüdliche wissenschaftliche Engagement und die schöne Zeit am Institut der Tierpathologie.

Außerdem danke ich Prof. Dr. rer. nat. Robert David, Dr. rer. nat. Alexandra Laskowski und Dr. med. vet. Sarah Kühenthal für die vielen kleinen Hilfestellungen, den wissenschaftlichen Rat und die schöne gemeinsam verbrachte Zeit in Großhadern.

Ein besonderer Dank gilt unserer technischen Assistentin Judith Arcifa, Seele unseres Labors, für ihre stete Hilfsbereitschaft, tatkräftige Unterstützung und unser freundschaftliches Miteinander. Gleichermassen gebührt Lisa Pichl ein großes Dankeschön für ihre großartige Unterstützung im Rahmen der Histotechnik.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Johanna Grabmeier und Dr. med. Marc Becker, die mich unermüdlich unterstützt und motiviert haben, sowie Renate Grabmeier und Katrin Engelhardt, die dafür gesorgt haben, dass den Lesern dieser Arbeit größere literarische Fauxpas erspart blieben.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Michael Vogeser für die freundliche Unterstützung und bei Dr. Katrin König für die Durchführung der Massenspektrometrie am Institut für klinische Chemie am Klinikum Großhadern bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön gebührt auch Katharina Kettner, Jitka Netolicka, Katrin Anders, Adrian Ciolovan, Sabine Zwirz, Carola Seibold und Judith Röder für die verantwortungsvolle und fürsorgliche Pflege und Betreuung unserer Tiere.

Ich möchte mich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe in Großhadern und den Mitarbeitern am Institut für Tierpathologie, von ganzem Herzen für die unvergessliche Zeit und immerwährende Hilfsbereitschaft während meiner Dissertation bedanken und darüber hinaus besonders bei Prof. Dr. med. vet. Walter Hermanns und Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz für die freundliche Unterstützung des Projekts.

Und schließlich danke ich meiner Familie und Freunden von ganzem Herzen: Meinem Papa Anton Ebner, der mir in allen Lebenslagen zur Seite steht und immer an mich geglaubt hat, meiner Mama Edith Ebner, die sehr stolz auf mich gewesen wäre, meinen Geschwistern Carina, Isabel und Marco für ihre endlose Geduld und Hilfsbereitschaft, Christian Schmidmaier, für sein unglaubliches Verständnis und seinen Rückhalt in all den gemeinsamen Jahren, Peter Weigel, der Vieles erst ermöglicht hat und all den Menschen auf meinem Weg, die mich begleitet, unterstützt und motiviert haben.