

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Steffen Massberg
ehem. Direktor: Prof. Dr. G. Steinbeck

**Kardioprotektives Potential von embryonalen endothelialen Stammzellen im
akuten Ischämiemodell am Schweineherz**

Dissertation

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

vorgelegt von
Sebastian Müller
aus Oldenburg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andrej Khandoga
PD Dr. med. Sebastian Lehner

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. vet. Rabea Hinkel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündl. Prüfung: 28.06.2018

Meinen verstorbenen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Kupatt C., Hinkel R., Lamparter M.; et al. Retrofusion of Embryonic Endothelial Progenitor Cells Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in Pigs.

Circulation. 2005;112 [suppl I]: I-117-I-122.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen	1
1.2 Endothel	2
1.2.1 Normale Endothelfunktion	2
1.2.2 Endothel-Dysfunktion	4
1.3 Ischämie- und Reperfusionsschaden	4
1.4 Stammzellen und endotheliale Vorläuferzellen	5
1.5 Phosphatidylinositol 3-Kinase/ AKT Signalkaskade	7
1.6 Fragestellung/ Versuchskonzeption	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Apparaturen, Medikamente und Verbrauchsmaterialien	9
2.2 Perkutane koronare Ballon-Okklusion als Modell der akuten Ischämie	11
2.2.1 Versuchstiere	11
2.2.2 Prämedikation, Narkoseinduktion und -aufrechterhaltung	11
2.2.3 Perioperatives Management	12
2.2.4 Selektive Absaugung und druckregulierte Retroinfusion	13
2.2.5 Sonomikrometrie	14
2.2.6 Vitalitätsbestimmung der Myokardzellen/ TTC-Test	17
2.2.7 Isolierung und Kultivierung muriner eEPCs	18
2.2.8 Präparation, Isolierung und Kultivierung neonataler Ratten-Kardiomyozyten	18
2.3 Therapeutische eEPC-Gabe im akuten ischämischen Myokard	18
2.3.1 Versuchstag 0: Induktion einer akuten Ischämie	18
2.3.2 Versuchstag 0: eEPC-Gabe nach 55 Minuten Ischämie	19
2.3.3 Versuchstag 1	20
2.3.4 Tag 7: Erfassung der Myokardfunktion und - Infarktgröße	21
2.4 Immunologische Aufarbeitung	23
2.4.1 Immunoblotting	23
2.4.2 Immunhistochemie	24

2.4.3 Vitalitätsbestimmung der Ratten-Kardiomyozyten in vitro	24
2.4.4 Radioaktive Markierung und Auswertung der eEPCs	25
2.4.5 Myeloperoxidase Methode	25
2.4.6 TUNEL-Methode/ -Färbung	26
2.5 Statistische Methoden	26
3. Ergebnisse	27
3.1 eEPC-Rekrutierung nach systemischer oder regionaler Applikation	27
3.2 eEPCs verringern den Ischämie-/ Reperfusionsschaden in Schweinen	30
3.3 Mechanismen der eEPC-vermittelten Kardioprotektion	32
4. Diskussion	38
4.1 Art und Auswahl der Versuchstierspezies	39
4.2 Auswirkung der Ischämie/ Reperfusion auf zellulärer Ebene	40
4.3 Zellbasierte Therapie	42
4.4 Art der Stammzellgabe	44
4.5 Zeitpunkt der Stammzellgabe	45
4.6 Limitationen der Stammzelltherapie	46
5. Zusammenfassung	48
Abbildungsverzeichnis	VII
Formelverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Literaturverzeichnis	X
Danksagung	XXIV

1. Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Die kardiovaskulären Erkrankungen (CVDs) sind die Haupttodesursache weltweit.¹ Hieran sterben jährlich mehr Menschen, als an jeder anderen Erkrankung. In 2012 verstarben schätzungsweise 17,5 Millionen Menschen an einer kardiovaskulären Erkrankung, was ungefähr 31% aller globalen Todesursachen entspricht.¹ Hiervon entfallen schätzungsweise 7,4 Millionen Todesfälle auf die Koronare Herzerkrankung (KHK) oder englisch Coronary heart disease (CHD), beziehungsweise Coronary artery disease (CAD).¹ Laut des statistischen Bundesamtes verstarben 2014 in Deutschland allein 118.071 Personen an einem akuten Myokardinfarkt oder einer chronischen ischämischen Herzkrankheit.² Dabei entfallen 56,9 % der Todesfälle auf Männer und 43,1 % auf Frauen.² Die direkten Kosten für die Behandlung ischämischer Herzkrankheiten beliefen sich in 2008 auf 6,3 Milliarden Euro.³ Allein das Akute Koronarsyndrom verursachte Ausgaben von ca. 3,3 Milliarden Euro.³ Neben diesen direkten Kosten die durch eine medizinische Therapie bedingt sind, gibt es auch die indirekten Kosten, die durch Krankheit, einer damit verbundenen Erwerbsunfähigkeit oder frühzeitigem Tod verursacht werden.³ Diese sogenannten indirekten Kosten haben nach Damm et al. eine massive volkswirtschaftliche Relevanz. Neben den direkten und indirekten Kosten, entstehen auch sogenannte intangible Kosten. Diese sind laut Damm et al. nicht messbar und können durch Krankheit oder eine medizinische Behandlung verursacht werden. Hierbei kann es sich zum Beispiel um verminderte Lebensqualität aber auch krankheitsspezifische Problematiken wie zum Beispiel Schmerzen oder Mobilitätseinschränkungen handeln.³

Die KHK ist das klinische Korrelat einer pathophysiologischen Veränderung im Sinne einer Arteriosklerose (=Atherosklerose) der Koronarien.⁴ Die Arteriosklerose fasst diejenigen arteriellen Veränderungen zusammen, bei denen eine Entzündung zu einer strukturellen Veränderung der Gefäßwand führt.⁴ Hierzu zählt auch die Atherosklerose, bei der es aufgrund von Einlagerungen unterschiedlicher Stoffe zu einer Veränderung der Intima kommt.⁴ Die dabei entstehenden Koronarstenosen führen zu einer Reduktion des Durchflusses mit der Folge einer Koronarinsuffizienz. Hieraus resultiert ein Ungleichgewicht zwischen dem Sauerstoffangebot und -bedarf des Myokards.⁵

Die koronare Herzerkrankung kann sich in Form einer Angina pectoris bemerkbar machen, wobei zwischen einer chronischen Variante und einem Akutgeschehen differenziert werden muss.⁵ Die instabile AP, der nicht-ST-Hebungs-Infarkt und der ST-Hebungsinfarkt, werden in der aktuellen Nomenklatur unter dem Begriff des akuten Koronarsyndroms, beziehungsweise englisch Acute coronary syndrome (ACS) subsumiert und können akut zum Tode führen.⁴⁻⁶

Die Myokardischämie kann sich klinisch wie folgt äußern: ^{3,5}

- Asymptomatische KHK
- Stabile Angina pectoris
- Instabile Angina pectoris
- Myokardinfarkt (NSTEMI, STEMI)
- Ischämische Kardiomyopathie (Links-/ Rechtsherzinsuffizienz)
- Mitralinsuffizienz
- Herzrhythmusstörungen
- Sudden Cardiac Death (SCD)

Für die Entstehung einer KHK sind allgemeine endo- und exogene Risikofaktoren bekannt. Hierzu sind diverse Studien veröffentlicht worden. In der dabei bekanntesten Untersuchung, der Framingham-Herz-Studie, wurden der Nikotinabusus, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Adipositas als kardiovaskuläre Risikofaktoren identifiziert.⁷ Die meisten kardiovaskulären Erkrankungen könnten durch Verhaltensänderungen betreffend dieser Risikofaktoren verhindert werden.¹

1.2 Endothel

Das Endothel fungiert als Grenzschicht zwischen dem Blut und den Koronargefäßen.⁴ Es übernimmt dabei unterschiedlichste Funktionen und interagiert mit dem gesamten Organismus.^{8,9} Diese umfassen indirekt den Bluttransport als umgebende Schicht mit seinen pro- und antikoagulatorischen Eigenschaften, die Fähigkeit Stoffe transmigrieren zu lassen oder zu binden und Signale zu senden oder zu empfangen.⁸

1.2.1 Normale Endothelfunktion

Das Endothel besteht aus einer einzelnen Schicht aus Zellen.^{4,10} Diese Grenzschicht aus Endothelzellen im Gefäß ist an der Erzeugung des Gefäßtonus beteiligt und spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des vaskulären Gleichgewichtes.¹¹ So ist das Endothel für die Gefäßpermeabilität verantwortlich und dient damit als Barriere gegen schädliche Substanzen. Es hat einen entscheidenden

Einfluss auf die Thrombozytenaktivität und die Modulation der bindenden Funktion im Sinne der Leukozytenadhäsion.¹² Das Endothel kontrolliert die Vaskulo-/ Angiogenese sowie die Inflammation.^{13, 14}

Die Beeinflussung des koronaren Blutflusses mittels Vasokonstriktion/ -dilatation erlaubt eine genaue Abstimmung zwischen O₂-Delivery und O₂-Bedarf im Myokard. Die Steuerung des lokalen Gefäßtonus beruht unter anderem auf der Wirkung des von Endothelzellen freigesetzten Stickstoffmonoxid (NO).¹⁵ Stickstoffmonoxid entsteht mit Hilfe der Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin.^{16, 17} Das NO ist ein parakriner Botenstoff mit sehr kurzer Halbwertszeit, der direkten Einfluss auf Zellen in seinem Umfeld nehmen kann und dabei diverse Prozesse aktiviert.^{17, 18} In der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt das NO durch eine Aktivierung der Guanylatzyklase eine Relaxierung der glatten Muskulatur.^{10, 16} Hierbei entsteht das cyclische Guanosin-Monophosphat (cGMP), welches die cGMP-abhängige Kinase aktiviert.¹⁸ Dies führt zu einer verminderten Konzentration an intrazellulärem Kalzium und in der Folge zu einer Relaxierung der glatten Muskulatur.^{10, 16, 19}

Neben der gefäßregulatorischen Wirkung beeinflusst Stickstoffmonoxid auch direkt das Zellwachstum. Neben einer hemmenden Wirkung auf das Wachstum von glatten Muskelzellen hat Stickstoffmonoxid cGMP-vermittelt auch Einfluss auf die Angiogenese.²⁰⁻²² Während NO das Wachstum von glatten Muskelzellen hemmt, bleibt das Wachstum von Endothelzellen von ihm unbeeinflusst.²³ Proliferierende Zellen, wie die Endothelzellen, produzieren große Mengen an eNOS und damit potentiell NO. Im gesunden Gefäß hemmen die Endothelzellen durch Ausschüttung von NO das Wachstum von glatten Muskelzellen. Ihr eigenes Wachstum und damit die Reparatur des Endothels wird nicht durch NO beeinflusst. Ein weiterer Effekt des NO ist, dass durch seine Abgabe nach endoluminal in Kombination mit dem vasodilatierenden PIG2 die Thrombozytenaggregation unterdrückt wird.¹⁶ Durch die fehlende Aktivierung der Thrombozyten setzen diese kein Serotonin und Thromboxan aus ihren Granula frei. Somit wird die Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel verhindert.

Stickstoffmonoxid ist wachstumshemmend, unterdrückt entzündliche Prozesse und wirkt damit antiatherosklerotisch.¹⁶

1.2.2 Endothel-Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion definiert sich als Zustand in dem das Endothel nicht mehr in der Lage ist, die zuvor genannten Eigenschaften (Hämostase, Gefäßtonus, Inflammation, etc.) aufrecht zu erhalten. Kommt es zum Verlust dieser Fähigkeiten, so bereitet dies den Boden für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen. Die endotheliale Dysfunktion und die damit einhergehende Atherosklerose bilden damit die Grundlage für die Entstehung der koronaren Herzerkrankung. Diese Prozesse finden sowohl auf Ebene größerer, als auch der kleinen Gefäße statt. Nahezu alle kardiovaskulären Risikofaktoren können eine Endothel-Dysfunktion auslösen.^{11, 16}

Der grundlegende pathophysiologische Mechanismus hinter der endothelialen Dysfunktion besteht in einem gestörten NO-Gleichgewicht zu Gunsten des Verbrauches.¹⁷ Durch reduzierte Produktion und erhöhten Verbrauch des Stickstoffmonoxids fehlt dem Gefäß die Fähigkeit der adäquaten Dilatation. Es resultiert eine erhöhte vaskuläre Kontraktion. Die Dysfunktion und NO-Dysbalance führt zu einer Plättchen- und Leukozytenaktivierung sowie Adhäsion. Die Gefäßpermeabilität wird durch Zytokine erhöht und erlaubt es inflammatorischen Botenstoffen die Gefäßwand zu durchdringen. Diese wird durch Wachstum glatter Muskelzellen und atherosklerotischer Plaquebildung in ihrer Struktur schwer beschädigt.

1.3 Ischämie- und Reperfusionsschaden

Wenn die Perfusion eines Koronargefäßes durch eine Stenose um über 75% vermindert wird, so hat dies meistens irreversible Folgen für das Myokard.^{4, 24} Die myokardiale Schädigung beruht auf einer Ischämie und der folgenden Reperfusion.²⁴ Wird das ischämische Myokard nicht schnell genug wieder reperfundiert oder ist es nicht ausreichend kollateralisiert, so führt der akute Myokardinfarkt aufgrund von Sauerstoff- und Substratmangel zum Untergang von Kardiomyozyten.^{4, 24, 25}

Die Reperfusion setzt ein, wenn ein verschlossenes Koronargefäß spontan, durch eine Thrombolyse oder eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) wiedereröffnet wird. Bei der nun einsetzenden Reperfusion des zuvor ischämischen Myokards wird dieses wieder mit oxygeniertem Blut versorgt. Dies führt paradoxerweise zu einer weiteren Myokardschädigung und kann Myokard-, Gefäß-, oder Rhythmusstörungen verursachen^{26-29, 29}. Hieraus resultieren dann möglicherweise Dys-/ Akinesien, Gefäßspasmen oder Kammerflimmern.^{5, 29}

Das akute Ischämie-Ereignis hat schwerwiegende Störungen im Energiehaushalt der Zelle zu Folge.^{24, 30, 31} Aus ihnen resultiert letztendlich ein Zellschaden und -tod. Es kommt zu einem Mangel an

Energieäquivalenten in Form von Adenosintriphosphat (ATP).^{29, 32} Die Zellen müssen aufgrund des Sauerstoffmangels von der aeroben auf die anaerobe Energieproduktion umstellen und die Produkte dieser anaeroben Stoffwechsellage „vergiften“ die Zellen.^{29, 30} Aufgrund der Azidose sinkt der pH-Wert und Calcium strömt nach intrazellulär.^{4, 29} Dadurch wird die Zellintegrität massiv gestört und führt zu einer Schädigung der Mitochondrien.³³ Die beginnende Zellschädigung setzt inflammatorische Prozesse in Gang, die zur Freisetzung von Phospholipasen führt, welche die mitochondriale Zellmembran schwer beschädigen.³⁴ Sie führt auch zur Bildung von inflammatorischen Hormonen wie Prostaglandinen (PGI₂) oder Leukotrienen, die eine Leukozytenmigration in das Ischämieareal bewirken.^{4, 13, 24}

Bevor die noch überlebensfähigen Kardiomyozyten sterben, besteht eine reversible Phase zur Erholung, wenn die Zirkulation frühzeitig wiederhergestellt wird. Jedoch kann diese Reperfusion zu einem weiteren Zellschaden führen.^{25, 31, 35} Obwohl die Reperfusion wieder in einer Flusserrhöhung resultiert, kann es zu einer distalen Flussverminderung auf mikrovaskulärer Ebene kommen.³⁶ Diese mikrovaskuläre Durchblutungsstörung wird als „no-reflow“ bezeichnet.³⁷ Die Folgen wären mögliche neue Thrombosierungen mit Aktivierung inflammatorischer Stoffe, Ödembildung und Vasokonstriktion.³⁸ Die bereits hohen intrazellulären Mengen an Calcium-Ionen werden durch die Reperfusion gesteigert, was zu einer Hyperkontraktilität der Myozyten durch Schädigung des Sarkolemms führt.³⁹⁻⁴¹ Im Anschluss an eine Reperfusion geraten die Zellen in einen „oxidativen Stress“ und es werden unterschiedlichste freie Radikale gebildet.⁴² Sie schädigen die Myozyten durch Veränderung der Membranstruktur, die sie zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion oder auch Kommunikation mit anderen Zellen benötigen.^{42, 43} Die Bildung von freien Radikalen führt zur Aktivierung von Leukozyten.²⁴ Dies bedingt eine Leukozyten-Aggregation und -Adhäsion.^{24, 43} Ebenso werden Thrombozyten⁴⁴ und das Komplementsystem⁴⁵ aktiviert, was in seiner Endstrecke zur Apoptose der Kardiomyozyten führt.^{46, 47} Der Ischämie-/ Reperfusionsschaden kann experimentell mittels unterschiedlicher Methoden und Maßnahmen abgeschwächt werden.^{48, 49} Gefäßtonus, Koagulation und die Entzündungskontrolle sind wichtige Faktoren für die postischämische Heilung. Besonders hervorheben lassen sich Stickstoffmonoxid und Wachstumsfaktoren.²⁴

1.4 Stammzellen und endotheliale Vorläuferzellen

Allen Stammzellen (SC) ist gemein, dass sie die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu vervielfältigen und sich in gewissem Maße ausdifferenzieren können.⁵⁰ Die Fähigkeit sich zu erneuern geht ohne einen Differenzierungsverlust oder Alterungsprozess einher. Eine Stammzelle kann sich symmetrisch oder asymmetrisch in eine Tochterzelle teilen. Dabei bedeutet symmetrisch, dass es sich um eine identische Stammzelle, asymmetrisch um eine differenziertere Zelle handelt.⁵¹ Die Potenz einer Stammzelle leitet sich

aus der Art der Tochterzelle ab, zu der sie proliferiert. Stammzellen können dabei totipotent, pluripotent, multipotent und unipotent sein.⁵² Aus einer toti- beziehungsweise omnipotenten Stammzelle kann jede Art von Zelle entstehen.⁵² Sie besitzen die Fähigkeit sich zu einem gesamten Organismus inklusive einer Plazenta zu entwickeln. Pluripotenten Zellen fehlt diese Eigenschaft bereits. Sie können zwar zu jeder Körperzelle differenzieren, extraembryonales Gewebe, wie eine Plazenta, können Sie nicht mehr bilden.⁵² Multipotente Stammzellen besitzen die Fähigkeit, jegliche Zellen aus ihrer Reihe zu bilden, das heißt aus einer multipotenten Blutstammzelle kann jede Zelle des Blutes werden.⁵² Eine unipotente Zelle kann nur noch zur selben Zelle proliferieren.⁵² Dabei gilt zu beachten, dass die Zellen, die unmittelbar nach der Befruchtung des Eies entstehen, als omnipotent gelten. Zellen, die sich danach aus der inneren Zellmasse der Blastozyste entwickeln, sind pluripotent.^{53, 54} Zellen, die man in diesem Zeitraum gewinnen und kultivieren kann, nennt man embryonale Stammzellen.⁵³⁻⁵⁵ Die Zellen die nach circa einer bis zwei Wochen nach der Befruchtung entstehen, sind nur noch multi- oder unipotent und werden adulte Stammzellen genannt. Die embryonalen Stammzellen sind pluripotent und können Zellen aller drei Keimblätter (Ento-/ Ekto-/ Mesoderm) bilden.^{55, 56} Aus diesem Potential können vollständige Organe entstehen.⁵⁷ Adulte Stammzellen findet man im Gewebe, im Knochenmark oder auch zirkulierend im Blut.^{58, 59} Zu letzteren zählen unter anderem auch die adulten endothelialen Progenitorzellen. Sowohl bei den Knochenmarkszellen, als auch bei den zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen konnte nachgewiesen werden, dass sie zu Kardiomyozyten differenzieren können.^{60, 61} Beim gesunden Menschen lassen sich nur wenige endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) im peripheren Blut finden. In diversen Tierstudien konnte nachgewiesen werden, dass eine Ausschüttung von EPCs durch inflammatorische Zytokine wie NFκB und Interleukin-8 (IL-8) induziert wird. Sie scheinen eine bedeutende Rolle in der Regeneration der geschädigten Gefäßintima, also Endothel, zu besitzen und revaskularisierende Effekte zu verstärken.^{62, 63} Sie könnten außerdem an der Regeneration des ischämischen Myokards, sowie der zerebralen Neovaskularisierung beteiligt sein. Von Asahara et al. wurden 1997 erstmals endotheliale, zirkulierende Progenitorzellen beschrieben, die ein relativ schnelles angiogenetisches Potential besitzen.^{58, 64} Die Vorläuferzellen scheinen aber auch noch Einfluss auf andere Mechanismen zu nehmen. Neben dem zuvor genannten angiogenetischen Potential besitzen sie weitere kardioprotektive Eigenschaften. So beeinflussen sie über unterschiedliche parakrine Faktoren zum Beispiel das myokardiale „Remodeling“⁶⁵ oder Apoptosemechanismen⁶⁶ des ischämischen Herzens. Die Menge, Art und Lokalisation der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen korreliert stark mit der Endothelfunktion und könnte bedeutenden Einfluss auf neue Therapieformen haben.^{67, 68} Die therapeutische Nutzung von endothelialen Vorläuferzellen scheint daher ein interessanter und vielversprechender Lösungsansatz zur Behandlung der myokardialen Ischämie darzustellen. Dies wurde bereits in unterschiedlichsten Studien untersucht und bestätigt.^{65, 69-71}

1.5 Phosphatidylinositol 3-Kinase/ AKT Signalkaskade

Ein Großteil der Pionierstudien mit xenogenen adulten EPCs (z.B. humanen EPCs) wurden in immunkompromittierten Empfängern (z.B. Ratten) durchgeführt. Diese wurden meistens kurz vor oder nach einer induzierten Ischämie verabreicht.⁶⁴ Dieses Vorgehen entsprach dem vermuteten Einsetzen des Ischämie-/ Reperfusionsschadens.⁷² Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) zum Beispiel, hemmt einen Ischämie-/ Reperfusionsschaden bereits vierundzwanzig Stunden nach Ischämie entscheidend.⁷³ Dies ist ein Prozess, der weit vor einer Neovaskularisation auftritt. Die angiogenetischen Wachstumsfaktoren, wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), aktivieren dabei die Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT Signalkaskade.^{74, 75}

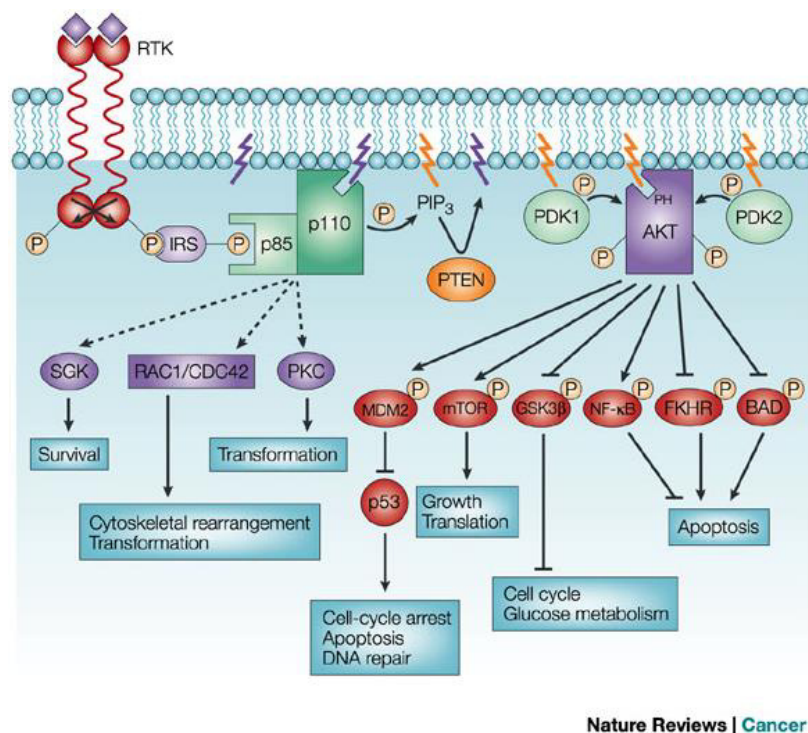


Abbildung 1: PI3-Kinase/AKT Signalkaskade

Abbildung aus Nature Reviews Cancer⁷⁶

Der PI3-Signalweg ist ein dynamischer Regulator von physiologischen und zellulären Prozessen. Die PI3-Kinasen sind an der Signaltransduktion beteiligt^{18, 76}, wobei der PI3/AKT-Signalweg noch nicht vollständig verstanden wurde. Der PI3-Signalweg kontrolliert das Wachstum von Zellen, ihre Proliferation und Migration.^{18, 76-78} Dies erfolgt unter anderem durch Wachstumsfaktoren, die an die Rezeptor-Thyrosinkinase (RTK) binden und diese aktivieren. Die RTK wiederum aktiviert die PI3-Kinase, bestehend aus zwei Untereinheiten, der p110 und der p85.^{18, 76, 79} Sie katalysieren die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen, zum Beispiel Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), in der

Zellmembran.^{18, 79} An den sekundären Botenstoff PIP₃ können sich Proteine binden, wie die Serin-/Threoninkinase Proteinkinase B (PKB) und Phosphoinositide-dependent Kinase-1 (PDK1), wobei die PKB der AKT entspricht.^{18, 79} Die durch Phosphorylierung aktivierte PKB kann nun selbst Substrate aktivieren oder inhibieren. Bei der Phosphatase PTEN handelt es sich in dieser Kaskade um einen Antagonisten, der PIP₃ inaktivieren kann und einen Tumorsuppressor darstellt.^{76, 79}

1.6 Fragestellung/ Versuchskonzeption

- I. Besitzen künstlich hinzugeführte embryonale endotheliale Vorläuferzellen in vivo einen kardioprotektiven Effekt?

- II. Über welche Mechanismen und Signalkaskaden wird der kardioprotektive Effekt vermittelt?

Um diese Fragestellungen zu beantworten wurde ein experimentelles Ischämie-/ Reperfusionen-Modell erstellt. Hierfür wurden Landschweine als Versuchstiere gewählt. Die embryonalen endothelialen Progenitorzellen entstammten einer klonalen murinen embryonalen Zelllinie. Diese wurden mit einer endothelialen Vorläufer-Eigenschaft ausgewählt.⁸⁰ Es wurden keine embryonalen stammzellartigen Zellen gewählt, da aus vorherigen Studien bekannt ist, dass diese eine akute bis subakute Abstoßung durch den Empfänger bewirken.^{81, 82} Die Applikation von eEPCs scheint, aufgrund ihres Mangels an MHC 1 Oberflächenstruktur und der Trägheit von natürlichen Killerzellen ihnen gegenüber,⁸¹ vielversprechender zu sein. Außerdem konnte in vorherigen Studien nachgewiesen werden, dass diese eEPCs bevorzugt von hypoxischen Tumoren^{81, 83} und ischämischem Myokard⁸⁴ rekrutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Apparaturen, Medikamente und Verbrauchsmaterialien

Apparaturen

Beatmungsgerät	Ventilog®, Dräger (Lübeck)
Blutgasanalyse-Gerät	ABL 300 Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Druckabnehmer	Statham Transducer, Hellige (Freiburg) LeycomSigma-5DF, Cardiodynamics, (Zoetermeer, Niederlande)
Computer	Pentium 200 mHZ, (Deutschland)
Durchleuchtungsgerät	C-Bogen, Siemens (München)
Mikroskop	Axio Vision, Zeiss (Jena)
Perfusor	Secura FT, BIBRAUN (Melsungen)
Schrittmacher	Siemens-Elma AG (Solna, Schweden)
Sonomikrometer	Triton Technology Inc. (San Diego, USA)
Sonomikrometrie-Kristalle	Sonometrics (Ontario, Kanada)
Sonomikrometrie-Software	SonoSoft, SonoMetrics (Ontario, Kanada)

Medikamente

Acetylsalicylsäure	Aspisol®, Bayer Vital (Leverkusen)
Azaperone	Stresnil®, Janssen-Cilag (Neuss)
Cefuroxim	Cefuroxim, Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Enflurane	Ethrane®, Abbott (Hannover)
Enrofloxacin	Baytril®, Bayer Vital (Leverkusen)
Fentanyl	Fentanyl®-Janssen, Janssen-Cilag (Neuss)
Nadroparin	Fraxiparin®, GlaxoSmithKline (München)
Heparin	Heparin-Natrium, BIBRAUN (Melsungen)
Ketamin	Ketamin, Inresa (Freiburg)
Midazolam	Dormicum®, Roche (Grenzach-Wyhlen)
Piritramid	Dipidolor®, Janssen-Cilag (Neuss)
Propofol	Disoprivan®, AstraZeneca (Wedel)
Pancuronium	Pancuronium, Hikma (Gräfelfing)
Ringer-Acetat	Ringer-Infusionslösung, BIBRAUN (Melsungen)

Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH Taufkirchen erworben

AKT-1	Santa Cruz Biotechnology (USA)
AKT-Inhibitor SH-5	AG Scientific (San Diego, USA)
Anti-GFP AK	Mobitec Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Filter Biocoat	Becton Dickenson
Führungsdraht	Cordis (Miami, USA)
HTAB	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Katheter: Amplatz, Courmand, Judkins, Pigtail	Cordis (Miami, USA)
Katheterschleuse	Cordis (Miami, USA)
Katheterspitzenmanometer	SPG-572, Millar (Houston, USA)
Kontrastmittel	Solutrast®, Byk Gulden (Konstanz)
Naht-Material	Ethicon - Johnson & Johnson (Norderstedt)
p-AKT	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Peroxidase-konjugierter AK	Zymed Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PTCA-Katheter	Cordis (Miami, USA)
PTFE-Stent	Jomed (Schaffhausen)
Retroinfusionskatheter	PTC Pro-Med Technology Consult GmbH (Mödling, Österreich)
Venenverweilkanüle	Vasofix, BIBRAUN (Melsungen)
^{99m} Tc-HMPAO Ceretec	Amersham Healthcare (Little Chalfont, UK)

2.2 Perkutane koronare Ballon-Okklusion als Modell der akuten Ischämie

2.2.1 Versuchstiere

Die Studie, und die damit verbundenen Tierversuche, wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz (01. Juni 1998) durchgeführt. Sie wurden nach Antrag durch die Regierung von Oberbayern autorisiert.

Die Versuchstiere der Rasse deutsches Landschwein (n= 32) wurden im Lehr- und Versuchsgut der Ludwig-Maximilians-Universität (St.-Hubertus-Straße 12, 85764 Oberschleißheim) erworben. Sie wurden in artgerechten Gruppen gehalten und durchgehend tiermedizinisch versorgt.

Alle Versuchsreihen erfolgten im Institut für chirurgische Forschung (ICF) der LMU Campus Großhadern.

2.2.2 Prämedikation, Narkoseinduktion und -aufrechterhaltung

Die Tiere waren am Versuchstag nüchtern und wurden kurz vor Beginn der Narkose in einen abgetrennten Bereich gebracht. Die Narkoseinduktion des jeweiligen Versuchstieres erfolgte dann in einer speziellen Tier-Box durch eine körporgewichtsadaptierte, intramuskuläre (i.m.) Bolusinjektion im Bereich des Hinterlaufes/Gesäßes. Hierzu wurde eine Mischinjektion aus Azaperone 10mg/kg, Ketamin 20mg/kg und Atropinsulfat 0,5 mg hergestellt und verwendet. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde den Tieren ein intravenöser Zugang mittels Venenverweilkanüle (G 20 oder G 22), bevorzugt an einer prominenten Ohrvene, gelegt. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte dann die kontinuierliche Gabe von Propofol (4-6 mg/kg/h) über eine Spritzenpumpe (Perfusor). Zur Analgesie wurde Fentanyl (1-3 µg/kg) verabreicht und die Versuchstiere nach optimaler Lagerung auf den Rücken mit einem speziell angefertigten Laryngoskop endotracheal intubiert (Magill-Tubus ID 7,0-8,0). Zur weiteren Aufrechterhaltung der Narkose während der Intervention, erfolgte eine Allgemeinanästhesie mit einem volatilen Anästhetikum (Enflurane 0,5 – 2 Vol.-%) und Fentanyl intravenös. Die Tiere wurden während der Narkose volumenkontrolliert beatmet (Ventilog®). Des Weiteren wurde eine Normovolämie angestrebt, weshalb intraoperativ kontinuierlich eine balancierte Ringer-Acetat-Lösung (ca. 8-10 ml/kg/h) infundiert wurde. Bei starker Hypotonie und Hypovolämie wurde ein künstliches, kolloidales Plasmaersatzmittel (HAES 6%) verabreicht.

Nach Etablierung der oben genannten Devices und Überwachungsgeräte, wurden die Tiere in waagerechter Rückenlage auf dem Tisch fixiert.

2.2.3 Perioperatives Management

2.2.3.1 Arterielle und venöse Gefäßzugänge

Für den jeweiligen Versuch musste bei den Tieren ein chirurgischer Gefäßzugang (Katheterschleusen) etabliert werden. Primär wurde hierfür der rechte Hals des betreffenden Tieres ausgewählt. Nach Entfernen von grobem Schmutz und Haaren, wurde die Haut mehrfach sprüh- und wischdesinfiziert. Im Anschluss wurde die Haut nach Identifikation der Leitstrukturen (Muskel) unter sterilen Kautelen circa 6 cm inzidiert. Dann erfolgte die chirurgische Präparation, bis auf die Gefäßscheide und Darstellung der A. carotis communis sowie der V. jugularis externa. Das betreffende Gefäß wurde mit einer Ligatur distal verschlossen und die Gefäßwand im rechten Winkel zum Verlauf inzidiert. Daraufhin konnte in Seldinger-Technik in die Arterie eine 9-F-Schleuse und in die Vene eine 11-F-Schleuse gelegt werden. Die Schleusen wurden an der naheliegenden Muskulatur, mittels Einzelknopfnah, fixiert. Nach dem Eingriff wurden die Schleusen mit Heparin geblockt, in der Wundhöhle versenkt, die Wunde vernäht sowie steril verbunden. Zum Eingriff am Folgetag, beziehungsweise am 7. Tag konnte die Naht wiedereröffnet und die Schleusen benutzt werden. In seltenen Fällen waren die Schleusen thrombosiert und die zuvor genannte Prozedur musste auf der linken Halsseite wiederholt werden.

2.2.3.2 Thrombose- und Infektionsprophylaxe

Zur Vermeidung thromboembolischer Komplikationen am ersten Versuchstag bei der Katheter-Intervention erfolgte eine Antikoagulation mit 20.000 IE unfraktioniertem Heparin intravenös. Außerdem wurden additiv 500 mg Acetylsalicylsäure i.v. gegeben. Des Weiteren erhielten die Versuchstiere bis zum Versuchsende täglich 100 mg Acetylsalicylsäure per os. Zur Infektionsprophylaxe wurde eine dreitägige perioperative i.v.-Antibiose mit Cefuroxim 750 mg verabreicht. Ergab sich im postoperativen Beobachtungszeitraum der klinische Verdacht einer Wund- oder Blutstrominfektion, erhielten die Versuchstiere eine tägliche intramuskuläre Antibiose (Enrofloxacin).

2.2.3.3 Monitoring der Vitalparameter

Die Vitalparameter aller Tiere wurden bei jedem Versuch kontinuierlich überwacht. So wurde die Sauerstoffsättigung durchgehend transkutan gemessen, die Ventilation durch Blutgasanalysen (BGA) im Intervall kontrolliert und im Bedarfsfall angepasst. Die Herzaktion wurde über ein Elektrokardiogramm (EKG) mittels Klebeelektroden und einer Monitoranlage abgeleitet. Weiter erfolgte eine kontinuierliche invasive Blutdruckmessung über die zuvor chirurgisch platzierte arterielle Schleuse. Die Körpertemperatur der Tiere wurde über eine rektal eingebrachte Mess-Sonde bestimmt und bei Bedarf durch Wärmemaßnahmen (Decken, warme Infusionen) angehoben.

2.2.4 Selektive Absaugung und druckregulierte Retroinfusion

Die Methode der selektiven Absaugung und der druckregulierten Retroinfusion, englisch „selective suction and pressure-regulated retroinfusion“ (SSR), wurde von Boekstegers et al. konzipiert und erstmalig 1990 vorgestellt. Hierbei wurde das bereits vorhandene Konzept der synchronisierten Retroperfusion (SRP) aufgenommen und modifiziert. Sie wurde in Kollaboration mit ProMed Technology Consult, Mödling, Österreich entwickelt und vermarktet.⁸⁵

Die Methode benötigt einen speziellen 4-Lumen-Katheter, ähnlich einem Pulmonalkatheter (Swan-Ganz). Dieser hat ein Infusions-Lumen, ein Lumen für die Absaugung, ein weiteres zur Ballon-In-/ deflation und das letzte zur Druckmessung im Gefäß.⁸⁵⁻⁸⁷ Das System besteht dazu analog aus einem Exzenter-Ventil, einer Absaugung, einer Rollerpumpe sowie einem Extrakorporal-Kreislauf mit einem Hochdruckreservoir.⁸⁵⁻⁸⁷ Das Gerät ist zudem mit einem Druckabnehmer und einer Ballonpumpe ausgerüstet.⁸⁵⁻⁸⁷ Nach der Entlüftung des Systems mit NaCl 0,9%, werden die Schenkel des SSR-Katheters mit den korrespondierenden Anschlüssen der Druckmessung, Pumpe, Reservoir und Absaugung konnektiert. Im Anschluss wird Blut aus dem zuvor etablierten, arteriellen Gefäßzugang in das System gepumpt. Nach Einführen des Katheters in die venöse Schleuse unter angiologischer Kontrolle wird dieser, nach Aufsuchen des Sinus coronarius, in der AIV positioniert. Vor dem Start jeder Retroinfusion muss zunächst das Gefäß durch Inflation des Katheterballons okkludiert werden. Die AIV wird dann mittels Absaugung evakuiert und ist dann blut-/ infusatleer. Dieser Vorgang wiederholt sich in jedem Zyklus. Das im Reservoir vorgehaltene Blut/ Retroinfusat kann nun retrograd über die anteriore interventrikuläre Vene (AIV) injiziert werden. Die Infusion der jeweiligen Substanzen erfolgt dabei ebenfalls zyklisch/pulsatil und

ist, wie bei einer Kardioversion, R-Zacken getriggert. Dies ermöglicht sowohl eine gezielte Applikation in der Diastole, aber theoretisch auch in jeder anderen Phase der Pumpaktion des Herzens.⁸⁵⁻⁸⁷

Es erlaubt auch die Gabe von eEPCs. Die verschiedenen Möglichkeiten der Applikation der eEPCs wurden bereits ausführlich evaluiert. Dabei erwies sich die Methode der SSR am effektivsten. Das Verfahren führte, im Vergleich zu anderen Techniken, zu einer deutlich erhöhten Rekrutierung von eEPCs im Ischämieareal. Um die AIV nicht zu rupturieren oder spitzendruckbedingte Schäden zu verursachen, erfolgt eine kontinuierliche Druckmessung im Applikationsschenkel (Transonic© Flowprobe, Transonic Systems Inc.). Die applizierten Drücke werden dabei durch das Exzenter-Ventil geregelt. Diese Druckregulation verhindert nicht nur Gefäßschäden, sondern garantiert dabei auch eine effektive Verabreichung und Rekrutierung der gewünschten Substanzen.

2.2.5 Sonomikrometrie

Die regionale Myokardfunktion spiegelt entscheidend die Beeinträchtigung der myokardialen Perfusion wider. Sie lässt sich durch unterschiedliche Methoden messen. Als ein moderneres diagnostisches Mittel gilt jedoch heute die kardiale Magnetresonanztomografie. Zum Zeitpunkt dieser Forschungsarbeit war die Sonomikrometrie der „Goldstandard“.⁸⁸ Die Sonomikrometrie bedient sich der Ultraschall-Laufzeit-Messmethode.⁸⁹ Zwei sphärische piezoelektrische Ultraschallkristalle (Ø ca. 2 mm) messen die Distanz zwischen einander. Dies funktioniert wie folgt: ein Kristall sendet ein Ultraschallsignal (5MHz) aus, der andere Kristall empfängt dieses Signal zeitverzögert und übermittelt dies an die Messeinheit, wobei jeder der zwei Kristalle sowohl als Transmitter, als auch als Responder fungieren kann (s. Abb. 2 & 3).⁹⁰ Hier macht man sich den inversen und den direkten piezoelektrischen Effekt zu nutze. Beim inversen Effekt entsteht nach Anlegen eine periodische Verformung der Kristalle und es werden mechanische Schwingungen (=Schallwellen) erzeugt. Im Gegenzug können beim direkten Effekt die entstandenen Schallwellen ein piezoelektrisches Element verformen. Dabei wird eine ableitbare elektrische Spannung induziert.⁹⁰

Ein Computer errechnet dann den Abstand der beiden Kristalle (s) aus der Laufzeit des Ultraschallsignals (t) und der Schallausbreitungsgeschwindigkeit (v) anhand folgender Formel:

$$s \text{ (Abstand Kristalle)} = v \text{ (Schallausbreitung)} \times t \text{ (Laufzeit)}$$

Formel 1: Kristallabstand

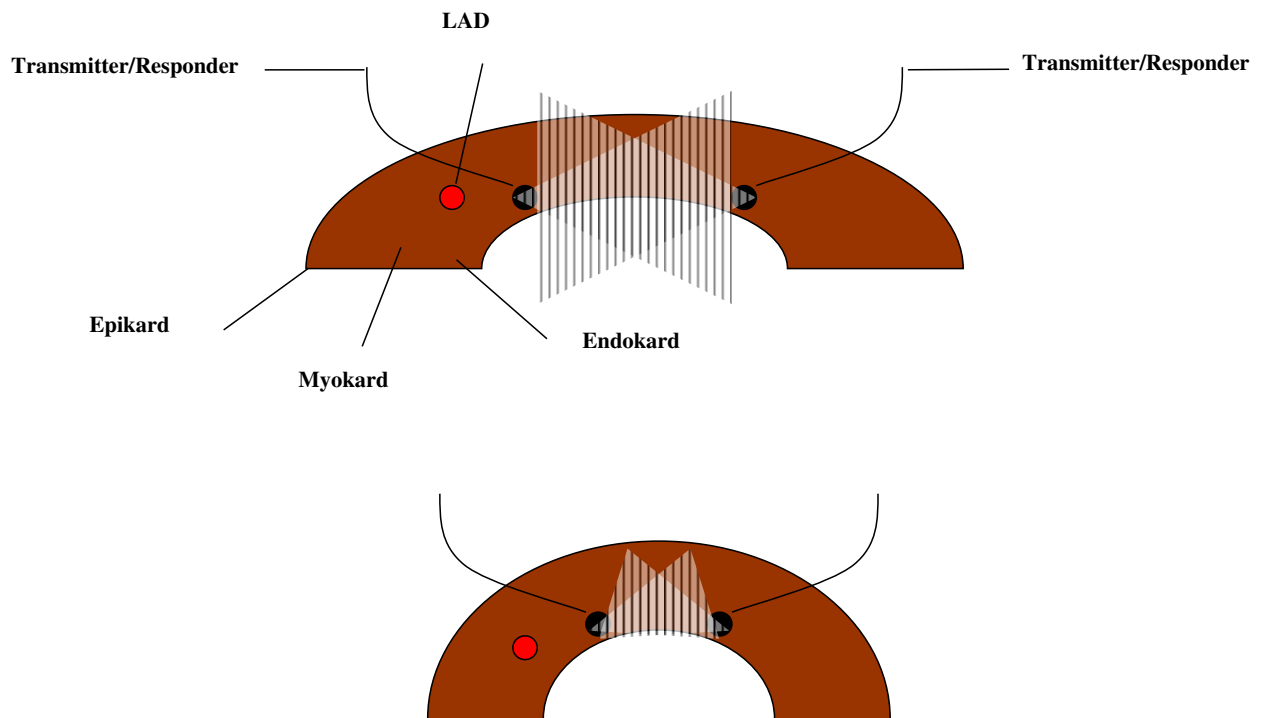


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lage der implantierten Kristalle und der Messung

Transversalebene

Es besteht eine Abhängigkeit des Auflösungsvermögens von der exakten Detektion der empfangenen Schallwellen sowie von der Laufzeitbestimmung. In weichem Gewebe, z.B. dem Myokard, wird eine durchschnittliche Ausbreitungsgeschwindigkeit des Ultraschalls von 1540 m/s angenommen und der von Blut gleichgesetzt (~1500-1560m/s). Bei einer Abtastrate von ungefähr 65 MHz ergibt sich rechnerisch ein räumliches Auflösungsvermögen von 24 μm . Daher kann die Segmentverkürzung mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung bestimmt werden und spiegelt damit sehr präzise die myokardiale Perfusion wider.⁸⁹ Dies gelingt auch bei einer hohen Herzfrequenz.

Die lokale Kontraktilität lässt sich anhand folgender Formel berechnen:

$$SS (\%) = (EDL - ESL) * \frac{100}{EDL}$$

Formel 2: Segmentverkürzung

SS = Segmentverkürzung, EDL = Enddiastolische Länge, ESL = Endsystolische Länge

Die Ermittlung der optimalen Messzeitpunkte wurde durch Heimisch et al. beschrieben und festgelegt. Diese gelten als allgemein anerkannte Referenzwerte. Sie erfolgen unter Zuhilfenahme der Ableitung der Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel. Dabei wird das Ende der Diastole als Moment kurz vor Beginn einer positiven Druckänderung = EDL ($dLVP/dt$ [mmHg/s]) definiert und das Ende der Systole beziehungsweise endsystolische Länge = ESL als maximaler Abfall des Druckes ($dLVP/dt$ min [mmHg/s]).⁹⁰

Um nun die regionale Myokardfunktion, wie oben beschrieben messen zu können, musste beim jeweiligen Versuchstier eine totale longitudinale Sternotomie durchgeführt werden. Nach Narkosevertiefung und ausreichender Analgesie erfolgte eine langstreckige Inzision der Haut mit einem Skalpell über dem Sternum vom „Jugulum“ bis Processus xiphoideus. Nach stumpfer Freipräparation bis auf das Sternum, wurde dieses dann mit einer Knochenzange durchtrennt. Entstehende Blutungsquellen am geöffneten Knochenmark wurden mit Knochenwachs versiegelt, Blutungen aus Arterien auch koaguliert oder sogar ligiert. Im Anschluss wurde ein Thoraxspreizer eingesetzt und der Thorax vorsichtig aufgedehnt.

Am nun freiliegenden Herzen wurde daraufhin der Perikardbeutel inzidiert und mit einer Schere unter Berücksichtigung der anatomischen Strukturen eröffnet. Als Messbereiche wurden standardisiert das Infarkt Areal, ein Risiko-Infarkt-Areal (AAR) und ein Nicht-Infarkt-Areal im Versorgungsgebiet der RCx ausgewählt. Nach Identifizierung der Messbereiche wurde das Epi-/ Myokard mit einem Stichskalpell im definierten Abstand inzidiert, ohne dabei das Endokard zu perforieren. Die Positionierung erfolgte orthograd in einer Distanz von circa 10 – 20 mm parallel zu den Myokardfasern. Jeweils zwei Piezokristalle wurden dann stumpf manuell bis zum elastisch federnden Endokard vorgeschoben. Wie zuvor erwähnt wurden zwei Kristalle im ischämischen Myokardareal (LAD proximal und LAD distal) positioniert und zwei weitere Kristalle im nichtischämischen Bereich (RCX) platziert (s. Abb. 2 & 3).

Der Versuchsaufbau sah dann eine Messung der regionalen Myokardfunktion in Ruhefrequenz und bei Pacing mit 120/bpm beziehungsweise 150/bpm vor. Die erfassten Abstandsdaten der Kristalle wurden zusammen mit dem linksventrikulären Druck und dem EKG kontinuierlich für die spätere Auswertung mittels spezieller Software des Herstellers aufgezeichnet. Standardisiert wurden dann jeweils fünf Herzzyklen analysiert und die resultierenden Mittelwerte in die Formel 2 eingesetzt.

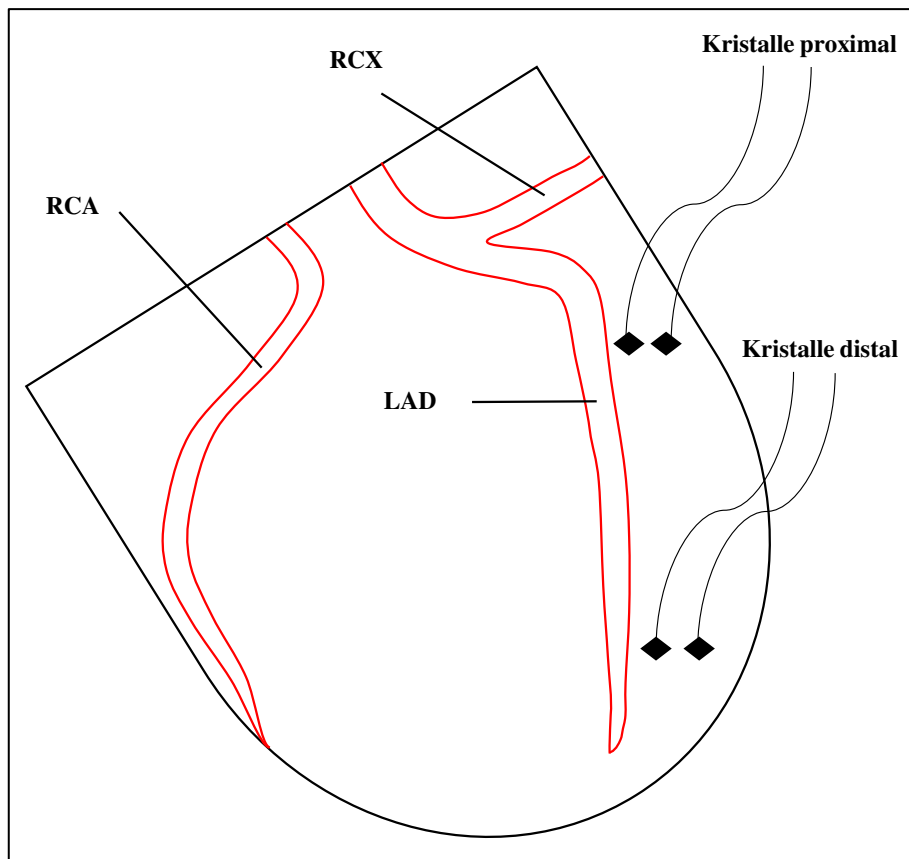


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Position der Sonomikrometrie-Kristalle

Koronarebene, RCA= Right coronary artery, RCx = Ramus circumflexus, LAD = Left anterior descending

2.2.6 Vitalitätsbestimmung der Myokardzellen/ TTC-Test

Der TTC oder Formazan Test wird benutzt um die metabolische Aktivität einer Zelle oder eines Gewebes zu bestimmen. Man kann auch von einer „Vitalfärbung“ sprechen. Die TTC-Färbung/ Test beruht auf dem Prinzip einer Farbindikator-Reaktion. So verfärbt sich das wasserlösliche und farblose Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) durch Reaktion mit vitalen Zellen.⁹¹ Diese basiert auf einer Redox-Reaktion, die durch unterschiedliche Dehydrogenasen der Zelle induziert wird. Es nimmt die Elektronen der Atmungskette auf und wird zu rotem Formazan (Triphenylformazan) umgewandelt. Nach einem Zelltod kommt es zu einer raschen Inaktivierung der Dehydrogenasen. Der Test ist also nur bei vitalen Zellen oder Geweben positiv.

In diesem Experiment wurde mit der TTC-Färbung die Infarktgröße quantifiziert (s. Kapitel 2.3.4).

2.2.7 Isolierung und Kultivierung muriner eEPCs

Die verwendeten eEPCs wurden nicht von unserer Arbeitsgruppe kultiviert, sondern von einem Fremdlabor (Dr. A. Hatzopoulos) erworben. Die klonierten Zellen wurden bis zum jeweiligen Versuch für 60 Tage in einem Nährmedium aufbewahrt. Das genaue Vorgehen zur Isolierung der Progenitorzellen hat Dr. Hatzopoulos in einer Arbeit 1998 erläutert.⁸⁰

2.2.8 Präparation, Isolierung und Kultivierung neonataler Ratten-Kardiomyozyten

Die ventrikulären Myokardzellen wurden von 200 g bis 250 g schweren Ratten isoliert. Die Methode nach der die neonatalen ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten isoliert und kultiviert wurden, wurde von Ladilov 1998 beschrieben.⁹²

2.3 Therapeutische eEPC-Gabe im akuten ischämischen Myokard

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die druckkontrollierte retrograde Applikation von embryonalen endothelialen Progenitorzellen einen Einfluss auf die myokardiale Infarktgröße und postischämische Myokardfunktion nach einer akuten Ischämie hat.

In dieser Forschungsarbeit wurden insgesamt 32 Schweine mittels beschriebenen Studienaufbau untersucht.

2.3.1 Versuchstag 0: Induktion einer akuten Ischämie

Die Versuchstiere wurden narkotisiert und präpariert (s. Kapitel 2.2.2). Nach Implantation der arteriellen Schleuse wurde unter Röntgen- und Kontrastmittelkontrolle ein Angioplastiekatheter in die LAD eingebracht. Der Ballon wurde dann distal der Bifurkation des ersten Diagonalasts mit 4 atm (0,41 MPa)

inflatiert. Die vollständige Ballonokklusion der LAD wurde für die Dauer von 60 Minuten aufrechterhalten und die Erfolgskontrolle der Okklusion durch eine Angiographie bestätigt. Nach Ablauf der 60-minütigen Ischämiezeit wurde der Katheter-Ballon entlüftet und gezogen. Die nun einsetzende gewünschte Reperfusion des Ischämiegebietes wurde ebenfalls mittels Kontrastmitteldarstellung radiologisch gesichert.

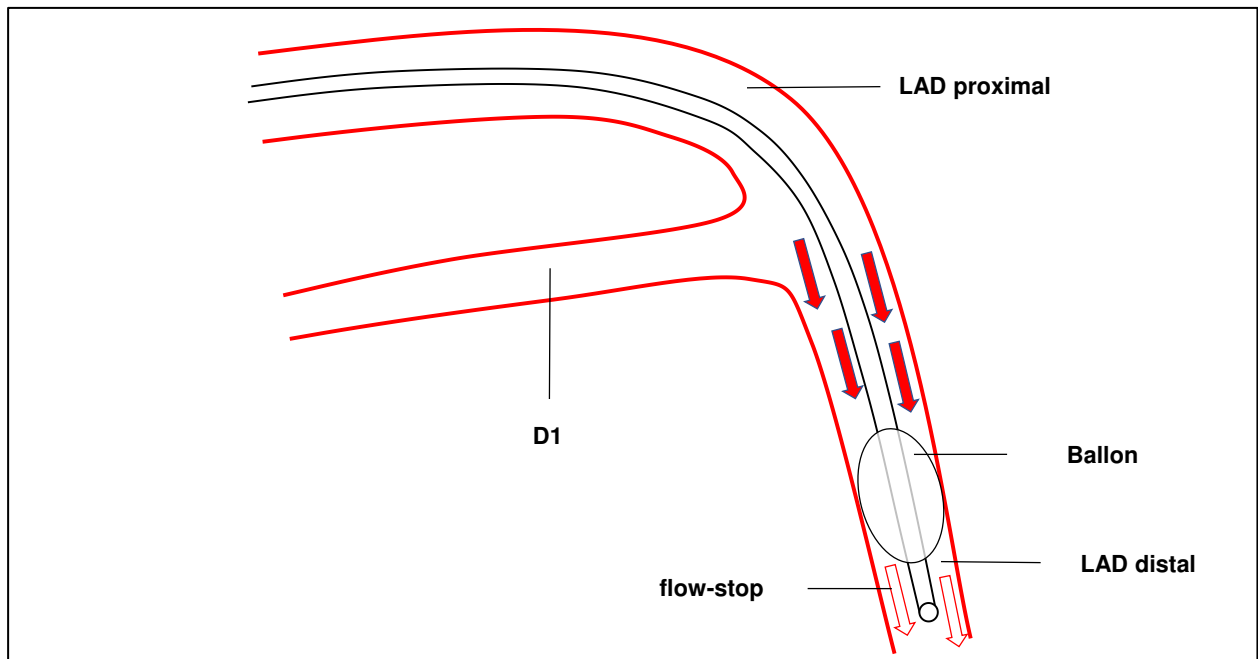


Abbildung 4: Ausschnitt LAD nach Ballon-Okklusion.

D1 = Ramus diagonalis 1

2.3.2 Versuchstag 0: eEPC-Gabe nach 55 Minuten Ischämie

Am Tag 0 sah das Versuchsprotokoll vier verschiedene Applikations-Gruppen vor. In jeder Versuchsreihe begann die Applikation in der 55. Minute nach LAD-Okklusion und endete 5 min nach Reperfusion. In jeder Gruppe wurde die LAD-Okklusion bis zur 60. Minute der Ischämie aufrechterhalten und der Beginn der Reperfusion angiografisch verifiziert und dokumentiert.

In der ersten Versuchsgruppe (n=6) erfolgte die Applikation der eEPCs (5×10^6 Zellen pro Tier) systemisch über die Vena jugularis externa. In den drei anderen Gruppen erfolgte die Applikation mit einer isothermen Tyrode-Lösung (25 ml/min) retrograd über den SSR-Katheter in die AIV. In der ersten retrograden Infusionsgruppe (n=6) wurde die Tyrode-Lösung mit 5×10^6 eEPCs appliziert. Davon wurde der Hälfte dieser Gruppe (n=3) noch der Selektin-Antagonist Fucoidin (1 mg/ml) hinzugegeben. In der zweiten Gruppe

(n=6) wurden 5×10^6 eECs gegeben. Bei der letzten Gruppe (n=6) handelte es sich um eine Kontrollgruppe. Diese erhielt lediglich nur die Tyrode-Lösung ohne Zellen.

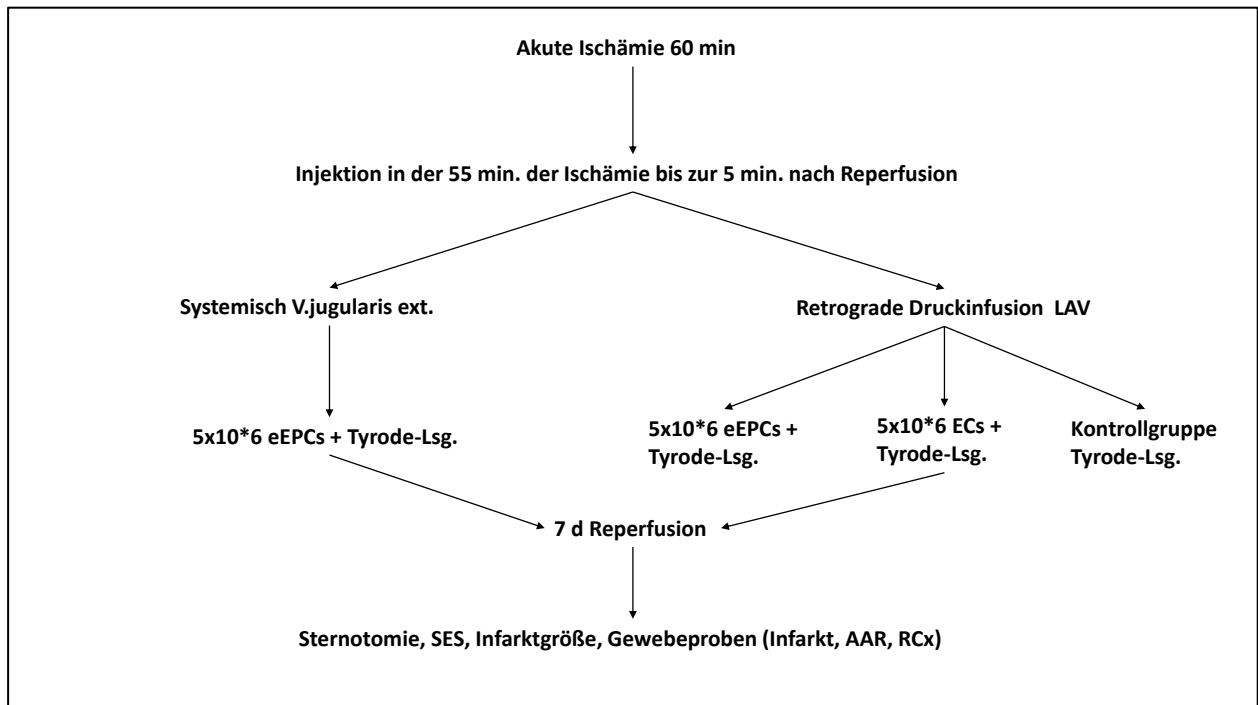


Abbildung 5: Versuchsaufbau 7 Tage Reperfusion

2.3.3 Versuchstag 1

2.3.3.1 Versuchstag 1: eEPC-Gabe nach 24 Stunden Reperfusion

In einer Untergruppe der Versuchsreihe wurde die Reperfusionsphase auf 24 Stunden begrenzt. Hier erhielt eine Gruppe (n=4) die Tyrode-Lösung mit den eEPCs (5×10^6), eine weitere wieder nur die Lösung alleine (n=4). In beiden Gruppen wurde Wortmannin ($20 \mu\text{g}/\text{kg}$) koappliziert. Bei dieser gewählten Dosierung konnte kein signifikanter Unterschied zu Kontroll-Experimenten mit einer alleinigen Wortmannin-Infusion festgestellt werden.

Am Ende des Versuches, 24 Stunden oder sieben Tage nach Ischämie, wurden die Tiere vorbereitet und die beschriebenen Messungen durchgeführt.

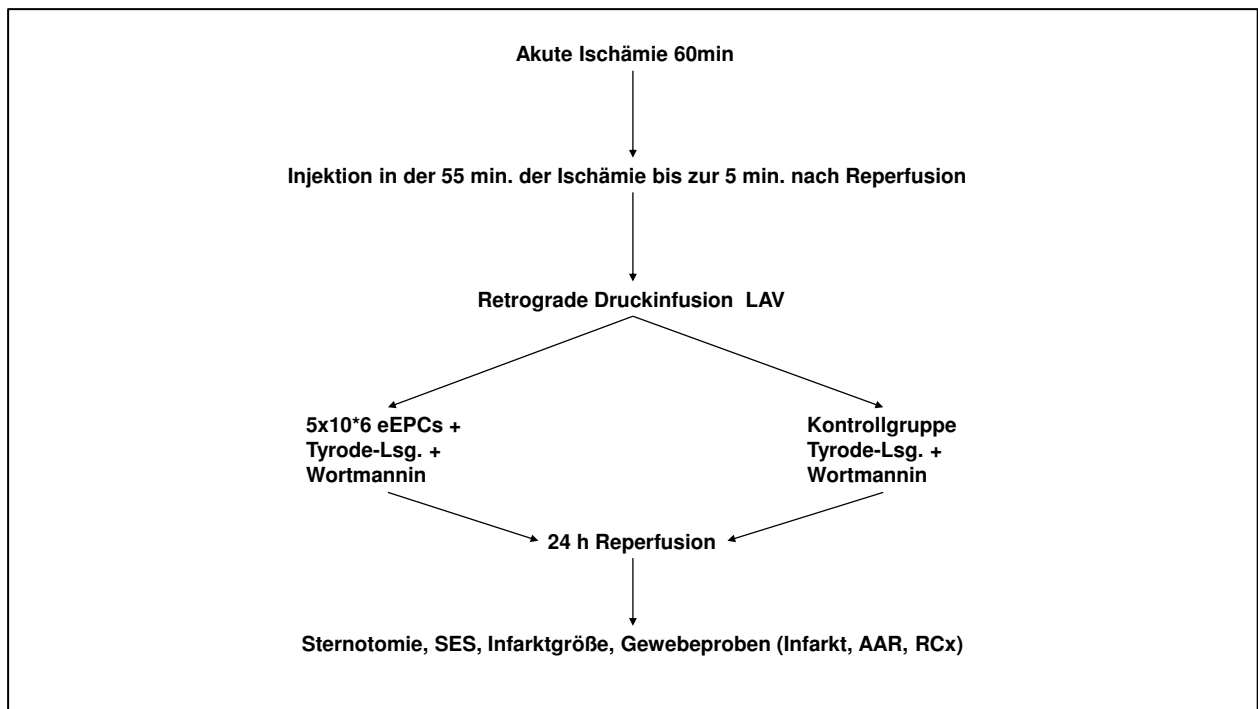


Abbildung 6: Versuchsaufbau 24 h Reperfusion

2.3.3.2 Versuchstag 1: Erfassung Myokardfunktion und -Infarktgröße

Eine Versuchsreihe endete an Tag 1. Zum Ablauf siehe Kapitel 2.3.4

2.3.4 Tag 7: Erfassung der Myokardfunktion und - Infarktgröße

Am Ende des Experimentes wurde nach Narkosevertiefung die Sternotomie durchgeführt. Mit einem Pigtail-Katheter und Kontrastmittel wurde zuvor eine linksventrikuläre Angiographie durchgeführt und dokumentiert. Des Weiteren wurde eine atriale Pacing-Sonde zur sonomikrometrischen Messung nahe dem Sinusknoten positioniert und die korrekte Lage mittels Testpacing und parallel abgeleitetem EKG verifiziert. Dann wurden die Sonomikrometrie-Kristalle platziert. Die regionale Myokardfunktion (SES) wurde dann unter Ruhebedingungen und unter Pacing bei 120 bpm beziehungsweise 150 bpm bestimmt. Vor dem medikamentös induzierten Herzstillstand wurden zur Ausschluss-Färbung 20 ml Methylenblau in den linken Ventrikel injiziert. Hierzu wurde die LAD am proximalen Ende mit einem Faden ligiert und

sogleich Methylenblau intraatrial in das noch schlagende Herz injiziert bis sich das Myokard der anderen Versorgungsgebiete gefärbt hatte. Hiermit konnte eine „Negativ“-Färbung des Infarkt-Risiko-Areals erreicht werden. Im Anschluss wurde die Infarktgröße quantifiziert. Dazu wurde die TTC-Färbung/ -Reaktion genutzt. Nach Sicherstellung einer ausreichende Narkosetiefe und Analgesie des jeweiligen Versuchstieres, wurde es mit einer letalen Dosis Kaliumchlorid 7,45% (20 ml) in den linken Ventrikel euthanasiert. Nach visuell gesichertem Herzstillstand wurde das Herz standardisiert explantiert. Nach Aufsuchen des linken Koronarostiums, wurde ein Katheter in die LAD vorgeschoben und, mit einer proximalen Umstechung und Ligatur um den Katheter, ein Abfluss nach retrograd verhindert. Zunächst wurde eine postmortem Koronarangiographie durchgeführt. Dann wurden 15 ml einer 10 %-igen TTC-Lösung mit einem definierten Druck von ca. 80 – 100 mmHg installiert. Nach der chemischen Redoxreaktion färbte sich vitales Gewebe rot, das ischämische beziehungsweise avitale Gewebe blieb ungefärbt. Optisch konnte nun das infarzierte Areal quantitativ bestimmt werden. Danach wurde der linke Ventrikel in 5 mm dicke axiale Scheiben geschnitten und diese einzeln digital fotografiert. Die Bilder wurden dann computer- und softwareassistent (SigmaScan) vermessen. Somit konnte die Infarktgröße des Infarktareals, der AAR, der RCx und des gesamten linken Ventrikels jeder Scheibe ermittelt werden. Die jeweilige Größe wurde in % des gesamten linksventrikulären Volumens angegeben. Es wurden dann jeweils 2 Scheiben jedes Gebietes (Infarkt, AAR, RCx) präpariert und in Formalinlösung für die spätere immunohistologische Untersuchung konserviert. Zum Vergleich der Myokard Gewebeproben wurden Kontroll-Gewebeproben aus der Lunge, Leber, Nieren, Milz, Muskel, Haut und aus dem zirkulierenden Blut entnommen.

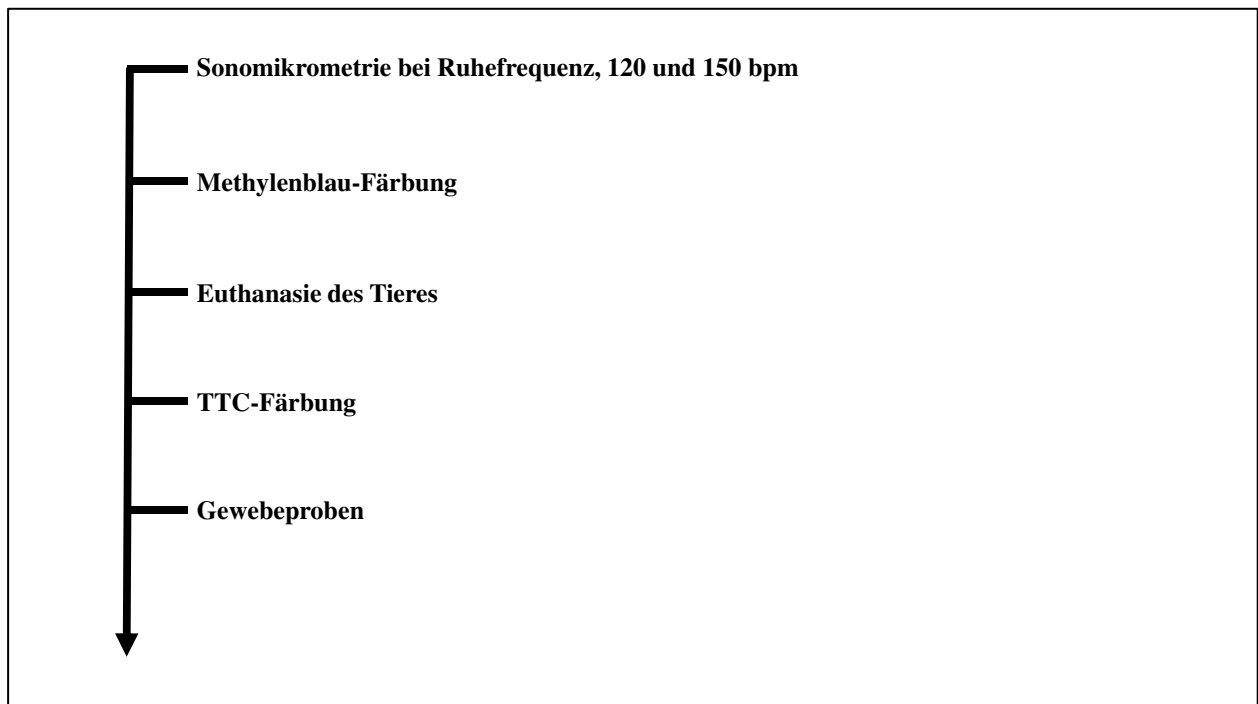


Abbildung 7: Versuchsende Tag 1 oder 7

2.4 Immunologische Aufarbeitung

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der erhöhten eEPC Anreicherung/ Rekrutierung im Ischämieareal durch die Methode der SSR, wurden unterschiedliche immunologische Untersuchungen durchgeführt. Deshalb wurden jeweils zwei Scheiben aus den Gebieten Infarkt, AAR und RCx entnommen.

Es erfolgte ein Immunoblotting, eine Immunhistochemie, ein Myeloperoxidase und TUNEL-Assay.

2.4.1 Immunoblotting

Das Immunoblotting, auch Westernblot genannt, ist eine Technik bei der Gewebeproben oder schon gelöste Proteine auf eine Trägerschicht gegeben werden. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (Elektrotransfer) wird das Proteingemisch dann entsprechend seines isoelektrischen Punktes, Molekulargewichtes oder elektrischer Ladung aufgetrennt. Beim eigentlichen Westernblotting wird das Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese in einer Trägermatrix aufgetrennt. Die Auftrennung kann alternativ auch durch einen Kapillar- oder Vakuumtransfer erfolgen. Die Proteine wandern aus dem Gel auf eine Membran (z.B. Nitrozellulose, Nylon, Glasfaser), meistens aber Polyvinylidendifluorid-(PVDF). Die nun eingewanderten Proteine werden auf der Membran immobilisiert und die verbliebenen freien Stellen für eine Proteinbindung blockiert. Dies erfolgt unter Zuhilfenahme eines für den Antikörper nicht detektierbaren Proteins oder chemischen Polymers (Milchpulver, Rinderserumalbumin, Polyvinylpyrrolidon, etc.). Es können nun keine unerwünschten Proteine an der Membran haften und eine unerwünschte Färbung in der AK-Färbung bewirken. Die Detektion der einzelnen gesuchten Proteine gelingt über ihre Epitope. Hier bindet ein sogenannter Primär-Antikörper, an den ein hochspezifischer Sekundär Antikörper bindet. Dieser sekundäre Antikörper kann nun, durch eine an ihn gekoppelte Enzymreaktion, nachgewiesen werden. Er kann aber auch radioaktiv markiert sein.

Die Gewebeproben wurden direkt nach Entnahme und Bearbeitung in einer Pufferlösung (Phosphatase und Protease-Inhibitoren) aufbewahrt. Diese wurden dann zur Verarbeitung mittels Aceton und Trockeneis auf 12 %-igen sodium dodecyl sulfate (SDS)-Polyacrylamid-Gelen eingefroren. Nach dem Übertragen und Immobilisieren auf einer PVDF-Membran wurden anschließend zur Detektion AKT-1 und p-AKT Antikörper hinzugegeben.⁹³

2.4.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie oder auch Immunzytochemie sind Methoden bei denen Gewebestrukturen/ Proteine/ Antigene mit immunchemischen Verfahren sichtbar gemacht werden können. Die Methode macht sich die Anziehung und Bindung von Antikörpern mit einer bestimmten Oberflächenstruktur (Antigen) zu Nutze. Um eine Bindung sichtbar zu machen, werden die Antikörper mit einem Indikator (Farbstoff) versehen. Werden die Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, dann handelt es sich bei der Untersuchung um eine Immunfluoreszenz. Es gibt die „direkte“ und „indirekte“ Färbung. Bei ersterer ist der primäre Antikörper mit einem Indikator versehen. Bei der „indirekten“ Variante nutzt man zunächst auch einen primären, allerdings unmarkierten Antikörper, der eine Bindung mit einem Epitop eingeht. In einem zweiten Schritt wird ein sogenannter sekundärer Antikörper hinzugegeben, der farbmarkiert ist und sich speziell an den primären Antikörper bindet.

Die Immunhistochemie unterscheidet sich von der Immunzytochemie dadurch, dass letzteres an intakten Zellen durchgeführt wird, bei denen die meiste extrazelluläre Matrix entfernt wurde. Die Proben der Immunhistochemie bestehen aus Gewebe mit intakter Struktur und anderen Zellen die im Gewebe gefunden werden können. Die Immunzytochemie ist eine Technik, die angewandt wird, um ein spezifisches Protein oder AG in Zellkulturen/-lösungen mittels spezifischer AK darzustellen

Die eEPCs wurden mit einem rekombinanten adeno-assoziierten Virus transfiziert. Dieser enthielt Enhanced-Grün-Fluoreszierendes-Protein (EGFP) und ein Hygromycin-Resistenzgen. Der Virus wurde dann unter Hygromycin (100 µg/ml) selektioniert, um eine Transfektions-Effektivität (> 90%) und eine lange Expressions-Periode (> 4 Wochen) zu erreichen.⁹⁴

Die jeweiligen Gewebeproben wurden nach Entnahme sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren immunhistochemischen Aufarbeitung wurden diese dann bei -80°C aufbewahrt. Nach der immunhistochemischen Färbung wurden die positiven Antikörperreaktionen bestimmt. Dazu wurden für jede Gewebeprobe der Testregion eines Herzens insgesamt fünf Felder (jeweils 0,0875 mm²) unter dem Mikroskop ausgewertet. Zur Detektion der in unserem Versuch verwendeten eEPCs wurde ein Kaninchen Anti-GFP-Antikörper und ein sekundärer Peroxidase-konjugierter Antikörper eingesetzt.

2.4.3 Vitalitätsbestimmung der Ratten-Kardiomyozyten in vitro

Nachdem die Kardiomyozyten auf eine 6-Loch Platte „gepflanzt“ wurden, wurde für 4 Stunden eine Hypoxie induziert, gefolgt von einer einstündigen Reoxygenierungsphase. Wo es testbedingt notwendig

war, wurden die eEPCs vor der Hypoxie in einen permeablen Einsatz in die Lochplatte gesetzt. Vor der Hypoxie wurden der AKT Inhibitor SH-5 und der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin zum Kardiomyozyten-Kompartiment hinzugefügt. Am Ende des Experiments wurde Trypanblau für 2 Minuten hinzugegeben. Trypanblau ist ein Farbstoff, der die defekte Zellmembran avitaler Zellen durchdringt. Es wurden dann fünf mikroskopische Felder fotografiert und quantifiziert.⁹⁴

2.4.4 Radioaktive Markierung und Auswertung der eEPCs

Das ^{99m}Tc-HMPAO-Kit wurde mit 20 mCi (70 MBq) frischem ^{99m}Tc Eluat in einem Gesamtvolumen von 5 ml rekonstituiert. Zur Stabilisierung des Komplexes wurden nach 2 Minuten 2 ml Cobalt(II)-Chlorid Lösung (0,1 µg/µl) hinzugefügt. Das frisch hergestellte ^{99m}Tc-HMPAO (2 - 5 mCi; 74 – 185 MBq) wurde dann langsam zu der eEPC-Suspension hinzugegeben und für 10 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dies garantierte eine Effizienz der radioaktiven Zell-Markierung von 45% bis 80%. Das Zell-Überleben betrug hierbei mehr als 80%, nach 3 Stunden noch 60%. Für jedes Experiment wurde eine Zell-Suspension mit 5×10^6 eEPCs benutzt, die 1 mCi (37 MBq) enthielt.⁹⁴

Zur Auswertung der radioaktiv markierten Zellen wurde das Herz nach Explantation standardisiert transversal von der Herzbasis bis zum Apex in circa 1 cm gleich hohe Scheiben geschnitten. Diese Scheiben wurden dann in 8 gleich große Stücke geschnitten. Es wurden dann jeweils 3 Stücke aus dem Gebiet (Infarkt, AAR, RCx) gewählt. Aus den anderen Organen (Lunge, Leber, Niere, Milz, Muskel, Haut und Blut) wurden auch jeweils 3 Gewebeproben entnommen. Im Anschluss wurden diese dann in der Klinik für Nuklearmedizin (Campus Großhadern) mittels Gamma-Counter (Counts/g Gewebe) ausgewertet.

2.4.5 Myeloperoxidase Methode

Die Myeloperoxidase (MPO) wird in den Leukozyten mit ihren Unterformen gebildet und dient im weitesten Sinne der Bekämpfung von Erregern. Durch den Nachweis einer Myeloperoxidase-Aktivität gelingt somit auch der Nachweis der Anwesenheit von Leukozyten.

Nach Erstellung eines Referenzwertes des Blutes und des Leerwertes des Gewebes, wurde die MPO-Aktivität der unterschiedlichen festgelegten Messareale ausgewertet. Die gefrorenen Gewebeproben wurden zerkleinert und aufgetaut. Im Anschluss wurden diese in einer Pufferlösung (3ml 50mM

Kaliumphosphatpuffer mit 0,5% Hexadecyltrimethylammoniumbromid) suspendiert.⁹⁵ Nach mehrfachem Auf- und Abtauen sowie Ultraschallbad wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand verworfen.⁹⁵ Danach wurde die Suspension (0,1 ml) zu einem Phosphatpuffer (2,9 ml), bestehend aus O-Dianisidine und H₂O₂, gegeben.⁹⁵ Die nun beginnende Indikatorreaktion wurde spektrophoretisch bestimmt.⁹⁶

Die Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität in unserer Arbeitsgruppe basiert auf den Erkenntnissen von Xia und Zweier (1997).⁹⁷

2.4.6 TUNEL-Methode/ -Färbung

Mit der TUNEL-Methode, Abkürzung für „Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling“, können speziell die Zellkerne apoptotischer Zellen sichtbar gemacht werden. Kommt es zur Apoptose einer Zelle, so wird die Kern-DNA durch Endonukleasen zerstört. Dabei werden Molekülbestandteile freigelegt, an die dann speziell präparierte Marker binden. Diese wurden in einer vorherigen katalytischen Reaktion mit der Tdt hergestellt. In einem weiteren Schritt kann dann diese Reaktion dann sichtbar gemacht werden.

Die TUNEL-Färbung wurde an jeweils zwei Gewebeproben der Nicht-Infarkt, Infarkt und „Area at risk“-Region durchgeführt und in fünfzehn Feldern nach TUNEL positiven Zellen gesucht. Die Proben wurden mittels Farbschwellenwert und größenorientierter Bildbearbeitung unter gleichbleibender Beleuchtung computergestützt ausgewertet (KS 400 Software, Zeiss).^{94, 96}

2.5 Statistische Methoden

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Untersuchung wurde als Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Wenn sich ein statistisch signifikanter Unterschied ergab, wurden die Gruppen nach dem Student-Newman-Keuls-Test verglichen. Die Datenauswertung erfolgte computergestützt (SPSS, SPSS 13.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Betrag der Wert $p < 0,05$, so wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen als statistisch signifikant gewertet.⁹⁴

3. Ergebnisse

3.1 eEPC-Rekrutierung nach systemischer oder regionaler Applikation

Die ^{99m}Tc -markierten eEPCs wurden in diesem Versuch systemisch oder direkt in das ischämische Areal mittels selektiver Retroinfusion in die AIV gegeben. Schon eine Stunde nach Gabe konnte eine erhöhte Aufnahme von eEPCs in das ischämische Myokard registriert werden. Dieser Effekt verstärkte sich sogar durch die Retroinfusion (s. Abb. 8). Das ischämische Gebiet enthielt 0,5% der gesamt applizierten Radioaktivität bei der systemischen Gabe und 2,7% bei Retroinfusion. Der Selektin-Antagonist Fucoidin hob den Effekt der Retroinfusion vollständig auf. Hierbei handelt es sich um ein aus Blasentang gewonnenes sulfatiertes Polysaccharid. Es kann zum Beispiel die Selektin-vermittelte Leukozytenadhäsion blockieren.⁹⁸

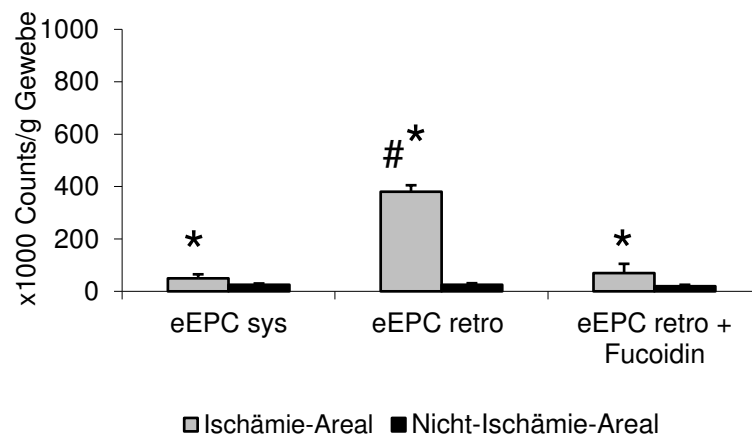


Abbildung 8: Aufnahme von ^{99m}Tc -markierten eEPCs

Aufnahme von ^{99m}Tc -markierten eEPCs im ischämischen vs. nicht-ischämischen Gewebe nach 1 Stunde nach Injektion von 5×10^6 Zellen in die V. jug.ext. (systemisch) oder in die AIV (retrograd) mit oder ohne Fucoidin (retro. + Fucoidin) das der Retroinfusion hinzugefügt wurde (1 mg/ml; n=3 pro Gruppe; * $P < 0,05$ vs. nicht-ischämisches Areal; # $P < 0,05$ vs. sys)

Erwähnt werden muss, dass die Lunge, im Vergleich zu allen anderen untersuchten Geweben (Muskel, Leber, Milz, Haut), bedeutende Mengen an eEPCs aufgenommen hat. Weil das hydrophile ^{99m}Tc , das von avitalen Zellen abgegeben wird, renal eliminiert wird, konnte auch in den Nieren eine substantielle Radioaktivität gemessen werden (s. Abb. 9). Nach 24 Stunden konnten unzählige Zellen (►) in kleineren und größeren Mikrogefäßen im Ischämiegebiet gefunden werden (s. Abb. 10 A), wohingegen die Aufnahme ins nicht-ischämische Areal begrenzt war. Am Tag 7 nahm die Menge der rekrutierten Zellen auf 42% ab (s. Abb. 10 C). Die Zellen (►) fanden sich nun an der Gefäßwand anhaftend oder waren sogar in die Gefäßwand integriert (s. Abb. 10 B).

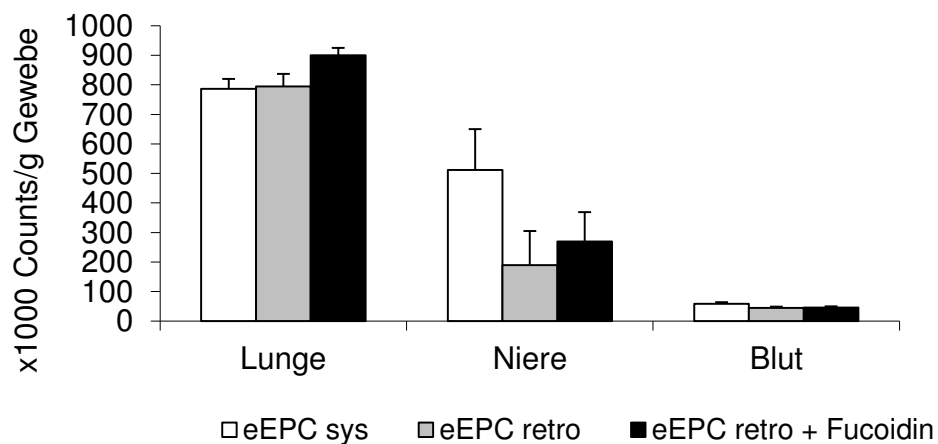
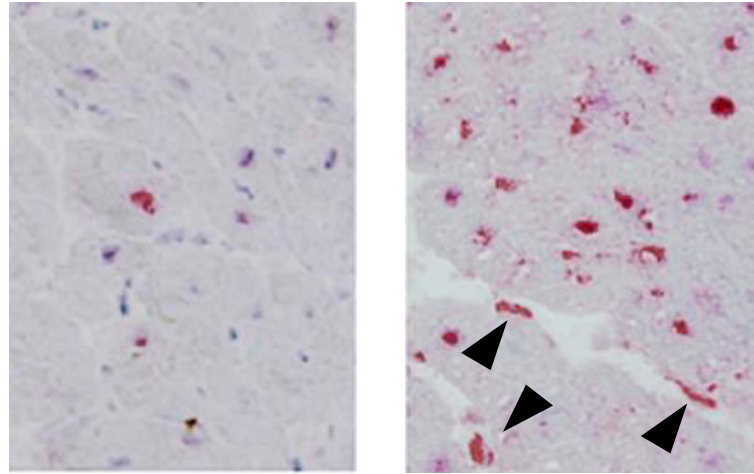


Abbildung 9: Aufnahme von ^{99m}Tc -markierten eEPCs

Aufnahme von ^{99m}Tc -markierten eEPCs in verschiedene Organe mit denselben Applikationsmodi wie in Abb.8 beschrieben.

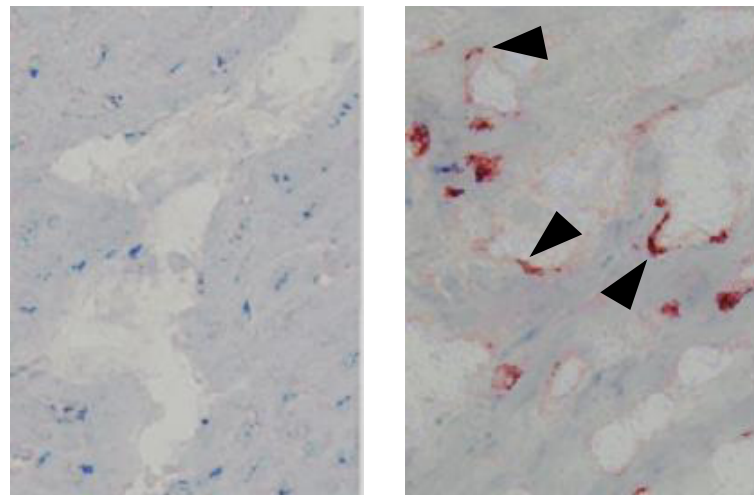
A



Nicht-Ischämie

Ischämie

B



C

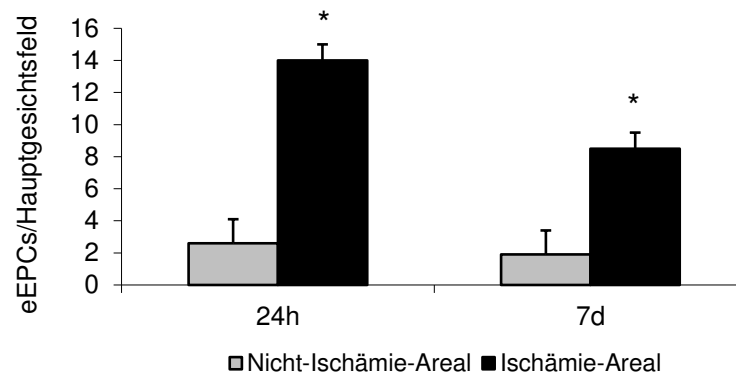


Abbildung 10: Immunhistochemische Detektion von eEPCs

Immunhistochemische Detektion von EGFP-positiven eEPCs im Nicht-Ischämieareal (linke Spalte) und dem Ischämiegebiet (rechte Spalte) nach 24 Stunden (A) und nach 7 Tagen (B) Reperfusion. ► zeigen die Adhäsion (24 h) oder Integration (7 Tage) in den größeren Gefäßen. C, quantitative Analyse des eEPC Gehaltes von drei Proben von drei Herzen pro Gruppe (* $P < 0.05$ vs. nicht-ischämischer Areal)

3.2 eEPCs verringern den Ischämie-/ Reperfusionsschaden in Schweinen

In diesem Experiment wurde der Einfluss der eEPCs auf die Infarktgröße und das Verhältnis von avitalem Myokard zum Ischämie bedrohten Areal (AAR) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von Ischämieareal zu Ischämie bedrohten Areal sieben Tage nach Retroinfusion reduziert war ($39\pm 5\%$ versus $51\pm 5\%$; Abb. 11). Die systemische Gabe von eEPCs führte zu keiner signifikanten Reduktion der Infarktgröße (44 ± 6). Auch die Retroinfusion von ECs konnte keine Reduktion bewirken ($49\pm 5\%$).

Das Ausmaß des Infarktes (AAR/LV) unterschied sich nicht in den Gruppen (s. Abb. 12).

Neben einer reduzierten Infarktgröße konnte auch festgestellt werden, dass es zu einer signifikanten Verbesserung des SES in der apikalen LAD Region kam (Abb. 13), wobei dieses Areal erfahrungsgemäß häufig von einem Infarkt betroffen ist. In der Kontrollgruppe war nur noch 23% der SES vom nicht ischämischen Areal vorhanden. Der Anteil nahm mit atrialem Pacing noch weiter ab. Dieser Effekt ließ sich weder bei der systemischen eEPC Gabe, noch bei der retrograden EC Infusion nachweisen (Abb. 13).

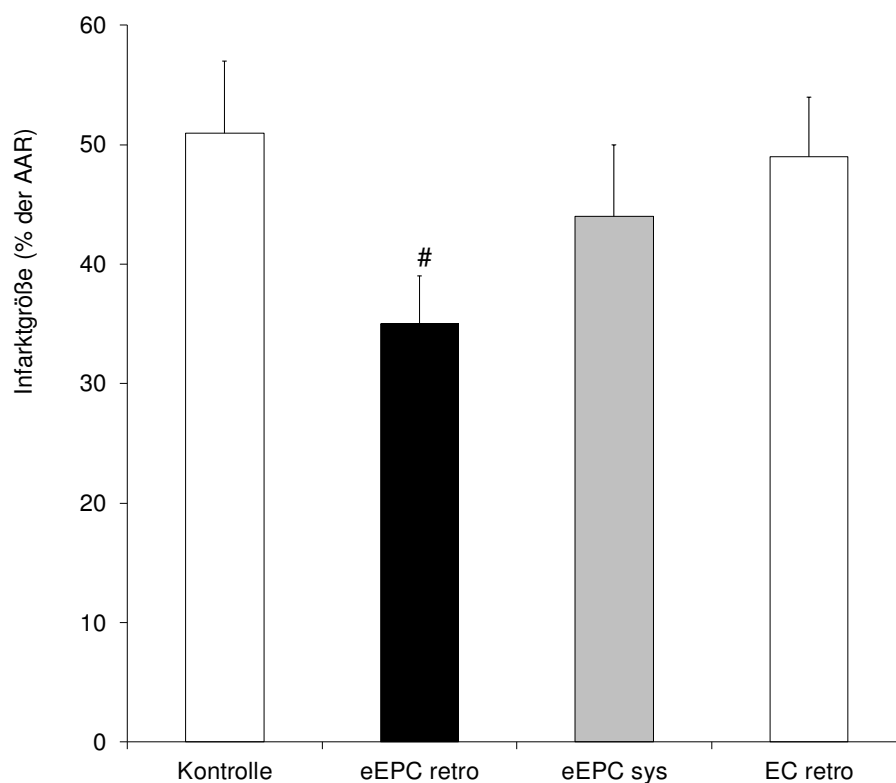


Abbildung 11: Infarktgröße 7 d

Infarktgröße (%AAR) 7 Tage nach Ischämie und Transfusion von 5×10^6 eEPCs via Retroinfusion (eEPC retro), systemische eEPC Infusion (eEPCsys) und Retroinfusion neonataler koronarer ECs (EC retro) ($\#P < 0.05$ vs. Kontrolle)

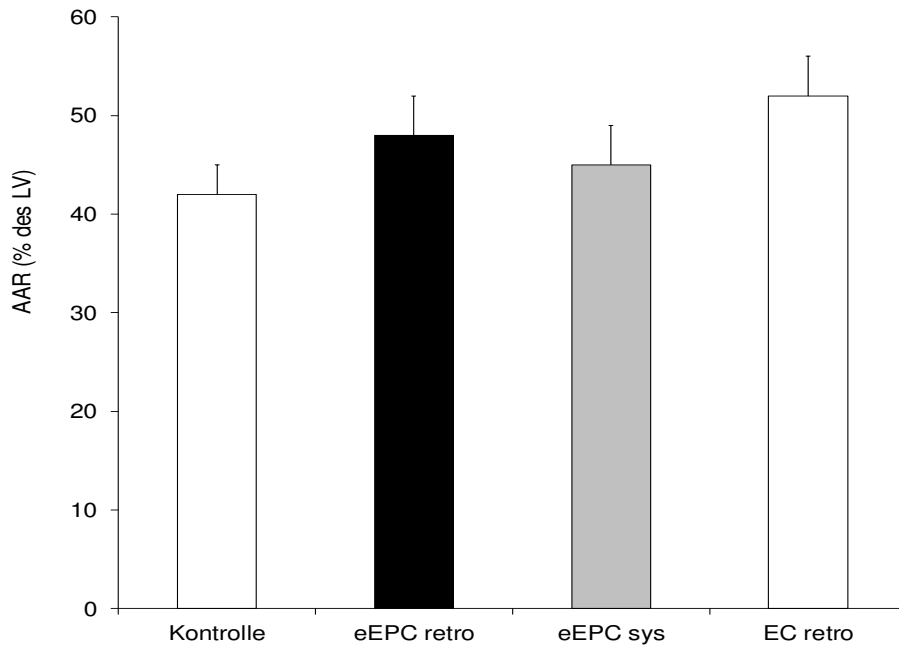


Abbildung 12: AAR/LV

AAR/LV unterschied sich nicht signifikant in den einzelnen Gruppen

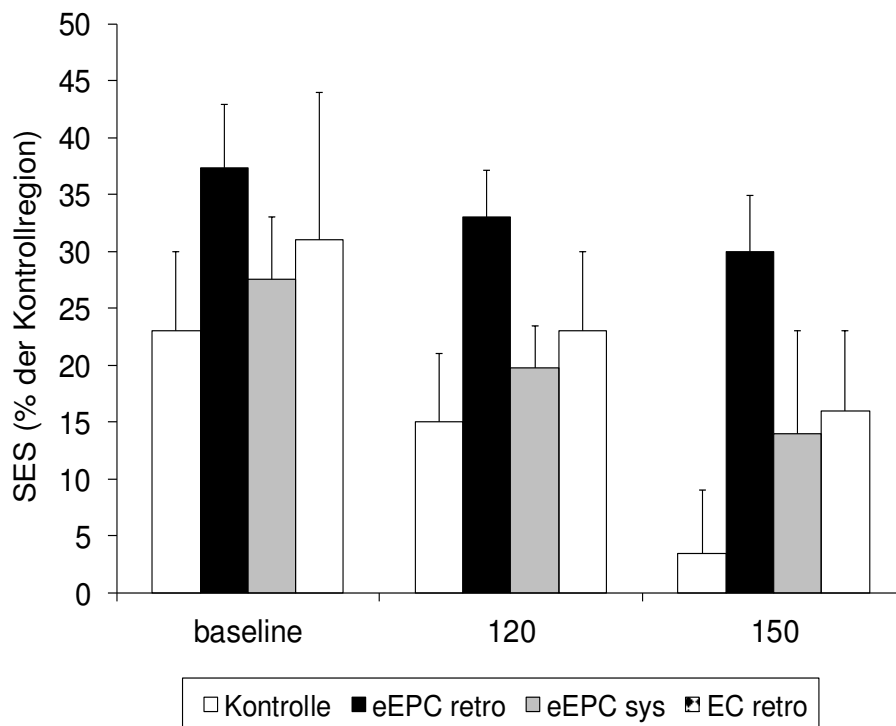


Abbildung 13: SES

SES in der apikalen LAD Region (% der nicht-ischämischen Cx Region) in Ruhe und bei atrialem Pacing mit 120 beziehungsweise 150 bpm (n=5/Gruppe); #P<0.05 vs. Kontrollgruppe)

3.3 Mechanismen der eEPC-vermittelten Kardioprotektion

Da die postischämische Inflammation eine äußerst schädliche Rolle spielt⁹⁶, wurde die Aktivität der Myeloperoxidase im postischämischen Myokardgewebe untersucht. Die MPO gilt dabei als ein charakteristisches Enzym der Granulozyten.

Nur die eEPC-Retroinfusion konnte am Tag 7 eine begrenzte Myeloperoxidase-Aktivität bewirken, die unter normalen Bedingungen im Infarktgebiet zu erwarten ist (Abb. 14). Die Myeloperoxidase Werte der Lunge unterschieden sich nicht von denen der Kontroll- oder eEPC behandelten Gruppe (1509 ± 116 und 1562 ± 151) U/g).

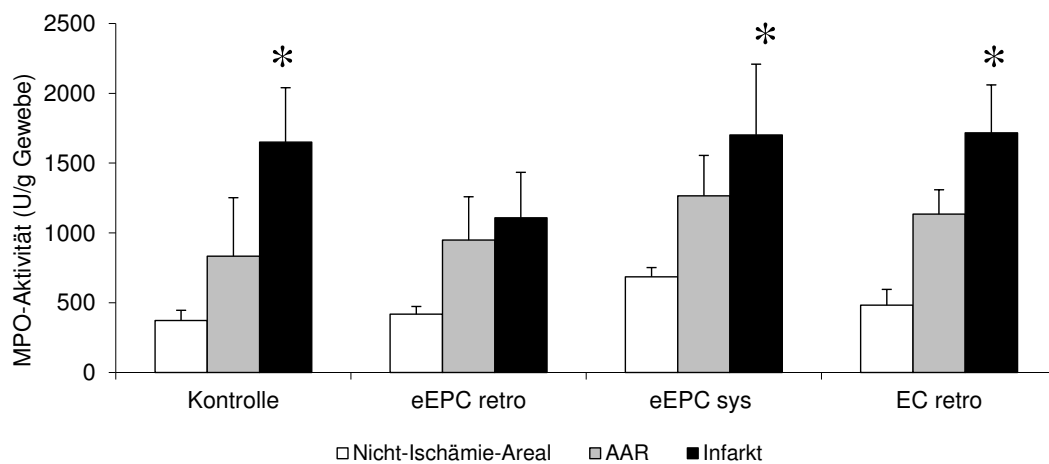


Abbildung 14: MPO-Aktivität Tag 7

Myeloperoxidase-Aktivität nach 7 Tagen Reperfusion im nicht-ischämischen, AAR und Infarkt-Gebiet nach Retroinfusion (eEPC retro) und systemischer Infusion (eEPC sys) von eEPCs, oder Retroinfusion von ECs (* $P < 0.01$ vs. nicht-ischämischen Gebiet)

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine durch eEPCs vermittelte Kardioprotektion für Kardiomyozyten direkt während einer Hypoxie und Reoxygenierung *in vitro* besteht. Tatsächlich gelang es mittels eEPCs, die zuvor mit Hilfe einer semipermeablen Membran separiert wurden, das Überleben von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach einer Stunde Hypoxie und einer Stunde Reoxygenierung statistisch signifikant zu erhöhen (Abb. 15). Die eEPC-vermittelte, schützende Wirkung trat rasch, circa 1 Stunde nach Reoxygenierung auf. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine posttranslationale Aktivierung von „survival“ Signalen, wie zum Beispiel dem Pi3-Kinase/AKT-Signalweg handelt.

Es ließ sich nachweisen, dass eine Inaktivierung der PI3-Kinase durch Wortmannin oder der AKT durch SH-5 die Kardioprotektion abschwächte. Dies war auch der Fall, wenn das Wortmannin nur den

Kardiomyozyten hinzugegeben wurde. Die selektive Inhibierung der eEPCs mit Wortmannin hingegen, zeigte keinen signifikanten Effekt. Erwähnt werden muss, dass in diesem in vitro Versuch, dem es an Immunzellen fehlt, neonatale ECs auch einen kardioprotektiven Effekt bewirkten.

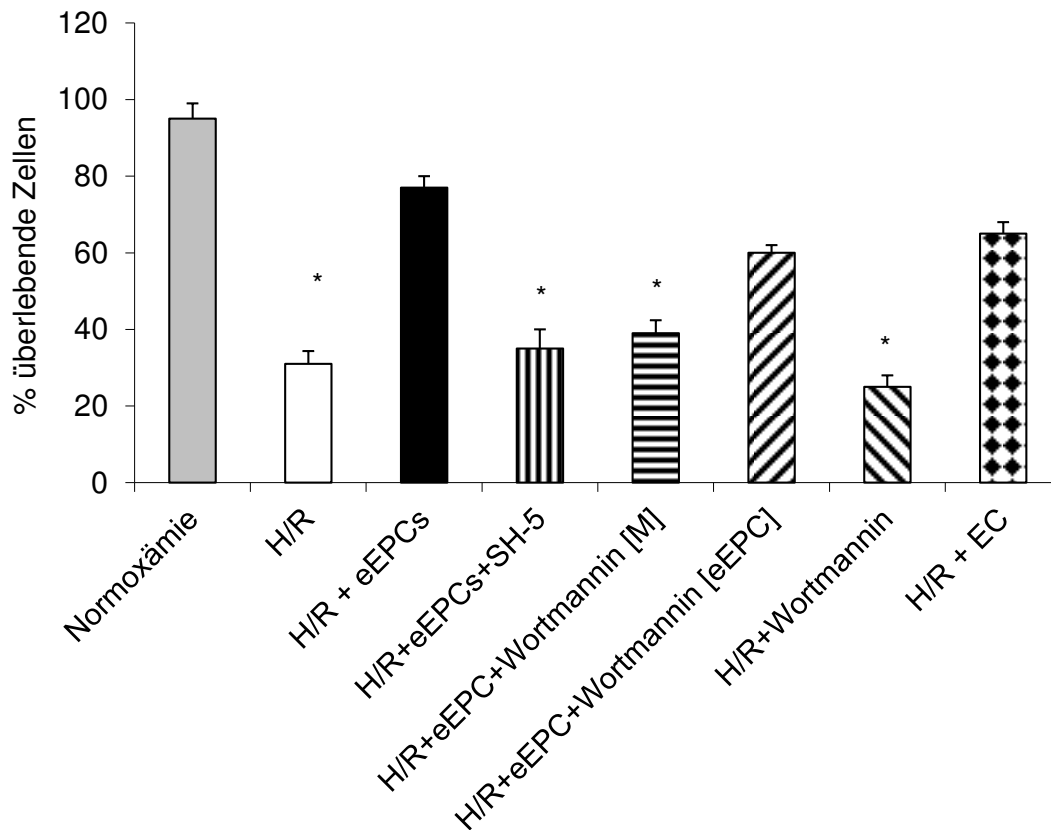


Abbildung 15: Zellüberleben

Überleben von neonatalen ventrikulären Ratten-Kardiomyozyten (quantifiziert mit Tryptan-Blau-Ausschluss) nach 5 Stunden Normoxämie, 4 Stunden Hypoxie und 1 Stunde Reoxygenierung (H/R) mit oder ohne Platten die eEPCs oder ECs tragen. Der AKT-Inhibitor SH-5 (10 $\mu\text{mol/l}$) und der PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin (1 $\mu\text{mol/l}$) wurden entweder den ECs (SH-5; Wortmannin [M]) oder den eEPCs (Wortmannin [eEPC]) für 30 min. hinzugefügt und nach Hypoxie entfernt (n=4 unabhängiges Experiment mit frisch isolierten Kardiomyozyten; * $P < 0.05$ vs. Normoxämie, Hypoxie/Reoxygenierung (H/R) + eEPC, H/R + EC und H/R + Wortmannin [eEPC]).

Um nun zu evaluieren, ob die eEPC-vermittelte Kardioprotektion in vivo von der PI3-Kinase/AKT-Signalkaskade abhängig ist, wurden die eEPCs mit Wortmannin zusammen appliziert. Gewebeproben die nach 24-stündiger Reperfusionzeit gewonnen wurden, deuteten auf Erhöhung von phosphorylierter AKT nach Retroinfusion im Infarktgebiet hin. Diese Wirkung konnte ebenfalls mittels Wortmannin abgeschwächt beziehungsweise aufgehoben werden (Abb. 16 & 17). Umgekehrt hemmte die eEPC Retroinfusion den Leukozyten-Einstrom und eine Erhöhung der TUNEL-positiven Zellen. Diese vorteilhaften Effekte verschwanden, wenn Wortmannin verabreicht wurde (Abb. 18 A & B).

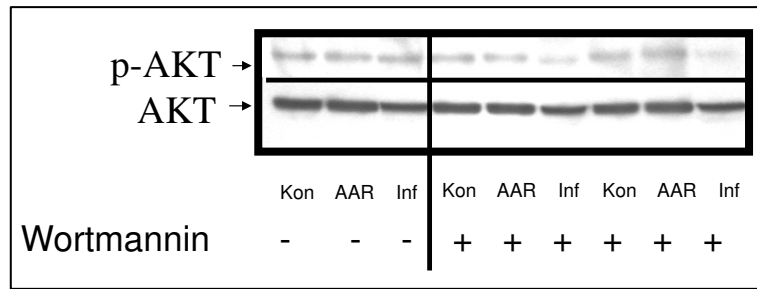


Abbildung 16: Immunoblotting p-AKT-1 & AKT-1

Immunoblotting von p-AKT-1 und AKT-1 nach eEPC Retroinfusion mit oder ohne gleichzeitiger Gabe von Wortmannin (20 µg/kg).

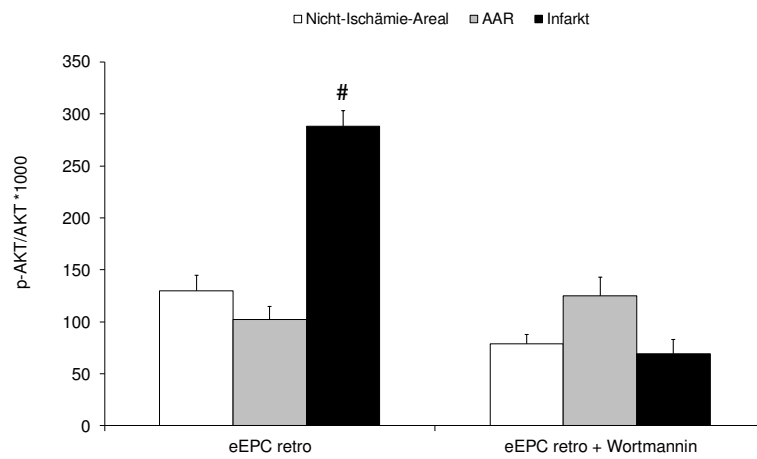
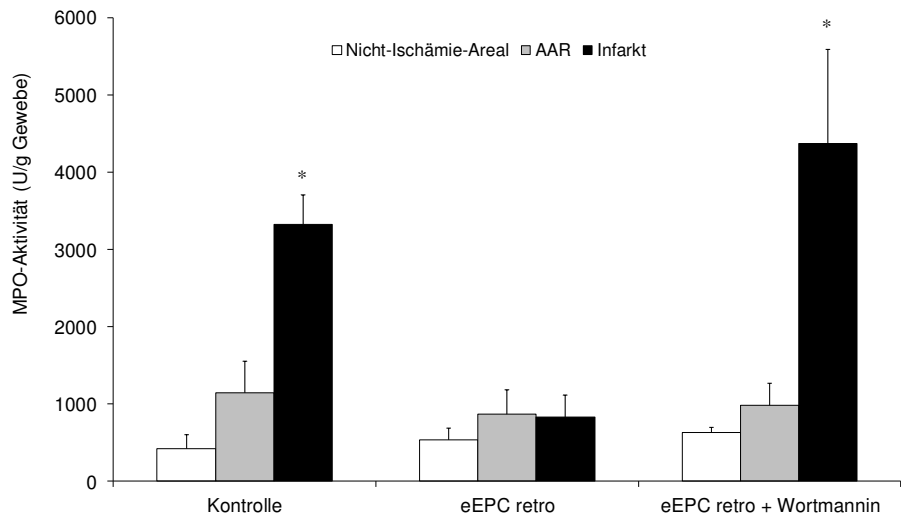
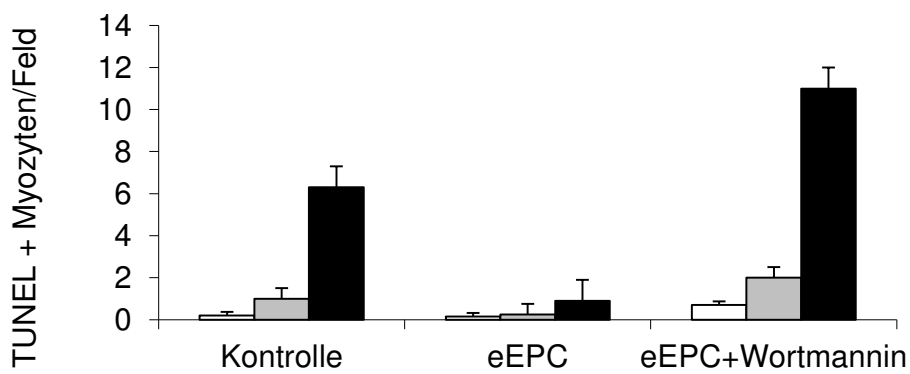


Abbildung 17: Dosimetrie p-AKT/AKT

Densitometrie p-AKT/AKT im nicht-ischämischen, AAR und infarzierten Gewebe von 4 Experimenten (# $P < 0.05$ vs. nicht-ischämisches Areal)



A



B

Abbildung 18: MPO-Aktivität

A, 24 h Myeloperoxidase-Aktivität und TUNEL-positive Zellen (B) pro Feld (ergänzende Abb. 19) im Kontroll-Experiment oder nach eEPC Retroinfusion mit oder ohne Wortmannin (* $P < 0,01$ vs. nicht-ischämisches Areal)

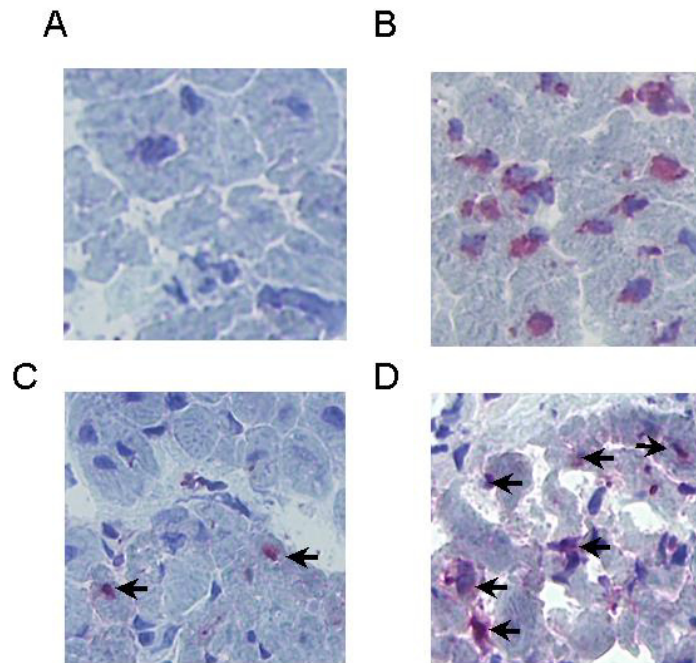
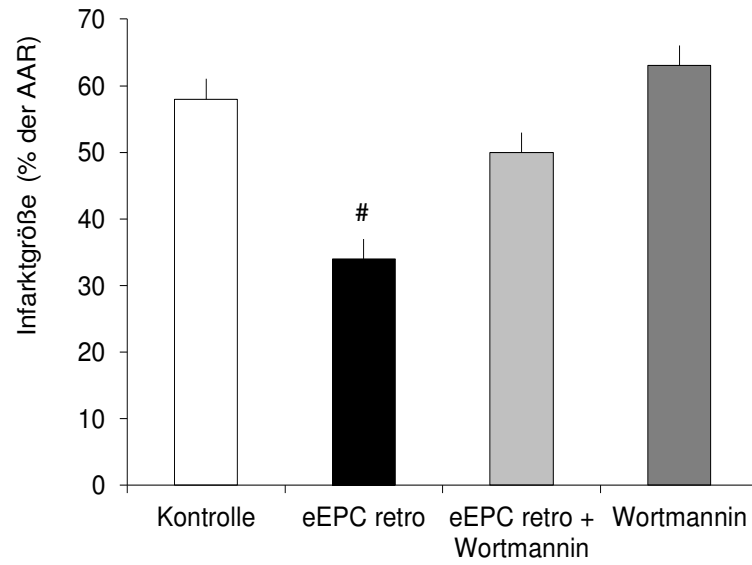


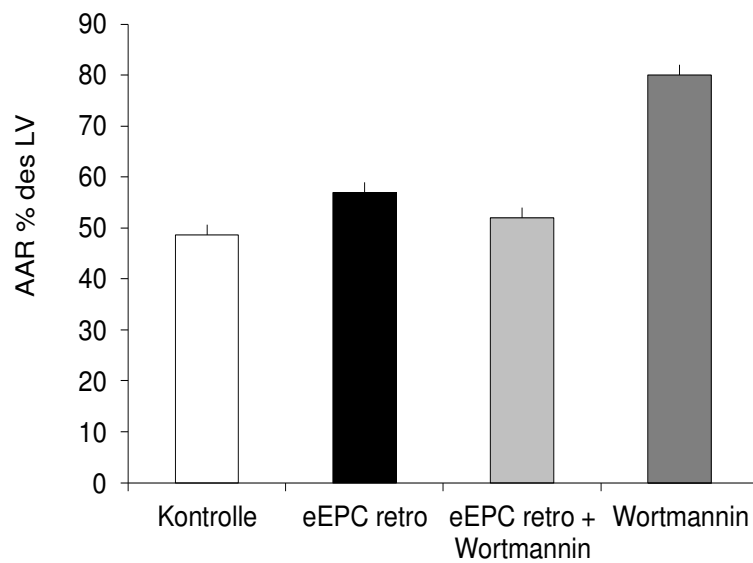
Abbildung 19: MPO-Aktivität/TUNEL-positive Zellen

Ergänzende Abbildung 24 h nach eEPC Retroinfusion: Myeloperoxidase-Aktivität mit (B) und ohne (A) Wortmannin; TUNEL-positive Zellen pro Feld mit (D) oder ohne (C) Wortmannin

Es bleibt hervorzuheben, dass die frühe Infarktreaktion (24 h) durch eEPC Retroinfusion durch Wortmannin unterdrückt wird (Abb. 20 A), was darauf schließen lässt, dass die Signalkaskade mittels PI3-Kinase/AKT durch eEPCs vermittelt wird. Die Größe des Ischämie-Risiko-Areals/LV unterschied sich nicht signifikant in den Gruppen (Abb.20 B).



A



B

Abbildung 20: Infarktgröße + AAR/LV

A, Infarktgröße (% des AAR) 24 h nach Ischämie und Retroinfusion von 5×10^6 eEPCs mit oder ohne Retroinfusion von Wortmannin. B, AAR/LV keine signifikante Unterscheidung in den Gruppen (n=4; # $P < 0.05$ vs. Kontrollgruppe).

4. Diskussion

In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Retroinfusion von embryonalen endothelialen Progenitorzellen einen kardioprotektiven Effekt im postischämischen Schweine-Myokard bewirkt. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass eEPCs bevorzugt in ischämisches Myokard⁸⁴ rekrutiert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass es nach selektiver, druckregulierter Retroinfusion zu einer gesteigerten Rekrutierung von eEPCs im Ischämiegebiet kommt. Bei der systemischen, intravenösen Gabe gelang dies hingegen nur unzureichend. Nur die druckregulierte, retrograde Gabe einer definierten Menge von eEPCs (5×10^6) zeigte eine gesteigerte kardioprotektive Wirkung in Bezug auf die Infarktgröße und die regionale Myokardfunktion. Der Ansatz der Retroinfusion bewirkte eine Abschwächung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens sieben Tage nach Ischämie.

Die Funktion der transfundierten Progenitor (Vorläufer)-zellen ist essentiell für diese Wirkung. Neonatale koronare Endothelzellen (ECs) hatten nachweislich keinen kardioprotektiven Effekt. Die Steigerung der Kapillardichte könnte einer der potentiellen Mechanismen dahinter sein. Wobei die Neovaskularisation in dieser frühen Phase des Reperfusionsschadens vernachlässigbar scheint. Führend ist hierbei der frühe Schutz des Myokards durch eine verminderte Inflammation, vermittelt durch die PI3-Kinase/AKT Signalkaskade. Dieser Signalweg scheint einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben der Kardiomyozyten zu haben. Die eEPCs sind in der Lage, via humoraler Mediatoren, einen schnellen Schutz gegenüber dem Zelltod von Kardiomyozyten auszuüben. Dieser parakrine Effekt konnte mit vitalen Herzmuskelzellen, die in einem Nährmedium mit einer durchlässigen Membran untersucht wurden, belegt werden. Die Tatsache, dass die kardioprotektive Wirkung über die trennende Membran hinweg stattfand, unterstützt diese These. Dies legt frühe posttranslationale Effekte nahe. Ein Faktor, der das Myozyten-Überleben bewirken könnte, ist die PI3-Kinase/AKT Signalkaskade.^{99, 100} Dieser Signalweg ist von besonderer Bedeutung, da humorale Aktivatoren, wie der insulin-like-growth factor-1,⁹⁹ der leukemia-inhibitory factor¹⁰¹ und Thymosin- β 4¹⁰² in hohem Maße in eEPCs exprimiert werden (3,3-fach, 4-fach und 7,1-fach der durchschnittlichen Expressierung; Affymetrix Chip Analyse). Durch die in vitro Anwendung von Inhibitoren wie Wortmannin und SH-5 konnte nachgewiesen werden, dass die PI3-Kinase/ AKT das Überleben von Kardiomyozyten erhöht. In vivo war dieses „Überlebens-Signal“ nach 24 Stunden Reperfusion voll aktiv und effektiv. Es senkte die Inflammation und die Kardiomyozyten-Apoptose.¹⁰³ Beides sind Faktoren, die den Ischämie-/ Reperfusionsschaden beeinflussen.

Hervorzuheben ist, dass die Versuchstiere von einer xenogenen Transplantation von murinen eEPCs profitierten, aber nicht von neonatalen Ratten Koronar-Endothel-Zellen. Zuvor veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe um Kupatt deuten darauf hin, dass murine eEPCs in diesem allogenen Setting immunprivilegiert sind, da bei ihnen eine mangelhafte Expression von MHC I vorliegt und sie resistent gegen aktivierte natürliche Killerzellen sind.⁸¹

Der initiale Vorgang der Zell-Rekrutierung in das postischämische Herz wurde zunächst für adulte Progenitorzellen beschrieben. Dieser Vorgang beruht hauptsächlich auf spezifischen Adhensionsmolekülen¹⁰⁴, β_2 -Integrinen¹⁰⁵ und den Chemokinen wie der „stromal cell derived factor 1“ (SDF-1)¹⁰⁶. Die eEPC Rekrutierung im ischämischen Myokard erfolgt im Schweine-Ischämie-Modell konstant. Für den Prozess des „Homing“ von eEPCs in Tumorgewebe wurde beschrieben, dass daran Liganden für P-Selektin und E-Selektin, die auf der eEPC-Oberfläche exprimiert werden, beteiligt sind.⁸¹ Ähnlich zum Maus-Modell⁸⁴ blockiert Fucoidin ein unspezifischer Selektin-Antagonist, die Rekrutierung in das postischämische Myokard. Die Selektin vermittelte Rekrutierung von eEPCs⁸³ weist dabei eine starke Ähnlichkeit zum Homing von Leukozyten auf. Die Leukozyten-Rekrutierung tritt vornehmlich im venösen Gefäßsystem¹⁰⁷ auf, worauf die gewählte Methode der Retroinfusion in die anteriore interventrikuläre Vene (AIV) abzielt.

4.1 Art und Auswahl der Versuchstierspezies

Primäres Ziel der Auswahl der Spezies ist es, dass sich die Ergebnisse gut auf den Menschen übertragen lassen müssen. Zunächst wurden Hunde in der Forschung als Versuchstiere genutzt. Im Verlauf etablierten sich dann Schweine als geeignetere Versuchstiere.^{108, 109} Die Anatomie des Schweines und des Menschen ist sich sehr ähnlich. Sie teilen sich wichtige Aspekte der Anatomie und Physiologie. Beide weisen zum Beispiel eine große Ähnlichkeit im Zellstoffwechsel und in der Entwicklung von Atherosklerose auf. Schweine und Menschen besitzen eine vergleichbar hohe Ruhefrequenz und Koronarperfusion, sowie ein identisches Erregungsleitungssystem. Das Herzgewicht, bezogen auf das Körpergewicht, ist im Verhältnis identisch groß. Das Schwein verfügt gegenüber dem Hund, ähnlich dem Menschen, über ein koronares Dreigefäßsystem. Dabei weisen die Koronargefäße sowohl im Verlauf als auch in der Entwicklung eine starke Ähnlichkeit auf.¹⁰⁹ Ebenso verhält es sich mit dem epikardialen Kollateralensystem, dass bei beiden Spezies nur schlecht ausgeprägt ist. Den akuten Verschluss eines Koronargefäßes tolerieren beide Spezies daher nur schlecht. Die Kollateralisierung hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Überleben und die Myokard-Funktionsfähigkeit während eines Infarktes oder beispielsweise der regionalen Ischämie-Modelle. Hunde hingegen besitzen ein ausgeprägtes epikardiales System an Kollateralen und können eine akute Ischämie besser kompensieren.¹⁰⁸ Während beim Menschen und beim Schwein der koronare Restfluss nach einem kompletten Verschluss des Koronargefäßes ungefähr 0,5% beträgt, so ist dieser beim Hund ungefähr 16%.^{108, 110} Dies bedingt auch, dass der transmurale Infarkt beim Schwein klar begrenzt ist, wohingegen er beim Hund unregelmäßig begrenzt ist.¹¹¹ Im porcinen Modell treten Myokardnekrosen nach ungefähr einer bis eineinhalb Stunden auf. Beim carninen Modell kann dies drei bis 6 Stunden dauern.¹¹¹¹¹² Damit scheinen die humane und porcine Ischämie besser miteinander vergleichbar zu sein und auch eine

größere Sicherheit in der Reproduzierbarkeit der Versuche zu geben. Neben den anatomischen, sowie physiologischen Vorteilen des Schweineherzens, sprechen auch monetäre und ethische Gründe für die Auswahl des Schweins als Versuchstier. Im Vergleich zu Hunden oder sogar Affen verursachen Schweine geringere Kosten. Als Versuchstier scheinen sie weniger moralisch bedenklich als etwa Primaten. Zuletzt bietet das Großtiermodell mit Schweinen aufgrund seiner identischen Größenverhältnisse auch die regulären Interventionsmöglichkeiten, analog zum Menschen beziehungsweise Patienten.

Zur Klärung der Fragestellungen wurde aus oben genannten Gründen und Vorteilen das in-vivo-Schweinmodell gewählt.

4.2 Auswirkung der Ischämie/ Reperfusion auf zellulärer Ebene

Die Kardiomyozyten sterben nach einem Gefäßverschluss aufgrund von Hypoxie und Ermangelung an neuen Substraten.^{4, 24, 25} Weiterer Schaden droht ihnen nach einer Wiedereröffnung des Gefäßes in der Reperfusion.^{26-29, 29} Der Zelltod von Kardiomyozyten ist der Hauptgrund für Herzversagen, Arrhythmien und Tod bei Patienten, die einen ST-Streckenhebungs-Infarkt erleiden. Bei einer Ischämie kommt die Atmungskette der Zellen schnell zum Erliegen, die ATP-Spiegel sinken rasch ab und verursachen eine Kontraktur der Muskulatur.^{29, 32} Weiter sammeln sich Metabolite der anaeroben Glykolyse an, die zu einer intrazellulären Azidose führen.^{4, 29} Setzt nun die Reperfusion ein, so kommt es zu einer raschen Verfügbarkeit von ATP, einer Anreicherung von freien Sauerstoff-Radikalen und zum Ausgleich des intrazellulären pH.¹¹³

Eine geschädigte Zellintegrität führt zu einem unkontrollierten Einstrom von Calcium, was zur Hyperkontraktilität führt. Bereits dieser Vorgang allein kann den Kardiomyozyten-Tod verursachen. Die mitochondriale „permeability transition pore“ (PTP) spielt hierbei eine wichtige Rolle.³² Sie bleibt während der Ischämie zunächst verschlossen und öffnet sich dann in der Reperfusionsphase aufgrund des unkontrolliert einströmenden Calciums und des oxydativen Stresses. Dies führt zu einer Schädigung der Mitochondrien, mit der Folge mangelnder ATP-Produktion und letztendlich zum Zelltod.²⁵ Nach aktuellem Stand scheint der Großteil des Zelltodes in den ersten Minuten der Reperfusion vom Öffnungszustand der „permeability transition pores“ abhängig zu sein.⁴⁸ Zellen, die unabhängig von der mitochondrialen Atmungskette sind, wie zum Beispiel Endothelzellen, besitzen eine weitaus größere Ischämietoleranz.¹¹⁴ Apoptosemechanismen spielen in dieser Phase beim Zelltod der Kardiomyozyten keine, beziehungsweise nur eine untergeordnete Rolle. In murinen Studien, in denen die Caspasen „ausgeschaltet“ wurden, ließ sich keine Veränderung der Infarktgröße nachweisen.¹¹⁵ Der Reperfusionsschaden kann durch eine ischämische Postkonditionierung deutlich reduziert werden. Hierbei handelt es sich um ein ähnliches Konzept, wie bei

der ischämischen Präkonditionierung. Der kurze intermittierende Verschluss des Koronargefäßes nach einer Ischämie kann das Myokard gegen den Reperfusionsschaden schützen. Sie aktiviert die RISK-Signalkaskade⁴⁹ und verhindert die Öffnung der PTP in der mitochondrialen Membran.^{32, 116} Das Sterben von Kardiomyozyten wird abgeschwächt, beziehungsweise verhindert.¹¹⁷ Der RISK-Pathway wurde 2002 von der Arbeitsgruppe um Yellon vorgestellt. Die RISK-Signalkaskade beinhaltet „Überlebens“-Proteinkinasen wie die AKT und Erk1/2. Ihre Aktivierung reduziert nachweislich die Infarktgröße zu Beginn der Reperfusion.¹⁰⁰ Viele dieser Studien, die die RISK-Signalkaskade für den kardioprotektiven Effekt verantwortlich machen, fanden an Nagetieren statt. Neuere Studien legen jedoch nahe, dass der RISK-Pathway bei größeren Tieren nicht an einer Kardioprotektion beteiligt ist.¹¹⁸ Es scheint also einen Unterschied zwischen den Spezies betreffend der Signalkaskaden in der Reperusionsphase zu geben. Lecour et al. beschrieben 2002, dass TNF- α unabhängig vom RISK-Pathway eine Kardioprotektion zu Beginn der Reperfusion vermittelt.^{119, 120} Sie entdeckten einen alternativen Signalweg, den sie SAFE-Pathway nannten. TNF- α bindet dabei an den TNF- α Rezeptor Typ 2, der die Janus-Kinase (JAK) aktiviert. Einige Studien konnten zeigen, dass eine medikamentöse Therapie, zum Beispiel mit Melatonin, den SAFE-Pathway aktiviert.¹²¹ Sowohl die beiden Kinasen AKT und Erk1/2 im RISK-Signalweg, als auch der RISK und SAFE-Signalweg scheinen miteinander vernetzt zu sein.¹²² Blockiert man eine der beiden Kinasen, so wird die andere aktiviert. Beide Wege haben die gleiche Zielstruktur, beide inhibieren die Öffnung der PTP und wirken so kardioprotektiv.¹²³ Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine Studien, die die direkte Einflussnahme auf den RISK/SAFE-Pathway mit dem Ziel einer Kardioprotektion untersucht haben. Es gibt aber pharmakologische Studien mit Substanzen, von denen man weiß, dass sie mit den beiden Signalkaskaden interagieren. Darunter Statine, das atriale natriuretische Peptid und Erythropoetin.^{124, 125}

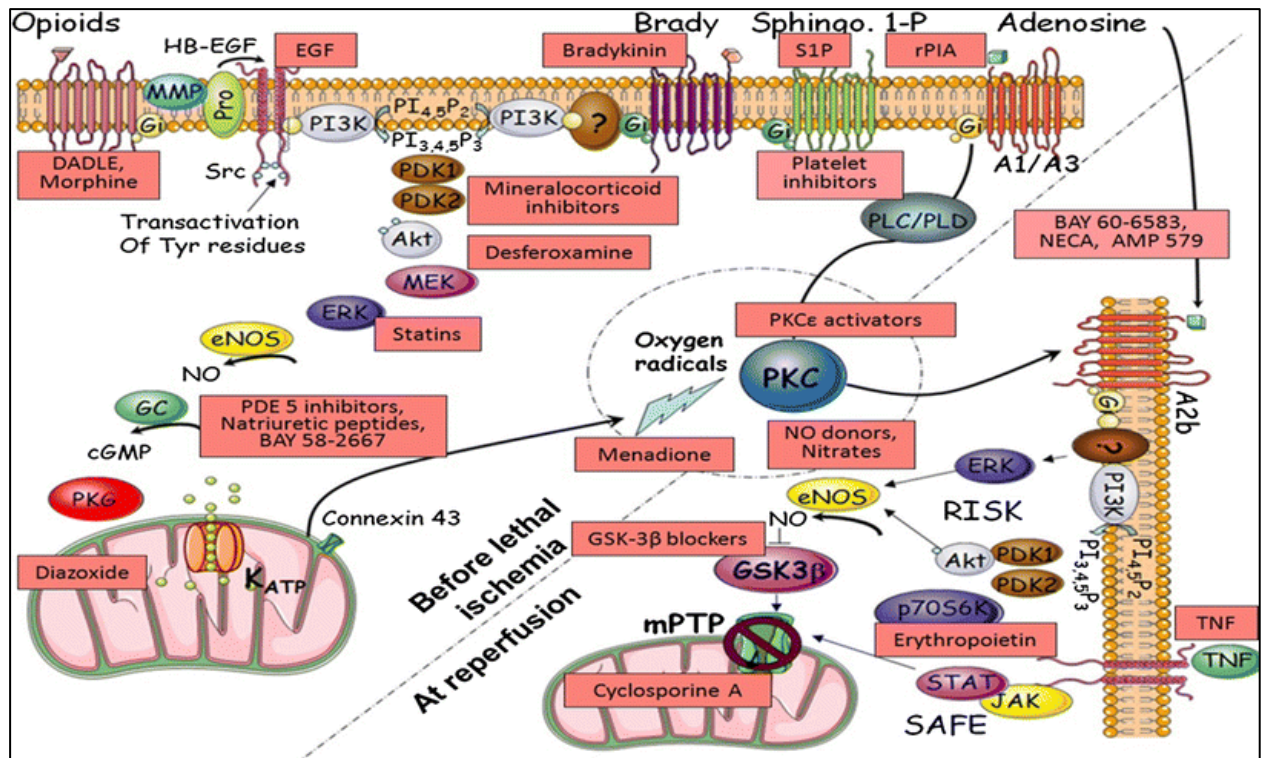


Abbildung 21: RISK- und SAFE-Pathway

Abbildung aus Basic research in cardiology (Hausenloy 2016)⁴⁸

4.3 Zellbasierte Therapie

Die zellbasierte Therapie bedeutet eine neue und einzigartige Chance in der Therapie des akuten Myokardinfarktes.¹²⁶ Ergebnisse aus Großtierversuchen, die einen signifikanten Benefit der Therapie bei Myokardinfarkt zeigten,^{127, 128} führten letztendlich zu klinischen Studien mit Stammzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt. Unterschieden werden muss hier zwischen den Zellen, die durch Signale aus dem Knochenmark mobilisiert werden, und den Zellen die aus Knochenmark oder Blut isoliert und dann verabreicht werden. Regenerative Funktion nach einem Myokardinfarkt haben neben mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen auch diverse andere Knochenmarkszellen. Zu erwähnen sind hier die Zellen der Side Population und multipotente adulte Vorläuferzellen. Endotheliale Vorläuferzellen sind mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark. Sie exprimieren sowohl hämatopoetische, als auch Endothelzellmarker. Die benötigten Vorläuferzellen können mittels Leukapherese aus dem peripheren Blut extrahiert werden. Sie können, nachdem sie drei Tage mit Wachstumsfaktoren kultiviert wurden, isoliert werden. Die Charakterisierung der Vorläuferzellen gelingt mittels spezifischer Oberflächenstrukturen, CD-Marker. Zur Therapie stehen unterschiedliche Zelllinien, beziehungsweise Stamm- und Progenitorzellen zur Verfügung. Sie unterscheiden sich durch ihre CD-Oberflächenmarker. Die EPC, die nach dem

Oberflächenmarker CD34 klassifiziert wird, bewirkt eine Neovaskularisation und Regeneration von Gewebe.¹²⁹ Der Neovaskularisations-Effekt konnte in einer klinischen Studie mit Patienten mit therapierefraktärer Angina pectoris (AP) nachgewiesen werden. Hier wurden die CD34⁺ EPCs appliziert und führten zu einer deutlicheren Verbesserung und Rückgang der AP-Beschwerden.¹³⁰ Die CD34⁺ EPCs zum Beispiel werden nach einem Myokardinfarkt vermehrt vom Knochenmark in das Blut abgegeben. Erstmals wurden von Ashara 1997 zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen im menschlichen Blut entdeckt.⁵⁸ Die Daten aus der Tierversuchsstudie von Quyyumi 2011 mit CD34⁺ Zellen legen nahe, dass die regenerative Wirkung nach einem Myokardinfarkt von der Menge und Mobilität der Zellen abhängig ist.¹³¹ Diese Ergebnisse führten zu einer klinischen Studie von Quyyumi 2017 (PreSERVE-AMI), welche die Wirkung und Sicherheit einer autologen Gabe von CD34⁺ Knochenmarkszellen untersuchte. Diese bisher größte Studie, mit einer zellbasierten Therapie bei ST-Hebungsinfarkten in den USA, deutet auf eine große Sicherheit und Effektivität der Therapie hin.¹³²

Endotheliale Vorläuferzellen besitzen die Fähigkeit, sich in Kardiomyozyten zu differenzieren.¹³³ Durch Applikation des Stammzellfaktors (SCF) oder des Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) können primitive Knochenmarkszellen aus dem Knochenmark mobilisiert werden. Bei diesen Stammzellen kommt es dann zum „Homing“ und sie wandern in das ischämische Myokard ein.⁵⁸ Hier nisten sie sich ein, was auch als „Engraftment“ der Zellen bezeichnet wird. Dass Stammzellen aus dem Knochenmark in geschädigtes Gewebe wandern und dort die Heilung positiv unterstützen, wurde erstmals schon 1985 von Ledney beschrieben.¹³⁴ Die Knochenmarkszellen proliferieren und differenzieren im Infarktareal und führen dann zu einer bedingten Regeneration der Myokardiozyten.¹³⁵ In tierexperimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, dass der Granulozyten Kolonie-stimulierende Faktor auch direkt auf den PI3-Kinase/AKT-Signalweg wirkt.^{136, 137} Andere Studien konnten diesen Effekt nur bedingt¹³⁸ oder gar nicht¹³⁹ nachweisen. In vielen klinischen Studien mit G-CSF-Gabe nach Ischämie, beziehungsweise Myokardinfarkt, gibt es unterschiedliche und diskussionswürdige Ergebnisse. So beschreiben Engelmann et al. eine signifikant verbesserte myokardiale Perfusion im Infarktareal nach G-CSF-Applikation.¹⁴⁰ Dagegen kann Ripa keinen Vorteil durch diese Therapie feststellen.¹⁴¹ Wie diese Studie, weisen auch diverse andere Untersuchungen auf einen möglicherweise parakrinen zytokinvermittelten Effekt hin.^{102, 142} Die Zytokine scheinen dabei einen positiven Einfluss auf die Inflammation, Apoptose und Neovaskularisation zu haben. Interleukin von mononukleären Zellen kann im murinen Modell die Infarktgröße reduzieren.¹⁴³ Hinkel et al. konnten in vitro und in vivo nachweisen, dass es eine eindeutige parakrine Wirkung von eEPCs zum Beispiel durch Thymosin β 4 auf Kardiomyozyten gibt.¹⁰²

4.4 Art der Stammzellgabe

Insgesamt gibt es diverse Methoden, Stammzellen im therapeutischen Ansatz zu transplantieren. Die Applikationsart ist, neben einer hohen Konzentration von Zellen im Zielgewebe, eine entscheidende Voraussetzung für den Erfolg der Gewebeheilung. Ziel muss auch sein, dass nur wenige Zellen in andere Organe abwandern. Unabhängig von der Applikationsart nimmt die Lunge schnell eine substantielle Menge von eEPCs auf, die aber wieder in den Kreislauf eintreten und in das Ischämiegebiet wandern können⁸¹. Im Gegensatz dazu, spiegeln die großen Mengen an Markern, die in den Nieren gefunden wurden, nur die Elimination von ^{99m}Tc wieder, welches von den eEPCs aller Gruppen abgegeben wurde. Zu diesem Zeitpunkt konnte in keinem anderen Organ einer größeren Menge eEPCs nachgewiesen werden. Wie durch Boekstegers et al. gezeigt werden konnte, ist die selektive druckregulierte Retroinfusion eine sehr erfolgreiche gezielte regionale Applikationsmethode.⁸⁵ Die Methode, die Zellen gezielt durch eine arterielle oder venöse intrakoronare Kathetertechnik an den Ort der Schädigung zu bringen, scheint aktuell der erfolgreichste Weg zu sein. Die Selektin vermittelte Rekrutierung von eEPCs⁸³ ins ischämische Myokard weist dabei eine starke Ähnlichkeit zum „Homing“ von Leukozyten auf, das vornehmlich im venösen Gefäßsystem¹⁰⁷ auftritt. Hierauf zielt die gewählte Methode der Retroinfusion in die anteriore interventrikuläre Vene (AIV) ab. Das Infarktareal kann so schnell, effizient und in ausreichender Konzentration mit den „transplantierten“ Zellen angereichert werden.¹⁴⁴ Insgesamt scheint die venöse Applikation der arteriellen überlegen zu sein. Da Patienten, die einen Myokardinfarkt erlitten haben, an einer koronaren Herzerkrankung leiden, ist von einem geschädigten Endothel auszugehen. Somit könnte die Aufnahme von Medikamenten und das Einnisten (Engraftment) von Stammzellen beeinträchtigt und erfolglos sein. Das venöse Koronarsystem hingegen ist in der Regel unbeeinträchtigt und weist keine Stenosen auf. Durch den Katheter mit einer Ballonokklusion wird hier auch ein zu schneller Abfluss der applizierten Substanzen verhindert.

Es gibt weitere Methoden die Stammzellen an den Ort des Schadens zu bringen. Der Ansatz der transendokardialen, beziehungsweise transperikardialen Applikation war bereits in Modellen am Schwein und Menschen erfolgreich, beinhaltet aber ein sehr hohes Risiko einer Verletzung.¹⁴⁵ Der direkte Kontakt zum Myokard bringt in dieser vulnerablen Phase das Risiko von Arrhythmien mit sich.¹⁴⁶ Auch ein Kombinationsverfahren scheint sinnvoll zu sein. In der MYSTAR-Studie konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte intrakoronare und intramyokardiale Gabe eine signifikante Verbesserung der Myokardfunktion bewirkt.¹⁴⁷

Ein schonenderes Verfahren mit minimaler Invasivität stellt die systemische intravenöse Gabe dar. Der Versuch die Zellen venös zu applizieren scheint aber, wie in dieser Arbeit nachgewiesen, nicht erfolgreich zu sein. Die systemische Gabe bewirkt wahrscheinlich aufgrund der relativen kleinen Menge an eEPCs keine suffiziente Kardioprotektion. Die systemisch verabreichte Menge von 5×10^6 eEPCs pro Versuch ist

nicht ausreichend. Sie stellt eine hundertfach niedrigere Zellkonzentration dar, als sie benötigt werden würde, um einen kardioprotektiven Effekt in Mäusen zu entfalten⁸⁴. Wie durch diese Arbeit belegt ist, reicherten sich nach venöser Applikation nur 0,5% der gesamt verabreichten Radioaktivität im ischämischen Myokard an. Die infundierten Stammzellen unterliegen einem hohen First-Pass-Effekt, da sie zunächst die Lunge passieren. Diese Arbeit konnte zeigen, dass es zu einer extrem hohen Rekrutierung von eEPCs in der Lunge kommt. Diese hohe Menge an transfundierten Zellen hätte aufgrund der pulmonalen Sequestrierung ein ungeahntes Risiko. Auch konnte nachgewiesen werden, dass sich die Zellen in anderen Organen wie zum Beispiel der Niere anreichern. Dieser Effekt beruht allerdings auf einer vorwiegend renalen Elimination. Des Weiteren fließen nach systemischer Gabe nur rund 3% des HZV durch das infarzierte Areal des linken Ventrikels.

Eine letzte, in der aktuellen Literatur beschriebene Möglichkeit der Applikation stellt die Injektion am offenen Herzen während einer Operation dar. Hierbei ließ sich auch eine deutliche Verbesserung der myokardialen Funktion nachweisen.¹⁴⁸

4.5 Zeitpunkt der Stammzellgabe

Der Reperfusionsschaden betrifft sowohl das Gefäßsystem, als auch das Myokard. Hier könnte ein Ansatz für eine zellbasierte Therapie mit Progenitorzellen liegen. In der aktuellen Literatur wird beschrieben, dass die späte Stammzellgabe der frühen Gabe überlegen zu sein scheint. In einer randomisierten Studie von Janssens et al. konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass eine frühe Applikation von Knochenmarkszellen innerhalb von 24h nach Infarkt keinen eindeutigen Benefit brachte.¹⁴⁹ Als eine mögliche Ursache hierfür wird das interstitielle Ödem in der frühen Phase nach Reperfusion verantwortlich gemacht. In diversen Publikationen wird der optimale Zeitpunkt für die Applikation von Stammzellen mit 5-7 Tagen nach einem Ischämie-Ereignis angegeben.¹⁴⁴ Dies wird mit den optimaleren Gewebebedingungen begründet. Pathophysiologisch kommt es, wie unter 1.3 dargelegt, in der Reperfusionphase zu einer ausgeprägten Inflammation und oxidativem Stress. Dieses Milieu scheint das „Homing“ der Stammzellen zu behindern¹⁵⁰ und ein limitierender Faktor für eine klinische Anwendung zu sein.¹⁴⁶ Auch scheint möglich, dass die Ähnlichkeit zwischen eEPCs und Entzündungszellen zu einer Aggravierung der Inflammation führt.

Von Assmus et al. konnte 2004 in der TOPCARE-AMI-Studie nachgewiesen werden, dass es nach regionaler Gabe von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen sieben Tage post-Infarkt zu einer signifikanten Verbesserung der myokardialen Funktion kam. Dieser positive Effekt ließ sich auch in einer 4-Monats-Kontrolle bestätigen. In der REPAIR-AMI Studie von 2004 konnten Schachinger et al. zeigen,

dass Patienten die nach einem Myokardinfarkt intrakoronar Knochenmarksstammzellen erhielten, eine deutliche bessere linksventrikuläre Pumpfunktion aufwiesen, als die Patienten der Kontrollgruppe. Die Therapie war am erfolgreichsten, wenn die Zellen an Tag 5-7 appliziert wurden.^{150, 151} Es gibt allerdings auch Studien (ASTAMI), die keinen Benefit im Sinne Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion nach einer Stammzellgabe nachweisen konnten.¹⁵² Insgesamt konnten unzählige Metaanalysen einer Stammzelltherapie bei Myokardinfarkt einen positiven Effekt nachweisen. Als positiver Effekt wird hierbei eine Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion/ Ejektionsfraktion (LVEF), eine Reduktion der Infarktgröße und Remodeling angesehen.¹⁵³⁻¹⁵⁶

In dieser Arbeit wird jedoch postuliert, dass vor allem die frühe Applikation von embryonalen endothelialen Progenitorzellen einen signifikanten Benefit hat. Die verzögerte Zelltherapie von mehr als drei Tagen nach einer Ischämie scheint ungünstig. In diesem Zeitraum finden im Infarkt-Areal nur noch Prozesse der Angiogenese, der Reparatur und des Remodeling der Herzmuskulatur statt.¹⁵⁷ Die Verhinderung von akuten Schäden an Zelle, Endothel oder Apoptose ist dadurch unmöglich. Sie lassen sich durch die späte eEPC-Gabe nicht rückgängig machen. In der frühen Phase der Reperfusion sollen aber möglichst potentiell gefährdete Myozyten geschützt werden. Dies können die adulten Stammzellen jedoch nicht leisten.¹⁵⁸

Die eEPCs besitzen gegenüber den adulten Vorläuferzellen keine phänotypische Ähnlichkeit mit den inflammatorischen Zellen.¹⁰² In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die frühe Gabe von eEPCs den auftretenden Ischämie-/ Reperfusionsschaden signifikant verringern kann.

4.6 Limitationen der Stammzelltherapie

Zunächst sind Komplikationen durch die Intervention selbst denkbar, die jede perkutane Koronarangioplastie mit sich bringt. Es kann zu Herzrhythmusstörungen, Infektion, Blutung oder Verletzung von wichtigen anatomischen Strukturen kommen. Die koronararterielle oder koronarvenöse Applikation selbst kann zu Mikrothrombosen von Kapillaren durch eEPCs bis hin zum fulminanten Gefäßverschluss durch einen Thrombus führen. Folgen wären dann ein verhinderter venöser Abfluss oder Re-Infarkt durch den Gefäßverschluss. Auch eine Ruptur der anterioren interventrikulären Vene, oder schlimmer des arteriellen Koronargefäßes, wäre in diesem Bereich gravierend. Die intramyokardiale Applikation von Stammzellen beinhaltet zum Beispiel das Risiko einer Myokardverletzung bis hin zur Ventrikelruptur. Metaanalysen zeigten jedoch kein erhöhtes Risiko für Re-Stenosen, Re-Infarkte oder Herzrhythmusstörungen nach Stammzelltherapie.^{153, 155}

Als entscheidene Kontraindikationen für eine Stammzelltherapie bei Myokardinfarkt gelten solide Malignomerkrankungen, Knochenmarkserkrankungen aber auch Infektionserkrankungen. Bei einer Tumorerkrankung, könnte das verstärkte „Homing“ von Progenitorzellen in den Tumor^{81, 83} unvorhersehbare Folgen haben. Auch eine schwerwiegende Infektionserkrankung wie HIV, Hepatitis oder Tuberkulose sollte im Vorfeld einer Therapie diagnostisch ausgeschlossen werden. Die Dauer bis zu einem validen negativen TBC-Test oder auch anderer Infektionserkrankungen kann eine frühe Therapie verzögern beziehungsweise vollständig verhindern.

5. Zusammenfassung

Die Myokardischämie stellt eine der führenden Todesursachen weltweit dar.¹ Neben der essentiell wichtigen Anpassung der Lebensgewohnheiten und Bekämpfung der Risikofaktoren, senken die allgemein anerkannten, konventionellen Interventionsmöglichkeiten die Mortalität der Myokardischämie. Bis jetzt kann der akute Myokardinfarkt nur mittels systemischer Thrombolyse oder auch der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie erfolgreich therapiert werden.

Ziel dieser Forschungsarbeit war es, den kardioprotektiven Effekt von retrograd venös-infundierten eEPCs nachzuweisen und damit eine Grundlage für weitere therapeutische Strategien zur Heilung der Myokardischämie zu schaffen. Die Idee der Applikation von embryonalen endothelialen Progenitorzellen stellt dabei einen vollkommen neuen Therapieansatz dar. Embryonale endotheliale Vorläuferzellen (eEPCs) vermitteln eine Kardioprotektion nach einem Ischämie-/ Reperfusionsschaden, wenn das eEPC-„Homing“ durch die selektive Retroinfusion verstärkt wurde. Die Retroinfusion von eEPCs bewirkte nachweislich eine deutliche Reduktion der Infarktgröße und signifikante Verbesserung der regionalen Myokardfunktion. Für diesen frühen kardioprotektiven Effekt kann die eEPC-vermittelte Stimulation der PI3-Kinase/AKT Signalkaskade in Empfängerzellen durch Abschwächung von Inflammation und Apoptose verantwortlich gemacht werden. Da bei den verabreichten eEPCs eine mangelhafte Expression von MCH I-Komplex vorliegt, sie resistent gegen natürliche Killerzellen und dadurch immunprivilegiert sind, entziehen sie sich einer Abstoßungsreaktion. Eine Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten scheint in diesem neuen Therapieansatz somit nicht notwendig. Sollte es gelingen humane eEPCs zu kultivieren und zu applizieren, so ist hier keine Abstoßungsreaktion zu erwarten.

Zu bedenken ist, dass die zellbasierte Therapie mit autologen Zellen nach einem Ischämie-Ereignis nicht sofort zur Verfügung steht. Die Zellen müssen zunächst zeitlich aufwändig isoliert und kultiviert werden, bevor sie dem Patienten appliziert werden können.

Wenn die zuvor genannten Limitationen, wie zum Beispiel solide Tumorerkrankungen, beachtet werden, scheint es nach jetzigem Kenntnisstand keine weiteren Einschränkungen für die Anwendung der retrograden Stammzell-Therapie zu geben.

Die Reichhaltigkeit und die spezifische kardioprotektive Wirkung der kultivierten eEPCs stellen einen neuen, attraktiven und zukunftssträchtigen Therapieansatz zur Behandlung der akuten Myokardischämie dar.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PI3-Kinase/AKT Signalkaskade	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lage der implantierten Kristalle und der Messung	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Position der Sonomikrometrie-Kristalle	17
Abbildung 4: Ausschnitt LAD nach Ballon-Okklusion.	19
Abbildung 5: Versuchsaufbau 7 Tage Reperfusion	20
Abbildung 6: Versuchsaufbau 24 h Reperfusion	21
Abbildung 7: Versuchsende Tag 1 oder 7	22
Abbildung 8: Aufnahme von ^{99m} Tc-markierten eEPCs	27
Abbildung 9: Aufnahme von ^{99m} Tc-markierten eEPCs	28
Abbildung 10: Immunhistochemische Detektion von eEPCs	29
Abbildung 11: Infarktgröße 7 d	30
Abbildung 12: AAR/LV	31
Abbildung 13: SES	31
Abbildung 14: MPO-Aktivität Tag 7	32
Abbildung 15: Zellüberleben	33
Abbildung 16: Immunoblotting p-AKT-1 & AKT-1	34
Abbildung 17: Dosimetrie p-AKT/AKT	34
Abbildung 18: MPO-Aktivität	35
Abbildung 19: MPO-Aktivität/TUNEL-positive Zellen	36
Abbildung 20: Infarktgröße + AAR/LV	37
Abbildung 21: RISK- und SAFE-Pathway	42

Formelverzeichnis

Formel 1: Kristallabstand	14
Formel 2: Segmentverkürzung	15

Abkürzungsverzeichnis

A	AAR	Area at risk
	Abb.	Abbildung
	ACS	Acute coronary syndrome
	AIV	Anteriore interventrikuläre Vene
	AKT	= Proteinkinase B
	ANP	Atriales natriuretisches Peptid
	ANOVA	Analysis of variance
	AP	Angina pectoris
	ATM	Atmosphären
	ATP	Adenosintriphosphat
B	BGA	Blutgasanalyse
C	CAD	Coronary artery disease
	cGMP	Cyclisches Guanylmorphosphat
	CHD	Coronary heart disease
	CVDs	Cardiovascular diseases
E	ECs	Endothelial cells
	eEPCs	Embryonic endothelial progenitor cells
	EKG	Elektrokardiogramm
	eNOS	Endotheliale Synthase
G	G	Gauge
	G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktor
H	H/R	Hypoxie/Reoxygenierung
	HZV	Herz-Zeit-Volumen
I	ICF	Institut für chirurgische Forschung
	ID	Innendurchmesser
	i.m.	intramuskulär
	i.v.	intravenös
K	KHK	Koronare Herzerkrankung
L	LAD	Left anterior descending
	LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	MHC	Major histocompatibility complex
	MPO	Myeloperoxidase
N	NO	Stickstoffmonoxid
	NSTEMI	Non- ST-segment-elevation-myocardial-infarction
P	PDK1	Phosphoinositide-dependent Kinase-1
	PGI2	Prostazyklin
	PI3-kinase/AKT	Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT
	PTCA	Perkutane Transluminale Coronarangioplastie
	PTP	Permeability transition pore
R	RCA	Right coronary artery
	RCx	Ramus circumflexus
	RTK	Rezeptor-Thyrosinkinase
S	SC	Stem cells
	SCF	Stammzellfaktor
	SDF-1	Stromal cell derived factor 1
	SES	Subendocardial segment shortening
	SH-5	AKT Inhibitor
	SPSS	Analyse- und Statistik-Software
	SS	Segment-Verkürzung oder Segment shortening
	SSR	System der selektiven druckregulierten Retroinfusion

	STEMI	ST-segment-elevation-myocardial-infarction
T	TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
	TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
V	VEGF	Vascular endothelial growth factor
	V. jug.ext	Vena jugularis externa
W	WHO	World health organisation

Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs); 2017 [cited 2017 Jan 15]. Available from: URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
2. Bundesamt S. Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2014 [cited 2017 Jan 15].
3. Damm K, Runge C, Zeymer U, Graf von der Schulenburg J-M. Krankheitskosten des akuten Koronarsyndroms in Deutschland. *Kardiologie* 2011; 5(2):122–8.
4. Riede U-N, editor. Allgemeine und spezielle Pathologie: 168 Tabellen. 5., komplett überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2004. Available from: URL:<http://ebooks.thieme.de/9783136833056&page=1>.
5. Herold G. *Innere Medizin* 2010; 2009.
6. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK - Langfassung, 4. Auflage. Version 1 [cited 2017 Jan 17].
7. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: A historical perspective. *The Lancet* 2014; 383(9921):999–1008.
8. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1994; 16(12):901–6.
9. Wolinsky H. A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circulation Research* 1980; 47(3):301–11.
10. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England journal of medicine* 1990; 323(1):27–36.
11. P R. Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *Journal für Kardiologie* [cited 2017 Jan 18]; 2002.
12. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology* 2007; 7(9):678–89.
13. Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity* 2014; 41(5):694–707.
14. Rajashekhar G, Willuweit A, Patterson CE, Sun P, Hilbig A, Breier G et al. Continuous endothelial cell activation increases angiogenesis: evidence for the direct role of endothelium linking angiogenesis and inflammation. *Journal of vascular research* 2006; 43(2):193–204.
15. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333(6174):664–6.

16. Munzel T. Endotheliale Dysfunktion: Pathophysiologie, Diagnostik und prognostische Bedeutung. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946) 2008 [cited 2017 Jan 18]; 133(47):2465–70.
17. Yang Z, Ming X-F. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clinical medicine & research* 2006; 4(1):53–65.
18. Aktories K, Forth W, Förstermann U. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*. 9., völlig überarb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2005.
19. Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 1992; 267(21):14519–22.
20. Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC et al. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *The Journal of clinical investigation* 1998; 101(6):1225–32.
21. Leyen HE von der, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92(4):1137–41.
22. Cayatte AJ, Palacino JJ, Horten K, Cohen RA. Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology* 1994; 14(5):753–9.
23. Arnal JF, Yamin J, Dockery S, Harrison DG. Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. *The American journal of physiology* 1994; 267(5 Pt 1):C1381-8.
24. Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature reviews. Cardiology* 2014; 11(5):255–65.
25. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine* 2007; 357(11):1121–35.
26. Simoons ML, Serruys PW, van den Brand M, Res J, Verheugt FW, Krauss XH et al. Early thrombolysis in acute myocardial infarction: limitation of infarct size and improved survival. *Journal of the American College of Cardiology* 1986; 7(4):717–28.
27. White HD, Norris RM, Brown MA, Takayama M, Maslowski A, Bass NM et al. Effect of intravenous streptokinase on left ventricular function and early survival after acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 1987; 317(14):850–5.

28. Sheehan FH, Doerr R, Schmidt WG, Bolson EL, Uebis R, Essen R von et al. Early recovery of left ventricular function after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: an important determinant of survival. *Journal of the American College of Cardiology* 1988; 12(2):289–300.
29. Lee JA, Allen DG. Mechanisms of acute ischemic contractile failure of the heart. Role of intracellular calcium. *The Journal of clinical investigation* 1991; 88(2):361–7.
30. Ferrari R. The role of mitochondria in ischemic heart disease. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1996; 28 Suppl 1:S1-10.
31. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Archives of pathology* 1960; 70:68–78.
32. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2003; 35(4):339–41.
33. Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R, Brown GC. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2003; 35(4):357–66.
34. Ravindran S, Kurian GA. The role of secretory phospholipases as therapeutic targets for the treatment of myocardial ischemia reperfusion injury. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2017; 92:7–16.
35. Verma S, Fedak PWM, Weisel RD, Butany J, Rao V, Maitland A et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 105(20):2332–6.
36. Hoffmann R, Haager P, Lepper W, Franke A, Hanrath P. Relation of coronary flow pattern to myocardial blush grade in patients with first acute myocardial infarction. *Heart (British Cardiac Society)* 2003; 89(10):1147–51.
37. Ito H. No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* 2006; 3(9):499–506.
38. Fernandez-Jimenez R, Garcia-Prieto J, Sanchez-Gonzalez J, Agüero J, Lopez-Martin GJ, Galan-Arriola C et al. Pathophysiology Underlying the Bimodal Edema Phenomenon After Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 66(7):816–28.
39. Ladilov YV, Siegmund B, Balsler C, Piper HM. Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circulation Research* 1997; 80(1):69–75.
40. Meissner A, Morgan JP. Contractile dysfunction and abnormal Ca²⁺ modulation during postischemic reperfusion in rat heart. *The American journal of physiology* 1995; 268(1 Pt 2):H100-11.

41. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovascular research* 1998; 38(2):291–300.
42. Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *The Journal of biological chemistry* 1988; 263(3):1353–7.
43. Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology international* 1999; 49(2):91–102.
44. Xu Y, Huo Y, Toufektsian M-C, Ramos SI, Ma Y, Tejani AD et al. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2006; 290(2):H692-9.
45. Frangogiannis N. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular research* 2002; 53(1):31–47.
46. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95(2):320–3.
47. Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL. Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* 1998; 97(22):2259–67.
48. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Botker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic research in cardiology* 2016; 111(6):70.
49. Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin. *Antioxidants & redox signaling* 2011; 14(5):893–907.
50. Brehm M, Darrelmann E, Strauer BE. Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt. *Internist*; 49(9):1068–78. Available from: URL:<http://link.springer.com.898.emedia1.bsb-muenchen.de/content/pdf/10.1007%2Fs00108-008-2079-y.pdf>.
51. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006; 441(7097):1068–74.
52. Denker H-W. Stem cell terminology and 'synthetic' embryos: a new debate on totipotency, omnipotency, and pluripotency and how it relates to recent experimental data. *Cells, tissues, organs* 2014; 199(4):221–7.
53. Wang L, Du Y, Ward JM, Shimbo T, Lackford B, Zheng X et al. INO80 facilitates pluripotency gene activation in embryonic stem cell self-renewal, reprogramming, and blastocyst development. *Cell stem cell* 2014; 14(5):575–91.

54. Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V et al. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Molecular reproduction and development* 2006; 73(3):298–305.
55. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)* 1998; 282(5391):1145–7.
56. Shroff G, Dhanda Titus J, Shroff R. A review of the emerging potential therapy for neurological disorders: human embryonic stem cell therapy. *American journal of stem cells* 2017; 6(1):1–12.
57. Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restorative neurology and neuroscience* 2010; 28(4):589–603.
58. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 1997; 275(5302):964–7.
59. Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008; 28(2):208–16.
60. Dawn B, Zuba-Surma EK, Abdel-Latif A, Tiwari S, Bolli R. Cardiac stem cell therapy for myocardial regeneration. A clinical perspective. *Minerva cardioangiologica* 2005; 53(6):549–64.
61. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation* 2001; 108(3):407–14.
62. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003; 23(7):1185–9.
63. Boos CJ, Goon PKY, Lip GYH. Circulating endothelial progenitor cells. *The New England journal of medicine* 2005; 353(24):2613-6; author reply 2613-6.
64. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103(5):634–7.
65. Xu S, Zhu J, Yu L, Fu G. Endothelial progenitor cells: current development of their paracrine factors in cardiovascular therapy. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2012; 59(4):387–96.
66. Yang Z, Ballmoos MW von, Faessler D, Voelzmann J, Ortmann J, Diehm N et al. Paracrine factors secreted by endothelial progenitor cells prevent oxidative stress-induced apoptosis of mature endothelial cells. *Atherosclerosis* 2010; 211(1):103–9.
67. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine* 2003; 348(7):593–600.

68. Murasawa S, Kawamoto A, Horii M, Nakamori S, Asahara T. Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005; 25(7):1388–94.
69. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106(15):1913–8.
70. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet (London, England)* 2004; 364(9429):141–8.
71. Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Schachinger V, Lehmann R et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2011; 100(10):925–34.
72. Frangogiannis NG, Youker KA, Rossen RD, Gwechenberger M, Lindsey MH, Mendoza LH et al. Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1998; 30(12):2567–76.
73. Kupatt C, Hinkel R, Vachenaer R, Horstkotte J, Raake P, Sandner T et al. VEGF165 transfection decreases postischemic NF-kappa B-dependent myocardial reperfusion injury in vivo: role of eNOS phosphorylation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003; 17(6):705–7.
74. Xie Y, Qi Y, Zhang Y, Chen J, Wu T, Gu Y. Regulation of angiogenic factors by the PI3K/Akt pathway in A549 lung cancer cells under hypoxic conditions. *Oncology letters* 2017; 13(5):2909–14.
75. Ruan G-X, Kazlauskas A. VEGF-A engages at least three tyrosine kinases to activate PI3K/Akt. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 2012; 11(11):2047–8.
76. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2(7):489–501.
77. Cao S, Chen C, Xue J, Huang Y, Yang X, Ling K. Silencing of type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase suppresses ovarian cancer cell proliferation, migration and invasion. *Oncology reports* 2017.
78. Aoki M, Fujishita T. Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis. *Current topics in microbiology and immunology* 2017.
79. Rodgers SJ, Ferguson D, Mitchell C, Ooms L. Regulation of PI3K effector signalling in cancer by the phosphoinositide phosphatases. *Bioscience reports* 2017.

80. Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development (Cambridge, England)* 1998; 125(8):1457–68.
81. Wei J, Blum S, Unger M, Jarmy G, Lamparter M, Geishauser A et al. Embryonic endothelial progenitor cells armed with a suicide gene target hypoxic lung metastases after intravenous delivery. *Cancer cell* 2004; 5(5):477–88.
82. Fandrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M et al. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nature medicine* 2002; 8(2):171–8.
83. Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B et al. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *The Journal of experimental medicine* 2003; 197(12):1755–65.
84. Kupatt C, Horstkotte J, Vlastos GA, Pfosser A, Lebherz C, Semisch M et al. Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005; 19(11):1576–8.
85. Boekstegers P, Diebold J, Weiss C. Selective ECG synchronised suction and retroinfusion of coronary veins: first results of studies in acute myocardial ischaemia in dogs. *Cardiovascular research* 1990; 24(6):456–64.
86. Boekstegers P, Peter W, Degenfeld G von, Nienaber CA, Abend M, Rehders TC et al. Preservation of regional myocardial function and myocardial oxygen tension during acute ischemia in pigs: comparison of selective synchronized suction and retroinfusion of coronary veins to synchronized coronary venous retroperfusion. *Journal of the American College of Cardiology* 1994; 23(2):459–69.
87. Degenfeld G von, Giehl W, Boekstegers P. Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion. *Cardiovascular research* 1997; 35(2):233–40.
88. Krumm P, Zitzelsberger T, Weinmann M, Mangold S, Rath D, Nikolaou K et al. Cardiac MRI left ventricular global function index and quantitative late gadolinium enhancement in unrecognized myocardial infarction. *European journal of radiology* 2017; 92:11–6.
89. Bugge-Asperheim B, Leraand S, Kiil F. Local dimensional changes of the myocardium measured by ultrasonic technique. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 1969; 24(4):361–71.

90. Mayer S. Therapeutische Neovaskularisation: Regionale Überexpression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase führt zu einem funktionell relevanten Gefäßwachstum im hibernierenden Schweinemyokard; 2012. Available from: URL:<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-151819>.
91. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *The American journal of pathology* 1985; 121(3):522–30.
92. Ladilov YV, Balsler C, Piper HM. Protection of Rat Cardiomyocytes Against Simulated Ischemia and Reoxygenation by Treatment With Protein Kinase C Activator. *Circulation Research* 1998; 82(4):451–7.
93. Belhassen L. Endothelial Nitric Oxide Synthase Targeting to Caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271(37):22810–4.
94. Kupatt C, Hinkel R, Lamparter M, Bruhl M-L von, Pohl T, Horstkotte J et al. Retroinfusion of embryonic endothelial progenitor cells attenuates ischemia-reperfusion injury in pigs: role of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase. *Circulation* 2005; 112(9 Suppl):I117-22.
95. Deiß M. Die Bedeutung von akuter und subakuter endothelialer Aktivierung für den myokardialen Reperfusionsschaden; 2005. Available from: URL:<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-43283>.
96. Kupatt C, Wichels R, Deiss M, Molnar A, Lebherz C, Raake P et al. Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene therapy* 2002; 9(8):518–26.
97. Xia Y, Zweier JL. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. *Analytical biochemistry* 1997; 245(1):93–6.
98. Nasu T, Fukuda Y, Nagahira K, Kawashima H, Noguchi C, Nakanishi T. Fucoidin, a potent inhibitor of L-selectin function, reduces contact hypersensitivity reaction in mice. *Immunology letters* 1997; 59(1):47–51.
99. Matsui T, Li L, del M, Fukui Y, Franke TF, Hajjar RJ et al. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation* 1999; 100(23):2373–9.
100. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovascular research* 2004; 61(3):448–60.
101. Oh H, Fujio Y, Kunisada K, Hirota H, Matsui H, Kishimoto T et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase through glycoprotein 130 induces protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 1998; 273(16):9703–10.

102. Hinkel R, El-Aouni C, Olson T, Horstkotte J, Mayer S, Muller S et al. Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection. *Circulation* 2008; 117(17):2232–40.
103. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 2000; 101(6):660–7.
104. Biancone L, Cantaluppi V, Duo D, Deregibus MC, Torre C, Camussi G. Role of L-selectin in the vascular homing of peripheral blood-derived endothelial progenitor cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2004; 173(8):5268–74.
105. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107(8):1164–9.
106. Falco E de, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood* 2004; 104(12):3472–82.
107. Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *The Journal of clinical investigation* 1998; 102(8):1526–33.
108. Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovascular research* 1987; 21(10):737–46.
109. Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovascular research* 1986; 20(12):907–17.
110. Hughes GC, Post MJ, Simons M, Annex BH. Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 2003; 94(5):1689–701.
111. Warltier DC, Zyvoloski MG, Gross GJ, Brooks HL. Subendocardial versus transmural myocardial infarction: relationship to the collateral circulation in canine and porcine hearts. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 1982; 60(12):1700–6.
112. Wakida Y, Nordlander R, Kobayashi S, Kar S, Haendchen R, Corday E. Short-term synchronized retroperfusion before reperfusion reduces infarct size after prolonged ischemia in dogs. *Circulation* 1993; 88(5 Pt 1):2370–80.

113. Fernandez-Sanz C, Ruiz-Meana M, Castellano J, Miro-Casas E, Nunez E, Inserte J et al. Altered FoF1 ATP synthase and susceptibility to mitochondrial permeability transition pore during ischaemia and reperfusion in aging cardiomyocytes. *Thrombosis and haemostasis* 2015; 113(3):441–51.
114. Mankad PS, Amrani M, Rothery S, Severs NJ, Yacoub MH. Relative susceptibility of endothelium and myocardial cells to ischaemia-reperfusion injury. *Acta physiologica Scandinavica* 1997; 161(1):103–12.
115. Inserte J, Cardona M, Poncelas-Nozal M, Hernando V, Vilarrosa U, Aluja D et al. Studies on the role of apoptosis after transient myocardial ischemia: genetic deletion of the executioner caspases-3 and -7 does not limit infarct size and ventricular remodeling. *Basic research in cardiology* 2016; 111(2):18.
116. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: the Holy Grail of cardioprotection. *Basic research in cardiology* 2010; 105(2):151–4.
117. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2003; 285(2):H579-88.
118. Khalili H, Patel VG, Mayo HG, Lemos JA de, Brilakis ES, Banerjee S et al. Surrogate and clinical outcomes following ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of 15 randomized trials. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2014; 84(6):978–86.
119. Lecour S, Smith RM, Woodward B, Opie LH, Rochette L, Sack MN. Identification of a novel role for sphingolipid signaling in TNF alpha and ischemic preconditioning mediated cardioprotection. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2002; 34(5):509–18.
120. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B et al. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation* 2005; 112(25):3911–8.
121. Lamont KT, Somers S, Lacerda L, Opie LH, Lecour S. Is red wine a SAFE sip away from cardioprotection? Mechanisms involved in resveratrol- and melatonin-induced cardioprotection. *Journal of pineal research* 2011; 50(4):374–80.
122. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *Journal of molecular and cellular cardiology* 2009; 47(1):32–40.

123. Davidson SM, Hausenloy D, Duchon MR, Yellon DM. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2006; 38(3):414–9.
124. Ludman AJ, Hausenloy DJ, Babu G, Hasleton J, Venugopal V, Boston-Griffiths E et al. Failure to recapture cardioprotection with high-dose atorvastatin in coronary artery bypass surgery: a randomised controlled trial. *Basic research in cardiology* 2011; 106(6):1387–95.
125. Ludman AJ, Yellon DM, Hasleton J, Ariti C, Babu GG, Boston-Griffiths E et al. Effect of erythropoietin as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention: a randomised controlled clinical trial. *Heart (British Cardiac Society)* 2011; 97(19):1560–5.
126. Simari RD, Pepine CJ, Traverse JH, Henry TD, Bolli R, Spoon DB et al. Bone marrow mononuclear cell therapy for acute myocardial infarction: a perspective from the cardiovascular cell therapy research network. *Circulation Research* 2014; 114(10):1564–8.
127. Sanina C, Hare JM. Mesenchymal Stem Cells as a Biological Drug for Heart Disease: Where Are We With Cardiac Cell-Based Therapy? *Circulation Research* 2015; 117(3):229–33.
128. van der Spoel TIG, Jansen of Lorkeers SJ, Agostoni P, van Belle E, Gyongyosi M, Sluijter JPG et al. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovascular research* 2011; 91(4):649–58.
129. Sekiguchi H, Ii M, Losordo DW. The relative potency and safety of endothelial progenitor cells and unselected mononuclear cells for recovery from myocardial infarction and ischemia. *Journal of cellular physiology* 2009; 219(2):235–42.
130. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Sup Lee J, Costa MA, Bass T et al. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circulation Research* 2011; 109(4):428–36.
131. Quyyumi AA, Waller EK, Murrow J, Esteves F, Galt J, Oshinski J et al. CD34(+) cell infusion after ST elevation myocardial infarction is associated with improved perfusion and is dose dependent. *American heart journal* 2011; 161(1):98–105.
132. Quyyumi AA, Vasquez A, Kereiakes DJ, Klapholz M, Schaer GL, Abdel-Latif A et al. PreSERVE-AMI: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Intracoronary Administration of Autologous CD34+ Cells in Patients With Left Ventricular Dysfunction Post STEMI. *Circulation Research* 2017; 120(2):324–31.
133. Condorelli G, Borello U, Angelis L de, Latronico M, Sirabella D, Coletta M et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(19):10733–8.

134. Ledney GD, Stewart DA, Gruber DF, Gelston HM, JR, Exum ED, Sheehy PA. Hematopoietic colony-forming cells from mice after wound trauma. *The Journal of surgical research* 1985; 38(1):55–65.
135. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(18):10344–9.
136. Ince H, Nienaber CA. G-CSF and cardioprotection--deeper experimental insights. *Cardiovascular drugs and therapy* 2006; 20(3):155–6.
137. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatric transplantation* 2003; 7 Suppl 3:86–8.
138. Dawn B, Guo Y, Rezazadeh A, Huang Y, Stein AB, Hunt G et al. Postinfarct cytokine therapy regenerates cardiac tissue and improves left ventricular function. *Circulation Research* 2006; 98(8):1098–105.
139. Deten A, Volz HC, Clamors S, Leiblein S, Briest W, Marx G et al. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovascular research* 2005; 65(1):52–63.
140. Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger AE et al. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; 48(8):1712–21.
141. Ripa RS. Granulocyte-colony stimulating factor therapy to induce neovascularization in ischemic heart disease. *Danish medical journal* 2012; 59(3):B4411.
142. Mirotsoiu M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneccchi M, Noiseux N et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104(5):1643–8.
143. Burchfield JS, Iwasaki M, Koyanagi M, Urbich C, Rosenthal N, Zeiher AM et al. Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction. *Circulation Research* 2008; 103(2):203–11.
144. Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 2003; 107(7):929–34.
145. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour R et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; 41(10):1721–4.

146. Tompkins BA, Natsumeda M, Balkan W, Hare JM. What Is the Future of Cell-Based Therapy for Acute Myocardial Infarction. *Circulation Research* 2017; 120(2):252–5.
147. Gyongyosi M, Giurgea GA, Syeda B, Charwat S, Marzluf B, Mascherbauer J et al. Long-Term Outcome of Combined (Percutaneous Intramyocardial and Intracoronary) Application of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells Post Myocardial Infarction: The 5-Year MYSTAR Study. *PloS one* 2016; 11(10):e0164908.
148. Stamm C, Westphal B, Kleine H-D, Petzsch M, Kittner C, Klinge H et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet (London, England)* 2003; 361(9351):45–6.
149. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 2006; 367(9505):113–21.
150. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 44(8):1690–9.
151. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 2006; 355(12):1210–21.
152. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 2006; 355(12):1199–209.
153. Abdel-Latif A, Bolli R, Im Tleyjeh, Montori VM, Perin EC, Hornung CA et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Archives of internal medicine* 2007; 167(10):989–97.
154. Hristov M, Heussen N, Schober A, Weber C. Intracoronary infusion of autologous bone marrow cells and left ventricular function after acute myocardial infarction: a meta-analysis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2006; 10(3):727–33.
155. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; 50(18):1761–7.
156. Afzal MR, Samanta A, Shah ZI, Jeevanantham V, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK et al. Adult Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: Evidence and Insights From Randomized Controlled Trials. *Circulation Research* 2015; 117(6):558–75.

157. Itescu S, Kocher AA, Schuster MD. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function. *Heart failure reviews* 2003; 8(3):253–8.

158. Piper HM, Abdallah Y, Schafer C. The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovascular research* 2004; 61(3):365–71.

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Christian Kupatt meinen ausdrücklichen Dank dafür aussprechen, dass er mir die Chance gegeben hat, diese Promotion nach so langer Zeit erfolgreich abzuschließen. Ich möchte mich auch für die Möglichkeit bedanken, dass ich in seiner Forschungsgruppe tätig sein und wissenschaftliches Arbeiten erlernen durfte.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. med. vet. Rabea Hinkel für die Unterstützung sowie fachliche Betreuung in der experimentellen Phase danken.

Dank gilt auch allen Mitarbeitern der kardiologischen Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Boekstegers und Prof. Dr. Kupatt am Klinikum Großhadern.

Meiner besten Freundin Theresa danke ich dafür, dass sie die große Mühe auf sich genommen hat, diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Besonderer Dank gilt meinem Mitdoktoranden Stefan Mayer für die große Unterstützung und Freundschaft bis zum heutigen Tage.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Freundin für die Unterstützung und vor allem Geduld, die Sie für mich in der Zeit der Fertigstellung dieser Dissertation aufgebracht hat.

Eidesstattliche Versicherung

Müller, Sebastian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Kardioprotektives Potential von embryonalen endothelialen Stammzellen im akuten Ischämiemodell am Schweineherz

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01.07.2018

Ort, Datum

Sebastian Müller

Unterschrift Doktorandin/Doktorand